


ฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ต่อแบคทีเรียก่อโรคใน
อาหาร



นางสาวฐิติญา รัตนดิลก ณ ภูเก็ต

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีทางอาหาร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
ปีการศึกษา 2556

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตที่ส่งมาขึ้นทะเบียนที่สำนักงานวิทยานิพนธ์ มหาวิทยาลัย
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALFSP1 AND ARASIN-LIKESP ANTIMICROBIAL PEPTIDES
AGAINST FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA

Miss Thitiya Rattanadilog Na Phuket



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Food Technology

Department of Food Technology

Faculty of Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2013

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร

โดย

นางสาวฐิติญา รัตนดิลก ณ ภูเก็ต

สาขาวิชา

เทคโนโลยีทางอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.อุบลรัตน์ สิริภัทราวรณ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเจียร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(ดร.ปิติ อ่ำพ่ายัพ)

ฐิติญา รัตนดิลก ณ ภูเก็ต : ฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร. (BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALFSp1 AND ARASIN-LIKE SP ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.จันทร์ประภา อิ่มจงใจรัก , หน้า.

เพปไทด์ต้านจุลชีพ (antimicrobial peptide; AMPs) เป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญและเป็นส่วนหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของจุลชีพแปลกปลอม เพปไทด์ต้านจุลชีพสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิด ในงานวิจัยนี้ศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ 4 ชนิด ได้แก่ antilipopopolysaccharide factor (ALFSp1) และ arasin-likeSp จากปูทะเล ไนซินจากเชื้อเชื้อ *Lactococcus lactis* และไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ ต่อเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารและเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียน ผลที่ได้พบว่าเพปไทด์สังเคราะห์ของ ALFSp1 มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* โดยมีค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC) ระหว่าง 0.39-50 μM ส่วนเพปไทด์สังเคราะห์ของ arasin-likeSp มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *V. harveyi* *V. parahaemolyticus* และ *V. anguillarum* โดยมีค่า MBC ระหว่าง 3.12-50 μM และจากผลที่ได้พบว่า ALFSp1 และ arasin-likeSp มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหาร *V. parahaemolyticus* ได้ดี ดังนั้นจึงเลือก *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในอาหารสำหรับใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป จากการศึกษาฤทธิ์ของไนซินและไลโซไซม์ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ได้ จากการศึกษาการใช้ ALFSp1 และ arasin-likeSp ร่วมกัน พบว่ามีการเสริมฤทธิ์กันในการต้านเชื้อ *V. parahaemolyticus* เมื่อศึกษาการเติม ALFSp1 และ arasin-likeSp ลงในแผ่นฟิล์มไคโตซานและทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* พบว่าฟิล์มไคโตซานที่เติม ALFSp1 และ arasin-likeSp ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตามเมื่อเติมสารละลายของ ALFSp1 และ arasin-likeSp ที่ความเข้มข้น 10 MBC ลงบนชิ้นเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่ง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถชะลอการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในชิ้นเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่งเมื่อเทียบกับเนื้อกุ้งที่ไม่ได้รับเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp

ภาควิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีทางอาหาร

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ปีการศึกษา 2556

5372237023 : MAJOR FOOD TECHNOLOGY

KEYWORDS: ANTIMICROBIAL PEPTIDE / CHITOSAN FILMS / VIBRIO

PARAHAEMOLYTICUS / ANTILIPOLYSACCHARIDE FACTOR (ALFSP1) / NISIN /

LYSOZYME / FOODBORNE PATHOGEN / ARASIN-LIKESP

THITIYA RATTANADILOG NA PHUKET: BIOLOGICAL ACTIVITY OF ALFSP1 AND ARASIN-LIKESP ANTIMICROBIAL PEPTIDES AGAINST FOODBORNE PATHOGENIC BACTERIA. ADVISOR: ASST. PROF. CHANPRAPA IMJONGJIRAK, Ph.D., pp.

Antimicrobial peptides (AMPs) are important components of the innate immune system and function as a first line of defense against invading microorganisms. AMPs are widely distributed in all living kingdom. This research aimed to investigate the biological activity of 4 antimicrobial peptides (Antilipopolysaccharide factor (ALFSp1) and arasin-likeSp from mud crab, nisin from *Lactococcus lactis* and lysozyme from chicken egg white) against foodborne pathogens and crustacean pathogens. Synthetic ALFSp1 revealed the antimicrobial activity against *A. viridans*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *V. harveyi*, and *V. parahaemolyticus* with Minimal Bactericidal Concentration (MBC) values of 0.39-50 μ M. Synthetic arasin-likeSp exhibited antimicrobial activity against *A. viridans*, *M. luteus*, *B. subtilis*, *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, and *V. anguillarum* with MBC values of 3.12-50 μ M. The result showed that ALFSp1, arasin-likeSp exhibited strong antimicrobial against *V. parahaemolyticus*. Therefore, *V. parahaemolyticus* was chosen as foodborne pathogen for further study. Antimicrobial assay of nisin and lysozyme revealed that nisin and lysozyme did not inhibit the growth of *V. parahaemolyticus*. The study of synergistic bacteriostatic effect found that the ALFSp1 and arasin-likeSp had synergistic effect on inhibition of *V. parahaemolyticus*. The incorporation of ALFSp1 and arasin-likeSp into chitosan film was investigated. The result showed that the chitosan film containing ALFSp1 and arasin-likeSp did not produce detectable inhibition zone against *V. parahaemolyticus*. The addition of 10 MBC of ALFSp1 and arasin-likeSp solution to the fresh-cut shrimp during refrigerated storage (4 °C) for 24 hours was studied. The result revealed that the total bacterial count was decelerated compare with control sample.

Department: Food Technology

Student's Signature

Field of Study: Food Technology

Advisor's Signature

Academic Year: 2013

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้โดยความกรุณาและการช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จันทร์ประภา อิมจงใจรัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งกรุณาสละเวลาให้คำแนะนำ ชี้แนะแนวทางที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย รวมถึงแรงผลักดันที่มีให้กับผู้วิจัยเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.อุบลรัตน์ สิริภัทราวรรณ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.สุเมธ ตันตระเชียร และ ดร.ปิติ อ่ำพ่ายพ ที่กรุณาสละเวลาตรวจสอบ แก้ไข ให้คำแนะนำ และร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ในภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และประสบการณ์อันมีค่ายิ่งแก่ผู้วิจัย

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่สนับสนุนทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช ในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่และบุคลากร ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกด้านต่าง ๆ ตลอดงานวิจัย

ขอบคุณ พี่ ๆ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหารทุกคน สำหรับความช่วยเหลือในด้านต่าง ๆ และให้กำลังใจกันตลอดมา

สุดท้ายผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่และญาติ ๆ สำหรับความช่วยเหลือ การสนับสนุน กำลังใจและแรงผลักดันในทุก ๆ ด้านที่มีให้เป็นอย่างดีเสมอมา

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สารบัญ

หน้า

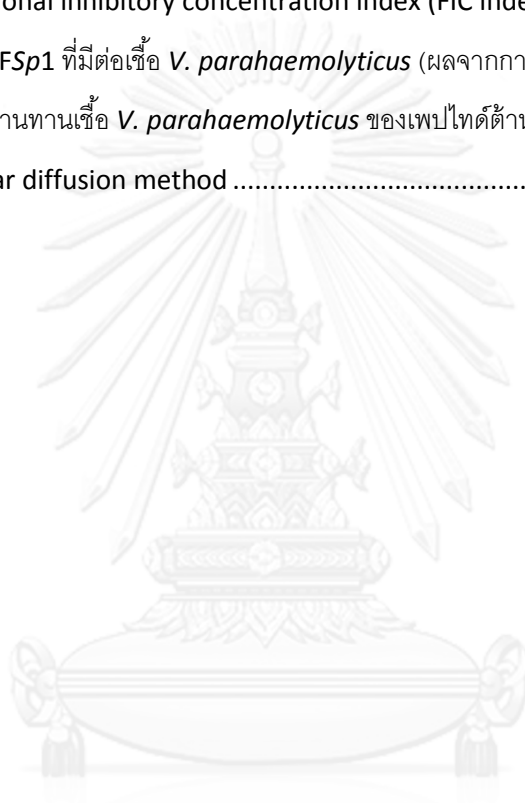
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฎ
สารบัญภาพ.....	ฏ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์.....	3
2.1 เพปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides, AMPs).....	3
2.2 โครงสร้างโมเลกุลและกลไกการทำงาน.....	4
2.2.1 โครงสร้างโมเลกุล.....	4
2.2.1.1 α -helical peptides.....	4
2.2.1.2 β -sheet peptides.....	4
2.2.1.3 β -hairpin หรือ loop structure.....	4
2.2.1.4 Extended peptides.....	4
2.2.2 โครงสร้างโมเลกุล.....	6
2.2.2.1 แบบจำลองคาร์เพท (carpet model).....	6
2.2.2.2 แบบจำลองโทรอยดัล (toroidal model).....	6
2.2.2.3 แบบจำลองบาร์เรล-สเตฟว์ (barrel-stave model).....	6
2.3 เพปไทด์ต้านจุลชีพในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ.....	7
2.3.1 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากแบคทีเรีย.....	7
2.3.2 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากพืช.....	9
2.3.3 เพปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์.....	9
2.3.4 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากสัตว์ทะเลกลุ่มครัสเตเชียน.....	11

2.4 เพปไทด์ต้านจุลชีพ Antilipopolysaccharide factor (ALF).....	12
2.5 เพปไทด์ต้านจุลชีพ Arasin-likeSp	13
2.6 ฟิล์มต้านเชื้อจุลชีพ (Antimicrobial films)	14
2.7 ไคโตซาน (Chitosan).....	14
2.8 <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	15
2.9 การนำเพปไทด์ต้านจุลชีพมาใช้ในอาหาร.....	16
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	17
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	17
3.2 สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ.....	18
3.3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์	20
3.3.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์	20
3.3.1.2 การเตรียมเพปไทด์ต้านจุลชีพ.....	20
3.3.1.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยหาค่า minimal inhibitory concentration, MIC.....	20
3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์โดยหาค่า minimal bactericidal concentration, MBC.....	21
3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยเทคนิค agar diffusion method.....	21
3.3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp ร่วมกับ ALFSp1 (Rosenfeld, Barra, Simmaco, Shai, & Mangoni, 2006)	21
3.3.5 การเตรียมฟิล์มไคโตซานและฟิล์มไคโตซานผสมเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp และ ALFSp1	22
3.3.6 การทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของฟิล์ม	23
3.3.6.1 การทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของฟิล์มโดยเทคนิค agar diffusion method.....	23
3.3.6.2 การทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของฟิล์มโดยเทคนิค broth microdilution assay (Muriel-Galet et al., 2012)	23
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง.....	25

4.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ antilipoplysaccharide factor (ALFSp1) และ arasin-likeSp จากปูทะเล	25
4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ antilipoplysaccharide factor (ALFSp1) และ arasin-likeSp โดยหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC).....	25
4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp โดยหาค่า minimal bactericidal concentration (MBC).....	27
4.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพโนซินและไลโซไซม์ โดยหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC)	30
4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ร่วมกัน	31
4.4 การทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของฟิล์มไบโโคชานที่ผสมเพปไทด์ต้านจุลชีพ.....	33
4.5 การใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp เพื่อดำเนินการเจริญของ <i>V. parahaemolyticus</i> ในเนื้อกุ้งกุลาดำ.....	38
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	41
5.1 สรุปวิจัย	41
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	42
.....	43
รายการอ้างอิง	43
ภาคผนวก ก.....	57
ภาคผนวก ข.....	59
ภาคผนวก ค.....	64
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 4. 1 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ด้วยเทคนิค broth microdilution (ผลจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ).....	27
ตารางที่ 4. 2 ค่า Fractional inhibitory concentration index (FIC index) ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp และ ALFSp1 ที่มีต่อเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> (ผลจากการทำการทดลอง 2 ซ้ำ)	32
ตารางที่ 4. 3 ฤทธิ์การต้านทานเชื้อ <i>V. parahaemolyticus</i> ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ทดสอบโดย agar diffusion method	38



สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
รูปที่ 2. 1 โครงสร้างของเพปไทด์ด้านจุลชีพ 3 แบบ ได้แก่ α -helical peptides (a), β -sheet peptides (b) และ Extended peptides (c) (Nguyen, Haney, & Vogel, 2011).....	5
รูปที่ 2. 2 แบบจำลองแสดงกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเพปไทด์ด้านจุลชีพ: แบบจำลองคาร์เปท (a), แบบจำลองโทรอยดัล (b) และแบบจำลองบาร์เรล-สเตพฟ์ (c) (Brogden, 2005)	7
รูปที่ 2. 3 ลำดับกรดอะมิโนของไนซิน (Chan, Dodd, Horn, & Maclean, 1996).....	8
รูปที่ 2. 4 โครงสร้างสามมิติและลำดับกรดอะมิโนของไลโซไซม์ที่ได้จากไขขาวของห่าน (Thammasirirak et al., 2010)	10
รูปที่ 2. 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ antilipoplysaccharide factor (ALFSp1) ที่พบในปูทะเล <i>Scylla paramamosain</i> (Imjongjirak, Amparyup, Tassanakajon, & Sittipraneed, 2007) ตัวอักษรสีดำเข้มและขีดเส้นใต้แสดง start codon stop codon และ signal sequence บริเวณกรอบสี่เหลี่ยมแสดง LPS-binding domain	12
รูปที่ 2.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของ arasin-likeSp ที่พบในปูทะเล <i>S. paramamosain</i> (Imjongjirak, Amparyup, & Tassanakajon, 2011b) ตัวอักษรสีดำเข้มและขีดเส้นใต้แสดง start codon stop codon และ signal sequence	13
รูปที่ 2. 7 โครงสร้างโมเลกุลของโคโคซาน.....	15
รูปที่ 4. 1 ตัวอย่างการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของเพปไทด์ด้านจุลชีพ ALFSp1 ด้วยเทคนิค broth microdilution assay ใน 96 well microplate	26
รูปที่ 4. 2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแผ่นฟิล์มโคโคซานผสมเพปไทด์ด้านจุลชีพ ALFSp1 (A) และฟิล์มโคโคซานผสมเพปไทด์ด้านจุลชีพ arasin-likeSp (B) โดยใช้ความเข้มข้นของ ALFSp1 และ arasin-likeSp เท่ากับ 2 และ 4 เท่าของค่า MIC	34
รูปที่ 4. 3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแผ่นฟิล์มโคโคซานผสมเพปไทด์ด้านจุลชีพ arasin-likeSp โดยใช้ฟิล์มโคโคซานที่ไม่เติมเพปไทด์ด้านจุลชีพเป็นตัวอย่างควบคุม (A) และใช้ความเข้มข้นของ arasin-likeSp เท่ากับ 1 เท่าของค่า MIC (B) และ 10 เท่าของค่า MIC (C).....	35
รูปที่ 4. 4 แถบโปรตีนในสารละลายจากการทดสอบฟิล์มโคโคซานฟิล์มโคโคซานที่ผสม ALFSp1 และฟิล์มโคโคซานที่ผสม arasin-likeSp ด้วยเทคนิค broth microdilution (ถูกครแสดงตำแหน่งของ ALFSp1 และ arasin-likeSp).....	36

- รูปที่ 4. 5 ลักษณะของ inhibition zone ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของเพปไทด์
 ด้านจุลชีพ ALFSp1 (A), arasin-likeSp (B), น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ตัวอย่างควบคุม) (C) เมื่อทดสอบโดย agar
 diffusion method 37
- รูปที่ 4. 6 ตัวอย่างกึ่งกลาดำ (A) กึ่งกลาดำที่ผ่านการปกเปลือกและล้างทำความสะอาด (B) ชื่นเนื้อกึ่งกลาดำ
 ที่ผ่านการตัดแต่งให้มีขนาดประมาณ 1x1x0.5 เซนติเมตร (C) และชื่นเนื้อกึ่งกลาดำที่ได้รับเพปไทด์ด้านจุลชีพ
 ALFSp1 และ arasin-likeSp (D) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง..... 39



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารยังคงได้รับความสนใจเนื่องจากมีความสำคัญต่ออายุการเก็บรักษา และความปลอดภัยของอาหาร ในปัจจุบันมีหลายวิธีการที่สามารถทำให้อาหารนั้นเก็บรักษาได้นานขึ้นเช่น การใช้ความร้อน การเก็บรักษาอาหารด้วยความเย็น การหมัก การดอง การอบแห้ง หรือการใช้สารต้านจุลชีพ (antimicrobial agent) เป็นต้น ซึ่งการใช้สารต้านจุลชีพกำลังเป็นที่สนใจ นักวิทยาศาสตร์ได้มีการค้นคว้าทดลองหาสารต้านจุลชีพหลายชนิดจากต่างแหล่งที่มาเช่น สารเคมี พืช และสัตว์ เป็นต้น (Fehlbaum et al., 1996; Izadpanah & Gallo, 2005; Reddy, Yedery, & Aranha, 2004) สารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อหรือยับยั้งการเจริญของจุลชีพเช่น เชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ ไวรัสและเชื้อรา (Reddy, Yedery, & Aranha, 2004) สารต้านจุลชีพที่เป็นสารเคมี เช่น กรดซอร์บิก กรดเบนโซอิก มีการนำมาใช้ในอาหารหลายชนิด เช่น กาแฟ น้ำอัดลม น้ำผักผลไม้ แยม เยลลี่ มาร์มาเลด เป็นต้น (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2552) ใช้ได้ทั้งในรูปกรดเบนโซอิกหรือเกลือของกรดเบนโซอิกเช่น โซเดียมเบนโซเอตหรือโพแทสเซียมเบนโซเอต กรดซอร์บิกเป็นเกลือที่นิยมใช้เป็นสารกันเสีย (Lueck, 1976, 1980; J.N. Sofos & Busta, 1981; J.N. Sofos & Busta, 1983) อยู่ในรูปเกลือของกรดซอร์บิก มักใช้ในอาหารประเภทนม เบเกอรี่ ผัก ผลไม้ รวมไปถึงเนื้อสัตว์ต่างๆ (J.N. Sofos, Pierson, Blocher, & Busta, 1986) ไนเตรท (nitrate) มักนำมาใช้ในรูปของเกลือ เช่นโซเดียมไนเตรทโพแทสเซียมไนเตรท หรือดินประสิวใช้กับอาหารประเภทเนื้อสัตว์ อย่างไรก็ตามสารกันเสียในอาหารเหล่านี้มีข้อจำกัดคือถ้าใช้ในปริมาณเกินกว่ากำหนดอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ขณะที่สารต้านจุลชีพจากพืชได้แก่สารจำพวกน้ำมันหอมระเหย เช่น ส้ม (*Citrus sinensis*), เลมอน (*Citrus lemon*) และส้มแมนดาริน (*Citrus reticulata*) (Espina et al., 2011) กระเทียม (Rohani, Moradi, Mehdizadeh, Saei-Dehkordi, & Griffiths, 2011) กานพลู อบเชย กะเพราและไทม์ (Bagamboula, Uyttendaele, & Debevere, 2004) เป็นต้น สามารถใช้น้ำมันหอมระเหยเหล่านี้ในอาหารได้แต่มีข้อจำกัดคือกลิ่นของน้ำมันอาจส่งผลกระทบต่อกลิ่นของอาหาร

แบคทีเรียโอซินเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความสำคัญต่อระบบการป้องกันตัวเองของสิ่งมีชีวิตในธรรมชาติที่ผลิตได้จากเชื้อจุลินทรีย์โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก lactic acid bacteria (LAB) สามารถใช้กับอาหารได้ (Sullivan, Ross, & Hill, 2002) ช่วยลดการใช้สารเคมีในอาหาร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ สมบัติของแบคทีเรียโอซินคือไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสิ่งมีชีวิต (eukaryotecells) สามารถยับยั้งการทำงานได้โดยเอนไซม์โปรตีเอส (protease) ทนต่อความเป็นกรดต่างและทนต่อความร้อน สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารได้หลายชนิด (L. V. Thomas, Clarkson, & Delves-Broughton, 2000) สำหรับในงานวิจัยนี้สนใจศึกษาเพปไทด์ต้านจุลชีพ 4 ชนิด ได้แก่

antilipopolysaccharide factorSp1 (ALFSp1), arasin-likeSp, ไนซิน (nisin) และไลโซไซม์ (lysozyme)

เพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในปูทะเลซึ่งเป็นสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียน มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบหลายชนิด เช่น *Bacillus subtilis* *Micrococcus luteus* *Vibrio harveyi* เป็นต้น (Imjongjirak, Amparyup, & Tassanakajon, 2011a; Imjongjirak et al., 2011b; Imjongjirak et al., 2007; Imjongjirak, Amparyup, Tassanakajon, & Sittipraneed, 2009) ส่วนไนซินเป็นแบคทีริโอซินที่ได้จาก *Lactococcus lactis* เป็น food preservative ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาให้เป็น generally recognized as safe (GRAS) สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกได้ เช่น เชื้อ *Listeria monocytogenes* (Rohani et al., 2011) นิยมใช้ในเนยแข็ง นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้กับน้ำสลัด อาหารกระป๋อง (Millette, L.C., Smoragiewicz, & Lacroix, 2007) ส่วนไลโซไซม์เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบได้ในไข่ขาว น้ำตา น้ำลาย น้ำนมมนุษย์ และเป็น food preservative ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดี

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ 4 ชนิด ได้แก่ antilipopolysaccharide factor (ALFSp1) และ arasin-likeSp จากปูทะเล, ไนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* และไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ที่มีต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 เพปไทด์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial peptides, AMPs)

เพปไทด์ต้านจุลชีพ (AMPs) เป็นโมเลกุลที่มีความสำคัญและเป็นส่วนหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันแบบที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) (แบบไม่จำเพาะ) ซึ่งเป็นกลไกการป้องกันตัวเองจากการบุกรุกของจุลชีพแปลกปลอม เพปไทด์ต้านจุลชีพสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดทั้งในโปรคาริโอตและยูคาริโอต เช่น จุลินทรีย์ เชื้อรา พืช สัตว์ รวมทั้งในมนุษย์ (Boman, 1995; Zasloff, 2002) จากคุณสมบัติในการต้านจุลชีพทำให้ได้รับความสนใจในการนำมาใช้เป็นสารต้านจุลชีพ เพปไทด์ต้านจุลชีพชนิดแรกที่มีการค้นพบ คือ cecropin ซึ่งแยกได้จากผีเสื้อกลางคืนขนาดใหญ่ *Hyalophora cecropia* (Hultmark, Steiner, Rasmuson, & Boman, 1980) โดยทั่วไปเพปไทด์ต้านจุลชีพเป็นเพปไทด์ที่มีขนาดเล็ก มีความยาวของกรดอะมิโนน้อยกว่า 100 ตัว มีลักษณะเป็น amphipathic peptide และมีประจุสุทธิเป็นบวกเนื่องจากประกอบด้วยกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (positively charge amino acids) (Jenssen, Hamill, & Hancock, 2006) เช่น อาร์จินีน (arginine) ไลซีน (lysine) รวมทั้งมักจะพบกรดอะมิโนชนิดไม่มีขั้ว (hydrophobic amino acids) เช่น อะลานีน (alanine) ฟีนีลอะลานีน (phenylalanine) ทริปโตฟาน (tryptophan) และไทโรซีน (tyrosine) เป็นองค์ประกอบ (Giuliani, Pirri, & Nicoletto, 2007)

ในปัจจุบันมีฐานข้อมูลจำนวนมากที่รวบรวมข้อมูลของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีการรายงานการค้นพบและได้รับการตีพิมพ์ ตัวอย่างเช่น ในฐานข้อมูล Antimicrobial Peptide Database (APD) (<http://aps.unmc.edu/AP/main.php>) (G. Wang, Li, & Wang, 2008; Z. Wang & Wang, 2004) ฐานข้อมูล AMPer Database (<http://www.cnbi2.com/cgi-bin/amp.pl>) (Fjell, Hancock, & Cherkasov, 2007) และฐานข้อมูล Collection of Anti-Microbial Peptides (CAMP) (<http://www.bicnirrh.res.in/antimicrobial>) (S. Thomas, Karnik, Barai, Jayaraman, & Idicula-Thomas, 2010) ซึ่งสามารถใช้สืบค้นข้อมูลของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีรายงานจากสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ รวมถึงข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่รวบรวมไว้ในฐานข้อมูลเหล่านี้ เช่น ลำดับกรดอะมิโน ประจุสุทธิ โดเมนที่สำคัญ โครงสร้างโมเลกุล และฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ ซึ่งเป็นประโยชน์ในการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโครงสร้างโมเลกุลและฤทธิ์ในการต้านจุลชีพซึ่งสามารถนำมาใช้ในการทำนายฤทธิ์การต้านจุลชีพของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีการค้นพบใหม่ได้

2.2 โครงสร้างโมเลกุลและกลไกการทำงาน

2.2.1 โครงสร้างโมเลกุล

จากการศึกษาโครงสร้างโมเลกุลของเพปไทด์ต้านจุลชีพพบว่ามีความหลากหลายค่อนข้างสูง ซึ่งส่งผลให้ยากต่อการจัดจำแนกประเภทของเพปไทด์ต้านจุลชีพ อย่างไรก็ตามในปัจจุบันสามารถแบ่งเพปไทด์ต้านจุลชีพโดยอาศัยความแตกต่างของโครงสร้างทุติยภูมิ (secondary structure) ของเพปไทด์ต้านจุลชีพได้เป็น 4 ประเภท ได้แก่ α -helical peptides, β -sheet peptides, β -hairpin หรือ loop structure และ extended peptides (รูปที่ 2.1) (Hancock & Lehrer, 1998)

2.2.1.1 α -helical peptides

เป็นเพปไทด์ที่มีลักษณะโครงสร้างเป็นเกลียวเวียนขวา ตัวอย่างของเพปไทด์โครงสร้างดังกล่าว เช่น magainins ซึ่งแยกได้จากผิวหนังของกบ (Zasloff, 2002) Buforin II ที่แยกจากคางคก (C. B. Park, Kim, & Kim, 1996) melittin จากสารพิษของผึ้ง (Lariviere & Melzack, 1996) เป็นต้น

2.2.1.2 β -sheet peptides

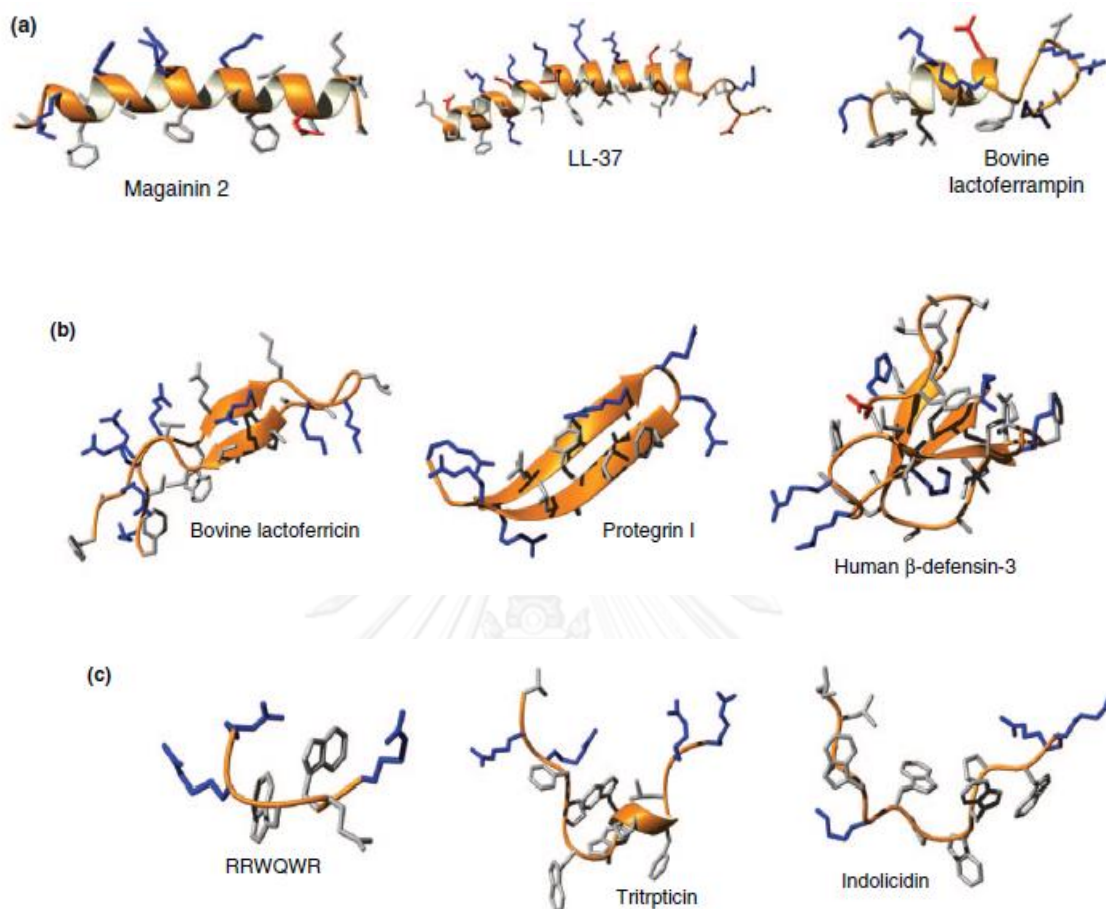
โครงสร้าง beta-sheet หรือ beta-strand เป็นโครงสร้างซึ่งประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulfide bond) อย่างน้อย 2 พันธะในการคงรูปร่าง เพปไทด์หลายชนิดในกลุ่มนี้จะไปรบกวนเชื้อจุลินทรีย์โดยการสร้าง toroidal pores เช่นใน porcine peptide protegrinI ที่ไปสร้าง oligomeric transmembranes β -barrels บน anionic membranes และไปสร้าง β -sheet aggregates เพื่อไปจับกับโคเลสเตอรอลบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ (Tang & Hong, 2009)

2.2.1.3 β -hairpin หรือ loop structure

ประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ในการคงรูปร่างของเพปไทด์เพียงพันธะเดียว ตัวอย่างเช่น lactoferrin ซึ่งพบได้จากทั้งในน้ำนมวัวและน้ำนมมนุษย์ thanatin จากแมลงจำพวกมวน (*Podisus maculiventris*) เป็นต้น (Fehlbaum et al., 1996)

2.2.1.4 Extended peptides

เป็นเพปไทด์สายตรงที่ประกอบไปด้วยเพปไทด์เพียงชนิดเดียวหรือมากกว่า 1 ชนิด มักพบในแมลง เช่น tritrypticin indolicidin (L. Otvos, 2002) pyrrocoricin (L. J. Otvos et al., 2000)



รูปที่ 2. 1 โครงสร้างของเพปไทด์ต้านจุลชีพ 3 แบบ ได้แก่ α -helical peptides (a), β -sheet peptides (b) และ Extended peptides (c) (Nguyen, Haney, & Vogel, 2011)

ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพมากกว่า 1000 ชนิด จากหลากหลายสิ่งมีชีวิต อย่างไรก็ตามพบว่าลักษณะทั่วไปของเพปไทด์ต้านจุลชีพส่วนใหญ่สามารถมีโครงสร้างในลักษณะที่เป็น amphipathic conformation ซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีทั้งส่วนที่มีขั้วและส่วนที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) เป็นคุณสมบัติที่มีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ของเชื้อจุลชีพซึ่งจะส่งผลให้เกิดการแทรกตัวของเพปไทด์และมีการทำลายเชื้อได้ (Jenssen et al., 2006) โดยมีขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์ของเชื้อจุลชีพที่เสนอเป็นแบบจำลองไว้หลายรูปแบบ ได้แก่ แบบจำลองคาร์เพท (carpet model) แบบจำลองทอรอยดัล (toroidal model) และแบบจำลองบาร์เรล-สเตฟว์ (barrel-stave model) (รูปที่ 2.2) (Brosgden, 2005)

2.2.2 โครงสร้างโมเลกุล

2.2.2.1 แบบจำลองคาร์เพท (carpet model)

ในแบบจำลองนี้เพปไทด์จะหันด้านที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) เข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ในลักษณะของการปูพรมและหันด้านที่ไม่ชอบน้ำออกด้านนอก (hydrophobic) เมื่อความเข้มข้นสูงขึ้นจะเกิดการยับตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ ด้านที่ชอบน้ำจะพับตัวเข้าหากันและด้านที่ไม่ชอบน้ำที่จับกับชั้นไขมันจะอยู่ด้านในทำให้เกิดรูและสารที่อยู่ในเซลล์จะไหลออกมาออกเซลล์

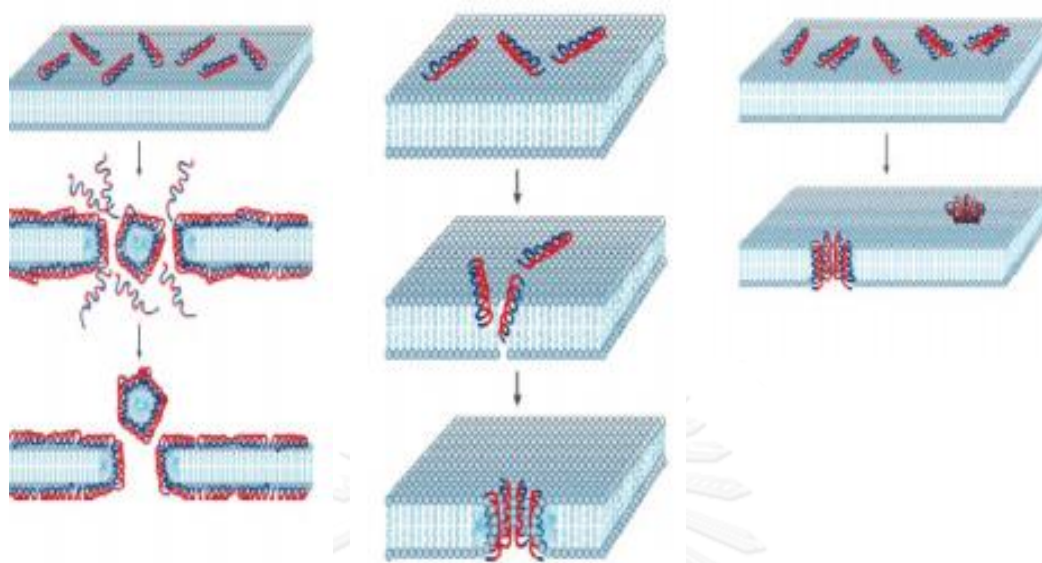
2.2.2.2 แบบจำลองโทรอยดัล (toroidal model)

ในแบบจำลองนี้เพปไทด์จะปกคลุมเยื่อหุ้มเซลล์แล้วเกิดการรวมตัวกันหลังจากนั้นจะไปเหนี่ยวนำให้กลุ่มของปลายที่เป็นไขมัน (lipid head group) ของ phospholipid bilayer เกิดการงอตัวเข้าหากันเกิดเป็นท่อหลวมๆ ทำให้เกิดเป็นช่องว่างระหว่างภายในและนอกเซลล์จุลชีพทำให้เกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ นอกจากนี้เพปไทด์ยังสามารถแทรกเข้าไปใน phospholipid bilayer ทำปฏิกิริยากับสารภายในเซลล์ได้

2.2.2.3 แบบจำลองบาร์เรล-สเตฟว์ (barrel-stave model)

ในแบบจำลองนี้เพปไทด์จะทำให้เกิดช่องว่างโดยการแทรกตัวเข้าไปในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ในลักษณะขนานกับชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งเป็น phospholipid bilayer โดยจะเรียงตัวด้านที่ไม่ชอบน้ำของเพปไทด์กับด้านที่ไม่ชอบน้ำของ phospholipid bilayer ด้านที่ชอบน้ำของเพปไทด์จะอยู่ชิดกับช่องว่างที่อยู่ตรงกลางซึ่งมีโมเลกุลของน้ำอยู่ การทำงานของเพปไทด์รูปแบบนี้ทำให้สารที่อยู่ภายในเซลล์ไหลออกสู่นอกเซลล์ทำให้เซลล์จุลินทรีย์ตายในที่สุด

นอกจากกลไกตามแบบจำลองดังกล่าวข้างต้นแล้วยังมีกลไกการทำงานในรูปแบบอื่นที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้เช่น การยับยั้งการสร้างโปรตีนในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ การรบกวนการแลกเปลี่ยนสารและพลังงานภายในกับนอกเซลล์จุลินทรีย์ การยับยั้งการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นต้น (Reddy, Yedery, & Arnha, 2004)



รูปที่ 2. 2 แบบจำลองแสดงกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ: แบบจำลองคาร์เพท (a), แบบจำลองโทรอยดัล (b) และแบบจำลองบาร์เรล-สเตฟว์ (c) (Brogden, 2005)

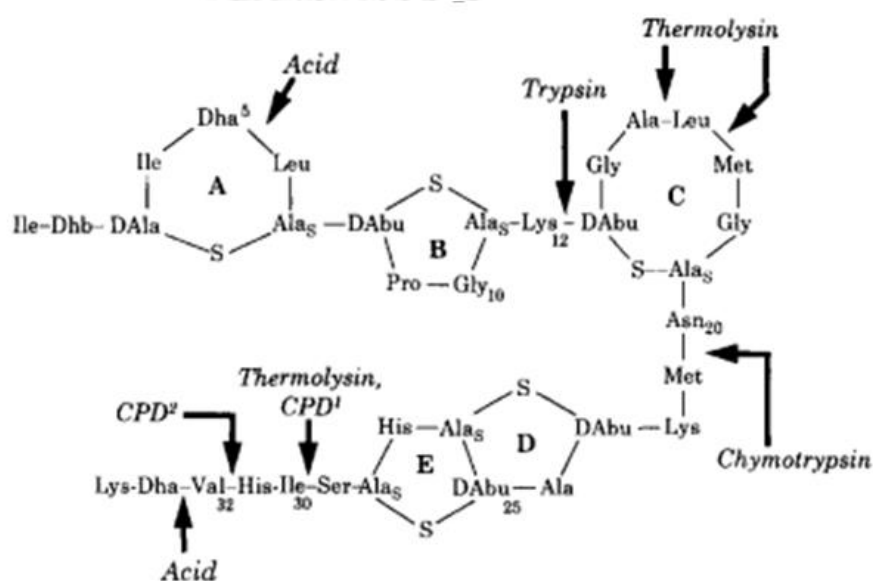
2.3 เพปไทด์ต้านจุลชีพในสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ

2.3.1 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากแบคทีเรีย

แบคทีริโอซิน (bacteriocins) เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่สังเคราะห์ได้โดยไรโบโซมของแบคทีเรีย (ribosomally-synthesized peptide) สร้างได้โดยแบคทีเรียหลายชนิด โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่ม lactic acid bacteria (LAB) เพปไทด์ต้านจุลชีพกลุ่มนี้มีมักถูกนำมาใช้เป็น food preservative เพื่อลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ลดการสูญเสียจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ลดและทดแทนการใช้สารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อนสูงในกระบวนการผลิตอาหาร ทำให้อาหารสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานโดยยังคงความสดใหม่ไว้ได้ (L. V. Thomas et al., 2000) ตัวอย่างของแบคทีริโอซิน เช่น ไนซิน (Nisin) และเพดิโคซิน (Pediocin) เป็นต้น

ไนซิน (nisin) เป็นแบคทีริโอซิน (polycyclic antibacterial peptide) ผลิตได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัว (รูปที่ 2.3) ได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO ไนซินสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดี เช่น เชื้อ *Listeria monocytogenes* (Rohani et al., 2011) นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอาหาร เช่น Solomakos, Govaris, Koidis, and Botsoglou (2007) ได้ทดสอบความสามารถในการต้านเชื้อ *L. monocytogenes* ในเนื้อมัต พบว่าไนซินที่ความเข้มข้น 500-1000 IU/ml สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้และเมื่อใช้ไนซินร่วมกับน้ำมันหอมระเหยของใบไทม์จะเสริมฤทธิ์ในการต้านเชื้อ *L. monocytogenes* นอกจากนี้ Gill and Holley (2000) ได้ทดลองใช้ไนซินร่วมกับไลโซไซม์ และ EDTA พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวกบางชนิด ได้แก่ *Brochothrix*

thermosphacta Lactobacillus curvatus และจุลินทรีย์แกรมลบบางชนิด ได้แก่ *E. coli* ได้ และเมื่อใช้ในซินร่วมกับ metabisulphite สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียในไวน์ได้ (Bezares, Sáenz, Zarazaga, Torres, & Larrea, 2007) นอกจากนี้ยังสามารถนำมาใช้กับน้ำสลัด อาหารกระป๋อง (Millette et al., 2007) ทั้งยังมีการนำมาใช้กับฟิล์มชนิดต่างๆ เช่น ฟิล์มไคโตซาน อัลจิเนตและ tapioca starch เป็นต้น (Marcos, Aymerich, Garriga, & Arnau, 2012; Millette et al., 2007; Sanjurjo, Flores, Gerschenson, & Jagus, 2006) และยังสามารถใช้ร่วมกับ modified atmosphere packaging ร่วมกับ EDTA ทำให้มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเนื้อไก่ได้นานยิ่งขึ้น (Economou, Pournis, Ntzimani, & Savvaidis, 2008)



รูปที่ 2. 3 ลำดับกรดอะมิโนของไนซิน (Chan, Dodd, Horn, & Maclean, 1996)

เพดดิโอซิน (Pediocin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Pediococcus* sp. บางสายพันธุ์ เช่น *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* แสดงฤทธิ์ยับยั้งและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์แกรมบวก (Cotter, Hill, & Ross, 2005) เช่น *L. monocytogenes* มักใช้เป็นสาร preservative เพื่อยับยั้งการเกิด post-processing contamination ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์เนื่องจากอาจเกิดการปนเปื้อน เช่น ในกระบวนการบรรจุ และการหั่น เป็นต้น (M. Zhu, Du, Cordray, & Ahn, 2005) Santiago-Silva et al. (2008) ทดสอบโดยการนำ pediocin (ALTA[®] 2351) มาใช้ร่วมกับฟิล์มเซลลูโลสเพื่อเก็บรักษาแฮมสไลด์ พบว่าสามารถลด *Listeria innocua* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์แกรมบวกได้ 2 log cycle

2.3.2 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากพืช

พืชมีการพัฒนากลไกเพื่อป้องกันและลดอันตรายที่จะเกิดขึ้นจากการถูกบุกรุกจากเชื้อจุลชีพ เช่น เชื้อรา ไวรัส และแบคทีเรีย ทั้งโดยการสร้างสาร secondary metabolites ได้แก่ สารประกอบฟีนอลิก และสารประกอบอัลคาลอยด์ (Franco & Melo, 2000) และการสร้างเพปไทด์ต้านจุลชีพ (AMPs) ซึ่งเป็นระบบภูมิคุ้มกันตัวเองที่เป็นกลไกด่านแรกในการต่อสู้กับเชื้อโรค โดยสามารถพบเพปไทด์ต้านจุลชีพในเนื้อเยื่อตามส่วนต่าง ๆ ของพืช เช่น ดอก เมล็ด ราก และใบ เป็นต้น (Lay, Brugliera, & Anderson, 2003; Pelegriani, Sarto, Silva, Franco, & Grossi-de-Sa, 2011) ตัวอย่างของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในพืช เช่น defensin เป็นต้น

เพปไทด์ต้านจุลชีพ defensin ที่พบในพืชเป็นเพปไทด์ขนาดเล็ก มีขนาด 5–6 กิโลดาลตัน (Almeida, Cabral, Kurtenbach, Almeida, & Valente, 2002) ประกอบด้วย N-terminal acidic signal peptide และ basic mature peptide มีกรดอะมิโน 45-54 ตัว โครงสร้างคล้ายคลึงกับ defensin ในมนุษย์และแมลง (Coninck, Cammue, & Thevissen, 2013) มีรายงานการศึกษา Im-def ซึ่งเป็น defensin จากต้น maca (*Lepidium meyenii*) มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Phytophthora infestans* ที่เป็นสาเหตุของโรค late blight ในมันฝรั่งและมะเขือเทศ (Solis, Medrano, & Ghislain, 2006) มีรายงานถึง defensin ที่ได้จากดอกทานตะวัน สามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพกลุ่มเชื้อราได้ (Urdangarin, Norero, Broekaert, & C., 2000) นอกจากนี้แล้วยังพบเพปไทด์กลุ่ม cysteine-rich antimicrobial peptides ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของยีสต์บางชนิด เช่น *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae* และ *Schizosaccharomyces pombe* (Mariângela et al., 2006)

2.3.3 เพปไทด์ต้านจุลชีพในสัตว์

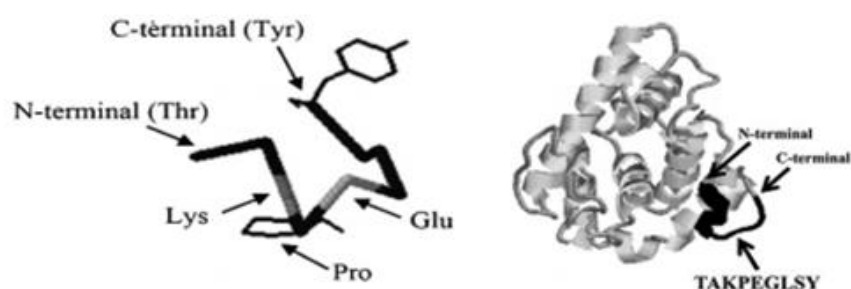
มีเพปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิดที่มีรายงานการค้นพบในสัตว์โดยพบได้ในเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น polymorphonuclear leukocytes และ macrophages (Brogden, Ackermann, McCray, & Tack, 2003) ตัวอย่างเช่น ไลโซไซม์ และแลคโตเฟอร์ริน (lactoferrin) เป็นต้น

ไลโซไซม์ (lysozyme) เป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบได้ในไข่ขาว น้ำตา น้ำลาย และน้ำนม มนุษย์ มีความสามารถในการไฮโดรไลซ์ β -1, 4 linkage ระหว่าง N-acetyl muramic acid และ N-acetyl glucosamine ที่พบมากใน peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของแบคทีเรีย มีรายงานวิจัยที่กล่าวถึงความสามารถของไลโซไซม์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ มีการทดลองใช้ไลโซไซม์ร่วมกับไนซินเพื่อยับยั้งการเจริญของ meat-borne spoilage bacteria พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Carnobacterium* sp. ได้เป็นระยะเวลา 21 วัน ในภาวะสุญญากาศ ที่อุณหภูมิ 2 °C (Nattress, Yost, & Baker, 2001) มีรายงานการใช้ไลโซไซม์ร่วมกับ

chitooligosaccharides ซึ่งจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการต้านเชื้อแบคทีเรียมากกว่าการใช้เพียงชนิดเดียว (Rao, Chander, & Sharma, 2008) นอกจากนี้ยังมีการนำไลโซไซม์มาใช้ในฟิล์มชนิดอื่นๆ เช่น ฟิล์ม zein และฟิล์มเซลลูโลส (Gemili, Yemenicioglu, & Altinkaya, 2009; Gucbilmez, Yemenicioflu, & Arslanoflu, 2006) เป็นต้น

```

      10          20          30          40          50
RTDCYGNVNRIDTTGASCKTAKPEGLSYCGVSASKKIAERDLQAMDRYKT
      60          70          80          90          100
I IKKVGEKLCVEPAVIAGI I SRESHAGKVLKNGWGDRGNFGFLM QVDKRS
      110         120         130         140         150
HKPQGTWNGEVHITQGTTLINFIKTIQKKFPSWTKDQQQLKGGI SAYNAG
      160         170         180
AGNVRSYARMDIGTTHDDYANDVVARAQYYKQHG Y
  
```



รูปที่ 2. 4 โครงสร้างสามมิติและลำดับกรดอะมิโนของไลโซไซม์ที่ได้จากไข่ขาวของห่าน (Thammasirak et al., 2010)

แลคโตเฟอริริน (lactoferrin) เป็น whey glycoprotein ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 80 กิโลดาลตัน สามารถแยกได้จากน้ำนมวัวในส่วนของ whey (Sorensen & Sorensen, 1939) และน้ำนมของมนุษย์ (Johansson, 1960) โปรตีน 1 โมเลกุล สามารถจับกับเหล็กได้ 2 ไอออน (González-Chávez, Arévalo-Gallegos, & Rascón-Cruz, 2009) มีรายงานกลไกในการฆ่าเชื้อ 2 แบบ โดยกลไกแรกแลคโตเฟอริรินจะเข้าไปจับธาตุเหล็ก (Fe^{3+}) ทำให้เกิดเป็น carbonate หรือ bicarbonate anions ทำให้เกิดภาวะขาดเหล็กเชื้อจึงไม่เจริญเติบโต (Dionysius & Milne, 1997) และกลไกที่ 2 ประจุบวกบนเพปไทด์จะเข้าไปจับประจุลบของ lipopolysaccharide บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนไปและเซลล์จะตายในที่สุด (Jenssen & Hancock, 2009)

2.3.4 เพปไทด์ต้านจุลชีพจากสัตว์ทะเลกลุ่มครัสเตเชียน

เพปไทด์ต้านจุลชีพของสัตว์ทะเลในกลุ่มครัสเตเชียน (crustacean) นั้นจะพบมากในส่วนของเลือด (Rosa & Barracco, 2010) เนื่องจากในทะเลเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยที่มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตสูงและมีการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมอยู่ตลอดเวลา ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำเหล่านี้จำเป็นต้องมีกลไกเพื่อป้องกันตัวเองและต่อต้านการรุกรานจากเชื้อจุลินทรีย์อย่างมีประสิทธิภาพเพื่อปรับตัวให้สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้

มีรายงานการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพจากสัตว์ทะเลในกลุ่มครัสเตเชียนหลายชนิด เช่น 6.5 kDa proline-rich antimicrobial peptide ในปูแสม, *Carcinus maenas* ซึ่งมีลำดับกรดอะมิโนทางด้านปลายอะมิโนคล้ายกับ bactenecin-7 ซึ่งเป็นเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบใน bovine neutrophil (Schnapp, Kemp, & Smith, 1996) เพปไทด์ต้านจุลชีพ Callinectin เป็นเพปไทด์ที่สกัดได้จากเลือดของปู *Callinectes sapidus* และพบว่าสามารถต้านเชื้อ *E. coli* ได้ (Khoo, Robinette, & Noga, 1999) ต่อมา มีการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพ Penaeidin ซึ่งมีขนาด 5.5-6.6 กิโลดาลตัน จากกุ้งหลายชนิด เพปไทด์ชนิดนี้จะมี proline-rich domain ทั้งทางด้านปลายอะมิโนและด้านปลายคาร์บอกซิลซึ่งภายในโดเมนดังกล่าวจะประกอบด้วยกรดอะมิโนซิสทีน (cysteine) 6 ตัว (Bachere, Destoumieux, & Bulet, 2000) และพบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพชนิดนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและเชื้อรา (Destoumieux et al., 1997) เพปไทด์ต้านจุลชีพ crustin แยกได้จากเม็ดเลือดปู *Carcinus maenas* (Relf, Chisholm, Kemp, & Smith, 1999) มีฤทธิ์ต้านจุลชีพในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก (Relf et al., 1999; Schnapp et al., 1996) ซึ่งต่อมามีรายงานการค้นพบ crustin ในกุ้งและปูอีกหลายชนิด หลังจากนั้นมีการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพ antilipopolysaccharide factor (ALF) ในกุ้งและปูหลายชนิด (de la Vega et al., 2008; Somboonwivat et al., 2005; L. Wang et al., 2011) และจากการสกัดเซลล์เม็ดเลือดของปู Spider crab, *Hyas araneus* ได้ค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีกรดอะมิโนโพรลีนและอาร์จินีนจำนวนมาก มีชื่อว่า arasin-1 (Stensvåg et al., 2008) เพปไทด์ต้านจุลชีพ hyastatin เป็นเพปไทด์ที่สกัดได้จากเม็ดเลือดของปู *H. araneus* เป็น glycine-rich peptide ขนาด 11.7 กิโลดาลตัน มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ จุลินทรีย์แกรมบวกและจุลินทรีย์แกรมลบ (Sperstad, Haug, Vasskog, & Stensvåg, 2009)

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสร้างห้องสมุด (Expressed Sequence Tag, EST) จากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล *Scylla paramamosain* ในประเทศไทยพบเพปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิด เช่น antilipopolysaccharide factor (ALF) (Imjongjirak et al., 2011a; Imjongjirak et al., 2007) crustin (Imjongjirak et al., 2009), arasin และ glycine-rich antimicrobial peptide (Imjongjirak et al., 2011b) ซึ่งมีคุณสมบัติในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ได้หลายชนิด

2.4 เพปไทด์ต้านจุลชีพ Antilipopolsaccharide factor (ALF)

เพปไทด์ต้านจุลชีพ antilipopolsaccharide factor (ALF) เป็นเพปไทด์ที่มีรายงานการค้นพบครั้งแรกใน amoebocytes ของแมงดาทะเล (*Limulus polyphemus*) (Tanaka, Nakamura, Morita, & Iwanaga, 1982) และต่อมาพบในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนอีกหลายชนิด โปรตีนชนิดนี้สามารถจับกับ lipopolysaccharide (LPS) และ lipoteichoic acid (LTA) ที่ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ (Carriel-Gomes et al., 2007; Imjongjirak et al., 2007; Somboonwivat et al., 2005; Yedery & Reddy, 2009)

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสร้างห้องสมุด EST จากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล *S. paramamosain* ในประเทศไทย พบเพปไทด์ต้านจุลชีพ antilipopolsaccharide factor (ALFSp1) มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) 11.1 กิโลดาลตัน และมีค่า pI 10.3 (รูปที่ 5) จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าภายในโมเลกุลของ ALFSp1 มีบริเวณ LPS-binding domain ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการจับกับ lipopolysaccharide (LPS) ที่ผนังเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลชีพได้จากการตรวจสอบ antimicrobial activity ของเพปไทด์สังเคราะห์ของ ALFSp1 ในส่วนของ LPS-binding domain พบว่ามีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อ *Vibrio harveyi* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์ทะเลกลุ่มครัสเตเชียนได้ โดยมีค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (minimal inhibitory concentration, MIC) และค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่สามารถทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ (minimal bactericidal concentration, MBC) เท่ากับ 0.39 μM (Imjongjirak et al., 2007)

```

GGGGAGTCACTATCCAAGGCACCACAAGAGGGACAGAAGAAACATTGAGGACGACGCAA      60
CCAAGCTTCCCTCAAGATGCGGACCAAGGTGATGGCCGGCCTGTGCGTGCGCTGGTGGT      120
      M R T K V M A G L C V A L V V
GATGTGCCTGTACATGCCCGAGCCATGCGAGGCTCAGTATGAAGCTCTGGTAGCTTCCAT      180
      M C L Y M P Q P C E A Q Y E A L V A S I
      ▼
TCTTGGAAAAGCTGTCTGGACTGTGGCACAGCGACACAGTGGACTTCATGGGACACACCTG      240
L G K L S G L W H S D T V D F M G H T C
CCACATCCGCCGCAAGCCGAAGTTTCAGGAAATTTAAGCTGTACCACGAGGGCAAGTTTTG      300
      H I R R K P K F R K F K L Y H E G K F W
      ▼
GTGTCTGGCTGGACACATCTCGAGGGCAATTCGAGGACCAAGAGCAGGTTCGGGGTCAGC      360
      C P G W T H L E G N S R T K S R S G S A
CAGGGACGCCATCAAGGACTTCGTGTACAAAGCTTTACAAAACAAACCTCATCACGGAGAA      420
R D A I K D F V Y K A L Q N K L I T E N
TAACGCGGCCCGCTGGCTGAAGGGGTGAGGCAAGTGATGCACACTCTCATGTACGAGGAG      480
N A A A W L K G *
GACGAGCGGCAGGAGGGTGAAAAACAACGAGGAAGTGACTCGTGTCTGACCTGTAATGGAT      540
GTTTTTGATTTCCATTTATATAACTACTACTACTACTGTATTATTACTGATTAATAAAAAA      600
AAAAAAAAAAAAAAAAA                                         614

```

รูปที่ 2. 5 ลำดับนิวคลีโอไทด์และลำดับกรดอะมิโนของ antilipopolsaccharide factor (ALFSp1) ที่พบในปูทะเล *Scylla paramamosain* (Imjongjirak, Amparyup, Tassanakajon, & Sittipraneed, 2007) ตัวอักษรสีดำเข้มและขีดเส้นใต้แสดง start codon stop codon และ signal sequence บริเวณกรอบสี่เหลี่ยมแสดง LPS-binding domain

2.5 เพปไทด์ต้านจุลชีพ Arasin-likeSp

เพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin มีรายงานการพบครั้งแรกในปู *Hyas araneus* (Stensvåg et al., 2008) ภายในโมเลกุลของเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin จะมี 2 โดเมนที่สำคัญ คือ ด้านปลายอะมิโนที่ตำแหน่งนี้จะประกอบด้วยกรดอะมิโนโพรลีนและอาร์จินีนจำนวนมาก และที่ด้านปลายคาร์บอกซิลจะประกอบด้วยพันธะไดซัลไฟด์ 2 พันธะ จากการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของ arasin ที่สกัดบริสุทธิ์จากเลือดของปู และเพปไทด์สังเคราะห์ arasin พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อ *Corynebacterium glutamicum* ได้ดี โดยมีค่า MIC และ MBC อยู่ในช่วง 0.8 และ 3.1 μM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และ *E. coli* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 11.7 และ 12.5 μM ตามลำดับ (Stensvåg et al., 2008)

จากข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้จากการสร้างห้องสมุด EST จากเซลล์เม็ดเลือดของปูทะเล *S. Paramamosain* ในประเทศไทย พบเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp ซึ่งมี molecular weight 4.4 กิโลดาลตัน และมีค่า pI 11.03 จากการวิเคราะห์ลำดับกรดอะมิโนพบว่าที่ด้านปลายอะมิโนของ arasin-likeSp ประกอบด้วยกรดอะมิโนไกลซีนอยู่มาก (29.6%) ในขณะที่ด้านปลายคาร์บอกซิลของโปรตีนมีกรดอะมิโนซิสเทอีนอยู่ 4 ตำแหน่ง นอกจากนี้พบว่า arasin-likeSp มีฤทธิ์ยับยั้งทั้งจุลินทรีย์แกรมบวก (*Staphylococcus haemolyticus*, *Aerococcus viridians* และ *Micrococcus luteus*) และแกรมลบ (*V. harveyi* และ *V. anguillarum*) โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วง 0.195-12.5 μM (Imjongjirak et al., 2011b)

```

GACACTTCGACATGGAGCGACGCACCCTGCTGATTGTCCTGCTAGTGTGCAGCTTCCTGC 60
      M E R R T L L I V L L V C S F L
TGCTGGCTGTACCCGCCGAGGCCTCGCCTCGGGTGAGTCGCCGCTACGGCAGACCGTTTG 120
L L A V T A E A S P R V S R R Y G R P F
GCGGCAGACCGTTTGTGCGGCGGACAGTTTGGTGGCAGACCAGGCTGCGTGTGTATCAGGT 180
G G R P F V G G Q F G G R P G C V C I R
CACCGTGTCTTGTGCCAATTACGGCTAACTCGACCAGCGAACACTTCGGCTTCCTGACA 240
S P C P C A N Y G *
CTGCTCCCTCGCGCCACACGACACTCGCCATGGATGGAACGAGTTGACTCTTGCTTCTT 300
TGACTTAAATGATAAATAAACGCAAAATTTTCCTTTGCATTTAGTGGTAAATAAAAAGCA 360
TAGCAATCCCTGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 390

```

รูปที่ 2.6 ลำดับนิวคลีโอไทด์ และลำดับกรดอะมิโนของ arasin-likeSp ที่พบในปูทะเล *S. paramamosain* (Imjongjirak, Amparyup, & Tassanakajon, 2011b) ตัวอักษรสีดำเข้มและขีดเส้นใต้แสดง start codon stop codon และ signal sequence

2.6 फिल्मต้านเชื้อจุลชีพ (Antimicrobial films)

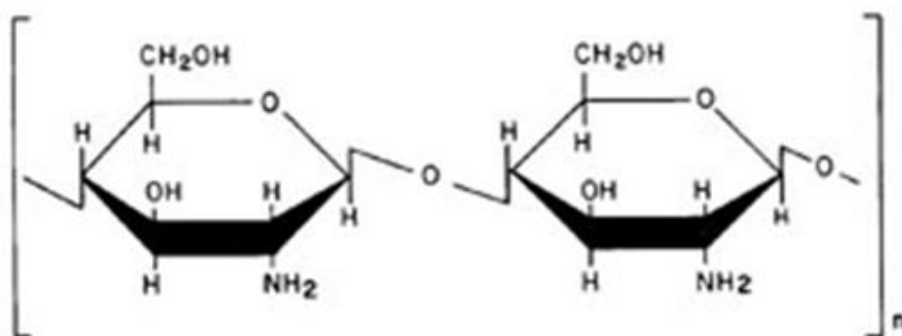
Active packaging เป็นนวัตกรรมหนึ่งของบรรจุภัณฑ์ที่ยังคงมีการพัฒนาอย่างต่อเนื่อง เช่น ในด้านการป้องกันการซึมผ่านของน้ำ อากาศ ความชื้น กลิ่น การป้องกันจุลชีพ เป็นต้น (Vermeiren, Devlieghere, van Beest, de Kruijf, & Debevere, 1999) บรรจุภัณฑ์ต้านจุลชีพ (Antimicrobial packaging) เป็น Active packaging ประเภทหนึ่งที่จะช่วยลด ยับยั้งหรือชะลอการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหาร (Appendini & Hotchkiss, 2002) फिल्मต้านจุลชีพเป็นบรรจุภัณฑ์ ต้านจุลชีพที่ช่วยเพิ่มความปลอดภัยและยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ได้แบ่งเป็น 2 ประเภทคือ फिल्मที่มีการเติมสารต้านจุลชีพลงไปเนื้อฟิล์มโดยตรงและฟิล์มที่มีการเคลือบด้วยสารต้านจุลชีพ โดยฟิล์มจะทำหน้าที่เป็นตัวกลางช่วยทำให้สารต้านจุลชีพไปสัมผัสกับเชื้อจุลินทรีย์ (Cooksey, 2001) फिल्मบางชนิดสามารถรับประทานได้ (edible film) เช่น फिल्मโคโตซาน (Leceta, Guerrero, Ibarburu, Duenas, & Caba, 2013; Ouattara, Simard, Piette, Begin, & Holley, 2000) फिल्म สตาร์ทซ์มันส์สำหรับหลัง (Kechichian, Ditchfield, Veiga-Santos, & Tadini, 2010; A. C. Souza, Goto, Mainardi, Coelho, & Tadini, 2013) फिल्मเวย์โปรตีน (Seydim & Sarikus, 2006) และ फिल्मถั่วเหลือง (Emiroglu, Yemis, Coskun, & Candogan, 2010) เป็นต้น (Gennadios & Weller, 1990) ซึ่งฟิล์มเหล่านี้สามารถควบคุมการเข้าออกของอากาศ ความชื้น และป้องกันและ ควบคุมการสูญเสียสารอาหาร กลิ่นและของเหลวในอาหาร เป็นต้น (Baker, Baldwin, & Nisperos-Carriedo, 1994; Gennadios & Weller, 1990) ได้มีการใช้ฟิล์มเหล่านี้ในการควบคุมการ ปลดปล่อยสารต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ เช่น ไนซิน ไลโซไซม์ (Buonocore et al., 2003) และโพรพิล พาราเบน (Chung, Chikindas, & Yan, 2001) เป็นต้น

2.7 โคโตซาน (Chitosan)

โคโตซานเป็นโพลีแซคคาไรด์สายตรงที่ประกอบไปด้วย (1,4)-linked 2-amino-deoxy- β -d-glucan เป็นอนุพันธ์ของไคตินที่ได้จากปฏิกิริยา deacetylation พบได้ในธรรมชาติ ไม่เป็นพิษ สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติ และยังมีสมบัติยับยั้งจุลชีพได้จึงถูกนำไปใช้เป็นบรรจุภัณฑ์ของ ผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด มักมีการใช้ร่วมกับสารต้านจุลชีพอื่น ๆ เช่น น้ำมันหอมระเหยและกรด อินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของฟิล์มโคโตซานโคโตซานละลายน้ำได้มากกว่าไคตินและยังมีสมบัติ การต้านทานเชื้อจุลินทรีย์ที่ดีกว่าทั้งนี้เกิดจากการเพิ่มขึ้นของประจุบวก (Chen, Liao, & Tsai, 1998) ทำให้โคโตซานเกิดแรง electrostatic interaction การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยประจุบวกที่อยู่บน หมู่อะมิโน (NH^+) ของเพปไทด์ (pH ต่ำกว่า pKa ,pH<6.3) ทำปฏิกิริยากับประจุลบที่อยู่บนผิว จุลินทรีย์นำไปสู่การรั่วไหลของสารที่อยู่ในเซลล์ ในที่สุดเซลล์จะตาย (Devlieghere, Vermeulen, & Debevere, 2004) ที่โคโตซานความเข้มข้นต่ำจะมีลักษณะเป็น polycationic อาจไปจับกับประจุ ลบบนผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทำให้เกิดการจับกันเป็นก้อน ขณะที่โคโตซานความเข้มข้นสูงจะมี ประจุบวกในปริมาณมากและอาจทำให้ผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์กลายเป็นประจุลบและทำให้เชื้อ แขนวลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Papineau, Hoover, Knorr, & Farkas, 1991; Sudarshan, Hoover, & Knorr, 1992) นอกจากนี้แล้วฤทธิ์การยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ยังขึ้นอยู่กับ degree of

deacetylation ความเข้มข้นของสารละลาย อุณหภูมิและ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (X. F. Liu, Guan, Yang, Li, & Yao, 2001) เชื้อราและยีสต์เป็นกลุ่มจุลชีพที่มีความไวต่อโคโตซานมากที่สุด รองลงมาเป็นเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบตามลำดับ

มีรายงานการวิจัยที่ได้ศึกษาการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งจุลชีพของฟิล์มโคโตซานโดยการเติมไนซิน และไลโซไซม์ เช่น S. I. Park, Deaschel, and Zhao (2004) พบว่าการเติมไลโซไซม์ลงในฟิล์มโคโตซานสามารถแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus faecalis* และ *E. coli* ได้นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยของ Pranoto, Rakshit, and Salokhe (2005) ได้ศึกษาการเติม garlic oil, potassium sorbate และไนซิน ลงในฟิล์มโคโตซาน และตรวจสอบ inhibition zone รอบแผ่นฟิล์ม พบว่าฟิล์มโคโตซานที่เติม garlic oil, potassium sorbate และไนซิน สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *L. monocytogenes* และ *B. cereus* ได้



รูปที่ 2. 7 โครงสร้างโมเลกุลของโคโตซาน

ที่มา: Trevor (<http://www.msm.cam.ac.uk/ccmm/research/st328.html>)

2.8 *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus เป็นเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบที่ชอบเกลือ (halophilic bacteria) ลักษณะเป็นแท่ง มี flagellum ทำให้สามารถว่ายน้ำได้อย่างอิสระ มักพบในเขตร้อนที่มีสภาพแวดล้อมที่เป็นทะเลหรือน้ำเค็มทั้งบนผิวน้ำ (Joseph, Colwell, & Kaper, 1982) และในสัตว์น้ำเช่นหอย กุ้ง ปู *V. parahaemolyticus* เป็นเชื้อที่เป็นปัญหาทางสุขภาพในหลายประเทศ เนื่องจากเป็นสาเหตุของโรคทางเดินอาหารได้แก่โรคอาหารเป็นพิษ โรคกระเพาะหรือโรคลำไส้อักเสบเฉียบพลัน ผู้ป่วยมีอาการท้องเสีย ปวดหัว คลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องและมีไข้ต่ำ (Su & Liu, 2007) เกิดจากการปนเปื้อนของอาหารหรือจากการบริโภคอาหารดิบหรืออาหารกึ่งสุกกึ่งดิบ โดยเฉพาะในหอย ที่มีเชื้อ *V. parahaemolyticus* ปนเปื้อนอยู่ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการติดเชื้อในกระแสโลหิตในผู้ป่วยที่เป็นโรคมะเร็งหรือโรคตับ (Yeung & Boor, 2004) *V. parahaemolyticus*

เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 9.5-45 °C ปริมาณเชื้อ *V.parahaemolyticus* จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงถูกพบในฤดูร้อนมากกว่าฤดูหนาว เชื้อนี้สามารถถูกทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60 °C นาน 15 นาที *V.parahaemolyticus* สามารถเจริญได้ในช่วงความเป็นกรดต่างระหว่าง pH 5-11 ในฤดูหนาวเชื้อสามารถอาศัยในตะกอนใต้พื้นน้ำ และสามารถมีชีวิตอยู่ในอาหารหรือน้ำที่มี NaCl ตั้งแต่ 1-8% ถ้ามากกว่า 10% เชื้อจะตาย (Broberg, Calder, & Orth, 2011; ศูนย์ข้อมูลโรคติดต่อและพาหะนำโรค)

2.9 การนำเพปไทด์ต้านจุลชีพมาใช้ในอาหาร

ในปัจจุบันความปลอดภัยของอาหารเป็นประเด็นต้น ๆ ที่ทั้งผู้บริโภคและผู้ผลิตในอุตสาหกรรมอาหารให้ความสำคัญ โดยในมุมมองของผู้ผลิตนั้นตระหนักถึงความไม่ปลอดภัยของการถนอมอาหารโดยใช้สารเคมีและพยายามที่จะพัฒนากระบวนการผลิตและการใช้สารที่มาจากธรรมชาติ เพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคที่หันมาใส่ใจสุขภาพกันมากขึ้น ส่งผลให้มีการค้นคว้าหาวัตถุภัณฑ์จากธรรมชาติมาทดแทนการใช้สารเคมี ตัวอย่างเช่น ไนซิน ซึ่งมักใช้ในอาหารประเภทนม และผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็ง และในอาหารกระป๋อง (J., P., R.J., & Hugenholtz, 1996) หรือการใช้ไลโซไซม์ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ได้รับการยอมรับให้ใช้ในอาหาร ซึ่งใช้เป็นสารกันเสียในอาหารหลายชนิด เช่น ผักผลไม้สด เต้าหู้ถั่วเหลือง เนื้อสัตว์ อาหารทะเล เปียและไวน์ (Cunningham, Proctor, & Goetsch, 1991; Makki & Durance, 1996) และแลคโตเฟอรินซึ่งได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร (Salamah & Al-Obaidi, 1995)

นอกจากนี้บรรจุภัณฑ์ต้านจุลชีพเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่ามาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร มีการพัฒนาประสิทธิภาพการต้านจุลชีพของฟิล์มโดยการเติมสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลชีพ เช่น ฟิล์ม sodium caseinate ที่ใช้ร่วมกับไลโซไซม์และ glyoxal เพื่อทำให้การปลดปล่อยไลโซไซม์จากแผ่นฟิล์มช้าลง พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Micrococcus lysodeikticus* และ *Staphylococcus aureus* ได้ (P. M. Souza, Fernandez, Lopez-Carballo, Gavara, & Hernandez-Munoz, 2010) การใช้สารเคลือบโปรตีนเวย์ร่วมกับไลโซไซม์เพื่อควบคุมการปล่อยไลโซไซม์ในอาหาร เช่น แอลมอนนมควีน (Min, Rumsey, & Krochta, 2008) การนำฟิล์มเพคตินมาใช้ร่วมกับไนซินสำหรับควบคุมปริมาณเชื้อ *L. monocytogenes* ในไก่จวงพร้อมรับประทาน (Jin, Liu, Sommers, Boyd, & Zhang, 2009) และการใช้ฟิล์ม pectin-polylactic acid ร่วมกับไนซินเพื่อลดปริมาณ *L. Monocytogenes* (Jin, Liu, Zhang, & Hicks, 2009)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ 4 ชนิดได้แก่ antilipopolsaccharide factor (ALFSp1) และ arasin-likeSp จากบูทะเล, ไนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* และไลโซไซม์จากไซขาวของไข่ไก่ที่มีต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์

- Laminar Flow Cabinet รุ่น BTV-123 (บริษัท Dwyer Instrument, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Micrometer รุ่น 7301 (บริษัท Mitotuyo, ประเทศญี่ปุ่น)
- Microplate Reader รุ่น GO19065;UVM340 (บริษัท Biochrome, ประเทศอังกฤษ)
- Power supply รุ่น Power Station 300, 220 V (บริษัท Cabinet International, ประเทศไต้หวัน)
- เครื่องกวนสารละลายพร้อมเตาความร้อน (Hotplate Stirrer) รุ่น LMS-1003 (บริษัท Daihan Labtech, ประเทศเกาหลี)
- เครื่องเขย่า (Shaker) Innova รุ่น 2000 (บริษัท New Brunswick Scientific, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น ML 1602 (บริษัท Mettler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น ML 204 (บริษัท Mettler Toledo, ประเทศสวิตเซอร์แลนด์)
- เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer) รุ่น G560E (บริษัท Scientific Industries, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 (บริษัท Thermo Scientific)
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Cyberscan 1000
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) รุ่น 5310 (บริษัท Kubota, ประเทศญี่ปุ่น)
- เครื่อง Electrophoresis รุ่น Hoefer mini VE (บริษัท Amersham Pharmacia Biotech, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- ตู้อบแห้ง (บริษัท WTB Binder, ประเทศเยอรมนี)
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (Incubator) (บริษัท United Instrument, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- ไมโครปิเปตขนาด 0.2-2 ไมโครลิตร

- ไมโครปิเปตขนาด 2-20 ไมโครลิตร
- ไมโครปิเปตขนาด 20-200 ไมโครลิตร
- ไมโครปิเปตขนาด 100-1000 ไมโครลิตร
- หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น SS-320 (บริษัท Tomy Seiki, ประเทศญี่ปุ่น)

3.2 สารเคมี/อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Acetic acid (glacial) (บริษัท Merck, ประเทศเยอรมนี)
- Acrylamide(บริษัท Bio Basic Inc., ประเทศแคนาดา)
- Agar Powder, Bacteriological (บริษัท Himedia, ประเทศอินเดีย)
- Ammonium persulfate (บริษัท Bio Basic Inc., ประเทศแคนาดา)
- Bis-acrylamide (บริษัท Bio Basic Inc., ประเทศแคนาดา)
- Casein Tryptic Peptone (Tryptone) (บริษัท Scharlau, ประเทศสเปน)
- Chitosan (บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศเยอรมนี)
- Ethanol 95% (บริษัท ห้าอุตสาหกรรม, ประเทศไทย)
- Glycerol 99% (บริษัท Vivantis Inc., ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Glycine (บริษัท Scharlau, ประเทศสเปน)
- Lysozyme chloride form, Grade VI (from chicken white egg)
(บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศเยอรมนี)
- Methanol (บริษัท Burdick & Lackson, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Nisin from *Lactobacillus lactis* (บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศเยอรมนี)
- Novex Sharp Pre-Stained Protein Standard (บริษัท Invitrogen, ประเทศสหรัฐอเมริกา)
- Sodium chloride (บริษัท Analar, ประเทศอังกฤษ)
- Sodium hydroxide (บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
- Sodium dodecyl sulfate (บริษัท Carlo Erba, ประเทศอิตาลี)
- Soybean Casein Digest Medium (Tryptone Soya Broth) (บริษัท Himedia, ประเทศอินเดีย)

- Tetramethylethylenediamine; TEMED (บริษัท Sigma-Aldrich, ประเทศเยอรมนี)
- Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)(บริษัท Himedia, ประเทศอินเดีย)
- Tris (บริษัท USB Corporation, ประเทศสหรัฐอเมริกา)



3.3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.3.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

3.3.1.1 การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์

เพาะเชื้อ *Aerococcus viridans*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus* ATCC9341, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio harveyi*, *Vibrio parahaemolyticus* ATCC17802, *Vibrio anguillarum*, *Vibrio cholera* non O1, non O139, *Escherichia coli* 363 และ *Aeromonas hydrophila* (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง เชื้อโคลนเดี่ยว ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) 3 ml บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน TSB อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm จนได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 แล้วจึงนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ Poor broth (1% tryptone 0.5% NaCl pH 7.5) ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10⁵ cfu/ml จึงนำมาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3.3.1.2 การเตรียมเพปไทด์ต้านจุลชีพ

ใช้ในซินที่เตรียมได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* (Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมนี) โดยชั่งโนซิน 8 mg ละลายใน 10 mM HCl ปริมาตร 200 µl ให้มีความเข้มข้น 40000 IU/ml แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยวิธี serial two fold dilution ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 1250-40000 IU/ml (1.1-34.4 mg/ml)

ใช้ไลโซไซม์จากไข่ขาวของไข่ไก่ (Sigma-Aldrich ประเทศเยอรมนี) โดยชั่งไลโซไซม์ 6 mg ละลายในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 200 µl ให้มีความเข้มข้น 30 mg/ml แล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นด้วยวิธี serial two fold dilution ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.39-30 mg/ml

ทำการสังเคราะห์เพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp (synthetic peptide) แยกบริสุทธิ์โดยเทคนิค reverse-phase HPLC (Genscript, USA) นำ ALFSp1 และ arasin-likeSp ที่ผ่านการ lyophilized มาละลายด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อให้มีความเข้มข้น 10000 µM แล้วเจือจางด้วยวิธี serial two fold dilution ด้วย 0.01% (v/v) acetic acid buffer ให้มีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 3.9-500 µM

3.3.1.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยหาค่า minimal inhibitory concentration, MIC

ทดสอบโดยวิธี broth microdilution assay ดัดแปลงจาก Lennette, Barilows, W.J., & Shadony, (1991); Lorian, (1995) โดยปิเปตเชื้อที่เตรียมไว้ 90 µl ตามข้อ 3.3.1.1

ลงใน 96-well microtiter plate และเติมเพปไทด์ต้านจุลชีพปริมาณ 10 μ l ตามแต่ละชนิดที่กำหนดไว้โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายของไลโซไซม์เท่ากับ 3.0, 1.5, 0.75, 0.375, 0.1875 และ 0.09375 mg/ml ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม สำหรับความเข้มข้นสุดท้ายของ arasin-likeSp และ ALFSp1 เท่ากับ 50, 25, 12.5, 6.25, 3.12, 1.56, 0.78 และ 0.39 μ M ใช้ 0.01% acetic acid buffer เป็นตัวควบคุม ในการทดสอบไนซินใช้เชื้อปริมาณ 80 μ l และเติมไนซินปริมาณ 20 μ l ลงในแต่ละ well โดยมีความเข้มข้นสุดท้าย 8000, 4000, 2000, 1000, 500 และ 250 IU/ml (6.88, 3.44, 1.72, 0.86, 0.43 และ 0.22 mg/ml) ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อและ 10 mM HCl เป็นตัวควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 °C) เขย่าที่ 100 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แต่ละการทดลองทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง ตรวจสอบค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ซึ่งเป็นความเข้มข้นต่ำสุดของสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลชีพ ตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรด้วย microplate reader

3.3.2 การทดสอบฤทธิ์ในการฆ่าจุลินทรีย์โดยหาค่า minimal bactericidal concentration, MBC

นำสารละลายใน 96-well microtiter plate ปริมาตร 10 μ l มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptone Soya Agar (TSA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงและนับจำนวนโคโลนีของเชื้อจุลชีพค่า MBC คือค่าความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด (Lennette, Barilows, W.J., & Shadony, 1991; Lorian, 1995)

3.3.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยเทคนิค agar diffusion method

นำเชื้อที่เตรียมจากข้อ 3.3.1.1 ปริมาตร 10 μ l มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA นำ sterile paper disc (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร) นำมาวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ spread เชื้อไว้ เติมสารละลายเพปไทด์ต้านจุลชีพความเข้มข้น 250 μ M 30 μ l ลงบน sterile paper disc นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยพิจารณาจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งที่เกิดขึ้น (Y. T. Lin, Labbe, & Shetty, 2005)

3.3.4 การทดสอบประสิทธิภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp ร่วมกับ ALFSp1

(Rosenfeld, Barra, Simmaco, Shai, & Mangoni, 2006)

ทดสอบโดย broth microdilution assay โดยปิเปตเชื้อ *V. parahaemolyticus* ATCC17802 ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.1.1 ลงใน 96-well microtiter plate เติม arasin-likeSp และ

ALFSp1 ที่เจือจางโดยวิธี serial two fold dilution ความเข้มข้นสุดท้ายของเพปไทด์หลังจากเติมลงใน 96-well microtiter plate ของ arasin-likeSp เป็น 0.195-25 μM และ ความเข้มข้นสุดท้ายของ ALFSp1 เป็น 0.195-6.25 μM ใช้ 0.01% acetic acid buffer เป็นตัวอย่างควบคุม แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 100 rpm ใช้เวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วจึงทำการตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยใช้วิธี microplate reader ทำการวัดความขุ่นด้วยที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรและประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพทั้ง 2 ชนิดด้วย fractional inhibitory concentration index (FIC index) ซึ่งคำนวณได้ดังนี้

$$\sum \text{FICindex} = \text{FIC}_a + \text{FIC}_b = \frac{A}{\text{MIC}_a} + \frac{B}{\text{MIC}_b}$$

A หมายถึง ค่า MIC ของสาร A ในสารผสมระหว่างสาร A และ B

B หมายถึง ค่า MIC ของสาร B ในสารผสมระหว่างสาร A และ B

MIC_a หมายถึง ค่า MIC ของสาร A

MIC_b หมายถึง ค่า MIC ของสาร B

การแปลผล $\text{FIC} \leq 0.5$ หมายถึง เสริมฤทธิ์กัน (synergy), $0.5 < \text{FIC} \leq 4.0$ หมายถึง ฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียว (indifference), > 4.0 หมายถึง ฤทธิ์ต้านกัน (antagonism) (Lorian, 2005) นำเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีการเสริมฤทธิ์กันมาใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.3.5 การเตรียมฟิล์มโคโตซานและฟิล์มโคโตซานผสมเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp และ ALFSp1

เตรียมฟิล์มโคโตซานโดยดัดแปลงจาก (S. I. Park et al., 2004; Pranoto et al., 2005) โดยชั่งโคโตซาน 1 กรัม (85% degree of deacetylation) (B. Li, Kennedy, Peng, Yie, & Xie, 2006) ละลายในสารละลาย 1% v/v acetic acid ปริมาตร 100 ml ผสมให้เข้ากันแล้วทำการเติมกลีเซอรอล 25% โดยน้ำหนักโคโตซาน ผสมให้เข้ากันอีกครั้งแล้วจึงนำไป centrifuge ที่ความเร็ว 3500 rpm เพื่อไล่ฟองอากาศ เติมเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ที่ความเข้มข้นเป็น 1 2 4 และ 10 เท่าของความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ของเพปไทด์ต้านจุลชีพแต่ละชนิด (MIC) (ALFSp1: 6.25 12.5 25 และ 62.5 μM ; arasin-likeSp: 25 50 100 และ 250 μM)

ผสมให้เข้ากัน หยดสารละลายฟิล์มปริมาตร 100 μl ลงบนจานเพาะเชื้อพลาสติกขนาด 90 X 15 mm ตากไว้ที่อุณหภูมิห้องข้ามคืนแล้วจึงลอกฟิล์มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C 50% RH

3.3.6 การทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของฟิล์ม

3.3.6.1 การทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของฟิล์มโดยเทคนิค agar diffusion method

นำเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมจากข้อ 3.3.1.1 ปริมาตร 10 μl มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA agar นำแผ่นฟิล์มโคโตซาน แผ่นฟิล์มโคโตซานผสมเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ความเข้มข้น 1 2 4 และ 10 เท่าของ MIC (ALFSp1: 6.25 12.5 25 และ 62.5 μM ; Arasin-likeSp: 25 50 100 และ 250 μM) นำมาวางบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ spread หรือทำการ pour plate เชื้อไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยพิจารณาจากขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น (Pranoto et al., 2005)

3.3.6.2 การทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของฟิล์มโดยเทคนิค broth microdilution assay (Muriel-Galet et al., 2012)

ทดสอบโดยวิธี broth microdilution assay โดยใส่ฟิล์มโคโตซานและฟิล์มโคโตซานผสมเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp และ ALFSp1 ความเข้มข้น 10 เท่าของ MIC (ALFSp1: 62.5 μM ; Arasin-likeSp: 250 μM) ลงไปใน 96-well microtiter plate แล้วทำการการปิเปิดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ที่เตรียมไว้ในข้อ 3.3.1.1 ปริมาตร 100 μl ใส่ลงไป โดยใช้ฟิล์มโคโตซานเป็นตัวควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C 100 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นแล้วจึงนำไปตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยใช้ microplate reader ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรจากนั้นนำสารละลายจาก 96-well microtiter plate ปริมาตร 1 และ 10 μl มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมงและนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ประเมินสมบัติการต้านเชื้อของฟิล์มแต่ละชนิด

3.3.6.2.1 SDS-PAGE

เตรียมพอลิอะคริลาไมด์เจลโดยใช้ 20% (w/v) separating และ 5.0% (w/v) stacking gel (ภาคผนวก ค) นำตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ผสมกับ 2x sample buffer (100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 20% glycerol, 2% SDS, 0.02% bromophenol blue, 100 mM DTT) (ภาคผนวก ข) นำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที โหลดโปรตีนตัวอย่างและโปรตีนมาตรฐานลงบนเจล จากนั้นนำไปทำอิเล็กโทรโฟรีซิส โดยใช้กระแสไฟฟ้า 20 mA เป็นเวลาประมาณ 1 ชั่วโมง จากนั้นนำเจลมาย้อมด้วย

staining solution (0.1% coomassie brilliant blue R-250, 40% methanol, 10% acetic acid) เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แล้วนำแผ่นเจลมา destain ด้วย destain solution (40% methanol, 10% acetic acid) จนกระทั่งเห็นแถบสีน้ำเงินของ โปรตีนอย่างชัดเจน

3.3.7 การใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ Arasin-likeSp เพื่อต้านการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อกุ้งกุลาดำ

นำกุ้งกุลาดำขนาดน้ำหนักตัวประมาณ 10 กรัม มาปอกเปลือกและล้างทำความสะอาด ด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อ ตัดแต่งชิ้นเนื้อกุ้งให้มีขนาดประมาณ 1x1x0.5 เซนติเมตร วางบน petri dish ปลอดเชื้อ จากนั้นนำ suspension ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเตรียมได้โดยเชื้อโคลนเดี่ยว ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อลงใน TSB บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เขย่าที่ความเร็ว 250 rpm จนได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.1 แล้วจึงนำมาเจือจางในอาหารเลี้ยงเชื้อ poor broth (1% tryptone 0.5% NaCl, pH 7.5) ให้ได้ปริมาณเชื้อ 10⁵ cfu/ml นำ suspension ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* 10 µl เติมลงในตัวอย่างกุ้งที่เตรียมไว้แล้วปล่อยให้แห้งในตู้ laminar flow ที่ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นจึงเติมเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ที่ความเข้มข้น 250 µM ลงบนชิ้นเนื้อกุ้งชิ้นละ 50 µl และใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยการ spread plate ลงบน TSA agar แล้วรายงานผลเป็น CFU/g

บทที่ 4

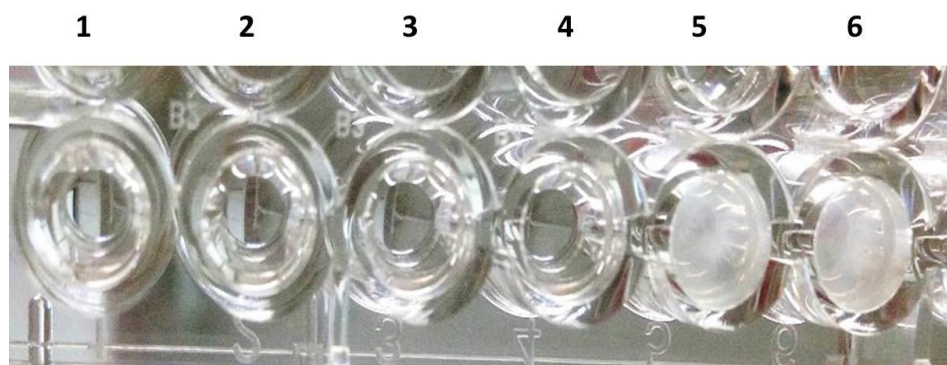
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ antilipopolysaccharide factor (ALFSp1) และ arasin-likeSp จากปูทะเล

4.1.1 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ antilipopolysaccharide factor (ALFSp1) และ arasin-likeSp โดยหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC)

จากข้อมูลรายงานการวิจัยที่ได้เคยมีการศึกษาฤทธิ์ของ antilipopolysaccharide factor (ALFSp1) และ arasin-likeSp ซึ่งพบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลชีพ โดยการศึกษาส่วนใหญ่ศึกษาเชื้อในกลุ่มก่อโรคในสัตว์น้ำ อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานถึงการศึกษาฤทธิ์ในกลุ่มเชื้อก่อโรคในอาหาร ดังนั้นในการวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ ALFSp1 และ arasin-likeSp ต่อกลุ่มเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำ และเชื้อก่อโรคในอาหารเพิ่มเติม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการหาแนวทางการประยุกต์ใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพทั้ง 2 ชนิดดังกล่าว

จากการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ 2 ชนิดที่ได้จากปูทะเล ได้แก่ ALFSp1 และ arasin-likeSp โดยใช้เพปไทด์สังเคราะห์ในบริเวณ LPS-binding domain ของ ALFSp1 และเพปไทด์สังเคราะห์ของ arasin-likeSp โดยวิเคราะห์หาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ที่มีต่อเชื้อจุลชีพ 11 ชนิดซึ่งเป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวก 5 ชนิด ได้แก่ *Aerococcus viridans* *Micrococcus luteus* *Bacillus subtilis* *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และเป็นแบคทีเรียแกรมลบ 6 ชนิด ได้แก่ *Vibrio harveyi* *Vibrio parahaemolyticus* *V. anguillarum* *Vibrio cholera* *Escherichia coli* และ *Aeromonas hydrophila* ด้วยเทคนิคการเจือจางในอาหารเหลว (broth microdilution assay) โดยใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพในช่วงความเข้มข้น two-fold serial dilution โดยแปรระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.39-50 μM จากการติดตามการเจริญของเชื้อจุลชีพที่ทดสอบโดยการตรวจสอบความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 4.1) และเมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เพื่อวิเคราะห์หาค่า MIC ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยพบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *S. aureus* *V. harveyi* *V. parahaemolyticus* *V. anguillarum* และ *E. coli* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.39-50 μM ส่วน arasin-likeSp สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *V. harveyi* *V. parahaemolyticus* และ *V. anguillarum* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.39-25 μM



รูปที่ 4. 1 ตัวอย่างการหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 ด้วยเทคนิค broth microdilution assay ใน 96 well microplate

1 = อาหารเลี้ยงเชื้อ (Poor broth)

2= อาหารเลี้ยงเชื้อ (Poor broth) + 50 μ M เพปไทด์ต้านจุลชีพ + *V. anguillarum*

3= อาหารเลี้ยงเชื้อ (Poor broth) + 25 μ M เพปไทด์ต้านจุลชีพ + *V. anguillarum*

4= อาหารเลี้ยงเชื้อ (Poor broth) + 12.5 μ M เพปไทด์ต้านจุลชีพ + *V. anguillarum*

5= อาหารเลี้ยงเชื้อ (Poor broth) + 6.25 μ M เพปไทด์ต้านจุลชีพ + *V. anguillarum*

6= อาหารเลี้ยงเชื้อ (Poor broth) + *V. anguillarum*

ตารางที่ 4. 1 ค่า minimal inhibitory concentration (MIC) และ minimal bactericidal concentration (MBC) ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ด้วยเทคนิค broth microdilution (ผลจากการทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

Microorganisms	ALF Sp1		Arasin-likeSp	
	MIC (μM)	MBC (μM)	MBC(μM)	MBC (μM)
Gram positive bacteria:				
<i>Aerococcus viridans</i>	3.125	12.5	0.39	12.5
<i>Micrococcus luteus</i>	0.39	1.56	0.78	3.125
<i>B. subtilis</i>	3.125	25	12.5	12.5
<i>B. cereus</i> ATCC9341	>50	>50	>50	>50
<i>Staphylococcus aureus</i>	50	>50	>50	>50
Gram negative bacteria:				
<i>Vibrio harveyi</i>	0.39	0.39	1.56	3.125
<i>V. parahaemolyticus</i> ATCC17802	6.25	25	25	25
<i>V. anguillarum</i>	12.5	>50	6.25	50
<i>V. cholerae</i> non O1, non O139	>50	>50	>50	>50
<i>Escherichia coli</i> 363	25	>50	>50	>50
<i>Aeromonas hydrophila</i>	>50	>50	>50	>50

4.1.2 การทดสอบฤทธิ์ในการทำลายจุลินทรีย์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp โดยหาค่า minimal bactericidal concentration (MBC)

จากการทดสอบเพื่อหาค่า minimal bactericidal concentration (MBC) โดยนำอาหารเลี้ยงเชื้อในหลายๆ well ที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียจากข้อ 4.1.1 มา spread ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA plate ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง ผลที่ได้พบว่า เพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 สามารถทำลายเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ATCC17802 ได้ โดยมีค่า MBC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.39-50 μM ส่วน arasin-likeSp สามารถทำลายเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *V. harveyi* *V. parahaemolyticus* ATCC17802 และ *V. anguillarum* ได้ โดยมีค่า MBC อยู่ในช่วงระหว่าง 3.125-50 μM (ตารางที่ 4.1)

เพปไทด์ต้านจุลชีพ antilipoplysaccharide factor (ALF) เป็นเพปไทด์ที่มีความเป็นประจุบวกสูง สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยเข้าจับกับ lipopolysaccharide (LPS) และ lipoteichoic acid (LTA) ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบ (Carriel-Gomes et al., 2007; Imjongjirak et al., 2007; Somboonwivat et al., 2005; Yedery & Reddy, 2009) มีรายงานการค้นพบครั้งแรกในแมงดาทะเล (*Limulus polyphemus*) (Tanaka et al., 1982) และในภายหลังได้มีรายงานการค้นพบ ALF ในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนอีกหลายชนิด เช่น กุ้ง (F. S. Liu, Liu, Li, Dong, & Xiang, 2005; Supungul et al., 2004) กุ้ง crayfish (H. P. Liu, Jiravanichpaisal, Söderhäll, Cerenius, & Soderhall, 2006) และปู (Imjongjirak et al., 2011a; Imjongjirak et al., 2007; C. Li et al., 2008; Y. Liu et al., 2012; L. Wang et al., 2011; L. Zhu et al., 2014) โดยภายในโครงสร้างโมเลกุลของ ALF จะมีบริเวณอนุรักษ์ (conserved) ที่เรียกว่า lipopolysaccharide (LPS)-binding domain ซึ่งที่บริเวณนี้มักจะพบกลุ่มของกรดอะมิโนที่มีประจุบวก (Hoess, Watson, Siber, & Liddington, 1993) LPS-binding domain นี้ทำให้ ALF สามารถจับกับ LPS ของแบคทีเรียและส่งผลให้เกิดการยับยั้งและทำลายแบคทีเรียได้

ในปัจจุบัน ALF ที่มีรายงานในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนหลายชนิด ทั้งนี้พบว่ามีส่วนของ LPS-binding domain เช่นเดียวกัน โดยจะมีความแตกต่างกันในส่วนของชนิดของลำดับกรดอะมิโนในบริเวณดังกล่าว (Yang et al., 2009) ในสัตว์น้ำกลุ่มปู มีรายงานการค้นพบ ALF ครั้งแรกในปูทะเล *Scylla paramamosain* (ALFSp1) (Imjongjirak et al., 2007) โดยพบว่า ALFSp1 ประกอบด้วยกรดอะมิโน 123 ตัว และมี LPS-binding domain ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 24 ตัว

LPS-binding domain ของ ALFSp1 แสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับในรายงานการวิจัยที่ผ่านมาของฤทธิ์ของ ALF จากปูชนิดอื่น ๆ โดย Yedery and Reddy (2009) ศึกษา ALF ที่พบในปู *Scylla serrata* (SsALF) และพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีนของ ssALF ที่สร้างขึ้นใน *E. coli* มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ใช้ทดสอบได้ โดยมีค่า MIC ต่อเชื้อ *P. aeruginosa* *E. coli* และ *S. pyogenes* เท่ากับ 50,100 และ 200 µg/ml ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม SsALF ที่ความเข้มข้น 200 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบไม่สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* ได้

Y. Liu et al. (2012) ได้ทำการศึกษา ALF ในปูทะเล (Sp-ALFs) โดยการสร้างรีคอมบิแนนท์โปรตีน (rSp-ALF1 และ rSp-ALF2) ในยีสต์ *Pichia pastoris* และศึกษาเพปไทด์สังเคราะห์ของโปรตีน ALF (sSp-ALF1 และ sSp-ALF2) ผลที่ได้พบว่าทั้งรีคอมบิแนนท์โปรตีนและเพปไทด์สังเคราะห์ของ ALF มีฤทธิ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้

L. Zhu et al. (2014) ได้รายงานการค้นพบ ALF ชนิดใหม่ (SpALF4) จากปูทะเล โดยพบว่ารีคอมบิแนนท์โปรตีน SpALF4 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus*

และ *B. megaterium*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*V. harveyi* *V. anguillarum* *V. alginolyticus* *A. hydrophila* *Pseudomonas putida*) และเชื้อรา (*Candida albicans*)

เพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp มีรายงานการพบครั้งแรกในปู *Hyas araneus* (Stensvåg et al., 2008) ในปัจจุบันยังไม่มีกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ชัดเจน อย่างไรก็ตาม arasin1 ซึ่งเป็น proline-rich antimicrobial peptide มีกรดอะมิโนโพรลีนและอาร์จินีนที่ปลายอะมิโน (N-terminus) เป็นจำนวนมาก และมีกรดอะมิโนซิสเตอีน 4 โมเลกุลที่ปลายคาร์บอกซิล (C-terminus) คล้ายคลึงกับเพปไทด์ต้านจุลชีพ penaeidin จึงอาจมีกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ 2 กลไกด้วยกัน ได้แก่ การเข้าไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพหรือการเข้าไปทำลายสารที่อยู่ภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ (Paulsen et al., 2013) มีรายงานการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพที่มีความคล้ายคลึงกับ arasin1 ในปูทะเล ชื่อว่า arasin-likeSp จากผลการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเชื้อจุลชีพของ arasin-likeSp พบว่า arasin-likeSp สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับผลของ Stensvåg et al. (2008) ที่ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการต้านจุลชีพของ arasin1 ที่สกัดบริสุทธิ์จากเลือดของปู และเพปไทด์สังเคราะห์ arasin1 ต่อเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*Corynebacterium glutamicum* และ *S. aureus*) และแบคทีเรียแกรมลบ (*Listonella anguillarum* และ *E. coli*) โดยพบว่าทั้ง arasin1 ที่สกัดบริสุทธิ์จากเลือดของปู และเพปไทด์สังเคราะห์ arasin1 แสดงฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพที่คล้ายคลึงกัน โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *C. glutamicum* ได้ดีที่สุด โดยมีค่า MIC เท่ากับ 0.8 μM ในขณะที่เพปไทด์สังเคราะห์ arasin1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* โดยมีค่า MIC เท่ากับ 11.7 μM อย่างไรก็ตามเพปไทด์สังเคราะห์ arasin1 ที่ความเข้มข้น 100 μM ที่ใช้ทดสอบ ไม่สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* ได้

จากผลของฤทธิ์การต้านจุลชีพของ ALFSp1 และ arasin-likeSp ต่อเชื้อจุลชีพหลายชนิดรวมทั้งเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียนเช่น เชื้อ *V. harveyi*, *V. anguillarum* และ *A. viridans* จึงแสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพเหล่านี้มีความสำคัญต่อระบบภูมิคุ้มกันของปูทะเล ซึ่งอาจสามารถนำไปพัฒนาโดยผสมในสูตรอาหารสำหรับสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ เพื่อทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอันจะช่วยส่งผลให้สัตว์น้ำมีสุขภาพที่ดีและไม่ติดโรคได้ง่าย

ในรายงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า arasin-likeSp และ ALFSp1 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่ม *Vibrios* หลายชนิด โดยมีรายงานค่า MIC ค่อนข้างต่ำ เช่น *V. harveyi* และ *V. anguillarum* ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำหลายชนิด อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบโดยนำเพปไทด์ทั้ง 2 ชนิดนี้มาทดสอบกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งเป็นเชื้อในกลุ่ม *Vibrios* และก่อโรคในอาหาร ผลพบว่าทั้ง arasin-likeSp และ ALFSp1 มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ ดังนั้นจึงได้นำ ALFSp1 และ arasin-likeSp มาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น *V. parahaemolyticus* *V. cholera* *E.coli* *M. luteus* *B. cereus* และ *S. aureus* ผลพบว่า ALFSp1 และ arasin-likeSp สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในอาหารที่ใช้ทดสอบบางชนิดได้ เช่น *V. parahaemolyticus* *E.coli* *M. luteus* และ *S. aureus* อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC และ MBC ของ ALFSp1 และ arasin-likeSp ต่อเชื้อในกลุ่มเชื้อก่อโรคใน

อาหาร พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด โดย ALFSp1 มีค่า MIC ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *M. luteus* เท่ากับ 6.23 และ 0.39 μM ตามลำดับ ส่วน arasin-likeSp มีค่า MIC ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* และ *M. luteus* เท่ากับ 25 และ 0.78 μM ตามลำดับจากผลการทดลองในขั้นตอนนี้จึงแสดงให้เห็นว่า ALFSp1 และ arasin-likeSp มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบได้หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารแล้วพบว่าสามารถยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ได้ดี ดังนั้นงานในขั้นตอนนี้จึงจะนำ ALFSp1 และ arasin-likeSp มาศึกษาฤทธิ์ในการใช้ร่วมกับสารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีรายงานการนำไปใช้ในอาหารได้ ได้แก่ ไนซิน และไลโซไซม์ ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ในการใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ร่วมกัน

4.2 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพไนซินและไลโซไซม์ โดยหาค่า minimal inhibitory concentration (MIC)

จากการทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของไนซินและไลโซไซม์โดยวิเคราะห์หาค่า minimal inhibitory concentration (MIC) ที่มีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ด้วยเทคนิค broth micro dilution โดยใช้ไนซินในช่วงความเข้มข้น two-fold serial dilution แปรระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.22-6.88 mg/ml (250-8000 IU/ml) และใช้ไลโซไซม์ในช่วงความเข้มข้น two-fold serial dilution แปรระดับความเข้มข้นตั้งแต่ 0.094-3 mg/ml จากการติดตามการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบโดยการตรวจสอบความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และเมื่อนำไปวิเคราะห์ค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader เพื่อวิเคราะห์หาค่า MIC ผลที่ได้พบว่าที่ความเข้มข้นของไนซิน 6.88 mg/ml ($2.05 \times 10^3 \mu\text{M}$) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ นอกจากนี้พบว่าไลโซไซม์ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml ($2.09 \times 10^2 \mu\text{M}$) ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้เช่นเดียวกัน

สำหรับกลไกของไนซินในการต้านจุลินทรีย์แกรมบวก ชั้นแรกไนซินจะใช้ปลายด้านคาร์บอกซิลจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยแรงแบบไอออนิก หลังจากนั้นก็จะสร้างรูบนเยื่อหุ้มเซลล์โดยปลายด้านอะมิโน (Breukink et al., 1999) และจะไปรบกวนการเกิด proton motive force ที่เป็นสิ่งที่ทำให้เกิดการสร้าง ATP ในเซลล์ และเกิดการรั่วไหลของสารภายในเซลล์ (Breukink et al., 1999; Bruno, Xu, Song, & Berelowitz, 1992; Okereke & Montville, 1992) ขณะที่ในจุลินทรีย์แกรมลบ ไนซินมีความสามารถทำลายจุลินทรีย์แกรมลบต่ำมาก เนื่องจากจากไม่สามารถแทรก (penetrate) ผ่านผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์แกรมลบได้ แต่อย่างไรก็ตามถ้าใช้ไนซินร่วมกับ EDTA ก็จะทำให้ไนซินมีประสิทธิภาพในการต้านเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบได้ (Stevens, Sheldon, Klapes, & Klaenhammer, 1991)

Solomakos, Govaris, Koidis, and Botsoglou (2008) ได้ทำการทดสอบผลการยับยั้งเชื้อ *E. coli* O157:H7 ของโนซิน ผลที่ได้พบว่าโนซินที่ความเข้มข้น 500 IU/g และ 1000 IU/g ไม่สามารถยับยั้งเชื้อได้

ในงานวิจัยของ Rohani et al. (2011) ทดสอบผลของโนซินและน้ำมันหอมระเหยจากกระเทียมต่อการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์แกรมบวกพบว่าโนซินสามารถยับยั้งการเจริญได้ที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดเท่ากับ 12.5 IU/ml

Solomakos et al. (2008) รายงานว่าโนซินและไลโซไซม์มักให้ผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แกรมบวก โดยโนซินนั้นจะทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์แกรมบวก ส่งผลให้เกิดการปลดปล่อยขององค์ประกอบต่าง ๆ ภายในเซลล์ และทำให้จุลินทรีย์ตายในที่สุด อย่างไรก็ตามโนซินไม่สามารถผ่านเข้าไปทำปฏิกิริยาของสารภายในเซลล์ในเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์แกรมลบได้ เนื่องจากขนาดโมเลกุลของโนซินที่มีขนาดใหญ่ (1.8-4.6 กิโลดาลตัน) (I.M. & Mattila-Sandholm, 2000; Sahl & Bierbaum, 1998) ทำให้ไม่สามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ด้านนอกของจุลินทรีย์แกรมลบที่ประกอบไปด้วย cytoplasmic membrane และชั้นของ peptidoglycan ไปได้ (Vaara, Plachy, & Nikaido, 1990)

ขณะที่ไลโซไซม์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อได้เนื่องจากสามารถไฮโดรไลซ์พันธะ β (1-4) ระหว่าง *N*-acetylmuramic acid และ *N*-acetylglucosamine ของ peptidoglycan ซึ่งพบมากในจุลินทรีย์แกรมบวก (Cunningham et al., 1991) จึงยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้ดีกว่าจุลินทรีย์แกรมลบ

จากผลการทดลองที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่าโนซินและไลโซไซม์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ ดังนั้นในขั้นต่อไปจึงจะทำการศึกษาฤทธิ์ของการใช้ ALFSp1 และ arasin-likeSp ร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

4.3 การทดสอบประสิทธิภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ร่วมกัน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp ร่วมกับ ALFSp1 ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยเทคนิค broth microdilution assay โดยใช้ arasin-likeSp และ ALFSp1 ที่เจือจางโดยวิธี serial two fold dilution โดยแปรระดับความเข้มข้นสุดท้ายของเพปไทด์หลังจากเติมลงใน 96-well microtiter plate ของ arasin-likeSp และ ALFSp1 อยู่ระหว่าง 0.195-25 μ M ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยใช้ microplate reader ทำการวัดความขุ่นที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตรและประเมินประสิทธิภาพการเสริมฤทธิ์ของเพปไทด์ต้านจุลชีพทั้ง 2 ชนิด ด้วย fractional inhibitory concentration index (FIC index)

ผลที่ได้พบว่าเมื่อนำเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp มาทดสอบร่วมกับ ALFSp1 เพื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ทำให้ค่า MIC ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp ในการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* มีค่า MIC เท่ากับ

3.125 μM หรือเท่ากับลดลง 8 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของ arasin-likeSp เพียงชนิดเดียว ส่วนค่า MIC ของ ALFSp1 ในสารผสมต่อ *V. parahaemolyticus* มีค่า MIC เท่ากับ 1.56 μM หรือเท่ากับค่าลดลง 4 เท่าเมื่อเปรียบเทียบกับค่า MIC ของ ALFSp1 เพียงชนิดเดียวและเมื่อคำนวณค่าดัชนีชี้วัดประสิทธิภาพร่วม (FIC) ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp ร่วมกับ ALFSp1 พบว่าค่า FIC ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* มีค่าเท่ากับ 0.375 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp และ ALFSp1 มีฤทธิ์ร่วมกันเป็นแบบเสริมฤทธิ์กัน (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4. 2 ค่า Fractional inhibitory concentration index (FIC index) ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp และ ALFSp1 ที่มีต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* (ผลจากการทำการทดลอง 2 ซ้ำ)

เชื้อจุลินทรีย์	MIC	MIC	MIC ในสารผสม		FIC
	Arasin-likeSp	ALFSp1	Arasin-likeSp	ALFSp1	
<i>V. parahaemolyticus</i>	25 μM	6.25 μM	3.125 μM	1.56 μM	0.375

ในปัจจุบันมีรายงานการค้นพบเพปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิด ซึ่งมีความแตกต่างกันในการจัดเรียงตัวของโมเลกุล โครงสร้างโมเลกุลที่แตกต่างกันอาจทำให้มีการทำงานในลักษณะที่ร่วมกันและมีการเสริมฤทธิ์กันได้ ผลที่ได้จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อนำเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp และ ALFSp1 มาใช้ร่วมกันนั้นให้ผลการเสริมฤทธิ์กัน ส่งผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ ที่ความเข้มข้นที่ต่ำลงซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเสริมฤทธิ์กันของเพปไทด์ต้านจุลชีพที่พบในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด

Gueguen et al. (2009) รายงานว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพ Cg-Prp และ defensin Cg-Def ในหอยนางรม มีผลเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* (FIC = 0.29) และมีผลเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของ *M. lysodeikticus* (FIC = 0.54) เช่นเดียวกันกับรายงานของ Schmitt et al. (2012) ที่ศึกษาพบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพหลายชนิดในหอยนางรม เช่น Cg-Defm, Cg-Defhs, Cg-BPI และ Cg-Prp มีผลเสริมฤทธิ์กัน

