การกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 เพื่อเพิ่มการสร้างไนซิน

นางสาว มาลินี สิงห์โตทอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

MUTATION OF *Lactococcus lactis* STRAIN MF2 FOR ENHANCING NISIN PRODUCTION

Miss Marlinee Singtothong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Industrial Microbiology

Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 เพื่อเพิ่มการสร้างไนซิน
โดย	นางสาวมาลินี สิงห์โตทอง
ภาควิชา	จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเทพ ธนียวัน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน)

..... กรรมการ

(อาจารย์ ดร.ปาหนัน เรืองสำราญ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

มาลินี สิงห์โตทอง: การกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 เพื่อเพิ่มการสร้างไนซิน. (MUTATION OF *Lactococcus lactis* STRAIN MF2 FOR ENHANCING NISIN PRODUCTION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา, 99 หน้า.

Lactococcus lactis สายพันธุ์ MF2 เป็นแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากน้ำนมดิบ ซึ่งสามารถผลิตไนซินได้ โดยได้เลี้ยงแบคทีเรีย MF2 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร พบว่าชั่วโมงที่ 9 เป็นระยะกึ่งกลางทวีคูณซึ่งเป็นระยะเจริญที่เหมาะสมในการเป็นเชื้อเริ่มต้นปรับปรุงสายพันธุ์ ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ได้ทำการปรับปรุงสายพันธุ์โดยการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เป็นเวลา 60-80 วินาที จำนวน 3 รอบ ซึ่งให้ร้อยละการรอดอยู่ในช่วง 0.86–0.06 และกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 10-60 นาที ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จำนวน 3 รอบ ให้ร้อยละการรอดอยู่ในช่วง 23.75–1.75 พบว่าได้สายพันธุ์กลายขั้นตอนสุดท้าย คือ สายพันธุ์ MU_2NUN_2 1, MU_2NUN_2 2 และ MU_2NUN_2 3 ซึ่งมีปริมาณไนซินเท่ากับ 2,638.89, 2,265.45 และ 2,564.23 หน่วยต่อมิลลิลิตร สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ที่ผลิตไนซินได้เพียง 370.51 หน่วยต่อมิลลิลิตร ถึง 7 เท่า และมีแอกทิวิตีหลังจากถ่ายเชื้อ 5 ครั้งเท่ากับ 90.4, 87.24 และ 85.29% ตามลำดับ จากนั้นได้ศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไนซินของเชื้อสายพันธุ์กลาย MU_2NUN_2 1 ซึ่งสามารถผลิตไนซินได้มากที่สุดและมีแอกทิวิตีมากที่สุด พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย MU_2NUN_2 1 ในอาหาร MRS ที่มีการแปรผันน้ำตาลเป็นซูโครส 1.0% แต่คงชนิดและปริมาณของแหล่งของไนโตรเจนเดิมไว้ พบว่าสามารถผลิตไนซินได้สูงขึ้นเป็น 4,303.09 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงขึ้นกว่าเลี้ยงในอาหาร MRS สูตรเดิม ถึง 1.67 เท่า

ภาควิชา...จุลชีววิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....มาลินี สิงห์โตทอง.....

สาขาวิชา..จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม.. ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา.....2551.....

4872419023 : MAJOR INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

KEYWORDS: *Lactococcus lactis* / NISIN / MUTATION / UV / NTG

MARLINEE SINGTOTHONG : MUTATION OF *Lactococcus lactis* STRAIN MF2 FOR ENHANCING NISIN PRODUCTION. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUPAT CHAREONPORNWATTANA.Ph.D., 99 pp.

Lactococcus lactis MF2 isolated from raw milk was capable of producing nisin. The bacteria was grown in MRS medium at 30°C for 24 hours. Growth was measured as optical density at 600 nm and found that the 9th hour of incubation period is a mid-log phase that is suitable to be a starter for improving the strain. After 3 rounds of UV exposure at 254 nm for 60-80 sec and 3 rounds of 50 μg/ml NTG treatment for 10-60 min, the highest producing strains designated as MU_2NUN_2 1, MU_2NUN_2 2 and MU_2NUN_2 3 gave nisin activity of 2,638.89, 2,265.45 and 2,564.23 IU/ml respectively or a 7-fold increase more than original strain that was able to produce nisin only 370.51 IU/ml. The strains showed their stability of nisin production after 5 rounds of consecutive subculture by giving approximately activities of 90.4, 87.24 and 85.29%, respectively. MU_2NUN_2 1 was subjected to media optimization by using 1% sucrose in MRS medium. The result showed that MU_2NUN_2 1 was able to produce nisin up to 4,303.09 IU/ml or a 1.67-fold increase.

Department:.....Microbiology..... Student's Signature:.Marlinee Singtothong

Field of Study:...Industrial..Microbiology... Advisor's Signature:.....

Academic Year:.....2008.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างยิ่งของผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้ให้ความกรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่าง ๆ ทุกขั้นตอน ตลอดจนตรวจแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ ซึ่งผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. สุเทพ ธนียวัน ที่กรุณารับเป็นประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และคำแนะต่างๆ ที่ผู้วิจัยได้รับตลอดเวลาการศึกษา

รองศาสตราจารย์ จิราภรณ์ ธนียวัน และ อาจารย์ ดร. ปาหนัน เริงสำราญ ที่กรุณารับเป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และคำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย ตลอดจนช่วยตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาจุลชีววิทยาที่กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำต่าง ๆ แก่ผู้วิจัย และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ช่วยเหลือและเอื้ออำนวยความสะดวกตลอดระยะเวลาการศึกษา

ขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ทุกคนสำหรับคำแนะนำเกี่ยวกับงานวิจัย ขอบคุณสำหรับทุกความช่วยเหลือ และขอบคุณสำหรับทุกความห่วงใยและกำลังใจที่มีให้ตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัวทุกคนที่ให้การสนับสนุนและความช่วยเหลือตลอดจนให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยในการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอดจนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญภาพ ..... ฏ

บทที่

1. บทนำ 1
2. วารสารปริทัศน์ 4
   - 2.1 ไนซิน 8
   - 2.2 สายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตไนซิน 10
   - 2.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน 12
   - 2.4 กลไกการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน 13
   - 2.5 กระบวนการสังเคราะห์ไนซิน 14
   - 2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการผลิตไนซิน 18
   - 2.7 การประยุกต์ใช้ไนซินในอุตสาหกรรมอาหาร 23
   - 2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณไนซิน 24
   - 2.9 การกลายพันธุ์ 29
   - 2.10 การปรับปรุงสายพันธุ์ที่ผลิตไนซิน 37
3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินงานวิจัย..... 39
   - 3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 39
   - 3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย 40
   - 3.3 วิธีและขั้นตอนดำเนินงานวิจัย 42
     - 3.3.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 42
     - 3.3.2 การชักนำการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 42
     - 3.3.3 การชักนำการกลายพันธุ์ด้วย NTG 45

บทที่ หน้า

3.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยวิธีวัดความขุ่น 47
3.3.5 การทดสอบความเสถียรในการสร้างไนซินของสายพันธุ์กลาย 48
3.3.6 ศึกษาหาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย เพื่อการผลิตไนซิน 48
3.3.7 ศึกษาชนิดของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย เพื่อการผลิตไนซิน 49
4. ผลการทดลอง 50
4.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 50
4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต 51
4.2.1 การหาร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร 51
4.2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 1 52
4.2.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 2 53
4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG 55
4.3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NTG ในการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2 55
4.3.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของ NTG ในการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2 ด้วย NTG 56
4.3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 1 57
4.3.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 3 58
4.3.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 2 60
4.3.6 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 3 63
4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยวิธีวัดความขุ่น 66
4.4.1 กราฟมาตรฐานของไนซิน 66

บทที่ หน้า

4.4.2 การหาปริมาณไนซินของเชื้อสายพันธุ์กลายโดยวิธีวัดความขุ่น 67

4.4.3 การทดสอบความเสถียรในการผลิตไนซินของสายพันธุ์กลาย $MU_2NUN_2$1, $MU_2NUN_2$2 และ $MU_2NUN_2$3 68

4.5 การหาชนิดและปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2 69

4.5.1 ชนิดของแหล่งน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2 69

4.5.2 ปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2 71

4.6 การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2 73

5. สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง 76

รายการอ้างอิง 82

ภาคผนวก 89

ภาคผนวก ก 90

ภาคผนวก ข 92

ภาคผนวก ค 93

ภาคผนวก ง 97

ภาคผนวก จ 98

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ	6
2.2	แสดงแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ด้วยไนซิน	13
2.3	แสดงอิทธิพลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ของ *L. lactis* A164 ซึ่งผลิตไนซิน.....	19
2.4	อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไนซิน ของ *L. lactis* A164.....	20
2.5	อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไนซิน ของ *L. lactis* A164.....	21
2.6	แสดงเชื้อที่ใช้ทดสอบความไวต่อไนซิน.....	24
4.1	แสดงปริมาณไนซินของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 และสายพันธุ์กลายต่างๆ.....	67
4.2	แสดงปริมาณไนซินของสายพันธุ์กลาย MU2NUN$_2$1, MU$_2$NUN$_2$2 และ MU$_2$NUN$_2$3 ก่อนและหลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง.....	68
4.3	แสดงการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU$_2$NUN$_2$.....	70
4.4	แสดงการหาปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU$_2$NUN$_2$.....	72
4.5	แสดงการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU$_2$NUN$_2$.....	74
5.1	แสดงลำดับขั้นตอนในการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและ NTG ได้สายพันธุ์กลาย MU$_2$NUN$_2$	79
6.1	แสดงการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU$_2$NUN$_2$.....	93
6.2	แสดงการหาปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU$_2$NUN$_2$.....	94
6.3	แสดงการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU$_2$NUN$_2$.....	95

สารบัญภาพ

รูปที่		หน้า
2.1	โครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน A.....	9
2.2	โครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน Z.....	9
2.3	โครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน Q.....	10
2.4	ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ไนซิน การควบคุม และระบบภูมิคุ้มกันตัวเองจากไนซิน	14
2.5	แสดงกระบวนการสังเคราะห์ไนซินหลังการแปลรหัสของไนซิน.....	15
2.6	แสดงตำแหน่งของไนซินหลังการแปลรหัสบนเยื่อหุ้มเซลล์.....	16
2.7	แสดงแบบจำลองการทำ ELISA.....	28
2.8	แสดงการเกิดการกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟ	31
2.9	แสดงการซ่อมแซมโดยกระบวนการ SOS repair หรือ Recombination repair.....	35
2.10	แสดงโครงสร้างของ NTG.....	36
4.1	แสดงการเจริญของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร	50
4.2	แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่าง ๆ.....	51
4.3	แสดงการเกิดบริเวณใสของเชื้อสายพันธุ์ MU ที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตครั้งที่ 1.....	52

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่		หน้า
4.4	แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ.....	53
4.5	แสดงการเกิดบริเวณใสของเชื้อสายพันธุ์ MU_2 เทียบกับสายพันธุ์ MU.....	54
4.6	แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2 ที่ผ่านการบ่มร่วมกับสารเคมี NTG ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที.....	55
4.7	แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2 ที่กลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาต่างๆ	56
4.8	แสดงการเกิดบริเวณใสของเชื้อสายพันธุ์ MU_2N เทียบกับสายพันธุ์ MU_2.....	57
4.9	แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2N ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ	58
4.10	แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2N ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ.....	59
4.11	แสดงร้อยละการรอดของ MU_2NU ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้น 0–200 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที.....	60
4.12	แสดงร้อยละการรอดของ MU_2NUN ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาต่างๆ.....	61
4.13	แสดงการเกิดบริเวณใสของเชื้อสายพันธุ์ MU_2NUN เทียบกับสายพันธุ์ MU_2NU...	62
4.14	แสดงร้อยละการรอดของ MU_2NUN ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้น 0–200 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที.....	63
4.15	แสดงร้อยละการรอดของ MU_2NUN ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาต่างๆ.....	64
4.16	แสดงการเกิดบริเวณใสของเชื้อสายพันธุ์ MU_2NUN_2 เทียบกับสายพันธุ์ MU_2NUN	65
4.17	กราฟมาตรฐานของไนซิน โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร.....	66
4.18	กราฟมาตรฐานของไนซิน โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร.....	69

รูปที่ หน้า
4.19 แสดงชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2..... 70
4.20 กราฟมาตรฐานของไนซิน โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร..... 71
4.21 แสดงปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2..... 72
4.22 กราฟมาตรฐานของไนซิน โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร..... 73
4.23 แสดงชนิดของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2..... 75

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

การถนอมอาหารเป็นการเก็บรักษาอาหารไม่ให้เน่าเสีย โดยเป็นการยับยั้ง ทำลาย และลดปริมาณจุลินทรีย์ในอาหาร การถนอมอาหารมีหลายวิธี เช่น การใช้ความร้อน ความเย็น การทำให้แห้ง การใช้สารเคมี และการใช้รังสี เป็นต้น แต่วิธีการเหล่านี้มักประสบปัญหา ได้แก่ พบแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium sp*. หรือพบแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น *Listeria monocytogenes* นอกจากนี้ยังพบว่าสารเคมีที่ใส่ลงไปในอาหารเพื่อถนอมอาหารบางชนิด เช่น ไนเตรต มีผลข้างเคียงทำให้เป็นมะเร็งได้ (นงลักษณ์ และปรีชา, 2541)

การค้นพบแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะชนิดเพปไทด์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย ซึ่งมีสมบัติในการทำลายหรือยับยั้งแบคทีเรีย จึงนับว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการถนอมอาหาร เนื่องจากมีความปลอดภัย และสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ในช่วงกว้าง การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหาร ส่วนใหญ่จะเป็นการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการหมักเพื่อให้ผลิตแบคเทอริโอซิน ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวที่องค์การอนามัยโลก (WHO) อนุญาตให้ใช้ในรูปของสารบริสุทธิ์ โดยองค์การอนามัยโลกประกาศให้ใช้ไนซินบริสุทธิ์เติมลงในอาหารได้ไม่เกิน 3.3×10^6 IU ต่อกิโลกรัม (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ในช่วงกว้าง โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกทั้งที่สร้างและไม่สร้างสปอร์ ตัวอย่างเช่น Enterococci, Lactobacilli, Leuconostoc, Pediococci, Lactococci, Staphylococci และ *L. monocytogenes* โดยเฉพาะ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร ซึ่งพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและควบคุมยาก สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์ พบว่าไนซินมีฤทธิ์ป้องกันการสร้างสปอร์ใน Clostridia และ Bacilli เป็นต้น (Chen และ Hoover, 2003) ไนซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ไนซินร่วมกับสารคีเลต เช่น EDTA เพื่อช่วยในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Mishra และ Lambart, 1996)

ไนซินเป็นสารปฏิชีวนะชนิดเพปไทด์ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* เนื่องจากไนซินมีส่วนประกอบของแลนไธโอนีน (lanthionine) จึงจัดไนซินอยู่ในกลุ่มแลนติไบโอติก (lantibiotic) (กลุ่มของสารปฏิชีวนะที่มีหมู่แลนไธโอนีนเป็นองค์ประกอบ) ไนซินพบครั้งแรกโดย Rogers และคณะในปี 1928 โดยพบว่าเชื้อในกลุ่ม Lactococci มีความสามารถใน

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ (De Vuyst และ Vandamme, 1994) โครงสร้างของไนซินประกอบด้วยกลุ่มกรดอะมิโนที่ไม่พบในธรรมชาติ (unusual amino acid) ได้แก่ ดีไฮโดรอะลานีน (Dha), ดีไฮโดรบิวทิรีน (Dhb), แลนไธโอนีน และบีตาเมทิลแลนไธโอนีน (ß-methyllanthionine) (Hensen, 1993)

การวิเคราะห์หาปริมาณไนซินจากเชื้อที่ผลิตไนซินโดยอาศัยสมบัติความเป็นสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ไวต่อไนซินด้วยวิธีแพร่ซึมในอาหารแข็ง เป็นวิธีที่วิเคราะห์ง่ายและมีต้นทุนต่ำ แต่มีความคลาดเคลื่อนสูง เนื่องจากมีปัจจัยภายนอก เช่น ความหนาของวุ้น ขนาดของจานเพาะเลี้ยงเชื้อ เข้ามารบกวน ทำให้การวัดบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบเกิดความผิดพลาดขึ้น ดังนั้นจึงใช้วิธีการวัดความขุ่น (turbidometric Bioassay) ซึ่งมีความคลาดเคลื่อนน้อยกว่า (Chandrapati และ Sullivan, 1998)

จุลินทรีย์ที่แยกได้ตามธรรมชาติ โดยเฉพาะแบคทีเรีย ตามปกติแล้วจะมีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการได้ค่อนข้างต่ำ ดังนั้นก่อนที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม จะต้องมีการเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต เพื่อให้มีผลผลิตที่สูงขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปมักทำการเลือกอาหารและภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ แต่การเพิ่มผลผลิตโดยวิธีนี้จะถูกจำกัดโดยความสามารถสูงสุดในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์ ซึ่งถูกควบคุมโดยยีน ดังนั้นในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตในอุตสาหกรรม นอกเหนือจากการปรับปรุงสูตรอาหารและภาวะการผลิตแล้ว วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ยังเป็นสิ่งที่จำเป็น และมีความสำคัญต่อการเพิ่มผลผลิตอีกด้วย กล่าวคือ สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้หากมีลักษณะพันธุกรรมที่ต้องการ ก็จะทำให้กระบวนการผลิตและผลผลิตเป็นไปตามที่วางไว้ อย่างไรก็ตาม จุลินทรีย์ตามธรรมชาติมักต้องมีการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อให้บรรลุถึงวัตถุประสงค์ดังกล่าว วิธีการปรับปรุงสายพันธุ์ (strain improvement) ของจุลินทรีย์ ที่นิยมทำกันมากที่สุด คือ การกลายพันธุ์ (mutation) (Baltz, 1986)

การกลายพันธุ์ หมายถึง ภาวะที่สิ่งมีชีวิตไม่สามารถคงลักษณะทางพันธุกรรมไว้ได้ และลักษณะที่เปลี่ยนแปลงนี้ สามารถจะถ่ายทอดจากชั่วอายุหนึ่งไปยังชั่วอายุหนึ่งได้ (Snustad และคณะ, 2000) ตัวกระตุ้นหรือตัวชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ เรียกว่า สิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagen) เช่น สารเคมี ที่นิยมใช้ในการก่อการกลายพันธุ์ คือ N-methyl-N-nitro-N-nitroso-guanidine (NTG, MNNG, NG) เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูง โดยสังเคราะห์ขึ้นมาจากปฏิกิริยา ไนโตรเซชันของเมธิลไนโตรกวานิดีน มีสูตรโมเลกุล $C_2H_5N_5O_3$ NTG สามารถทำงานได้ดีในช่วงความเป็นกรด-เบส 6.0-9.0 แต่มีความเสถียรในภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรด โดย NTG จะแตกตัวเป็นกรดไนตรัส ในภาวะที่เป็นกรด และแตกตัวเป็นไดอะโซมีเธน (CH_2N_2) ในภาวะที่เป็นเบส โดย NTG จะ

เติมหมู่แอลคิลให้กับเบสแต่ละชนิดที่ตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจน มีผลโดยตรงต่อการจับคู่ผิด และมีผลทางอ้อมทำให้เกิดการซ่อมแซมดีเอ็นเอผิดไป เป็นสาเหตุให้เกิดการกลายพันธุ์ (Mendel และ Greenberg, 1960)

นอกจากสารเคมีแล้ว รังสีจัดเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ด้วย โดยเฉพาะแสงอัลตราไวโอเลต ซึ่งเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่นิยมใช้ในงานปรับปรุงสายพันธุ์มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวก มีประสิทธิภาพสูง การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของจุลินทรีย์จะเกิดจากการที่ดีเอ็นเอของจุลินทรีย์ดูดซับแสงอัลตราไวโอเลตเข้าไปโดยตรง ที่ช่วงความยาวคลื่นที่ 254 - 260 นาโนเมตร พลังงานที่ดูดซับไว้นี้ สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพันธะของเบสเพียวริน และไพริมิดีน โดยเฉพาะในกลุ่มเบสไพริมิดีนจะมีการเปลี่ยนแปลงมากกว่าเพียวริน โดยจะมีผลทำให้เบสไทมีน 2 โมเลกุลที่อยู่ติดกันบนสายพอลินิวคลีโอไทด์สายเดียวกันของโมเลกุลดีเอ็นเอที่มาเชื่อมต่อกัน ทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์ (thymine dimer) ขึ้น (Russel, 1996)

การเกิดไทมีนไดเมอร์นี้ จะทำให้เบสไทมีนไม่สามารถจับคู่กับเบสอะดินีนของสายพอลินิวคลีโอไทด์สายตรงข้ามได้ มีผลทำให้เกิดการทรานซิชันขึ้น โดยจะไปขัดขวางกระบวนการถ่ายแบบดีเอ็นเอ (DNA replication) เซลล์จึงไม่สามารถแบ่งตัวต่อไปได้

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมาย เพื่อปรับปรุงเชื้อ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 โดยการกลายพันธุ์ซึ่งใช้แสงอัลตราไวโอเลต และ NTG เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ใหม่ที่มีความสามารถในการผลิตไนซินได้เพิ่มมากขึ้น โดยมีความเสถียรทางพันธุกรรม จากนั้นหาภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตไนซิน จากเชื้อ MF2 และเชื้อที่เกิดการกลายพันธุ์ เพื่อพัฒนาไปใช้ในการผลิตไนซินในระดับขยายส่วนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

ในภาวะปัจจุบันโลกได้เผชิญกับปัญหาวิกฤตการขาดแคลนอาหาร โดยสาเหตุหนึ่งเนื่องมาจากผลิตผลทางการเกษตรที่เป็นอาหารของมนุษย์ประมาณร้อยละ 30 ต้องเสื่อมคุณภาพไปจนไม่สามารถนำไปใช้เป็นอาหารบริโภคได้ โดยประมาณว่าร้อยละ 70 ของอาหารที่มนุษย์บริโภค เน่าเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ ดังนั้นความสำเร็จในการเก็บรักษาหรือถนอมอาหารจึงขึ้นอยู่กับความสามารถในการควบคุมจุลินทรีย์เป็นสำคัญ ซึ่งวิธีการถนอมอาหารมีด้วยกันหลายวิธีได้แก่ การใช้ความร้อน การอาบรังสี การใช้ปาสคาไลเซชัน (Pascalization) การใช้วัตถุกันเสีย การดัดแปลงบรรยากาศ และการควบคุมวอเตอร์แอคติวิตี เป็นต้น อย่างไรก็ตามการเลือกใช้วิธีการถนอมอาหารนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเป็นสำคัญ การใช้วัตถุกันเสียเติมลงไปในอาหารเป็นวิธีการถนอมที่ได้รับความนิยมวิธีหนึ่ง เนื่องจากเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพและไม่ต้องการกระบวนการที่ซับซ้อน ตลอดจนสามารถคงคุณค่าทางโภชนาการของอาหารไว้ได้ ผลการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์โดยมากขึ้นอยู่กับปริมาณของวัตถุกันเสียที่ใช้ แต่เนื่องจากวัตถุกันเสียบางชนิดเป็นสารเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคได้หากใช้ในปริมาณมาก เช่น ไนไตรต์จะทำให้เกิดไนโตรซามีน (N-nitrosamines) ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง ด้วยสาเหตุนี้จึงทำให้มีการเปลี่ยนวัตถุกันเสียที่เป็นสารเคมีมาใช้วัตถุกันเสียที่มีแหล่งที่มาจากธรรมชาติ เช่น น้ำมันหอมระเหยจากเครื่องเทศ กระเทียม ระบบเอนไซม์แลคโตเพอร์ออกซิเดส (สุมณฑา, 2545) ซึ่งต่อมานักวิทยาศาสตร์ได้มีการค้นพบสารปฏิชีวนะจำพวกโปรตีนในเซลล์แบคทีเรียแลคติก ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักอาหารทั่วๆ ไป และพบว่าสารชนิดนี้มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและเชื้อที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย ภายหลังให้ชื่อสารนี้ว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) (นงลักษณ์ และปรีชา, 2539)

แบคเทอริโอซินเป็นเพปไทด์ หรือ โปรตีน ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด (Stiles, 1996) Klaenhamer (1988) ได้ให้คำจำกัดความของแบคเทอริโอซินไว้ 2 แบบ ประการแรก คือ แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่เป็นสายพันธุ์คล้ายคลึงกับเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้น และยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้บางชนิด ประการที่สอง คือ สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้กว้าง

ขึ้น มีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ปัจจุบันมีแบคเทอริโอซินเท่านั้นที่ถือกันว่าปลอดภัยที่ใช้กันอยู่ในอาหารอย่างแพร่หลายเชิงพาณิชย์ในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแลคติกแบคทีเรีย ส่วนมากจะมีประจุบวก และเป็นโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำ ประกอบด้วยหมู่อะมิโน 20-60 หมู่ สามารถจำแนกแบคเทอริโอซินออกเป็น 3 กลุ่ม (ตารางที่ 2.1)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ (Chen และ Hoover, 2003)

แบคเทอริโอซิน	แบคทีเรียที่ผลิต
กลุ่ม 1 (แลนติไบโอติก)	
1.1 แลนติไบโอติกชนิด A	
ไนซิน	*Lactococcus lactis*
แลคโตซิน S	*Lactobacillus sakei*
เอพิเดอมิน	*Staphylococcus epidermidis*
แกลลิเดอมิน	*Staphylococcus gallinarum*
แลคติซิน 481	*L. lactis*
1.2 แลนติไบโอติกชนิด B	
เมอซาซิดิน	*Bacillus subtilis*
ซินนามัยซิน	*Streptomyces cinnamoneus*
แอนโคเวนิน	*Streptomyces* sp.
ดูรามัยซิน	*S. cinnamoneus*
แอคตาการ์ดิน	*Actinoplanes* sp.
กลุ่ม 2	
2.1 กลุ่ม 2 A	
เพดิโอซิน PA-1/AcH	*Pediococcus acidilactici*
ซากาซิน A	*Lb. sakei*
ซากาซิน P L. sake	*Lb. sakei*
ลิวโคซิน A-UAL 187	*Leuconostoc gelidum*
เมอเซนเทอริซิน Y105	*Leuconostoc mesenteroides*
เอนเทอโรซิน A	*Enterococcus faecium*
ไดเวอซิน V41	*Carnobacterium divergens*
แลคโตคอคซิน MMFII	*L. lactis*

ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างแบคเทอริโอซินในกลุ่มต่าง ๆ (Chen และ Hoover, 2003) (ต่อ)

แบคเทอริโอซิน	แบคทีเรียที่ผลิต
2.2 กลุ่ม 2 B	
แลคโตคอคซิน G	*L. lactis*
แลคโตคอคซิน M	*L. lactis*
แลคตาซิน F	*Lactobacillus johnsonii*
แพลนทาริซิน A	*Lactobacillus plantarum*
แพลนทาริซิน EF	*Lb. plantarum*
แพลนทาริซิน JK	*Lb. plantarum*
2.3 กลุ่ม 2 C	
อะซิโดซิน B	*Lactobacillus acidophilus*
คาร์โนแบคเทอริโอซิน	*Carnobacterium piscicola*
ไดเวอจิซิน A	*C. divergens*
เอนเทอโรซิน P	*E. faecium*
เอนเทอโรซิน B	*E. faecium*
กลุ่ม 3	
เฮลเวติซิน J	*Lactobacillus helveticus*
เฮลเวติซิน V-1829	*Lb. helveticus*

กลุ่มที่ 1 แลนติไบโอติก เป็นเพปไทด์ขนาดเล็ก (น้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโนแลนไธโอนีน, แอลฟา-เมธิลแลนไธโอนีน, ดีไฮโดรอะลานีน และดีไฮโดรบิวทีรีน แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามโครงสร้างทางเคมี และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

- แลนติไบโอติกชนิด A เป็นเพปไทด์สายยาว ประจุบวก ยับยั้งแบคทีเรียโดยการสร้างรูบนผนังของเซลล์แบคทีเรีย

- แลนติไบโอติกชนิด B เป็นเพปไทด์ก้อนกลม ประจุลบหรือไม่มีประจุ ยับยั้งแบคทีเรียโดยสร้างเอนไซม์ไปยับยั้งแบคทีเรีย

กลุ่มที่ 2 เป็นเพปไทด์ขนาดเล็กที่ไม่ประกอบด้วยกรดอะมิโนแลนไธโอนีน (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) ทนความร้อนได้ดี แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ

- กลุ่มที่ 2 A ประกอบด้วยเพปไทด์ที่คล้ายกับเพดิโอซิน มีความสามารถจำเพาะในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria sp.*
- กลุ่มที่ 2 B ประกอบด้วยเพปไทด์ที่แตกต่างกัน 2 ชนิด
- กลุ่มที่ 2 C เป็นแบคเทอริโอซินประเภท sec-dependent secreted

กลุ่มที่ 3 เป็นเพปไทด์ขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน ไม่นิยมนำมาใช้ทางด้านอาหาร

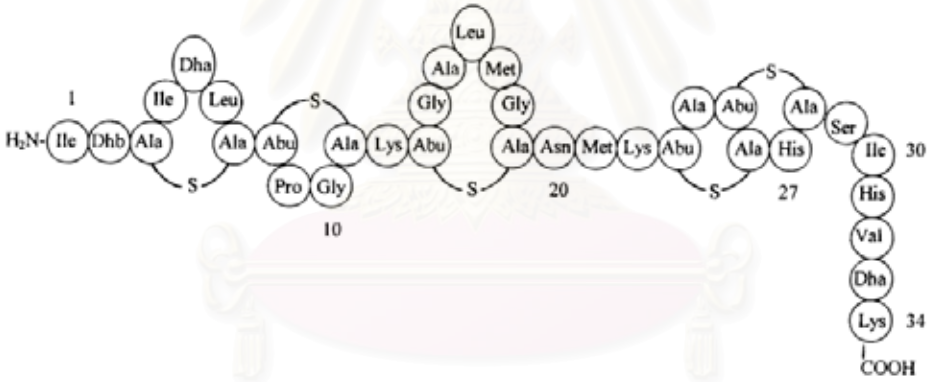
2.1 ไนซิน

ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้กว้างโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกทั้งที่สร้างและไม่สร้างสปอร์ตัวอย่าง เช่น Enterococci, Lactobacilli, Leuconostoc, Pediococci, Lactococci, Staphylococci และ *L. monocytogenes* โดยเฉพาะ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารซึ่งพบทั่วไปในสิ่งแวดล้อมและควบคุมยาก สำหรับแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์พบว่าไนซินมีฤทธิ์ป้องกันการสร้างสปอร์ใน Clostridia และ Bacilli เป็นต้น (Nes และคณะ, 1996) ไนซินไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่ในปัจจุบันได้มีการประยุกต์ใช้ไนซินร่วมกับสารคีเลต เช่น EDTA และไลโซไซม์ เพื่อช่วยในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (Mishra และ Lambart, 1996)

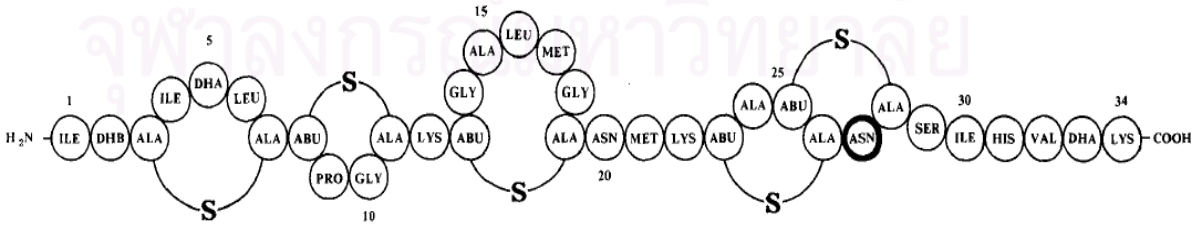
เนื่องจากไนซินมีส่วนประกอบของแลนไธโอนีน (lanthionine) จึงจัดไนซินอยู่ในกลุ่มแลนติไบโอติก (lantibiotic) (กลุ่มของสารปฏิชีวนะที่มีหมู่แลนไธโอนีนเป็นองค์ประกอบ) ไนซินพบครั้งแรกโดย Rogers และคณะในปี 1928 โดยพบว่าเชื้อในกลุ่ม Lactococci มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลกติก ชนิดอื่น ๆ โครงสร้างของไนซิน (รูปที่ 2.1) ประกอบด้วยกลุ่มกรดอะมิโนที่ไม่พบในธรรมชาติ (unusual amino acid) ได้แก่ ดีไฮโดรอะลานีน (Dha), ดีไฮโดรบิวทีรีน (Dhb), แลนไธโอนีน และบีตาเมธิลแลนไธโอนีน (β-methyllanthionine) (Hensen, 1993) จากโครงสร้างดังกล่าวทำให้ความสามารถในการละลาย, ความเสถียร และ แอกทิวิตีทางชีวภาพของไนซินขึ้นอยู่กับความ

เป็นกรด-เบสของสารละลาย โดยจะมีประสิทธิภาพดีเมื่ออยู่ในสารละลายที่มีค่าความเป็นกรด-เบส 2-4 และ ไนซินยังเป็นโมเลกุลที่ทนความร้อนสูงได้

ไนซินสามารถแบ่งออกได้เป็นสามชนิดโดยอาศัยความแตกต่างของกรดอะมิโน โดยไนซินสองชนิดแรกที่ค้นพบได้แก่ ไนซิน A (รูปที่ 2.1) โดย Gross และ Morell ในปี 1971 และไนซิน Z (รูปที่ 2.2) โดย Mulders และคณะ ในปี 1991 ไนซิน A และไนซิน Z มีกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 แตกต่างกัน โดยไนซิน A เป็นฮิสติดีน ส่วนไนซิน Z เป็นแอสพาราจีน แล้วด้วยเหตุนี้ทำให้ไนซิน Z สามารถละลายในน้ำที่เป็นกลางได้ดีกว่า (Rollema และคณะ, 1995) แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์ไนซินได้แก่ *L. lactis* subsp. *lactis* ซึ่งส่วนใหญ่แยกได้จากน้ำนม หรือผลิตภัณฑ์ที่มาจากน้ำนม (Ayad และคณะ, 2002) สามารถแยกเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* ที่สร้างไนซินได้จากน้ำนมวัว, น้ำนมแพะ และน้ำนมแกะ *L. lactis* subsp. *lactis* นอกจากจะแยกได้จากน้ำนมยังสามารถแยกได้จากอาหารหมักต่าง ๆ เช่น ไส้กรอกหมัก และกิมจิ เป็นต้น (Rodriguez และคณะ 1995; Park และคณะ, 2003)

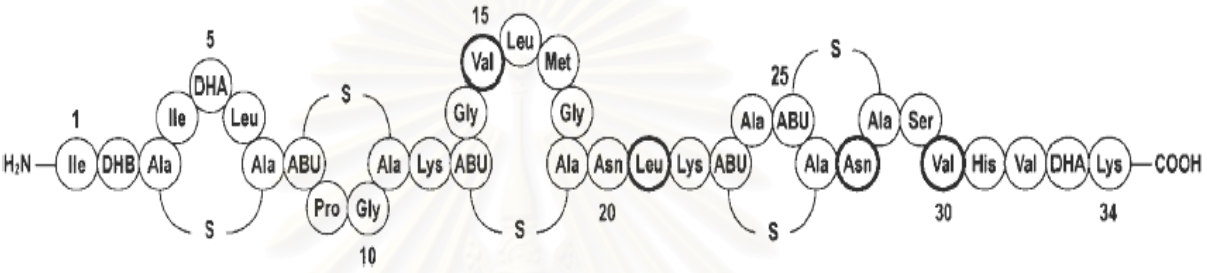


รูปที่ 2.1 โครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน A (Gross และ Morell, 1971)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน Z (Mulders และคณะ, 1991)

ในปี ค.ศ. 2003 Zendo และคณะ ได้ค้นพบไนซิน Q (รูปที่2.3) โดย *Lactococcus lactis* 61-14 ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำในแม่น้ำในประเทศญี่ปุ่น ซึ่งไนซิน Q มีกรดอะมิโนต่างจากไนซิน A อยู่ 4 ตำแหน่ง คือ กรดอะมิโนเวลีนในตำแหน่งที่ 15 กรดอะมิโนลิวซีนในตำแหน่งที่ 21 กรดอะมิโนแอสพาราจีนในตำแหน่งที่ 27 และกรดอะมิโนเวลีนในตำแหน่งที่ 30 โดยพบว่าไนซิน Q มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ในช่วงกว้างเหมือนไนซิน A และ Z (Zendo และคณะ, 2003)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน Q (Zendo และคณะ, 2003)

การทดสอบหาแบคทีเรียที่สร้างไนซินอาศัยสมบัติความเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ไวต่อไนซิน วิธีแพร่ซึมในอาหารแข็งเป็นวิธีที่วิเคราะห์ง่ายและมีต้นทุนต่ำ ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ (Parente และคณะ, 1995)

2.2 สายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิตไนซิน

ในปี ค.ศ. 1928 Rogers และคณะได้ตรวจพบสายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้างไนซินได้เป็นครั้งแรกที่ประเทศอังกฤษ โดยคัดกรองได้จากน้ำนม หลังจากนั้นในปี 1933 Whitehead และ Riddet ได้ตรวจพบสายพันธุ์ที่สร้างไนซินได้ที่ประเทศนิวซีแลนด์ โดยพบว่าการเก็บรักษานมไว้นานๆ ทำให้เกิดกรดขึ้น ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นมานี้สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งเชดด้าได้ แต่เนื่องจากมีการปนเปื้อนของเชื้ออื่น ทำให้การผลิตเนยแข็งไม่ประสบความสำเร็จ จึงไม่สนใจศึกษา จนกระทั่งในปี 1943 Meanwell ได้พบว่ากรดที่ได้ในระหว่างการผลิตเนยแข็งนั้นสามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตเนยแข็งครั้งต่อๆ ไปได้ Shattock และ Mattick, 1943 พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้คล้ายกับแบคทีเรียในกลุ่ม Lactic streptococci ต่อมาในปี 1944 Mattick และ Hirsch, ได้ทดสอบสมบัติในการยับยั้งเชื้ออื่นๆ พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด ดังนั้นพวกเขาจึงจัดให้สารนี้เป็น

ยาปฏิชีวนะประเภทหนึ่งโดยตั้งชื่อว่าไนซิน ซึ่งคัดกรองได้จากแบคทีเรียกลุ่ม Lactic streptococci หรือที่เรียกปัจจุบันนี้คือ Lactococci (Schleifer และคณะ, 1985) ไนซินได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารปฏิชีวนะตัวแรกที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ในปี 1968 หลังจากนั้นไนซินได้ถูกนำมาทดสอบเพื่อศึกษาสมบัติต่างๆ

ปี 1994 De Vuyst และคณะ ได้คัดกรองเชื้อที่สามารถผลิตไนซิน 21 สายพันธุ์ เชื้อแต่ละสายพันธุ์มีการผลิตไนซินในปริมาณที่แตกต่างกันตั้งแต่ 10 ถึง 1886 IU/ml และแสดงให้เห็นว่าไม่เกี่ยวกับจำนวนชุดของยีน *nis* หรือระดับการแปลและการถอดรหัสของยีน ต่อมา Quiao และ คณะ, 1996 พบว่า ความสามารถในการทนต่อไนซินของเชื้อผู้ผลิตอาจเป็นปัจจัยสำคัญในการเพิ่มการผลิตไนซิน โดย *Lactococcus lactis* LAC48 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ จะสามารถผลิตไนซินได้มากกว่า *Lactococcus lactis* N8 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ดั้งเดิม ถึง 10 เท่า แม้จะพบว่ามีการแสดงออกของยีน *nisA* ในปริมาณเท่าๆ กัน จากนั้นได้มีผู้ทดลองโคลนพลาสมิดที่มียีน *nisI* เข้าสู่เชื้อ *Lactococcus lactis* เพื่อให้ทนต่อไนซินที่ผลิตขึ้น ปรากฏว่ามีการเพิ่มปริมาณการผลิตไนซินและเพิ่มการเจริญอีกด้วย (Kim และ คณะ, 1998) จากการที่เชื้อซึ่งสามารถผลิตไนซินได้ ในแต่ละสายพันธุ์จะมีความทนสูงสุด (ceiling of immunity) ต่อไนซินที่สร้างไม่เท่ากันในแต่ละเชื้อ การทำให้เชื้อที่ผลิตไนซินทนต่อไนซินที่ผลิตขึ้นทำให้เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น จำนวนเซลล์ที่มีมากนี้จะทำให้มีปริมาณไนซินในน้ำเลี้ยงเชื้อมากขึ้นด้วย

ในปัจจุบันได้มีการคัดกรองไนซินจากอาหารและธรรมชาติหลายแหล่งด้วยกัน เช่น คัดแยก *Lactococcus lactis* BFE 1500 จากเนยแข็งของประเทศไนจีเรีย ในปี 2003 Noonpakdee และคณะได้แยก *Lactococcus lactis* WNC20 จากแหนมได้ โดยแบคทีเรียดังกล่าวสามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่มีลำดับเบสคล้ายกับไนซิน Z Chan และคณะ (2001) ได้คัดกรอง *Lactococcus lactis* subsp. lactis A164 จากกิมจิ แล้วหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิต เพื่อเพิ่มปริมาณการสร้างไนซิน พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อดังกล่าวในอาหาร M 17 ที่มีน้ำตาลแลคโทสเป็นแหล่งคาร์บอน และเติมสารสกัดจากยีสต์ 3% ทำให้สามารถผลิตไนซินได้มากที่สุด นอกจากนี้ในปี 2003 Zendo และคณะได้คัดกรองเชื้อที่สร้างไนซินชนิดใหม่ (ไนซิน Q) จากแม่น้ำในประเทศญี่ปุ่นได้ ซึ่งมีหมู่อะมิโนต่างจากไนซิน A 4 ตำแหน่ง โดยที่ไนซิน Q มีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากับ 3,327.31 ดาลตัน เทียบกับไนซิน A ซึ่งมีขนาดมวลโมเลกุลเท่ากับ 3,354.53 ดาลตัน นอกจากนี้ไนซิน Q มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ในช่วงกว้างเหมือนไนซินชนิดอื่น

ในปี 2549 นางสาว ไปรมา แก้วสามศรี ได้คัดกรองแบคทีเรียที่ได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบ คือ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 เนื่องจาก Rodriguez และคณะ ในปี 2000 ได้ทำการหาความหลากหลายของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากน้ำนมดิบ พบว่าไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่พบได้มากที่สุดในตัวอย่างน้ำนมดิบ ดังนั้นจึงทำการเลือกเก็บตัวอย่างส่วนใหญ่เป็นน้ำนมดิบ โดยในขั้นต้นจะทำการคัดกรองแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก เพราะเนื่องจากในปัจจุบันค้นพบแบคทีเรียเพียงสกุลเดียวที่ผลิตไนซิน คือ *L. lactis* subsp. *lactis* (De Vuyst และ Vandamme, 1994) ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแลคติก นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งพบว่า *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 มีผลการวิเคราะห์ความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของชิ้นส่วนผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรีย MF2 พบว่ามีความเหมือนกับยีนไนซินเอ และยีนไนซินแซดของ *L. lactis* subsp. *lactis* เท่ากับ 99%และ 98% ตามลำดับ และจากข้อมูลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ที่มีกรดอะมิโนที่ตำแหน่งที่ 27 เป็นฮิสติดีน จึงสามารถระบุได้ว่าไนซินที่แบคทีเรีย MF2 ผลิตได้นั้นเป็นไนซิน A

2.3 ฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน

ไนซินจะมีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียที่ค่อนข้างกว้าง เมื่อเทียบกับแบคเทอริโอซินชนิดอื่น กล่าวคือ ไนซินจะมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเกือบทั้งหมดได้ การยับยั้งจะมีประสิทธิภาพดีโดยเฉพาะกับสกุล *Lactococcus, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Staphylococcus pyogenes, Staphylococcus epidermidis, Erysipelothrix rhusiopathiae* นอกจากนี้ไนซินยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียในสกุล *Bacillus, Clostridia, Corynebacteria, Lactobacillus, Leuconostocs, Micrococcus, Pediococcus, Pneumococcus*, *Streptococcus* และ *Actinomyces* นอกจากไนซินจะยับยั้งตัวเซลล์ได้แล้วยังสามารถยับยั้ง สปอร์จาก spore-forming bacilli และ clostridia ได้ดีเมื่อให้ความร้อนร่วมด้วย (Delves และคณะ, 1996) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบ, เชื้อรา และไวรัสไม่สามารถถูกยับยั้งด้วยไนซิน (De Vuyst และ Vandamme, 1994) อย่างไรก็ตามไนซินสามารถยับยั้ง *Salmonella typhimurium* ได้ เมื่อใช้ร่วมกับ EDTA (Gill และ Holley, 2003) ในปี 1992 Strevens และ Henning รายงานว่า ยีสต์ และราถูกยับยั้งแบบไม่จำเพาะ เมื่อใช้ไนซินในปริมาณเข้มข้นสูง แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ด้วยไนซิน ดังแสดงในตารางที่ 2.2

ตารางที่ 2.2 แสดงแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้ด้วยไนซิน (Jennifer และคณะ, 2001)

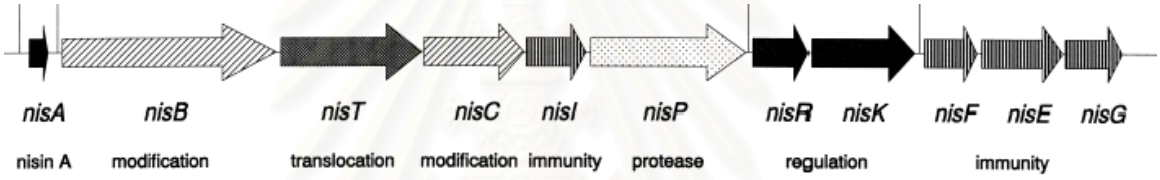
ชื่อแบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง	เอกสารอ้างอิง
L. monocytogenes	Ferreira และ Lund, 1996
	Davies และคณะ, 1997
B. cereus (สปอร์)	Wandling และคณะ, 1999
Lactobacillus sake และ *Lactobacillus*	Davies และคณะ, 1997
curvatus	Cutter และ Siragusa, 1998
Brochothrix themosphacta	Choi และ Park, 2000
Lactobacilli	

2.4 กลไกการยับยั้งแบคทีเรียของไนซิน

กลไกในการยับยั้งแบคทีเรียของไนซินจะเหมือนของดีเทอร์เจนต์ คือ ทำลายที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งกลไกการยับยั้งนี้ถูกนำเสนอโดย Bierbaum และ Sahl ในปี 1991 ซึ่ง Bierbaum และ Sahl พบว่าไนซินจะใช้ส่วนที่ชอบน้ำ หรือ ประจุบวก เพปไทด์ ที่บริเวณปลาย N ทำปฏิกิริยากับส่วนที่เป็นประจุลบที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดช่องผ่านเข้า-ออกของสารบริเวณที่มีประจุลบ ได้แก่ กรดไทโคอิก, กรดไลโพไทโคอิก และฟอสฟอลิพิด เป็นผลให้สารที่มีมวลโมเลกุลน้อย เช่น โปแทสเซียมไอออน, ไฮโดรเจนไอออน, กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์รั่วออกมานอกเซลล์ และสูญเสียความต่างศักย์บนเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ไม่สามารถสร้างพลังงานได้ ในที่สุดกระบวนการสังเคราะห์สารชีวโมเลกุลต่างๆ ก็จะหยุด เป็นสาเหตุให้เซลล์ตาย กลไกนี้ใช้เวลาเพียง 10-15 นาที ก็สามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้อย่างมีประสิทธิภาพ ต่อมาพบว่าความไวของไนซินในการยับยั้งแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์นั้นอาจขึ้นอยู่กับจำนวนประจุลบบนเยื่อหุ้มเซลล์ และพบว่าประสิทธิภาพของไนซินจะเพิ่มขึ้นถ้ามีการเติมไลโซไซม์เพื่อทำลายเพพทิโดไกลแคนก่อน และไนซินจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ บางสายพันธุ์ได้ เช่น *E. coli*, *Salmonella typhimurium* เมื่อมีการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกด้วย EDTA

2.5 กระบวนการสังเคราะห์ไนซิน

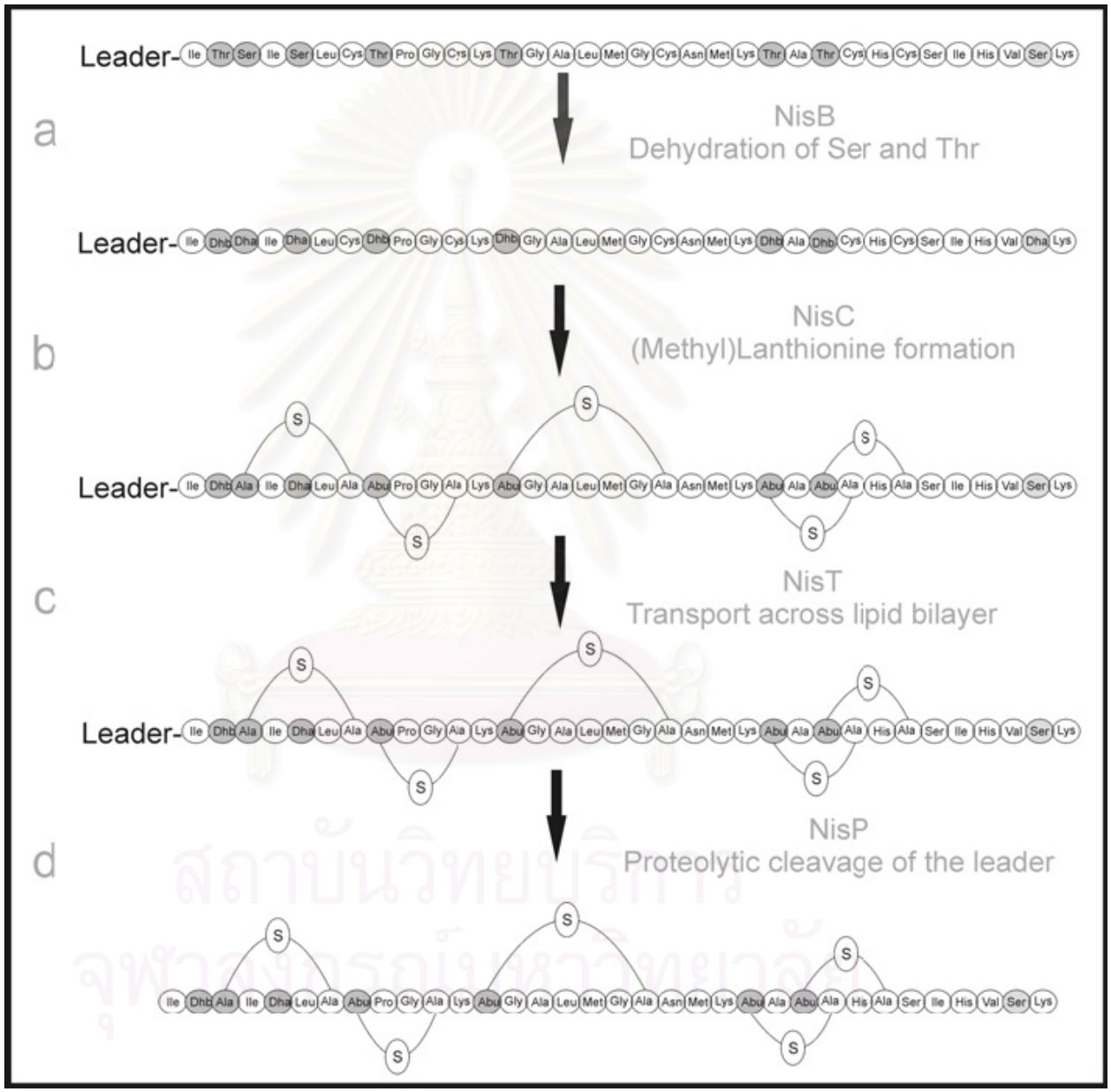
ไนซินถูกสังเคราะห์โดยไรโบโซมได้เป็นสายอาร์เอ็นเอนำรหัส (mRNA) และแปลรหัสเป็นไนซินตั้งต้น (Gross และ Morell, 1971) Buchman และคณะ (1988) ได้เริ่มจำแนกยีนที่สังเคราะห์ไนซินและศึกษาขั้นตอนการสังเคราะห์ไนซิน ซึ่งพบว่าในการสังเคราะห์ไนซิน การควบคุม และระบบภูมิคุ้มกันตัวเองจากไนซินนั้น มียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 11 ยีน ซึ่งอยู่ในกลุ่มยีน nisin sucrose transposon *Tn5276* (Dodd และคณะ, 1990) โดยยีนที่สังเคราะห์ไนซินนั้นจะถูกควบคุมโดยโอเปรอน 4 กลุ่มคือ *nisABTCIPRK*, *nisI*, *nisRK*, *nisFEG* ดังแสดงในรูปที่ 2.4 (Quiao และคณะ, 1996)



รูปที่ 2.4 ตำแหน่งของยีนที่เกี่ยวข้องในการสังเคราะห์ไนซิน การควบคุม และระบบภูมิคุ้มกันตัวเองจากไนซิน (Ra และคณะ, 1999)

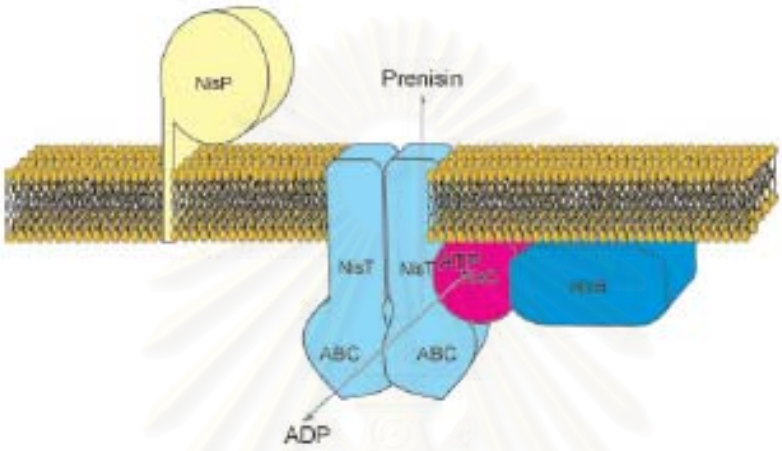
ขั้นตอนการสังเคราะห์ไนซินเริ่มจาก ยีน *nisA* ถอดรหัสได้ออกมาเป็นสายอาร์เอ็นเอนำรหัส (mRNA) และแปลรหัสเป็นไนซินตั้งต้น (nisin precursor peptide) ที่มีกรดอะมิโนทั้งหมด 57 หมู่ มีการดัดแปลงไนซินตั้งต้นเหล่านั้นด้วยกระบวนการดึงน้ำออกและกระบวนการสร้างแลนไธโอนีน โดยยีน *nisB* และ *nisC* ทำหน้าที่สังเคราะห์โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัสของไนซิน แล้วจึงถูกขนส่งผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ออกนอกเซลล์โดยโปรตีนที่สังเคราะห์ได้จากยีน *nisT* ซึ่งมีสมบัติเป็น ABC transporter การดัดแปลงไนซินให้สมบูรณ์จะสิ้นสุดเมื่อโปรตีน NisT นำไนซินตั้งต้นออกนอกเซลล์ ต่อจากนั้นยีน *nisP* ทำการสังเคราะห์ subtilin like โปรตีเนส ซึ่งมีสมบัติตัดส่วนเพปไทด์สายนำ และจะได้ไนซินที่สมบูรณ์ที่พร้อมจะทำงานออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งประกอบไปด้วยกรดอะมิโนแลนไธโอนิน 1 หมู่, เมธิลแลนไธโอนิน 4 หมู่, ดีไฮโดรบิวทีรีน 1 หมู่, ดีไฮโดรอะลานีน 2 หมู่ และกรดอะมิโนอื่นๆ ที่ไม่ได้ดัดแปลงอีก 21 หมู่ ดังแสดงในรูปที่ 2.5 ยีน *nisI* และยีน *nisFEG* ทำ

หน้าที่สังเคราะห์ไลโพโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของแบคทีเรียในการป้องกันตัวเองจากฤทธิ์ของไนซิน เมื่อขนส่งไนซินออกนอกเซลล์ (Siegers และคณะ, 1996)



รูปที่ 2.5 แสดงกระบวนการสังเคราะห์ไนซินหลังการแปลรหัสของไนซิน (Kuipers และคณะ, 1995)

จากรูป 2.5a แสดงถึงพรีไนซินที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 หมู่ ซึ่งเมื่อแปลรหัสแล้วได้ผ่านกระบวนการดัดแปลง ซึ่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ดังรูปที่ 2.6



รูปที่ 2.6 แสดงตำแหน่งของไนซินหลังการแปลรหัสบนเยื่อหุ้มเซลล์ (Kuipers และคณะ, 1995)

โดยที่บริเวณปลาย N ของส่วนเพปไทด์สายนำประกอบด้วยกรดอะมิโน 23 หมู่ ซึ่งเป็นบริเวณสำคัญที่ใช้ในการจับกับโปรตีนที่ใช้ในการดัดแปลงและการขนส่ง (Kuipers และคณะ, 1993) โดยขั้นตอนแรกของการสร้างไนซินที่สมบูรณ์เริ่มจาก NisB ดีไฮดราเทส ซึ่งเมื่อจับกับ leader peptide แล้ว จะดึงน้ำออกจากกรดอะมิโนเซรีน และธรีโอนีน ดังแสดงในรูปที่ 2.5a (Kuipers และคณะ, 2006) หลังจากนั้นกรดอะมิโนโนที่ถูกดึงน้ำออกจะจับกันเป็นวงแหวนแลนไธโอนีนด้วย NisC ไซเคลส ดังแสดงในรูป 2.5b (Li และคณะ, 2006) แล้วไนซินที่สมบูรณ์นี้จะถูกส่งออกนอกเซลล์โดย ABC-type transporter NisT ดังแสดงในรูป 2.5c (Kuipers และคณะ, 1993) แล้วเอนไซม์โปรตีเอสของ NisP จะทำหน้าที่ตัดส่วนปลาย N ของส่วนเพปไทด์สายนำออก ดังแสดงในรูป 2.5d ได้ไนซินที่พร้อมทำงานและกระตุ้นโปรตีน NisRK ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมยีนที่สร้างไนซินและยีนในระบบภูมิคุ้มกัน (Quiao, 1996)

Koponen และคณะ (2002) ได้ศึกษาถึงหน้าที่ที่สำคัญของโปรตีน NisB และ NisC ในกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัสของไนซิน โดยในกระบวนการดัดแปลงหลังการแปลรหัสประกอบด้วยสองส่วนที่สำคัญ คือ กระบวนการดึงน้ำออกในกรดอะมิโนเซรีน และธรีโอนีน และ

กระบวนการสร้างแลนไธโอนีน โดยได้ทดลองเติมกรดอะมิโนฮีสติดีนที่ส่วนปลายของยีนไนซิน ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อช่วยในการทำ ไนซินให้บริสุทธิ์ ซึ่งในการต่อปลายด้วยฮิสติดีนนั้นไม่มีผลกระทบต่อการสังเคราะห์ไนซิน สายพันธุ์กลายที่ขาดยีน *nisB* และ *nisC* จะไม่สร้างโปรตีน NisB และ NisC ตามลำดับ ทำให้กระบวนการขนส่งไนซินออกนอกเซลล์ต่ำลงและสามารถตรวจสอบกระบวนการการดึงน้ำออกได้จากการวิเคราะห์ด้วยแมสสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ (MS) โดยในกระบวนการดึงน้ำออกนั้นมวลของไนซินตั้งต้นจะลดลงประมาณ 18 ดาลตัน จากการทดลองในสายพันธุ์ที่ขาด *nisB* แต่มี *nisC* จะให้ผลน้ำหนักมีค่าหนักมากกว่าในสายพันธุ์ที่ขาด *nisC* แต่มี *nisB* แสดงว่า *nisB* มีความสำคัญในกระบวนการดึงน้ำออกของเซรีนและธรีโอนีน ดังนั้นเมื่อขาด *nisB* ทำให้ไม่มีกระบวนการดึงน้ำออก จึงทำให้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น แต่วิธี MS ไม่สามารถวิเคราะห์ว่ามีการสร้างแลนไธโอนีนได้ จากข้อเท็จจริงที่ว่าถ้ามีการสังเคราะห์แลนไธโอนีน เมื่อส่วนเพปไทด์สายนำถูกตัดแล้วก็จะได้ไนซินที่สมบูรณ์ทำหน้าที่เป็นสารต้านจุลชีพได้ แต่เมื่อทำการทดลองหาการทำงานของไนซินในสายพันธุ์ที่ขาด *nisC* แต่มี *nisB* ไม่พบการทำงานของไนซินจึงคาดว่ายีน *nisC* จะสร้างโปรตีน NisC ที่เกี่ยวข้องในการสร้างแลนไธโอนีนในกระบวนการสังเคราะห์ไนซิน

จากสมบัติของไนซินในการเป็นสารต้านจุลชีพซึ่งมีฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียอื่นๆ แต่ไม่มีผลต่อตัวเอง ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจสำหรับแบคทีเรียที่สร้างไนซิน จะต้องมีกลไกบางอย่างที่ควบคุมและป้องกันตัวเองจากฤทธิ์ของไนซินที่ตัวเองสร้าง จึงได้มีการศึกษายีนที่เกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเอง จากการศึกษาของ Stein และคณะ (2003) ได้อธิบายถึงกลไกการทำลายแบคทีเรียของไนซินประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือเริ่มจากการจับของ ไนซินที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ ขั้นที่สองไนซินจะแทรกเข้าไปในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ ขั้นที่สามเป็นกระบวนการที่ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ และสุดท้ายรูที่เยื่อหุ้มเซลล์จะขยายออกใหญ่ขึ้นจนทำให้เซลล์สูญเสียสมดุลและตายในที่สุด กลุ่มยีนอิมมูนิตีซึ่งประกอบด้วยยีน *nisI*, *nisF*, *nisE* และ *nisG* จะป้องกันตัวเองจากกลไกเหล่านี้ จากการทดลองโคลนยีนทั้งสี่เข้าใน *B. subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไวต่อไนซินควบคุมการแสดงออกของกลุ่มยีนอิมมูนิตีด้วยโปรโมเตอร์ชนิดเหนี่ยวนำ (inducible promoter) พบว่าในสายพันธุ์ที่โคลนยีนทั้งหมดสี่ชนิดมีระดับการทนทานต่อไนซินสูงสุด นอกจากนั้นกลุ่มยีนอิมมูนิตีจะมีความจำเพาะต่อไนซิน จากการทดลองบ่ม ไนซินกับโปรตีน NisI จะทำให้เกิดการจับกันระหว่างไนซินกับโปรตีน NisI เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อน และปริมาณของไนซินอิสระจะลดลง แต่ไม่เกิดผลเช่นนี้เมื่อบ่มโปรตีน NisI กับซับทิลินซึ่งเป็นแลนติไบโอติกที่ใกล้เคียงกับไนซิน NisI เป็นลิโพโปรตีนมีขนาด 25.8 กิโลดาลตัน จะถูกส่งออกนอกเยื่อหุ้มเซลล์โดยจะ

ทำหน้าที่ตัดสายไนซินบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อป้องกันไนซินเข้าสู่เซลล์ และไม่ให้ไนซินเพิ่มจำนวนมากขึ้น และโปรตีน NisFEG จะทำหน้าที่ส่งไนซินออกนอกเซลล์ซึ่งจะช่วยลดปริมาณของไนซินที่จะเข้าภายในเซลล์ การทำงานร่วมกันของยีน *nisIFEG* จะช่วยป้องกันตัวเองจากฤทธิ์ของไนซิน

2.6 ปัจจัยที่มีอิทธิผลต่อการผลิตไนซิน

2.6.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้เลี้ยง *L. lactis* คือ MRS หรือ M17 เนื่องจาก *L. lactis* เป็นเชื้อที่พิถีพิถันต่อการใช้แหล่งอาหารต่างๆ (fastidious bacteria) จากรายงานพบว่า MRS เป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและผลิตไนซินมากกว่าอาหารชนิดอื่นๆ (Biswas และคณะ, 1991)

Chan-Ick และคณะ, 2002 ได้เลี้ยงเชื้อ *L. lactis* สายพันธุ์ A164 พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร M17 ที่เติมแลคโทส 0.5% จะสามารถผลิตไนซินได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 8 ชนิด ดังแสดงในตารางที่ 2.3 และพบว่าอาหาร M17 ที่เติมแลคโทส 0.5% สามารถผลิตไนซินได้มากกว่าอาหาร M17 ที่เติมกลูโคส 0.5% ถึง 8 เท่า นอกจากนี้แล้วพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS และ APT ซึ่งมีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ให้น้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกับเลี้ยงใน M17 ที่เติมแลคโทส 0.5% แต่ผลิตไนซินได้น้อยกว่า จึงได้ทำการสรุปว่าอาหาร M17 จะสามารถผลิตไนซินได้ดีกว่า ในขณะที่อาหาร MRS จะทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ดีกว่า แต่การที่เชื้อจะสามารถผลิตไนซินได้ในปริมาณมากเพียงใดขึ้นอยู่กับองค์ประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย ได้แก่ แหล่งคาร์บอน, แหล่งไนโตรเจน, ธาตุอาหารและเกลือแร่ที่เหมาะสมกับสายพันธุ์นั้นๆ ซึ่ง Chan-Ick และคณะ ได้ศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตไนซิน โดยทดลองกับอาหาร M17 ที่แปรผันแหล่งคาร์บอนที่เป็นน้ำตาล 9 ชนิด พบว่าแลคโทสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดเมื่อเทียบกับน้ำตาลชนิดอื่น โดยสามารถผลิตไนซินได้สูงถึง 16,384 $AUml^{-1}$ (0.5% แลคโทส) ดังแสดงในตารางที่ 2.4 และเมื่อแปรผันแหล่งไนโตรเจน 8 ชนิด พบว่าสารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ดีที่สุด ผลิตไนซินได้สูงถึง 16,384 $AUml^{-1}$(0.5% สารสกัดจากยีสต์) ซึ่งเท่ากับในอาหาร M17 เดิม ดังแสดงในตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.3 แสดงอิทธิพลของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ของ *L. lactis* A164 ซึ่งผลิตไนซิน (Chan-Ick และคณะ, 2002)

อาหารเลี้ยงเชื้อ	เวลาบ่มเชื้อ (ชม.)					
	12	24	12	24	12	24
	ค่าความเป็นกรด-เบส		น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)		แอกทิวิตี (อาร์บิทารียูนิตต่อมล.)	
MRS (Difco)	5.06	4.38	1.31	1.51	2048	1024
TGE (Difco)	4.54	4.52	0.37	0.24	1024	256
BHI (Difco)	5.69	5.62	0.75	0.67	512	512
Elliker (Sigma)	4.22	4.20	1.01	0.97	2048	2048
TSB (Difco)	5.05	5.01	1.02	0.78	1024	1024
APT (Sigma)	4.23	4.16	1.66	1.63	2048	2048
Tomato Juice Broth (Difco)	4.13	4.03	0.58	0.69	512	512
M17+แลคโทส (M17L)	5.57	5.52	1.65	1.60	16384	16384
M17+กลูโคส (M17G)	5.75	5.72	1.28	1.27	2048	2048

ปริมาณแลคโทสและกลูโคสที่เติมลงในอาหาร M17 คือ 0.5%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.4 อิทธิพลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตไนซิน ของ *L. lactis* A164 (Chan-Ick แล ะคณะ, 2002)

แหล่งคาร์บอน	ค่าความเป็นกรด-เบส	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	แอกทิวิตี (อาร์บิทารียูนิตต่อมล.)
ชุดควบคุม	6.58	0.31	256
กลูโคส	5.75	1.40	2048
แลคโทส	5.64	1.62	16348
ซูโครส	5.76	1.67	2048
ไซโลส	6.12	0.71	2048
ฟรุกโทส	6.10	0.75	512
มอลโทส	6.03	0.92	4096
กาแลคโทส	6.01	0.99	2048
อะราบิโนส	6.08	0.87	1024
ราฟฟิโนส	5.71	1.37	4096

ชุดควบคุม = อาหาร M17 ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 2.5 อิทธิพลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตไนซิน ของ *L. lactis* A164 (Chan-Ick และคณะ, 2002)

แหล่งไนโตรเจน	ค่าความเป็นกรด-เบส	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)	แอคติวิตี (อาร์บิทารียูนิตต่อมล.)
ชุดควบคุม	5.56	1.74	16384
อาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน	6.73	0.20	32
สารสกัดจากเนื้อ	6.18	0.50	256
ทริปโตน	5.86	1.32	8192
ซอยโตน	5.02	1.75	8192
สารสกัดจากยีสต์	5.50	1.74	16384
เพพโตน	5.88	0.92	1024
เคซิโตน	5.83	1.30	4096
โปรติเอสเพพโตน	5.60	1.55	8192
เคซีน	6.06	0.57	512

ชุดควบคุม = อาหาร M17 ที่ไม่เติมแหล่งคาร์บอน

Matsusaki และ คณะ, 1995 ได้ศึกษาถึงแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม พบว่าเชื้อ *L. lactis* สายพันธุ์ IO-1 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐาน ซึ่งประกอบไปด้วยสารสกัดจากยีสต์ 0.5% พอลิเพพโตน 0.5% และ 0.5% โซเดียมคลอไรด์ สามารถผลิตไนซินได้ดีสุดเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลกลูโคส โดยใช้ปริมาณกลูโคสเริ่มต้น 3% โดยเชื้อสามารถผลิตไนซินได้ถึง 4000 $IUml^{-1}$ แต่ถ้าปริมาณกลูโคสเริ่มต้นเพิ่มขึ้นคือ 4% ทำให้การผลิตไนซินลดลง เนื่องจากกรดแลคติกอาจจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ได้มีการนำหางนมที่เหลือใช้จากอุตสาหกรรมผลิตเนยแข็ง มาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเป็นการลดต้นทุนและเป็นการกำจัดปัญหาสิ่งแวดล้อมจากหางนม โดยมีการศึกษาทั้งในการหมักแบบแบช และการหมักแบบต่อเนื่อง จากผลการทดลองพบว่าสามารถผลิตไนซินได้ในปริมาณที่น้อยกว่าการใช้น้ำตาลบริสุทธิ์เพียงเล็กน้อย เมื่อมีการเสริมสารอาหารในหางนมด้วยสารสกัดจากยีสต์ 0.5% และ tween 80 0.5% (Guerra และคณะ 1999; Xia Liu และคณะ 2003) การที่ *Lactococcus*

lactis สามารถใช้แหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด ในการสร้างไนซินได้ในปริมาณต่างๆ กันนั้น เนื่องจากแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิดจะควบคุมการผลิตไนซินโดยกระตุ้นการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างโมเลกุลไนซินให้สมบูรณ์ เช่น การสร้างโมเลกุลเริ่มต้นของไนซิน, การป้องกันตัวของเซลล์ผู้ผลิตจากไนซิน หรือ การส่งไนซินออกนอกเซลล์ได้แตกต่างกัน (De Vuyst และ Vandamme, 1993)

เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์เป็นตัวจำกัดการเจริญและการสร้างไนซินของ *Lactoccocus lactis* Kim และ คณะ, 1998 พบว่าปริมาณไนซินสูงสุดเพิ่มขึ้นเมื่อปริมาณไนโตรเจนอินทรีย์เพิ่มขึ้น ซึ่งต่อมาได้มีการศึกษาแหล่งของไนโตรเจน พบว่าเมื่อใช้สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 จะมีการสร้างไนซินมากกว่าการใช้ทริปโตน, ซอยโตน และ โปรติเอสเพพโตน ถึง 2 เท่า ส่วนเกลือแร่ที่เป็นส่วนเสริมการเจริญและการผลิตไนซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ M17 นั้น พบว่า KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสเฟตที่ดีที่สุด (De Vuyst และ Vandamme , 1993) Mg^{2+} ทำให้ *Lactococcus latcis* ATCC11454 เพิ่มการผลิตไนซินขึ้นและลดการดูดซับของไนซินในเซลล์ผู้ผลิต (Meghrous และ คณะ 1992) แต่ในสายพันธุ์ IO-1 ไม่พบการเพิ่มผลผลิตไนซิน (Matsusaki และคณะ, 1996) การเติม $CaCl_2$ 0.1 โมลต่อลิตร สามารถเพิ่มปริมาณไนซินแต่ไม่มีผลกับการผลิตกรดแลคติกและการเจริญของเชื้อซึ่งอธิบายได้ว่า Ca^{2+} จะกระตุ้นเอนไซม์สำคัญในการดัดแปลงโมเลกุลไนซินให้สมบูรณ์ โดยมีการพบว่า Ca^{2+} จะจับกับเอนไซม์ NisP เพพทิเดส ซึ่งทำหน้าที่ตัด leader peptide จาก precursor nisin (Siezen และ คณะ 1995) หรือทำให้ไนซินที่สร้างขึ้นไม่สามารถจับกับลิพิดเมมเบรนของเซลล์ผู้ผลิต ทำให้เชื้อมีความต้านทานต่อไนซินที่ผลิตขึ้นเอง (De Vuyst และ Vandamme 1993)

2.6.2 ผลกระทบของภาวะในการเลี้ยงเชื้อ

การควบคุมภาวะต่างๆ เช่น ค่าความเป็นกรด-เบส, อุณหภูมิ และการให้อากาศให้เหมาะสมเป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งในการเลี้ยงเชื้อและการผลิตไนซินโดยจากการศึกษาพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* ที่อุณหภูมิ 30°ซ เชื้อจะมีการเจริญและผลิตไนซินมากที่สุด ส่วนค่าความเป็นกรด-เบส ซึ่งมีความสำคัญต่อการสร้างไนซินเป็นอย่างมาก พบว่าค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมกับการผลิตไนซินจะมีค่าต่ำกว่าค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมกับการเจริญ โดยค่าที่เหมาะสมกับการผลิตไนซินจะอยู่ในช่วง ค่าความเป็นกรด-เบส 5.5-6.0 ซึ่งจะแตกต่างกันในเชื้อแต่ละสายพันธุ์และอาจขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ นอกจากนี้ค่าความเป็นกรด-เบสที่เป็นกลางจะทำให้เชื้อดูดซับไนซินไว้ทำให้

ปริมาณไนซินที่ปล่อยสู่น้ำเลี้ยงเชื้อน้อยลง จากผลกระทบของค่าความเป็นกรด-เบสดังกล่าว จึงต้องมีการควบคุมค่าความเป็นกรด-เบสในการผลิตอย่างเข้มงวดโดย Wenhua และคณะ (2004) ทดลองใช้การควบคุมแบบย้อนกลับ (pH feed back control) ควบคุมค่าความเป็นกรด-เบสในการหมักแบบเฟดแบช โดยใช้เซนเซอร์วัดค่าความเป็นกรด-เบส ถ้าค่าที่ได้เกินกว่าที่ได้ตั้งไว้ก็จะส่งสัญญาณให้ป้อนโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้าไปปรับค่าความเป็นกรด-เบส ผลจากการศึกษาพบว่าการควบคุมค่าความเป็นกรด-เบสให้คงที่ในเฟดแบช ให้ผลผลิตไนซิน (5,010 IU/ml) มากกว่าการผลิตไนซินแบบแบช ซึ่งไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-เบส (2,660 IU/ml) และจากการทดลองพบว่าการให้อากาศปริมาณ 10-40 มิลลิลิตรต่อนาที และการกวนด้วยความเร็ว 320 รอบต่อนาที ภายในถังหมักจะทำให้เชื้อผลิตไนซินได้ปริมาณมากขึ้น

2.7 การประยุกต์ใช้ไนซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ไนซินจัดเป็นสารต้านจุลชีพที่น่าสนใจ เนื่องจากไนซินมีสมบัติหลายประการที่เหมาะสมในการใช้เป็นสารถนอมอาหาร คือ เป็นสารที่มีความปลอดภัย ไม่ทำลายหรือเป็นพิษต่อเซลล์ยูแคริโอต สามารถทำให้เสื่อมสภาพโดยใช้เอนไซม์โปรตีเอส ทนต่อความร้อนและค่าความเป็นกรดเบสสูงๆ ได้ และยังสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ จนได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ว่ามีความปลอดภัยและอนุญาตให้ใช้ไนซินเพื่อถนอมอาหารได้ (Antonio และคณะ, 2007) จึงนำมาใช้เพื่อวัตถุประสงค์ของการควบคุมการเน่าเสียของอาหาร (Parente และ Ricciardi, 1999) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกระบวนการผลิตเนยแข็งเพื่อป้องกันการเจริญเติบโตและการสร้างพิษโดย *Clostridium* spp. หรือในนมพาสเจอไรซ์ ขนมหวาน และผักกระป๋อง เป็นต้น ในสหรัฐอเมริกา ไนซินได้ยอมรับว่าปลอดภัยสามารถใช้ได้ในไข่เหลว ไส้กรอก และน้ำสลัด ในประเทศออสเตรเลียก็อนุญาตให้ใช้ไนซินได้รับการยอมรับในผลิตภัณฑ์ขนมอบที่มีองค์ประกอบของความชื้นสูง เพื่อป้องกันการเจริญเติบโตของ *Bacillus cereus* และยังมีรายงานอื่น ๆ อีกมากมายที่ได้ระบุว่า สามารถใช้ไนซินในการควบคุมการเติบโตของ *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium* spp. ได้ในผลิตภัณฑ์นมและสัตว์ (Szabo และ Chahill, 1998)

2.8 การวิเคราะห์หาปริมาณไนซิน

วิธีที่ใช้ทดสอบสามารถแบ่งได้เป็น 3 วิธีใหญ่ๆ ได้แก่ วิธีทางชีวภาพ วิธีทางกายภาพ วิธีทางวิทยาอิมมูน

2.8.1 วิธีทางชีวภาพ (bioassay)

เป็นวิธีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยอาศัยสมบัติความเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อชนิดอื่น ตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ไวต่อไนซินแสดงในตารางที่ 2.6

ตารางที่ 2.6 แสดงเชื้อที่ใช้ทดสอบความไวต่อไนซิน

เชื้อที่ใช้ทดสอบ	เอกสารอ้างอิง
Lactobacillus brevis *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* *Streptococcus agalactiae* *Bacillus stearothermophillus* *Micrococcus luteus* *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* *B. coagulans*	De Vuyst และ Vandamme, 1994
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* CNRZ117 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435	Parente และคณะ, 1995
Carnobacterium divergens LV 13	Rose และคณะ, 1999
Micrococcus luteus ATCC10240 *Weissella paramesenteroides* ATCC33313	Chan-Ick และคณะ, 2002
Pediococcus acidilactici	Turcotte และคณะ, 2004

วิธีทางชีวภาพสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ วิธีแพร่ซึมในอาหารแข็ง (agar diffusion assay) และวิธีวัดความขุ่น (turbidimetric assay, photometric assay)

2.8.1.1 วิธีแพร่ซึมในอาหารแข็ง (agar diffusion assay)

ทำได้โดยนำเชื้อที่ไวต่อไนซินมาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่หลอมเหลวแล้วเทลงบนจานอาหาร จากนั้นนำอาหารที่แข็งแล้วมาเจาะหลุม และหยอดด้วยเชื้อที่จะทดสอบการสร้างไนซิน เชื้อที่สามารถสร้างไนซินได้จะไปยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อที่ไวต่อไนซินทำให้เกิดโซนใสรอบๆ โคโลนี (Parente และคณะ, 1995) การวิเคราะห์การสร้างไนซินด้วยวิธีแพร่ซึมในวุ้นสามารถประยุกต์ใช้หาปริมาณไนซินที่เชื้อสร้างได้ โดยทำการทดลองเปรียบเทียบโซนของการยับยั้งระหว่างเชื้อที่จะทดสอบกับไนซินมาตรฐานที่ทราบความเข้มข้นแน่นอน โดยเทียบจากกราฟมาตรฐานระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้ง (แกน Y) กับความเข้มข้นของไนซิน (แกน X) แต่โซนของการยับยั้งที่เกิดจากเชื้อที่ทดสอบอาจมีตัวแปรอื่นนอกจากไนซินที่เชื้อสร้างขึ้นทำให้ขนาดโซนไม่ถูกต้อง ดังนั้นในการทำปริมาณวิเคราะห์จะต้องทำไนซินให้บริสุทธิ์ก่อนเพื่อให้ได้ผลถูกต้องแม่นยำ หรือใช้ภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงเชื้อที่จะไม่ส่งผลกระทบต่อการแพร่ของไนซิน

แอกทิวิตีของไนซินจะแสดงในรูปหน่วยอาร์บิทารี (AU) ซึ่งหมายถึง ค่าความเจือจางที่สูงที่สุดที่ได้จากการทำเจือจางแบบลำดับสอง ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อที่ไวต่อไนซินต่อปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรืออาจแสดงในรูปหน่วยอินเตอร์เนชันแนล (IU) ซึ่งแสดงถึงค่าแอกทิวิตีของไนซินบริสุทธิ์ที่เตรียมด้วยวิธีมาตรฐานปริมาตร 1 ไมโครกรัมเทียบกับไนซินมาตรฐาน เช่น เทียบกับไนซินมาตรฐาน Nisaplin (Nisaplin 1 กรัม มีแอกทิวิตีที่แน่นอน 10^6 IU) (De Vuyst และ Vandamme 1994)

การทดสอบการสร้างไนซินด้วยวิธีแพร่ซึมในวุ้นเป็นวิธีที่วิเคราะห์ง่าย และมีต้นทุนต่ำ ดังนั้นจึงเป็นวิธีที่นิยมใช้ แต่ก็มีขีดจำกัดหลายอย่างโดยเฉพาะในการวิเคราะห์หาปริมาณไนซินนั้น ขนาดของโซนเป็นสิ่งสำคัญ ถ้าขนาดโซนมีความคลาดเคลื่อนก็จะทำให้เกิดความผิดพลาดในการวิเคราะห์ปริมาณ ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อขนาดของโซนมีดังต่อไปนี้

I. ส่วนประกอบของวุ้น อาจมีผลต่อฤทธิ์ของไนซิน การแพร่ซึมของไนซิน และการเจริญของเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีต้องไม่มีผลต่อฤทธิ์และการแพร่ของไนซิน และส่งเสริมการเจริญของเชื้อ Chandrapati และ O'Sullivian (1998) ได้ศึกษาการผลิตไนซินจากเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* ด้วยวิธี rapid plate method พบว่าแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดต่อการ

สร้างไนซินคือการใช้กลูโคสเพียงอย่างเดียว และการเติมเกลือลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไปยับยั้งการสร้างไนซิน ยกเว้นการเติม $MnCl_2$

II. ค่าความเป็นกรด-เบส และแคตไอออน โดยแคตไอออนมีผลต่อฤทธิ์ของไนซิน Wolf และ Gibbons (1996) พบว่า เมื่อใช้ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Na_2HPO_4 buffer) ความเข้มข้น 1% เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะช่วยป้องกันการเกิดโซนที่ผิดพลาดจากกรดที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแลกติดซึ่งจะไปยับยั้งเชื้อที่ไวต่อไนซิน

III. ชนิดของเชื้อที่ใช้ทดสอบความไวต่อไนซิน Pongthorangkul และ Demirci (2004) ศึกษาถึงผลของเชื้อที่ไวต่อไนซินที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธีแพร่ซึมในอาหารแข็ง โดยเปรียบเทียบระหว่างเชื้อ 3 ชนิด ได้แก่ *Micrococcus luteus*, *Lactobacillus sakeii* และ *Brochothrix thermosphacta* พบว่าเชื้อ *Lactobacillus sakeii* เมื่อนำมาทดสอบ จะให้ผลการทดสอบถูกต้องและแม่นยำที่สุด

นอกจากนั้นยังมีปัจจัยอื่นๆ อีกที่สำคัญ เช่น ความหนาของวุ้น โดยทั่วไปในการวิเคราะห์ความไวต่อ ไนซินใช้วุ้นหนา 4 มิลลิเมตร แต่ถ้าวิเคราะห์ปริมาณใช้วุ้นหนา 2 มิลลิเมตร ปริมาณเชื้อที่ใช้ทดสอบความไวต่อไนซิน ใช้เชื้อปริมาณ 10^6 โคโลนีต่อจานอาหาร หรือวัดปริมาณเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรให้ได้ค่า 0.5 นอกจากนี้ยังรวมถึงอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม ซึ่งทุกปัจจัยจะมีผลต่อการเกิดโซนของเชื้อ

2.8.1.2 วิธีวัดความขุ่น (turbidimetric assay, photometric assay)

เป็นวิธีที่ใช้ในการหาปริมาณไนซิน โดยเปรียบเทียบความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อตัวอย่างที่จะทดสอบต่อการยับยั้งเชื้อที่ไวต่อไนซินกับไนซินมาตรฐาน ซึ่งสามารถเตรียมในรูปหลอดทดลองหรือในปัจจุบันนิยมใช้ในรูปจานไมโครไตเตอร์ ซึ่งมีความสะดวกและสามารถเตรียมได้หลายตัวอย่าง

ทำได้โดยการนำไนซินที่แยกได้จากเชื้อมาทำให้บริสุทธิ์และนำมาเจือจางให้ได้หลายความเข้มข้นจากนั้นบ่มไนซินกับเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน และหยุดการเจริญด้วยการเติมสารไธโอเมอร์ซาเลต (thiomersalate) จากนั้นนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร สร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (แกน Y) กับล็อกความเข้มข้นของไนซิน (แกน X)

ปริมาณไนซินของสารตัวอย่างหาได้โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน วิธีนี้เป็นวิธีที่รวดเร็ว สามารถประยุกต์ใช้ในการหาปริมาณไนซินในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ได้ แต่สารที่จะใช้ทดสอบหรืออาหารเลี้ยงเชื้อต้องใส และไม่มีตะกอน

Turcotte และคณะ (2004) ได้พัฒนาวิธีวิเคราะห์ความขุ่น ให้มีความแม่นยำ มีความไว และใช้เวลาน้อย โดยพบว่าเมื่อใช้เชื้อทดสอบความไวเป็น *Pediococcus acidilactici* UL5 ปริมาณ 10^7 โคโลนีต่อจานอาหาร จะช่วยลดเวลาในการบ่มเชื้อลงเหลือ 3 ชั่วโมง และได้เปรียบเทียบค่าต่างๆ ของการวิเคราะห์ด้วยวิธีแพร่ซึมในวุ้น กับวิธีวัดความขุ่น ซึ่งจะเห็นว่าวิธีวัดความขุ่น เป็นวิธีวิเคราะห์ที่รวดเร็วกว่า และมีความไวมากกว่า และไม่มีปัญหาเกี่ยวกับการแพร่ในวุ้นเหมือนวิธีแพร่ซึมในวุ้น แต่วิธีนี้จะยุ่งยากกว่า เพราะต้องเตรียมไนซินให้บริสุทธิ์ก่อนที่จะวิเคราะห์

Reunanen และ Saris (2003) ได้ปรับปรุงเชื้อที่ใช้ทดสอบความไวต่อไนซินให้มีการตรวจสอบง่ายขึ้น มีความไว และมีความแม่นยำมากขึ้น โดยสร้างพลาสมิดที่ประกอบด้วยยีน *nisR* และ *nisK* ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมตัวเอง (autoregulation gene) และยีน *gfp* ซึ่งเป็นยีนที่สร้างโปรตีน green fluorescent จากนั้นนำพลาสมิดใส่เข้าไปในเชื้อ *L. lactis* สายพันธุ์ MG1614 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่สร้างไนซิน ด้วยวิธีอิเล็กโทรพอเรชัน และเรียกสายพันธุ์ใหม่นี้ว่า *L. lactis* LAC240 ซึ่งใช้เป็นเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน เมื่อบ่มเชื้อ *L. lactis* LAC240 กับเชื้อที่ต้องการจะทดสอบการสร้างไนซิน ถ้าเชื้อนั้นสามารถสร้างไนซิน ไนซินที่สร้างได้ จะไปกระตุ้นให้โปรตีน green fluorescent เปล่งแสงวัดแสงที่เปล่งออกด้วยเครื่องฟลูออโรมิเตอร์ โดยที่แปลผลออกมาเป็นค่าความสัมพันธ์ระหว่างแสงที่กระตุ้นวัดได้ที่ความยาวคลื่น 485 นาโนเมตร และแสงที่ปล่อยออกวัดได้ที่ความยาวคลื่น 538 นาโนเมตร หน่วยฟลูออเรสเซนซ์สัมพัทธ์ (RFU) จะแปรผันตามปริมาณไนซิน วิธีนี้สามารถวิเคราะห์ไนซินได้แม้มีเพียงปริมาณเล็กน้อย ซึ่งวิเคราะห์ไนซิน บริสุทธิ์ได้ตั้งแต่ 2.5 นาโนกรัมต่อมิลลิมิตร วิเคราะห์ไนซินในนมที่มีความเข้มข้นเพียง 45 นาโนกรัมต่อมิลลิมิตร ในเนยแข็ง 0.9 ไมโครกรัมต่อมิลลิมิตร และวิเคราะห์ไนซินในน้ำสลัดได้ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

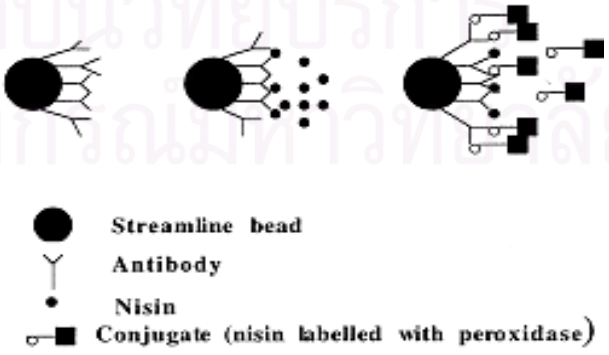
2.8.2 วิธีทางกายภาพ

เป็นวิธีตรวจหาไนซินโดยอาศัยโครงสร้างของไนซิน เช่น การวิเคราะห์จากมวลโมเลกุลของไนซิน โดยวิธี Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry

(MALDI-TOF MS) จากการทดลองของ Rose และคณะ (1999) ได้ใช้เทคนิค MALDI-TOF MS ในการหาไนซินจากสารละลายส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ โดยวิเคราะห์จากมวลโมเลกุลเทียบกับไนซินมาตรฐาน MALDI-TOF MS เป็นวิธีที่มีความรวดเร็วเมื่อเทียบกับวิธีทางชีวภาพที่ต้องบ่มเชื้อ และสามารถนำมาใช้วิเคราะห์หาไนซินในผลิตภัณฑ์ต่างๆ แต่ก็มีข้อด้อยคือ การเตรียมสารเคมีในการทดสอบมีความยุ่งยาก และเครื่องมือที่จะใช้วิเคราะห์มีราคาแพง และในการทำปริมาณวิเคราะห์จำเป็นจะต้องเตรียมไนซินให้มีความบริสุทธิ์สูง

2.8.3. วิธีทางวิทยาอิมมูน

เป็นวิธีที่อาศัยปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดี โดยให้ไนซินเป็นแอนติเจน และสร้างแอนติบอดีจากการฉีดไนซินเข้าในสัตว์ทดลองเพื่อให้สร้างแอนติบอดีต่อไนซิน วิธีenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นวิธีที่สามารถนำมาประยุกต์เพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยอาศัยหลักการที่ไนซินจะจับกับแอนติบอดีต่อไนซิน โดยเตรียมให้แอนติบอดีจับกับเม็ดบีด จากนั้นเมื่อเติมสารที่จะวิเคราะห์ไนซินลงไป ไนซินในสารตัวอย่างจะจับกับแอนติบอดี แล้วจึงล้างและเติมคอนจูเกต ไนซินซึ่งติดฉลากด้วยเอนไซม์ฮอร์สราดิชเพอร์ออกซิเดส คอนจูเกตไนซินจะไปแย่งจับกับแอนติบอดี และเมื่อเติมซับสเตรต เอนไซม์จะย่อยซับสเตรตซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 540 นาโนเมตร โดยปริมาณ ไนซินจะแปรผกผันกับค่าการดูดกลืนแสง ถ้าในตัวอย่างมีไนซินมากคอนจูเกตไนซินจะเข้าไปแย่งจับกับแอนติบอดีได้น้อย ทำให้ค่าการดูดกลืนแสงต่ำ (Nandakumar และคณะ, 1999) แบบจำลองการทำ ELISA แสดงในรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 แสดงแบบจำลองการทำ ELISA (Nandakumar และคณะ, 1999)

2.9 การกลายพันธุ์

การกลายพันธุ์ คือการเปลี่ยนแปลงลำดับของเบสหรือโครงสร้างของสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตให้ผิดไปจากสภาพธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้จะต้องสามารถถ่ายทอดไปสู่ลูกหลานได้(Brown, 1992)

การกลายพันธุ์มี 2 แบบคือ การกลายพันธุ์ระดับยีน (Gene Mutation) และการกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (Chromosomal mutation)

2.9.1 การกลายพันธุ์ระดับยีน

การกลายพันธุ์ของยีนจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของเบส (A, T, C, G) ในยีน โดยอาจเปลี่ยนที่ชนิดของเบส โครงสร้างหรือลำดับของเบสทำให้ยีนเปลี่ยนไป มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโนในสายพอลิเพพไทด์ที่สร้างขึ้น โปรตีนที่สร้างขึ้นมานั้นเปลี่ยนสมบัติทางเคมีไปจากเดิมหรือหมดสภาพไป การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นเป็นการกลายพันธุ์เฉพาะที่ มีผลทำให้รหัสพันธุกรรมเปลี่ยนไปจากเดิม ลำดับและชนิดของกรดอะมิโนจะเปลี่ยนไป สมบัติของโปรตีนหรือพอลิเพพไทด์ที่สังเคราะห์ขึ้นจึงแตกต่างไปจากเดิม

การกลายพันธุ์ระดับยีนแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ การแทนที่คู่เบส (Base – pair Substitution) และการสอดแทรกของนิวคลีโอไทด์ (Insertion) หรือการตัดออกของนิวคลีโอไทด์ (Deletion)

2.9.1.1 การแทนที่คู่เบส (Base – pair Substitution)

เกิดจากมีเบสใดเบสหนึ่งในสายดีเอ็นเอปกติถูกแทนที่โดยเบสอีกชนิดหนึ่ง จึงทำให้ลำดับการเรียงตัวของเบสในสายดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงไป ทำให้มีลำดับการเรียงตัวของเบสในโคดอนเปลี่ยนแปลงไป โปรตีนที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะเปลี่ยนแปลงไป การกลายพันธุ์ลักษณะนี้ถูกเรียกว่าการกลายพันธุ์แบบแทนที่ ซึ่งสามารถ แบ่งย่อยตามประเภทของเบสที่เปลี่ยนแปลงไปเป็น 2 รูปแบบคือ ทรานสเวอร์ชัน (transversion) และทรานสิชัน (transition)

2.9.1.1.1 ทรานสเวอร์ชัน (transversion)

คือ การแทนที่เบสด้วยเบสต่างกลุ่มกัน โดยแทนที่เบสจากเบสพิวรีนเปลี่ยนเป็นไพริมิดีน หรือเป็นการเปลี่ยนเบสจากไพริมิดีนไปเป็นพิวรีน โดยลำดับเบสที่เปลี่ยนแปลง มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงชนิดกรดอะมิโนในสายพอลิเพพไทด์ที่สร้างขึ้น

2.9.1.1.2 ทรานสิชัน (transition)

การที่เบสเดิมและเบสใหม่ที่แทนกันเป็นประเภทเดียวกัน เช่น การเปลี่ยนเบสจากพิวรีนไปเป็นพิวรีน (เช่น ตำแหน่งที่เคยเป็น A ถูกแทนที่ด้วย G) หรือเป็นการเปลี่ยนเบสจากไพริมิดีนไปเป็นไพริมิดีน (เช่น ตำแหน่งที่เคยเป็น T ถูกแทนที่ด้วย C)

การแทนที่คู่เบส (Base – pair Substitution) มีหลายลักษณะ ได้แก่

- การกลายพันธุ์แบบมิสเซ้นต์ (Missense mutation)

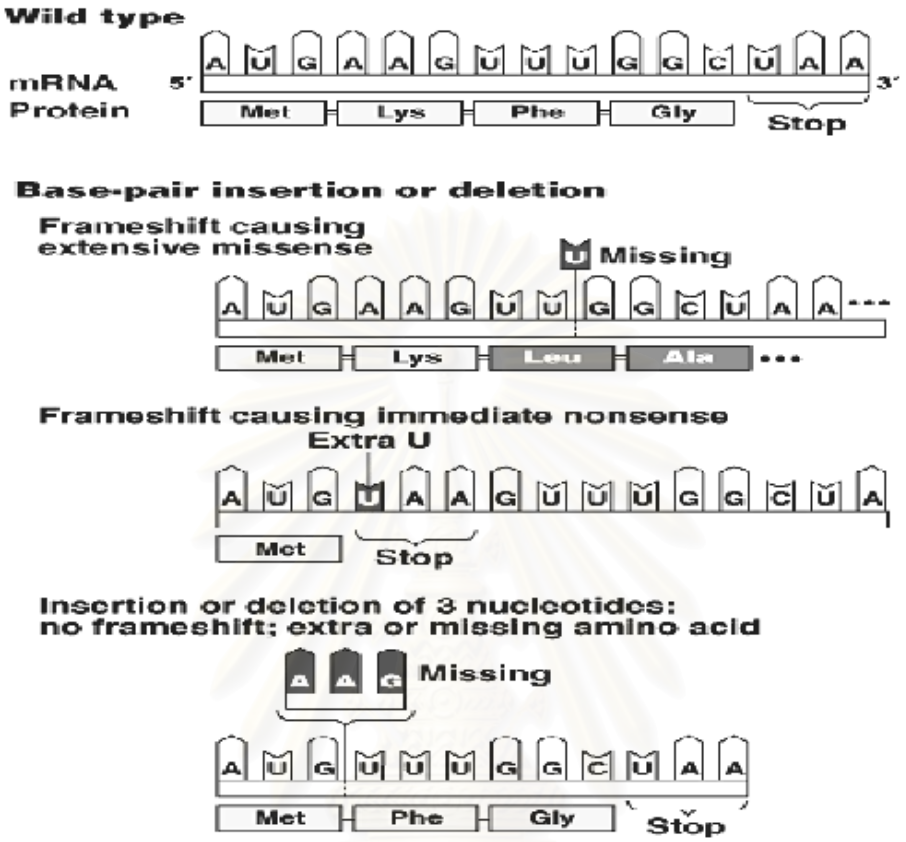
การเปลี่ยนเบสมีผลให้เกิดการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรม (genetic codon) ทำให้เปลี่ยนกรดอะมิโน หรือเบสในรหัสพันธุกรรมเปลี่ยนเป็นเกิดกรดอะมิโนใหม่ ทำให้สายพอลิเพพไทด์เปลี่ยนจากเดิม

- การกลายพันธุ์แบบนอนเซ้นต์ (Nonsense mutation)

การเปลี่ยนเบสมีผลให้เกิดการเปลี่ยนรหัสพันธุกรรม (genetic codon) ไปเป็นรหัสหยุด (termination codon) คือ เบสในรหัสพันธุกรรมเปลี่ยนเป็นรหัสสำหรับหยุดสร้างสายพอลิเพพไทด์) คือ UAA, UAG, UGA

2.9.1.2 การสอดแทรกของนิวคลีโอไทด์ (Insertion) หรือการตัดออกของนิวคลีโอด์ (Deletion)

การเปลี่ยนเบสโดยการสอดแทรกหรือการตัดออก มีผลทำให้ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่อยู่ในโมเลกุลสายดีเอ็นเอเกิดการเคลื่อนตัวไปหรือมีรหัสพันธุกรรมเปลี่ยน ส่งผลกระทบต่อการสังเคราะห์สายพอลิเพพไทด์ ทำให้สายสั้นลง หรือยาวขึ้น หรือทำให้ไม่ทำงาน (nonfunction) เรียกการการกลายพันธุ์แบบนี้ว่า การกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟ (Frameshift Mutation)



รูปที่ 2.8 แสดงการเกิดการกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟ (Frameshift Mutation) (Goodenough, 1978)

2.9.2 การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม (Chromosomal mutation)

การที่โครโมโซมเปลี่ยนไปโดยอาจมีผลต่อจำนวน หรือ โครงสร้างของโครโมโซม การกลายพันธุ์ระดับนี้มีผลต่อยีนเป็นจำนวนมาก สิ่งมีชีวิตที่มีความผิดปกติมักแสดงอาการมากกว่า 1 อาการ จึงเรียกความผิดปกติที่เกิดจากการกลายพันธุ์ระดับโครโมโซมว่า กลุ่มอาการ (syndrome) ถ้ายีนมีความผิดปกติมากๆ อาจทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นผิดปกติมากจนไม่อาจมีชีวิตอยู่ได้ การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซมนี้ นอกจากจะสามารถเห็นได้จากลักษณะทางฟีโนไทป์ แล้วยังสามารถใช้กล้องจุลทรรศน์ศึกษารูปร่าง จำนวน และโครงสร้างของโครโมโซม

การกลายพันธุ์ระดับโครโมโซม มี 2 ประเภท คือ การเปลี่ยนแปลงรูปร่างโครงสร้างภายในของโครโมโซม และการเปลี่ยนแปลงจำนวนโครโมโซม

สาเหตุของการกลายพันธุ์

I. การกลายพันธุ์ที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ (Spontaneous mutation) การกลายที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาตินั้น มีโอกาสเกิดขึ้นน้อยมาก คือมีโอกาสน้อยกว่า 1 ในล้านเซลล์ โดยสาเหตุของการเกิดการกลายพันธุ์ขึ้นเองตามธรรมชาตินั้นคาดว่าน่าจะเกิดจากรังสีคอสมิก หรือเกิด tautomeric shift ของเบสในสายเดิมของสายดีเอ็นเอ ดังนั้นเมื่อมีการสังเคราะห์สายดีเอ็นเอขึ้นใหม่ก็จะเกิดการจับคู่ของเบสในสายดีเอ็นเอผิดไป (Gardner, 1975)

II. การกลายพันธุ์ที่เกิดจากการชักนำ (Induce mutation) การเกิดการกลายพันธุ์นี้เกิดในอัตราที่สูง โดยการใช้สารชักนำ หรือสิ่งก่อกลายพันธุ์ (mutagenic agent หรือ mutagen) (Goodenough, 1978) ซึ่งสิ่งก่อกลายพันธุ์ที่ใช้ชักนำนี้ ได้แก่ สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ เช่น อุณหภูมิและรังสีต่างๆ และสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี เช่น สารเคมีต่างๆ กระบวนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ ด้วยสารชักนำให้เกิดการกลายดังกล่าว เรียกว่า mutagenesis

สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพ

จากที่ได้พบการเกิดการกลายพันธุ์ทางกายภาพโดยใช้รังสีเอ็กซ์ ในแมลงหวี่ (*Drosophila melanogaster*) ทำให้มีงานวิจัยเกี่ยวกับการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้รังสีต่างๆ กับสิ่งมีชีวิตตามมา (Bos และ Stadler, 1996) รังสีเป็นสิ่งก่อกลายพันธุ์ทางกายภาพที่สำคัญในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์และด้วยความยาวคลื่นของรังสีที่ต่างกันทำให้มีผลต่อการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในรูปแบบที่แตกต่างกัน (Weaver และ Hedrick, 1977) สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

I. รังสีที่ก่อให้เกิดไอออน (ionizing radiation) ได้แก่ รังสีเอกซ์ รังสีแกมมา รังสีแอลฟา รังสีบีตา เป็นต้น รังสีเหล่านี้มีอำนาจในการทะลุทะลวงสูง โดยทะลุทะลวงผ่านเนื้อเยื่อต่างๆ และทำให้อิเล็คตรอนที่เรียงอยู่วงนอกสุดในโครงสร้างอะตอมหลุดออกไป ทำให้ไอออนเกิดเป็นประจุบวก ส่วนอิเล็คตรอนที่หลุดออกมานี้จะเคลื่อนที่ด้วยความเร็วสูงไปชนอะตอมอื่นๆ จนพลังงานของอิเล็คตรอนลดลง จากการเกิดประจุบวกและลบทำให้ต้องเกิดปฏิกิริยาเคมีทำให้ประจุเป็นกลาง เพื่อให้โครงสร้างของอะตอมคงที่ ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นมีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น ทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมและโครมาติด โดยบริเวณที่แตกนี้จะเกี่ยวข้องกับส่วนที่ต่อกันของน้ำตาล และหมู่ฟอสเฟตของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ทำให้เกิดการตัดออกและการสอดแทรก

II. รังสีที่ไม่ก่อให้เกิดไอออน (nonionizing radiation) ได้แก่ แสงอัลตราไวโอเลต รังสีประเภทนี้จะไม่ก่อให้เกิดไอออนตามทางที่เคลื่อนผ่าน เนื่องจากมีอำนาจในการทะลุทะลวงต่ำกว่ารังสีประเภทแรก ทำให้เกิดการแทนที่

สิ่งก่อกลายพันธุ์ทางเคมี

เป็นการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์โดยใช้สารเคมีต่างๆ (Moore และ Frazer, 2002) ดังนี้

I. สารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบส (base analog) เป็นสารเคมีที่มีโครงสร้างคล้ายคลึงกับเบสบางตัวในสายดีเอ็นเอ จึงสามารถเข้าไปแทนที่ได้ เป็นผลให้สายดีเอ็นเอมีสารเคมีนั้นแทรกอยู่ เมื่อเกิดการถ่ายแบบดีเอ็นเอ จะทำให้มีการเข้าคู่แบบสุ่ม ซึ่งจะทำให้สายดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ขึ้นผิดไปจากเดิม สารเคมีชนิดนี้ เช่น 5-โบรโมยูราซิล ที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบสไทมีน และ 2-อะมิโนเพียวรีน ที่มีโครงสร้างคล้ายกับเบสอะดีนีน เป็นต้น

II. สารเคมีที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเบส (base modifying agent) ได้แก่ กรดไนตรัส ซึ่งทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายหมู่อะมิโนของเบสไซโทซีนออกไปแล้วเปลี่ยนเป็นกลุ่มคีโตแทน ทำให้เบสเปลี่ยนจากไซโทซีนเป็นยูราซิล และไฮดรอกซีลามีน ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกลุ่มอะมิโนของเบสไซโทซีนเป็นกลุ่มไฮดรอกไซด์แทน ทำให้เบสเปลี่ยนจากไซโทซีนเป็นไฮดรอกซิลอะมิโนไซโทซีน นอกจากนี้ยังมีสารที่ทำให้เกิดการย้ายหมู่เอธิลและเมธิลให้แก่เบส ซึ่งจัดสารประเภทนี้ในกลุ่ม alkylation agent และเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงในการก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ เช่น เอธิลมีเทนซัลโฟเนต (EMS), เอธิลอีเทนซัลโฟเนต (EES) และ เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (NTG) เป็นต้น

III. สารเคมีที่ทำให้เกิดการขาดหายไป หรือเพิ่มนิวคลีโอไทด์ในสายดีเอ็นเอ (intercalating agent) สารกลุ่มนี้ได้แก่ โพรฟลาวิน และ สีย้อมอะคริดีน (Drake, 1970) โดยสารพวกนี้จะแทรกเข้าไปอยู่ระหว่างเบสของสายดีเอ็นเอ เมื่อเกิดการถ่ายแบบดีเอ็นเอ จะทำให้การอ่านลำดับผิดปกติซึ่งอาจเกิดการขาดหายไปหรือเพิ่มขึ้นของเบส

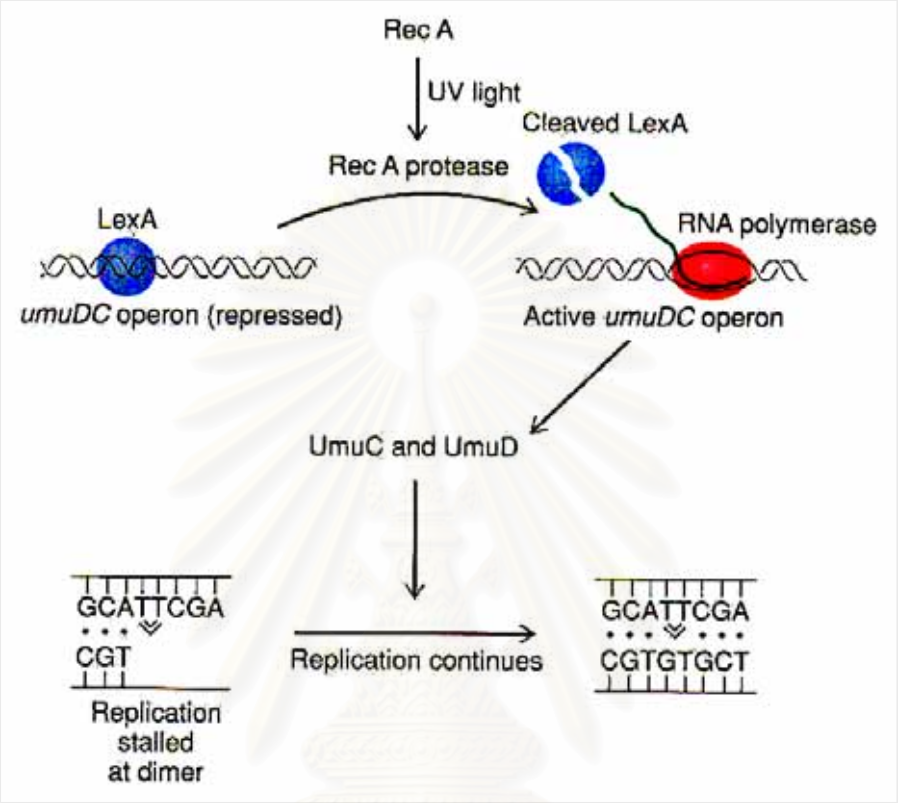
การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

แสงอัลตราไวโอเลตเป็นแสงที่ชักนำให้เกิดการกลายในกลุ่มของสารรังสี โดยรังสีที่แผ่ออกมานั้นเป็นรังสีชนิดไม่แตกตัว คือเป็นรังสีที่ไม่ทำให้เกิดประจุ มีพลังงานน้อยกว่ารังสีที่แตกตัวได้ และมี

ความสามารถในการทะลุทะลวงต่ำกว่า แสงอัลตราไวโอเลตที่มีประสิทธิภาพในการการชักนำให้เกิดการกลาย ต้องเป็นแสงอัลตราไวโอเลตที่ปล่อยพลังงานออกมาในช่วงความยาวคลื่นสั้นเท่านั้น คืออยู่ระหว่าง 200-300 นาโนเมตร และความยาวคลื่นแสงที่เหมาะสมในการชักนำให้เกิดการกลายได้ดีที่สุด ควรมีความยาวคลื่นแสง 254 นาโนเมตร เนื่องจากเป็นความยาวคลื่นที่สายดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนคลื่นแสงเข้าไปในโมเลกุลของเบสได้สูงสุด ทำให้เกิดความผิดปกติบนสายดีเอ็นเอ โดยจะทำให้เบสไพริมิดีน 2 โมเลกุลที่อยู่ชิดกันบนสายดีเอ็นเอเดียวกัน มีการเชื่อมต่อกันด้วยพันธะโคเวเลนต์เกิดเป็นไทมีน-ไทมีนไดเมอร์ (Drake, 1970) ดังแสดงในรูป 2.9 หรือ ไทมีน-ไซโทซีนไดเมอร์ หรือ ไซโทซีน-ไซโทซีนไดเมอร์ ซึ่งอาจจะเกิดได้ในอัตราส่วน 2:1:1 หรืออาจมีสาเหตุมาจากการเกิดไดเมอร์บนสายดีเอ็นเอเดียวกันแล้วทำให้เกิดการบิดตัวของดีเอ็นเอสายคู่ไปจนเสียรูป การเกิดไดเมอร์จะมีผลต่อการถ่ายแบบของดีเอ็นเอ เพราะพันธะโคเวเลนต์ที่เกิดขึ้นจะทำให้ไดเมอร์ไม่สามารถแยกออกจากกัน ส่งผลให้ไทมีนไม่สามารถจับคู่กับอะดีนีนของสายดีเอ็นเอที่อยู่ตรงข้ามได้ เมื่อสายดีเอ็นเอต้องการถ่ายแบบจึงต้องมีกลไกมาซ่อมแซม จึงอาจทำให้เกิดการผิดพลาด จากการนำเอาเบสคู่ใหม่เข้ามาแทนที่ ผลจากการชักนำให้เกิดการกลายโดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต ส่วนใหญ่จะเกิดการกลายแบบ AT $\rightarrow$ GC ซึ่งเป็นการแทนที่แบบทรานสิชัน และอาจพบการแทนที่แบบทรานสเวอร์ชัน, การกลายพันธุ์แบบเฟรมชิฟ และการตัดออกได้เช่นกัน (Gardner, 1975)

SOS repair หรือ Recombination repair เป็นการซ่อมแซมที่เกิดขึ้นหลังจากมีการแยกสายพอลินิวคลีโอไทด์ขณะที่มีการถ่ายแบบตัวเอง เมื่อมีการอ่านรหัสมาถึงบริเวณนี้ เอนไซม์ดีเอ็นเอพอลิเมอเรสจะนำเบสมาเติมในส่วนที่ขาดหรือผิดปกติแบบสุ่ม และใช้สายดีเอ็นเอที่ซ่อมแซมแล้วเป็นแม่แบบต่อไป ดังนั้นการซ่อมแซมแบบนี้มีผลทำให้เกิดการกลายพันธุ์ เป็นกระบวนการที่ซับซ้อน (รูปที่ 2.11)

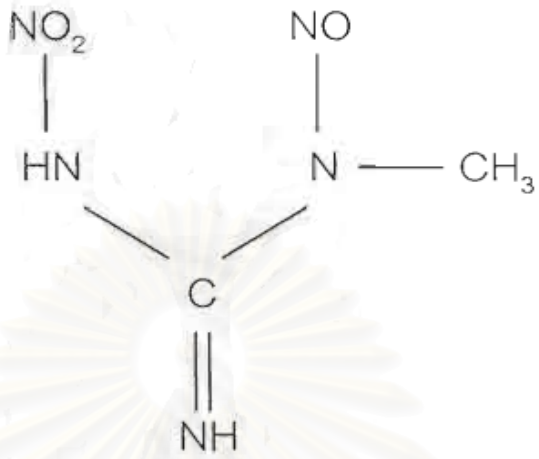
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 2.11 แสดงการซ่อมแซมโดยกระบวนการ SOS repair หรือ Recombination repair (Brown, 1992)

การกลายพันธุ์ด้วย NTG

เอ็น-เมธิล-เอ็น-ไนโตร-เอ็น-ไนโตรโซกัวนิดีน (NTG) เป็นสารประกอบทางเคมี มีสูตรโมเลกุล $C_2H_5N_5O_3$ และมีสูตรโครงสร้างดังแสดงในรูปที่ 2.12 น้ำหนักโมเลกุล 147.1 หน่วย ละลายน้ำได้สูงสุด 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จุดหลอมเหลว 116-118°ซ สามารถชักนำให้เกิดการกลายได้ดีในช่วงค่าความเป็นกรด-เบสระหว่าง 6.0-9.0 (Mendel และ Greenberg, 1960)



รูปที่ 2.12 แสดงโครงสร้างของ NTG (Fincharm และ Day, 1971)

NTG เป็นตัวอย่างของสารที่ชักนำให้เกิดการกลายในกลุ่มของ alkylation agent ที่นิยมใช้กันอย่างกว้างทั้งแบคทีเรียและรา เพราะเป็นสารที่ชักนำให้เกิดการกลายที่มีความรุนแรงสูงมากที่สุด โดยมีสมบัติทำให้เกิดการย้ายหมู่แอลคิลตั้งแต่ 1 หมู่ขึ้นไปให้กับสารอื่นๆ ได้ การทำงานของ NTG ต้องมีการแตกตัวจึงจะมีสมบัติเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายได้ NTG สามารถแตกตัวเป็นกรดไนตรัสได้อย่างรวดเร็วในภาวะที่เป็นกรด โดยเฉพาะอย่างยิ่งใน HCl 0.1 โมลาร์ ส่วนในภาวะที่เป็นเบส NTG จะแตกตัวอย่างรวดเร็วเป็นไดอะโซมีเทน (CH_2N_2) แล้วเข้าจับกับสายดีเอ็นเอภายในเซลล์แบคทีเรียอย่างรวดเร็วในการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในแบคทีเรีย โดยชักนำให้เกิดการเติมหมู่แอลคิล 1 หมู่ให้กับเบส จากนั้นชักนำให้คู่เบสที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเข้ามาอยู่แทนที่เบสปกติในระหว่างการถ่ายแบบดีเอ็นเอ ทำให้เบสบนสายดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลงไป การเติมหมู่แอลคิลจะเกิดที่ตำแหน่งไนโตรเจนหรือออกซิเจนของเบสแต่ละชนิด คือ ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 3 ของเบสอะดีนีน ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 4 ของเบสไซโทซีน ไนโตรเจนตำแหน่งที่ 3 ของเบสกวานีน ออกซิเจนตำแหน่งที่ 6 ของเบสกวานีน และออกซิเจนตำแหน่งที่ 4 ของเบสไทมีน การเคลื่อนย้ายของหมู่แอลคิลมีผลโดยตรงต่อการจับคู่กันผิดของเบสที่มีหมู่แอลคิลเข้าไปอยู่ และมีผลทางอ้อมต่อการซ่อมแซมสายดีเอ็นเอ โดยทำให้การซ่อมแซมผิดพลาดได้ถึง 90% ของการกลายพันธุ์ การกลายพันธุ์ด้วย NTG มักเกิด การแทนที่แบบทรานสิชันแบบ GC→AT การชักนำให้เกิดการกลายด้วย NTG นั้น นิยมละลาย NTG ในสารละลายกรดไทรมาเลอิก ค่าความเป็นกรด-เบส 8.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เนื่องจาก NTG จะ

เข้าไปจับกับสายดีเอนเอที่กำลังถ่ายแบบในช่วง replication fork ดังนั้น NTG จะมีประสิทธิภาพมากที่สุดในการทำให้เกิดการกลายพันธุ์ ถ้าถูกใช้ในขณะที่เซลล์กำลังมีการแบ่งตัว ปัจจัยหลักที่สำคัญของการใช้ NTG เป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ คือ ความเข้มข้น โดยความเข้มข้นของ NTG ยิ่งมาก ร้อยละการรอดของแบคทีเรียก็จะยิ่งต่ำลง ทำให้พบแบคทีเรียที่เกิดการกลายพันธุ์ไปแล้วจำนวนมาก และช่วงความเข้มข้นที่นิยมใช้คือความเข้มข้นที่ทำให้แบคทีเรียมีร้อยละการรอดอยู่ระหว่าง 0-50

2.10 การปรับปรุงสายพันธุ์ที่ผลิตไนซิน

Kalra และคณะ (1973) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ *Streptococcus lactis*-6 โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต พบว่า ในการฉายรังสีครั้งที่ 2 มีอัตราการอยู่รอด 0.26 % และพบว่าความสามารถในการผลิตไนซินเท่ากับ 1,028 RU/ml เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้นซึ่งผลิตไนซินได้เพียง 500 RU/ml ซึ่งสายพันธุ์กลายสามารถผลิตไนซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นถึง 100 %

De Vuyst และ Vandamme (1993) ได้เลี้ยง *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* สายพันธุ์ NIZO 22186 ในอาหาร CM ที่มีการแปรผันปริมาณ KH_2PO_4 0-5% พบว่า KH_2PO_4 5% ทำให้เชื้อสามารถผลิตไนซินได้สูงสุด และถ้าใช้สารสกัดจากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งไนโตรเจนจะช่วยเพิ่มความสามารถในการผลิตไนซินได้อีก

Quiao และคณะ (1996) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ N8 โดยการใช้กระแสไฟฟ้า แล้วนำมาใส่ในพลาสมิด M17GS พบว่าสายพันธุ์กลาย LAC 48 สามารถผลิตไนซินได้มากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นถึงประมาณ 10 เท่า คือ 2.8×10^{-5} IU/cfu

Van Kraaij และคณะ (1997) ได้ปรับปรุงสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ NZ9800 โดยทำการเปลี่ยนชนิดของกรดอะมิโนบริเวณตำแหน่ง C-terminal พบว่าความสามารถในการยับยั้ง *Streptococcus thermophilus* ลดลง 3-5 เท่า เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงชนิดของกรดอะมิโน ทำให้ประจุลบมีการเปลี่ยนแปลงด้วย ซึ่งประจุลบนี้มีผลต่อความสามารถในการยับยั้ง *Streptococcus thermophilus*

Kim และคณะ (1998) ได้เพิ่มยีนต้านทานซึ่งคล้ายกับที่อยู่ใน nisin-production transposon ใน *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* MG1363 พบว่าสายพันธุ์กลายมีอัตราการเจริญที่เร็วกว่าและสามารถผลิตไนซินได้มากกว่าในสายพันธุ์ตั้งต้นถึง 1.5 เท่า

Chan-Ick และคณะ (2002) ได้หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ ATCC 11454 พบว่า อาหารที่ประกอบด้วยซูโครส 1%, ซอยบีน เพพโตน 0.45%, สารสกัดจากยีสต์ 1%, KH_2PO_4 2.84%, NaCl 0.2% และ $MgSO_4 \bullet 7H_2O$ 0.02% สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุด

Cheigh และคณะ (2002) ได้หาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ A164 พบว่า อาหาร M17 ที่เติมแลคโทส 3% สามารถสร้างไนซินได้เพิ่มขึ้นถึง 4 เท่าเมื่อเทียบกับอาหาร M17 เดิม และใช้สารสกัดจากยีสต์ 3% ที่อุณหภูมิ 30°ซ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6

Jozala และคณะ (2004) ได้หาภาวะที่เหมาะสมของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ ATCC 11454 พบว่า การเติมนม 25% ในอาหาร M17 ทำให้เพิ่มความสามารถในการสร้างและปลดปล่อยไนซินของเชื้อได้ดีที่สุด

Babalola (2007) ได้ปรับปรุงการผลิตไนซินของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ WO81 และ N13L โดยทำการเลี้ยงในอุณหภูมิ 30°ซ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6 และใช้ KH_2PO_4 เป็นแหล่งฟอสเฟต พบว่าเชื้อสามารถผลิตไนซินได้ดีที่สุด

ในงานวิจัยนี้มุ่งเน้นที่จะปรับปรุงความสามารถในการผลิตไนซินของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 โดยการกลายพันธุ์โดยใช้แสงอัลตราไวโอเลต และ NTG และหาภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อสายพันธุ์กลายนั้น เพื่อพัฒนาไปใช้ในการผลิตไนซินในระดับขยายส่วนต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์ เคมีภัณฑ์ วิธีและขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer) รุ่น 502P-2 บริษัท PMC, U.S.A.
2. เครื่องชั่ง รุ่น PG2002-S และ AG285 ของบริษัท METTLER TOLEDO, Switzerland.
3. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น MLS3020 ของบริษัท SANYO, Japan.
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge) รุ่น 6500 ของบริษัท Kubota, Japan.
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดกลาง รุ่น AG-506R
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น AG-2506
5. เครื่องปั่นเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerate Centrifuge) รุ่น 1920 ของบริษัท Kubota, Japan
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดเล็ก รุ่น RA50J
    - หัวปั่นเหวี่ยง (rotor) ขนาดใหญ่ รุ่น RA228J
6. เครื่องผสมสาร (Vortex-Genie 2) รุ่น G-560E บริษัท Scientific Industries Inc., U.S.A.
7. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น Lamda 25 ของบริษัท Perkin Elmer, USA.
8. เครื่องวัดความเป็นกรด-เบส (pH meter) รุ่น 240 ของบริษัท Corning, USA.
9. ตู้เขี่ยเชื้อรุ่น Clean model. V4 ของบริษัท LAB Service, Thailand.
10. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -70°ซ รุ่น ULT1786 ของบริษัท Forma Scientific, USA.
11. ตู้แช่แข็งจุดเยือกแข็งต่ำ (deep freezer) อุณหภูมิ -20°ซ รุ่น MDF-U332 ของบริษัท Sanyo Electric, Japan.
12. ตู้บ่มเชื้อ (incubator) รุ่น D06061 ของบริษัท Memmert, Germany
13. ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) รุ่น D06063 ของบริษัท Memmert, Germany.

14. ไมโครปิเปตต์ (micropipette) รุ่น P10 P20 P200 P1000 ของบริษัท Gilson, France.
15. หลอดแสงอัลตราไวโอเลต (Ultraviolet lamp) ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร G30T8 30W บริษัท Sankyo Denki, Japan
16. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Temppet บริษัท T-80 Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan และรุ่น W 760 Memmert, Germany
17. ชุดกรองสำเร็จรูปชนิดเซลลูโลสอะซีเตต ขนาดความกว้างรู 0.45 ไมโครเมตร รุ่น DISMIC-25SC ของบริษัท Tokyo Roshi Kaisha, Japan.
18. กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 1 มิลลิลิตร และ 5 มิลลิลิตร ของบริษัท Nissho Nipro, Japan.

3.2 เคมีภัณฑ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) บริษัท Merck, Germany.
2. ไดโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) บริษัท Merck, Germany.
3. โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy.
4. สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract) บริษัท Difco, U.S.A.
5. สารสกัดจากเนื้อ (Beef extract) บริษัท Difco, U.S.A.
6. ทริปโตน (Tryptone) บริษัท Difco, U.S.A.
7. แมกเนเซียมซัลเฟต ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) บริษัท Carlo Erba Regenti, Italy.
8. กรดเกลือ (HCl) บริษัท J.T. Baker, U.S.A.
9. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัท Merck, Germany.
10. เอธานอล (Ethanol) กรมสรรพมิต, ประเทศไทย.
11. เอน-เมทิล-เอน-ไนโตร-เอน-ไนโตรโซกัวนิดีน (N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine, $C_2H_5N_5O_3$) บริษัท Nagalai Tesque Inc., Japan.
12. เพปโตน (peptone) บริษัท Becton, Dickinson and Company, U.S.A.
13. แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 \cdot H_2O$) บริษัท Merck, Germany.

14. ซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck, Germany.
15. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Merck, Germany.
16. กาแลคโทส (galactose) ของบริษัท Merck, Germany.
17. แลคโทส (lactose) ของบริษัท Merck, Germany.
18. ฟรุกโทส (fructose) ของบริษัท Merck, Germany.

หมายเหตุ สารเคมีที่ใช้ในการทดลองทุกชนิดเป็นชนิดเพื่อการวิเคราะห์ (analytical grade)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.3 วิธีและขั้นตอนดำเนินงานวิจัย

3.3.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2

3.3.1.1 *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบโดยนางสาว ไปรมา แก้วสามศรี, 2550 ซึ่งเลี้ยงในอาหาร Lactobacillus deMan Rogosa Sharpe medium (MRS) (ภาคผนวก ก) เก็บรักษาโดยขีดแบคทีเรีย ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (slant agar) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ จนเชื้อเจริญเต็มที่แล้ว เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°ซ จนกว่าจะนำมาใช้ เก็บรักษา *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ในอาหาร MRS นำมาผสมกับกลีเซอรอล (ภาคผนวก ข) ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของกลีเซอรอลเท่ากับ 20% (v/v) บรรจุลงในหลอดเก็บเชื้อแช่แข็ง เก็บที่อุณหภูมิ -20 °ซ เป็นเวลา 6 เดือน หรือที่อุณหภูมิ –70 °ซ เป็นเวลา 1 ปี

3.3.1.2 ปลูกเชื้อตั้งต้นจากข้อ 3.3.1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 50 มล. ซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สร้างกราฟแสดงการเจริญของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 เพื่อหาระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase)

3.3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

3.3.2.1 การหาร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

3.3.2.1.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตตามวิธีข้อ 3.3.1.2 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ ที่เวลา 9 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ใน

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 เซลล์ต่อมล.

3.3.2.1.2 ปิเปตต์เซลล์แขวนลอย 10 มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงโดยใช้แท่งกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)

3.3.2.1.3 ชักนำการกลายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กำลังงาน 30 วัตต์ 1 หลอด ระยะห่างจากแสง 20 เซนติเมตร โดยมีการกวนที่ระยะเวลาการฉายแสงต่างกันทุกๆ 10 วินาที ตั้งแต่ 0-200 วินาที

3.3.2.1.4 ปิเปตต์เซลล์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว ทำการเจือจางแบบอนุกรมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มล. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดแข็ง แล้วนำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้ในช่วงการฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่างๆ กัน คำนวณร้อยละของการรอดโดยสร้างกราฟการอยู่รอด เพื่อศึกษาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ โดยคัดเลือกช่วงเวลาที่เชื้อมีค่าร้อยละการรอด 0.1 – 5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ที่จะให้ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด

3.3.2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

3.3.2.2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตตามวิธีข้อ 3.3.1.2 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ ที่เวลา 9 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 เซลล์ต่อมล.

3.3.2.2.2 ปิเปตต์เซลล์แขวนลอย 10 มล. ลงในจานเพาะเลี้ยงโดยใช้แท่งกวนแม่เหล็ก (Magnetic stirrer)

3.3.2.2.3 ชักนำการกลายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร กำลังงาน 30 วัตต์ 1 หลอด ระยะห่างจากแสง 20 เซนติเมตร โดยมีการกวนที่ระยะเวลาการฉายแสงต่างกันทุกๆ 10 วินาที ตั้งแต่ 0-200 วินาที

3.3.2.2.4 ปิเปตต์เซลล์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว ทำการเจือจางแบบอนุกรมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มล. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดแข็ง แล้วนำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.2.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้ในช่วงการฉายแสงอัลตราไวโอเลตต่างๆ กัน คำนวณร้อยละของการรอดโดยสร้างกราฟการอยู่รอด เพื่อศึกษาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ โดยคัดเลือกช่วงเวลาที่เชื้อมีค่าร้อยละการรอด 0.1 – 5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ที่จะให้ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด

3.3.2.2.6 นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.2.2.5 มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการราดทับด้วยเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว MRS ที่มีวุ้นปริมาณ 0.75% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วราดทับลงบนจานเพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมปริมาตรของวุ้นเท่ากับ 15 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30-37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นตัวชี้บ่งการสร้างไนซิน เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสกับสายพันธุ์ตั้งต้น

3.3.2.2.7 คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างของบริเวณใสมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นนำมาหาปริมาณไนซินที่สร้างได้ต่อไป

3.3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG

3.3.3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NTG ในการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis*

3.3.3.1.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการกลายพันธุ์ด้วย NTG ตามวิธีข้อ 3.3.1.2 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ ที่เวลา 9 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในทริส-มาลิอิก บัฟเฟอร์ ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 เซลล์ต่อมล.

3.3.3.1.2 นำสารละลาย NTG ในทริส-มาลิอิกบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0 แล้วปิเปตต์ลงในหลอดที่มีเซลล์แขวนลอยอยู่ ให้มีความเข้มข้นของ NTG เท่ากับ 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เก็บตัวอย่างเซลล์ทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 60 นาที

3.3.3.1.3 นำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ และล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0

3.3.3.1.4 ปิเปตต์เซลล์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว ทำการเจือจางแบบอนุกรมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มล. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดแข็ง แล้วนำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.1.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้ใน NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คำนวณร้อยละของการรอดโดยสร้างกราฟการอยู่รอด เพื่อศึกษาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ โดยคัดเลือกความเข้มข้นของ NTG ที่เชื้อมีค่าร้อยละการรอด 0-50 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ที่จะให้ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด

3.3.3.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG

3.3.3.2.1 เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการกลายพันธุ์ด้วย NTG ตามวิธีข้อ 3.3.1.2 เมื่อเชื้อเจริญอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ ที่เวลา 9 ชั่วโมง นำสารละลายที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ ล้างเซลล์ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในทริส-มาลิอิก บัฟเฟอร์ ปรับความหนาแน่นของเซลล์ให้อยู่ในช่วง 10^6-10^7 เซลล์ต่อมล.

3.3.3.2.2 นำสารละลาย NTG ในทริส-มาลิอิกบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0 แล้วปิเปตต์ลงในหลอดที่มีเซลล์แขวนลอยอยู่ ให้มีความเข้มข้นของ NTG เท่ากับที่เลือกไว้ในข้อ 3.3.3.1.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เก็บตัวอย่างเซลล์ทุกๆ 10 นาที เป็นเวลา 60 นาที

3.3.3.2.3 นำเซลล์ที่ได้มาปั่นด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ และล้างเซลล์จำนวน 2 ครั้งด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ ที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.0

3.3.3.2.4 ปิเปตต์เซลล์ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้ว ทำการเจือจางแบบอนุกรมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85% (น้ำหนักต่อปริมาตร) กระจายเซลล์แขวนลอย 0.1 มล. บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดแข็ง แล้วนำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.3.2.5 นับจำนวนโคโลนีที่เจริญได้ในช่วงเวลาการสัมผัส NTG ต่างๆ กัน คำนวณร้อยละของการรอดโดยสร้างกราฟการอยู่รอด เพื่อศึกษาอัตราการอยู่รอดของเซลล์ โดยคัดเลือกช่วงเวลาที่เชื้อมีค่าร้อยละการรอด 0-50 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ที่จะให้ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด

3.3.3.2.6 นำจานเพาะเลี้ยงเชื้อจากข้อ 3.3.3.2.5 มาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยการราดทับด้วยเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว MRS ที่มีวุ้นปริมาณ 0.75% (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วราดทับลงบนจาน

เพาะเลี้ยงที่มีการควบคุมปริมาตรของวุ้นเท่ากับ 15 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 30-37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้น ซึ่งเป็นตัวชี้บ่งการสร้างไนซิน เปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสกับสายพันธุ์ตั้งต้น

3.3.3.2.7 คัดเลือกสายพันธุ์ที่ให้ความกว้างของบริเวณใสมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น จากนั้นนำมาหาปริมาณไนซินที่สร้างได้ต่อไป

3.3.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยวิธีวัดความขุ่น (turbidiometric bioassay)

3.3.4.1 กราฟมาตรฐานของไนซิน

เตรียมไนซินบริสุทธิ์ที่ละลายอยู่ในสารละลาย HCl 0.02 นอร์แมล โดยแปรผันความเข้มข้นของไนซินให้อยู่ในช่วงระหว่าง 0-1,000 IU/ml แล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จากนั้นนำมาทดสอบด้วยเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน คือ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 บ่มที่อุณหภูมิ 30-37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร แล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของไนซิน เลือกช่วงความเข้มข้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรง

3.3.4.2 การหาปริมาณไนซินของเชื้อสายพันธุ์กลายโดยวิธีวัดความขุ่น

3.3.4.2.1 นำเชื้อที่ผ่านการคัดเลือกในข้อ 3.3.2.2.7 และ 3.3.3.2.7 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เพื่อเตรียมเป็นหัวเชื้อตั้งต้นบ่มที่ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3.4.2.2 นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากข้อ 3.3.4.2.1 มาปั่นแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4°ซ แยกส่วนใสมาวิเคราะห์หาปริมาณไนซิน โดยปิเปตต์ส่วนใสปริมาตร 50, 200, 500 และ 1000 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยให้มีปริมาตรรวมทั้งหมดเท่ากับ 5 มล.

3.3.4.2.3 ปิเปตต์เชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน คือ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว MRS ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เป็น 0.6 ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองข้อ 3.3.4.2.2 เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วนำไปบ่มที่ 37°ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง

3.3.4.2.4 นำมาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไนซิน (IU/ml) เทียบกับกราฟมาตรฐานของไนซิน

3.3.5 การทดสอบความเสถียรในการสร้างไนซินของสายพันธุ์กลาย

นำแบคทีเรียสายพันธุ์กลายที่ได้จากการคัดเลือก มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ชนิดเหลว เพื่อการผลิตไนซิน วิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยวิธีวัดความขุ่น (turbidimetric assay) (Turcotte และคณะ, 2004) ซึ่งใช้สายพันธุ์กลายที่ผ่านการถ่ายเชื้อมาแล้ว 5 ครั้ง ทำโดยปิเปตต์เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์กลายปริมาณ 0.1% (ปริมาตรต่อปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ) ลงในอาหาร MRS ชนิดเหลว จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง คัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ยังสามารถผลิตไนซินได้อย่างสม่ำเสมอ และมีปริมาณมากกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น

3.3.6 ศึกษาหาชนิดและปริมาณของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย เพื่อการผลิตไนซิน

3.3.6.1 ชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย เพื่อการผลิตไนซิน

นำเชื้อสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยแปรผันชนิดของน้ำตาล ชนิดของน้ำตาล ได้แก่ กลูโคส ฟรุกโทส กาแลคโทส ซูโครส และแลคโทส โดยปรับให้มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับปริมาณแหล่งคาร์บอนที่มีทั้งหมดในอาหาร MRS คือ กลูโคส ฟรุกโทส และกาแลคโทส 2.2%(มวลต่อปริมาตร) ซูโครส และแลคโทส 1.1%(มวลต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ง) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวิธีวัดความขุ่น ซึ่งวัดค่า

ดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไนซิน (IU/ml) เทียบกับกราฟมาตรฐานในข้อ 3.3.4.1

3.3.6.2 ปริมาณของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย เพื่อการผลิตไนซิน

จากข้อ 3.3.6.1 เลือกใช้น้ำตาลที่เหมาะสมสำหรับการผลิตไนซิน ได้แปรผันปริมาณน้ำตาลที่เลือกได้จากข้อ 3.3.6.1 เป็น 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 30° ซ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวิธีวัดความขุ่น ซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไนซิน (IU/ml) เทียบกับกราฟมาตรฐานในข้อ 3.3.4.1

3.3.7 ศึกษาชนิดของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย เพื่อการผลิตไนซิน

นำเชื้อสายพันธุ์กลายในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยแปรผันชนิดของไนโตรเจน ชนิดของอินทรีย์ไนโตรเจน ได้แก่ ทริปโตน, สารสกัดจากยีสต์, เพปโตน และสารสกัดจากเนื้อ ชนิดของอนินทรีย์ไนโตรเจนได้แก่ $NH_4H_2PO_4$, $NH_4(NO_3)_2$, $Ca(NO_3)_2$ และ KNO_3 โดยคำนวณให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่มีทั้งหมดในอาหาร MRS คือ 3.614% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ง) บ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยวิธีหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวิธีวัดความขุ่น ซึ่งวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณไนซิน (IU/ml) เทียบกับกราฟมาตรฐานในข้อ 3.3.4.1

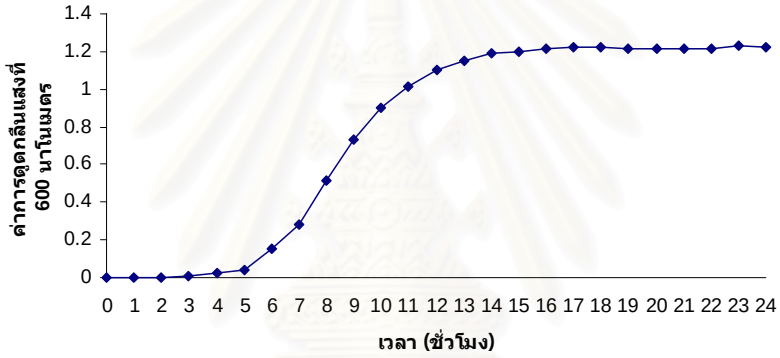
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ศึกษารูปแบบการเจริญของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2

เลี้ยง *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นในงานวิจัยนี้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS (ภาคผนวก ก) ที่อุณหภูมิ 30°ซ วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ที่ระยะเวลาต่างๆ ได้ ดังแสดงผลในรูปที่ 4.1



รูปที่ 4.1 แสดงการเจริญของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

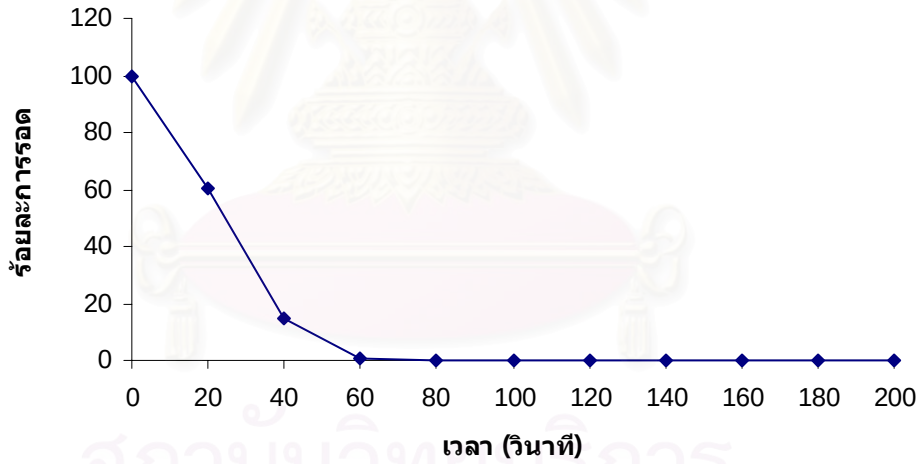
เมื่อเลี้ยง *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ในอาหาร MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วพบว่าการเจริญในระยะกึ่งกลางทวีคูณ (mid log phase) อยู่ที่ชั่วโมงที่ 9 ซึ่งเป็นระยะการเจริญที่เหมาะสมในการนำไปกลายพันธุ์ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต

4.2.1 การหาร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

ชักนำการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นอายุ 9 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ และดำเนินการกลายพันธุ์ตามวิธีในข้อ 3.3.2.1 จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ มาเจือจางเชื้อแบบอนุกรม เกลี่ยเชื้อที่มีความเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารแข็ง MRS แล้วนำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่รอด แล้วคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังรูปที่ 4.2 และนับโคโลนีในช่วงที่มีร้อยละการรอด 0.1-5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ซึ่งตรงกับผลที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 60-80 วินาที โดยให้ร้อยละการรอด 0.86-0.06



รูปที่ 4.2 แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

4.2.2 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 1

ชักนำการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นอายุ 9 ชั่วโมง ซึ่งอยู่ในช่วงกึ่งกลางทวีคูณ และดำเนินการกลายพันธุ์อีกครั้งตามข้อ 3.3.2.2 โดยนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 60-80 วินาทีแล้ว ทำการเจือจางเชื้อแบบอนุกรม เกลี่ยเชื้อที่มีความเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารแข็ง MRS แล้วนำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาทดสอบโดยการราดทับด้วยเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน คือ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น ได้ผลดังรูปที่ 4.3

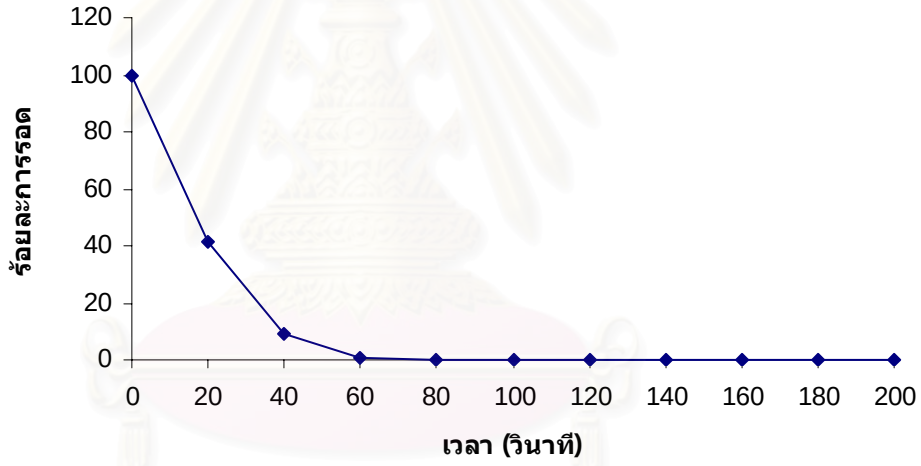
จากการทดลองพบว่า การฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลา 70 วินาที มีแบคทีเรียที่ให้บริเวณใสสูงสุดเป็น 10.0 มม. โดยระบุชื่อเป็นสายพันธุ์ MU ดังแสดงในรูปที่ 4.3

MF2 MU

รูปที่ 4.3 แสดงการเกิดบริเวณใสของ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งถูกยับยั้งโดยไนซินที่ผลิตได้จากเชื้อสายพันธุ์ MU จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตครั้งที่ 1 เป็นเวลา 70 วินาที เทียบกับสายพันธุ์ MF2

4.2.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 2

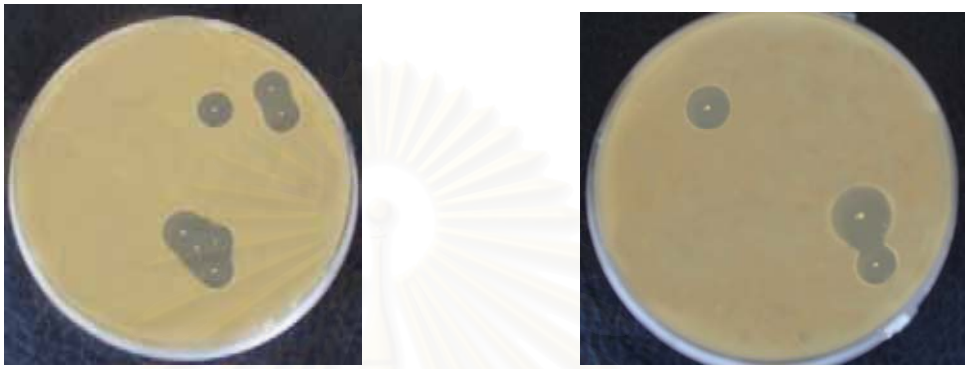
ชักนำการกลายพันธุ์ สายพันธุ์ MU ซึ่งกลายพันธุ์มาจาก *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นอายุ 9 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ ทำการเจือจางเชื้อแบบอนุกรม เกลี่ยเชื้อที่มีความเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารแข็ง MRS แล้วนำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่รอด แล้วคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังรูปที่ 4.4 และ ทำการนับโคโลนีในช่วงที่มีร้อยละการรอด 0.1-5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ซึ่งตรงกับผลที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 60-80 วินาที โดยให้ร้อยละการรอด 1.02-0.07



รูปที่ 4.4 แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

ชักนำการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์กลาย MU ซึ่งกลายพันธุ์มาจาก *Lactococcus lactis* มาทำการกลายพันธุ์ซ้ำด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 60-80 วินาทีแล้ว ทำการเจือจางเชื้อแบบอนุกรม เกลี่ยเชื้อที่มีความเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารแข็ง MRS นำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาทดสอบโดยการราดทับด้วยเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน คือ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ MU ได้ผลดังรูปที่ 4.5

หลังจากที่ฉายแสงอัลตราไวโอเลตครั้งที่ 2 พบว่าที่เวลาการฉายแสง 60 วินาที สามารถทำให้ขนาดบริเวณใสมีขนาดใหญ่ที่สุดเท่ากับ 13.2 มม. โดยระบุชื่อเป็นสายพันธุ์ MU_2 ดังแสดงในรูปที่ 4.5



MU MU_2

รูปที่ 4.5 แสดงการเกิดบริเวณใสของ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งถูกยับยั้งโดยไนซินที่ผลิตได้จากเชื้อสายพันธุ์ MU_2 จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตครั้งที่ 2 เป็นเวลา 60 วินาที เทียบกับสายพันธุ์ MU

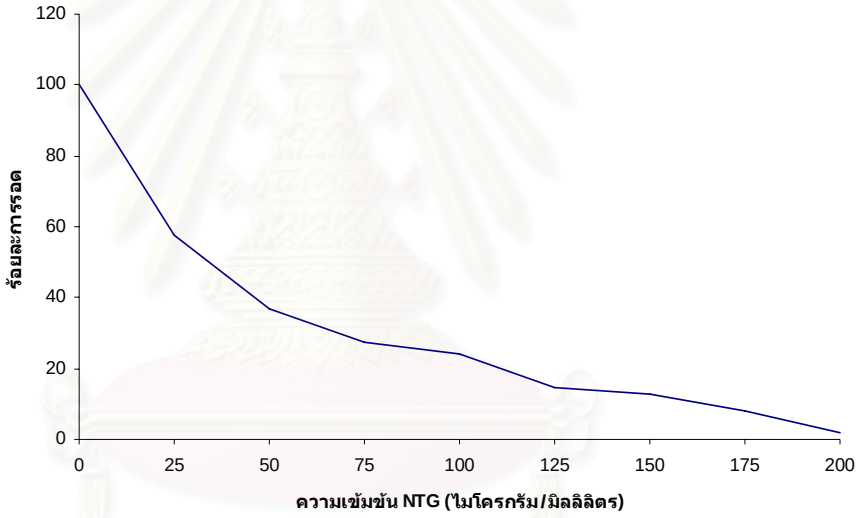
เนื่องจากผลจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในรอบที่ 3 พบว่า สายพันธุ์กลายให้ขนาดบริเวณใสเท่าเดิม เมื่อเปรียบเทียบกับการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตในรอบที่ 2 การทดลองต่อไปจึงทำการกลายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกโดยใช้ NTG แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ขนาดบริเวณใสสูงสุด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG

4.3.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ NTG ในการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2

นำเชื้อสายพันธุ์ MU_2 ซึ่งให้ขนาดบริเวณใสสูงสุดเท่ากับ 13.2 มม. มากลายพันธุ์ต่อด้วยสาร NTG ที่แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. ในทริสมาลิอิกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากการกลายพันธุ์ นำเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญและคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังรูปที่ 4.6

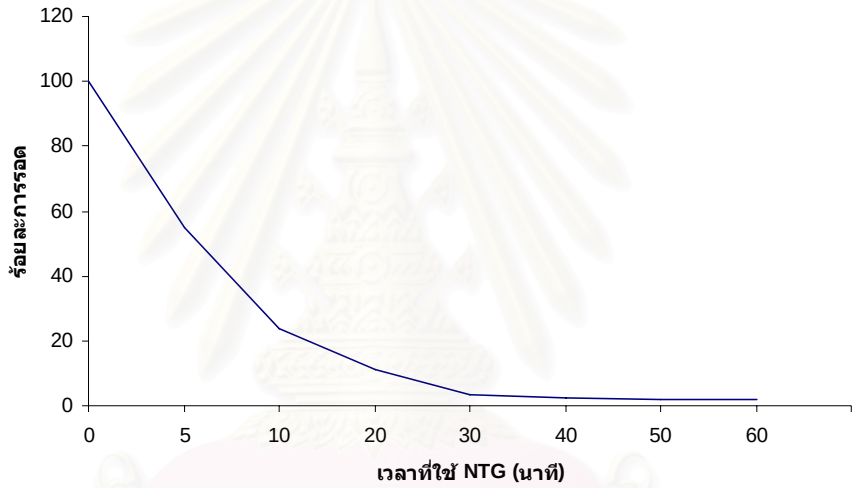


รูปที่ 4.6 แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2 ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้น 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที

การกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ให้ร้อยละการรอดอยู่ในช่วงร้อยละ 0-50 เป็นช่วงที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้ความเข้มข้น NTG เท่ากับ 50 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วทำการแปรผันเวลาในการที่เชื้อสัมผัสกับ NTG ที่จะให้ประสิทธิภาพการกลายพันธุ์ที่ดีที่สุดต่อไป

4.3.2 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2 ด้วย NTG

ในการคัดเลือกภาวะการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2 ด้วย NTG เพื่อให้ได้อัตราร้อยละการรอดอยู่ในช่วงระหว่าง 0-50 ได้คงปริมาณ NTG ไว้ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ อยู่ในช่วงระหว่าง 10-60 นาที ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.7 ซึ่งพบว่าเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อด้วย NTG เป็นเวลา 10-60 นาที เนื่องจากให้อัตราร้อยละการรอดอยู่ในช่วงที่ต้องการ



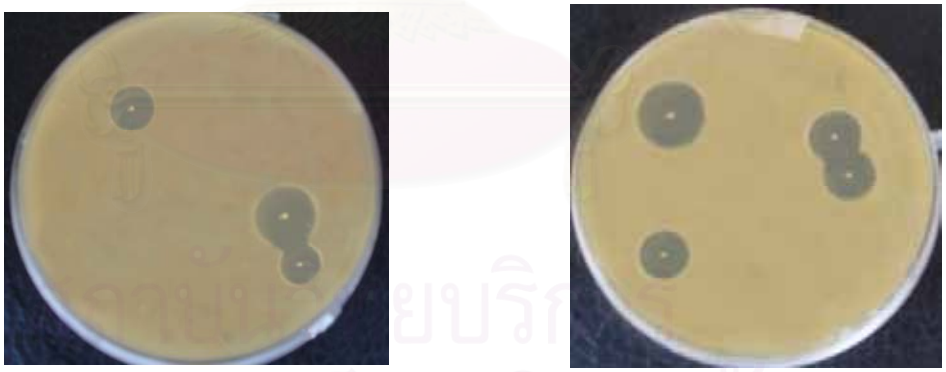
รูปที่ 4.7 แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2 ที่กลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลาต่างๆ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3.3 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 1

นำเชื้อสายพันธุ์ MU_2 มากลายพันธุ์ต่อด้วยสาร NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ในทริสมาลิอิกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 37° ซ เป็นเวลา 10-60 นาที หลังจากการกลายพันธุ์ ทำการเจือจางเชื้อแบบอนุกรม เกลี่ยเชื้อที่มีความเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารแข็ง MRS แล้วนำมาบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาทดสอบโดยการราดทับด้วยเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน คือ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้น เปรียบเทียบกับสายพันธุ์ MU_2 ได้ผลดังรูปที่ 4.8

พบว่าโซนใสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีขนาดเท่ากับ 15.5 มม. โดยผู้ทำการทดลองให้ชื่อเชื้อดังกล่าวว่า เชื้อ MU_2N

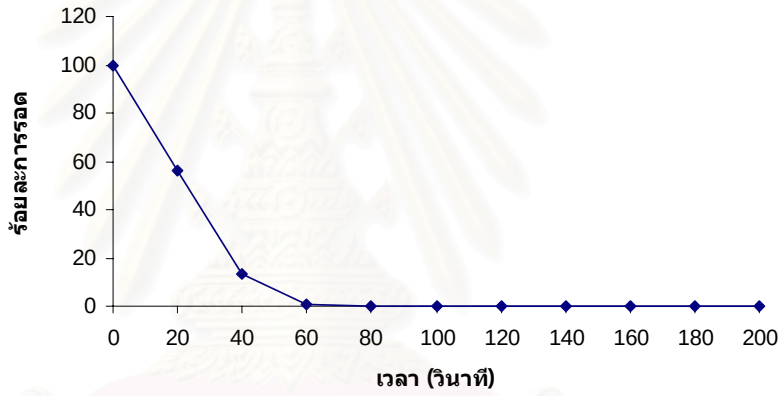


MU_2 MU_2N

รูปที่ 4.8 5 แสดงการเกิดบริเวณใสของ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งถูกยับยั้งโดยไนซินที่ผลิตได้จากเชื้อสายพันธุ์ MU_2N จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG ครั้งที่ 1 เทียบกับสายพันธุ์ MU_2

4.3.4 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต รอบที่ 3

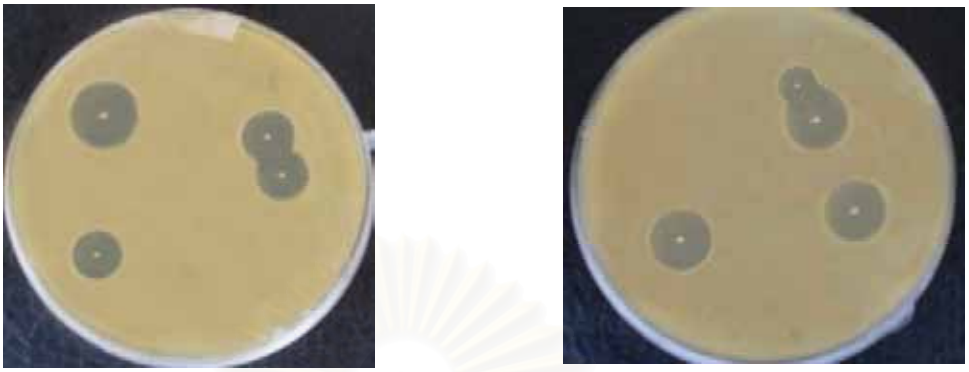
ชักนำการกลายพันธุ์ สายพันธุ์กลาย MU_2N ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร โดยใช้หัวเชื้อตั้งต้นอายุ 9 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เวลาต่างๆ ทำการเจือจางเชื้อแบบอนุกรม เกลี่ยเชื้อที่มีความเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารแข็ง MRS แล้วนำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่รอด แล้วคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังรูปที่ 4.9 และนับโคโลนีในช่วงที่มีร้อยละการรอด 0.1-5.0 ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม ซึ่งตรงกับผลที่ได้จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 60-80 วินาที โดยให้ร้อยละการรอด 0.84-0.09



รูปที่ 4.9 แสดงร้อยละการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2N ที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ 254 นาโนเมตร ที่เวลาต่างๆ

ชักนำการกลายพันธุ์ของสายพันธุ์กลาย MU_2N ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 60-80 วินาทีแล้ว ทำการเจือจางเชื้อแบบอนุกรม เกลี่ยเชื้อที่มีความเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารแข็ง MRS นำมาบ่มในที่มืด อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาทดสอบโดยการราดทับด้วยเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน คือ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30-37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้น ได้ผลดังรูปที่ 4.10

พบว่าที่ระยะเวลาการฉายแสงที่ 80 วินาที ให้ผลโซนใสที่ใหญ่ที่สุดเท่ากับ 19.0 มม. โดยผู้ทำการทดลองให้ชื่อเชื้อที่ผ่านการกลายพันธุ์ในการทดลองนี้ว่า เชื้อ MU_2NU



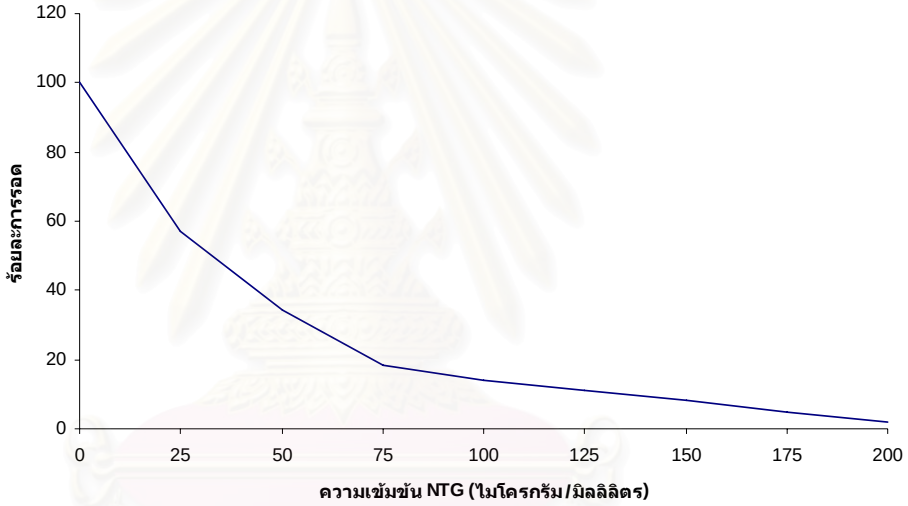
MU_2N MU_2NU

รูปที่ 4.10 แสดงการเกิดบริเวณใสของ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งถูกยับยั้งโดยไนซินที่ผลิตได้จากเชื้อสายพันธุ์ MU_2NU จากการฉายแสงอัลตราไวโอเลตครั้งที่ 3 เทียบกับสายพันธุ์ MU_2N

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

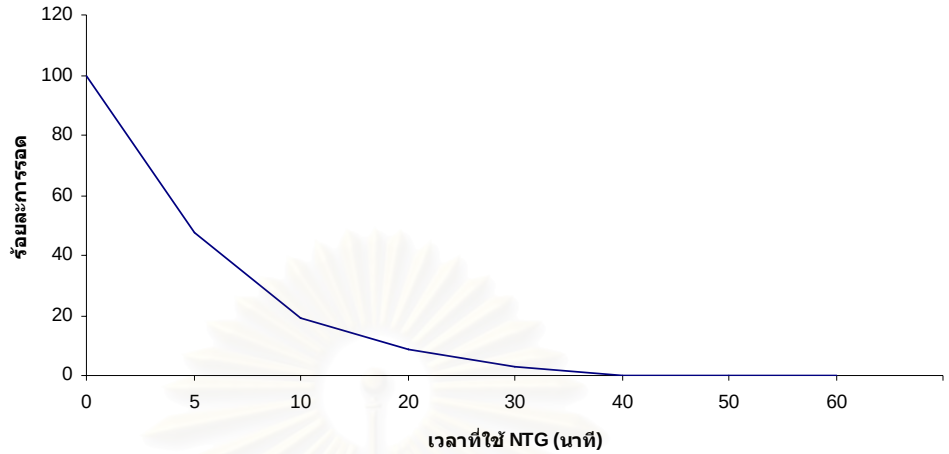
4.3.5 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 2

กลายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกโดยใช้ NTG แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ขนาดบริเวณใสสูงสุด ซึ่งทำโดยนำเชื้อสายพันธุ์ MU_2NU ซึ่งให้ขนาดบริเวณใสสูงสุดเท่ากับ 19.0 มม. มากลายพันธุ์ต่อด้วยสาร NTG ที่แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. ในทริสมาลิอิกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากการกลายพันธุ์ นำเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญและคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังรูปที่ 4.11



รูปที่ 4.11 แสดงร้อยละการรอดของ MU_2NU ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้น 0–200 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที

ในการคัดเลือกภาวะการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2NU ด้วย NTG เพื่อให้ได้อัตราร้อยละการรอดอยู่ในช่วงระหว่าง 0-50 นั้น พบว่าหากคงปริมาณ NTG ไว้ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ อยู่ในช่วงระหว่าง 10-60 นาที ดังผลที่แสดงในรูปที่ 4.12



รูปที่ 4.12 แสดงร้อยละการรอดของ MU_2NU ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลาต่างๆ

นำเชื้อสายพันธุ์ MU_2NU ซึ่งให้ขนาดบริเวณใสสูงสุดเท่ากับ 19.0 มม. มากลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ในทริสมาลิอิกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 10-60 นาที หลังจากการกลายพันธุ์ ทำการเจือจางเชื้อแบบอนุกรม เกลี่ยเชื้อที่มีความเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารแข็ง MRS แล้วนำมาบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาทดสอบโดยการราดทับด้วยเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน คือ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้น ได้ผลดังรูปที่ 4.13

พบว่าโซนใสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีขนาดเท่ากับ 20.5 มม. โดยผู้ทำการทดลองให้ชื่อเชื้อดังกล่าวว่า เชื้อ MU_2NUN

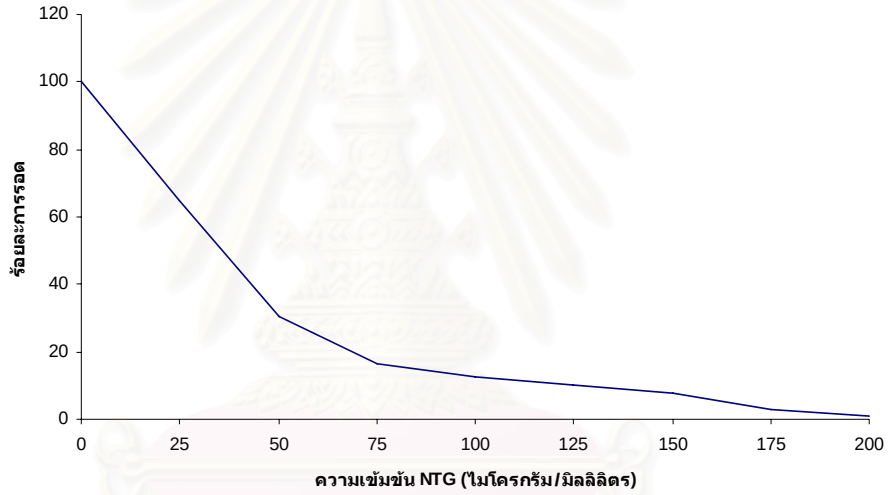
MU_2NU MU_2NUN

รูปที่ 4.13 แสดงการเกิดบริเวณใสของ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งถูกยับยั้งโดยไนซินที่ผลิตได้จากเชื้อสายพันธุ์ MU_2NUN จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG ครั้งที่ 2 เทียบกับสายพันธุ์ MU_2NU

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

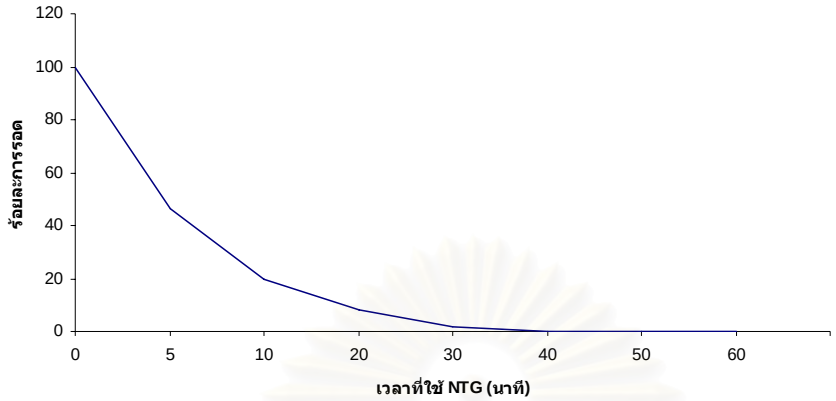
4.3.6 การชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 3

กลายพันธุ์เชื้อที่คัดเลือกโดยใช้ NTG แล้วคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ให้ขนาดบริเวณใสสูงสุด ซึ่งทำโดยนำเชื้อสายพันธุ์ MU_2NUN ซึ่งให้ขนาดบริเวณใสสูงสุดเท่ากับ 20.5 มม. มากลายพันธุ์ต่อด้วยสาร NTG ที่แปรผันความเข้มข้นตั้งแต่ 0-200 ไมโครกรัมต่อมล. ในทริสมาลิอิกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที หลังจากการกลายพันธุ์ นำเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญและคำนวณร้อยละการรอด ได้ผลดังรูปที่ 4.14



รูปที่ 4.14 แสดงร้อยละการรอดของ MU_2NUN ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG ที่ความเข้มข้น0–200 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 30 นาที

ในการคัดเลือกภาวะการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2NUN ด้วย NTG เพื่อให้ได้อัตราร้อยละการรอดอยู่ในช่วงระหว่าง 0-50 นั้น พบว่าหากคงปริมาณ NTG ไว้ที่ 50 ไมโครกรัมต่อมล. แล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°ซ อยู่ในช่วงระหว่าง 10-60 นาที ได้ผลแสดงในรูปที่ 4.15

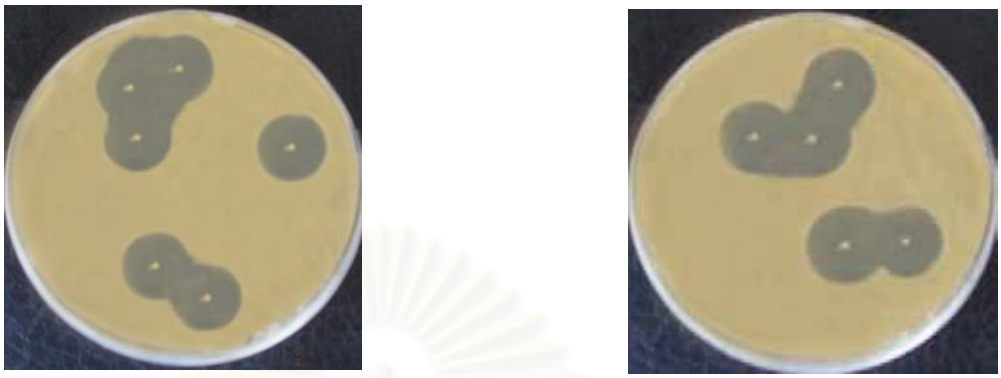


รูปที่ 4.15 แสดงร้อยละการรอดของ MU_2NUN ที่ผ่านการกลายพันธุ์ด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ที่อุณหภูมิ 37°ซเป็นเวลาต่างๆ

นำเชื้อสายพันธุ์ MU_2NUN ซึ่งให้ขนาดบริเวณใสสูงสุดเท่ากับ 20.5 มม. มากลายพันธุ์ต่อด้วย NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมล. ในทริสมาลิอิกบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 10-60 นาที หลังจากการกลายพันธุ์ ทำการเจือจางเชื้อแบบอนุกรม เกลี่ยเชื้อที่มีความเจือจางที่เหมาะสมลงบนอาหารแข็ง MRS แล้วนำมาบ่มในที่มืด ที่อุณหภูมิ 30°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงเชื้อดังกล่าวมาทดสอบโดยการราดทับด้วยเชื้อทดสอบที่ไวต่อไนซิน คือ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 ซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสที่เกิดขึ้น ได้สายพันธ์กลายทั้งหมด 3 สายพันธุ์ได้แก่ MU_2NUN_21, MU_2NUN_22 และ MU_2NUN_23 ได้ผลดังรูปที่ 4.16

โดยพบว่าโซนใสที่มีขนาดใหญ่ที่สุดมีขนาดเท่ากับ 23.0 มม. โดยผู้ทำการทดลองให้ชื่อเชื้อดังกล่าวว่า เชื้อ MU_2NUN_2

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



MU_2NUN MU_2NUN_2

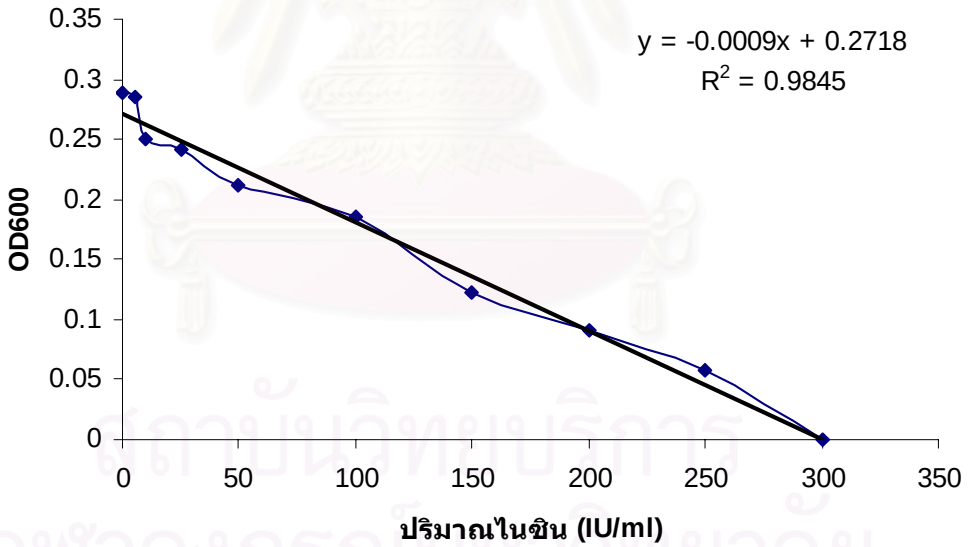
รูปที่ 4.16 แสดงการเกิดบริเวณใสของ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งถูกยับยั้งโดยไนซินที่ผลิตได้จากเชื้อสายพันธุ์ MU_2NUN_2 จากการกลายพันธุ์ด้วย NTG ครั้งที่ 3 เทียบกับสายพันธุ์ MU_2NUN

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.4 การวิเคราะห์หาปริมาณไนซินโดยวิธีวัดความขุ่น (turbidiometric bioassay)

4.4.1 กราฟมาตรฐานของไนซิน

เตรียมไนซินบริสุทธิ์ที่ละลายอยู่ในสารละลาย HCl 0.02 นอร์แมล โดยแปรผันความเข้มข้นของไนซินให้ อยู่ในช่วงระหว่าง 0-1,000 IU/ml แล้วใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จากนั้นนำมาทดสอบด้วยเชื้อทดสอบ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 บ่มที่อุณหภูมิ 30-37°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร แล้วนำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรกับความเข้มข้นของไนซิน เลือกช่วงความเข้มข้นที่ให้ค่าการดูดกลืนแสงเป็นเส้นตรง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.17



รูปที่ 4.17 กราฟมาตรฐานของไนซิน โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

4.4.2 การหาปริมาณไนซินของเชื้อสายพันธุ์กลายโดยวิธีวัดความขุ่น

นำเชื้อที่ได้ทำการกลายพันธุ์มาหาปริมาณไนซินโดยเปรียบเทียบกับ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้น โดยเติมส่วนน้ำใสของเชื้อที่ปริมาณแตกต่างกัน ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ เชื้อทดสอบ *Pediococcus pentosaceus* สายพันธุ์ TISTR 374 ตามข้อ 3.3.4.2 ทำ 3 ซ้ำ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร จากนั้นนำไปคำนวณปริมาณไนซิน (IU/ml) จากกราฟมาตรฐาน ได้ผลดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงปริมาณไนซินของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 และสายพันธุ์กลายต่างๆ

สายพันธุ์	เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสสูงสุด (มิลลิเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรโดยเฉลี่ย	ระดับการเจือจาง (เท่า)	ปริมาณไนซิน (IU/ml)	จำนวนเท่าของไนซิน เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น
MF2	8.0	0.2033	5	370.51	0
MU	10.0	0.1987	20	875.29	2.36
MU_2	13.2	0.2238	20	1026.67	2.77
MU_2N	15.5	0.2130	20	1,266.67	3.42
MU_2NU	19.0	0.2018	25	1,894.44	5.11
MU_2NUN	20.5	0.1929	25	2,141.67	5.78
MU_2NUN_2	23.0	0.1750	25	2,638.89	7.12

เมื่อพิจารณาจากตารางพบว่า ปริมาณไนซินของสายพันธุ์กลายมีปริมาณเพิ่มขึ้น เมื่อทำการกลายพันธุ์ตามขั้นตอนไปเรื่อยๆ โดยพบว่าสายพันธุ์ MU_2NUN_2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำการกลายพันธุ์ขั้นตอนสุดท้ายมีปริมาณไนซินสูงขึ้นจากสายพันธุ์ MF2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ตั้งต้นประมาณ 7 เท่า

4.4.3 การทดสอบความเสถียรในการผลิตไนซินของสายพันธุ์กลาย $MU_2NUN_2$1, $MU_2NUN_2$2 และ $MU_2NUN_2$3

นำสายพันธุ์กลายทั้ง 3 ที่เกิดจากการกลายพันธุ์ด้วย NTG รอบที่ 3 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS หลังจากมีการถ่ายเชื้อไป 5 ครั้ง นำมาหาปริมาณไนซิน ด้วยวิธีการวัดความขุ่นดังข้อ 3.3.4.2 โดยทำทั้งหมด 3 ซ้ำ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงปริมาณไนซินของสายพันธุ์กลาย MU2NUN$_2$1, $MU_2NUN_2$2 และ $MU_2NUN_2$3 ก่อนและหลังการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง

สายพันธุ์	ปริมาณไนซินก่อนถ่ายเชื้อ (IU/ml)	ปริมาณไนซินหลังถ่ายเชื้อ (IU/ml)
$MU_2NUN_2$1	2,638.89	2,413.37
$MU_2NUN_2$2	2,265.45	1,976.28
$MU_2NUN_2$3	2,564.23	2,187.12

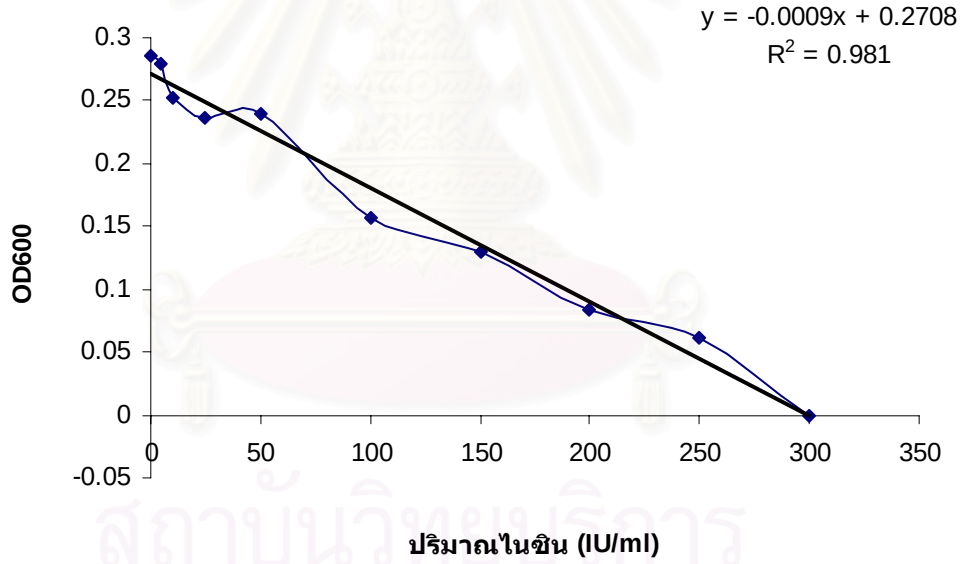
หลังจากการถ่ายเชื้อครบ 5 ครั้ง พบว่าปริมาณไนซินที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์กลาย $MU_2NUN_2$1 มีความเสถียรที่ดีกว่า เชื้อสายพันธุ์กลาย $MU_2NUN_2$2 และ $MU_2NUN_2$3 โดยที่เชื้อสายพันธุ์กลาย $MU_2NUN_2$1 มีปริมาณไนซินลดลงร้อยละ 9.6 ขณะที่เชื้อสายพันธุ์กลายอีก 2 สายพันธุ์มีปริมาณไนซิน ลดลงร้อยละ 12.76 และ 14.71 ตามลำดับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.5 การหาชนิดและปริมาณน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

4.5.1 ชนิดของแหล่งน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

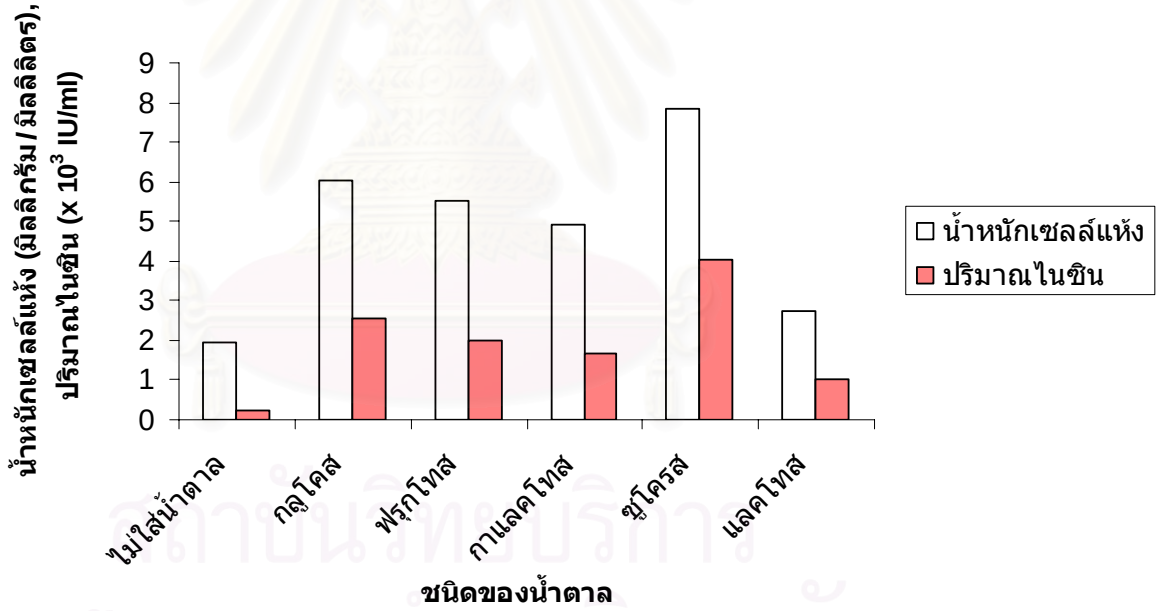
เมื่อศึกษาหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตไนซิน โดยการเลี้ยง *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2NUN_2 ในอาหาร MRS ที่เปลี่ยนชนิดของน้ำตาล โดยปรับให้มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในอาหาร MRS คือ กลูโคส ฟรุกโทส และกาแลคโทส 2.2%(มวลต่อปริมาตร) ซูโครส และแลคโทส 1.1%(มวลต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ง) หลังจากนั้นหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดปริมาณไนซินที่ผลิตได้ตามวิธีในข้อ 3.3.4.2 ผลดังแสดงตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.18-4.19



รูปที่ 4.18 กราฟมาตรฐานของไนซิน โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.3 แสดงผลของแหล่งคาร์บอนต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

แหล่งคาร์บอน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณไนซิน (IU/ml)
ไม่ใส่น้ำตาล	1.96	234.34
กลูโคส	6.04	2,564.54
ฟรุกโทส	5.53	2,011.26
กาแลคโทส	4.9	1,675.39
ซูโครส	7.85	4,027.18
แลคโทส	2.75	1,032.32

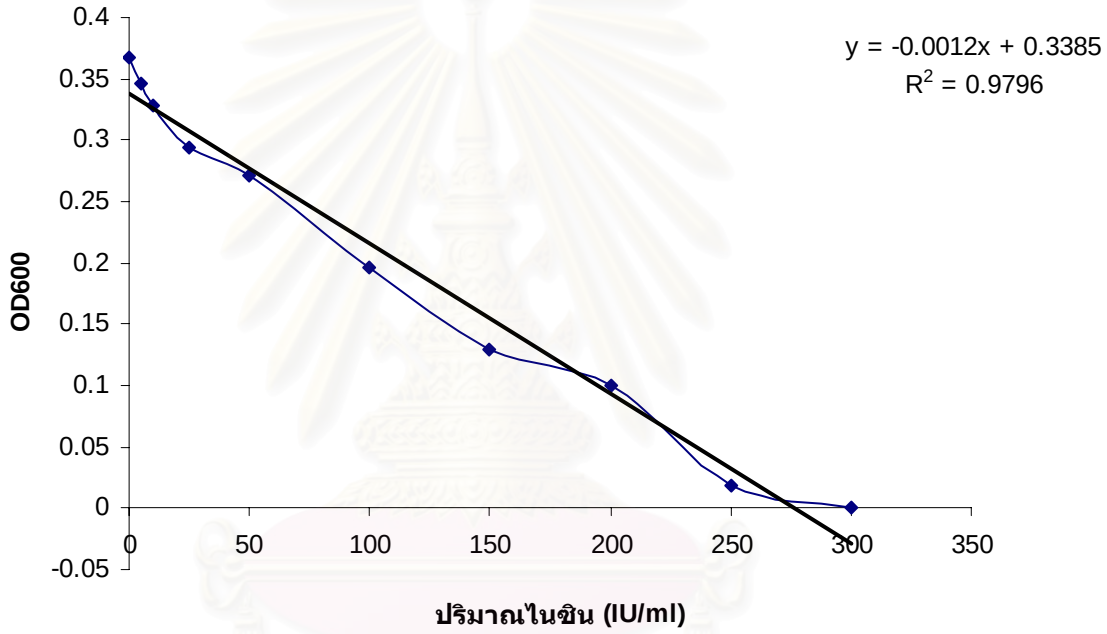


รูปที่ 4.19 แสดงผลของชนิดของน้ำตาลต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

จากผลการทดลองพบว่าชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตไนซิน คือ ซูโครส ผลิตไนซินได้เท่ากับ 4,027.18 IU/ml เมื่อเปรียบเทียบกับกลูโคส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เดิมพบว่าสามารถผลิตไนซินได้เพียง 2,564.54 IU/ml ดังนั้นจึงเลือกซูโครส ใช้สำหรับการผลิตไนซิน ของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

4.5.2 ปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

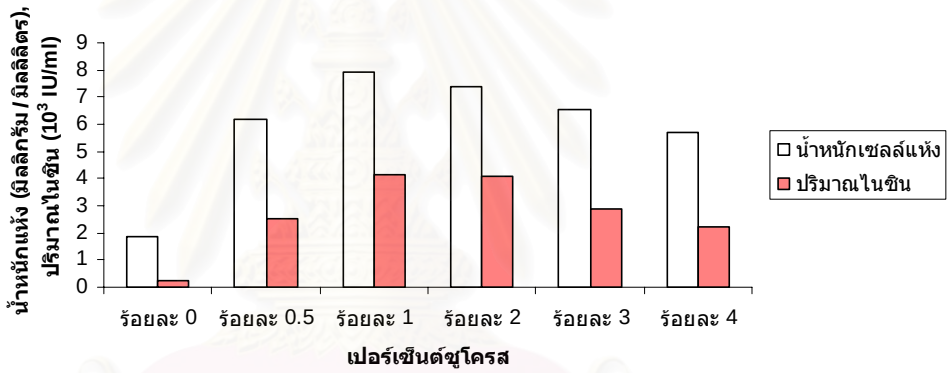
จากผลการทดลองที่ 4.5.1 ชนิดน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตไนซิน คือ ซูโครส ดังนั้นจึงได้แปรผันปริมาณซูโครสเป็น 0, 0.5, 1, 2, 3 และ 4% (น้ำหนักต่อปริมาตร) หลังจากนั้นหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดปริมาณไนซินที่ผลิตได้ผลดังแสดงตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.20-4.21



รูปที่ 4.20 กราฟมาตรฐานของไนซิน โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.4 แสดงปริมาณของซูโครสที่มีต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

ปริมาณซูโครส	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณไนซิน (IU/ml)
0%	1.87	265.23
0.5%	6.21	2543.61
1%	7.93	4129.45
2%	7.37	4068.38
3%	6.54	2864.12
4%	5.69	2236.78

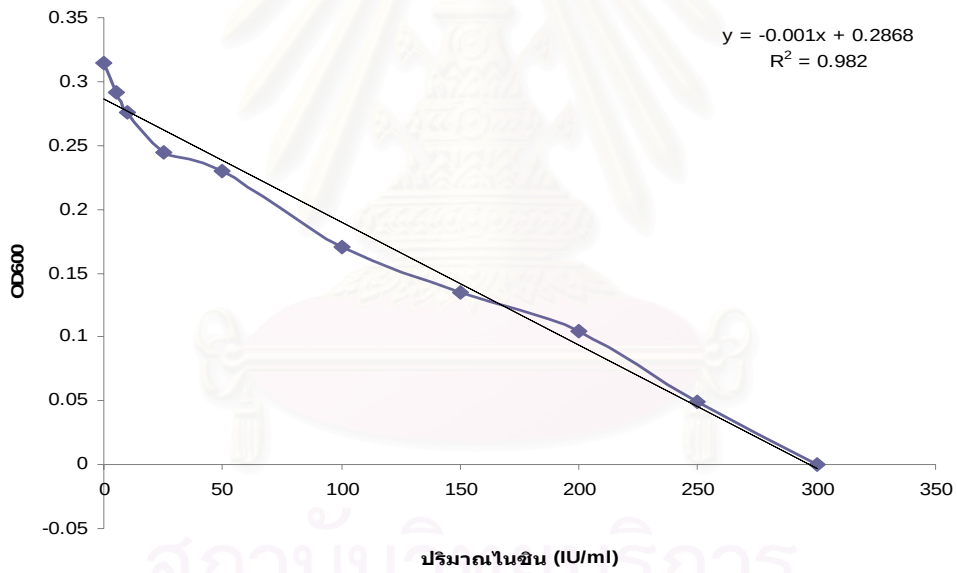


รูปที่ 4.21 แสดงปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

จากผลการทดลองพบว่าปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อการผลิตไนซิน คือ 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) ซึ่งสามารถผลิตไนซินได้เท่ากับ 4,129.45 IU/ml ดังนั้นจึงเลือกซูโครส 1% สำหรับการผลิตไนซินของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

4.6 การหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

เมื่อศึกษาแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไนซิน โดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2NUN_2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้จากการทดลองที่ 4.5 แล้วเสริมด้วยแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนและอนินทรีย์ไนโตรเจนชนิดต่างๆ โดยปรับให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่มีทั้งหมดในอาหาร MRS คือ 3.614% (น้ำหนักต่อปริมาตร) (ภาคผนวก ง) หลังจากนั้นหาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดปริมาณไนซินที่ผลิตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนต่างๆ เทียบกับปริมาณไนซินที่ผลิตได้ในอาหาร MRS เดิม ได้ผลดังตารางที่ 4.8 และ รูปที่ 4.22-4.23

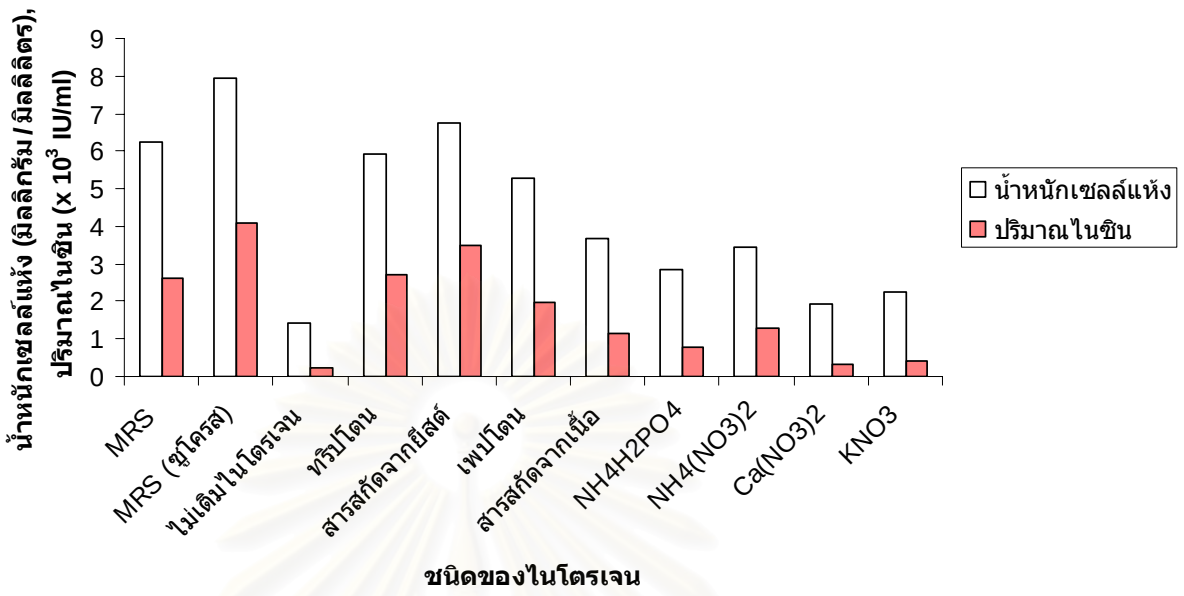


รูปที่ 4.22 กราฟมาตรฐานของไนซิน โดยการวัดการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร

ตารางที่ 4.5 แสดงผลของแหล่งไนโตรเจนที่มีต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

แหล่งไนโตรเจน	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัม/ลิตร)	ปริมาณไนซิน (IU/ml)
ชุดทดลองควบคุม		
MRS	6.49	2691.04
MRS ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน	7.71	4082.52
ไม่เติมไนโตรเจน	1.67	271.18
ไนโตรเจนอินทรีย์		
ทริปโตน	5.98	2649.37
สารสกัดจากยีสต์	6.80	3513.56
เพปโตน	5.33	1994.12
สารสกัดจากเนื้อ	3.74	1126.95
ไนโตรเจนอนินทรีย์		
$NH_4H_2PO_4$	2.70	759.66
$NH_4(NO_3)_2$	3.19	1207.31
$Ca(NO_3)_2$	3.57	1344.93
KNO_3	2.31	410.79

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.23 แสดงชนิดของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

จากผลการทดลองพบว่าชนิดของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตไนซิน คือ สารสกัดจากยีสต์ ซึ่งสามารถผลิตไนซินได้เท่ากับ 3,513.56 IU/ml ซึ่งผลิตไนซินได้น้อยกว่า MRS ที่มีซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งสามารถผลิตไนซินได้เท่ากับ 4,082.52 IU/ml ดังนั้นจึงเลือกชนิดของไนโตรเจนที่มีอยู่เดิมในอาหาร MRS คือ สารสกัดจากเนื้อ 1% สารสกัดจากยีสต์ 0.5% เพปโตน 1%(มวลต่อปริมาตร) สำหรับการผลิตไนซินของเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ไนซินเป็นสารปฏิชีวนะชนิดเพปไทด์ที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่พบในชีวิตประจำวันและก่อโรค นอกจากนี้แล้วไนซินยังเป็นแบคเทอริโอซินชนิดแรกที่องค์การอนามัยโลกอนุญาตและรับรองความปลอดภัยเมื่อถูกใช้ในอาหารอย่างแพร่หลายทั่วโลก โดยปัจจุบันได้มีการใช้ไนซินในอุตสาหกรรมอาหารอย่างแพร่หลาย (Hurst, 1981)

งานวิจัยนี้จะทำการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้างไนซินที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบ และศึกษาหาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตไนซิน ขั้นตอนแรกของการทดลองนี้ คือ นำแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากน้ำนมดิบ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 มาศึกษาหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเพื่อเตรียมหัวเชื้อในอาหารเหลว MRS ใช้ในการปรับปรุงสายพันธุ์ จากผลการทดลองพบว่า ชั่วโมงที่ 9 เป็นระยะกึ่งกลางทวีคูณ ซึ่งเป็นระยะการเจริญที่เหมาะสมในการนำการปรับปรุงสายพันธุ์เพื่อเพิ่มความสามารถในการผลิตไนซินต่อไป

การปรับปรุงสายพันธุ์ในงานวิจัยครั้งนี้ ใช้สิ่งชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ 2 ชนิดคือ แสงอัลตราไวโอเลต และ NTG ซึ่งในการปรับปรุงสายพันธุ์แต่ละครั้ง จะใช้สิ่งชักนำทั้ง 2 วิธี โดยแต่ละครั้งจะเลือกวิธีที่ให้ผลที่ดีที่สุด เพื่อนำไปเป็นเชื้อเริ่มต้นในการกลายพันธุ์ครั้งต่อๆ ไป

การกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตเป็นการกลายพันธุ์ที่นิยมใช้มากที่สุด เนื่องจากเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกที่สุด แต่เนื่องจากการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตสามารถทำให้กลับคืนสู่สภาพเดิมได้ เมื่อนำแบคทีเรียที่ผ่านการฉายแสงอัลตราไวโอเลตแล้วไปฉายกับแสงแดดหรือแสงจากหลอดฟลูออเรสเซนต์ ส่วนการกลายพันธุ์ด้วย NTG นั้น เนื่องด้วย NTG เป็นสารที่ชักนำให้เกิดการกลายที่มีความรุนแรงสูงมากที่สุด ทำให้การกลายพันธุ์มีประสิทธิภาพสูง ไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ แต่ควรใช้อย่างระมัดระวัง เนื่องจาก NTG เป็นสารเคมีอันตราย

โดยทั่วไปแล้วงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการปรับปรุงสายพันธุ์นั้นจำเป็นต้องหาภาวะที่เหมาะสมในการปรับปรุงสายพันธุ์ก่อน คือ ต้องทราบอัตราการรอดของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ซึ่งร้อยละการรอดที่ใช้ในการคัดเลือกสายพันธุ์กลายที่ใช้ในการกลายพันธุ์โดยทั่วไปใช้ค่าประมาณร้อยละ 0.1-10 (Li Chang, 1991) แล้วแต่ความเหมาะสมของแต่ละงานวิจัย ซึ่งในงานวิจัยนี้ เมื่อหาร้อยละการรอดของเชื้อ หลังจากกลายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เมื่อฉายแสงที่ระยะห่างจากแสง 22 เซนติเมตร พบว่า ช่วงที่เกิดการกลายพันธุ์ที่เหมาะสม คือ เมื่อฉายแสงอัลตราไวโอเลตนาน 60-80 วินาที ซึ่งให้ร้อยละการรอด 0.86 – 0.06 ซึ่งจัดว่าอยู่ในช่วงร้อยละการรอดที่เหมาะสม คือ 0.1-5.0 (Kiguchi และ Yanagi, 1985) ส่วนการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG นั้น ซึ่งมีช่วงร้อยละการรอดที่สนใจอยู่ในช่วง 0-50 ซึ่งเป็นช่วงที่มีการกลายพันธุ์ได้ดีที่สุด (Carlton และ Brown, 1981) พบว่า เมื่อใช้ NTG ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร อยู่ในช่วงเวลาระหว่าง 10 – 60 นาที จะให้ร้อยละการรอดอยู่ในช่วง 23.75 – 1.75 ซึ่งจัดว่าอยู่ในช่วงร้อยละการรอดที่เหมาะสม

จากกลายพันธุ์ของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลต พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดลง เมื่อเทียบกับเวลาในการฉายแสงอัลตราไวโอเลตที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยการฉายแสงอัลตราไวโอเลตนั้น จะทำให้เกิดไทมีนไดเมอร์บนสายดีเอ็นเอ ทำให้ไทมีนไม่สามารถจับคู่กับอะดีนีนของสายดีเอ็นเอที่อยู่ตรงข้ามได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอแบบสุ่ม เมื่อเกิดการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้ดีเอ็นเอมีการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสไปจากเดิม และเมื่อเกิดการถอดรหัส จะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม (ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ, 2541) และเมื่อเกิดการกลายพันธุ์แล้ว รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น ทำให้บริเวณที่สังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์สูญเสียไป จนไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นขึ้นได้ หรือสร้างขึ้นมาได้แต่องค์ประกอบของโปรตีนเปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์แก่เซลล์ได้ เซลล์นั้นจะตาย (อาทิตย์ ปุษยะนาวิน, 2539) ซึ่งเป็นสาเหตุของการลดจำนวนเซลล์ลงหลังจากฉายแสงอัลตราไวโอเลต

จากการชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย NTG พบว่าจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจะลดลง เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ NTG โดย NTG เป็นสารเคมีในกลุ่ม alkylating agent โดยจะไปเติมหมู่เมธิลให้กับเบส ทำให้การจับคู่เบสผิดพลาดไป เกิดการเปลี่ยนแปลงลำดับเบสในสายดีเอ็นเอแบบสุ่มขณะที่มีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ ทำให้ได้สายดีเอ็นเอที่มีลำดับเบสเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม

(Goodenough, 1978) เมื่อเกิดการถอดรหัสขึ้นจะทำให้ได้รหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป เช่นเดียวกับการกลายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ถ้ารหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนั้น ทำให้บริเวณที่สังเคราะห์โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบสำคัญของเซลล์สูญเสียไป จนไม่สามารถสร้างโปรตีนชนิดนั้นขึ้นได้หรือสร้างขึ้นมาได้ แต่องค์ประกอบเปลี่ยนแปลงจนไม่สามารถนำไปใช้ให้เป็นประโยชน์แก่เซลล์ได้ เซลล์นั้นจะตาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการลดจำนวนเซลล์ลงหลังจากใช้ NTG

การทดสอบความสามารถในการผลิตไนซินของสายพันธุ์กลายที่ได้จากการปรับปรุงสายพันธุ์ด้วยแสงอัลตราไวโอเลต ทำโดยวัดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดขึ้น จากการเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS แต่การวัดปริมาณของไนซินด้วยวิธีนี้ยังให้ผลไม่ชัดเจนนัก เนื่องจากไม่สามารถบอกปริมาณไนซินที่สร้างขึ้นได้ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการตรวจความสามารถในการผลิตไนซินอย่างละเอียด ซึ่งคือวิธีวัดความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วคำนวณปริมาณไนซินจากกราฟมาตรฐานที่สร้างจากการแปรผันปริมาณไนซินบริสุทธิ์ต่างๆ กัน (G.L. Blay และคณะ, 2007)

จากการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตทั้งหมด 3 รอบ และ NTG ทั้งหมด 3 รอบ ทำให้ได้สายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2NUN_2 ซึ่งเป็นสายพันธุ์กลายขั้นตอนสุดท้าย พบว่ามีปริมาณไนซินเท่ากับ 2,638.89 IU/ml สูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ตั้งต้น ซึ่งมีปริมาณไนซินเท่ากับ 370.51 IU/ml โดยเมื่อเปรียบเทียบแล้วพบว่าสูงขึ้นกว่าสายพันธุ์ตั้งต้นถึงประมาณ 7 เท่า โดยมีขั้นตอนการกลายพันธุ์โดยสรุปแสดงดังตารางที่ 5.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5.1 แสดงลำดับขั้นตอนในการกลายพันธุ์ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MF2 ด้วยแสงอัลตราไวโอเลตและ NTG ได้สายพันธุ์กลาย MU_2NUN_2

สายพันธุ์	เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณใสสูงสุด (มิลลิเมตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรโดยเฉลี่ย	ระดับการเจือจาง (เท่า)	ปริมาณไนซิน (IU/ml)	จำนวนเท่าของไนซิน เมื่อเทียบกับสายพันธุ์ตั้งต้น
MF2	8.0	0.2033	5	370.51	0
MU	10.0	0.1987	20	875.29	2.36
MU_2	13.2	0.2238	20	1026.67	2.77
MU_2N	15.5	0.2130	20	1,266.67	3.42
MU_2NU	19.0	0.2018	25	1,894.44	5.11
MU_2NUN	20.5	0.1929	25	2,141.67	5.78
MU_2NUN_2	23.0	0.1750	25	2,638.89	7.12

จากตารางที่ 5.1 พบว่า ปริมาณไนซินที่สายพันธุ์กลายต่างๆ ผลิตได้ มีแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นเมื่อทำการกลายพันธุ์ต่อไป และจากการตรวจสอบความสามารถในการผลิตไนซินพบว่า สามารถคัดเลือกได้เพียง 3 โคโลนี คือ MU_2NUN_2 1, MU_2NUN_2 2 และ MU_2NUN_2 3 จึงนำทดสอบความเสถียรในการผลิตไนซินของสายพันธุ์ต่อไป

เมื่อทำการกลายพันธุ์แล้วจำเป็นต้องมีการทดสอบความเสถียร เพื่อให้ได้สายพันธุ์กลายที่มีสมบัติที่ต้องการอย่างถาวรไม่เปลี่ยนแปลงสมบัติไปและสามารถถ่ายทอดไปยังรุ่นต่อไปได้ ซึ่งทาโดยการถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง พบว่าปริมาณไนซินที่ได้จากเชื้อสายพันธุ์กลาย MU_2NU $N_2$1 มีความเสถียรที่ดีกว่า เชื้อสายพันธุ์กลาย $MU_2NUN_2$2 และ $MU_2NUN_2$3 โดยที่เชื้อสายพันธุ์กลาย $MU_2NUN_2$1 มีปริมาณไนซินลดลงร้อยละ 9.6 ขณะที่เชื้อสายพันธุ์กลายอีก 2 สายพันธุ์มีปริมาณไนซิน ลดลงร้อยละ 12.76 และ 14.71 ตามลำดับ

ในการศึกษาภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตไนซิน ต้องมีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุที่จำเป็น ค่าความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ เป็นต้น พบว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดต้องการพลังงานแตกต่างกันไป ดังนั้นการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม จึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งในการปรับปรุงความสามารถในการผลิตไนซิน ในการคัดเลือกแหล่งคาร์บอนนั้นจำเป็นต้องพิจารณาราคา ความบริสุทธิ์ ผลผลิตที่ต้องการ ซึ่งในการงานวิจัยนี้ได้ทำการหาชนิดของน้ำตาลที่เหมาะสมต่อเลี้ยง *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2NUN_2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการเปลี่ยนชนิดของน้ำตาล โดยปรับให้มีปริมาณน้ำตาลเท่ากับ 0.11 โมลต่อลิตร จากผลการทดลองพบว่าซูโครส เป็นน้ำตาลที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งในปี 2002, Penna และ Maraes ได้พบว่าการเติมซูโครสลงในอาหาร MRS หรือ M17 จะช่วยเพิ่มการสร้างไนซิน โดยพบว่าเมื่อใช้ซูโครส 2 กรัมต่อลิตร จะผลิตไนซินได้ 298 AU/ml ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของน้ำตาลซูโครสเป็น 5 กรัมต่อลิตร พบว่าสามารถผลิตไนซินได้เพิ่มขึ้นเป็น 7770 AU/ml และในปี 2001, Chan Li และคณะ ได้ทำการศึกษาหาแหล่งอาหารที่เหมาะสมในการผลิตไนซินพบว่าน้ำตาลซูโครส 1% จัดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตไนซิน ช่วยเพิ่มปริมาณไนซินจากเดิม 1,074 IU/ml เมื่อเลี้ยงในอาหาร CM เป็น 2,150 IU/ml ซึ่งเพิ่มขึ้นจากเดิม 2 เท่า

ส่วนการศึกษาความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นนั้นเป็นสิ่งสำคัญ เพราะคาร์บอนเป็นธาตุอาหารที่สำคัญต่อการสังเคราะห์สารประกอบต่างๆ ภายในเซลล์ ดังนั้นหากปริมาณของแหล่งคาร์บอนเริ่มต้นน้อยไป อาจทำให้เชื้อตายได้ ส่วนหากมีความเข้มข้นมากเกินไป เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง แหล่งคาร์บอนก็จะเหลือและสูญเสียไปโดยเปล่าประโยชน์ จากผลการทดลองพบว่า ของซูโครส 1% (น้ำหนักต่อปริมาตร) เหมาะสมต่อการผลิตไนซินมากที่สุด อาจเป็นเพราะที่ระดับความเข้มข้น 1% เป็นระดับความเข้มข้นที่พอเหมาะ เพราะหากความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนสูงกว่านี้ อาหารจะหนืดมาก เมื่อเลี้ยงเชื้อไปอาจทำให้การให้อากาศกับเชื้อเป็นไปได้ยาก เชื้อจึงอาจตายได้ในที่สุด

เมื่อทำการศึกษาชนิดและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมพบว่า สารสกัดจากยีสต์เป็นแหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ที่เชื้อสามารถผลิตไนซินได้มากที่สุด ซึ่งมีความสามารถในการผลิตไนซินได้เพียง 3,513.56 IU/ml เมื่อเทียบกับอาหาร MRS ที่ทำการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส 1% ผลิตไนซินได้ถึง 4,082.52 IU/ml อาจเนื่องจากสารสกัดจากยีสต์ไม่เพียงแต่มีกรดอะมิโนอิสระและเพปไทด์สายสั้นๆ ในปริมาณมาก โดยจะส่งผลให้เชื้อมีอัตราการเจริญได้เพิ่มขึ้นและเพิ่มปริมาณเซลล์ นอกสารสกัดจากยีสต์มีส่วนช่วยในการเจริญของเชื้อมากกว่าแหล่ง

ไนโตรเจนชนิดอื่น (Aasen, 2000) และแอมโมเนียมไนเตรตเป็นแหล่งอนินทรีย์ไนโตรเจนที่เชื้อสามารถผลิตไนซินได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์อื่นๆ แต่เมื่อเทียบกับอาหาร MRS แล้ว พบว่า แอมโมเนียมไนเตรต เชื้อสามารถผลิตไนซินได้น้อยกว่าเชื้อที่เจริญอยู่ในอาหาร MRS จากผลการทดลองนี้อาจจะสรุปได้ว่า *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2NUN_2 สามารถเจริญในอาหารที่มีไนโตรเจนอินทรีย์ได้ดีกว่าไนโตรเจนอนินทรีย์ แต่เนื่องจากปริมาณไนซินที่ได้จากเชื้อที่เลี้ยงในสารสกัดจากยีสต์ และปริมาณไนซินที่ได้จากเชื้อที่เลี้ยงใน MRS มีปริมาณใกล้เคียงกัน เราถือว่าแหล่งไนโตรเจนเดิมที่มีอยู่ในอาหาร MRS เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตไนซินของ *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2NUN_2

จากนั้นได้ทำการศึกษาชนิดและปริมาณของสารอาหารรองที่เหมาะสมต่อการผลิตไนซิน พบว่า โปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0% สามารถเพิ่มการผลิตไนซินได้ 4,303.09 IU/ml ซึ่งเมื่อเทียบกับ อาหาร MRS ที่ทำการเปลี่ยนแหล่งคาร์บอนเป็นซูโครส 1% ผลิตไนซินได้เพียง 4,008.23 IU/ml ซึ่งมีความสามารถในการผลิตไนซินได้เพิ่มขึ้นถึง 0.736 เท่า ในปี 1993 De Vuyst และ Vandamme ได้ทำการเพิ่มการผลิตไนซินโดยการปรับปริมาณของแหล่งฟอสเฟตและไนโตรเจนให้เหมาะสม พบว่าโปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็นแหล่งฟอสฟอรัสที่ดีที่สุดในการผลิตไนซิน ที่ความเข้มข้น 5% ผลิตไนซินได้ถึง 3,500 IU/ml โดยพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโปแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตให้เป็น 6% ผลิตไนซินได้เพียง 1,800 IU/ml เนื่องจากเซลล์แตกและส่งผลให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความหนืดเพิ่มมากขึ้น

ดังนั้นในการหาภาวะที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง *Lactococcus lactis* สายพันธุ์ MU_2NUN_2 พบว่าควรเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีการปรับปรุงเปลี่ยนแปลงสูตรอาหารเพื่อให้เหมาะสมต่อการผลิตไนซินให้ได้ปริมาณมากที่สุด โดยเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เปลี่ยนชนิดของน้ำตาลเป็นซูโครส 1.0% และเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.0%

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2539. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ประดิษฐ์ พงศ์ทองคำ. 2541. พันธุศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไปรมา แก้วสามศรี. 2549. การคัดกรองแบคทีเรียที่สร้างไนซินและการยืนยันยีนที่ประมวลรหัสไนซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์.2545.จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

อาทิตย์ ปุษยะนาวิน. 2539. การคัดเลือกมิวแทนต์ของ *Pachysolen tanophilus* ที่หมักไซโลสโดยการชักนำด้วยแสงอัลตราไวโอเลท. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาพฤกษศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

Aasen, I.M. Moretro, T., Katla, T., Axelsson, L. and Storro, I. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 159-166.

Ayad, E. H. E., Verheul, A., Wouters, J. T. M., and Smit, G. 2002. Antimicrobial-producing wild lactococci isolated from artisanal and non-dairy origins. Inter. Dairy. J. 12: 145-150.

Baltz, R. H. Strain improvement. In A. L. Demain; and N. A. Solomon (eds.), Manual of Industrail Microbiology and Biotechnology, pp.154-169. Washington, D. C.: American Society for Microbiology, 1986.

Bierbaum, G., and Sahl H. G. 1991. Autolytic system of Staphylococcus simulans 22: influence of cation peptides on activity of N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase. J. Bacteriol. 169: 5452-5458.

Biswas, S .R., Ray, P., Johnson, M. C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1265-1267.

Blay G. L., Lacroix C., Zihler A. and Fliss I. 2007. *In vitro* inhibition activity of nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and antibiotics against common intestinal bacteria. Applied microbiology 45: 252-257.

Bos, C. J., and stadler, D. Fungal Genetics. Principle and Practice., pp. 169-218. New York: Marcel Dekker, 1996.

Brown, T.A. Genetic a Molecular Approach. 2nd edition. London: Chapman & Hall, 1992.

Buchman, G. W., Banerjee, S., and Hansen, J. N. 1988. Structure, expression and evolution of a gene encoding the precursor nisin, a small peptide antibiotic. J. Biol. Chem. 263: 1620-1626.

Chan Li, Jinghua Bai, Zhaoling Cai and Fan Ouyang 2001. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. Biotechnology 93: 27-34.

Chandrapati, S., and O' Sullivan, D. J. 1998. Procedure for quantifiable assessment of nutritional parameters influencing nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. J. Biotechnol. 63: 229-233.

Chan-Ick Cheigh, Hak-Jong Choi, Hoon Park, Seong-Bo Kim, Moo-Chang Kook, Tae-Seok Kim, Jae-Kwan Hwang and Yu-Ryang Pyun 2002. Influence of growth conditions on the production of a nisin – like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. Biotechnology 95: 225-235.

Chen, H., and Hoover, D. G. 2003. Bacteriocins and their food applications. Comprehensive Rev. Food. Sci. Food. Safe. 2: 82-100.

Choi, H. J., and Park, Y. H. 2000. Selective control of *lactobacilli* in kimchi with nisin. Lett. Appl. Microbiol. 30: 173-177.

Cleveland J., Thomas J. Montville, Ingolf F. Nes and Michael L. Chikindas 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. International J. Food Microbiol. 71: 1–20.

Cutter C. N., Siragusa G. R. 1998. Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. Appl. Microbiol. 27: 19-23.

Davies, E. A., Bevis, H. E., and Delves, B. J. 1997. The use of the bacteriocin, nisin as a preservative in ricotta-type cheeses to control the food-borne pathogen *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 24: 343-346.

Delves Broughton J., Blackburn P., Evans R. J., Hugenholtz J. 1996. Application of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek 69: 193-202.

De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. 1993. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* sbusp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 17-22.

De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. Nisin, A lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*: properties, biosynthesis, fermentation and applications. In De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. (eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria, pp. 152-199. United Kingdom: Chapman & Hall, The Alden Press, 1994.

Dodd, H. M., Horn, N., and Gasson, M. J. 1990. Analysis of the genetic determinant for production of the peptide antibiotic nisin. J. Gen. Microbiol. 136: 555-566.

Drake, J. W. The Molecular basis of mutation. California: Holden-day, 1970.

Ferreira, M. A., and Lund, B. M. 1996. The effect of nisin on *Listeria monocytogenes* in culture medium and long-life cottage cheese. Lett. Appl. Microbiol. 22: 433-438.

Gardner, E.J. Principles of Genetics. 5th ed., pp. 231-264. New York, John Wiley & sons, 1975.

Gill A. O. and Holley R. A. 2003. Interactive inhibition of meat spoilage and pathogenic bacteria by lysozyme, nisin and EDTA in the presence of nitrite and sodium chloride at 24°c. Int. J. Food Microbiol. 80: 251-259.

Goodenough, U. SOS repair. In G. Kendall; S. Jean (eds), Genetics, pp. 193-194. New York : Holt, Rinehart and Winston.,1978.

Gross, E., and Morell, J. L. 1971. The structure of nisin. J. Am. Chem. Soc. 93: 4634 – 4635.

Guerra, N. P., Gonzahlez, B., Gaya, P., Nunez, M., and Medina, M. 1999. Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. Inter. Dairy. J. 10: 7-15.

Hensen, J. N. The molecular biology of nisin and its structural analogues . In Hoover, D. G., and Steenson, L. R. (eds.), Bacteriocins of lactic acid bacteria. 93-119, Academic Press.,1993

Hurst A. 1981. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27: 85-123.

Ishizaki A., Ueda T., Tanaka K. and Stanbury P.F. 1993. The kinetics of end-product inhibition of L-lactate production from xylose and glucose by *Lactococcus lactis* IO-1. Biotechnol. Lett. 15: 489-494.

Kim W. S., Hall R. J. and Dunn N. W. 1998. Improving nisin production by increasing nisin immunity/resistance genes in the producer organism *Lactococcus lactis*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48: 449-453.

Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70: 337-349.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 39–85.

Koponen, O., Tolonen, M., Qiao, M. Q., Wahlstrom, G., Helin, J., and Saris, P. E. J. 2002. NisB is required for the dehydration and NisC for the lanthionine formation in the post-translational modification of nisin. Microbiology. 148: 3561-3568.

Kuipers, O. P., Beerthuyzen, M. M., De Ruyter, P. C. M., Luesink, E. J., and De Vos, W. M. 1993. Characterization of the nisin gene cluster nisABTCIPR of *Lactococcus lactis*. Eur. J. Biochem. 216: 281-291.

Kuipers, O. P., Beerthuyzen, P. C. M., Siezen R. J., and De Vos, W. M. 1995. Autoregulation of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* by signal transduction. J. Biol. Chem. 270: 27299-27304.

Kuipers, O. P., Hester, H. E., Kramer, H. E. and Smith J. L. 2006. An Alternative Bactericidal Mechanism of action for lantibiotic peptides that target lipid II. Science 15: 1636-1637.

Li, H., and O'Sullivan, J. D. 2006. Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. Appl. Environ. Microbiol. 68: 3392-3400.

Mattick, A. T. R. & Hirsch, A. 1944. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. Nature 154: 551-552.

Matsusaki H., Endo N., Sonomoto K., Ishizaki A. 1995. Purification and identification of a peptide antibiotic produced by *Lactococcus lactis* IO-1. J. Fac. Agric. Kyushu. Univ. 40: 73-85.

Meanwell, L. J. 1943. The influence of raw milk quality on 'slowness' in cheesemaking. Proc. Soc. Agr. Bacteriol. 19: 112-119.

Mendell, J. D., and Greenberg, J. 1960. A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine. Biochem. Biophys. Res. Commun. 3: 575-577.

Mishra, C., and Lambart, J. 1996. Production of anti-microbial substance by probiotics. Asia Pacific J Clin Nutr. 5: 20-24.

Mulders, J. W. M. Boerrigter, I. J., Rollema, H. S., Siezen, R. J. and De Vos, W. M. 1991. Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. Eur. J. Biochem. 201: 581-584.

Nandakumar, R., Nandakumar, M. P., and Mattiasson, B. 1999. Quantification of nisin in flow-injection immunoassay systems. Biosensors & Bioeletronics. 15: 241-247.

Nes, I. F., Diep, D. B., Havarstein, L. S., Brurberg, M. B., Eijsink, V. and Holo, H. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70: 113-128.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit. P., Sonomoto, K., and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. J. Food. Microbiol. 81: 137-145.

Parente, E., Brienza, C., Moles, M., and Ricciardi, A. 1995. A comparision of methods for the measurement of bacteriocin activity. J. Microbiol. Method. 22: 95-108.

Parente, E. and Ricciardi, A., 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 628-638.

Park, S. H., Itoh, K., Kikuchi, E., Niwa, H., and Fujisawa, T. 2003. Identification and characteristics of nisin Z producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Kimchi. Current Microbiol. 46: 385–388.

Pongtharangkul. T., and Demirci. A. 2004. Evaluation of agar diffusion bioassay for nisin quantification. Appl. Microbiol. Biotechnol. 65: 268-272.

Quiao M., Omaetxebarria M. J., Ra. R., Usabiaga M., Immonen T. and Saris P. E. J. 1996. Regulation of the nisin operons in *Lactococcus lactis* N8. J. Appl. Bacteriol. 80: 626-634.

Ra, R., Beerthuyzen. M. M., de Vos, W. M., Saris, P. E. J., and Kuipers, O. P. 1999. Effect of gene disruptions in the nisin gene cluster of *Lactococcus lactis* on nisin production and producer immunity. Microbiology. 145: 1227-1233.

Reunanen, J., and Saris, P. E. J. 2003. Microplate bioassay for nisin in foods, based on nisin-induced green fluorescent protein fluorescence. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4214-4218.

Rodriguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Horn, N., Dodd, H. M., Hernandez, P. E., and Gasson, M. J. 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriol. 78: 109-115.

Rogers, L.A. & Whittier, E. O. 1928. Limiting factors in lactic fermentation. J. Bacteriol. 16: 211-214

Rollema, H. S., Kuipers, O. P., Both, P., de Vos, W. M., and Siezen, R. J. 1995. Improvement of solubility and stability of the antimicrobial peptide nisin by protein engineering. Appl. Environ. Microbiol. 61: 2873-2878.

Rose, N. L., Sporns, P., and McMullen, L. M. 1999. Detection of bacteriocins by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry. Appl. Environ. Microbiol. 65: 2238-2242.

Russel, P.J. Genetics. 4th ed., pp. 345-372. New York: Harper Collins College, 1996.

Schleifer, K. H., Kraus, J., Dvorak, C., Klipper-Balz, R., Collins, M. D. and Fischer, W. 1985. Transfer of *Streptococcus lactis* and related streptococci to the genus *Lactococcus* gen. nov., System. Appl. Microbiol. 6: 183-195.

Shattock, P. M. F. & Mattick, A. T. R. 1943. Inhibitory effect of nisin upon various organisms. J. Hyg. Comb. 43: 827-832.

Siegers, K., Heinzmann S., and Entian K-D. 1996. Biosynthesis of lantibiotic nisin posttranslational modifications of its prepeptide occurs at a multimeric membrane-associated lanthionine synthetase complex. J. Biol. Chem. 271: 12294-12301.

Snustad, D.P., Simmonsons, M.J., and Jerkins, J.B. Principles of Genetics, pp. 311-348. New York: John Wiley & Sons, 1997.

Stein,T., Heinzmann, S., Solovieva, I. And Entian, K-D. 2003. Function of *Lactococcus lactis* nisin immunity genes *nisI* and *nisFEG* after coordinated expression in the surrogate host *Bacillus subtilis.* J. Biol. Chem. 278: 89-94.

Stiles M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek 70: 199-210.

Szabo E. A. and Cahill M. E. 1998. The combined effects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol. 43: 21-31.

Turcotte, C., Lacroix, C., Khead, E., Grignon, L., and Fliss, I. 2004. A rapid turbidometric microplate bioassay for accurate quantification of lactic acid bacteria bacteriocins. Int. J. Food Microbiol. 90: 283-293.

Vessoni Penna T.C. and Moraes D.A. 2002. Optimization of nisin production by *Lactococcus lactis.* Appl. Biochem. Biotech. 98: 775-789.

Wanding, L. R., Sheldon, B. W., and Foegeding, P. M. 1999. Nisin in milk sensitizes *Bacillus* spores to heat and prevents recovery of survivors. J. Food protect. 62: 492-498.

Weaver, R. F., and Hedrick P. W. Genetics. 3rd ed., pp. 311-345. U.S.A.: W.M.C., Brown Publishers, 1977.

Whitehead, H. R. & Riddet, W. 1933. Slow development of acidity in cheese manufacture. N. Z. J. Agric. 46: 225-229.

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus deMan Rogosa Sharpe medium (MRS)

โปรติเอสเปปโตน	10.0	กรัม
เนื้อวัวสกัด	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
กลูโคส	22.0	กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	2.0	กรัม
ไดแอมโมเนียมซิเตรท	1.8	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.089	กรัม
ทวีน 80	1.0	มล.

ละลายสารทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เท่ากับ 6.2 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว Luria-Bertani (LB broth) (Sambrook และ Russell, 2001)

ทริปโตน	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	5.0	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 7.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. **อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria-Bertani (LB agar)** (Sambrook และ Russell, 2001)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว LB ละลายวุ้น 15 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. **สารละลายทริส-มาลิก บัฟเฟอร์** ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 6.0 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

ทริส-(ไฮดรอกซีเมทิล)-อะมีโนมีเทน ($C_4H_{11}NO_3$)	12.1	กรัม
กรดมาลิอิก	11.6	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 6.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

2. **สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์** ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-เบส เท่ากับ 7.0 ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1 ลิตร ประกอบด้วย

โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH2PO4)	2.7	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K2HPO4)	5.25	กรัม

ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเป็น 7.0 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

3. **กลีเซอรอล**

นำกลีเซอรอลมานึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121^{O}ซ เป็นเวลา 20 นาที ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งฆ่าเชื้อซ้ำอีกรอบหนึ่ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 6.1 แสดงการหาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

แหล่งคาร์บอน	ปริมาณส่วนน้ำใสที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ซ้ำที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ซ้ำที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร ซ้ำที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เฉลี่ย
ไม่เติมน้ำตาล	50	0.584	0.543	0.539	0.555
	200	0.604	0.595	0.520	0.573
	500	0.639	0.624	0.611	0.642
	1,000	0.250	0.203	0.231	0.228
กลูโคส	50	0.592	0.588	0.593	0.591
	200	0.549	0.566	0.590	0.568
	500	0.092	0.079	0.097	0.089
	1,000	0	0	0	0
ฟรุกโทส	50	0.559	0.546	0.572	0.559
	200	0.544	0.581	0.543	0.556
	500	0.072	0.093	0.105	0.090
	1,000	0	0	0	0
กาแลคโทส	50	0.542	0.589	0.529	0.553
	200	0.577	0.527	0.581	5.562
	500	0.119	0.127	0.115	0.120
	1,000	0	0	0	0
ซูโครส	50	0.516	0.585	0.557	0.553
	200	0.130	0.121	0.129	0.126
	500	0.090	0.095	0.091	0.092
	1,000	0	0	0	0
แลคโทส	50	0.557	0.560	0.565	0.561
	200	0.561	0.529	0.564	0.551
	500	0.548	0.569	0.573	0.563
	1,000	0.078	0.094	0.079	0.084

ตารางที่ 6.2 แสดงการหาปริมาณของซูโครสที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

ปริมาณซูโครส	ปริมาณส่วนน้ำใสที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรซ้ำที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรซ้ำที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง600 นาโนเมตรซ้ำที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เฉลี่ย
0%	200	0.591	0.596	0.587	0.591
	500	0.556	0.563	0.549	0.556
	1,000	0.270	0.258	0.297	0.275
0.5%	200	0.296	0.283	0.281	0.216
	500	0.018	0.020	0.017	0.018
	1,000	0	0	0	0
1%	200	0.153	0.132	0.135	0.140
	500	0	0	0	0
	1,000	0	0	0	0
2%	200	0.151	0.145	0.133	0.143
	500	0	0	0	0
	1,000	0	0	0	0
3%	200	0.211	0.203	0.197	0.201
	500	0.012	0.018	0.020	0.017
	1,000	0	0	0	0
4%	200	0.261	0.212	0.22	0.231
	500	0.023	0.025	0.025	0.024
	1,000	0	0	0	0

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6.3 แสดงการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณส่วนน้ำใส ที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรซ้ำที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรซ้ำที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง600 นาโนเมตรซ้ำที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เฉลี่ย
MRS	200	0.195	0.185	0.154	0.178
	500	0.016	0.013	0.014	0.015
	1,000	0	0	0	0
MRS+ซูโครส 1%	200	0.119	0.118	0.138	0.125
	500	0	0	0	0
	1,000	0	0	0	0
ไม่เติมไนโตรเจน	200	-	0.290	0.267	0.278
	500	0.267	0.264	0.268	0.267
	1,000	0.255	0.245	0.256	0.253
เพปโตน	200	0.199	0.221	0.192	0.206
	500	0.086	0.084	0.091	0.087
	1,000	0	0	0	0
ทริปโตน	200	0.185	-	0.191	0.188
	500	0.038	0.031	0.027	0.033
	1,000	0	0	0	0
สารสกัดจากยีสต์	200	0.147	0.151	0.137	0.145
	500	0	0	0	0
	1,000	0	0	0	0
สารสกัดจากเนื้อ	200	0.243	0.239	0.237	0.240
	500	0.162	0.177	-	0.170
	1,000	0.051	0.046	0.035	0.044

ตารางที่ 6.3 แสดงการหาแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อเชื้อสายพันธุ์กลาย *Lactococcus lactis* MU_2NUN_2

แหล่งไนโตรเจน	ปริมาณส่วนน้ำใส ที่ใช้ (ไมโครลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรซ้ำที่ 1	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตรซ้ำที่ 2	ค่าการดูดกลืนแสง600 นาโนเมตรซ้ำที่ 3	ค่าการดูดกลืนแสง 600 นาโนเมตร เฉลี่ย
MRS	200	0.195	0.185	0.154	0.178
	500	0.016	0.013	0.014	0.015
	1,000	0	0	0	0
MRS +ซูโครส1%	200	0.119	0.118	0.138	0.125
	500	0	0	0	0
	1,000	0	0	0	0
ไม่เติมไนโตรเจน	200	-	0.290	0.267	0.278
	500	0.267	0.264	0.268	0.267
	1,000	0.255	0.245	0.256	0.253
$NH_4H_2PO_4$	200	0.185	0.170	0.203	0.186
	500	0.062	0.063	0.049	0.058
	1,000	0	0	0	0
$NH_4(NO_3)_2$	200	0.264	0.259	0.270	0.265
	500	0.238	0.247	0.239	0.231
	1,000	0.175	0.177	0.179	0.185
$Ca(NO_3)_2$	200	0.256	0.248	0.247	0.251
	500	0.229	0.235	0.231	0.232
	1,000	0.169	0.156	0.164	0.162
KNO_3	200	0.102	0.110	0.120	0.111
	500	0.043	0.056	0.049	0.051
	1,000	0	0	0	0

ภาคผนวก ง

การคำนวณหาปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหาร MRS

1. การคำนวณหาปริมาณแหล่งคาร์บอนในอาหาร MRS

อาหาร MRS 1ลิตร ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส ($C_6H_{12}O_6$) 22.0 กรัม

ซึ่งคิดเป็น $\frac{22}{180}$ = 0.12 โมลต่อลิตร

ดังนั้นถ้าต้องการหาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสม ต้องปรับปริมาณของแหล่งคาร์บอนต่างๆ ที่เติมลงในอาหาร MRSให้มีค่าเท่ากับ 0.12 โมลต่อลิตร

2. การคำนวณหาปริมาณแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MRS

อาหาร MRS 1 ลิตร ประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจน คือ

โปรติเอสเปปโตน 10.0 กรัม คิดเป็นไนโตรเจน 15.56% ดังนั้นมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.556 กรัม

เนื้อวัวสกัด 10.0 กรัม คิดเป็นไนโตรเจน 12.15% ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.215 กรัม

ผงสกัดจากยีสต์ 5.0 กรัม คิดเป็นไนโตรเจน 11.91% ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.595 กรัม

แอมโมเนียมซิเตรต [$(NH_4)_2HC_6H_5O_7$] 0.2 กรัม ซึ่งมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด $\frac{28}{226} \times 0.2$ = 0.248 กรัม

ดังนั้น อาหาร MRS 1 ลิตร มีแหล่งไนโตรเจนทั้งหมดรวม 3.614 กรัม คิดเป็น 0.3614%

ดังนั้นถ้าต้องการหาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ต้องปรับปริมาณของแหล่งไนโตรเจนต่างๆ ที่เติมลงในอาหาร MRSให้มีค่าเท่ากับ 0.3614%

หมายเหตุ : ปริมาณไนโตรเจน วิเคราะห์โดย สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตร

โปรติเอสเปปโตน มีไนโตรเจน 15.56%

เนื้อวัวสกัด	มีไนโตรเจน 12.15%
ผงสกัดจากยีสต์	มีไนโตรเจน 11.19%
แบคโตทริปโตน	มีไนโตรเจน 13.58%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก จ

การเตรียมการและการป้องกันอันตรายจากการกลายพันธุ์

แสงอัลตราไวโอเลต

เป็นรังสีที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในจุลินทรีย์ อาจทำให้เกิดมะเร็งผิวหนังได้ การปฏิบัติงานที่เกี่ยวข้องกับแสงอัลตราไวโอเลตควรมีการสวมแว่นป้องกัน ห้ามมองหลอด UV โดยตรง เพราะเป็นแสงที่เป็นอันตรายต่อตา ควรมีการสวมแว่นป้องกันหรือใช้แสงอัลตราไวโอเลตที่อยู่ภายในตู้เขี่ยเชื้อที่มีกระจกกั้น ควรสวมถุงมือเมื่อต้องทำงานภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต เนื่องจากแสงอัลตราไวโอเลตนี้ผ่านกระจกได้ไม่ดี เชื้อที่ต้องการฉายแสงเพื่อกลายพันธุ์จึงต้องเปิดฝาจานเพราะเลี้ยงเชื้อไว้

สาร NTG (N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine)

สาร NTG เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิต และอาจเป็นสารก่อมะเร็งด้วย ดังนั้นในการทดลองจึงต้องทำด้วยความระมัดระวัง สาร NTG เป็นสารที่อันตรายต่อการสัมผัส การสูดดม การทดลองเกี่ยวกับสาร NTG ทั้งในลักษณะผลึกของแข็ง หรือสารละลาย ควรสวมถุงมือยางตลอดเวลา ควรสวมผ้าปิดปากเพื่อปิดปากเพื่อป้องกันละอองหรือไอระเหย ห้ามใช้ปากในการดูดปิเปตสารนี้เด็ดขาด การชั่งสาร NTG ควรทำในที่ไม่มีลมพัด ไม่ควรชั่งบนกระดาษชั่งสารเพราะอาจปลิวไปทำให้เกิดอันตรายต่อผู้ทำการทดลองและผู้ที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง อย่าเปิดขวดที่ใส่สาร NTG ทิ้งไว้ ควรใช้หลอดปลอดเชื้อที่แห้งสนิทและมีฝาปิด ชั่งน้ำหนักหลอดเปล่าก่อน แล้วจึงใช้ช้อนตักสาร NTG เติมลงในหลอด ปิดฝาแล้วชั่งน้ำหนักอีกครั้ง คำนวณน้ำหนักของสารและนำไปเตรียมเป็น stock ซึ่งควรเตรียมใหม่ทุกครั้งเมื่อต้องการใช้

อุปกรณ์ที่สัมผัสกับสาร NTG นำไปแช่ใน 1 N NaOH ในตู้ควัน เปิดเครื่องให้ดูดควันออก ทิ้งไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงนำมาล้าง และควรสวมมือยางในการล้างด้วย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวมาลินี สิงห์โตทอง เกิดเมื่อวันที่ 5 มีนาคม พ.ศ. 2526 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 และเข้ารับการศึกษาต่อในระดับปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย