ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน

Screening of Bacteriocin – producing Lactic acid bacteria from fermented rice sausage

โดย

นางสาว เพ็ญทิภา	ปางสุข	รหัสประจำตัว45045035
นางสาว รัชนีวรรณ	แนวเงินดี	รหัสประจำตัว45045041
นางสาว สุกัญญา	ปานนพภา	รหัสประจำตัว45045054

ได้รับพิจารณาเห็นชอบจาก

อดิศร .... 5 / ม.ค. / 47 **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์)

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน

Screening of Bacteriocin – producing Lactic acid bacteria from fermented rice sausage

นางสาว เพ็ญทิภา ปางสุข
นางสาว รัชนีวรรณ แนวเงินดี
นางสาว สุกัญญา ปานนพภา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2546

เพ็ญทิภา ปางสุข รัชนีวรรณ แนวเงินดี และ สุกัญญา ปานนพภา 2546 : การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน (Screening of Bacteriocin – producing Lactic acid bacteria from fermented rice sausage) . ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง .
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ. อดิศร เสวตวิวัฒน์ .46 หน้า

บทคัดย่อ

จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ จากไส้กรอกอีสาน 100 ไอโซเลท โดยวิธีColony – Spot – on – lown พบว่ามี 47 ไอโซเลทที่สร้างสารยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดมา 6 สายพันธุ์ และนำมาทดสอบดูการยับยั้งอินดิเคเตอร์ของสารแบคเทอริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งได้มากที่สุด สายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ดีที่สุด คือ สายพันธุ์ที่ 49 และ สายพันธุ์ที่ 54 เมื่อนำมาทดสอบความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด 2 สายพันธุ์ มีความสามารถในการสร้างสารแบคเทอริโอซินซึ่งสารแบคเทอริโอซินเป็นสารที่ใช้ในการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei JCM1157,Pediococcus pentosaeues JCM 5890* นอกจากนี้สายพันธุ์ที่ 54 ยังสามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum ATCC 8014* สามารถยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดการเสื่อมเสียและเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ คือ เชื้อ *Staphyiococcus aureus ATCC 12600* และเชื้อ *Listeria innocua ATCC33090* ซึ่งถือว่าเป็นสายพันธุ์ที่ดี ดังนั้นสารที่ถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน สายพันธุ์ที่ 54 มีแนวโน้มจะเป็นสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งหวังว่าต่อไปในอนาคตจะได้สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินที่ดีที่สุด และสามารถนำไปผลิตกล้าเชื้อเพื่อหมักไส้กรอกอีสานที่มีคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่ดีในอนาคต

รัชนีวรรณ แนวเงินดี เพ็ญทิภา ปางสุข สุกัญญา ปานนพภา	อดิศร	5 ม.ค. 47
ลายเซนต์นักศึกษา	ลายเซนต์อาจารย์ที่ปรึกษา	วัน/เดือน/ปี

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำปัญหาพิเศษ เรื่อง "การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน" คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์ เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ซึ่งมีส่วนอย่างมากในการทำให้ปัญหาพิเศษเรื่องนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง และ ผศ.ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการสอบปัญหาพิเศษนี้ กราบขอบพระคุณ บิดา และมารดา เป็นอย่างยิ่งที่คอยให้การสนับสนุนไม่ว่าในด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ และขอขอบคุณ นายสุเทพ ขยันทำ นายสุทนต์ ศิริโสม และเพื่อน ๆ ที่คอยให้ความช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

คณะผู้จัดทำ

1 มกราคม 2547

สารบัญ

	หน้า

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

สารบัญรูปภาพ

บทที่ 1

บทนำ

อาหารหมักพื้นเมืองของไทยมีมากมายหลายชนิด ซึ่งล้วนอาศัยการหมักที่เป็นไปตามธรรมชาติโดยอาศัยเชื้อที่ติดมากับวัตถุดิบที่ใช้โดยทั่วการหมักขึ้นอยู่กับเชื้อที่ติดมาและต้องควบคุมสภาวะการหมักที่เหมาะสม อาหารหมักเหล่านี้ ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ส้มฟัก ปลาร้า ข้าวหมาก ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง เป็นต้น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะนำเชื้อที่คัดแยกได้จากไส้กรอกอีสาน การหมักดองส่วนใหญ่เป็นการหมักดองที่เกิดจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. , *Pediococcus* sp. โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตในอาหารให้เป็นกรดแลคติก อาหารจึงมีรสเปรี้ยว และความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารก็ลดลงจึงมีผลช่วยในการถนอมอาหารได้การเปลี่ยนแปลงโดยแบคทีเรียแลคติกนี้จะทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่อาจก่อให้เกิดโทษในร่างกายนอกจากกรดแลคติกที่มีผลในการถนอมอาหารแล้วแบคทีเรียแลคติกยังสามารถสร้างสารอื่นๆอีกหลายชนิดในกระบวนการหมักซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ ดังนั้นการที่อาหารหมักดองสามารถเก็บไว้ได้นานนั่น ไม่ใช่เพียงเพราะกรดแลคติกที่ทำให้ความเป็นกรดด่างของอาหารลดลงเท่านั้นแต่สารอีกหลายชนิดที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักก็มีส่วนช่วยในการถนอมอาหารด้วย สารเหล่านี้ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล คาร์บอนไดออกไซด์ แบคเทอริโอซินและสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ยังไม่ระบุว่าเป็นประเภทใด (Un-identified antagonistic substance) เป็นต้น (วิเชียร, 2534)

จากคุณสมบัติต่างๆ ของสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นนี้ ล้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารไว้ได้นานๆ โดยสารที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ได้รับการสนใจในการศึกษาวิจัยมากที่สุด คือ แบคเทอริโอซิน และสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ยังไม่ระบุว่าเป็นประเภทใด (Un-identified antagonistic substance) เพราะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวางรวมทั้งยังเป็นผลผลิตจากจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาและวิจัยแล้วว่าไม่มีอันตรายต่อร่างกาย และเป็นเชื้อชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS (General Recognized as Safe) สามารถใช้เติมในอาหารได้ โดยอาจเติมในรูปของสารบริสุทธิ์ เช่น ไนซิน (nisin) หรือในรูปของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จึงมีการริเริ่มใช้สารเหล่านี้เพื่อประโยชน์ในด้านการถนอมอาหารในอุตสาหกรรมการหมักต่าง ๆ ซึ่งมีจำนวนมากและก้าวหน้าสูงในปัจจุบัน แต่มักมีปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้เกิดโรคเสมอ การศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทำให้คุณสมบัติในการยับยั้งสารดังกล่าวน่าจะเป็นหนทางที่ดี ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงวิธีที่จะยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา ทั้งนี้จึงมีการคัดเลือกสายพันธุ์ Lactic acid bacteria ที่สร้างแบคเทอริโอซินเพื่อทดสอบการยับยั้งจุลิทรีย์ที่ก่อให้เกิด

โรค เช่น โรคไทฟอยด์ โรคระบบทางเดินอาหารอักเสบ และโลหิตเป็นพิษ เป็นต้น จากประโยชน์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้นการศึกษานี้จึงได้มุ่งเน้นเพื่อทำการคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากไส้กรอกอีสานและนำเชื้อที่คัดแยกความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาน่าจะเป็นทางเลือกใหม่ที่ดีสำหรับผู้ประกอบการในการเลือกใช้ในการผลิตไส้กรอกอีสานที่มีคุณภาพดีในอนาคต

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อ แบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ โดยแยกเชื้อจากอาหารหมัก
2. เพื่อศึกษาความสามารถการสร้างและปริมาณสารแบคเทอริโอซินจากเชื้อแบคทีเรีย แลคติกที่คัดเลือกได้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

ไส้กรอก

เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พื้นบ้านของประเทศไทย นิยมมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคเหนือของไทย ทำจากเนื้อหมู คุณภาพปานกลางหรือเศษหมูติดมัน ถ้าใช้เนื้อวัวทำเรียกชื่อเป็นส้มต่อนหรือส้มวัว วิธีการทำไม่พิถีพิถัน โดยนำเนื้อบดละเอียด พอประมาณ ผสมเครื่องปรุงจากข้าวหุงสุก หนัง กระเทียมและเกลือ อาจมีการเติมมันแข็งบดละเอียด เพื่อเพิ่มให้ไส้กรอกนุ่ม นวดผสมให้เข้ากับเครื่องปรุงนำเข้าเครื่องบรรจุไส้ บรรจุไส้กรอกเปรี้ยวในไส้หมูสด มัดเป็นปล้อง ขนาด 1 – 3 นิ้ว แขวนราวหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 2 – 3 วัน จะได้ไส้กรอกอีสานที่มีรสชาติเปรี้ยว ก่อนนำมาบริโภคจึงควรนำมาทำให้สุกก่อนรับประทาน ด้วยการ ปิ้ง ทอด หรือ อบ (เยาวลักษณ์ , 2536)

การหมักที่เกิดขึ้นในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสาน

ไส้กรอกอีสานมีรสชาติเปรี้ยวเนื่องจากเกิดการหมักของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ต่อน้ำตาล ข้าว และโปรตีน ในส่วนผสมเนื้อ จุลินทรีย์ที่ตรวจพบว่า มีบทบาทต่อการผลิตกรดแลกติกขึ้นในผลิตภัณฑ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* , *Lactobacillus brevis* , *Lactobacillus leichannii* , *Leuconostoc mesenteroides* และ*Pediococcus cerevisiae* พบว่าผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะมีความปลอดภัยจากสารพิษที่ผลิตจาก *Clostidium botulinum* เนื่องจาก แบคทีเรียที่สร้างกรดขึ้น ได้เหล่านี้จะลดความเป็นกรด – ด่างทำให้สภาพผลิตภัณฑ์ที่หมักไม่เหมาะกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่สร้างสารพิษได้ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประเภทแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เป็นแกรมบวก ในระยะแรกของการหมัก *Pediococcus cerevisiae* เจริญ จะมีรูปร่างทั้งที่เป็นแท่งและทรงกลม ทั้งที่เป็นแกรมบวกและแกรมลบที่สามารถผลิตกรดได้ ทำให้การเจริญของกรด และ pH ลดลงเป็น 4.5 – 5.6 ต่อมาพบ *Lactobacillus* sp. เจริญมากในช่วงหลัง อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ไส้กรอกอีสานสุดท้ายจะมีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นรสเฉพาะตัว

เชื้อแบคทีเรียแลคติก

เชื้อแบคทีเรียแลคติกจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae มีลักษณะทั้งที่เป็นท่อนยาว ท่อนสั้นหรือกลม แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophillic) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน (Frazier และ Westhoff, 1979) มีความต้องการอากาศที่ซับซ้อน และค่อนข้างสมบูรณ์ในการเจริญ (Prescott และ Dunn, 1959) แหล่งพลังงานได้จากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน ต้องการแหล่งไนโตรเจนรวมทั้งวิตามินและ growth factor

หลายชนิดในการเจริญ เช่น Riboflavin , biotin และกรดอะมิโนต่าง ๆ สำหรับความต้องการ organic growth factor เช่น adenine , guanine และ uracil ของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ ส่วนเกลืออนินทรีย์ที่จุลินทรีย์กลุ่มนี้บางชนิดต้องการในการเจริญ ได้แก่ แมงกานีส โปรแตสเซียม และฟอสเฟต (Tittsler และ คณะ , 1952) แบคทีเรียแลคติกจัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae แต่จัดกลุ่มแบคทีเรียแลคติกเพียง 4 สกุล ได้แก่ *Pediococcus* , *Leuconostoc* , *Streptococcus* และ *Lactobacillus* (Frazier และ Westhoff , 1988) ปัจจุบันเพิ่มสกุลของแบคทีเรียแลคติกรวมแล้ว 8 สกุล ได้แก่ *Carnobacterium* , *Enterococcus* , *Lactococcus* และ *Vagococcus* โดยที่ *Carnobacterium* จัดเป็นสมาชิกในกลุ่ม*Lactobacilli* ส่วนสามสกุลหลังที่ได้เพิ่มนั้นเดิมเป็นสมาชิกในกลุ่ม*Streptococcus*

Pediococci

จัดเป็น Homofermentative มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวแบบกลุ่ม กลุ่มละ 4 (Tetrads) แบ่งเป็น 2 ระนาบ บางครั้งอาจพบเซลล์เดียว เซลล์เรียงเป็นคู่ๆ หรือเป็นสายสั้นๆ จัดเป็น จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (Microaerophillic bacteria) สามารถเจริญที่อุณหภูมิประมาณ 7-45 องศาเซลเซียส แต่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-32 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังเจริญในน้ำเกลือ ซึ่งเข้มข้นไม่เกิน 5.5 % ไม่สามารถเจริญในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 6-10 %

Pediococcus มักพบในอาหารประเภทผักผลไม้ หรือในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกเปรี้ยว

Streptococcus

จัดเป็น Homofermentative รูปร่างกลมจัดเรียงตัวเป็นคู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสายเจริญได้ทั้งสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Facutative anaerobe) *Streptococcus* บางชนิดก่อให้เกิดโทษกับมนุษย์และสัตว์ (Pathogenic bacteria) แบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* มีบทบาทสำคัญในการผลิตเนยแข็งเนยบางชนิด และผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่นๆ ได้แก่ *S. thermophillus* , *S.diacetlactic* , *S.lactis* และ *S.cremoris* เป็นต้น (FreazierและWesthoff , 1988 ; George , 1983)

Leuconostoc

แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรูปร่างค่อนข้างกลมจัดเรียงตัวกันเป็นคู่หรือต่อตัวกันเป็นสายมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ *Streptococcus* แต่จัดเป็น Heterofermentative สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาล เช่น *Leu.mesenteroides* สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 55-60 % แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารที่ให้กลิ่นรส ซึ่งประกอบด้วยไดอะเซทิลและอะซิโตอินทำให้เกิดปริมาณกรดในผลิตภัณฑ์เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอื่นๆได้อย่างรวดเร็วกว่าแบคทีเรียแลคติกหรือแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องชนิดอื่นๆแบคที่เรียจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโรค (Nonpathogenic bacteria) พบอยู่ตามพื้นผิวของพืช

เชื้อ *Leuconostoc* sp. เชื้อ *Leu. mesenteroides* มีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์กระหล่ำปลีดอง และแตงกวาดอง นอกจากนี้ยังร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ในการสร้างรสที่ดีใน ผลิตภัณฑ์นมหมัก อีกด้วย

Lactobacilli

แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรูปร่างค่อนข้างยาวเรียงต่อกันเป็นสายเกือบทุกสายพันธุ์ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตในปริมาณที่น้อยมาก (Microaerophillic bacteria) หรือบางชนิดไม่ต้องการออกซิเจนเลย (Strictly anaerobe) เนื่องจากแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* มีองค์ประกอบของดีเอนเอแตกต่างกันมากแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติที่แตกต่างกันบางชนิดจัดเป็น Homofermentative และบางชนิดจัดเป็น Heterofermentative lactobacilli สามารถทนต่อสภาวะกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ สามารถเจริญได้ดีที่พีเอชประมาณ 5 ดังนั้นทั่วไปในการหมัก แลคติกตามธรรมชาติ *Lactobacilli* จึงสามารถดำเนินปฏิกิริยาการหมักต่อไปเมื่อค่าพีเอชลดลงเกินกว่าที่แบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ จะเจริญได้ แบคทีเรียในจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโรคพบตามพื้นผิวของพืชปุ๋ยจากมูลสัตว์และน้ำนม

Lactobacilli ที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมการหมัก ได้แก่ *L. bulgaricus* , *L. acedophillus* และ *L. bravis* เป็นต้น

และอีก 4 ชนิด เนื่องจากมีองค์ประกอบทาง DNA ที่แตกต่างกัน แต่ละสายพันธุ์จึงมีคุณสมบัติแตกต่างกัน จึงถูกแยกออกจากกลุ่ม *Lactobacilli* และกลุ่มของ *Streptococci*

Carnobacterium

จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative แยกมาจาก *Lactobacilli* เช่น *C. divergens* , *C. mobile*

Vagococcus

จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative แยกมาจากกลุ่มของ *Streptococci* เช่น *V. luvialis* , *V. salmoninarm*

Lactococcus

จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative แยกมาจากกลุ่มของ *Streptococci*

Enterococcus

แยกมาจากกลุ่มของ *Streptococci*

<u>กลไกการหมักของแบคทีเรียแลคติก</u>

แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นและยาวไม่มีสปอร์ รูปร่างกลมเดี่ยวหรือเกาะกันเป็นคู่ หรือวางเรียงกันเป็นสายในบางกรณีอาจมีเซลล์เกาะติดกัน 4 เซลล์ เนื่องมาจาก Lactic acid bacteria มีรูปร่างกลมและมีรูปร่างแท่งขนาดสั้น ดังนั้นการจำแนกชนิดจึงทำได้ค่อนข้างยากและรูปร่างของเซลล์ยังเปลี่ยนไปตามสภาวะแวดล้อม เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ไม่สามารถสังเคราะห์ฮีม ไม่มีเอนไซม์ catalase ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต เช่น วิตามินบี และกรดอะมิโน ต้องการอาหารที่มีแป้งชนิดที่ใช้ในการหมักได้ มีโคโลนีขนาดเล็กมีความสามารถในการทนกรดได้ดี ชอบอาศัยในแหล่งที่มีสารอาหารที่ใช้ในการหมัก เช่น พืช สัตว์ นมและผลิตภัณฑ์ และสิ่งปฏิกูล เป็นต้น

เชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งตามลักษณะการหมักได้ 2 กลุ่ม คือ

1.<u>Homofermentative lactic acid bacteria</u>

คือ แบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติก 85-95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อยขั้นตอนการสร้างแลคติกเริ่มจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติกโดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึม ที่เรียกว่า Phosphenol – Piruvate – Dependent Phsphotraferase System (PEP-PTS) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟ(Phosphorylation) อยู่ในรูป lactose-6-phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ phspho-β-galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น galactose-6-phosphate กับ glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ของ Embden – Meyerhof – Parmas Pathway : (EMP Pathway) จนได้เป็น lactate ในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเปลี่ยนมาจากไพรูเวต โดยเอนไซม์ lactic dehydrogenasse ส่วน galcatose-6-phosephate จะเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ใน D-tagatose-6-phosephate pathway ได้เป็น tagatose-1,6-diphosphate และเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone phosphate ท้ายสุดโดยเอนไซม์ tagatose-1,6-aldolaseซึ่งจะเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphatae โดยเอนไซม์ trisephosphate isomerase ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway และเปลี่ยนเป็น lactate ในที่สุด

น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติก โดยเอนไซม์ PEP-PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป glucose-6-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่ EMP pathway ได้เป็น lactase ในที่สุด ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์เมนเบรนได้เลยหลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ galactokinase ได้เป็น galactose-1-phosphate จากนั้นเข้าสู่ Leloir pathway จนได้เป็น Glucose-1-phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ hexokinase phosphoglucomutase เปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางใน EMP pathway เปลี่ยนเป็น lactate ในที่สุด เชื้อแบคทีเรีย

แลคติกที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ได้แก่ *L.bulgaricus* , *L.casei* , *L.plantarum* และ *L.acidophilus* เป็นต้น (Lawrence และTerence , 1979)

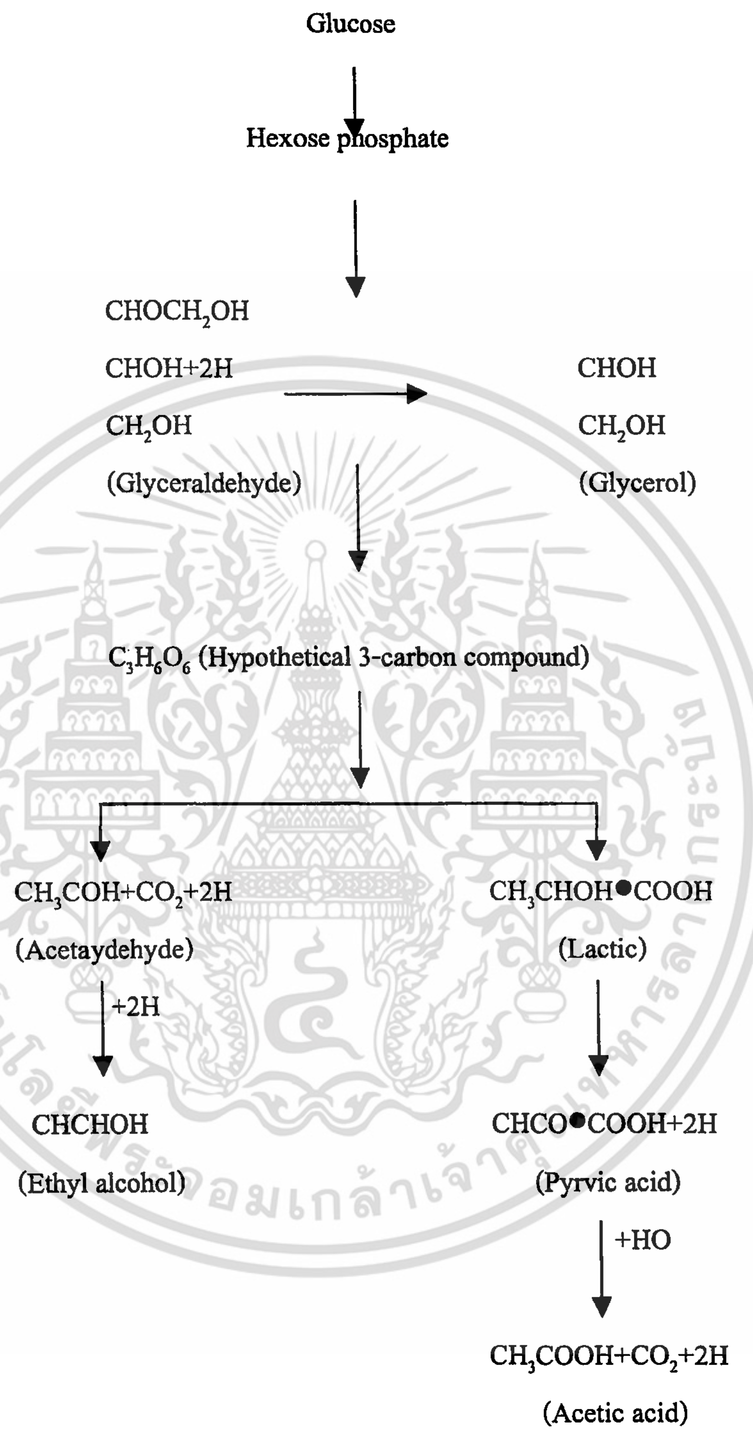
2. Heterofermentative

หมายถึง Lactic acid bacteria ที่สามารถหมักน้ำตาลให้กลายเป็นกรดแลคติกได้ในปริมาณต่ำและมีสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก แบคทีเรียที่อยู่ในประเภทนี้ เช่น *Lactobacillus vaccinosterus* , *L.blevis* , *Lecconostoc* sp.

เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมให้กรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและเอทิลแอกอฮอล์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างเช่น Leu. Mesenteoids (Tamine,1981) แลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มนี้จะไม่มีเอนไซม์ aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการไกลโคไลซิส จึงทำให้ไม่สามารถย่อย fructose-6-phosphate ได้เป็น triose-phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา decerboxylate ได้เป็น pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่ง pentose-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่ triose-phosphat และ acetyl-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่ triose-phosphate จะเปลี่ยนเป็น lactate ได้ส่วน acetylphosphate จะเปลี่ยนเป็น acetyldehyde และ ethanol นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกอาจจะใช้กระบวนการอื่นๆ ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่นกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอลเป็นต้น

ในการกำหนด dissimulation จะใช้สารอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ Lactic acid bacteria โดยใช้ glucose 20 % , peptone 1 % , yeast extract 0.3 % ,KH_2PO_4 0.6 % , pH = 6.2 ทำการสเตอริไลซ์ โดยใช้เวลา 20 นาที ภายใต้ความดันไอ 20 ปอนด์ ก่อนการเติมหัวเชื้อลงไป ซึ่ง mesh ถูกบ่มภายใต้บรรยากาศที่มีออกซิเจน ไนโตรเจนอิสระที่อุณหภูมิ 30 ° C สำหรับช่วงเวลา 3 สัปดาห์ ก่อนเริ่มทำการวิเคราะห์

Nelso และ Werkman (1972)แผนทดสอบสำหรับการ dissmulation จากกลูโคสโดยพวก Heterofermentative bacteria ดังขั้นตอนดังนี้



ภาพที่ 1 แสดงกลไกการหมักกลูโคสแบบ Heterofermentative bacteria(อ้างอิงโดย ดำรงศักดิ์ , 2546)

<u>การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก</u>

ผลการถนอมอาหารของเชื้อแบคทีเรียแลคติกระหว่างการผลิต และการเก็บรักษาอาหารหมักที่สำคัญ คือสภาวะกรด โดยเกิดขึ้นในอาหารระหว่างการหมัก การสร้างกรดนี้ จะเป็นขั้นตอนแรกของการหมักโดยการเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรต ในอาหารไปเป็นกรดอินทรีย์ (กรดแลคติก และกรดอะซิติก) โดยเกิดขึ้นพร้อมกับการพร้อมกับการลดลงของกรดด่างของอาหารมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มอายุการเก็และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สุดท้ายนอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียแลคติกยังสามารถผลิตและปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นนอกเหนือไปจากกรดแลกติกและกรดอะซิติก สารเหล่านี้จะยับยั้งได้หลายชนิด และมีผลสำคัญช่วยในการถนอมอาหาร โดยสารเหล่านี้จะผลิตออกมาในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติก และ กรดอะซิติก ซึ่งสารเหล่านี้ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล อะซิโตอิน 2,3-บิวทาไดออล อะซิทัลดีไฮด์ เบนโซเอท เอนไซม์แบคเทอริโอไลติก แอนติไบโอติก และแบคเทอริโอซิน (Klaenhammer,1998; Lindgren และ Dobrogosz , Schilling ,1990 และ Piard และDesmazeauld ,1991) (อ้างอิงโดย ดำรงศักดิ์ ,2546) จากสารเหล่านี้จะขอกล่าวถึงแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารที่ได้ทำการวิจัยในครั้งนี้

<u>การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียแลคติก</u>

แบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลคติกที่ช่วยในการถนอมอาหาร นอกจากกรดแลคติกที่มีผลในการถนอมอาหารแล้วยังสามารถสร้างาสารอีกหลายชนิดในกระบวนการหมัก ซึ่งมีผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ ดังนั้นอาหารที่หมักสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานนั้นจึงมิใช้เพียงกรดแลคติกทำให้พีเอชอาหารลดลงเท่านั้นแต่สารอีกหลายอย่างที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักก็มีส่วนช่วยในการถนอมรักษาอาหารด้วย สารเหล่านี้ได้แก่

1. กรดอินทรีย์

การสะสมของกรดอินทรีย์ซึ่งจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดลงในช่วงเริ่มต้นของการหมักจะมีผลต่อจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถทนกรด เช่น *Bacillus sp.* , *Escherichia coli* , *Pseudomonas sp.* เป็นต้น กรดอินทรีย์จะมีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์โดยการยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นต่อการดำรงชีพ กรดอินทรีย์ที่อยู่ในรูปไม่แตกตัวจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียได้และแตกตัวเป็นอิออนภายใน ทำให้ระดับความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ลดน้อยลง หรืออาจเกิดปฏิกิริยากับเซลล์หรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลินทรีย์นั้น

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึม ในระหว่างการเจริญเติบโตของแลคติกแอซิด แบคทีเรียโดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเวลล์ในสภาวะที่มีอากาสโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอนซึ่งอาจเกิดได้หลายทางดังปฏิกิริยา

2.1) Pyruvate+O_2+PO_4^{3-} pyruvate oxidase ⟶ acetyl phosphatre+CO_2+H_2O_2

2.2) Lactate+O_2+ L-lactate oxidase ⟶ pyruvate+H_2O_2

2.3) Lactate+O_2 NAD-independent D-lactate dehydrogenase ⟶ pyruvate+H_2O_2

2.4) NADH+H^++O_2 NADH oxidase ⟶ NAD+H_2O_2

2.5) O_2^-+2H+Mn^{2+} nonenzymetic superoxide reduction ⟶ H_2O_2+Mn^{2+}

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหารเพราะแบคทีเรียแลคติกไม่มีเอนไซด์คะตาเลสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์การสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นกลายเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น ในน้ำนมดิบไฮโรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไทโอไซยาเนต(Thiocyanate)โดยมีเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase) เป็นตัวเร่งได้ผลิตผลที่สามารถยับยั้ง จุลินทรีย์ และช่วงยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ

3. คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide)

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตส่วนใหญ่ที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentation โดยแบคทีเรียกรดแลคติคซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆ ทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจนโดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรานอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์และรอบๆเซลล์ลดลงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย

4. ไดอะซิทิล (diacetyl)

ไดอะซิทิลหรือ 2 , 3-butedione เป็นผลผลิตจากกระบวนการ metabolism ของไพรูเวต โดยแบคทีเรียกรดแลคติคในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติคเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วยจะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมากซึ่งสารตัวนี้จะเปลี่ยนต่อไปเป็น diacetyl และ acetoin โดย diacetyl สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและท่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ซึ่งผลในการยับยั้งของสารในกลุ่มนี้จะมีต่อแบคทีเรียแกรมลบยีสต์ และ รามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวกเนื่องจากไดอะซิทิลจะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบโดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine- binding protein

5. อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde)

สารดังกล่าวเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการmetabolismของคาร์โบไฮเดรทแบบ heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติค ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับ acetaldehyde ออกมาภายนอกเซลล์ โดยผลของ acetaldehyde ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้นยังไม่มีการศึกษาวิจัยมากนัก เพียงแต่มีรายงานว่า acetaldehyde มีความเข้มข้นระหว่าง 10 – 100 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เช่น E. coli , S. aureus และ Samonella typhimrium ได้

6. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซินจัดเป็นสารต่อต้านจุลชีพ (antimicrobial substances) ที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนและอาจมีคาร์โบไฮเดรตร่วมอยู่ด้วย มีขนาดใหญ่กว่าสารปฏิชีวนะและมีฤทธิ์ในการฆ่าและทำลายแบคที่เรียที่มีภูมิรับไว (susceptible bacteria) และจำเพาะต่อบริเวณรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin recepter) บนเซลล์แบคทีเรียด้วย (Tagg , Dajanii และ Wannamaker, 1976) อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินที่สร้างเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์กัน จะมีผลต่อการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียใกล้เคียงกัน มีลักษณะทางชีวะเคมี พันธุศาสตร์คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินเริ่มศึกษาใน *E. coli* ที่สร้างสารโคลิซิน (colicins) ซึ่งได้มีการศึกษาอย่างละเอียดถึงกลไกการทำงาน (made of action) ผู้ถูกอาศัย (host range) ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic determination) การทำให้บริสุทธิ์ (purification) เป็นต้น ได้มีการศึกษาการสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่สร้างโดยพวกแบคทีเรียแลคติก เช่น *L. fermentum* (deklerk , 1967 ; Deklerk และ Smit,1967) , *L. helveticus* (Upreti และ Hindsdill , 1973) , *L. acidophillus* (Barefoot และ Klaenhammer,1983 ; 1984) และ *L. plantarum* (Daeschel , Mckenny และ mcDonald , 1990)(อ้างอิงโดย ดำรงศักดิ์ ,2546)

ในปี 1988 Klaenhammer ได้แบ่งสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะผลการยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial spectrum) คือ

1. สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ในกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน เช่น แบคทีเรีแลค ติก และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด

2. สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด โดยมีผลยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Clostridium botulinum* , *Listeria monocytogenase*

แบคทีเรียแลคติกที่ต่างสายพันธ์จะสร้างแบคเทอริโอซินที่คล้ายคึงกัน แต่มีความแตกต่างในการยับยั้งจุลินทรีย์ การแบ่งชนิดของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มต่างๆได้แก่

1. กลุ่ม Lactobacillus

เริ่มใช้ในช่วงยับยั้งครั้งแรก ค.ศ 1930 โดยในหัวเชื้อของการผลิตเนยแข็งในอุตสาหกรรม พบว่ามีผลการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกันแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรีย *Lactobacillus* ได้แก่ ไนซิน (Nisin) , Diplococcin และ Lactostrepcins

Mattic และ Hirsch (1974) เป็นผู้ตั้งชื่อ ไนซิน ที่เดิมมาจากคำว่า N-inhibitor substance เป็นสารที่ผลิตจากแบคทีเรีย *L. lactis* ssp. *lactis* สามารถใช้ผลิตในทางการค้าในช่วงปี ค.ศ.1950 ใช้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin สารประกอบของไนซิน สามารถแยกได้ 5 ชนิด คือ Nisin A,B,C,d และ E Nisin A จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดและหมักผลิตในทางการค้า

2. กลุ่ม Pediococcus

Pediococcus pentosaceas FBB-61 ที่แยกได้จากแตงกวาดอง จะสร้างแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า Pediocin A มีความสามารถในการยับยั้ง *Pediococcus sp., S. aureus , Cl. Sporogenes , Lb. bravis , Lb. plantarum ,Lb. lactis ssp.* ATTC 11454 (Klaenhammer,1993) ขณะที่ Pediocin PA-1 สามารถได้จาก Pediococcus acidilactici PAC 1.0 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16,500 ดาลตัน ถูกทำลายโดยเอนไซม์pronase , papain , pepsin และ Alpha – chymotrypsin แต่มีความคงตัวที่ความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม *Pediococcus , Lactoobacillus* บางชนิดและ *Leu. mesenteroides spp. dextranicum* แต่ไม่มีผลต่อ *Lactoobacillus* (Gonzales และ Kunk , 1987) ส่วน pediocin ACH เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *P. acidilactici* H มีน้ำหนักโมเลกุล 27,00 ดาลตัน และถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ trypsin , chymotrypsin , fisin และ papain สามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยไม่สูญเสียกิจกรรมและทนต่อสารละลายอินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ดีที่ pH 2.5-90 (Bhunia และ คณะ , 1987) และสามารถยับยั้ง *Listeria spp.* ได้ทุกสายพันธุ์ แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ (Motlagh และ คณะ ,1991) (อ้างอิงโดย ดำรงศักดิ์ ,2546)

ต่อมาได้มีรายงานผลการศึกษาแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *P. acidilactici* ที่แยกได้จากการผลิตแหนมพบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค และทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสีย ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *Listeria monocytogenase , L. innocua , L. ivanovii , Enterococcus faeaclis , CL. Perfringens , S. aureus , B. cereus* และ แบคทีเรียแกรมลบ *Salmonella enterritidis* และ *S.derby* (วารสารอาหาร,2546)

3. กลุ่ม Leuconostoc

สามารถยับยั้งที่แบคทีเรียกลุ่ม *Leuconostoc* สร้างขึ้นมา ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก และไดอะเซทิลนอกจากนี้ยังมีรายงานการสร้างสรยับยั้งจุลินทรียืที่มีลักษณะคล้ายแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin-like-substance) Orberg และ Sandine (1984) ได้ทำการทดลองพบว่า *Leuconostoc sp.* PO 184 สามารถยับยั้ง *Streptococcus cremoris* U 134 ได้ แต่ไม่มีผลต่อ *S. lactic* ATTC 11454

นอกจากนี้ Sandine (1987) ยังพบการถ่ายทอด DNA โดยวิธีคอนจูเกชั่นของ *S. lactic* 7962 กับ *Leu. dextranicum* ผลการทดลองพบว่าคอนจูแกนท์ของเชื้อผู้รับ *Leu. dextranicum* จะสามารถสร้างไนซินได้ดีกว่า Streptococcus ถึง 1,000 เท่า

