การศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum ในแหนมโมเดลบรอทและการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อ *Lactobacillus plantalum* SKI2

POTENTIAL OF BACTERIOCIN OF *Lactobacillus plantalum* SKI2 FOR INHIBITORY ACTIVITY AGAINST *Salmonella* Anatum IN NHAM MODEL BROTH AND ITS BIOGENIC AMINES FORMATION

นวพร อินทะสร้อย

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

การศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ
Salmonella Anatum ในแหนมโมเดลบรอทและการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อ
Lactobacillus plantalum SKI2

POTENTIAL OF BACTERIOCIN OF *Lactobacillus plantalum* SKI2
FOR INHIBITORY ACTIVITY AGAINST
Salmonella Anatum IN NHAM MODEL BROTH AND ITS BIOGENIC
AMINES FORMATION

จัดทำโดย

นวพร อินทะสร้อย รหัสนักศึกษา 58080105

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....ลงชื่อ..... 23/ก.ค./62

(รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ	การศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus plantalum* SKI2 กับ *Salmonella* Anatum ในแหนมโมเดลบรอทและการสร้างไบโอจีนิกเอมีน
ชื่อนักศึกษา	นวพร อินทะสร้อย รหัสนักศึกษา 58080105
หลักสูตร	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
พ.ศ.	2562
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

Lactobacillus plantalum SKI2 เป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน จึงนำมาศึกษาต่อเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้แก่ *B. cereus*, *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157T, *Lb. dextranicus* JCM 5887T, *S. aureus*, *Lis. innocua* และ *S.* Anatum บนอาหาร BSM จากผลการศึกษาพบว่า *Lb. plantalum* SKI2 สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Lb. dextranicus* JCM 5887T และ *S. aureus* สูงที่สุด จึงทำการคัดเลือกเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้ไปศึกษาต่อคู่กับ *S.* Anatum เนื่องจาก *S.* Anatum เป็นเชื้อที่พบมากในอาหารหมักพื้นบ้านของไทย จากนั้นได้นำไปศึกษาต่อในแหนมโมเดลบรอท พบว่า *Lb. plantalum* SKI2 สามารถลดจำนวนของเชื้อ *S.* Anatum ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 และไม่พบอีกเลยในชั่วโมงที่ 36 และยังได้ศึกษาการสร้างและไม่สร้างไบโอจีนิกเอมีนเมื่อเทียบกับ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งเป็น negative control และ *Weissella cibaria* SI21 ที่ให้ผล positive control โดยใช้อาหาร improved medium broth และ improved medium agar ที่มีกรดอะมิโนไทโรซีน ไลซีน ออร์นิทีน และฮิสติดีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยสังเกตจากสีอาหารหากมีการสร้างไบโอจีนิกเอมีนที่มีความเป็นด่างจะทำให้สีของอาหารเป็นสีม่วง แต่ถ้ามีการสร้างกรดแลคติกจะทำให้อาหารเป็สีเหลือง ซึ่งจากการศึกษาพบว่าเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ไม่มีการเกิดสีอาหารไปเป็นสีม่วงเลยจึงบอกได้ว่า *Lb. plantalum* SKI2 ให้ผล negative ซึ่งหมายความว่าไม่สร้างสารไบโอจีนิกเอมีนต่อกรดอะมิโนใด ดังนั้น เชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหารหมักเพื่อควบคุมการผลิตอาหารหมักในกลุ่มแหนม ไส้กรอกอีสาน ของแหล่งผลิตให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้

คำสำคัญ: แหนม ไส้กรอกอีสาน *Lb. plantalum* SKI2 *S.* Anatum ไบโอจีนิกเอมีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Potential of Bacteriocin for inhibitory activity against *Salmonella* Anatum in Nham Model broth and Biogenic amines formation of *Lactobacillus plantarum* SKI2
Student name	Nawaporn Inthasoy Student ID 58080105
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2019
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

Lactobacillus plantarum SKI2 was isolated from Saikrok Isan and showed to have activity against various pathogens (*B. cereus, Lb. sakei* supsp. *sakei* JCM 1157T, *Lb. dextanicus* JCM 5887T, *S. aureus, Lis. innocua* and *S.* Anatum) on BSM agar, and exhibited the largest inhibition zone on *Lb. dextranicus* JCM 5887T and *S. aureus* .Due to *S.* Anatum usually found in Thai traditional fermentrd meat products, thus this *S.* Anatum was selected for study on effect of using *Lb. plantalum* SKI2 on the reduction of this pathogenic strain in Nham Model broth. The study found that used of *Lb. plantalum* SKI2 as starter in NMB could decrese *S.* Anatum at 24 hour and cannot detect at 36 hour. The study of Biogenic amines formation of *Lb. plantarum* SKI2 compare with *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 is negative control and *Weissella cibaria* SI21 is positive control in improved medium broth and improved medium agar + 0.1% amino acid (Tyrosine, Ornitine, Lysine and Histidine) by observing the color on medium between purple and yellow (If have produce biogenic amines medium become to purple cause it have base but medium become yellow if produce acid). The results showed that *Lb. plantalum* SKI2 could not change the color in both improved medium and agar to purple which meant that *Lb. plantalum* SKI2 could not produce biogenic amine from Tyrosine, Ornitine, Lysine and Histidine. Hence, in order to produce a safety of meat fermentation products to consumers, this *Lb. plantalum* SKI2 strain can be used as starter culture to control the fermentation of various meat products of the company

Keywords: Nham, Fermented pork sausage, *Lb. plantalum* SKI2, *S.* Anatum, Biogenic amines

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษเรื่อง การศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus plantalum* SKI2 กับ *Salmonella* Anatum ในแหนมโมเดลบรอทและการสร้างไบโอจีนิกเอมีนฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องด้วยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ได้ให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาในการทำปัญหาพิเศษ ตลอดจนให้ความรู้ คำปรึกษา และคอยดูแลในเรื่องการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี รวมถึงการจัดหา เครื่องมืออุปกรณ์ต่างๆ และการตรวจสอบในการแก้ปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้เสร็จสมบูรณ์ จึงขอกราบของพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอบคุณ ส. ขอนแก่นฟู้ดส์ จำกัด (มหาชน) ที่ให้การสนับสนุนทุนการศึกษาปัญหาพิเศษดังกล่าวนี้ด้วย

ขอขอบคุณนางสาววิภาวี ใยโพธิ์ทอง ที่คอยดูแล ช่วยเหลือ และให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการดำเนินงานวิจัยเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ เพื่อนๆ และนักวิทยาศาสตร์ที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน รวมถึงผู้ที่ไม่ได้เอ่ยถึงที่คอยให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำปัญหาพิเศษฉบับนี้

นวพร อินทะสร้อย

2 กรกฎาคม 2562

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... I

ABSTRACT..... II

กิตติกรรมประกาศ..... III

สารบัญ..... IV

สารบัญตาราง..... VI

สารบัญภาพ..... VII

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา..... 1

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 1

บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 2

2.1 แหนม..... 2

2.2 แบคเทอริโอซิน..... 2

2.3 Lactic acid bacteria..... 3

2.4 *Lactobaillus plantarum*..... 4

2.5 *Salmonella spp.*..... 5

2.6 *Salmonella* Anatum..... 6

2.7 ไบโอจีนิกเอมีน..... 7

บทที่3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง..... 7

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี..... 7

3.2 อุปกรณ์..... 9

3.3 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง..... 11

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 16

4.1 การทดสอบประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus, Lb. sakei* supsp. *sakei* JCM 1157T, *Lb. dextranicus* JCM 5887T, *S. aureus, Lis. innocua* ATTC 3309T และ *S.* Anatum ของ *Lb. plantarum* SKI2 โดยเทียบกับ *Lb. plantalum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR 536..... 16

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus, Lb. sakei* supsp. *sakei, Lb. dextranicus* JCM 5887T, *S. aureus, Lis. innocua* และ *S.* Anatum ของ *Lb. plantarum* SKI2 ในแบบจำลองแหนม 18

4.3 การวิเคราะห์สมบัติด้านเคมีของแบบจำลองแหนม 19

4.4 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 ต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม 21

4.5 การตรวจสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในอาหาร Improved medium 23

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 27

บรรณานุกรม 28

ภาคผนวก 30

ภาคผนวก ก 31

ภาคผนวก ข 39

ประวัติผู้เขียน 40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	สารอาหารของแบบจำลองการหมักแหนมที่ใช้ทดแทนส่วนประกอบของแหนม.....	11
4.1	แสดงระยะที่วัดได้จากโซนใสของเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อเชื้ออินดิเคเตอร์แต่ละตัว (เซนติเมตร).....	12
4.2	แสดงความเข้มข้น (arbitrary unit, AU/ml) ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 เมื่อบ่นเพาะเชือใน NMB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง.....	22
4.3	แสดงค่าพีเอชของอาหารเหลว Improved medium.....	24
4.4	แสดงแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารไบโอจิกเอมีนในอาหารเหลว Improved medium.....	24
4.5	แสดงแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารไบโอจิกเอมีนในอาหารแข็ง Improved medium.....	26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	ลักษณะของ *Lb. plantalum* Gram-positive ที่ติดสีม่วงของ crystal violet.....	4
4.1	แสดงการเกิดโซนใสของเชื้อ *Lb. plantalum* SS7, *Lb. plantalum* SKI2 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ *B. cereus* (ก), *Lb. sakei* supsp. *sakei* (ข), *Lis. innocua* ATTC 3309T (ค), *S. aureus* (ง), *S.* Anatum (จ) และ *Lb. dextranicus* JCM 5887T (ฉ).....	16
4.2	แสดงการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantalum* SKI2 ที่เลี้ยงในแบบจำลองแหนม (ก) และการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค *S.* Anatum ที่เลี้ยงในแบบจำลองการหมักแหนม (ข) เมื่อเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง.....	17
4.3	แสดงค่าพีเอชของแบบจำลองการหมักแหนมทั้ง 5 ขวด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 72..	20
4.4	แสดงค่ากรดของแบบจำลองการหมักแหนมทั้ง 5 ขวด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 72....	21
4.5	แสดงการเกิดโซนใสจากแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ที่เลี้ยงในแหนมโมเดลบรอท ต่อเชื้ออิดิเคเตอร์ ดังนี้ *S.* Anatum (ก), *S. aureus* (ข), *Lis.innocua* ATTC 3309T (ค), *Lb. sakei* subsp. *sakei* (ง) และ *Lb. dextranicus* JCM 5887T (จ).....	21
4.6	แสดงสีที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว improve medium ของอะมิโน Tyrosine (ก), Ornitine (ข), Lysine (ค) และ Histidine (ง).....	23
4.7	แสดงสีของอาหารแข็ง improved medium ของทั้ง 4 อะมิโน.....	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา (Comenuanta *et al.*, 1966)

แหนมเปนผลิตภัณฑอาหารแปรรูปพื้นบาน การหมักแหนมทำได้โดยนำเนื้อหมูมาผสมกับข้าวสุกบด กระเทียมบด และเครื่องปรุงต่างๆ จากนั้นบ่มไว้ประมาณ 3-4 วัน เพื่อให้เกิดการหมัก อันเนื่องมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติคจนผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่มีแกรมบวก การผลิตแหนมในปัจจุบันมักผลิตในลักษณะอุตสาหกรรมในครัวเรือน ทำให้มีปัญหาในการควบคุมคุณภาพ แหนมที่ผลิตได้มีอายุการเก็บรักษาสั้น มีการเน่าเสียสูง รวมทั้งมีการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโทษ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักแต่ละครั้งไม่คงที่ เนื่องจากผู้ผลิตมักอาศัยจุลินทรีย์ตามธรรมชาติในการหมัก

S. Anatum เป็นจุลินทรีย์ที่พบได้มากในเนื้อหมู (สุวัฒน์ และคณะ, 2555) แหนมจึงพบ *S.* Anatum เนื่องจากใช้เนื้อหมูสดในการหมัก ดังนั้นจึงมีการนำ *Lb. plantalum* SKI2 มาศึกษาถึงประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ใช้ในการยับยั้ง *S.* Anatum ในแหนม

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินของ *Lb. plantalum* SKI2 ต่อการยับยั้ง *S.* Anatum ในแหนมโมเดลบรอท

1.2.2 ศึกษาดูการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของ *Lb. plantalum* SKI2

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้ทราบถึงประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินของ *Lb. plantalum* SKI2 เพิ่มเติม

1.3.2 ได้ทราบว่า *Lb. plantalum* SKI2 มีโอกาสสร้างไบโอจีนิกเอมีนในระหว่างหมักแหนมหรือไม่ เพื่อเป็นข้อมูลในการตัดสินใจเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวเป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แหนม

แหนม หมายถึง ผลิตภัณฑ์เนื้อที่เตรียมได้โดย การนำเนื้อหมูมาบดหรือสับให้ละเอียด ใส่หนังหมูไปผสมกับเกลือ กระเทียมบด และสารประกอบไนเตรทหรือไนไตรท์ แล้วบรรจุห่อด้วยใบตองหรือพลาสติก เก็บไว้ 2-3 วันก็สามารถนำมา รับประทานได้ ส่วนประกอบหลักที่ใช้ในการทำแหนมก็คือ เนื้อ เนื้อเป็นแหล่ง สำคัญของอาหารโปรตีนที่มีคุณภาพดี เป็นแหล่งของแร่เหล็กและวิตามินบี ซึ่งสารอาหารเหล่านี้มีอยู่พร้อมในเนื้อสัตว์ และข้าวเหนียวนึ่ง หรือข้าวสวย บดละเอียด เป็นอาหารของ lactic acid bacteria ในการหมัก พริกขี้หนูสด และเกลือ มีหน้าที่ให้รสชาติ และทำให้เกิดการออสโมซีส โดยน้ำจากวัตถุดิบจะถูกขับออกมา ได้สารละลายเกลือซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรค เกลือไนไทรต์หรือไนเทรต์ซึ่งทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน ให้เนื้อเป็นสี เกลืออิริทอร์เบต ได้แก่ โซเดียมอิริทอร์เบตเพื่อเร่งการรีดิวซ์ เปลี่ยนไนเทรตและไนไทรต์ให้เป็นไนทริกออกไซด์ และช่วยรักษากลิ่นรส (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2554)

2.2 แบคเทอริโอซิน (da Silva Sabo *et al.*, 2014)

แบคเทอริโอซิน หมายถึงเพปไทด์หรือโปรตีน ที่สังเคราะห์จากไรโบโซมของแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ คือ แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งเป็นวงแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบและแกรมบวก แต่กลุ่มที่ได้รับความสนใจมากที่สุด คือแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดย Lactic acid bacteria ชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้าง จะมีการนำไปใช้ในการแปรรูปอาหาร เพื่อลดการใช้สารกันเสีย รวมทั้งลดการใช้ความร้อนในการฆ่าเชื้อ สารแบคเทอริโอซินจะทำให้เกิดรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการเสียสมดุลขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย ปัจจุบันไนซินเป็นสารแบคทีริโอซินที่ สร้างจาก *Lactococcus lactis* ซึ่งได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยทางอาหาร

2.2.1 กระบวนการผลิตแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การสร้างแบคเทอริโอซินจะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือส่วนที่เป็นยีนโครงสร้างและส่วนที่เป็น repressor gene โดยปกติเมื่อนำแบคทีเรียที่มียีนควบคุมแบคเทอริโอซินมาเพาะเลี้ยง พบว่ามีเฉพาะบางเซลล์เท่านั้นที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่ จะถูกยับยั้งไม่ให้มีการผลิตแบคเทอริโอซินโดย repressor gene ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซิน ในขั้นตอนการสร้างแบคเทอริโอซินพบว่าแบคเทอริโอซินจะสร้างขึ้นในไซโตพลาสซึมต่อจากนั้นรวมตัวกับ immunity protein โมเลกุลของสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้จะผ่านเนื้อเยื่อชั้นในและสะสมอยู่บริเวณ peri-plasmic space และแผ่ขยายไปถึงบริเวณพื้นผิวหน้าของแบคทีเรีย ซึ่งบริเวณพื้นผิวหน้าของแบคทีเรียสารเชิงซ้อนจะจับกับ polysaccharides หรือ O-antigen ของ cuter membrane และท้ายสุดสารเชิงซ้อนนี้จะทำให้เกิด cerd bacteriocin และขับออกสู่นอกเซลล์

2.2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซินเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลรวมกันทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์

2.3 Lactic acid bacteria (da Silva Sabo *et al.*, 2014)

Lactic acid bacteria (LAB) สามารถใช้เป็นสารกันบูดธรรมชาติที่มีประสิทธิภาพได้เนื่องจากความสามารถในการผลิตสารที่ออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อแบคทีเรียเช่น แบคเทอริโอซินกลุ่มที่ใหญ่ที่สุดในหมู่ Lactic acid bacteria คือแลคโตบาซิลลัส (Lactobacillus) ที่มีมากกว่า 150 สายพันธุ์ หนึ่งในนั้นคือ *Lb. plantarum* ที่มีความสำคัญอย่างมากทางอุตสาหกรรมและบางสายพันธุ์ของ *Lb. plantarum* ยังมีความสามารถในการเป็นโพรไบโอติกอีกด้วย สามารถพบและแยก *Lb. plantarum* ได้จากผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมัก เช่น ขนมปังเปรี้ยว (Sourdough) ไส้กรอก ชีส ไวน์ กะหล่ำปลีดอง (Sauerkraut) หรือจากระบบทางเดินอาหารและระบบขับถ่าย

2.3.1 ประโยชน์ของ LAB

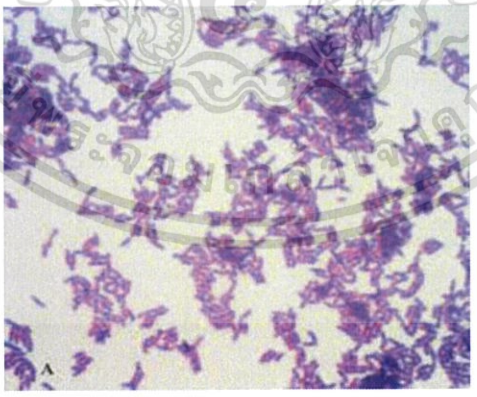
กรดแลคติกที่ผลิตขึ้นช่วยในการถนอมอาหาร และทำให้อาหารปลอดภัย เพราะกรดที่ได้จากการหมักทำให้ ค่า pH ของอาหารลดลง ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น แบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค รา ยีสต์ เนื่องจากไฮโดรเจนไอออนจะซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าสู่ภายใน ทำให้ไซโตพลาสซึมมีสภาวะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในเซลล์เป็นกรดสูง ซึ่งส่งผลให้ electrochemical proton gradient ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์เสียไป เซลล์จึงถูกทำลายและไปยับยั้งการนำเข้ากรดอะมิโนของเซลล์จุลินทรีย์ นอกจากนี้การหมักด้วย lactic acid bacteria ยังได้ hydrogen peroxide และ diacetyl ที่มีฤทธิ์เป็นสารกันเสีย อีกด้วย (พิมพ์เพ็ญ และคณะ, 2558)

2.4 *Lactobaillus plantarum* (Eslamifar et al., 2016)

Lactobacillus plantarum เป็นสปีชี่ส์ที่แพร่หลายในสกุล *Lactobacillus* ซึ่งมักพบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิดรวมทั้งพืชที่ไม่ใช้ออกซิเจน เติบโตที่ 15 ° C แต่ไม่อยู่ที่ 45 ° C และระดับ pH เท่ากับ 3.2 หรือสูงกว่า เป็น Gram positive bacteria ซึ่งจะติดสีม่วงของ crystal violet (ภาพที่ 2.1) และผลิตกรดแลคติกทั้งแบบ D และ L สามารถใช้ออกซิเจนได้ การใช้ออกซิเจนในท้ายที่สุดจะกลายเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในตำแหน่งของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ dismutase ที่มีอยู่ในเซลล์ที่ทนต่อออกซิเจนได้เกือบทุกชนิด สิ่งมีชีวิตเหล่านี้สะสมปริมาณโพลีฟอสเฟตแมงกานีสในรูปมิลลิเมตร แมงกานีสถูกใช้โดยใน pseudo-catalase เพื่อลดระดับปฏิกิริยาออกซิเจน เนื่องจากสารเคมีที่มีส่วนผสมของแมงกานีสช่วยป้องกันเซลล์จากความเสียหายจากออกซิเจนจะถูกทำลายโดยธาตุเหล็กทำให้เซลล์เหล่านี้ไม่มีอะตอมของธาตุเหล็ก ด้วยเหตุนี้ *Lb. plantarum* จึงไม่สามารถนำมาใช้เพื่อสร้างเอนไซม์ได้ จึงจำเป็นต้องมี heme complex เช่น catalases และ *lactobacillus* เช่น *Lb. plantarum* สามารถเลี้ยงได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS



ภาพที่ 2.1 ลักษณะของ *Lb. plantalum* Gram-positive ที่ติดสีม่วงของ crystal violet

ที่มา: Klabkong และคณะ (2013)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 *Salmonella* spp. (การันต์ และคณะ, 2555)

Salmonella spp. เป็นที่รู้จักกันดีว่าเป็นหนึ่งในแบคทีเรียก่อโรคในคนที่เป็นปัญหาสำคัญ การบริโภคเนื้อสัตว์ที่ปนเปื้อน *Salmonella* เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้เกิดโรค salmonellosis (จินต์ศุจี และคณะ 2557) จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบมีรูปร่างเป็นท่อนสั้น มีขนาดความกว้าง 0.5 ไมโครเมตร และยาว 2-4 ไมโครเมตร ไม่สร้างสปอร์ และแคปซูล เคลื่อนที่ด้วยแฟลกเจลลาที่มีอยู่รอบตัว เชื้อสามารถเจริญได้ในอุณหภูมิ 8-45 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่อความเย็นหรืออุณหภูมิต่ำได้ดีในสภาวะแช่แข็ง ซึ่งเชื้อจะถูกยับยั้งการเจริญเติบโตและสามารถเพิ่มจำนวนได้ใหม่เมื่อนำมาไว้ที่อุณหภูมิห้อง เชื้อสามารถผลิตกรดและก๊าซ H_2S จากการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส และให้ผลบวกต่อการทดสอบ catalase และ citrate แต่ให้ผลลบต่อการทดสอบ oxidase และ urease

2.6 *Salmonella* Anatum

โกวินย์ และคณะ (2517) ได้รายงานการตรวจเนื้อหมูในประเทศไทยว่า มีเชื้อ *Salmonella* อยู่ในเนื้อหมูร้อยละ 0.7 จากการตรวจ 1705 ตัวอย่างพบว่า *S* .derby และ *S* .Anatum เป็นเชื้อที่พบบ่อยที่สุด และ Thai และคณะ (2012) ได้มีการรายงานการพบ *S*. Anatum ในเนื้อไก่ 13 ตัวอย่าง จาก 268 ตัวอย่าง และในเนื้อหมูพบ 25 ตัวอย่าง จาก 318 ตัวอย่าง หรือทั้งหมด 15.8 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมากกว่าสายพันธุ์อื่นๆ ที่ตรวจพบ เช่น *S*. Infrantis ที่พบรองลงมาซึ่งพบทั้งหมด 13.3 เปอร์เซ็นต์ และยังมีรายงานอีกว่าพบ *S*. Anatum ในไส้กรอกที่ประเทศโมร็อกโก โดยพบ 1 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 6 ตัวอย่าง (Ed-dra et al., 2017)

มีงานวิจัยของ Swetwiwathana และคณะ (1999) ได้ศึกษาถึงการเจริญเติบโตของ *S*. Anatum ในแหนมโมเดลบรอท โดยศึกษาถึงผลกระทบของการเจริญเติบโตของ *S*. Anatum จากกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *Lb. curvatus, Lb. sakei* และ *P. acidilactici* ร่วมกับผลกระทบจากกระเทียม ไนเตรท และไนไตรท จากงานวิจัยพบว่าแบบจำลองแหนมโมเดลบรอทที่มีกระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมไนไตรท 125 ppm สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S*. Anatum ได้ดีกว่าแหนมโมเดลบรอทที่มี กระเทียม 5 เปอร์เซ็นต์และโซเดียมไนไตรท 500 ppm ส่วนกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดในแหนมโมเดลบรอทคือ 10^6 cfu/ml *Lb. sakei* โดยสามารถลดการเจริญเติบโตของ *S*. Anatum ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 อยู่ที่ 10^3 cfu/ml และลดลงอย่างรวดเร็วจนไม่สามารถตรวจพบได้อีกในชั่วโมงที่ 30 ของการหมัก ในขณะที่เชื้อ *Lb. curvatus* และ *P. acidilactici* สามารถลดการเจริฐเติบโตของ *S*. Anatum ได้ในชั่วโมงที่ 12 อยู่ที่ 10^4 cfu/ml และค่อยๆ ลดลงจนไม่สามารถตรวจพบได้อีกในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก จากงานวิจัยนี้จึงสามารถนำกล้าเชื้อ *Lb. sakei* ไปใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนของ *S*. Anatum ในแหนมได้

2.7 ไบโอจีนิกเอมีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป็นสารประกอบที่พบได้ทั่วไปในเซลล์ที่มีชีวิต พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น ปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา ไวน์ เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากนม เบียร์ เนื้อ และผัก ไบโอจินิกเอมีนเกิดขึ้นในระหว่างการเน่าเสียของอาหาร จากการที่จุลินทรียจ์สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส ย่อยสลายกรดอะมิโนอิสระในอาหารนั้นได้เป็นสารไบโอจีนิกเอมีน ไบโอจินิกเอมีนที่พบในอาหารมีปริมาณและชนิดต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของกรดอะมิโนที่เป็นสารตั้งต้น (Leuschner และคณะ, 1998) เช่น ถ้าพบฮีสติดีนในอาหารมากก็จะทำให้พบสารไบโอจีนิกเอมีนที่เป็นฮีสตามีนมาก สารเอมีนมีบทบาทสำคญัต่อสิงมีชีวิตเนืองจากเอมีนเป็นแหล่งของไนโตรเจนในการสังเคราะห์ฮอร์โมน อัลคาลอยด์ กรดนิวคบีอีก โปรตีน และเอมีน และมีความสำคัญต่อการเกิดกลิ่นของอาหารเป็นสารตั้งต้นในการเกิดสารก่อมะเร็ง (Silla, 1996)