นอกจากนี้แล้วยังมีรายงานการเสริมฤทธิ์กันระหว่างเพปไทด์ต้านจุลชีพกับสารปฏิชีวนะ โดย M. C. Lin, Hui, Chen, and Wu (2013) ได้ทดสอบเพปไทด์ต้านจุลชีพ epinecidin (Ep-1 และ Ep-8) ที่แยกได้จากปลาเก๋า (*Epinephelus coioides*) และ pardaxin (GE-1 และ GE-6) ในปลา red sea moose sole (*Pardachirus marmoratus*) ร่วมกับยาปฏิชีวนะ streptomycin และ kanamycin เพื่อยับยั้ง Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ผลพบว่ามีฤทธิ์เสริมฤทธิ์กัน โดยค่า MIC ของ Ep-1, GE-1 และ GE-6 ลดลงจาก 12.5 mg/ml เหลือ 4.3 mg/ml

ในขณะที่ค่า MIC ของ Ep-8 ลดลงจาก 50 mg/ml เหลือ 16.6 mg/ml ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพร่วมกับยาปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในการลดความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะที่ใช้ลงได้

Choi and Lee (2012) รายงานว่าเมื่อทดสอบเพปไทด์ต้านจุลชีพ Arenicin-1 ซึ่งเป็นเพปไทด์ที่ได้จาก *Arenicola marina* ร่วมกับยาปฏิชีวนะ ampicillin, erythromycin และ chloramphenicol ผลพบแสดงการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (*S. aureus* *S. epidermidis* *P. aeruginosa* *E. coli* *E. coli* และ O-157 และ *E. faecium* เสริมฤทธิ์เพียงเล็กน้อย) โดยมีค่า FIC อยู่ระหว่าง 0.375-0.75 โดยในการทดลองนี้กำหนดให้ ค่า FIC น้อยกว่า 0.5 หมายถึงเสริมฤทธิ์กัน ค่า FIC อยู่ระหว่าง 0.5-1 หมายถึงเสริมฤทธิ์เล็กน้อย ค่า FIC อยู่ระหว่าง 1-4 หมายถึงฤทธิ์ไม่แตกต่างจากการใช้สารตัวเดียวและค่า FIC มากกว่า 4 หมายถึงฤทธิ์ต้านกัน

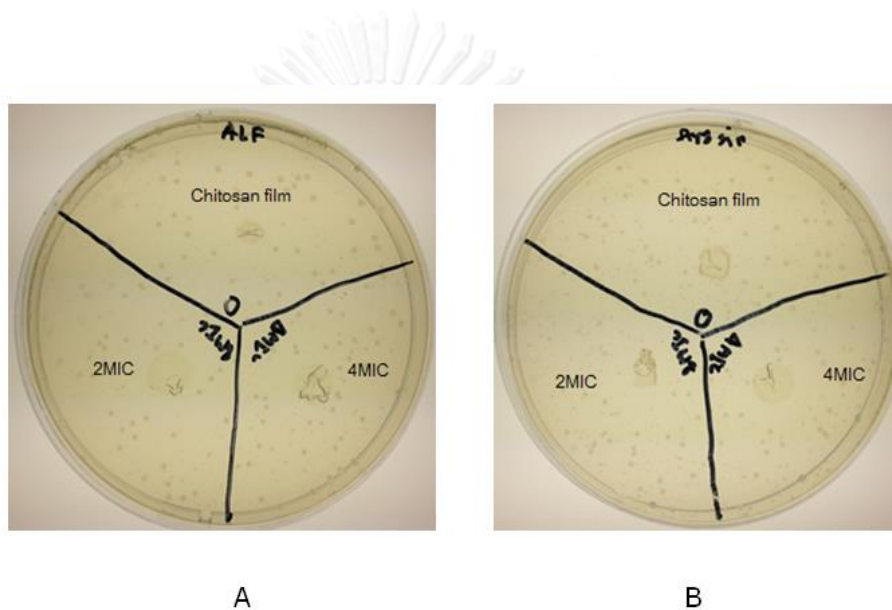
จากผลการทดลองที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่า ALFSp1 และ arasin-likeSp มีการเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ซึ่งการทำงานร่วมกันของเพปไทด์ต้านจุลชีพในลักษณะเช่นนี้อาจเป็นกลไกในสิ่งมีชีวิตที่ทำให้การยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

4.4 การทดสอบสมบัติการต้านจุลชีพของฟิล์มโคโตซานที่ผสมเพปไทด์ต้านจุลชีพ

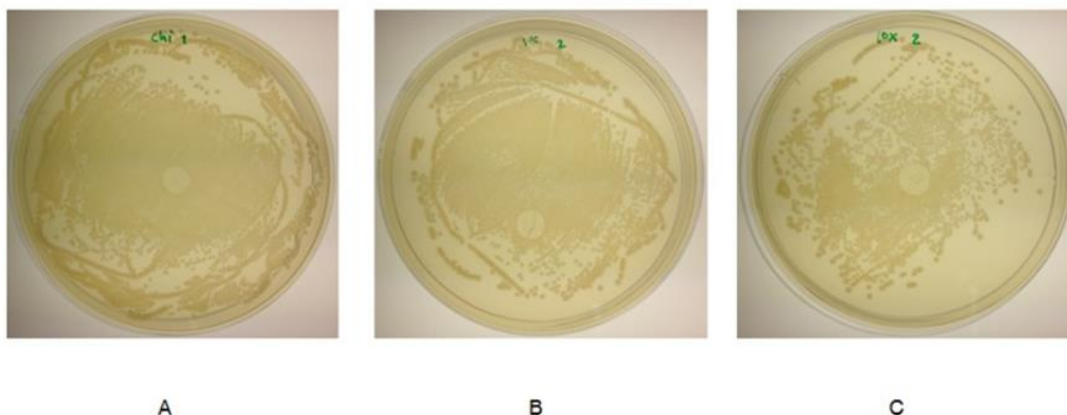
จากผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่า ALFSp1 และ arasin-likeSp มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้นั้น ส่งผลให้มีแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้ในการนำ ALFSp1 และ arasin-likeSp ผสมลงในฟิล์มโคโตซาน โดยผลจากการขึ้นรูปฟิล์มโคโตซานพบว่าลักษณะทางกายภาพที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าของฟิล์มโคโตซานมีลักษณะเป็นแผ่นวงกลม สี ไม่มีสี ส่วนขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6.40 mm หนา 0.41 mm ฟิล์มโคโตซานที่เติมเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp และ ALFSp1 ที่ความเข้มข้นเป็น ความเข้มข้น 1 2 4 และ 10 เท่าของ MIC (ALFSp1: 6.25 12.5 25 และ 62.5 μ M; arasin-likeSp: 25 50 100 และ 250 μ M) สามารถขึ้นรูปเป็นแผ่นฟิล์มได้เช่นเดียวกัน โดยฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 และ arasin-likeSp มีลักษณะกลม สี ไม่มีสี ฟิล์มโคโตซานผสม ALFSp1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 8.09 mm หนา 0.24 mm ขณะที่ฟิล์มโคโตซานผสม arasin-likeSp มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7.52 mm หนา 0.24 mm

จากการศึกษาการประยุกต์ใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ในฟิล์มโคโตซานโดยการขึ้นรูปฟิล์มโคโตซานผสม ALFSp1 และ arasin-likeSp ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 1 2 4 และ 10 เท่า ของค่า MIC แล้วนำมาตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งโดยใช้วิธี agar diffusion method ผลที่ได้พบการยับยั้งบริเวณใต้แผ่นฟิล์ม แต่ไม่พบบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) รอบแผ่นฟิล์มโคโตซาน แผ่นฟิล์มโคโตซานผสม ALFSp1 และแผ่นฟิล์มโคโตซานผสม arasin-likeSp (รูปที่ 4.2 และ 4.3) ซึ่งจากผลที่ได้อาจเนื่องมาจากการใช้เพปไทด์ในปริมาณน้อยเกินไปและอาจเกิด electrostatic interaction ระหว่างโคโตซานกับเพปไทด์ (Cai et al., 2008) จึงทำให้เพปไทด์ ALFSp1 และ arasin-likeSp ไม่มีฤทธิ์ในการ

ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ (Darmadji & Izumimoto, 1994; Jongrittiporn, Kungsuwan, and Rakshit (2001); G. H. Wang, 1992) ที่ได้รายงานถึงฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *B. cereus* ภายใต้แผ่นฟิล์มไคโตซาน ทั้งนี้โดยธรรมชาติไคโตซานจะมีฤทธิ์ยับยั้งจุลชีพเนื่องจากประจุบวกบนโมเลกุลของไคโตซานจะเข้าทำปฏิกิริยากับประจุลบบนจุลชีพ ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญ โดยการเข้าไปรบกวนเซลล์ (Coma, Deschamps, & Martial-Gros, 2003; Zivanovic, Chi, & Draughon, 2003)



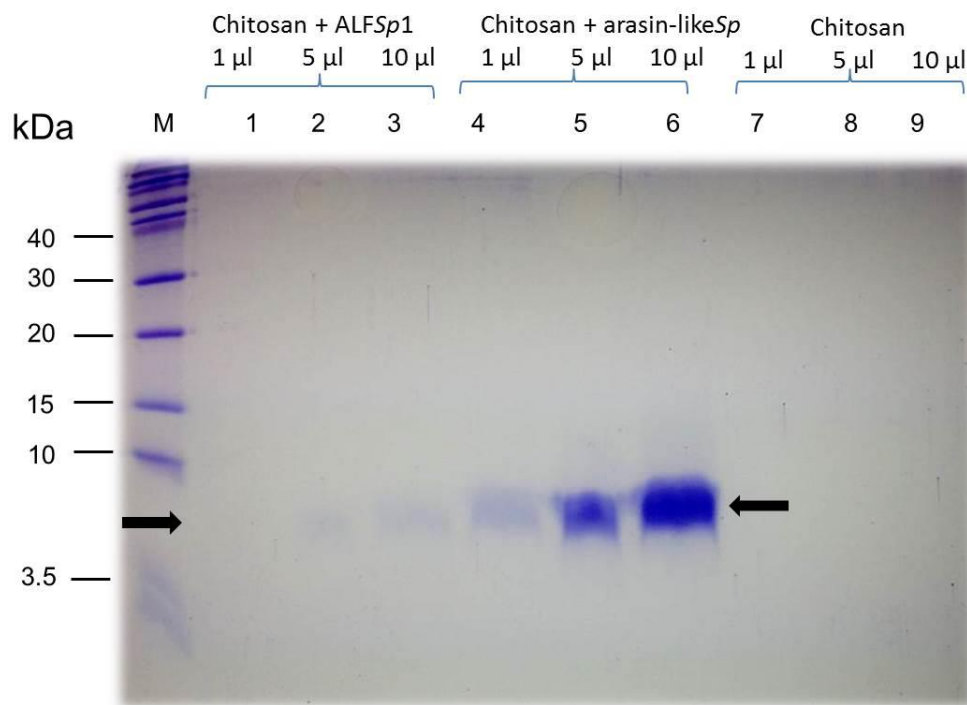
รูปที่ 4. 2 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแผ่นฟิล์มไคโตซานผสมเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 (A) และฟิล์มไคโตซานผสมเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp (B) โดยใช้ความเข้มข้นของ ALFSp1 และ arasin-likeSp เท่ากับ 2 และ 4 เท่าของค่า MIC



รูปที่ 4. 3 การทดสอบฤทธิ์การยับยั้งการเจริญของแผ่นฟิล์มโคโตซานผสมเพปไทด์ต้านจุลชีพ arasin-likeSp โดยใช้ฟิล์มโคโตซานที่ไม่เติมเพปไทด์ต้านจุลชีพเป็นตัวอย่างควบคุม (A) และใช้ความเข้มข้นของ arasin-likeSp เท่ากับ 1 เท่าของค่า MIC (B) และ 10 เท่าของค่า MIC (C)

อย่างไรก็ตาม เมื่อนำฟิล์มโคโตซานและฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 และ arasin-likeSp มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ในระบบของอาหารเหลวด้วยเทคนิค broth microdilution assay พบว่าฟิล์มโคโตซาน ฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 และฟิล์มโคโตซานที่ผสม arasin-likeSp ทั้งหมดแสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus*

เมื่อนำสารละลายจากการทดสอบฟิล์มโคโตซานฟิล์มโคโตซานที่ผสม arasin-likeSp และฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 ด้วยเทคนิค broth microdilution ไปวิเคราะห์ด้วยเทคนิค SDS-PAGE แล้วย้อมด้วย coomassie brilliant blue ผลที่ได้พบว่าสารละลายที่ได้จากการทดสอบฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 มีแถบโปรตีน 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 3.2 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.5 lane ที่ 1-3) และพบว่าสารละลายที่ได้จากการทดสอบฟิล์มโคโตซานที่ผสม arasin-likeSp มีแถบโปรตีน 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 4.4 กิโลดาลตัน (รูปที่ 4.5 lane ที่ 4-6) ซึ่งสอดคล้องกับน้ำหนักโมเลกุลของ ALFSp1 และ arasin-likeSp ตามลำดับ อย่างไรก็ตามพบว่าสารละลายที่ได้จากการทดสอบฟิล์มโคโตซานไม่ปรากฏแถบโปรตีนบนเจล (รูปที่ 4.5 lane ที่ 7-9) จากผลการทดลองที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่าเมื่อนำฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 และ arasin-likeSp มาทดสอบในระบบของอาหารเหลวพบว่าเพปไทด์ต้านจุลชีพสามารถถูกปลดปล่อยออกมาจากแผ่นฟิล์มโคโตซานได้ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 และ arasin-likeSp น่าจะเกิดจากฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อของโคโตซานเอง เนื่องจากกลุ่มควบคุมที่เป็นฟิล์มโคโตซานที่ไม่ผสมเพปไทด์มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อได้

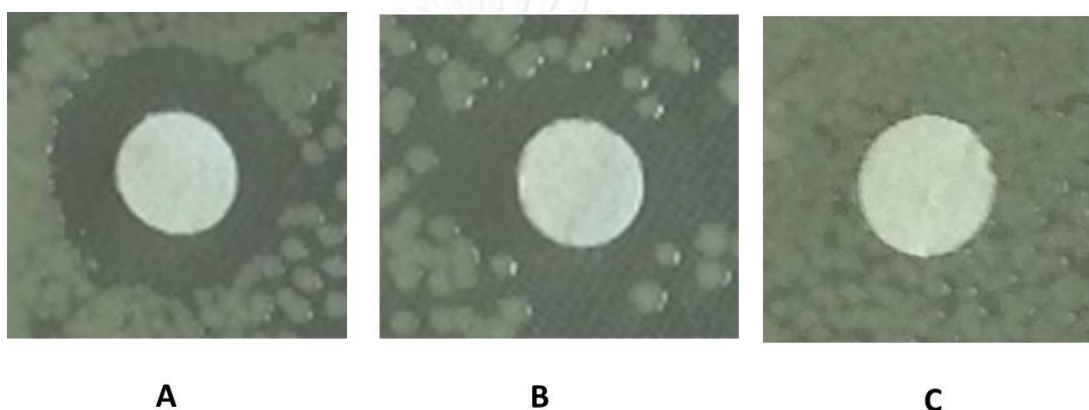


รูปที่ 4. 4 แถบโปรตีนในสารละลายจากการทดสอบฟิล์มไคโตซานฟิล์มไคโตซานที่ผสม ALFSp1 และฟิล์มไคโตซานที่ผสม arasin-likeSp ด้วยเทคนิค broth microdilution (ลูกศรแสดงตำแหน่งของ ALFSp1 และ arasin-likeSp)

- Lane M = โปรตีนมาตรฐาน
- Lane 1-3 = แถบโปรตีนที่ได้จากสารละลายจากการทดสอบฟิล์มไคโตซานที่ผสม ALFSp1
- Lane 4-6 = แถบโปรตีนที่ได้จากสารละลายจากการทดสอบฟิล์มไคโตซานที่ผสม arasin-likeSp
- Lane 7-9 = แถบโปรตีนที่ได้จากสารละลายจากการทดสอบฟิล์มไคโตซาน

นอกจากนี้จากผลการทดลองที่ได้ยังพบว่า เมื่อนำสารละลายของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ที่ความเข้มข้น 250 μ M ซึ่งเท่ากับ 40 เท่าของค่า MIC ของ ALFSp1 และเท่ากับ 10 เท่าของค่า MIC ของ arasin-likeSp มาทดสอบโดยตรงกับเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยวิธี agar diffusion assay พบว่ามีบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เกิดขึ้น (รูปที่ 4.5) จากเพปไทด์ทั้ง 2 ชนิด โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งเท่ากับ 12 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่า ALFSp1 และ arasin-likeSp สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ จากผลที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่า

การไม่พบบริเวณยับยั้งจากการทดสอบแผ่นฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 และ arasin-likeSp อาจเนื่องมาจากการเกิดปฏิกิริยาระหว่างหมู่ฟังก์ชันของโคโตซานและเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ซึ่งส่งผลให้ ALFSp1 และ arasin-likeSp ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *V. parahaemolyticus*



รูปที่ 4. 5 ลักษณะของ inhibition zone ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 (A), arasin-likeSp (B), น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ตัวอย่างควบคุม) (C) เมื่อทดสอบโดย agar diffusion method

Cai et al. (2010) ได้รายงานผลศึกษาของผสมระหว่างโคโตซาน (CS-40) และไนซินโดยใช้ Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) และได้อธิบายว่าเกิดจาก electrostatic interaction ระหว่างหมู่ protonated amino ที่ตำแหน่ง backbone ของโคโตซานกับ carboxylate ion ของไนซิน จึงแสดงให้เห็นว่าการเกิด electrostatic interaction ระหว่างเพปไทด์กับโคโตซานทำให้ไม่สามารถปลดปล่อยไนซินออกจากฟิล์มได้

จากผลการทดลองที่ได้จึงแสดงให้เห็นว่าการนำเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ไปประยุกต์ใช้ในลักษณะที่ผสมลงในแผ่นฟิล์มโคโตซานนั้นยังไม่เหมาะสม เนื่องจากทำให้ ALFSp1 และ arasin-likeSp ไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง *V. parahaemolyticus* ดังนั้นจึงจะทำการศึกษาต่อไปโดยนำ ALFSp1 และ arasin-likeSp ในลักษณะที่เป็นสารละลายมาใช้ทดสอบเพื่อลดปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในชั้นเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่งต่อไป

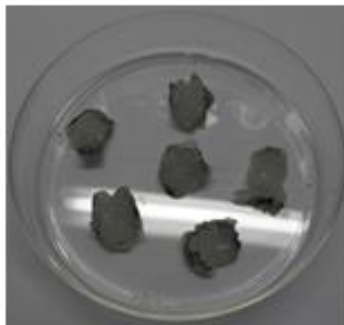
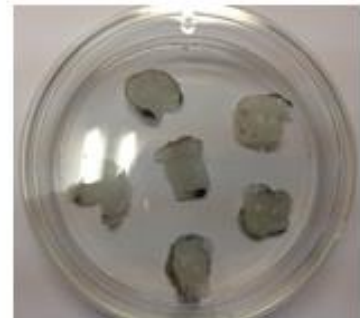
ตารางที่ 4. 3 ฤทธิ์การต้านทานเชื้อ *V. parahaemolyticus* ของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ทดสอบโดย agar diffusion method

จุลินทรีย์	ผล	ALFSp1	arasin-likeSp	น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (ตัวอย่างควบคุม)
<i>V. parahaemolyticus</i>	การยับยั้ง	+	+	-
	inhibition zone (mm)	12	10	-

(+) หมายถึง ยับยั้งการเจริญของเชื้อ และ (-) หมายถึง ไม่ยับยั้งการเจริญ

4.5 การใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp เพื่อต้านการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อกุ้งกุลาดำ

จากการศึกษาการต้านการเจริญของเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่งที่มีขนาดประมาณ 1x1x0.5 เซนติเมตร โดยเติม suspension ของเชื้อ *V. parahaemolyticus* 10 μ l ลงในตัวอย่างกุ้งที่เตรียมไว้หลังจากนั้นจึงเติมเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ที่ความเข้มข้น 250 μ M (10 เท่าของค่า MBC) ลงบนชิ้นเนื้อกุ้งชิ้นละ 50 μ l และใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลที่ได้พบว่าสีของเนื้อกุ้งตัดแต่งภายหลังการทดลองยังคงเดิมไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 4.6) และเมื่อนำมาตรวจวิเคราะห์หาปริมาณของเชื้อ *V. parahaemolyticus* โดยการ spread plate โดยใช้ TSA agar แล้วรายงานผลเป็น CFU/g ผลที่ได้พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของชิ้นเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่งในการทดลองชุดควบคุมมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 5.37 log CFU/g ในขณะที่ในชิ้นเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่งที่เติมเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp มีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เท่ากับ 3.95 และ 4.20 log CFU/g ตามลำดับ จากผลที่ได้แสดงให้เห็นว่าเมื่อเติมเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ที่ความเข้มข้น 250 μ M (10 เท่าของค่า MBC) แล้วเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถชะลอการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในชิ้นเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่งเมื่อเทียบกับเนื้อกุ้งที่ไม่ได้รับเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp โดย ALFSp1 สามารถชะลอการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่งได้ดีกว่า arasin-likeSp

**A****B****C****D**

รูปที่ 4. 6 ตัวอย่างกุ้งกุลาดำ (A) กุ้งกุลาดำที่ผ่านการปกเปลือกและล้างทำความสะอาด (B) ชิ้นเนื้อกุ้งกุลาดำที่ผ่านการตัดแต่งให้มีขนาดประมาณ 1x1x0.5 เซนติเมตร (C) และชิ้นเนื้อกุ้งกุลาดำที่ได้รับเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp (D) เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากผลของ ALFSp1 และ arasin-likeSp ในการชะลอการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อกึ่งกุดาตัดแต่ง จึงแสดงให้เห็นถึงแนวทางการนำเพปไทด์ต้านจุลชีพไปประยุกต์ใช้ โดยอาจนำไปใช้ในการแช่หรือล้างทำความสะอาดเพื่อลดปริมาณเชื้อลงได้ Mahmoud (2014) รายงานการใช้สารสกัดจากเมล็ดตองุ่นในการลดจำนวนเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในเนื้อหอยนางรมและพบว่าสารสกัดจากเมล็ดตองุ่นมีค่า MIC ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* เท่ากับ 10 mg/ml และเมื่อจุ่มเนื้อหอยนางรมในสารสกัดที่ความเข้มข้นเท่ากับ 500 mg/ml สามารถลดเชื้อ *V. parahaemolyticus* ลงได้เหลือน้อยกว่า 1.0 log CFU/g

Nattress et al. (2001) รายงานการใช้ไนซิน และไลโซไซม์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Brochothrix thermosphacta* B2 และ *Carnobacterium sp.* ซึ่งทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อหมู โดยนำเอาเนื้อแดง (cores of lean) ที่ฆ่าเชื้อแล้วมาจุ่มลงในสารละลายไนซิน ไลโซไซม์ และสารผสมระหว่างไนซินกับไลโซไซม์ แล้วจุ่มลงไปในเชื้อ *B. thermosphacta* B2 และ *Carnobacterium sp.* และนำมาตรวจปริมาณเชื้อทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ผลพบว่าสารละลายไนซิน ไลโซไซม์ และสารผสมระหว่างไนซินกับไลโซไซม์มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. thermosphacta* B2 เป็นเวลา 6 สัปดาห์แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Carnobacterium sp.* ได้ทั้งหมด และพบว่าการใช้สารผสมระหว่างไนซินกับไลโซไซม์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าการใช้ไนซินและไลโซไซม์เพียงชนิดเดียว

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปวิจัย

เพปไทด์ต้านจุลชีพที่ได้จากปุทะเล 2 ชนิด ได้แก่ ALFSp1 และ arasin-likeSp มีฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อในกลุ่มเชื้อก่อโรคในสัตว์น้ำและเชื้อก่อโรคในอาหารที่ใช้ทดสอบได้หลายชนิด โดยพบว่า ALFSp1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *S. aureus* *V. harveyi* *V. parahaemolyticus* *V. anguillarum* และ *E. coli* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.39-50 μ M นอกจากนี้มีฤทธิ์สามารถทำลายเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ได้ โดยมีค่า MBC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.39-50 μ M ส่วน arasin-likeSp สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *V. harveyi* และ *V. parahaemolyticus* ได้ โดยมีค่า MIC อยู่ในช่วงระหว่าง 0.39-25 μ M และสามารถทำลายเชื้อ *A. viridans* *M. luteus* *B. subtilis* *V. harveyi* *V. parahaemolyticus* และ *V. anguillarum* ได้ โดยมีค่า MBC อยู่ในช่วงระหว่าง 3.12-50 μ M โดยเมื่อเปรียบเทียบค่า MIC และ MBC ของ ALFSp1 และ arasin-likeSp ต่อเชื้อในกลุ่มก่อโรคในอาหารพบว่า มีฤทธิ์ในการยับยั้งและทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้ดีที่สุด

เมื่อนำ ALFSp1 และ arasin-likeSp มาศึกษาฤทธิ์ในการใช้ร่วมกับสารยับยั้งจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่มีรายงานการนำไปใช้ในอาหารได้ ได้แก่ ไนซิน และไลโซไซม์ต่อเชื้อ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตามพบว่า ไนซินที่ความเข้มข้นของไนซิน 6.88 mg/ml และไลโซไซม์ที่ความเข้มข้น 3 mg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการทดสอบไม่สามารถยับยั้งการเจริญและทำลายเชื้อ *V. parahaemolyticus* ได้จากการศึกษาฤทธิ์ของการใช้ ALFSp1 และ arasin-likeSp ร่วมกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* พบว่า ALFSp1 และ arasin-likeSp มีฤทธิ์ร่วมกันเป็นแบบเสริมฤทธิ์กัน

จากการศึกษาการใช้ ALFSp1 และ arasin-likeSp ในการลดปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus* เพื่อประยุกต์ใช้ในอาหารโดยการนำ ALFSp1 และ arasin-likeSp ผสมลงในฟิล์มโคโตซานและตรวจสอบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งโดยใช้วิธี agar diffusion method ผลที่ได้ไม่พบบริเวณยับยั้งรอบแผ่นฟิล์มโคโตซาน แผ่นฟิล์มโคโตซานผสม ALFSp1 และแผ่นฟิล์มโคโตซานผสม arasin-likeSp อย่างไรก็ตาม เมื่อนำฟิล์มโคโตซานและฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 และ arasin-likeSp มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ในระบบของอาหารเหลวด้วยเทคนิค broth microdilution assay ผลพบว่าฟิล์มโคโตซานฟิล์มโคโตซานที่ผสม arasin-likeSp และฟิล์มโคโตซานที่ผสม ALFSp1 แสดงฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *V. parahaemolyticus* อย่างไรก็ตามเมื่อนำ ALFSp1 และ arasin-likeSp ในลักษณะที่เป็นสารละลายมาใช้ทดสอบเพื่อต้านการเจริญของเชื้อ *V.*

parahaemolyticus ในชั้นเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่งพบว่า ALFSp1 และ arasin-likeSp สามารถชะลอการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในชั้นเนื้อกุ้งกุลาดำตัดแต่งเมื่อเทียบกับเนื้อกุ้งที่ไม่ได้รับเพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. การใช้เพปไทด์ต้านจุลชีพ ALFSp1 และ arasin-likeSp ควรจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติมถึงการแปรระดับความเข้มข้นของ ALFSp1 และ arasin-likeSp ในการลดปริมาณเชื้อ *V. parahaemolyticus*
2. การเกิด interaction ระหว่างโคโตซานกับเพปไทด์ต้านจุลชีพ ควรจะได้มีการศึกษาเพิ่มเติม
3. การนำ ALFSp1 และ arasin-likeSp ไปประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ อาจต้องใช้เพปไทด์ในปริมาณสูง ดังนั้นการผลิตเพปไทด์ด้วยการใช้เพปไทด์สังเคราะห์อาจทำให้มีข้อจำกัดในเรื่องของปริมาณของเพปไทด์ ซึ่งอาจต้องพิจารณาเทคนิคอื่น ๆ เพิ่มเติม เช่น รีคอมบิแนนท์โปรตีน
4. จากผลของฤทธิ์การต้านจุลชีพของ ALFSp1 และ arasin-likeSp ต่อเชื้อจุลชีพหลายชนิดรวมทั้งเชื้อจุลชีพที่ก่อโรคในในสัตว์น้ำกลุ่มครัสเตเชียน เช่น เชื้อ *V. harveyi* *V. anguillarum* และ *A. viridans* ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำไปพัฒนาผสมในสูตรอาหารสำหรับสัตว์น้ำชนิดต่างๆเพื่อทำหน้าที่เป็นสารที่ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันอันจะช่วยส่งผลให้สัตว์น้ำมีสุขภาพที่ดีและไม่ติดโรคได้ง่าย

รายการอ้างอิง

- Almeida, M. S., Cabral, K. M., Kurtenbach, E., Almeida, F. C., & Valente, A. P. (2002). Solution structure of *Pisum sativum* defensin I by high resolution NMR: plant defensins, identical backbone with different mechanisms of action. *Journal of Molecular Biology*, 315(749-757).
- Appendini, P., & Hotchkiss, J. H. (2002). Review of antimicrobial food packaging. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 3(113-126).
- Bachere, E., Destoumieux, D., & Bulet, P. (2000). Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. *Aquaculture*, 191, 71-88.
- Bagamboula, C. F., Uyttendaele, M., & Debevere, J. (2004). Inhibitory effect of thyme and basil essential oils, carvacrol, thymol, estragol, linalool and *p*-cymene towards *Shigella sonnei* and *S. flexneri*. *Journal of Food Protection*, 21, 33-42.
- Baker, R. A., Baldwin, E. A., & Nisperos-Carriedo, N. O. (1994). *Edible coatings and films for processed foods*. Lancaster: Technomic Publishing Company.
- Bezares, B. R., Sáenz, Y., Zarazaga, M., Torres, C., & Larrea, F. R. (2007). Antimicrobial activity of nisin against *Oenococcus oeni* and other wine bacteria. *International of Food Microbiology*, 116, 32-36.
- Boman, H. (1995). Peptide antibiotics and their role in innate immunity. *Annual Review of Immunology*, 13, 61-92.
- Breukink, E., Wiedemann, I., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Sahl, H., & de Kruijff, B. (1999). Use of the cell wall precursor lipid II by a pore-forming peptide antibiotic. *Science*, 286, 2361-2364.
- Broberg, C., Calder, T. J., & Orth, K. (2011). *Vibrio parahaemolyticus* cell biology and pathogenicity determinants. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238-250.
- Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 238-250.
- Brogden, K. A., Ackermann, M., McCray, P. B., & Tack, B. F. (2003). Antimicrobial peptides in animals and their role in host defences. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 22, 465-478.
- Bruno, J. F., Xu, Y., Song, J., & Berelowitz, M. (1992). Molecular cloning and functional expression of a novel brain-specific somatostatin receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 89, 11151-11155.

- Buonocore, G. G., Del Nobile, M. A., Panizza, A., Bove, S., Battaglia, G., & Nicolais, L. (2003). Modeling the lysozyme release kinetics from antimicrobial Wlms intended for food packaging applications. *Journal of Food Science*, 68, 1365–1370.
- Cai, J., Yang, J., Wang, C., Hu, Y., Lin, J., & Fan, L. (2010). Structural Characterization and Antimicrobial Activity of Chitosan (CS-40)/Nisin Complexes. *Journal of Applied Polymer Science*, 116(6), 3702-3707.
- Carriel-Gomes, M. C., Kratz, J. M., Barracco, M. A., Bachère, E., Barardi, C. R., & Simoes, C. M. (2007). *In vitro* antiviral activity of antimicrobial peptides against herpes simplex virus1, adenovirus, and rotavirus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 102(4), 469-472.
- Chan, W. C., Dodd, H. M., Horn, N., & Maclean, K. (1996). Structure-activity relationships in the peptide antibiotic nisin: role of dehydroalanine 5. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 2966-2969.
- Chen, C. S., Liao, W. Y., & Tsai, G. J. (1998). Antibacterial effects of N-sulfonated and N-sulfobenzoyl chitosan and application to oyster preservation. *Journal of Food Protection*, 61, 1124-1128.
- Choi, H., & Lee, D. G. (2012). Synergistic effect of antimicrobial peptide arenicin-1 in combination with antibiotics against pathogenic bacteria. *Microbiological Research*, 163(6-7), 479-486.
- Chung, D., Chikindas, M., & Yan, K. (2001). Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by slow release of propyl paraben from a polymer coating. *Journal of Food Protection*, 64(9), 1420-1424.
- Coma, V., Deschamps, A., & Martial-Gros, A. (2003). Bioactive packaging materials from edible chitosan polymer-Antimicrobial activity assessment on dairy-related contaminants. *Journal of Food Science*, 69(9), 2788–2792.
- Coninck, B. D., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2013). Modes of antifungal action and in planta functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biology Review*, 26, 109-120.
- Cooksey, K. (2001). Antimicrobial food packaging. *Food, Cosmetics and Drug Packaging*, 2004, 133-137.
- Cotter, P. D., Hill, C., & Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nature Reviews Microbiology*, 3, 777-788.
- Cunningham, F. E., Proctor, V. A., & Goetsch, S. J. (1991). Egg-white lysozyme as a food preservative: an overview. *Worlds Poultry Science Journal*, 47.

- Darmadji, P., & Izumimoto, M. (1994). Effect of chitosan in meat preservation. *Meat Science*, 38, 243–254.
- de la Vega, E., O'Leary, N. A., Shockey, J. E., Robalino, J., Payne, C., Browdy, C. L., . . . Gross, P. S. (2008). Anti-lipopolysaccharide factor in *Litopenaeus vannamei* (LvALF): a broad spectrum antimicrobial peptide essential for shrimp immunity against bacterial and fungal infection. *Molecular Immunology*, 45(7), 1916-1925.
- Destoumieux, D., Bulet, P., Loew, D., Dorsselaer, A. V., Rodriguez, J., & Bachere, E. (1997). Penaeidins, a new family of antimicrobial peptides isolated from the shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda). *Journal of Biological Chemistry*, 272, 28398-28406.
- Devlieghere, F., Vermeulen, A., & Debevere, J. (2004). Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21(6), 703-764.
- Dionysius, D. A., & Milne, J. M. (1997). Antibacterial peptides of bovine lactoferrin: purification and characterization. *Journal of Dairy Science*, 80, 667-674.
- Economou, T., Pournis, N., Ntzimani, A., & Savvaidis, I. N. (2008). Nisin-EDTA treatment and modified atmosphere packaging to increase fresh chicken meat shelf-life. *Journal of Food Chemistry*, 114, 1470-1476.
- Emiroglu, Z. K., Yemis, G. P., Coskun, B. K., & Candogan, K. (2010). Antimicrobial activity of soy edible films incorporated with thyme and oregano essential oils on fresh ground beef patties. *Meat Science*, 86, 283-288.
- Espina, L., Somolinos, M., Loreen, S., Conchello, P., Garcia, D., & Pageen, R. (2011). Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. *Food Control*, 22, 896-902.
- Fehlbaum, P., Bulet, P., Chemysh, S., Briand, J. P., Roussel, J. P., Letellier, L., . . . Hoffmann, J. A. (1996). Structure-activity analysis of thanatin, a 21-residue inducible insect defense peptide with sequence homology to frog antimicrobial peptides. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 93, 1221-1225.
- Fjell, C. D., Hancock, R. E. W., & Cherkasov, A. (2007). AMPper: a database and an automated discovery tool for antimicrobial peptides. *Bioinformatics*, 23, 1148-1155.
- Franco, O. L., & Melo, F. R. (2000). Osmoprotectants, a plant strategy in response to osmotic stress. *Russian Journal of Plant Physiology*, 47, 137-144.

- Gemili, S., Yemenicioglu, A., & Altinkaya, S. A. (2009). Development of cellulose acetate based antimicrobial packaging materials for controlled release of lysozyme. *Journal of Food Engineering*, 90, 453-462.
- Gennadios, A., & Weller, C. L. (1990). Edible films and coatings from wheat and corn proteins. *Food Technology*, 63-69.
- Gill, A. O., & Holley, R. A. (2000). Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. *Food Research International*, 33, 83-90.
- Giuliani, A., Pirri, G., & Nicoletto, S. F. (2007). Antimicrobial peptides: an overview of a promising class of therapeutics. *Central European Journal of Biology*, 2(1), 1-33.
- González-Chávez, S. A., Arévalo-Gallegos, S., & Rascón-Cruz, Q. (2009). Lactoferrin: structure, function and applications. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 33(4), 301.
- Gucbilmez, C. M., Yemenicioflu, A., & Arslanoflu, A. (2006). Antimicrobial and antioxidant activity of edible zein films incorporated with lysozyme, albumin proteins and disodium EDTA. *Food Research International*, 40, 80-91.
- Gueguen, Y., Romestand, B., Fievet, J., Schmitt, P., Destoumieux Garzon, D., Vandenbulcke, F., . . . Bachere, E. (2009). Oyster hemocytes express a proline-rich peptide displaying synergistic antimicrobial activity with a defensin. *Molecular Immunology*, 46, 516-522.
- Hancock, R. E., & Lehrer, R. (1998). Cationic peptides: a new source of antibiotics. *Trends Biotechnology*, 16, 82-88.
- Hoess, A., Watson, S., Siber, G. R., & Liddington, R. (1993). Crystal structure of an endotoxin-neutralizing protein from the horseshoe crab, *Limulus anti-LPS* factor, at 1.5 Å resolution. *EMBO Journal*, 12(9), 3351-3356.
- Hultmark, D., Steiner, H., Rasmuson, T., & Boman, H. G. (1980). Insect immunity. Purification and properties of three inducible bactericidal proteins from hemolymph of immunized pupae of *Hyalophora cecropia*. *European Journal of Biochemistry*, 106, 7-16.
- I.M., H., & Mattila-Sandholm, T. (2000). Permeability barrier of the Gram-negative bacterial outer membrane with special reference to nisin. *International Journal of Food Microbiology* 60, 153-161.
- Imjongjirak, C., Amparyup, P., & Tassanakajon, A. (2011a). Molecular cloning, genomic organization and antibacterial activity of a second isoform of antilipoplysaccharide factor (ALF) from the mud crab, *Scylla paramamosain*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 58-66.

- Imjongjirak, C., Amparyup, P., & Tassanakajon, A. (2011b). Two novel antimicrobial peptides, arasin-like *Sp* and GRP*Sp*, from the mud crab *Scylla paramamosain*, exhibit the activity against some crustacean pathogenic bacteria. *Fish and Shellfish Immunology*, 30, 706-712.
- Imjongjirak, C., Amparyup, P., Tassanakajon, A., & Sittipraneed, S. (2007). Antilipopolysaccharide factor (ALF) of mud crab *Scylla paramamosain*: Molecular cloning, genomic organization and the antimicrobial activity of its synthetic LPS binding domain. *Molecular Immunology*, 44, 3195-3203.
- Imjongjirak, C., Amparyup, P., Tassanakajon, A., & Sittipraneed, S. (2009). Molecular cloning and characterization of crustin from mud crab *Scylla paramamosain*. . *Molecular Biology Reports*, 36, 841-850.
- Izadpanah, A., & Gallo, R. L. (2005). Antimicrobial peptides. *Continuing Medical Education*, 52, 381-390.
- J., D.-B., P., B., R.J., E., & Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 69, 193-202.
- Jenssen, H., Hamill, P., & Hancock, R. E. W. (2006). Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Reviews*, 19, 491-511.
- Jenssen, H., & Hancock, R. E. (2009). Antimicrobial properties of lactoferrin. *Biochimie*, 91(1), 19-29.
- Jin, Z. T., Liu, L. S., Sommers, C. H., Boyd, G., & Zhang, H. Q. (2009). Radiation resistance and post-irradiation proliferation of *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat deli meat in the presence of pectin/nisin films *Journal of Food Protection*, 72(3), 644-649.
- Jin, Z. T., Liu, L. S., Zhang, H. Q., & Hicks, K. B. (2009). Antimicrobial activity of nisin incorporated in pectin and polylactic acid composite films against *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 322-329.
- Johansson, B. G. (1960). Isolation of an iron-containing red protein from human milk. *Acta Chemica Scandinavica*, 14, 510-512.
- Jongrittiporn, S., Kungsuwan, A., & Rakshit, S. K. (2001). *A study on the preservation of fishballs using chitosan*. Paper presented at the European Conference on Advanced Technology for Safe and High Quality Foods, Berlin.
- Joseph, S. W., Colwell, R. R., & Kaper, J. B. (1982). *Vibrio parahaemolyticus* and related halophilic *Vibrios*. *Critical Reviews in Microbiology*, 10(1), 77-124.

- Kechichian, V., Ditchfield, C., Veiga-Santos, P., & Tadini, C. C. (2010). Natural antimicrobial ingredients incorporated in biodegradable films based on cassava starch. *LWT-Food Science and Technology*, 43(1088-1094).
- Khoo, L., Robinette, D. W., & Noga, E. J. (1999). Callinectin, an Antibacterial Peptide from Blue Crab, *Callinectes sapidus*, Hemocytes. *Marine biotechnology (New York, N.Y.)*, 1, 44-51.
- Lariviere, W. R., & Melzack, R. (1996). The bee venom test: a new tonic-pain test. *Pain*, 66, 271-277.
- Lay, F. T., Brugliera, F., & Anderson, M. A. (2003). Isolation and properties of floral defensins from ornamental tobacco and petunia. *Plant Physiology*, 131(3), 1289-1293.
- Leceta, I., Guerrero, P., Ibarburu, I., Duenas, M. T., & Caba, K. D. L. (2013). Characterization and antimicrobial analysis of chitisan-base films. *Journal of Food Engineering*, 116, 889-899.
- Lennette, T. H., Barilows, A., W.J., H. J., & Shadony, H. J. (1991). *Manual of clinical microbiology* (5th ed.). Washington, DC.: American Society for Microbiology.
- Li, B., Kennedy, J. F., Peng, J. L., Yie, X., & Xie, B. J. (2006). Preparation and performance evaluation of glucomannan–chitosan–nisin ternary antimicrobial blend film. *Carbohydrate Polymers*, 65, 488-494.
- Li, C., Zhao, J., Song, L., Mu, C., Zhang, H. G., Y., Qiu, L., . . . Xing, K. (2008). Molecular cloning, genomic organization and functional analysis of an anti-lipopolysaccharide factor from Chinese mitten crab *Eriocheir sinensis*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32, 784–794.
- Lin, M. C., Hui, C. F., Chen, J. Y., & Wu, J. L. (2013). Truncated antimicrobial peptides from marine organisms retain anticancer activity and antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*. *Peptides*, 44, 139-148.
- Lin, Y. T., Labbe, R. G., & Shetty, K. (2005). Inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood systems using oregano and cranberry phytochemical synergies and lactic acid. *Innovation food science & emerging technologies*, 6, 453-458.
- Liu, F. S., Liu, Y. C., Li, F. H., Dong, B., & Xiang, J. H. (2005). Molecular cloning and expression profile of putative antilipopolysaccharide factor in Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). *Marine biotechnology*, 7, 600–608.
- Liu, H. P., Jiravanichpaisal, P., Söderhäll, I., Cerenius, L., & Soderhall, K. (2006). Antilipopolysaccharide factor interferes with white spot syndrome virus replication in vitro and in vivo in the crayfish *Pacifastacus leniusculus*. *Journal of Virology*, 80, 10365–10371.

- Liu, X. F., Guan, Y. L., Yang, D. Z., Li, Z., & Yao, K. D. (2001). Antibacterial action of chitosan and carboxymethylated chitosan. *Journal of Applied Polymer Science*, 79, 1324-1335.
- Liu, Y., Cui, Z. X., Li, X. H., Song, C. W., Li, Q. Q., & Wang, S. Y. (2012). Molecular cloning, expression pattern and antimicrobial activity of a new isoform of anti-lipopolysaccharide factor from the swimming crab *Portunus trituberculatus*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33, 85–91.
- Lorian, V. (1995). *Antibiotics in laboratory medicine* (J. F. Acar & F. W. Goldstein Eds. 4th ed.). London: Williams & Walkins Awaverly.
- Lueck, E. (1976). Sorbic acid as food preservative. *International Flavors Food Additive*, 7, 122-138.
- Lueck, E. (1980). *Sorbates in antimicrobial food additives: characteristics, uses, effects*. Berlin: Springer-Verlage.
- Mahmoud, B. S. M. (2014). The efficacy of grape seed extract, citric acid and lactic acid on the inactivation of *Vibrio parahaemolyticus* in shucked oysters. *Food Control*, 41, 13-16.
- Makki, F., & Durance, T. D. (1996). Thermal inactivation of lysozyme as influenced by pH, sucrose and sodium chloride and inactivation and preservative effect in beer. *Food Research International*, 29(7), 635-645.
- Marcos, B., Aymerich, T., Garriga, M., & Arnau, J. (2012). Active packaging containing nisin and high pressure processing as post-processing listericidal treatments for convenience fermented sausages. *Food Control*, 30, 325-330.
- Mariângela, S., Diz, S., Carvalho, A. O., Rodrigues, R., Neves-Ferreira, A. G. C., Cunha, M. D., . . . Gome, V. M. (2006). Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1760(9), 1323-1332.
- Millette, M., L.C., T., Smoragiewicz, W., & Lacroix, M. (2007). Inhibition of *Staphylococcus aureus* on beef by nisin-containing modified alginate films and beads. *Food Control*, 18, 878-884.
- Min, S., Rumsey, T. R., & Krochta, J. M. (2008). Diffusion of the antimicrobial lysozyme from a whey protein coating on smoked salmon. *Journal of Food Engineering*, 84, 39-47.
- Muriel-Galet, V., Cerisuelo, J. P., Lopez-Carballo, G., Lara, M., Gavara, R., & Hernandez-Munoz, P. (2012). Development of antimicrobial films for microbiological

- control of packaged salad. *International of Food Microbiology*, 157(2), 195-201.
- Nattress, F. M., Yost, C. K., & Baker, L. P. (2001). Evaluation of the ability of lysozyme and nisin to control meat spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 70, 111-119.
- Nguyen, L. T., Haney, E. F., & Vogel, H. J. (2011). The expanding scope of antimicrobial peptide structures and their modes of action. *Cell Press*, 29(9), 464-472.
- Okereke, A., & Montville, T. J. (1992). Nisin dissipates the proton motive force of the obligate anaerobe *Clostridium sporogenes* PA367. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 2463-2467.
- Otvos, L. (2002). The short proline-rich antibacterial peptide family. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59, 1138-1150.
- Otvos, L. J., Bokonyi, K., Varga, I., Otvos, B. I., Hoffmann, R., Ertl, H. C., . . . Bulet, P. (2000). Insect peptides with improved protease-resistance protect mice against bacterial infection. *Protein Science*, 9(4), 742-749.
- Ouattara, B., Simard, R. E., Piette, G., Begin, A., & Holley, R. A. (2000). Inhibition of surface spoilage bacteria in processed meats by application of antimicrobial films prepared with chitosan. *International Journal of Food Microbiology*, 62, 139-148.
- Papineau, A. M., Hoover, D. G., Knorr, D., & Farkas, D. F. (1991). Antimicrobial effect of water-soluble chitosans with high hydrostatic pressure. *Food Biotechnology*, 5, 45-47.
- Park, C. B., Kim, M. S., & Kim, S. C. (1996). A novel antimicrobial peptide from *Bufo bufo gargarizans*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 218, 408-413.
- Park, S. I., Deaschel, M. A., & Zhao, Y. (2004). Functional properties of antimicrobial lysozyme-chitosan composite films. *Journal of Food Science*, 69, 215-221.
- Paulsen, V. S., Blencke, H. M., Benincasa, M., Haug, T., Eksteen, J. J., Styrvold, O. B., . . . Stensvag, K. (2013). Structure-activity relationships of the antimicrobial peptide arasin1 and mode of action studies of the N-terminal, proline-rich region. *PLoS ONE*, 8(1).
- Pelegriani, P. B., Sarto, R. P. D., Silva, O. N., Franco, O. L., & Grossi-de-Sa, M. F. (2011). Antibacterial peptides from plants: What they are and how they probably work. *Biochemistry Research International*, 2011.

- Pranoto, Y., Rakshit, S. K., & Salokhe, V. M. (2005). Enhancing antimicrobial activity of chitosan films by incorporating garlic oil, potassium sorbate and nisin. *LWT-Food Science and Technology*, 38(859-865).
- Rao, M. S., Chander, R., & Sharma, A. (2008). Synergistic effect of chitooligosaccharides and lysozyme for meat preservation. *LWT-Food Science and Technology*, 41(10), 1995-2001.
- Reddy, K. V. R., Yedery, R. D., & Aranha, C. (2004). Antimicrobial peptides: premises and promises. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 24, 536-547.
- Relf, J. M., Chisholm, J. R., Kemp, G. D., & Smith, V. J. (1999). Purification and characterization of a cysteine-rich 11.5-kDa antibacterial protein from the granular haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry*, 264(2), 350-357.
- Rohani, S. M. R., Moradi, M., Mehdizadeh, T., Saei-Dehkordi, S. S., & Griffiths, M. W. (2011). The effect of nisin and garlic (*Allium sativum L.*) essential oil separately and in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*. *LWT-Food Science and Technology*, 44, 2260-2265.
- Rosa, R. D., & Barracco, M. A. (2010). Antimicrobial peptides in crustaceans. *Invertebrate Survival Journal*, 7, 262-284.
- Rosenfeld, Y., Barra, D., Simmaco, M., Shai, Y., & Mangoni, M. L. (2006). A synergism between temporins toward Gram-negative bacteria overcomes resistance imposed by the lipopolysaccharide protective layer. *Journal of Biological Chemistry*, 281(39), 28565-28574.
- Sahl, H. G., & Bierbaum, G. (1998). Lantibiotics: biosynthesis and biological activities of uniquely modified peptides from Gram-positive bacteria. *Annual Review of Microbiology*, 52, 41-79.
- Salamah, A. A., & Al-Obaidi, A. S. (1995). Effect of some physical and chemical factors on the bactericidal activity of human lactoferrin and transferrin against *Yersinia pseudotuberculosis*. *Microbiologica*, 18, 275-282.
- Sanjurjo, K., Flores, S., Gerschenson, L., & Jagus, R. (2006). Study of the performance of nisin supported in edible films. *Food Research International*, 39, 749-754.
- Santiago-Silva, P., Soares, N. F. F., Nóbrega, J. E., Júnior, M. A. W., Barbosa, K. B. F., Volp, A. C. P., . . . Würlitzer, N. J. (2008). Antimicrobial efficiency of film incorporated with pediocin (ALTA® 2351) on preservation of sliced ham. *Food Control*, 20, 85-89.
- Schmitt, P., Rosa, R. D., Duperthuy, M., de Lorgeril, J., Bachere, E., & Destoumieux-Garzon, D. (2012). The antimicrobial defense of the pacific oyster, *Crassostrea*

- gigas. How diversity may compensate for scarcity in the regulation of resident/pathogenic microflora. *Frontiers in Microbiology*, 3, 1-17.
- Schnapp, D., Kemp, G. D., & Smith, V. J. (1996). Purification and characterization of a proline-rich antibacterial peptide, with sequence similarity to bactenecin-7, from the haemocytes of the shore crab, *Carcinus maenas*. *European Journal of Biochemistry*, 240(532-539).
- Seydim, A. C., & Sarikus, G. (2006). Antimicrobial activity of whey protein based edible films incorporated with oregano, rosemary and garlic essential oils. *Food Research International*, 39, 639-644.
- Sofos, J. N., & Busta, F. F. (1981). Antimicrobial activity of sorbate. *Journal of Food Protection*, 44, 614-622.
- Sofos, J. N., & Busta, F. F. (1983). *Sorbates: Antimicrobials in foods* (B. a. Davidson Ed.).
- Sofos, J. N., Pierson, M. D., Blocher, J. C., & Busta, F. F. (1986). Mode of action of sorbic. *International Journal of Food Microbiology*, 3, 1-17.
- Solis, J., Medrano, G., & Ghislain, M. (2006). Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology*, 164, 1071-1082.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N. (2007). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 25, 120-127.
- Solomakos, N., Govaris, A., Koidis, P., & Botsoglou, N. (2008). The antimicrobial effect of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. *Food Microbiology*, 25(1), 120-127.
- Somboonwivat, K., Marcos, M., Tassanakajon, A., Klinbunga, S., Aumelas, A., Romestand, B., . . . Bachère, E. (2005). Recombinant expression and antimicrobial activity of anti-lipopolysaccharide factor (ALF) from the black tiger shrimp *Penaeus monodon*. *Developmental and Comparative Immunology*, 29(10), 841-851.
- Sorensen, M., & Sorensen, S. P. L. (1939). The proteins in whey. *Comptes-rendus des Travaux du Laboratoire*, 23, 55-99.
- Souza, A. C., Goto, G. E. O., Mainardi, J. A., Coelho, A. C. V., & Tadini, C. C. (2013). Cassava starch composite films incorporated with cinnamon essential oil:

- antimicrobial activity, microstructure, mechanical and barrier properties. *LWT-Food Science and Technology*, 54.
- Souza, P. M., Fernandez, A., Lopez-Carballo, G., Gavara, R., & Hernandez-Munoz, P. (2010). Modified sodium caseinate films as releasing carriers of lysozyme. *Food Hydrocolloids*, 24, 300-306.
- Sperstad, S. V., Haug, T., Vasskog, T., & Stensvag, K. (2009). Hyastatin, a glycine-rich multidomain antimicrobial peptide isolated from the spider crab (*Hyas araneus*) hemocytes. *Molecular Immunology*, 46(2604-2612).
- Stensvåg, K., Haug, T., Sperstad, S. V., Rekdal, O., Indrevoll, B., & Styrvold, O. B. (2008). Arasin 1, a proline-arginine-rich antimicrobial peptide isolated from the spider crab, *Hyas araneus*. *Developmental and Comparative Immunology*, 32(3), 275-285.
- Stevens, K. A., Sheldon, B. W., Klapes, N. A., & Klaenhammer, T. R. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(12), 3613-3615.
- Su, Y. C., & Liu, C. (2007). *Vibrio parahaemolyticus*: a concern of seafood safety. *Food Microbiology*, 24(6), 549-558.
- Sudarshan, N. R., Hoover, D. G., & Knorr, D. (1992). Antibacterial action of chitosan. *Food Biotechnology*, 6, 257-272.
- Sullivan, O. L., Ross, R. P., & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocins-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*, 84, 593-604.
- Supungul, P., Klinbunga, S., Pichyangkura, R., Hirono, I., Aoki, T., & Tassanakajon, A. (2004). Antimicrobial peptides discovered in the black tiger shrimp *Penaeus monodon* using the EST approach. *Diseases of Aquatic Organisms*, 61(1-2), 123-135.
- Tanaka, S., Nakamura, T., Morita, T., & Iwanaga, S. (1982). *Limulus* anti-LPS factor: an anticoagulant which inhibits the endotoxin mediated activation of *Limulus* coagulation system. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 105, 717-723.
- Tang, M., & Hong, M. (2009). Structure and mechanism of beta-hairpin antimicrobial peptides in lipid bilayers from solid-state NMR spectroscopy. *Molecular BioSystems*, 5(317-322).
- Thammasirirak, S., Pukcothanung, Y., Preecharam, S., Daduang, S., Patramanon, R., Fukamizo, T., & Araki, T. (2010). Antimicrobial peptides derived from goose egg

- white lysozyme. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C*, 151(1), 84-91.
- Thomas, L. V., Clarkson, M. R., & Delves-Broughton, J. (2000). *Nisin* (A. S. Naidu Ed.). Boca-Raton, Florida: CRC Press.
- Thomas, S., Karnik, S., Barai, R. S., Jayaraman, V. K., & Idicula-Thomas, S. (2010). CAMP: a useful resource for research on antimicrobial peptides. *Nucleic Acids Research*, 38.
- Trevor, S. Stimulus responsive 'smart materials' for controlled release and targeted delivery within the gastric environment. Retrieved 19 March, 2014, from <http://www.msm.cam.ac.uk/ccmm/research/st328.html>
- Urdangarin, M. C., Norero, N. S., Broekaert, W. F., & C., D. I. (2000). A defensin gene expressed in sunflower inflorescence. *Plant Physiology*, 38, 253-258.
- Vaara, M., Plachy, W. Z., & Nikaido, H. (1990). Partitioning of hydrophobic probes into lipopolysaccharide bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1024, 152-158.
- Vermeiren, L., Devlieghere, F., van Beest, M., de Kruijf, N., & Debevere, J. (1999). Developments in active packaging of foods. *Trends in Food Science and Technology*, 10, 77-86.
- Wang, G., Li, X., & Wang, Z. (2008). APD2: the updated antimicrobial peptide database and its application in peptide design. *Nucleic Acids Research*, 37, 933-937.
- Wang, G. H. (1992). Inhibition and inactivation of five species of foodborne pathogens by chitosan. *Journal of Food Protection*, 55(11), 916-919.
- Wang, L., Zhang, Y., Wang, L., Yang, J., Zhou, Z., Gai, Y., . . . Song, L. (2011). A new anti-lipopolysaccharide factor (*EsALF-3*) from *Eriocheir sinensis* with antimicrobial activity. *African Journal of Biotechnology*, 10, 77.
- Wang, Z., & Wang, G. (2004). APD: the Antimicrobial Peptide Database. *Nucleic Acids Research*, 32, 590-592.
- Yang, Y., Boze, H., Chemardin, P., Padilla, A., Moulin, G., Tassanakajon, A., . . . Aumelas, A. (2009). NMR structure of rALF-Pm3, an anti-lipopolysaccharide factor from shrimp: model of the possible lipid A-binding site. *Biopolymers*, 91(3), 207-220.
- Yedery, R. D., & Reddy, K. V. (2009). Identification, cloning, characterization and recombinant expression of an anti-lipopolysaccharide factor from the hemocytes of Indian mud crab, *Scylla serrata*. *Fish Shellfish Immunology*, 27(2), 275-284.

- Yeung, P. S., & Boor, K. J. (2004). Epidemiology, pathogenesis, and prevention of foodborne *Vibrio parahaemolyticus* infections. *Foodborne Pathogens and Disease*, 1(2), 74-88.
- Zasloff, M. (2002). Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature*, 415, 389-395.
- Zhu, L., Lan, J. F., Huang, Y. Q., Zhang, C., Zhou, J. F., Fang, W. H., . . . Li, X. C. (2014). SpALF4: a newly identified anti-lipopolysaccharide factor from the mud crab *Scylla paramamosain* with broad spectrum antimicrobial activity. *Fish and Shellfish Immunology*, 36(1), 172-180.
- Zhu, M., Du, M., Cordray, J., & Ahn, D. U. (2005). Control of *Listeria monocytogenes* contamination in ready-to-eat meat products *Comprehensive reviews in food science and food safety*, 4(2), 34-42.
- Zivanovic, S., Chi, S., & Draughon, A. F. (2003). Antimicrobial activity of chitosan films enriched with essential oils. *Journal of Food Science*, 70 (1), 45–51.
- ศูนย์ข้อมูลโรคติดต่อและพาหะนำโรค. *Vibrio parahaemolyticus*. Retrieved 18 มกราคม 2556, from http://webdb.dmsc.moph.go.th/ifc_nih/a_nih_1_001c.asp?info_id=1134
- พระราชบัญญัติอาหาร พ.ศ.2552 (ฉบับปรับปรุงปี 2556) (2552).



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Thiosulfate citrate bile sucrose (TCBS) Agar, 100 ml

TCBS agar 8.9 g

นำอาหารมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml แล้วให้ความร้อนจนส่วนผสมละลายเข้ากัน รอให้อุณหภูมิลดลงจนถึงประมาณ 55 °C แล้วจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2. Tryptic Soy Broth (TSB), 100 ml

TSB 3 g

นำอาหารมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. Tryptic Soy Agar (TSA), 100 ml

TSB 3 g

Bacto agar 1.5 g

นำอาหารมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที รอให้อุณหภูมิลดลงจนถึงประมาณ 55 °C แล้วจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. Poor Broth (PB), 100 ml

Tryptone	1	g
Sodium chloride	0.5	g

นำอาหารมาละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml แล้วปรับ pH ให้เท่ากับ 7.5 ด้วยสารละลาย NaOH แล้วจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงเก็บที่อุณหภูมิห้อง



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย NaOH ความเข้มข้น 1 N สำหรับปรับ pH ของ Poor Broth (PB), 100 ml

NaOH	4	g
------	---	---

นำ NaOH ใส่ลงในขวด volumetric flask แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

2. สารเคมีสำหรับละลายเพปไทด์

- 2.1. สารละลาย acetic acid buffer 0.01%, 100 ml

acetic acid	0.01	ml
-------------	------	----

นำน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml ใส่ลงในขวด volumetric flask แล้วเติมกรดอะซีติกลงไป หลังจากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

- 2.2. สารละลาย HCl stock HCl 10 mM, 100 ml

HCl	1	ml
-----	---	----

นำน้ำกลั่นปริมาตร 50 ml ใส่ลงในขวด volumetric flask แล้วเติมกรด HCl ลงไป หลังจากนั้นจึงปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml เขย่าให้เข้ากัน แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3. สารละลายสำหรับ SDS-PAGE

3.1. 2 M Tris-HCl, pH 8.8, 100 ml

Tris (hydroxymethyl)-aminomethanen 24.2 g

นำ Tris (hydroxymethyl)-aminomethane มาละลายด้วยน้ำกลั่น 50 ml หลังจากนั้นเติม conc. HCl 4 ml และปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้เท่ากับ 8.8 แล้วปรับปริมาตรอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml หลังจากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.2. 1 M Tris-HCl, pH 6.8, 100 ml

Tris (hydroxymethyl)-aminomethane 12.1 g

นำ Tris (hydroxymethyl)-aminomethane มาแล้วละลายด้วยน้ำกลั่น 50 ml หลังจากนั้นเติม conc. HCl 8 ml และปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้เท่ากับ 8.8 แล้วปรับปริมาตรอีกครั้งด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 100 ml หลังจากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำมาเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.3. 10% SDS, 100 ml

SDS 10 g

นำ SDS ที่ซื้อมาแล้ว มาละลายด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 80 ml แล้วปรับปริมาตรจนได้ 100 ml หลังจากนั้นจึงนำไปฆ่าเชื้อด้วย autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.4. 1% Bromophenol blue, 10 ml

Bromophenol blue	0.1	g
------------------	-----	---

นำ Bromophenol blue ที่ซึ่งเตรียมไว้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรจนได้ 10 ml
นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้อง

3.5. 10% Ammonium persulphate, 1 ml

Ammonium persulphate	0.1	g
----------------------	-----	---

นำ Ammonium persulphate ที่ซึ่งเตรียมไว้มาละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนได้
1 ml แล้วจึงนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

3.6. 1 M Dithiothreitol (DTT), 1 ml

DTT	0.1542	g
-----	--------	---

นำ DTT ที่ซึ่งเตรียมไว้มาละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรจนได้ 1 ml แล้วจึงนำไปเก็บที่
อุณหภูมิ -20 °C

3.7. Working solution A (30% acrylamide, 0.8% bis-acrylamide), 100 ml

Acrylamide	29.2	g
Bis-acrylamide	0.8	g

นำสารที่ซึ่งแล้วมาละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรจนได้ 100 ml นำไปเก็บที่ 4 °C

3.8. Working solution B (4x Separating gel buffer; 1.5 M Tris, 0.4% SDS), 100 ml

2 M Tris-HCl, pH 8.8	75	ml
10% SDS	4	ml
น้ำกลั่น	21	ml

3.9. Working solution C (4x Stacking gel buffer; 0.5M Tris, 0.4% SDS), 100 ml

1 M Tris-HCl, pH 6.8	50	ml
10% SDS	4	ml
น้ำกลั่น	46	ml

3.10. 2X Sample buffer, 10 ml

1 M Tris-HCl, pH 6.8	1	ml
glycerol	2	ml
10% SDS	2	ml
0.1% bromophenol blue	2	ml
1 M DTT	1	ml
น้ำกลั่น	2	ml

3.11. Electrophoresis buffer (25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% SDS), 1 litre

Tris (hydroxymethyl)-aminomethane	3	g
Glycine	14.4	g
SDS	1	g

ละลายส่วนประกอบทั้งหมดในน้ำกลั่น 800 ml แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1 litre ไม่ต้องปรับ pH (pH ควรได้ประมาณ 8.3)

3.12. Staining solution, 1 litre

Coomassie Brilliant Blue R-250	1	g
Methanol	450	ml
Glacial acetic acid	100	ml
น้ำกลั่น	450	ml

3.13. Destain solution, 1 litre

Methanol	100	ml
Glacial acetic acid	100	ml
น้ำกลั่น	800	ml

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์โปรตีนด้วยวิธี SDS-PAGE

1. การเตรียม 20% Separating gel

Working solution A	6.7	ml
Working solution B	2.5	ml
น้ำกลั่น	0.8	ml
10% Ammonium persulphate	50	μ l
TEMED	5	μ l

2. การเตรียม 5% Stacking gel

Working solution A	0.67	ml
Working solution C	1	ml
น้ำกลั่น	2.3	ml
10% Ammonium persulphate	30	μ l
TEMED	5	μ l

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวฐิติญา รัตนดิลก ณ ภูเก็ต เกิดเมื่อวันที่ 18 กันยายน พ.ศ. 2530 ที่จังหวัดพังงา สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เมื่อปีการศึกษา 2552 และเข้าศึกษาต่อ ในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2553 นำเสนอผลงานทางวิชาการเรื่อง ฤทธิ์ทางชีวภาพ ของเพปไทด์ ต้านจุลชีพ arasin-likeSp และ ALFSp1 จากปูทะเลต่อเชื้อก่อโรคทางอาหาร Vibrio parahaemolyticus. ใน การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 27 “การวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา: หนทางสู่การพัฒนาประเทศในบริบทประชาคมอาเซียน” ระหว่างวันที่ 28 กุมภาพันธ์-1 มีนาคม 2556 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก



จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY