สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพ

นายกิตติชัย โหบาง
นางสาวทัศนพร แก้วทองมา
นางสาวปฏิมา ลิขิตธรรมนิตย์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....33511.....
วัน, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2542

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Isolation and Screening of Antimicrobial substances of Lactic Acid Bacteria

Mr. Kittichai Hobang

Miss Thursanapon Kaewthongma

Miss Patima Likittumanit

Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirements for the Degree of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ	การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพ	
โดย	นายกิตติชัย	โหบาง
	นางสาวทัศนาพร	แก้วทองมา
	นางสาวปฏิมา	ลิขิตธรรมนิตย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์มงคล	เพ็ญสายใจ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์	
ปีการศึกษา	2541	

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบังอนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชา
(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการตรวจสอบโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ
(ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

_____ กรรมการ
(อาจารย์ ลินจง สุขลำภู)

_____ กรรมการ
(อาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษ การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพ

ผู้เสนอ นายกิตติชัย โหบาง รหัส 38054305

นางสาวทัศนพร แก้วทองมา รหัส 38054330

นางสาวปฏิมา ลิขิตธรรมนิตย์ รหัส 38054337

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ

ปีการศึกษา 2541

บทคัดย่อ

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย 56 สายพันธุ์ แยกได้จากอาหารหมัก 2 ชนิด คือ แหนมและไส้กรอกเปรี้ยว และนำเชื้อทั้งหมดมาทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลชีพทั้งหมด 6 ชนิด คือ *Bacillus subtilis, B.cereus, Vibrio* sp., *Escherichia coli, Salmonella* sp. และ *Staphylococus aureus*. ในการคัดเลือกครั้งนี้พบว่าเชื้อรูปแท่ง 5 สายพันธุ์และเชื้อรูปกลม 2 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง และจากการศึกษาลักษณะต่างๆของเชื้อที่คัดเลือกปรากฏว่าได้แลคติกแอซิดแบคทีเรีย 2 ชนิด คือ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp.

จากการทดลองพบว่า สารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้นมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกที่สร้างสปอร์มากที่สุด นอกจากนี้การทดลองประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้งหมด 3 ปัจจัย คือ 1) นำอาหารเหลว MRS มาทดสอบการยับยั้งโดยตรง 2) นำอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรต 0.45 ไมโครเมตร มาทดสอบการยับยั้ง 3) นำอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส 10 นาทีมาทดสอบการยับยั้ง พบว่า การนำอาหารเหลว MRS มาทดสอบยับยั้งโดยตรงมีประสิทธิภาพสูงสุด โดยการยับยั้งจะสูงสุดในชั่งโมงที่ 18 จากนั้นจะคงที่และลดลงในชั่วโมงที่ 24 แบคทีเรียแลคติก L1 มีประสิทธิภาพสูงสูดในการยับยั้ง และ *Bacillus subtilis* เป็นแบคทีเรียทดสอบที่ถูกยับยั้งได้มากที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Isolation and Screening of Antimicrobial substances of Lactic Acid Bacteria
Name	Mr. Kittichai Hobang
	Miss Thursanapon Kaewthongma
	Miss Patima Likittumanit
Special Project Adviser	Mr. Mongkol Phensaijai
Department	Applied Biology
Academic Year	1998

Abstract

Fifty six strains of lactic acid bacteria are isolated from two kinds of fermented foods that are Nam and Fermented sausage and take all of this lactic acid bacteria to test the ability in produced antimicrobial to inhibited six types of microorganisms : *Bacillus subtilis* , *B. cereus* , *Vibrio* sp. , *Escherichia coli* , *Salmonella* sp. and *Staphylococcus aureus.* In the screening this bacteria, it was found that microorganism in five strains of rod-shaped and two strains of cocci-shaped have the efficiency of inhibition. From the characteristic studied about the screening of lactic acid bacteria , it will be use *Lactobacillus* sp. and *Pediococcus* sp.

Antimicrobial substances of Lactic acid Bacteria had influence for gram positive and spore forming bacteria . The experiment that compared the efficiency to inhibited 3 factors are 1) Take MRS broth to tested the inhibition directly 2) Filtrated MRS broth by 0.45 micrometers cellulose nitrate and tested the inhibition 3) Heated MRS broth at 100 ^{o}C for 10 minutes and tested the inhibition . The highest inhibited is the directly tested of MRS broth in hours at 18 ,Afterthat , there will be stable and decrease in hours at 24 . Lactic acid Bacteria that has a highest efficiency in inhibited is L1 strains and *Bacillus subtilis* is most inhibited by Lactic acid Bacteria

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การทำงานวิจัยนี้สำเร็จด้วยดี เนื่องจากได้รับแนวคิดและคำแนะนำในการดำเนินงานวิจัยตลอดจนการแก้ปัญหาต่างๆอันเป็นประโยชน์จากอาจารย์ มงคล เพ็ญสายใจ อาจารย์ผู้ควบคุมโครงงานพิเศษ และผศ. ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ประธานกรรมการสอบโครงงานพิเศษ และอาจารย์ลินจง สุขลำภู กรรมการสอบโครงงานพิเศษ และเป็นที่ปรึกษาโครงงานพิเศษมาโดยตลอด จึงขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร และคุณวิทยา เขียวเขิน เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่ได้ให้ความสะดวกต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ขอบคุณรุ่นพี่และเพื่อนๆ ทุกคนที่ได้ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุนและเป็นกำลังใจตลอดเวลาที่ได้ทำโครงงานพิเศษเรื่องนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้จัดทำ

3 มีนาคม 2542

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 การตรวจเอกสาร	3
บทที่ 3 ดำเนินการทดลอง	17
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	26
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	66
เอกสารอ้างอิง	68
ภาคผนวก ก องค์ประกอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ	71
ภาคผนวก ข สีย้อมและน้ำยา	
ภาคผนวก ค สารเคมีและวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์	75
ภาคผนวก ง ผลการทดลองชุดควบคุม	78
ภาคผนวก จ ลักษณะการเกิดบริเวณใสโดยแบคเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติ	80
ภาคผนวก ฉ ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียที่แลคติกโดยเทคนิค การย้อมสีแกรม	84
ภาพผนวก ช เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	89

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	แหล่งอาหารหมักที่พบ *Pediococcus* spp.	6
2.	ตัวอย่างอาหารหมักและแหล่งที่มาในการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติก	19
3.	จำนวนและลักษณะเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมัก	26
4.	ความสามารถของบริเวณใส (clear zone) ที่สารยับยั้งถูกผลิตมาทำปฏิกิริยากับ $CaCO_3$	27
5.	ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติก	30
6.	การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต	31
7.	ผลการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบอาหารเหลว MRS ที่มีแบคทีเรียแลคติก	33
8.	ผลการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที	34
9.	ผลการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบอาหารเหลว MRS ที่มีแบคทีเรียแลคติกและผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรต	36
10.	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 6	37
11.	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 12	38
12.	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 18	39
13.	ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 24	40
14.	ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่คัดได้จากอาหารหมัก	48
15.	การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ต่อเชื้อทดสอบ	53
16.	ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ต่อเชื้อทดสอบเมื่อเปรียบเทียบ	54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS และให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ต่อเชื้อทดสอบ 56

18 . ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRSและให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ต่อเชื้อทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบโดย $DMRT_{0.05}$ 57

19. การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS และผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรตต่อเชื้อทดสอบ 58

20. ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRSและผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรตต่อเชื้อทดสอบเมื่อเปรียบเทียบของ $DMRT_{0.05}$ 59

21. การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ณ ชั่วโมงที่ 6 , 12 , 18 และ 24 ต่อเชื้อทดสอบ 60

22. ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ณ ชั่วโมงที่ 6 , 12 , 18 และ 24 ต่อเชื้อทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบโดย $DMRT_{0.05}$ 61

ง1 ผลการทดลองการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบ MRS broth 79

ง2 ผลการทดลองการทดสอบการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบด้วยกรดแลคติก 1% 79

ง3 ผลการทดลองการทดสอบการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบด้วยกรดแลคติก 2% 80

ง4 ผลการทดลองการทดสอบการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบด้วยกรดแลคติก 3% 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ -	หน้า
1. กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเชื้อ *Lactobacillus plantarum*	3
2. กระบวนการเมแทบอลิซึมน้ำตาลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	5
3. การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย	8
4. โครงสร้างไนซิน A และไนซิน Z	10
5. ผลของแบคทีริโอซินต่อการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย	11
6. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J6	41
7. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J1	42
8. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K20	43
9. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ D5	44
10. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K7	45
11. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H15	46
12. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H17	47
13. การเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงพีเอชของเชื้อที่คัดเลือกได้	50
14. การเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อที่คัดเลือก	51
15. การเปรียบเทียบความสามารถผลิตกรดของเชื้อที่คัดเลือก	52
จ1 การทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียของผลิตแลคติกสายพันธุ์ J6 ในชั่วโมงที่ 18	81
จ2 การทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียของผลิตแลคติกสายพันธุ์ J1 ในชั่วโมงที่ 18	80
จ3 การทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียของผลิตแลคติกสายพันธุ์ K20 ในชั่วโมงที่ 18	82
จ4 การทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียของผลิตแลคติกสายพันธุ์ D5 ในชั่วโมงที่ 18	82
จ5 การทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียของผลิตแลคติกสายพันธุ์ K7 ในชั่วโมงที่ 18	83

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่	หน้า
จ6 การทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียของผลิตแลคติกสายพันธุ์ H15 ในชั่วโมงที่ 18	83
จ7 การทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียของผลิตแลคติกสายพันธุ์ H17 ในชั่วโมงที่ 18	84
ฉ1 แบคทีเรียแลคติก J6	85
ฉ2 แบคทีเรียแลคติก J7	85
ฉ3 แบคทีเรียแลคติก K20	86
ฉ4 แบคทีเรียแลคติก D5	86
ฉ5 แบคทีเรียแลคติก K7	87
ฉ6 แบคทีเรียแลคติก H15	87
ฉ7 แบคทีเรียแลคติก H17	88
ช1 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	89
ช2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	90
ช3 แผ่นทดสอบการยับยั้ง	90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก(Gram-positive)ไม่สร้างสปอร์ (Non-spore forming) ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลให้ได้กรดแลคติก นอกจากนี้ยังให้สารที่เป็นผลิตภัณฑ์ในช่วงของการเจริญเติบโตที่มีคุณสมบัติยับยั้งจุลชีพได้ รูปร่างของแบคทีเรียแลคติกนั้นมีทั้งเป็นแบบกลม เช่น *Lactococcus, Vagococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Streptococcus, Enterococcus.* และแบบแท่ง เช่น *Lactobacillus, Carnobacterium, Bifidobacterium.* เป็นต้น แบคทีเรียแลคติกมีประโยชน์ทั้งด้านอุตสาหกรรมอาหารหมัก,ผลิตภัณฑ์นม-เนย,อาหารกระป๋องรวมไปถึงอุตสาหกรรมการแปรรูปอาหารและการถนอมอาหาร

การถนอมอาหารในอุตสาหกรรมอาหารมักมีปัญหาการเน่าเสียจากจุลินทรีย์ เช่น ยีสต์, รา รวมถึงแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคทางอาหาร(Food-borne pathogens) อาจปนเปื้อนมาจากการบรรจุผลิตภัณฑ์,วัตถุดิบไม่ได้มาตรฐาน,การสุขาภิบาลโรงงานไม่ดี ทำให้ทางโรงงานอุตสาหกรรมอาหารใช้สารถนอมอาหารที่เป็นสารเคมีมากขึ้น เช่น ก๊าซซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2), กรดเบนโซอิก (Benzoic acid), กรดซอร์บิก (Sorbic acid), ไนไตรท์ (Nitrite), ไนเตรต (Nitrate) เป็นต้น สารพวกนี้จะช่วยในการยืดอายุผลิตภัณฑ์อาหารให้มีอายุการเก็บรักษาได้นานขึ้น จึงต้องมีการควบคุมคุณภาพและปริมาณการใช้สารเคมีเหล่านี้ เพราะสามารถเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

ในปัจจุบันต่างประเทศได้นิยมใช้สารที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติกที่มีชื่อว่า แบคทีริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งเป็นสารถนอมอาหารอีกตัวหนึ่งที่เป็นสารธรรมชาติไม่มีพิษและอันตรายต่อผู้บริโภคเหมือนกับสารเคมีที่ใช้ทั่วไป เนื่องจากแบคทีริโอซินเป็นสารธรรมชาติที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมหรือจากช่วงการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

1) เป็นสารต้านจุลชีพ (Antimicrobial)
2) มีโครงสร้างเป็นโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายตัวที่เชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์
3) มีกลุ่มเป้าหมายในการต้านต่อแบคทีเรียแกรมบวกและจุลินทรีย์ที่ทำให้โรคทางอาหาร เช่น *Bacillus cereus,Clostridium botulinum, C. perfringens, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus,* ,แบคทีเรียแกรมลบบางตัว เช่น *Salmonella* spp. และ *E.coli* เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ ห้ามมิให้ผู้ใดนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า เว้นแต่ได้รับอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การใช้สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคบางชนิดที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกจึงอาจเป็นแนวทางหนึ่งซึ่งจะช่วยขจัดปัญหาทางด้านสาธารณสุข,สารตกค้าง,สารก่อมะเร็งจากพวกสารถนอมอาหารในด้านอุตสาหกรรมอาหารได้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1) ศึกษาและคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ
2) ศึกษาปัจจัยการผลิตและการยับยั้งของสารที่แบคทีเรียแลคติกผลิต

ขอบเขตการศึกษาโครงงาน

1) เปรียบเทียบและคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดในการผลิตสารยับยั้งต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ
2) เปรียบเทียบการยับยั้งของสารยับยั้งที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกในรูปแบบต่างๆ ดังนี้ จากอาหารเลี้ยงเชื้อ(Supernantant), อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรอง และอาหารเลี้ยงที่ผ่านการให้ความร้อน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) เพื่อเป็นแนวทางและความเป็นไปได้ในการนำแบคทีเรียแลคติกมาใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร เพื่อเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและการถนอมอาหารต่อไป
2) เพื่อสามารถทราบถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องและรูปแบบที่เหมาะสมที่สุดของสารยับยั้งที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

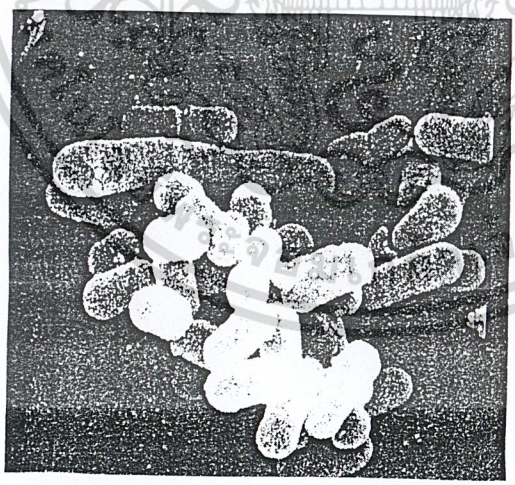
บทที่ 2

ตรวจเอกสาร

แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในการหมักอาหารหลายชนิดด้วยกัน เช่น นม เปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผัก และผลไม้ดอง ไส้กรอก และผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดอื่นๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีทั้งพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) ซึ่งเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคลิติก(Glycolytic pathway) และพวกเฮทเทอโรเฟอเมนเททีฟ (Heterofermentative) ซึ่งเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติก เอทานอล กรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิถีฟอสฟอคีโตเลส (Phosphoketolase pathway) นอกจากนั้นยังมีเชื้อหลายสายพันธุ์สามารถเปลี่ยนกรดซิตริก หรือเกลือซิเตรทได้สารพวกไดอะซิธิล(Diacetyl) อะซิโตอิน(Acetoin) และบิวธิลลีนไกลคอล(2,3-butylene glycol) ดังนั้นบทบาทที่สำคัญในการหมักอาหารที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติกจึงได้แก่ การผลิตกรดทำให้เกิดรสเปรี้ยว และมีกลิ่นหอมของสารต่างๆได้ดังกล่าวแล้ว และยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆที่แตกต่างกันออกไปตามประเภทของผลิตภัณฑ์

ลักษณะเชื้อสกุล *Lactobacillus*



รูปที่ 1 รูปถ่ายกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเชื้อ *Lactobacillus plantarum*

ที่มา : Daeschel และ Nes (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

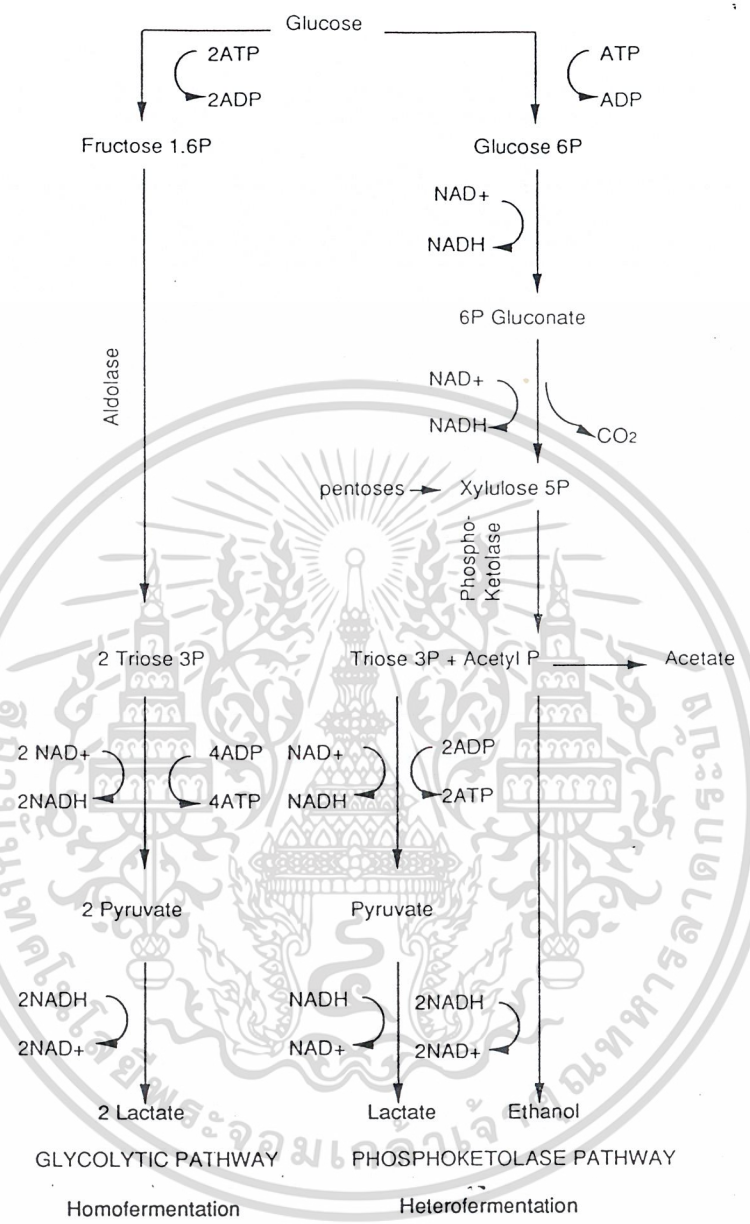
เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งยาว บางครั้งพบเป็นแท่งโค้ง ถ้าเป็นแท่งสั้นมักเป็น coryneform coccobacilli บางทีต่อกันเป็นสายโซ่ บางเชื้อเคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ สามารถย้อมติดสีแกรมบวกเป็นเฟอร์เมนเททีฟแบคทีเรีย (Fermentative bacteria) ที่หมักน้ำตาลกลูโคส แล้วสร้างกรดแลคติก แต่ไม่สามารถหมักแลคเตตได้ แต่จะมีผลพลอยได้จากการหมัก คือ พวกอะซิเตต เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ ฟอร์เมต หรือ ซัคซิเนต เป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศเล็กน้อย (Microaerophile) ไม่มีการรีดิวซ์ไนเตรต ไม่สลายเจลาตินและเคซีน ไม่สร้างอินโดล และไฮโดรเจนซัลไฟด์(H_2S) ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส แต่จะมีบางสายพันธุ์ที่สามารถสลายเปอร์ออกไซด์ (Peroxide) ด้วยเอนไซม์ pseudocatalase และปฏิกิริยาต่อ benzidine นั้นจะให้ผลลบ (สมบูรณ์และคณะ,2530) บางเชื้อสามารถสร้างรงควัตถุสีเหลือง ส้ม สนิมเหล็ก หรือแดงอิฐ เป็นพวกที่ต้องการอาหารซับซ้อน ทั้งกรดอะมิโน เปปไตด์ อนุพันธ์กรดนิวคลีอิควิตามิน เกลือแร่ กรดไขมันหรือเอสเตอร์ของกรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะมีความจำเพาะต่อความต้องการอาหารที่แตกต่างกัน สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 2-53 องศาเซลเซียส แต่เจริญเติบโตได้ดี และเหมาะสมที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 5.5-6.2 แต่เชื้อก็สามารถเจริญอยู่ได้ที่ พีเอช 5.0 หรือต่ำกว่านี้ได้ อัตราการเจริญจะลดลงที่ภาวะเป็นกลาง หรือเป็นด่าง โมลร้อยละของ G+Cของ DNA อยู่ในช่วง 32-53 (Bd,Tm)

แบคทีเรียพวกนี้แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม

1) พวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Homofermentative) ซึ่งเป็นพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ โดยทั่วไปร้อยละ 85 หรือมากกว่า และผลพลอยได้อื่นๆ ซึ่งพวกนี้จะหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมล เป็นกรดแลคติก 1.8 โมล และได้กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย ได้แก่ *L.delbrueckii* , *L.leichmanii* , *L.jensenii* , *L.lactis* , *L.bulgaricus* , *L.helveticus* , *L.acidophilus* , *L.salivarus* , *L.casei* , *L.xylosus* , *L.plantarum* , *L.curvatus* , *L.coryniformis* , *L.homohiochii* (สมใจ,2537)

2) พวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (Heterofermentative) ซึ่งเป็นพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติกประมาณร้อยละ50 นอกจากนั้นให้คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอะซิติก และเอทานอลมากกว่ากลุ่ม Homofermentative ซึ่งจะหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมล แล้วสร้างกรดแลคติกได้น้อยกว่า 1.8 โมล (สมบูรณ์และคณะ,2530) ได้แก่ *L.fermentum* , *L.cellobiosus* , *L.brevis* , *L.buchneri* , *L.viridescens* , *L.copeophilus* (สมใจ,2537)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2 แสดงกระบวนการแมทอบอลิซึมน้ำตาลของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลักษณะของเชื้อสกุล *Pediococcus*

เชื้อสกุล *Pediococcus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0-2.0 ไมครอน มักเรียงตัวเป็น 4 เซลล์แต่ในบางครั้งอาจอยู่เป็นคู่บ้าง มีโอกาสน้อยมากที่จะพบอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก Facultative anaerobic bacteria เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารครบถ้วน (Nutritionally rich media) สามารถหมักคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และโมเลกุลคู่ได้ สารหลักคือ DL หรือ L(+)-lactate ไม่ผลิตแก๊สจึงจัดเป็น Homofermentative lactic acid bacteria บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catatase) ซึ่งเป็นประโยชน์ในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไม่รีดิวส์ไนเตรต สามารถสร้างสารปฏิชีวนะจำพวกแบคทิริโอซินยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโรคได้อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต คือ 25-40 องศาเซลเซียส ไม่ก่อโรคต่อพืช และสัตว์

Pediococcus pentosaceousc และ *Pediococus acidilactici* จะมีลักษณะโดยทั่วไปเป็นเซลล์รูปกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือสี่เซลล์ติดกัน(Tetrad)อยู่เดี่ยวๆหรือเป็นพันธุ์ที่พบน้อยมาก ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่มีการสร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก เป็นจุลินทรีย์พวกที่หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดร้อยละ 0.5-0.9 ส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก ซึ่งเป็นการหมักแบบโฮโมแลคติก และเป็นพวกที่ต้องการออกซิเจนเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (Facultative anaerobic) แบคทีเรียเหล่านี้จะให้ผลลบ(Negative)ใน catalase activity, gelatin hydrolysis, nitrate reduction, slime formation จากน้ำตาลซูโครส, citrate utilization, มีการผลิตกรด และมีการรีดักชันของ limus milk และการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ จะเจริญได้จะต้องมีอาหารที่ซับซ้อนและเจริญได้ดีในที่มีเกลือร้อยละ 10-12

ตารางที่ 1 แหล่งอาหารหมักที่พบ *Pediococcus* spp.

