

ขอเสนอคณะกรรมการ ใน โฉมการเกษตร
จากบัณฑิต โฉมการเกษตรแห่งชาติ ภาคกระบี่



ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโฮซินที่แยกได้จาก
อาหารหมักไทย
(Screening Halotolerant bacteriocin-producing lactic acid isolated from thai fermented foods)

จัดทำโดย

นางสาวปาจารย์

ฤทธินอก

นายณัฐพงษ์

อัมพลพ

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก



24. 1. 03. 1. A. 9

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ผศ.ดร. อติศร เสวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักงานคณะกรรมการ พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกเชื้อทนเกลือของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักไทย
(Screening Halotolerant bacteriocin-producing lactic acid isolated from thai fermented foods)



รพ.
ร5A211
ร5A7

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วันเดือนปี.....

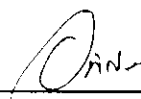
รายงานปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาอุตสาหกรรมเกษตร
โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปาจริย์ ฤทธินอก และ ณัฐพงษ์ อัมพลท. 2548. : การคัดเลือกเชื้อทนเกลือของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักไทย (Screening Halotolerant bacteriocin-producing lactic acid isolated from thai fermented foods). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา: ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ , 44 หน้า

แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียโอซินนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ เป็นวิธีการที่เลียนแบบมาจากการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ การถนอมอาหารโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัย จากคุณสมบัติต่างๆของสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นนี้ ล้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารได้เป็นเวลานาน ในการทดลองได้ทำการศึกษาวิจัยการเจริญเติบโตและการสร้างแบคทีเรียโอซินของ *Lactococcus lactis* N 100, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 จากตัวอย่างแฮม (Swetwivathana and Lotong, 1999) และ *Lactobacillus plantarum* RS 49 และ RS 54 จากไส้กรอกอีสานใน MRS Broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0% ผลปรากฏว่า *Lactococcus lactis* N 100 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 จากตัวอย่างแฮม (Swetwivathana and Lotong, 1999) สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นเกลือ 0, 2.5, 5.0 และ 7.5% สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในความเข้มข้นเกลือ 10.0% ขณะที่ *Lactobacillus plantarum* RS 49 และ RS 54 จากไส้กรอกอีสานสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นเกลือ 0, 2.5 และ 5.0% สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในความเข้มข้นเกลือ 7.5 และ 10.0% และสร้างแบคทีเรียโอซินได้โดยมีโดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 1,600 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU /ml¹)

ปาจริย์ ฤทธินอก
ณัฐพงษ์ อัมพลท.
ลายมือชื่อนักศึกษา


ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

๒๑/๐๓/๑๙
วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การนำเสนอปัญหาพิเศษเรื่อง การคัดเลือกเครื่องดนตรีของเบคท์ที่เรียกแลคติกที่สามารถผลิตแอมพลีเตอร์ไอซินที่แยกได้จากอาหารหมักไทย สำเร็จลงด้วยดี คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อดิสร เสวตวิวัฒน์ เป็นอย่างสูงที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษของคณะผู้จัดทำและสละเวลาอันมีค่ามาแนะนำ ให้คำปรึกษาและดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างมาก รวมทั้งช่วยปรับปรุงแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้ออกต้องเสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ให้กำลังใจและกำลังทรัพย์ในการทำงานครั้งนี้ ขอบคุณเพื่อนๆ ที่ช่วยให้คำปรึกษา ให้คำชี้แนะ ความช่วยเหลือและกำลังใจด้วยดีเสมอมา



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	
2.1 แบบที่เรียกกรดแลคติก	3
2.2 แบบที่เรียกทนเกลือ	5
2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก	6
2.4 เชื้อแบคทีเรียในจีนีเยสลิสทีเรีย	18
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี เชื้อจุลินทรีย์ และวิธีการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	19
3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	21
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง	27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ	10
ตารางที่ 2	แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งแยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ	13
ตารางที่ 3	แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ	14
ตารางที่ 4	ผลการทดสอบประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ	15
ตารางที่ 5	แสดงผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, S36, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	28
ตารางที่ 6	ผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7.5 %	29
ตารางที่ 7	ผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10.0 %	29
ตารางที่ 8	แสดงผลการศึกษาค่า pH การเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, S36, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	30
ตารางที่ 9	แสดงผลการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง <i>L.innocua</i> ของเชื้อ N 100 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	32
ตารางที่ 10	แสดงผลการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง <i>L.innocua</i> ของเชื้อ S36 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	32
ตารางที่ 11	แสดงผลการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง <i>L.innocua</i> ของเชื้อ RS 49 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	33
ตารางที่ 12	แสดงผลการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง <i>L.innocua</i> ของเชื้อ RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แบบจำลองการทำให้เกิดครุฑ์เชื้อหุ้มเซลล์เป้าหมาย โดยแบคทีเรียไอซินิก สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก	11
ภาพที่ 2	การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของแบคทีเรียไอซินิก	23



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามธรรมชาติทั่วไปและมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักชนิดต่างๆเช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ซีอิ๊ว แหนม ไส้กรอก ด้วน้ำที่แปรรูป โดยผ่านกระบวนการหมัก ผักและผลไม้ดองต่างๆ (Pot et al.,1994) โดยแบคทีเรียดังกล่าวทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติเฉพาะตัวในแต่ละผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและอาหารเสื่อมเสียที่ปนเปื้อนมาในผลิตภัณฑ์ ด้วยสารเมแทบอไลต์ (metabolite) ที่สร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์(organic acids) คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เอทานอล (ethanol) ไดอะซีทิล (diacetyl) แบคทีริโอซิน (bacteriocin) รวมทั้งการทำให้เกิดการแข่งขันในการใช้สารอาหารและพื้นที่สำหรับการเจริญกับจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต (Adam, 1999 ; Franz et al.,1998) ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีริโอซิน ได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวาง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ(biopreservation)ซึ่งเป็นวิธีที่เลียนแบบมาจากการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆในธรรมชาติ จึงไม่มีสารพิษตกค้างเหมือนการใช้วิธีทางเคมี (Schillinger et al., 1996 ; Yildirim and Johnson, 1998 ; Rodriguez et al.,2003)ดังนั้น FDA จึงกำหนดให้การถนอมอาหาร โดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกหรือ ไนซินซึ่งเป็นแบคทีริโอซินชนิดหนึ่ง ที่ถูกสร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS) (Eckner,1992) โดยการใช้งานอาจใช้ในรูปของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ กิ่งบริสุทธิ์หรือเซลล์ จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินเป็นเชื้อตั้งต้น(starter cultures)ในกระบวนการผลิตอาหารหมัก (Fields, 1996) นอกจากนี้ยังมีการนำแบคทีริโอซิน โดยเฉพาะ ไนซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดซึ่งปนเปื้อนและมีผลต่อคุณภาพรวมถึงความปลอดภัยของอาหาร เช่น *Staphylococcus sp.*, *Listeria sp.*, *Clostridium sp.*, และ *Bacillus sp.* (De Vuyst and Vandamme, 1994)

จากคุณสมบัติต่างๆของสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นนี้ ถ้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหาร ได้เป็นเวลานาน ในการศึกษาวิจัยนี้เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกและการผลิตแบคทีริโอซินในความเข้มข้นเกลือที่ระดับต่างๆ รวมทั้งศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทนเกลือ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดและเพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกและการผลิตแบคทีเรียโอซินในความเข้มข้นเกลือที่ระดับต่างๆ
2. เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคทีเรียโอซินที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2 วารสารปริทัศน์

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.1. **คุณลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป** แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือเป็นท่อนยาว ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophilic) ไม่มีไซโทโครม มีปริมาณของเบส G+C น้อยกว่า 50 โมลเปอร์เซ็นต์ (mol%) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) แต่อาจพบการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลสได้ (pseudocatalase enzyme) โดยเฉพาะในสภาวะการเจริญที่มีความเข้มข้นของน้ำดालูอยู่น้อย สามารถทนต่อสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ต่ำกว่า 5 อุณหภูมิสูงกว่า 37-40 องศาเซลเซียส รวมทั้งต้องการสารประกอบไนโตรเจนที่มีความซับซ้อนเพื่อใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนและวิตามินสำหรับการเจริญและการสร้างอินทรีย์ (Pot et al., 1994; Ringo and Gatesoupe, 1998) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกต้องการพลังงานสำหรับการเจริญจากกระบวนการหมัก (fermentation) คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคสซึ่งกระบวนการหมักสามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ (Litchfield, 1996; Holzpfel and Wood, 1995) คือ

ก. **homofermentation** เป็นกระบวนการหมักกลูโคสแล้วได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก เช่น ที่พบใน *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งกลไกการเกิดกรดแลคติกจะเป็นไปตาม glycolysis (Embden-Meyerhof-Parnas) pathway คือ การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) แล้วจึงเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์ แลคเตคดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) (Schlegel, 1993; Holzpfel and Wood, 1995)

ข. **heterofermentation** เป็นกระบวนการหมักที่จะเกิดกรดแลคติกเพียงบางส่วน ที่เหลือเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือกรดแอสซิดิก เช่นที่พบใน *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bifermantans*, *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับ glycolysis pathway กลไกการเกิดกรดแลคติกและสารอื่นๆ นั้นจะเป็นไปตาม pentose phosphate pathway และ glycolysis pathway (Schlegel, 1993; Holzpfel and Wood, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก ในระยะแรก Orla-Jensen (1991) ได้จัดหมวดหมู่แบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปแบบของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และ โครงร่าง (configuration) ของกรดแลคติกที่สร้างขึ้น ออกเป็น 4 สกุล ได้แก่ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* ซึ่งต่อมาได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมีและพันธุศาสตร์มาช่วยในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น องค์ประกอบของผนังเซลล์ (Kandler and Weiss, 1986), ชนิดและปริมาณของกรดไขมันภายในเซลล์ (Schleifer, 1987), เทคนิค SDS-PAGE ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (Pot et al. 1993), ความเหมือนกันของดีเอ็นเอ (DNA homology) (Johnson, 1984), การศึกษาความแตกต่างของพลาสมิดที่อยู่ภายในเซลล์ (plasmid profile) (Josephson and Nielsen, 1988), ลำดับเบสของ ribosomal RNA (Saiki et al.,1998) ดังนั้นจึงทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจาก 4 สกุลข้างต้นออกเป็นสกุลใหม่ๆ เพิ่มขึ้น เช่น สกุล *Streptococcus* ถูกแบ่งออกเป็น 4 สกุล คือ *Enterococcus*, *Lactococcus* *Streptococcus* และ *Vagococcus* ส่วน *Pediococcus halophilus* ถูกแยกออกมาอยู่ในสกุลใหม่คือ *Tetragenococcus halophilus* นอกจากนี้ยังมีการแยกสกุล *Carnobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างท่อนออกมาจากสกุล *Lactobacillus* เป็นต้น (Stiles and Holzapfel, 1997) ต่อมา Axelsson (1998) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) และลักษณะอื่นๆ ออกเป็น 12 สกุลคือ *Aerococcus*(A.), *Carnobacterium*(C.), *Enterococcus* (E.), *Lactobacillus* (Lb.), *Lactococcus* (Lc.), *Leuconostoc*(Ln.), *Oenococcus*(O.), *Pediococcus*(P.), *Streptococcus*(S.), *Tetragenococcus*(T), *Vagococcus*(V.) และ *Weissella*(W.) โดยในจำนวนนี้พบว่า 11 สกุล (ยกเว้น *Aerococcus*) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งถูกระบุว่ามีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับอาหาร (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.1.3. แหล่งที่พบ สามารถพบแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในอาหารประเภทต่างๆ เช่น เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์ ผักและผลไม้ นมและผลิตภัณฑ์ อาหารที่ผ่านกระบวนการหมักชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังพบในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร สิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงในน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ อีกด้วย (Pot et al., 1994 ; Sarkar and Banerjee, 1996; Stiles and Holzapfel, 1997) สำหรับในปลาที่มีชีวิต Ringo and Gatesoupe(1998) ได้รวบรวมผลการศึกษาดังชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในบริเวณส่วนต่างๆ ของปลาแต่ละชนิด ซึ่งพบว่าในบริเวณระบบทางเดินอาหารของปลา จะพบแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* อาศัยอยู่นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดที่อาจทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* และ *Carnobacterium* โดยแบคทีเรียเหล่านี้เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะทำให้เกิดโรคที่อวัยวะภายในของสัตว์น้ำ เช่น ไต ตับ ม้าม ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสกุลจะทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำแต่ละชนิดที่ต่างกันออกไป จึงเห็นได้ว่าปลาและสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ที่ยังมีชีวิตอยู่ และที่ผ่านกระบวนการหมักเป็นแหล่งที่อยู่สำคัญสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.4. ความสำคัญ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติซึ่งน่าสนใจทั้งในด้านเศรษฐกิจ รวมถึงสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์ เช่น ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแล็กโทส การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ความสามารถในการต้านทานต่อแบคทีเรียฟาจ (bacteriophage) การสร้างแบคทีเรียโอซินและคุณสมบัติทางด้านอิมมูโนวิทยา (McKay et al., 1983) ช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านโภชนาการของอาหาร กระตุ้นกระบวนการสร้างวิตามิน ป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องทางเดินปัสสาวะ ลดระดับคอเลสเตอรอล (cholesterol) ในกระแสเลือด ลดความเป็นพิษจากสารก่อมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (Gilliland, 1990) นอกจากนี้ De Vuyst and Vandamme (1994) ได้กล่าวถึงความสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกต่ออุตสาหกรรมอาหารนมไว้ว่า เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่สร้างสารพิษหรือผลผลิตที่เป็นพิษ มีคุณสมบัติที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อยและสามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดี จึงไม่ต้องการกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน มีการเจริญที่รวดเร็วจึงใช้ระยะเวลาในกระบวนการผลิตสั้น เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นเวลานาน การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจะ ไปมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียและแบคทีเรียอื่นๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการผลิต

2.2 แบคทีเรียทนเกลือ (Halotolerant bacteria)

Halotolerant bacteria : คือแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์แต่ไม่ได้ต้องการ โซเดียมคลอไรด์

halophilic หรือ halotolerant bacteria เป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูงหรือเป็นที่รู้จักกันคือ halobacteria แบคทีเรียที่จัดเป็นชนิด halotolerant สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือสูงแต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือต่ำ ส่วน halophilic คือแบคทีเรียที่ต้องการเกลือไปใช้ในการเจริญเติบโต

Rastelli (2005) แยกแบคทีเรียสกุล *Carnobacterium* sp. จากแฮมหมักแห้งเป็น halotolerant bacteria แกรบยวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) และเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase enzyme) ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างท่อนสั้นและมีรายงานการตรวจพบ *Marimilactibacillus psychrotolerans* ในแฮมหมักแห้งซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นเอกซาร์เนเป็นเอกซาร์ที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเกลือสูง อุณหภูมิต่ำ (0-3 °C) และ pH ปานกลาง *Marinilactibacillus psychrotolerans* ถูกพบเป็นครั้งแรกโดย Ishikawa et al. (2003) ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้มาจากพื้นที่บริเวณทะเลเขตร้อนของประเทศญี่ปุ่น พบในผลิตภัณฑ์นมและเนยแข็ง *M. psychrotolerans* มีลักษณะที่เป็น halophilic lactic acid bacterium

Marinilactibacillus psychrotolerans (Ishikawa et al., 2003) เป็น lactic acid bacterium แบคทีเรียชนิดนี้แยกมาจากสิ่งมีชีวิตในทะเล (พองน้ำ, การเน่าเปื่อยของสาหร่ายทะเล และเปลือกของสัตว์ทะเล) สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือ (halophilic) และสามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่มีเกลือ (halotolerant) เข้มข้นของเกลือ 3.2- 3.8 % (w/v) pH 8.2-8.3 พบอยู่ในสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในทะเล ซึ่งเรียกว่า "marine lactic acid bacterium" *Marinilactibacillus* เป็นแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต เป็น halophilic และ halotolerant เป็น alkaliphilic เล็กน้อย

Amano (1962) กล่าวว่าในอาหารหมักประเภทปลาพบว่า จุลินทรีย์ที่ติดมากับเกลือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในขบวนการหมัก แบคทีเรียที่พบในเกลือสินเธาว์มีพวก *Micrococcus* ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ และ *Corynebacterium* 20 เปอร์เซ็นต์ และ *Bacillus* อีกประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณทั้งหมด ส่วนในเกลือทะเลพบกลุ่มฮาโลไฟล์ ซึ่งติดมาจากน้ำทะเล เช่น *Halobacterium*, *Serratia Salinaria*, *Serratia cutirubra* นอกจากนี้ยังพบ *Micrococcus* และ *Sarcina* อีกด้วย ส่วน *Bacillus* ที่พบในเกลือทะเลส่วนใหญ่เป็น *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งปะปนมากับอาหาร เช่น *B. cereus*, *Clostridium botulinum*, *Cl. perfringens*, *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (Abee et al., 1995; Franz et al., 1998; De Vuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติกและกรดแอซิติก รวมทั้งยังมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติกและกรดแอซิติก แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก (formic acid), กรดไขมันอิสระ (free fatty acid), แอมโมเนีย (ammonia), เอทานอล (ethanol), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide), ไดอะซีทิล (diacetyl), อะซีโตอิน (acetoin), อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde), เบนโซเอต (benzoate), เอนไซม์ที่มีเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (bacteriolytic enzyme) และแบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (De Vuyst and Vandamme, 1994; Abec, 1995., Franz et al., 1998; McMullen and Stiles, 1996; Schillinger et al., 1996; Eckner, 1992) นอกจากนี้การที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อมคือ จะทำให้เกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหารและการใช้พื้นที่สำหรับการเจริญ (Adams, 1999) โดยสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่

2.3.1. กรดอินทรีย์ กรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ กรดแลคติกซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะมีการเปลี่ยนไพรูเวต (pyruvate) ไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลคติกสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อเจอสภาพภายในเซลล์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลคติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไม่มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ต่างๆ ภายในเซลล์ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.3.2. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและ โปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ โดยยังพบอีกว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นอกจากจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยตรงแล้วยังไปรวมตัวกับสารอื่นๆ และเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.3.3. คาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentation โดยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆ ทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจน โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสภายในเซลล์ และรอบเซลล์ ลดลงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.3.4. ไดอะซีทิล หรือ 2,3 - butanedione เป็นผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของไพรูเวต โดยแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญในสภาวะที่มีซิเตรดอยู่ด้วยจะสร้างไพรวูเวคออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นโคอะซิทิลและอะซีโคอิน โดยโคอะซิทิลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรามมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากโคอะซิทิลจะไปขัดขวางการใช้อาร์จินินของแบคทีเรียแกรมลบ โดยไปแทนที่อาร์จินินในการรวมตัวกับarginine-binding protein (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.3.5. อะซีทัลดีไฮด์ โดยสารดังกล่าวจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักแบบอลิซิซึม ของคาร์โบไฮเดรตแบบ heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับ acetaldehyde ออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนผลของ acetaldehyde ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ นั้นยังไม่มีรายงานการศึกษามากนัก เพียงแต่มีการรายงานว่า acetaldehyde ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เช่น *E. coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella Typhimurium* ได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.3.6 แบคทีเรียโอซิน

2.3.6.1 ประวัติความเป็นมาและความหมายของแบคทีเรียโอซิน

ในระยะเริ่มต้นของการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียโอซินพบว่า *E. coli* V สามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีนออกมายับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ และเรียกสารดังกล่าวว่า colicins ต่อมามีการค้นพบสารที่มีลักษณะคล้าย colicin ซึ่งสารโดยแบคทีเรียแกรมบวกจึงมีการเรียกสารกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่า แบคทีเรียโอซิน (bacteriocin) โดยในระยะแรกพบว่าแบคทีเรียโอซินเป็นโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีคุณสมบัติในการทำละลายเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ในสปีชีส์ (species) เดียวกันเท่านั้น (Jacob et al., 1953) ต่อมา Tagg et al. (1976) ได้ให้คำจำกัดความของแบคทีเรียโอซินว่าเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีลักษณะดังนี้ (1) มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในชนิดเดียวกันหรือที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซินออกมา (2) การออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการยับยั้งเกิดการตาย (bactericidal mode of action) (3) มีตำแหน่งที่จำเพาะในการยึดจับกับเซลล์เป้าหมาย (4) ยีนที่ควบคุมการสร้างและการต้านทานของเซลล์ต่อแบคทีเรียโอซินที่สร้างขึ้นอยู่บนพลาสมิด (plasmid) (5) เซลล์ที่สร้างจะถูกทำลายขณะที่มีการปลดปล่อยแบคทีเรียโอซินออกนอกเซลล์ แต่พบว่ามีผลการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียโอซินชนิดต่างๆ ที่ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับคำจำกัดความข้างต้น เช่น leucocin A-UAL 187 และ leucocin S สามารถยับยั้งได้เฉพาะการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทดสอบได้เท่านั้น (Hastings and Stiles, 1991; เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่ขึ้นด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lewis et al., 1992) ไนซิน (nisin) ซึ่งสร้างจาก *Lc. lactis* สามารถทำลาย *S. aureus* และเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ (Anderson, 1983) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการสร้างแบคทีเรียไอสินภายในเซลล์ของแบคทีเรียเหมือนกับการสร้างโปรตีนทั่วไปที่ผลิตจากไรโบโซมซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการลอกแบบ (transcription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียไอสิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียไอสินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่น ไนซิน, lactocin, helveticin J, lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin, lacticin 481, lactococcins, pediocins, sakacin A และ lactocin B (De Vuyst and Vandamme, 1994; Joerger and Klaehammer, 1986; Stiles and Hastings, 1991; Lyon and Glatz, 1993) ดังนั้นคำนิยามของแบคทีเรียไอสินซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือ สารประกอบโปรตีนซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (Konisky, 1982; De Vuyst and Vandamme, 1994)

ในการศึกษาวิจัยทางด้านสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปอาจมีความสับสนหรือไม่แน่ใจระหว่างแบคทีเรียไอสินและสารปฏิชีวนะ ซึ่ง Cleveland และคณะ (2001) ได้สรุปความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียไอสินและสารปฏิชีวนะไว้ ดังแสดงในตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอจีนและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคทีเรียโอจีน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตโดยผ่านกระบวนการที่เป็น secondary metabolite
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	โดยปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	โดยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ลักษณะของปฏิกริยาบนเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดครู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษของผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

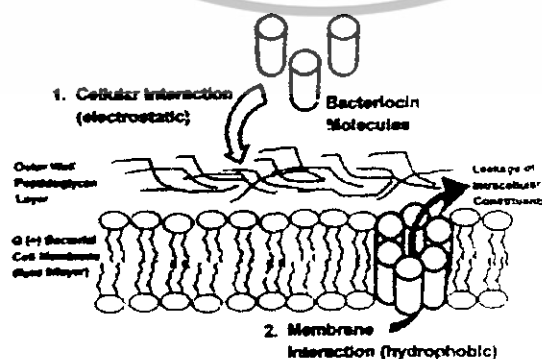
ที่มา : ดัดแปลงจาก Cleveland และคณะ (2001)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคทีเรียโอจีนที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีโมเลกุลขนาดเล็กใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยชนิดกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก (Jack et al., 1995) โดยแบคทีเรียโอจีนที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบได้มีการศึกษากันในด้านต่าง ๆ ได้แก่ โครงสร้างของโปรตีน กิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมาย กระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ที่ผลิต กลไกการเข้าทำลายและตำแหน่งของการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เป้าหมาย ตัวอย่างเช่น colicins ซึ่งผลิตโดย *E. coli* และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ชนิดอื่น ๆ หรือ microcins ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ (De Vuyst and Vandamme, 1994) ส่วนแบคทีเรียโอจีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกพบว่ามีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบคือ มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียที่แตกต่างกัน ได้หลายชนิดรวมทั้งเซลล์เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป้าหมายจะมีการต้านทานน้อยและไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลาย นอกจากนี้การควบคุมการผลิตภายในเซลล์ถูกควบคุมได้ทั้งจากพลาสมิดและ โครโมโซม (Tagg et al.1976) โดยในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ได้หลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียโอซิน ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวเป็นสายเพปไทด์หรือ โปรตีนขนาดเล็กและในแบคทีเรียโอซินบางชนิด เช่น ไนซิน อาจพบกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบในโปรตีนปกติทั่วไป เช่น dehydroalanine, dehydrobutyrine โดยแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลรวมถึงมีโครงสร้างของโมเลกุลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน(proteolytic enzymes) ที่แตกต่างกันด้วย(Kleinkauf and von Dohren, 1987) โดย Montville and Kaiser (1993) ได้รวบรวมชนิดของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชนิดต่าง ๆ ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินไว้ ได้แก่ *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Haemophilus*, *Haloferax*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc*, *Pseudomonas*, *Pediococcus*, *Salmonella*, *Propionibacterium*, *Serratia*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Streptococcus* และ *Yersinia*

2.3.6.2 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรียโอซินเกิดจากการที่แบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลมารวมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่าง ที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel- stave) ดังแสดงในแบบจำลองภาพที่ 2 โดยรูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสถียรของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ (Klaenhammer, 1993; Abee, 1995; Jack et al., 1995 ; Ennahar et al., 2000) ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียโอซิน



เอกสารนี้เป็นขององค์กรทำในกิจกรรมที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียโอซินนอกจากจะมีผลในการฆ่าทำลายเซลล์เป้าหมาย (bactericidal) แล้ว ยังอาจมีผลในการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วยดังเช่นที่พบใน leuconocin S ซึ่งแบคทีเรียโอซินจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้นมักขึ้นอยู่กับ ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซิน สภาพแวดล้อม ชนิดและปริมาณของเซลล์เป้าหมาย (De Vuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคัดแยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

2.3.5.3 การใช้ประโยชน์แบคทีเรียโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันการถนอมอาหาร โดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่อยู่ผลิตภัณฑ์โดยการ ไปแข่งขันในการใช้สารอาหาร รวมทั้งสร้างสารยับยั้งบางชนิดออกมา (Schillinger et al., 1996) ซึ่งในกลุ่มของสารยับยั้งพบว่าแบคทีเรียโอซิน โดยเฉพาะไนจีนเป็นสารที่ได้รับการยอมรับทั้งในด้านความปลอดภัยโดย FDA (Eckner, 1992) และ FAO/WHO (Schillinger et al., 1996) ซึ่งพบว่าไนจีนมีการผลิตขายในทางการค้ารวมทั้งมีการใช้ในประเทศต่างๆ ประมาณ 50 ประเทศ (Gould, 1996; Hurst and Hoover, 1993) ตามปกติแบคทีเรียโอซินจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* (McMullen and Stiles, 1996; Schillinger et al., 1996) *C. tyrobutyricum*, *Bacillus stearothermophilus*, *C. thermosaccharolyticum* (Gould, 1996), *B. licheniformis* (Beasley and Saris, 2002) และแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (Davidson and Hoover, 1993) ส่วนการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella* พบว่าได้ผลไม่ชัดเจนยกเว้นในกรณีที่ใช้ร่วมกับสารจับอนุภาคของโลหะ (chelating agent) ที่ชอบให้ใช้ในอาหาร ได้แก่ EDTA, EGTA ซึ่งสารดังกล่าวจะไปรบกวนการทำงานของเมื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายทำให้เซลล์มีความไวต่อแบคทีเรียโอซินมากขึ้น (Stevens et al., 1991; Cutter and Siragusa, 1995) โดยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ ได้รวบรวมไว้ดังในตารางที่ 3

ส่วนการนำแบคทีเรียโอซิน ไปใช้งานนั้นอาจดำเนินการได้ใน 3 ลักษณะคือ (1) การเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินลงไปเป็นเชื้อตั้งต้นหรือเชื้อที่มีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก (2) การเติมแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ลงไปเป็นสารถนอมอาหาร (3) การเติมผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินลงไปเป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตอาหาร (Schillinger et al., 1996) Cleveland และคณะ (2001) ได้รวบรวมการทดลองที่ใช้ประโยชน์แบคทีเรียโอซินเป็นสารถนอมอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 4 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แบคทีเรียโอจีนที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งแยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ

แบคทีเรียโอจีน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Camocin L V17	<i>Carnobacterium piscicola</i> L V17	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Camocin UI49	<i>C. piscicola</i> UI49	ปลา
Camocin CP5	<i>C. piscicola</i> CP5	เนยเหลว
Piscicolin 61	<i>C. piscicola</i> L V 61	เนื้อวัว
Enterocin 226 NWC	<i>Enterococcus faecalis</i> 226	เนยที่ทำจากหางนมของกระบือ
Enterocin 6E	<i>Enterococcus faecium</i> 6E	เนย
Enterocin 01	<i>E. faecium</i> NA 01	น้ำนมเปรี้ยวของประเทศไนจีเรีย
Enterocin RZS C5	<i>E. faecium</i> RZS C5	เนย
Enterocin CRL 35	<i>E. faecium</i> CRL35	เนย
Acidocin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> TK9201	น้ำนมวัวหมัก
Bavaricin MN	<i>Lb. bavaricus</i> MN	เนื้อวัว
Curvaticin FS47	<i>Lb. curvatus</i> FS47	เนื้อวัวบด
Curvaticin 13	<i>Lb. curvatus</i> SB13	ไส้กรอกแบบกึ่งแห้ง
Plantaricin C19	<i>Lb. plantarum</i> C19	แตงกวาดอง
Plantaricin F	<i>Lb. plantarum</i> BF001	ปลาแล
Sakacin A	<i>Lb. sake</i> LB 706	เนื้อวัว
Sakacin 148	<i>Lb. sake</i> 148	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Sakacin P	<i>Lb. sake</i> LTH673	เนื้อวัว
Curvacin A	<i>Lb. curvatus</i> LTH1174	ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์
Nisin	<i>Lactococcus lactis</i> BB24 & G18	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Carnosin 44A	<i>Leuconostoc carnosum</i> LA44A	ไส้กรอกแบบเวียนนา
Carnosin 54	<i>Ln. carnosum</i> LA54A	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Leucocin B-Talla	<i>Ln. carnosum</i> Talla	เนื้อวัวแปรรูปในถุงสุญญากาศ
Leucocin A-UAL 187	<i>Ln. gelidum</i> UAL187	เนื้อวัวแปรรูป
Mesenterocin Y105	<i>Ln. mesenteroides</i> Y105	น้ำนมแพะ
Mesenterocin 52	<i>Ln. mesenteroides</i> FR 52	น้ำนมวัวดิบ

ที่มา: รวบรวมและดัดแปลงจาก Muriana (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียโอสลินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ

แบคทีเรียกรดแลคติก	แหล่งที่คัดแยก	แบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง
<i>Carnobacterium piscicola</i> CP5	เนยเหลว	<i>Carnobacterium</i> , <i>Listeria</i> , <i>Enterococcus</i>
<i>C. piscicola</i> JG 126	แฮมที่เสื่อมคุณภาพ	<i>Listeria monocytogenes</i>
<i>Enterococcus mundtii</i>	ผัก	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Clostridium botulinum</i>
<i>E. faecalis</i> 226	ทางนม	<i>L. monocytogenes</i>
<i>E. faecalis</i> EFS2	เนย	<i>L. innocua</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	เนยเกลือ	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coil</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i>
<i>Lb. plantarum</i> BFE905	สลัด	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Lb. plantarum</i> WHE92	เนย	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Lb. plantarum</i> UG1	ไส้กรอกอบแห้ง	<i>L. monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>C. sporogenes</i>
<i>Lb. plantarum</i> SA6	ไส้กรอกหมัก	<i>Lactobacillus</i>
<i>Lb. bavaricus</i>	แป้งขนมปัง	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Lactococcus lactis</i>	พืชหัว	<i>Clostridium</i> , <i>Staphylococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Leuconostoc</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	กระทงลำปลีคอง	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ถั่วงอก	<i>L. monocytogenes</i> Scott A
<i>Lc. lactis</i> DPC3147	เมล็ดธัญพืช	<i>Clostridium</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i> , <i>Leuconostoc</i>
<i>Lc. lactis</i>	ไส้กรอกหมักอบแห้ง	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y105	นมแพะ	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Ln. carnosum</i> Ta 11A	เนื้อวัว	<i>L. monocytogenes</i>
<i>Streptococcus</i> sp.	ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก	<i>Clostridium</i> sp. , <i>L. monocytogenes</i>

ที่มา: รวบรวมและดัดแปลงจาก Cleveland และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ผลการทดลองประยุกต์ใช้แบคทีเรียโอจีนในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ

ชนิดของแบคทีเรียโอจีน	ลักษณะการประยุกต์ใช้งาน	ผลที่ได้
Nisin A	ใช้เติมลงในขั้นตอนการผสมเนื้อสัตว์	ลดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์
Pediocin AcH	ใช้ทนลงบนผิวหน้าของเนยแข็งในช่วงเริ่มต้นของการบ่ม	ยับยั้งการเจริญของ <i>Listeria monocytogenes</i>
Enterocin 4	ใช้ <i>Enterococcus faecalis</i> INIA 4 ซึ่งผลิต enterocin 4 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	ยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> Ohio แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> Scott A
Linocin M-18	ใช้ <i>Brevibacterium linos</i> ซึ่งผลิต linocin M-18 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	ลดจำนวนของ <i>L. ivanovii</i> และ <i>L. monocytogenes</i> ลง 100 เท่า
Nisin A	ใช้เติมลงไปในการบ่มเนย	ยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i> ได้นาน 8 สัปดาห์
Piscicolin 126	ใช้เติมลงในแฮม	ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีกว่าการใช้โอจีน
Leucocin A	ใช้ <i>Leuconostoc gelidum</i> UAL 187 ซึ่งผลิต leucocin A ผสมลงในเนื้อที่เก็บรักษาไว้นานในสภาวะสุญญากาศ	ยับยั้งการเจริญของ <i>Lactobacillus sake</i> ได้นาน 8 สัปดาห์
Leucocin 705	ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อบด	ยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i>
Pediocin AcH	ใช้ <i>Pediococcus acidilactici</i> ซึ่งผลิต pediocin AcH เป็นเชื้อตั้งต้น	ยับยั้งการเจริญของ <i>L. monocytogenes</i>
Pediocin	ถ้ำยีสที่ควบคุมการสร้าง pediocin ไปสู่ <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ช่วยในการถนอมอาหารอบและไวน์
Pediocin AcH	เติมลงในไก่สด	ควบคุมการเจริญ <i>L. monocytogenes</i> ได้ 28 วัน ที่อุณหภูมิ 5 °C
Enterocin	เติมลงในแฮม เนื้อไก่ เนื้อหมู และ ไส้กรอก	ควบคุมการเจริญ <i>L. monocytogenes</i>

ที่มา: รวบรวมและดัดแปลงจาก Cleveland และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6.4 การศึกษาถึงแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินในประเทศไทย

อาภัสรา (2537) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักผลไม้ดอง แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ได้จำนวน 50 สายพันธุ์ โดยทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีอายุ 36 ชั่วโมงให้เป็นกลางพบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากหน่อไม้ดอง สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี tube test และเมื่อนำสารต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์พบว่า สารดังกล่าวเป็นไลโปโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 และ 43,000 คาลตัน รวมทั้งเมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต โยเกิร์ต พบว่าจะให้ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงกว่าโยเกิร์ตที่จำหน่ายในท้องตลาด

ศิรินาถ (2539) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมักประเภทต่างๆ 4 ชนิด เช่น ผลึกกล้วยประมงที่ผ่านกระบวนการหมัก ผักดอง แหนม ไส้กรอก นมเปรี้ยวและ โยเกิร์ต ด้วยวิธี deferred method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และตรวจวัดกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก ได้กับแบคทีเรียทดสอบที่เป็นชนิดแกรมลบและแกรมบวก จำนวน 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี spot on lawn และ agar well diffusion ซึ่งพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโอซินยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ได้จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Staphylococcus lactis* SN 33, *S. lactis* SN 48, *Staphylococcus* sp. SN61 และ *S. lactis* SN62 โดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เป็น โปรตีนที่ทนต่อความร้อนแต่ถูกกิจกรรมโดยเอนไซม์ pronase-E, proteinase-K, trypsin และ α -chymotrypsin นอกจากนี้ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ *S. aureus* ในสัมปัทได้ภายในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

Ostergaard และคณะ (1998) ได้ทดลองแยกแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria innocua* จากผลิตภัณฑ์ประมงหมักของประเทศไทย โดยพบว่าสามารถคัดเลือกได้ทั้งหมด 44 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้พบว่า 43 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้ และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ ได้ด้วย ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากผลของแบคทีเรียโอซินซึ่งสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สร้างขึ้น โดยจากผลการทดลองยังพบอีกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 44 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ ซึ่งในจำนวนนี้ 37 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้สัตว์น้ำเกิดการเน่าเสีย เช่น *Aeromonas* sp. ได้ ซึ่งผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบนั้นคาดว่าเกิดจากผลของกรดแลคติกที่แบคทีเรียที่คัดเลือกได้สร้างขึ้น เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่าทั้ง 44 สายพันธุ์อยู่ในสกุล *Lactobacillus* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส สามารถทนเกลือได้สูงถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จากข้าว มันฝรั่ง และข้าวฟ่างได้

Swetwathana and Lotong (1999) นำ *Pediococcus* spp. 5 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus* spp. 4 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากหมัก นาทดสอบการสร้างแบคทีเรียโอซินด้วยวิธี ager spot method ซึ่งพบว่า *Pediococcus* spp. จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญของ *Listeria innocua* และ *Enterococcus faecalis* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella Anatum* และ *E. coli* ได้

Rattanachaiakunson และ Phumkhachorn (2000) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักคองจำนวน 11 ตัวอย่าง และทดสอบความสามารถในการสร้างแบคทีเรียโอซินด้วยวิธี swab-paper disc technique โดยสามารถคัดเลือก *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* ได้จากตัวอย่างคั้นหมักคองและพบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายโดยการฆ่า (bactericidal mode of action) โดยที่ไม่ได้ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายแตก (lysis) และ *Lb. lactis* subsp. *lactis* ที่ได้มีการสร้างแบคทีเรียโอซินสูงสุดในการเจริญระยะ stationary

Noonpakdec และคณะ (2003) คัดแยก *Lc. lactis* WNC 20 ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้จากตัวอย่างหมัก โดยแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยกันเองอีกหลายชนิด เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซินดังกล่าวโดยการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายชนิดต่างๆ กับแบคทีเรียอ้างอิง *Lc. lactis* subsp. *lactis* DL11 ที่สามารถสร้างโนซินและการเพิ่มจำนวนชุดขึ้นที่ควบคุมการสร้างแบคทีเรียโอซินด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ทำการศึกษาเป็นโนซินแซค (Nisin Z)

แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียโอซินมีส่วนสำคัญในการใช้เป็นสารถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ ดังนั้นการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินจากตัวอย่างปลาร้าของประเทศไทย ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน รวมทั้งการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมาจัดจำแนกชนิด ศึกษาคุณสมบัติด้านต่างๆของแบคทีเรียโอซินที่ได้ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างแบคทีเรียโอซิน การนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแบคทีเรียที่มีผลต่อคุณภาพของอาหาร จึงเป็นการศึกษาวิจัยที่จะก่อให้เกิดการเรียนรู้และสร้างองค์ความรู้พื้นฐาน รวมถึงการประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพซึ่งเป็นทางเลือกที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการทำงานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กำลังได้รับความสนใจและน่าจะปลอดภัยมากกว่าการถนอมอาหารด้วยการใช้สารเคมีซึ่งอาจมีผลต่อความปลอดภัยและสุขภาพของผู้บริโภค

2.4 เชื้อแบคทีเรียในจีเนียสลิสทีเรีย (Genus *Listeria*)

การศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคทีเรียโอซินที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแลคติก โดยใช้เชื้อ *Listeria innocua* เป็นตัวทดสอบ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ที่เลือกใช้เชื้อตัวนี้เพราะไม่เป็นอันตรายต่อผู้ทำการศึกษาวิจัยและมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *Listeria monocytogenes* โดยอยู่ในจีเนียสเดียวกันน่าจะให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกันหรือเหมือนกัน ถ้าการตรวจสอบให้ผลออกมาว่า แบคทีเรียโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria innocua* ก็สามารรถกล่าวได้ว่าแบคทีเรียโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria monocytogenes* ได้เช่นกัน

Listeria monocytogenes คือเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลิสเตอริโอซิส (Listeriosis) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก แอร์โรฟิลิก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.5 x 0.8–2.5 ไมโครเมตร เซลล์อาจเรียงตัวต่อกันเป็นสาย เคลื่อนที่ได้เล็กน้อยโดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ พบว่าโรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 26 สปีชีส์ รวมทั้งคน และเกิดในนกด้วย แหล่งที่แพร่กระจายเชื้ออาจมาจากสัตว์ป่าที่เป็นโรค แล้วยังโรคมานาคสัตว์เลี้ยงตามบ้านและคน ซึ่งทั่วโลกในการถ่ายทอดเชื้อยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ลักษณะของโรคจะมีอาการทางประสาทในระยะแรก และมีอาการของ acute encephalitis ตามมาด้วยอวัยวะภายในหลายแห่งอาจแสดงอาการของโรคได้ และเมื่อตรวจเลือดจะพบเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรค ถ้าเกิดในผู้ชายจะเป็นโรคใช้สมองอักเสบ ถ้าเกิดในผู้หญิงอาจทำให้เกิดการแท้งบุตรได้ หรือบุตรที่เกิดมาจะมีพัฒนาการทางสมองช้า รวมทั้งอาจแยกเชื้อได้จาก cerebrospinal fluid ด้วย การรักษาทำโดยใช้สารปฏิชีวนะเตตระไซคลินในการรักษา (อภิญา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี เชื้อจุลินทรีย์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

- หม้อสแตนเลส
- ถังร้อน
- หนังสาย
- ซ้อนดักสาร
- ที่ใส่หลอดทดลอง (Rack)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ขวดน้ำกลั่น
- จุกยาง
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- Eppendorf
- Tip สีเหลือง
- Foggy
- ไฟแช็ค

3.1.2 เครื่องแก้ว

- ปิเปต (pipette) ขนาด 0.1 และ 10 มิลลิลิตร
- Autopipette 2 – 20 μ l
- Autopipette 100 - 200 μ l
- หลอดทดลอง (test tubes) ขนาด 16 x 150 พร้อมฝา
- หลอดฝาเกลียว
- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารงานทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญาของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
 งานทะเบียนทรัพย์สินทางปัญญา
 อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- แท่งแก้วรูปค้อน
- ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3 เครื่องมือ

- เครื่องชั่งน้ำหนัก (Balance)
- Autoclave
- Hot plate
- Water Bath
- pH - meter
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (vortex)
- ตู้บ่มเชื้อ
- เตาแก๊ส
- เตาอบไมโครเวฟ
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)
- ตู้แช่เย็น

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- MRS Broth (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
- Tryptic Soy Broth (Merck KGaA Darmstadt Germany)
- Peptone (Merck KGaA Darmstadt Germany)
- Beet extract (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
- Yeast extract (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
- Agar (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
- โซเดียมคลอไรด์ (LAB-SCAN analytical sciences Thailand)
- Etanol 95 %
- Etanol 70 %
- Buffer pH 4 and 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2106

3.1.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดลอง

- *Lactococcus lactis* N 100 จากตัวอย่างเหนม (Swetwivathana and Lotong, 1999)
- *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 จากตัวอย่างเหนม (Swetwivathana and Lotong, 1999)
- *Lactobacillus plantarum* RS 49 จากไส้กรอกอีสาน
- *Lactobacillus plantarum* RS 54 จากไส้กรอกอีสาน
- *Listeria innocua* รหัส ATCC 33090^T

3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 มาใช้ในการทดลอง

3.2.1.1 เตรียม MRS Broth หลอดละ 10 ml. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อใน Autoclave ที่ 121 °C 15 นาที

3.2.1.2 นำ Loop เชื้อเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ถ่ายลงใน MRS Broth 10 ml. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.1.3 ย้อมแกรมคู่ลักษณะเชื้อที่เจริญเติบโต

MRS broth 52 g/น้ำ 1 ลิตร

นำ MRS broth ใส่หลอดฝาเกลียวหลอดละ 10 ml.

Autoclave 121 °C 15 นาที

นำ Loop เชื้อเชื้อ N100, RS 49, RS 54, 536
บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ย้อมแกรม

บันทึกผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

3.2.2 ศึกษาผลของการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5%, 7.5%, 10.0%)

3.2.2.1 เตรียม MRS Broth ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) หลอดละ 10 ml. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อใน Autoclave ที่ 121 °C 15 นาที

3.2.2.2 ถ่ายเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 จากขั้นตอนที่ 3.2.1.2 มา 0.1 ml. ลงใน MRS Broth 10 ml. ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ตรวจวัดค่า pH บันทึก ผลการทดลอง ผลที่ Negative หลอดใสไม่พบการเจริญของเชื้อใน 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปศึกษาการมีชีวิตอยู่รอด ส่วนผลที่ Positive หลอดขุ่นเนื่องจากการเจริญของเชื้อใน 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปตรวจหาแบคทีเรียไอซัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 ศึกษาผลการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Linnocua* ของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%)

3.2.2.1 เทออาหารแข็ง NA ลงบนจานเพาะเชื้อ (อบฆ่าเชื้อแล้ว) กระจายเพลทให้แห้ง โดยเปิด UV เทหน้างานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง NA ด้วย TSA Soft Agar ที่เติม *Linnocua* 10 μ l กระจายเพลทให้แห้ง โดยไม่ต้องเปิด UV

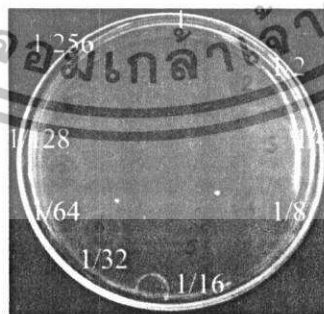
3.2.2.2 นำเชื้อ N100 , RS 49 , RS 54 , 536 ที่ให้ผล Positive คัมในน้ำเดือด 10 นาที นำมาเจือจางทั้ง 10 ความเข้มข้น (น้ำกลั่นสเตอไรท์ 100 ไมโครลิตร/เชื้อ 100 ไมโครลิตร)

3.2.2.3 นำเชื้อแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA soft agar (ปริมาตร 5 มิลลิตร) ซึ่งมี *Linnocua* ที่เจริญอยู่ในระยะ log (log phase) ผลมอยู่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ร่องนกระทั้งส่วนที่หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3.2.2.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าหากมี Clear zone แสดงว่า มีการสร้างแบคทีเรียโอซินขึ้นมาซึ่งการเจริญเติบโต *Linnocua*

3.2.2.5 บันทึกผลการทดลอง

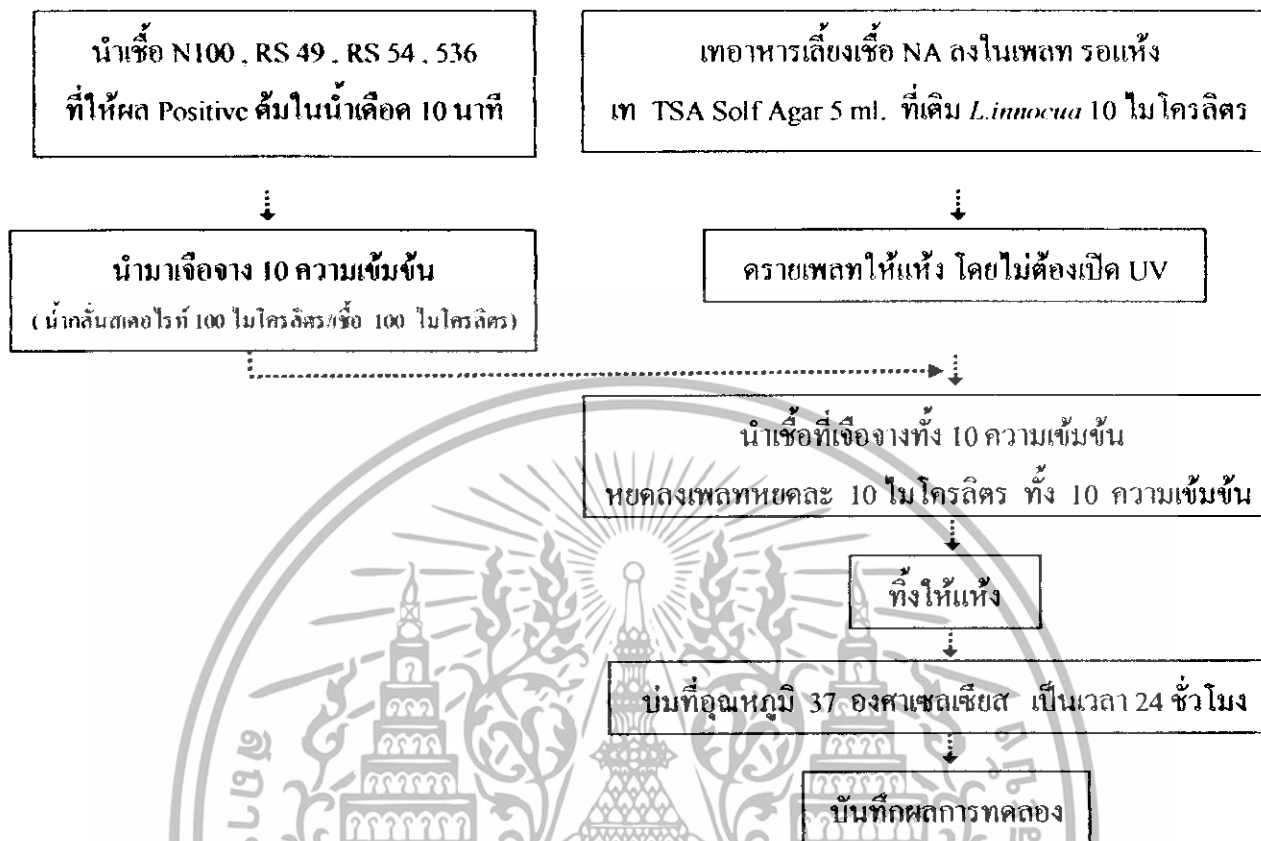
โดยทำการวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินโดยใช้ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของเชื้อซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบและคูณด้วย 100



$$\text{ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน} = 16/1 \times 100$$

$$= 1,600 \text{ (AU ml}^{-1}\text{)}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้เผยแพร่เห็นประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



3.2.4 ศึกษาผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของไฮเดียมกลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%)

3.2.4.1 เทอาหารแข็ง MRS Agar ลงบนจานเพาะเชื้อ (อบฆ่าเชื้อแล้ว) กระจายเพลทให้แห้ง โดยเปิด UV

3.2.4.2 นำเชื้อ N100 , RS 49 , RS 54 , 536 ที่ให้ผล Negative มาเจือจาง(Dilution) โดยเมื่อทำการเพาะเชื้อให้เจริญบนอาหารวุ้นในจานเพาะเชื้อแล้วมีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30 – 300 โคโลนี

3.2.2.3 นำเชื้อ N100 , RS 49 , RS 54 , 536 ที่เจือจางแล้วมา Spread plate ในอาหารแข็ง MRS Agar 0.1 ml. ทิ้งให้แห้ง

3.2.2.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.2.5 บันทึกผลการทดลอง โดยทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทดลอง

ใช้เวลาในการทดลองประมาณ 5 เดือน โดยเริ่มตั้งแต่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2548 ถึง 31 สิงหาคม 2548 และ 1 ธันวาคม 2548 ถึง 15 กุมภาพันธ์ 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนการดำเนินการทดลอง

ขั้นตอน	ระยะเวลา					
	ม.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.
1. กำหนดหัวข้อและขอบเขตของเนื้อหาที่ ต้องการศึกษา	←-----→					
2. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง และ ทดสอบเชื้อ	←-----→					
3. ศึกษา		←-----→				
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง						←-----→

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์การทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%)

จากผลการทดลองศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่มีเชื้อเริ่มต้น 4.3×10^2 Cfu/ml. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) โดยดูจากความขุ่นเนื่องจากการเจริญของเชื้อ (ตารางที่ 5) พบว่าเชื้อ N 100 และ 536 ให้ผล Positive ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5% และ 5.0% ให้ผล Negative ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7.5% และ 10.0% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อบ่มนานขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้งสองสามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นใน MRS Broth ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7.5 % แต่ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10.0% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อทั้งสองยังคงไม่สามารถเพิ่มจำนวนจนเห็นความขุ่นได้ ส่วนเชื้อ RS 49 และ RS 54 สามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 2.5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 5.0% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 48 ชั่วโมง แสดงว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญของชนิดสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่มที่ศึกษาก็คือ N 100 และ 536 ที่แยกได้จากเหมืองจะเจริญได้ดีกว่าใน MRS Broth ที่มี ความเข้มข้นเกลือที่สูง เมื่อเทียบกับ RS 49 และ RS 54 ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ โซเดียมคลอไรด์	N100		536		RS 49		RS 54	
	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+
2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+
5.0%	+	+	+	+	-	+	-	+
7.5%	-	+	-	+	-	-	-	-
10.0%	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีเชื้อเจริญจนหลอคุ่น

- คือ Negative ไม่พบการเจริญของเชื้อ

4.2 ศึกษาผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%)

จากผลการทดลองศึกษาการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 7.5% และ 10.0% พบว่าที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 7.5% เชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 บ่มที่ 24 ชั่วโมง สามารถมีชีวิตอยู่รอด 2470000, 2890000, 2200000, 2670000 Cfu/g ตามลำดับ และเชื้อ RS 49, RS 54 บ่มที่ 48 ชั่วโมง สามารถมีชีวิตอยู่รอด 2350000, 2700000 Cfu/g ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10.0 % เชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 บ่มที่ 24 ชั่วโมง สามารถมีชีวิตอยู่รอด 2620000, 3820000, 2200000, 2750000 Cfu/g ตามลำดับ เชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 บ่มที่ 48 ชั่วโมง สามารถมีชีวิตอยู่รอด 2750000, 3900000, 2250000, 2700000 Cfu/g ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7.5 %

ระดับเชื้ออาจ ความเข้มข้น ของ NaCl	จำนวนโคโลนีที่นับได้				ผลการตรวจนับ โคโลนีกรับ
	1:10 (10 ⁻¹)	1:100 (10 ⁻²)	1:1000 (10 ⁻³)	1:10000 (10 ⁻⁴)	
N100, 48 hr.	>300	>300	285	21	2.47x 10 ⁶
536, 48 hr.	>300	>300	169	41	2.89x 10 ⁶
RS 49, 24 hr.	>300	>300	120	32	2.20x 10 ⁶
RS 49, 48 hr.	>300	>300	130	34	2.35x 10 ⁶
RS 54, 24 hr.	>300	>300	154	38	2.67x 10 ⁶
RS 54, 48 hr.	>300	>300	200	34	2.70x 10 ⁶

หมายเหตุ ปริมาณเชื้อ 536 เริ่มต้น 430 Cfu/g. ปริมาณเชื้อ N100 เริ่มต้น 440 Cfu/g.
ปริมาณเชื้อ RS 49 เริ่มต้น 420 Cfu/g. ปริมาณเชื้อ RS 54 เริ่มต้น 420 Cfu/g.

ตารางที่ 7 ผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10.0 %

ระดับเชื้ออาจ ความเข้มข้น ของ NaCl	จำนวนโคโลนีที่นับได้				ผลการตรวจนับ โคโลนีกรับ
	1:10 (10 ⁻¹)	1:100 (10 ⁻²)	1:1000 (10 ⁻³)	1:10000 (10 ⁻⁴)	
N100, 24 hr.	>300	>300	283	24	2.62x 10 ⁶
N100, 48 hr.	>300	>300	240	31	2.75x 10 ⁶
536, 24 hr.	>300	>300	294	47	3.82 x 10 ⁶
536, 48 hr.	>300	>300	280	50	3.90 x 10 ⁶
RS 49, 24 hr.	>300	>300	120	32	2.20x 10 ⁶
RS 49, 48 hr.	>300	>300	110	34	2.25x 10 ⁶
RS 54, 24 hr.	>300	>300	230	32	2.75x 10 ⁶
RS 54, 48 hr.	>300	>300	210	33	2.70x 10 ⁶

หมายเหตุ ปริมาณเชื้อ 536 เริ่มต้น 430 Cfu/g. ปริมาณเชื้อ N100 เริ่มต้น 440 Cfu/g.
ปริมาณเชื้อ RS 49 เริ่มต้น 420 Cfu/g. ปริมาณเชื้อ RS 54 เริ่มต้น 420 Cfu/g.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาค่า pH การเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%)

จากผลการทดลองศึกษาค่า pH การเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) พบว่าค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0% (ตารางที่ 8) เริ่มต้นก่อนการบ่มเพาะเชื้อมีค่า pH 5.94, 5.73, 5.67, 5.54 และ 5.57 ตามลำดับ แต่เมื่อบ่มได้ 24 ชั่วโมงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อ N 100 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0% มีค่า pH 4.49, 4.61, 5.00, 5.45, 5.49 ที่ 24 ชั่วโมง และ 4.45, 4.43, 4.78, 5.24, 5.38 ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อ 536 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0% มีค่า pH 4.12, 4.23, 4.46, 4.94, 5.32 ที่ 24 ชั่วโมง และ 4.07, 4.03, 4.19, 4.79, 5.07 ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อ RS 49 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0% มีค่า pH 4.78, 4.93, 5.14, 5.54, 5.55 ที่ 24 ชั่วโมง และ 4.62, 4.87, 5.06, 5.31, 5.53 ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อ RS 54 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0% มีค่า pH 4.58, 4.85, 5.08, 5.42, 5.49 ที่ 24 ชั่วโมง และ 4.32, 4.73, 4.97, 5.34, 5.52 ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าความเข้มข้นของเกลือนอกจากจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ ที่ทำการศึกษาก็ยังมีผลต่อการเกิดกรดซึ่งเทียบจาก pH โดยความเข้มข้นของเกลือที่ค่าการเจริญของเชื้อจะเจริญได้เร็วมีผลทำให้มีการหมักน้ำตาลที่มีใน MRS Broth ไปเป็นกรดแลกติกได้มากส่งผลให้ค่า pH ของ MRS Broth ลดลงได้เร็วกว่า MRS Broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง

ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาค่า pH การเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ NaCl	Control	N100		536		RS 49		RS 54	
		24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.
0%	5.94	4.49	4.45	4.12	4.07	4.78	4.62	4.58	4.32
2.5%	5.73	4.61	4.43	4.23	4.03	4.93	4.87	4.85	4.73
5.0%	5.67	5.00	4.78	4.46	4.19	5.14	5.06	5.08	4.97
7.5%	5.54	5.45	5.24	4.94	4.79	5.54	5.31	5.42	5.34
10.0%	5.57	5.49	5.38	5.32	5.07	5.55	5.53	5.49	5.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Linnocua* ของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%)

จากผลการทดลองศึกษาการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Linnocua* ของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0% (ตารางที่ 9) พบว่า เชื้อ N 100 ที่ 24 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5% และ 5.0% สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินขึ้นมายับยั้ง *Linnocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 1,600 หน่วย/มิลลิลิตร (AU ml⁻¹) และที่ 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5%, 5.0% และ 7.5 % สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินขึ้นมายับยั้ง *Linnocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 1,600 หน่วย/มิลลิลิตร (AU ml⁻¹) เชื้อ 536 ที่ 24 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5%, 5.0% และ 7.5 % สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินขึ้นมายับยั้ง *Linnocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 1,600 หน่วย/มิลลิลิตร (AU ml⁻¹) และที่ 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5%, 5.0% และ 7.5 % สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินขึ้นมายับยั้ง *Linnocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 1,600 หน่วย/มิลลิลิตร (AU ml⁻¹) เชื้อ RS 49 ที่ 24 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 2.5 % สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินขึ้นมายับยั้ง *Linnocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 800 หน่วย/มิลลิลิตร (AU ml⁻¹) และที่ 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5% และ 5.0 % สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินขึ้นมายับยั้ง *Linnocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 800 หน่วย/มิลลิลิตร (AU ml⁻¹) เชื้อ RS 54 ที่ 24 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 2.5 % สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินขึ้นมายับยั้ง *Linnocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 1,600 หน่วย/มิลลิลิตร (AU ml⁻¹) และที่ 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5% และ 5.0 % สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินขึ้นมายับยั้ง *Linnocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 1,600 หน่วย/มิลลิลิตร (AU ml⁻¹) (ตารางที่ 9, 10, 11 และ 12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงผลการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Limococcus* ของเชื้อ N 100 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16		1:32		1:64		1:128		1:256		1:512	
เวลา	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
% NaCl	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.5%	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีไขมันของการยับยั้งเชื้อ

- คือ Negative ไม่มีไขมันของการยับยั้งเชื้อ

จากการศึกษาในขั้นตอนนี้กล่าวถึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของเกลือใน MRS Broth มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยที่

ตารางที่ 10 แสดงผลการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Limococcus* ของเชื้อ 536 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16		1:32		1:64		1:128		1:256		1:512	
เวลา	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
% NaCl	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.5%	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีไขมันของการยับยั้งเชื้อ

- คือ Negative ไม่มีไขมันของการยับยั้งเชื้อ

เพื่อการศึกษานี้ ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 แสดงผลการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Limocina* ของเชื้อ RS 49 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16		1:32		1:64		1:128		1:256		1:512	
เวลา	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
% NaCl	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0%	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีโชนไลของการยับยั้งเชื้อ

- คือ Negative ไม่มีโชนไลของการยับยั้งเชื้อ

ตารางที่ 12 แสดงผลการสร้างแบคทีเรียโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Limocina* ของเชื้อ RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16		1:32		1:64		1:128		1:256		1:512	
เวลา	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48	24	48
% NaCl	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.	hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0%	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีโชนไลของการยับยั้งเชื้อ

- คือ Negative ไม่มีโชนไลของการยับยั้งเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาวิจัยการเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีเรียโอซินของ N100, 536, RS 49 และ RS 54 ใน MRS Broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 % พบว่า *Lactococcus lactis* N 100 จากตัวอย่างแฮม (Swetwivathana and Lotong, 1999) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 จากตัวอย่างแฮม (Swetwivathana and Lotong, 1999) สามารถเจริญได้ดีในความเข้มข้นเกลือ 5 % ภายใน 24 ชั่วโมงแต่เจริญได้ช้าในความเข้มข้นเกลือ 7.5% และไม่เจริญเมื่อความเข้มข้นเกลือสูงถึง 10.0 % หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง ขณะที่ *Lactobacillus plantarum* RS 49 และ RS 54 จากไส้กรอกอีสาน เจริญได้เร็วที่ความเข้มข้นเกลือ 2.5 % ใน 24 ชั่วโมง แต่เจริญช้าที่ความเข้มข้นเกลือ 5.0 % ใน 48 ชั่วโมง และไม่เจริญที่ความเข้มข้นเกลือ 7.5 และ 10 %

สำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซินในความเข้มข้นเกลือระดับต่างๆ นั้น พบว่ามีความสามารถในการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0, 2.5, 5 และ 7.5 % และมีความสามารถในการทนเกลือที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10 % และยังสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้โดยมีโดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 1,600 หน่วย/มิลลิลิตร (AU/ml) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นกลิ่นเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆ ในอนาคตปลอดภัยจาก *Listeria* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค ลดการใช้สารเคมีที่เติมลงไปเพื่อถนอมอาหาร ซึ่งถ้าสะสมอยู่ในร่างกายเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ใช้เป็นกลิ่นเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆ ในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. **ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์**. คณะวิทยาศาสตร์.
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

อภิญา ผลิโกมล. 2542 **แบคทีเรีย**. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
288 น.

อภัสรา กอบกัญกิจ. 2537. การแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพจากอาหารหมัก.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อังคณา สุขบุญ. 2541. ผลการยับยั้งเซลล์โมเนลลาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากไส้กรอกเปรี้ยว.
วารสารสงขลานครินทร์ 20 (4) : 429 – 436.

ศรินาด หนูเอก. 2539. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีริโอซินจากอาหารหมัก.
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abcc, T. 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection
mechanisms of producer organisms. **FEMS Microbiol. Lett.** 129: 1-10.

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

Amano, K. 1962. The influence of fermentation on the nutritive value of fish with special
reference to fermented fish products of Southeast Asia, pp. 180-200. In E. Heen and R.
Kreuzer, eds. **Fish in Nutrition**. Fishing News (Books) Ltd., London.

Anderson, D.G. and L.L. McKay. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA
from lactic Streptococci. **Appl. Environ. Microbiol.** 46: 549-552

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, pp. 1-23. In S.Salminen
and A.V. wright, eds. **Lactic acid bacteria**. Marcel Dekker, Inc., New York.

Beasley, S. and P. Saris. 2002. Protection of infant formula against pathogenic *Bacillus*
licheniformis using a nisin producer isolated from human milk. Book of Abstracts of
Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Application. 1-5
September 2002. Egmond am Zee, The Netherland: Abstract No. C10.

Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes, and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural
antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71: 1-20.

Cutter, C.N and G.R. Siragusa. 1995. Population reductions of gram-negative pathogens following
treatments with nisin and chelators under various conditions. **J. Food Prot.** 58: 977-983.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Davidson, P.M. and D.G. Hoover. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-160. In S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. **J. Gen. Microbiol.** 138: 571-578.
- De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacter **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Application**. Blackie- Academic & Professional, London. p. 91-142.
- Eckner, K.F. 1992. Bacteriocins and food application. **Dairy, Food and Environ. Sanitation.** 12: 204-209.
- Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Assobhei and C. Hasselmann. 1998. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. **J. Appl. Microbiol.** 85: 521-526.
- Fields, F.O. 1996. Use of bacteriocins in food: Regulatory considerations. **J. Food Prot.** 59: 72-77.
- Franz, C.M.A.P., M. Du Toit, N.A. Olasupo, U. Schillinger and W.H. Holzapfel. 1998. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad. **Lett. Appl. Microbiol.** 26: 231-235.
- Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 175-185.
- Gould, G.W. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **J. Food Prot.** 59: 82-86.
- Hastings, J.W. and M.E. Stiles. 1991. Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. **J. Appl. Bacteriol.** 70: 127-134.
- Holzapfel, W.H. and B.J.B. Wood. 1995. Lactic acid bacteria in contemporary perspective, p.1-6. In W.H. Holzapfel and B.J.B. Wood, eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic & Professional, London.
- Hurst, A. 1981. Nisin, p. 85-123. In D. perlman and A.I. Laskin, eds. **Adv. Appl. Microbiol.** Academic Press, Inc., New York.
- and D.G. Hoover. 1993. Nisin, p. 369-394. In A.L. Branen and P.M. Davidson, eds.

Antimicrobial in Foods. Marcel Dekker, New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้ในเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y., & Yamasato, K. (2003).

Mainilactibacillus psychrotolerans gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marine lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of Japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, 53, 711-720.

Jack, R.W., J.R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.** 59: 171-200.

Jacob, F., A. Siminovitch and E.L. Wollman. 1953. Definition de quelques termes relatifs a la lysogenie. **Ann. Inst. Pasteur Paris**, 84 : 222-224

Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. bacteriol.** 167: 439-446.

Johnson, J.I. 1984. Bacterial classification III. Nucleic acids in bacterial classification, pp. 8-11. In N.R. Krieg and J.G. Holt, eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1**. Williams, Baltimore.

Josephson, J. and E.W. Nielsen. 1988. Plasmid profiles and bacteriophage sensitivity of bacteria of cheddar starter used for five years without rotation, pp. 219-223. In B.Pot, W. Ludwig, K. Kersters and Karl-Heinz, eds. **Taxonomy of Lactic Acid Bacteria: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Application**. Blackie Academic & Professional, New York.

Kandler, O, and N. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, pp. 1209-1234. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2**. Williams and Wilkins, Baltimore.

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

Kleinkauf, H. and H. von Dohren. 1987. Biosynthesis of peptide antibiotics. **Annu. Rev. Microbiol.** 41: 259-289.

Konisky, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. **Annu. Rev. Microbiol.** 36: 125-144.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Lewus, C.B., A. Kaiser and T.J. Montville. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic bacteria isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1683-1688.
- Lewus, C.B., S. Sun and T.J. Montville. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by an atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 58: 143-149.
- Litchfield, J.H. 1996. Microbiological production of lactic acid bacteria. **Adv. Appl. Microbiol.** 43: 75-80.
- Lyon, W.J. and B.A. Glatz. 1993. Isolation and purification of propionicin PLG-I, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59: 83-88.
- McKay, L.L., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker. 1983. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. **Antonie van Leeuwenhoek.** 49: 259-274.
- McMullen, L.M. and M.E. Stiles. 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. **J. Food Prot.** 59: 64-71.
- Montville, T.J. and A.L. Kaiser. 1993. Antimicrobial proteins : classification, nomenclature, diversity and relationship to bacteriocins, p. 1-22. In D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic Press, Inc., New York.
- Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. Sonomoto and S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** 81: 137-145.
- Ohmomo, S., S. Murata, N. Katayama, S. Nitisingprasart, M. Kobayashi, T. Nakajima, M. Yajima and K. Nakanishi. 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. **J. Appl. Microbiol.** 88: 81-89.
- Orla-Jensen, S. 1991. **The Lactic Acid Bacteria**. Host and Son, Copenhagen.
- Ostergaard, A., P.K.B. Embarek, C.W. Neergaard, H.H. Huss and L. Gram. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. **Food microbial.** 15: 223-233.
- Pilet, M.F., X. Dousset, R. Barre, G. Novel, M. Desmazeaud and J.C. Piard. 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 58: 256-262

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์สำหรับวารสารวิชาการของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Pot, B., C. Hertel, W. Ludwig, P. Descheemaeker, K. Kersters and K.H. Schleifer. 1993. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. johnsonii* strain by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotides probe hybridization. **J. Gen. Microbiol.** 139: 513-517.
- W. Ludwig, K. Kersters and K. Heinz. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria, pp. 13-90. In L. De Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetics and Applications**. Blackie Academic & Professional, London.
- Rastelli, E. 2005. Identification and characterisation of halotolerant bacteria in spoiled dry-cured hams. **Meat Science**. 70: 241-246
- Rastelli, E. and N. Deschamps. 2000. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. **J. Appl. Microbiol.** 88: 449-457.
- Rattanachaiyumsophon, P. and P. Phumkhachorn. 2000. A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from Thai fermented foods. **ScienceAsia**. 26: 195-200.
- Ringo, E. and F.J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish : a review. **Aquaculture**. 160: 177-203.
- Rodriguez, J.M., M.L. Martinez., N. Horn and H.M. Dodd. 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 81 : 101-116.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1998. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science**. 239: 487-494.
- Sarkar, P.K. and S. Banerjee. 1996. Antibacterial activity of lactic acid bacterial isolates obtained from natural habitats. **J. Food Sci. Technol.** 33: 231-233.
- Sashihara, T., M. Dan, H. Kimura, H. Matsusaki, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2001. The effect of osmotic stress on the production of nukacin ISK-1 from *Staphylococcus warneri* ISK – 1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56 : 496-501.
- Schillinger, U., R. Geisen and W.H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. Technol.** 7 : 158-164.
- Schlegel, H.G. 1993. **General Microbiology**. Cambridge University Press, Cambridge.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Schleifer, K.H. 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 46 : 201-203.
- Stevens, K.A., N.A. Klapes, B.W. Sheldon and T.R. Klaenhammer. 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of gram-negative bacteria. **J. Food Prot.** 55: 763-766.
- B. W. Sheldon, N.A. Klapes and T.R. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* and others gram-negative bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 : 3613-3615.
- Stiles, M.E. and L.W. Hastings. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria : potential for use in meat preservation: a review. **Trend Food Sci. Technol.** 2: 247-251.
- and W.H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.** 36 : 1-29.
- Swetwivathana, A. and N. Lotong. 1999. Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from nham (Thai fermented meat). In Proceeding of **International Conference on Asian Network on Microbial Research**, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Chiang- Mai, Thailand, 29 November-1 December 1999.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** 40 : 722-756.
- Tanasupawat, S. and K. Komagata. 1995. Lactic acid bacteria in fermented food in Thailand. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 11: 253-256.
- Yildirim, Z. and M.G. Johnson. 1998. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. **Lett. Appl. Microbiol.** 26: 297-304.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. MRS broth

MRS	52	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

2. MRS agar

MRS	52	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

3. NA

Peptone	5	กรัม
Beet extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

4. TSA soft agar

TSB	30	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Agar	10	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

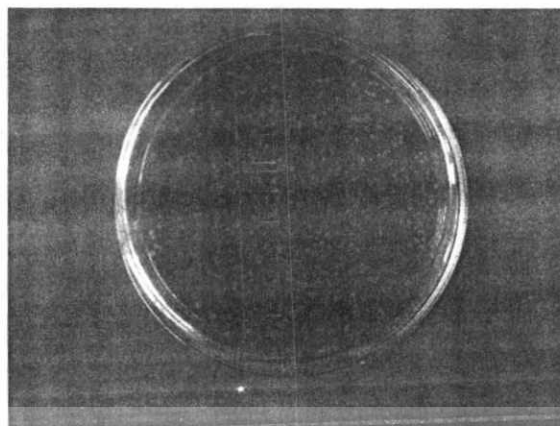
ภาคผนวก ข



ภาคผนวก ข.1 ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีเชื้อเจริญเติบโตและไม่มีเชื้อเจริญเติบโต

ภาคผนวก ข.2 แสดง clear zone ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวก ข.3 แสดงโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้