91755

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

T097023

เรื่อง

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากผักดอง

(Screening of Bacteriocin producing Lactic acid Bacteria from Fermented Vegetables)

จัดทำโดย

นางสาว ปริยานุช เลิศธัญญาลักษณ์ รหัสนักศึกษา 46040217

นางสาว ชนม์นิภา ติยะศิริตานนท์ รหัสนักศึกษา 46040864

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....97023.....
วัน เดือน ปี.....
12 / 2 / 50

(รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

วัน เดือน ปี

b 11229664
i

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากผักดอง

(Screening of Bacteriocin producing Lactic acid Bacteria from Fermented Vegetables)

จัดทำโดย

นางสาว ปริยานุช เลิศธัญญาลักษณ์ รหัสนักศึกษา 46040217

นางสาว ชนม์นิภา ติยะศิริตานนท์ รหัสนักศึกษา 46040864

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของวิชาปัญหาพิเศษ

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปริยานุช เลิศธัญญาลักษณ์ และชนม์นิภา ติยะศิริตานนท์. 2549: การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากผักดอง (Screening of Bacteriocin producing Lactic acid Bacteria from Fermented Vegetables). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา : รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

จากการทดลองเพื่อศึกษาลักษณะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผักดองจำนวน 10 ตัวอย่างจากแหล่งผลิตต่างๆในจังหวัดกรุงเทพฯ โดยวิธี Colony-spot-on-lawn พบว่ามี 10 สายพันธุ์จาก 60 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้ดี จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดมา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 2 ,10 และ 31 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ที่เป็นแกรมบวกได้ดี รวมถึง *L. innocua* ซึ่งทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ด้วย และเมื่อนำมาทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อินดิเคเตอร์พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกมา 3 สายพันธุ์ ไม่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินได้เลย อาจเป็นเพราะว่า สภาวะในอาหารเหลวไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซิน หรือมีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ต่ำเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว จึงทำให้แบคทีเรียแลคติก ทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่แสดงการยับยั้งเหมือนในวิธี Colony-spot-on-lawn

ปริยานุช เลิศธัญญาลักษณ์

ชนม์นิภา ติยะศิริตานนท์

นักศึกษา

รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

อาจารย์ที่ปรึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การนำเสนอปัญหาพิเศษในหัวข้อเรื่องที่เกี่ยวกับ การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้จากผักดอง (Screening of Bacteriocin producing Lactic acid Bacteria from Fermented Vegetables) สำเร็จลุล่วงด้วยดี ต้องกราบขอบพระคุณ รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ท่านได้กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษา เสนอแนะ และดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี รวมทั้งแก้ไขข้อบกพร่องของสัมมนาให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ที่เป็นกำลังใจให้และสนับสนุนในด้านต่างๆให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่ให้กำลังใจและคอยช่วยเหลือ และสุดท้ายขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการแนะนำ ติชมและให้กำลังใจในการจัดทำปัญหาพิเศษทุกๆท่าน

ผู้จัดทำ

10 กุมภาพันธ์ 2550

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มา	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	2
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก	2
2.2 สารต่างๆที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติก	2
2.3 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ (antibiosis) ของสารต่างๆที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก	8
2.4 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน	9
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	11
3.1 อุปกรณ์	11
3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ	11
3.3 วัตถุดิบ	12
3.4 วิธีการทดลอง	12
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	18
4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผักดอง	18
4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่มีแนวโน้มในการสร้าง Bacteriocin โดยวิธี Colony spot-on-lawn	19
4.3 ทดสอบการย้อมแกรม	22
4.4 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซิน	22
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
เอกสารอ้างอิง	26
ภาคผนวก	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากแหล่งต่างๆ	18
2. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่างๆทั้ง 10 สายพันธุ์	20
3. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือก	21
4. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ ทั้ง 3 สายพันธุ์	22
5. ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิตของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์	23

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. สารต่างๆที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติก	3
2. ผักดองในประเทศไทย	15
3. เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เกิดโซนใสรอบโคโลนี	15
4. การเจริญของ LAB ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (deep tube)	15
5. เติม MRS broth 5 ml ลงใน MRS agar	16
6. การเจริญของเชื้อเมื่อเติม MRS broth	16
7. การเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบน BSM medium	16
8. การเกิด Clear Zone ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	17
9. การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	17

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มา

การหมักดองส่วนใหญ่เป็นการดองที่เกิดจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียในตระกูล *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc* เป็นต้น โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตในอาหารให้เป็นกรดแลคติก อาหารจึงมีรสเปรี้ยว แบคทีเรียแลคติกที่สร้างขึ้นมานี้ส้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารได้เป็นเวลานานๆ โดยสารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับความสนใจในการศึกษาคือแบคเทอริโอซิน เพราะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง รวมทั้งยังเป็นผลผลิตจากจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาและวิจัยแล้วว่า ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย และเป็นเชื้อชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS (General Recognized as Safe) สามารถใช้เติมในอาหารได้ โดยอาจเติมในรูปของสารบริสุทธิ์ หรือในรูปของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จึงมีการริเริ่มใช้สารเหล่านี้เพื่อประโยชน์ในด้านการถนอมอาหารในอุสาหกรรมอาหารหมักต่างๆ การศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทำให้คุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งดังกล่าวน่าจะเป็นหนทางที่ดีในการหาสารที่ใช้ในการทดแทนสารกันบูดประเภทสารเคมี

จากประโยชน์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น การศึกษานี้จึงได้มุ่งเน้นเพื่อทำการคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผักดอง และนำเชื้อที่คัดแยกความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ จากผักดอง
2. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินและปริมาณแบคเทอริโอซิน ที่เชื้อสามารถสร้างได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria-LAB) : เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ สามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ ส่วนมากแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แบคทีเรียกรดแลคติกขาดสารไซโตโครม (cytochromes) และฟอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์คะทะเลสและออกซิเดส (flavoprotein oxidases) และใช้ออกซิเจนนี้สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ/หรือใช้เพื่อออกซิไดซ์ NADH ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการดีไฮโดรจิเนชันของน้ำตาล

2.1.1 การหมักกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เกิดกรดแลคติกจากปฏิกิริยา 2 วิถีทาง คือ วิถีทางที่ได้กรดแลคเตทเพียงอย่างเดียว เรียกว่าโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ(homofermentative) และวิถีทางที่ได้แลคเตทร่วมกับสารอื่นในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative)

<u>แบบที่ 1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ</u>

เป็นการหมักที่ได้แลคเตทอย่างเดียวเป็นผลผลิตสำคัญ

<u>แบบที่ 2 การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ</u>

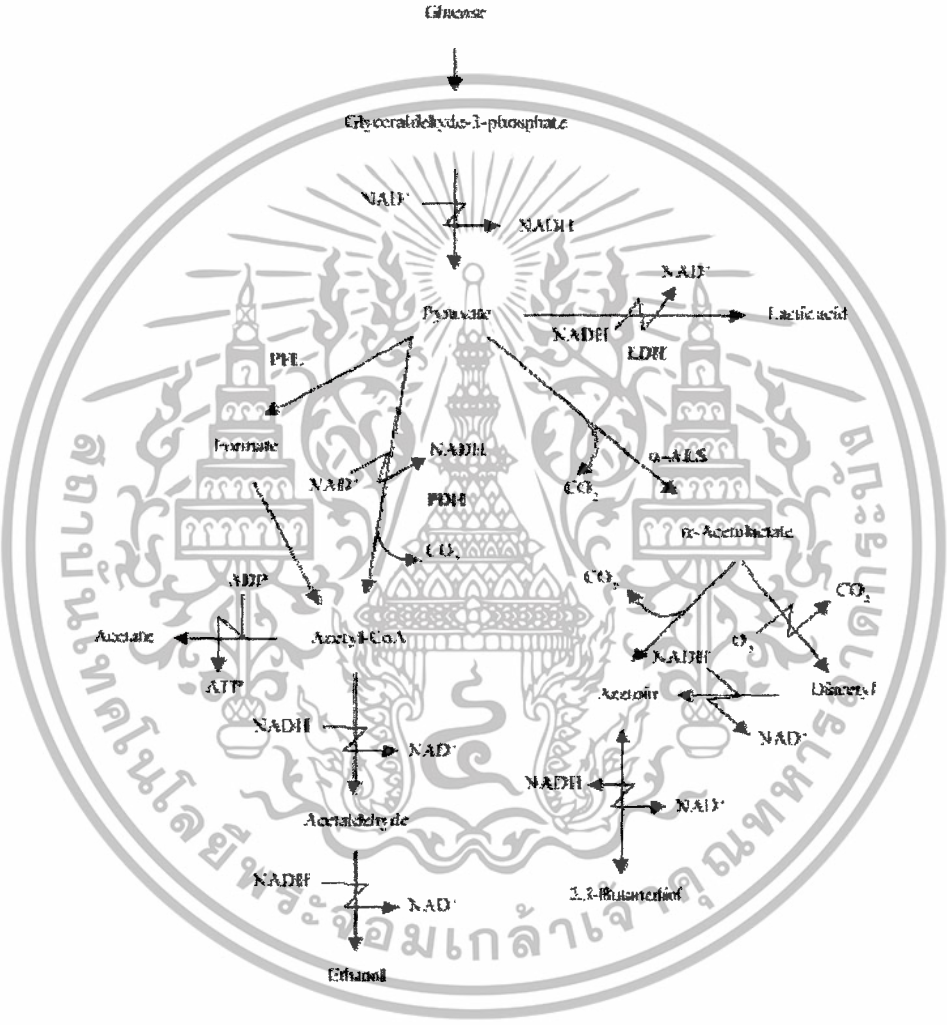
เป็นการหมักที่ได้แลคเตท เอทธานอล หรืออะซิเตทและคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส

2.2 สารต่างๆที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเมื่อเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆจะเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อมคือ ทำให้เกิดการแข่งขันกันใช้สารอาหารและการใช้พื้นที่สำหรับการเจริญ (O'Sullivan et al., 2002) โดยการสร้างสารต่างๆขึ้นมาเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งส่วนใหญ่จะสร้าง กรดแลคติกและกรดอะซิติก รวมทั้งยังมีสารชนิดอื่นๆ (รูปที่ 1) ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้อยกว่า กรดแลคติกและกรดอะซิติก แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ formic acid , free fatty acid , ammonia , ethanol , hydrogen peroxide , diacetyl , acetoin , acetaldehyde , benzoate , bacteriolytic enzyme และ bacteriocin รวมถึงสารที่ไม่สามารถจำแนกได้อีกหลายชนิด (Adams, 1999)



รูปที่ 1 สารต่างๆที่เกิดขึ้นจากกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่มา : www.funpecrp.com.br/.../gmr0075_full_text.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่สำคัญและศึกษากันมาก ได้แก่

2.2.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid), อะซิตาลดีไฮด์ (acetaldehyde) และเอทานอล (ethanol)

2.2.1.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กรดแลคติก (Lactic acid)

กรดแลคติกจะถูกผลิตโดย *Lactobacillus* spp. ซึ่งมีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหารโดยใช้เป็นตัวปรับความเป็นกรดของอาหาร เติมแต่งในอาหารและเครื่องดื่ม เพื่อปรุงแต่งกลิ่นรสให้รสชาติเปรี้ยวที่พึงประสงค์ นิยมใช้กับผลิตภัณฑ์ เนยแข็ง ขนมหวาน น้ำสลัด ผลิตภัณฑ์จากเนื่อสัตว์ แยม เยลลี่ และขนมปัง เป็นต้น

กรดอะซิติก (Acetic acid)

กรดอะซิติกเป็นผลผลิตจากกระบวนการหมักแบบ Heterofermentative ของแบคทีเรียพวก *Leuconostoc* spp. และ lactobacilliบางชนิด และกรดอะซิติกจะเกิดขึ้นในปริมาณน้อยแต่มีความจำเป็น เช่น ในผลิตภัณฑ์ผักดอง เช่น กะหล่ำปลีดอง (Buckenhuskes et al.,1990) มีการนำมาใช้กับผลิตภัณฑ์หลายชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญและลดความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และ รา ซึ่งกรดแลคติกจะถูกผลิตโดย *Lactobacillus* spp. ซึ่งนิยมนำมาเติมลงใน มายองเนส และ ซาลัดเดสซิง (salad dressing)

กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid)

กรดโพรพิโอนิกจะถูกผลิตโดย *Propionibacterium* spp. ซึ่งกรดโพรพิโอนิกมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเจริญและลดปริมาณของแบคทีเรียแกรมบวก และ แบคทีเรียแกรมลบซึ่งแบคทีเรียแกรมลบจะไวต่อกรดโพรพิโอนิกมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก การใช้ในปริมาณ 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ นิยมนำมาใช้ในการควบคุม ชีส เนย และผลิตภัณฑ์เบเกอรี่ และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียและยีสต์ ในแอปเปิ้ลซอส ผลไม้สด (fresh fruit) และ ไซรัป (Syrup)

2.2.1.2 อะซิตาลดีไฮด์ (acetaldehyde)

มีส่วนช่วยน้อยในการยับยั้ง โดยจะเกี่ยวข้องกับกลิ่นรสเริ่มต้น แต่ก็จำเป็นในการยับยั้ง

2.2.1.3 เอทานอล (ethanol)

จะมีหน้าที่คล้ายอะซิเตลดีไฮด์ ถึงแม้ว่าจะเกิดขึ้นจากการหมักแบคทีเรียแลคติก แต่จะเกิดขึ้นน้อย ทำให้มีส่วนเกี่ยวข้องน้อยในการยับยั้ง

2.2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลึซึมระหว่างการเจริญในสภาพที่มีออกซิเจน แบคทีเรียแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรงและมีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport system) โดยการทำงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) ของเอนไซค์ออกซิเดส(oxidase) และซุปเปอร์ออกไซค์ดิสมิวเทส (superoxidedismutase)

นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังเป็นพิษต่อจลินทรีย์ที่ไม่สามารถผลิดเอนไซม์คะตะเลส (catalase) มาทำลายฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ เพราะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็น สารตั้งต้นของการเกิด ซุปเปอร์แรดิคอล (superoxidase radicals) และ ไฮโดรซิลแรดิคอล (hydroxyl radicals) ซึ่งเป็นพิษต่อแบคทีเรียแลคติกสายพันธ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

2.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide)

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซส (hexose) ให้เป็นกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม heterofermentative นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม heterofermentative บางชนิด สามารถผลิตกรดคาร์บอนไดออกไซด์จากมาเลทและ ซิเตรท โดยมาเลท จะเปลี่ยนเป็นกรดแลคเตรทและคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเอนไซม์ซิเตรทไลเอส (citrate lyase) จากนั้นออกซาโลอะซิเตรทจะเกิดปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน เช่น ฮีสติดีน ไทโรซีน สามารถเกิดคาร์บอนไดออกไซด์ได้เช่นกัน และคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะเป็นพิษต่ออาหารที่มีแบคทีเรียที่จำเป็นต้องใช้ออกซิเจนในกระบวนการ

2.2.4 ไดอะซิทิล (diacetyl)

ไดอะซิทิลชนิด 2,3 – butanedione เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลีซึมของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวทที่เป็นสารตัวกลางแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง *Lactobacilllus* , *Streptococcus* , *Leuconostoc* และ *Peddiococcus* สามารถสังเคราะห์ไดอะซิทิลได้ โดยจะมีการสร้างไดอะซิทิลขึ้นในระหว่างการใช้น้ำตางเฮกโซสและบางครั้งอาจเกิดขึ้นจากการ ใช้ซิเทรตจะถูกเปลี่ยนผ่านไพรูเวตไปเป็นสารไดอะซิทิลและอาจอยู่ในรูปรีดิวซ์ คือ อะซีโทอีน

การสร้างสารไดอะซิทิลจะเกิดขึ้นน้อยในสภาวะที่มีไพรูเวท ซิเทรต อะซีเตต หรือ ปัจจัยอื่นๆ การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจะลดการสร้างไดอะซิทิล แต่การสร้างสารไดอะซิทิลจะเพิ่มขึ้น ถ้าพบไอออนของโลหะ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Cu^{2+} Mg^{2+} หรือMn^{2+} พีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างไดอะซิทิล คือ 4.5-5.5 ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ ที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถถูกยับยั้งที่ความเข้มข้นสูงกว่า 350 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไดอะซิทิล (diacetyl) ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยและสามารถใช้เป็นสารกันบูดและเป็นสารที่ให้กลิ่นรสในเนย เนยแข็ง และผลิตภัณฑ์นมอื่นๆ นอกจากนั้นยังพบว่า ในไวท์ขาว และ ไวท์แดง บรั่นดี กาแฟดั่ว หญ้าหมัก และอาหารหมักชนิดอื่นๆ แต่ก็มีข้อจำกัด เนื่องจากต้องใช้ในปริมาณมากจึงจะมีผลในการถนอมอาหาร และเนื่องจากมีกลิ่นรุนแรง จึงทำให้สามารถใช้ในอาหารได้เพียงบางชนิด แต่อาจจะใช้เป็นสารฆ่าเชื้อสำหรับพื้นผิวต่างๆหรือเครื่องมือที่สัมผัสกับอาหารในกระบวนการผลิตอาหารและอุตสาหกรรม

2.2.5 ริวเทอริน (Reuterin)

ริวเทอรินเป็นสารที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ มีคุณสมบัติว่องไวที่พีเอชต่ำ ละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง เสถียรต่อความร้อน มีฤทธิ์ในการทำงานได้กว้าง และละลายได้ในอะซิโตน

2.2.6 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)

แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิด สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ ซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีสปีชีส์เดียวกันหรือสปีชีส์ใกล้เคียงกัน โดยไม่มีผลต่อเซลล์ที่ผลิต นอกจากนี้พบว่า แบคเทอริโอซินยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เช่น *Listeria* แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกได้รับความสนใจอย่างมาก โดยอาจนำมาใช้ในกระบวนการแปรรูปอาหาร ปรับปรุงกลิ่นของอาหารหมักดอง หรือใช้ป้องกันโรคเต้านมอักเสบในวัว และโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นสารถนอมอาหาร เช่น ไนซิน (Nisin) เป็นแบคเทอริโอซิน ที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายและได้รับการรับรองจากองค์การอนามัยโลก (WHO) ให้ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารและใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก นอกจากนั้นยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน ได้ เช่น *Leuconostoc* , *Lactobacillus* , *Pediococcus* , *Lactococcus* และ *Streptococcus* เป็นต้น

2.2.6.1 การจัดจำแนกประเภทของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่ละลายน้ำ มีประจุบวก มีจุดสมมูลทางไฟฟ้าสูง มักเสถียรที่พีเอชเป็นกรดหรือเป็นกลาง

<u>หากพิจารณาเฉพาะลำดับอะมิโนแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม</u> คือ

1. แบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยแลนไทโอนีน (lantionine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัส เช่น mutacin, carnosin UI149 , lactocin S , salivericin A

2. แบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วย กรดอะมิโนทั่วไป แบ่งเป็น 2 ชนิดตามลำดับของกรดอะมิโนที่ปลายด้านเอ็น (N-terminal) ได้แก่ ชนิดคล้าย pediocin เช่น sakacin A , sakacin P , leucocin A-UAL!89, curvicin A, และชนิดคล้าย lactococcin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. แบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สายทำงานร่วมกันจึงออกฤทธิ์ได้แก่ lactococcin และ plantaricin A

<u>เมื่อพิจารณาสมบัติอื่นๆ ประกอบ ได้แก่ โครงสร้างปฐมภูมิ มวลโมเลกุล และความเสถียรต่อความร้อน</u> สามารถแบ่งแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. แลนติไบโอติก (Lantibiotic)

เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กประกอบด้วยกรดอะมิโนชนิดดีไฮโดรไทโอลีเทอร์ (dehydrothioether) แลนไทโอนีน และ 3-เมทิลแลนไทโอนีน สร้างขึ้นโดยดัดแปลงกรดอะมิโนปกติในสารเปปไทด์หลังกระบวนการแปลรหัส แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ของแบคทีเรียเป็นชนิด A มีโครงสร้างคล้ายเกลียวที่ยืดออก (ชนิด B โครงสร้างเป็นก้อนกลม) ได้แก่ cornocin UI49, cytolysin L1, cytolysin L2, lacticin 481, lactocin S, lactococin, mutacin, nisin A, nisin Z, salivaricin A, streptococcin a-FF22

2. นอลแลนติไบโอติก (*non*-Lantibiotic)

แบคเทอริโอซินที่เป็นเปปไทด์ขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตัน ทนอุณหภูมิตั้งแต่ 100-121 แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

2.1 กลุ่มย่อย a. (IIa)

เป็นแบคเทอริโอซินซึ่งยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้ดี กลุ่มย่อยนี้มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนเหมือนกัน(38-55เปอร์เซ็นต์) โดยเฉพาะที่ด้านปลายเอ็นมีรูปแบบของกรดอะมิโนเป็น Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Gys บางครั้งเรียกกลุ่มนี้ว่า แบคเทอริโอซินในตระกูล *Pediocin* พบในแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิด เช่น Prdiocin PA-1 ผลิตโดย *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0, Sakacin A ผลิตโดย *Lactobacillus sake* 706 และ *Enterococcus*

2.2 กลุ่มย่อย b. (IIb)

เป็นแบคเทอริโอซินซึ่งการออกฤทธิ์ต้องอาศัยสายเปปไทด์ 2 สายทำงานร่วมกันจึงจะมีประสิทธิภาพ ลักษณะคล้ายแบคเทอริโอซิน เป็นองค์ประกอบร่วม ได้แก่ Lactococcin G, Lactacin F, LaLactococcin M

2.3 กลุ่มย่อย c. (IIc)

เป็นแบคเทอริโอซินซึ่งการออกฤทธิ์ต้องอาศัยหมู่ไทออล

3. แบคเทอริโอซินซึ่งเป็นโปรตีนขนาดใหญ่

แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (มากว่า 30 กิโลดาลตัน) รวมทั้งเอนไซม์ เช่น ฮีโมไลซิน (hemolysins) และ มิวรามิเดส (muramirase) แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ไม่ทนความร้อน แยกได้จากสกุล *Lactobacillus* เท่านั้น เช่น Acidophilucin A, Caseicin 80

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. แบคเทอริโอซินซึ่งมีคาร์โบไฮเดรต หรือไขมันเป็นองค์ประกอบร่วม

สำหรับการออกฤทธิ์ไม่ได้รับการยอมรับนัก เพราะอาจเกิดจากการทำให้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ไม่ดีพอ

2.2.6.2 แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคเทอริโอซินสร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก จะมีคุณสมบัติน่าสนใจกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบ เช่น colcins หรือ microcins ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียได้หลายชนิด เซลล์เป้าหมายมีความต้านทานน้อยและไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลาย

2.2.6.3 ประโยชน์ของแบคเทอริโอซิน

ปัจจุบันการถนอมอาหารด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก จัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (Generally recognized as safe หรือ GRAS) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญของ จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ ด้วยการใช้สารอาหารทั้งสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดออกมา สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ โดยไม่มีผลข้างเคียงต่อผู้บริโภค ไม่ก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้ต่อผู้บริโภค

2.3 กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ (antibiosis) ของสารต่างๆที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีกลไกการทำงานที่มีลักษณะเฉพาะ จึงมีความสามารถในการถนอมอาหาร ซึ่งประกอบด้วย กรดอินทรีย์ (organic acid) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) ไดอะซิทิล (diacetyl) ริวเทอริน (reuterin) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocins) (De Vuyst and Vandamme ,1994) ปัจจัยทั้งหมดนี้มีบทบาทหน้าที่ในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ

2.3.1 กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซินแต่ละกลุ่ม มีกลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายแตกต่างกันแต่ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนที่เหมือนกันคือ การยึดเกาะกับผิวเซลล์และการสร้างโพรง (pore) ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ แบคเทอริโอซินแต่ละชนิด มีผลต่อแบคทีเรียไม่เท่ากัน เช่น mycobacteria ทนต่อไนซินสูงกว่า staphylococci , streptococci , bacilli และ clostridia ประมาณ 100 เท่า บางสายพันธุ์ของแบคทีเรียสปีชีส์เดียวกันหรือ บางเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันทนต่อแบคเทอริโอซินแตกต่างกัน เซลล์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่งอาจไม่ทนต่อแบคเทอริโอซินชนิดอื่นและภายใต้สภาวะปกติแบคทีเรียแกรมลบทนต่อแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแกรมบวก กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินกลุ่มที่ 3 และ 4 ไม่เป็นที่รู้จักกันดีเพราะกลุ่มที่ 1 แต่แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยกเว้น lactococcin 972 สามารถทำให้แบคทีเรียตายหรือหยุดการเจริญเติบโต โดยทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลง

2.4 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน

เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากจะสามารถสังเคราะห์แบคเทอริโอซินได้แล้วยังสามารถสร้างสารอื่นๆที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้อีกหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซีทิล ดังนั้นในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินจึงต้องมีการกำจัดผลของปัจจัยข้างต้นไม่ให้เข้ามารบกวนผลการทดลองที่อาจจะเบี่ยงเบนได้ เช่น

2.4.1 การกำจัดผลของกรดอินทรีย์

โดยการเติมอาหารที่มีส่วนประกอบที่จะทำปฏิกิริยากับกรดที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นให้มีสภาพเป็นกลางเสียก่อน โดยการเพิ่มสารอาหารในกลุ่มที่เป็น buffering agents เช่น K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 หรือลดปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้แบคทีเรียกรดแลคติกเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติกลดน้อยลง (กรณีของกรดแลคติก) หรือในกรณีของกรดอะซิติกทำโดยบ่มเชื้อในสภาวะ anaerobe เนื่องจากกรดอะซิติกเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (ในกรณีที่ทดสอบด้วยอาหารแข็ง) หรือถ้าใช้วิธีทดสอบด้วยอาหารเหลวก็กำจัดโดยการนำมาไตเตรตด้วยเบส (NaOH)

2.4.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะกำจัดโดยทำการบ่มเชื้อในสภาพไร้อากาศ เพราะแบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาพที่มีออกซิเจนเท่านั้น หรือโดยการเติมเอนไซม์คะตะเลสที่จะไปสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน ซึ่งโดยปกติแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่มีเอนไซม์คะตะเลสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย hydrogenperoxide

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน ดังนั้นถ้าเติมเอนไซม์ทริปซินซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสลงไปด้วยจะมีผลทำให้แบคเทอริโอซินถูกทำลาย จึงไม่มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียทดสอบ ดังนั้นถ้าสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นเป็นแบคเทอริโอซินก็ควรจะให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.4.3 เทคนิคต่างๆที่ได้มีการนำมาเพื่อใช้ทดสอบหาแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซิน (Swetwiwathana และ Lotong, 1999; Tichaczek และคณะ, 1992)

สามารถแบ่งวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกโดยใช้การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหลัก ได้แก่

2.4.3.1 การคัดเลือกแบบที่ให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญไปพร้อมกับแบคทีเรียทดสอบ เช่นวิธี Colony direct method โดยการเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารกึ่งแข็งหรือเกลี่ยเชื้อทดสอบบนผิวหน้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารและทำการแต้มแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาทดสอบความสามารถบนอาหารกึ่งแข็งนั้นไปพร้อมๆกัน

2.4.3.2 การคัดเลือกโดยการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกก่อนเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยจะต้องเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่จะทดสอบความสามารถล่วงหน้าก่อนประมาณ 16-24 ชม. แล้วจึงเททับด้วยแบคทีเรียทดสอบ ในอาหารกึ่งแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และบ่มในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

นอกจากนี้การแบ่งวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกโดยใช้การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหลักแล้วยังแบ่งออกได้โดยดูความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารแข็งและในอาหารเหลวเป็นหลักด้วย ดังนี้

1. การสร้างแบคเทอริโอซินบนอาหารแข็ง

การติดตามการสร้างแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะศึกษาจากการติดตามการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารแข็ง (โดยทั่วไปจะผสมเชื้อลงในอาหารกึ่งแข็งแล้วเททับบนโคโลนีของแบคทีเรียที่ทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน) แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างกรดอินทรีย์ (กรดแลคติกและกรดอะซิติก) และสารต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆอีก (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิทิล) และอาจจะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ ดังนั้นจึงต้องมีวิธีที่จะกำจัดสารต่างๆเหล่านี้เสียก่อน ตัวอย่างที่ใช้ในวิธีนี้ เช่น Flip streak method และ Colony direct method

2. การสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารเหลว

การสร้างแบคเทอริโอซินอาจจะสังเกตได้ง่ายบนอาหารแข็ง แต่การศึกษาถึงลักษณะปลีกย่อยอื่นๆของแบคเทอริโอซินจะศึกษาในอาหารเหลว เพราะอาหารเหลวง่ายต่อการปรับแต่งสูตรอาหารและตรวจเช็คผลการทดสอบ เช่น สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์และการสร้างแบคเทอริโอซิน แต่วิธีติดตามการสร้างในอาหารเหลว มีวิธีการทำที่ค่อนข้างยุ่งยาก จึงมักใช้ยืนยันผลจากการทดสอบบนอาหารแข็ง และใช้ในการศึกษารายละเอียด โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว แล้วใช้น้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบ โดยกำจัดเซลล์ออกโดยการปั่นแยกหรือการกรองจะได้เป็น crude cell-free preparation of the bacteriocin แล้วนำไดอะไลซิสเพื่อเป็นการกำจัดสารแปลกปลอมอื่นๆออกไป และปรับสภาพความเป็นกรดด้วย NaOH จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ไปหยดลงบนกระดาษกรอง หรือหลุมที่เจาะลงบนอาหารแข็งเพื่อตรวจผลการยับยั้ง หรือนำไปเติมลงในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อทดสอบ แล้วตรวจผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือการนับจำนวนเชื้อทดสอบที่เปลี่ยนไป เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 เครื่องหมุนเหวี่ยง (Benchtop Centrifuge, Beckman Coulter Inc., Model Allegra X-12R)

3.1.2 ไมโครปิเปต (Eppendorf AG, Germany)

3.1.3 เครื่องวัดพีเอช (Inolab pH Level, Germany)

3.1.4 water bath (Thermotek)

3.1.5 vortex (VM-300, U.S.A.)

3.1.6 ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, Germany)

3.1.7 Laminar flow (Model-CLF 460 EC, Woerden, Belgium)

3.1.8 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus CH 30, Japan)

3.2 สารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1 Di-Potassium hydrogen phosphate ของบริษัท Merck, Germany

3.2.2 di-Ammonium hydrogen citrate ของบริษัท Merck, Germany

3.2.3 Citric acid diammonium salt ของบริษัท Merck, Germany

3.2.4 Potassium dihydrogen phosphate ของบริษัท Merck, Germany

3.2.5 Sodium acetate ของบริษัท Merck, Germany

3.2.6 Manganese sulphate ของบริษัท Merck, Germany

3.2.7 Magnesium sulfate ของบริษัท Merck, Germany

3.2.8 Calciumcabornate ของบริษัท Merck, Germany

3.2.9 Sodiumchloride ของบริษัท Merck, Germany

3.2.10 Glucose ของบริษัท SP Scientific, Thailand

3.2.11 Meat extract ของบริษัท Merck, U.S.A.

3.2.12 Yeast extract ของบริษัท Merck, U.S.A.

3.2.13 D-glucose ของบริษัท Merck, Germany

3.2.14 Tween-80 ของบริษัท Merck, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.15 Agar ของบริษัท Merck, Germany

3.2.16 Tryptone ของบริษัท Merck, U.S.A.

3.2.17 Peptone ของบริษัท Merck, Germany

3.3 วัตถุดิบ

ตัวอย่างผักดอง (รูปที่ 2) ทั้งหมด 10 ตัวอย่าง จาก 10 แหล่ง ได้แก่

- ผักดองจากตลาดในเขตยานนาวา 5 แหล่งๆละ 1 ตัวอย่าง
- ผักดองจากตลาดในเขตบางพลัด 5 แหล่งๆละ 1 ตัวอย่าง

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากผักดอง

3.4.1.1 เตรียมตัวอย่างผักดองเจือจาง 10^{-5} ในการเตรียมระดับความเจือจาง 10^{-1} จะปิเปตตัวอย่าง 25 มิลลิลิตร ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ แล้วเติมน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า

3.4.1.2 ทำการเจือจางที่ระดับ 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4}, 10^{-5}

3.4.1.3 ปิเปตระดับความเจือจาง 10^{-5} ใส่ในจานเพาะเชื้อ MRS medium ที่มี $CaCO_3$ 0.5 %

3.4.1.4 ใช้แท่งแก้วรูปตัวแอลเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อจนแห้ง

3.4.1.5 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

3.4.1.6 ตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแลคติก (มีโซนใสรอบโคโลนี) (รูปที่ 3) สุ่มเลือกเชื้อไปเก็บเพาะเลี้ยงไว้ใน MRS agar (deep tube) ที่มี $CaCO_3$ 1.0 % เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 20 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (รูปที่ 4) หลังจากนั้นทำการเก็บเชื้อที่คัดเลือกไว้ทั้งหมดที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อตรวจสอบหาสายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินในขั้นตอนต่อไป

3.4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่มีแนวโน้มในการสร้าง Bacteriocin โดยวิธี Colony spot-on-lawn (Swetwiwathana และ Lotong, 1999; Tichaczek และคณะ, 1992)

<u>3.4.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกเพื่อทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน</u>

3.4.2.1.1 นำหลอดตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้เท MRS broth หลอดละ 5 มิลลิลิตร (รูปที่ 5) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม. จะสังเกตเห็นเชื้อเจริญ (รูปที่ 6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.1.2 นำ loop เขี่ยเชื้อแลคติกจากตัวอย่างข้างต้น มาทำการ spot ลงบน BSM medium (Bacteriocin Screening Medium)* ซึ่งแบ่งไว้ 10 ช่อง ช่องละ 1 ตัวอย่างเชื้อ โดยทำหลอดละ 8 จานเพาะเชื้อ แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มไว้ใน Candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

3.4.2.1.3 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาดูการเจริญของเชื้อที่ทำการ spot เอาไว้ (รูปที่ 7)

3.4.2.2 การเตรียมเชื้ออินดิเคเตอร์

3.4.2.2.1 เตรียมหลอดอาหารเหลว TSBYE ขอถ่ายเชื้อ *Enterococcus faecalis* JCM 5803^{T}, *Escherichia coli* JM 109, *Staphylococcus aureus* subsp *aureus* ATCC 12600^{T}, *Salmonella anatum* WHO-BKK , *Bacillus circulans* JCM 2504 ^{T}, *B. coagulans* JCM 2257 ^{T}, *B. subtilis* JCM 1465 ^{T}, *Kokuria varians* LTH 1545, *Listeria innocua* ATCC 33090^{T}, *L. innocua* LTH 3096, *S. carnosus* LTH 2102 และ อาหารเหลว MRS broth ถ่ายเชื้อ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ^{T}, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435^{T}, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L *L. plantarum* ATCC 14917^{T}, *P. pentosaceus* JCM 5890 ^{T} จากห้องปฏิบัติการ แล้วนำหลอดเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม. (ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Md; JCM, Japanese Culture of Microorganisms,Wako,Japan; JM, commercial strain from Toyobo, Osaka, Japan; LTH, Lebensmitteltechnologie Hohenheim University, Suttgart, Germany; TUA, Tokyu University of Agriculture, Tokyo, Japan; WHO-BKK, World Health Organization, Salmonella-Shigella Center, Bangkok, Thailand.)

3.4.2.2.2 ตรวจสอบดูการเจริญของเชื้ออินดิเคเตอร์ว่ามีการเจริญหรือไม่ โดยดูจากความขุ่น

3.4.2.3 การทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซิน

3.4.2.3.1 หลอมอาหาร MRS soft agar และ TSAYE soft agar เพื่อให้วุ้นหลอมเหลว และนำไปเก็บไว้ใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

3.4.2.3.2 นำเชื้ออินดิเคเตอร์ถ่ายลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้โดยให้มีเชื้อ 2 % (มีเชื้อ 10 µl) ผสมให้เข้ากันด้วย mixer

3.4.2.3.3 เทอาหารที่มีเชื้ออินดิเคเตอร์ผสมอยู่ หลอดละ 5 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่ spot ของแบคทีเรียแลคติกเจริญอยู่ ให้วุ้นกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ (seeding)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.2.3.4 รอจนวุ้นชั้นบนแข็งตัวดีจึงนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส โดยที่เชื้อ *Listeria innocua* ให้นำไปบ่มในสภาพ microaerophillic

3.4.2.3.5 ดูการสร้างแบคเทอริโอซิน ถ้ามีรอบโคโลนีแบคทีเรียแลคติกที่เจริญนั้น จะมีโซนใส (clear zone) (รูปที่ 8)

3.4.3 ทดสอบการย้อมแกรม

3.4.3.1 เกลี่ย (smear) เชื้อที่คัดเลือกไว้ โดย loop จุ่มน้ำสะอาดแตะหยดน้ำลงบนสไลด์ แล้วเผา loop ให้ร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้ loop เย็นลงแล้วจึงแตะเชื้อติดมาเพียงเล็กน้อย แล้วนำมาผสมกับหยดน้ำบนสไลด์ เกลี่ยให้แผ่อย่างสม่ำเสมอ ปล่อยให้แห้งเองแล้วจึง fix สไลด์ โดยลนสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง

3.4.3.2 หยดสี crytal violet ให้ท่วมรอย smear นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

3.4.3.3 หยด gram iodine บนรอย smear นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

3.4.3.4 ล้างสีโดยหยด decolorizing agent บนรอย smear นาน 20-30 วินาที สังเกตดูว่าสีน้ำเงินจางเกือบหมด แล้วล้างด้วยน้ำทันที

3.4.3.5 ย้อมทับด้วย safranine นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษจนแห้ง

3.4.3.6 นำสไลด์ที่แห้งแล้ว หยดด้วย immersion oil 1 หยด นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100X แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน แบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

3.4.4 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซิน

3.4.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติก

3.4.4.1.1 นำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียมาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 5 ml ที่ตู้บ่ม อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-20 ชม.

3.4.4.1.2 นำเชื้อที่เจริญแล้วมา centrifuge ที่ 4 องศาเซลเซียส 5,500 rpm /10 นาที

3.4.4.1.3 นำส่วนใสที่ได้มาปรับ pH ให้ได้ 6.5

3.4.4.1.4 นำมากรองด้วย sterile membrane filter

3.4.4.1.5 เก็บส่วนใสที่ปราศจากเชื้อลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.4.4.2 การเตรียมเชื้ออินดิเคเตอร์

3.4.4.2.1 เลี้ยงเชื้ออินดิเคเตอร์ใส่ใน soft agar 10 µl mixer ให้เข้ากัน

3.4.4.2.2 เทลงใน TSAYE agar ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อ

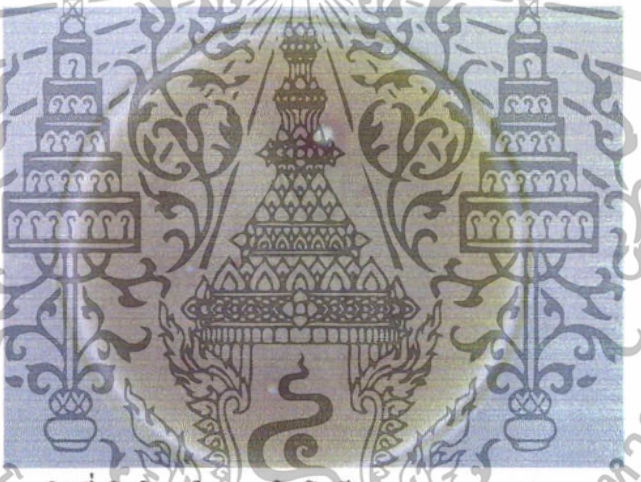
3.4.4.2.3 นำส่วนใสที่กรองแล้วในข้อ 7.3.1.5 มา spot ลงในจานเพาะเชื้อใน ข้อ 3.4.3.2.2 ในปริมาตร 10 µl

3.4.4.2.4 นำไปบ่มตามสภาพของเชื้ออินดิเคเตอร์ จะแสดงการยับยั้งเป็นโซนใส (รูปที่ 9)

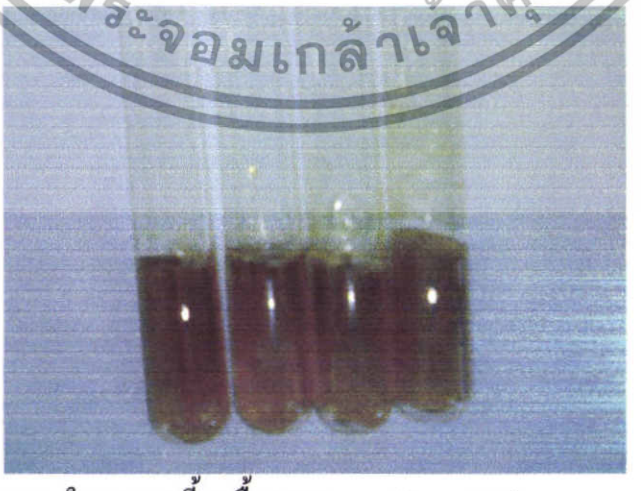
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2 ผักดองในประเทศไทย

ที่มา : food.toryod.com/yodfoodTECHNOferment.php

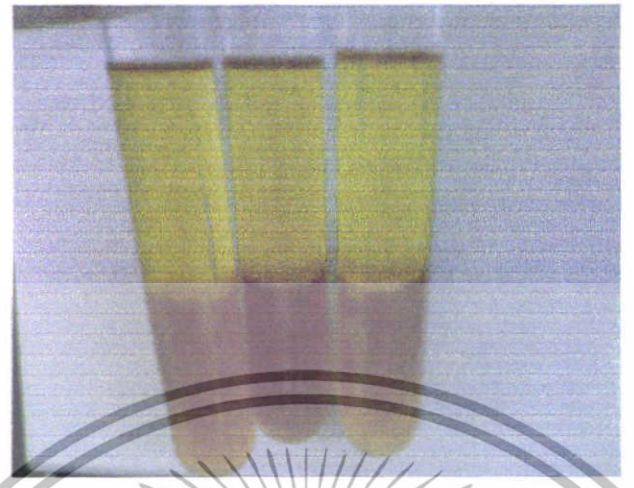


รูปที่ 3 เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เกิดโซนใสรอบโคโลนี

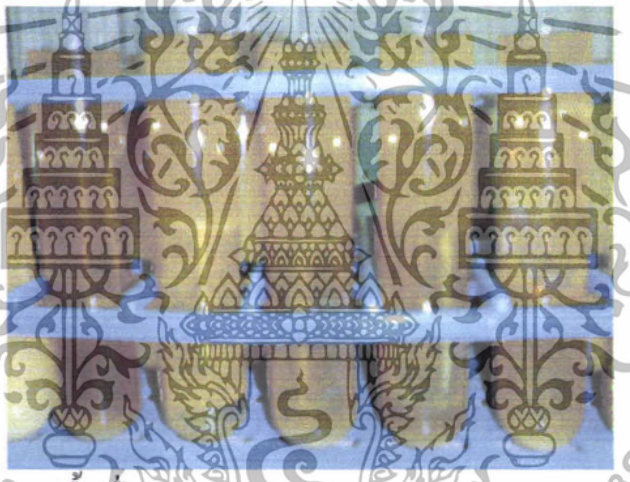


รูปที่ 4 การเจริญของ LAB ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (deep tube)

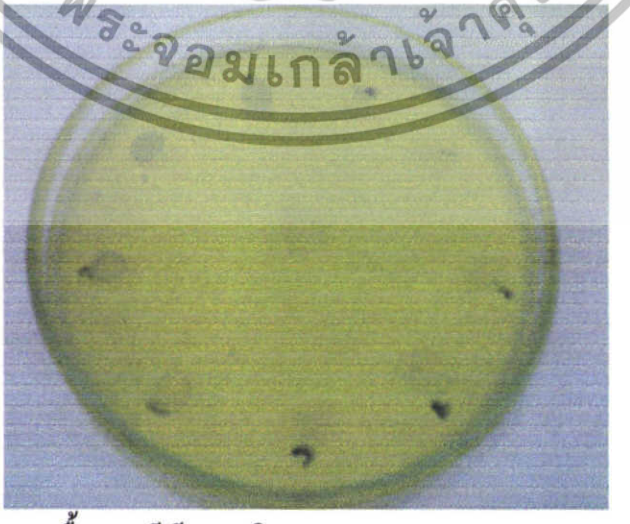
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 เมื่อเติม MRS broth 5 ml ลงใน MRS agar



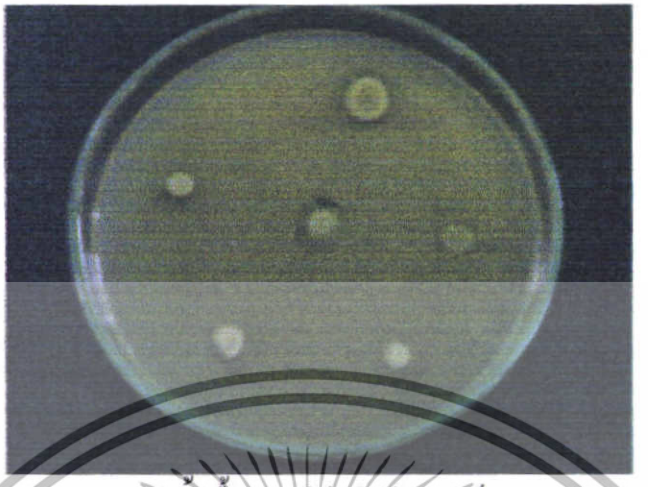
รูปที่ 6 แสดงการเจริญของเชื้อเมื่อเติม MRS broth 5 ml



รูปที่ 7 แสดงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบน BSM medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร พระจอมเกล้าลาดกระบัง



รูปที่ 8 แสดงการเกิด Clear Zone ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

รูปที่ 9 แสดงการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

97023

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผักดอง

เมื่อได้ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างผักดอง 10 แหล่ง ได้แก่ ตัวอย่างผักดองจากตลาดในเขตยานนาวา 5 แหล่งๆละ 1 ตัวอย่าง และตัวอย่างผักดองจากตลาดในเขตบางพลัด 5 แหล่งๆละ 1 ตัวอย่าง รวมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 60 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถแจกแจงได้ดังตารางที่ 1

ตารางที่1 แสดงการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากแหล่งต่างๆ

แหล่งที่	จำนวนสายพันธุ์ที่พบ
1. จากตลาดเขตยานนาวา ร้านที่ 1	5
2. จากตลาดเขตยานนาวา ร้านที่ 2	7
3. จากตลาดเขตยานนาวา ร้านที่ 3	4
4. จากตลาดเขตยานนาวา ร้านที่ 4	4
5. จากตลาดเขตยานนาวา ร้านที่ 5	5
6. จากตลาดเขตบางพลัด ร้านที่ 1	6
7. จากตลาดเขตบางพลัด ร้านที่ 2	3
8. จากตลาดเขตบางพลัด ร้านที่ 3	8
9. จากตลาดเขตบางพลัด ร้านที่ 4	7
10. จากตลาดเขตบางพลัด ร้านที่ 5	11
รวม	**60**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิคที่มีแนวโน้มในการสร้าง Bacteriocin โดยวิธี Colony spot-on-lawn

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 60 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 18 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการผลิตแบคเทอริโอซิน 38 สายพันธุ์ โดยมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละสายพันธุ์ไม่เท่ากัน และมีขนาดรัศมีของขอบใสของการยับยั้งที่วัดได้ไม่เท่ากัน แสดงว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 38 สายพันธุ์ มีความสามรถในการสร้าง แบคเทอริโอซินได้ไม่เท่ากัน จึงทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดมา 10 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ที่ 2,7,8,10,16,18,31,39,48 และ 57 ผลของการยับยั้งแสดงดังตารางที่ 2

แบคทีเรียแลคติกทั้ง 10 สายพันธุ์ มีประสิทธิภาพในการสร้างแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ไม่เท่ากัน โดยบางสายพันธุ์ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายสายพันธุ์ แต่บางสายพันธุ์ยับยั้งได้น้อย และมีขนาดรัศมีของขอบใสของการยับยั้งไม่เท่ากัน จึงคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการสร้างแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดมา 3 สายพันธุ์ คือสายพันธุ์ที่ 2,10,31 ซึ่งสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกมาสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แกรมบวกได้ดี นอกจากนี้สายพันธุ์ที่ 10 และ 31 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. innocua* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษด้วย (ตารางที่ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แสดงการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่างๆทั้ง 10 สายพันธุ์

เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ทดสอบ	สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากผักดอง									
	2	**7**	**8**	**10**	**16**	**18**	**31**	**39**	**48**	**57**
Bacillus circulans JCM 2504 ^{T}	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B. coagulans JCM 2257 ^{T}	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-
B. subtilis JCM 1465 ^{T}	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Enterococcus faecalis JCM 5803	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Escherichia coli JM 109	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kokuria varians LTH 1545	-	-	++	++	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
L. plantarum ATCC 14917 ^{T}	+	+	+	++	-	-	++	-	-	-
L. sakei subsp. *sakei* JCM 1157 ^{T}	-	-	-	++	-	++	-	-	-	-
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* TUA 1344L	-	-	-	-	+	-	++	+	-	-
L. lactis subsp. *lactis* ATCC 19435 ^{T}	+++	++	++	+++	+++	++	++	++	+	++
Listeria innocua ATCC 33090 ^{T}	-	-	-	++	-	-	+	-	-	-
L. innocua LTH 3096	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Pediococcus pentosaceus JCM 5885	-	++	-	-	-	-	+	+	-	-
P. pentosaceus JCM 5890 ^{T}	++	-	-	-	-	+	-	-	-	++
Salmonella anatum WHO-BKK	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus subsp *aureus* ATCC 12600 ^{T}	+	-	++	-	-	-	-	-	-	-
S. carnosus LTH 2102	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : + = มีขนาดรัศมีโซนใส 1 mm ; ++ = มีขนาดรัศมีโซนใส 2 mm ; +++ = มีขนาดรัศมีโซนใส 3 mm ; - = ไม่เกิดโซนใส

ตารางที่ 3 แสดงการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือก

เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ทดสอบ	สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากผักดอง		
	สายพันธุ์ที่ 2	สายพันธุ์ที่ 10	สายพันธุ์ที่ 31
Bacillus circulans JCM 2504^T	+	-	-
B. coagulans JCM 2257^T	+	-	-
B. subtilis JCM 1465^T	-	-	-
Enterococcus faecalis JCM 5803	-	-	-
Escherichia coli JM 109	-	-	-
Kokuria varians LTH 1545	-	++	-
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	-	+	++
L. plantarum ATCC 14917^T	+	++	-
L. sakei subsp. *sakei* JCM 1157^T	-	++	++
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* TUA 1344L	-	-	++
L. lactis subsp. *lactis* ATCC 19435^T	+++	+++	+
Listeria innocua ATCC 33090^T	-	++	-
L. innocua LTH 3096	-	-	+
Pediococcus pentosaceus JCM 5885	-	-	-
P. pentosaceus JCM 5890^T	++	-	-
Salmonella anatum WHO-BKK	+	-	-
Staphylococcus aureus subsp *aureus* ATCC 12600^T	+	-	-
S. carnosus LTH 2102	-	++	-

หมายเหตุ : + = มีขนาดรัศมีโซนใส 1 mm

++ = มีขนาดรัศมีโซนใส 2 mm

+++ = มีขนาดรัศมีโซนใส 3 mm

- = ไม่เกิดโซนใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ทดสอบการย้อมแกรม

จากการที่นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก คือสายพันธุ์ที่ 2,10,31 มาย้อมแกรมได้ผลดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ ทั้ง 3 สายพันธุ์

สายพันธุ์ที่คัดเลือก	การติดสีแกรม	ลักษณะสัณฐานวิทยา
2	บวก	รูปท่อน
10	บวก	รูปท่อน
31	บวก	รูปท่อน

4.4 การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซิน

จากการทดลองโดยใช้วิธี Colony-spot-on-lawn ซึ่งเป็นวิธี Direct method พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาคือ 2,10,31 สามารถสร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ จึงได้นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มาทำการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซิน เพื่อยืนยันการสร้างสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นวิธี Indirect method อีกครั้งหนึ่ง ได้ผลดังตารางที่ 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิตของแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์

เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ทดสอบ	ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิต		
	สายพันธุ์ที่ 2	สายพันธุ์ที่ 10	สายพันธุ์ที่ 31
Bacillus circulans JCM 2504 ^{T}	0	0	0
B. coagulans JCM 2257 ^{T}	0	0	0
B. subtilis JCM 1465 ^{T}	0	0	0
Enterococcus faecalis JCM 5803 ^{T}	0	0	0
Escherichia coli JM 109	0	0	0
Kokuria varians LTH 1545	0	0	0
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	0	0	0
L. plantarum ATCC 14917 ^{T}	0	0	0
L. sakei subsp. *sakei* JCM 1157 ^{T}	0	0	0
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* TUA 1344L	0	0	0
L. lactis subsp. *lactis* ATCC 19435 ^{T}	0	0	0
Listeria innocua ATCC 33090 ^{T}	0	0	0
L. innocua LTH 3096	0	0	0
Pediococcus pentosaceus JCM 5885	0	0	0
P. pentosaceus JCM 5890 ^{T}	0	0	0
Salmonella anatum WHO-BKK	0	0	0
Staphylococcus aureus subsp *aureus* ATCC 12600 ^{T}	0	0	0
S. carnosus LTH 2102	0	0	0

จากตารางที่ 5 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกมาทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้เหมือนการทดลองโดยวิธี Colony-spot-on-lawn ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นอาจมีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ต่ำเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ดังนั้นเมื่อใช้แต่เพียงสารละลายแบคเทอริโอซินในการทดสอบกับเชื้ออินดิเคเตอร์ทำให้ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้

ดังนั้นในอนาคตอาจต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้อง ที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติก เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อเท็จจริงที่เกี่ยวข้องในการผลิตสารแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ต่างๆ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. ปัจจัยในเรื่องของระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก ก่อนนำไปทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซิน
2. อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต้องเหมาะสม เพราะแบคเทอริโอซินเป็นโปรตีน อาจเสียสภาพได้ถ้าอุณหภูมิที่ใช้สูงเกินไป
3. ระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะแบคเทอริโอซินจะเสถียรที่สภาวะเป็นกรดหรือเป็นกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างผักดองจำนวน 10 ตัวอย่างจากแหล่งผลิตต่างๆ จำนวน 10 แหล่ง สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้ 60 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 18 สายพันธุ์ โดยวิธี Colony-spot-on-lawn ซึ่งเป็นวิธี Direct method มีแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน 38 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดมา 10 สายพันธุ์ และเมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 10 สายพันธุ์นี้มาทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 18 สายพันธุ์พบว่า สามารถสร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้หลายชนิดแตกต่างกันไป โดยจากการทดลองสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการสร้างแบคเทอริโอซิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดมา 3 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ที่ 2,10,31 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 5,6,5 สายพันธุ์ตามลำดับ โดยแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แกรมบวกได้ดี รวมถึงสายพันธุ์ที่ 10 และ 31 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. innocua* ATCC 33090 ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษได้อีกด้วย แต่เมื่อทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซิน โดยวิธี Indirect method พบว่าไม่มีการสร้างแบคเทอริโอซิน เนื่องจากสภาวะในอาหารเหลวไม่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซิน เช่น ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ เป็นต้น และมีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ต่ำ เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว จึงทำให้แบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ไม่แสดงการยับยั้งเหมือนในวิธี Direct method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ภาษาอังกฤษ

-Adams, M.R. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. J. Biotechnol. 68: 171-178.

-Beuchat, L.R. 1997. Traditional Fermented Foods. In:Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds), Food Microbiology: Fundamentals and Frontier, ASM Press, Washington D.C, pp.629-648

-Buckenhuskes, H., Aabye Jensen, H., Andersson, R., Garrido Fernandez, A. and Rodrigo, M. (1990) Fermented vegetables. In: P. Zeuthen, J.C. Chefiel, C. Eriksson, T.R. Cormley, P. Linko and K. Paulus (editors) Processing and Quality of Foods, Vol. 2: Food Biotechnology. Elsevier Applied Science, London, pp. 2162-2187.

-Caplice, E., and Fitzgerald, G.F.1999. Food fermentations:role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology. 50:131-149

-Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L., 2001. Bacterioins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. Int. J. Food Microbials. 71: 15-25.

-Cogan, T.M., and Hill, C. 1993. Cheese starter cultures. In: Fox, P.F. (Ed.), Cheese: Chemistry, Physics and Microbiolog-Vol.1, Second Edition, Chapman and Hall, London, pp. 193-255

-Daly, C., Fitzgerald, G.F., O'Connor, L., and Davis, R. 1998. Technological and health benefits of dairy starter cultures. Int. Dairy Journal 8, 195-205

-De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Lactic Acid Bacteria and Bacteriocins : Their Practical Important, pp. 1-11. In De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. (eds.) Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application. Blackie-Academic & Professional, London.

-Dykes, G.A., Britz, T.J., and von Holy, A. 1994. Numerical taxonomy and identification of lactic acid bacteria from spoiled, vacuum packaged Vienna sausages. Journal of Applied Bacteriology 76, 246-252.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-Holzapfel W.H., Geisen R., and Schillinger U. 1995 Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes, Int. J. Food Micro. 24: 343-362.

-Jay, J.M.,1996. Modern Food Microbiology, 5th Edition, Chapman and Hall, New York

-Knorr, D., 1998. Technology aspects related to microorganism in functional foods. Trends Food Sci. Technol. 9, 295-306

-Lindgren, S.E., and Dobrogosz, W.J., 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbial. Rev. 87, 149-163

-Lucke, F.-K., 1998. Fermented sausages. In:Wood, B.J.B. (Ed), Microbiology of fermented foods-Volume 2, Second Edition, Blackie Academic and Professional, London, pp. 441-483

-Michael, P.D.; Larry, R.B.; Thomas, J.M.1997. Food Microbiology : Fundamentals and Fronties. Washington, DC : ASM Press., 768 p.

-Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for Control of *Listeria* spp. In Food. J. Food Prot. 59: 54-63

-O' Sulivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002. Potential of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for improvements in Food Safety and Quality. Biochimic. 84: 593-604.

-Rauch, P.J.G., Kuiper, O.P., Siezen, R.J., and de Vos, W.M., 1994. Genetics and protein engineering of nisin. In: De Vuyst, L., Vandamme, E.J. (Eds.), Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, Blackie Academic and Professional, London, pp. 223-249

-Stamer, J.R., 1976. Lactic acid bacteria. In: deFigueiredo, M.P., Splittstoesser, D.F. (Eds.), Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects, AVI, Westport, cT, pp. 404-426.

-Steinkraus, K.H., 1998. Bio-enrichment: production of vitamins in fermented foods. In: Wood, B.J.B. (Ed.), Microbiology of Fermented Foods, 2nd Edition, Blackie Academic and Professional, London, pp. 603-619.

-Stiles, M.E., and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and their Current Taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36: 1-29.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาษาไทย

- สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. หน้า: 283-302.
- ชาติรส บุญเกิด และพิมพ์มาส ต่ายทอง. 2547. Lactic Acid Bacteria ในอาหารผักหมัก. สัมมนาปริญญาตรี ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า: 24-27
- อดิศร เสวตวิวัฒน์, บุญเทียม พันธุ์เพ็ง และสร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา. 2548. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. หน้า: 43

เว็บไซต์

food.toryod.com/yodfoodTECHNOferment.php

www.funpecrp.com.br/.../gmr0075_full_text.htm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. สูตรการเตรียม MRS medium (de Man, Rogosa, and Sharp medium)

MRS broth	52	กรัม
Agar	15	กรัม
CaCO3	5	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

2. สูตรการเตรียม MRS deep tubes

MRS broth	52	กรัม
Agar	12	กรัม
CaCO3	10	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

3. สูตรการเตรียม BSM medium (Bacteriocin Screening Medium)

Glucose	2	กรัม
Meat extract	2	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Tween-80	1	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
diammonium citrate	2	กรัม
$MgSO_4 7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4 4H_2O$	0.05	กรัม
$K_2HPO_4 3H_2O$	8.7	กรัม
KH_2PO_4	8	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สูตรการเตรียม MRS broth

D-Glucose	20	กรัม
Meat extract	2	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Tryptone	12	กรัม
Tween-80	1	มิลลิลิตร
diammonium citrate	2	กรัม
$MgSO_4 7H_2O$	0.2	กรัม
$MnSO_4 4H_2O$	0.05	กรัม
$K_2HPO_4 3H_2O$	2	กรัม
KH_2PO_4	8	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

5. สูตรการเตรียม TSBYE (Trypticase Soy Broth + 0.6% Yeast extract)

TSB	30	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

6. สูตรการเตรียม MRS Soft agar

MRS broth	52	กรัม
Agar	7	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

7. สูตรการเตรียม TSAYE *Soft* agar (Trypticase Soy agar + 0.6% Yeast extract)

TSB	30	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Agar	7	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้