จากงานวิจัยของ Tosukhowong (2011) มีการศึกษาถึงปริมาณไบโอจีนิกเอมีนที่สะสมจนส่ผลกับคุณภาพของเนื้อหมูและกล้าเชื้อโดยใช้วิธี Liquid chromatographic การสร้างไบโอจีนิกเอมีนได้แก่ cadaverine, putrescine, histamine และ tyramine มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อมีการใส่กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* BCC 9546 หรือ *Lb. brevis* BCC 26756 หรือทั้งสองเชื้อร่วมกัน พบว่ามีการลดลงของปริมาณไบโอจีนิกเอมีนอย่างมีนัยสำคัญ โดยจะศึกษาโดยหมักแหนมไว้ตั้งแต่ 0-7 วัน พบว่าการหมักแบบไม่ใส่กล้าเชื้อมีสารไบโอจีนิกเอมีนเพิ่มขึ้นได้แก่ tyramine, putrescine, cadaverine, histamine และ spermidine และเมื่อเวลาหมักผ่านไปครบ 7 วัน พบการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยของ cadaverine และ histamine อยู่ที่ 100 และ 10 mg/kg ตามลำดับและมีการลดลงของ spermidine เพียงเล็กน้อย และพบว่า tyramine และ putrescine มีปริมาณที่เพิ่มขึ้นจาก 0 ไปเป็น 180 mg/kg และ 20 ไปเป็น 320 mg/kg ตามลำดับ เมื่อเติมกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* BCC 9546 พบว่าเมื่อเวลาการหมักผ่านไป 7 วัน มีการเพิ่มขึ้นของ cadaverine และ tyramine จาก 20 เป็น 40 mg/kg และจาก 10 เป็น 20 mg/kg ตามลำดับ และมีการลดลงของ putrescine จาก 20 เป็น 10 mg/kg ส่วนแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. brevis* BCC 26756 พบว่าเมื่อเวลาการหมักผ่านไป 7 วัน มีการเพิ่มขึ้นของ cadaverine และ tyramine จาก 20 เป็น 50 mg/kg และจาก 0 เป็น 220 mg/kg ตามลำดับ และมีการลดลงของ putrescine จาก 30 เป็น 20 mg/kg และเมื่อใส่กล้าเชื้อทั้งสองตัวผสมกันในแหนม พบว่าเมื่อเวลาการหมักผ่านไป 7 วัน มีการเพิ่มขึ้นของ cadaverine และ tyramine จาก 20 เป็น 40 mg/kg และจาก 0 เป็น 120 mg/kg ตามลำดับ และมีการลดลงของ putrescine จาก 10 เป็น 5 mg/kg จากการวิจัยนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าสามารถใช้กล้าเชื้อทั้ง *Lb. plantarum* BCC 9546 และ *Lb. brevis* BCC 26756 ร่วมกันเพื่อนำไปผลิตแหนมให้ปลอดภัยจากไบโอจีนิกเอมีนได้ เนื่องจากสามารถลดปริมาณการผลิตไบโอจีนิกเอมีนจากเดิมได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

กระเทียม จากท็อปซูเปอร์มาร์เก็ต

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

Agar	(Merck, Germany)
Beef extract	(V.S.Chemhouse, Thailand)
Dextose	(Merck, Germany)
De Man-Rogosa-Sharpe broth)MRS)	(Difco, USA)
Nutrient Agar (NA)	(Merck, Germany)
Peptone	(Rajasthan, India)
Trypticase Soy Agar (TSA)	(Difco, USA)
Trypticase Soy Broth (TSB)	(Difco, USA)
Trytone	(Merck, Germany)
Yeast extracts	(Rajasthan, India)
Tween 80	(Merck, Germany)
Di - potassium hydrogen phosphate	(Merck, Germany)
Di – ammonium citrate	(Merck, Germany)
Sodium acrtate	(Carlo Erba, Italy)
Manganese sulfate	(Carlo Erba, Italy)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Magnesium sulfate	(Carlo Erba, Italy)
Sodium chloride	(Merck, Germany)
Sodium ascorbate	(Merck, Germany)
Sodium nitrite	(Merck, Germany)
Sodium-tri-polyphosphate	(Sigma,USA)
Thiamine	(Sigma,USA)
Pyridoxal-5-phosphate	(Sigma,USA)
Ferrous sulfate	(Merck, Germany)
Calsium carbornate	(Merck, Germany)
Bromocresol purple	(Sigma,USA)
Iodine (I_2)	(Carlo Erba, Italy)
L-Tyrosine disodium salt hydrate	(Sigma,USA)
L-Histidine monohydrochloride monohydrate	(Sigma,USA)
L-Ornitine monohydrochloride	(Sigma,USA)
L-Lysine monohydrochloride	(Sigma,USA)
Safranin O	(ScharlauChemieS.A.,Spain)
Sodium hydroxide (NaOH)	(Carlo Erba, Italy)

3.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อแบคทีเรียแลคติกและเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้รับความอนุเคราะห์จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.1 เชื้อจุลินทรีย์แลคติก

Lactobacillus dextranicus JCM 5887T

Lactobacillus plantarum RS49

Lactobacillus plantalum SKI2

Lactobacillus plantalum SS7

Lactobacillus sakei supsp. *sakei* JCM 1157T

Pediococcus pentosaceus TISTR 536

3.2.2เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

Bacillus cereus 1062

Listeria innocua ATTC 3309T

Salmonella anatum

Sthapylococcus aureus

Weissella cibaria SI21

3.3 อุปกรณ์

เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง (Balance)	(Melttler Toledo, Germany)
เครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (Balance)	(Melttler Toledo, Germany)
ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)	(Heraeus, Germany)
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow)	(Bosstech, Thailand)
ไมโครเวฟ (Microwave)	(Electrolux, China)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อ่างควบคุมอุณหภูมิ	(Memmert, Germany)
ไมโครปิเปตขนาด 20-200 และ 1000 ไมโครลิตร	(Gilson, France)
เครื่อง Vortex	(Scientific Industrirs, USA)
เครื่อง auto clave	(Tommy, Japan)
กล้องจุลทรรศน์	(Nikon ECLIPSE E200, China)
pH meter	(Inolab, Germany)
ขวดดูแรน ขนาด 500 มิลลิลิตร	(Duran, Germany)
ทิป (Tips) ขนาด 20-200 และ 1000 ไมโครลิตร	(Gilson, USA)
เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วสูงควบคุมอุณหภูมิ (Centrifuge)	(Thermo, Germany)
ช้อนสแตนเลส	(หัวม้าลาย, ประเทศไทย)
บีกเกอร์ ขนาด 250, 500 และ 1000 มิลลิลิตร	
ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask (ขนาด 250 มิลลิลิตร	
หลอดทดลองขนาด16x 150มิลลิลิตร	
กระบอกตวง 1000มิลลิลิตร	
ปิเปตแก้ว ขนาด 1, 5 และ 10 มิลลิลิตร	
บิวเรตขนาด 50 มิลลิลิตร	
จานเพาะเชื้อแบบแก้ว	
สแตนด์	
ตะเกียง (Burner)	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 การทดสอบประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus, Lb. sakei* supsp. *sakei* JCM 1157T, *Lb. dextranicus* JCM 5887T, *S. aureus, Lis. innocua* และ *S.* Anatum ของ *Lb. plantarum* SKI2 โดยเทียบกับ *Lb. plantalum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR 536

3.4.1.1การเตรียมเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2, *Lb. sakei* supsp. *sakei* JCM 1157T, *Lb. plantalum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR 536

ทำการถ่ายเชื้อ *L. plantarum* SKI2, *Lb. sakei* supsp. *sakei* JCM 1157T, *Lb. plantalum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว MRS ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายที่ผ่านการบ่มแล้ว จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหาร MRS broth ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้เชื้อความเข้มข้นที่ 10^8 cfu/ml

3.4.1.2 การเตรียมเชื้อ *B. cereus 1062, S.* Anatum, *S. aureus, Lis. innocua* ATTC 3309T และ *W. cibaria* SI21

ทำการถ่ายเชื้อ *B. cereus 1062, S.* Anatum, *S. Aureus และ Lis. innocua* ATTC 3309T ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดอาหารเหลว TSB ส่วนเชื้อ *W. cibaria* SI21 ถ่ายเชื้อปริมารต 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS แล้วบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส ยกเว้น *B. cereus 1062* บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาจึงต่อเชื้ออีกครั้งด้วยการปิเปตเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงหลอดอาหารเหลว TSB และ MRS แล้วบ่มที่ บ่มที่อุณหภูมิ 30 และ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้ได้เชื้อความเข้มข้นที่ 10^6 cfu/ml

3.4.1.3 การทดสอบประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 เทียบกับ *Lb. plantalum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR 536

การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus, Lb. sakei* supsp. *sakei, Lb. dextanicus* JCM 5887T, *S. aureus, Lis. innocua* ATTC 3309T และ *S.* Anatum ของ *Lb. plantarum* SKI2 เทียบกับ *Lb. plantalum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 ทำได้โดยดูดเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1.1 มา 10 ไมโครลิตร แล้วสปอตลงบนเพลท Bacteriocin screening medium (BSM) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเชื้อแล้วจึงดูดเชื้ออินดิเคเตอร์ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1.2 มา 20 ไมโครลิตร ลงใน TSB soft agar ทำการ vortex ให้อาหารกับเชื้อผสมกันดีแล้วจึงนำมาเททับหน้าเพลท BSM ที่ได้สปอตเชื้อแบคทีเรียแลคติกและบ่มเอาไว้แล้ว รอเพลทแข็งแล้วจึงนำไปบ่มตามอุณหภูมิของเชื้ออินดิเคเตอร์โดย *B. cereus* บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง *Lb. sakei* supsp. *sakei, Lb. dextranicus* JCM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5887T, *S. aureus, Lis. innocua* ATTC 3309T และ *S* .Anatum บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลจากโซนใส

3.4.2 การเตรียม Nham Model Broth (NMB)

เตรียมแบบจำลองการหมักแหนมปริมาตร 200 มิลลิลิตร ในขวดดูแรน 5 ขวด โดยใช้สารอาหารต่างๆ มาทดแทนส่วนประกอบจริงที่ใช้ในการทำแหนม (ตารางที่ 3.1) ใช้สารสกัดจากเนื้อแทนเนื้อหมู กลูโคสใส่แทนข้าวสุก กระเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 30 นาที แทนกระเทียมสด โซเดียมคลอไรด์แทนเกลือ และไนไตร์ทหรือไนเตรทต้องกรองฆ่าเชื้อก่อนนำมาใช้ เนื่องจากหนังหมูไม่เป็นปัจจัยในการเจริญของเชื้อจึงไม่จำเป็นต้องใส่สารใดทดแทน จากตารางที่ 1 เติมส่วนผสมของแบบจำลองแหนมแล้วใช้กลีซอรอล 4 เปอร์เซ็นต์เพื่อปรับค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที แล้วเติมไนไตร์ทที่ผ่านการกรองฆ่าเชื้อ และกระเทียมสับที่ผ่านการฆ่าเชื้อ และเททับด้วยน้ำมันพาราฟินเพื่อให้การหมักอยู่ในรูปแบบไร้อากาศ

ตารางที่ 3.1 สารอาหารของแบบจำลองการหมักแหนมที่ใช้ทดแทนส่วนประกอบของแหนม

ส่วนประกอบของแหนม		ส่วนประกอบแบบจำลองแหนม (NMB)	
เนื้อหมู	650 กรัม	เนื้อสกัด (Meat extract)	10 กรัม
หนังหมูสุก	350 กรัม	ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ	
ข้าวสุก	60 กรัม	กลูโคส	10 กรัม
กระเทียม	50 กรัม	กระเทียมที่ผ่านการฆ่าเชื้อ	50 กรัม
เกลือ	25 กรัม	เกลือหรือโซเดียมคลอไรท์	25 กรัม
ไนไตร์ท/ไนเตรท	125/500 ppm	กรองฆ่าเชื้อในปริมาณเท่าเดิม	
กรดแอสคอบิก	0.5 กรัม	เติมปริมาณเท่าเดิม	
โซเดียมไตรโพลีฟอสเฟต	0.3 กรัม	เติมปริมาณเท่าเดิม	

ที่มา : Swetwiwathana และคณะ (1999)

3.4.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus, Lb. sakei* supsp. *sakei, Lb. dextanicus* JCM 5887T, *S. aureus, Lis. innocua* และ *S.* Anatum ของ *Lb. plantarum* SKI2 ในแบบจำลองแหนม

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อต่างๆ ของ *Lb. plantarum* SKI2 เตรียมได้หลังจากเตรียมเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 ตามข้อ 3.4.1.1 และเตรียมเชื้ออินดิเคเตอร์ซึ่งได้แก่ *B. cereus, S. aureus, Lis. innocua* ATTC 3309T และ *S.* Anatum ตามข้อ 3.4.1.2 จากนั้นดูดเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมได้จากข้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.1 มา 10 ไมโครลิตร แล้วสปอตลงบนเพลท Bacteriocin screening medium (BSM) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเชื้อแล้วจึงดูดเชื้ออินดิเคเตอร์ ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1.2 มา 20 ไมโครลิตร ลงใน TSA agar + 0.6เปอร์เซ็นต์ yeast extract ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่หลอมเตรียมเอาไว้และอุ่นอยู่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส ทำการ vortex ให้อาหารกับเชื้อผสมกันดี แล้วจึงนำมาเททับหน้าเพลท BSM ที่มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกเจริญแล้ว รอเพลทแข็งแล้วจึงนำไปบ่มตามอุณหภูมิของเชื้ออินดิเคเตอร์โดย *B. cereus* บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง *Lb. sakei* supsp. *sakei, Lb. dextanicus* JCM 5887T, *S. aureus, Lis. innocua* ATTC 3309T และ *S.* Anatum บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เพื่อสังเกตการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่ใช้ทดสอบ โดยวัดขนาดความกว้างของโซนใสที่เกิดจากการยับยั้ง หาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน

3.4.5การศึกษาการเจริญของเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 และ *S.* Anatum ในแบบจำลองแหนม

เมื่อเตรียมแบบจำลองแหนมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตามข้อ 3.4.3 โดยทำทั้งหมดในขวดดูแรน 500 มิลลิลิตร ทั้งหมด 5 แบบ โดยแต่ละแบบจะแตกต่างกันดังนี้

แบบที่ 1 คือ NMB1 (control)

แบบที่ 2 คือ NMB2 + กระเทียมฆ่าเชื้อ

แบบที่ 3 คือ NMB3 + *Lb. plantarum* SKI2 ที่ 10^6 cfu/ml

แบบที่ 4 คือ NMB4 +*Lb. plantarum SKI2* ที่ 10^6 cfu/ml + *S.* Anatum ที่10^4 cfu/ml

แบบที่ 5 คือ NMB5 *S.* Anatum ที่ 10^5 cfu/ml

โดยบ่มทั้ง 5 ขวด ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 เพื่อนำไปศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในแหนมโดยใช้วิธี spread plate ด้วย MRS agar+ $CaCO_3$ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ TSA ตรวจสอบค่าทางเคมี ตรวจสอบความเข้มข้นและการสร้างสารแบคเทอริโอซินในสภาวะจำลองการหมักแหนม และลักษณะการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum

3.4.6 การวิเคราะห์สมบัติด้านเคมีของแบบจำลองแหนม

3.4.6.1ตัวอย่าง NMB ทั้ง 5 แบบจากข้อ 3.4.5 มาทำการวัดพีเอชโดยใช้ตัวอย่างละ 5 มิลลิลิตร มาวัดพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช โดยทำการทดลองจนครบทั้ง 5 แบบและบันทึกผล

3.4.6.2วิเคราะห์ค่าความเป็นกรดทั้งหมด โดยใช้ตัวอย่างจากข้อ 3.4.6.1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วเติมน้ำกลั่นต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 49 มิลลิลิตร เติมสารละลาย 0.1 เปอร์เซ็นต์ ฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด แล้วไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH จนสารถึงจุดยุติจะเกิดสารเป็นสีชมพูอ่อน ทำซ้ำตัวอย่างละ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ครั้ง และบันทึกผล นำค่ามาคำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลคติก ทำการทดลองจนครบทั้ง 5 แบบ และบันทึกผล

3.4.7 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 ต่อการยับยั้งเชื้อ S. Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม (Swetwiwathana et al., 2016)

นำเชื้ออินดิเคเตอร์ *Lb. sakei* supsp. *sakei* JCM 1157T ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1.1 และเชื้อ *B. cereus 1062, S.* Anatum, *S. aureus, Lis. innocua* ATTC 3309T ที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.1.2 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร มาถ่ายเชื้อใส่ TSA agar + 0.6 เปอร์เซ็นต์ yeast extract ปริมาตร 7 มิลลิลิตร vortex ให้อาหารและเชื้อผสมกันดีก่อนจะเททับหน้าเพลท Nutrient agar (NA) แล้วระเหยหยดน้ำที่ผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อในตู้ปลอดเชื้อจนผิวหน้าอาหารแห้ง จากนั้นนำตัวอย่างจากขวด NMB3 จากข้อ 3.4.5 มา 10 มิลลิลิตร ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 6000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสใส่บีกเกอร์ปลอดเชื้อก่อนจะนำมากรองปลอดเชื้อโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร นำส่วนใสมาทำการเจือจางแบบ 2 fold dilution (ตั้งแต่ 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128) โดยเจือจางโดยในหลอด eppendorf ที่ทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที และอบจนแห้งในตู้อบ 80 องศาเซลเซียส จากนั้นหยดแต่ละระดับการเจือจางลงบนอาหารที่เททับด้วยเชื้ออินดิเคเตอร์ โดยใช้ปริมตร 10 ไมโครลิตร ต่อระดับการเจือจางนั้น รอจนหยดของเหลวบนผิวหน้าอาหารแห้ง จึงนำไปบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่สภาวะต่างๆ ที่เหมาะสมกับเชื้ออินดิเคเตอร์แต่ละตัว เมื่อครบเวลาการบ่มจึงนำค่าการเจือจางสูงสุดที่เกิดโซนใสมาหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตได้ในแบบจำลองแหนม เป็นค่า arbitrary unit (AU/ml)

3.4.8การศึกษาการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติก (Bover-Cid และ Holzapfel., 1999)

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lb. plantarum* RS49, *Lb. plantalum* SKI2, *Lb. plantalum* SS7, *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *W. cibaria* SI21 มาทำการตรวจสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีน

3.4.8.1การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติกสำหรับทดสอบไบโอจีนิกเอมีน

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ

3.4.8.2ตรวจสอบการสร้างและไม่สร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกในอาหาร Improved medium

ก) การศึกษาผลการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว Improved medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.4. 8.1ถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว Improved medium ที่แบ่งเป็น 4 กรดอะมิโน ได้แก่ กรดอะมิโนไทโรซีน ไลซีน ออร์นิทีน และฮิสติดีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 4 กรดอะมิโนจะใส่สารอินดิเคเตอร์เดียวกัน ได้แก่ โบรโมครีซอลเพอเพิล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และไพริโดซอล-5-ฟอสเฟต 0.005 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบการสร้างและไม่สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้โดยสังเกตสีของอาหาร

ข) .การศึกษาผลการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารแข็ง Improved medium

เลือกโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เตรียมได้ในอาหารแข็งจากข้อ 3.4. 8.1มาจิ้มลงบนอาหารแข็ง Improved medium ที่มีกรดอะมิโน ไทโรซีน ไลซีน ออร์นิทีน และฮิสติดีน 0.1 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 4 กรดอะมิโนจะใส่สารอินดิเคเตอร์เดียวกัน ได้แก่ โบรโมครีซอลเพอเพิล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และไพริโดซอล-5-ฟอสเฟต 0.005 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ตรวจสอบการสร้างและไม่สร้างไบโอจีนิกเอมีนได้โดยสังเกตสีของอาหาร

3.4.8.3ศึกษาผลพีเอชในอาหารเหลว Improved medium ต่อการสร้างไบโอจีนิกเอมีน

นำเชื้อที่เลี้ยงได้จากข้อ ก. ในข้อ 3.4.8.2 จนครบ 48 ชั่วโมง มาวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช เพื่อดูแนวโน้มการสร้างไบโอจีนิกเอมีน โดยทำซ้ำ 3 ครั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

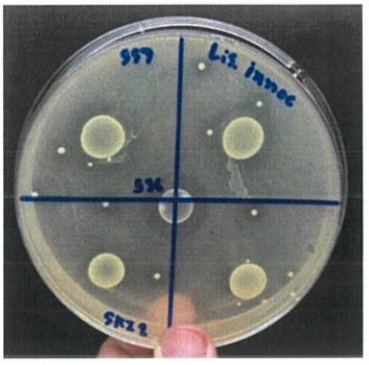
4.1 การทดสอบประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus, Lb. sakei* supsp. *sakei* JCM 1157T, *Lb. dextranicus* JCM 5887T, *S. aureus, Lis. innocua* และ *S.* Anatum ของ *Lb. plantarum* SKI2 โดยเทียบกับ *Lb. plantalum* SS7 และ *P. pentosaceus* TISTR 536

จากการศึกษายืนยันการสร้างผลิตแบคเทอริโอซีนของเชื้อ *Lb. plantarum* SS7, *Lb. plantalum* SKI2 และ *P. pentosaceus* TISTR536 พบว่าเชื้อ *Lb. plantarum* SS7 มีผลการยับยั้งเชื้อ *B. cereus, Lb. sakei* subsp. *sakei, S. aureus* และ *S.* Anatum ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4.1 (ก), (ข), (ง) และ (จ))โดยมีโซนใส มากถึง 0.1721 เซนติเมตร 0.3156 เซนติเมตร 0.1833 เซนติเมตร และ 0.1562 (ตารางที่ 4.1) ในขณะที่ *Lb. plantalum* SKI2 สามารถยับยั้ง *Lb. dextranicus* JCM 5887T ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4.1 (ฉ)) โดยมีโซนใส 0.2125 เซนติเมตร ส่วนเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 พบว่าสามารถยับยั้ง *Lis. innocua* ATTC 3309T ได้ดีที่สุด (ภาพที่ 4.1 (ค)) โดยมีโซนใส 0.2125 เซนติเมตร

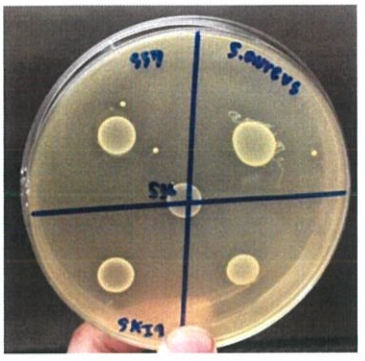
(ก)

(ข)

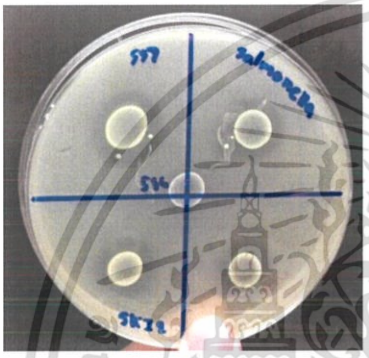
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



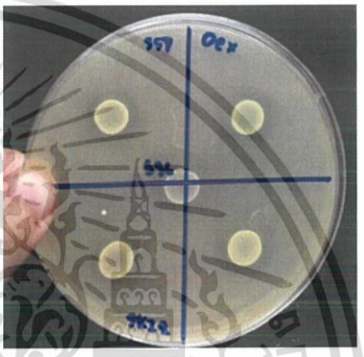
(ค)



(ง)



(จ)



(ฉ)

ภาพที่ 4.1 แสดงการเกิดโซนใสของเชื้อ *Lb. plantalum* SS7, *Lb. plantalum* SKI2 และ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ *B. cereus* (ก), *Lb. sakei* supsp. *sakei* (ข), *Lis. innocua* ATTC 3309T (ค), *S. aureus* (ง), *S.* Anatum (จ) และ *Lb. dextranicus* JCM 5887T (ฉ)

ตารางที่ 4.1 แสดงระยะที่วัดได้จากโซนใสของเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อเชื้ออินดิเคเตอร์แต่ละตัว (เซนติเมตร)

	เชื้ออินดิเคเตอร์					
เชื้อ Lactic acid	*B. cereus*	*L. sakei*	*Lis. Innocua*	*S. aureus*	*S.* anatum	*Lb. dextranicus*
Lb. plantalum SS7	0.1721	0.3156	0.1770	0.1833	0.1562	0.1875
Lb. plantalum SKI2	0.1168	0.1865	0.1437	0.1604	0.1337	0.2125
P. pentosaceus TISTR536	0.125	0.2500	0.2125	0.1	0.1	0.1833

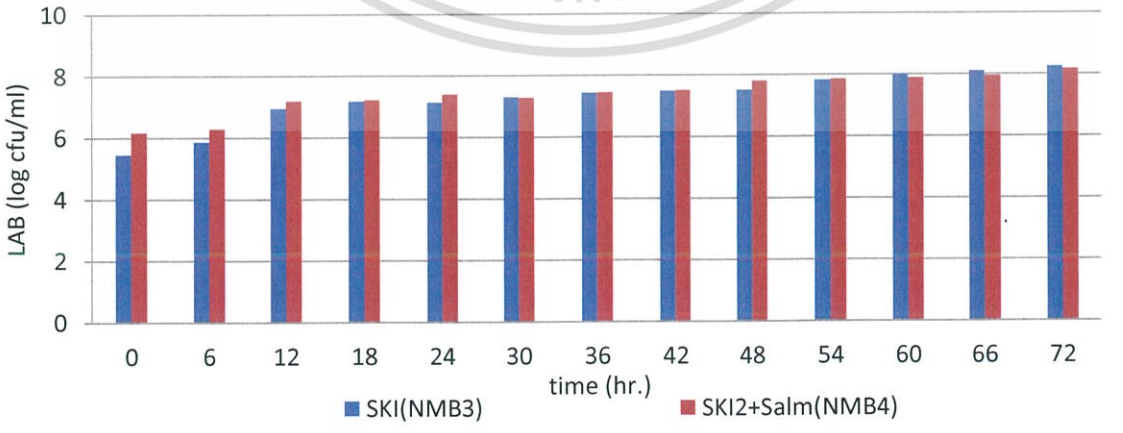
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดสอบประสิทธิภาพแบคเทอริโอซินสรุปได้ว่าเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 มีผลการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ดี ซึ่งเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 เป็นเชื้อที่สามารถแยกได้จากแหนมของบริษัท ส.ขอนแก่น และเนื่องจากเชื้อสามารถยับยั้ง *S.* Anatum ได้ จึงได้นำเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวไปทำการศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมให้ปลอดภัยในขั้นตอนการศึกษาต่อไป

4.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *B. cereus, Lb. sakei* supsp. *sakei, Lb. dextanicus* JCM 5887T, *S. aureus, Lis. innocua* และ *S.* Anatum ของ *Lb. plantarum* SKI2 ในแบบจำลองแหนม

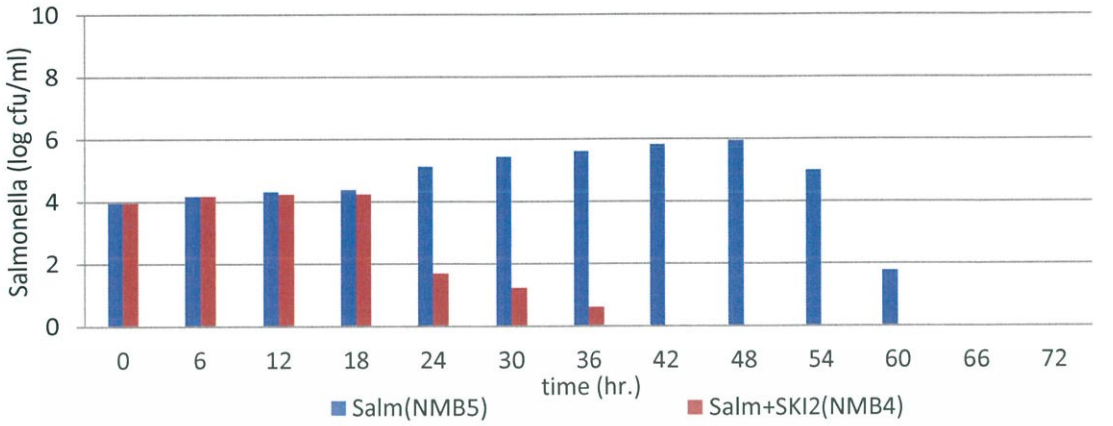
จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติกทุกๆ 6 ชั่วโมงจนครบ 72 ชั่วโมง ในสภาวะการหมักแบบไร้อากาศที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าปริมาณเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ของแบบจำลองแหนมในขวด NMB3 ซึ่งเป็นขวดที่ใส่เชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ในชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ 10^6 cfu/ml และเมื่อการหมักผ่านไปจนถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่าเกิดการเพิ่มปริมาณของเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ขึ้นอย่างรวดเร็วถึง 10^7cfu/ml และมีเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ปริมาณสูงสุดอยู่ที่ 10^8cfu/ml หลังจากหมักไปจนถึงชั่วโมงที่ 60 (ภาพที่ 4.2 (ก)) เช่นเดียวกันกับเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ในขวด NMB4 ที่เป็นขวดที่ใส่เชื้อผสมระหว่าง *Lb. plantalum* SKI2 และ *S.* Anatum ในขณะที่เชื้อ *S.* Anatum ในขวด NMB4 ที่ชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ 10^4 cfu/ml และมีปริมาณเชื้อคงที่ตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 18 และในชั่วโมงที่ 24 เชื้อมีปริมาณลดลงจนถึง 10^1 cfu/ml และไม่สามารถตรวจพบได้อีกในชั่วโมงที่ 42 (ภาพที่ 4.2 (ข)) ส่วนในขวด NMB5 ซึ่งเป็นขวดที่ใส่เชื้อ *S.* Anatum ในชั่วโมงที่ 0 มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ 10^4 cfu/ml และมีปริมาณเชื้อคงที่ตลอดจนถึงชั่วโมงที่ 24 จึงค่อยๆ เพิ่มขึ้นถึง 10^5 cfu/ml หลังจากหมักไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 เชื้อมีปริมาณสูงสุดอยู่ที่ 10^6cfu/ml และเริ่มลดลงถึง 10^4cfu/ml ในชั่วโมงที่ 54 และไม่สามารถตรวจพบได้อีกในชั่วโมงที่ 66

(ก)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(ข)



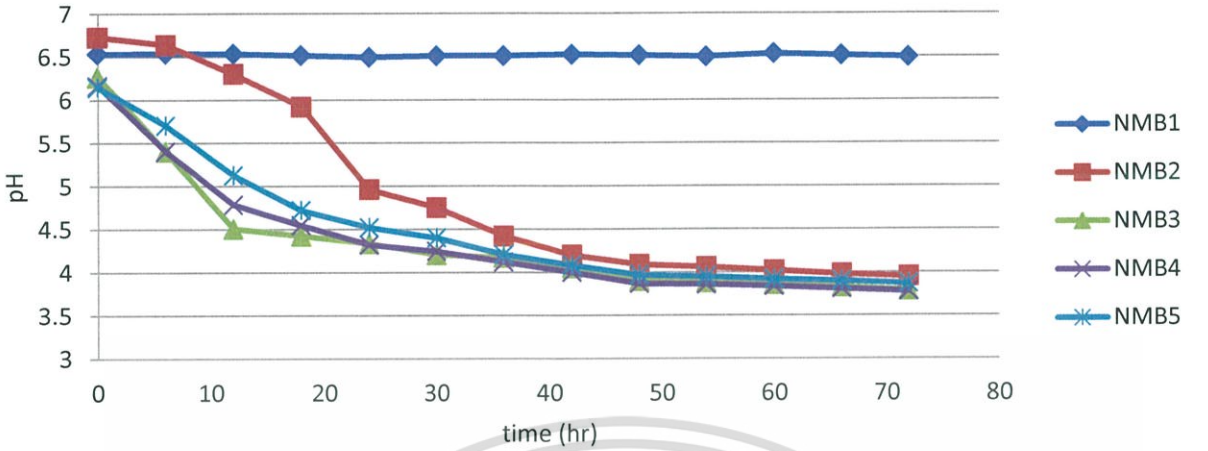
ภาพที่ 4.2 แสดงการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก *Lb. plantalum* SKI2 ที่เลี้ยงในแบบจำลองแหนม (ก) และการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค *S.* Anatum ที่เลี้ยงในแบบจำลองการหมักแหนม (ข) เมื่อเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จนครบ 72 ชั่วโมง

เนื่องจากขวด NMB4 เป็นขวดที่มีการผสมกันระหว่างเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ 10^{6} cfu/ml กับ *S.* Anatum ที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นอยู่ที่ 10^{4} cfu/ml พบว่าเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 สามารถเจริญเติบโตได้ดีตลอดการหมักและมีปริมาณเชื้อสูงสุดอยู่ที่ 10^{8} cfu/ml ในขณะที่เชื้อ *S.* Anatum เจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 โดยมีปริมาณเชื้อสูงสุดอยู่ที่ 10^{4} cfu/ml และมีปริมาณเชื้อลดลงเรื่อยๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เหลือ 10^{1} cfu/ml จนไม่สามารถตรวจพบได้อีกในชั่วโมงที่ 42 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Swetwiwathana และคณะ (2015) ที่ศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนมด้วยเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินชนิด pediocin PA-1 ซึ่งทำให้การเจริญของเชื้อ *S.* Anatum ลดลงที่ชั่วโมงที่ 12 และไม่พบเชื้อ *S.* Anatum อีกเลยในชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก จึงสรุปได้ว่ามีโอกาสในการใช้เชื้อแลคติกผลิตแหนมเพื่อให้เกิดความปลอดภัยและพัฒนาเชื้อแบคทีเรียหรือสารอาหารที่ไม่มีพิษต่อสุขภาพโดยพิสูจน์ผ่านทางการแพทย์แล้ว และในอนาคตการนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกมาใช้จะสามารถยอมรับได้มากขึ้นเมื่อมีการศึกษาต่อไปเพิ่มขึ้นถึงวิธีการ ขบวนการและสิ่งที่เป็นผลดีกับร่างกายมนุษย์เมื่อรับประทานเข้าไป

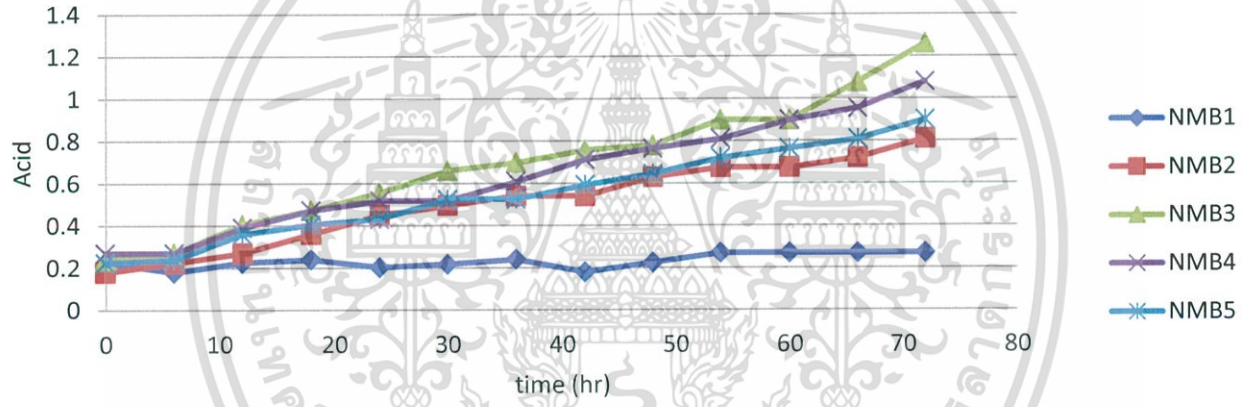
4.3 การวิเคราะห์สมบัติด้านเคมีของแบบจำลองแหนม

การสร้างกรดในรูปกรดแลคติกของเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ส่งผลทำให้ค่าพีเอชและค่าความเป็นกรดของแบบจำลองแหนมที่มีเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 (NMB3 และ NMB4) ในชั่วโมงที่ 72 มีค่าพีเอชอยู่ที่ 3.61 จากเริ่มต้น 5.96 และ 3.82 จากเริ่มต้น 5.84 ตามลำดับ และที่ชั่วโมงที่ 72 มีค่าความเป็นกรดเท่ากับ 1.25 จากเริ่มต้น 0.23 และ 1.07 จากเริ่มต้น 0.27 โดยค่าความเป็นกรดของ NMB3 และ NMB4 เพิ่มขึ้นมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 แสดงค่าพีเอชของแบบจำลองการหมักแหนมทั้ง 5 ขวด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 72



ภาพที่ 4.4 แสดงค่ากรดของแบบจำลองการหมักแหนมทั้ง 5 ขวด ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 72

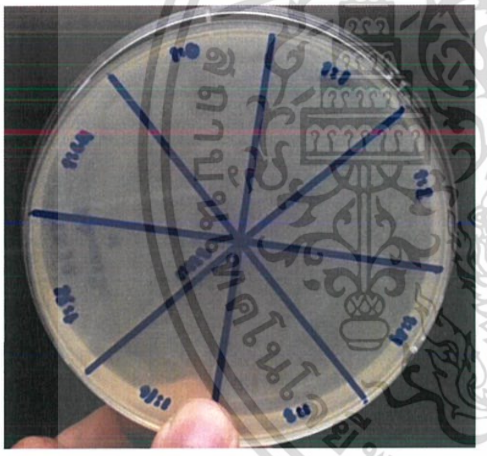
เมื่อเทียบกับแบบจำลองแหนมที่ใส่กระเทียม (NMB2) และแบบจำลองแหนมที่ใส่เชื้อ *S.* Anatum (NMB5) โดยพบว่า NMB2 มีค่าพีเอชต่ำสุดอยู่ที่ 3.95 ในชั่วโมงที่ 72 จากเริ่มต้น 6.73 และมีค่าความเป็นกรดสูงสุดอยู่ที่ 0.80 จากเริ่มต้น 0.18 เช่นเดียวกันกับขวด NMB5 ที่ใส่เชื้อ *S.* Anatum มีค่าพีเอชต่ำสุดอยู่ที่ 3.90 ในชั่วโมงที่ 72 จากเริ่มต้น 6.14 และมีค่าความเป็นกรดสูงสุดอยู่ที่ 0.89 จากเริ่มต้น 0.22 ส่วนขวดที่ไม่ได้ใส่เชื้อและกระเทียม) NMB1 (มีค่าพีเอชและค่าความเป็นกรดที่คงที่ตลอดการหมักที่ 6.51 และ 0.22 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3 และ 4.4) จึงสรุปได้ว่าเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดีในระหว่างการหมักแหนมและมีผลทำให้ค่าพีเอชในแหนมโมเดลบรอทลดลง ส่งผลให้ขวดแหนมโมเดลบรอท NMB4 เกิดการลดลงของ *S.* Anatum ด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

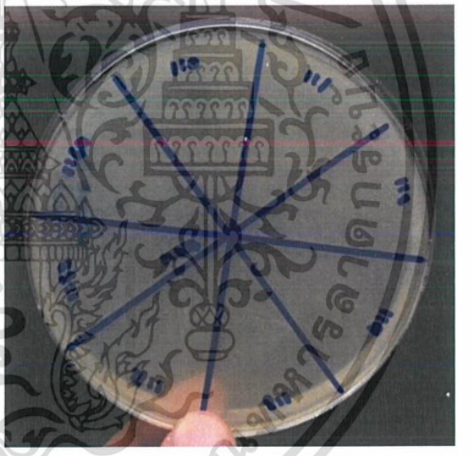
ซึ่งสอดคล้องกันกับงานวิจัยของ ปาริชาติ และคณะ (2561) ที่ศึกษาถึงผลของกลาเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่อคุณภาพทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยา ของแหนมซี่โครงหมูอ่อน โดยใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantarum* TISTR 543 ซึ่งจากการวิจัยพบว่าการใช้กล้าเชื้อทำให้ค่าความเป็นกรดและปริมาณแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นสูงกว่าแหนมซี่โครงหมูอ่อนที่ไม่เติมกล้าเชื้อ และเมื่อครบ 48 ชั่วโมง หรือสิ้นสุดระยะการหมัก แหนมซี่โครงหมูอ่อนที่หมักด้วยกลาเชื้อ *Lb. plantarum* TISTR 543 มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุด โดยมีความเปนกรดด-าง 4.42±0.01 ปริมาณกรดทั้งหมด รอยละ 0.910±0.021 ในรูปกรดแลคติก ผลการวิเคราะหคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑแหนมซี่โครงหมูออนที่ทำใหสุกด้วยการอบตรวจไมพบ *Salmonella spp.* จึงบอกได้ว่า *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 เนื่องจากเปนกลาเชื้อที่ เกิดการหมักไดเร็ว ซึ่งเปนผลดีในกระบวนการแปรรูปและชวยลด การเสื่อมเสียจากจุลินทรียชนิดอื่น

4.4 ศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยกล้าเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 ต่อการยับยั้งเชื้อ S. Anatum ในแบบจำลองการหมักแหนม

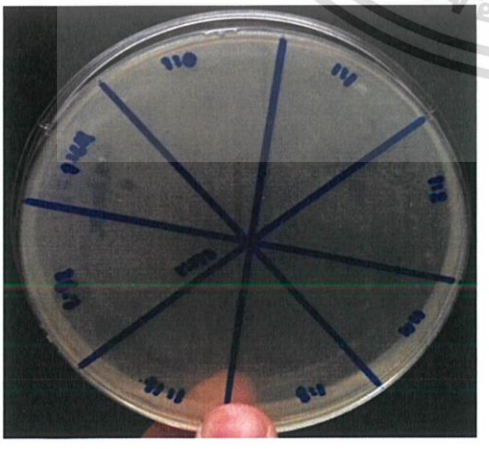
(ก)



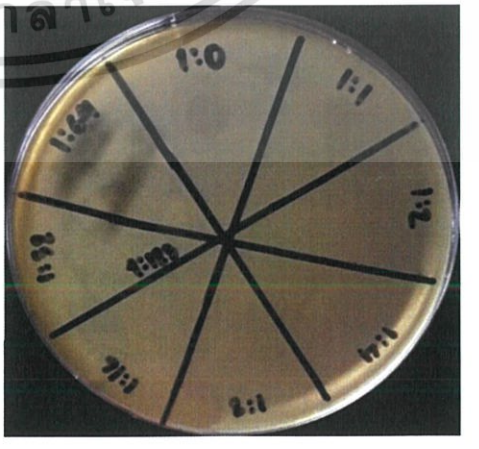
(ข)



(ค)

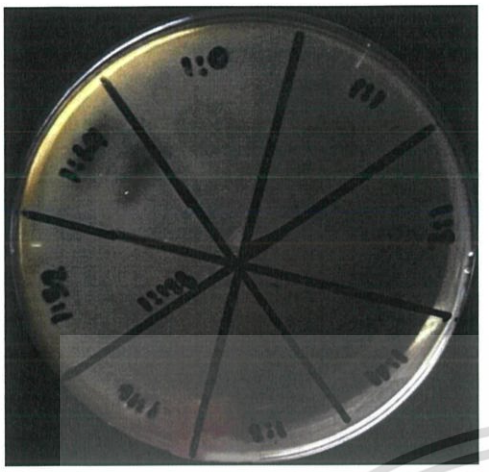


(ง)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(จ)



ภาพที่ 4.5 แสดงการเกิดโซนใสจากแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ที่เลี้ยงในแหนมโมเดลบรอท ต่อเชื้ออิดิเคเตอร์ ดังนี้ *S.* Anatum (ก), *S. aureus* (ข), *Lis. innocua* ATTC 3309T (ค), *Lb. sakei* subsp. *sakei* (ง) และ *Lb. dextranicus* JCM 5887T (จ)

ตารางที่ 4.2 แสดงความเข้มข้น (arbitrary unit, AU/ml) ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 เมื่อบ่มเพาะเชื้อใน NMB ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง

Indicator	Activity unit (AU/ml)
S. Anatum	10
S. aureus	100
Lb. dextranicus JCM 5887T	200
Lb. sakei subsp. *sakei*	100
Lis. innocua ATTC 3309T	10

จากการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 โดยเก็บตัวอย่างจาก NMB ในชั่วโมงที่ 36 พบว่าการเกิดโซนใสในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum และ *Lis. innocua* ATTC 3309T ที่เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์เริ่มจากความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินมากที่สุดที่ 1:0 เท่านั้น (ภาพที่ 4.5 (ก) และ (ค)) ในขณะที่เชื้อ *S. aureus* และ *Lb. sakei* subsp. *sakei* เริ่มเกิดโซนใสจากความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินมากสุดที่ 1:0 และ 1:1 (ภาพที่ 4.5 (ข) และ (ง)) และเชื้อ *Lb. dextranicus* JCM 5887T เริ่มเกิดโซนใสจากความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินมากสุดที่ 1:0, 1:1 และ 1:2 (ภาพที่ 4.5 (จ)) จากนั้นเมื่อนำมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินพบว่าเมื่อใช้เชื้อ *S.* Anatum และ *Lis. innocua* ATTC 3309T เป็นอินดิเคเตอร์จะมีค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 10 (ตารางที่ 4.2) เชื้อ *S. aureus* และ *Lb.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

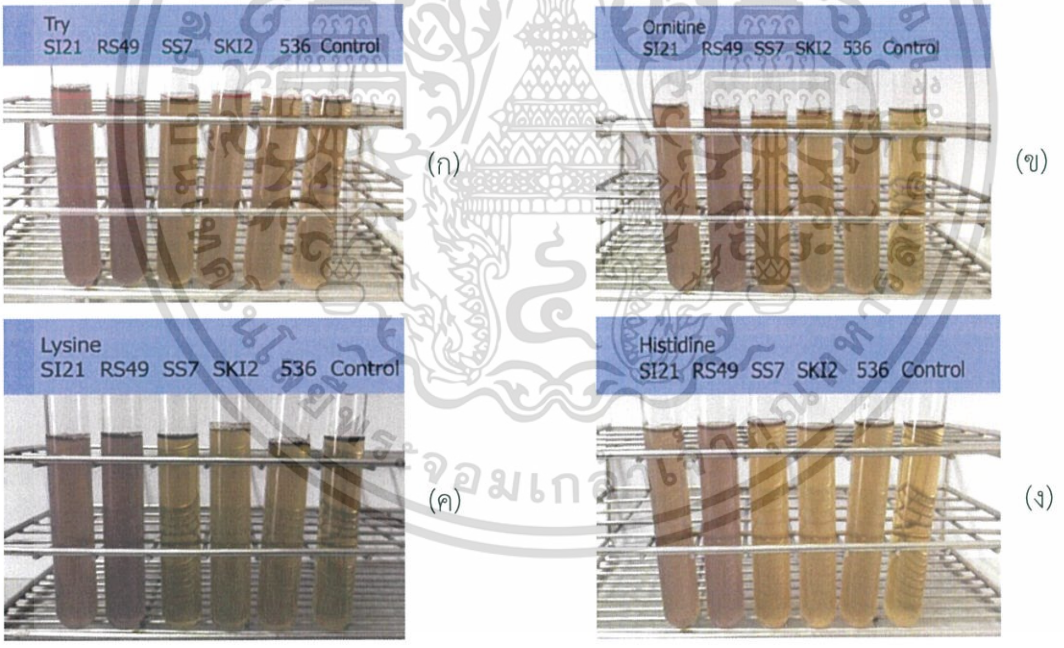
sakei subsp. *sakei* จะมีค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 100 และเชื้อ *Lb. dextanicus* JCM 5887T จะมีค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 200

จึงสรุปได้ว่าการลดลงของเชื้อ *S.* Anatum ในแหนมโมเดลบรอท NMB4 ของการทดลองข้างต้นมีผลมาจากแบคเทอริโอซินและกรดแลคติกที่เชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ผลิตขึ้น รวมถึงกระเทียมก็มีส่วนช่วยที่ทำให้เชื้อ *S.* Anatum ลดลงด้วย เนื่องจากพบการลดลงของเชื้อ *S.* Anatum ในขวด NMB5 ที่มีเพียงเชื้อ *S.* Anatum และกระเทียมฆ่าเชื้อด้วยเช่นกัน แต่ในขวดแหนมโมเดลบรอท NMB5 จะมีการลดลงของเชื้อ *S.* Anatum ที่ช้าการในขวดแหนมโมเดลบรอท NMB4

4.5 การศึกษาการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติก

4.5.1ผลการศึกษาผลการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลว Improved medium

จากการทดลองเพื่อดูแนวโน้มของการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 เทียบกับเชื้อ *Lb. plantalum* SS7, *P. pentosaceus* TISTR 536, *W. cibaria* SI21 และ *Lb. plantalum* RS49 โดยการเปลี่ยนสีของอาหารเหลว Improved medium จากสีเหลืองไปเป็นสีม่วง หรือเป็นสีม่วงเข้มขึ้น



ภาพที่ 4.6 แสดงสีที่เกิดขึ้นในอาหารเหลว improve medium ของอะมิโน Tyrosine (ก), Ornitine (ข), Lysine (ค) และ Histidine (ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พบว่าเมื่อสังเกตจากสีอาหาร *Lb. plantalum* SKI2 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีอาหารใดๆ จากเหลืองไปเป็นสีม่วง (ภาพที่ 4.6) และมีค่าพีเอชต่ออะมิโน Tyrosine, Ornitine, Lysine และ Histidine อยู่ที่ 6.03, 5.8, 5.66 และ 5.61 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.3) เชื้อ *Lb. plantalum* SS7 ไม่มีแนวโน้มต่อการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนกับกรดอะมิโนใด โดยสังเกตจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงสีอาหารจากเหลืองไปเป็นสีม่วงและมีค่าพีเอชต่ออะมิโน Tyrosine, Ornitine, Lysine และ Histidine อยู่ที่ 6.04, 5.8, 5.6 และ 5.63 เชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536มีแนวโน้มต่อการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนกับกรดอะมิโน Tyrosine พบว่าการเปลี่ยนแปลงสีอาหารจากเหลืองไปเป็นสีม่วงเล็กน้อย และมีค่าพีเอชต่ออะมิโน Tyrosine อยู่ที่ 6.12 เชื้อ *W. cibaria* SI21 มีแนวโน้มต่อการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนกับกรดอะมิโน Tyrosine, Ornitine, Lysine และ Histidine พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสีอาหารจากเหลืองไปเป็นสีม่วงเทา และมีค่าพีเอชต่ออะมิโน Tyrosine, Ornitine, Lysine และ

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าพีเอชของอาหารเหลว Improved medium

เชื้อทดสอบ (LAB)	Tyrosine	Ornitine	Lysine	Histidine
Lb. plantalum SKI2	6.12	5.74	5.52	5.58
Lb. plantalum SS7	6.03	5.8	5.66	5.61
P. pentosaceus TISTR 536	6.04	5.8	5.6	5.63
W. cibaria SI21	6.2	5.83	5.74	5.68
Lb. plantalum RS49	6.16	6.05	5.88	5.81
Control	6.18	5.82	5.72	5.63

ตารางที่ 4.4 แสดงแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารไบโอจิกเอมีนในอาหารเหลว Improved medium

เชื้อทดสอบ)LAB(	Tyrosine	Ornitine	Lysine	Histidine
Lb. plantalum SKI2	-	-	-	-
Lb. plantalum SS7	-	-	-	-
P. pentosaceus TISTR 536	-	-	-	-
W. cibaria SI21	+++	+++	++	++
Lb. plantalum RS49	+++	+++	+++	+++

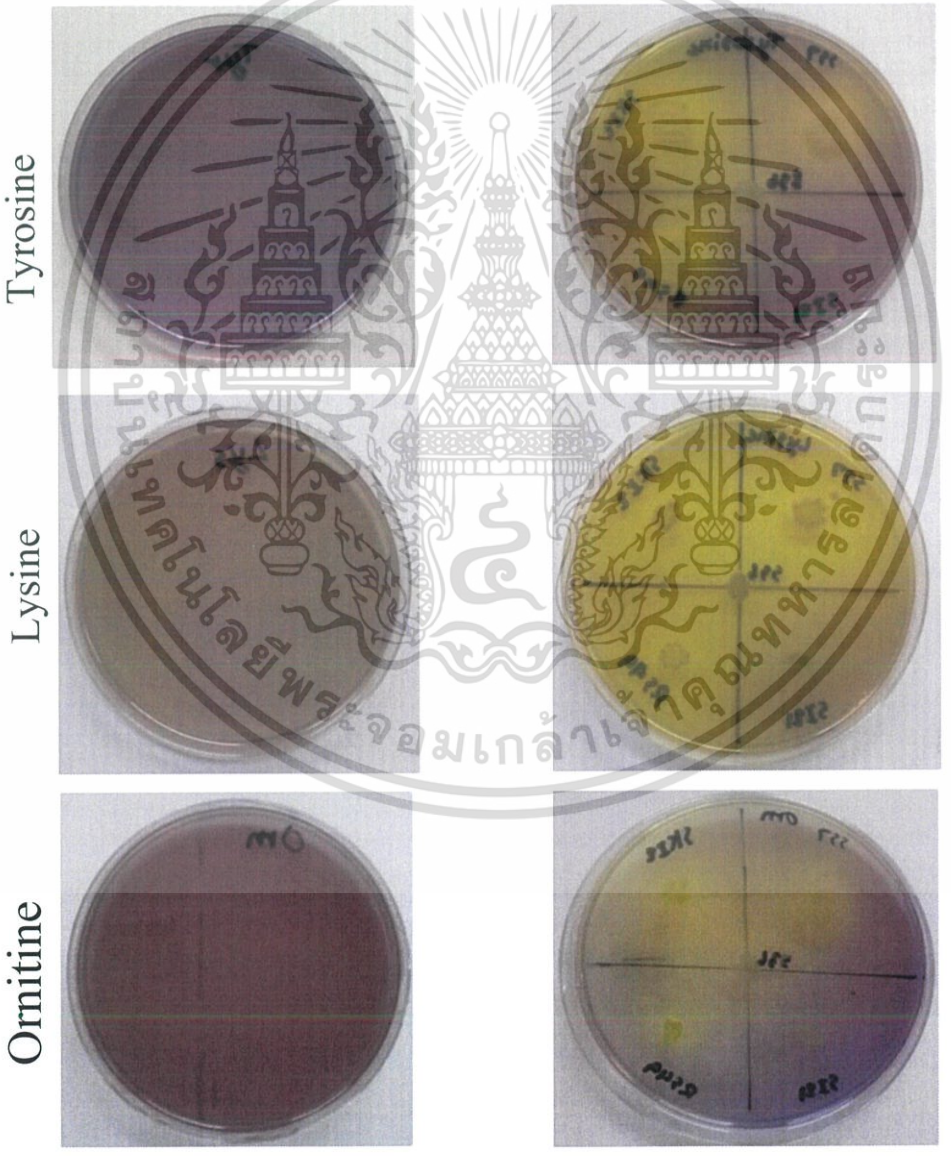
หมายเหตุ: จำนวน + = เพลทอาหารเปลี่ยนเป็นสีม่วงมากขึ้นตามจำนวน, - = ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของเพลทอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Histidine อยู่ที่ 6.2, 5.83, 5.74 และ 5.68 และเชื้อ *Lb. plantalum* RS49 มีแนวโน้มต่อการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีนกับกรดอะมิโน Tyrosine, Ornitine, Lysine และ Histidine พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสีอาหารจากเหลืองไปเป็นสีม่วงเทา และมีค่าพีเอชต่ออะมิโน Tyrosine, Ornitine, Lysine และ Histidine อยู่ที่ 6.16, 6.05, 5.88 และ 5.81 จึงสรุปออกได้เป็นตารางที่ 4.4

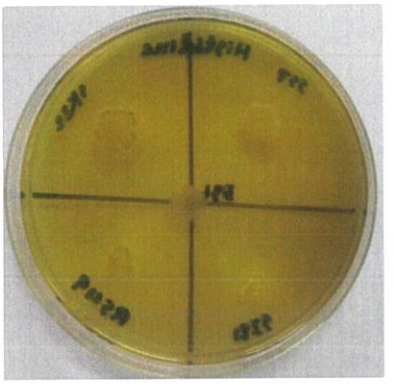
จากการทดสอบวัดค่าพีเอสพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เปลี่ยนอาหารเหลว Improve medium ไปเป็นสีม่วงได้แก่ *W. cibaria* SI21 และ *Lb. plantalum* RS49 โดยพีเอชในอาหารเหลว Improve medium ทั้ง 4 อะมิโน เชื้อ *Lb. plantalum* RS49 มีพีเอชสูงที่สุดในเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ทดสอบทั้ง 5 ตัว

4.5.2การศึกษาผลการสร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารแข็ง Improved medium



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Histidine



ภาพที่ 4.7 แสดงสีของอาหารแข็ง improved medium ของทั้ง 4 อะมิโน

จากการทดสอบเชื้อทั้ง 5 ตัว พบว่าในอะมิโน Tyrosine ที่มีสีม่วงถ้ามีการสร้างไบโอจีนิกเอมีนที่มีความเป็นเบสออกมาจะไม่เปลี่ยนแปลงสีของอาหารไปเป็นสีเหลืองแต่จะม่วงเท่าเดิมหรืออาจจะเพิ่มขึ้นเล็กน้อย ในขณะที่อาหารที่มีอะนิโนชนิดอื่นๆ จะพบว่ามีการเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองไปเป็นสีม่วง โดยเชื้อที่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารแข็ง improve medium ได้แก่ *W. cibaria* SI21 และ *Lb. plantalum* RS49 (ภาพที่ 4.7) โดยสังเกตจากสีอาหารเกิดทั้งอะมิโน Tyrosine, Ornitine, Lysine และ Histidine จึงสรุปมาได้ตามตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.5 แสดงแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารไบโอจิกเอมีนในอาหารแข็ง Improved medium

เชื้อทดสอบ (LAB)	Tyrosine	Ornitine	Lysine	Histidine
Lb. plantalum SKI2	-	-	-	-
Lb. plantalum SS7	-	-	-	-
P. pentosaceus TISTR 536	-	-	-	-
W. cibaria SI21	+	+	+	+
Lb. plantalum RS49	+	+	+	+

หมายเหตุ: จำนวน + = เกิดการสร้างไบโอจีนิกเอมีน, - = ไม่เกิดการสร้างไบโอจีนิกเอมีน

ซึ่งแตกต่างกันกับงานวิจัยของ Nuttinee (2017) ที่ศึกษาประสิทธิผลของกล้าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536 ต่อความปลอดภัยของการผลิตแหนม โดยการทดสอบอะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ ไทโรซีน ไลซีน ฮีสติดีน และออร์นิทีน ซึ่งได้ผลว่าแบคทีเรียแลคติกเชื้อสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 ไม่พบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของทุกกรดอะมิโน ในขณะที่เชื้อสายพันธุ์ *Lb. plantalum* SS7 พบการสร้างไทรามีนในอาหารแข็ง Improved medium แต่ไม่พบการสร้างในอาหารเหลว Improved medium

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองตรวจสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีนของเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 พบว่าเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 ไม่มีการสร้างไบโอจีนิกเอมีน ดังนั้นการใช้กล้าเชื้อ *Lb. plantalum* SKI2 นอกจากช่วยลดปริมาณของ *S.* Anatum ในระหว่างการหมักแหนมในการศึกษาข้างต้นแล้ว ยังสามารถทำให้แหนมเป็นผลิตภัณฑ์ที่ปลอดภัยจากการแพ้เนื่องจากสารไบโอจีนิกเอมีนด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

ผลการวิจัยแหนมโมเดลบรอทพบว่าเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 สามารถยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum จนหมดได้ในแหนมโมเดลบรอทได้ที่ชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก และเมื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินพบโซนใสของเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 เมื่อใช้เชื้ออินดิเคเตอร์เป็น *Lb. dextranicus* JCM 5887T กว้างที่สุดโดยมีโซนใส 0.2125 เซนติเมตร โดยเกิดโซนใสของเชื้ออินดิเคเตอร์ *S.* Anatum อยู่ที่ 0.1337 เซนติเมตร เมื่อนำเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 มาทดสอบการสร้างและไม่สร้างไบโอจีนิกเอมีนในอาหารเหลวและอาหารแข็ง improve medium โดยใช้อะมิโน 4 ชนิด ได้แก่ Tyrosine, Ornitine, Lysine และ Histidine ทดสอบเทียบกับเชื้อ *Lb. plantalum* SS7, *P. pentosaceus* TISTR 536, *W. cibaria* SI21 และ *Lb. plantalum* RS49 โดยให้ *P. pentosaceus* TISTR 536 เป็น negative control และ *W. cibaria* SI21 เป็น positive control พบว่าเชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 ให้ผล negative กับอะมิโนทั้ง 4 ชนิด จึงสรุปได้ว่า *Lb. plantarum* SKI2 สามารถยับยั้ง *S.* Anatum และไม่ผลิตสารไบโอจีนิกเอมีนในแหนมโมเดลบรอท จึงสามารถนำ *Lb. plantarum* SKI2 ไปพัฒนาความปลอดภัยและคุณภาพต่อในระดับอุตสาหกรรมอาหารได้

5.2 ข้อเสนอแนะ

นำข้อมูลจากงานวิจัยครั้งนี้ไปศึกษาต่อเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่สามารถใช้เชื้อ *Lb. plantarum* SKI2 ร่วมได้ หรือนำวิธีการต่างๆ นี้ไปใช้ศึกษาเป็นแนวทางในงานวิจัยกับเชื้อตัวอื่นต่อไป โดยอาจนำแนวโน้มที่เกิดขึ้นไปใช้ในการอ้างอิงต่างๆ ได้ เพื่อก่อให้เกิดอุตสหากรรมอาหารที่มีคุณภาพและประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

โกวินย์ บุชประมูล และ ไพศาล เลาห์เรณู. (2517). การอาบรังสีแหนมเพื่อทำลายเชื้อโรคท้องร่วงซัลโมเนลล่า. กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ. สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ

จินต์ศุจี กอบกุธร, นิภาพรรณ สฤษดิ์อภิรักษ์ และ กรรณิการ์ หมอนพังเทียม. (2557). สถานการณ์โรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทย. กองแผนงานกรมควบคุมโรค

ปาริชาติ ศงสนันทน และ ศิรลิกัษณ เจริญรัตน์. (2561). ผลของกลาเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกตอคุณภาพทางกายภาพ เคมี จุลชีววิทยา และประสาทสัมผัสของแหนมซี่โครงหมูอ่อน. สาขาวิชาวิทยาศาสตรและเทคโนโลยีอาหาร. คณะวิทยาศาสตร. มหาวิทยาลัยพายัพ.

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. (2554). แหนม. (ออนไลน์). สืบค้นเมื่อ เมษายน 29, 2562, จากเว็บไซต์http://www.foodnetworksolution.com/wiki/word

พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และนิธิยา รัตนาปนนท์. (2558). (Probiotic/โปรไบโอติก). (ออนไลน์). สืบค้นเมื่อ เมษายน 29, 2562, จากเว็บไซต์http://wwwfoodnetworksolution.com/wiki/probiotic

สุวัฒน์ มลิจารย์ และ ศิรินทร์ทิพย์ วนาประเสริฐศักดิ์. (2555). การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella spp.* และ *Staphylococcus aureus* ในเนื้อสัตว์จากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดราชบุรี. สำนักงานสาธารณะสุขจังหวัดราชบุรี.

Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 53: 33-41.

Comenanta, J. (1966). Thai Fermented Pork. I. Microbiology of the Thai Fermented Pork. B.Sc. thesis, Kasetsart University, Thailand.

da Silva Sabo, S., Vitolo, M., González, J.M.D. and de Souza Oliveira, R.P. (2014) Overview of *Lactobacillus plantarum* as a promising bacteriocin producer among lactic acid bacteria. Food research international, 64: 527-536.

Ed-dra, A., Filali, F. R., Karraouan, B., El-Allaoui, A., Aboulkacem, A., Bouchrif, B. (2017). Prevalence, molecular and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from sausages in Meknes, Morocco. Microbial Pathogenesis, 105, 340–345.

Eslamifar, M, and Kbojanowski, B. (2016) *Lactobacillus plantarum* Revision history. Journal of food science and technology, 447-508.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Klabkong, K., Kwanmuang, P., and Bunnak, J. (2013) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* . JCM Catalogue, 586-595.

Leuschner, R.G., Heidel, M. and Hammes, W.P. (1998). Histamine and tyramine degradation by food fermenting microorganisms. Int. J. Food Microbiol. 39: 1-10.

Nuttinee, J. (2017). Efficiency of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 as starter for safety nham production. Journal of food science and technology, 1-34.

Silla Santos, M.H.S. 1996. Biogenic amines: Theirimportance in foods. Int. J. Food.Microbiol. 29: 213-231.

Swetwiwathana, A., Leutz, U., Lotong, N. and Fischer, A. (1999). Controlling the Growth of *Salmonella* anatum in Nham. Effect of Meat Starter Culture, Nitrate, Nitrite and Garlic. Fleischwirtsch. 79(9): 124-128.

Swetwiwathana, A., Visessanguan, W. (2015). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvement of traditional Thai fermented meat and human health. Elsevier.

Swetwiwathana, A., Jindaprasert, A., Zendo, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. (2016). Plantaricin W producer: *Lactobacillus plantarum* SS7 isolated from Isan-sausage. 62nd International Congress of Meat Science and Technology. Thailand.

Thai, T. H., Hirai, T., Lan, N. T., and Yamaguchi, R. (2012). Antibiotic resistance profiles of *Salmonella* serovars isolated from retail pork and chicken meat in North Vietnam. International Journal of Food Microbiology, 156(2), 147151.

Tosukhowong, A., Visessanguan, W., Pumpuang, L., Tepkasikul, P., Panya, A., & Valyasevi, R. (2011). *Biogenic amine formation in Nham, a Thai fermented sausage, and the reduction by commercial starter culture, Lactobacillus plantarum BCC 9546. Food Chemistry, 129(3), 846–853.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

ก.1 การเตรียมสารเคมี

1. Kovac indole reagent

Pure amyl หรือ Isoamyl alcohol	150	ml
p-Dimethylaminobenzaldehyde	10	g
HCL (conc.)	50	ml

ละลาย aldehyde ใน alcohol แล้วค่อยๆ เติม HCL เก็บในขวดสีชา 4-10 องศา

ก.2 การเตรียมสีย้อม

1. Gram crystal violet

Solution A (Stock)

Crystal violet (90% dye content)	2	g
95% Ethanol	20	g

Solution B

Ammonium oxalate	0.8	g
น้ำกลั่น	80	ml

เจือจาง Solution A ลง 10 เท่าด้วยน้ำกลั่นแล้วผสมกับสาร Solution B ตั้งไว้ 24 ชม. แล้วกรองก่อนใช้

2. Gram iodine (Mordant)

Iodine	2	g
Potassium iodide	4	g
น้ำกลั่น	300	ml

ละลาย KI ในน้ำกลั่น บด iodine แล้วละลายในสารละลาย KI กวนจนละลายหมด เก็บไว้ในขวดสีชา

3. Decolorizing agent

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

95% Ethanol	100	ml

4. Gram safranin O (Counter stain)

Safranin O	0.25	g
95% Ethanol	10	ml
น้ำกลั่น	90	ml

ละลายสีใน Ethanol (กวนด้วยแท่งแก้วหรือ magnetic bar) แล้วเติมน้ำกลั่น กรองก่อนใช้

ก.3 การเตรียมน้ำยาเจือจาง

1. Butterfield's Phosphate-Buffered Dilution Water

1.1 การเตรียมสารละลายสต็อก

ละลายโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH2PO4) 34 g ในน้ำกลั่น 500 ml ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ด้วย สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1N และปรับปริมาตรเป็น 1 L แล้วนำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียม Dilution blank

ตวงสารละลายสต็อก 1.25 ml แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 L ด้วยน้ำกลั่น ตวงใส่ขวดปริมาตร 225 ml (สำหรับเจือจางตัวอย่าง 25 g) และดูด 9 ml ใส่หลอดทดลองขนาด 16 x 150 mm. นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 15 นาที

ก.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

Tween 80	1	ml
Di-potassium hydrogen phosphate	2	g
Sodium acetate	5	g
Di-ammonium citrate	2	g
Manganese sulfate	0.05	g
Magnesium sulfate	0.1	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Calcium carbonate	5	g
Tryptone	10	g
Dextrose	20	g
Beef extract	10	g
Yeast extract	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ปรับพีเอชให้ได้ 6.5-6.8 เข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 15 นาที

2. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Tween 80	1	ml
Di-potassium hydrogen phosphate	2	g
Sodium acetate	5	g
Di-ammonium citrate	2	g
Manganese sulfate	0.05	g
Magnesium sulfate	0.1	g
Tryptone	10	g
Dextrose	20	g
Beef extract	10	g
Yeast extract	5	g
น้ำกลั่น	1	L

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ปรับพีเอชให้ได้ 6.5-6.8 เข้า autoclave ดูดใส่ในหลอดทดลอง 16 x 150 mm. ปริมาตรหลอดละ 10 ml ปิดจุกแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 15 นาที

3. Buffer Peptone Water (BPW)

Tryptone	10	g
Sodium chloride	5	g
Disodium hydrogen phosphate	9	g
Potassium dihydrogen phosphate	1.5	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำกลั่น	1	L

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ปรับพีเอชให้ได้ = 7.0 ± 0.2 แล้วท้าการฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 15 นาที

4. Trypticase (Tryptic) Soy Broth

Trypticase peptone	17	g
Phytone peptone	3	g
NaCl	5	g
K2HPO4	2.5	g
Glucose	2.5	g
น้ำกลั่น	1	L
Final pH	7.3 ± 0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ถ่ายอาหารปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในฟลาสก์หรือขวดที่มีจุกส้าลีหรือฝาปิด เข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 15 นาที

5. Baird-Parker medium

5.1 Base medium

Tryptone	10	g
Beef extract	1	g
Yeast extract	1	g
Sodium pyruvate	10	g
Glycine	12	g
Lithium chloride.6H2O	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	950	ml
Final pH	7.0 ± 0.2	

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มวุ้นจนละลาย ปรับพีเอช เทสารละลายที่ได้ลงฟลาส์ก 250 มิลลิลิตร ให้ได้ฟลาส์กละ 190 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 สารละลาย1% Potassium tellurite

Potassium tellurite	1	g
น้ำกลั่น	100	ml

ละลาย Potassium tellurite ในน กลั่น กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.3 Egg yolk – tellurite emulsion

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ไข่ไก่ไว้ใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่และทำการแยกไข่ขาวโดยเทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มีขีดบอกปริมาตร ผสมไข่แดงและน้ำเกลือ 0.85% (normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมในอัตราส่วนเกลือ 0.85% 5 ส่วน + ไข่แดง 5 ส่วน จากนั้นนำ Egg yolk emulsion ที่ได้จำนวน 50 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลาย1% Potassium tellurite ที่กรองปลอดเชื้อแล้ว 10 มิลลิลิตร ปิดฝาเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งอาหาร Baird-Parker medium มา 190 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส) Egg yolk – tellurite emulsion ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันระวังฟองอากาศ แล้วเทใส่จานเพาะเชื้อ

6. Mannitol-Egg Yolk-Polymyxin (MYP) Agar

6.1 Base medium

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

ผสมองค์ประกอบทั้งหมดแล้วต้มวุ้นจนละลาย ปรับพีเอช เทสารละลายที่ได้ลงฟลาส์ก 500 มิลลิลิตร ให้ได้ฟลาส์กละ 225 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 Polymyxin B solution

ละลายผง Polymyxin B solution 1 MU (sigma P1004) ลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร กรองผ่านแผ่นกรอง ปลอดเชื้อ 0.2 µm เก็บในขวดปลอดเชื้อที่ปิดสนิท เก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งใช้

6.3 Egg yolk emulsion, 50%

ล้างไข่ไก่ให้สะอาด แช่ไข่ไก่ไว้ใน 70% ethanol เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ตอกไข่ไก่และทำการแยกไข่ขาวโดย เทคนิคปลอดเชื้อ แยกไข่แดงใส่ลงในขวดปราศจากเชื้อที่มีขีดบอกปริมาตร ผสมไข่แดงและน้ำเกลือ 0.85% (normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ผสมในปริมาตรที่เท่ากัน ปิดฝาเก็บในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

6.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

แบ่งอาหาร MYP Agar มา 225 มิลลิลิตร (อุณหภูมิ 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

7. Nutrient Agar (NA)

Beef extract	3	g
Peptone	5	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1	L

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ปรับพีเอชให้ได้ 7.0 ± 0.2 เข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 15 นาที

8. Bacteriocin screening medium (BSM)

Tryptone	10	g
Beef extract	2	g
Yeast extract	4	g
Glucose	2	g
Dipotassium hydrogen phosphate	8.7	g
Potassium dihydrogen phosphate	8	g
Tween 80	1	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Diammonium hydrogen citrate	2	g
Magnesium sulfate	0.2	g
Manganese sulfate	0.05	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	L

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ปรับพีเอชให้ได้ 6.8-7.0 เข้า autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศา เป็นเวลา 15 นาที

9. Hektoen Enteric Agar

Peptone	15	g
Sodium chloride	5	g
Sucrose	14	g
Lactose	14	g
Salicin	2	g
Sodium thiosulfate	5	g
Ferric ammonium citrate	1.5	g
Bile salts	2	g
Bromthymol blue	0.05	g
Acid Fuchsin	0.08	g
Agar	13.5	g
น้ำกลั่น	1	L

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ต้มพอเดือดให้วุ้นละลายระวัง overheat จะทำให้เกิดตะกอนของเกลือได้ ไม่ต้องฆ่าเชื้อใน autoclave ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 องศา แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ไม่ควรใส่ฟลาสก์ไว้ใน water bath นานเกิน 2 ชม. (ไม่ควรเก็บอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อนี้เกิน 1 วัน หลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

10. Muller Kauffmann Trathionate Novobiocin borth (MKTTn)

10.1 Base medium

Tryptone	8.6	g
Meat extract	4.3	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sodium choloride	2.6	g
Calcium carbonate	38.7	g
Sodium thiosulfate, anhydrous	30.5	g
Ox bile	4.78	g
Brilliant green	0.0096	g
Novobiocin	0.04	g
น้ำกลั่น	1	L
Final pH	7.8-8.2 ที่ 25 องศา	

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ต้มพอเดือดนาน 5 นาที ไม่ต้องฆ่าเชื้อใน auto clave ปล่อยให้เย็น

10.2 Iodine – Potassium Iodide (I-KI) solution

Potassium iodide (KI)	5	g
Iodine, resublimed (I)	4	g
น้ำกลั่น, sterile	20	ml

ละลาย KI ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เติม I เพื่อให้ละลายในสารละลาย KI จนหมด จากนั้นเติมน้ำให้ปริมาตรครบ 20 มิลลิลิตร เก็บใส่ขวดสีน้ำตาลหรือขวดที่กันแสงแดดได้ ในวันที่จะใช้อาหารเลี้ยงเชื่อดังกล่าวในการทดลอง ให้เติม I-KI 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและให้ตะกอนของ $CaCO_3$ กระจายให้ทั่วก่อนที่จะถ่ายอาหารลงในหลอดทดลองที่ปราศจากเชื้อในปริมาตร 10 มิลลิลิตร

11. Triple Sugar Iron (TSI) agar

Beef extract	3	g
Yeast extract	3	g
Peptone	15	g
Proteose peptone	5	g
Glucose	1	g
Lactose	10	g
Sucrose	10	g
Ferrous sulfate	0.2	g
Sodium chloride	5	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sodium thiosulfate	0.3	g
Phenol red	0.024	g
Agar	12	g
น้ำกลั่น	1	L
Final pH	7.4 ± 0.2	

ต้มละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นโดยกวนตลอดเวลา ถ่ายใส่หลอดขนาด 13 x 100 mm. ปริมาตร 1 ใน 3 ของความยาวหลอดปิดจุกเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 118 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นให้ทำการเอียงหลอดให้เกิดผิว slant ก่อนที่อาหารเลี้ยงเชื้อจะแข็งโดยที่ให้มีผิวหน้า slant ยาว ประมาณ 4 – 6 ซม. และมี butt ยาวประมาณ 2 – 3 ซม.

12. Xylose Lysine Desoxycholate (XLD) Agar

Yeast extract	3	g
Ferric ammonium citrate	0.8	g
L-Lysine	5	g
Sodium thiosulfate	6.8	g
Xylose	3.75	g
Sodium chloride	5	g
Lactose	7.5	g
Agar	15	g
Sucrose	7.5	g
Phenol red	0.08	g
Sodium desoxycholate	2.5	g
น้ำกลั่น	1	L
Final pH	7.4 ± 0.2	

ละลายส่วนผสมทั้งหมด ต้มให้เดือดจนวุ้นละลายระวังการเกิด overheat จะทำให้เกิดการตกตะกอนของเกลือได้ ไม่ต้องฆ่าเชื้อใน autoclave ปล่อยให้เย็นลงประมาณ 50 องศาเซลเซียส แล้วเทลงใส่จานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อไม่ควรใส่ฟลาสก์ไว้ใน water bath นานเกิน 2 ชั่วโมง (ไม่ควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ไว้เกิน 1วัน หลังจากเทลงในจานเพาะเชื้อแล้ว)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีวิคราะห์คุณสมบัติทางจุลชีววิทยาและเคมี

ข.1 การวิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด (AOAC, 2006)

ดูดตัวอย่างแหนมโมเดลบรอท ตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร ใส่ในน้ำยาเจือจาง Butterfield's Phosphate-Buffered 10 มิลลิลิตร vortex ตัวอย่างให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS โดยวิธี spread plate และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ที่สภาวะไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่ได้ในแต่ละอัตราการเจือจาง และคำนวน โคโลนีที่ได้ ต่อมิลลิตรของตัวอย่างที่ใช้

สูตรการคำนวณ (cfu/ml) = จำนวนโคโลนีที่นับได้ x อัตราการเจือจาง / 1

ข.2 การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก

นำตัวอย่างส่วนใสที่ทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์จุลินทรียอ์อกแล้วมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มิลลิลิตร แล้วทำการเจือจางส่วนใสด้วยน้ำกลัน 25 มิลลิลิตร หยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยดจากนั้นไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล คำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกโดยใช้สมการดังนี้

เปอร์เซ็นตก์รดแลคติก = น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก x ปริมาตร NaOH ที่ใช้ x ความเข้มข้นขอ

$$\text{เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก} = \frac{\text{น้ำหนักโมเลกุลกรดแลคติก } x \text{ ปริมาตร } NaOH \text{ ที่ใช้ } x \text{ ความเข้มข้นของ } NaOH \; x \; 100}{1000 \; x \text{ ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้}}$$

หมายเหตุ: น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก (C3H6O3) = 90.8 กรัมต่อโมล

ข.3 การวัดค่าพีเอช (pH)

โดยใช้เครื่องวัดพีเอช นำตัวอย่างน้ำหมัก 5 มิลลิลิตรวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (pH-meter) (Inolab, Germany)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวนวพร นทะสร้อย
วันเดือนปีเกิด	27 มกราคม 2540
ประวัติการศึกษา	สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนต้นจากโรงเรียนนวมินทราชูทิศ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเศรษฐบุตรบำเพ็ญ กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ปีการศึกษา 2561
ประสบการณ์ทำงาน	นักศึกษาฝึกงานบริษัทไฮคิวผลิตภัณฑ์อาหาร (ประเทศไทย) จำกัด
ผลงานวิจัย	ผลงานการวิจัย นวพร อินทะสร้อย. 2562. การศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus plantalum* SKI2 กับ *Salmonella* anatum ในแหนมโมเดลบรอทและการสร้างไบโอจีนิกเอมีน. ปัญหาพิเศษหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิตสาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้