ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากปูดอง

Screening of Bacteriocin producing Lactic acid Bacteria from Fermented Crab

โดย

นางสาวศิรัญญา ศรีภิรมย์

นางสาวอังคนา มาตย์เสนา

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... **5 ม.ค. 54** **.....** **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....

(ผศ.ดร.ระติพร หาเรืองกิจ)

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19746

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากปูดอง

Screening of Bacteriocin producing Lactic acid Bacteria from Fermented Crab

T096720

นางสาวศิรัญญา ศรีภิรมย์
นางสาวอังคนา มาตย์เสนา

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2546

ปพ.
ศ442ก
2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....96720
รับเมื่อ.....

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ศิรัญญา ศรีภิรมย์ และ อังคนา มาตย์เสนา 2546 : การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากปูดอง (Screening of Bacteriocin - producing Lactic Acid Bacteria from Fermemted Crab) . ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง . อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์ , 40 หน้า

บทคัดย่อ

จากการทดลองเพื่อศึกษาลักษณะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากปูดอง พบว่า Lactic acid bacteria มีความสามารถในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน ในขั้นตอน colony spot - on – lawn จากการขั้นเลือกได้ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ ผลปรากฏว่ามี 3 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ Indicator 4 ชนิด สามารถยับยั้งได้ 2 ชนิด คือ *Listeria innocua* และ *Enterococcus faecalis* คือสายพันธุ์ที่ 25 ,26 และ 28 และเมื่อนำมาทดสอบระดับความเข้มข้นสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์พบว่าเชื้อ Lactic acid bacteria ที่คัดเลือกมา 3 สายพันธุ์ไม่มีความสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้เลย อาจเป็นเพราะว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการสร้างแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อIndicator ได้ ดังนั้นจึงนำเชื้อที่คัดเลือกไว้ 1 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้าง Clear zoneที่กว้างที่สุดคือสายพันธุ์ที่ 25 มาตรวจสอบหาว่าเป็นสายพันธุ์ใด โดยใช้วิธี api 50 CH ผลปรากฏว่า เชื้อ Lactic acid bacteria ที่ได้เป็น *Lactococcus.para.paracasei* และเชื่อว่าในอนาคตเชื้อ *Lactococcus.para.paracasei* น่าจะเป็นสายพันธ์ที่นำไปศึกษาต่อไปในการนำมาทำเป็นกล้าเชื้อที่จะนำมาทำผลิตภัณฑ์ ปูดอง ให้มีคุณภาพทางจุลชีวิทยาที่ดีได้

นางสาวศิรัญญา ศรีภิรมย์		
นางสาวอังคนา มาตย์เสนา		
ลายเซนต์นักศึกษา	ลายเซนต์อาจารย์ที่ปรึกษา	วัน/เดือน/ปี
		5 ม.ค. 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำปัญหาพิเศษเรื่อง " การคัดแยกเชื้อแลคติกแอสิดแบคทีเรียสามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากปูดอง " ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.อดิศร เสวตวิวัฒน์ เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ซึ่งมีส่วนอย่างมากในการทำให้ปัญหาพิเศษเรื่องนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง และ ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการสอบปัญหาพิเศษนี้

ขอกราบขอบพระคุณบิดามารดา เป็นอย่างยิ่งที่คอยให้การสนับสนุนในด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์เป็นอย่างดีตลอดมา

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ที่คอยช่วยเหลือและเป็นกำลังใจอยู่ห่าง ๆ ตลอดเวลา

และขอขอบคุณกำลังสมอง และสองมือของเราเอง ที่ช่วยให้ปัญหาพิเศษ ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี

ศิรัญญา ศรีภิรมย์

อังคนา มาตย์เสนา

มกราคม 2547

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.1 วัตถุประสงค์	1
2. วารสารปริทัศน์	2
2.1 การถนอมอาหารโดยการหมัก	2
2.2 กรดแลคติค	4
2.3 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวกับการหมัก	4
2.4 แบคทีเรียแลคติคหรือแลคติคแอสิดแบคทีเรีย	5
2.5 บทบาทของ LAB ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น	9
2.6 ประโยชน์อื่นๆ ของแบคทีเรียแลคติค	9
2.7 เงื่อนไขสำหรับแบคทีเรียแลคติคในกระบวนการหมัก	10
2.8 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติค	10
2.9 แบคเทอริโอซิน	13
2.10 แบคเทอริโอซินจากแลคติคแอสิดแบคทีเรีย	13
2.11 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน	14
2.12 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซิน	16
3. อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	17
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้การทดลอง	17
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	18
3.3 ตัวอย่างอาหาร	18
3.4 สารเคมี	18
3.5 จุลินทรีย์	18
3.6 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	19

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
3.7 การแยกเชื้อแลคติคจากปูดอง	19
3.8 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่มีแนวโน้มสร้าง Becteriocin โดยวิธี Colony spot – on – lawn	19
3.9 การทดสอบความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซิน	20
3.10 การทดสอบการย้อมแกรม	21
3.11 การทดสอบโดยวิธี api 50 CHL	21
4. ผลการทดลอง	24
4.1 การคัดเลือก LAB ที่มีแนวโน้มสร้างสารแบคเทอริโอซิน	24
4.2 การทดสอบระดับความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS	25
4.3 การศึกษาสัณฐานวิทยาและชนิดของเชื้อโดยใช้ Carbohydrate fermentation test ของ api 50 CH	26
5. สรุปผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	30
ภาคผนวก	32
ภาคผนวก ก	33
ภาคผนวก ข	36
ภาคผนวก ค	37
ภาคผนวก ง	39
ประวัติผู้เขียน	40

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ตัวอย่างอาหารหมักในประเทศไทย	3
2. ตัวอย่างอาหารหมักบางชนิดในประเทศต่างๆ ทั่วโลก	3
3. แบคทีเลียแลคติคและยีสต์ในอาหารหมัก	5
4. การแบ่งชนิดของแบคทีเรียแลคติค	8
5. ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซิน	12
6. แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติค	14
7. การยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์จากสายพันธ์ของ แบคทีเรียแลคติคที่คัดเลือกจากปูดอง	24
8. ผลการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ที่แยกเอาโคโลนีออก	25
9. ผลการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆ จาก api test	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. การเฟอร์เมนต์กลูโคส	7
2.อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS	22
3. ลักษณะของ clear zone	22
4. การเจริญของแบคทีเรียแลคติคใน MRS deep tupe	23
5. การปีเปตอาหารเหลวที่มีเชื้ออยู่ลงใน strip test	23
6. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ LAB สายพันธุ์ที่ 25	26
7. ผลการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ จาก api test	28
8. ปูดอง	36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

อาหารหมักพื้นเมืองของไทยมีมากมายหลายชนิด ซึ่งล้วนอาศัยการหมักที่เป็นไปตามธรรมชาติโดยอาศัยเชื้อที่ติดมากับวัตถุดิบที่ใช้ โดยทั่วไปการหมักขึ้นอยู่กับเชื้อที่ติดมา และต้องควบคุมสภาวะการหมักที่เหมาะสม อาหารหมักเหล่านี้ได้แก่แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ส้มฟัก ปลาร้า ข้าวหมาก ผักกาดดองหนอไม้ดอง เป็นต้น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะนำปูดองมาเป็นตัวอย่างในการทดลอง การหมักดองส่วนใหญ่เป็นการดองที่เกิดจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียในตระกูล *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Streptococcus* , *Pediococcus* , *Leconosnostoc* เป็นต้น โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตในอาหารให้เป็นกรดแลคติก อาหารจึงมีรสเปรี้ยว และความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารก็ลดลง จึงมีผลช่วยในการถนอมอาหารได้

จากคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นมานี้ ล้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารได้เป็นเวลานาน ๆ โดยสารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับการสนใจในการศึกษาวิจัยมากที่สุด คือ แบคเทอริโอซิน และสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ยังไม่ระบุว่าเป็นสารประเภทใด เพราะว่ามีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง รวมทั้งยังเป็นผลผลิตจากจุลินทรีย์ที่มีการศึกษา และวิจัยแล้วว่า ไม่มีอันตรายต่อร่างกาย และเป็นเชื้อชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS (General Recognized as Safe) สามารถใช้เติมในอาหารได้ โดยอาจเติมในรูปของสารบริสุทธิ์ หรือในรูปของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จึงมีการริเริ่มใช้สารเหล่านี้เพื่อประโยชน์ในด้านการถนอมอาหารในอุตสาหกรรมการหมักต่าง ๆ การศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทำให้คุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งดังกล่าวน่าจะเป็นหนทางที่ดีในการหาสารที่ใช้ในการทดแทนสารกันบูด ประเภทสารเคมี

จากประโยชน์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น การศึกษานี้จึงได้มุ่งเน้นเพื่อทำการคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากปลาร้าและนำเชื้อที่คัดแยกความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ต่าง ๆ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากปูดอง
2. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินและปริมาณแบคเทอริโอซินที่เชื้อสามารถสร้างได้
3. วินิจฉัยเชื้อที่เป็นสายพันธุ์ที่ดีที่สุด โดยใช้ api 50 CH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

การถนอมอาหารโดยการหมัก

อาหารหมักจำนวนมากที่ผลิตขึ้นโดยจำเป็นจะต้องใช้กิจกรรมของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นบทบาทในทางบวกหรือประโยชน์ของการใช้จุลินทรีย์ในอาหาร ซึ่งเป็น

- การถนอมอาหาร
- ทำผลิตภัณฑ์อาหารใหม่

มนุษย์มีการทำอาหารหมักก่อนที่จะมีความรู้เกี่ยวกับจุลชีววิทยาซึ่งได้จากการสังเกตการเปลี่ยนแปลงของอาหารไปในลักษณะที่ต้องการ และทำให้อาหารเก็บได้นานไม่เน่าเสียและปลอดภัยจากเชื้อโรค

วัตถุประสงค์ดั้งเดิมในการทำอาหารหมักเริ่มแรกก็เพื่อการถนอมอาหาร ไว้รับประทาน แต่ถึงแม้ในโลกปัจจุบันมีวิธีการถนอมอาหารแบบต่างๆ ที่ทันสมัยมากขึ้น เช่น การทำอาหารกระป๋อง การแช่เย็น การทำอาหารหมักก็ไม่ได้ลดน้อยลงเนื่องจากอาหารหมักกลิ่นรสชวนรับประทาน

การนำอาหารมาทำเป็นอาหารหมักจะทำให้อาหารมีคุณสมบัติและการยอมรับของผู้บริโภคเปลี่ยนไป อาหารหมักที่ผู้บริโภคนิยมรับประทานมีหลากหลาย ซึ่งทำจากวัตถุดิบหลายชนิด ดังที่จะแสดงในตารางที่ 1และ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1. ตัวอย่างอาหารหมักของประเทศไทย

วัตถุดิบ	ผลิตภัณฑ์
ปลา	ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาจ่อม ปลาส้ม ปลาแป้งแดง ส้มฟัก น้ำปลา ไตปลา
กุ้ง,เคย	กะปิ กุ้งจ่อม
หอย	หอยดอง
ปู	ปูดอง
เนื้อหมู	แหนม ไส้กรอกเปี้ยว
ทำมาจาก	ชื่ออาหารหมัก
เนื้อวัว	ส้มวัว มั่ม ไส้กรอกวัว
ถั่วเหลือง	ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว เต้าหู้ยี้ ถั่วเน่า
ผัก	ผักดอง ผักส้ม
นม	นมเปรี้ยว เนย
ข้าว	ข้าวหมาก สาโท สุรา
น้ำตาลสด น้ำตาลมะพร้าว	น้ำตาลเมา
หน่อไม้	หน่อไม้ดอง

ที่มา : บุญเทียม (2545)

ตารางที่ 2. ตัวอย่างอาหารหมักบางชนิดในประเทศต่างๆ ทั่วโลก

ชื่ออาหาร	วัตถุดิบ	ภูมิภาค
Busa	ข้าว ข้าวฟ่าง น้ำตาล	ตุรกี
เบียร์	ข้าวบาร์เลย์	ทั่วไป
เนยแข็ง	นม	ทั่วไป
Chicha	ข้าวโพด	อเมริกาใต้
Dawadawa	Lucust beans	อาฟริกา
Gari	มันสำปะหลัง	ไนจีเรีย
I-sushi	ปลา	ญี่ปุ่น
Kefir	นม	ยุโรปตะวันออก
Kimchi	ผัก	เกาหลี
ขนมปังที่ใช้เชื้อ	ข้าวสาลี	ทั่วไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2. ตัวอย่างอาหารหมักบางชนิดในประเทศต่างๆ ทั่วโลก (ต่อ)

ชื่ออาหาร	วัตถุดิบ	ภูมิภาค
แหนม	เนื้อ	ไทย
Salami	เนื้อ	ทั่วไป
Sauerkraut	กะหล่ำปลี	ยุโรป อเมริกา
Sorghum beer	ข้าวฟ่าง	อาฟริกา
Soy sauce, Miso	ถั่วเหลือง	เอเชีย
Tempeh	ถั่วเหลือง	อินโดนีเซีย
Yoghurt	นม	ทั่วไป

ที่มา : บุญเทียม (2545)

กรดแลคติก (lactic acid)

กรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ที่เกิดตามธรรมชาติ มีการนำมาใช้ในอาหารทั้งในอาหารทั้งในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง และอาหารต่าง ๆ เพื่อเป็นตัวให้กลิ่นรส และมีผลทางด้านการถนอมอาหารเนื่องจากกรดแลคติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียบางชนิดได้ปริมาณกรดแลคติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมีทั้งที่ผลิตได้จากกระบวนการหมักและขบวนการสังเคราะห์ทางเคมี โดยการใช้กรดจำนวนมากจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้มากขึ้น

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก

- แบคทีเรีย
- ยีสต์
- รา
- จุลินทรีย์หลายชนิดรวมกัน

การผลิตอาหารหมักแต่ละชนิดจะมีจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญแตกต่างกัน เช่น

- ยีสต์ มีบทบาทสำคัญในการผลิต ขนมปัง เบียร์ ไวน์ สุรา
- ยีสต์และแบคทีเรีย มีบทบาทสำคัญในการผลิต น้ำส้มสายชู
- แบคทีเรีย มีบทบาทสำคัญในการผลิต นมเปรี้ยว
- รา มีบทบาทสำคัญในการผลิต เนยแข็ง และอาหารหมักของประเทศในเขตร้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในการทำอาหารหมักเป็นการปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งๆ ที่เป็นผลดีกับอาหารมากกว่าที่จะทำให้อาหารเน่าเสีย

ความสำเร็จของการทำอาหารหมักส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของ Lactic acid bacteria (LAB) และยีสต์พวกที่เจริญในสภาพไม่มีอากาศ (facultative anaerobe yeast) จุลินทรีย์ทั้ง 2 พวก มีคุณสมบัติในการเจริญร่วมกัน คือ

- เจริญได้ในสภาพที่มี pH และ a_w ต่ำ
- โดย LAB และยีสต์พวก facultative anaerobe yeast เจริญได้ในสภาพที่ไม่มีอากาศ

ตารางที่ 3. LAB และยีสต์ ในอาหารหมัก

ยีสต์	LAB	ยีสต์ และ LAB
เบียร์	โยเกิร์ต	Kefir
ขนมปัง	ผักดอง	ซีอิ้ว
ไวน์	เนยแข็ง	เบียร์พื้นบ้าน

ที่มา : บุญเทียม (2545)

แบคทีเรียกรดแลคติกหรือแลคติกแอสิดแบคทีเรีย (Lactic acid bacteria ,LAB)

แบคทีเรียกรดแลคติค (LAB) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามธรรมชาติทั่วไปเช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ผักและผลไม้ นมและผลิตภัณฑ์ ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร รวมถึงสิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ (Stiles และ Holzapfel, 1997) โดยแบคทีเรียกรดแลคติคมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมอาหารรวมถึงสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์หลายประการ เช่น ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโทส การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านโภชนาการของอาหาร กระตุ้นกระบวนการสร้างวิตามิน ป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องทางเดินปัสสาวะ ลดระดับโคเรสเตอรอลในกระแสเลือด ลดการเป็นพิษจากสารก่อมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติคยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักชนิดต่างๆ คือ เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่สร้างสารพิษ มีคุณสมบัติที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อยและสามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีจึงไม่ต้องการกระบวนผลิตที่ซับซ้อน มีการเจริญที่รวดเร็วจึงใช้ระยะเวลาในกระบวนการผลิตสั้น เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นเวลานานจึงมีขั้นตอนและวิธีการสำหรับการเลี้ยงเชื้อในการขยายการผลิตอยู่แล้ว และสามารถใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีราคาถูก (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

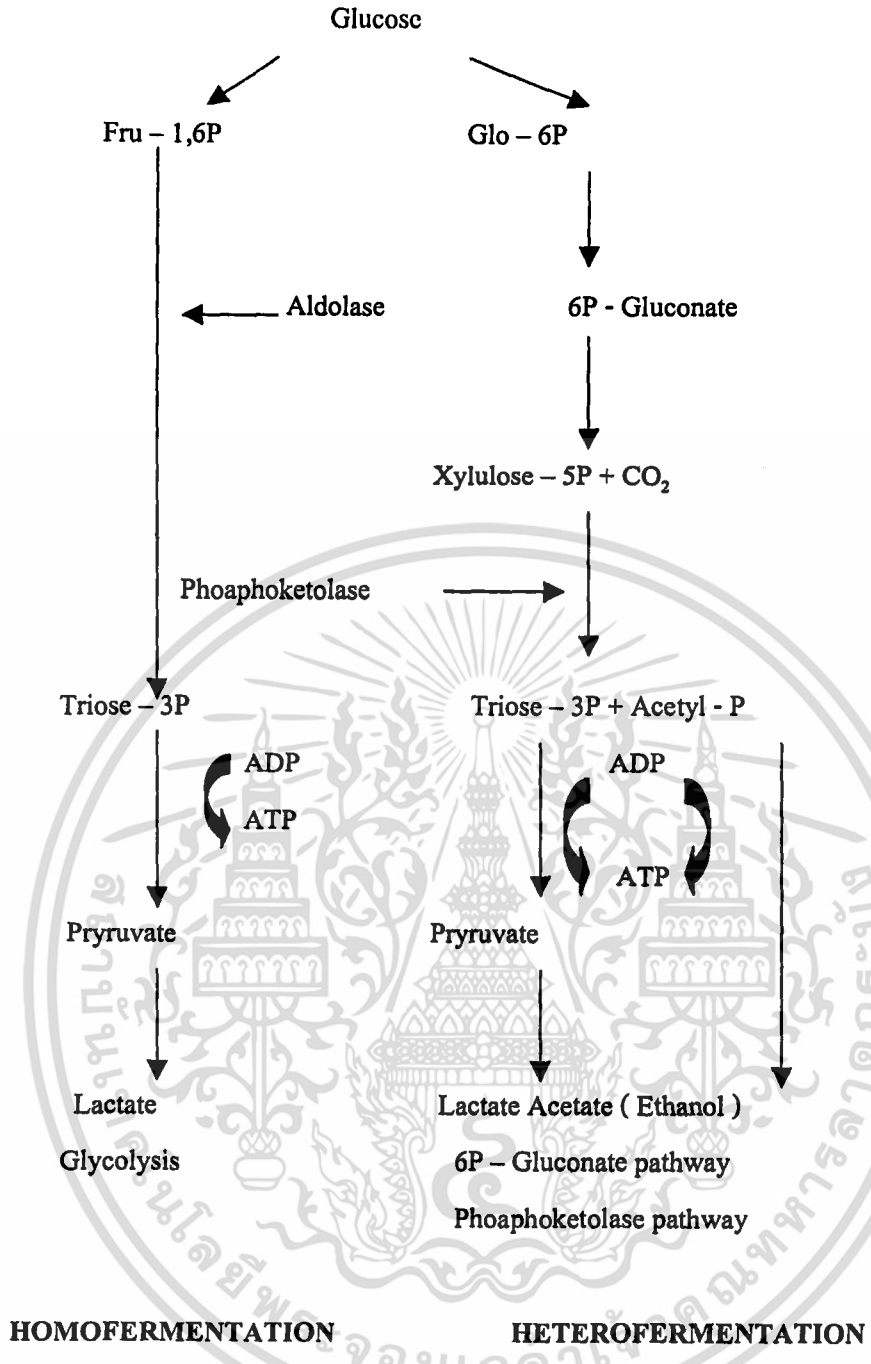
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในด้านการแปรรูปและถนอมอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติคมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักดองชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียดังกล่าวทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติเฉพาะตัวในแต่ละผลิตภัณฑ์ ซึ่งในปี ค.ศ. 1997 Stiles และ Holzapfel ได้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีความเกี่ยวข้องกับอาหารโดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางฟีโนไทป์ และลักษณะอื่นๆ ออกเป็น 11 สกุล คือ Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus และ Weissella

ลักษณะของ LAB

- แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์รูปร่างเป็นท่อนหรือกลม
- ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในสภาพที่ไม่มีอากาศ แต่จะทนมีอากาศได้ (aerotolerant anaerobe)
- ไม่มี cytochrome และ porphyrin ซึ่งเป็นผลให้เมื่อทดสอบ catalase และ oxidase ให้ผลเป็นลบ
- LAB บางพวกใช้ออกซิเจนได้โดยการใช้เอนไซม์ flavoprotein oxidase ซึ่งจะได้ H_2O_2 และ/หรือ การออกซิไดซ์ NADH ที่ได้จากกระบวนการ dehydrogenation ของน้ำตาล
- LAB ได้พลังงานมาใช้ภายในเซลจากการเฟอร์เมนต์คาร์โบไฮเดรต ไปเป็นกรดแลคติกโดยใช้วิถีเคมี หนึ่งใน 2 วิถี (รูปที่ 1) ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1. การเฟอร์เมนต์กลูโคสไปเป็นกรดแลคติคโดยใช้วิถีเคมี 2 วิธี

ที่มา : บุญเทียม (2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. Homofermentation เป็นการเฟอร์เมนต์กลูโคสโดย homofermentative LAB แล้วได้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว โดยใช้วิถี Emden – Meyerhof – Parnas (EMP) pathway (หรือ Glycolysis) จะได้ 2 ATP ต่อ 1 โมเลกุลของกลูโคส ซึ่งจะนำไปใช้ในการเปลี่ยน NAD^+ ไปเป็น NADH เพื่อใช้ในการรีดิวซ์ pyruvate ไปเป็น lactate พวก Obligate homofermenter เป็นพวกที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูง เช่น *Lb. acidophilus, Lb. delbruckii Lb. helveticus* พวกนี้เฟอร์เมนต์ hexose ได้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว และไม่สามารถเฟอร์เมนต์ pentose

2. Heterofermentation เป็นการเฟอร์เมนต์กลูโคสโดย heterofermentative lactic acid bacteria แล้ว ได้สารหลายอย่าง คือ lactate, ethanol หรือ acetate, และ CO_2 เนื่องจาก LAB พวกนี้จะขาด aldolase จึงต้องเปลี่ยนกลูโคสไปเป็น ribose แล้วต่อไปเป็น xylulose – 5P และ CO_2 โดยวิถี 6P – Gluconate pathway (หรือ Phoaphoketolase pathway) แบ่งเป็น 2 พวก คือ

- พวก Facultative heterofermenter เป็นพวกที่เฟอร์เมนต์ hexose ผ่านวิถี EMP ไปเป็นกรดแลคติก แต่พวกนี้มี inducible phoaphoketolase ซึ่งทำให้พวกนี้สามารถเฟอร์เมนต์ pentose ไปเป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติก พวกนี้ได้แก่ *Lb. plantarum, Lb. casi, Lb. sake*
- พวก Obligate heterofermenter เป็นพวกที่ใช้วิถี phosphoketolase pathway เพียงอย่างเดียวในการเฟอร์เมนต์ hexose ได้แก่ *Lb. brevis, Lb. fermentum, Lb. kefir*

พวก heterofermentative LAB เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่กลูโคสจะสามารถ เฟอร์เมนต์กลูโคสแล้วเกิดก๊าซ CO_2 ในหลอดดักก๊าซ ในขณะที่พวก homofermentative LAB ไม่เกิดก๊าซ LAB แบ่งเป็นชนิดหลักๆ ได้ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4. การแบ่งชนิดของ LAB

ชนิด	รูปร่าง	แบบการหมัก	lactate isomer	DNA (mole%GC)
Lactococcus	coccus เป็นสาย	homo	L – lactate	33 – 37
Leuconostoc	coccus	hetero	D – lactate	38 – 41
Pediococcus	coccus	homo	DL – lactate	34 – 42
Lactobacillus	Rod	homo/hetero	DL,D,L – lactate	32 – 53
Streptococcus	Coccus เป็นสาย	homo	L- lactate	40

ที่มา : บุญเทียม (2545)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทบาทของ LAB ในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น

LAB สามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ทำให้สามารถเพิ่มคุณภาพในการเก็บรักษา (keeping quality) และเพิ่มความปลอดภัยของอาหาร (safety) ได้ ซึ่งมีปัจจัยต่างๆ คือ

- Hydrogen peroxide
- Ethanol
- การขาดแคลนอาหาร
- มีค่า redox potential ต่ำ
- ทำให้พีเอชของอาหารต่ำลง (Low pH)

สิ่งสำคัญคือ LAB สามารถสร้าง กรดแลคติก กรดอะซิติก แล้วทำให้ pH ของอาหารลดต่ำลงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญและจุลินทรีย์อื่นตาย

- ผลิตกรดอินทรีย์ (Organic acid) หลายชนิด กรดอินทรีย์แต่ละชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน
- ผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นโมเลกุลของ peptide หรือโปรตีนที่มีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรีย ซึ่งปกติจะมีฤทธิ์กับแบคทีเรียที่เป็นชนิดใกล้เคียงกันกับแบคทีเรียที่สร้าง bacteriocin นั้น การผลิต bacteriocin เพื่อใช้ในอาหารได้รับความสนใจเนื่องจาก สารนี้สร้างขึ้นโดย LAB ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีอยู่แล้วในอาหารตามธรรมชาติจึงได้รับการยอมรับให้ใช้เป็นสารกันการเน่าเสีย ซึ่ง bacteriocin มีหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งอย่างจำกัด จึงไม่เหมาะที่จะนำมาใช้

ประโยชน์อื่น ๆ ของแบคทีเรียแลกติก

- ◆ ช่วยลดการเกิดสารก่อมะเร็งบางชนิด เช่น ไนโตรซามีน จึงลดอัตราการเสี่ยงการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่
- ◆ ช่วยลดระดับคอเลสเทอรอลในเลือด
- ◆ ช่วยสร้างเอนไซม์แลกเทส ช่วยย่อยน้ำตาลในนม
- ◆ ป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องปัสสาวะโดยการผลิตสารต่อต้านแบคทีเรียและกระตุ้นระบบ Lactoperoxidase
- ◆ ทำให้ระบบภูมิคุ้มกันแข็งแรง บรรเทาอาการโรคภูมิแพ้
- ◆ บรรเทาอาการของผลข้างเคียงที่เกิดจากการฉายรังสี และการทำเคมีบำบัดหลังการผ่าตัดมะเร็ง
- ◆ ช่วยในการทำให้มีการนำเอาฮอร์โมนเอสโทรเจน กลับมาใช้ใหม่ เป็นการช่วยชะลอความแก่ และบรรเทาโรคกระดูกพรุน เนื่องจากขาดฮอร์โมนเอสโทรเจน ทำให้การดูดซึมแคลเซียมบกพร่อง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เงื่อนไขสำหรับแบคทีเรียแล็กติกในกระบวนการหมัก

หลักสำคัญ ต้องให้แบคทีเรียแลคติคสามารถเจริญได้รวดเร็ว และสร้างกรดแลคติค ทำให้ pH ลดลง เป็นผลให้แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ถูกกำจัดออกไป ปัจจัยที่ควรพิจารณา คือ

- สารอินทรีย์ที่ช่วยในการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ วิตามิน เกลือแร่ กรดอะมิโนจากเนื้อปลา (สัตว์น้ำ)
- สภาพไร้อากาศ
- อุณหภูมิที่พอเหมาะ ค่อนข้างสูง 20 – 35 องศาเซลเซียส
- ความเข้มข้นของเกลือที่พอเหมาะ
- ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์และค่า pH
- ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ พวกแบคทีเรียแลคติคที่มีความทนต่อคาร์บอนไดออกไซด์
- สารประกอบอื่นที่เกิดขึ้นทีผลยับยั้งการเจริญของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย
- ความเป็นกรดเป็นด่างของคาร์โบไฮเดรตที่ใส่ลงไปพอเหมาะ ถ้าอยู่ในสภาพเป็นกรด (pH 5-6)อาจเสียได้
- ปริมาณแบคทีเรียแลคติคในตอนเริ่มต้นควรมีปริมาณมาก

สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติค

แบคทีเรียกรดแลคติคนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการหมักและทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมักดองแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปะปนมากับอาหาร เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Clostridium perfrigen, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติคบางชนิด (O' Sullivan และคณะ, 2002) ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลคติคสร้างขึ้นมาเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติคและอะซีติก รวมทั้งยั้งมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่าแลคติคและกรดอะซีติก แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ formic acid, free fatty acid, ammonia, ethanol, hydrogen peroxide, diacetyl, acetoin, acetaldehyde, benzoate, bacteriolytic enzyme และ bacteriocin รวมถึงสารที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (Abee และคณะ, 1995 ; Adams, 1999) นอกจากนี้การที่มีแบคทีเรียกรดแลคติคเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อม คือ ทำให้เกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหารและการใช้พื้นที่สำหรับการเจริญ โดยสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติคที่สำคัญและศึกษากันมากได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 . กรดอินทรีย์ (organic acid) กรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ กรดแลคติค เป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรท เกิดจากการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแลคติคโดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลคติคจะสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อเจอสภาพภายในเซลล์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลคติคจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการ metabolism ต่างๆ ภายในเซลล์

2 . ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) แบคทีเรียกรดแลคติคจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ ได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิคและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ และยังพบอีกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถรวมตัวกับสารอื่นๆ และเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย

3 . คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตส่วนใหญ่ที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentation โดยแบคทีเรียกรดแลคติค ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆ ทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจน โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรานอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์และรอบๆ เซลล์ลดลงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย

4 . ไดอะซีทิล (diacetyl) ไดอะซีทิลหรือ 2 , 3 – butanedione เป็นผลผลิตจากกระบวนการ matabolism ของไพรูเวต โดยแบคทีเรียกรดแลคติคในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติคเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วยจะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น diacetyl และ acetoin โดย diacetyl สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ ซึ่งผลของการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไดอะซีทิล จะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบโดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine-binding protien

5 . อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) สารดังกล่าวขึ้นในระหว่างกระบวนการ matabolism ของคาร์โบไฮเดรทแบบ heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติคในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดสารและขับ acetaldehyde ออกมาภายนอกเซลล์โดยผลของ acetaldehyde ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ นั้นยังไม่มีรายงานการศึกษาวิจัยมากนัก เพียงแต่มีการรายงาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่า acetaldehyde ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10 – 100 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เช่น *E. coli* , *S. aureus* และ *Salmonella typhimurium* ได้

6 . แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นสายเปปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็กซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวแต่ไม่ทำลายหรือเป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน ในบางครั้งอาจพบกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบในโปรตีนทั่วไป เช่นพบ dehydroalanine , dehydrobutyrine ในไนซิน (nisin) ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่ง นอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes) แบคเทอริโอซินนอกจากถูกสร้างด้วยแบคทีเรียกรดแลคติคแล้วยังถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อีก ได้แก่ Acetobacter , Actinobacillus , Bacillus , Brevibacterium , Clostridium , Erwinia , Haemophillus , Haloferax , Listeria , Leuconostoc , Pseudomonas , Salmonella , Propionibacterium , Serratia , Shigella , Straphylococcus และ Yersinia (Montville และ Kaise, 1993) โดยแบคเทอริโอซินจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งสามารถสรุปความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะได้ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5. ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคเทอริโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตผ่าน secondary metabolite
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่หลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
การต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	ปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ปฏิกิริยาต่อเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา : Cleveland และคณะ. (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน คือ สารโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีความสารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็วเป็นสารต่อต้านจุลชีพ มีขนาดใหญ่กว่าสารปฏิชีวนะ และมีฤทธิ์ในการฆ่าและทำลายแบคทีเรียที่จำเพาะ แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์แตกต่างกันไปในแง่ของการทำลายกลไกของการทำงานและสมบัติที่แตกต่างกัน

แบคเทอริโอซิน ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Lactobacillus fermentum* , *L. helviticus* , *L. acidophilus* เป็นต้น ซึ่งมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Listeria monocytogenes* ดังนั้นแบคทีเรียจึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นสารกันบูดในอุตสาหกรรมอาหาร

แบคเทอริโอซิน แบ่งออกเป็น ประเภท ตามลักษณะผลการยับยั้งจุลินทรีย์

แบบที่ 1 มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน เช่น กลุ่มแบคทีเรียแลคติกและกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด

แบบที่ 2 มีผลการยับยั้งจุลินทรีย์ที่กว้างกว่า โดยการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น

แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติค

แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติคจะมีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบเช่น colicins หรือ microcins ซึ่งมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียได้หลายชนิด เซลล์เป้าหมายที่มีความต้านทานน้อยและไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลาย นอกจากนี้การควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินภายในเซลล์ถูกบังคับได้ทั้งจากพลาสมิดและโครโมโซม โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติคมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่มีผลต่อคุณภาพและความปลอดภัยของอาหาร เช่น *B. Cereus, C. botulinum, C. perfringen, S. aureus, L. monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติคบางชนิด (Cleveland และคณะ.,2001) โดยตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติคซึ่งคัดแยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6. แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติคซึ่งแยกได้จากอาหาร

แบคเทอริโอซิน	สายพันธ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Carnocin LV17	*Carnobacterium piscicola* LV17	เนื้อวัวที่บรรจุถุงสุญญากาศ
Piscicolin 61	*Carnobacterium piscicola* LV61	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* FS47	เนื้อวัวบด
Plantaricin C19	*Lactobacillus plantarum* C19	แตงกวาดอง
Sakacin A	*Lactobacillus sake* LB 706	เนื้อวัว
Nisin	*Lactococcus lactis* BB24 & G18	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Carnocin 44A	*Leuconostoc carnosum* LA44A	ไส้กรอกแบบเวียนนา
Leococin B-Talla	*Leuconostoc carnosum* Talla	เนื้อวัวแปรรูปที่บรรจุถุงสุญญากาศ
Leucocin A-UAL 187	*Leuconostoc gelidum* UAL 187	เนื้อวัวบรรจุในถุงปรับสภาวะบรรยากาศ
Mesenterocin Y 105	*Leuconostoc mesenteroides* Y 105	น้ำนมแพะ

ที่มา : Muriana (1996)

การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน

ในปี ค.ศ. 1993 Klaenhammer ได้แบ่งประเภทของแบคเทอริโอซินโดยพิจารณาจากโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุล มวลโมเลกุลรวมถึงคุณสมบัติด้านอื่นๆ ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

1. กลุ่ม lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่ลักษณะเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19 – 38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5000 ดาลตันมีชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนทั่วไป เช่น dehydrobutyrine, dehydroalanine มีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลกุลของสารประกอบซัลเฟอร์ภายในโมเลกุลที่เรียกว่า lanthionine และ β–methyl lanthionine และเป็นแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการทนความร้อน ตัวอย่างเช่น nisin, mersacidin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็ก โดยมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 15000 ดาลตัน และทนต่อความร้อนได้ดีโดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

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

2.2 กลุ่มแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน (two-peptide bacteriocin) โดยในการทำลายเซลล์เป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเปปไทด์ดังกล่าว ตัวอย่างเช่น brochocin C, enterocin L50, lactococcins G

3. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 15000 ดาลตัน และไม่ทนความร้อน ตัวอย่างเช่น helveticins J, acidophilucun A, lactacins B

4. กลุ่มที่รวมตัวเป็นสารเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่นๆ เช่น ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรท

กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซินเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาร่วมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย โดยจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) รูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* พบว่าเป็นสายเปปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลทำให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์สู่ภายนอก เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ในกรณีที่เป็นสปอร์พบว่า เยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ในระหว่างที่สปอร์เกิดการงอกออกมาและยังพบว่า ไนซินที่ความเข้มข้นสูงๆ สามารถยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของ *Bacillus sterothermophilus* และ *E. coli* ได้ (Davidson และ Hoover, 1993; Muriana, 1996) ส่วนในแบคเทอริโอซินกลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อนพบว่า ในขั้นตอนแรกปลายด้าน N-terminal ของโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งมีประจุลบโดยแรงไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C-terminal ในโมเลกุลของแบคเทอริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จะทำปฏิกิริยากับ acyl group ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูในเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออนและ สารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar และคณะ., 2000) ในยับยั้งการเจริญของเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจาก จะมีผลในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายแบบฆ่าทำลาย (bacteriocidal) แล้วยังอาจมีผลทำให้เกิดการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วย ดังเช่นที่พบใน leuconocin S แบคเทอริโอซินจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้นมักขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน สภาพแวดล้อมรวมถึงชนิดและปริมาณของเซลล์เป้าหมาย

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซิน

การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซิน ส่วนใหญ่ทำการศึกษากันมากในไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินทางการค้าที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร Daeschel (1993) ได้สรุปปัจจัยดังกล่าวไว้ดังนี้

1. ชนิดของแบคทีเรียเป้าหมาย โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกันไป เช่น ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด, enterocin 1146 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sake* และ *Listeria* sp., ส่วน pisicocin V1 และ divercin V41 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes, L. innocua* และ *C. Tyrobutyricum*

2. สภาวะที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพทางชีวภาพของแบคเทอริโอซินนั้นจะเหมือนกับโปรตีนทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน โลหะหนัก การกวนที่รุนแรงและมากเกินไป การฉีกขาดของโมเลกุลแบคเทอริซินเนื่องจากการแช่แข็งและการละลาย เช่น ไนซินถูกทำลายด้วยเอนไซม์ alpha-chymotrypsin และ nisinase, lactocin 27 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin และ pronase, lactacin B ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K

3. การรวมตัวกันของแบคเทอริโอซินกับองค์ประกอบของอาหารหรือส่วนประกอบอื่นๆ ของอาหารที่เติมลงไป พบว่า เกลือไนไตรต กรดอินทรีย์ สารจับโลหะ และสารอิมัลซิไฟเออร์ มีส่วนช่วยให้ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญขของแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีขึ้น ส่วนไขมัน เนย ฟอสโฟลิปิด โปรตีน และสารในกลุ่มฟีนอลจะมีผลในการลดกิจกรรมของไนซิน

4. ค่าความเป็นกรดด่างของสารละลายหรือตัวกลาง ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการละลายและกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 และ 5 ไนซินจะสามารถละลายได้ 12 และ 4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะที่เป็นกลางหรือเบส นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรด ไนซินยังสามารถทนต่อความร้อนได้ดี โดยค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 ไนซินสามารถทนต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °ซ ได้โดยไม่สูญเสียกิจกรรม และที่อุณหภูมิที่ 121 °ซ จะมีการสูญเสียกิจกรรมเล็กน้อย ส่วน lacticin 481 มีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 หรือ 7 แต่ไม่คงตัวที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 นอกจากนี้ diplococcin จะมีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 โดยสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ100 °ซ ได้นาน 1 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องแก้ว

- ปิเปต ขนาด 0.1 , 1 และ 10 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง ขนาด 16 x 150
- บีกเกอร์ขนาด 250 , 1000 และ 2000 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตร
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ
- แท่งแก้วคน
- แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ
- ลวดเขี่ยเชื้อ
- เข็มเขี่ยเชื้อ

1.2 ช้อนตักสาร

1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

1.4 ตู้อบลมร้อน

1.5 ตู้ปลอดเชื้อ

1.6 ตู้แช่เย็น

1.7 Autoclave รุ่น SS – 320

1.8 กระบอกใส่ปิเปต

1.9 ที่ใส่หลอดทดลอง

1.10ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.11ขวดน้ำกลั่น

1.12ลูกยาง

1.13 เครื่องวัด pH

1.14 เครื่องไมโครเวฟ

1.15 water bath

1.16 vortex

1.17 ตู้บ่มเชื้อของ memert

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
96720

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 peptone จาก casein ของบริษัท Merck, Germany

2.2 Meat extract ของบริษัท Merck, Germany

2.3 yeast extract ของบริษัท Merck, Germany

2.4 D – glucose ของบริษัท Merck, Germany

2.5 Tween – 80 ของบริษัท Merck, Germany

2.6 Agar ของบริษัท Merck, Germany

2.7 Tryptone ของบริษัท Merck, Germany

3.สารเคมี

3.1 Di – Potassium hydrogen phosphate

3.2 di – Ammonium hydrogen citrate

3.3 Citric acid diammonium salt

3.4 potassium dihydrogen phosphate

3.5 Sodium acetate

3.6 Manganese sulphate

3.7 Magnesium sulfate

3.8 Calciumcabornate

3.9 Sodiumchloride

4. ตัวอย่างอาหาร

ปูดอง 4 แหล่งจากตลาดหัวตะเข้

5. จุลินทรีย์

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มาจาก

- เชื้อที่แยกหมักจากอาหารใหม่คือ ปูดอง 4 แหล่ง จำนวน 40 สายพันธ์

จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรียได้จาก ห้องปฏิบัติการทดลองได้แก่

Enterococcus	*faecalis*	JCM	5803	*P. pentosaceus*		JCM	5890
Escherichia	*coli*	JM	109	*Staphylococcus*	*aureus*	AYCC	12600
Listeria	*innocua*	ATCC	33090				
Lactobacillus	*sakei*	JCM	1157				
Lb. plantarum		ATCC	8014				
Lb. plantarum		ATCC	14917				
Pediococcus	*pentosaceus*	JCM	5885				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากปูดอง

1.1 เตรียมตัวอย่างปูดองเจือจาง 1 :10 , 10^{-2} ,10^{-3} , 10^{-4} ในการเตรียมระดับความเจือจาง 10^{-1} จะชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ แล้วเติมน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้า

1.2 ทำการเจือจางที่ระดับ 10^{-2} ,10^{-3} , 10^{-4}

1.3 ปิเปตแต่ละระดับความเจือจางจากข้อ 2 ใส่ในจานเพาะเชื้อ MRS medium (รูปที่ 2)

1.4 ใช้แท่งแก้วรูปตัว L เกลี่ยตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจางให้ทั่วจาน

1.5 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มไว้ใน Candel jar เป็นเวลา 24 ช.ม.

1.6 คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่มีบริเวณใส (clear Zone) (รูปที่ 3) ล้อมรอบโคโลนีเก็บไว้ในหลอดทดลองด้วย MRS deep tube (รูปที่ 4) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ช.ม. และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อไว้สำหรับการทดสอบแบคเทอริโอซิน

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกแอซิดที่มีแนวโน้มในการสร้าง Becteriocin โดยวิธี Colony spot – on – lawn (Swetwiwathana และ Lotong, 1999; Tichaczek และคณะ, 1992)

2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่คัดเลือกเพื่อทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน

2.1.1 นำหลอดตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้เท MRS broth หลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ช.ม.

2.1.2 นำ loop เขี่ยเชื้อแลคติกจากตัวอย่างข้างต้น มาทำการ spot ลงบน BSM medium ซึ่งแบ่งไว้ 4 ช่อง ช่องละ 1 ตัวอย่างเชื้อ โดยทำหลอดละ 4 จานเพาะเชื้อ แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มไว้ใน Candel jar เป็นเวลา 24 ช.ม.

2.1.3 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาดูการเจริญของเชื้อที่ทำการ spot เอาไว้

2.2 การเตรียมเชื้ออินดิเคเตอร์

2.2.1. เตรียมหลอดอาหารเหลว TSBYE (ภาคผนวก ก) ขอถ่ายเชื้อ *E. Coli* , *Enterococcus faecalis, Listeria innocua* และ *Staphylococcus aureus* จากห้องแลบ แล้วนำหลอดเชื้อทั้งหมดไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.

2.2.2 ตรวจสอบดูการเจริญของเชื้ออินดอเคเตอร์ว่ามีการเจริญหรือไม่ โดยดูจากความขุ่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3 การทดสอบหาเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่สร้างแบคเทอริโอซิน

2.3.1. หลอม soft agar เพื่อให้วุ้นหลอมเหลว และเก็บไว้ใน water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส

2.3.2 นำเชื้ออินดิเคเตอร์ถ่ายลงใน solf agar โดยให้มีเชื้อใน soft agar 2 % (soft agar 5 ml ถ่ายเชื้อ 0.01 ml) โดยนำเชื้ออินดิเคเตอร์ทั้งหมดถ่ายลงใน TSBYE + 0.7% agar ผสมให้เข้ากันด้วย mixer

2.3.3 ถ่าย soft agar ที่มีอินดิเคเตอร์ผสมอยู่ หลอดละ 5 มิลลิลิตรลงบนจานเพาะเชื้อ ที่ spot ของแบคทีเรียแลคติคเจริญอยู่ ให้วุ้นกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ (seeding)

2.3.4 รอจนวุ้นชั้นบนแข็งตัวดีจึงนำไปบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส โดยที่เชื้อ *Listeria innocua* ให้นำไปบ่มในสภาพ microaerophillic

2.3.5. ดูการสร้างแบคเทอริโอซิน ถ้ามีรอบโคโลนีแบคทีเรียแลคติคที่เจริญนั้นจะมีโซนใส (clear zone)

3. การทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซิน

3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติค

3.1.1 นำเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรีย มาบ่มในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 5 ml ที่ตู้บ่มอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.

3.1.2 นำเชื้อที่เจริญแล้วมา centrifuge ที่ 4 °C 5,500 rpm/ 10 นาที

3.1.3 นำส่วนใสที่ได้มาปรับ pH ให้ได้ 6.5

3.1.4 นำมากรองด้วย sterile membrand filter

3.1.5 เก็บส่วนใสที่ปราศจากเชื้อลงในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

3.2 การเตรียมเชื้ออินดิเคเตอร์

3.2.1 เลี้ยงเชื้ออินดิเคเตอร์ใส่ใน soft agar 10 µl mixer ให้เข้ากัน

3.2.2 เทลงใน TSBYE ager ที่เตรียมไว้ ในจานเพาะเชื้อ

3.2.3 นำส่วนใสที่กรองแล้ว spot 3:1:5 ลงในจานเพาะเชื้อในข้อ 3.2.2 ในปริมาตร10 µl

3.2.4 นำไปบ่มตามสภาพของเชื้ออินดิเคเตอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. ทดสอบการย้อมแกรม

1. เกลี่ย (smear)เชื้อที่คัดเลือกไว้ โดย loop จุ่มน้ำสะอาดแตะหยดน้ำลงบนสไลด์ แล้วเผา loop ให้ร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อ รอให้ loop เย็นลงแล้วจึงแตะเชื้อให้เชื้อติดมาเพียงเล็กน้อย แล้วนำมาผสมกับหยดน้ำบนสไลด์ เกลี่ยให้แผ่อย่างสม่ำเสมอ ปล่อยให้แห้งเองแล้วจึง fix สไลด์โดยลนสไลด์ผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2 – 3 ครั้ง

2. หยดสี crytal violet ให้ท่วมรอย smear นาน 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ

3. หยด gram iodine บนรอย smear นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ

3. ล้างสีโดยหยด decolorizing agent บนรอย smear นาน 20 – 30 วินาที สังเกตดูว่าสีน้ำเงินจางเกือบหมด แล้วล้างด้วยน้ำทันที

4. ย้อมทับด้วย safranine o นาน 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษจนแห้ง

5. นำสไลด์ที่แห้งแล้ว หยดด้วย immersion oil 1 หยด นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 X แบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีน้ำเงิน แบคทีเรียแกรมลบจะติดสีแดง

5. การทดสอบโดยวิธี api 50 CHL

1. นำเชื้อ lactic acid bacteria ที่คัดเลือกไว้ คือ 25 มา streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + 0.5% $CaCo_3$ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ใน candle jar เป็นเวลา 18-24 ชม.

2. เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ มา 3-4 โคโลนี ใส่ลงในอาหารเหลวสำเร็จรูป (api 50 CHL)

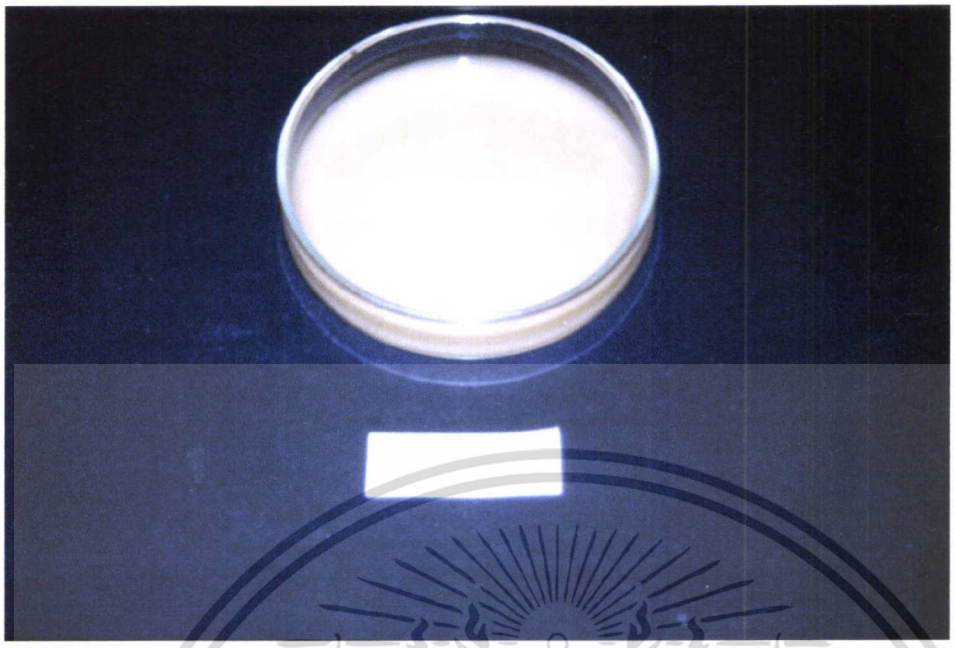
3. ใช้ Pasture ปิเปต ดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้ออยู่ ลงใน strip test ซึ่งมีส่วนผสมของ Brom Cresol Purple โดยจะมีสีม่วง pH เป็นกลาง ดังรูปที่ 5 แล้วปิดด้วย paraffin oil ที่ปราศจากเชื้อเพื่อให้อยู่ในสภาพที่ไร้อากาศ

4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส ในตู้บ่ม เป็นเวลา 24 - 48 ชม.

5. สังเกตดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเชื้อมีการหมักย่อยน้ำตาลแล้วเกิดกรด ส่วนของช่องน้ำตาลที่ถูกหมักย่อยจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง หรือเขียว

6. นำผลการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ได้ไปอ่านหาความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติค จาก api 50 CH database

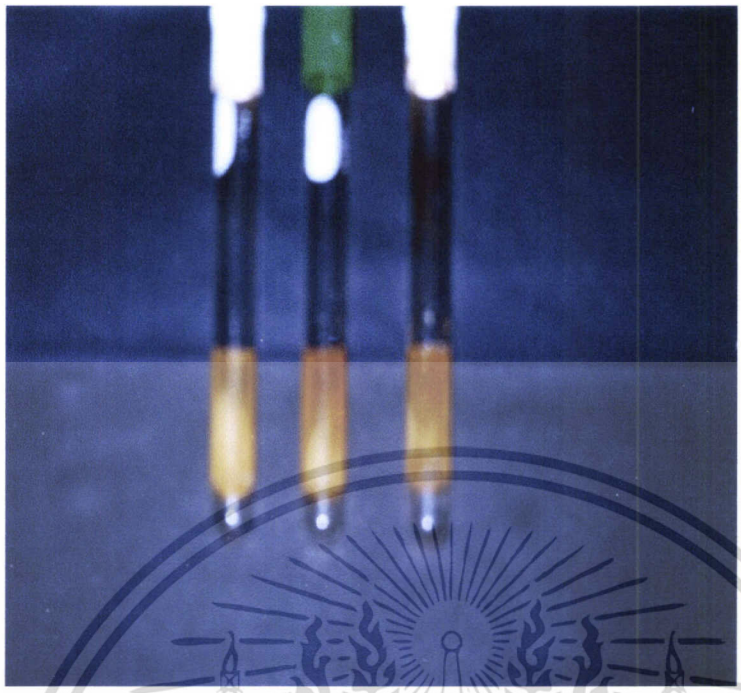
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2. แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium

รูปที่ 3. แสดงลักษณะของ clear zone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4. การเจริญของ LAB ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS deep tubes

รูปที่ 5. การปิเปตอาหารเหลวที่มีเชื้ออยู่ลงใน strip test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือก LAB ที่มีแนวโน้มสร้างสารแบคเทอริโอซิน

จากการคัดเลือกเชื้อ LAB จากปูดองที่ซื้อจาก 4 แหล่ง จำนวน 40 สายพันธุ์ เพื่อทดสอบหาสายพันธ์ที่มีแนวโน้มสร้างแบคเทอริโอซิน โดยวิธี colony spot – on – lawn พบว่ามี 3 สายพันธุ์ ที่มีแนวโน้มในการสร้างแบคเทอริโอซิน ยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis*และ *Listeria innocua* (ตารางที่ 7) ซึ่งได้แก่สายพันธุ์ที่ 25, 26 และ 28 โดยที่สายพันธุ์ที่ 25 ให้ผลในการยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *Enterococcus faecalis* ได้มากที่สุดรวมถึงยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ได้ด้วย ในขณะที่สายพันธุ์ที่ 26 และ 28 ยับยั้งเฉพาะ *Enterococcus faecalis* สายพันธุ์ทั้ง 3 ดังกล่าวจึงใช้ในการศึกษาดูแนวโน้มในการสร้าง แบคเทอริโอซินในอาหารเหลวในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 7. การยับยั้งเชื้อ Indicator จากสายพันธ์ของ LABที่คัดเลือกได้จากปูดอง

Indicator strains	**Tested LAB strains**		
	25	**26**	**28**
Listeria innocua	+	-	-
Bacillus cereus	-	-	-
Staphylococcus aureus	-	-	-
Enterococcus faecalis	+++	++	++

- = no inhibition
+ = inhibition zone > 0 - 1 mm
++ = inhibition zone > 1- 2 mm
+++ = inhibition zone > 2 - 3 mm
++++ = inhibition zone > 3 - 4 mm

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การทดสอบระดับความเข้มข้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเชื้อสายพันธุ์ที่ 25, 26 และ 28 ในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 – 48 ชม. แล้วนำมา centrifuge เพื่อให้ส่วนใสที่อาจจะมีสารแบคเทอริโอซิน ยับยั้งเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ดังกล่าว จากนั้นนำมาปรับ pH แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดย sterile membranl filter แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งจากเชื้อกลุ่มอินดิเคเตอร์เพิ่มขึ้นเป็น 9 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8) พบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ เมื่อเจริญใน MRS broth ไม่สามารถผลิตสารยับยั้งเหมือนกับการทดลองข้างต้น โดยวิธี colony spot – on – lawn ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า สภาพใน MRS broth ไม่มีความเหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ดังรายงานของ Scillinger และ Luecke (1989) ที่รายงานว่ามีกลุ่ม LAB หลายกลุ่มที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักและพบว่า มีการสร้างสารที่น่าจะเป็นแบคเทอริโอซินโดยวิธี colony spot – on – lawn แต่เมื่อมาเลี้ยงในอาหารเหลวหลายชนิดกลับไม่พบสารแบคเทอริโอซิน แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทั้ง 3 ตัวนี้ จัดเป็นกลุ่มที่น่าสนใจที่จะศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเหลวชนิดอื่น รวมถึงการนำไปใช้ประโยชน์ในการผลิตเป็นกล้าเชื้ออาหารหมักสำหรับผลิตภัณฑ์ปูดอง ในโอกาสต่อไปจึงได้ทำการคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ดีที่สุดในขั้นตอน colony spot – on – lawn นั้นคือ สายพันธุ์ที่ 25 เพื่อดูลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อและสายพันธุ์โดยใช้ api 50 CH system ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 8. ผลการยับยั้งเชื้อของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเอาโคโลนีออก

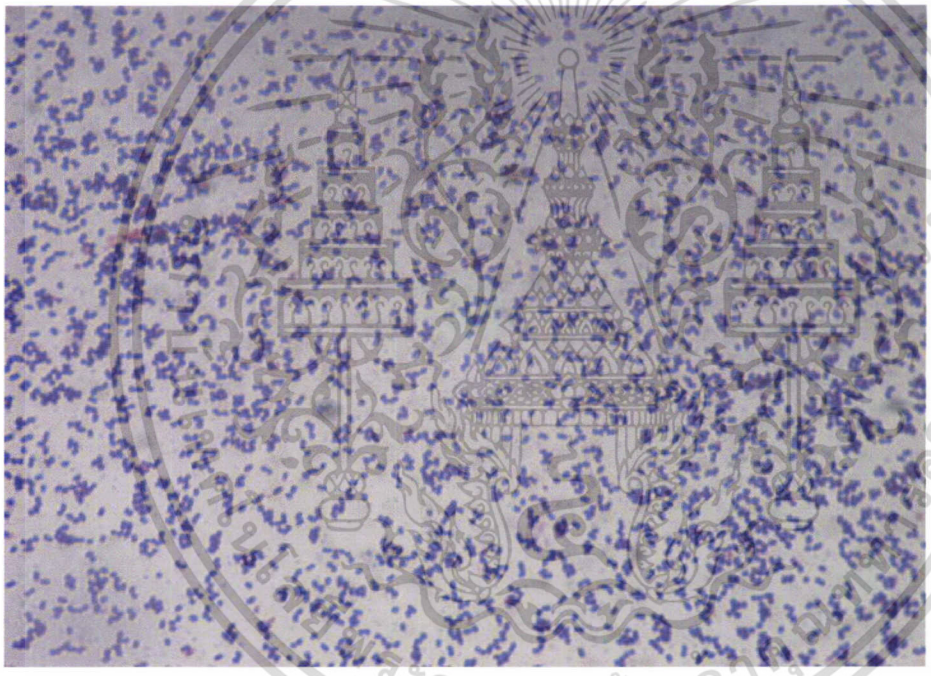
Indicator strains	**Tested LAB strains**		
	25	**26**	**28**
Enterococcus faecalis ATTC	-	-	-
E. coli	-	-	-
Staphylococcus aureus JCM	-	-	-
Listeria innocua	-	-	-
Listeria sakei	-	-	-
Listeria plantarum 8014	-	-	-
Listeria plantarum 14914	-	-	-
Pediococcus pentosaceus 5885	-	-	-
P. pentosaceus 5890	-	-	-

- = no inhibition

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การศึกษาสัณฐานวิทยาและชนิดของเชื้อโดยใช้ Carbohydrate fermentation test ของ api 50 CH

จากการนำเชื้อที่ 25 นำมาย้อมแกรมพบว่า เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ได้ ติดสีน้ำเงิน รูปร่างกลม (รูปที่ 6)แสดงว่าเชื้อสายพันธุ์ที่ 25 เป็นแบทีเรียแกรมบวก แล้วนำมาทดสอบโดย api 50 CH พบว่า เชื้อสายพันธุ์ที่ 25 มีการหมักย่อยน้ำตาลบางชนิดทำให้เปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (+) และไม่มีการหมักย่อยน้ำตาลบางชนิดทำให้สีม่วงไม่เปลี่ยนสี (-) และยังมีการหมักย่อยไม่สมบูรณ์ทำให้เปลี่ยนเป็นสีเขียว (?) (ตารางที่ 9) (รูปที่ 7) เมื่อนำผลที่ได้ไปอ่านค่าความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อจาก api 50 CH database พบว่าเชื้อ LAB มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactococcus.para.paracasei* 87.4%



รูปที่ 6. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อ LAB สายพันธุ์ที่ 25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9. ผลการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ จาก api test

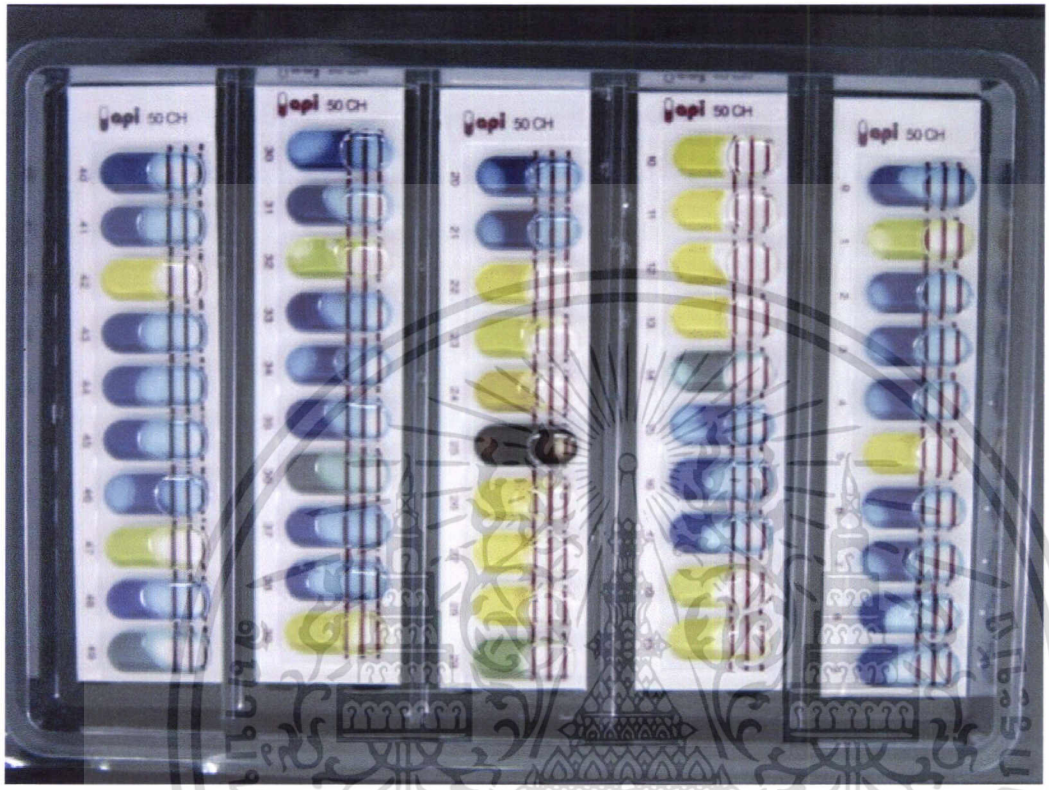
0	Control	-	17	Ino	-	34	MLZ	-
1	Gly	+	18	Man	+	35	D- Raf	-
2	Ery	-	19	Sor	+	36	AMD	?
3	D-Ara	-	20	MDM	-	37	GLYG	-
4	L-Ara	-	21	MDG	-	38	XYT	-
5	Rib	+	22	NAG	+	39	Gen	+
6	D-Xyl	-	23	Amy	+	40	Tur	-
7	L-Xyl	-	24	Arb	+	41	Lyx	-
8	Ado	-	25	Esc	+	42	Tag	+
9	MDX	-	26	Sal	+	43	D-Fuc	-
10	Gal	+	27	Cel	+	44	L-Fuc	-
11	D-Glu	+	28	Mal	+	45	DARL	-
12	D-Fru	+	29	Lac	?	46	LARL	-
13	MNE	+	30	Mel	-	47	GNT	+
14	SBE	?	31	Sac	-	48	2KG	-
15	Rha	-	32	Tre	+	49	5KG	?
16	Dul	-	33	Lnu	-			

\+ = มีการหมักย่อน้ำตาล

\- = ไม่มีการหมักย่อยน้ำตาล

? = การหมักย่อน้ำตาลไม่เสร็จสมบูรณ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 7. ผลการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ จาก api test

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเพื่อศึกษาลักษณะของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรีย แลคติกจากปูดองพบว่า Lactic acid bacteria มีความสามารถในการสร้างสารแบค เทอริโอซิน ในขั้นตอน colony spot – on – lawn จากการขั้นเลือกได้ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ ผลปรากฏว่ามี 3 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ Indicator 4 ชนิด สามารถยับยั้งได้ 2 ชนิด คือ *Listeria innocua* และ *Enterococcus faecalis* คือ 25 ,26 และ 28 และเมื่อนำมาทดสอบระดับความเข้มข้นสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์พบว่าเชื้อ Lactic acid bacteria ที่คัดเลือกมา 3 สายพันธุ์ไม่มีความสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้เลย ดังนั้นจึงนำเชื้อที่คัดเลือกไว้ 1 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการสร้างClear zoneที่กว้างที่สุดคือสายพันธุ์ที่ 25 มาศึกษาสัณฐานวิทยาและชนิดของเชื้อโดยใช้ Carbohydrate fermentation test ของ api 50 CHผลปรากฏว่า เชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ได้ ติดสีน้ำเงิน รูปร่างกลม เมื่อนำมาทดสอบโดย api 50 CH แล้วนำมาอ่านค่าความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อจาก api 50 CH database พบว่าเชื้อ LAB มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactococcus.para.paracasei* 87.4%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

นภา โล่ห์ทอง. 2522 . เอกสารประกอบการบรรยายวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา, บุญเทียม พันธุ์เพ็ง และ อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2545. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร. โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2545 . เอกสารประกอบการสอนวิชาจุลชีววิทยาอาหาร . ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิเชียร ลีลามาศ. 2534. อาหารจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในประเทศไทย . คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

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

ภาษาอังกฤษ

Abee, T ., Krockel, L. and Hill, C. 1995. Bacteriocins : Modes of Action and Potentials in Food Preservation and Control of Food Poisoning. Int. J. Food Microbiol. 28 : 169 – 185.

Adam, MR 1999. Safety of Industrial Lactic Acid Bacteria. J. Biotechnol. 68 : 171 – 178.

Cleveland, j., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikindas, M.L. 2001 Bacteriocin : Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. Int. J. Food Microbiol. 71 : 1 – 20.

Daeschel, M.A. 1993. Application and Interactions of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Foods and Beverages, pp. 63 – 91. In Hoover, D.G. and Steenson, L.R. (eds.). Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press, Inc., New York.

Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. Antimicrobial Components from Lactic Acid Bacteria, pp. 127 – 160. In Salmine, S. and von Wright, A. (eds.). Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class II a Bacteriocins : Biosynthesis, Structure and Activity. FEMS Microbiol. Rev. 24 : 85 – 106 .

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12 : 39 – 58.

Montville, T.J. and Kaiser, A.L. 1993. Antimicrobial Proteins : Classification, Nomenclature, Diversity and Relationship to Bacteriocins, L.R. (eds.). Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. Academic Press, Inc., New York.

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

O' Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002. Potential of Bacteriocins – Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements in Food Safety and Quality. Biochimie. 84 : 593 – 604.

Schilling, U. And F.K. Luecke. 1989. Antibacterial Activity of *lactobacillus sakei* Isulated from Nham. Appl. And Microbiol. 55 (8) : 1901 – 1906.

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

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, 1999. Chiangmai, Thailand.

Tichazek, P.S., J. Nissen-Meyer, I.F. Nes, R.F. Vogel, and W.P. Hammes. 1992. Characterization of the Bacteriocins Curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and Sakacin P from *L. sake* LTH 673. System. Appl. Microbiol. 15: 460-468.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1. สูตรการเตรียม MRS medium

Peptone จาก Cascin	10	กรัม
Meat extract	8	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
D-Gluccose	20	กรัม
Tween-80	1	มิลลิลิตร
Agar	15	กรัม
Di- Potasium Hydrogen Phosphate	2	กรัม
di- Ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulphate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.04	กรัม
$CaCO_3$	0.7%	
Dw	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตราฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว , 121องศาเซลเซียส 15 นาที)

2.การเตรียม MRS Deep tubes

MRS	จากสูตรข้อ 1 ข้างต้น
Agar	1 %
$CaCO_3$	1.2 %

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตราฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว , 121 องศาเซลเซียส 15 นาที) นำมาทำการ Mixer ทันทีให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำเย็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. สูตรการเตรียม BSM medium (Bacteriocin Screening Medium)

Glucose	2 กรัม
Meat extract	2 กรัม
Yeast extract	4 กรัม
Tryptone	10 กรัม
Tween-80	1 มิลลิลิตร
Agar	15 กรัม
Citric acid diammonium Salt	2 กรัม
$MgSO_4$ $7H_2O$	0.2 กรัม
$MnSO_4$ $4H_2O$	0.05 กรัม
K_2HPO_4 $3H_2O$	8.7 กรัม
KH_2PO_4	8 กรัม
Dw	1 ลิตร
pH 6.8 – 7.0	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตราฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว , 121 องศาเซลเซียส15 นาที)

4. สูตรการเตรียม TSB

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม

น้ำกรอง 1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตราฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว , 121 องศาเซลเซียส 15นาที)

5. สูตรการเตรียม TSBYE

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract 0.6 %

น้ำกรอง 1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตราฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว , 121 องศาเซลเซียส15 นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. สูตรการเตรียม TSBYE Soft agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract 0.6 %

อาหารเลี้ยงเชื้อ Agar 0.7 %

น้ำกรอง 1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตราฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว , 121 องศาเซลเซียส15 นาที)

7.สูตรการเตรียม TSB Soft agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อ Agar 0.7 %

น้ำกรอง 1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตราฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ,121 องศาเซลเซียส15 นาที)

8. การเตรียม Soft agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ Agar 0.7 %

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตราฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ,121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

รูปที่ 8. ผลิตภัณฑ์ปูดอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก ได้แก่ จุลินทรีย์ เกลือ เอนไซม์ และปัจจัยอื่น ๆ

ลักษณะและสกุลของแบคทีเรียแลคติด

แบทีเรียแลคติกซึ่งจัดจำแนกปัน 12 สกุล มีลักษณะสำคัญในแต่ละสกุลดังนี้ คือ

1. Streptrococcus เซลล์มีรูปร่างกลมหรือ รูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 – 1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลคติคชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักชนิดเดียวเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายชนิดเป็นปรสิตในคนหรือสัตว์ และบางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20 – 41 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์

2. Vagococcus เป็นแบคทีเรียแลคติกที่เคลื่อนที่ได้บางสายพันธ์เท่านั้น สกุลนี้พบเพียง 2 ชนิดคือ *Vogococcus flauvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน streptococci กลุ่ม N และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค

3. Lactococcus เป็นเซลทีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 – 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ

4.Enterococcus เซล์มีรูปไข่จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้น ๆ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญ 10 และ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ และบางสปีชีส์ทำให้เกิดโรค

5.Pediococcus เซลล์รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.38 – 1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทาง ในระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ ติดกัน ในสภาวะไม่มีอากาศ ผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L (+) จากการหมักกลูโคส บางสปีชีส์ทำให้เบียร์และไวน์เน่าเสีย

6.Tetragenococcus มีลักษณะการแบ่งตัวเป็นเหมือน Pediococcus เนื่องจากเดิมคือสปีชีส์ *P. halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมอยู่สูงถึงร้อยละ 18 และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับสกุล Enterococcus และ Carnobacterium มากกว่าสกุลเดิม

7.Aerococcus มีลักษณะการแบ่งตัวเป็นเหมือน Pediococcus ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridans* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *p. hormari* และ *p. urinae – equi* โดย *A. viridans* ทำให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.Leuconostoc ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์นี้ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหาร ซึ่งมีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม lactobacilli แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติกชนิด D (-) , เอทานอล , คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง

9.Oenococcus ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวกันคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenos* ด้วยสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจาก ดีเอ็นเอ : ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น และมีลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล Leuconostoc อย่างชัดเจน

10. Weissella รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม มีลักษณะคล้าย Leuconostoc มีสปีชีส์เดิมอยู่ในสกุล Leuconostoc และ lactobacillus

11. Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มที่ใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมี และสรีระเนื่องจากความแตกต่างของ mol% G + C ภายในสกุลสูงคือระหว่าง 32 – 35 พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์ สัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บางสปีชีส์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม

กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแล็กโตส เป็นกรดแลคติกโดยวิธี Embden – Meyerhof – parnas pathway (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1, 6 biphoshosphae – adolase แต่ไม่ผลิต phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตไม่ได้ มี 18 สปีชีส์

กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง adolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้ มี 18 สปีชีส์

กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli หมักย่อยน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสผ่านวิถี ฟอตโฟกลูโคเนตเป็นแลคเทต ,เอทานอล , คาร์บอนไดออกไซด์ มี 19 สปีชีส์

12.Carnobacterium เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรง ขนาดสั้นถึงปานกลางหรือท่อนเรียว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5- 0.7 ไมครอน และยาว 1.1 – 3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) , เอทานอล , คาร์บอนไดออกไซด์ และแอซีเตต จากการหมักน้ำตาลเฮกโซส มี 6 สปีชีส์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

การย้อมสีแกรม แบคทีเรีย

การย้อมสีวิธี Gram จัดเป็น differential stain ที่สำคัญที่สุดในการจำแนกแบคทีเรีย การย้อมสีวิธีนี้จะแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 2 พวก ซึ่งขึ้นอยู่กับการติดสี

แบคทีเรียที่ยังคงติดสี crystal violet (สีน้ำเงินหรือม่วง) หลังจากการล้างด้วยแอลกอฮอล์เรียกว่า "Gram-positive"ส่วนพวกที่ไม่ติดสีของcrystal violet แต่ติดสีที่ย้อมทับ (Counter stain) ของ Safranin (สีแดง) เรียกว่า "Gram-negative"

ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นเมื่อย้อมสีมีดังนี้

การย้อมสี Gram ในขั้นแรกย้อม smear ด้วยสี crystal violet เซลล์แบคทีเรียทุกเซลล์บน smear จะติดสีน้ำเงินหรือม่วง เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกมีผนังหนาจึงติดสี crystal violet ได้ดีและเมื่อเติมสารละลายไอโอดีนลงไปจะรวมกับสี crystal violet กลายเป็นผลึกที่มีโครงสร้างซับซ้อน

(crystal violetiodine complex) ทำให้สีติดดียิ่งขึ้น ต่อมาเมื่อล้างเซลล์แบคทีเรียด้วย ethyl alcohol 95% ขั้นตอนนี้ แบคทีเรียแกรมลบซึ่งมีไขมันอยู่ในส่วนประกอบของผนังเซลล์มาก ไขมันจะถูกละลายออกมากับแอลกอฮอล์ ทำให้รูผนังเซลล์กว้างขึ้น ผลึกของสีจึงหลุดออกมากับผนังเซลล์ตอนนี้แบคทีเรียแกรมลบจึงไม่ติดสี ส่วนแบคทีเรียแกรมบวกที่มีส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่เป็นไขมันอยู่น้อย ผลึกของสียังคงติดแน่นอยู่ (crystal violet สีน้ำเงินหรือม่วง) ซึ่งต่อมาเมื่อย้อมทับด้วยSafranin (สีแดง) ผนังเซลล์ของแบคทีเรียพวกแกรมลบซึ่งเดิมไม่ติดสีจะติดสีแดงในขั้นตอนนี้จึงเห็นความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่มอย่างชัดเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวศิรัญญา ศรีภิรมย์ เกิดวันที่ 14 พฤษภาคม พ.ศ. 2525 ที่จังหวัดลำปาง สำเร็จการศึกษาระดับชั้นประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูงจาก สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลวิทยาเขตปทุมธานี เมื่อพุทธศักราช 2545

นางสาวอังคนา มาตย์เสนา เกิดวันที่ 27 ตุลาคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัดสมุทรปราการ สำเร็จการศึกษาระดับชั้นประกาศนียบัตรวิชาชีพชั้นสูงจาก สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลวิทยาเขตปทุมธานี เมื่อพุทธศักราช 2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้