Species	**แหล่งที่พบ**
Pediococcus pentosaceus	ปลาส้ม, ส้มฟัก, แหนม, ไส้กรอก
Pediococcus acidilactici	แหนม
Pediococcus halophilus	ปลาร้า, ปลาจ่อม, น้ำปลา, ไตปลา, กุ้งจ่อม, น้ำบูดู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การควบคุมสภาวะระหว่างการเพาะเลี้ยง

1) อุณหภูมิ ต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพราะมีต่อการเจริญเติบโต และสร้างเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์

2) ระดับพีเอชถึงแม้แบคทีเรียแลคติกจะเจริญได้ที่ระดับพีเอชในค่อนข้างกว้าง(pH 4.0-7.5) แต่พีเอชที่เหมาะสมโดยทั่วๆไปจะอยู่ในช่วงประมาณพีเอช 6.0-6.5 และเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติก ทำให้พีเอชของอาหารลดลงอย่างรวดเร็วจึงจำเป็นต้องคอยปรับพีเอชให้สูงขึ้น การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรดนั้นนอกจากการเจริญเจริญจะช้าลงแล้ว ยังมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อในขณะเก็บ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดมากๆ เซลล์บางส่วนจะบาดเจ็บ และไม่สามารถดำเนินกิจกรรมการหมักได้ทันที นอกจากนี้ยังมีส่วนช่วยควบคุมทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดมี optimum pH ต่างกัน มีความสามารถในการทนความเป็นกรดได้ต่างกัน

1) ออกซิเจน แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย (Microaerophile) ซึ่งสามารถใช้สารอาหารด้วยกระบวนการหมักในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย และปริมาณออกซิเจนยังมีผลต่อการเจริญเติบโต และสร้างเอนไซม์ของเชื้อจุลินทรีย์

การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆโดยแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติกที่ช่วยในการถนอมอาหาร นอกจากกรดแลคติกที่มีผลในการถนอมอาหารแล้วยังสามารถสร้างสารอีกหลายชนิดในกระบวนการหมัก ซึ่งมีผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ ดังนั้นการที่อาหารหมักสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานนั้นจึงมิใช่เพียงกรดแลคติกทำให้พีเอชอาหารลดลงเท่านั้นแต่สารอีกหลายอย่างที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักก็มีส่วนช่วยในการถนอมอาหารด้วย สารเหล่านี้ได้แก่

1. **กรดอินทรีย์**

การสะสมของกรดอินทรีย์ซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงในช่วงเริ่มต้นของการหมักจะมีผลต่อจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถทนกรด เช่น *Bacillus* sp., *Escherichia coli* ,*Pseudomonas* sp. เป็นต้น กรดอินทรีย์จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยการยับยั้งกระบวนการเมตาโบลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้และแตกตัวเป็นไอออนภายใน ทำให้ระดับความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ลดน้อยลง หรืออาจเกิดปฏิกิริยากับเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์นั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม ในระหว่างการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีอากาศโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน ซึ่งอาจเกิดได้หลายทางดังปฏิกิริยา

1) $Pyruvate + O_2 + PO^3{}_4^- \xrightarrow{\text{pyruvate oxidase}} acetyl\ phosphate + CO_2 + H_2O_2$

2) $Lactate + O_2 \xrightarrow{\text{L-lactate oxidase}} pyruvate + H_2O_2$

3) $Lactate + O_2 \xrightarrow{\text{NAD-independent D-lactate dehydrogenase}} pyruvate + H_2O_2$

4) $NADH + H^+ + O_2 \xrightarrow{\text{NADH oxidase}} NAD + H_2O_2$

5) $O_2^- + 2H + Mn^2 + \xrightarrow{\text{nonenzymatic superoxide reduction}} H_2O_2 + Mn^{2+}$

รูปที่ 3 แสดงการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในกระบวนการแมทอบอลิซึมของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก จะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหาร เพราะแบคทีเรียแลคติกไม่มีเอนไซม์คะตาเลสที่จะเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลิทรีย์นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นกลายเป็นสารที่ยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น ในน้ำนมดิบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไทโอไซยาเนต (Thiocyanate) โดยมีเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase) เป็นตัวเร่งได้ผลิตผลที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. **ไดอะเซทิล** (Diacetyl)

ไดอะเซทิลมีชื่อทางเคมีว่า 2,3-butanediol เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวตที่เป็นสารตัวกลาง(Intermediate) ไดอะเซทิลมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการทำเนยเพราะเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก ไดอะเซทิลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด โดยที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ส่วนแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นยีสต์ และแบคทีเรียแกรมลบ จะมีความไวต่อไดอะเซทิลมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก

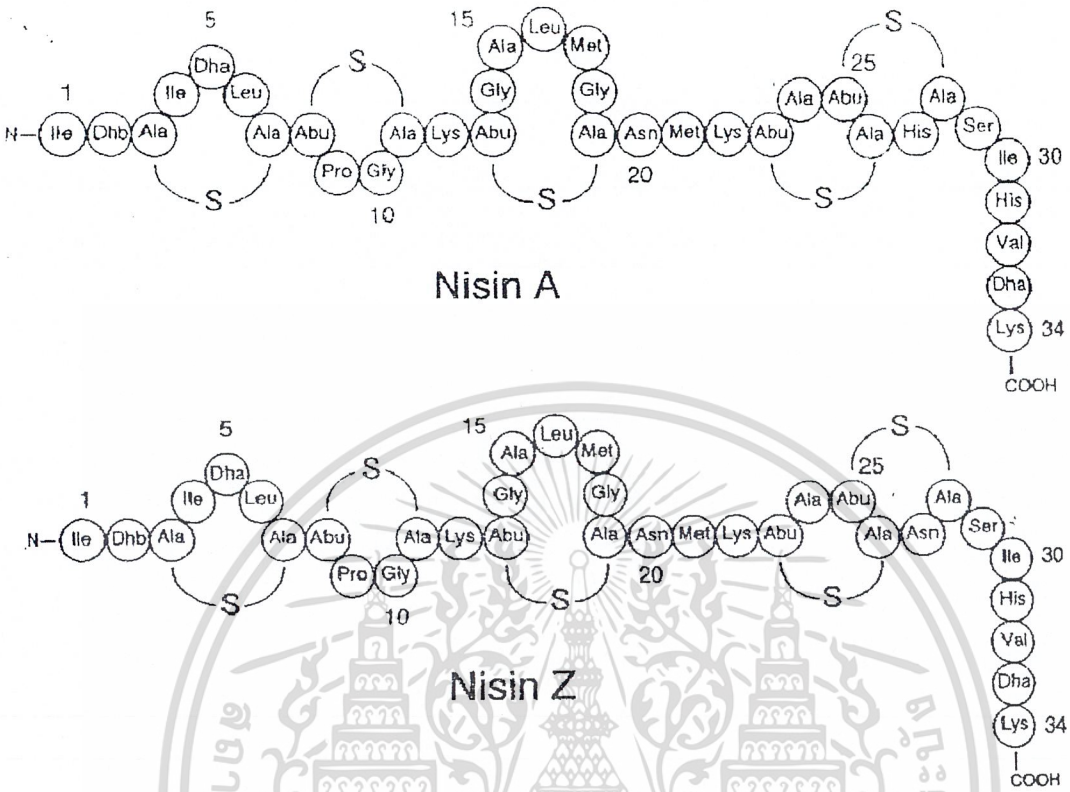
4. **แบคทีริโอซิน** (Bacteriocin)

แบคทีริโอซิน คือสารโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็ว จัดเป็นสารต่อต้านจุลชีพ(Antimicrobial substance)มีขนาดใหญ่กว่าสารปฏิชีวนะ และมีฤทธิ์ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่จำเพาะ (Tagg,1976) แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างกันไปในแง่ของการทำลาย กลไกการทำงาน และสมบัติทางเคมีที่ต่างกัน

แบคทีริโอซินผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Lactobacillus fermentum* , *L. helveticus* , *L. acidophilus* , *L. plantarum* , *L. sake* , *L. curvatus* , *Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus acidilactici, P. pentosaceus* และ *P. damnosus* เป็นต้น ซึ่งมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Listeria monocytogenes* ดังนั้นแบคทีริโอซินจึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหาร

แบคทีริโอซินที่ได้รับการยอมรับจาก GRAS (Generally Recognized as Safe)ผลิตจากแบคทีเรียพวก *Lactococcus lactis* serological group N ที่เรียกว่า nisin (ได้มาจาก group N-inhibiting substance) มีการนำไปใช้ในอุตสาหกรรมถนอมอาหารมากที่สุด พบว่า nisin สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น Lactococci , Bacillus , Micrococci , *Staphyiococcus aureus* , *Listeria monocytogenes* และสามารถป้องกันการงอกของสปอร์ของ *Clostridium botulinum* (Hurt, 1983) สามารถทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10นาที ทนต่อเอนไซม์โปรเนส , ทริปซินในสภาวะที่เป็นกรดแต่ถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ไคโมทริปซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4 แสดงโครงสร้างของไนซิน A และ ไนซิน Z

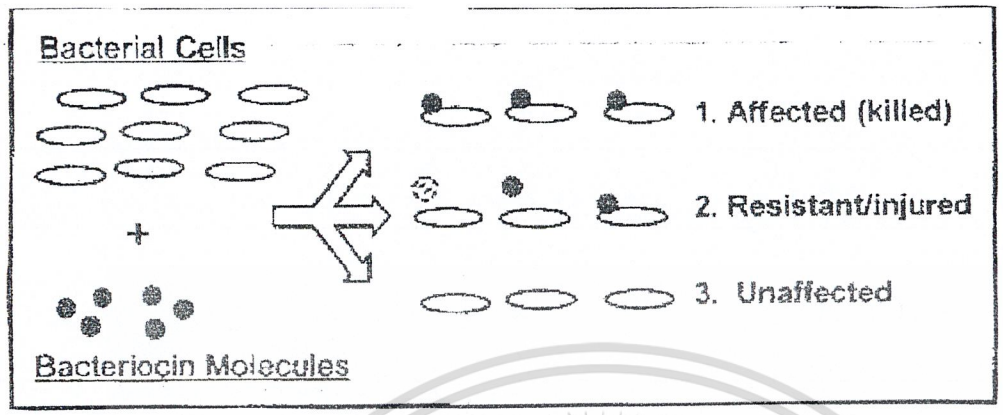
สารต่อต้านจุลชีพที่เราใช้ในการถนอมอาหารอาจจะทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์หรือทำลายจุลินทรีย์(Bacteriostatic or bacteriocidal) ลักษณะในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลชีพอาจแบ่งได้เป็น

1) การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ (Cell membrane) ทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออก (Permeability) และทำให้ลักษณะของเซลล์เสียความสมดุลไป โดยปกติสารต่อต้านจุลชีพจะทำปฏิกิริยาที่บริเวณไม่จำเพาะบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สูญเสียความสามารถในการทำงาน เช่น ความสามารถในการต่อต้านของสารจุลชีพที่มีลักษณะเป็น hydrophobic compounds จะจำกัดการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารต่อต้านจุลชีพชนิดนี้สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ในชั้น lipopolysaccharide ได้ง่าย

2) ทำให้เอนไซม์บางชนิดทำงานไม่ได้

3) ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่าง หรือหน้าที่ไปจากเดิม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 แสดงผลของแบคเทอริโอซินต่อการทำลายผนังเซลล์ของแบคทีเรีย

1. Affected cell มีผลในการทำลายเซลล์ของแบคทีเรีย
2. Resistant cell มีผลในการยับยั้งการทำงานของแบคทีเรีย
3. Unaffected cell ไม่มีผลต่อเซลล์ของแบคทีเรีย

จากการทดลองของ Gandhi และ Nambudriped (1990)โดยใส่ *L. acidophilus* R ในหางนม (Skim milk)ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นแยกเชื้อออกแล้วนำส่วนใส (Supernatant) มาสกัดสารต้านจุลชีพด้วยเมทานอลและอะซิโตน ทำให้บริสุทธิ์ได้ด้วย Sephadex-G 25 gel filtration พบว่าสารบริสุทธิ์ที่ได้สามารถยับยั้งการเจริญของ *E.coli, Micrococcus flavus, Staphylococcus aureus* และ *Salmonella weltevreden* ซึ่งสารต้านจุลชีพชนิดนี้จะมีความเสถียรที่ระดับพีเอชต่ำๆและทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

Hoover , D.G. (1992) ได้ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่าจาก *L. acidophilus* จำนวน 13 สายพันธุ์ ที่นำมาศึกษา มีเพียง 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* , *S. aureus* , *E. coli* และ *Salmonella* spp. คณะผู้วิจัยได้วิเคราะห์และสกัดสารยับยั้งดังกล่าวในน้ำเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* AR1 ซึ่งแยกเอาเซลล์ออก แล้วนำมาตกตะกอนโดยแอมโมเนียซัลเฟต และทำให้บริสุทธิ์ด้วย Sephadex G-100 gel filtration พบว่าสารบริสุทธิ์ที่แยกได้ คือโปรตีนซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 5200 เป็นสารที่มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส สารจะมีความเสถียรอยู่ถึง 6 สัปดาห์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีนชนิดนี้จะถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ทริปซิน (Trypsin) หรือ เปปซิน (Pepsin) และยังพบว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นมีค่าประมาณ 4.0-5.5

Reddy และ Ranganathan (1993)ได้สกัดสารยับยั้งเชื้ออื่น ซึ่งผลิตโดย *Streptococcus diacetyiactic* ด้วยเอทานอล และเมื่อผ่าน Sephadex G-15 เวลา 20 นาที นอกจากนั้นยังสามารถเก็บที่อุณหภูมิ –25 องศาเซลเซียสได้ และDowex 50 Wx8 สารดังกล่าวจะถูกแยกออกเป็น 3 ส่วน โดยแต่ละส่วนจะพบสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ซึ่งปรากฏว่าในส่วนที่หนึ่งจะมีสารยับยั้งเหล่านี้ในปริมาณมากที่สุด สารนี้จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์เปปซินหรือทริปซิน พบว่าสารนี้มีน้ำหนักโมเลกุล 385 ดาลตัน(Dalton) และเป็นสารที่เสถียรต่อความร้อนในระดับอุณหภูมิ 121-125 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-60 นาที ที่พีเอชระหว่าง 3.0-9.0

จากการทดลอง Fernandez (1994) แยกเชื้อ *Streptococcus* spp., *Leuconostoc* spp. และ *Lactobacillus* spp. จากเนยแข็งและนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ดังต่อไปนี้ *S. aureus, Salmonella* spp., *Shigella* spp. เมื่อแบคทีเรียแลคติกมีปริมาณมากเป็น 30 เท่าของจุลินทรีย์ดังกล่าว พบว่า *Streptococcus* spp. จะยับยั้งเชื้อเหล่านี้ได้สมบูรณ์ ในขณะที่ *Leuconostoc* spp. และ *Lactobacillus* spp. จะยับยั้งได้บ้าง แต่เมื่อแบคทีเรียแลคติกมีปริมาณน้อยกว่าจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งประมาณ 3-4 เท่า จะพบว่า *Streptococcus* spp. ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Shigella* spp. และเกือบทุกสายพันธุ์ของ *Streptococcus* spp. จะยับยั้งการเจริญ *S. aureus* และ *Salmonella* spp. ในขณะที่ *Leuconostoc* spp. และ *Lactobacillus* spp . จะยับยั้ง 3 ชนิดดังกล่าวได้น้อยกว่า

Kim (1994) ทดลองเลี้ยง *L. acidophilus* ในน้ำมะเขือเทศและพบการผลิตสารยับยั้งเชื้ออื่นซึ่งสามารถสกัดออกจากน้ำมะเขือเทศได้โดยใช้เมทานอลและเอทานอล จากนั้นนำสารนี้มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธี gel filtration บน Sephadex G-50 สารบริสุทธิ์ที่ได้จะมีค่าพีเอช 2.0 และมีความเสถียรต่อความร้อนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แต่ความสามารถยับยั้งเชื้ออื่นจะถูกทำลายเมื่อระดับพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 7.0

Choi และคณะ (1995) พบว่า *Lactobacillus casei* ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว MRS หรือน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียดังกล่าว สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคทุกชนิดที่ทดสอบซึ่งได้แก่ *S. typhi* , *S. typhimurium* , *Shigella flexneri* , *Sh. dysenteriae* , *E. coli* , *Klebsiella pneumoniae* และ *Pseudomonas aeruginosa* ในการศึกษานี้สรุปได้ว่า นอกจากกรดแล้วจะไม่พบการยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคเหล่านี้

จากการศึกษาของ Lai (1996) ได้เติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงในน้ำนมพาสเจอไรซ์ในปริมาณ 50 100 200 และ 300 ppm นำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Enterobacter aerogenes* , *Escherichia coli* , *Streptococcus lactis* , *Lactobacillus bulgaricus* ,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bulgaricus , *Salmonella typhosa* , *Staphylococcus aureus* , *Bacillus subtilis* และ *B.cereus* โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิห้อง พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่ทั้ง 8 ชนิดดังกล่าวได้ ซึ่งอัตราการทำลายจะมากหรือน้อยขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ที่ถูกทำลาย ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และระยะเวลาที่ใช้ในการทำลาย (Contact time) คณะผู้วิจัยได้รายงานว่าในบรรดาจุลินทรีย์ทั้ง 8 ชนิดนี้ *Enterobacter aerogenes* และ *Escherichia coli* จะถูกทำลายได้มากที่สุด ซึ่งการยับยั้งจะสมบูรณ์ในเวลา 120 นาที เมื่อมีปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในน้ำนมตั้งแต่ 200 ppm ขึ้นไป ส่วนการทำลาย *Streptococcus lactis* และ *Lactobacilus bulgaricus* โดยสารนี้จะเป็นไปอย่างช้าๆ และไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวได้อย่างสมบูรณ์ แม้ว่าจะใช้ระยะเวลายับยั้งนานถึง 240 นาทีก็ตาม สำหรับการทำลาย *S . typhosa* , *S . aureus* , *B . subtilis* และ *B . cereus* โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นั้นจะพบว่า *S . typhosa* ถูกทำลายได้มากที่สุด รองลงมาคือ *S . aureus* ส่วน *B.subtilis* และ *B. cereus* จะถูกทำลายน้อยที่สุด

Lee และ Kim (1996) รายงานว่า nisin เข้มข้น 200 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus thermophilus* ATCC 10987 ได้อย่างสมบูรณ์เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS และพบว่าสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆเช่น *L. bulgaricus* , *L. casei* , *L. plantarum* , *L. helviticus* , *L. acidophilus* , *B. subtilis* , *B. megaterium* , *B. coagulans* และ *S. aureus* นอกจากนี้ nisin ยังทำให้การงอกของสปอร์ *B.subtilis* ลดลง และเมื่อมีสารนี้เข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะให้ความทนทานต่อความร้อนของสปอร์ที่อยู่ในหางนมลดลงด้วย คณะผู้วิจัยยังรายงานว่า เมื่อเติมสารนี้ลงในน้ำนมพาสเจอไรซ์ จะทำให้น้ำนมเก็บได้นานขึ้น ซึ่งสามารถเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ เป็นเวลา 32 วัน และเก็บที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ได้เพียง 2 วันเท่านั้น ในขณะที่ *Lactobacillus* spp. และ *Leuconostoc* spp. จะยับยั้งได้บ้าง แต่เมื่อแบคทีเรียแลคติคมีปริมาณน้อยกว่าจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้ง 3-4 เท่า จะพบว่า *Streptococcus* sp ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Shigella* spp. และเกือบทุกสายพันธุ์ของ *Streptococcus* sp จะยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ Salmonella spp. ในขณะที่ *Lactobacillus* spp. และ *Leuconostoc* spp. จะยับยั้ง 3 ชนิดดังกล่าวได้น้อยลง

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่ม propionibacteria ได้ถูกค้นคว้าเพื่อสังเคราะห์แบคทีริโอซิน แบคทีริโอซินเป็นโปรตีนที่ประกอบด้วยโมเลกุลใหญ่ (Macromolecules) ที่สามารถฆ่าแบคทีเรีย โดยการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane lysis) หรือยับยั้งกระบวนการในเซลล์ที่สำคัญ เช่น การสังเคราะห์โปรตีน หรือการสังเคราะห์ DNA แบคทีริโอซินหลายชนิดเช่น colicins ผลิตโดย *Escherichia coli* จะมีลักษณะเฉพาะในส่วนของโครงสร้าง,การสังเคราะห์,การแสดงออก (Mode of action) และตัวกำหนดทางพันธุกรรม (Genetic

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

determinants) สำหรับลักษณะเฉพาะในข้ออื่นๆ ส่วนใหญ่จะศึกษาในทางเคมี,ชีววิทยาโมเลกุล และการนำไปใช้งาน อย่างไรก็ตามได้มีความสนใจนำแบคทีเรียไปใช้ในอาหารสำหรับมนุษย์มากกว่าแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ ได้มีการนำสารโมเลกุลใหญ่ดังกล่าวไปใช้ในวิชาวิทยาศาสตร์และสารถนอมอาหารอย่างมากมาย หลายสิบปีที่ผ่านมาความก้าวหน้าทางการค้นคว้า แบคทีริโอซินส่งผลให้เกิดความเจริญเติบโตทางด้านสารถนอมอาหารและกระบวนการเป้าหมายของส่วนแบ่งทางเศรษฐกิจและเป็นทางเลือกใหม่แทนสารเคมีถนอมอาหาร

จุลินทรีย์ที่สำคัญในการผลิตแบคทีริโอซิน

จุลินทรีย์ที่สำคัญในการผลิตแบคทีริโอซิน ได้แก่

Lactococcus

- *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*
- *Lactococcus lactis* subsp. *diacetyactis*

Lactobacillus

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus helveticus*
- *Lactobacillus brevis*
- *Lactibacillus casei*
- *Lactobacillus plantarums*
- *Lactobacillus sake*

Leuconostoc

- *Leuconostoc gelidium*
- *Leuconostoc mesenteroides*

เริ่มจากการรายงานของ Klaenhommer (1988) เรื่องแบคทีริโอซิน จากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจนถึงปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าอย่างต่อเนื่อง ขอบเขตของการศึกษาได้แก่ การศึกษาทางด้านเคมี และชีววิทยาโมเลกุลของแบคทีริโอซินเพื่อที่จะพัฒนาไปใช้ในการถนอมอาหาร เช่น การนำแบคทีริโอซิน จาก *L. acidophilus* และ *L. helveticus* ทำให้บริสุทธิ์อย่างสมบูรณ์ และศึกษาการโคลนนิ่ง , หาลำดับยีนและ การแสดงออกของยีนที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือยีนต้านทานการทำงาน (Antagonistic activity) และยีนภูมิคุ้มกันการติดต่อ bacteriocinogenic ตัวอย่างจุลินทรีย์อื่นที่ได้รับการศึกษาและพัฒนากาารผลิตแบคทีริโอซิน ได้แก่ *L. casei* , *L. sake* , *L. brevis* , *L. gelidium* และ *L. mesenteroides* มีบางตัวอย่างที่ถูกนำไปพัฒนา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการนำแบคทีริโอซินเพื่อใช้เป็นสารป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารแบคทีริโอซินหลายชนิดจากแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ต้าน *L. monocytogenes* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคที่มักจะพบได้บ่อยในอาหารที่เก็บรักษาในตู้เย็น จุดมุ่งหมายของการป้องกันอาหาร รวมถึงการใช้แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ที่สามารถผลิตแบคทีริโอซิน ที่อุณหภูมิตู้เย็นได้ การศึกษาอื่นๆจะมุ่งเน้นไปที่ทำอย่างไรที่จะผลิตแบคทีริโอซิน ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารเช่น *Salmonella* sp. ที่ไวต่อการทำงานของ nisin โดยเติม EDTA เพื่อเร่งปฏิกิริยา ซึ่งจะไปทำให้เสถียรภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบลดลง นอกจากนี้ถ้าใช้ emulsifier เช่น tween 80 เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของ nisin ในการยับยั้ง *L. manocytogenes* ในน้ำนม

ซึ่งการค้นคว้าในอนาคตจะมุ่งเน้นไปทางด้าน การแสดงออกของการทำงานของแบคทีริโอซิน , การผลิตภูมิคุ้มกัน , การควบคุมการสังเคราะห์แบคทีริโอซินทางพันธุกรรม และวิศวกรรมโปรตีนของแบคทีริโอซิน การค้นพบแต่ละประเภทมีความสำคัญที่จะช่วยพัฒนาการนำแบคทีริโอซินไปใช้ในวิทยาศาสตร์ทางอาหารมากขึ้น

แบคทีริโอซินอีกชนิดหนึ่งที่คือ โคลิซิน (Colicin) ซึ่งผลิตจาก *Escherichia coli* และแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้นั้นจะแตกต่างกันที่ความเข้มข้น สำหรับเกณฑ์ที่ใช้ในการพิจารณาสารประกอบที่เป็นสารต้านแบคทีเรียที่ได้จากแบคทีเรียแกรมบวก โปรตีนที่ได้เป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีช่วงการออกฤทธิ์แคบ อย่างไรก็ตามแบคทีริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดก็มีช่วงการออกฤทธิ์กว้าง แบคทีริโอซินหลายชนิดจากแบคทีเรียแกรมบวกจะประกอบด้วยกรดอะมิโนหนึ่งชนิดหรือมากกว่านั้น ซึ่งในนั้นก็คือ แลนไธโอนีน (Lanthionin : Alanine-S-Alanine)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

การดำเนินการทดลอง

อุปกรณ์และสารเคมี

1) เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1 เครื่องแก้ว

1.1 หลอดทดลอง (Test tube)

1.2 หลอดทดลองฝาเกลียว (Scewcap tube)

1.3 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50,100,250,500 และ 1000 มิลลิลิตร

1.4 จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish or Plate)

1.5 ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 100,250 และ 500 มิลลิลิตร

1.6 ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 500 และ 1000 มิลลิลิตร

1.7 ปิเปต (Pipette) ขนาด 0.1,1,2,5,10 มิลลิลิตร และลูกยาง

1.8 บิวเรต (Buret) และขาตั้งบิวเรต

1.9 กรวยแก้ว (Funnel)

1.10 กระบอกตวง (Graduate cylinder) ขนาด 10 และ100 มิลลิลิตร

1.11 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.12 แท่งแก้ว (Stirring rod)

1.13 หลอดหยดสาร (Dropper)

2 บ่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

3 ที่ใส่หลอดทดลอง (Test tube rack)

4 ปากคีบ (Forcept)

5 ช้อนตักสาร (Spacular)

6 กระดาษฟอยล์ (Foil paper)

7 พาราฟิล์ม (Parafilm)

8 สำลี

9 ตะเกียงแอลกอฮอล์

10 เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 3 ตำแหน่ง)

11 กล้องจุลทรรศน์

12 กล้องจุลทรรศน์สำหรับถ่ายรูปเชื้อจุลินทรีย์ (Microscope with camera)

13 ตู้อบ (Hot air oven)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

14 ตู้เขี่ยเชื้อ (Larminar air flow)

15 ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

16 ตู้เย็น (Refrigirator)

17 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)

18 กระบอกใส่ปิเปต

19 ขวดน้ำกลั่น

20 กล่องใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

21 เครื่องวัดpH (pH meter)

22 เครื่องวัดการดูดกลืนของแสง(Spectrophotometer)

23 เครื่องหมุนเหวี่ยง(Centrifuge)

24 ดิสก์ (Disc) ทดสอบชนิดแผ่นบางขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มล.

2) สารเคมีและน้ำยาทดสอบ

1 ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (Phosphate buffer) พีเอช 7.0

2 นอร์มอลซาลีน (Normal saline) 0.85%

3 สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับความเป็นกรด-ด่าง

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) 1 N
- ไฮโดรคลอริก (Hydrochloric) 1 N

4 ชุดทดสอบแกรมสเตรน (gram's stian) ประกอบด้วย

- คริสตรอลไวโอเลต (Crystal violet)
- ไอโอดีน (Iodine)
- แอลกอฮอล์ 95%
- Safranin-O

5 Immersion oil

6 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณกรด

- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium Hydroxide) ความเข้มข้น 0.1 N
- Mixed indicator

7 พาราฟิน (Parafin)

8 กลีเซอรอล (Glycerol)

9 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide) ความเข้มข้น 3%

3) อาหารเลี้ยงเชื้อ

1 MRS agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

33511

2 MRS broth

3 nutrient agar (NA)

4 Nutrient broth (NB)

5 Tryptic soy agar (TSA)

6 Tryptic soy broth (TSB)

7 GYP agar

8 GYP broth

9 Buffer Peptone Water

10 Mannitol Salt Eggs Yolk agar

11 Brain Heart Infusion agar

12 Brain Heart Infusion broth

12 Salmonella-Shigella agar

13 Xylose Lysine Deoxycholate agar

14 Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) agar

15 Eosin Methlene Blue agar

16 Brilliant Green agar

4) **อาหารหมักต่างๆ จากแหล่งต่างๆ กัน**

1 แหนม

2 ไส้กรอกอีสาน

5) **เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ**

1 เชื้อแบคทีเรีย *Vibrio* sp.

2 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli*

3 เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus cereus*

4 เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

5 เชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนการดำเนินงาน

1) การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก และการทำเชื้อให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 2 แสดงตัวอย่างอาหารหมักและแหล่งที่มาในการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติก

ตัวอย่างอาหารหมัก	แหล่ง
แหนม	ตอนเมือง
แหนม	ขอนแก่น
ไส้กรอกเปรี้ยว	ตลาดซอยจินดา
ไส้กรอกเปรี้ยว	ตลาดหัวตะเข้

1.1 ใช้ 0.85%Normal saline ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 225 มิลลิลิตร

1.2 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ลงไปโดยวิธีปลอดเชื้อ

1.3 ทำการเจือจางเพื่อลดปริมาณของเชื้อตัวอย่างให้เจือจาง $1:10^2$, $1:10^3$, $1:10^4$ และ $1:10^5$

1.4 นำตัวอย่างที่เจือจางได้ที่ $1:10^3$, $1:10^4$ และ $1:10^5$ โดยดูดน้ำตัวอย่างอย่างละ 0.1 มล.ใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง GYP (GYP Agar + $CaCO_3$) แล้วใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ(เทคนิค Spread plate) บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-3 วัน

1.5 จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจะสร้างบริเวณใส (clear zone) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำการคัดเลือกเชื้อที่เฉพาะสร้างบริเวณใส (clear zone) ลงใน MRS broth ที่มี Glucose 1% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน

1.6 นำเชื้อที่ได้หลังจากการบ่มไว้แล้ว 3-4 วัน มา streak ใหม่อีกครั้งหนึ่งในอาหารแข็ง MRS (MRS agar) บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2วัน

1.7 นำไปตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์

การเก็บรักษาเชื้อ

1 Stab เชื้อลงใน MRS agar ที่มี $CaCO_3$ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บไว้ที่ 4-10 องศาเซลเซียส ในตู้เย็น

2 ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 0.5% บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บไว้ที่ 0 องศาเซลเซียส ในตู้เย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2) **การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ**

2.1 การเตรียมเชื้อที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์

- นำเชื้อที่แยกได้ และทำให้บริสุทธิ์แล้วมานำทำการเลี้ยงในอาหารMRS broth บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

- เชื้อทดสอบที่ใช้ ได้แก่ *Vibrio* sp.

Escherichia coli

Bacillus cereus

B. subtilis

Samonella sp.

Staphylococcus aureus

-นำเชื้อทดสอบมาเลี้ยงใน NB บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

-จากนั้นทำการเทอาหารลงในจานเลี้ยงเชื้อ โดยเติมเชื้อทดสอบลงไป 1% ของปริมาตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง

- นำกระดาษแผ่นดิสก์(Paper disk) ทดสอบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตรไปชุบส่วนใสในข้อ 1. 1 แล้วนำไปวางบนผิวหน้าของอาหารแข็งที่เตรียมไว้ในข้อ 1.2 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

- ตรวจสอบความสามารถโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone) ซึ่งจะเกิดเป็นบริเวณใส(Clear zone) รอบกระดาษแผ่นดิสก์

3.) **การศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ**

เลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth ที่มี Glucose 2% โดยจะทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทำการทดสอบทุกๆ 6 ชั่วโมง ตามหัวข้อดังนี้

3.1 Activity

นำเชื้อที่คัดเลือกมาทำการทดสอบดังข้อ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 พีเอช

นำเชื้อที่คัดเลือกวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วย pH meter

3.3 O.D.

นำเชื้อที่คัดเลือกวัดค่า O.D. ด้วยเครื่องSpectophotometer

3.4 ปริมาณกรด

นำเชื้อที่คัดเลือกวิเคราะห์หาปริมาณกรดโดยหยดMixed indicator แล้วนำมาทำการไตเตรตด้วย NaOH 0.1 N

4) การพิสูจน์เชื้อ (Identification)

นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา และลักษณะการเจริญสรีรวิทยา และชีวเคมี เพื่อเป็นแนวทางในการพิสูจน์แบคทีเรียแลคติกโดยการยึดแนวการจัดจำแนกแบคทีเรียตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol.9, William & Wilkin Co.,1994.

- ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เตรียมเชื้อโดยการเลี้ยงในอาหารMRS agar บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยว (single colony) มาตรวจสอบการติดการติดสีแกรม รูปแบบของเซลล์ ขนาด และการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

- การศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสรีรวิทยา และทางชีวเคมี

4.1 การศึกษาลักษณะการเจริญ

สังเกตลักษณะของโคโลนี รูปร่าง และขนาดของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งMRS agar บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา และทางชีเคมี

4.2.1 การทดสอบเอนไซม์ Catalase

นำลูป (loop) เขี่ยโคโลนีที่เจริญบนอาหาร MRS agar บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ลงบนสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลาย H_2O_2 3 % ลงบนโคโลนีของเชื้อทดสอบ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น ให้ผลบวกแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ catalase ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น ให้ผลเป็นลบแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์ catalase

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต

การเตรียมเชื้อ โดยการเลี้ยงในอาหารMRS agar บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 10,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสทิ้ง และทำการล้างเซลล์ด้วย Normal saline 0.85% 2-3 ครั้ง หลังจากนั้นนำเซลล์มาทำการทดสอบต่อไป คาร์โบไฮเดรตที่ใช้ทดสอบมี 16 ชนิด ได้แก่ Arabinose , Fructose , Lactose , Maltose , Manitol , Raffinose , Salicin , Sucrose , Rhamnose , Melezitose , Melibiose , Cellobiose , Sorbitol , Sorbose , Mannose , Glycerol โดยเติมลงไป 0.5% (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ตรวจผลการสร้างกรดโดยหยด Mixed indicator แล้วนำมาทำการไตเตรตด้วย NaOH 0.1N จนกระทั่งสารละลายสีแดงเปลี่ยนเป็นน้ำเงินสีเขียว

4.2.3 การทดสอบการสลาย Arginine

นำเชื้อที่เตรียม มาเลี้ยงในอาหาร Ariginine แล้วเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อ บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-7 วัน ถ้าสีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีแดง แสดงว่าเกิดแอมโมเนียขึ้น ผลการทดสอบเป็นบวก

4.2.4 การทดสอบการเจริญ โดยทดสอบจาก

- การเจริญที่ pH ต่างๆ ได้แก่ 4.0 , 4.5 , 5.0 , 5.5 และ 8.0
- การเจริญที่ความเข้มข้นของ NaCl ต่างๆ ได้แก่ 4% , 6% , 8% และ 10%
- การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 15 $^{\circ}$ C , 40 $^{\circ}$ C และ 50 $^{\circ}$ C

นำเชื้อที่เตรียมมาเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีคุณสมบัติข้างต้น เป็นเวลา 3-7 วัน ตรวจผลการสร้างกรดโดยหยด Mixed indicator แล้วนำมาทำการไตเตรตด้วย NaOH 0.1 N จนกระทั่งสารละลายสีแดงเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเขียว

5) การทดสอบการยับยั้งของสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากอาหารหมัก ในสภาวะต่าง ๆ

- การทดสอบการยับยั้งของสารยับยั้งจุลชีพที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่างๆที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติลงในอาหารเหลว MRS บ่มไว้ที่ 37 $^{\circ}$ C เป็นเวลา 24 ชม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ถ่ายเชื้อทดสอบ ทั้ง 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ลงในอาหาร NB บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

3. ปิเปตเชื้อทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. เทอาหารแข็ง NA ลงไป ใช้เทคนิค pour plate

4. ใช้ดิสก์ชุบสารยับยั้งจุลชีพที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว MRS วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบทำเชื้อละ 3 ซ้ำ

5. บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. วัด clear zone ที่เกิดขึ้น

- การทำสอบการยับยั้งของสารยับยั้งจุลชีพที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการกรองเอาเซลล์ของจุลินทรีย์ออกไปแล้ว

1. ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติลงในอาหารเหลว MRS บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

2. ถ่ายเชื้อทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ลงในอาหาร NB บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

3. ปิเปตเชื้อทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. เทอาหารแข็ง NA ลงไป ใช้เทคนิค pour plate

4. กรองเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกออกจากอาหารเหลว MRS โดยใช้เซลลูโลสไนเตรต (cellulose nitrate) ขนาด 0.45 μm.

5. ใช้ดิสก์ชุบสารยับยั้งดังกล่าว วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบ ทำเชื้อละ 3 ซ้ำ

6. บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. วัด clear zone ที่เกิดขึ้น

- การทดสอบการยับยั้งของสารยับยั้งที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการต้ม 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1. ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติลงในอาหารเหลว MRS บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ถ่ายเชื้อทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ลงในอาหาร NB บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

3. ปิเปตเชื้อทดสอบลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. เทอาหารแข็ง NA ลงไป ใช้เทคนิค pour plate

4. นำอาหารเหลว MRS ที่มีสารยับยั้งมาต้มให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. ใช้ดิสก์ชุบสารยับยั้งดังกล่าว วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบ ทำเชื้อละ 3 ซ้ำ

6. บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. วัด clear zone ที่เกิดขึ้น

6) การทำการทดลองชุดควบคุม (Control)

- การทดสอบอาหารเหลว MRS ที่ปราศจากเชื้อ

1. ปิเปตเชื้อทดสอบลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มล. เทอาหาร NA ลงไป ใช้เทคนิค pour plate

2. ใช้ดิสก์ชุบอาหารเหลว MRS ที่ปราศจากเชื้อ วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้ออาหาร NA ที่มีเชื้อทดสอบ ทำซ้ำเชื้อละ 3 ซ้ำ

3. บ่มไว้ 1 วัน วัด clear zone ที่เกิดขึ้น

- การทดสอบความเข้มข้นของกรดแลคติกที่มีความเข้มข้น 1%

1. ปิเปต เชื้อทดสอบลงใน plate 1 มล. เทอาหาร NA ลงไป ใช้เทคนิค pour plate

2. ใช้ดิสก์ชุบกรดแลคติกที่มีความเข้มข้น 1% วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่มีเชื้อทดสอบทำซ้ำเชื้อละ 3 ซ้ำ

3. บ่มไว้ 1 วัน วัด clear zone ที่เกิดขึ้น

- การทดสอบความเข้มข้นของกรดแลคติกที่มีความเข้มข้น 2%

1. ปิเปตเชื้อทดสอบลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate) 1 มล. เทอาหาร NA ลงไป ใช้เทคนิค pour plate

2.ใช้ดิสก์ชุบกรดแลคติกที่มีความเข้มข้น 2% วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุ อาหาร NA ที่มีเชื้อ ทดสอบทำซ้ำเชื้อละ 3 ซ้ำ

3. บ่มไว้ 1 วัน วัด clear zone ที่เกิดขึ้น

- การทดสอบความเข้มข้นของกรดแลคติก ที่มีความเข้มข้น 3 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ปิเปตเชื้อทดสอบ ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate) 1 มล. เทอาหาร NA ลงไป ใช้เทคนิค pour plate

2. ใช้ดิสก์ ชุบกรดแลคติกที่มีความเข้มข้น 3% วางลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่บรรจุอาหาร NA ที่มีเชื้อทดสอบทำซ้ำเชื้อละ 3 ซ้ำ

3. บ่มไว้ 1 วัน วัด clear zone ที่เกิดขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก การทำเชื้อให้บริสุทธิ์

ตารางที่ 3 แสดงจำนวนและลักษณะเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมัก

ตัวอย่างอาหาร	แหล่ง	จำนวนเชื้อที่แยกได้	
		Rod	Cocci
แหนม	ดอนเมือง	10	-
แหนม	ขอนแก่น	14	6
ไส้กรอกเปรี้ยว	ตลาดซอยจินดา	7	-
ไส้กรอกเปรี้ยว	ตลาดหัวตะเข้	11	8

ทำการแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักข้างต้น โดยการเลี้ยงในอาหาร MRS Agar Plate ที่มี Glucose 2% พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจากแหล่งต่างได้ทั้งหมด 56 สายพันธุ์

จากตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่า แหนมดอนเมือง และไส้กรอกเปรี้ยวตลาดซอยจินดา จะไม่พบจุลินทรีย์ที่มีลักษณะรูปร่างกลม (Cocci) ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องมาจากระยะเวลาการหมักของอาหารหมัก ซึ่งมีผลต่อการควบคุมชนิดของจุลินทรีย์ และจากทฤษฎีเราพบว่า ในระยะของการหมัก *Pediococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมจะเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว ส่วน *Lactobacillus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียรูปร่างแท่งจะเจริญเติบโตช้า หลังจากการหมักแล้วประมาณ 3 วัน *Pediococcus* sp. เจริญเติบโตช้าลง และในที่สุดจะหยุดการเจริญ แต่ *Lactobacillus* sp. จะเจริญเติบโตมากขึ้นเรื่อยๆ (พวงพร,2530) ดังนั้นถ้าทำแยกเชื้อในอาหารหมักที่ได้ผ่านกระบวนการหมักหลายๆ วัน จะมีโอกาสพบแบคทีเรียรูปแท่งมากกว่า ปัจจัยที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งในการกำหนดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในอาหารหมัก ก็คือชนิดของอาหารหมักนั่นเอง ดังนั้นจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเจริญในอาหารหมักแต่ละชนิดนั้นจึงแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงความสามารถของบริเวณใส(Clear Zone) ที่สารยับยั้งถูกผลิตมาทำปฏิกิริยากับ$CaCO_3$

เชื้อที่แยกได้	ความกว้างของบริเวณใส (ซม.)
D1	0.90
D2	0.80
D3	0.95
D4	0.90
D5	1.15 *
D6	0.70
D7	0.95
D8	0.80
D9	1.00
D10	0.90
K1	0.80
K2	0.85
K3	0.90
K4	0.95
K5	0.90
K6	0.80
K7	1.20*
K8	1.10*
K9	1.00
K10	1.00
K11	0.90
K12	0.85

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อที่แยกได้	ความกว้างของบริเวณใส (ซม.)
K13	0.75
K14	0.70
K15	0.90
K16	0.95
K17	0.70
K18	1.10
K19	1.05
K20	1.20*
J1	1.20*
J2	0.80
J3	0.90
J4	0.95
J5	1.00
J6	1.30*
J7	0.70
H1	0.85
H2	0.75
H3	0.90
H4	0.60
H5	0.65
H6	0.75
H7	0.50
H8	0.80
H9	0.70
H10	0.60
H11	0.75
H12	0.70
H13	0.90
H14	1.05
H15	1.20*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อที่แยกได้	ความกว้างของบริเวณใส (clear zone)
H16	1.10
H17	1.30*
H18	1.00
H19	1.05

หมายเหตุ

1) * = เชื้อที่จะนำมาคัดเลือกผลิตสารยับยั้งจุลชีพ เนื่องจากเกิด Clear zone กว้างนำเชื้อทั้งหมดที่ได้ 7 สายพันธุ์ดังนี้ J6, J1, K20, D5, K7, H15, H17

1) แหนมจากดอนเมือง ใช้สัญลักษณ์ **D**

แหนมจากขอนแก่น ใช้สัญลักษณ์ **K**

ไส้กรอกเปรี้ยวจากตลาดซอยจินดาใช้สัญลักษณ์ **J**

ไส้กรอกเปรี้ยวจากตลาดหัวตะเข้ ใช้สัญลักษณ์ **H**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การพิสูจน์เชื้อ

ตารางที่5 แสดงลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติก

ลักษณะ	J6	J1	K20	D5	K7	H15	H17
Cell form	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Cocci	Cocci
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+
Catalase test	-	-	-	-	-	-	-
Aesculin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-
Arginine hydrolysis	-	-	-	-	-	+	-
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°C	-	-	+	-	-	+	-
Growth at 40°C	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 50°C	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5.5	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+
Growth in NaCl 4%	+	+	+	+	+	+	+
Growth in NaCl 6%	+	-	+	+	+	+	+
Growth in NaCl 8%	-	-	-	-	-	-	-

+ = Positive reaction

- = Negative reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 แสดงการสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต

ลักษณะ	J6	J1	K20	D5	K7	H15	H17
Arabinose	-	-	-	+	+	+	-
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	-	+	-	+	+	+	-
Glycerol	+	+	+	+	-	+	+
Lactose	-	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	-	-	-	+	-	-
Melezitose	-	+	-	-	-	+	-
Melebiose	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	+	-	-	-	-	+	-
Rhamnose	+	-	-	-	+	-	-
Salicin	+	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	+	-	-	-	-	-	-
Sorbose	-	+	+	+	+	-	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+

+ = Positive reaction

- = Negative reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การพิสูจน์ชนิดของแบคทีเรียนี้อ้างอิงการจัดจำแนกตามหนังสือ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Vol.9 ,(Holt และคณะ,1994) ซึ่งสามารถแบ่งได้ดังนี้ J6 , J1 , K20 , D5 , K7 , H15 และ H17 จัดเป็นพวก Homofermentative และเมื่อนำมาทำการพิสูจน์เชื้อจะได้ผลดังนี้

J6, J1, K20, D5 และ K7 เป็นเชื้อที่มีรูปร่างแท่ง ติดสีแกรมบวก ไม่มีเอนไซม์ catalase จึงไม่สลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนมากจะเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และไม่สามารถไฮโดรไลซ์ Aesculin ส่วนการใช้น้ำตาลนั้นได้แสดงไว้ในตารางที่ 5

H15 และ H17 เป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลม เรียงตัวแบบ Tetrad หรืออยู่กันแบบเป็นคู่ ติดสีแกรมบวก ไม่มีเอนไซม์ catalase ส่วนมาจะเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และไม่สามารถไฮโดรไลซ์ Aesculin แต่ H15 สามารถสร้างแอมโมเนียจาก Arginine ได้

ผลการศึกษาลักษณะต่างๆ ของเชื้อดังกล่าว โดยอ้างอิงการจัดจำแนกตามหนังสือ The Prokaryotes A handbook on the Biology of Bacteria : Ecophysiology,Isolation , Identification , Application , Second Edition.(1994) ได้ดังนี้ J6, J1, K20, D5 และ K7 เป็นเชื้อ *Lactobacillus* spp. ส่วน H15 และ H17 เป็นเชื้อ *Pediococcus* spp.

3. การทดสอบการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกต่อเชื้อทดสอบ

เชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่

- *Vibrio* sp.
- *E. coli*
- *Staphylococcus aureus*
- *Bacillus cereus*
- *Bacillus subtilis*
- *Salmonella* sp.

การทดสอบจะใช้วิธีวัดความกว้างของบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น จากการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติก โดยกำหนดสภาวะในการทดลองดังนี้

1.1 ผลการทดสอบการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบอาหารเหลว MRS ที่มีแบคทีเรียแลคติกเจริญอยู่

ผลความกว้างของบริเวณใส (clear zone) ที่แสดงถึงการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ต่อเชื้อทดสอบ ดังตารางที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งจากตารางที่ 7 ผลการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติ คือ J6, J1, K20, D5, K7, H15 และ H17 ที่เจริญในอาหาร MRS ต่อเชื้อทดสอบ 6 ชนิด คือ *Vibrio* sp. , *Bacillus subtilis* , *Bacillus cereus* , *Salmonella* sp. , *E. coli* และ *Staphylococcus aereus* พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 6 ชนิดได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J6 และ H17 สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis* ได้ดี โดยสังเกตจากขนาดของ clear zone ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางถึง 3.2 เซนติเมตร

ตารางที่ 7 แสดงผลการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบอาหารเหลว MRS ที่มีแบคทีเรียแลคติก

	J6	J1	K20	D5	K7	H15	H17
Vibrio sp.	1.60	0.90	1.00	1.00	1.20	0.7	1.95
	1.40	0.80	1.00	1.00	1.40	0.75	1.7
	1.10	0.80	1.00	1.00	1.10	0.85	1.8
E. coli	0.85	1.40	0.80	1.00	1.00	0.95	0.90
	0.75	1.50	1.00	1.00	1.10	1.05	1.10
	0.80	1.60	1.00	1.00	0.95	1.00	1.00
Staphylococcus	1.20	1.00	1.00	0.90	0.90	0.80	0.90
aureus	1.10	1.20	0.80	0.90	0.90	1.15	0.90
	1.10	1.20	1.00	0.80	1.10	1.00	0.90
Bacillus cereus	1.70	1.50	0.90	1.00	1.05	1.00	0.75
	1.80	1.20	1.00	0.90	0.90	1.00	0.80
	1.90	1.50	1.00	1.00	1.10	1.05	0.80
B. subtilis	3.00	1.10	0.90	0.80	0.90	0.90	2.50
	3.20	1.20	0.90	0.80	0.90	0.95	3.00
	3.10	1.10	0.80	0.85	0.95	1.00	2.70
Samonella sp.	1.10	1.00	1.00	1.00	1.50	1.00	1.00
	1.20	0.80	0.90	1.00	1.30	1.05	1.05
	1.00	1.00	0.90	1.15	1.10	1.20	1.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ผลการทดสอบของดิสก์ที่ชุบอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ผลความกว้างของบริเวณใส ที่แสดงถึงการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS และผ่านการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงผลการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

	J6	J1	K20	D5	K7	H15	H17
Vibrio sp.	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
E. coli	1.10	0.00	1.00	0.85	1.00	0.95	1.00
	1.00	0.00	0.95	1.00	0.95	0.75	1.00
	0.90	0.00	1.00	1.00	1.00	0.95	1.00
Staphylococcus	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
aureus	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
Bacillus cereus	1.15	0.00	1.05	0.85	1.00	0.80	1.00
	0.95	0.00	1.00	0.90	1.00	0.85	1.00
	1.00	0.00	0.85	1.05	0.85	1.00	1.00
B. subtilis	1.00	0.00	1.00	1.00	0.90	0.70	1.25
	1.10	0.00	1.00	0.85	1.00	1.00	0.95
	0.90	0.00	1.00	0.85	1.00	0.90	0.95
Samonella sp.	0.85	0.00	0.00	0.00	0.90	1.00	0.90
	0.95	0.00	0.00	0.00	0.80	0.80	1.00
	0.90	0.00	0.00	0.00	0.90	0.75	0.90

จากตารางที่ 8 เมื่อผ่านการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาทีแก่อาหารเหลว MRS ที่มีแบคทีเรียแลคติกเจริญอยู่ ความร้อนจะมีผลต่อการยับยั้งอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งพบว่าขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส (clear zone) จะลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J1 จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เลย โดยสังเกตได้จากการที่ไม่มีบริเวณใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(clear zone) เกิดขึ้น แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J1 , K20 และ D5 จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* sp. , *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J6 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* sp. และ *Staphylococcus aureus* ส่วนแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K7 , H15 และ H17 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* sp. ได้

3.3 ผลการทดสอบการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบอาหารเหลว MRS ที่มีแบคทีเรียแลคติกเจริญอยู่ และผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรต

ผลแสดงบริเวณใสที่แสดงถึงการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS และผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรต ดังตารางที่ 9

จากตารางที่ 9 เมื่อกรองอาหารเหลว MRS ที่มีแบคทีเรียแลคติกเจริญอยู่ ด้วยเซลลูโลสไนเตรต 0.45 ไมโครเมตร จะได้สารละลายที่มีสารยับยั้งปะปนอยู่ พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ผ่านการกรอง โดยพบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J6 และ J1 สามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis* ได้เพียงอย่างเดียวเท่านั้น และไม่ให้ผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบสายพันธุ์อื่นๆ แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H15 และ H17 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio* sp. ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H17 ก็ไม่สามารถการเจริญของ *Bacillus cereus* ได้อีกด้วย สำหรับความสามารถในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ D5 และ K7 พบว่าการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรตไม่มีผลต่อการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงผลการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบอาหารเหลว MRS ที่มีแบคทีเรียแลคติกและผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรต

	J6	J1	K20	D5	K7	H15	H17
Vibrio sp.	0.00	0.00	0.00	1.15	0.80	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	1.05	0.73	0.00	0.00
	0.00	0.00	0.00	0.70	0.70	0.00	0.00
E. coli	0.00	0.00	1.00	1.05	1.15	1.00	0.70
	0.00	0.00	0.90	1.00	0.95	0.95	0.70
	0.00	0.00	1.00	0.95	0.90	0.90	0.95
Staphylococcus aureus	0.00	0.00	1.00	0.85	1.00	0.95	0.70
	0.00	0.00	0.75	0.95	0.80	0.85	0.70
	0.00	0.00	0.75	0.95	0.80	0.75	1.05
Bacillus cereus	0.00	0.00	0.80	1.05	1.00	0.70	0.00
	0.00	0.00	0.80	0.80	0.95	0.70	0.00
	0.00	0.00	0.85	0.85	1.00	0.75	0.00
B. subtilis	1.00	3.10	0.80	0.95	0.95	0.75	0.95
	1.00	3.00	0.80	1.15	0.85	0.70	1.00
	1.10	3.00	0.90	0.95	0.85	0.75	1.00
Salmonella sp.	0.00	0.00	0.90	0.95	0.85	0.75	0.75
	0.00	0.00	0.95	0.95	1.00	1.00	0.75
	0.00	0.00	0.90	0.85	0.90	0.95	0.75

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ผลการทดสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติกในเวลาต่าง ๆ

ความสามารถในการสร้างบริเวณใส (clear zone) ของแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 6 ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 6

	J6	J1	K20	D5	K7	H15	H17
Vibrio sp.	1.50	1.7	0.90	1.40	0.90	0.00	1.10
	1.60	1.5	0.90	1.2	0.90	0	1.10
E. coli	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.85	0.90
	0.90	0.90	0.95	0.85	0.90	0.85	1.00
Staphylococcus	0.90	0.90	0.00	0.85	1.00	0.95	1.00
areus	0.90	0.90	0.00	0.85	1.00	0.95	1.00
Bacillus cereus	1.20	1.10	0.90	0.92	1.00	0.00	1.00
	1.10	1.10	1.00	0.90	0.90	0.00	1.00
B. subtilis	1.50	1.80	1.00	0.85	0.90	1.40	1.00
	1.40	1.50	1.00	0.80	0.90	1.40	1.00
Salmonella sp.	1.00	0.90	0.00	0.85	1.10	0.90	0.90
	1.00	0.90	0.00	0.90	0.90	0.90	0.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการสร้างบริเวณใส (clear zone) ของแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 12 ต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 12

	J6	J1	K20	D5	K7	H15	H17
Vibrio sp.	2.00	1.40	0.90	0.90	1.00	0.90	1.40
	1.90	1.5	0.90	0.9	0.90	0.9	1.50
E.coli	0.95	0.90	1.00	0.90	1.00	1.60	1.00
	0.95	0.90	1.00	0.90	1.00	1.70	1.10
Staphylococcus	1.30	1.20	1.30	1.10	1.40	1.10	1.10
aureus	1.20	1.30	1.20	1.10	1.50	1.00	1.10
Bacillus cereus	1.50	1.90	1.20	1.15	1.50	1.00	1.10
	1.40	1.90	1.20	1.20	1.50	1.00	1.10
B.subtilis	1.80	1.70	1.10	1.00	1.40	1.80	1.10
	1.70	1.70	1.10	1.00	1.30	1.60	1.10
Salmonella sp.	1.00	0.90	0.00	0.90	1.00	1.00	0.90
	1.00	1.00	0.00	0.90	1.00	1.00	0.90

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการสร้างบริเวณใส (clear zone) ของแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 18 ต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังตารางที่ 12

ตารางที่12 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 18

	J6	J1	K20	D5	K7	H15	H17
Vibrio sp.	1.20	1.20	1.00	0.90	1.00	1.00	0.90
	1.10	1.0	1.00	0.9	0.90	1.0	0.90
E.coli	1.00	1.10	1.00	1.00	1.00	1.10	0.85
	1.20	1.00	1.00	1.00	1.00	1.10	0.85
Staphylococcus	1.60	1.50	1.20	1.40	1.20	1.000	1.50
aureus	1.50	1.5	1.10	1.30	1.30	1.00	1.50
Bacillus cereus	1.90	1.900	1.30	1.20	2.00	1.20	1.20
	1.80	1.80	1.30	1.10	2.10	1.10	1.20
B.subtilis	2.10	2.00	1.25	1.60	1.40	1.40	1.30
	2.00	2.00	1.40	1.50	1.30	1.30	1.20
Salmonella sp.	1.20	1.00	0.90	1.00	1.20	0.90	1.10
	1.00	1.00	0.90	1.10	1.00	1.00	0.90

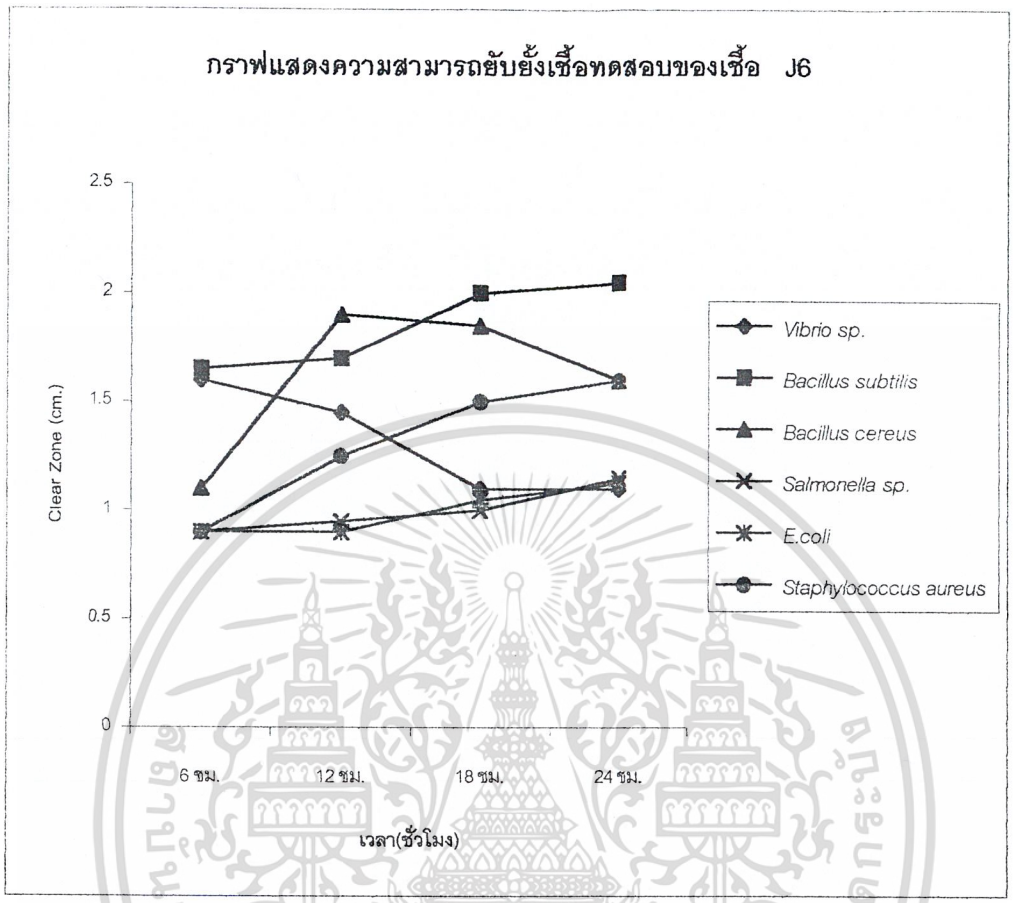
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการสร้างบริเวณใส (clear zone) ของแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 24 ต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 24

	J6	J1	K20	D5	K7	H15	H17
Vibrio sp.	0.95	1.10	1.00	0.90	1.40	0.90	0.90
	1.20	1.1	1.10	0.85	1.40	0.95	0.90
E.coli	1.10	1.10	1.00	0.90	0.90	1.00	1.00
	1.10	1.15	1.20	0.90	0.90	1.10	0.90
Staphylococcus aureus	1.50	1.50	1.10	1.10	1.00	1.00	1.10
	1.60	1.70	1.00	1.10	1.00	1.00	1.10
Bacillus cereus	2.00	1.60	1.10	1.40	1.10	1.10	1.40
	2.20	1.60	1.10	1.40	1.10	1.20	1.40
B. subtilis	2.10	2.10	1.10	1.40	1.10	1.30	1.60
	2.00	2.00	1.10	1.40	1.15	1.20	1.50
Salmonella sp.	1.50	1.50	1.10	1.10	1.00	1.00	1.10
	1.60	1.70	1.00	1.10	1.00	1.10	1.10

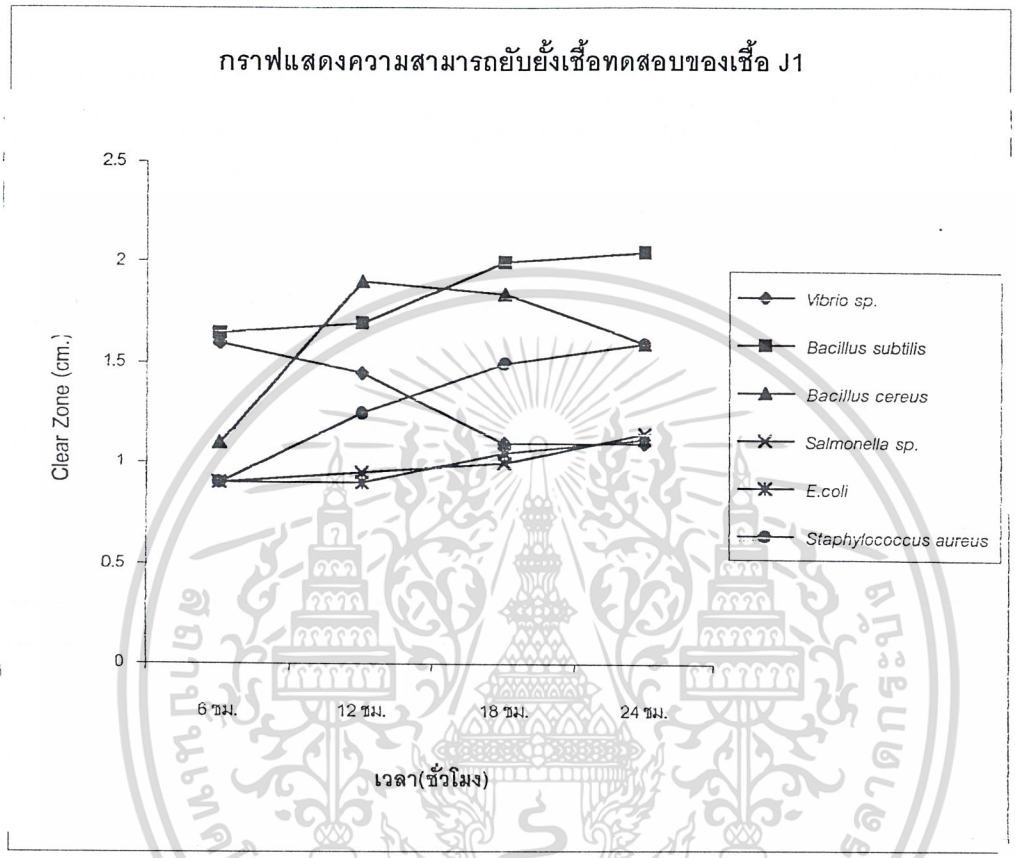
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 8 กราฟแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ J6

จากกราฟรูปที่ 8 แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J6 มีความสามารถในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อทดสอบชนิดอื่นๆ โดยความสามารถในการยับยั้งจะสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 18 สำหรับผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J6 พบว่าความสามารถในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มขึ้น เมื่อถึงชั่วโมงที่ 18 จะคงที่ หรือมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามการยับยั้ง *Vibrio* sp. จะสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 และจากนั้นการยับยั้งจะเริ่มลดลง และการยับยั้ง *Bacillus cereus* จะสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 จากนั้นการยับยั้งจะเริ่มคงที่และลดลงในที่สุด

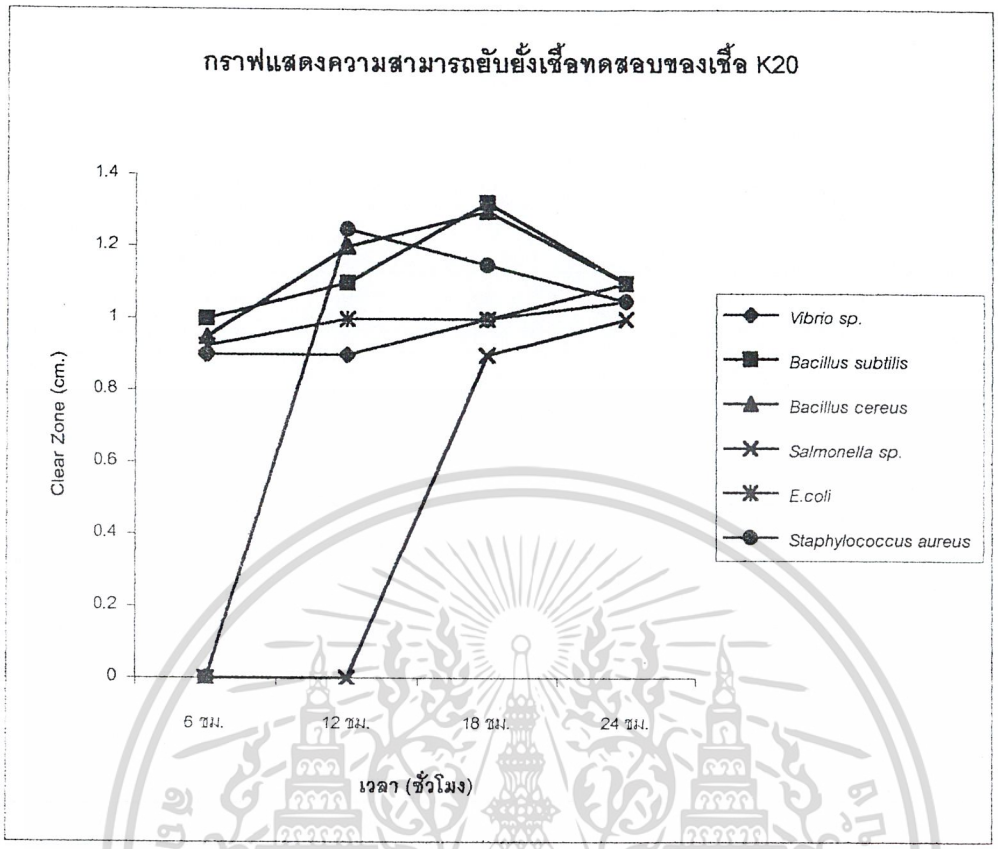
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 9 กราฟแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ J1

จากกราฟรูปที่ 9 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J1 มีแนวโน้มสูงขึ้น เมื่อเวลามากขึ้น โดยส่วนใหญ่จะสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 และหลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด อย่างไรก็ตาม J1 จะยับยั้ง *Bacillus cereus* และยับยั้ง *Vibrio* sp. ได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 12 และ 6 ตามลำดับ จากนั้นความสามารถในการยับยั้งจะเริ่มลดลง

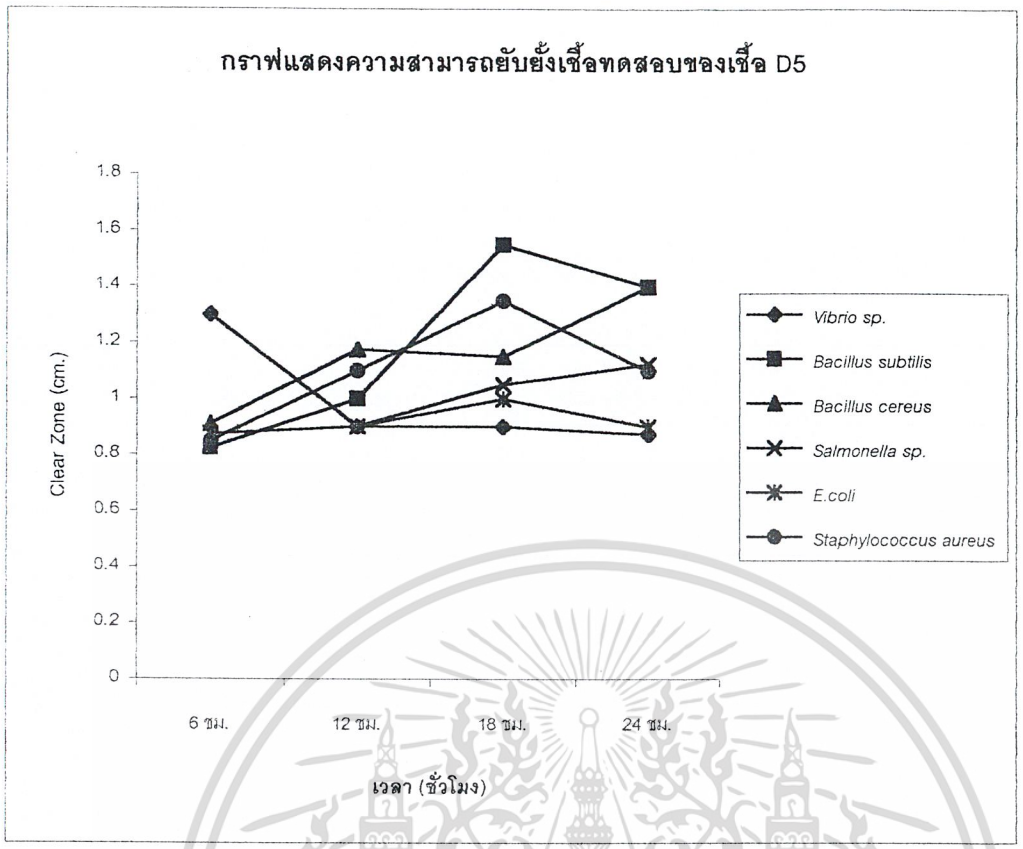
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 10 กราฟแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K20

จากกราฟรูปที่ 10 แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K20 จะมีความสามารถในการยับยั้ง *Bacillus subtilis* ได้ดีที่สุด สำหรับแนวโน้มในการยับยั้งจะสูงขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้น และจะยับยั้งได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 18 และหลังจากนั้นประสิทธิภาพในการยับยั้งก็จะเริ่มคงที่ อย่างไรก็ตามจะไม่เกิดการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ใน 6 ชั่วโมงแรก แต่หลังจากนั้นก็จะมีการยับยั้งเกิดขึ้น และสูงที่สุดในชั่วโมงที่ 12 แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K20 จะไม่สามารถยับยั้ง *Salmonella* sp. ได้ใน 6-12 ชั่วโมงแรกแต่หลังจากชั่วโมงที่ 12 พบว่าจะมีการยับยั้งเกิดขึ้น

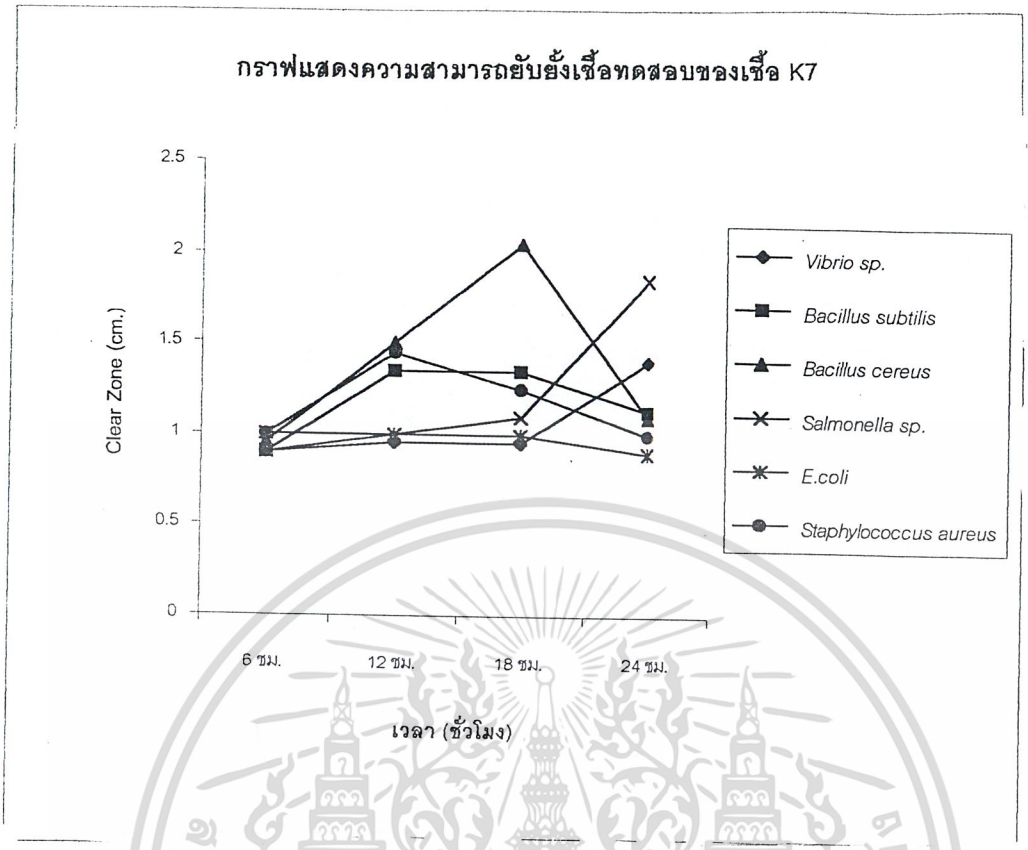
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 11 กราฟแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ D5

จากกราฟรูปที่ 11 แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ D5 มีแนวโน้มของการยับยั้งเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้น และให้ผลสูงสุดในการยับยั้ง *B. subtilis* ในชั่วโมงที่ 18 อย่างไรก็ตาม การยับยั้ง *Vibrio* sp. จะสูงสุดในชั่วโมงที่ 6 จากนั้นประสิทธิภาพในการยับยั้งจะเริ่มลดลงและคงที่ในที่สุด

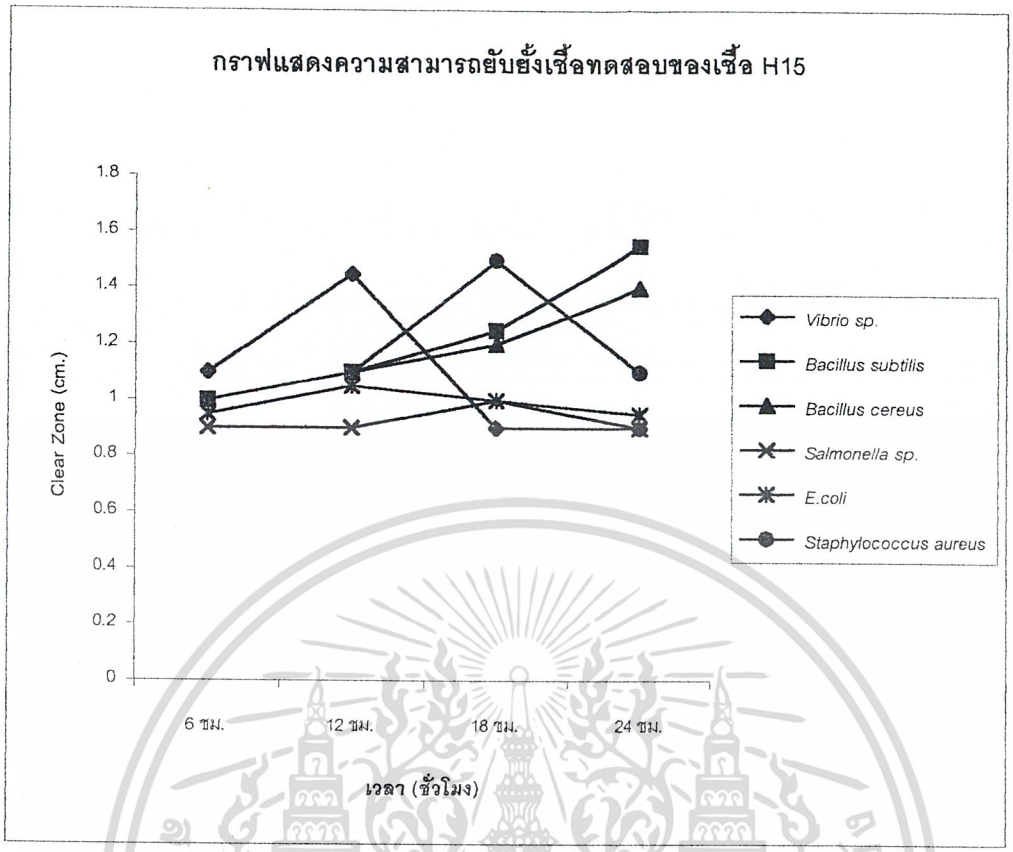
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 12 กราฟแสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K7

จากกราฟรูปที่ 12 แนวโน้มของการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K7 ต่อเชื้อทดสอบ จะสูงขึ้นเมื่อเวลามากขึ้น และพบว่า K7 สามารถยับยั้ง *B.cereus* ได้ดีที่สุดและยับยั้งได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 18 อย่างไรก็ตาม การยับยั้ง *Staphylococcus aureus* จะสูงสุดในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งจากนั้น ผลของการยับยั้งก็จะเริ่มคงที่และลดลงในที่สุด สำหรับการยับยั้ง*Salmonella* sp. และ *Vibrio* sp. มีแนวโน้มคงที่ใน 6-18 ชั่วโมงแรก แต่หลังจากนั้นการยับยั้งจะสูงขึ้นและจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 24

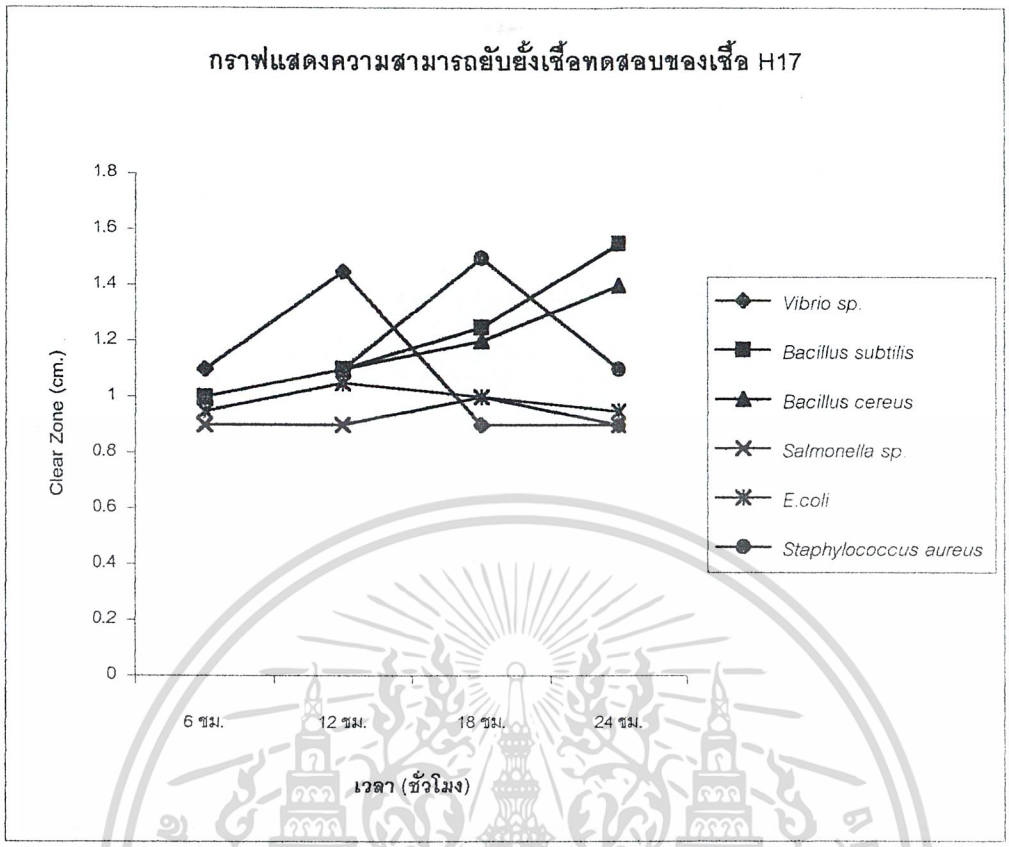
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 13 กราฟแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H15

จากกราฟรูปที่ 13 ความสามารถในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H15 ต่อ *B.subtilis* และ *B.cereus* มีแนวโน้มในการยับยั้งสูงขึ้นเมื่อเวลามากขึ้น ส่วน *Vibrio* sp. และ *E.coli* แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H15 สามารถยับยั้งได้สูงสุดได้ในชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นการยับยั้งต่ำลงและเริ่มคงที่ และการยับยั้ง *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* จะสูงสุดในชั่วโมงที่ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 14 กราฟแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H17

จากกราฟรูปที่ 14 แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H17 สามารถยับยั้ง *B.subtilis* ได้ดีที่สุด ซึ่งการยับยั้งสูงสุดดังกล่าวจะพบในชั่วโมงที่ 24 ความสามารถในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H17 จะสูงขึ้นเมื่อเวลามากขึ้นอย่างไรก็ตาม พบว่า *Vibrio* sp. และ *E.coli* จะถูกยับยั้งได้สูงสุดในชั่วโมงที่ 12 และการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. จะสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 จากนั้นความสามารถในการยับยั้งของ H17 จะลดลงและคงที่ในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างยับยั้งเชื้อทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบหาลักษณะการเจริญ ซึ่งเชื้อที่ถูกคัดเลือกมานี้ได้แก่ J6 , J1 , K20 , D5 , K7, H15 และ H17 โดยจะทำการตรวจสอบทุกๆ 6 ชั่วโมง ตามหัวข้อต่อไปนี้

- Activity
- pH
- O.D.
- ปริมาณกรด

ตารางที่ 14 แสดงลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมัก

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	เชื้อ J6			เชื้อ J1		
	pH	O.D.	Acidity	PH	O.D.	Acidity
6	4.00	1.129	3.19	3.80	1.142	3.37
12	3.40	1.284	5.05	3.50	1.331	5.67
18	3.15	1.341	6.70	3.10	1.339	6.74
24	3.10	1.401	7.09	3.00	1.448	7.00
30	3.05	1.421	7.18	3.00	1.456	7.53
36	3.00	1.464	7.27	2.90	1.513	7.80

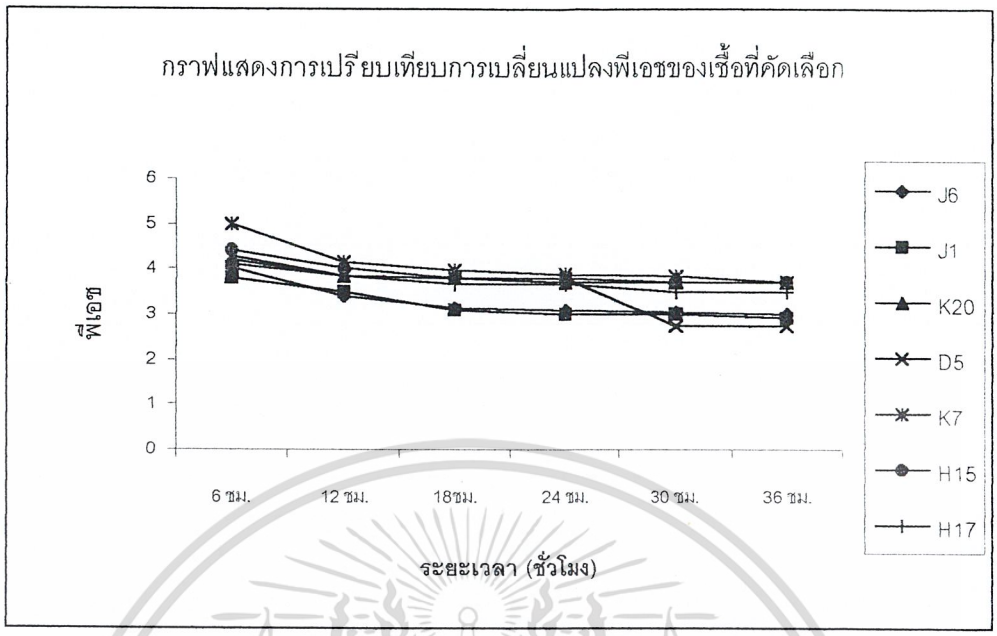
ระยะเวลา (ชั่วโมง)	เชื้อ K20			เชื้อ D5		
	pH	O.D.	Acidity	PH	O.D.	Acidity
6	4.20	0.777	2.75	4.30	0.750	2.39
12	3.85	0.880	3.28	3.85	0.847	3.28
18	3.80	0.889	3.37	3.80	0.903	3.55
24	3.70	0.900	3.72	3.80	0.908	3.63
30	3.70	0.901	7.00	2.75	0.917	3.72
36	3.70	0.918	7.54	2.75	0.940	3.72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	เชื้อ K7			เชื้อ H15		
	pH	O.D.	Acidity	PH	O.D.	Acidity
6	5.00	0.600	1.95	4.40	0.780	2.30
12	4.15	0.871	2.84	4.00	0.840	2.57
18	3.95	0.892	3.46	3.80	0.851	3.01
24	3.90	0.942	3.63	3.80	0.863	3.81
30	3.85	0.952	3.72	3.70	0.889	4.16
36	3.70	1.134	3.72	3.70	0.890	4.16

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	เชื้อ H17		
	pH	O.D.	Acidity
6	4.10	0.806	2.75
12	3.85	0.907	3.37
18	3.65	0.919	3.72
24	3.65	0.927	3.98
30	3.50	0.940	4.16
36	3.50	0.953	4.16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

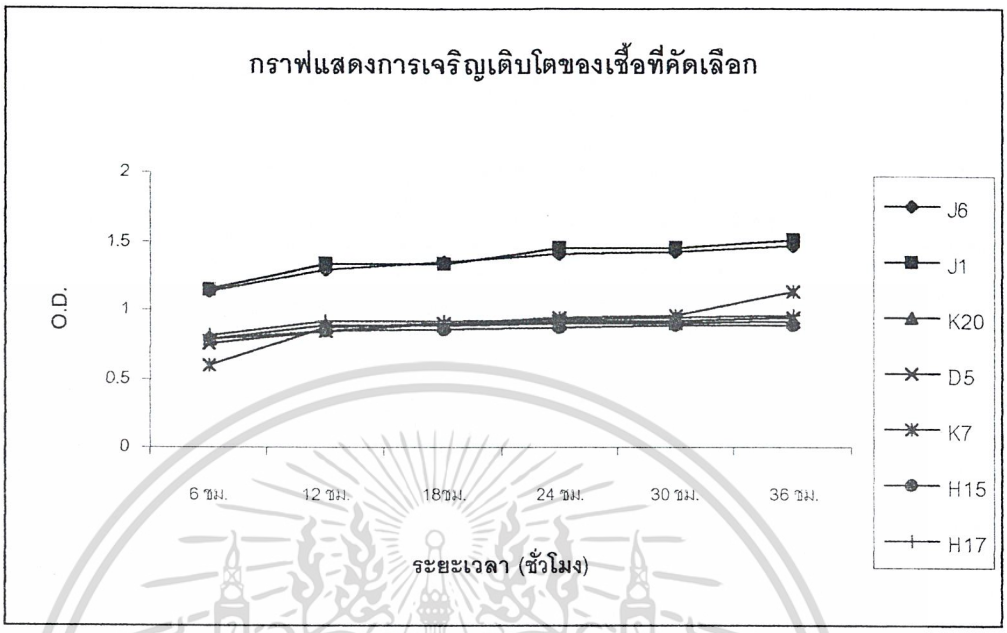


รูปที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงพีเอชของเชื้อที่คัดเลือกได้

จากการทดลอง ทำการตรวจสอบเชื้อรหัส J6, J1, K20, D5, K7, H15 และ H17 ทุกๆ 6 ชั่วโมง เพื่อเป็นการติดตามผลการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรดด่าง (pH), ค่าความขุ่น (O.D.), ปริมาณกรด(Acidity) และกิจกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป (Activity) ในการยับยั้งเชื้อทดสอบของเชื้อคัดเลือก

จากรูปที่ 15 ทำให้ทราบว่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะต่ำอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกและจะค่อยๆ ลดลงอย่างช้าๆในเวลาหลังจากชั่วโมงที่ 18 เป็นต้นไป

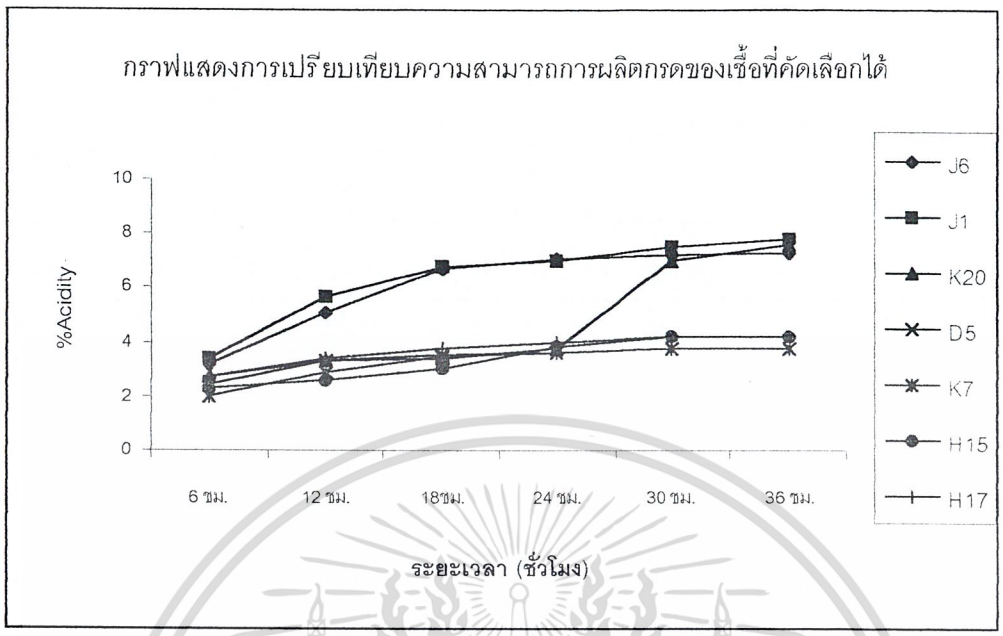
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อที่คัดเลือก

จากรูปที่ 16 แสดงการเปลี่ยนแปลงค่า O.D. ของเชื้อที่คัดเลือก จะพบว่ามีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรกเช่นกัน ภายหลังจากชั่วโมงที่ 12 จะมีการเจริญเติบโตค่อนข้างคงที่ และชั่วโมงที่ 36 นั้นการเจริญของจุลินทรีย์จะลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบความสามารถผลิตกรดของเชื้อที่คัดเลือก

จากรูปที่ 17 พบว่าปริมาณกรดจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากชั่วโมงที่ 18 โดยที่ในระหว่างชั่วโมงที่ 6 ถึง ชั่วโมงที่ 12 อัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดก็จะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ ซึ่งสังเกตเห็นว่าจะสอดคล้องกับค่าpHที่ลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

5.1 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ต่อเชื้อทดสอบ

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อเปรียบเทียบการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากอาหารหมัก J6, J1, K20, D5, K7, H15 และ H17 ต่อเชื้อทดสอบ *Vibrio* sp. , *E.coli* , *S.aureus* , *B.cereus* , *B.subtilis* และ *Salmonella* sp. (ตารางที่ 15) พบว่า แบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์มีผลต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ได้ไม่เท่ากัน แบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดี

จากตารางที่ 16 แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J6 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด และเชื้อทดสอบที่ถูกยับยั้งได้มากที่สุดในสภาวะนี้ คือ *B.subtilis*

ตารางที่ 15 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลวMRSต่อเชื้อทดสอบ

SV	DF	SS	MS	F
REP (R)	2	0.0096	0.0048	<1
TREATMENT	41	34.0432	0.8303	78.07**
LAB (L)	6	6.4752	1.0792	101.47**
MICRO (M)	5	5.6601	1.1321	106.45**
LxM	30	21.9074	0.7302	66.66**
ERROR	82	0.8721	0.0106	
TOTAL	125	34.9249		

CV = 9.45 %

** = แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

หมายเหตุ LAB = แบคทีเรียแลคติก

MICRO = เชื้อทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 16 ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ต่อเชื้อทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบโดย $DMRT_{0.05}$

	MICRO						
LAB(L)	*Vibrio* sp.	*E.coli*	*S.aureus*	*B.cereus*	*B.subtilis*	*Salmonella* sp.	L-MEAN
J6	1.367 b	0.800 c	1.133 a	1.800 a	3.100 a	1.100 b	1.550
J1	0.833 cd	1.500 a	1.133 a	1.400 b	1.133 c	0.933 b	1.156
K20	1.000 c	0.933 bc	1.133 a	0.967 c	0.867 d	0.933 b	0.972
D5	1.000 c	1.000 b	0.867 b	0.967 c	0.817 d	1.050 b	1.950
K7	1.233 b	1.017 b	0.967 ab	1.017 c	0.917 d	1.300 a	1.075
H15	0.767 d	1.000 b	0.983 ab	1.017 c	0.950 d	1.083 b	1.967
H17	1.817 a	1.000 b	0.900 b	0.783 d	2.733 b	1.050 b	1.381
M-MEAN	1.145	1.036	1.017	1.136	1.502	1.064	1.436

ในแต่ละคอลัมน์ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรตัวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 การวิเคราะห์ความแบรบรวนเพื่อเปรียบเทียบการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ต่อเชื้อทดสอบ

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อเปรียบเทียบการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากอาหารหมัก J6, J1, K20, D5, K7, H15 และ H17 ต่อเชื้อทดสอบ *Vibrio* sp. , *E.coli* , *S.aureus* , *B.subtilis* , *B.cereus* และ *Salmonella* sp. (ตารางที่ 17) พบว่าความร้อนมีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกต่อเชื้อทดสอบบางสายพันธุ์ แบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์มีผลต่อการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ไม่เท่ากัน

จากตารางที่ 18 พบว่าแบคทีเรียแลคติก J6 , K7 และ H15 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ และแบคทีเรียแลคติก D5 และ H15 ก็ไม่ความแตกต่างในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบในสภาวะดังกล่าวนี้เช่นกัน แต่แบคทีเรียแลคติก J1 และ K20 มีความแตกต่างทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ ยกเว้น การยับยั้ง *Vibrio* sp. , *S.aureus* และ *Salmonella* sp.

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ความร้อนจะลดประสิทธิภาพในการยับยั้ง แต่ก็ยังสามารถยับยั้งได้ดีในแบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ต่อเชื้อทดสอบบางสายพันธุ์เท่านั้น ซึ่งแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งในสภาวะดังกล่าวนี้ ได้แก่ H17 และสามารถยับยั้ง *E.coli* อย่างไรก็ตามในสภาวะดังกล่าวนี้ แบคทีเรียแลคติก J1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำที่สุด และเชื้อทดสอบที่ไม่ถูกยับยั้งในสภาวะนี้ ได้แก่ *Vibrio* sp. และ *S. aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 17 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS และให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ต่อเชื้อทดสอบ

SV	DF	SS	MS	F
REP (R)	2	0.0046	0.0023	< 1
TREATMENT	41	28.5760	0.6970	157.14**
LAB(L)	6	5.8537	0.9756	219.97**
MICRO(M)	5	17.2038	3.4407	775.78**
LxM	30	5.5184	0.1840	41.47**
ERROR	82	0.3637		
TOTAL	125	28.9443		

CV = 13.4 %

** = แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

หมายเหตุ LAB = แบคทีเรียแลคติก

MICRO = เชื้อทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 18 ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS และให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ต่อเชื้อทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบโดย $DMRT_{0.05}$

	MICRO						
LAB (L)	*Vibrio* sp.	*E.coli*	*S.aureus*	*B.cereus*	*B.subtilis*	*Salmonella* sp.	L-MEAN
J6	0.000 a	1.000 a	0.000 a	1.033 a	1.000 ab	0.900 a	0.656
J1	0.000 a	0.000 b	0.000 a	0.000 c	0.000 d	0.000 b	0.000
K20	0.000 a	0.983 a	0.000 a	0.967 ab	1.000 ab	0.000 b	0.492
D5	0.000 a	0.950 a	0.000 a	0.933 ab	0.900 bc	0.000 b	0.464
K7	0.000 a	0.983 a	0.000 a	0.950 ab	0.967 abc	0.867 a	0.638
H15	0.000 a	0.883 a	0.000 a	0.883 b	0.867 c	0.850 a	0.581
H17	0.000 a	1.000 a	0.000 a	1.000 ab	1.050 a	0.933 a	0.664
M-MEAN	0.000	0.829	0.000	0.824	0.826	0.507	0.498

ในแต่ละคอลัมน์ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรตัวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ที่ผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรตต่อเชื้อทดสอบ

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อเปรียบเทียบการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากอาหารหมัก J6, J1, K20, D5, K7, H15 และ H17 ต่อเชื้อทดสอบ *Vibrio* sp , *E.coli* , *S.aureus* , *B.cereus* , *B.subtilis* และ *Salmonella* sp. (ตารางที่ 19) พบว่าการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรต มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกต่อเชื้อทดสอบบางชนิด แบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์มีผลต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบแต่ละชนิดไม่เท่ากัน

จากตารางที่ 20 พบว่าแบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างทางสถิติในการยับยั้งเชื้อทดสอบทุกสายพันธุ์เช่นกัน

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งในสภาวะดังกล่าวนี้ คือ D5 และเชื้อทดสอบที่ถูกยับยั้งได้ดีที่สุด คือ *E.coli*

ตารางที่ 19 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS และผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรตต่อเชื้อทดสอบ

SV	DF	SS	MS	F
REP (R)	2	0.0090	0.0045	< 1
TREATMENT	41	40.3730	0.9847	190.93**
LAB (L)	6	7.8000	1.3000	252.06**
MICRO (M)	5	10.4819	2.0964	406.47**
LxM	30	22.0912	0.7364	142.78**
ERROR	82	0.4229	0.0052	
TOTAL	25	40.8050		

CV = 11.1 %

** = แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

หมายเหตุ LAB = แบคทีเรียแลคติก

MICRO = เชื้อทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 20 ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS และผ่านการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรตต่อเชื้อทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบโดย $DMRT_{0.05}$

	MICRO						
LAB (L)	*Vibrio* sp.	*E.coli*	*S.aureus*	*B.cereus*	*B.subtilis*	*Salmonella* sp.	L-MEAN
J6	0.000 c	0.000 c	0.000 b	0.000 d	1.033 b	0.000 c	0.172
J1	0.000 c	0.000 c	0.000 b	0.000 d	3.033 a	0.000 c	0.506
K20	0.000 c	0.967 a	0.833 a	0.817 bc	0.833 de	0.917 a	0.728
D5	1.100 c	1.000 a	0.917 a	0.900 ab	1.017 b	0.917 a	0.975
K7	0.743 c	1.000 a	0.867 a	0.983 a	0.883 cd	0.917 a	0.899
H15	0.000 c	0.950 a	0.850 a	0.717 c	0.733 e	0.900 a	0.692
H17	0.000 c	0.783 b	0.817 a	0.000 d	0.983 bc	0.750 b	0.556
M-MEAN	0.263	0.671	0.612	0.488	1.217	0.629	0.647

ในแต่ละคอลัมน์ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยอักษรตัวเดียวกันไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ 95%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 การวิเคราะห์ความแปรปรวนเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่มีการเจริญในอาหารเหลว MRS ณ ชั่วโมงที่ 6 , 12 , 18 และ 24 ต่อเชื้อทดสอบ

ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวน เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากอาหารหมัก J6, J1, K20, D5, K7, H15 และ H17 ต่อเชื้อทดสอบ *Vibrio* sp. , *E.coli* , *S.aureus* , *B.cereus* , *B.subtilis* และ *Salmonella* sp. (ตารางที่ 21) พบว่าแบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ได้ต่างกัน แบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบบางสายพันธุ์ได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ณ ชั่วโมงที่แตกต่างกันก็ให้ผลที่แตกต่างกันในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

จากตารางที่ 22 พบว่าแบคทีเรียแลคติก J1 ที่เพาะเลี้ยงถึงชั่วโมงที่ 18 และที่ชั่วโมงที่ 24 ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ แต่แบคทีเรียแลคติกที่เพาะเลี้ยงถึง ณ ชั่วโมงอื่นๆ ให้ผลที่แตกต่างกันทางสถิติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก ณ ชั่วโมงต่างๆ มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก ณ ชั่วโมงที่ 18 ให้ผลในการยับยั้งสูงสุด แบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดีที่สุด คือ J6 และเชื้อทดสอบที่ถูกยับยั้งได้ดีที่สุด คือ *B.subtilis*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 21 การวิเคราะห์ความแปรปรวนที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และ 0.01 เพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ณ ชั่วโมงที่ 6 , 12 , 18 และ 24 ต่อเชื้อทดสอบ

SV	DF	SS	MS	F
REP (R)	1	0.0044	0.0044	1.05 ns
TREATMENT	167	49.8361	0.2984	71.08**
LAB(L)	6	9.8211	1.6369	389.89**
MICRO(M)	5	9.6727	1.9345	460.80**
HOUR(H)	3	3.9414	1.3138	312.94**
LxM	30	6.4494	0.2150	51.21**
LxH	18	1.1220	0.0623	14.85**
MxL	15	4.8718	0.3248	77.36**
LxMxH	90	13.9577	0.1551	36.94**
ERROR	167	0.7011	0.0042	
TOTAL	335	50.5416		

CV = 5.8 %

** = แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

ns = ไม่แตกต่างกันที่ระดับความเชื่อมั่น 99%

หมายเหตุ LAB = แบคทีเรียแลคติก

MICRO = เชื้อทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 22 ผลของประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MRS ณ ชั่วโมงที่ 6 , 12 , 18 และ 24 ต่อเชื้อทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบโดย $DMRT_{0.05}$

	Micro(M)						
LAB	*Vibrio* sp.	*B. cereus*	*Salmonella* sp.	*E. coli*	*B. subtilis*	*S.cereus*	L. mean
H = 6							
J6	1.5500 a	1.1500 a	1.0000 a	0.9000 a	1.4500 b	0.9000 ab	1.1583
J1	1.6000 a	1.1000 ab	0.9000 a	0.9000 a	1.6500 a	0.9000 ab	1.1750
K20	0.9000 c	0.9500 c	0.0000 ab	0.9250 a	1.0000 d	0.0000 c	0.6292
D5	1.3000 b	0.9100 c	0.8750 a	0.8750 a	0.8250 c	0.8500 b	0.9392
K7	0.9000 c	0.9500 c	1.0000 a	0.9000 a	0.9000 d	1.0000 a	0.9417
H15	0.0000 e	0.0000 d	0.9000 a	0.8500 a	1.4000 b	0.9500 ab	0.6833
H17	1.1000 c	1.0000 b	0.9000 a	0.9500 a	1.0000 d	1.0000 d	0.9917
H = 12							
J6	1.9500 a	1.4500 ab	1.0000 a	0.9500 bc	1.7500 a	1.2500 b	1.3917
J1	1.4500 b	1.9000 a	0.9500 a	0.9000 c	1.7000 a	1.2500 b	1.3583
K20	0.9000 c	1.2000 c	0.0000 b	1.0000 bc	1.1000 c	1.2500 b	0.9083
D5	0.9000 c	1.1750 c	0.9000 a	0.9000 c	1.0000 c	1.1000 c	0.9958
K7	0.9500 c	1.5000 b	1.0000 a	1.0000 bc	1.3500 b	1.4500 a	1.2083
H15	0.9000 c	1.0000 d	1.0000 a	1.6500 a	1.7000 a	1.0500 c	1.2167
H17	1.4500 b	1.1000 cd	0.9000 a	1.0500 b	1.1000 c	1.1000 c	1.1167
H = 18							
J6	1.1500 a	1.8500 b	1.1000 a	1.1000 a	2.0500 a	1.5500 a	1.4667
J1	1.1000 ab	1.8500 b	1.0000 abc	1.0500 a	2.0000 a	1.5000 a	1.4167
K20	1.0000 bc	1.3000 c	0.9000 cd	1.0000 a	1.3250 c	1.1500 cd	1.1125
D5	0.9000 c	1.1500 d	1.0500 ab	1.0000 a	1.5500 b	1.3500 b	1.1667
K7	0.9500 c	2.0500 a	1.1000 a	1.0000 a	1.3500 c	1.2500 bc	1.2833
H15	1.0000 bc	1.1500 d	0.9500 bcd	1.1000 a	1.3500 c	1.0000 c	1.0917
H17	0.9000 c	1.2000 cd	1.0000 abc	1.0000 a	1.2500 c	1.5000 a	1.1417
H = 24							
J6	1.0750 b	2.1000 a	1.1500 b	1.1000 a	2.0500 a	1.5500 a	1.5042
J1	1.1000 b	1.6000 b	1.1500 b	1.1250 a	2.0500 a	1.6000 a	1.4375

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

K20	1.0500 b	1.1000 d	1.0000 cd	1.1000 a	1.1000 f	1.0500 b	1.0667
D5	0.8750 c	1.4000 c	1.1250 bc	0.9000 c	1.4000 d	1.1000 b	1.1333
K7	1.4000 a	1.1000 d	1.8500 a	0.9000 c	1.1280 ef	1.0000 b	1.2297
H15	0.8975 c	1.1500 d	0.9500 d	1.0500 ab	1.2500 e	1.0000 b	1.0496
H17	0.9000 c	1.4000 c	0.9000 d	0.9500 bc	1.5500 c	1.1000 b	1.1333
M-mean	1.0765	1.2780	0.9482	1.0045	1.4046	1.1339	1.1517

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักต่างๆนี้ ได้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 56 สายพันธุ์ โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง และเมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยใช้เกณฑ์การตัดสินใจจากปริมาณของบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบนั้นเอง จะสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 7 สายพันธุ์ คือ J6, J1, K20, D5, K7, H15 และ H17

เมื่อทำการศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแลคติก ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 7 ชนิดนี้แล้วพบว่า เชื้อทั้ง 7 ชนิดจะมีอัตราการเจริญรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก ซึ่งช่วงเวลานั้นเองจะมีอัตราการเพิ่มขึ้นของปริมาณกรดสูงขึ้นอย่างรวดเร็วด้วย จึงทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงอย่างรวดเร็ว และสำหรับระยะเวลาหลัง 12 ชั่วโมงนี้ การเจริญของเชื้อค่อนข้างคงที่ จึงทำให้พีเอชและปริมาณกรดที่สร้างขึ้นค่อนข้างคงที่ด้วย และเมื่อพิจารณาถึงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดต่างๆนั้นพบว่า สารยับยั้งจุลชีพที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดนั้น จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งแตกต่างกัน และสารยับยั้งจุลชีพชนิดใดชนิดหนึ่งที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแลคติกก็จะมีผลแตกต่างกันไปไปในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดนั้นเอง สำหรับผลของระยะเวลาที่มีผลต่อกิจกรรมที่เปลี่ยนไปในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆนั้นพบว่า ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารยับยั้งที่เกิดขึ้นในช่วงเวลาต่างๆจะมีความเหมาะสมแตกต่างกันไปเมื่อใช้ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ต่างชนิดกันไป นั่นคือกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อทดสอบจะเปลี่ยนไปตามระยะเวลาที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก ซึ่งอาจเกิดเนื่องจาก ความแตกต่างกันของสารยับยั้งของจุลชีพที่ผลิตออกมาในเวลาที่แตกต่างกันไปนั่นเอง

และเมื่อมีการนำอาหารเหลว MRS ที่มีแบคทีเรียแลคติกเจริญอยู่มาผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และการกรองด้วยเซลลูโลสไนเตรต มีผลต่อการลดประสิทธิภาพการยับยั้งต่อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ แต่การยับยั้งก็ยังเกิดขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้นมานั้นสามารถทนต่อความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ได้ และสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้นมานั้น เป็นสารยับยั้งประเภทที่ปลดปล่อยออกนอกเซลล์ (Extracellular)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ จากผลการทดลองยังสามารถสรุปได้อีกว่า การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว MRS ให้ถึง ณ ชั่วโมงที่ 6 , 12 , 18 และ 24 แล้วจึงนำมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง ก็มีผลต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเช่นกัน โดยพบว่าการยับยั้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ และจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 18 จากนั้นการยับยั้งจะคงที่ และมีแนวโน้มที่จะลดลงในชั่วโมงที่ 24

แบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบทั้ง 6 สายพันธุ์ ได้แก่ J6 และแบคทีเรียทดสอบที่ถูกยับยั้งได้มากที่สุด คือ*B. subtilis*

ข้อเสนอแนะ

1) จากการทดลองครั้งนี้ ถ้าต้องการแยก *Pediococcus* spp. ต้องนำอาหารหมักที่ผ่านการหมักมาเป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง แต่ถ้าต้องการแยก *Lactobacillus* spp. ต้องนำอาหารหมักที่ผ่านการหมักเป็นเวลามากกว่า 24 ชั่วโมง หรือประมาณ 3 – 4 วัน
2) สารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกผลิตสามารถทนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีได้
3) เมื่อนำสารยับยั้งไปผ่านการกรองเซลลูโลสไนเตรตขนาด 0.45 ไมโครเมตรนั้น แบคทีเรียแลคติกบางตัวก็สามารถผลิตสารยับยั้งที่มีขนาดใหญ่กว่า 0.45 ไมโครเมตรทำให้ไม่สามารถผ่านเซลลูโลสไนเตรตจึงไม่เกิดการยับยั้งขึ้นเมื่อนำมาทดสอบ ถ้าสารยับยั้งที่ถูกผลิตมีขนาดเล็กกว่า 0.45 ไมโครเมตรจะผ่านเซลลูโลสไนเตรตได้ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งขึ้น
4) เมื่อนำสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกผลิตไปทดสอบการยับยั้งในชั่วโมงที่ 6 , 12 , 18 และ 24 ในชั่วโมงที่ 18 ประสิทธิภาพของการยับยั้งจะสูงที่สุด แสดงว่าแบคทีเรียแลคติกจะผลิตสารยับยั้งออกมามากที่สุดและเป็นชั่วโมงที่มีสภาวะของการยับยั้งที่เหมาะสม
5) สารยับยั้งที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกจะมีหลายชนิด แต่ละชนิดจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งแตกต่างกันไป แต่โดยส่วนใหญ่แล้วจะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ และยับยั้งพวกที่สร้างสปอร์มากกว่าพวกที่ไม่สร้างสปอร์ (กุลวดีและคณะ,2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6) ถ้าต้องการสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกมีประสิทธิภาพมากกว่าเดิม ควรผ่านการทำพันธุวิศวกรรมโดยการผ่าเหล่า (Mutation) เช่น การฉายรังสี UV , การใช้สารเคมี ตลอดจนการทำรีคอมบิเนนท์ดีเอ็นเอ (Recombinant DNA) เป็นต้น (สุรินทร์,2539)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กุลวดี ทองภูเบศร์,สุธารัตน์ เอื้อเกียรติพงศ์ และอุไรลักษณ์ ทองดี. การยับยั้ง *Salmonella* ที่แยกได้จากไข่ผง โดยใช้ไนซินร่วมกับ EDTA. ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2535.

เชิดชัย เชี่ยวธีรกุล. ทิศทางการพัฒนาอุตสาหกรรมชีวภาพ. วารสารจาร์พา(อาหาร เคมี สิ่งแวดล้อม). ฉบับที่20. พฤศจิกายน 2538.

ดวงพร คันธโชติ. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. พิมพ์ครั้งที่ 1. พิมพ์ที่ โอ. เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์. 2537.

บัญญัติ สุขศรีงาม. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่3. กรุงเทพฯ. โอเดียนสโตร์. 2534.

ไปรมา ยงมานิตชัย. ไนซิน-สารกันบูดธรรมชาติ. สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2531.

พวงพร โชติไกร. จุลชีววิทยาของอาหารและนม. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยรามคำแหง. พิมพ์ครั้งที่3. 2530.

ดร.วราวุฒิ ครูส่ง. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 2530.

สมใจ ศิริโภค. เทคโนโลยีการหมัก. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 2537.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และสุมนา วรรธรณะ. ผลงานวิจัย เรื่องการศึกษาฟีโนไทป์ของแบคทีเรียแลคโตบาซิลไลที่แยกจากอาหารหมักดอง. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2530.

สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล. พันธุวิศวกรรมเบื้องต้นและการประยุกต์. ภาควิชาพันธุศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2539.

Choi, L., Y. Ghouati, W.E. Sandine, and Tantaoui-Elaraki. 1995. Methods to demonstrate the bactericidal activity of bacteriocins. Letter Applied Microbiology. 17:78-18.

Fernandez K. Mode of Action of a Bacteriocin (J46) Produced by *Lactococus lactis* subsp. *cremoris* J46. Journal of food Protection. 59(9)(1994):955-962.

Gandhi F.and D. Nambudriped . Detection and activity of lactacin B,a bacteriocin produced by Lactobacillus acidophilus. Applied Environmental Mifcrobiology. 58(1)(1990) : 1808-1815.

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hoover D.G.Improvement of Detection and Production of Propionicin PLG-1, a Bacteriocin Produced by Propionibacterium thoenii. Journal of food Protection. 59(7) (1992) : 734-738.

Holt, J.G.,Krieg, N.R., Sneath, P.A., Staley, J.T., and Williams, S.T., Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Vol. 9. Williams & Wilkins Co. 1994

Hurt, A. Antibotulinal Effectiveness of Nisin in Pasteurized Process Cheese Spreads. Journal of food Protection. 50(10)(1983) : 842-849.

Kim, W.J. 1994. Isolation and Purification of Propionicin PLG-1,a bacteriocin Produced by a Strain of *Propionibacterium hoenii*. Applied and Environmental Microbiology. 59: 83-88.

Lee, O. and W.J. Kim, W.J. 1996. Potential for Use of Bacteriocin-Produceding Lactic Acid Bacteria in the Preservation of meats. Journal of food Protection. (Supplement) :64-71.

Mark, A. Daeschel and Ingolf F. Nes. Lactic Acid Bacteria. Food Biotechnology. Vol 3. 1995.

Reddy, I. and P. Ranganathan . Isolation and Purification of a bacteriocin Produced by a Strain of *Streptococcus diacetylactic*. Applied and Environmental Microbiology. 75(6)(1993) : 83-88.

Tagg, D.and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriology Review. 40 : 722-756.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
องค์ประกอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที

1. Nutrient agar

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช	7.0	

2. **GYP agar**

glucose	10.0	กรัม
yeast extract	10.0	กรัม
peptone	10.0	กรัม
agar	15.0	กรัม
$CaCO_3$	1%	
โซเดียมเอไซด์	0.02%	
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร
พีเอช	6.8	

3. **GYP-Sodium Acetate Mineral Salts Agar**

Glucose	10.0	กรัม
Yeast Extract	10.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Sodium acetate	10.0	กรัม
Solution B*	5.0	มิลลิลิตร
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH 6.8		

SOLUTION B*

$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	$FeSO_4.7H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
	$MnSO_4.4H_2O$	10.0	มิลลิกรัม
	NaCl	10.0	มิลลิกรัม
	Distilled water	1000	มิลลิลิตร

4. Nutrient broth

beef extract	3.0	กรัม
peptone	5.0	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0		

5. Glucose broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Glucose	10.0	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
Bromthymol blue	15.0	มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0		

6. Lactose broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
Bromthymol blue	15.0	มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0		

7. Sucrose broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
Bromthymol blue	15.0	มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. Brilliant green lactose bile broth

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Oxgall	20.0	กรัม
Brilliant green	0.0133	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
pH 7.2		

9. Eosin methylene blue agar (EMB agar)

Peptone	10.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
pH 7.1		

10. Peptone Water

Peptone	10.0	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร

11. Brain Heart Infusion broth (BHI broth)

Calf brain infusion	200.0	กรัม
Beef heart infusion	250.0	กรัม
Proteose peptone or gelysate	10.0	กรัม
Sodium chloride	5..0	กรัม
Disodium phosphate	25.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร

12. Brain Heart Infusion Agar (BHI agar)

Calf brain infusion	200.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Beef heart infusion	250.0	กรัม
Proteose peptone or gelysate	10.0	กรัม
Sodium chloride	5..0	กรัม
Disodium phosphate	25.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร

13. Xylose Lysine Deoxycholate Agar (XLD agar)

Yeast extract	5.0	กรัม
Xylose	3.5	กรัม
L-Lysine hydrochloride	5.0	กรัม
Lactose	7.5	กรัม
Sucrose	7.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Bile salts	2.5	กรัม
Sodium thiosulphate	4.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.8	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
pH 7.4		

14. Brilliant Green Agar (BGA)

Proteose peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Sucrose	10.0	กรัม
Phenol red	0.08	กรัม
Brilliant Green Indicator	0.0125	กรัม
Agar	20.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
pH 6.8-7.0		

15. GYP-Sodium Acetate Mineral Salts broth

Glucose	10.0	กรัม
Yeast Extract	10.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Sodium acetate	10.0	กรัม
Solution B*	5.0	มิลลิลิตร
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH 6.8		

16. อาหารแข็งบิสมัท ซัลไฟต์

Beef extract	5.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Disodiumhydrogensulfate	4.0	กรัม
Phorus sulfate	0.3	กรัม
Bisthmus sulfite	8.0	กรัม
Brilliant green	0.025	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

17. Thiosulfate Citrate Bile Salts Sucrose (TCBS) Agar

Sodium thiosulfate	10.0	กรัม
Oxgall	5.0	กรัม
Sucrose	20.0	กรัม
Sodium citrate	10.0	กรัม
Sodium cholate	3.0	กรัม
Polypeptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
Iron citrate	1.0	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thymol blue	0.04	กรัม
Bromthymol blue	0.04	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

pH 8.6

*NO AUTOCLAVE

18. MRS agar and broth

Proteosepeptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Dipotassium Hydrogen Phosphate	2.0	กรัม
Sodium Acetate	5.0	กรัม
Triammonium Citrate	2.0	กรัม
Magnesium sulphate Hydrate	200.0	มิลลิกรัม
Manganese Sulphate Tetrahydrate	50.0	มิลลิกรัม
Agar	15.0	กรัม

pH 6.2-6.6

19. Aesculin broth

Aesculin	1.0	กรัม
Glucose	0.25	กรัม
Ferric citrate	0.05	กรัม
Beef extract	0.5	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
$MnSO_4.4\ H_2O$	0.01	กรัม
Tween 80	0.1	กรัม

20. Arginine agar

Peptone	0.1	กรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NaCl	0.5	กรัม
K_2HPO_4	0.03	กรัม
L(+)Arginine HCl	1.0	กรัม
Phenol red	0.001	กรัม
Agar	0.3	กรัม

ปรับ pH ให้ได้ 7.2

21. Fermentable Carbohydrate broth

Carbohydrate	10.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Distilled Water	1000	มิลลิลิตร
Bromthymol blue	15.0	มิลลิลิตร

pH 6.8-7.2

Carbohydrate ที่ใช้คือ น้ำตาล Maltose, Lactose, Xylose, Sucose, Rhamnose, Raffinose, Glucose, Melezitose, Melibiose, Cellobiose, Sorbitol, Salicin, Mannose, Fructose, Manitol, Glycerol และ Arabinose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.
สีย้อมและน้ำยา

1. สีย้อม

Crystal violet (Modified Hucker's)

สารละลาย A

crystal violet	2.0	กรัม
95% ethanol	20.0	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	กรัม

ผสมสารละลาย A และสารละลาย B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองตะกอนออก

Iodine (Gram's)

Iodine crystal	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

Safranin

Safranin 0	0.25	กรัม
95% ethanol	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย safranin 2.5 % ด้วย ethanol แล้วจึงเติมน้ำกลั่น

2. น้ำยา

Brom thymol blue

Dibromothymolsulphonphthalein	0.1	กรัม
NaOH 0.02 N.	8	มิลลิลิตร

ละลาย Dibromothymolsulphonphthalein 0.1 กรัมใน NaOH0.02 N. 8 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นลงไปจนครบ 250 มิลลิลิตร จะได้สารละลาย 0.4 % ซึ่งมีสีเหลืองที่ pH 6.0 และ สีน้ำเงินที่ pH 7.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สารละลาย 0.85% Normal Saline

3.1 ชั่งสารโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร

3.2 เติมน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.3 นำสารละลาย 0.85% NaCl ไปทำการฆ่าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

สารเคมีและวิธีที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. กรดแลคติก

1.1 สารเคมี

1.1.1 น้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มเดือด 20 นาที

1.1.2 สารละลายมาตรฐาน 0.1 N. NaOH เตรียมจาก NaOH 4 กรัม ที่เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร เก็บไว้ในขวดพลาสติก ก่อนใช้นำมาหาความเข้มข้นมาตรฐานก่อน

การหาความเข้มข้นมาตรฐานของ 0.1 N. NaOH ทำได้โดยชั่ง acid potassium phthalate(อบ 2 ชั่วโมง ที่ 120 องศาเซลเซียส แล้วทำให้เย็นในโถอบแห้ง) อย่างละเอียดประมาณ 0.3 กรัม เติมลงในฟลาสก์ขนาด 250 มิลลิลิตร จึงเติมน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ 50 มิลลิลิตร เมื่อ acid potassium phthalate (มีสูตร $KHC_8H_4O_4$) ละลาย จึงเติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไตเตรตด้วยสารละลาย 0.1 N. NaOH ความเข้มข้นมาตรฐาน คำนวณได้จากสูตร

$$\text{ความเข้มข้นมาตรฐาน (N)} = \frac{\text{กรัม } KHC_8H_4O_4 \text{ X } 1000}{\text{มิลลิลิตรNaOH X } 204.229}$$

1.1.3 สารละลายฟีนอฟธาลีน (Phenolphthalein)ชั่ง 1 กรัมฟีนอฟธาลีนละลายในเอทธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ 100 มิลลิลิตร

1.2 วิธีวิเคราะห์

นำตัวอย่าง 1 มิลลิลิตรมาเจือจางด้วยน้ำปลอดคาร์บอนไดออกไซด์ เติมสารละลายฟีนอฟธาลีน 3 หยด แล้วไตเตรตด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1 N. NaOH จนกระทั่งถึง end point สีชมพู ปริมาณกรดคำนวณเป็นกรดแลคติกตามสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก} = \frac{\text{N X V X } 90.01 \text{ X } 100}{1000 \text{ X } 1}$$

กำหนดให้ N = ความเข้มข้นมาตรฐาน 0.1 N. NaOH

V = จำนวนมิลลิลิตรของสารละลาย มาตรฐาน 0.1 N.NaOH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

ผลการทดลองชุดควบคุม

ตารางที่ ง1 แสดงผลการทดลองการทดสอบการยับยั้งดิสก์ที่ชุบ MRS broth

	1	2	3
Vibrio sp.	0	0	0
E. coli	0	0	0
Staphylococcus aureus	0	0	0
Bacillus cereus	0	0	0
B. subtilis	0	0	0
Samonella sp.	0	0	0

ตารางที่ ง2 แสดงผลการทดลองการทดสอบการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบด้วยกรดแลคติก 1%

	1	2	3
Vibrio sp.	0	0	0
E. *coli*	1.5	1.6	1.65
Staphylococcus aureus	1.1	1.0	1.15
Bacillus cereus	1.2	1.35	1.4
B. subtilis	1.35	1.5	1.5
Salmonella sp.	0	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ง3 แสดงการทดสอบการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบด้วยกรดแลคติก 2%

	1	2	3
Vibrio sp.	0	0	0
E. coli	1.55	1.5	1.9
Staphylococcus aureus	1.5	1.6	1.5
Bacillus cereus	1.5	1.8	1.7
B. subtilis	1.35	1.9	1.8
Salmonella sp.	0	0	0

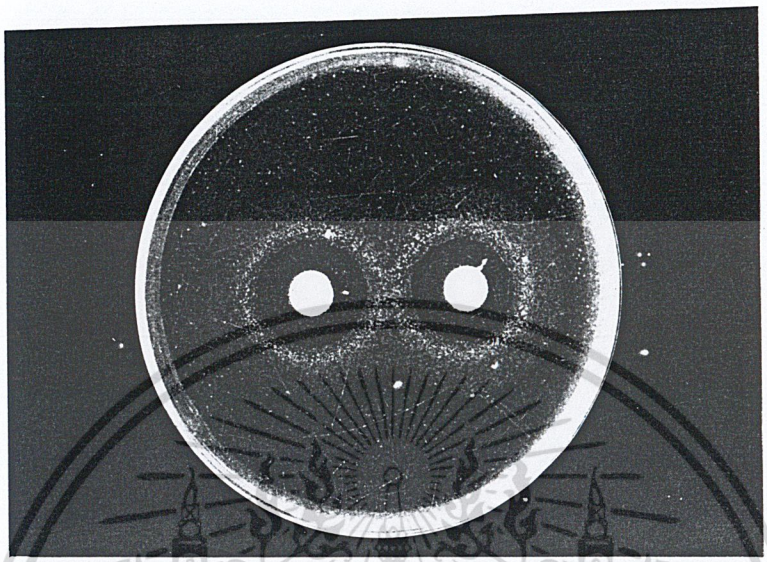
ตารางที่ ง4 แสดงการทดสอบการยับยั้งของดิสก์ที่ชุบด้วยกรดแลคติก 3%

	1	2	3
Vibrio sp.	0	0	0
E. coli	1.55	1.6	1.65
Staphylococcus aureus	1.5	1.45	2.0
Bacillus cereus	1.8	1.7	1.8
B. subtilis	1.9	1.7	1.9
Samonella sp.	0	0	0

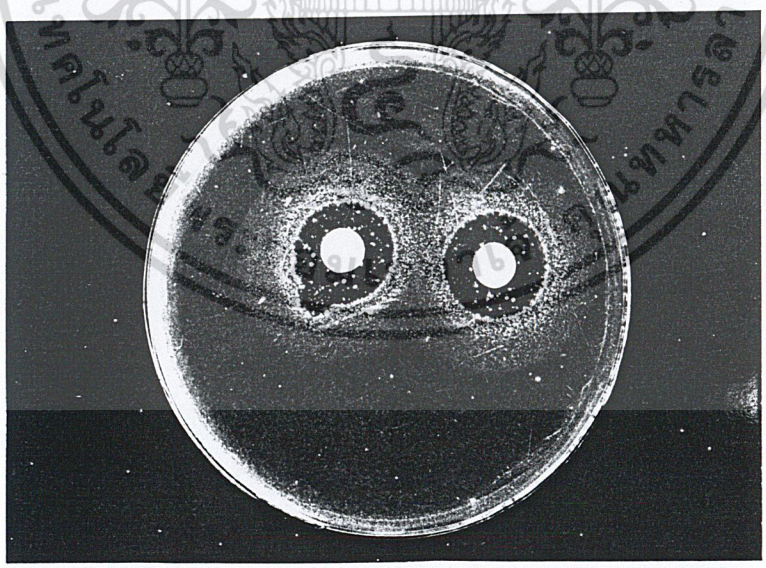
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

ลักษณะการเกิดบริเวณใสโดยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติ

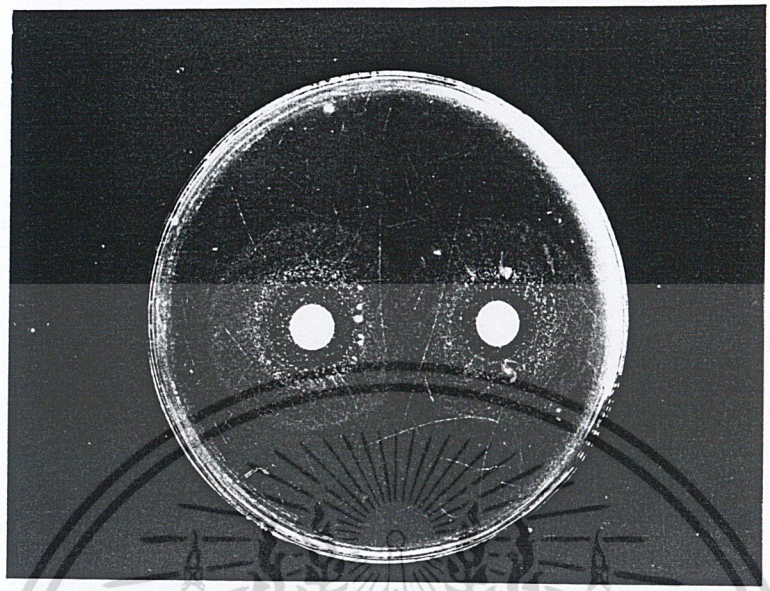


รูปที่ จ1 แสดงการทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J6 ในชั่วโมงที่ 18

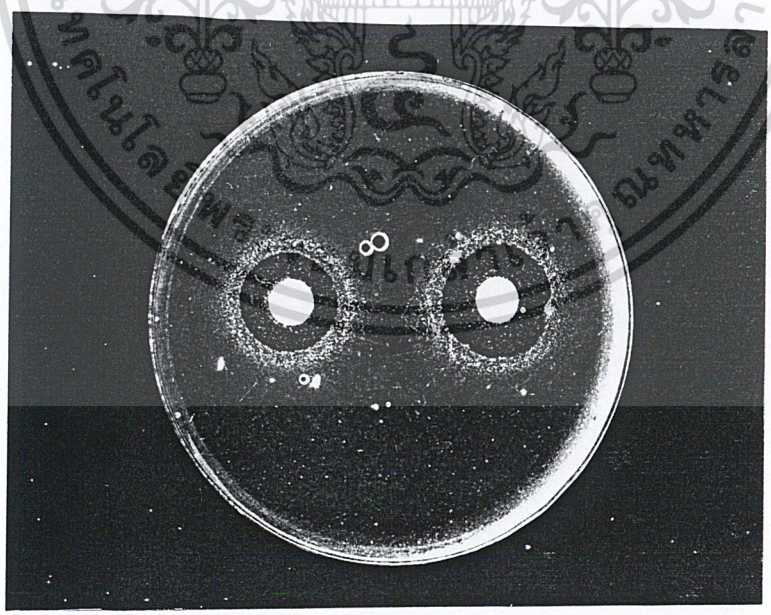


รูปที่ จ2 แสดงการทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ J1 ในชั่วโมงที่ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

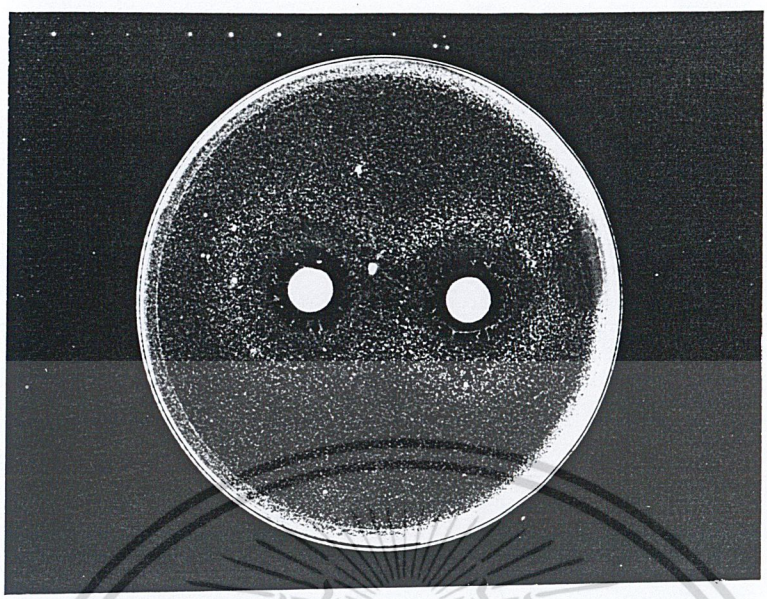


รูปที่ จ3 แสดงการทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K20 ในชั่วโมงที่ 18

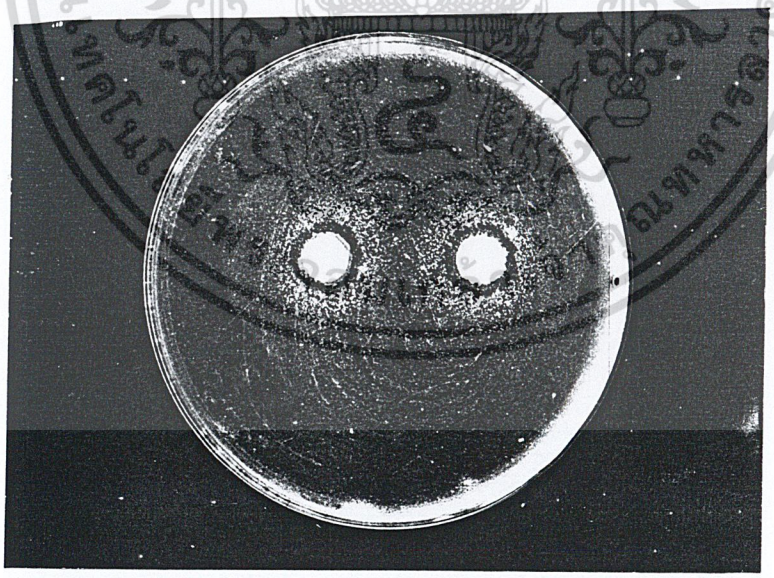


รูปที่ จ4 แสดงการทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ D5 ในชั่วโมงที่ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือแสวงหาประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

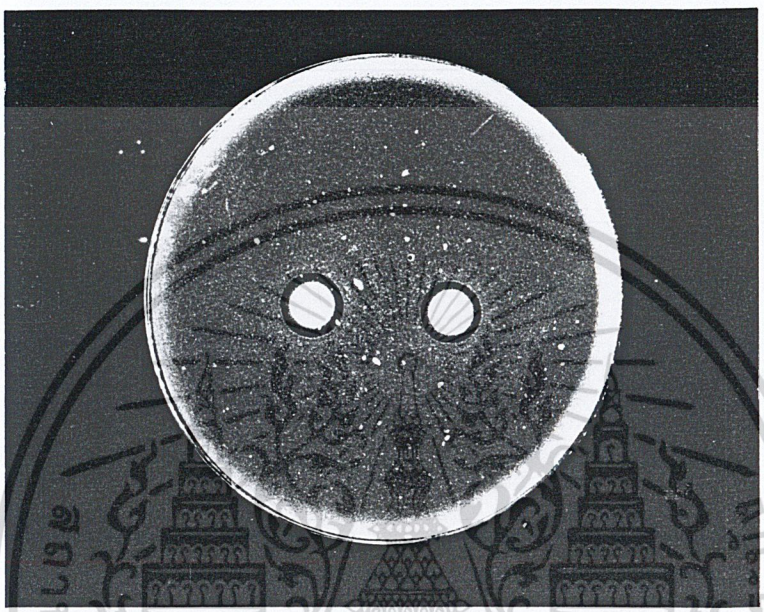


รูปที่ จ5 แสดงการทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ K7 ในชั่วโมงที่ 18



รูปที่ จ6 แสดงการทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H15 ในชั่วโมงที่ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



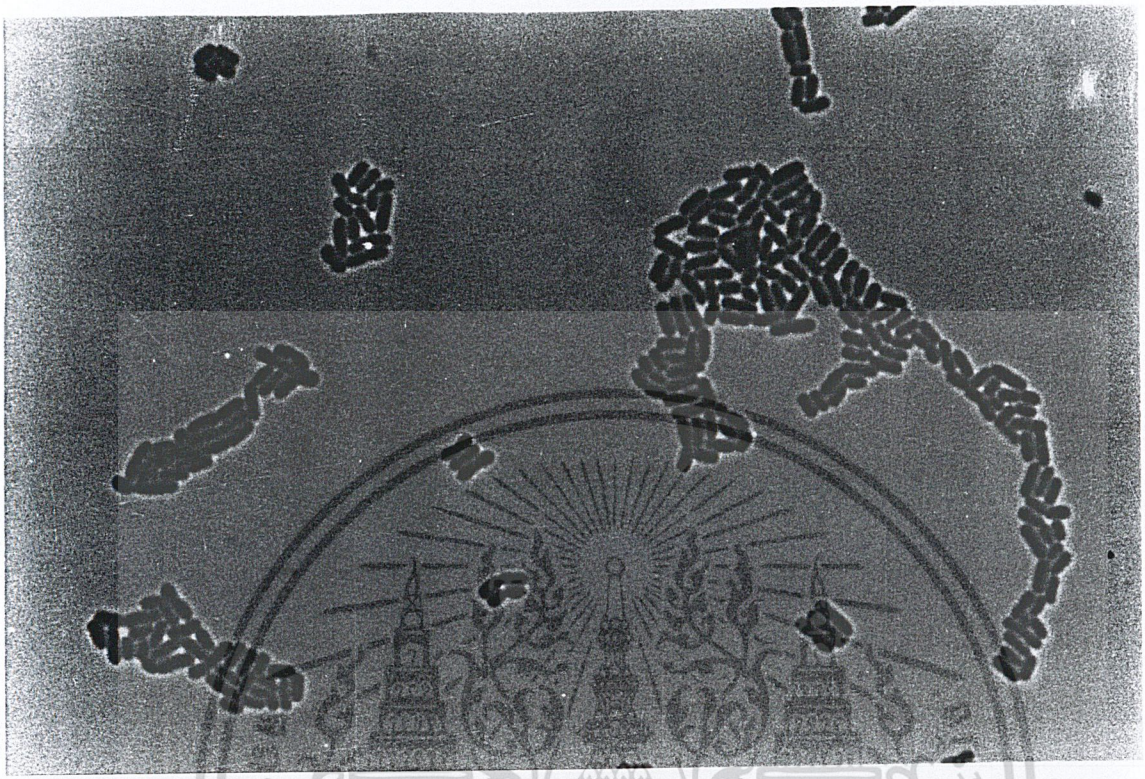
รูปที่ จ7 แสดงการทดสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ H17 ในชั่วโมงที่ 18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ฉ

ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของแบคทีเรียแลคติก

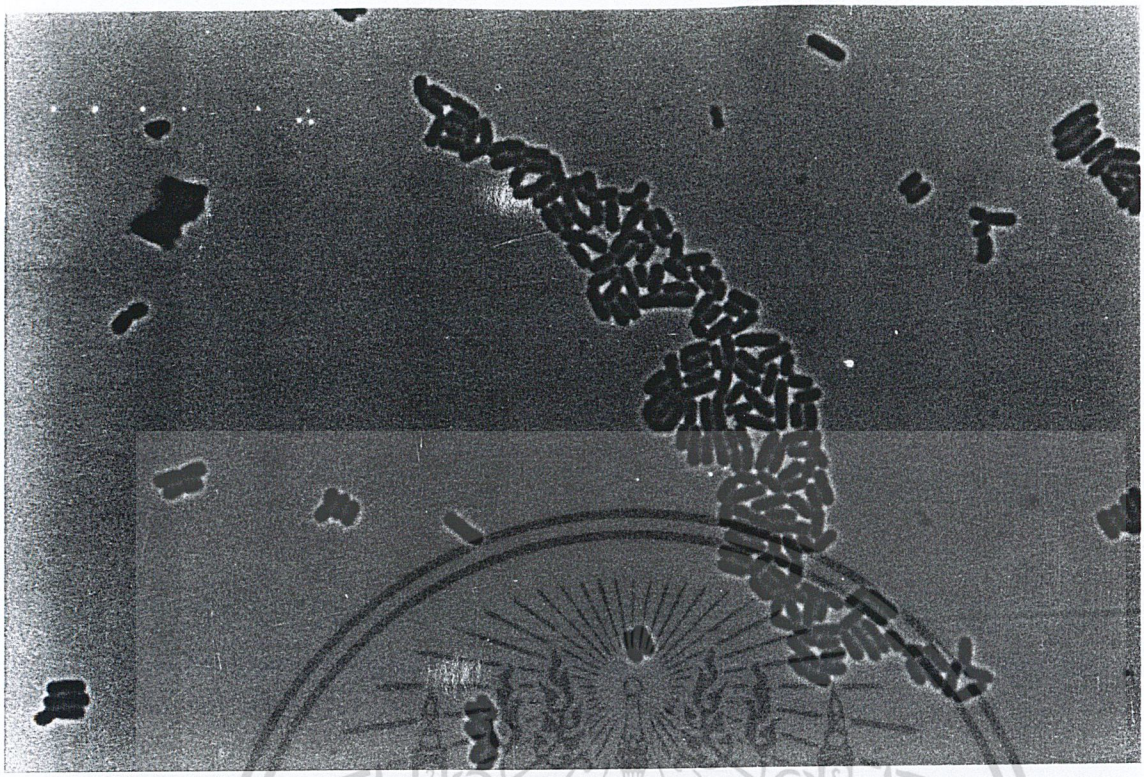
โดยเทคนิคการย้อมสีแกรม



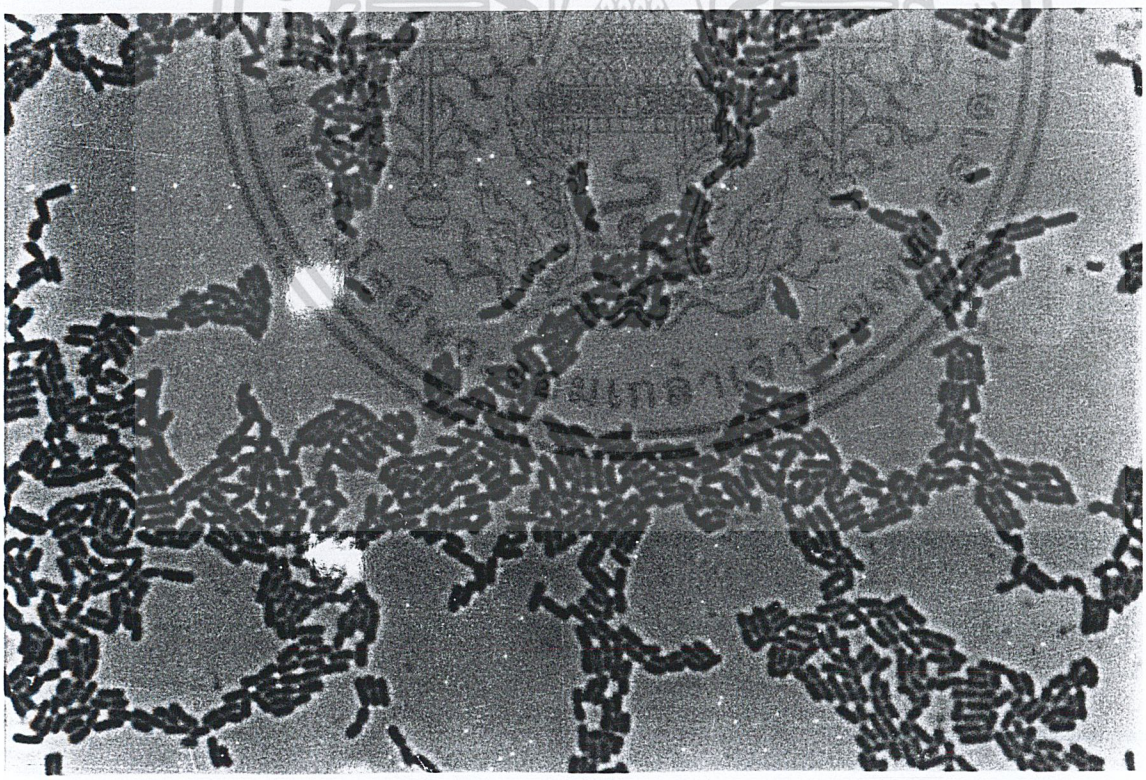
รูปที่ ฉ1 แบคทีเรียแลคติก J6

รูปที่ ฉ2 แบคทีเรียแลคติก J1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

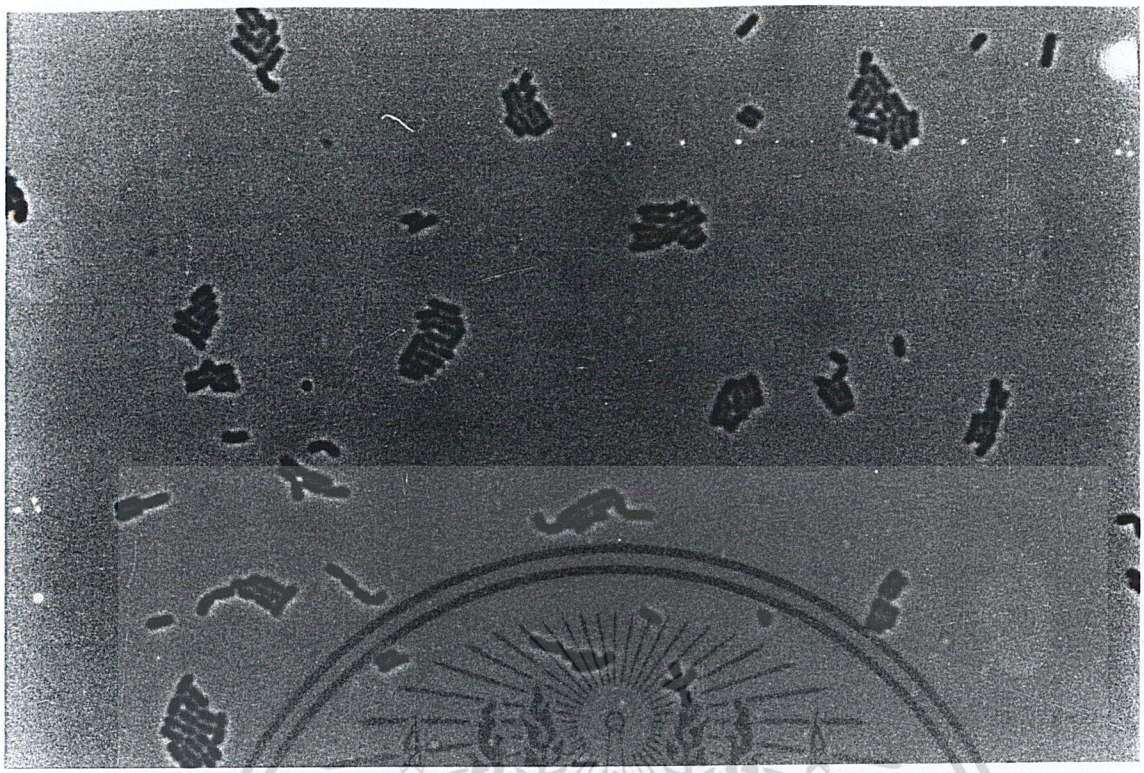


รูปที่ ฉ3 แบคทีเรียแลคติก K20

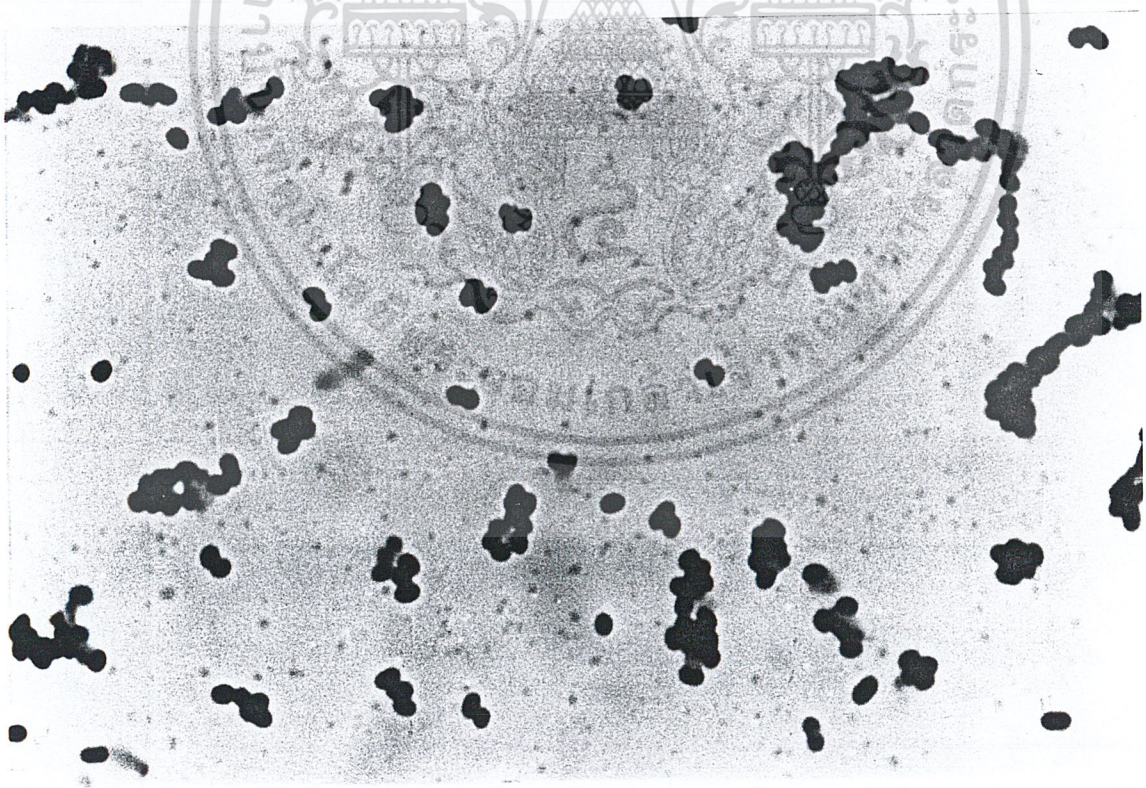


รูปที่ ฉ4 แบคทีเรียแลคติก D5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

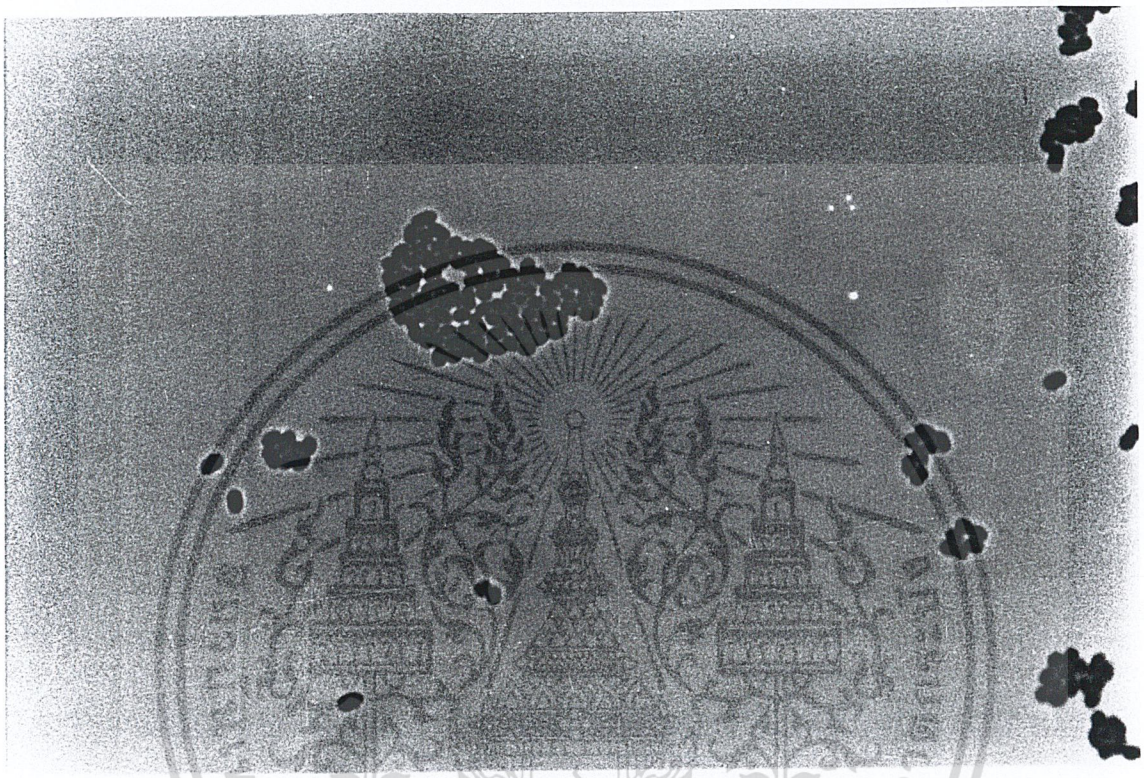


รูปที่ ฉ5 แบคทีเรียแลคติก K7



รูปที่ ฉ6 แบคทีเรียแลคติก K15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

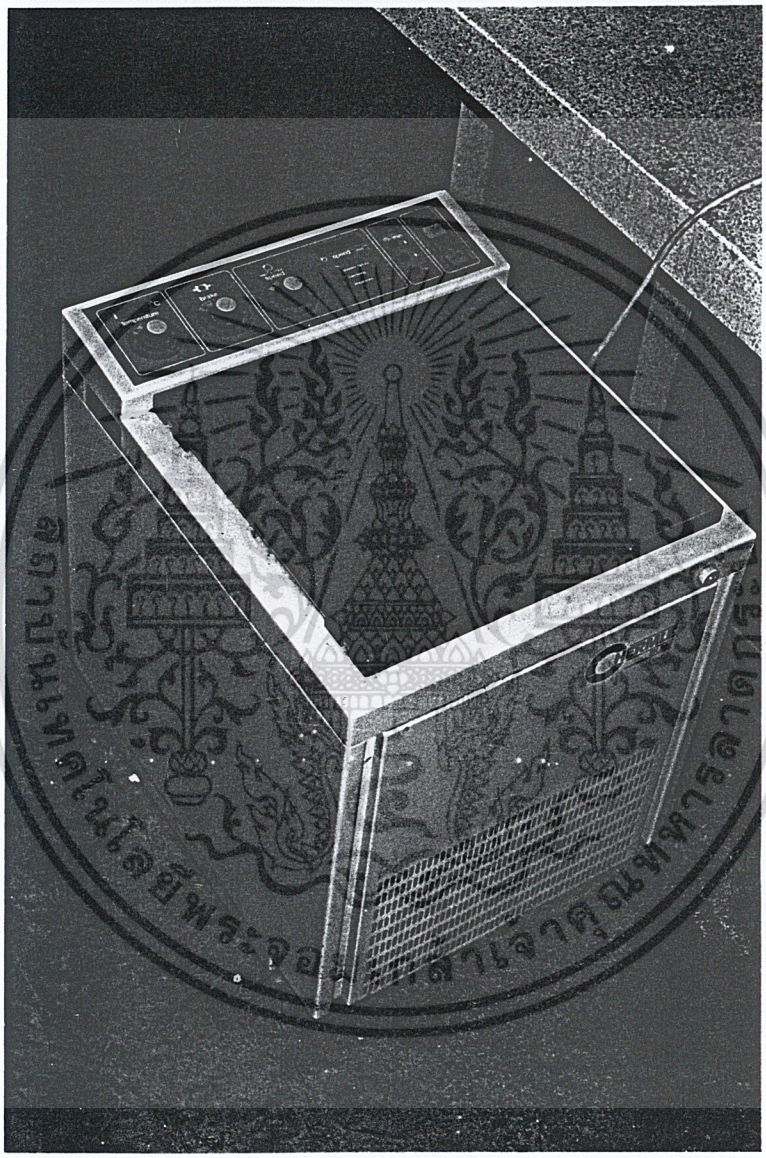


รูปที่ ฉ7 แบคทีเรียแลคติก K17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

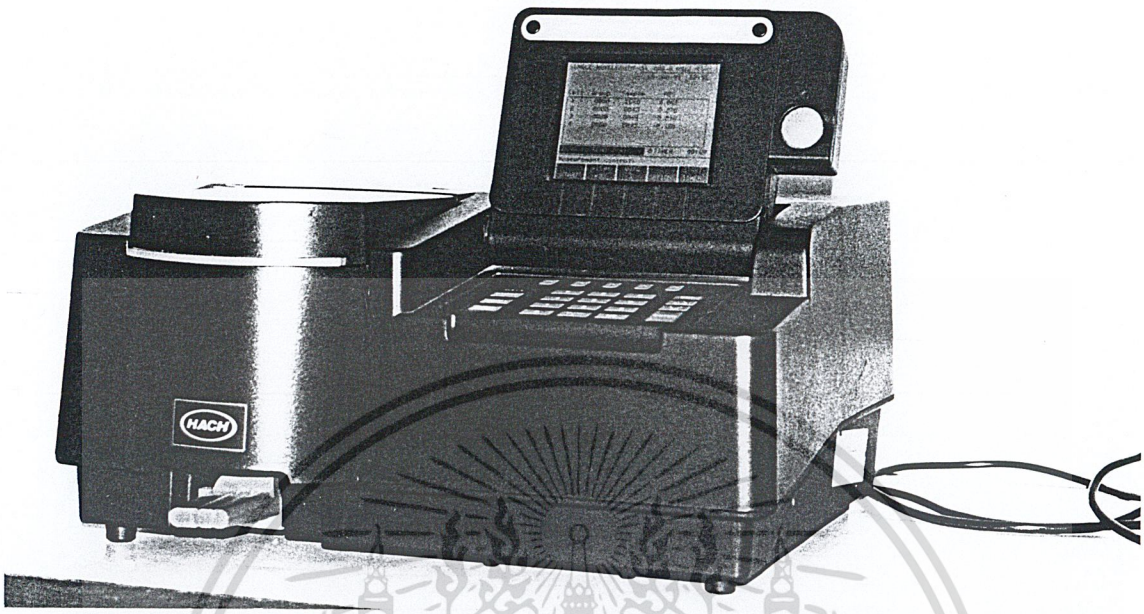
ภาคผนวก ช

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง



รูปที่ ช1 แสดงเครื่องหมุ่นเหวี่ยง (Centrifuge)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ ช2 แสดงเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

รูปที่ ช3 แสดงแผ่นทดสอบการยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้