

ผลของสารแบคทีริโอซินในการลดเชื้อ *Bacillus cereus* ในเมล็ดบัวต้ม

Effect of Bacteriocin on Reduction of *Bacillus cereus* in Boiled Lotus Seed



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษิตตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาการจัดการความปลอดภัยอาหาร

คณะอุตสาหกรรมอาหาร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2564

KMITL-2021-FI-M-054-384

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Effect of Bacteriocin on Reduction of *Bacillus cereus* in Boiled Lotus Seed



THAMMANOON SOMCHIT

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SAFETY MANAGEMENT
SCHOOL OF FOOD-INDUSTRY
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2021

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่ออนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



COPYRIGHT 2021

SCHOOL OF FOOD-INDUSTRY

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารแบคทีเรียโอซินในการลดเชื้อ <i>Bacillus cereus</i> ในเมล็ดบัวตัม
นักศึกษา	นายธรรมณูญ สมจิตร
รหัสประจำตัว	58608020
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	การจัดการความปลอดภัยอาหาร
พ.ศ.	2564
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ.ดร.อพัชชา จินดาประเสริฐ

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ทำการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างเมล็ดบัว และ ใส่เมล็ดบัวกวนจากโรงงานอาหารแห่งหนึ่ง พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด Coliforms, *Escherichia coli* และ *Bacillus* spp. มีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐาน 83.3 46.7 26.7 และ 80.0% ตามลำดับ ใส่เมล็ดบัวกวนตรวจพบปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. เกินเกณฑ์มาตรฐานคิดเป็น 42.9% และผลตรวจยืนยันเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากเมล็ดบัวตัมด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ระบุสายพันธุ์เชื้อที่แยกได้คือ *B. cereus* LT5 LT6 และ LT7 นำเชื้อ *B. cereus* AIKL1062 และเชื้อแยกที่ได้มาทำการศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KL-1 และสารแบคทีเรียโอซิน D4 ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* KL-D4 ในการยับยั้งเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y มีกิจกรรมยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT5, LT6, LT7 และเชื้อ *B. cereus* AIKL1062 สายพันธุ์อ้างอิง โดยมีขนาดวงใส (inhibition zone) เท่ากับ 1.92 ± 0.27 1.52 ± 0.20 1.08 ± 0.12 และ 0.70 ± 0.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ สาร D4 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ ซึ่งสายพันธุ์ที่มีความต้านทานมากที่สุดคือ *B. cereus* LT7 จากนั้นศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ที่เชื้อเริ่มต้น 3.64 และ 6.24 log CFU/ml ที่ความเข้มข้น 0.5 และ 10% ระยะเวลา 1 นาที 6 12 18 และ 24 ชั่วโมง พบว่าทุกความเข้มข้นไม่สามารถทำลายเชื้อได้หมด แต่ที่ความเข้มข้น 10% จะลดการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ในช่วงเวลา 6 – 12 ชั่วโมงแรก แต่เมื่อใช้สารแบคทีเรียโอซินและปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.06 log CFU/ml สาร KL-1Y ที่ความเข้มข้น 10% เวลา 18 ชั่วโมง ตรวจพบเชื้อเหลือรอด 1.00 ± 0.00 log CFU/ml ลดปริมาณเชื้อลง 2.29 log CFU/ml (การลดลงของเชื้อ 67.32%) และปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.66 log CFU/ml ที่ความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เข้มข้น 10% เวลา 18 ชั่วโมง พบเชื้อเหลือรอด $5.32 \pm 0.61 \log \text{CFU/ml}$ ลดปริมาณเชื้อลง $1.24 \log \text{CFU/ml}$ (การลดลงของเชื้อ 20.12%) ตามลำดับ หลังจากนั้นนำสภาวะที่ได้คือ ความเข้มข้นสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y 10% ที่เวลา 18 ชั่วโมง มาทำการศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ในการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเมล็ดบัวตัม โดยแช่เมล็ดบัวตัมในสารแบคทีเรียโอซิน ที่ความเข้มข้น 10% ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ระยะเวลา 22 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ เมล็ดบัวตัมก่อนการแช่พบเชื้อ $6.31 \pm 0.03 \log \text{CFU/g}$ ตรวจพบเชื้อเหลือรอดหลังการแช่ $4.49 \pm 0.10 \log \text{CFU/g}$ ทำให้เชื้อลงได้ $1.82 \log \text{CFU/ml}$ ดังนั้นการแช่เมล็ดบัวตัมในสารแบคทีเรียโอซินปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อ *B. cereus* ในเมล็ดบัวตัมได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis	Effect of Bacteriocin on Reduction of <i>Bacillus cereus</i> in Boiled Lotus Seed
Student	Mr. Thammanoon Somchit
Student ID.	58608020
Degree	Master of Science
Program	Food Safety Management
Year	2021
Thesis Advisor	Asst. Prof. Dr. Aphacha Jindaprasert

ABSTRACT

The aim of this research was to study the microbiological quality of boiled lotus seed and lotus seed paste from a food manufacturer. It was found total plate count (TPC), Coliforms, *Escherichia coli* and *Bacillus* spp. in boiled lotus seed exceeded the standard of 83.3 46.7 26.7 and 80.0%, respectively. *Bacillus* spp. in lotus seed paste exceeded the standard of 42.9%. *B. cereus* isolated from boiled lotus seed samples was confirmed by biochemical test. The isolated strains, LT5, LT6, and LT7 were identified to *B. cereus*. The effect of bacteriocin KL-1Y produced by *Lactobacillus plantarum* KL-1 and bacteriocin D4 produced by *Lb. salivarius* KL-D4 on inhibition of isolated *B. cereus* by agar well diffusion method. *B. cereus* AIKL1062 was the reference strain. Bacteriocin KL-1Y had inhibitory activity against *B. cereus* LT5, LT6 and LT7 and *B. cereus* AIKL1062 with an inhibition zone of 1.92 ± 0.27 , 1.52 ± 0.20 , 1.08 ± 0.12 and 0.70 ± 0.38 mm, respectively. The most resistant strain was *B. cereus* LT7. Inhibition of growth of *B. cereus* LT7 at 3.64 and 6.24 log CFU/ml at KL-1Y 0, 5 and 10% concentrations for 1 min 6, 12, 18 and 24 hours showed all concentrations were ineffective all stains. However, number of *B. cereus* LT7 decreased at 10% concentration during the 6 - 12 hours. The results of KL-1Y at 10% concentration to adjust for pH 4.0 at the initial cells 3.06 log CFU/ml for 18 hours found that *B. cereus* LT7 was detected at 1.00 ± 0.00 log CFU/ml, decreased 2.29 log CFU/ml (67.32% reduction). At the initial cells 6.66 log CFU/ml, survival of *B. cereus* LT7 was 5.32 ± 0.61 log CFU/ml, decreased 1.24 log CFU/ml (20.12% reduction), respectively. The concentration of bacteriocin KL-1Y 10% at 18 hours was studied on the effect of bacteriocin on the reduction of TPC in boiled lotus seed. The boiled lotus seeds were soaked in 10% concentration of bacteriocin and adjusted for pH 4.0 for 22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

hours at temperature of 4 ± 1 °C. Initial TVC in the boiled lotus seeds 6.31 ± 0.03 log CFU/g was reduced to 4.49 ± 0.10 log CFU/g, decreased 1.82 log CFU/ml. Therefore, soaking boiled lotus seed in bacteriocin and adjust pH can reduce TPC and *B. cereus* in boiled lotus seed.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้จัดทำวิทยานิพนธ์ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. อพัชชา จินดาประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และ รศ.ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์ ที่กรุณาให้ความรู้ แนวคิด คำปรึกษา และข้อเสนอแนะในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิรามศรี ศรีพจนารถ อาจารย์คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง และ รศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่ได้ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบปกป้องวิทยานิพนธ์ และได้กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่ง ตลอดจนตรวจทานแก้ไขจนวิทยานิพนธ์ี้มีความถูกต้องยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณสมภพ วัฒนมณี สำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ที่กรุณาช่วยตรวจยืนยันสายพันธุ์เชื้อ *Bacillus cereus*

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.ศุภนิษฐ์ นิธิสินประเสริฐ อาจารย์ประจำภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่อนุเคราะห์ในการเตรียมสารแบคทีเรียโอซินในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ เจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่าน รวมถึงเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ นักศึกษา คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำในการทำวิจัย และให้กำลังใจในการทำวิจัยนี้ตลอดมา

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่ของข้าพเจ้าที่สนับสนุนและช่วยเหลือทางด้านการศึกษาและเป็นกำลังใจอยู่เสมอ ทำให้ข้าพเจ้าทำงานวิจัยนี้จนสำเร็จ ประโยชน์อันใดที่ได้จากวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ย่อมเป็นผลมาจากความกรุณาของทุกท่านดังกล่าวข้างต้น ผู้วิจัยจึงใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านไว้ ณ โอกาสนี้

ธรรมบุญ สมจิตร

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	X
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 เม็ดบัว.....	4
2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของเม็ดบัว.....	4
2.1.2 คุณค่าทางอาหารของเม็ดบัว.....	4
2.1.3 ขั้นตอนการผลิตเม็ดบัวต้ม.....	6
2.1.4 ประโยชน์ของเม็ดบัว.....	7
2.1.5 มาตรฐานผลิตภัณฑ์.....	7
2.2 เชื้อบาซิลลัส ซีเรียส (<i>Bacillus cereus</i>).....	9
2.2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ <i>B. cereus</i>	9
2.2.2 สารพิษจากเชื้อ <i>B. cereus</i>	9
2.2.3 อาหารที่พบการปนเปื้อนเชื้อ <i>B. cereus</i>	10
2.2.4 การควบคุมป้องกันการปนเปื้อนเชื้อ <i>B. cereus</i>	11
2.3 สารแบคทีริโอซิน (Bacteriocin).....	11
2.3.1 ความหมายของสารแบคทีริโอซิน.....	11
2.3.2 การจำแนกสารแบคทีริโอซิน.....	11
2.3.3 กลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแบคทีริโอซิน.....	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.3.4 การใช้สารแบคทีเรียโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร.....	15
2.3.5 สารแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์..	16
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	19
2.4.1 การศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์.....	19
2.4.2 การประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอซิน.....	20
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	24
3.1 วัตถุประสงค์.....	24
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี.....	24
3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	25
3.4 วิธีการทดลอง.....	26
3.5 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	33
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	34
4.1 ผลการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวตัม.....	34
4.2 ผลการศึกษาสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเซลล์ของเชื้อ <i>B. cereus</i>	40
4.3 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ <i>Lb. plantarum</i> KL-1 ต่อเซลล์ของ <i>B. cereus</i>	43
4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ในการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ในเมล็ดบัวตัม.....	55
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	58
5.1 สรุปผลการทดลอง.....	58
5.2 ข้อเสนอแนะ.....	59
บรรณานุกรม.....	62
ภาคผนวก.....	67
ภาคผนวก ก.....	67
ภาคผนวก ข.....	71
ภาคผนวก ค.....	72
ประวัติผู้เขียน.....	77

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 คุณค่าทางโภชนาการของเม็ดยาว.....	5
2.2 เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆ ที่พบในเม็ดยาว.....	5
2.3 มาตรฐานจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค กำหนดชนิดจุลินทรีย์และปริมาณที่พบในอาหาร...	8
2.4 เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560) อาหารปรุงสุกหรืออาหารที่ผ่านกรรมวิธี.....	8
2.5 การสำรวจผลิตภัณฑ์อาหารที่ตรวจพบเชื้อ <i>B. cereus</i>	10
2.6 การจัดจำแนก class ของแบคทีเรีย โอซิน	12
2.7 ช่วง pH 2 - 12 และความร้อน ต่อกิจกรรมของสาร KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ <i>Lactobacillus plantarum</i> KL-1.....	17
2.8 กิจกรรมการยับยั้งของ ไนซิน (Nisaplin) และ plantaricin KL-1Y.....	17
2.9 กิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ <i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> jcm1157 ^T ของสารแบคทีเรีย โอซินไม่บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะต่างๆ.....	18
4.1 ค่าช่วงพีเอช ค่าเฉลี่ยพีเอช ของเม็ดยาวต้ม 30 ตัวอย่าง และไส้เม็ดยาวกวน 14 ตัวอย่าง..	34
4.2 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในเม็ดยาว จำนวนและ %ของตัวอย่างเม็ดยาวที่มีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยา.....	35
4.3 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในไส้เม็ดยาว จำนวนและ % ของตัวอย่างเม็ดยาวที่มีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยา.....	36
4.4 ปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ <i>B. cereus</i> ในเม็ดยาวและไส้เม็ดยาว.....	37
4.5 ผลตรวจยืนยันเชื้อ <i>B. cereus</i> ในเม็ดยาว จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยใช้วิธีการดัดแปลงจาก FDA-BAM (2001).....	38
4.6 สายพันธุ์เชื้อ <i>B. cereus</i> และชนิดของสารแบคทีเรีย โอซินที่มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มิลลิเมตร)	41
4.7 ผลการทดสอบสารแบคทีเรีย โอซิน KL-1Y ที่เวลาต่างกันต่อปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 เริ่มต้น 3.64 log CFU/ml.....	46
4.8 ผลการทดสอบสารแบคทีเรีย โอซิน KL-1Y ที่เวลาต่างกันต่อปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 เริ่มต้น 6.24 log CFU/ml.....	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.9 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.64 log CFU/ml.....	48
4.10 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.24 log CFU/ml.....	48
4.11 ผลการทดสอบสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ที่เวลาต่างกันต่อปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 เริ่มต้น 3.06 log CFU/ml.....	51
4.12 ผลการทดสอบสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ที่เวลาต่างกันต่อปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 เริ่มต้น 6.66 log CFU/ml.....	52
4.13 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อปรับกรดซिटริก pH 4.0 ร่วมกับการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.06 log CFU/ml.....	53
4.14 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อปรับกรดซिटริก pH 4.0 ร่วมกับการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.66 log CFU/ml.....	53
4.15 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของเมล็ดบัวต๋มก่อนและหลังการแช่สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 10% เวลา 22 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส.....	55
ค.1 ปริมาณสารที่เติมสำหรับการเตรียมสารแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้นต่างกัน.....	72

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ผังกระบวนการผลิตเม็ดบัวต้ม.....	6
2.2 ผลของแบคทีเรียโอซินต่อผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์.....	14
3.1 การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของสารแบคทีเรียโอซินใน การยับยั้งเชื้อ.....	31
4.1 ลักษณะบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของสารแบคทีเรียโอซินต่อการยับยั้งเชื้อเชื้อ <i>B. cereus</i> 1062 (ก), <i>B. cereus</i> LT5 (ข), <i>B. cereus</i> LT6 (ค) และ <i>B. cereus</i> LT7 (ง)	41
4.2 ลักษณะของเม็ดบัวเริ่มต้น (ก), ลักษณะของเม็ดบัวหลังการแช่สารแบคทีเรียโอซิน (ข) และเม็ดบัวหลังการนึ่ง (ค).....	56
ค.1 เม็ดบัวหลังต้มจากร้านค้าแห่งหนึ่ง.....	72
ค.2 ใสบัวกวนจากร้านค้าแห่งหนึ่ง.....	72
ค.3 ลักษณะโคโลนีเชื้อ <i>B. cereus</i> ที่เจริญบนอาหาร MYP.....	73
ค.4 ลักษณะโซนใสที่เกิดบนอาหาร 5% sheep blood agar.....	73
ค.5 การเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย cork borer.....	73
ค.6 กระบวนการผลิตเม็ดบัวต้มจากโรงงานแห่งหนึ่ง.....	74
ค.7 เม็ดบัวที่แช่สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10% ปรับ pH 4.0.....	75
ค.8 เม็ดบัวที่แช่สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10% ปรับ pH 4.0 จัดเก็บที่ อุณหภูมิ 0 – 4°C เวลา 22 ชั่วโมง.....	75
ค.9 อุปกรณ์สำหรับการนึ่งเม็ดบัว (ก), เม็ดบัวหลังแช่สารแบคทีเรียโอซิน KL1Y ก่อนนึ่ง (ข) และเม็ดบัวหลังแช่สารแบคทีเรียโอซิน KL1Y หลังนึ่ง 30 นาที (ค).....	76
ค.10 การแยกเม็ดบัวหลังแช่สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10%.....	76

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้บริโภคนิยมหันมาบริโภคอาหารที่มีคุณค่าทางโภชนาการกันมากขึ้น ซึ่งเมล็ดบัว (Lotus seed) เป็นวัตถุดิบที่มีคุณค่าทางอาหาร และมีรสชาติที่ดี เหมาะสำหรับการนำมาแปรรูปเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์ต่างๆ ทั้งอาหารคาวและอาหารหวาน ซึ่งส่วนใหญ่แล้วเมล็ดบัวที่เราจะพบเห็นนั้นจะอยู่ในรูปแบบของเมล็ดบัวแห้ง โดยก่อนการนำมาทำอาหารจะต้องนำไปต้มหรือแช่น้ำให้เมล็ดบัวนิ่มก่อน ผลิตภัณฑ์ที่ใช้เมล็ดบัวเป็นส่วนประกอบ เช่น ขนมไหว้พระจันทร์ ใส้ขนมเปียะ เต้าทึง ข้าวต้มเมล็ดบัว ข้าวเหนียวเผือกเมล็ดบัว เมล็ดบัวเชื่อม ใส้ขนมต่างๆ และเปิดต้นดอกไม้จันทน์กับเมล็ดบัว เป็นต้น โดยในขั้นตอนการแปรรูปนั้นถึงแม้ใส้ขนมจะผ่านการให้ความร้อนมาแล้วก็ตาม แต่การให้ความร้อนที่สูงเป็นเวลานานก็จะส่งผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสและทำให้คุณภาพของใส้ขนมเปลี่ยนไปไม่ได้คุณภาพตามที่ต้องการ

ดังนั้นในการผลิตใส้ขนมจากเมล็ดบัวจึงนิยมใช้อุณหภูมิต่ำเพื่อไม่ให้ส่งผลต่อลักษณะเนื้อสัมผัสและคุณภาพของใส้ขนม ซึ่งการใช้อุณหภูมิต่ำทำให้พบปัญหาการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ ในกลุ่มที่มีการสร้างสปอร์ที่เป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มก่อโรค โดยเป็นกลุ่มที่เป็นอันตรายกับสุขภาพของผู้บริโภค ตั้งแต่ทำให้เกิดอาการผิดปกติของร่างกาย เช่น อาเจียน คลื่นไส้ ท้องเสียไปจนถึงขั้นทำให้ผู้บริโภคเสียชีวิต จากการสุ่มตรวจตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ใส้บัวกวนก่อนที่จะนำไปขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ของโรงงานอาหารแห่งหนึ่งพบว่ามีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ *Bacillus cereus* ในบางรุ่นของการผลิต ซึ่งบางครั้งมีจำนวนที่เกินกว่ากฎหมายกำหนด ทำให้เกิดความเสียหายต่อกระบวนการผลิต และส่งผลต่อความปลอดภัยของอาหารและผู้บริโภคอันตรายกับสุขภาพของ

โดยสารแบคทีเรียโอซิน เป็นสารประกอบสายเปปไทด์ขนาดเล็กมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่ก่อโรคและทำให้อาหารเสื่อมเสีย เช่น *B. cereus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* (Cleveland et al., 2001) ซึ่งจากความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรค การทนความร้อน และทนกรดต่ำได้ จึงเป็นข้อดีของแบคทีเรียโอซินในการประยุกต์ใช้ในการแปรรูปเพื่อทดแทนสารสังเคราะห์ (น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว, 2544) รายงานของ Therdtatha et al. (2016) ได้ศึกษาลักษณะของสารต้านจุลินทรีย์จาก *Lactobacillus salivarius* KL-D4 และการประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติสำหรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ศึกษาพบว่าแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* KL-D4 มีความสามารถในการยับยั้ง *B. cereus* JCM 2152 ได้ที่ 3,200 AU/ml และ Rumjuankiat et al. (2015) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซิน plantaricin KL-1Y ที่ได้จากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KL-1 พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. plantarum* KL-1Y มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์แกรมลบ เช่น *Salmonella enterica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 และเชื้อจุลินทรีย์แกรมบวก เช่น *B. cereus* JCM 2125^T ได้ที่ 800 AU/ml

ดังนั้นงานวิจัยนี้มุ่งเน้นทำการศึกษาถึงประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิดได้แก่ KL-D4 ที่ได้จาก *Lactobacillus salivarius* KL-D4 และสารแบคทีเรียโอซิน plantaricin KL-1Y ที่ได้จากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KL-1 ซึ่งเป็นสารฆ่าเชื้อทางธรรมชาติที่สร้างได้จากเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการแก้ปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในเมล็ดบัวตัมก่อนที่จะนำไปใช้ในกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เพื่อให้วัตถุดิบมีคุณภาพตามมาตรฐานที่กำหนด

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

- 1.2.1 เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในเมล็ดบัวตัมที่ผ่านการต้มก่อนการผลิตไส้เมื่อบัวกวน
- 1.2.2 เพื่อศึกษาความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus*
- 1.2.3 เพื่อลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในวัตถุดิบเมล็ดบัวตัมด้วยสารแบคทีเรียโอซินก่อนนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์

1.3 ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้เริ่มจากการสำรวจการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างเมล็ดบัวตัมและไส้เมื่อบัวกวนจากโรงงานแห่งหนึ่ง ทำการแยกเชื้อและระบุสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* ที่พบในเมล็ดบัวตัม จากนั้นศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซินทั้ง 2 ชนิด คือสาร KL-1Y และ KL-D4 ที่ผลิตจาก เชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 และ เชื้อ *Lb. salivarius* KL-D4 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธีการ agar well diffusion คัดเลือกชนิดของสารแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* สูงสุด หลังจากนั้นนำสารแบคทีเรียโอซินที่คัดเลือกได้มาศึกษาความเข้มข้นและเวลาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 และ 6 log CFU/ml ใช้ความเข้มข้นสารแบคทีเรียโอซิน 3 ระดับ ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่ pH 4.0 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ เมื่อได้สภาวะของความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซินที่เหมาะสมในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* แล้วนำมาใช้ในขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบเมล็ดบัวตัม เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ในวัตถุดิบเมล็ดบัวตัมด้วยสารแบคทีเรียโอซินก่อนนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบชนิดและปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและเชื้อ *B. cereus* ในเมล็ดบัวที่ผ่านการต้มก่อนการผลิตไส้เมล็ดบัวกวน

1.4.2 ทราบความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus*

1.4.3 สามารถลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในวัตถุดิบเมล็ดบัวตัมด้วยสารแบคทีเรียโอซินก่อนนำไปแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 เม็ดบัว

2.1.1 ข้อมูลทั่วไปของเม็ดบัว

บัวเป็นพืชที่ปลูกได้ง่าย สามารถขึ้นเองได้ตามธรรมชาติ จึงพบได้ตามแหล่งน้ำของไทย บัวเป็นพรรณไม้สารพัดประโยชน์ โดยนอกจากดอกบัวที่นิยมนำมาใช้บูชาพระแล้ว รากบัว สายบัว และเม็ดบัวก็ยังใช้รับประทานได้ ซึ่งเม็ดบัวเป็นเมล็ดของพืชในสกุล *Nelumbo* โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ *Nelumbo nucifera* ที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่ออาหารเอเชียตะวันออก โดยมีการใช้อย่างกว้างขวางในการแพทย์แผนจีนและของหวานจีน นิยมขายในรูปแบบเม็ดแห้ง และยังมีนิยมนำมาแปรรูปเป็นไส้ขนมต่างๆ และใช้เป็นส่วนผสมสำคัญในตำรับยาจีนโบราณเป็นยาอายุวัฒนะ (กมลวรรณ, 2554) ดังนั้น ประเทศจีนจึงสนับสนุนให้บัวเป็นพืชเศรษฐกิจสำคัญอย่างหนึ่งของประเทศ ทั้งนี้เม็ดบัวเป็นพืชที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงเหมาะแก่การนำมาผลิตเป็นอาหาร เพราะมีไขมันต่ำกว่าถั่วเหลือง ปริมาณโปรตีนและแคลเซียมมากกว่าข้าวโพด และเม็ดบัวยังเป็นส่วนประกอบหลักของไส้ขนมไหว้พระจันทร์ไส้ลูกบัวของโรงงานผลิตขนมไหว้พระจันทร์ต่างๆ สำหรับส่งขายทั่วประเทศ เช่น โรงงานขนมไหว้พระจันทร์ เอส แอนด์ พี เป็นต้น (จตุรงค์ และคณะ, 2558) โดยเม็ดบัวจะมีลักษณะกลมๆ รีๆ ภายในเป็นเนื้อสีขาวอมเหลืองให้รสชาติหวานมันอร่อย เม็ดบัวที่ได้มาจากดอกของบัวที่ได้รับการผสมแล้ว ซึ่งจะนำเม็ดบัวนี้ออกมาจากฝัก

2.1.2 คุณค่าทางอาหารของเม็ดบัว

เม็ดบัวมีสรรพคุณ บำรุงสายตา บำรุงไต รักษาอาการท้องร่วง บิดเรื้อรัง เม็ดบัวมีปริมาณสารอาหารที่สำคัญ คือ โปรตีน ประมาณ 23% ซึ่งสูงกว่าข้าวถึง 3 เท่า และเป็นแหล่งรวมธาตุอาหารหลายชนิดด้วยกัน ดังตารางที่ 2.1 และตารางที่ 2.2 และยังช่วยทำให้เลือดไหลเวียนในร่างกายได้สะดวก ช่วยบำรุงสมอง ช่วยให้นอนหลับได้ดีขึ้น

ตารางที่ 2.1 คุณค่าทางโภชนาการของเมล็ดบัว

คุณค่า	เปอร์เซ็นต์ (%)
เถ้า	4.50
ความชื้น	10.50
ไขมันดิบ	1.93
โปรตีน	10.60
คาร์โบไฮเดรต	72.17
เส้นใยดิบ	2.70
พลังงาน (cal/100 gm)	348.45

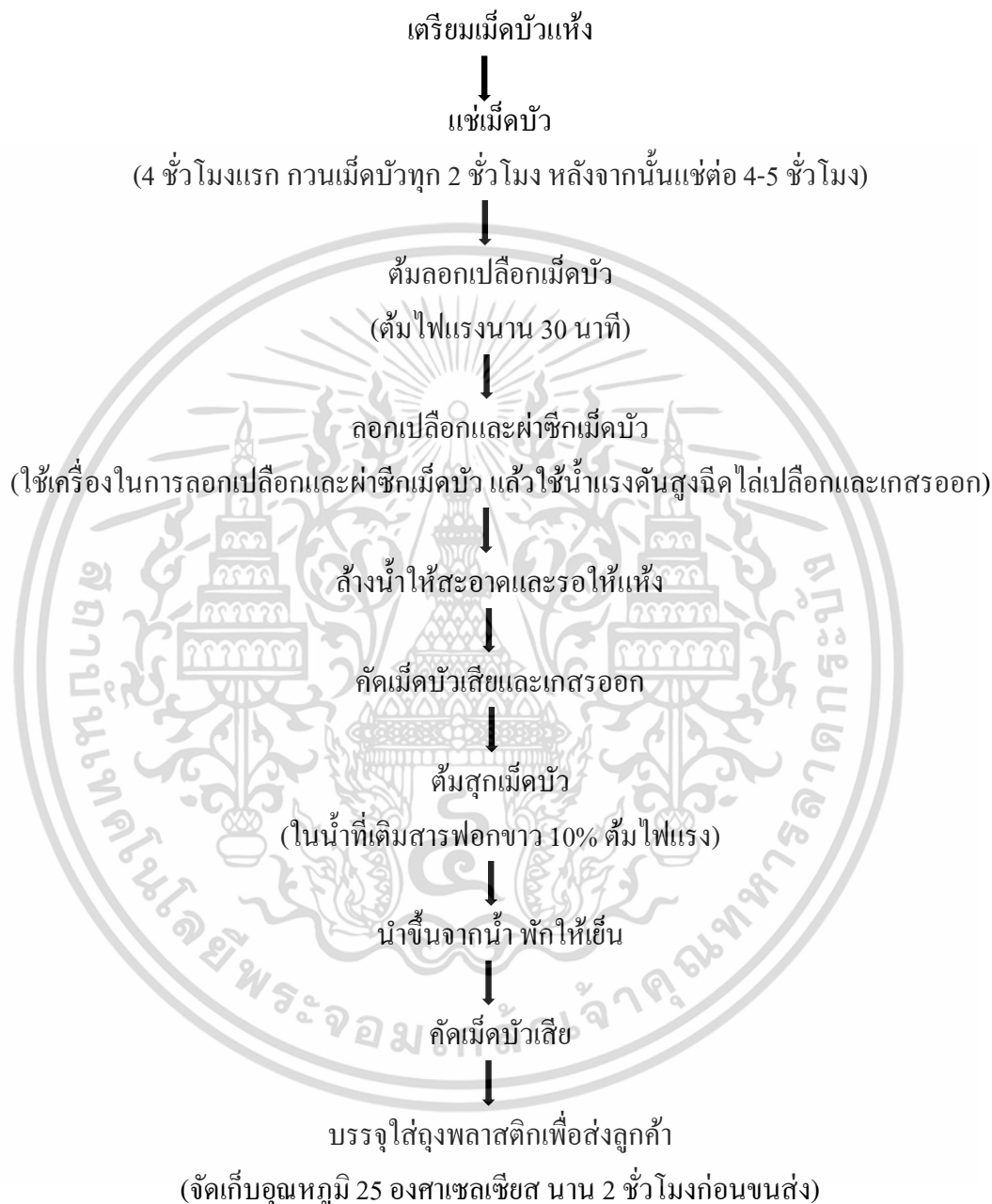
ตารางที่ 2.2 เปอร์เซ็นต์ความเข้มข้นของธาตุอาหารต่างๆ ที่พบในเมล็ดบัว

คุณค่า	เปอร์เซ็นต์ (%)
โครเมียม	0.0042
โซเดียม	1.00
โพแทสเซียม	28.5
แคลเซียม	22.10
แมกนีเซียม	9.20
ทองแดง	0.0463
สังกะสี	0.0840
แมงกานีส	0.356
เหล็ก	0.1990

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3 ขั้นตอนการผลิตเม็ดบัวต้ม

ขั้นตอนการผลิตเม็ดบัวต้ม เป็นไปตามผังกระบวนการผลิตเม็ดบัวต้ม (flow diagram) ดังภาพที่ 2.1



ภาพที่ 2.1 ผังกระบวนการผลิตเม็ดบัวต้ม

ที่มา : ร้านค้าผลิตเม็ดบัวต้มแห่งหนึ่งในจังหวัดกรุงเทพมหานคร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขั้นตอนการผลิตเม็ดบัวต้ม จะเริ่มจากนำวัตถุดิบคือเม็ดบัวตากแห้งที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส มาชั่งน้ำหนักตามที่กำหนด หลังจากนั้นนำมาแช่น้ำเพื่อให้เปลือกหลุดออกโดยใช้เวลา 4 ชั่วโมง จะต้องกวนเม็ดบัวให้จมน้ำจนทั่วทำทุก 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นแช่ในน้ำต่อประมาณ 4-5 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เทน้ำที่แช่ออกแล้วนำเม็ดบัวไปต้มเพื่อลอกเปลือก โดยใช้ไฟแรงในการต้ม และต้มเป็นเวลาประมาณ 30 นาที หรือจนกว่าเปลือกเม็ดบัวจะหลุดออกมา หลังจากนั้นนำเม็ดบัวที่ผ่านการต้มแล้ว มาเข้าเครื่องลอกเปลือกเม็ดบัว โดยขณะที่เครื่องทำงานจะมีการฉีดน้ำด้วยเครื่องฉีดแรงดันสูงเพื่อช่วยลอกเปลือกให้หลุดออก เมื่อลอกเปลือกแล้วนำเม็ดบัวไปล้างทำความสะอาดและคัดเอาเกสรและเมล็ดที่เสียออก หลังจากนั้นนำไปต้มเพื่อให้เม็ดบัวสุกในน้ำที่ผสมสารฟอกขาว 10% ต้มประมาณ 30 นาที หรือจนเม็ดบัวสุก เทน้ำออกและนำมาพักให้เย็นเพื่อรอการบรรจุ ขั้นตอนการบรรจุเมื่อเม็ดบัวได้อุณหภูมิประมาณ 25 องศาเซลเซียสจะเริ่มบรรจุลงถุงพลาสติก โดยน้ำหนักบรรจุตามที่ลูกค้ากำหนด หลังจากนั้นจะเริ่มขนส่ง ไปให้ลูกค้า ดังภาพที่ 2.1

2.1.4 ประโยชน์ของเม็ดบัว

เม็ดบัวนอกจากจะใช้รับประทานสดแล้วยังสามารถนำเม็ดบัวแห้งมาแปรรูปสำหรับการรับประทานได้อีก โดยการนำเม็ดบัวมาทำเป็นอาหารว่าง หรือทำเป็นอาหารคาวและหวาน เช่น นำไปตุ๋นกับหัวใจหมูหรือทำเป็นเม็ดบัวเชื่อม รวมทั้งนำไปทอดหรือคลุกกับเกล็ดรับประทาน (สุขภาพดี, 2560)

2.1.5 มาตรฐานผลิตภัณฑ์

เม็ดบัวต้มและไส้เม็ดบัวกวนใช้เกณฑ์มาตรฐานอ้างอิงเชื้อจุลินทรีย์ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 364) พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค กำหนดชนิดจุลินทรีย์และปริมาณที่พบในอาหาร และประกาศเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560) เรื่อง อาหารปรุงสุกหรืออาหารที่ผ่านกรรมวิธี ดังตารางที่ 2.3 และ 2.4

ตารางที่ 2.3 มาตรฐานจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค กำหนดชนิดจุลินทรีย์และปริมาณที่พบในอาหาร

ผลิตภัณฑ์	ชนิดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค	ปริมาณที่กำหนด
อาหารสำเร็จรูปพร้อมบริโภค ทันทีที่ทำจากธัญพืช หรือแป้ง ในส่วนประกอบหลัก	1. แซลโมเนลลา (<i>Salmonella</i> spp.)	ไม่พบใน 25 กรัม (g)
	2. สแตฟีโลค็อกคัส ออเรียส (<i>Staphylococcus aureus</i>)	ไม่พบใน 0.1 กรัม (g)
	3. แบซิลลัสซีเรียส (<i>Bacillus cereus</i>)	ไม่เกิน 100 ใน 1 กรัม (CFU/g)

ที่มา : ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 364) พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค กำหนดชนิดจุลินทรีย์และปริมาณที่พบในอาหาร

ตารางที่ 2.4 เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560) อาหารปรุงสุกหรืออาหารที่ผ่านกรรมวิธี

ขนมอบที่มีไส้หรือไม่มีไส้	
ขนมอบที่ไม่มีไส้หรือเติมไส้หรือส่วนผสมอื่นก่อนอบ เช่น ลูกก๊าก บิสกิต แครกเกอร์ เวเฟอร์ ขนมเปียะ ขนมโมจิ ขนมไหว้พระจันทร์ ขนมปัง และพาย เป็นต้น	
จำนวนจุลินทรีย์ CFU/กรัม	น้อยกว่า 1×10^4
จำนวนยีสต์และรา CFU/กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Escherichia coli</i> MPN/กรัม	น้อยกว่า 3
<i>Clostridium perfringens</i> CFU/กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Bacillus cereus</i> CFU/กรัม	น้อยกว่า 100
<i>Staphylococcus aureus</i> CFU/กรัม	น้อยกว่า 10
<i>Salmonella</i> spp. /25กรัม	ไม่พบ

ที่มา : ประกาศเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560) เรื่อง อาหารปรุงสุกหรืออาหารที่ผ่านกรรมวิธี

2.2 เชื้อบาซิลลัส ซีเรียส (*Bacillus cereus*)

2.2.1 ลักษณะทั่วไปของเชื้อ *B. cereus*

บาซิลลัสเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน มีความสามารถในการสร้างสปอร์ภายในเซลล์ เรียกว่าเอนโดสปอร์ซึ่งบาซิลลัสเป็นชนิดที่พบทั่วไปในดิน อากาศ ฝุ่นละออง ในพืช เช่น ผักต่างๆ ธัญพืช ถั่ว เครื่องเทศ สมุนไพร ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งในสภาพที่มีหรือไม่มีออกซิเจน อีกทั้งยังมีความสามารถในการสร้างสปอร์ ซึ่งมีสปอร์รูปรีอยู่กลางหรืออยู่ด้านขวาของเซลล์ (ellipsoidal center หรือ paracentral) นอกจากนี้ *B. cereus* ยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตั้งแต่ 10 – 50 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 28 – 35 องศาเซลเซียส ทำให้สามารถปรับตัวให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมที่สภาวะต่างๆ ได้ ตัวอย่างเช่นการศึกษาพบว่าสปอร์ของ *B. cereus* สามารถอยู่รอดได้ในอาหารแช่แข็งที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส นานกว่า 6 เดือน และยังพบว่าที่อุณหภูมิ 8°C สปอร์ของ *B. cereus* สามารถงอกออกมาเป็นเซลล์ได้ แต่เซลล์ที่งอกออกมาจะไม่สามารถเจริญหรือเพิ่มจำนวนต่อได้

2.2.2 สารพิษจากเชื้อ *B. cereus*

สารพิษที่เชื้อ *B. cereus* สร้างขึ้นมาเป็นสารประเภทเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ซึ่งแบ่งเป็น 2 ชนิด คือ diarrhea toxin ทำให้เกิดอาการท้องร่วง และ emetic toxin ทำให้เกิดอาการอาเจียน โดยทั่วไป *B. cereus* สามารถผลิตสารพิษที่ทำให้เกิดการเจ็บป่วยกับผู้บริโภคหรือทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ที่เซลล์ประมาณ 1×10^6 CFU/g และยังพบว่าการปนเปื้อนของ *B. cereus* ที่ปริมาณ $10^3 - 10^4$ CFU/g ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้เช่นกัน (Anderson et al., 1995) จากการสำรวจความสามารถในการสร้างสารพิษของ *B. cereus* พบว่า 74% ของ *B. cereus* จะสร้างสารพิษชนิด diarrhea toxin และ 5% จะสร้างสารพิษชนิด emetic toxin ดังนั้น *B. cereus* ส่วนใหญ่จึงทำให้เกิดอาการท้องร่วงได้มากกว่าอาการอาเจียน และอาการอาเจียน เกี่ยวข้องกับการกินอาหารจำพวกข้าวที่มีการปนเปื้อน โดยเมื่อมีการหุงข้าวเซลล์จะถูกทำลาย แต่สปอร์ยังอยู่และเมื่อข้าวที่หุงแล้วไม่ได้ถูกเก็บแช่เย็นส่งผลให้สปอร์ของเชื้อเจริญงอกออกมา และสร้างสารพิษทำให้เกิดการอาเจียนที่ทนความร้อนและเมื่อนำไปอุ่นซ้ำสารพิษไม่ถูกทำลาย โดยการเกิดโรคอาหารเป็นพิษนี้ เรียกว่า “Chinese Restaurant Syndrome” ผู้ป่วยจะคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องท้องร่วง และอาการจะมีอยู่ประมาณ 6-24 ชั่วโมง (บุญศรี จงเสรีจิตต์, 2552)

2.2.3 อาหารที่พบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus*

B. cereus สามารถพบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมเนื่องจากเชื้อสามารถสร้างเอนโดสปอร์จึงทนต่อสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้และสามารถแยกเชื้อได้จากดิน น้ำและอากาศ รวมไปถึงจนถึงวัตถุดิบต่างๆ ที่มาจากพืชและสัตว์ ในส่วนการปนเปื้อนในอาหารมักพบในผลิตภัณฑ์นม เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ข้าว ผักพร้อมบริโภคและกลุ่มเครื่องเทศ จากการสำรวจพบเชื้อ *B. cereus* ในผลิตภัณฑ์ต่างๆ ดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 การสำรวจผลิตภัณฑ์อาหารที่ตรวจพบเชื้อ *B. cereus*

ผลิตภัณฑ์อาหาร	เปอร์เซ็นต์ (%) ที่ตรวจพบ	ประเทศที่พบ
ข้าวและผลิตภัณฑ์จากข้าว	28.5	อินเดีย
ข้าวต้ม	100	อินเดีย
ผลิตภัณฑ์นม	100	อินเดีย
ผลิตภัณฑ์เนื้อและไก่	80	อินเดีย
เนื้อควาย	35	อินเดีย
อาหารเหลวพร้อมบริโภค	83	สหราชอาณาจักร
นมผงสำหรับทารก	75	สหราชอาณาจักร
นมผงไร้อิมัน	100	สหราชอาณาจักร
นมผงที่สกัดเอาไขมันออก	10.3	ญี่ปุ่น
ชีสเหลว	69	เวเนซุเอลา
ตัวอย่างเมล็ดพืช	67.3	สหราชอาณาจักร
ผลิตภัณฑ์สัตว์ปีก	6.9	อังกฤษ
ตัวอย่างอาหารหลากหลาย	14.7 (เซลล์)	
ชนิด		สเปน
จากตลาดสดของสเปน	82.4 (สปอร์)	
ตัวอย่างนมเป้	16	เนเธอร์แลนด์
เนื้อดิบ	7.9	ญี่ปุ่น
เนื้อหมู	4.4	ญี่ปุ่น
เนื้อไก่	7.2	ญี่ปุ่น
แฮม	3.8	ญี่ปุ่น
ไส้กรอก	14.9	ญี่ปุ่น

ที่มา: Rajkowski and Smith (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การควบคุมป้องกันการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus*

การป้องกันการปนเปื้อนของอาหารจากเชื้อ *B. cereus* ทำได้โดยการป้องกันการงอกของสปอร์และลดการเจริญของเซลล์ให้มีจำนวนน้อยที่สุด ดังนั้นการปรุงอาหารควรใช้อุณหภูมิมากกว่า 60 องศาเซลเซียส และเมื่อปรุงอาหารเสร็จแล้วต้องทำให้อาหารมีอุณหภูมิต่ำกว่า 7 องศาเซลเซียสอย่างรวดเร็ว สำหรับการอุ่นอาหารควรที่จะใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมเพื่อไม่ให้เชื้อเจริญได้

2.3 สารแบคทีริโอซิน (Bacteriocin)

2.3.1 ความหมายของสารแบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซิน พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1925 ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *E. coli* V (*E. coli* CA7) สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* (*E. coli* CA81) โดยผลิตสารที่เรียกว่า colicins ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเป็นสารอินทรีย์ประเภทโพลีเปปไทด์ (polypeptide) เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว โดยแบคทีริโอซินต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotics) ตรงที่แบคทีริโอซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน โดยแบคทีริโอซินสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกหลายสปีชีส์ แต่แบคทีริโอซินที่สร้างจากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกนั้นได้รับความสนใจมากที่สุด ซึ่งส่วนใหญ่แยกได้จากอาหาร ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในกระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งแบคทีเรียแลคติกบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้าง ทำให้การนำแบคทีริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้สารเคมี เนื่องจากมีความปลอดภัย (อรอนงค์ พริ้งสุลละ, 2550)

2.3.2 การจำแนกสารแบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซินถูกสร้างมาจากไรโบโซม (ribosomally synthesized) และเป็นเมแทบอไลต์ทุติยภูมิ (secondary metabolites) (Hurst, 1981) ปัจจุบันมีการจัดจำแนกแบคทีริโอซินเป็น 4 class ดังตารางที่ 2.6 ซึ่งส่วนใหญ่มักพบจัดอยู่ใน class I และ class II (Klaenhammer, 1993)

ตารางที่ 2.6 การจัดจำแนก class ของแบคทีเรียโอซิน

การจัดจำแนก	ลักษณะของแบคทีเรียโอซิน
Class I	Lantibiotics (<5 กิโลดาลตัน)
Class II	Small (<10 กิโลดาลตัน) เปปไทด์ที่ไม่ผ่านการตัดแปลง, ปานกลาง (100°C) ทนความร้อนสูงกว่า (120°C)
Class III	Large (>30 กิโลดาลตัน) โปรตีนที่ไม่ทนความร้อน
Class IV	องค์ประกอบของแบคทีเรียโอซิน : โปรตีน ไขมัน และ/หรือ คาร์โบไฮเดรต

ที่มา : Klaenhammer (1993)

Class I

แบคทีเรียโอซินชนิด class I มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 KDa) หลังจากผ่านกระบวนการแปรรหัสแล้วจะเข้าร่วมตัวกับกรดอะมิโนแลนไธโอนีน (Lanthionine; Lan) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีซัลโฟเอเทอร์ (thioether) อยู่ในโมเลกุล และเมทิลแลนไธโอนีน (Methylanthionine; MeLan) ซึ่งบางครั้งจะเรียก class I นี้ว่าแลนติไบโอติก (Lantibiotics) แบ่งออกเป็น 2 type หรือ 2 subclass โดยอาศัยความคล้ายคลึงกันทางโครงสร้างดังนี้

Type A หรือ subclass Ia

โครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่มีประจุบวก มีสายยาว ไม่คงรูป โดยออกฤทธิ์ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียบางสปีชีส์ ตัวอย่างเช่น ไนซิน

Type B หรือ subclass Ib

โครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่เป็นก้อน (globular) ซึ่งคงรูป และมีประจุลบหรือไม่มีประจุ มีฤทธิ์ในการรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่จำเป็นต่อเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียบางชนิด ตัวอย่างเช่น เมอซาซิดิน (Mersacidin) ซึ่งออกฤทธิ์รบกวนการสร้างผนังเซลล์ โดยเข้าจับกับสารตั้งต้นในการสร้างเปปติโดไกลแคน (Peptidoglycan) ทำให้แบคทีเรียไม่สามารถสร้างผนังเซลล์ได้

Class II

มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 KDa) แต่ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไธโอนีน ที่พบมากมี 2 subclass ดังนี้

Subclass Ia มีชื่อว่า Pediocin-like (หรือเรียกว่า Listeria-active) เป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้ดี ตัวอย่างแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ได้แก่ Pediocin AcH, Pediocin PA1, Mesentericin Y105, Enteriocin A และ Sakacin P เป็นต้น (Tichaczek et al., 1992) แบคทีเรียโอซิน ในกลุ่มนี้ที่มีการศึกษามากที่สุด คือ Pediocin AcH/PA1 สารที่อยู่ในกลุ่มนี้มีความคล้ายคลึงกันทางลำดับของกรดอะมิโน 40-60% โดยบริเวณ N-terminal ของโครงสร้าง จะมีลำดับของกรดอะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น เมื่อผู้ใดเห็นประโยชน์ในการนำเอกสารนี้ไปใช้โดยไม่ได้รับอนุญาตจากเจ้าของเอกสาร กรุณาแจ้งเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มิโนเป็น YNGVXCXXXXCXV หรือเรียกว่า pediocin box ต่อกับกรดอะมิโนซิสเตอีน 2 ตัว ด้วยพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bridge) เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน โดยจะยับยั้งเฉพาะเชื้อ *Listeria* เท่านั้น แต่มีข้อจำกัดคือไม่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ในอาหาร (Ennahar et al., 1999)

Subclass IIb เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 ชนิดที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน ถ้าเหลือเพียงตัวเดียวมักจะไม่มีแอกติวิตีหรือแอกติวิตีเหลือน้อย ตัวอย่างกลุ่มนี้คือ แลคตาซินเอฟ (Lactacin F) และแลคโตคอกซินจี (Lactococcin G)

Subclass IIc (Sec-dependent bacteriocin) เช่น อะซิโดซิน บี (Acidocin B) ไดเวอจีซิน เอ (Divergicin A) แบคทีเรียโอซิน 31 และเอนเทอโรซิน พี (Enterocin P)

Subclass IIc จะมีลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างจาก subclass อื่นๆ เช่น แลคโตคอกซินเอและ บี (Lactococcin A&B) ไดอะเซทิน บี (Diacetin B) อะซิโดซิน 8912 (Acidocin 8912) เป็นต้น

Class III

ประกอบด้วยแบคทีเรียโอซินขนาดใหญ่ ไม่ทนความร้อน แตกต่างจาก Class I และ II เช่น เฮลเวติซิน เจ (Helveticin J) และเอนเทอโรไลซิน เอ (Enterolysin A)

Class IV

แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะมีหมู่กลูซิติก (Glucidic) และ/หรือลิปิดในโครงสร้างด้วย นอกเหนือจากส่วนที่เป็นโพรตีน เช่น ลิวโคซิน เอส (Leucocin S) และโตซิน 27 ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโพรตีนในโครงสร้าง หรือมีเมเซนเทอโรซิน 52 (Mesenterocin 52) โดยจะพบส่วนของลิโปโพรตีนในโครงสร้าง เป็นต้น

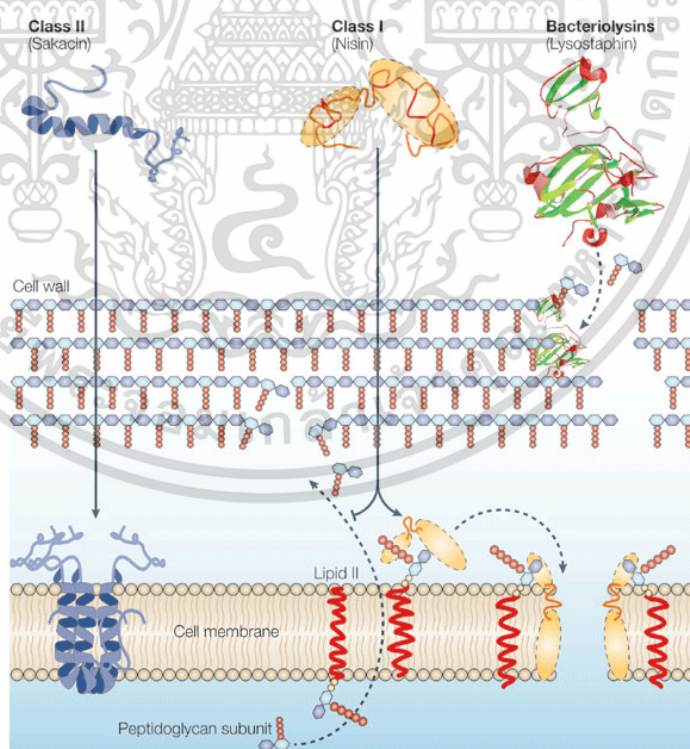
2.3.3 กลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารแบคทีเรียโอซิน

โดยทั่วไปแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน (narrow spectrum) จำพวกแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Clostridium* และ *Staphylococcus* (Noonpakdee et al., 2003) แต่ไม่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ข้ามสายพันธุ์ได้ โดยในการยับยั้งนั้นแบคทีเรียโอซินจะจับกันระหว่างความเป็นไฮโดรโฟบิก ของโมเลกุลแบคทีเรียโอซินกับผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ในแบคทีเรียแกรมลบผนังเซลล์จะเป็นองค์ประกอบของลิโปโพลีแซคคาไรด์ ทำให้แบคทีเรียโอซินไม่สามารถจับกับผนังเซลล์ได้ แต่อย่างไรก็ตาม พบว่าการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างสายพันธุ์ (broad spectrum) ก็เกิดขึ้นได้ โดยเกิดกระบวนการทำลายลิโปโพลีแซคคาไรด์บนผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย เช่น ทำให้แบคทีเรียอยู่ในรูปเปลือก (spheroplast form) ซึ่งจะถูกละลายได้ง่ายโดยเอนไซม์ย่อยผนังเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Hydrolytic enzyme) (วิไลลักษณ์, 2554) ให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ในหมู่ฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ภาพที่ 2.2 (Muriana, 1996 : Ennaher et. al., 2000) โดยกลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียโอซิน เช่น colicins ที่ผลิตจาก *E. coli* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ โดยกลไกการทำลายเซลล์จะแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ (Schaller et. al., 1981)

1. บริเวณตรงกลางของโมเลกุล colicins ทำหน้าที่ในการจับกับตำแหน่งจำเพาะบนผิวเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย
2. บริเวณปลายด้าน N (N-terminal) ทำหน้าที่เคลื่อนย้ายโมเลกุลของ colicins ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย
3. บริเวณปลายด้าน C (C-terminal) ทำหน้าที่ในการทำลายเซลล์เป้าหมาย (McCormick et. al., 1999) ทำให้เซลล์เป้าหมายของ colicins ตาย โดยเกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่ว และทำให้เกิดการสูญเสียแรงในการขับเคลื่อนโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์เป้าหมายเกิดการเสียรูปทรง



ภาพที่ 2.2 ผลของแบคทีเรียโอซินต่อผนังเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์

ที่มา : Damian and Anna (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.4 การใช้สารแบคทีเรียโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

แบคทีเรียโอซินสามารถนำไปใช้ในการปรับปรุงความปลอดภัยในอาหาร เพื่อลดการเจ็บป่วยจากอาหารเป็นพิษ โดยแบคทีเรียโอซินที่เข้ามาจับกับอาหารอย่างน้อย 3 ทางในการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร คือ การใช้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์หรือทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเดิมเป็นส่วนประกอบหนึ่งในอาหาร การใช้สายพันธุ์ของเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินผสมเป็นส่วนประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร หรือการใช้สายพันธุ์ที่สร้างแบคทีเรียโอซินแทนสายพันธุ์เดิมที่ใช้เป็นสารตั้งต้นในอาหาร (Deegan et al., 2006) จากการศึกษาของ Todorov (2009) ซึ่งใช้สารแบคทีเรียโอซินเพื่อยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม *Lb. plantarum* ที่ได้จากเนื้อปลา, ผลไม้, ผัก, นมและผลิตภัณฑ์ชีส พบว่าสาร plantaricins หลายชนิดที่เชื้อ *Lb. plantarum* สร้างขึ้นนั้น มีคุณลักษณะและลำดับกรดอะมิโนที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังมีการจำแนกคุณลักษณะทางพันธุกรรมรวมถึงรูปแบบการทำงานที่เหมาะสมของแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิด เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย *Lb. plantarum* ซึ่งมีการศึกษาและนำไปใช้ในอุตสาหกรรม

Swetwathana and Lotong (1999) ทำการคัดแยกเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินจากตัวอย่างแฮม เพื่อใช้เป็นกล้ำเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักแฮม และเพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อซัลโมเนลลาที่เป็นปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์แฮม จากงานวิจัยพบว่า ได้เชื้อกลุ่มที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้หลายสายพันธุ์ แต่สายพันธุ์ที่น่าสนใจคือ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นเชื้อที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ชื่อว่า pediocin PA-1 ดังนั้น จึงได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพในการใช้เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็นกล้ำเชื้อหมักแฮมเทียบกับแฮมที่หมักโดยธรรมชาติ รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งและทำลายเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *S. anatum* จากการทดลองดังกล่าวทำให้เชื่อมั่นว่าเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 น่าจะเป็นทางเลือกที่จะใช้เป็นกล้ำเชื้อในการหมักแฮม เพื่อช่วยพัฒนาคุณภาพของแฮมให้คงที่ในด้านรสชาติ และลักษณะของเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์รวมถึงความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรค

Arief et al. (2017) ศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่แยกได้จากแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantarum* IAA-1A5 ที่ส่งผลต่อคุณภาพของไส้กรอกเนื้อ โดยทำการศึกษาคูณสมบัติทางเคมีของเชื้อจุลินทรีย์ และลักษณะทางประสาทสัมผัส เปรียบเทียบกับตัวอย่าง 3 กลุ่มคือ ไส้กรอกเนื้อ (control), ไส้กรอกเนื้อ + ไนไตรท 0.3%, ไส้กรอกเนื้อ + แบคทีเรียโอซิน 0.3%

พบว่า การใช้ plantaricin IAA-1A5 ที่ผลิตโดย *Lb. plantarum* IAA-1A5 สามารถยับยั้งการเจริญของเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* ที่พบในไส้กรอกเนื้อหลังการเก็บรักษา 6 วันได้ และสามารถนำมาใช้เป็นสารกันเสียทางธรรมชาติแทนการเติมไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์ได้อีกด้วย

ปัญหาที่พบในการใช้แบคทีเรียโอซินเป็นสารกันเสีย คือ พบการดื้อต่อแบคทีเรียโอซิน ซึ่ง แก้ไข โดยการใช้เชื้อตั้งต้นที่สร้างแบคทีเรียโอซินหลายสายพันธุ์ (Rogers et al., 1928) และปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้นุพันธ์ของแบคทีเรียโอซินที่ได้รับการปรับปรุงทางพันธุวิศวกรรมมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ซึ่งเป็นการเพิ่มความเสถียร และเพิ่มการสร้างแบคทีเรียโอซินให้มากขึ้น รวมทั้งช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ (Yuan et al., 2004)

2.3.5 สารแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

2.3.5.1 แบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KL-1

Rumjuankiat et al. (2015) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และการกำหนดคุณสมบัติของ plantaricin KL-1Y ที่ได้จากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. plantarum* KL-1Y มีความสามารถในการยับยั้ง *B. cereus* JCM 2125^T ได้ โดยแสดง กิจกรรมในการยับยั้งที่ 800 AU/ml

ขั้นตอนการเตรียมสารแบคทีเรียโอซิน เริ่มจากการเลี้ยงเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 ในอาหาร MSR broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8800 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์มี 3 ขั้นตอน โดยขั้นที่ 1 คือ การดูดซับด้วย Amberlite XAD-16 resin, อะซิโตน หรือ แอมมีเนียมซัลเฟต ขั้นตอนที่ 2 การทำให้บริสุทธิ์ด้วย โครมาโตกราฟี ขั้นตอนที่ 3 คือการกลั่นเฟสด้วย HPLC เมื่อครบทั้ง 3 ขั้นตอนจะได้ออกมาเป็นสารแบคทีเรียโอซินที่มีความบริสุทธิ์

นำสารแบคทีเรียโอซินไปทดสอบการทนความเป็นกรด-ด่าง (pH) และการทนความร้อน โดยทำการทดสอบที่ pH 2.0, 4.0, 6.0, 8.0, 10.0 และ 12.0 โดยให้ความร้อนที่ 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาทดสอบหากิจกรรมการยับยั้งด้วยวิธี spot-on-lawn กับเชื้อกลุ่มแกรมบวกและแกรมลบผลที่ได้คือ สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y สามารถทนความร้อนและที่ pH 4.0 ได้ โดยยังมีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ 100% ทุกอุณหภูมิที่ทดสอบ ดังตารางที่ 2. 7

หลังจากนั้นนำสาร KL-1Y ไปทดสอบเปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 6 เชื้อกับสารโนซินทางการค้า Nisaplin พบว่า สาร plantaricin KL-1Y สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* JCM 2152^T ได้ที่ 800 AU/ml และยังสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารกลุ่มอื่นได้ ดังตารางที่ 2.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.7 ช่วง pH 2 - 12 และความร้อน ต่อกิจกรรมของสาร KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KL-1

pH	Relative activity of KL-1Y (%)			
	C	80°C	100°C	121°C
2	100	50	50	12.5
4	100	100	100	100
6	100	100	100	50
8	100	50	50	50
10	100	50	50	6.25
12	50	50	50	0

หมายเหตุ : C คือ ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ที่มา : Rumjuankiat et al. (2015)

ตารางที่ 2.8 กิจกรรมการยับยั้งของไนซิน (Nisaplin) และ plantaricin KL-1Y

Indicator strain	Nisaplin (104 IU; AU/ml)	plantaricin KL-1Y (AU/ml)
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T (control)	102,400	102,400
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	200	200
<i>Bacillus cereus</i> JCM 2152 ^T	800	800
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090 ^T	0	1600
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR 118	0	800
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	0	400
<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	0	400

ที่มา : Rumjuankiat et al. (2015)

2.3.5.2 แบคทีเรียโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* KL-D4

Therdtatha et al. (2016) ได้ศึกษาลักษณะของสารต้านจุลชีพจาก *Lb. salivarius* KL-D4 และการประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียจากธรรมชาติสำหรับไอศกรีม พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* KL-D4 มีความสามารถในการยับยั้ง *B. cereus* JCM 2152 ได้ โดยแสดงกิจกรรมในการยับยั้งที่ 3,200 AU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยขั้นตอนการเตรียมสารแบคทีเรียโอซิน เริ่มจากการเลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* KL-D4 ในอาหาร MSR broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 – 18 ชั่วโมง พร้อมทั้งมีการเขย่าตลอดเวลา หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4400 x g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จะได้สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์มี 3 ขั้นตอน โดยขั้นที่ 1 คือ ตกตะกอนด้วยแอมมีเนียมซัลเฟต ขั้นตอนที่ 2 การทำให้บริสุทธิ์ด้วย โครมาโตกราฟี ขั้นตอนที่ 3 คือการกลั่นเฟสด้วย High Performance Liquid Chromatography (HPLC) เมื่อครบทั้ง 3 ขั้นตอนจะได้ออกมาเป็นสารแบคทีเรียโอซินที่มีความบริสุทธิ์

นำสารแบคทีเรียโอซินไปทดสอบการทนความเป็นกรด-ด่าง (pH) และการทนความร้อน โดยทำการทดสอบที่ pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0 และ 10.0 โดยให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำมาทดสอบหากิจกรรมการยับยั้งด้วยเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T ด้วยวิธี spot-on-lawn ผลที่ได้คือ สารแบคทีเรียโอซิน D4 กิจกรรมการยับยั้งที่ 25,600 AU/ml ที่ pH 5.5-7.0 เมื่อ pH เพิ่มขึ้น ค่ากิจกรรมจะลดลง ดังตารางที่ 2.9

หลังจากนั้นนำสาร D4 ไปทดสอบเปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 17 สายพันธุ์ มีทั้งจุลินทรีย์แกรมบวกและแกรมลบ พบว่า สาร D4 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T ได้ที่ 25,600 AU/ml และเชื้อ *B. cereus* JCM 2152^T ได้ที่ 800 AU/ml แต่พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus coagulans* TISTR1447 ได้

การประยุกต์ใช้ในการยับยั้งการปนเปื้อนในไส้ครีม โดยใช้สาร salivarin KLD ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วย แอมโมเนียมซัลเฟต 20% โดยการนำมาใช้ที่ความเข้มข้น 5% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Pseudomonas* sp., *P. stutzeri*, *Stenotrophomonas* sp., *E. faecalis* และมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อที่ต่ำกว่าเชื้อ *B. cereus*, *Staphylococcus epidermidis* และ *Staphylococcus hominis*

ตารางที่ 2.9 กิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* jcm1157^T ของสารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ภายใต้สภาวะต่างๆ

Treatment	Activity (AU/ml)
Enzymatic stability	
Control	12,800
Protenase K pH 8.0	0
Pepsin pH 3.0	0
Trysin pH 8.5	0
α -chymotrypsin pH 8.0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารต้นฉบับที่จัดทำขึ้นเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Treatment	Activity (AU/ml)
Actinase E pH 7.0	0
α -amylase pH 7.0	12,800
Lipase pH 7.0	12,800
Heat stability	
100°C for 5 min, pH 5.5	25,600
100°C for 30 min, pH 5.5	25,600
121°C for 15 min, pH 5.5	25,600
pH stability	
pH 3.0	12,800
pH 4.0	12,800
pH 5.0	12,800
pH 5.5	25,600
pH 6.0	25,600
pH 7.0	25,600
pH 8.0	12,800
pH 9.0	12,800
pH 10.0	12,800

ที่มา : Therdtatha et al. (2016)

2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.4.1 การศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

Abriouel et al. (2001) ได้ศึกษาการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การผลิตเอนเทอโรทอกซิน และการเจริญของสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* โดยแบคทีเรียโอซิน AS-48 ซึ่งแบคทีเรียโอซิน AS-48 มีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่สูงในสายพันธุ์ mesophilic และ psychrotrophic ของ *B. cereus* ในช่วง pH ที่กว้าง การเจริญของแบคทีเรียและการผลิตสารเอนเทอโรทอกซิน โดยสายพันธุ์ LWL1 จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ที่ความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน 7.5 $\mu\text{g/ml}$ ยังสามารถชะลอการงอกของสปอร์ได้

Rosland et al. (2003) ได้ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ด้วยเชื้อ *Lactobacillus* และ *Lactococcus* ในนม ซึ่งการเจริญ การตาย หรือการอยู่รอด ของเชื้อ *B. cereus* ในนมพร้อมมันเนยที่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก 18 สายพันธุ์ พบว่ามีเชื้อ *B. cereus* เพียงอย่างเดียวในนมปริมาณเชื้อ $10^7 - 10^8$ CFU/ml เมื่อนำเชื้อ *B. cereus* มาหมักร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus* หรือเชื้อ *Lactococcus* ที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส หลังจากหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อ *B. cereus* ได้ในช่วงระหว่าง <10 CFU/ml และประมาณ 10^6 CFU/ml โดยการยับยั้งขึ้นอยู่กับสภาวะการหมักที่ต่างกัน โดย *Lactococcus* สามารถลด pH ลงเหลือ 5.3 หรือต่ำกว่าในเวลา 7 ชั่วโมง และหลังผ่านไป 24 ชั่วโมง ไม่พบเชื้อ *B. cereus* ในตัวอย่างนมที่หมักด้วย *Lactococcus* ส่วนเชื้อ *Lactobacillus* หลักเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจไม่พบเชื้อ *B. cereus* 4 จาก 12 สายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus* และเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์อื่นๆยังยับยั้งเชื้อ *B. cereus* แต่มีปริมาณเชื้อที่เหลือ $10^4 - 10^6$ CFU/ml และ pH จะลดลงอย่างช้าหลังจากเวลา 72 ชั่วโมง และการอยู่รอดของเชื้อ *B. cereus* ยังเชื่อมโยงกับปริมาณการสร้างเอนโคสปอร์ของเชื้อ ดังนั้นการผลิตกรดที่มีค่า pH ลดลง โดยเฉพาะอย่างยิ่งอัตราเริ่มต้นของการลดค่า pH สำคัญที่สุดในการควบคุมเชื้อ *B. cereus* ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติก

Lv et al. (2018) ได้ศึกษากลไกการทำให้บริสุทธิ์คุณสมบัติและการทำงานของ plantaricin JY22 ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. plantarum* JY22 ที่แยกได้จากลำไส้ปลาจาระโกส สาร plantaricin JY22 ถูกทำให้บริสุทธิ์โดยใช้การสกัดด้วยเอทิลอะซิเตตและการกรองแบบเจลน้ำหนักโมเลกุลอยู่ที่ประมาณ 4.1 kDa โดยการวิเคราะห์ Sodium Dodecyl Sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ลำดับกรดอะมิโนบางส่วนของ plantaricin JY22 คือ DFGFDIPDEV มีความเสถียรทางความร้อนสูงและยังคงทำงานในช่วง pH ตั้งแต่ 2.5 ถึง 5.5 แต่มีความไวต่อโปรติเอส สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้จากการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดระบุว่าทำลายเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ได้ นอกจากนี้ Plantaricin JY22 ยังทำลายความสมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ จากการวิเคราะห์การรั่วไหลของอิเล็กโทรไลต์ การสูญเสีย $\text{Na}^+ \text{K}^+ \text{-ATP}$, AKP , กรดนิวคลีอิก แสดงให้เห็นว่า plantaricin JY22 มีผลต่อโปรตีนของแบคทีเรีย

2.4.2 การประยุกต์ใช้สารแบคทีริโอซิน

เนื่องจากแบคทีริโอซินได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัยและใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมในปัจจุบันมีสารแบคทีริโอซินที่ใช้ในเชิงการค้าคือ ไนซินซึ่งได้รับการยอมรับด้านความปลอดภัยจาก Food and Drug Administration (FDA) และ World Health Organization (WHO) ซึ่งปัจจุบันการใช้แบคทีริโอซินนั้นถูกนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่มเป็นส่วนใหญ่มีทั้งการใช้แบบสารสกัดและแบบชนิดเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงไปในการผลิตทันทีแล้วให้เชื้อสร้างสร้างแบคทีริโอซินขึ้นมาเพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มเป้าหมาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาลัยพร ศรีวิระ (2551) ได้ศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์และสารสกัดโรสแมรี่ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และทางเคมีกายภาพของลูกชิ้นไก่ โดยวิเคราะห์การเจริญของจุลินทรีย์ ความเป็นกรดค่า การเกิดออกซิเดชัน และเนื้อสัมผัสของลูกชิ้นไก่ขณะเก็บรักษา เก็บเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่จำนวนมาก (dominant flora) แยกและจำแนกได้ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *S. saprophyticus* (ประชากร 12%) และ *Bacillus* spp. PN-3 (ประชากร 85%) ใช้เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกพร้อมกับเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก (*S. aureus* TISTR 118, *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687 และ *B. subtilis* TISTR 008) เป็นเชื้อแบคทีเรียทดสอบ เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคทีเรียโอซินจาก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* TISTR 1401, *Lb. acidophilus* TISTR 1338, *Pediococcus acidilactici* TISTR 425, *P. acidilactici* TISTR 424 และ *P. acidilactici* TISTR 051 พบว่า สายพันธุ์ที่ผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากลูกชิ้นไก่ได้ดีที่สุดคือ *Lc. lactis* TISTR 1401 สารแบคทีเรียโอซินผลิตได้จากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติม 2% yeast extract, 2% glucose และ 2% meat extract มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus* spp. PN-3 เฉลี่ยเท่ากับ 5,333.3 AU/ml มีความเสถียรต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 20 นาที และมีความเสถียรที่ pH 2-8 นอกจากนี้สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ชนิดเข้มข้นเหลว (concentrated crude bacteriocins, CCB) และชนิดผงแห้ง (freeze-dried crude bacteriocins, FDCB) มีประสิทธิภาพการยับยั้งเฉลี่ยเท่ากับ 3,200 และ 6,400 AU/ml ตามลำดับ

Phongphakdee and Nitisinprasert (2015) ได้ศึกษา activity ของโนซินและเอทานอลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแบคทีเรียแกรมลบ และการประยุกต์ใช้เป็นสารฆ่าเชื้อ พบว่าการใช้โนซินอย่างเดียวไม่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบได้ยกเว้นจะใช้ร่วมกับสารอินทรีย์ที่จับกับแร่ธาตุประจุบวก EDTA หรือ กรดอินทรีย์ โดยการวิจัยนี้จะศึกษาการอยู่รอดของ *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium TISTR 292 และ *Sal. Enteritidis* DMST 17368 หลังจากทดสอบ โนซินที่ความเข้มข้น 100, 200, 300, 500, 800 หรือ 1000 IU/ml และเอทานอลที่ความเข้มข้น 10, 20, 30, 50 หรือ 70% (v/v) โดยทดสอบแบบเดี่ยวและนำมาใช้ร่วมกัน พบว่าความเข้มข้นที่ไม่มีโนซินสามารถลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป้าหมายได้ แต่อย่างไรก็ตามการใช้ทั้งสองส่วนผสมกันที่โนซิน 500, 800 หรือ 1000 IU/ml และ 20% เอทานอล พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 15 นาที สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ลงไปได้ 1 log CFU/ml ดังนั้นความเข้มข้นต่ำสุดของโนซินและเอทานอลที่สามารถยับยั้งได้คือ 500 IU/ml และ 20% (v/v) ตามลำดับ จากผลการทดลองแนะนำว่าการใช้ โนซินร่วมกับเอทานอล อาจจะเป็นประโยชน์สำหรับอุตสาหกรรมอาหารในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* O157:H7 และ *Salmonella* sp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Syaputri และ Iwahashi (2020) ได้รายงานคุณสมบัติที่แตกต่างกันของสาร plantaricin จากเชื้อ *Lb. plantarum* และในอนาคตใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร ว่า plantaricin เป็นแบคทีเรีย class II ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่กว้างมาก ซึ่งกลไกการฆ่าเชื้อที่พบคือการการยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ และยับยั้งการสร้างโปรตีน หรือกรดนิวคลีอิก โดยมีการประยุกต์ใช้สาร plantaricin ดังนี้ การใช้เป็นสารกันเสียทางธรรมชาติในผลิตภัณฑ์เนื้อดิบ อาหารทะเล และผลิตภัณฑ์จากนม โดยมีการรายงานว่า *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* และ *Clostridium botulinum* เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และมีรายงานว่า plantaricin มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียเหล่านี้ และ plantaricin ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ เป็นสารที่ทนความร้อนและมีฤทธิ์ของสารปฏิชีวนะและรายงานว่าสามารถย่อยสลายง่ายโดยเอนไซม์โปรตีโอไลติกเพราะเป็นโปรตีนทางธรรมชาติ มีการทดสอบความเข้มข้นของสาร plantaricin ในหนูที่ปริมาณ 5,000 มก./กก. ของน้ำหนักตัวหนู พบว่าไม่ส่งผลกระทบต่อระดับของเม็ดเลือดขาว เม็ดเลือดแดง เฮโมโกลบิน เกล็ดเลือด แม้ว่าการใช้ plantaricin จะปลอดภัยกับมนุษย์ แต่ก็ยังไม่สามารถใช้ในระดับอุตสาหกรรมได้ เพราะสามารถฆ่าและยับยั้งได้เฉพาะสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องอย่างใกล้ชิด และการใช้เป็นสารกันเสียทางธรรมชาติในวัตถุดิบจากพืช แบคทีเรีย class II ที่ทดสอบเป็นส่วนหนึ่งของสารเคลือบที่รับประทานได้ซึ่งอาจลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์และการสลายตัวในผลไม้ที่เน่าเสียง่าย ซึ่งช่วยปรับปรุงอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์และรูปลักษณะในเชิงพาณิชย์แบคทีเรีย class II ที่อุดมด้วยคาร์บอกซิเมทิลเซลลูโลส 0.5% มีรายงานว่ามีประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บของสตอเบอรี่สด และมีรายงานว่าทำให้บริสุทธิ์บางส่วน of plantaricin Gt2 จาก *Lb. plantarum* UTNGt2 ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของ *E. coli* ทำให้เกิดการปลดปล่อย β -galactosidase และการรั่วไหลของโมเลกุล DNA/RNA ตามด้วยการตายของเซลล์ ซึ่งเผยให้เห็นโหมดการสลายแบคทีเรีย plantaricin Gt2 คล้ายกับ plantaricin W ซึ่งมีความเสถียรที่ pH 2–10 และมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อ *Salmonella* และ *E. coli* ในร่างกายมนุษย์ โดยเทคโนโลยีการเคลือบนี้ ยังไม่ได้นำมาใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผักและผลไม้โดยการฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่เน่าเสีย วิธีนี้จะช่วยยืดอายุการเก็บและจำหน่ายผลไม้โดยไม่ใช้สารกันบูดที่เป็นอันตราย เพื่อให้ทุกคนรู้สึกได้ถึงคุณภาพ ประโยชน์เหล่านี้ โดยไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ plantaricins เหล่านี้สามารถใช้เป็นผลิตภัณฑ์เคลือบตามโครงสร้างและกิจกรรมที่หลากหลาย แต่น่าเสียดายที่เทคโนโลยีนี้ยังไม่ได้รับการพัฒนาโดยอุตสาหกรรม ซึ่งอาจนำไปสู่การพัฒนาบรรจุภัณฑ์พลาสติกแบบใหม่ที่สามารถเก็บอาหารได้นานขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nandika et al. (2021) ได้ศึกษาการปรับปรุงคุณภาพน้ำมันด้วยการใช้ plantaricin IIA-1A5 เป็นสารกันบูดในนมสดในฟาร์มโคนม รายงานว่าการดื่มนมสดยังคงเป็นประเด็นถกเถียงมาจนถึงทุกวันนี้ บางคนอ้างว่านมสดที่ยังไม่แปรรูปมีคุณค่าทางโภชนาการมากกว่าเมื่อเทียบกับนมพาสเจอร์ไรส์ แม้ว่ากระบวนการรีดนมจะไม่รับประกันการป้องกันจากแบคทีเรียและสิ่งสกปรก แบคทีเรียชนิดหนึ่งที่รู้จักคือ plantaricin IIA-1A5 แบคทีเรียนี้มีบทบาทเป็นสารกันบูดตามธรรมชาติ เพราะมีสารต้านจุลชีพที่คาดว่าจะสามารถทำลายและฆ่าแบคทีเรียก่อโรค เช่น *S. aureus* โดยการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นๆ ด้วยการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของมัน การวิเคราะห์ข้อมูลการศึกษานี้ดำเนินการโดยใช้การออกแบบบล็อกแบบสุ่ม (RDB) โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง การออกแบบการรักษาประกอบด้วยกลุ่มควบคุม แพลนทารีซิน (11.02 มล.) และเพนิซิลลิน (7.5 มล.) ลักษณะทางจุลชีววิทยา ลักษณะทางเคมีกายภาพ และการทดสอบโปรตีน Lowry ได้ทำการทดสอบวิธีการผลการวิจัยพบว่าคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาและคุณสมบัติทางเคมีกายภาพได้มาตรฐาน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุดิบ

3.1.1 วัสดุดิบ

3.1.1.1 ตัวอย่างเมล็ดบัวตัมจากกระบวนการผลิตได้รับจากผู้ส่ง (supplier) ของโรงงานแห่งหนึ่ง จำนวน 30 ตัวอย่าง

3.1.1.2 ตัวอย่างไส้เมล็ดบัวตัมจากกระบวนการผลิตได้รับจากโรงงานอาหารแห่งหนึ่ง จำนวน 14 ตัวอย่าง

3.1.1.3 เมล็ดบัวตัมที่ใช้ในการทดสอบผลของสารแบคทีเรียโอซินได้รับจากผู้ส่ง (supplier) ของโรงงานแห่งหนึ่ง โดยเก็บเมล็ดบัวตัมใส่ถุงพลาสติกปิดเชื้อ เก็บในตู้เย็นเพื่อรักษาความชื้นไว้ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบการยับยั้งสารแบคทีเรียโอซิน คือ *B. cereus* AIKL 1062 (เชื้อสายพันธุ์อ้างอิง) และเชื้อ *B. cereus* ที่แยกจากเมล็ดบัวตัม

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและสารเคมี

3.2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2.1.1 ไข่ไก่ (CP, Thailand)

3.2.1.2 น้ำกรอง

3.2.1.3 น้ำกลั่น

3.2.1.4 น้ำปราศจากไอออน

3.2.1.5 Agar (Oxoid, England)

3.2.1.6 5% Sheep Blood Agar (White Group Public, Thailand)

3.2.1.7 Glucose (Oxoid, England)

3.2.1.8 Mannitol–Egg Yolk–Polymyxin (MYP) agar (Difco, USA)

3.2.1.9 Pancreatic digest of casein (Oxoid, England)

3.2.1.10 Peptone (Difco, USA)

3.2.1.11 Tryptic soy agar (TSA) (Difco, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1.12 Tryptic soy broth (TSB)	(Difco, USA)
3.2.1.13 Yeast extract	(Oxoid, England)
3.2.1.14 3M Petrifilm™ AC	(3M, USA)
3.2.1.15 3M Petrifilm™ EC	(3M, USA)
3.2.1.16 3M Petrifilm™ STX	(3M, USA)

3.2.2 สารเคมี

3.2.2.1 สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ (Crude Bacteriocin Supernatant : CBS) ได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.2.2.1.1 สาร KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KL-1 ความเข้มข้น 102,400 AU/ml (Rumjuankiat et al., 2015)

3.2.2.1.2 สาร KL-D4 ที่ผลิตจาก เชื้อ *Lb. salivarius* KL-D4 ความเข้มข้น 25,600 AU/ml (Therdatha et al., 2016)

3.2.2.2 Citric acid (Univar, Australia)

3.2.2.3 Ethanol (C₂H₅OH) 95 % (องค์การสุราไทย, ไทย)

3.2.2.4 Nisin (E234, 951 IU/mg) (Shandong Freda Biotechnology, China)

3.2.2.5 Polymyxin B solution (Sigma P1004) (Sigma, USA)

3.2.2.6 Potassium dihydrogen phosphate (KH₂PO₄) (Carlo Erba, Italy)

3.2.2.7 Sodium hydroxide (NaOH) (Carlo Erba, Italy)

3.3 เครื่องมือและอุปกรณ์

3.3.1 เครื่องเขย่าสาร (Vortex mixer) (Scientific Industries, USA)

3.3.2 เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Electric balance) (Mettler Toledo, Germany)

3.3.3 เครื่องตีปั่น (Stomacher) (Interscience, France)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 เครื่องวัดพีเอช (pH Meter)	(Mettler Toledo, Switzerland)
3.3.5 จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri dish)	(Kartell, Italy)
3.3.6 ตู้แช่แข็ง (Freezer) -20 และ -80 องศาเซลเซียส	(Sanyo, Japan)
3.3.7 ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator)	(Heraeus, Germany)
3.3.8 ตู้ปลอดเชื้อ (Biological safety cabinet)	(Astec Microflow, UK)
3.3.9 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	(Skadi, Netherland)
3.3.10 ไมโครปิเปต และ ทิป (Micropipette and tip)	(Gilson, France)
3.3.11 ไมโครเวฟ (Microwave)	(Electrolux, China)
3.3.12 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำ (Autoclave)	(Tommy, Japan)
3.3.13 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	(Mettler, Germany)
3.3.14 กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 50 100 และ 1,000 มิลลิลิตร	
3.3.15 ขวดดูแรน (Duran bottle) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร	
3.3.16 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol lamp)	
3.3.17 ที่เจาะหลุม (Cork borer)	
3.3.18 แผงแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)	
3.3.19 บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 100 250 500 และ 1,000 มิลลิลิตร	
3.3.20 ปากคีบ (Forcep)	
3.3.21 ปิเปต (Pipette) ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร	
3.3.22 หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150 มิลลิลิตร (Test tube)	
3.3.23 หัวและเข็มเย็บเชื้อ (Loop and needle)	

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาและทางเคมี ในเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวตัม

3.4.1.1 วิธีการเก็บตัวอย่างเมล็ดบัวตัม

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดบัวตัมที่ใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตไส้เมล็ดบัวตัมของโรงงานแห่งหนึ่ง จำนวน 30 ตัวอย่าง เพื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพ ช่วงมกราคม พ.ศ. 2560 – กันยายน พ.ศ. 2561 โดยสุ่มเก็บตัวอย่างสัปดาห์ละ 1 ครั้ง เก็บตัวอย่างละ 300 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นเก็บตัวอย่างใส่กล่องโฟมที่บรรจุของน้ำแข็ง (ice pack) เพื่อรักษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความเย็นไว้ที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาภายใน 12 ชั่วโมง หลังจากเก็บตัวอย่าง ที่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาของโรงงาน

3.4.1.2 วิธีการเก็บตัวอย่างไส้เม็คบัวกวน

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างไส้เม็คบัวกวนที่ผลิตจากเม็คบัวต้มของโรงงานแห่งหนึ่ง จำนวน 14 ตัวอย่าง เพื่อนำมาตรวจสอบคุณภาพ ช่วงมกราคม พ.ศ. 2560 – กันยายน พ.ศ. 2561 โดยเก็บตัวอย่างละ 300 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ จากนั้นเก็บตัวอย่างใส่กล่องโฟมที่บรรจุของน้ำแข็ง (ice pack) เพื่อรักษาความเย็นไว้ที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส และทำการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาภายใน 12 ชั่วโมงหลังจากเก็บตัวอย่างที่ห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาของโรงงาน

3.4.1.3 การตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

3.4.1.3.1 การเตรียมตัวอย่างเม็คบัวต้มและไส้เม็คบัวกวน

ทำการเตรียมตัวอย่างเม็คบัวต้มและไส้เม็คบัวกวนในตู้ปลอดเชื้อ โดยสุ่มตัวอย่างเม็คบัวต้มและไส้เม็คบัวกวน ตัวอย่างละ 25 กรัม โดยใช้ช้อนสแตนเลสจุ่มแอลกอฮอล์ 95% แล้วเผาไฟมาเชื้อ ตักตัวอย่างใส่ในถุงปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลาย butterfield's phosphate buffer ปริมาตร 225 มิลลิลิตร (BAM, 2003) จากนั้นนำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (stomacher) ที่ความเร็ว 8 นาน 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างด้วย butterfield's phosphate buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ให้ได้ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-7} ตามลำดับ แล้วนำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) ปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์ม (Coliforms), *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* ปริมาณ เซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ตามวิธีการต่อไปนี้

3.4.1.3.2 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (3M Petrifilm Interpretation guide AC, USA)

นำตัวอย่างเม็คบัวต้มที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.3.1 มาทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยเปิดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-5} - 10^{-7} ส่วนไส้เม็คบัวกวนทำการเจือจางตัวอย่างที่ 10^0 - 10^{-2} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 3M Petrifilm™ AC (3M, USA) รอให้อาหารแข็งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยนับโคโลนีสีแดงที่เจริญภายในขอบเขตรัศมี 20 ตารางเซนติเมตร และรายงานผลจำนวนโคโลนีต่อหน่วยเป็น CFU/g

3.4.1.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Escherichia coli* (3M Petrifilm Interpretation guide EC)

นำตัวอย่างเม็คบัวต้มและไส้เม็คบัวกวนที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.3.1 ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-3} โดยเปิดตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 3M Petrifilm™ EC (3M,

USA) รอให้อาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง อ่านผลโดยนับโคโลนีสีน้ำเงินและมีฟองแก๊สรอบโคโลนี และรายงานผลจำนวนโคโลนีต่อหน่วยเป็น CFU/g

3.4.1.3.4 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ โคลิฟอร์ม (3M Petrifilm Interpretation guide EC)

นำตัวอย่างเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวกวนที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.3.1 ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-3} โดยปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 3M Petrifilm™ EC (3M, USA) รอให้อาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยนับโคโลนีสีแดงและมีฟองแก๊สรอบโคโลนี และรายงานผลจำนวนโคโลนีต่อหน่วยเป็น CFU/g

3.4.1.3.5 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *S. aureus* (3M Petrifilm Interpretation guide STX)

นำตัวอย่างเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวกวนที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.3.1 ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-1} - 10^{-3} โดยปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน 3M Petrifilm™ STX (3M, USA) รอให้อาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลโดยนับโคโลนีสีม่วงแดง และรายงานผลจำนวนโคโลนีต่อหน่วยเป็น CFU/g

3.4.1.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *B. cereus* (FDA-BAM, 2002)

นำตัวอย่างเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวกวนที่เจือจางแล้วจากข้อ 3.4.1.3.1 ที่ระดับการเจือจางที่ 10^{-5} - 10^{-7} ส่วนไส้เมล็ดบัวกวนทำการเจือจางตัวอย่างที่ 10^{-1} - 10^{-3} โดยปิเปตตัวอย่าง ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในจานอาหาร Mannitol – Egg Yolk – Polymyxin (MYP) agar ด้วยวิธีสเปรดเพลท (spread plate) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MYP agar โดยใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมที่ปลอดเชื้อเกลี่ยตัวอย่างเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี ที่มีลักษณะสีชมพูหรือขาวอมชมพู ขอบหยัก หรือโค้งมน มีโซนตะกอนสีขาวขุ่นรอบๆ โคโลนี และรายงานผลจำนวนโคโลนีต่อหน่วยเป็น CFU/g

3.4.1.4 การตรวจวัดความเป็นกรด-ด่างเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวกวน (AOAC, 2000)

นำตัวอย่างเมล็ดบัวตัม และไส้เมล็ดบัวกวน 5 กรัม เติมน้ำปราศจากไอออน 45 มิลลิลิตร บดผสมให้ตัวอย่างเข้ากัน นำตัวอย่างไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

3.4.1.5 การตรวจวิเคราะห์และยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus*

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเมล็ดบัวตัม และไส้เมล็ดบัวกวนที่ผลิตจากเมล็ดบัวตัมของโรงงานแห่งหนึ่ง จำนวนตัวอย่างละ 4 ตัวอย่าง รวม 8 ตัวอย่าง ในช่วงเดือน กรกฎาคม และธันวาคม พ.ศ. 2560 ตามวิธีการเก็บตัวอย่างจากข้อ 3.4.1.1 และ 3.4.1.2 และเตรียมตัวอย่างและเจือจางตัวอย่างเมล็ด

บัวต้มและไส้เม็บบัวตามวิธีการข้อ 3.4.1.3.1 นำมาตรวจวิเคราะห์ปริมาณเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* และเก็บเชื้อ *B. cereus* บริสุทธิ์ที่แยกได้จากตัวอย่างเม็บบัวต้มและไส้เม็บบัว

การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ โดยวิธี spread plate ทำการเจือจางจนได้ระดับที่เหมาะสม ในช่วง $10^{-2} - 10^{-7}$ ปิเปตแต่ละความเจือจางลงในจานอาหาร MYP agar 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ปลอดเชื้อเกลี่ยตัวอย่างเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีที่สงสัยที่มีลักษณะสีชมพูหรือขาวอมชมพู ขอบหยักหรือโค้งมน มีโซนตะกอนสีขาวขุ่นรอบๆ โคโลนีจากอาหาร MYP agar นำมาแยกโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ไปทดสอบการสร้างฮีโมไลซิส (hemolysis) บนอาหาร 5% sheep blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูการสลายเม็บบเลือดแดงของแคะ โดยลักษณะโคโลนี *B. cereus* จะมีโซนใสรอบโคโลนีโดยมีความกว้างของโซน 2-4 มิลลิเมตร นับจำนวนโคโลนีที่ให้ผลบวกของการสลายเม็บบเลือดแดงแคะ จำนวนหาปริมาณของเซลล์ของ *B. cereus* ที่มีอยู่ในตัวอย่าง รายงานผลเป็น CFU/g และเก็บโคโลนีที่ให้ผลบวกในอาหาร TSA slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* โดยวิธี biochemical test ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

การวิเคราะห์สปอร์ โดยวิธี spread plate นำตัวอย่างที่ผ่านการตีบั่นแล้วผ่านความร้อนในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (วันทศมนบดี, 2559) แล้วนำหลอดตัวอย่างดังกล่าวมาแช่เย็นในน้ำที่มีน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว นาน 2 นาที ทำการเจือจางจนได้ระดับที่เหมาะสม ปิเปตแต่ละความเจือจางลงในจานอาหาร MYP agar 0.1 มิลลิลิตร โดยใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ปลอดเชื้อเกลี่ยตัวอย่างเชื้อให้ทั่วผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลโคโลนีที่สงสัยที่มีลักษณะสีชมพูหรือขาวอมชมพู ขอบหยักหรือโค้งมน มีโซนตะกอนสีขาวขุ่นรอบๆ โคโลนีจากอาหาร MYP agar นำมาแยกโคโลนีเดี่ยวบนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวที่แยกได้ไปทดสอบการสร้างฮีโมไลซิส (hemolysis) บนอาหาร 5% sheep blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อดูการสลายเม็บบเลือดแดงของแคะ โดยลักษณะโคโลนี *B. cereus* จะมีโซนใสรอบโคโลนีโดยมีความกว้างของโซน 2-4 มิลลิเมตร นับจำนวนโคโลนีที่ให้ผลบวกของการสลายเม็บบเลือดแดงแคะ จำนวนหาปริมาณของเซลล์ของ *B. cereus* ที่มีอยู่ในตัวอย่าง รายงานผลเป็น spore/g และเก็บโคโลนีที่ให้ผลบวกในอาหาร TSA slant บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* โดยวิธีทางชีวเคมี (biochemical test) ที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

3.4.2 การเลี้ยงเชื้อ *B. cereus* บริสุทธิ์

3.4.2.1 การเก็บเชื้อบริสุทธิ์

นำเชื้อ *B. cereus* AIKL1062 และ *B. cereus* บริสุทธิ์ที่แยกได้จากเมล็ดบัวตัมที่ได้รับการยืนยันผลเชื้อ *B. cereus* จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มาเลี้ยงในอาหาร TSA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการถ่ายเชื้อลงในอาหารใหม่ 2 ครั้ง ก่อนเก็บ stock culture ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส

3.4.3 การศึกษาผลของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* AIKL1062 และ *B. cereus* ที่แยกจากเมล็ดบัวตัม

3.4.3.1 การเตรียมเชื้อ *B. cereus*

ใช้ลูป (loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ถ่ายเชื้อ *B. cereus* AIKL1062 และ *B. cereus* บริสุทธิ์ที่แยกได้จากเมล็ดบัวตัม บน TSA slant (ข้อ 3.4.2.1) จำนวน 1 ลูป โดยเทคนิคปลอดเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy broth (TSB) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณเชื้อเริ่มต้น โดยปิเปตเชื้อมา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลาย Butterfield's phosphate buffer ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ นำมา spread plate ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนำส่วนที่เหลือไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ทำการตรวจนับโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30 – 300 โคโลนี กำหนดหาปริมาณเซลล์เชื้อ *B. cereus* ให้มีเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^7 CFU/ml

3.4.3.2 การทดสอบผลของสารแบคทีริโอซิน KL-1Y และ KL-D4 ที่ได้จาก *Lb. plantarum* KL-1 และ *Lb. salivarius* KL-D4, ด้วยวิธี agar well diffusion (Denkova et al., 2017)

นำกล้าเชื้อ *B. cereus* AIKL1062 และ *B. cereus* บริสุทธิ์ที่แยกได้จากเมล็ดบัวตัม จากข้อ 3.4.3.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในเพลท เทอาหาร TSA ที่หลอมละลายอุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส ปริมาตร 15 มิลลิลิตร พอร์เพลท (pour plate) ปล่อยให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัว ใช้ cork borer ที่ปลอดเชื้อเจาะรูให้เป็นหลุมขนาด 6 มิลลิเมตร เจาะจานละ 4 หลุม จากนั้นใช้ไมโครปิเปต ปิเปตสารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (Crude Bacteriocin Supernatant : CBS) KL-1Y ที่ได้จากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 ที่ความเข้มข้น 102,400 AU/ml สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ KL-D4 ที่ได้จากเชื้อ *Lb. salivarius* KL-D4 ที่ความเข้มข้น 25,600 AU/ml, และไนซิน (951 IU/mg) ความเข้มข้น 5% ที่เตรียมไว้ใส่ลงในหลุม โดยใส่หลุมละ 40 ไมโครลิตร โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อเป็นตัวควบคุม นำไปวางไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนสาร CBS และไนซินแห้ง ประมาณ 4 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสาร CBS โดยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้น (ภาพที่ 3.1) มีหน่วยเป็นมิลลิเมตร เปรียบเทียบกับไนซิน ทำการทดสอบเชื้อละ 3 ซ้ำ

ทำการคัดเลือกชนิดของสารแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* และเชื้อ *B. cereus* สายพันธุ์ที่มีความต้านทานสารแบคทีเรียโอซิน ได้ดีที่สุดมาศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ในขั้นถัดไป



ภาพที่ 3.1 การวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ

3.4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเซลล์ของ *B. cereus* ที่แยกจากเม็ดบัวต้ม

นำกล้าเชื้อ *B. cereus* บริสุทธิ์ที่แยกได้จากเม็ดบัวต้มที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.3 เลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% จากนั้นปิเปตเชื้อ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร TSB ไม่ปรับกรด ปริมาตร 9 มิลลิลิตร และใส่ลงในอาหาร TSB ที่ปรับด้วยกรดซิตริก (pH 4.0) ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 3 และ 6 log CFU/ml เติมสารละลายแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.3 ลงในหลอดทดลอง ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำมาตรวจสอบปริมาณเชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอดโดยปิเปตเชื้อมา 1 มิลลิลิตร เจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ให้ได้ระดับความเจือจางที่ต้องการ นำมา spread plate ลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการตรวจนับโคโลนิบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 30 – 300 โคโลนี คำนวณหาปริมาณเซลล์เชื้อ *B. cereus* ที่เหลือรอด รายงานผลเป็น log CFU/ml จากนั้นนำ

ส่วนที่เหลือในหลอดทดสอบไปทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) จำนวน 3 ซ้ำ โดยใช้เครื่องวัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการเรียนการสอนเท่านั้น เมื่อผู้จัดทำเห็นประโยชน์ทางวิชาการไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พีเอช (pH meter) คัดเลือกความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซินที่เหมาะสมในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus*

3.4.5 การศึกษาผลของความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซินในการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเมล็ดบัวตัม

3.4.5.1 วิธีการทดสอบความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน

นำเมล็ดบัวตัมที่รับจากผู้ส่งมาชั่งน้ำหนัก 25 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ อัตราส่วน 1:1 ของน้ำหนักเมล็ดบัวตัม (เมล็ดบัวตัม 25 กรัม ต่อน้ำกลั่น 25 กรัม) ปรับความเป็นกรด-ด่าง (pH) ให้เท่ากับ 4.0 ± 0.2 ด้วยกรดซิตริก เติมสารแบคทีเรียโอซินที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.4.3.2 ที่มีเมล็ดบัวตัมในน้ำกลั่น 50 กรัม ตามความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากการทดลองในข้อ 3.4.4 และเขย่าให้เข้ากันจนสารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นปิดปากบีกเกอร์ด้วยอลูมิเนียมฟลอยด์ให้สนิท และบรรจุใส่ถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อและนำไปแช่เย็นอุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเน่าเสียของเมล็ดบัวตัม เมื่อครบเวลา 22 ชั่วโมง นำตัวอย่างเมล็ดบัวตัมมาทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำแช่เมล็ดบัวตัมก่อนและหลังการจัดเก็บ ทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.4.5.2 การตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (FDA-BAM, 2002)

นำตัวอย่างเมล็ดบัวตัมจากข้อ 3.4.5.1 มาทำการตรวจวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยทำการแยกเอาส่วนเมล็ดบัวตัมออกจากน้ำที่แช่ด้วยวิธีการกรองด้วยตะแกรงสเตนเลสที่ผ่านการฆ่าเชื้อ แบ่งเมล็ดบัวตัมออกเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 นำไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เม็ดบัวตัมส่วนที่ 2 นำไปนึ่งในหม้อนึ่งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จับเวลาหลังจากน้ำเดือด หลังจากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด ในตัวอย่างเมล็ดบัวตัมก่อนและหลังแช่สารแบคทีเรียโอซิน เม็ดบัวตัมหลังการนึ่งและน้ำที่แช่เมล็ดบัวตัม โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ผสมกับสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 90 มิลลิลิตร แล้วนำตัวอย่างไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น (stomacher) ที่ความเร็ว 8 นาน 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ใช้วิธี spread plate โดยเปิดตัวอย่างที่ระดับการเจือจางที่เหมาะสม ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร PCA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และรายงานผลจำนวนโคโลนีต่อหน่วยเป็น log CFU/g

3.4.5.3 การตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำแช่เมล็ดบัว

นำตัวอย่างน้ำแช่เมล็ดบัวตัมที่ผสมกับสารแบคทีเรียโอซินจนเข้ากันก่อนการจัดเก็บ และตัวอย่างน้ำแช่เมล็ดบัวตัมที่กรองแยกเมล็ดบัวตัมออกหลังจัดเก็บครบเวลา 22 ชั่วโมง มาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH Meter) ทำการวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

3.5 การวางแผนการทดลองและการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเซลล์ของ *B. cereus* AIKL1062 และ *B. cereus* ที่แยกจากเมล็ดบัวตัม โดยจัดสิ่งทดลองแบบ 3×4 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in Completely Randomized Design) โดยมีปัจจัยที่ 1 คือ ชนิดของสารแบคทีเรียโอซิน ปัจจัยที่ 2 คือ เชื้อ *B. cereus* ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความต่างทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

การศึกษาผลของความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเซลล์ของ *B. cereus* ที่แยกจากเมล็ดบัวตัม โดยจัดสิ่งทดลองแบบ 3×5 แฟกทอเรียล ในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Factorial in CRD) โดยมีปัจจัยที่ 1 คือ ความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน ปัจจัยที่ 2 คือ เวลาที่ใช้ในการทดสอบ ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความต่างทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธี LSD ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 ผลการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวตัม

ทำการเก็บตัวอย่างเมล็ดบัวตัม จำนวนทั้งหมด 30 ตัวอย่าง และไส้เมล็ดบัวตัม จำนวน 14 ตัวอย่าง ในระหว่างกระบวนการผลิตของโรงงานแห่งหนึ่ง มาทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมี โดยทำการวิเคราะห์หาค่าความเป็นกรดต่าง (พีเอช) และทำการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในกลุ่ม *E. coli*, Coliforms, *S. aureus* และ *B. cereus*

4.1.1 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางเคมีในตัวอย่างเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวตัม

ผลการวิเคราะห์ค่าพีเอชของตัวอย่างเมล็ดบัวตัม 30 ตัวอย่าง และไส้เมล็ดบัวตัม 14 ตัวอย่าง ดังตารางที่ 4.1 พบว่าค่าพีเอชของเมล็ดบัวตัมอยู่ในช่วง 6.72 – 7.28 โดยค่าพีเอชเฉลี่ยมีค่า 7.01 และไส้เมล็ดบัวตัมพบค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.01 – 6.67 โดยค่าพีเอชเฉลี่ย มีค่า 6.25 จากตารางจะเห็นได้ว่าค่าพีเอชของเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวตัมจะเป็นกลางซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *B. cereus* (บุษกร อุดรภิกษาคติ, 2555)

ตารางที่ 4.1 ค่าช่วงพีเอช ค่าเฉลี่ยพีเอช ของเมล็ดบัวตัม 30 ตัวอย่าง และไส้เมล็ดบัวตัม 14 ตัวอย่าง

ตัวอย่าง	ช่วงพีเอช	พีเอช เฉลี่ย
เมล็ดบัว (30 ตัวอย่าง)	6.72 – 7.28	7.01
ไส้บัวตัม (14 ตัวอย่าง)	6.01 – 6.67	6.25

4.1.2 ผลการตรวจวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ในเมล็ดบัวตัมและไส้เมล็ดบัวตัม

ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count), *E. coli*, Coliforms, *S. aureus* และ *B. cereus* ในตัวอย่างเมล็ดบัวตัม เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของเมล็ดบัวตัมกำหนดว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุดิบของโรงงานกำหนดไว้ดังนี้ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด น้อยกว่า 1×10^4 CFU/g เชื้อ Coliforms น้อยกว่า 1×10^2 CFU/g เชื้อ *S. aureus* น้อยกว่า 10 CFU/g เชื้อ *E. coli* น้อยกว่า 10 CFU/g และเชื้อ *B. cereus* น้อยกว่า 1×10^3 CFU/g และประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556) เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค กำหนดว่าผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปพร้อมบริโภคทันทีที่ทำจากธัญพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หรือแบ่งเป็นส่วนประกอบ ต้องตรวจไม่พบ *Salmonella* spp. ไม่พบเชื้อ *S. aureus* และตรวจพบเชื้อ *B. cereus* น้อยกว่า 100 CFU/g พบว่า การตรวจสอบปริมาณเชื้อทั้งหมดในเมล็ดบัวตัม 30 ตัวอย่าง พบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในตัวอย่าง ที่มีจำนวนที่เกินเกณฑ์มาตรฐาน 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 83.3% เชื้อ Coliforms พบจำนวนที่เกินเกณฑ์มาตรฐาน 15 ตัวอย่าง คิดเป็น 46.7% เชื้อ *E. coli* พบจำนวนที่เกินเกณฑ์มาตรฐาน 8 ตัวอย่าง คิดเป็น 26.7% เชื้อกลุ่ม *Bacillus* พบจำนวนที่เกินเกณฑ์มาตรฐาน 24 ตัวอย่าง คิดเป็น 80.0% และตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* จากตัวอย่างทั้งหมด ดังตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในเมล็ดบัว จำนวนและ % ของตัวอย่างเมล็ดบัวที่มีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยา

ชนิดจุลินทรีย์ที่ตรวจสอบ (จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)	จำนวนตัวอย่างที่เกินเกณฑ์ มาตรฐาน *	% ตัวอย่างที่เกิน เกณฑ์มาตรฐาน
Total plate count (30 ตัวอย่าง)	28	83.3
Coliforms (30 ตัวอย่าง)	15	46.7
<i>E. coli</i> (30 ตัวอย่าง)	8	26.7
<i>Bacillus</i> spp. (30 ตัวอย่าง)	24	80.0
<i>S. aureus</i> (30 ตัวอย่าง)	0	0.0

หมายเหตุ : เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในวัตถุดิบของโรงงาน และประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 364 (พ.ศ. 2556) เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค กล่าวว่า ผลิตภัณฑ์อาหารสำเร็จรูปพร้อมบริโภคทันทีที่ทำจากถั่วงอก หรือแบ่งเป็นส่วนประกอบ

ผลการตรวจสอบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์, *E. coli*, Coliforms, *S. aureus* และ *B. cereus* ในไส้เมล็ดบัวกวนเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560) ระบุว่า ขนมอบที่ไม่มีไส้หรือเดิมไส้หรือส่วนผสมอื่นก่อนอบ เกณฑ์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่กำหนด ดังนี้ จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด น้อยกว่า 1×10^4 CFU/g เชื้อ *E. coli* น้อยกว่า 3 MPN/g เชื้อ *S. aureus* น้อยกว่า 10 CFU/g และเชื้อ *B. cereus* น้อยกว่า 100 CFU/g พบว่าปริมาณเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างไส้เมล็ดบัวกวนทั้งหมด 14 ตัวอย่าง ไม่พบจำนวนตัวอย่างที่มีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐาน เชื้อ Coliforms พบจำนวนที่เกินเกณฑ์มาตรฐาน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 7.1% เชื้อกลุ่ม *Bacillus* พบจำนวนที่เกินเกณฑ์มาตรฐาน 6 ตัวอย่าง คิดเป็น 42.9% ส่วนเชื้อ

S. aureus และเชื้อ *E. coli* ตรวจไม่พบการปนเปื้อนในไส้บัวกวนจากตัวอย่างทั้งหมด ดังตารางที่ 4.3 เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 จุลินทรีย์ที่ตรวจพบในไส้บัวกวาน จำนวนและ % ของตัวอย่างเม็ดบัวที่มีค่าเกินเกณฑ์
มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยา

ชนิดจุลินทรีย์ที่ตรวจสอบ / (จำนวนตัวอย่างทั้งหมด)	จำนวนตัวอย่างที่เกินเกณฑ์ มาตรฐาน *	% ตัวอย่างที่เกิน เกณฑ์มาตรฐาน
Total plate count (14 ตัวอย่าง)	0	0.0
Coliforms (14 ตัวอย่าง)	1	7.1
<i>E. coli</i> (14 ตัวอย่าง)	0	0.0
<i>Bacillus</i> spp. (14 ตัวอย่าง)	6	42.9
<i>S. aureus</i> (14 ตัวอย่าง)	0	0.0

หมายเหตุ *เกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560)

จากการศึกษาการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเม็ดบัวต้มและไส้เม็ดบัวกวานในกระบวนการผลิตพบว่าการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus* spp. ที่เกินเกณฑ์มาตรฐานจำนวนมาก ดังนั้นในขั้นตอนถัดไปจึงทำการตรวจสอบและยืนยันว่าเชื้อกลุ่ม *Bacillus* spp. ที่พบเป็นเชื้อ *B. cereus* หรือไม่

4.1.3 ผลการตรวจวิเคราะห์และยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus*

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเม็ดบัวต้มและเก็บตัวอย่างไส้บัวกวานที่ผลิตจากเม็ดบัวต้มที่ทำการเก็บตัวอย่างจากโรงงานอาหารแห่งหนึ่ง จำนวนตัวอย่างละ 4 ตัวอย่าง รวม 8 ตัวอย่าง วิเคราะห์ปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ด้วยอาหาร MYP agar หลังจากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะสีชมพูหรือขาวอมชมพู ขอบหยัก หรือโค้งมน มีโซนตะกอนสีขาวขุ่นรอบๆ โคโลนี และยืนยันสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus* ด้วยอาหาร 5% sheep blood agar เพื่อทดสอบการสลายฮีโมไลซิส (hemolysis) ของเชื้อ เมื่อได้โคโลนีที่เกิดโซนใสจากการย่อยเม็ดเลือดแดงทำการเก็บตัวอย่างเชื้อแต่ละไอโซเลทเพื่อส่งตรวจยืนยันสายพันธุ์ด้วยวิธีทางชีวเคมีที่กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* จากเม็ดบัวต้มและไส้เม็ดบัวกวาน พบว่าเม็ดบัวต้ม จากตัวอย่างทั้งหมด 4 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของเซลล์ 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 50% โดยตรวจพบมีปริมาณเซลล์ 3.99 และ 4.14 log CFU/g ตามลำดับ ขณะที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจไม่พบการปนเปื้อนของสปอร์ในตัวอย่างเม็ดบัวต้ม ตัวอย่างไส้เม็ดบัวกวนไม่พบการปนเปื้อนของเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ปริมาณเซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* ในเม็ดบัวและไส้บัวกวน

ตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	<i>B. cereus</i> Cell (log CFU/g)	<i>B. cereus</i> Spore (spore/g)
เม็ดบัว	1	ND	ND
	2	ND	ND
	3	3.99	ND
	4	4.14	ND
ไส้บัว	1	ND	ND
	2	ND	ND
	3	ND	ND
	4	ND	ND

หมายเหตุ : ND = Not Detect คือ ตรวจไม่พบโคโลนีของเชื้อที่เจือจาง 1:10

นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็นเชื้อ *B. cereus* ที่มีลักษณะสีชมพูหรือขาวอมชมพู ขอบหยัก หรือโค้งมน มีโซนตะกอนสีขาวจุ่มรอบๆ โคโลนีบนอาหาร MYP agar จากตัวอย่างเม็ดบัวต้มจำนวน 7 ไอโซเลท รหัสตัวอย่างที่ 3 (LT1 – LT4) และ 4 (LT5 – LT7) มาทำการตรวจยืนยันเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากเม็ดบัวต้ม พบว่าลักษณะการเจริญเติบโตในอาหาร nutrient growth (NA) ให้ผลเป็นบวก (+) ทดสอบการย้อมแกรม (gram stain) ให้ผลเป็นบวก (+) เพราะเซลล์ติดสีม่วง มีลักษณะเป็นรูปแท่ง ทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ (motility) ให้ผลเป็นบวก (+) การย่อยน้ำตาลกลูโคสในสภาวะไม่มีออกซิเจน (glucose (AnO₂)) ให้ผลเป็นบวก (+) สามารถย่อยสลายกรดอะมิโนไทโรซีน (tyrosine) ให้ผลเป็นบวก (+) ทดสอบการเกิด acetyl-methylcarbinol (Voges-Proskauer, VP) ให้ผลเป็นบวก (+) สามารถเจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส (growth 43 °C) ให้ผลเป็นบวก (+) โดยไม่มีการสร้างผลึกสารพิษ (toxin crystal) ให้ผลเป็นลบ (-) และไม่มีการเจริญแบบไรซอยด์บนอาหาร (rhizoid growth) ให้ผลเป็นลบ (-) พบว่าจาก 7 ไอโซเลทที่สงสัยมี 3 ไอโซเลทที่แยกได้จากเม็ดบัวต้ม คือ ไอโซเลท LT5 LT6 และ LT7 ให้ผลการทดสอบทางชีวเคมีตรงตามลักษณะของเชื้อ *B. cereus* ดังตารางที่ 4.5 จึงเรียกชื่อไอโซเลทที่ LT5, LT6 และ LT7 เป็นเชื้อ *B. cereus* LT5, *B. cereus* LT6 และ *B. cereus* LT7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลตรวจยืนยันเชื้อ *B. cereus* ในเมล็ดบัว จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข โดยใช้วิธีการดัดแปลงจาก FDA-BAM (2001)

Isolate	NA	Gram stain	Motility	VP	Glucose (AnO ₂)	Hemolyse	Rhizoid growth	Tyrosine	Toxin crystal	Growth 43°C
LT-1	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
LT-2	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
LT-3	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
LT-4	-	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
LT-5	+	+	+	+	+	++	-	+	-	+
LT-6	+	+	+	+	+	++	-	+	-	+
LT-7	+	+	+	+	+	++	-	+	-	+

หมายเหตุ - = ผลเป็นลบ (Negative); + = ผลเป็นบวก (Positive); N/A = ไม่ได้วิเคราะห์ (Not analyzed)

ผลการตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของเมล็ดบัวตัม และไส้เมล็ดบัวกวจากโรงงานแห่งหนึ่งเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของโรงงาน พบว่าปริมาณเมล็ดบัวตัม มีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐาน ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด คิดเป็น 83.3% เชื้อ Coliforms คิดเป็น 46.7% เชื้อ *E. coli* คิดเป็น 26.7% และเชื้อ *B. cereus* คิดเป็น 80.0% ตามลำดับ ตรวจพบปริมาณเซลล์ *B. cereus* ในเมล็ดบัวตัม มีค่า 3.99 และ 4.14 log CFU/g สอดคล้องกับรายงานมีการสำรวจการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ในร้านค้าตลาดพื้นเมืองของประเทศโปแลนด์ พบว่าการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* ส่วนใหญ่ในกลุ่มผลิตภัณฑ์พืช เช่น ลูกเดือย (85%), บักวีท (85.7%) และข้าวสาลี (100%) และตรวจพบเชื้อ *B. cereus* อยู่ที่ 10^2 MPN/g (Daczowska-Kozon et al., 2009) สาเหตุของการปนเปื้อนของเชื้อในตัวอย่างเมล็ดบัว เนื่องจากเมล็ดบัวเป็นวัตถุดิบที่มาจากดินจึงทำให้พบการปนเปื้อนเชื้อ *B. cereus* และจากการตรวจสอบสถานที่ที่ผลิตเมล็ดบัวตัมเพื่อจำหน่ายให้โรงงานพบว่าสถานที่ผลิตนั้นมีโอกาสทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ทุกขั้นตอนการผลิต สถานที่ผลิตเป็นแหล่งผลิตขนาดเล็ก ในกระบวนการผลิตมีการใช้น้ำเป็นหลักในขั้นตอนการแช่เมล็ดบัว การต้มลอกเปลือกเมล็ดบัว การลอกเปลือกเมล็ดบัว การล้างทำความสะอาดเมล็ดบัวหลังการลอกเปลือก ทำให้เกิดการปนเปื้อนข้ามได้ในขั้นตอนการผลิตและการบรรจุหลังการต้มเสร็จ ระยะทางจากสถานที่ผลิตเมล็ดบัวตัมถึงโรงงานแปรรูปมีระยะทางประมาณ 50 กิโลเมตร ระยะเวลาในการเดินทางประมาณ 2 ชั่วโมง และไม่ได้มีการควบคุมอุณหภูมิรถขนส่ง ทำให้อุณหภูมินั้นเหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เพิ่มขึ้น และหากโรงงานนำเมล็ดบัวตัมที่มีการปนเปื้อนของเชื้อเกินมาตรฐานมาใช้เป็นวัตถุดิบจะส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคได้

ผลการตรวจสอบทางจุลชีววิทยาของไส้เมล็ดบัวกว เปรียบเทียบกับมาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร พบว่าไส้เมล็ดบัวกวนมีตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อ *Bacillus* spp. เกินเกณฑ์มาตรฐาน คิดเป็น 42.9% ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากระบวนการผลิตและการให้ความร้อนในการกวนไส้เมล็ดบัวกวน ที่อุณหภูมิประมาณ 80–100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 3-4 ชั่วโมง สามารถที่ลดจำนวนของเชื้อลงไปให้อยู่ในระดับที่อยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ (Christina et al., 2006) แต่ก็ยังมีบางครั้งที่มีการตรวจพบว่าการปนเปื้อนของเชื้อ *Bacillus* spp. เนื่องจาก *Bacillus* สามารถสร้างสปอร์ที่ทนความร้อนได้ (Vos et al., 2009) จึงสามารถเหลือรอดในระหว่างกระบวนการแปรรูปอาหาร หรืออาจเกิดการปนเปื้อนลงไปในผลิตภัณฑ์ไส้เมล็ดบัวกวนหลังการแปรรูปและเมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ สปอร์ก็จะงอกออกมาเป็นเซลล์และเพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็ว (Andersson et al., 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยามให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการตรวจยืนยันและระบุสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากเมล็ดบัวตัม ระบุว่าไอโซเลท LT5, LT6 และ LT7 เป็นเชื้อ *B. cereus* คือ *B. cereus* LT5, LT6 และ LT7 จึงนำเชื้อดังกล่าวมาศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus*

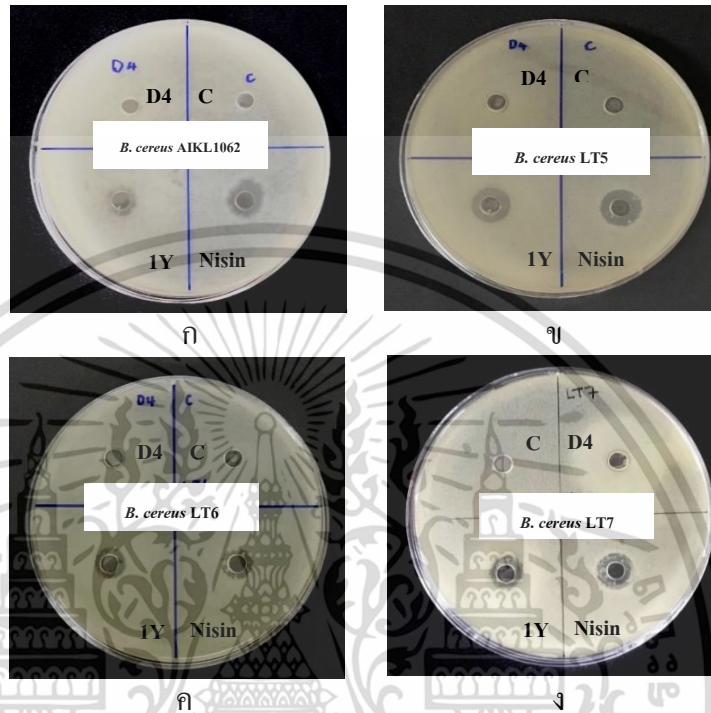
4.2 ผลการศึกษาสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเซลล์ของเชื้อ *B. cereus*

นำเชื้อ *B. Cereus* บริสุทธิ์จากเมล็ดบัวตัมที่ยืนยันสายพันธุ์จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุขทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *B. cereus* LT5, LT6 และ LT7 ตามลำดับ และ *B. cereus* AIKL1062 เชื้อสายพันธุ์อ้างอิง นำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ด้วยสารแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิด คือ KL-D4 ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* KL-D4 KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 โดยมีสารไนซินความเข้มข้น 5% เป็นสารเปรียบเทียบ ทำการทดสอบโดยใช้วิธี agar well diffusion และตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารแบคทีเรียโอซิน ด้วยการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) ที่เกิดขึ้นมีหน่วยเป็นมิลลิเมตร ดังภาพที่ 4.1 และตารางที่ 4.6

เมื่อเปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซิน D4 และ KL-1Y กับเชื้อ *B. cereus* LT5, LT6, LT7 และ *B. cereus* AIKL1062 พบว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อของสารแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยพบว่าสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y จากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 และไนซินยับยั้งการเจริญเชื้อ *B. cereus* ทุกสายพันธุ์แต่สารแบคทีเรียโอซิน D4 พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ (ภาพที่ 4.1) สาร KL-1Y ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* AIKL1062 ได้น้อยที่สุด มีบริเวณยับยั้งขนาด 0.70 ± 0.38 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *B. cereus* LT7 พบบริเวณยับยั้งขนาด 1.08 ± 0.12 มิลลิเมตร แตกต่างกับการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* LT5 และ LT6 พบบริเวณยับยั้งขนาด 1.92 ± 0.27 และ 1.52 ± 0.20 มิลลิเมตร ($P > 0.05$) ส่วนสารไนซินพบว่ายับยั้งเชื้อ *B. cereus* ทุกสายพันธุ์ไม่ต่างกันทางสถิติ ($P < 0.05$) พบเกิดบริเวณยับยั้งขนาด $0.93 \pm 0.77 - 1.32 \pm 0.35$ มิลลิเมตร และสารแบคทีเรียโอซิน D4 พบว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของเชื้อ *B. cereus* ได้ทุกสายพันธุ์ จึงไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้เมื่อทำการเปรียบเทียบสายพันธุ์ของเชื้อ *B. cereus* LT5, LT6 และ LT7 ที่แยกได้จากเมล็ดบัวตัม กับชนิดของสารแบคทีเรียโอซิน พบว่าการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* LT5 เกิดบริเวณยับยั้งสาร KL-1Y ขนาด 1.92 ± 0.27 มิลลิเมตร มากกว่าบริเวณยับยั้งไนซินขนาด 1.32 ± 0.35 มิลลิเมตร *B. cereus* LT6 เกิดบริเวณยับยั้งสาร KL-1Y ขนาด 1.52 ± 0.20 มิลลิเมตร มากกว่าบริเวณยับยั้งของไนซินขนาด 0.98 ± 0.19 มิลลิเมตร ($P > 0.05$) สายพันธุ์ *B. cereus* LT7 เกิดบริเวณยับยั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สาร KL-1Y ขนาด 1.08 ± 0.12 มิลลิเมตร ไม่แตกต่างจากบริเวณยับยั้งของโนซินขนาด 0.95 ± 0.40 มิลลิเมตร และสายพันธุ์ *B. cereus* AIKL1062 เกิดบริเวณยับยั้งสาร KL-1Y ขนาด 0.70 ± 0.38 มิลลิเมตร และบริเวณยับยั้งสารโนซินขนาด 0.93 ± 0.77 มิลลิเมตร. ($P < 0.05$) ดังตารางที่ 4.6



ภาพที่ 4.1 ลักษณะบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ของสารแบคทีเรียโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* AIKL 1062 (ก) *B. cereus* LT5 (ข) *B. cereus* LT6 (ค) *B. cereus* LT7 (ง)

หมายเหตุ : D4 = สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* KL-D4 ความเข้มข้น 25,600 AU/ml
 1Y = สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 ความเข้มข้น 102,400 AU/ml
 Nisin = สารโนซินความเข้มข้น 5% ; C = น้ำกลั่นปลอดเชื้อ

ตารางที่ 4.6 สายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* และชนิดของสารแบคทีเรียโอซินที่มีผลต่อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง บริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มิลลิเมตร)

สายพันธุ์เชื้อ <i>B. cereus</i>	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มิลลิเมตร)		
	สารแบคทีเรียโอซิน		
	KL-1Y	Nisin	D4
LT5	1.92 ± 0.27^{cC}	1.32 ± 0.35^{bA}	- ^{aA}
LT6	1.52 ± 0.20^{cBC}	0.98 ± 0.19^{bA}	- ^{aA}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการศึกษาวิจัยเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านอื่น

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) (มิลลิเมตร)			
สารแบคทีเรียโอซิน			
สายพันธุ์เชื้อ <i>B. cereus</i>	KL-1Y	Nisin	D4
LT7	1.08 ± 0.12 ^{bAB}	0.95 ± 0.40 ^{bA}	- ^{aA}
1062	0.70 ± 0.38 ^{aA}	0.93 ± 0.77 ^{aA}	- ^{aA}

หมายเหตุ : การทดลองค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ ; - = ไม่เกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

บริเวณยับยั้ง = [ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้ง (มิลลิเมตร) - ขนาดหลุมที่เจาะ (มิลลิเมตร)]

KL-1Y = สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

D4 = สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* KL-D4

Nisin = สารไนซินความเข้มข้น 5 %

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกัน ในแถวแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกัน ในแถวแนวดิ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

จากการศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิด ในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* LT5, LT6, LT7 และ *B. cereus* AIKL1062 สายพันธุ์อ้างอิง พบว่าเชื้อ *B. cereus* แต่ละสายพันธุ์มีผลต่อการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินที่ทดสอบ โดยเชื้อที่มีความต้านทานสารแบคทีเรียโอซินน้อยที่สุดคือ *B. cereus* LT5 พบขนาดการยับยั้งมากที่สุดคือ 1.92 ± 0.27 มิลลิเมตร และเชื้อที่มีความต้านทานต่อการยับยั้งสารแบคทีเรียโอซินมากที่สุดคือ *B. cereus* LT7 และ *B. cereus* AIKL1062 ซึ่งพบการเกิดบริเวณยับยั้งมีขนาด 1.08 ± 0.12 และ 0.70 ± 0.38 มิลลิเมตร ตามลำดับ ผลการศึกษาพบว่าสารแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุดคือสาร KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 ไม่แตกต่างจากไนซินความเข้มข้น 5%

สารแบคทีเรียโอซินเป็นสารอินทรีย์ประเภทโพลีเปปไทด์ (polypeptide) เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว สามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน (narrow spectrum) จำพวกแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Bacillus*, *Enterococcus*, *Listeria*, *Clostridium* และ *Staphylococcus* (Noonpakdee et al., 2003) โดยแบคทีเรียโอซินจะทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย ทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสูญเสียสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ส่งผลให้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์โค่นทำลาย (Klaenhammer, 1993) จากผลการทดลองพบว่า สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ที่แยกจากเมล็ดบัวตัมได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rumjuankiat et al. (2015) ได้ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซิน plantaricin KL-1Y ที่ได้จากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 พบว่าสารแบคทีเรียโอซินมีความสามารถในการยับยั้ง *B. cereus* JCM 2125^T ได้ ส่วนสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. salivarius* KL-D4 พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบได้ เนื่องจากความเข้มข้นของสาร D4 น้อยกว่า KL-1Y ซึ่งแตกต่างกับการทดลองของ Therdtatha et al. (2016) ได้ศึกษาคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จาก *Lb. salivarius* KL-D4 มีความสามารถในการยับยั้ง *B. cereus* JCM 2152 ได้ ที่แสดงกิจกรรมในการยับยั้งที่ 3,200 AU/ml และจากการทดลองของ คณิน อิ่มทองคำ (2561) ได้ศึกษาว่าสารแบคทีเรียโอซินชนิด cell-free supernatant ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองสามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าจุลินทรีย์ *S. aureus*, *Y. enterocolitica* และ *Cr. sakazakii* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* ได้

จากผลการศึกษาสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y มีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ไม่ต่างจากโอซิน และพบว่าเชื้อ *B. cereus* LT7 มีความสามารถในการต้านทานสารแบคทีเรียโอซินมากที่สุด ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อ *B. cereus* LT7 และสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y มาทำการศึกษาความเข้มข้นและเวลาในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ต่อไป

4.3 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 ต่อเซลล์ของ *B. cereus*

4.3.1 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ต่อการยับยั้งของ *B. cereus*

ทำการทดสอบความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ที่เวลา 1 นาที, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์ *B. cereus* LT7 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3 และ 6 log CFU/ml ผลการทดลอง ดังตารางที่ 4.7 และ 4.8 และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารแบคทีเรียโอซิน ดังตารางที่ 4.9

จากตารางที่ 4.7 ผลของความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus* LT7 เริ่มต้นที่ 3.64 log CFU/ml พบว่าที่เวลา 1 นาที ความเข้มข้น 10% เชื้อ *B. cereus* LT7 มีการลดลงของเชื้อที่ 1.64% และเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นพบว่า การเจริญของเชื้อมีการเพิ่มขึ้นทุกความเข้มข้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตั้งแต่เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เวลาที่ 1 นาที จนถึงเวลาที่ 18 ชั่วโมง พบเชื้อที่ประมาณ 7 log CFU/ml แต่ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 0% มากกว่าที่ความเข้มข้น 5 และ 10% ตรวจพบปริมาณเชื้อ 7.64 ± 0.10 และ 7.51 ± 0.06 log CFU/ml ตามลำดับ ตารางที่ 4.7

ทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่เวลาต่างๆ พบว่าในช่วง 6 ชั่วโมงแรก เชื้อเพิ่มปริมาณขึ้นอย่างรวดเร็วจากเชื้อเริ่มต้น 3.64 log CFU/ml เป็น 6.22 – 6.30 log CFU/ml แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ที่เวลา 12 - 24 ชั่วโมง ทุกความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซินเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 1-1.5 log ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยเชื้อเจริญที่ประมาณ 7 log CFU/ml (ตารางที่ 4.7)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ที่เวลาเพิ่มขึ้น พบค่า pH ลดลง โดยที่เวลา 1 นาที ความเข้มข้น 0% ค่า pH เท่ากับ 6.96 ± 0.04 ความเข้มข้น 5 และ 10% ค่า pH เท่ากับ 6.63 ± 0.04 และ 6.29 ± 0.01 ตามลำดับ เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ค่า pH ที่ความเข้มข้น 0% มีค่า 5.13 ± 0.01 ความเข้มข้น 5 และ 10% ค่า pH เท่ากับ 5.06 ± 0.08 และ 5.07 ± 0.02 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.9)

จากผลการศึกษาความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y แสดงให้เห็นว่าการเติมสารแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ที่เชื้อเริ่มต้น 3.64 log CFU/ml แต่พบว่าที่ความเข้มข้น 10% สามารถช่วยชะลอการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ในช่วงเวลา 6 - 12 ชั่วโมงแรก แต่เมื่อเวลาเพิ่มขึ้นสาร KL-1Y ทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อได้

จากตารางที่ 4.8 ผลของความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus* LT7 เริ่มต้นที่ 6.24 log CFU/ml พบว่าที่เวลา 1 นาที ความเข้มข้น 5 และ 10% เชื้อ *B. cereus* LT7 มีการลดลงของเชื้ออยู่ที่ 2.40 และ 1.76% ตามลำดับและเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นพบว่าการเจริญของเชื้อมีการเพิ่มขึ้นทุกความเข้มข้นไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ตั้งแต่เวลาที่ 1 นาที จนถึงเวลาที่ 24 ชั่วโมง พบการเจริญของเชื้อที่ประมาณ 7 log CFU/ml

ทำการเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่เวลาต่างๆ พบว่าที่เวลา 6 - 24 ชั่วโมง เชื้อเพิ่มปริมาณขึ้นจากเชื้อเริ่มต้น 6.24 log CFU/ml เป็น 7.07 – 7.39 log CFU/ml แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยทุกความเข้มข้นการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นประมาณ 1-1.5 log ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) (ตารางที่ 4.8)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ที่เวลาเพิ่มขึ้น ค่า pH ลดลง โดยเอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่เวลา 1 นาที ความเข้มข้น 0% พบค่า pH เท่ากับ 6.96 ± 0.11 ความเข้มข้น 5 และ 10% ค่า pH เท่ากับ 6.20 ± 0.62 และ 6.08 ± 0.42 ตามลำดับ เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ค่า pH ที่ความเข้มข้น 0% มีค่า 5.30 ± 0.29 ความเข้มข้น 5 และ 10% ค่า pH เท่ากับ 4.95 ± 0.17 และ 4.83 ± 0.23 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10)

จากผลการศึกษาความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y แสดงให้เห็นว่าการเติมสารแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ที่เชื้อเริ่มต้น $6.24 \log \text{CFU/ml}$

4.3.2 ผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ต่อการยับยั้งของ *B. cereus* ในสภาวะที่มีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0

เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ด้วยกรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5, และ 10% ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.06 และ $6.66 \log \text{CFU/ml}$ ผลการทดลองดังตารางที่ 4.11 และ 4.12 และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารแบคทีเรียโอซิน ดังตารางที่ 4.13

จากตารางที่ 4.11 พบว่าการปรับค่า pH 4.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาร KL-1Y ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ เมื่อเวลาที่เพิ่มขึ้นกับความเข้มข้นของสาร KL-1Y ความเข้มข้น 5 และ 10% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ ไม่ต่างกัน ($P < 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 0% เวลาที่ 18 ชั่วโมง พบว่าการเหลือรอดของเชื้ออยู่ที่ $1.20 \pm 0.07 \log \text{CFU/ml}$ ซึ่งแตกต่างกับสาร KL-1Y ที่ความเข้มข้น 5 และ 10% การเหลือรอดของเชื้ออยู่ที่ $1.00 \pm 0.00 \log \text{CFU/ml}$ ($P < 0.05$) โดยพบว่าที่เวลา 18 ชั่วโมงสามารถลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* LT7 ลงได้ $2 \log \text{CFU/ml}$

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่เวลาต่างกันต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus* LT7 เริ่มต้น 3.64 log CFU/ml

เวลา	ความเข้มข้นสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ต่อปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 ที่เหลือรอด (log CFU/ml)					
	0%	% การลดลงของเชื้อ	5%	% การลดลงของเชื้อ	10%	% การลดลงของเชื้อ
1 นาที	3.64 ± 0.44 ^{aA}	-	3.66 ± 0.55 ^{aA}	-	3.58 ± 0.56 ^{aA}	1.64
6 ชั่วโมง	6.30 ± 0.56 ^{aB}	-	6.26 ± 0.61 ^{aB}	-	6.22 ± 0.57 ^{aB}	-
12 ชั่วโมง	7.16 ± 0.39 ^{aC}	-	7.12 ± 0.35 ^{aC}	-	6.88 ± 0.15 ^{aBC}	-
18 ชั่วโมง	7.62 ± 0.12 ^{aC}	-	7.36 ± 0.46 ^{aC}	-	7.34 ± 0.46 ^{aC}	-
24 ชั่วโมง	7.81 ± 0.21 ^{bC}	-	7.64 ± 0.10 ^{abC}	-	7.51 ± 0.06 ^{aC}	-

หมายเหตุ : การทดลองค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ; KL-1Y = สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันแถวแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันแถวแนวดิ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

- = ไม่มี % การลดลงของเชื้อ

% การลดลงของเชื้อ = $\frac{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (log CFU/ml)}}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)}} \times 100$

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)

ตารางที่ 4.8 ผลการทดสอบสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่เวลาต่างกันต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus* LT7 เริ่มต้น 6.24 log CFU/ml

เวลา	ความเข้มข้นสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ต่อปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 ที่เหลือรอด (log CFU/ml)					
	0%	% การลดลงของเชื้อ	5%	% การลดลงของเชื้อ	10%	% การลดลงของเชื้อ
1 นาที	6.24 ± 0.85 ^{aA}	-	6.09 ± 0.57 ^{aA}	2.40	6.13 ± 0.58 ^{aA}	1.76
6 ชั่วโมง	7.23 ± 0.45 ^{aB}	-	7.34 ± 0.64 ^{aB}	-	7.07 ± 0.53 ^{aB}	-
12 ชั่วโมง	7.37 ± 0.30 ^{aB}	-	7.50 ± 0.13 ^{aB}	-	7.47 ± 0.11 ^{aB}	-
18 ชั่วโมง	7.25 ± 0.13 ^{aB}	-	7.22 ± 0.28 ^{aB}	-	7.31 ± 0.14 ^{aB}	-
24 ชั่วโมง	7.39 ± 0.10 ^{aB}	-	7.18 ± 0.51 ^{aB}	-	7.33 ± 0.05 ^{aB}	-

หมายเหตุ : การทดลองค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ; KL-1Y = สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันแถวแนวนอนมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันแถวแนวดิ่งมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

- = ไม่มี % การลดลงของเชื้อ

% การลดลงของเชื้อ = $\frac{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (log CFU/ml)}}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)}} \times 100$

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)

ตารางที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารแบคทีเรียโอสติน KL-1Y ที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.64 log CFU/ml

เวลา	pH		
	ความเข้มข้นของสาร KL-1Y		
	0%	5%	10%
1 นาที	6.96 ± 0.04	6.63 ± 0.04	6.29 ± 0.01
6 ชั่วโมง	5.86 ± 0.20	6.04 ± 0.58	5.93 ± 0.01
12 ชั่วโมง	5.55 ± 0.28	5.22 ± 0.31	5.32 ± 0.01
18 ชั่วโมง	5.27 ± 0.01	5.18 ± 0.04	5.14 ± 0.01
24 ชั่วโมง	5.13 ± 0.01	5.06 ± 0.08	5.07 ± 0.02

หมายเหตุ : KL-1Y = สารแบคทีเรียโอสตินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารแบคทีเรียโอสติน KL-1Y ที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.24 log CFU/ml

เวลา	pH		
	ความเข้มข้นของสาร KL-1Y		
	0%	5%	10%
1 นาที	6.96 ± 0.11	6.20 ± 0.62	6.08 ± 0.42
6 ชั่วโมง	5.73 ± 0.58	5.51 ± 0.28	5.63 ± 0.19
12 ชั่วโมง	5.38 ± 0.02	5.02 ± 0.02	5.33 ± 0.06
18 ชั่วโมง	5.36 ± 0.01	5.03 ± 0.03	5.17 ± 0.01
24 ชั่วโมง	5.30 ± 0.29	4.95 ± 0.17	4.83 ± 0.23

หมายเหตุ : KL-1Y = สารแบคทีเรียโอสตินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

เมื่อเปรียบเทียบผลความเข้มข้นของสาร KL-1Y ในแต่ละความเข้มข้นกับเวลาต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 พบว่าในช่วงเวลา 6 – 12 ชั่วโมง พบปริมาณเชื้อลดลง ทุกความเข้มข้นไม่แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยปริมาณเชื้อลดลงประมาณ 1 log CFU/ml และการลดลงของเชื้อในช่วง 13.07 – 21.56% ที่เวลา 18 ชั่วโมง ทุกความเข้มข้นพบปริมาณเชื้อลดลง 2 log CFU/ml และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อเปรียบเทียบการลดลงของเชื้อที่ความเข้มข้นของสาร KL-1Y 0% การลดลงของเชื้ออยู่ที่ 60.78% ที่ความเข้มข้น 5 และ 10% การลดลงของเชื้ออยู่ที่ 67.32% และที่เวลา 24 ชั่วโมงไม่พบการลดลงของเชื้อ แต่เชื้อมีแนวโน้มเจริญเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.11)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยกรดซิตริก pH 4.0 ร่วมกับการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% พบว่าเวลาเพิ่มขึ้นค่า pH มีแนวโน้มลดลงเล็กน้อยใน 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นค่า pH คงที่จนครบ 24 ชั่วโมง โดยที่เวลา 1 นาที ความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y 0% ค่า pH เท่ากับ 4.94 ± 0.01 ความเข้มข้น 5 และ 10% ค่า pH เท่ากับ 4.77 ± 0.01 และ 4.65 ± 0.01 ตามลำดับ เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ค่า pH ความเข้มข้น 0% มีค่า 4.06 ± 0.05 ความเข้มข้น 5 และ 10% ค่า pH เท่ากับ 3.99 ± 0.00 และ 3.93 ± 0.01 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.13)

เมื่อทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ด้วยกรดซิตริกในอาหารเลี้ยงเชื้อ ร่วมกับการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5, และ 10% ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.66 log CFU/ml ผลการทดลองดังตารางที่ 4.12 และการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารแบคทีเรียโอซิน ดังตารางที่ 4.14

จากตารางที่ 4.12 พบว่าการปรับค่า pH 4.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสาร KL-1Y ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ เมื่อเวลาที่เพิ่มขึ้นกับความเข้มข้นของสาร KL-1Y ความเข้มข้น 5 และ 10% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ ไม่ต่างกัน ($P < 0.05$) แต่ที่ความเข้มข้น 10% เวลาที่ 6 ชั่วโมง พบว่าการเหลือรอดของเชื้ออยู่ที่ 5.75 ± 0.67 log CFU/ml ซึ่งแตกต่าง ($P < 0.05$) กับสาร KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0 และ 5% การเหลือรอดของเชื้ออยู่ที่ 5.20 ± 0.15 และ 5.62 ± 0.43 log CFU/ml โดยพบว่าที่เวลา 12 - 24 ชั่วโมงสามารถลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* LT7 ลงได้ไม่แตกต่างกัน ($P < 0.05$) โดยเชื้อจะลดลง 1 log CFU/ml

เมื่อเปรียบเทียบผลความเข้มข้นของสาร KL-1Y ในแต่ละความเข้มข้นกับเวลาต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 พบว่าในช่วงเวลา 6 - 24 ชั่วโมง พบปริมาณเชื้อลดลง ทุกความเข้มข้นไม่แตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยปริมาณเชื้อลดลงประมาณ 1 log CFU/ml และการลดลงของเชื้อในช่วง 13.66 - 22.97% ที่เวลา 24 ชั่วโมง ความเข้มข้น 10% การลดลงของเชื้ออยู่ที่ 18.76% การลดลงของเชื้อแตกต่างทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยเชื้อมีแนวโน้มเจริญเพิ่มขึ้น (ตารางที่ 4.12)

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ด้วยกรดซิตริก pH 4.0 ร่วมกับการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% พบว่าเวลาเพิ่มขึ้นค่า pH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเล็กน้อยใน 6 ชั่วโมงแรก จากนั้นค่า

pH จะลดลงและคงที่จนครบ 24 ชั่วโมง แต่ที่ความเข้มข้น 10% ค่า pH มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่เวลา 6 – 18 ชั่วโมง และลดลงที่เวลา 24 ชั่วโมง โดยที่เวลา 1 นาที ความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y 0% ค่า pH เท่ากับ 4.14 ± 0.10 ความเข้มข้น 5 และ 10% ค่า pH เท่ากับ 4.00 ± 0.01 และ 4.88 ± 0.07 ตามลำดับ เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ค่า pH ความเข้มข้น 0% มีค่า 4.04 ± 0.05 ความเข้มข้น 5 และ 10% ค่า pH เท่ากับ 4.01 ± 0.01 และ 3.91 ± 0.05 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.14)



ตารางที่ 4.11 ผลการทดสอบสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ที่เวลาต่างกันต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus* LT7 เริ่มต้น 3.06 log CFU/ml

เวลา	ความเข้มข้นสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ต่อปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 ที่เหลือรอด (log CFU/ml)					
	0%	% การลดลงของเชื้อ	5%	% การลดลงของเชื้อ	10%	% การลดลงของเชื้อ
1 นาที	3.06 ± 0.06 ^{aC}	-	3.27 ± 0.44 ^{aD}	-	3.29 ± 0.48 ^{aD}	-
6 ชั่วโมง	2.66 ± 0.11 ^{aC}	13.07	2.59 ± 0.09 ^{aC}	15.35	2.57 ± 0.29 ^{aC}	16.01
12 ชั่วโมง	2.49 ± 0.52 ^{aC}	18.62	2.40 ± 0.21 ^{aC}	21.56	2.48 ± 0.33 ^{aC}	18.94
18 ชั่วโมง	1.20 ± 0.07 ^{bA}	60.78	1.00 ± 0.00 ^{aA}	67.32	1.00 ± 0.00 ^{aA}	67.32
24 ชั่วโมง	1.83 ± 0.41 ^{aB}	40.19	1.78 ± 0.35 ^{aB}	41.83	1.67 ± 0.37 ^{aB}	45.42

หมายเหตุ : การทดลองค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ; KL-1Y = สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแต่ละแถวมีความแตกต่างกันทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

- = ไม่มี % การลดลงของเชื้อ

% การลดลงของเชื้อ = $\frac{[\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (log CFU/ml)}]}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)}} \times 100$

ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ที่เวลาต่างกันต่อปริมาณเชื้อ *B. cereus* LT7 เริ่มต้น 6.66 log CFU/ml

เวลา	ความเข้มข้นสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ต่อปริมาณเชื้อ <i>B. cereus</i> LT7 ที่เหลือรอด (log CFU/ml)					
	0%	% การลดลงของเชื้อ	5%	% การลดลงของเชื้อ	10%	% การลดลงของเชื้อ
1 นาที	6.67 ± 0.30 ^{ab}	-	6.64 ± 0.39 ^{ab}	0.45	6.56 ± 0.30 ^{ab}	1.50
6 ชั่วโมง	5.20 ± 0.15 ^{aa}	22.07	5.62 ± 0.43 ^{aa}	15.61	5.75 ± 0.67 ^{aaB}	13.66
12 ชั่วโมง	5.13 ± 0.14 ^{aa}	22.97	5.56 ± 0.51 ^{aa}	16.66	5.35 ± 0.60 ^{aa}	19.81
18 ชั่วโมง	5.20 ± 0.32 ^{aa}	21.92	5.33 ± 0.41 ^{aa}	19.96	5.32 ± 0.61 ^{aa}	20.12
24 ชั่วโมง	5.34 ± 0.55 ^{aa}	19.96	5.34 ± 0.73 ^{aa}	19.81	5.41 ± 0.80 ^{aaB}	18.76

หมายเหตุ : การทดลองค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ; KL-1Y = สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกันในแต่ละแถวแสดงความแตกต่างทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ($P < 0.05$) โดยวิธี LSD

- = ไม่มี % การลดลงของเชื้อ

$$\% \text{ การลดลงของเชื้อ} = \frac{[\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)} - \text{ปริมาณเชื้อที่เหลือรอด (log CFU/ml)}]}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log CFU/ml)}} \times 100$$

ตารางที่ 4.13 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อปรับกรดซिटริก pH 4.0 ร่วมกับการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.06 log CFU/ml

เวลา	pH		
	ความเข้มข้นของสาร KL-1Y ปรับ pH 4.0		
	0%	5%	10%
1 นาที	4.94 ± 0.01	4.77 ± 0.01	4.65 ± 0.01
6 ชั่วโมง	4.09 ± 0.01	4.43 ± 0.01	3.96 ± 0.01
12 ชั่วโมง	4.12 ± 0.02	4.03 ± 0.04	3.94 ± 0.02
18 ชั่วโมง	4.07 ± 0.01	4.02 ± 0.01	3.95 ± 0.01
24 ชั่วโมง	4.06 ± 0.05	3.99 ± 0.00	3.93 ± 0.01

หมายเหตุ : KL-1Y = สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

ตารางที่ 4.14 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อปรับกรดซिटริก pH 4.0 ร่วมกับการเติมสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ระยะเวลาการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6.66 log CFU/ml

เวลา	pH		
	ความเข้มข้นของสาร KL-1Y ปรับ pH 4.0		
	0%	5%	10%
1 นาที	4.14 ± 0.10	4.00 ± 0.01	3.88 ± 0.07
6 ชั่วโมง	4.16 ± 0.09	4.01 ± 0.03	3.90 ± 0.06
12 ชั่วโมง	4.06 ± 0.01	4.01 ± 0.01	3.96 ± 0.01
18 ชั่วโมง	4.07 ± 0.01	4.01 ± 0.01	3.96 ± 0.01
24 ชั่วโมง	4.04 ± 0.05	4.01 ± 0.01	3.91 ± 0.05

หมายเหตุ : KL-1Y = สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

จากผลความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 ในการกำจัดเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* LT7 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ 3 และ 6 log CFU/ml การใช้สารแบคทีเรียโอซินเพียงอย่างเดียวทุกความเข้มข้นไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ แต่เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้นทำให้ค่า pH ลดลงเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์มีการใช้กลูโคส เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่นิยมนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารเกิดกระบวนการ glucose metabolism มีผลทำให้เกิดกรดอะซิติกและกรดไพรูวิก (Haavik, 1974) และจากผลการระบุสายพันธุ์เชื้อ *B. cereus* ข้อ 4.1 พบว่าเชื้อ *B. cereus* LT7 สามารถย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสได้ส่งผลให้ค่า pH ลดลงผลของความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซินในสภาวะมีการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% พบว่าที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 3.06 log CFU/ml เวลาผ่านไป 18 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ได้ทุกความเข้มข้น พบปริมาณเชื้อลดลงประมาณ 2 log CFU/ml พบว่าที่ความเข้มข้น 5 และ 10% การลดลงของเชื้ออยู่ที่ 67.32% และที่เชื้อเริ่มต้น 6 log CFU/ml ปริมาณเชื้อลดลง 1 log CFU/ml ตั้งแต่เวลาที่ 6 ชั่วโมง จนถึง 24 ชั่วโมงทุกความเข้มข้นซึ่งพบการลดลงของเชื้ออยู่ที่ 13.07 และ 45.42% แสดงว่าการปรับค่า pH ให้เหมาะสมกับการทำงานของสารแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* และสารแบคทีเรียโอซินสามารถทำลายเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้โดยกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากการทำให้เกิดรูที่ฟอสโฟไลปิดในเซลล์เมมเบรนของเชื้อเป้าหมาย ทำให้เซลล์สูญเสียความสมดุลและพลังงานภายในเซลล์ ทำให้เซลล์บาดเจ็บและตาย ซึ่งคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่คือทนกรดและความร้อนสูงได้ดี (อรอนงค์ พริ้งสุลกะ, 2550)

สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 (Rumjuankiat et al., 2015) เป็นแบคทีเรียโอซินที่อยู่ใน class II มีคุณสมบัติทนความร้อนสูง (Ahmad et al., 2017) การทดลองของ Rumjuankiat et al. (2015) ได้ศึกษาการทำให้บริสุทธิ์และการกำหนดคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซิน ที่มีชื่อว่า plantaricin KL-1Y ที่ได้จากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 พบว่าแบคทีเรียโอซิน มีความสามารถในการยับยั้ง *B. cereus* JCM 2125^T ได้ และได้ศึกษาผลของ pH กับอุณหภูมิที่ 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส ต่อกิจกรรมการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มแกรมบวกและแกรมลบของสาร KL-1Y ที่ pH 4.0 พบว่าสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ยังมีกิจกรรมอยู่ 100% และสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบหลังผ่านการให้ความร้อนตามอุณหภูมิและเวลาที่กำหนด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Rosslund et al. (2003) ที่ศึกษาการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* โดยใช้สายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus* และเชื้อ *Lactococcus* ในนม พบว่าการเติมเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* และเชื้อ *Lactococcus* สามารถที่จะลดจำนวนเชื้อ *B. cereus* ได้ 2-3 log CFU/ml ในเวลา 24 – 48 ชั่วโมง และมีการใช้เชื้อ *Lb. plantarum* 2741 ในการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* โดยปริมาณเชื้อเริ่มต้น 2.22 log CFU/ml พบว่าที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถลดเชื้อ *B. cereus* ได้ <1 log CFU/ml ที่ค่า pH 4.2 และ Xinran et al. (2018) ได้ศึกษาการทำงานของ plantaricin JY22 ที่ผลิตโดย *Lb. plantarum* JY22 แยกได้จากลำไส้ปลาการ์ปสีทองต่อเชื้อ *B. cereus* พบว่าสารแบคทีเรียโอซิน plantaricin JY22 ทำให้เซลล์และสปอร์ของเชื้อ *B. cereus* เกิดการบาดเจ็บ และยับยั้งเชื้อได้ และมีคุณสมบัติในการทนความร้อนสูง และมีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในช่วง pH 2.5 – 5.5

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน plantaricin KL-1Y ที่ได้จากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 พบว่าที่ความเข้มข้น 10% ที่เวลา 18 - 24 ชั่วโมง เป็นสภาวะที่เหมาะสมและสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ดีที่สุดจึงเลือกสภาวะนี้มาทำการศึกษาผลของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ต่อการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในเมล็ดบัวตัมเป็นขั้นถัดไป

4.4 การศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ในการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเมล็ดบัวตัม

จากผลการศึกษาความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซินและเวลาที่ใช้ในการกำจัดเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* พบว่าสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 10% เวลาช่วง 18 - 24 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ จึงทำการทดสอบกับเมล็ดบัวตัมโดยนำมาแช่สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 แล้วนำไปแช่เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 22 ชั่วโมง

ผลการตรวจวิเคราะห์ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเมล็ดบัวตัมเริ่มต้นมีค่า 6.31 log CFU/g จากนั้นแช่เมล็ดบัวในสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10% เป็นเวลา 22 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส นำเมล็ดบัวมาตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมีค่า 4.49 log CFU/g หลังจากนั้นนำเมล็ดบัวที่ผ่านการแช่สารแบคทีเรียโอซิน ไปนึ่งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ไม่พบการเหลือรอดของเชื้อจุลินทรีย์และเมื่อนำน้ำแช่เมล็ดบัวไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ก่อนการจืดเก็บมีค่า pH เริ่มต้น 4.6 และเมื่อจืดเก็บครบเวลา นำน้ำที่แช่เมล็ดบัวมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) มีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 5.55 (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.15 ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของเมล็ดบัวตัมก่อนและหลังการแช่สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 10% เวลา 22 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส

สภาวะในการทดลอง	ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)
เมล็ดบัวเริ่มต้น	6.31 ± 0.03
เมล็ดบัวหลังแช่สารแบคทีเรียโอซิน	4.49 ± 0.10
เมล็ดบัวหลังการนึ่ง	ND
น้ำแช่เมล็ดบัว	6.82 ± 0.48

หมายเหตุ : ND = ตรวจไม่พบ (Not Detect) ที่ระดับเงื่อนจาง <10; ทำการทดลองค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ทำการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของเมล็ดบัวตัม หลังผ่านการแช่สารแบคทีเรียโอซินความเข้มข้น 10% เวลา 22 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส พบว่าเมล็ดบัวยังมีลักษณะ
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้เผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางกายภาพเหมือนตอนก่อนแช่ คือยังมีลักษณะเป็นเม็ดสมบูรณ์ มีความเป็นแป้งที่เนื้อเม็ดบัวไม่พบว่ามึกลื่นเหมือนเปรี้ยวหรือกลื่นไม่พึงประสงค์อื่นเกิดขึ้น เมื่อนำเม็ดบัวไปผ่านการนึ่ง ลักษณะเม็ดบัวหลังการนึ่งยังคงปกติ (ภาพที่ 4.2)

จากศึกษาผลความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1 ที่ความเข้มข้น 10% เวลา 22 ชั่วโมง เก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ตรวจพบเชื้อที่เหลือรอด $4.49 \pm 0.10 \log \text{CFU/ml}$ มีผลทำให้เชื้อลดลง $1.82 \log \text{CFU/ml}$ ซึ่งเชื้อที่ลดลงเนื่องมาจากสารแบคทีเรียโอซินและการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 รวมถึงการแช่เย็น

การจัดเก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส เพื่อชะลอการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ และยังช่วยรักษาสภาพของเม็ดบัวให้มีคุณภาพตามที่กำหนดไว้ จากนั้นนำเม็ดบัวจากการแช่สารแบคทีเรียโอซินไปทำการนึ่งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที ตรวจปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่พบการเหลือรอดของเชื้อจุลินทรีย์หลังผ่านการนึ่ง ซึ่งความร้อนและเวลาที่ใช้สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด



ก

ภาพที่ 4.2 ลักษณะของเม็ดบัวเริ่มต้น (ก), ลักษณะของเม็ดบัวหลังการแช่สารแบคทีเรียโอซิน (ข) และเม็ดบัวหลังการนึ่ง (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10% (ในเมล็ดบัวตัม 25 กรัม) ต่อการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในวัตถุดิบเมล็ดบัวตัมได้ สอดคล้องกับ Yasmina และคณะ (2002) รายงานว่าการใช้สารไนซินร่วมกับกรดแลคติกสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จำพวกต้องการอากาศในการเจริญเติบโต total coliforms ในเนื้อโคสดได้ดีกว่าการใช้สารไนซิน หรือกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว และ Mustapha และคณะ (2002) การใช้สารผสมระหว่างสารไนซินร่วมกับกรดนั้นสามารถลดเชื้อ *E. coli* ที่ปนเปื้อนในเนื้อโคเหลือ 2-3 log CFU/cm² โดยใช้เชื้อเริ่มต้น 7 log CFU/cm² เก็บรักษาเนื้อโคที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การแช่สารแบคทีเรียโอซินในเมล็ดบัวตัมสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดได้จากปริมาณเชื้อเริ่มต้น 6 log CFU/ml ระยะเวลาที่ใช้ตั้งแต่ 18 ชั่วโมงขึ้นไป สามารถลดปริมาณเชื้อลงมาได้ 2 log CFU/ml โดยเมื่อเปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานการรับวัตถุดิบของโรงงาน และเกณฑ์มาตรฐานคุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2560) พบว่าอยู่ในเกณฑ์ที่กำหนดและคุณภาพของเมล็ดบัวไม่มีการเปลี่ยนแปลงยังคงลักษณะตามเกณฑ์ที่กำหนดไว้คือมีความเป็นเนื้อแป้งไม่แข็งหรือความเป็นแป้งลดลง และไม่มีกลิ่นที่ไม่เป็นลักษณะที่ต้องการ เช่น กลิ่นเหม็นเปรี้ยว ดังนั้นเมล็ดบัวตัมที่ผ่านการแช่สารแบคทีเรียโอซินสามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ใส่เมล็ดบัวกวน หรือผลิตภัณฑ์อื่นได้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในเมล็ดบัวคัมและไส้เมล็ดบัวกววนของโรงงานอาหารแห่งหนึ่ง เปรียบเทียบกับเกณฑ์มาตรฐานวัตถุดิบของโรงงาน พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด Coliforms, *E. coli* และ *Bacillus* spp. มีค่าเกินเกณฑ์มาตรฐาน 83.3, 46.7, 26.7 และ 80.0% ตามลำดับ ไส้เมล็ดบัวกววนตรวจพบปริมาณเชื้อ *Bacillus* spp. เกินเกณฑ์มาตรฐานคิดเป็น 42.9% และผลตรวจยืนยันเชื้อ *B. cereus* ที่แยกได้จากเมล็ดบัวคัมด้วยการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ระบุสายพันธุ์เชื้อที่แยกได้ คือ *B. cereus* LT5, LT6 และ LT7

ผลการศึกษาสารแบคทีเรีย ไอซอินในการยับยั้งเซลล์ของเชื้อ *B. cereus* ด้วยวิธี agar well diffusion โดยทำการเปรียบเทียบกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรีย ไอซอิน D4 และ KL-1Y กับเชื้อ *B. cereus* LT5, LT6, LT7 และ *B. cereus* AIKL1062 พบว่าสารแบคทีเรีย ไอซอิน KL-1Y สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ทุกสายพันธุ์และสารแบคทีเรีย ไอซอิน D4 พบว่าไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* ได้ สาร KL-1Y ยับยั้งเชื้อ *B. cereus* AIKL1062 ได้น้อยที่สุด มีบริเวณยับยั้งขนาด 0.70 ± 0.38 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *B. cereus* LT7 พบบริเวณยับยั้งขนาด 1.08 ± 0.12 มิลลิเมตร มากกว่าการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* LT5 และ LT6 พบบริเวณยับยั้งขนาด 1.92 ± 0.27 และ 1.52 ± 0.20 มิลลิเมตร ดังนั้นเชื้อ *B. cereus* LT7 มีความต้านทานสารแบคทีเรีย ไอซอินมากที่สุด และสารแบคทีเรีย ไอซอินมีกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้ดีที่สุดคือสาร KL-1Y ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

ผลของความเข้มข้นและเวลาของสารแบคทีเรีย ไอซอิน KL-1Y ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $3.64 \log \text{CFU/ml}$ พบว่าสารแบคทีเรีย ไอซอิน KL-1Y ที่ความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ทุกช่วงเวลา แต่ที่ความเข้มข้น 10% สามารถช่วยชะลอการเจริญของเชื้อ *B. cereus* LT7 ได้ในช่วงเวลา 6 – 12 ชั่วโมงแรก แต่เมื่อใช้สาร KL-1Y ทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 พบว่าปริมาณเชื้อเริ่มต้น $3.06 \log \text{CFU/ml}$ ความเข้มข้น 10% ที่เวลา 18 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณเชื้อ *B. cereus* LT7 พบเชื้อเหลือรอด $1.00 \pm 0.00 \log \text{CFU/ml}$ ลดปริมาณเชื้อลง $2.29 \log \text{CFU/ml}$ (การลดลงของเชื้อ 67.32%) และที่ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $6.24 \log \text{CFU/ml}$ พบว่าการใช้สารแบคทีเรีย ไอซอินที่ไม่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่าง (pH) ไม่สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ แต่เมื่อใช้สารแบคทีเรียโอซินและทำการปรับค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH) 4.0 พบว่าความเข้มข้น 10% สามารถลดปริมาณเชื้อจากปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ $6.66 \log \text{CFU/ml}$ ที่เวลา 18 ชั่วโมง พบเชื้อเหลือรอด $5.32 \pm 0.61 \log \text{CFU/ml}$ สามารถลดเชื้อ *B. cereus* LT7 ลงได้ $1.24 \log \text{CFU/ml}$ (การลดลงของเชื้อ 20.12%)

การศึกษาผลของความเข้มข้นและระยะเวลาของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ในการกำจัดเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเมล็ดบัวตัมด้วยการแช่สารแบคทีเรียโอซินความเข้มข้น 10% ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ต่าง (pH) 4.0 เก็บที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 22 ชั่วโมง ตรวจพบปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเมล็ดบัวตัมเริ่มต้น $6.31 \pm 0.03 \log \text{CFU/g}$ หลังจากนำเมล็ดบัวตัมไปแช่สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10% จนครบเวลานำเมล็ดบัวตัมมาตรวจหาปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดพบปริมาณ $4.49 \pm 0.10 \log \text{CFU/g}$ สามารถลดเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดลงได้ $1.82 \log \text{CFU/g}$ หลังจากนั้นนำเมล็ดบัวตัมที่ผ่านการแช่สารแบคทีเรียโอซินไปนึ่งที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ตรวจไม่พบการเหลือรอดของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการแช่เมล็ดบัวตัมด้วยสารแบคทีเรียโอซินความเข้มข้น 10% ที่อุณหภูมิ 4 ± 1 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 22 ชั่วโมง สามารถลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบเมล็ดบัวตัมได้บางส่วนก่อนนำไปผ่านกระบวนการแปรรูปไปเป็นไส้เมล็ดบัวตัมต่อไป

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ผู้ผลิตเมล็ดบัวตัม สถานที่ผลิตเมล็ดบัวตัมนั้นมีส่วนทำให้เกิดการปนเปื้อนเชื้อได้ทุกขั้นตอนการผลิต จากการตรวจสอบโรงงานผู้ผลิตควรมีการปรับปรุงสถานที่ผลิตให้สอดคล้องตามหลักเกณฑ์วิธีการที่ดีในการผลิตอาหาร Good Manufacturing Practice (GMP) คือ บริเวณสถานที่การผลิตต้องแบ่งส่วนการเตรียมวัตถุดิบ การฆ่าเชื้อ การบรรจุให้ชัดเจน เช่น

ขั้นตอนการแช่เมล็ดบัวตัมที่ใช้ในการแช่คือโถพลาสติกที่บริเวณปากจะมีมุมพับเข้าด้านใน เกิดเป็นบริเวณที่การทำความสะอาดเข้าไม่ถึงและเกิดการสะสมของสิ่งสกปรกและเชื้อจุลินทรีย์ได้ การแก้ไขเปลี่ยนแปลงอุปกรณ์ในการแช่โดยใช้ถังพลาสติกที่ไม่มีการพับปากถึงเข้าด้านในหรือใช้ถังสเตนเลสในการแช่เมล็ดบัวตัมแทนอุปกรณ์เดิม เพื่อการทำความสะอาดจะได้ทั่วถึงและลดการสะสมของสิ่งสกปรกและเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดจากการทำความสะอาดไม่ทั่วถึง

ขั้นตอนการลอกเปลือกและผ่าซีกเมล็ดบัวตัมจะมีการใช้เครื่องลอกเปลือก สำหรับลอกเปลือกเมล็ดบัวตัมที่ผ่านการต้ม จากการตรวจสอบพบว่าบริเวณกระบะรับเมล็ดบัวตัมที่ผ่านเครื่องลอกเปลือกจะมีลักษณะเป็นกระบะ 4 เหลี่ยม และเกิดการสะสมสิ่งสกปรกจากการทำความสะอาดที่ไม่

ทั่วถึงบริเวณมุมทั้ง 4 ดังนั้นควรเปลี่ยนลักษณะของกระเบื้องไม้ใหม่ไม่ให้มีมุมเพื่อลดการสะสมของสิ่งสกปรกที่เกิดจากการทำความสะอาดไม่ทั่วถึง

ขั้นตอนการล้างเม็บบัวหลังการลอกเปลือกควรจะใช้สำหรับล้างที่มีการยกสูงจากพื้นไม่น้อยกว่า 30 เซนติเมตร เพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้ามเข้ามาในวัตถุดิบ สะดวกต่อการปฏิบัติงานและการทำความสะอาด

ขั้นตอนการต้มฆ่าเชื้อ ต้องมีพื้นที่แยกออกมาจากบริเวณเตรียมวัตถุดิบและมีการกำหนดทางเข้าออกของวัตถุดิบที่ชัดเจน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้ามของเชื้อจุลินทรีย์ หรืออันตรายประเภทอื่นปนเข้ามาในวัตถุดิบ

ขั้นตอนการลดอุณหภูมิของวัตถุดิบต้องแยกพื้นที่ให้ชัดเจนและจัดทางเข้าออกไม่ให้มีการสวนทางกันระหว่างวัตถุดิบที่ยังไม่ผ่านการฆ่าเชื้อกับวัตถุดิบที่ฆ่าเชื้อมาแล้ว เพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้าม

ขั้นตอนการบรรจุห้องบรรจุต้องมีการแยกพื้นที่ชัดเจน และมีบริเวณการเปลี่ยนชุดของพนักงานก่อนเข้าในห้องบรรจุเพื่อป้องกันการปนเปื้อนข้ามของเชื้อจุลินทรีย์และอันตรายประเภทอื่นๆ เข้าไปในวัตถุดิบได้

ขั้นตอนการขนส่งในกระบวนการขนส่งเม็บบัวต้มของเดิมใช้การขนส่งด้วยรถกระบะธรรมดาไม่ได้มีการควบคุมอุณหภูมิ ดังนั้นต้องมีการควบคุมอุณหภูมิในการขนส่งให้อยู่ที่ 0 – 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ขณะที่ขนส่งและเป็นการคงลักษณะของวัตถุดิบให้ได้คุณภาพตามที่ลูกค้ากำหนด

5.2.2 โรงงานแปรรูปอาหารที่นำเม็บบัวต้มไปใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับกระบวนการแปรรูปก่อนการรับวัตถุดิบ ควรมีโอกาสการตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของวัตถุดิบ เช่น การสุ่มตรวจลักษณะเม็บบัวมีปริมาณแป้งมากน้อยเพียงใด ลักษณะกลิ่นของเม็บบัวมีกลิ่นที่ไม่พึงประสงค์หรือไม่ เช่น กลิ่นเปรี้ยว อุณหภูมิของวัตถุดิบมีอุณหภูมิที่สูงเกินมาตรฐานที่กำหนดหรือไม่ เพราะอุณหภูมิที่สูงขึ้นมีโอกาสที่เชื้อจะเจริญเพิ่มมากขึ้น และเกณฑ์การสุ่มตรวจมาตรฐานทางเชื้อจุลินทรีย์จะต้องมีความถี่ในการสุ่มตามแผนการซักรับตัวอย่างระบุขีดจำกัดคุณภาพที่ยอมรับ (AQL) หรือตามความเหมาะสมของการปฏิบัติงาน และต้องมีแผนรองรับในกรณีที่สินค้าหรือวัตถุดิบไม่ได้ตามมาตรฐาน (Nonconformity product, NC) ต้องมีการดำเนินการอย่างไรกับสินค้าเพื่อป้องกันอันตราย และเมื่อรับวัตถุดิบมาแล้วควรมีพื้นที่การจัดเก็บที่สามารถควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ที่ 0 - 4 องศาเซลเซียส เพื่อชะลอการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และคงไว้ซึ่งลักษณะของวัตถุดิบ และขั้นตอนการนำเม็บบัวไปใช้งาน จุดที่ต้องควบคุมคือเวลาการนึ่งเม็บบัวต้มกับอุณหภูมิต้องไม่น้อยกว่า 30 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อให้ความร้อนฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีในเม็บบัวให้หมด และถ้ามีการใช้สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10% ร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต่าง (pH) 4.0 จุดที่ต้องควบคุมคือ ปริมาณสารแบคทีเรียโอซินที่เติมลงไปต้องคำนวณให้พอดี เพราะจะไม่ได้ความเข้มข้นตามที่กำหนด รวมถึงปริมาณกรดซิตริกที่เติมลงไปต้องได้ค่า pH ตามที่กำหนด เพื่อให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมกับการทำงานของสารแบคทีเรียโอซิน และอุณหภูมิในการจัดเก็บที่ 0 – 4 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันการเน่าเสียของเม็ดบัวต้มขณะแช่ หลังการแช่ต้องมีการกรองน้ำออกอุปกรณ์ในการกรองและภาชนะที่จะใส่เม็ดบัวต้มต้องมีการฆ่าเชื้อมาก่อนเพื่อป้องกันการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์เข้าไปในเม็ดบัวต้มในส่วนขั้นตอนการนึ่งต้องควบคุมเวลาและอุณหภูมิไม่น้อยกว่า 30 นาที ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อให้ความร้อนฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่มีในเม็ดบัวให้หมด

5.2.3 การทดสอบประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y จากงานวิจัยนี้เป็นการใช้สารแบคทีเรียโอซินไม่บริสุทธิ์(Crude Bacteriocin Supernatance, CBS) พบว่าสาร KL-1Y สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* LT7 และลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในเม็ดบัวต้มหลังการแช่สารแบคทีเรียโอซิน KL-1Y ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ได้ระดับหนึ่งแต่ควรมีการทำให้สารมีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น หรือทำให้อยู่ในรูปของแห้ง (spray dry) เพื่อเพิ่มกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และสะดวกต่อการจัดเก็บและการใช้งาน อาจจะมีการประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอซินกับกระบวนการต่างๆก่อนการแปรรูปผลิตภัณฑ์ เช่นการเติมสารแบคทีเรียโอซินลงในขั้นตอนการกวน เพื่อลดความเสี่ยงในด้านความปลอดภัยของอาหารและสุขภาพของผู้บริโภคได้ และควรเพิ่มการทดสอบการยอมรับทางด้านประสาทสัมผัสของผู้บริโภค ด้านกลิ่นและรสชาติ ของเม็ดบัวต้มที่ผ่านการแช่สารแบคทีเรียโอซินร่วมกับการปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 4.0 ทั้งวัตถุดิบและใส่เม็ดบัวกวน เพื่อตรวจสอบว่าผู้บริโภคสามารถยอมรับกลิ่นและรสชาติของวัตถุดิบและสินค้าหลังการแปรรูป

บรรณานุกรม

- กมลวรรณ เตชะวณิช. (2554). คู่มือปลูกและดูแลดอกบัว ราชินีไม้น้ำ-ประดับสวนสวย. กรุงเทพฯ. ไทยควอลิตี้บุ๊ก.
- กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2560). เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร ฉบับที่ 3. สืบค้นเมื่อ 22 กันยายน 2560, จาก http://www.dmsc.moph.go.th/dmscnew/news_detail.php?cid=2&id=1646
- จตุรงค์ ลังกาพินธุ์ สุนัน ปานสาคร และ ภูรินทร์ อัครกุลธร. 2558. การศึกษาและทดสอบเครื่องนวด เมล็ดบัวหลวง. แก่นเกษตร. 43: 161-170.
- ณัฐธิดา จันทร์ประเสริฐ. 2553. การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร โดยแบคทีเรียโอซินแบบหยาบซึ่งผลิตจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์มะดันดอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- บุญศรี จงเสรีจิตต์. 2553. จุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์. โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวัง สนามจันทร์. นครปฐม.
- บุญกร อุดรภิชชาติ. (2555). จุลชีววิทยาทางอาหาร (พิมพ์ครั้งที่ 5). สงขลา. บริษัทนำศิลป์โฆษณา จำกัด.
- มาลัยพร ศรีวิระ. 2551. ผลของสารแบคทีเรียโอซินและสารสกัดโรสแมรี่ต่อคุณภาพทางจุลินทรีย์และเคมี-กายภาพของลูกชิ้นไก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.
- วัฒนาคนบดี วัฒนหงส์ศิริ. 2559. ผลของความร้อนต่อการเหลือรอดของเชื้อ *Bacillus cereus* ในระหว่างการเตรียมข้าวลูกกะปิในครัวโรงพยาบาล. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเทคโนโลยีการจัดและบริการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สุขภาพดี. (2560, 9 กันยายน). เมล็ดบัว แพทย์แนะนำกินได้ กินดี บำรุงสมอง ประสาท และไต. [Postsod](https://www.postsod.com/lotus-seeds-doctor-recommended-nourish-nerve-kidney). สืบค้นเมื่อ 22 กันยายน 2560, จาก <https://www.postsod.com/lotus-seeds-doctor-recommended-nourish-nerve-kidney>
- สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2556). ประกาศกระทรวงสาธารณสุข (ฉบับที่ 364) พ.ศ. 2556 เรื่อง มาตรฐานอาหารด้านจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค. สืบค้นเมื่อ 27 กันยายน 2560,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- จาก <http://elib.fda.moph.go.th/fulltext2/กฎหมาย/กองควบคุมอาหาร/ประกาศกระทรวงสาธารณสุข/56/364.pdf>
- อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์. 23 : 145-148.
- AOAC. (2000). Official Method of Analysis of AOAC international. 17th ed. Maryland. The Association of Official Analytical Chemists.
- Abriouel, H., Maqueda, M., Galvez, A., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. 2001. Inhibition of bacterial growth, enterotoxin production, and spore outgrowth in strains of *Bacillus cereus* by Bacteriocin AS-48. Applied and Environmental Microbiology. 68: 1473-1477
- Andersson, A., U. Ronner and Granum, P. E. (1995). What problems does the food industry have with the spore - forming pathogens *Bacillus cereus* and *Clostridium perfringens*. International Journal of food Microbiology. 28: 145 – 155.
- Arief, I.I., Wulandari, Z., Sinaga, E.S. and Situmorang, D.M. 2017. Application of purified bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* IIA-1A5 as a bio-preservative of beef sausage. Pakistan Journal of Nutrition. 16 (6): 444-450.
- Bottone, E.J. 2010. *Bacillus cereus*, a volatile human pathogen. Chemical Microbiology Reviews. pp. 382-398.
- Christina, T., Penna, V. and Moraes, D.G. (2002). The influence of Nisin on the Thermal Resistance of *Bacillus cereus*. Journal of Food Protection. 65: 415-418.
- Daczkowska-Kozon, E.G., Bednarczyk, A., Biba, M. and Repich, K. 2009. Bacteria of *Bacillus cereus* group in cereals at retail. Pol. Journal of Nutrition Sci. 59: 53-59.
- Ennahar, s., Sashihara, T., Soromoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class II a bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews. 24:85-106.
- Goepfert, J.M., Spira, W.M. and Kim, H.U. 1972. *Bacillus cereus*: food poisoning organism. J. Milk Food Technol. 35: 213-227.
- Lv, X., Miao, L., Ma, H., Bai, F., Lin, Y., Sun, M. and Li, J. 2018. Purification, characterization and action mechanism of plantaricin JY22, a novel bacteriocin against *Bacillus cereus* produced by *Lactobacillus plantarum* JY22 from golden carp intestine. Food Sci Biotechnol. 27(3): 695–703.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Mukherjee, P.K., Mukherjee, D., Maji, A.K., Rai, S. and Heinrich, M. 2009. The sacred lotus *Nelumbo nucifera* phytochemical and therapeutic profile. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 61: 407-422.
- Mustapha, A., Ariyapitipun, T., and Clarke, A.D. 2002. Survival of *Escherichia coli* O157:7 on vacuum-Packaged raw beef treated with polylactic acid, lactic acid and nisin. *J.Food. Sci.* 67(1): 262-267.
- Nandika, A., Arief, I. I. and Wulandari, Z. 2021. Milk quality improvement through the application of plantaricin IIA-1A5 as biopreservatives on fresh milk in dairy cow farm. *IOP Conf. Series: Earth and Environmental Science*. 788: 1-3.
- Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P. and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a tradition Thai fermented sausage. *Journal Food Microbiology*. 81: 137-145.
- Johnson, K.M. 1984. *Bacillus cereus* foodborne illness-An update. *Journal of Food Protection*. 47: 145-153.
- Pal, I. and Dey, P. 2013. A review on lotus *Nelumbo nucifera* seed. *International Journal of Science and Research*. 1659-1666.
- Perez, R.H., Perez, M.T. and Elegado, F.B. 2015. Bacteriocins from lactic acid bacteria: a review of biosynthesis, mode of action, fermentative production, uses, and prospects. *International Journal of Philippine Science and Technology*. 8: 61-67.
- Rumjuankiat, K., Perez, R.H., Pilasombut, K., Keawsompong, S., Zendo, T., Sonomoto, K. and Nitisinprasert, S. 2015. Purification and characterization of a novel plantaricin, KL-1Y, from *Lactobacillus plantarum* KL-1. *World J Microbiol Biotechnol*. 31:983-994.
- Rogers, L.A., and Whittier, E.D. 1982. Limiting Factors in Lactic Fermentation. *Journal of Bacteriology*. 16:211-229.
- Røssland, E., Borge, G. I. A., Langsrud, T. and Sørhaug, T. 2003. Inhibition of *Bacillus cereus* by strains of *Lactobacillus* and *Lactococcus* in milk. *International Journal of Food Microbiology*. 89: 205-212.
- Swetwivathana, A., Fischer, A., Lotong N. and U. Leutz. 1999. Controlling the growth of *Salmonella* Anatum in Nham. Effect of meat starter culture, nitrate, nitrite and garlic. *Fleisch Wirtschaft International*. 9: 124-128.

- Syaputri, Y. and Iwahashi, H. 2020. Characteristics of heterologous plantaricin from *Lactobacillus plantarum* and its future in food preservation. *Reviews in Agricultural Science*. 8: 124–137
- Therdatha, P., Tandumrongpong, C., Pilasombut, K., Matsusaki, H., Keawsompong, S. and Nitisinprasert, S. 2016. Characterization of antimicrobial substance from *Lactobacillus salivarius* KL-D4 and its application as biopreservative for creamy filling. *SpringerPlus*. 5: 1060. Doi: 10.1186/s40064-016-2693-4
- Todorov, S.D., and Dicks, L.M.T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from Molasses Produces Bacteriocins Active against Gram-Negative Bacteria. *Enzyme and Microbial Technology*. 36: 318-326.
- U.S., Food and Drug Administration (FDA). 2002. BAM : Aerobic Plate Count. Retrieved March 3, 2017, from : <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm063346.htm>
- U.S., Food and Drug Administration (FDA). 2002. BAM : *Bacillus cereus*. Available from : <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070875.htm> (Accessed March 3, 2017)
- U.S., Food and Drug Administration (FDA). 2001. BAM : Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. Retrieved March 3, 2017, from : <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm064948>.
- U.S., Food and Drug Administration (FDA). 2003. BAM : Food Sampling/Preparation of Sample Homogenate. Available from : <https://www.fda.gov/food/foodscienceresearch/laboratorymethods/ucm063335.htm> (Accessed March 3, 2017)
- U.S., Food and Drug Administration (FDA). 2001. BAM : *Staphylococcus aureus*. Retrieved March 3, 2017, from : <https://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071429.htm>
- Vos, P., Garrity, G., Jones, D., Krieg, N.R., Ludwig, W., Rainey, F.A., Schleifer, K.-H and Whitman, W. 2009. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. 2nd ed. Georgia. Springer.

Yasmina, B., Kenna, F., and Enrique, M. S. 2002. Combined effects of lactic acid and nisin solution in reducing levels of microbiological contamination in red meat carcasses. *J.Food. Prot.* 65(11): 1780-1783

Zhu, M., Liu, T. and Guo, M. 2016. Current advances in the metabolomics study on lotus seed. *Front Plant Sci.* 7: 891. doi: 10.3389/fpls.2016.00891.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase (Tryptic) Soy Agar (TSA) (Difco,USA)

Trypticase peptone (Tryptone)	15	g
Phytone peptone (Soytone)	5.0	g
NaCl	5.0	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml
Final pH	7.3 ± 0.2	

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวุ้นละลายปรับพีเอชถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ในหลอดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิดเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase (Tryptic) Soy Broth (Bacto,USA)

Trypticase peptone	17.0	g
Phytone peptone	3.0	g
NaCl	5.0	g
K ₂ HPO ₄	2.5	g
Glucose	2.5	g
น้ำกลั่น	1000	ml
Final pH	7.3 ± 0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมดถ่ายอาหารปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกหรือขวดที่มีจุกสำลีหรือฝาปิดเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ Standard plate count agar (APHA) (Oxoid, England)

Pancreatic digest of casein	5.0	g
Yeast extract	2.5	g
Glucose	1.0	g
Agar	15.0	g
Final pH	7.0 ± 0.2	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่งน้ำหนัก PCA 23.5 ± 0.1 กรัม ละลายส่วนผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปให้ความร้อนบน hot plate จนกระทั่งส่วนผสมละลายเข้ากัน ถ่ายใส่ขวดที่มีฝาปิด แล้วนำเข้าฆ่าเชื้อ ใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที pH 7.0 ± 0.2 หลังการฆ่าเชื้อ

ก.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) Agar (Difco, U.S.A)

Beef extract	1	g
Mannitol	10	g
Phenol red	0.025	g
น้ำกลั่น	900	ml
Peptone	10	g
NaCl	10	g
Agar	15	g
Final pH:	7.2 ± 0.2	

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มจนวันละลาย ปรับพีเอช เทสารละลายที่ได้ลงในพลาสติก 500 มิลลิลิตร ให้ได้ พลาสติกละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วนำเข้าฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ก.4.1 เตรียมสารละลาย Polymyxin B solution

ละลายผง Polymyxin B sulfate 1 MU (sigma P1004) ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ 0.2 ไมโครเมตร เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาใช้

ก.4.2 Egg yolk emulsion, 50 %

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ไข่ไก่ไว้ใน 70 % ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่ แล้วทำการแยกไข่ขาว โดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มีขีดบอก ปริมาตร ผสมไข่แดงและน้ำเกลือ 0.85% (Normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยผสมในอัตราส่วน 1:1 ปิดฝาเก็บในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส

ก.4.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งอาหาร MYP agar มา 225 มิลลิลิตร (อุณหภูมิประมาณ 50 องศาเซลเซียส) เติม polymyxin B ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 50 % Egg yolk emulsion ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเทใส่ลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ จะได้อาหาร MYP agar ที่มี polymyxin B 100,000 IU/L

ก.5 น้ำยาเจือจาง Buttlefield's Phosphate Buffered (BAM R11, 2001)

ก.5.1 การเตรียมสารละลายสต็อก

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) 34 กรัมในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 นอร์มัล และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร แล้วนำเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บในตู้เย็น

ก.5.2 การเตรียม Dilution blank

ตวงสารละลายสต็อก 1.25 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่นตวงใส่ขวดปริมาตร 450 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 50 กรัม) หรือ ตวงใส่ขวดปริมาตร 225 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 25 กรัม) และคูด 9 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร นำเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ก.6 สารละลายเปปโตน 0.1%

Peptone	1.0	g
น้ำกลั่น	1,000	ml

ชั่งเปปโตน 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ละลายให้สารเข้ากันตวงใส่ขวดปริมาตร 225 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 25 กรัม) หรือตวงใส่ขวดปริมาตร 90 มิลลิลิตร (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 10 กรัม) และคูด 9 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 มิลลิเมตร นำเข้ามาเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

ก.7 1M Citric Acid (Univar, Australia)

Citric acid	9.61	g
DI Water	100	ml
Total volume	100	ml

ชั่งกรดซิตริก 9.61 กรัมละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร ละลายให้สารเข้ากันและปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น

ก.8 Nisin 5%

Nisin powder	5.0	g
DI Water	100	ml
Total volume	100	ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซังสารไนซินผง 5.0 กรัมละลายในน้ำกลั่นปราศจากไอออน 100 มิลลิลิตร ละลาย
ให้สารเข้ากันและปรับปริมาตร เป็น 100 มิลลิลิตร เก็บในตู้เย็น



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมี

ข.1 การวิเคราะห์ความเป็นกรดต่าง (pH) ตามวิธีการของ (AOAC, 2000)

เมื่อได้ตัวอย่างเมล็ดบัวและใสบัวกวนแล้ว ชั่งตัวอย่างละ 5 กรัม ทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำปราศจากไอออน (DI) ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จำนวน 20 มิลลิลิตร โดยใช้แท่งแก้วผสมตัวอย่างให้เข้ากัน วัดความเป็นกรดต่าง (pH) โดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH meter) โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 3 ครั้ง ซ้ำ และบันทึกผล



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตารางแสดงการเติมปริมาณสารแบคทีเรียโอซิน

ตารางที่ ค.1 ปริมาณสารที่เติมสำหรับการเตรียมสารแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้นต่างกัน

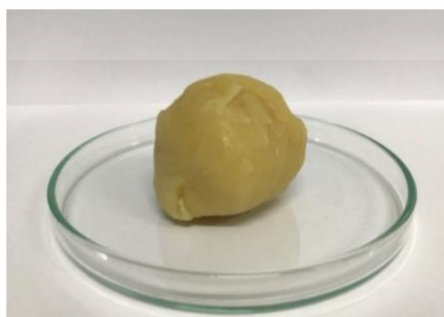
ชนิดสารที่เติม	ความเข้มข้นของสารแบคทีเรียโอซิน (ml)					
	0%	5%	10%	0%	5%	10%
TSB	9	9	9	-	-	-
TSB pH 4.0	-	-	-	9	9	9
Starter <i>B. cereus</i>	1	1	1	1	1	1
KL-1Y	-	0.5	1	-	0.5	1

KL-1Y = สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* KL-1

- = ไม่มีการเติม

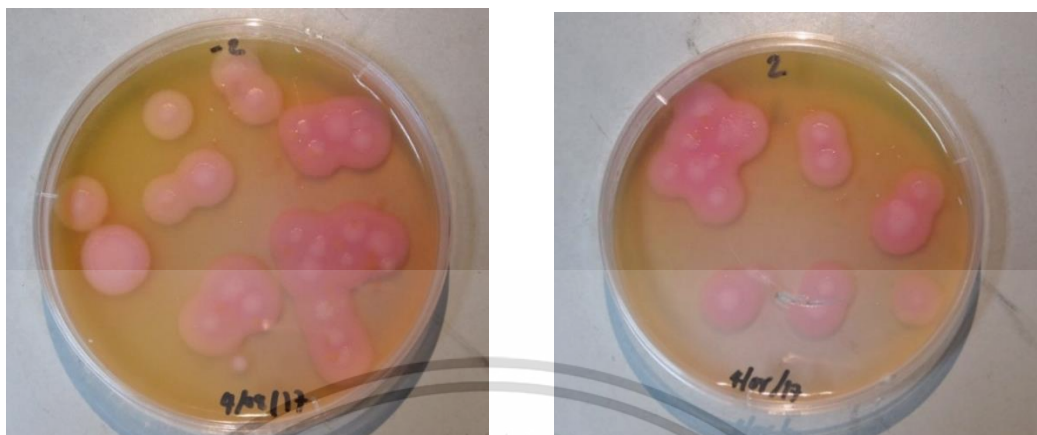


ภาพที่ ค.1 เม็ดบัวหลังต้มจากร้านค้าแห่งหนึ่ง



ภาพที่ ค.2 ใส้บัวกวนจากร้านค้าแห่งหนึ่ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค.3 ลักษณะ โคลนเชื้อ *B. cereus* ที่เจริญบนอาหาร MYP



ภาพที่ ค.4 ลักษณะ โซนไลที่เกิดบนอาหาร 5% sheep blood agar



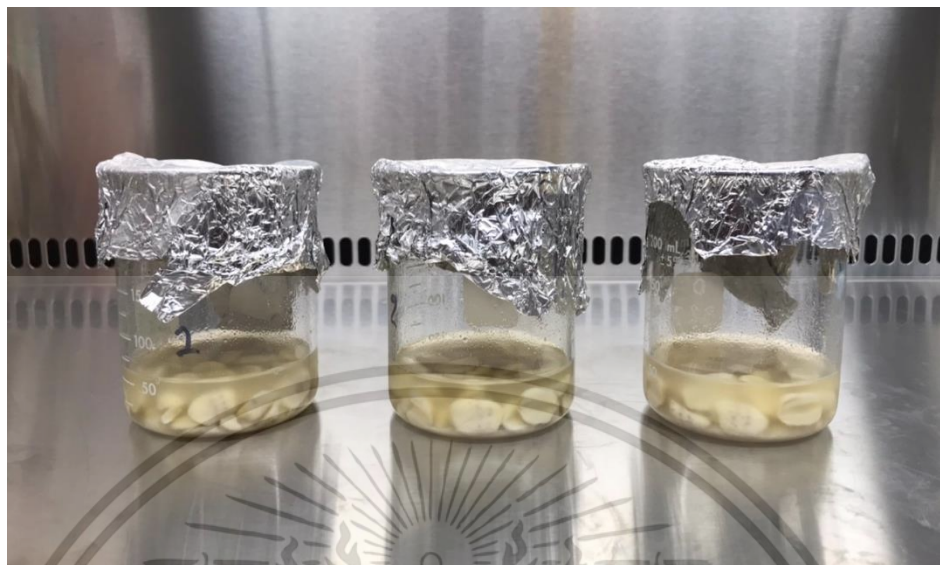
ภาพที่ ค.5 การเจาะหลุมบนอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย cork borer ขนาด 6 มม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับ	ขั้นตอน	รายละเอียด	รูปภาพ	จุดควบคุม
1	เม็ดบัวแห้ง	-		เก็บห้องเย็น อุณหภูมิประมาณ 10-15 C เก็บทั้งกระสอบ (50 กก.) ระยะเวลา ไม่นเกิน 2 ปี
2	แช่เม็ดบัว	แบ่งเม็ดบัวแห้งใส่ถัง น้ำหนัก 25 กก./ถัง ใส่ น้ำให้ท่วมเม็ดบัว		4 ชม. แรก ควนเม็ดบัวทุก 2 ชม. หลังจากนั้นแช่ต่ออีก 4-5 ชม.
3	ต้มลอกเปลือกเม็ดบัว	1 หม้อ จะใส่เม็ดบัว 2 ถัง (50 กก./น้ำหนักเม็ดแห้ง) เดิม นำลงไปให้ท่วมเม็ดบัวและสารเคมีที่ช่วยกัดเปลือกลงไปพร้อมกัน		ใช้ไฟแรง ต้มประมาณ 30 นาที โดยสังเกตจากเปลือกถ้าเริ่มหลุดออกแสดงว่าใช้ได้
4	นำเข้าเครื่องลอกเปลือก	เทเม็ดบัวออกจากหม้อต้ม แล้วนำเข้าเครื่องเพื่อลอกเปลือกและผ่าซีกเม็ดบัว หลังจากนั้นใช้น้ำแรงดันสูงฉีดเพื่อไลเปลือกและเกสรบัวออกบางส่วนก่อนการล้างในขั้นถัดไป		-
5	ล้างน้ำ	นำเม็ดบัวที่ผ่านกระบวนการลอกเปลือกและผ่าซีกแล้วมาล้างน้ำเพื่อไลเปลือกออกให้สะอาดและสะเด็ดน้ำให้แห้งร้อนขั้นตอนต่อไป		-
6	คัดเม็ดบัวเสียและเกสร	คัดเม็ดบัวที่เสียและเอาเกสรที่เหลือคังจากการล้างออกให้หมด หลังจากนั้นนำไปล้างน้ำและผึ่งให้แห้งรอการต้มในขั้นถัดไป		-
7	ต้มสุกเม็ดบัว	นำเม็ดบัวที่คัดแล้วใส่หม้อต้มกับเกลือในใส่น้ำให้ท่วมเม็ดบัวและใส่สารฟอสฟอรัสลงไป		ต้มไฟแรง ใส่สารฟอสฟอรัสประมาณ 2 ชช. เริ่มจับเวลาในการต้มประมาณ 30 นาที หลังจากนั้นนำเริ่มเด็ด
8	พักให้เย็น	นำเม็ดบัวใส่ตะแกรงพลาสติกทิ้งไว้เพื่อลดอุณหภูมิเม็ดบัวหลังต้มก่อนการคัด		-
9	คัดเม็ดบัวเสียและบรรจุ	นำเม็ดบัวที่ที่ลดความร้อนแล้วมาคัดเม็ดเสียอีกครั้งและบรรจุลงถุงตามน้ำหนักที่กำหนดไว้		-

ภาพที่ ค.6 กระบวนการผลิตเม็ดบัวต้มจากโรงงานแห่งนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ ค.7 เม็ดบัวที่แช่สารแบคทีเรีย โอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10% ปรับ pH 4.0



ภาพที่ ค.8 เม็ดบัวที่แช่สารแบคทีเรีย โอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10% ปรับ pH 4.0 จัดเก็บที่ อุณหภูมิ 0 – 4°C เวลา 22 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



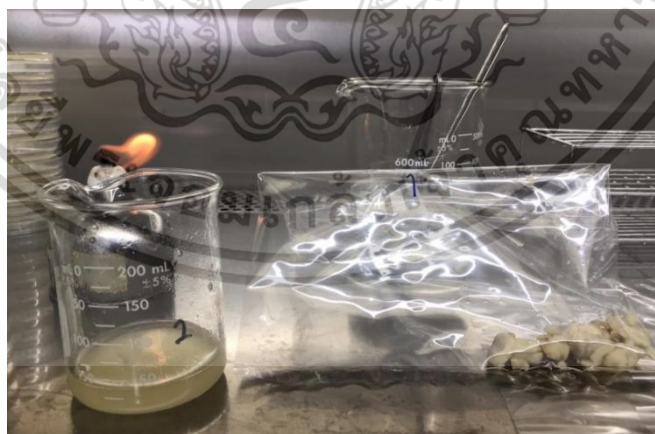
ก



ข

ค

ภาพที่ ค.9 อุปกรณ์สำหรับการนึ่งเม็ดบัว (ก), เม็ดบัวหลังแช่สารแบคทีเรีย โอซิน KL1Y ก่อนนึ่ง (ข) และเม็ดบัวหลังแช่สารแบคทีเรีย โอซิน KL1Y หลังนึ่ง 30 นาที (ค)



ภาพที่ ค.10 การแยกเม็ดบัวหลังแช่สารแบคทีเรีย โอซิน KL-1Y ความเข้มข้น 10%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นายธรรมบุญ สมจิตร
วัน เดือน ปีเกิด	10 ธันวาคม พ.ศ. 2531
ที่อยู่	159 ถนนชุมทอง-ลำต้อยติง แขวงชุมทอง เขตลาดกระบัง จังหวัด กรุงเทพมหานคร 10520
E-mail	tsomchit_31@hotmail.com
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2554 จบการศึกษาระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต คณะ อุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก สถาบันเทคโนโลยี พระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ประสบการณ์ทำงาน	พ.ศ. 2554 – 2561 ตำแหน่ง Assistant Production Manager ที่บริษัท S&P Syndicate Public Co., Ltd. พ.ศ. 2561 – ปัจจุบัน ตำแหน่ง Assistant Production Manager ที่บริษัท โรเบียร์เซอร์มันตะวันออก จำกัด
การนำเสนอผลงาน	ผลงานตีพิมพ์ งานประชุม “มศว วิจัย” ครั้งที่ 12 วันที่ 20-21 มีนาคม 2562 เรื่อง คุณภาพทางจุลชีววิทยาของเม็ดบัวและไส้บัวหวาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้