Orergและ Sandine(1984)สารประกอบที่คล้ายแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นโดยว่า *Leuconostoc sp.* PO 184 สามารถยับยั้ง *Streptococcus cremoris* U 134 แต่ไม่ยับยั้ง *Strep. lactic* (สามารถไนซิน) ขณะที่ *Leuconostoc sp.* สายพันธุ์ UAL ซึ่งผลิตแบคเทอริโอซินที่ไม่ทราบชื่อสามารถยับยั้ง *L. monocytogenase* จำนวน 8 สายพันธุ์

สารต่อต้านจุลชีพที่เราใช้ในการถนอมอาหารอาจจะทำหน้าที่ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ หรือทำลายจุลินทรีย์ ลักษณะในการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านจุลินทรีย์ อาจแบ่งได้เป็น

1. การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายความสามารถในการผ่านเข้าออก (Permmeability)และทำให้ลักษณะของเซลล์เสียความสมดุลไปโดยปกติสารต่อต้านจุลชีพจะทำปฏิกิริยาบริเวณไม่จำเพาะบนผิวเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เสียความสามารถในการทำงาน เช่น ความสามารถในการต่อต้านของสารจุลชีพที่มีลักษณะเป็น hydrophobic compoundจะจำกัดการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารต่อต้านจุลชีพชนิดนี้ สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ในชั้น lipolysaccaride ได้ง่าย
2. ทำให้เอนไซม์บางชนิดทำงานไม่ได้
3. ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่าง หรือหน้าที่ผิดไปจากเดิม

อย่างไรก็ตาม ได้มีผู้สนใจนำแบคทีเรียที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินไปใช้ผลิตอาหารหมักสำหรับมนุษย์มากกว่าการใช้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ชนิดต่างๆซึ่งในปัจจุบันแบคเทอริโอซินที่จัดว่าเป็นที่ยอมรับให้สามารถใช้เป็นสารในการถนอมอาหาร ได้แก่ nisin เพียงตัวเดียวเท่านั้น ที่อนุญาตให้ใช้ในการควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยาของนมและผลิตภัณฑ์นม สำหรับแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ นั้นยังอยู่ในการศึกษาวิจัยเพื่อที่จะทำสารบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ ดังกล่าวไปใช้ในวิชาวิทยาศาสตร์และการถนอมอาหารและกระบวนการทางเป้าหมายของส่วนแบ่งทางเศรษฐกิจและเป็นทางเลือกใหม่แทนสารเคมีถนอมอาหาร

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร

แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามธรรมชาติทั่วไปเช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ผักและผลไม้ นมและผลิตภัณฑ์ ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร รวมถึงสิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์โดยแบคทีเรียกรดแลคติคมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมอาหารรวมถึงสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์หลายประการ เช่น ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านโภชนาการของอาหาร กระตุ้นกระบวนการสร้างวิตามินป้องกันการยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องทางเดินปัสสาวะลด

ระดับโคเรสเตอรอลในกระแสเลือด ลดความเป็นพิษจากสารก่อมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเนื้องอกนอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติคยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักชนิดต่าง ๆ คือ เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคและสร้างสารพิษ มีคุณสมบัติที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อยและสามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีจึงไม่ต้องการกระบวนการผลิตที่ซับซ้อนมีการเจริญที่รวดเร็วจึงใช้ระยะเวลาในขบวนการผลิตสั้น เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร มาเป็นเวลานานจึงมีขั้นตอนและวิธีการสำหรับการเลี้ยงเชื้อในการขยายขนาดการผลิตอยู่แล้วและสามารถใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีราคาถูก

ในด้านการแปรรูปและถนอมอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักดองชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียดังกล่าวทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติเฉพาะในแต่ละผลิตภัณฑ์ซึ่งในปี ค.ศ. 1997 Stiles และ Holzapfel ได้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเกี่ยวข้องกับอาหาร โดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางฟีโนไทป์และลักษณะอื่นๆ ออกเป็น 11 สกุล คือ *Carnobacterium* ,*Enterococcus*,*Lactobacillus* ,*Lactococcus* ,*Leuconostoc* ,*Oenococcus* ,*Pediococcus* ,*Streptococcus* ,*Tetragenococcus* ,*Vagococcus* และ *Weissella*

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นสายเปปไทด์ หรือโปรตีนขนาดเล็กซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าว แต่ไม่ทำลายหรือเป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน ในบางครั้งอาจพบกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบในโปรตีนทั่วไป เช่น พบ dehydroalanine , dehydrobutyrine ในไนซิน (nisin) ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่งนอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes) แบคเทอริโอซินนอกจากถูกสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกแล้วยังถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อีก ได้แก่ *Acetobacter* , *Astinnobacillus* , *Bacillus* , *Brevibacterium* , *Clostrium* , *Erwinia* , *Haemophilus* , *Haloferax* , *Listeria* , *Leuconostoc* , *Pseudomonas* , *Samonella* , *Propionibacterium* , *Serratia* , *Shigella* , *Staphylococcus* และ *Yersinia* โดยแบคเทอริโอซินจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งสามารถสรุปความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะได้ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคเทอริโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตผ่าน secondary metablite
ความสามารถในการยับยั้ง แบคทีเรียเป้าหมายที่หลากหลาย	น้อย	มาก
กาสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของ เซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
การต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	ปรับสภาพองค์ประกอบ ของเยื่อหุ้มเซลล์	การเปลี่ยนแปลงทางพันธุ์ กรรม
ปฏิกิริยาต่อเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครง สร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีการรายงาน	มี

ที่มา:Cleveland ed al , 2001

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคเทอริโอซินที่สร้างแบคทีเรียกรดแลคติก จะมีคุณสมบัติน่าสนใจ กว่าที่สร้างแบคทีเรีแกรมลบ เช่น colicins หรือ microcins ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียได้หลายชนิด เซลล์เป้าหมายมีการต้านทานน้อยและไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลายนอกจากนี้การควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินภายในเซลล์ถูกควบคุมได้ทั้งจากพลาสมิดและโครโมโอซินภายในเซลล์ถูกควบคุมได้ทั้งจากพลาสมิดและโครโมโซมโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ที่มีผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร เช่น *B. cereus* , *C. botulinum* , *C. perfringens* , *S. aureus* และ *L. monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด โดยตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติคซึ่งคัดแยกได้จากอาหาร

แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Carnocin LV17	*Carnobacterium piscicola LV 17*	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสูญญากาศ
Piscicolin 61	*Carnobacterium piscicoa LV 16*	เนื้อวัว
Enterocin 226NWC	*Enterococcus faecalis 226*	เนยที่ทำจากหางนมของกระบือ
Enterocin 6E	*Enterococcus faecium 6E*	เนย
Acidocin A	*Lactobacillus acidophilus TK9201*	น้ำนมวัวหมัก
Bavaricin MN	*Lactobacillus bavaricus MN*	เนื้อวัว
Curvaticin FS47	*Lactobacillus curvatus FS 47*	เนื้อวัวบด
Plantaricin C19	*Lactobacillus plantarum C19*	แตงกวาดอง
Sakacin A	*Lactobacillus sakei LB 706*	เนื้อวัว
Nisin	*Lactococcus latis BB24 & G18*	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Carnocin 44A	*Lauconostoc carnosum LA44A*	ไส้กรอกเวียนนา
Leucocin B - Talla	*Lauconostoc carnosum Talla*	เนื้อวัวแปรรูปที่บรรจุในถุงสูญญา
Leucocin A-UAL	*Lauconostoc gelidum UAL 187*	กาศ
187	*Lauconostoc mesenteroides Y105*	เนื้อวัวบรรจุในถุงปรับสภาวะ
Mesenterocin Y 105		บรรยากาศ
		น้ำนมแพะ

ที่มา: Muriana , 1996

การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน

ในปี ค.ศ. 1993 Kleahammer แบ่งประเภทของแบคเทอริโอซินโดยพิจารณาจากโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลมวลโมเลกุลรวมถึงคุณสมบัติด้านอื่นๆ ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. กลุ่ม lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่ลักษณะเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19-38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5,000ดาลตันมีชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนทั่วไปเช่นdehydrobutyrine dehydroalanine มีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลดุลของสารประกอบซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลที่เรียกว่า lanthionine และ β- methyl lanthionine เป็นแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ตัวอย่าง เช่น nisin , mersacidin

2. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็ก โดยมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 15,000 ดาลตัน และทนต่อความร้อนได้ดีโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยได้แก่

2.1 กลุ่มแบคเทอริโอซินที่สามารถทำลาย *Listeria* sp. ได้ดีโดยในขั้นแรกจะถูกสร้างขึ้นในลักษณะที่เป็น precursor peptide ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยการตัดบางส่วนของสายเปปไทด์ออกในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกัน ได้เป็นสายเปปไทด์ที่สมบูรณ์ ตัวอย่างเช่น pediocin PA –1 , sakacin A

2.2 กลุ่มแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์2 สายที่แตกต่างกัน (two –peptide bacteriocin) โดยในการทำลายเซลล์เป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเปปไทด์ดังกล่าว ตัวอย่างเช่น brococin C , enterocin L50 , lactococcins G

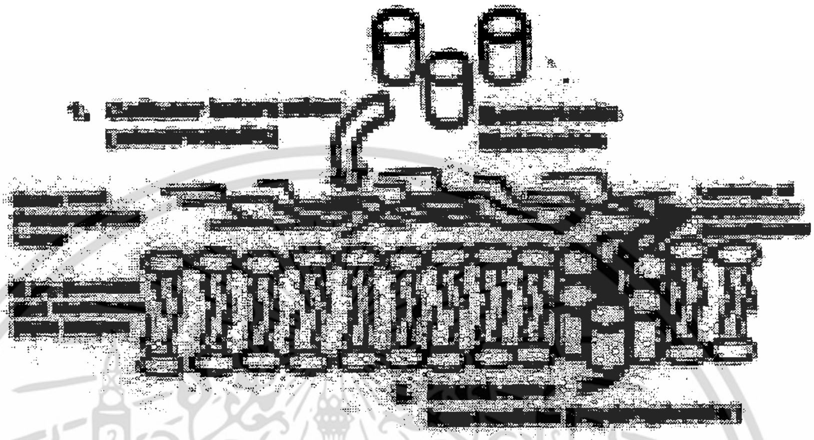
3. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลมกกว่า 15,000 ดาลตัน และไม่ทนความร้อน ตัวอย่างเช่น helveticins J , acidophilcin A , lactacins A , lactacins B

4. กลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่น ๆ เช่น ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรท

กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซินเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลร่วมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย โดยจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel - stave) รูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชิดของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก Lactococcus lactis subsp. lactis พบว่าเป็นสายเปปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก เช่นกรดอะมิโน สารให้พลังงานและไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ในกรณีที่เป็นสปอร์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ในระหว่างที่สปอร์เกิดการงอกออกมาและยังพบว่าไนซินที่ความเข้มข้นสูง ๆ สามารถยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* และ *E. coli* ได้ ส่วนในแบคเทอริโอซินกลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน พบว่า ในขั้นตอนแรกปลายด้าน N – terminal ของโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งมีประจุลบโดยแรงทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C- terminal ในโมเลกุลแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จะทำปฏิกิริยากับ acyl group ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ซึ่งแบบจำลองการทำให้เกิดรูในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย โดยแบคเทอริโอซินได้แสดงภาพที่ 2 ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เป้าหมาย

โดยแบคเทอริโอซินนอกจาก จะมีผลในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายแบบฆ่าทำลาย (bactericidal) แล้วยังอาจมีผลทำให้เกิดการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วย ดังเช่น ที่พบใน leuconocin S แบคเทอริโอซินจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้นมักขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน สภาพแวดล้อมรวมถึงชนิดและปริมาณของเซลล์เป้าหมาย



ภาพที่ 2 แสดงแบบจำลองการทำให้เกิดรูในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย โดยแบคเทอริโอซิน
ที่มา : Ennahar et al., 2000

