รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการภาษาไทย: การผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพ

ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ: Production of bacteriocins from lactic acid bacteria for use as food biopreservatives

ชื่อผู้วิจัย: นางสาวสุรีย์ นานาสมบัติ หัวหน้าโครงการวิจัย

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ

พ. ศ. 2554

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รายงานการวิจัย

ชื่อโครงการภาษาไทย: การผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพ

ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ: Production of bacteriocins from lactic acid bacteria for use as food biopreservatives

ชื่อผู้วิจัย: นางสาวสุรีย์ นานาสมบัติ หัวหน้าโครงการวิจัย

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ

พ. ศ. 2554

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

12122 679

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อโครงการวิจัยภาษาไทย: การผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพ

ชื่อโครงการวิจัยภาษาอังกฤษ: Production of bacteriocins from lactic acid bacteria for use as food biopreservatives

แหล่งเงิน เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 152,210 บาท

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึง กันยายน พ.ศ. 2554

หัวหน้าโครงการวิจัย: รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

หน่วยงานต้นสังกัด: สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อีเมล์: knsuree@kmitl.ac.th

คำสำคัญ (Keywords): bacteriocins, lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes*, biopreservatives, chilled ground pork

บทคัดย่อ

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และเชื้อ *Lactobacillus brevis* LT0904 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ (25-42 องศาเซลเซียส) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชต่างกัน (พีเอช 4-8) ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินแตกต่างกัน (12,800 AUต่อมิลลิลิตรเท่ากัน) การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส (30-40 กรัมต่อลิตร) และทริปโตน (10 กรัมต่อลิตร) ในอาหาร MRS สูตรปกติช่วยกระตุ้นการผลิตแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้การเติม K_2HPO_4 ทำให้เชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีกิจกรรมสูงถึง 25,000 AUต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกับการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็น 20 กรัมต่อลิตร และ K_2HPO_4 ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเพื่อผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ทั้งนี้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 จะมีกิจกรรมสูงเมื่อเติม KH_2PO_4 ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรแทน K_2HPO_4 ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรในสูตรอาหาร MRS ปกติ จากนั้นนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำไดอะไลซิส และการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกและนำมาศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ผลปรากฏว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงสุด 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ไม่สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงสุด 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แบคเทอริโอซินจากเชื้อทั้งสองชนิดมีความคงตัวในสภาพที่มี pH 7 และในสภาพที่มีเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น α-amylase, lipase, papain, pepsin และ trypsin trypsin นอกจากนี้แบคเทอริ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอซินจากเชื้อทั้งสองยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลวได้ดีจึงได้ทดลองใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อทั้งสองในการควบคุมการเจริญของ *L. monocytogenes* ในหมูยอแช่เย็นและในแหนม พบว่าการเติมแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 4) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ให้ผลดีกว่าการเติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ในการลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในหมูยอระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และได้ศึกษาผลของแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 4) ร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการควบคุมเชื้อ *L. monocytogenes* ในระหว่างการหมักแหนมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่าการเติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 (ร้อยละ 4) ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ในแหนมสามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ได้ถึง 1.5 log cycle เมื่อหมักครบ 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abstract

The optimum temperature, pH and medium components for bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* LS0602 and *Lactobacillus brevis* LT0904 to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* were studied. No significant differences in bacteriocin activity were observed when both strains were cultured in MRS broth at 25-42 °C and pH 4-8 (12,800AU/ml). High concentration of glucose (30-40 g/l) and tryptone (10g/l) in MRS broth stimulated their bacteriocin production. Maximum bacteriocin activity by *L. plantarum* LS0602 (25,600 AU/ml) was recorded in MRS broth with 5g/l K_2HPO_4, while 20g/l yeast extract and 20g/l K_2HPO_4 in MRS broth resulted in the same bacteriocin activity by *L. brevis* LT0904. In addition, bacteriocin production by *L. brevis* LT0904 was stimulated in MRS broth with 2g/l K_2HPO_4 replaced by 2g/l KH_2PO_4. The bacteriocins in cell-free supernatant were partial purified by ammonium sulfate precipitation, dialysis and trichloroacetic acid precipitation, and subsequently tested for their stability to heat, pH and enzymes. The bacteriocins from *L. plantarum* LS0602 and *L. brevis* LT0904 were not inactivated after treatment at highest temperature of 85°C for 30 min and 72°C for 30 min, respectively. The bacteriocins from both strains maintained full stability at pH 7 and after treatments with α-amylase, lipase, papain, pepsin and trypsin. They also exhibited strong inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* in MRS broth. Then, these bacteriocins were used to control the growth of *L. monocytogenes* in ground pork during storage at 4°C and in nham during fermentation at 30°C. The bacteriocins (4%) produced by *L. plantarum* LS0602 were more effective to reduce the total bacterial counts and *L. monocytogenes* counts in chilled ground pork than those produced by *L. brevis* LT0904, whereas the bacteriocins (4%) in combination with *L. plantarum* LS0602 could reduce the number of *L. monocytogenes* in nham for 1.5 log cycle after 3-day fermentation.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม	3
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย	8
บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์	18
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ	35
บรรณานุกรม	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

กล้าเชื้อ (starter culture) เป็นจุลินทรีย์ที่เติมในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก กล้าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมักที่ดีควรมีคุณสมบัติหลายประการเช่น ความเป็นโพรไบโอติก มีกิจกรรมสลายโปรตีนและไขมัน การไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลส มีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ในเตรทรีดักเทส และในไตรทรีดักเทส โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อมีคลไกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยการผลิตกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล และแบคทีเรียโอซิน (Holzapfel. 1994)

แบคทีเรียโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนหรือเปปไทด์ที่สร้างจากแบคทีเรีย แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการใช้ในการถนอมอาหารหลายประการเช่นเป็นสารที่มีความปลอดภัย (generally recoguized as safe substances) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์และพืชชั้นสูง (eukaryotic cells) ถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์โพรติเอสในทางเดินอาหาร (digestive protcases) มีผลเล็กน้อยต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร มักจะทนต่อกรดและความร้อน มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นซึ่งเจริญแข่งขันได้กว้างเช่น ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Listeria monocytogenese*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* และ *Bacillus cereus* รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย สารแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคทีเรียโอซิน เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งจะช่วยป้องกันสารแบคทีเรียโอซินและสารประกอบชนิดอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 600 ดาลตัน (Da) ไม่ให้เข้าถึงเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Ammor และ Mayo. 2007; Gálvez และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะผลิตแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียเหล่านี้เพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพทดแทนการใช้สารเคมีในการถนอมอาหารเพื่อการผลิตอาหารที่ปลอดภัย

แบคทีเรียโอซินบางชนิดมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Clostridium botulinum*, *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus*. (Carolissen-Maclay และคณะ. 1996) มีการทดลองของนักวิจัยหลายท่านที่ทดลองเติมแบคทีเรียโอซินลงไปในอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น Vignolo และคณะ (1996) ที่เติม Lactocin 705 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus casei* CRL 705 เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อวัวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส โดยเติมสารแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรม 2 ระดับคือ 8,400 และ 16,800 AU ต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคเทอริโอซินที่ทั้งสองระดับสามารถลดการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้อย่างน้อย 1 log cycle หรือการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับแบคเทอริโอซินเช่นการทดลองของ Kingcha และคณะ (2012) ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* BCC 772 ร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์แหนมพบว่าจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในแหนมลดลงจาก 5.9-6.1 log CFUต่อกรัม เหลือ 2.5 log CFUต่อกรัมเมื่อหมักไปแล้ว 96 ชั่วโมง

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำแบคเทอริโอซินมาใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสัตว์ หรือการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียร่วมกับการเติมแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ในการลดจำนวนหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในแหนม พร้อมทั้งเปรียบเทียบคุณภาพทางจุลินทรีย์ เคมี และกายภาพกับแหนมที่ไม่เติมกล้าและไม่เติมแบคเทอริโอซิน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากิจกรรมของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกและความคงตัวของแบคเทอริโอซินต่อพีเอช อุณหภูมิและเอนไซม์
2. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการทำแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกให้บริสุทธิ์
3. เพื่อศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินและการประยุกต์ใช้ในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

แบคทีเรียซินเหล่านี้ของ antimicrobial peptides แบคเทอริโอซินเป็นแหล่งของแปปไทด์ที่ต่อต้านจุลินทรีย์ซึ่งใช้ประโยชน์สำหรับการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร แบคเทอริโอซินประกอบด้วยกลุ่มของสารต่างชนิดกัน (heterogenous group) ถึงแม้ว่าจะประกอบด้วยสารที่มีความแตกต่างกันทางเคมีแต่คุณสมบัติหนึ่งที่เป็นจุดเด่นของแบคเทอริโอซินก็คือมีโปรตีนเป็นส่วนสำคัญ การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ที่จำเพาะ (โปรติเอสและไลเปส เป็นต้น) ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของโมเลกุลสารแบคเทอริโอซิน จากหลักการนี้มีผู้รายงานว่า streptocin STH อาจเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยหมู่ของโปรตีน ไขมันและฟอสเฟตที่สำคัญ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารแบคเทอริโอซินบ่งชี้ได้ว่าสารแบคเทอริโอซินบางชนิดประกอบด้วยโปรตีนอย่างง่าย อย่างไรก็ตามจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ทำให้ทราบว่าแบคเทอริโอซินของ Staphylococcal, Clostridial และ *Lactobacillus* เป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างซับซ้อนซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของไขมันและคาร์โบไฮเดรตนอกเหนือจากโปรตีนที่มีอยู่ในโมเลกุลสำหรับองค์ประกอบของ staphylococcin 414 คล้ายกับองค์ประกอบโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Staphylococcus* จากการวิเคราะห์สาร colicins พบว่ามีส่วนประกอบของแอคทีฟโปรตีนที่ซับซ้อนซึ่งมีไลโปพอลิแซคคาไรด์แอนติเจน (lipopolysaccharide antigen) อยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างสาร colicins นั้น โมเลกุลของสาร butyricin 7423 และ perfringocin 11105 ประกอบด้วยส่วนที่เป็นแอมฟิฟิลิกโปรตีน (amphiphilic protein) และคาดการณ์ว่ามีส่วนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ด้วยซึ่งอาจช่วยให้การกระทำกับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อสารแบคเทอริโอซินเกิดได้ง่ายขึ้น (Tagg และคณะ. 1976)

สารที่จัดเป็นแบคเทอริโอซินประกอบด้วย โปรตีนขนาดต่างๆ กัน อยู่ในช่วงตั้งแต่ขนาดโมเลกุลเล็กอย่างง่ายและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น streptococcin A–FF22 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8,000 ดาลตัน จนกระทั่งถึงขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ซับซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลมากถึง 10^6 แบคเทอริโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำโดยทั่วไปแล้วจะมีความไวต่อเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) สูงแต่มีความไวต่อความร้อนต่ำ นักวิจัยได้เคยตรวจสอบแบคเทอริโอซินในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและพยายามที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินกับโครงสร้างที่เห็นภายใต้กล้อง ซึ่งคุณลักษณะของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แกรมบวกที่พบได้บ่อยคือมีโครงสร้างทางกายภาพ 2 แบบหรือมากกว่านั้น ซึ่งโมเลกุลของสารแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันในแบคเทอริโอซินเหล่านี้ ดูเหมือนว่าจะมีความสมดุลในแง่ของสัดส่วนของโมเลกุลที่มีขนาดเล็กและโมเลกุลขนาดใหญ่ที่รวมกันอยู่โดยค่าพีเอชและความแรงของไอออน (ionic strength) จะมีอิทธิพลต่อแบคเทอริโอซินเหล่านี้ (Tagg และคณะ, 1976)

ความคงตัวของสารแบคเทอริโอซินจะลดลงอย่างมาก เมื่อสารแบคเทอริโอซินถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นและพบว่าการเติม bovine serum albumin จะช่วยป้องกันสารแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากการถูกยับยั้งการทำงาน (inactivation) ตัวอย่างสารแบคเทอริโอซิน เช่น staphylococcin 1580 และสารปฏิชีวนะที่เกิดจาก *Staphylococcus aureus* จะมีความไวสูงต่อการเสียสภาพทางกล (mechanical denaturation) (Tagg และคณะ, 1976)

ความคงตัวของสารแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมาก โดยความไวของสารแบคเทอริโอซินต่อการถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชสารแบคเทอริโอซินและ bacteriocin-like substrate ส่วนใหญ่สามารถทนกรดได้สูงกว่าด่าง ซึ่งหลักเกณฑ์ของความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารแบคเทอริโอซินสามารถอธิบายได้ยากเนื่องจากขึ้นอยู่กับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และปัจจัยอื่นๆ เช่น พีเอช ความแรงของไอออนและการมีโมเลกุลที่ช่วยปกป้องแบคเทอริโอซินจากการเสียสภาพอยู่ด้วย (protective molecules) (Tagg และคณะ, 1976)

การจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซิน (Classification of bacteriocins)

โดยทั่วไปแบคเทอริโอซินสามารถแบ่งได้เป็น 3-4 กลุ่ม ไนซิน (nisin) ค้นพบในปี ค.ศ. 1928 และซับทิลิน (subtilin) พบในปี ค.ศ. 1948 เป็นสารที่คล้ายไนซินต่างกันโดย 12 กรดอะมิโน ทั้งคู่จัดอยู่ใน Class I เรียกว่าเป็นแลนติไบโอติก (lantibiotics) การจำแนกแบคเทอริโอซินในปัจจุบันมีการปรับปรุง แสดงให้เห็นความเหมือนและความต่างซึ่งสังเกตได้ในโมเลกุลที่ค้นพบใหม่ Class I แบ่งย่อย เป็น Class Ia และ Class Ib โดยทั่วไปเปปไทด์ของ Class I มีกรดอะมิโน 19 ชนิดถึงมากกว่า 50 ชนิด แบคเทอริโอซิน Class I ถูกจัดจำแนกโดยอาศัยกรดอะมิโนที่ต่างออกไป (unusual amino acid) ตัวอย่างเช่น lanthioninie, methyl-lanthionine, dehydrobuthyrin Class Ia จะรวมถึงไนซินด้วย ประกอบด้วย cationic และ hydrophobic peptides ซึ่งทำให้เกิดลักษณะเป็นรูใน target membrane และมีโครงสร้างที่ยืดหยุ่นได้เมื่อเปรียบเทียบกับโครงร่างแข็งของ Class Ib bacteriocins ซึ่งเป็นเปปไทด์รูปกลม (globular peptides) (Cleveland และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Class II ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่คงตัวต่อความร้อนและสามารถแบ่งย่อยได้เป็น Class IIa รวมถึงเปปไทด์ที่คล้าย pediocin ที่แสดงฤทธิ์กับเชื้อ *Listeria* ที่มีลำดับของกรดอะมิโนด้าน N-terminal ต่อกับ Tyr-Gly-Asn-Gly-Val และต่อกับ 2 cyteimes ทำให้เกิด s-s brige ใน N-terminal ครึ่งหนึ่งของสายเปปไทด์แบคเทอริโอซิน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สายที่ต่างกัน ประกอบกันจัดเป็น Class IIb สายเปปไทด์ 2 สายของแบคเทอริโอซินจำเป็นทั้งคู่ในการเกิดกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ลำดับของกรดอะมิโนสายแรกของเปปไทด์นั้นแตกต่างกัน แม้ว่าแต่ละอันจะถูกก้ำกับไว้โดยยีนของตัวเองที่อยู่ใกล้เคียงกันแต่มีเพียงยีนเดียวซึ่งจำเป็นที่เป็นยีนภูมิคุ้มกัน แบคเทอริโอซิน Class IIc เริ่มแรกถูกเสนอขึ้นว่าถูกปล่อยโดย general sec-system และแบคเทอริโอซิน Class III เป็นแบคเทอริโอซินที่ไม่ทนความร้อน สำหรับแบคเทอริโอซิน Class III นี้ยังมีข้อมูลไม่มากนัก สำหรับแบคเทอริโอซิน Class ที่ 4 ได้ถูกเสนอว่าอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับสารโมเลกุลใหญ่อื่น ๆ (Cleveland และคณะ, 2001)

ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในอาหาร

ถึงแม้ว่าจากผลการทดลองในอาหารหลายได้แสดงให้เห็นว่า แบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายแต่ก็จะต้องทำการศึกษาในเชิงประยุกต์เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในอาหาร การใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซิน โดยเฉพาะไนซินในอาหาร ได้มีการรายงานไว้แล้วว่าองค์ประกอบทางเคมีอาหารและกระบวนการทางกายภาพมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ตัวอย่างเช่น ไนซินสามารถละลายได้ดีที่พีเอช 2 มากกว่าพีเอช 8 ถึง 228 เท่า (Cleveland และคณะ, 2001)

การนำแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ไปใช้ในอาหาร

-ระบบการถนอมอาหารชีวภาพ (Biopreservation Systems)

ได้มีรายงานถึงการประเมินประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินเกี่ยวกับความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย แม้ว่าประสิทธิภาพของการยับยั้ง จุลินทรีย์จะถูกพิสูจน์แล้วใน synthetic media แต่ก็ยังไม่เป็นที่แน่นอนว่าแบคเทอริโอซินจะให้ผลแบบเดียวกันในอาหาร ไนซิน (nisin) เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่รู้จักกันดีที่สุดและเป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้ในอาหาร ในสหรัฐอเมริกาได้มีการนำไนซินมาใช้ใน cheese spreads ที่ผ่านการพาสเจอไรส์เพื่อยับยั้งการเจริญของสปอร์ *Clostridium*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

*botulinum*และใช้ในชีสกันทั่วโลกในผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายรวมถึงนมพาสเจอไรซ์นมปรุงแต่งและนมที่มีอายุการเก็บยาวนาน รวมทั้งเนยแข็งที่ผ่านการบ่มและเนยแข็งที่ผ่านการแปรรูป ผักกระป๋องและซุปกระป๋อง เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการนำไนซินไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เป็นที่ต้องการในไวน์และเบียร์ แต่การนำไนซินไปใช้ประโยชน์ในอาหารบางครั้งก็ถูกจำกัด เพราะว่าไนซินมีความสามารถในการละลายต่ำ ราคาแพง และมีความผันแปรในแง่ของความไวต่อแบคทีเรียเป้าหมายและปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น พีเอช โซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิ มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของไนซิน (Muriana และ Luchansky, 1993) ตัวอย่างการใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารแสดงดังตารางที่ 1 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพยายามมุ่งไปสู่การผลิตแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ชนิดใหม่และจัดจำแนกแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับการประยุกต์ใช้ในอาหาร

การเติมแบคเทอริโอซินลงในอาหาร

การเติมแบคเทอริโอซินลงในอาหารสามารถทำได้โดยเติมในรูปของแบคเทอริโอซินที่เตรียมได้หรือโดยการเติมเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินภายสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน ในกรณีแรกจะต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินในถังหมักในระดับอุตสาหกรรมแล้วเก็บเกี่ยวแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้ ทำให้แบคเทอริโอซินเข้มข้นที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปัจจุบันมีแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวที่จดลิขสิทธิ์เป็นสารถนอมอาหาร โดยอาจเติมแบคเทอริโอซินลงในอาหารในรูปของ

1) raw concentrates ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินในสับสเตรทที่เป็นอาหาร (food-grade substrate) เช่น นมหรือ เวย์ ซึ่งจะทำให้ได้ food additives หรือ food ingredients ที่ใช้ได้อย่างปลอดภัยตามและถูกกฎหมาย องค์ประกอบของสารที่ผลิตได้อาจทำหน้าที่อื่นด้วยเช่น ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนหรือทำให้อาหารข้น และอาจมีสารเมแทบอไลซ์อื่นจากจุลินทรีย์เช่น กรดแลคติกซึ่งทำหน้าช่วยเสริมการยับยั้ง concentrates ที่มีจำหน่ายแล้วเช่น ALTA™ 2341 หรือ Microgard™ ซึ่งเป็น grade A skim milk ที่ผ่านการหมักโดย *Propionibacterium freudenreichii subsp. shermanii* แล้วผ่านการพาสเจอร์ไรส์ ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ได้ผ่านการยอมรับโดย FDA ให้ใช้ได้ในอาหาร เช่นใน cottage cheese และ fruit-flavoured yogurt (Salih และคณะ, 1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) immobilized preparations แบคเทอริโอซินที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนหรือ concentrated cultured broth จะถูกจับไว้โดยตัวพา (carrier) ตัวพานี้จะทำหน้าที่เป็นแหล่งหรือตัวกระจายโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่ถูกทำให้เข้มข้นในอาหารเพื่อการกระจายตัวอย่างทั่วถึง ตัวพานี้อาจช่วยยืดการแยด เทอริโอซินจากการถูกทำให้เสียสภาพโดยองค์ประกอบในอาหารและเอนไซม์ จากการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกับในอาหารนัก พบว่า แบคเทอริโอซินในอาหารมีประสิทธิภาพต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาก บางครั้งจะต้องเติมแบคเทอริโอซินในระดับความเข้มข้นสูงกว่าอย่างน้อย 10 เท่าเพื่อให้ได้ผลการยับยั้งเท่ากัน

ถึงแม้ว่าจะมีการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในอาหารหลายชนิดแต่ก็ไม่ควรถนอมอาหารไว้ด้วยแยด เทอริโอซินอย่างเดียวเท่านั้น ควรใช้แบคเทอริโอซินควบคู่ไปกับการควบคุมสภาวะต่างๆ แม้ว่าแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับอาหาร แต่ก็อาจไม่มีประสิทธิภาพในอาหารทุกชนิดอย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินหลายชนิดมีศักยภาพโดยสามารถนำมาใช้ได้ในอาหาร เมื่อมีการควบคุมภายใต้สภาวะต่าง ๆ อย่างเหมาะสมตัวอย่างสำคัญที่สนใจคือการใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์เนื้อปกติใช้ไนเตรตในการป้องกันการเจริญของ *Clostridium* ในเนื้อสัตว์แต่มีข้อจำกัดด้านความปลอดภัยในแง่ของการมีไนไตรต์จึงทำให้อุตสาหกรรมอาหารพยายามที่จะหาวิธีอื่นมาทดแทน เช่น การนำไนซินมาใช้ หรือใช้ไนซินร่วมกับไนเตรตที่ระดับความเข้มข้นต่ำลง สามารถป้องกันการเจริญของ *Clostridium* ได้ (Cleveland และคณะ, 2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัตถุดิบ

เนื้อหมูสด หนังหมู เกลือ กระเทียม

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ได้แก่ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ *Lactobacillus plantarum* LS0602 แยกได้จากแหนม และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกอีสาน (Charoenrak และ Nanasombat, 2011)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS, พีเอช 7.2 ± 0.2, Difco) Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE soft Agar, 7.1 ± 0.2), Tryptic Soy Broth/Agar (TSB/TSA พีเอช 7.1 ± 0.2, Difco), Nutrient Agar (NA), PALCAM Listeria Selective Agar (PALCAM พีเอช 7.2 ± 0.2, Difco) พี่เติม selective agents

3.1.4 สารเคมีและชุดทดสอบ

สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่างได้แก่ สารละลายเปปโทนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต กรดไตรคลอโรแอซิติก

เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เอนไซม์คะตะเลส (catalase, จาก bovine liver, Fluka) เอนไซม์α-chymotrypsin (จาก bovine pancreas, Merck) เอนไซม์ trypsin (จาก porcine pancreas, Fluka) เอนไซม์ pepsin (จาก porcine gastric mucosa, Fluka) เอนไซม์ α-amylase (จาก *Aspergillus oryzae*, Fluka) เอนไซม์ papain (จาก carica papaya, Merck)

ชุดทดสอบที่ใช้ได้แก่ชุด Quick start Bradford (Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารแบคเทอริโอซินตามวิธีการของ Bradford

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เครื่องตีปั่นอาหาร (stomacher masticator, บริษัท IUL instrument ประเทศอังกฤษ) เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (AquaLAB, รุ่น Series 3 TE ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องวัดพีเอช (pH meter, รุ่น 510 บริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์) เครื่องวัดทีเอชสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (รุ่นTesto 205 ประเทศเยอรมนี) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV 1601 บริษัท Shimadzu ประเทศออสเตรเลีย) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (รุ่น SS-325 บริษัท Tommy ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น Z383K บริษัท Hamle ประเทศเยอรมนี) ตู้อ่านเชื้อ (รุ่น ABS 1200 บริษัท Astec Microflow ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องนับจำนวนโคโลนี (บริษัท Reichert ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate reader/Washer, รุ่น iEM Reader MF บริษัท Labsystems ประเทศสหรัฐอเมริกา) ถุงไดอะไลซิสเมอร์ 6 ซึ่งมี MWCO ขนาด 1000 ดาลตัน (Spectrapor, บริษัท Spectrum ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ บีกเกอร์ หลอดทดลอง กระบอกตวงและอุปกรณ์ที่จำเป็นเช่น ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อใช้สำหรับตีปั่น ลูปเขี่ยเชื้อ จานเพาะเชื้อ ปิเปต ลูกยาง

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดลองนี้ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้ออาหารหมักซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ จำนวน 2 ชนิดได้แก่ *Lactobacillus plantarum* LS0602 ซึ่งแยกได้จากแหนม และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกอีสาน (Charoenrak และ Nanasombat, 2011) นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินตลอดจนศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของแบคเทอริโอซิน และความคงทนของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ รวมทั้งทดลองนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคชนิดที่แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งได้ตามการทดลองในขั้นตอนต่อไปนี้ดังนี้

3.2.1.1 การเตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

วิธีการทดสอบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Cuozzo และคณะ (2001) ; Schillinger และ Locke. (1989) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จนส่วนใสมีพีเอชเท่ากับ 6.5 และนำไปกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วเติม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้เพื่อการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์คะตะเลส (จากbovine liver บริษัท Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.2 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยการใช้สารแบคเทอริโอซิน

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion (Cuozzo และคณะ. 2001; Schillinger และ Lücke. 1989) โดยเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง เพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบและปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหาร TSYE Soft Agar ซึ่งมี agar ร้อยละ 0.7 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วเทเชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหารแข็ง TSYE ซึ่งมี agar ร้อยละ 1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลง ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง แล้วเจาะให้ได้หลุมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำส่วนใสที่เตรียมไว้มาจากข้อ 3.2.1.1 มาทำการเจือจาง โดยทำการเจือจางแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilutions) จนได้หลาย ๆ ระดับความเจือจาง ก่อนหยดตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจางลงหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตรหลุมละ 40 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่ออีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งการเจริญ โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดรอบ ๆ หลุม

3.2.1.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ก) การหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ทำการศึกษาเพื่อหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมส่งผลให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดซึ่งทำตามวิธีการของ Altuntas และคณะ (2010) โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37, 39 และ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.1.1) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion ตามวิธีการข้อ 3.2.1.2 โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซินตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข) การหาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ทำการศึกษาเพื่อหาระดับพีเอชที่เหมาะสมส่งผลให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดซึ่งทำตามวิธีการของ Almutas และคณะ (2010) โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มีพีเอช 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับจากจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.1.1) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 3.2.1.2 โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซินตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

ค) การศึกษาผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ทำการเปรียบเทียบผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งให้กิจกรรมของสาร แบคเทอริโอซินสูงสุดตามวิธีการ Todorov และคณะ (2011) ทำได้ดังนี้ โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 60 มิลลิลิตรที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหารต่าง ๆ กัน จำนวน 31 สูตร ได้แก่ สูตรที่1) อาหารเหลว MRS สูตรปกติตามสูตรของ Difco ซึ่งประกอบด้วย Proteose peptone no 3 ปริมาณ 10 กรัม beef extract 10 กรัม yeast extract 5 กรัม glucose 20 กรัม sodium acetate 5 กรัม Tween 80 ปริมาณ 1 กรัม Dipotassium hydrogen phosphate 2 กรัม Ammonium citrate 2 กรัม Magnesium sulfate 0.1 กรัม Manganese sulfate 0.05 กรัม (ชุดควบคุม) สูตรที่2-6) อาหาร MRS ปกติที่เติมฟรุคโตส แมนโนส แลกโตส มอลโตส และซูโครส จำนวน 20 กรัมแทนน้ำตาลกลูโคสตามลำดับ สูตรที่7-9) อาหาร MRS ปกติที่เติมกลูโคสเพิ่มเป็น 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่10-11) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 ตามลำดับ สูตรที่12-13) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมยีสต์สกัดเพิ่มเป็น 10 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่14) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 12.5 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 7.5 กรัมต่อลิตร สูตรที่15) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 20 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 10 กรัมต่อลิตร สูตรที่16) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 10 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 20 กรัมต่อลิตร สูตรที่17-19) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเพิ่มเป็น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่20-23) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 , 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทนไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต สูตรที่24) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตรแทนสูตรปกติที่ไม่เติมวิตามินบี 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูตรที่25) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมวิตามินบี 12 ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตรแทนสูตรปกติที่ไม่เติมวิตามินบี 12 สูตรที่26-28) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มเป็น 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่29-31) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมแมงกานีสซัลเฟต 2 , 5 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.1.1) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion ตามข้อ 3.2.1.2 โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซินตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

3.2.1.4 การศึกษาการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ การหาระดับอุณหภูมิ ระดับพีเอช และส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดและนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งทำการทดลองโดยทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดในอาหารเหลว MRS ที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสมปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและทำการทดลองในขั้นต่อไปจนกระทั่งได้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.1 จากนั้นทำให้สารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ได้แก่ การนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำส่วนใสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาทำไดอะไลซิส ตลอดจนนำส่วนใสที่ผ่านการไดอะไลซิสมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกและทำการตรวจหากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยใช้สารที่ทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนได้แก่ 1) ส่วนใสก่อนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 2) สารตัวอย่างที่ได้จากการตกตะกอนส่วนใสหลังนำมาทำไดอะไลซิส 3) สารตัวอย่างที่ได้จากการตกตะกอนส่วนใสผ่านการทำไดอะไลซิสแล้วตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก เพื่อหาวิธีการทำให้สารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ที่จะให้กิจกรรมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด ตามวิธีการต่อไปนี้

ก) การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตทำตามวิธีที่ได้ดัดแปลงมาจาก Ogunbanwo และคณะ. (2003) และ Doonan.(2004) โดยทำการแบ่งส่วนใสที่ปราศจากเซลล์(bacteriocin-containing supernatant) ซึ่งผ่านการปรับพีเอชและเติมคะตะเลสแล้วออกเป็น 3 ส่วนดังนี้ ส่วนใสส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปทดสอบตามการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.5.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ตามวิธีการในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 นำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซัลเฟตร้อยละ 60 (ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 36.1 กรัม) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยค่อย ๆ ละลายแอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยและคนช้า ๆ เพื่อป้องกันการเกิดฟอง (ทิ้งไว้นานพอสมควรเพื่อให้แน่ใจว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงไปนั้นละลายแล้วก่อนเติมเข้าไปอีก) จากนั้นให้ทิ้งไว้นาน 10 นาทีเพื่อให้แน่ใจว่าเกิดตะกอนของโปรตีนอย่างสมบูรณ์ และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำตะกอนโปรตีนให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยโดยนำไปละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วแบ่งสารละลายโปรตีนเป็น 3 ส่วนดังนี้ สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตรให้ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.1.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาตรโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 นำไปทำไดอะไลซิสในขั้นตอนต่อไป

ข) การทำไดอะไลซีส (Dialysis)

เมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนของส่วนใสโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีการข้างต้นแล้ว นำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยการใช้วิธีการทำไดอะไลซีส (Doonan. 2004) โดยใช้ถุงไดอะไลซีสเบอร์ 6 ซึ่งมี MWCO ขนาด 1000 ดาลตัน (Spectrapor, บริษัท Spectrum ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตัดถุงไดอะไลซิสตามความยาวที่ต้องการ (สารละลายโปรตีน 4.6 มิลลิลิตรต่อถุงไดอะไลซิส ความยาว 1 เซนติเมตร) โดยให้มีความยาวเพิ่มขึ้นอีกเพื่อให้มีช่องว่าง (head space) เหนือสารละลายโปรตีนเล็กน้อย (เพิ่มพื้นที่ว่างอีกประมาณร้อยละ 10 ของปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด) จากนั้นแช่แผ่นเยื่อในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อล้างสารกันเสียเช่น กลีเซอรินหรือโซเดียมแอไซด์ (sodium azide) จากนั้นล้างแผ่นเยื่อนี้อีกครั้งด้วยน้ำกลั่น เปิดที่หนีบถุงไดอะไลซิสซึ่งเป็นตัวล็อกออกแล้วสอดถุงไดอะไลซิสเข้าไปในตัวหนีบที่เปิดไว้ และกดตัวหนีบเข้าด้วยกันยึดถุงไดอะไลซิสไว้โดยให้ปลายถุงยื่นออกมาจากตัวหนีบ 3-5 เซนติเมตร ทดสอบด้วยการเติมน้ำกลั่นลงไปในถุงเพื่อให้มั่นใจว่าตัวหนีบปิดสนิทดีแล้วก่อนเติมสารละลายโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว ปรับความยาวของถุงเพื่อให้มีที่ว่างเหนือสารละลายโปรตีนตามต้องการแล้วใช้ตัวหนีบปิดด้านปลายของถุงไดอะไลซิส นำไปวางลงในบีกเกอร์หรือภาชนะที่มีฝาปิดที่มีฟอสเฟสบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 เท่าของปริมาตรสารละลายโปรตีน (หากตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรต้องใช้บัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร) นำแท่งแม่เหล็กที่สะอาดใส่ลงในบีกเกอร์หรือภาชนะสำหรับทำไดอะไลซิสที่ตั้งบนเครื่องกวน (stirrer) ควรแน่ใจว่าแท่งแม่เหล็กโหญ่พอที่จะกวนสารละลายทั้งหมดได้แต่ไม่ควรจะใหญ่เกินไปจนหมุนอย่างอิสระไม่ได้ ก่อนปรับความเร็วของเครื่องกวนให้สูงพอที่จะไม่ทำให้เกิดการดึงถุงลงไปด้านล่าง โดยทำไดอะไลซิสที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 12 ให้เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทำไดอะไลซิส (บัฟเฟอร์) เป็นสารละลายใหม่ (fresh dialysis solution) ได้ (ในกรณีที่มีการปนเปื้อนมาก อาจทำไดอะไลซิสเป็นเวลานานและเปลี่ยนบัฟเฟอร์บ่อย ๆ ซึ่งควรให้มีการเกิดไดอะไลซิส อย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 2-4 ชั่วโมง

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ในการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากที่เปลี่ยนบัฟเฟอร์ครั้งสุดท้าย) สารละลายโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์หรือเข้มข้นขึ้นที่ได้จากการทำไดอะไลซิสจะถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังนี้สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.1.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาตรโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 นำไปตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกในขั้นตอนต่อไป

ค) การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Tricloroacetic acid)

การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกตามวิธีของ Ogunbanwo และ คณะ (2003) โดยนำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการทำไดอะไลซีสแล้วมาตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (สารละลายโปรตีน 100 มิลลิลิตรต่อไตรคลอโรแอซิติก 5 กรัม) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนมาทำสารแขวนลอยตะกอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารแขวนลอยโปรตีนออกเป็น 2 ส่วนดังนี้สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.1.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาตรโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ในภาคผนวก ข

3.2.1.5 การศึกษาอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารแบคเทอริโอซิน

จากการทดสอบการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ข้างต้นแล้วจึงเลือกขั้นตอนซึ่งให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุดเพื่อนำมาทดสอบความคงตัวต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ดังต่อไปนี้

ก) ความคงตัวของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิ

การทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซินดัดแปลงจาก Ogunbanwo และคณะ (2003) และ Castro และคณะ (2011) นำสารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 6.5 (เพื่อกำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรด) จากนั้นกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (เพื่อกำจัดจุลินทรีย์) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37, 63, 72 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100 และ 121 เป็นเวลา 15 นาที (ทั้งหมด 8 ชุดการทดลอง) ในอ่างน้ำร้อน (water bath) และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.1.2

ข) การทดสอบผลของพีเอชที่มีต่อสารแบคเทอริโอซิน

การทดสอบผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซินดัดแปลงจาก Ogunbanwo และคณะ (2003) และ Castro และคณะ (2011) นำสารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปรับพีเอชเป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ด้วยสารละลายกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไฮโดรคลอริก หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.1.2

ค) การทดสอบผลของเอนไซม์ที่มีต่อสารแบคเทอริโอซิน

การทดสอบผลของเอนไซม์ที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซิน ดัดแปลงจาก Lee และคณะ (1999) นำสารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ trypsin (จาก porcine pancreas บริษัท Fluka), pepsin (จาก porcine gastric mucosa บริษัท Fluka), α-amylase (จาก *Aspergillus oryzae* บริษัท Fluka), lipase (จาก porcine pancreas บริษัท Fluka) และ เอนไซม์ papain (จาก carica papaya บริษัท Merck) ที่ละลายในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเอนไซม์ pepsin ให้ละลายในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล และให้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ยกเว้น trypsin, α-amylase บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.1.2

3.2.2 การทดลองนำสารแบคเทอริโอซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว

การทดลองนี้ได้เปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการที่เหมาะสม (2 ระดับความเข้มข้นคือ ร้อยละ 16.7 และ ร้อยละ 23.1) ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหารเหลวโดยทำการทดลองตามวิธีของ Pinto และคณะ (2009) ดังนี้ ทำการเติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้นระดับหนึ่ง (ร้อยละ 16.7 และ ร้อยละ 23.1) ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเจริญอยู่ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบ 4 ชั่วโมง (การเจริญแบบโลของเซลล์อยู่ในระยะ exponential phase ช่วงต้น) นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสุ่มตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในระหว่างการบ่มทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อโดยใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

3.2.3.1 การศึกษาผลของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็น

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 2 และร้อยละ 4) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในหมูบดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อการอยู่รอดหรือการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งทำการทดลองตามวิธีการดังนี้

ก) การเตรียมแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

นำ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มาผลิตแบคเทอริโอซิน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมได้แก่ อุณหภูมิของการบ่ม ค่าพีเอชและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด (ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2.1.3 ค) จากนั้นนำแบคเทอริโอซินมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการที่เหมาะสมซึ่งจะทำให้กิจกรรมการยับยั้งสูงสุด (ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2.1.4) ก่อนนำมาเติมในหมูบด

ข) การเตรียมเชื้อ *L. monocytogenes*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเหลว TSB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งไปและทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมให้เข้ากันและปรับความขุ่นของเซลล์แต่ละสายพันธุ์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 1 เพื่อให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^9 CFUต่อมิลลิลิตร

ค) การใช้แบคเทอริโอซินในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในหมูบดแช่เย็น

ทำการเตรียมหมูบดซึ่งประกอบด้วยเนื้อหมูบดร้อยละ 80 และมันหมูร้อยละ 20 ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ นำเนื้อหมูและมันหมูมาล้างให้สะอาดก่อนจึงนำมาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (KitchenAid model 5k5SS) ที่อัตราความเร็ว 2 เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นแบ่งส่วนผสมทั้งหมดออกเป็น 6 ส่วนเพื่อนำมาเติมแบคเทอริโอซินทั้งหมด 6 ทรีตเมนต์ ดังนี้ ส่วนที่ 1) หมูชุดควบคุม (ไม่เติมแบคเทอริโอซิน) ส่วนที่ 2) หมูบดที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคเทอริโอซิน) ส่วนที่ 3) หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร้อยละ 2 ส่วนที่ 4) หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิต

เอกสารนี้เป็น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร้อยละ 4 ส่วนที่ 5) หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร้อยละ 2 ส่วนที่ 6) หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร้อยละ 4 หลังจากเติมแบคเทอริโอซินและผสมให้เข้ากันดีแล้ว ใส่ลงในถุงปลอดเชื้อก่อนเติมสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่ได้เตรียมไว้แล้วข้างต้นซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10^9 CFUต่อมิลลิลิตรลงในหมูบด (ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหมูบด 25 กรัม) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^5 CFUต่อกรัม นำเนื้อหมูบดทั้งหมดไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 7 และ 10 วันของการเก็บรักษา เพื่อนำมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมด และทำการวัดค่าพีเอช

ง) การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดทำตามวิธีการของ Maturin และ Peeler. 2001 และจำนวน *L. monocytogenes* ทั้งหมดทำตามวิธีการของ Hitchins และ Jinneman. 2011 โดยนำตัวอย่างหมูบด จำนวน 25 กรัม ใส่ถุงตีปั่นที่ปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นอาหารเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางให้ได้ระดับที่เหมาะสม ในการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดให้ทำการเจือจางถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-5} และจำนวน *L. monocytogenes* ทั้งหมด ทำการเจือจางถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-4} โดยใช้เทคนิค spread plate ซึ่งปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับสุดท้าย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในแต่ละระดับความเจือจางลงบนอาหารแข็ง PCA สำหรับการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และอาหาร selective media (PALCAM ที่เติม antimicrobic supplement) สำหรับเชื้อ *L. monocytogenes* แล้วใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับอาหารแข็ง PCA ส่วนจานอาหาร selective media นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ *L. monocytogenes* ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมตัวอย่างของหมูบด)

จ) การวัดค่าพีเอช

การวัดหาค่าพีเอชของเนื้อหมูบดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชในอาหาร (Testo 205)

ฉ) การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี analysis variance (ANOVA) และ Duncan 's multiple range test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.1.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ก) ผลการศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน

จากการทดสอบหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลต คือ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT 0904 ที่ระดับอุณหภูมิต่างกัน 6 ระดับ คือ 25, 30, 35, 37, 39 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิทั้ง 6 ระดับนั้นเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งสูงที่สุด คือ 21.0 และ 18.0 มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* คือ 34 องศาเซลเซียส

จากการทดลองนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 คือ 37 องศาเซลเซียสซึ่งที่ระดับอุณหภูมินี้ให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Karthikeyan และ Santosh (2009) ที่พบว่าเชื้อ *L. plantarum* มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (12,800 AUต่อมิลลิลิตร) Altuntas และคณะ (2010) รายงานว่า *Pediococcus acidilactici* 13 มีกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินมากที่สุดถึง 204,800 AUต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งต่างจาก Drosinos และคณะ (2006) ที่พบว่าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* E131 ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ข) ผลการศึกษาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน

สำหรับทดสอบหาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีระดับพีเอชต่างกัน 5 ระดับ คือ พีเอช 4-8 พบว่าที่เชื้อ *L. plantarum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีระดับพีเอช 4-8 พบว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งพบว่าเชื้อ เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งสูงที่สุด คือ 10.50 และ 12.0 มิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่มีพีเอช 6 และ พีเอช 7 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6-7 เช่นเดียวกับการรายงานโดยนักวิจัยท่านอื่นซึ่งได้พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* สายพันธุ์ ST23LD มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นคือ 6.5 ขณะที่ *L. plantarum* สายพันธุ์ ST341LD มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นคือ 6.0 (Todorov และ Dicks. 2006) อย่างไรก็ตาม Mataragas และคณะ. 2003 ได้รายงานว่าเชื้อ *L.curvatus* L442 และ *Leuconostoc mesenteroides* L124 มีกิจกรรมได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีพีเอช 5.5 ทั้งนี้ De Vuyst และคณะ (1996) และ Mataragas และคณะ (2003) ได้กล่าวว่าการผลิตแบคเทอริโอซินถูกส่งเสริมในสภาวะแวดล้อมระดับที่ต่ำกว่าสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินเกิดขึ้นได้ดีขณะที่มีอัตราการเจริญต่อนข้างต่ำ อัตราการเจริญที่สูงขึ้นไม่ได้มีผลทำให้การผลิตแบคเทอริโอซินเกิดได้ดีขึ้นเสมอไป แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานว่าการผลิตแบคเทอริโอซินเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิใกล้เคียงกันกับอุณภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Daba และคณะ. 1993)

ตารางที่ 4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*

อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ (องศาเซลเซียส)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AUต่อมิลลิลิตร)	
	Lactobacillus plantarum LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
25	13.0 (12,800)	11.0 (12,800)
30	15.0 (12,800)	15.0 (12,800)
35	19.0 (12,800)	16.0 (12,800)
37	21.0 (12,800)	18.0 (12,800)
39	18.25 (12,800)	15.0 (12,800)
42	10.83 (12,800)	12.0 (12,800)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 พีเอชที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AUต่อมิลลิลิตร)	
	Lactobacillus plantarum LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
4	8.67 (12,800)	6.0 (12,800)
5	9.0 (12,800)	8.0 (12,800)
6	10.50 (12,800)	9.0 (12,800)
7	9.50 (12,800)	12.0 (12,800)
8	9.0 (12,800)	8.50 (12,800)

ค) ผลการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน

จากการทดลองหาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้คือ เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในอาหารเหลว MRS (Difco) ชุดควบคุมเปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS ที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบในอาหารเหลว MRS เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ตลอดจนสารที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ พบว่าเมื่อพิจารณาผลการเติมสารประกอบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าการมีกลูโคส จำนวน 20 กรัมต่อลิตรใน MRS ชุดควบคุม มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 12,800 AUต่อมิลลิลิตร (ตามตารางที่ 4.9) แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้ต่างไปจากชุดควบคุมพบว่า การเติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส มอลโตส และซูโครส มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงกว่าสูตรควบคุม และเมื่อเติมกลูโคส จำนวน 30 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อดังกล่าวมีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดถึง 102,400 AUต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ได้ผลแตกต่างกันคือ เมื่อเติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส และมอลโตส จำนวน 20 กรัมต่อลิตร พบว่ามีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับสูตรควบคุมซึ่งเติมกลูโคส จำนวน 20 กรัมต่อลิตร แต่ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงถึง 25,600 AUต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมน้ำตาลซูโครส และเมื่อเติมกลูโคส จำนวน 40 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อมีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงที่สุดถึง 102,400 AUต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาแหล่งไนโตรเจนของส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมทริปโตน จำนวน 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทนโปรตีโอสเปปโตน เบอร์3 สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ทำให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงกว่าสูตรควบคุม โดยปริมาณทริปโตน จำนวน 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สูงที่สุด (51,200 AUต่อมิลลิลิตร) แต่การเพิ่มปริมาณยีสต์สกัด จำนวน 10 และ 20 กรัมต่อลิตร (จากเดิม 5 กรัมต่อลิตร) ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น สำหรับการเติมทริปโตนร่วมกับยีสต์สกัดไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามก็ไม่มีผลในการทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเช่นเดียวกับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เติมทริปโตนแทนโปรติโอสเปปโตน เบอร์3 พบว่า การเติมทริปโตน จำนวน 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงกว่าการเติมทริปโตน 20 กรัมต่อลิตร แต่การเติมยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 25,600 AUต่อมิลลิลิตร ส่วนการเติมทริปโตนร่วมกับยีสต์สกัดไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเช่นเดียวกัน และเมื่อพิจารณาการเติมสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อเช่น การเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมากถึง จำนวน 5 กรัมต่อลิตรแทนไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงที่สุดคือ 25,600 AUต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่างกับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ที่การเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 20 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงที่สุดคือ 25,600 AUต่อมิลลิลิตร สำหรับการเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตรเพิ่มในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *L. brevis* LT 0904 พบว่ามีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงที่สุด 51,200 AUต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสูตรควบคุมที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จะเห็นได้ว่าการเพิ่มโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟสที่ระดับสูงกว่า 2 กรัมต่อลิตรไม่มีผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาสูตรอาหารเหลว MRS ที่เติมวิตามินบี 1 และวิตามินบี 12 เทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมวิตามินดังกล่าว พบว่าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับสูตรควบคุมที่ไม่ได้เติมวิตามินคือ 12,800 AUต่อมิลลิลิตร รวมทั้งการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าในอาหารชุดควบคุมที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต จำนวน 0.1 กรัมต่อลิตร และแมงกานีสซัลเฟต จำนวน 0.05 กรัมต่อลิตร ก็ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 เพื่อให้มีการสร้างแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดคือ อาหารเหลว MRS ปกติที่เติมกลูโคสจำนวน 30 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 5 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ควรเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปกติที่เติมกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด ตามตารางที่ 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

ลำดับที่ของสูตรอาหาร	ชนิดและปริมาณของส่วนประกอบอาหาร (กรัมต่อลิตร)		กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/มิลลิลิตร)	
	ส่วนประกอบที่เติมเพิ่ม[a]	ทดแทนส่วนประกอบในอาหาร MRS สูตรควบคุม	*Lactobacillus plantarum* LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
1	ชุดควบคุม (MRS, Difco)[b]	-	12,800	12,800
2	Fructose (20)	Glucose (20)	25,600	12,800
3	Mannose (20)	Glucose (20)	51,200	12,800
4	Lactose (20)	Glucose (20)	25,600	12,800
5	Maltose (20)	Glucose (20)	51,200	12,800
6	Sucrose (20)	Glucose (20)	25,600	25,600
7	Glucose (30)	Glucose (20)	102,400	51,200
8	Glucose (40)	Glucose (20)	51,200	102,400
9	Glucose (50)	Glucose (20)	25,600	25,600
10	Tryotone (10)	Proteose peptone (10)	51,200	25,600
11	Tryotone (20)	Proteose peptone (10)	25,600	12,800
12	Yeast extract (10)	Yeast extract (5)	12,800	12,800
13	Yeast extract (20)	Yeast extract (5)	12,800	25,600
14	Tryotone (12.5)+Yeast extract (7.5)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
15	Tryotone (20)+Yeast extract (10)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
16	Tryotone (10)+Yeast extract (20)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
17	K_2HPO_4 (5)	K_2HPO_4 (2)	25,600	12,800
18	K_2HPO_4 (10)	K_2HPO_4 (2)	12,800	12,800
19	K_2HPO_4 (20)	K_2HPO_4 (2)	12,800	25,600
20	KH_2PO_4 (2)	K_2HPO_4 (2)	6,400	51,200
21	KH_2PO_4 (5)	K_2HPO_4 (2)	12,800	6,400
22	KH_2PO_4 (10)	K_2HPO_4 (2)	12,800	12,800
23	KH_2PO_4 (20)	K_2HPO_4 (2)	12,800	12,800
24	วิตามินบี1 (0.001)	0	12,800	12,800
25	วิตามินบี12 (0.001)	0	12,800	12,800
26	$MgSO_4$ (2)	$MgSO_4$ (0.1)	12,800	12,800
27	$MgSO_4$ (5)	$MgSO_4$ (0.1)	12,800	12,800
28	$MgSO_4$ (10)	$MgSO_4$ (0.1)	12,800	12,800
29	$MnSO_4$ (2)	$MnSO_4$ (0.05)	12,800	12,800
30	$MnSO_4$ (5)	$MnSO_4$ (0.05)	12,800	6,400
31	$MnSO_4$ (10)	$MnSO_4$ (0.05)	12,800	6,400

[a] ส่วนประกอบที่เติมเพิ่มทดแทนส่วนประกอบบางอย่างในสูตรอาหาร MRS

[b] อาหาร MRS ประกอบด้วย Proteose peptone no 3 จำนวน 10 กรัมต่อลิตร Beef extract จำนวน 10 กรัมต่อลิตร Yeast extract จำนวน 5 กรัมต่อลิตร Dextrose จำนวน 20 กรัมต่อลิตร Sodium acetate จำนวน 5 กรัมต่อลิตร Tween 80 จำนวน 1 กรัมต่อลิตร Dipotassium hydrogen phosphate จำนวน 2 กรัมต่อลิตร Ammonium citrate จำนวน 2 กรัมต่อลิตร Magnesium sulfate จำนวน 0.1 กรัมต่อลิตร Manganese sulfate จำนวน 0.05 กรัมต่อลิตร Agar จำนวน 10 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่พบว่าการเติมปริมาณกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นในอาหารเหลว MRS ส่งผลให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากปริมาณกลูโคสที่สูงขึ้นส่งผลต่อสภาวะเครียด (เกิดจากความดันออสโมติกที่เพิ่มสูงขึ้น) De Vuyst และVandamme (1994) สอดคล้องกับการทดลองของ Todorov และคณะ (2006) ที่พบกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 102,400 AUต่อมิลลิลิตร ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST16Pa เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติมกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ส่วนการทดลองของ Enan และคณะ (1996) กล่าวว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินชนิด plantaricin UG1 ได้ดี นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนอย่างอื่นก็สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีเช่นกัน โดยการศึกษาของ Cheigh และคณะ (2002) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสและไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่าเชื้อผลิตแบคเทอริโอซินที่ให้กิจกรรมการยับยั้งได้ดี แต่ถ้าใช้แลคโตสจะพบว่ามีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงกว่า และParente และRicciardi (1994) กล่าวว่าซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลูโคสสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินอย่าง enterocin 1146 นอกจากนี้แหล่งไนโตรเจนก็ช่วยส่งเสริมในการผลิตแบคเทอริโอซินด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Kim และคณะ (1997) โดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นทริปโตนหรือยีสต์สกัดก็ส่งเสริมให้เชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ขณะที่ Todorov และ Dicks (2006) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST341LD ในอาหารเหลว MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นทริปโตน 12.5กรัมต่อลิตร ร่วมกับยีสต์สกัด 7.5 กรัมต่อลิตร และเป็นทริปโตน 12.5กรัมต่อลิตร ร่วมกับมีทสกัด 7.5 กรัมต่อลิตร พบว่าได้แบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมสูงกว่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ใช้เปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MRS สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ และการเติมสารอนินทรีย์อย่างหมู่ฟอสเฟตอย่างเช่น ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟส หรือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟส ก็มีส่วนช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างแบคเทอริโอซิน แต่อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และชนิดของเชื้อเช่นการทดลองของ Matsusaki และคณะ (1996) ซึ่งเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ทำให้แบคเทอริโอซินมีกิจกรรมสูงแต่ก็ไม่ใช่เชื้อทุกสายพันธุ์

4.1.2 การศึกษาการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาการนำแบคเทอริโอซินมาทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนดังนี้คือ การนำส่วนใสซึ่งปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) มาผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำตะกอนที่ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการทำไดอะไลซิส และนำมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก พบว่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในขั้นตอนสุดท้ายคือ การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2) โดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร และ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) สอดคล้องกับค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ที่เพิ่มสูงขึ้นจาก 80.3 AUต่อไมโครกรัมของโปรตีนเป็น 1,853.4 AUต่อไมโครกรัมของโปรตีนเป็นสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 โปรตีนในแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน Fraction 2 และเพิ่มเป็น 1,163.6 AUต่อไมโครกรัมของโปรตีนในส่วน Fraction 2 ของเชื้อ *L. brevis* LT 0904 และให้ปริมาณการได้กลับคืน (Recovery) เท่ากับ ร้อยละ 34.7 และ ร้อยละ 29.3 ของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ตามลำดับ เมื่อกล่าวถึงปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (purification factor) แล้วจะเท่ากับ 2.9 สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และเท่ากับ 3.4 สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904

การทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์มีหลายขั้นตอนและจากการทดลองพบว่าการตกตะกอนด้วยไตรคลอโรแอซิติก ส่งผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดสอดคล้องกับการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* F1 และ *Lactobacillus brevis* OG1 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก ต่างจาก Rajarm และคณะ. 2010 พบว่าส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus lactis* มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด (7,350 AUต่อมิลลิลิตร) Copeland (1994) กล่าวว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะตกตะกอนออกจากสารละลายเมื่ออยู่ในสภาพที่มีกรดไตรคลอโรแอซิติกความเข้มข้นสูง วิธีการนี้ทำให้โปรตีนเสียสภาพซึ่งไม่สามารถกลับคืนสภาพเดิมได้ ด้วยเหตุนี้จึงควรใช้วิธีการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกเพียงเพื่อวิเคราะห์โปรตีนที่ไม่จำเป็นต้องให้มีการเปลี่ยนกลับไปเป็นโปรตีนรูปร่างเดิม ขณะที่ Carolissen-Mackay (1997) วิธีการทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์นั้นทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate precipitation) อิออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ion-exchange chromatography) แรงที่เกิดจากปฏิกิริยาของสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และ การแยกสารโดยวิธี reverse phase HPLC เพื่อความบริสุทธิ์ของ curvacin A, sakacin P, lactosin S และbavaricin A ส่วนแบคเทอริโอซินอย่าง helveticin J and lactacin F ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ขณะที่ lactacin B ใช้เทคนิคเจลเพอมีแอชั่นโครมาโตกราฟี (gel permeation chromatography)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การทำแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ

ชนิดของจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำให้สารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์	ปริมาตรแบคเทอริโอซิน (มล.)	กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (Total activity: AV)[a]	ความเข้มข้นของโปรตีน (Protein)[b] (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity)[c] (AU/ไมโครกรัม)	ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor)[d]	ปริมาณการได้กลับคืน (% Recovery)[e]
L. plantarum	ส่วนใส	200	102,400	20,480,000	1,275	80.3	1	100
LS0602	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	50	204,800	10,240,000	953	214.9	2.7	74.7
	ไดอะไลซีส (Fraction 1) (ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต)	30	409,600	12,288,000	642	638.0	3.0	50.4
	ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2)	2	819,200	1,638,400	442	1,853.4	2.9	34.7

[a] กิจกรรมรวม (Total activity) คือ ผลคูณระหว่างปริมาตรแบคเทอริโอซินกับกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ได้

[b] ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณจากวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford method) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

[c] กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) หาได้จากการนำกิจกรรมของแบคเทอริโอซินมาหารด้วยความเข้มข้นโปรตีน (AU/ไมโครกรัม)

[d] ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) คือการนำค่า Specific activity ที่เพิ่มขึ้นมาหารกัน

[e] ปริมาณร้อยละของการได้กลับคืน (% Recovery) คือค่าความเข้มข้นของโปรตีนคิดเป็นร้อยละหารด้วยความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น

ตารางที่ 4.4 การทำแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus brevis* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำให้สารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์	ปริมาตรแบคเทอริโอซิน (มล.)	กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (Total activity: AV)$_a$	ความเข้มข้นของโปรตีน (Protein)$_b$ (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity)$_c$ (AU/ไมโครกรัม)	ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor)$_d$	ปริมาณการได้กลับคืน (% Recovery)$_e$
L. brevis	ส่วนใส	200	51,200	10,240,000	1,202	42.6	1	100
LT0602	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	50	102,400	5,120,000	910	112.5	2.6	75.7
	ไดอะไลซีส (Fraction 1) (ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต)	30	204,800	6,144,000	598	342.5	3.0	49.8
	ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2)	2	409,600	819,200	352	1,163.6	3.4	29.3

$_a$ กิจกรรมรวม (Total activity) คือ ผลคูณระหว่างปริมาตรแบคเทอริโอซินกับกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ได้

$_b$ ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณจากวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford method) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

$_c$ กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) หาได้จากการนำกิจกรรมของแบคเทอริโอซินมาหารด้วยความเข้มข้นโปรตีน (AU/ไมโครกรัม)

$_d$ ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) คือการนำค่า Specific activity ที่เพิ่มขึ้นมาหารกัน

$_e$ ปริมาณร้อยละของการได้กลับคืน (% Recovery) คือค่าความเข้มข้นของโปรตีนคิดเป็นร้อยละหารด้วยความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น

4.1.3 ผลของอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซิน

จากการทดสอบหาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยนำแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกัน 8 ระดับดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ 37, 63, 72, และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100, และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินไม่ลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร) แต่จะมีการสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ตารางที่ 4.5) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีค่ากิจกรรมต่ำกว่าและมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมแบคเทอริโอซินไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 409,600 AU ต่อมิลลิลิตร) แต่จะสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีขึ้นไป

สำหรับการศึกษาผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 ต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคเทอริโอซิน พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคงตัว (ค่ากิจกรรมไม่ลดลง) เมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตรซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 (มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร) ตามตารางที่ 4.5 แต่ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอช 8

เมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ α-amylase เอนไซม์ lipase เอนไซม์ papain เอนไซม์ pepsin และเอนไซม์ trypsin ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรม (ตารางที่ 4.5)

จากการทดสอบหาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยนำแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกัน 8 ระดับดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ 37, 63, 72, และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100, และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินไม่ลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่า

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร) แต่จะมีการสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ตารางที่ 4.5) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีค่ากิจกรรมต่ำกว่าและมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมแบคเทอริโอซินไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 409,600 AU ต่อมิลลิลิตร) แต่จะสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีขึ้นไป

สำหรับการศึกษาผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 ต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคเทอริโอซิน พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคงตัว (ค่ากิจกรรมไม่ลดลง) เมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตรซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 (มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร) ตามตารางที่ 4.5 แต่ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอช 8

เมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ α-amylase, lipase, papain, pepsin และtrypsin ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรม

การที่แบคเทอริโอซินไม่สูญเสียกิจกรรมในสภาวะที่เป็นพีเอชกรด ทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงแต่ไม่ถึงจุดเดือด และทนต่อสภาวะที่มีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่นำมาทดสอบสอดคล้องกับการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ L. *plantarum* F1 และ L. *brevis* OG1 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูง (6,400 AUต่อมิลลิลิตร) ขณะอยู่ในสภาวะที่มีพีเอช 2-6 แต่เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น (ตั้งแต่พีเอช 8) กลับพบว่ามีการสูญเสียกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้เมื่อนำแบคเทอริโอซินมาทดสอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ คือ เอนไซม์ lipase, pronase E, catalase, lysozyme, α-amylase แล้ว แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* F1 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลงเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ pronase E ขณะที่แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* OG1 กลับไม่สูญเสียกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเลย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลของความคงตัวของสารแบคทอริโอซินต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์

ทรีทเมนต์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของแบคทอริโอซิน (AU/มิลลิลิตร)	
	Lactobacillus plantarum LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
อุณหภูมิ/เวลา (นาที)	819,200	409,600
30 °C/30 (ชุดควบคุม)	819,200	409,600
37 °C/30	819,200	409,600
63 °C/30	819,200	409,600
72 °C/15	819,200	409,600
72 °C/30	819,200	409,600
85 °C/15	819,200	0
85 °C/30	819,200	0
100 °C/15	0	0
121 °C/15	0	0
พีเอช		
2	819,200	409,600
3	819,200	409,600
4	819,200	409,600
5	819,200	409,600
6	819,200	409,600
7	819,200	409,600
8	409,600	204,800
9	204,800	102,400
10	102,400	25,600
เอนไซม์		
ชุดควบคุม (ไม่เติมเอนไซม์)		
Ot-amylase	819,200	409,600
Lipase	819,200	409,600
Papain	819,200	409,600
Pepsin	819,200	409,600
Trypsin	819,200	409,600

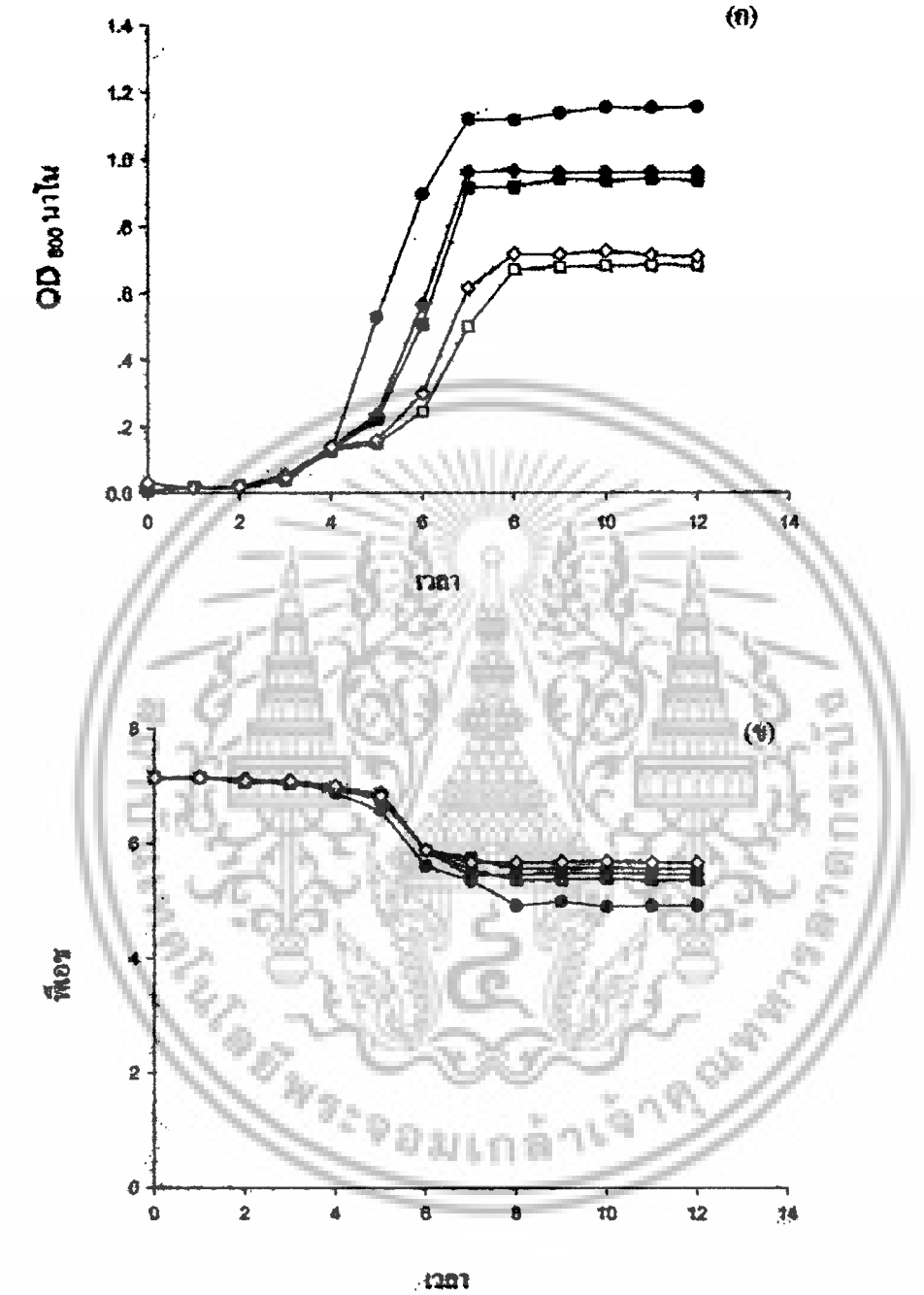
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่วนการทดลองของ Noonpaldee และคณะ (2002) ที่ผลิตไนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ซึ่งแยกมาจากแหนม ไส้กรอกหมักของไทย พบว่าไนซินมีกิจกรรมถึง 12,800 AUต่อมิลลิลิตรที่พีเอช 2-7 และเมื่อทดสอบกิจกรรมของไนซินที่พีเอช 8-10 ไนซินมีกิจกรรมลดลงอยู่ในช่วง 6400-3200 AU ต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เมื่อนำไนซินมา ทดสอบที่พีเอช 3 ระดับคือ พีเอช 3, 5 และ7 ตามลำดับโดยที่พีเอชแต่ละระดับมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทั้งนี้ที่พีเอช 3 พบว่าไนซินยังคงมีกิจกรรมปกติ (12,800 AU ต่อมิลลิลิตร) เมื่อให้อุณหภูมิทั้ง 2 ระดับ แต่เมื่อทดสอบซินที่พีเอช 5 และ 7 ที่อุณหภูมิทั้งสองระดับทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลง นอกจากนี้ไนซินจะสูญเสียกิจกรรมเมื่อทดสอบความคงทนต่อเอนไซม์ proteinase K และ α-chymotrypsin นอกจากนี้มีรายงานจากนักวิจัยท่านอื่นที่พบว่าสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. acidophilus* AC1 สูญเสียกิจกรรมเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ trypsin และ α-chymotrypsin แต่จะทนต่อเอนไซม์ pepsin มีกิจกรรมเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชระหว่างพีเอช 4.0-7.5 แต่จะไม่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเลยเมื่อให้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Mehta และคณะ 1983) และ แบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างแบบแมคโครโมเลกุล (macromolecule) จะไม่ทนต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (เอนไซม์ pepsin และ trypsin) และทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Andersson และคณะ. 1988)

4.2 ผลการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลว

จากการนำแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ16.7 และร้อยละ 23.1) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 เติมลงในอาหารเหลว TSB เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* พบว่า หลังจากเติม แบคเทอริโอซินเมื่อเข้าสู่ระยะ exponential phase ช่วงต้น (เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 4) ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 23.1 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มีค่าต่ำกว่าค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของอาหารเหลว TSB ชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* จะเริ่มคงที่เมื่อตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 จนถึงชั่วโมงสุดท้ายของการทดสอบ (ชั่วโมงที่ 12) พบว่าอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 23.1) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ได้ดีกว่า อาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 16.7) คืออยู่ที่ 0.77-0.80 และ 0.85-0.97 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช พบว่าค่าพีเอชของอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ทั้ง 2 ระดับมีค่าพีเอชลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกช่วงเวลาของการบ่มและเมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่ามีค่าพีเอชลดลงอยู่ในช่วงพีเอช 5.4-5.6 จากพีเอชเริ่มต้นคือพีเอช 7.1 ขณะที่พีเอชของอาหาร TSB ชุดควบคุมมีค่าพีเอชลดลงมากที่สุด (พีเอช 4.9) ซึ่งมีพีเอชน้อยกว่าค่าพีเอชของอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รูปที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว Tryptic Soy broth (TSB) ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904 (รูป ก) การเปลี่ยนแปลงค่าความขุ่น (OD_{600} นาโนเมตร) และ(รูป ข) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร TSB ขณะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สัญลักษณ์ : ● ชุดควบคุม (ไม่เติมแบคเทอริโอซิน) ■ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ16.7 □ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ23.1 ♦ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ16.7 ◊ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ23.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การที่แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ได้ดีสอดคล้องกับการทดลองของ Pinto และคณะ (2009) ที่เติมแบคเทอริโอซินคือ bacALP7 (มีกิจกรรมแบคเทอริโอซินที่ 25, 600 AUต่อมิลลิลิตร) และ bacALP57 (มีกิจกรรมแบคเทอริโอซินที่ 12, 800 AUต่อมิลลิลิตร) ที่เติมเมื่อเข้าสู่ระยะ exponential phase ช่วงต้น พบว่าแบคเทอริโอซินทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการเชื้อยับยั้งเชื้อในสายพันธุ์ *Listeria* ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้ Lücke (2000) ได้กล่าวว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน เช่น *Listeria, Bacillus, Clostridium* และ *Staphylococcus* ทั้งนี้แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจาก cytoplasmic membrane ของแบคทีเรียแกรมบวกไวกว่าจึงถูกแบคเทอริโอซินทำลายได้ง่าย

4.3 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็นโดยใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

4.3.1 การศึกษาผลของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในหมูบดแช่เย็น

ก) การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดในเนื้อหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

จากการศึกษาผลของแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 2 และ ร้อยละ 4) ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดในหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดทุกชุดการทดลองลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บรักษาครบ 3 วัน โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดชุดควบคุมที่ไม่เติมสารใด ๆ ลดลงน้อยที่สุด (0.59 log cycle) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดชุดอื่นที่เติมสารแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 4 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงมากที่สุด (1.42 log cycle) หลังจากเก็บรักษาครบ 3 วัน (รูปที่ 4.2 ก) และเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละชุดการทดลองเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่ทุกช่วงเวลาของการเก็บรักษา โดยพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดชุดควบคุมลดลงน้อยกว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกัน และเมื่อเก็บรักษาจนครบ 10 วัน หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.85 log cycle ซึ่งลดลงมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดของชุดการทดลองอื่น ๆ (ได้แก่ หมูบดที่เติมในซินความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.25 log cycle และหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ที่ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.28-0.29 log cycle) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เติมในหมูบดที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าหมูบดที่เติมสารแบคเทอริโอซินร้อยละ 4 มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อพิจารณาจำนวน *Listeria monocytogenes* พบว่าหลังจากเก็บหมูบดแช่เย็นครบ 3 วัน จำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในหมูบดชุดควบคุมลดลงน้อยกว่าจำนวน *L. monocytogenes* ในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (รูปที่ 4.2ข) โดยหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 4 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ลดลงมากที่สุดถึง 1.7 log cycle หลังจากนั้นจำนวน *L. monocytogenes* ในหมูบดทุกชุดการทดลองมีจำนวนค่อนข้างคงที่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษานานขึ้นจนครบ 10 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกที่เก็บรักษา พบว่าเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาจำนวน *L. monocytogenes* ในหมูบดชุดควบคุมมีจำนวนลดลงเพียง 0.31 log cycle จากจำนวนเริ่มต้นซึ่งลดลงน้อยกว่าจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินทุกชุดการทดลอง (ลดลงมากถึง 1.40-1.58 log cycle) โดยหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ให้ผลดีกว่าหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ในการลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ทั้งหมด

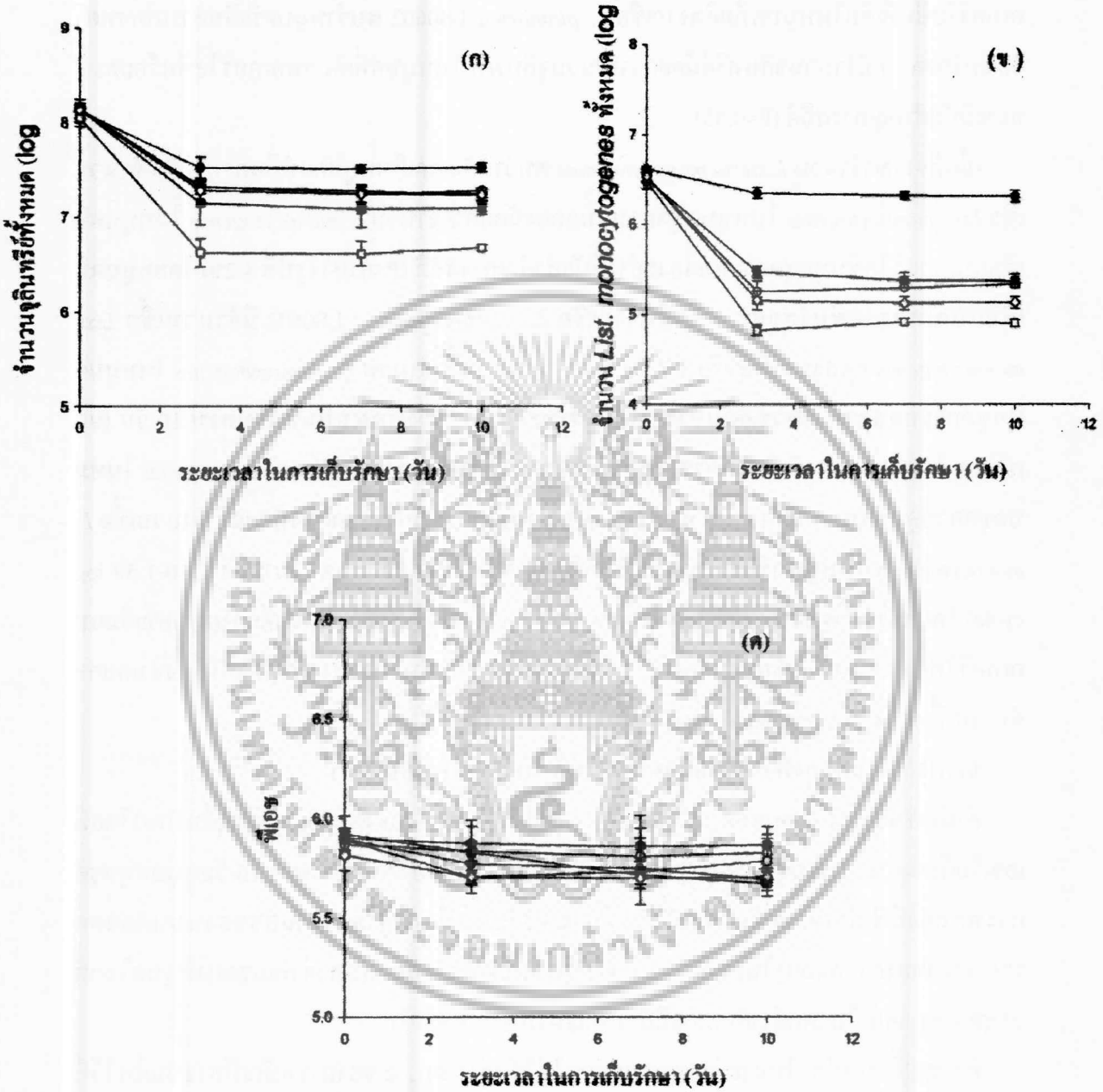
ข) การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเนื้อหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

ค่าพีเอชของหมูบดทุกชุดการทดลองเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาโดยพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วงพีเอช 5.7-6.0 (รูปที่ 4.2 ค) และเมื่อเก็บรักษาต่อไปจนครบ 10 วันหมูบดทุกชุดการทดลองมีพีเอชลดลงเพียงเล็กน้อย (พีเอช 5.5-5.8) เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของหมูบดตลอดระยะเวลาของการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของหมูบดในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

พีเอชเปลี่ยนแปลงไม่มากนักเพราะหมูบดไม่ได้อยู่ในสภาวะของการหมักเนื่องจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำดังนั้นจึงมีเพียงเชื้อ *List. monocytogenes* ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะดังกล่าวเท่านั้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Vignolo และคณะ (1996) ที่ทดลองเติม Lactocin 705 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. casei* CRL 705 เพื่อยับยั้งการเจริญของ *List. monocytogenes* ในเนื้อวัวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสโดยเติมแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรม 2 ระดับคือ 8,400 และ 16,800 AU ต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคเทอริโอซินที่ทั้งสองระดับสามารถลดการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ได้อย่างน้อย 1 log cycle โดยที่แบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นสูงสุดสามารถลดจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในเนื้อวัวได้ร้อยละ 40 หลังจากเก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ -30 องศา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลเซียส เป็นเวลา 1 วันและการที่แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของ *List. monocytogenes* อาจเนื่องมาจาก cytoplasmic membrane ไวต่อการถูกทำลายด้วยแบคเทอริโอซิน (LUcke. 2000)



รูปที่ 4.2 ผลการเปลี่ยนแปลง (ก) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (ข) จำนวน *List. monocytogenes* ทั้งหมด (ค) พีเอช ของหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก สัญลักษณ์ : ● ชุดควบคุม (ไม่เติมแบคเทอริโอซิน) ○ หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ■ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2 □ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4 ♦ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2 ◊ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีระดับพีเอชที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่ที่พีเอช 6 และพีเอช 7 ตามลำดับ และ *L. plantarum* LS0602 มีการสร้างแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดในอาหารเหลว MRS สูตรปกติที่เติมเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 30 กรัมต่อลิตร มีทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร และมีไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ควรเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรปกติที่เติมกลูโคสเพิ่มเป็น 40 กรัมต่อลิตร มีทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร มียีสต์สกัดเพิ่มเป็น 20 กรัมต่อลิตร และมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด สำหรับวิธีการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ปรากฏว่า วิธีที่จะทำให้ได้แบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคสูงสุดจะต้องนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาผ่านกระบวนการต่างๆหลายขั้นตอน ตั้งแต่การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำไดอะไลซีสและการตกตะกอนแบคเทอริโอซินด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก สำหรับการทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอซินที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่อระดับการให้ความร้อน (ที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน) ระดับพีเอชและสภาพที่มีเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีความคงตัว (ไม่สูญเสียกิจกรรม) เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิระดับต่ำจนถึงอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมแบคเทอริโอซินไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคงตัว (ค่ากิจกรรมไม่ลดลง) เมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 แต่ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอช 8 และเมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ α-amylase เอนไซม์ lipase เอนไซม์ papain เอนไซม์ pepsin และเอนไซม์ trypsin ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรม และเมื่อนำแบคเทอริ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โอซินจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารเหลว พบว่าแบคเทอริโอซินจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลวที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ปริมาตรร้อยละ 23.1

แบคเทอริโอซินจาก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารชีวภาพต้านจุลินทรีย์ *L. monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็นโดยแบคเทอริโอซินจาก *L. plantarum* LS0602 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 ให้ผลดีที่สุดในการลดจำนวน *L. monocytogenes* งานวิจัยขั้นต่อไปควรศึกษาสภาวะต่างๆในการผลิตแบคเทอริโอซินในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการจำหน่าย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

Altunta, E.G., Cosansu. S. and Ayhan. K. 2010. "Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13." **International Journal of Food Microbiology**. 141 : 28-31.

Andersson, R.E., Daeschel, M.A. and Hassan, H.M. 1988. "Antibacterial activity of plantaricin SIL-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*." **Biochimie**. 70 : 381-90.

Ammor, M.S. and Mayo, B. 2007. "Selection criteria for lactic acid bacteria used as function starter cultures in dry sausage production: an update. **Meat Science** 76 : 138-146.

Carolissen-Mackay, V., Arendse, A., Hastings, J.W. 1997. "Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers." **International Journal of Food Microbiology**. 34 : 1-16.

Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A., Campos, C.A. 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat science**. 87: 321-329.

Charoenrak, N. and Nanasombat, S. 2011. Characterization of lactic acid bacteria and coagulase negative staphylococci isolated from raw meat and cured meat products, pp. 323-331. In the Proceeding of the 12th Asean Food Conference, 16-18 June, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

Cheigh, C.I.,Choi , H.J., Park ,H., Kim, S.K.,Kook, M.C., Kim, T.S., Hwang, J.K. Pyun a, Y.R. 2002. "Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by Lactococcus lactis subsp. Lactis A164 isolated from kimchi." **Journal of Biotechnology**. 95 (2002) 225-235.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikidas, M. L. (2001). Bacteriocin:safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 7: 1-20.

Copeland, R.A. 1994. **Methods for protein analysis : A practical Guide to laboratory protocols.** New York. USA : Chapman and Hall.

Cuozzo, S.A., Sesma, F.J.M., Pesce de R. Holgago, A.A. and Raya, R.R. 2001. "Methods for the

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

detection and concentration of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." in Spencer, J.F.T. and Ragout de Spencer, A. L. **Food Microbiology Protocols.** New Jersey : Humana Press Inc.

Doonan, S. 2004. "Concentration of extracts." in Cutler, P. **Protein Purification Protocols,** 2nd ed. Totowa, New Jersey : Humana press Inc.

Daba, H., Lacroix, C., Huang, J. and Simard, R.E. 1993. "Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 39 (2) : 166-173.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** UK : Blackie academic & professional.

Drosinos, E.H., Mataragas, M. and Metaxopoulos, J. 2006. "Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131." **Meat Science.** 74 : 690-696.

Enan, G., Essawy, A.A., Uyttendaele, M. and Debevere, J. 1996. "Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1." **International Journal of Microbiology.** 30 : 189-215.

Gálvez, A. Abriouel, H., López, R. L., and Omar, N. B. 2007. "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation." **International Journal of Food Microbiology** 120: 51-70.

Hitchins, A.D. and Jinneman, K. 2011. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Available from: www.fda.gov/food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm

Holzapfel, W.H., Geisen, R. and Schillinger, U. 1994. "Biological preservation of food with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes." **Food Microbiology** 24 : 343-362.

Kim, W.S., Hall, R.J. and Dunn, N.W., 1997. "The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis.*" **Applied Microbiology and Biotechnology.** 50 : 657-662.

Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P., Charoenpornsook, K.,Valyyasevi, Ruud. And Sonomoto, K. 2012. "Anti-listeria activity of Pediococcus

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

pentosaceus BCC 3772 and application as starter culture of Nham, traditional fermented pork sausage." **Food control.** 25 : 190-196.

Lee, H.J., Joo, Y.J., Park, C.S., Kim, S.H., Hwang, I.K., Ahn, J.S., Mheen, T.I. 1999."Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactococcus lactis subsp. lactis H-559 isolated from kimchi." **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 88 : 153-159.

L0ck, F.K. 2000. "Utilization of microbes to process and preserve meat." **Meat Science.** 56 : 105-115.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. "Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1." **African Journal of Biotechnology.** 2 (8) : 219-227.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. and Drosinos, E.H. 2003. "Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by Leuconostoc mesenteroides L124 and Lactobacillus curvatas L442." **Meat Science.** 64 : 265-271.

Matsusaki, H. Endo, N. Sonomoto, K. Ishikazi, A. 1996. "Lantibiotic nisin Z fermentative production by Lactococcus lactis IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 45 : 36-40.

Mehta, A.M., Patel, K.A. and Dave, P.J. 1983. "Purification and properties of the inhibitory protein isolated from Lactobacillus acidophilus AC1." Microbios. 38 : 73-81.

Muriana, P. M., & Luchansky, J. B. 1993. Biochemical methods for purification of bacteriocin. In D. G. Hoover, & L. R. Steenson, *Bacteriocin of lactic acid bacteria.* San diego: Academic Press.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2002. "Isolation of nisin-producing Lactococcus lactis WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermentaed sausage." **International Journal of Food Microbiology.** 81 : 137-145.

Parente. E. and Ricciardi, A. 1994. "Effect of nitrogen and carbohydrate sources on lactic acid and bacteriocin production by Enterococcus faecium DPC1146." **Agro-Industry Hi-Tech.** 5 : 35-39.

Pinto, A.L., Fernandes, M., Pinto, C. Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P. and Gibbs, P.A. 2009.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

"Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. ." **International Journal of Food Microbiology.** 129 : 50-58.

Salih, M. A., Sandine, W. E. and Ayres, J. W. 1990. "Inhibitory effects of Microgard™ on yogurt and cottage cheese spoilage organisms." **Journal of Dairy Science.** 73: 887-893.

Schillinger, U. and LÜcke F.K. 1989. "Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat." **Applied and Environmental Microbiology.** 55(8): 1901-1906.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. "Bacteriocin of gram positive bacteria." Bacteriological Reviews. 40: 722-756.

Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2006. "Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine." **Microbiological Research** 161: 102-108.

Todorov, S.D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J.G. and Franco, B.D.G.M. 2011. "Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (Carica papaya)-from isolation to application: Characterization of a bacteriocin." **Food Research International.** 44 : 1351-1363.

Vignolo, G., Fadda, S., de Kairuz, M.N., de Ruiz Holgado, A.A.P., 1996. "Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by Lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. **International Journal of Food Microbiology.** 29 : 397-402.

Yousef, A.E. and Carlstrom, C 2003. **Food Microbiology : a laboratory manual.** Hoboken, New York : John Wiley.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 de Man Rogosa and sharpe medium (MRS agar) ประกอบด้วย

Proteose peptone no 3	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัม
Triammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Agar	10	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE Soft Agar) ประกอบด้วย

Tryptic soy broth	30	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Agar	10	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

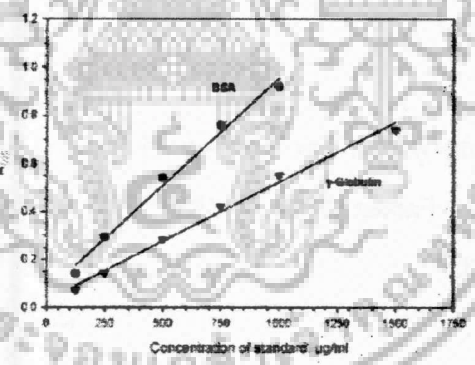
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารแบคเทอริโอซินในแต่ละส่วน

ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารแบคเทอริโอซินตามวิธีการของ Bradford ด้วยชุด Quick start Bradford (Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา) ทำได้โดย ปิเปตส่วนใส (cell-free supernatant) ส่วนใสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนใสที่ผ่านการทำไลซะไลซีส และส่วนใสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก ทั้งหมด 4 ส่วน โดยปิเปตตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่สะอาดแล้วเติมสีย้อม 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที (ไม่เกิน 1 ชั่วโมง) ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 ไมโครลิตรเพื่อบันทึกผลค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ในการคำนวณจะต้องเปรียบเทียบการสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังนี้

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 125, 250, 500, 750, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมพร้อมกับ Blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อเตรียมเทียบปริมาณโปรตีนในสารแบคเทอริโอซินที่ทำให้บริสุทธิ์หรือเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการต่าง ๆ



รูปที่ 1 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีน

2. การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ตารางด้านล่างจะใช้ในการกำหนดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม) สำหรับสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยคิดเป็นร้อยละของความอิ่มตัว เมื่อต้องการใช้ตารางเริ่มต้นด้วยการหารายการในคอลัมน์แรกที่ให้ร้อยละความอิ่มตัว เริ่มจากสารละลายตัวอย่าง (เช่น ครั้งแรกจะใช้ที่ร้อยละ 0 ก่อนเติมแอมโมเนียมซัลเฟต) แล้วหารายการในแถวบนสุดที่แสดงถึงร้อยละของความอิ่มตัวที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้องการ โดยค่าที่ได้จะเป็นค่าที่จุดตัดของแถวและคอลัมน์ที่เป็นจำนวนของแอมโมเนียมซัลเฟต (ของแข็ง) ที่เติมลงในสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง: มีสารละลายปริมาตร 25 มล. ที่ความอิ่มตัวร้อยละ 40 ถ้าหากต้องการที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 จะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟตกี่กรัม

ตอบ ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ความอิ่มตัวร้อยละ 40 ดังนั้นให้ลากไปที่คอลัมน์แรกที่ร้อยละ 40 และความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการคือ ที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 ดังนั้นให้ลากแถวบนไปที่ร้อยละ 80 ที่จุดตัดของแถวและคอลัมน์นี้คือ "26.3" ดังนั้นจะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 26.3 กรัมเพื่อเติมในสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร แต่มีสารละลายเพียง 25 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำนวน 6.6 กรัม

ตารางที่ ข3 การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

Init %	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	[illegible]	85	90	95	100
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.2	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.9	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.8	29.6	32.9	36.9	41.0	45.3
[illegible]					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	[illegible]	29.6	33.5	37.6	41.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค
วิธีการคำนวณ

1. คำนวณหา bacteriocin activity โดยวิธี critical dilution assay

วิธี critical dilution assay เป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อวัดกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเมื่อไม่มีสารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบ เมื่อพิจารณาตามหลักการแล้ววิธีการนี้คล้ายกับเทคนิคการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญ (minimum inhibitory concentration) เทคนิคสำหรับวัดค่า antibiotic potency วิธีการ critical dilution assay นี้จะต้องทำการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง (culture) หรือ สารที่ได้จากการหมัก (fermentate) ที่จะนำทดสอบ (ปกติมักทำการเจือจางแบบ 2 เท่าหลาย ๆ ระดับความเจือจาง) และใช้หยดในปริมาณน้อย เช่น 5 ไมโครลิตร) ลงบนผิวหน้าอาหาร soft agar ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อยู่ หลังจากนำจานเพาะเชื้อไปบ่มแล้ว สังเกตบริเวณของการยับยั้งรอบบริเวณที่ได้หยดสารซึ่งได้ทำการเจือจางเพื่อทดสอบถึงการมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ค่า dilution factor สูงที่สุดที่สามารถทำให้เกิดบริเวณการยับยั้งชี้ให้เห็นถึงกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ดังนั้นกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (bacteriocin activity) ซึ่งทราบกันว่าคือค่า arbitrary units (AU) ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้ (Yousef และ Carlstrom. 2003)

$$\frac{\text{AU}}{\text{ml culture}} = \frac{1}{\text{dilution factor ที่สูงสุดที่เกิดการยับยั้ง (DFi)}} \quad \frac{1000}{\text{ปริมาตรของ dilution ที่หยดลงในหลุม (ไมโครลิตร)}}$$

เช่น ถ้าหยดครั้งละ 5 ไมโครลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้ออินดิเคเตอร์อยู่ดังนั้น AU/ml เท่ากับ 200/DFi ตัวอย่างเช่น ถ้าสารที่ได้จากการหมักซึ่งทำการเจือจางตั้งแต่ระดับความเจือจางที่ $1/2^1$ - $1/2^8$ ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ (เช่นวงใส) ที่ทุกระดับการเจือจางตั้งแต่ที่ $1/2^1$ - $1/2^7$ แต่ที่ระดับความเจือจาง $1/2^8$ ไม่เกิดโซนการยับยั้งดังนั้นค่า AU/ml = $200/(1/2^7)$ = 25,600 ซึ่งมีค่า AU จะต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้