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซิน

การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ทำการศึกษากันมากในไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินทางการค้านิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร Daeschel ได้สรุปปัจจัยดังกล่าวดังนี้

1. ชนิดของแบคทีเรียเป้าหมายโดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกันไป เช่น ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด enterocin 1146 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sakei* และ *Listeria* sp. ส่วน piscicocin V1 และ divercin V41 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* , *L. innocua* และ *C. tyrobutyricum*

2. สภาวะที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพทางชีวภาพของแบคเทอริโอซินนั้น จะเหมือนกับโปรตีนทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน โลหะหนัก การกวนที่รุนแรงและมากเกินไป การฉีกขาดของแบคเทอริโอซินเนื่องจากการแช่แข็งและการละลาย เช่น ไนซินถูกทำลายด้วยเอนไซม์ a-chymotrypsin และ nisinase , lactacin B ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K

3. การรวมตัวกันของแบคเทอริโอซินกับองค์ประกอบของอาหารหรือส่วนประกอบอื่น ๆ ของอาหารที่เติมลงไป พบว่า เกลือไนเตรต กรดอินทรีย์ สารจับโลหะ และสารอิมัลซิไฟเออร์ มีส่วนช่วยให้ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีขึ้น ส่วนไขมัน เนย ฟอสโฟลิปิด โปรตีน และสารในกลุ่มฟีนอลจะมีผลในการลดกิจกรรมของไนซิน

4. ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายหรือตัวกลาง ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการละลายและกิจกรรมแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยที่ค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 2.5 และ 5 ไนซินจะสามารถละลายได้ 12 และ 4 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ แต่ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะที่เป็นกลางหรือเบส นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรดไนซินยังสามารถทนต่อความร้อนได้ดี โดยที่ค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 2.5 ไนซินสามารถทนต่อการให้ความร้อน ที่อุณหภูมิ 100^{0} ซ ได้โดยไม่สูญเสียกิจกรรมและที่อุณหภูมิ 121^{0} ซ จะมีการสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อย ส่วน lacticin 481 มีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 หรือ 7 แต่ไม่คงตัวที่ค่าความเป็นกรดด่าง เท่ากับ 2 นอกจากนี้ diplococcin จะมีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 โดยสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100^{0} ซ ได้นานถึง 1 ชั่วโมง

การใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันการถนอมอาหารด้วยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติคจัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ ด้วยการไปแข่งขันในการใช้สารอาหารรวมทั้งสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดออกมา ซึ่งในกลุ่มของสารดังกล่าว พบว่า แบคเทอริโอซิน โดยเฉพาะไนซินได้มีการผลิตขายภายใต้ชื่อการค้าว่า Nisaplin เป็นแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวในปัจจุบัน ที่ได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO เนื่องจากไนซินมีค่า LD_{50} สูงถึง 7 กรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเทียบเท่ากับเกลือที่บริโภคกันในชีวิตประจำวัน และไนซินจะถูกทำให้เสียสภาพ โดยเอนไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ นอกจากนี้ไนซินเองก็ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ ปัจจุบันพบว่ามีการใช้ไนซินในอุตสาหกรรมการแปรรูปและการถนอมอาหารชนิดต่าง ๆ ในมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก โดยอุตสาหกรรมอาหารที่มีการใช้ไนซินกันมาก ได้แก่

1. อุตสาหกรรมการผลิตเนย การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 3.75 – 12.50 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างกรดบิวไทริค เช่น *C. butyricm* และ *C. tyrobutyricum* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เนยและผลิตภัณฑ์มีกลิ่นและรสผิดปกติ

2. อุตสาหกรรมการผลิตนมพร้อมดื่มการใช้ไนซินที่ความเข้มข้น 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่า F_0 สำหรับการฆ่าเชื้อ *C. botulinum* ในผลิตภัณฑ์นมรสชอคโกแลต จาก 11 นาที ลงมาเหลือ 3 นาที

3. อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ การใช้ไนซินที่ความเข้มข้นระหว่าง 100 – 500 ยูนิตต่อกรัม ของอาหารสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* , *S. aureus* และแบคทีเรียกรดแลคติคบางชนิดที่ปนเปื้อนมากับเนื้อวัวสดได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไนซินในการยับยั้งการเจริญของ *C. botulinum C. sporogenes* ในผิตภัณฑ์เนื้อหมักทดแทนการใช้สารไนเตรต เพื่อป้งกันหรือลดการเกิดสารไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง

4. อุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ (low acid canned food) การในไนซินที่มีความเข้มข้น 2.5 พีพีเอ็ม ในถั่วบรรจุกระป๋องสามารถลดความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อลงได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารที่เป็นกรด (acid food) การใช้ไนซินที่ความเข้มข้น 100-200 ยูนิตต่อกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. pasteurianum C. butyricum B. thermoacidurans B. coagulans* และ *B. macerans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียได้

5. อุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 100-1,000 ยูนิตต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc oenos* และ *Pediococcus damnosus* ซึ่งสร้างสารในกลุ่ม malolactic , glycerol , butyleneglycol และ tartaric acid ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ไวน์ทางประสาทสัมผัสเปลี่ยนแปลงไป โดยที่ไนซินไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหมักแต่อย่างไร

การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินชนิดต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหารสามารถดำเนินการได้ใน 3 ลักษณะ คือ

1. การเติมแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินลงไปเป็นเชื้อตั้งต้นหรือเชื้อที่มีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก

2. การเติมแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ ลงไปเป็นสารถนอมอาหาร

3. การเติมผลิตภัณฑ์ที่กิดจากการหมักของแบคทีเรียแลคติคที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน ลงไปเป็นส่วนประกอบในกระบวนการลิตอาหารซึ่งทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินชนิดต่าง ๆ ในการถนอมอาหาร ดังแสดงผลในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่า ๆ

ชนิดของแบคเทอริโอซิน	ลักษณะการประยุกต์ใช้งาน	แบคทีเรียที่ต้องการควบคุม / ผลที่ได้รับ
Enterocin 4	ใช้ Enterococcus faecalis INIA 4 ซึ่งผลิต enterocin 4 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	Listeria monocytogenes Ohio
Nisin A	ใช้เติมลงไปในกระบวนการผลิตเนย	Listeria monocytogenes
Leucocin A	ใช้ Leuconostoc gelidum UAL 187 ซึ่งผลิต leucocin A ผสมลงในเนื้อที่เก็บรักษาไว้ในสภาะสูญญากาศ	ยับยั้งการเจริญของ Lactobacillus. sakei ได้นาน 8 สัปดาห์
Lactocin 705	ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อบด	Listeria monocytogenes
Pediocin AcH	ใช้ Pediococcus acidilactici ซึ่งผลิต pediocin AcH เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตไส้กรอกไก่แบบเปรี้ยว	Listeria monocytogenes
Pediocin	ถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้าง pediocin ไปสู่ Saccharomyces cerevisiae	ช่วยในการถนอมอาหารอบและไวน์
Pediocin AcH	เติมลงในไก่สด	Listeria monocytogenes
Enterocin	เติมลงในแฮม เนื้อไก่ เนื้อหมู และไส้กรอก	Listeria monocytogenes

ที่มา:วารสารอาหาร(2546)

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

เครื่องมือ

- เครื่องฆ่าเชื้อ (Auto clave)
- ไมโครเวฟ (Microwave)
- ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow)
- ตู้แช่เย็น
- ตู้บ่มเชื้อ
- เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง และ 4 ตำแหน่ง
- อ่างน้ำร้อน (Water bath)
- ตู้เย็น
- เครื่องตีปั่น (Stomacher)
- เครื่องวัด pH
- Centrifuge
- Hot plate
- Vortex
- Anaerobic jar หรือ Candle jar

อุปกรณ์

- หลอดทดลอง (test tubes) ขนาด 16×150 และ 16×100 มิลลิลิตร
- Pipette ขนาด 0.1 มิลลิลิตร
- Auto pipette ขนาด 2-20 , 20-100 และ 100-1000 ไมโครลิตร
- Trip ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
- หลอด Eppendorf
- บีกเกอร์ (beaker)ขนาด 100 , 250 และ 1000 มิลลิลิตร
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (plate)
- แท่งแก้วคน
- ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- ช้อนตักสาร
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ขวดน้ำกลั่น
- ขวด M

- ลูกยาง
- ที่ใส่หลอดทดลอง (rack)

สารเคมี

- Calciumcabornate ($Caco_3$)
- Sodium chloride (NaCl)
- Citric acid diammonium salt
- Magnesium sulfate ($MgSO_4$ $7H_2O$)
- Manganesium sulfate ($MnSO_4$ $4H_2O$)
- Di-potassium hydrogen phosphate ($K_2HPO_43H_2O$)
- Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Bacteriocin Screening Medium (BSM) ซึ่งมีสูตรดังนี้

Meart extract	2	g
Yeast extract	4	g
Tween – 80	1	ml
$MgSO_47H_2O$	0.2	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	g
$K_2HPO_4.3H_2O$	8.7	g
KH_2PO_4	8	g
Glucose	2	g
Agar	12	g
Tryptone	10	g
Citric acid diammonium Salt	2	g
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว , 121^0 C 15 นาที)

Tryptone Soy Broth(TSB) ซึ่งมีสูตรดังนี้

Tryptone	15	g
Soy Peptone	5	g
Sodium Chloride	5	g
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว , 121^0 C 15 นาที)

Tryptone Soy Ager Yeast Extreact (TSAYE)

Tryptone	15	g
Soy Peptone	5	g
Sodium Chloride	5	g
Yeast extract	6	g
Ager	12	
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว , 121^0 C 15 นาที)

TBS Soft agarซึ่งมีสูตรดังนี้

TSB จากสูตรข้างต้น

Agar	1	%
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว , 121^0 C 15 นาที) .

อาหารสำเร็จรูป MRS broth (Merek)

MRS ager (MRS broth +1.2% ager+ 0.5%$CaCO_3$)

MRS Deep tubes

- MRS broth		
- $CaCO_3$	1	%
- Agar	1.2	%

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว , 121^0 C 15 นาที) นำมาทำการ Mixer ให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำเย็นทันที

การเตรียม MRS Soft agar

MRS broth

Agar	1	%
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์/ตารางนิ้ว , 121^0 C 15 นาที)

ตัวอย่างอาหาร

จุลินทรีย์ ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน 5 ตัวอย่าง จำนวน 100 ไอโซเลทเพื่อใช้ในการตรวจสอบหาสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

ตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 5 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆดังนี้

- ตัวอย่างที่ 1 : ซอยจินดา
- ตัวอย่างที่ 2 : ซอยจินดา (ฝั่งตรงข้ามเบทเทอร์เวย์)
- ตัวอย่างที่ 3 : โรงอาหารคณะเทคโนโลยีการเกษตร (สจล.)
- ตัวอย่างที่ 4 : หน้า มหาวิทยาลัยมหานคร
- ตัวอย่างที่ 5 : หลังมหาวิทยาลัยมหานคร

จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้จากห้องปฏิบัติการทดลอง ได้แก่

- *Lactobacillus sakei* JTM 1157
- *Pediococcus pentosaeues* JCM 5890
- *Pediococcus pentosaeues* JCM 5885
- *Lactobacillus plantarum* ATCC14917
- *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014
- *Enterococcus faecolis* JCM 5803
- *Staphylococcus aureus* ATCC 12600
- *Listeria innocua* ATCC 33090
- *Staphylococcus carnosus* LTH 2102
- *Escherichai coli* JM 109

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

1. ขั้นตอนการเตรียมเชื้อ

1.สุ่มตัวอย่างอาหารหมักที่ต้องการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกโดยใช้กรรไกรตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ

2. ชั่งตัวอย่างอาหารหมักโดยใช้ช้อนสุ่มตักตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก

3. เติมสารละลายสำหรับเจือจาง 225 มล. ลงในตัวอย่างอาหารที่ชั่ง ตีปั่นตัวอย่างและสารละลายเจือจางให้เข้ากันด้วย stomacher ประมาณ 1 นาที (ขั้นตอนนี้จะได้ตัวอย่างที่เจือจางในระดับ 1 :10)

4. ทำการเจือจางตัวอย่างอาหารเพิ่มขึ้นแบบ 10 fold dilution จนถึงระดับ $1 : 10^6$

5. ดูดตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มล. ใส่บน MRS agar + 0.5 % Calcium carbonate plate ที่เทเตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อ ระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ

6. แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อจากแอลกอฮอล์ เกลี่ยตัวอย่างที่ใส่ไว้ ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 5 ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ

7. คว่ำจานแล้วทำการบ่มเพาะเชื้อใน anaerobic jar หรือ candle jar ก่อนเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน

8. ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญในระดับความเจือจางที่เหมาะสมโดยสังเกตโคโลนีที่มีขอบใส (Clear zone) รอบ ๆ โคโลนี คำนวณปริมาณเชื้อต่อกรัมตัวอย่างอาหาร

9. สุ่มเลือกโคโลนีที่มีขอบใสตัวอย่างละ 10 โคโลนี เก็บเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ deep tube ใน MRS agar + 1.0% Calcium carbonate บ่มที่ 35 ° C เป็นเวลา 2 วัน ก่อนเก็บในตู้เย็นเพื่อใช้สำหรับปฏิบัติการครั้งต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากไส้กรอกอีสานโดยวิธี Colony – Spot – on - lown

1. นำหลอดเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เก็บใน deep tube มาทำการเติม MRS broth หลอดละ 5 ml.

2. เทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ BSM ลงในจานเพาะเชื้อ (พยายามระเหยหยดน้ำบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM แห้ง)

3. ในช่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อที่เก็บและเพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 1 มาแตะบนผิวหน้า BSM ในข้อ 2 ที่แบ่งเป็นช่อง ๆ ไว้ (ดังรูป) ช่องละ 1 ตัวอย่าง ตัวอย่างละ 5 จาน

4. นำจานเพาะเชื้อที่เขี่ยเพาะเชื้อแล้วทั้งหมดไปบ่มในสภาพ anaerobe ใน anaerobic jar หรือ candle jar ที่อุณหูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม.

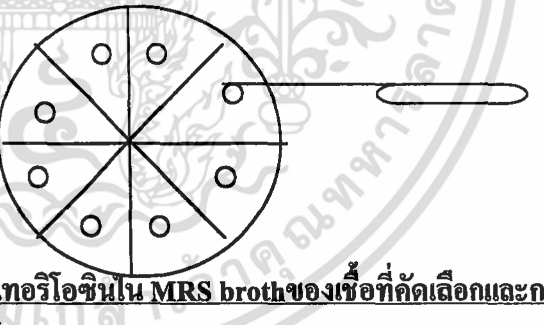
5. เตรียมอาหาร soft agar ในหลอด ๆ ละ 5 มล. ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ ทั้ง MRS และ TSAYE soft agar อุ่นไว้ใน water bath 50 ° C

6. นำเชื้อ indicators ทั้งหมดที่ทำการเพาะเลี้ยงใน broth ดังนี้ *Pediococcus pentosaceus Lactobacillus sakei* เพาะเลี้ยงใน MRS brothe และ *Listeria innocua* , *Staphylococcus aureus* , *Enterococcus faecalis* เพาะเลี้ยงใน TSB เป็นเวลา18 – 24 ชม. ใส่ใน soft agar ที่อุ่นใน water bath ในข้อ 5 ตามชนิด อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็น indicators ในประมาณ 2 % เขย่าให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร soft agar ด้วย vortex

7. นำหลอดเชื้อที่ผสมใน soft agar ในข้อ 6 ไปเทลงในจานเพาะเชื้อที่ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่จะทำการตรวจสอบการสร้างแบคเทอริโอซินในข้อ 4 โดยใช้เชื้อ indicator เชื้อละ 1 จาน โดยเกลี่ย soft agar ให้ทั่วจาน

8. นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปทำการบ่มโดยจานเพาะเชื้อที่ indicator เป็นเชื้อ *Pediococcus pentosaceus, Lactobacillus sakei* และ *Listeria innocua* ให้บ่มในสภาพ microaerope หรือ anaerope ที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. ส่วนเชื้อ *Staphylococcus aureus* , *Enterococcus faecolis* บ่มในตู้บ่มธรรมดา 35° C เป็นเวลา 24 ชม.

9. อ่านผล โดยดูการเกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ถ้าเชื้อที่เป็น indicatorตัวใดถูกยับยั้งการเจริญจากแบคทีเรียแลคติกจนทำให้เห็นโซนใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียแลคติก แสดงว่ามีการตรวจพบแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริ โอซิน



3. **<u>การตรวจยืนยันการสร้างสารแบคเทอริโอซินใน MRS brothของเชื้อที่คัดเลือกและการ ทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิต</u>**

1.นำเชื้อตัวอย่างที่คัดเลือกมา แล้วเพาะเชื้อลงในอาหาร MRS broth 5 ml ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่ 35^{0}C เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง

2. นำของเหลวในหลอดทดลองมา Centrifuge ที่ความเร็วรอบ 5,500 rpm นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 ^{0}C เมื่อทำการ Centrifuge เสร็จแล้วนำส่วนของเหลวใส ไปปรับ pH ให้ได้ 6.5

3. นำมากรองด้วยชุดกรองเมมเบรน ลงในหลอดที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำหลอด Eppendrof ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อนำมาเจือจางสารแบคเทอริโอซินที่ได้ในอัตราส่วน 1:1 , 1:2 , 1:4 , 1:8 ,1:16 , 1:32 , 1:64 , 1:128 , 1:256 ,1:512

4. นำเชื้ออินดิเคเตอร์มาถ่ายลงใน อาหาร soft agar จากนั้นเทลงในจานเพาะเชื้อทับหน้าอาหาร TSAYE แล้วนำไปบ่มโดยเชื้อที่เป็นแลคติก บ่มใน candle jar ส่วนเชื้ออื่นบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 ^{0}C นาน 24 ชั่วโมง

5. แบ่งจานเพาะเชื้อเป็น 10 ช่อง แต่ละช่องต่อ 1 อัตราส่วน ดูดสารแบคเทอริโอซิน 10 ไมโครลิตร จากหลอด Eppendrof ในแต่ละความเจือจางในข้อ 3 มา หยดลงบนจานเพาะเชื้อโดยเชื้อที่เป็น แลคติก บ่มใน candle jar ส่วนเชื้ออื่นบ่มในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 35 ^{0}C นาน 24 ชั่วโมง

6. รายงานผลความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตได้ต่อ มิลลิลิตร โดยดูการเกิดโซนใสของสารแบคเทอริโอซิน จากข้อ 5 ว่าถึงระดับความเจือจางที่เท่าไหร่

4. <u>การย้อมสีแบบแกรม</u>

1.ล้างทำความสะอาดสไลด์ให้ปราศจากคราบไขมัน และเช็ดให้แห้ง

2. เกลี่ย (smear) เชื้อแบคทีเรียโดยใช้ loop จุ่มน้ำสะอาดแตะหยดน้ำลงบนสไลด์ แล้วเผา loop ให้ร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้ loop เย็นลงแล้วจึงแตะเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้นให้เชื้อมาเพียงเล็กน้อย แล้วนำมาผสมกับหยดน้ำบนสไลด์ เกลี่ยให้แผ่อย่างสม่ำเสมอ ปล่อยไว้ให้แห้งเองแล้วจึง fix สไลด์โดยลนสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง

3. หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอย smear นาน 1 นาที แล้

4. หยด gram iodine บนรอย smear นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

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

6. ย้อมทับด้วย safranin o นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษจนแห้ง

7. นำสไลด์ที่แห้งแล้ว หยดด้วย immertion oil 1 หยด นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 x แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วง แบคทีเรียแกรมลบติดสีแดง

8. รายงานผล การติดสี ลักษณะและรูปร่าง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. <u>การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก เพื่อทดสอบหาสายพันธุ์ที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน</u>

จำนวนโคโลนีที่ทำการสุ่มนับจากตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 5 ตัวอย่าง

ตัวอย่างที่ 1 $3.75x10^3$, $3.32x10^4$,$3.1x10^5$, $2.12x10^6$, $2x10^7$

ตัวอย่างที่ 2 $2.88x10^3$, $2.59x10^4$,$3.25\ x10^5$, $2x10^6$, $1.5x10^7$

ตัวอย่างที่ 3 $2.95x10^3$,$2.19\ x10^4$,$2x10^5$, $1.9x10^6$, $1.53x10^7$

ตัวอย่างที่ 4 $2.78x10^3$, $2.73x10^4$,$2.1x10^5$, $1.92x10^6$, $1.78x10^7$

ตัวอย่างที่ 5 $2.78x10^3$, $2.14x10^4$,$2.16x10^5$, $1.56x10^6$, $1.32x10^7$

ทำการคัดเลือกตัวอย่าง ตัวอย่างละ 20 โคโลนี

2. <u>การทดสอบเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากไส้กรอกอีสาน</u>

โดยนำเชื้อที่คัดเลือกจากไส้กรอกอีสาน 5 ตัวอย่าง มาทั้งหมดรวม 100 ไอโซเลท มาทดสอบกับเชื้อ อินดิเคเตอร์ ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ โดยดูผลด้วยวิธี Colony – Spot – on – lawn จากการเกิดบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบโคโลนีของเชื้อที่ตรวจสอบ (ตารางที่ 5) พบว่า

ตารางที่ 5 ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 4 สายพันธุ์

ไอโซเลทที่	*Lactobacillus sakei JCM 1157*	*Listeria innocua ATCC 33090*	*Lactobacillus plantarum ATCC 8014*	*Staphylococcus aureus ATCC 12600*
	ขนาดรัศมี (มม.)	ขนาดรัศมี (มม.)	ขนาดรัศมี (มม.)	ขนาดรัศมี (มม.)
1	-	-	-	-
2	-	-	-	-
3		-	-	-
4	-	-	-	-
5	-	-	-	-
6	-	-	-	-
7	-	-	-	-

ตารางที่ 5 ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 4 สายพันธุ์ (ต่อ)

8	-	-	-	-
9	-	-	-	-
10	-	-	-	-
11	-	-	-	-
12	-	-	-	-
13	-	-	-	-
14	-	-	-	-
15	-	-	-	-
16	-	-	-	-
17	-	-	-	-
18	-	-	-	-
19	-	-	-	-
20	-	-	-	-
21	-	-	-	-
22	-	-	-	-
23	-	-	-	-
24	-	-	-	-
25	-	-	-	-
26	-	-	-	-
27	-	-	-	-
28	-	-	-	-
29	-	-	-	-
30	-	-	-	-
31	-	-	-	-
32	-	-	-	-
33	-	-	-	-
34	-	-	-	-
35	-	-	-	-

ตารางที่ 5 ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 4 สายพันธุ์ (ต่อ)

36	-	-	-	-
37	-	-	-	-
38	-	-	-	-
39	-	-	-	-
40	-	-	-	-
41	1	-	-	-
42	-	-	-	-
43	-	-	-	-
44	-	-	-	-
45	1	-	1	1
46	1	-	9	-
47	4	-	7	2
48	2	-	7	1
49	2	-	8	1
50	5	-	6	1
51	4	-	6	1
52	-	-	-	-
53	2	-	5	1
54	1	3	7	1
55	1	-	2	-
56	1	-	4	-
57	1	-	6	-
58	1	-	5	-
59	-	-	3	-
60	1	-	4	-
61	1	-	5	-
62	-	-	4	-
63	-	-	2	-

ตารางที่ 5 ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 4 สายพันธุ์ (ต่อ)

64	1	-	7	-
65	-	-	1	-
66	1	-	5	-
67	-	-	2	-
68	3	-	3	-
69	3	-	7	-
70	-	-	-	-
71	3	-	2	-
72	2	-	-	-
73	-	-	2	-
74	-	-	2	-
75	-	-	-	-
76	-	-	4	-
77	1	-	3	-
78	3	-	-	-
79	1	-	-	-
80	-	-	-	-
81	3	-	6	-
82	2	-	-	-
83	2	-	-	-
84	-	-	-	-
85	2	-	5	-
86	2	-	-	-
87	-	-	-	-
88	3	-	6	-
89	-	-	-	-
90	-	-	3	-
91	-	-	1	-

ตารางที่ 5 ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 4 สายพันธุ์ (ต่อ)

92	-	-	1	-
93	-	-	1	-
94	-	-	2	-
95	-	-	1	-
96	-	-	1	-
97	-	-	-	-
98	-	-	1	-
99	-	-	1	-
100	-	-	-	-

*หมายเหตุ มม. = มิลลิเมตร

มีการตรวจพบเชื้อแบคทีเรียแลคติคมีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ 47 สายพันธุ์ โดยสายพันธุ์ทั้งหมดมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ไม่เท่ากัน และมีขนาดรัศมีของโซนต่างกัน ซึ่งคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ ได้มากที่สุดคือ สายพันธุ์ ที่ 54 ที่สามารถยับยั้งอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 เชื้อ และ สายพันธุ์ที่ 47 และ 49 สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ 3 เชื้อ ส่วน 69 , 81 และ 88 สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ 2 เชื้อ โดยทั้ง 6 สายพันธุ์นี้สามาถรยับยั้งอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่ 54 ,47 ,49 ,69 ,81 และ 88 ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ได้จากไส้กรอกอีสาน เพื่อใช้ในการทดสอบการสร้างสารแบคเทอริ โอซินในอาหาร MRS broth และตรวจสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตสามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้

ตารางที่ 6 ผลการใช้แบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ 10 สายพันธุ์หลังจากทำการคัดเลือกสายพันธุ์มา 6 สายพันธุ์ที่ดีที่สุด

เชื้อ อินดิเคเตอร์	สายพันธุ์ ที่					
	47	49	54	69	81	88
Lactobacillus sakei JCM1157	-	+++	+++	-	-	-
Pediococcus pentosaeues JCM5890	-	-	++	-	-	-
Pediococcus pentosaeuesJCM 5885	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	-	-	-	-	-	-
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	-	+++	+++	-	-	-
Enterococcus faecolis JCM 5803	-	-	-	-	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 12600	-	-	+	-	-	-
Listeria innocua ATCC 33090	-	-	+	-	-	-
Staphylococcus carnosus LTH 2102	-	-	-	-	-	-
Escherichai coli JM 109	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ : +++ ความยาวของโซน 7 มิลลิเมตร ขึ้นไป , ++ ความยาวของโซน 4 – 6 มิลลิเมตร
+ ความยาวของโซน 1 – 3 มิลลิเมตร

สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาพบว่า สายพันธุ์ที่ 49 และ สายพันธุ์ที่ 54 มีความสามารถในการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้ออินคอเคเตอร์ได้ 2 เชื้อ และสายพันธุ์ที่เหลือทั้ง 4 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ ดังนั้นจึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่ 49 และ สายพันธุ์ที่ 54 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุดเพื่อใช้ในการทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้

การทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน

โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ดีที่สุดมา 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ที่ 49 และ สายพันธุ์ที่ 54 มาทดสอบกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 10 เชื้อ ได้ผลดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบระดับความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่มีผลต่อเชื้อในกลุ่มเชื้ออินดิเคเตอร์

เชื้ออินดิเคเตอร์	ระดับความเจือจาง	
	สายพันธุ์ ที่ 49	สายพันธุ์ ที่ 54
Lactobacillus sakei JCM 1157	1:512	1:512
Pediococcus pentosaeues JCM5890	1:2	1:256
Pediococcus pentosaeues JCM5885	-	-
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	-	-
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	-	1:4
Enterococcus faecolis JTM 5803	-	-
Staphylococcus aureus ATCC 12600	-	1:2
Listeria innocua ATCC 33090	-	1:1
Staphylococcus carnosus LTH 2102	-	-

หมายเหตุ ระดับความเจือจางใช้อัตราส่วน คือ อัตราส่วนสาร : อัตรส่วนโซเดียมคลอไรด์ 0.85 %

ผลการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน จากสายพันธุ์ที่ 54 และ สายพันธุ์ที่ 49 นำมาทดสอบความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ พบว่าสายพันธุ์ที่ 54 มีความสามารถในการยับยั้ง อินดิเคเตอร์ได้ 5 เชื้อ และสายพันธุ์ที่ 49 สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ 2 เชื้อ ซึ่งสายพันธุ์ที่ 49 และ 54 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei JCM 1157* ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 1:512 แสดงว่าเชื้ออินดิเคเตอร์ชนิดนี้มีความไวต่อสารที่ถูกสร้างจากเชื้อ สายพันธุ์ที่ 49 และ สายพันธุ์ที่ 54

การย้อมสีแบบแกรม

จากการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ยับยั้งอินดิเคเตอร์ที่ดีที่สุดมา 2 สายพันธุ์แล้วจึงนำมาทดสอบการย้อมสีแบบแกรม เพื่อดูรูปร่างของทั้งสองสายพันธุ์ (ตารางที่ 8) พบว่า

ตารางที่ 8 แสดงผลการย้อมสีแบบแกรม

สายพันธุ์ที่ 49	สายพันธุ์ที่ 54
เป็นเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus* ติดสีม่วง แกรมบวก มีลักษณะเป็นท่อน	เป็นเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus* ติดสีม่วง แกรมบวก มีลักษณะเป็นท่อน

ผลของการย้อมแกรม เชื้อสายพันธุ์ ที่ 49 และ สายพันธุ์ ที่ 54 เป็นเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus* sp. ติดสีม่วง แกรมบวก มีลักษณะเป็นท่อน

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองเพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินเบื้องต้นโดยพช้วิธี Colony – Spot – on – lawn เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่าง ไส้กรอกอีสาน 5 ตัวอย่าง รวม 100 ไอโซเลท พบว่า สายพันธุ์ที่ 54 มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออินดิเคเตอร์ 5 สายพันธุ์จากเชื้อ อินดิเคเตอร์10 สายพันธุ์สายพันธุ์ดังกล่าวแยก ได้จากไส้กรอกอีสานที่โรงอาหารคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อนำสายพันธุ์มาทดสอบการสร้างสารแบคเทอริโอซินในอาหารเหลว MRS และทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ พบว่าสายพันธ์ที่ 54 มีความสามารถในการยับยั้ง *Lactobacillus sakei JCM1157* ได้ที่ระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดคือ 1:512 และสารที่ผลิตจากสายพันธุ์ที่ 54 พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญในกลุ่ม *Staphylococcus aureus ATCC 12600* ที่จัดว่าเป็นกลุ่มเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอาหารได้และเมื่อนำไปย้อมสีแบบแกรมพบว่าเป็นเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus* sp ดังนั้น สารที่ถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน 1 สายพันธุ์ มีแนวโน้มว่าจะเป็นสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งหวังว่าต่อไปในอนาคตจะได้สายพันธุ์ Lactic acid bacteria ที่สร้างแบคเทอริโอซินที่ดีที่สุด และสามารถนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อเพื่อหมักไส้กรอกอีสานที่มีคุณภาพทางจุลชีววิทยา ที่ดีในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

กิตติชัย โหบาง . 2541. **การแยกเชื้อและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติก.** สัมมนา ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 4-7

ชุตินันท์ ประสิทธิ์ภูริประชา , จันทรวดี โล่เสถียรกิจ และศิริมา สุวรรณกูฏ. 2545.สารแบคเทอริโอซินของ *Lactobacillus spp.* ที่แยกได้จากอาหารหมัก. **วารสารวิชาการ มหาวิทยาลัยอุบลราชธานี** 4,2 (กรกฎาคม – ธันวาคม): 10-20.

ดำรงศักดิ์ ผาดไธสง . 2545. **การศึกษาลักษณะบางประการของแบคเทอริโอซินจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากแหนม** . ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง .

นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา , อดิศร เสวตวิวัฒน์ และบุญเทียม พันธุ์เพ็ง . 2545 . **ปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร.** โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง .

ภูริวัฒน์ ศรีปัญญาวิญญ์ . 2539 . **กรดแลคติกในอุตสาหกรรม.** ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์.**ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.135น.

วิเชียร ลีลามาศ. 2534 . **อาหารจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในประเทศไทย.** แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารของไทย. ครั้งที่ 1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันค้นคว้าและวิจัย .**วารสารอาหาร** . ปีที่ 33 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม – กันยายน 2546

สุพจน์ ใช้เทียมวงศ์ . 2542 . **จุลชีววิทยา** . ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง .

สุมาลี เหลืองสกุล . 2541. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

Cleveland ,J., Montville , T .,Nes, IF.and Chikindas,M.L.2001. **Bacteriocin : Safe , Natural Antimicrobials for Food Preservation.** *Int.j.Food Microbial.*71:1- 20

Collins. M.D., and Jone. D. 1981. **The distribution of isoprenoid quinone structural type in bacteria and their taxonomic in plication. Microbiol.** Rev. 45 : 316-354.

Daeschel , M.A. , Mckenny , M.C. , and McDonsld , L.C. 1990 . **Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11 . Food Microbiol** . 7 : 91-98 .

Daly , C. , Chance , M.L. , Sandine , W.E. , and Elliker , P. R. 1973 . **Control of *Streptophylococcus aureus* in sausage by starter culture and chemical acidulation** . J . Food . Sci . 38 : 426-430 .

Dellaglio .F ., Trovatelli , L.D. , and Sara P.G. 1981 **Deoxyribonucleic acid and homology anatomy representative strains of the genus Pediococcus** . Hyg . 1 :140-150.

Feazier , W.C. , and Westhoff , D.C. 1988 . **Food Microbiology** .4th ed. Singapore : McGraw-Hill Co. 539 pp.

George , J. 1983 . **Basic Food Microbiology** . USA : Saybrook Press , Inc . 781 pp.

Klaenhammer,T.R.1993. **Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria.** *FEMS Microbiol.* Rev. 12:39-85.

Lawrence , R.C. , and Terence , T.D. 1979 . **The fermentation of milk by lactic acid bacteria .In A.T. Bull (ed) Microbial Technology** : Curren State Future Prospect . Cambbridge University Press. pp.187-219 .

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

Orla-Jensen , S . 1942 .**The lactic acid bacteria** . Ed.E. Munksguard . 2th . Ed. Copenhagen . pp. 106-107 .

Swetwiwathana , A., and n. Lotong. 1999. **Selection of Bacteriocin – producing Lactic Acid Bacteria from Nham (Thai Fermented Meat)** .Proceeding of International Conference on **ASIAN Network on Microbial Research.** November 29 – December 1, Chiangmai Thailand.

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 9 แสดงการเปรียบเทียบสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM และ MRS

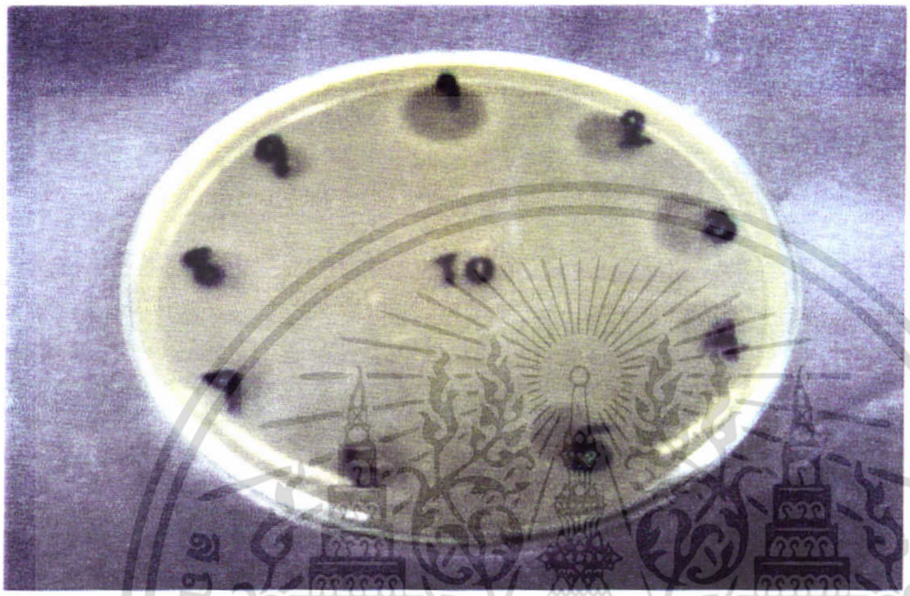
BSM		MRS	
Meart extract	2 g	Meat extract	8 g
Yeast extract	4 g	Yeast extract	4 g
Tween – 80	1 ml	Tween-80	1 ml
$MgSO_47H_2O$	0.2 g	Magnesium sulphate	0.2 g
$MnSO_4.4H_2O$	0.05 g	Manganese sulphate	0.04 g
$K_2HPO_4.3H_2O$	8.7 g	di-Ammonium hydrogen citrate	2 g
KH_2PO_4	8 g	di-Potasium Hydrogen Phosphate	2 g
Glucose	2 g	D –glucose	20 g
Agar	12 g	Agar	12 g
Tryptone	10 g	Peptoneจาก Casine	10 g
Citric acid diammonium Salt	2 g	Sodium acetate	5 g

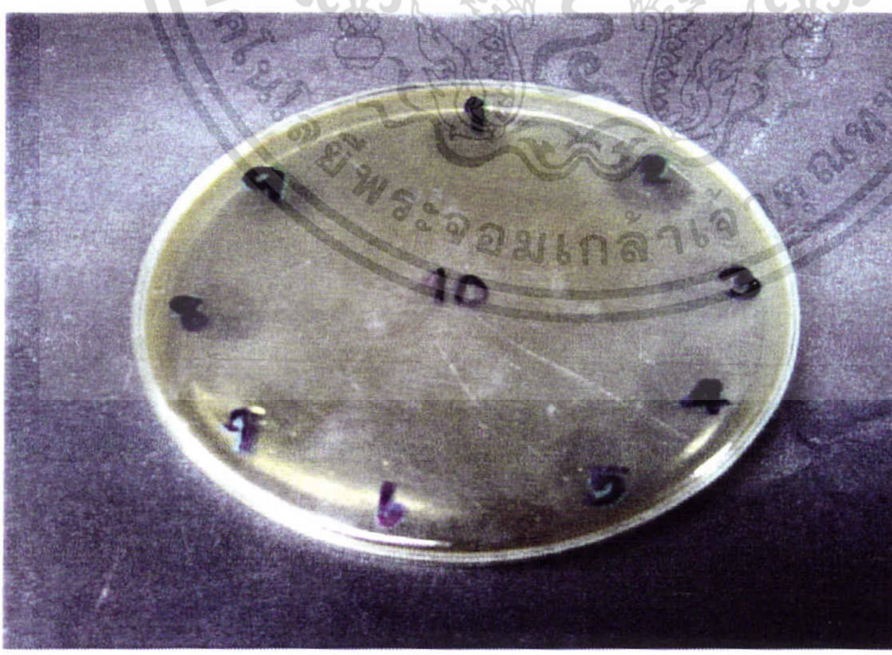
MRS เป็นอาหารสำหรับแบคทีเรียแลคติกเนื่องจากเมื่อดูจากสูตรของอาหารจะมีแหล่งของคาร์โบไฮเดรตจากกลูโคส ซึ่งแบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกทำให้อาหารมีความเป็นกรด และจะทำให้มองเห็นบริเวณใส (clear zone) ล้อมรอบโคโลนีได้อย่างชัดเจนเนื่องมาจาก $CaCO_3$ มีผลในการยับยั้งเชื้อชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ

BSM เป็นอาหารที่เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียแลคติก จากสูตรอาหารจะเห็นว่าปริมาณน้ำตาลจะน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และมีการเติมโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงไปในอาหารด้วยเพื่อจะช่วยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้มีสภาวะเป็นกลาง เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM มาทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกจะสามารถรู้ได้อย่างชัดเจนว่าเมื่อเกิดบริเวณใส (clear zone) ล้อมรอบโคโลนี คือ การสร้างเอนไซม์โปรติเอส ออกมาย่อยเชื้อที่ผสมใน soft agar ซึ่งจะเป็นสารพิษต่อจุลินทรีย์ไม่ใช่เป็นสร้างกรดแลคติกเหมือนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

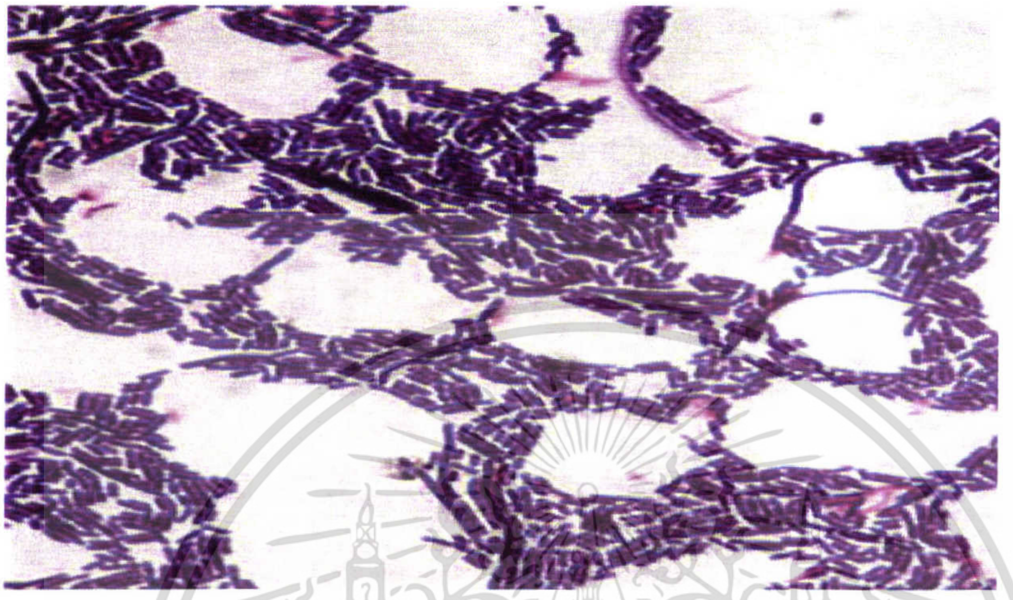
ภาคผนวก ข

ภาพที่3. แสดงผลการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน

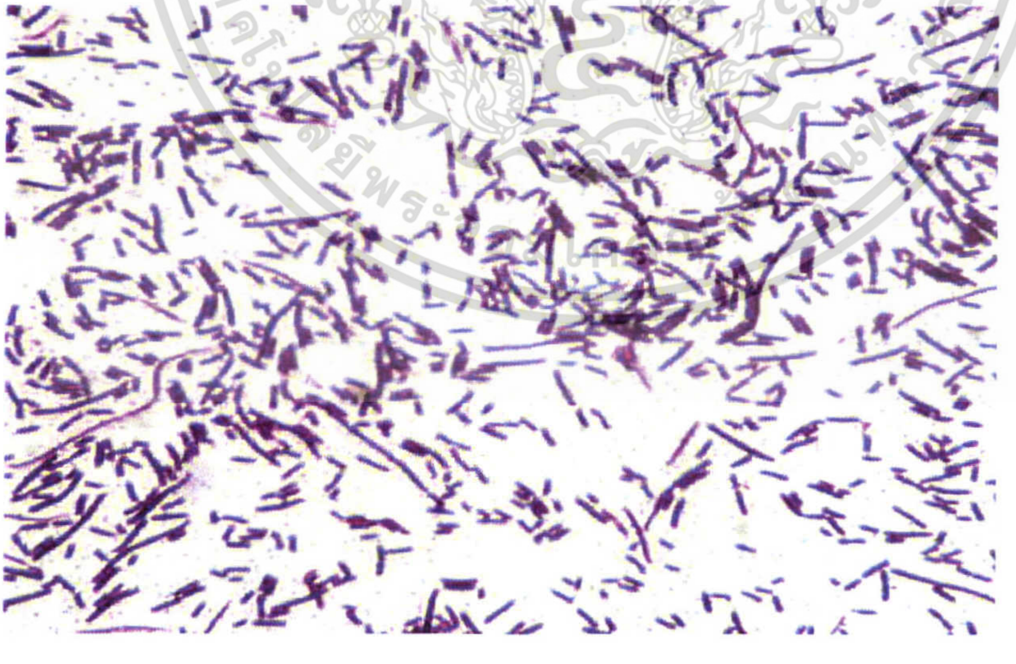




ภาพที่ 4. แสดงการทดสอบการย้อมแกรม เพื่อดูรูปร่างของสายพันธุ์ที่ 49

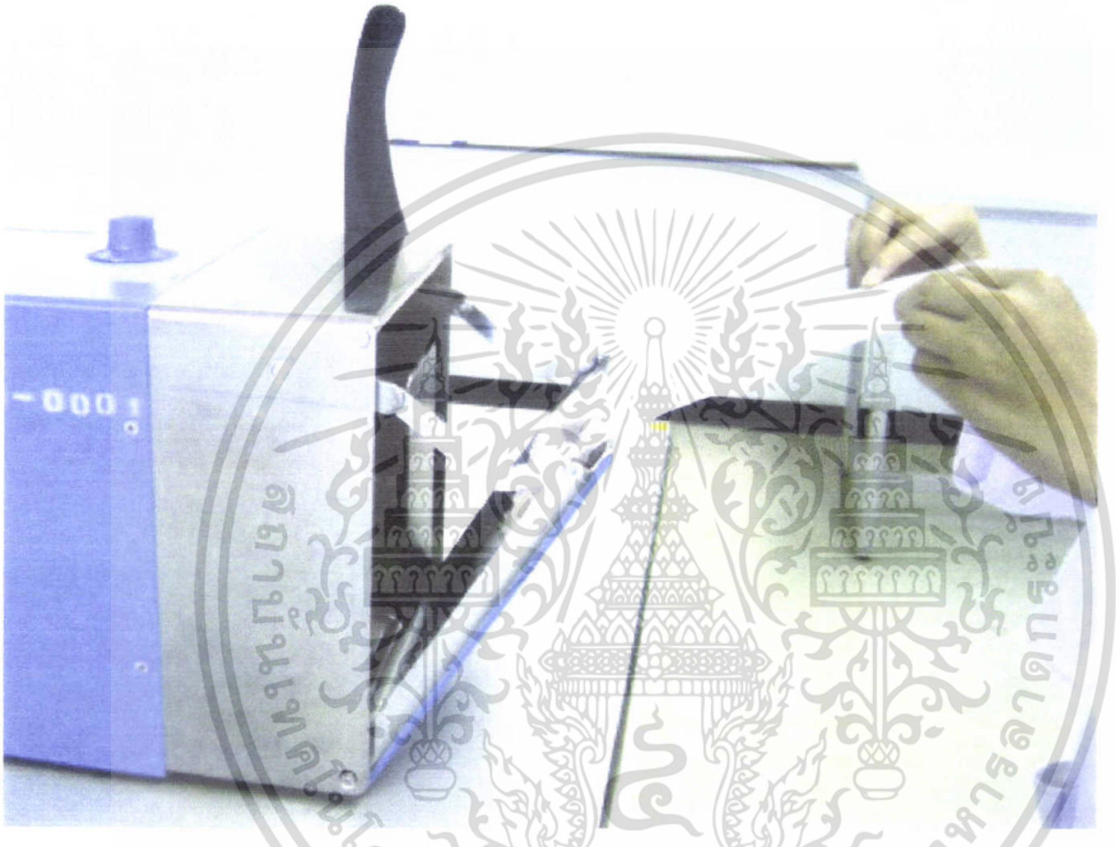


ภาพที่ 5. แสดงการทดสอบการย้อมแกรม เพื่อดูรูปร่างของสายพันธุ์ที่ 54



ภาพที่ 6. แสดงการกรองสารแบคเทอริโอซินด้วยเมมเบรน

ภาพที่ 7. แสดงการตีปั่นตัวอย่างไส้กรอกอีสานที่ใช้ในการทดลอง



ภาคผนวก ค

วิธีการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน