สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

การศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อของไทย

(Preliminary study for probiotic prospect of isolated bacteriocin - producing lactic acid bacteria from Thai traditional fermented meat products)

โดย

1. นางสาวคณินทรา สุวรรณมานนท์ รหัส 47040800
2. นางสาวชมพูนุท ขาวนวล รหัส 47040804
3. นางสาวพิมลพรรณ ทองอุ่น รหัส 47040817

ปพ.
ค132ก
2550

เลขหมู่.......................................
เลขทะเบียน 85421
วัน,เดือน,ปี 11 พ.ย. 2551

b. 12010121
i. ....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณินทรา สุวรรณมานนท์, ชมพูนุท ขาวนวล และพิมลพรรณ ทองอุ่น .2550 : การศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อของไทย. โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : รศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์

จากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินโดยเริ่มจากการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้มา 6 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากอาหาร คือ สายพันธุ์ A5, M13, N100, NF3, RS54 และ 536 มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ทำการปรับ pH ในระดับต่าง ๆและในอาหาร MRS broth ที่ทำการเติมเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ดีในระดับ pH ต่ำๆ และ สามารถทนเกลือน้ำดีในระดับความเข้มข้นสูงๆได้ จากนั้นนำสายพันธุ์ที่ได้ดังกล่าวมาทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Listeria innocua* เมื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมได้แล้วจึงนำสายพันธุ์ดังกล่าวมาทดลองดูการอยู่รอดในกระเพาะเทียมที่ระดับ pH 2, 7 และ skimmed milk (pH 2) ที่ใช้เป็นอาหารที่เวลา 0, 90 และ 180 และผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียม (pH 8) ที่เวลา 0 (180 นาทีของกระเพาะเทียม), 90 และ 180 นาที พบว่าระดับ pH 2 มีจำนวนเชื้อหลงเหลืออยู่น้อยกว่าระดับ pH 7 และ skimmed milk (pH 2) เนื่องจาก pH 7 มีสภาวะความเป็นกลางจึงไม่เกิดการทำลายเชื้อ ทำให้เชื้อหลงเหลืออยู่มากเพียงพอผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียม สำหรับ skimmed milk (pH 2) มีเชื้อหลงเหลืออยู่เนื่องจาก skimmed milk ไปห่อหุ้มเชื้อ เชื้อจึงถูกทำลายจากสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะเทียมได้น้อย ดังนั้นเวลานำเชื้อไปใช้เป็นโพรไบโอติกจึงควรบริโภคในสภาวะที่กระเพาะเป็นกลาง (pH 7) หรือ ควรบริโภคอาหาร เช่น นม เพื่อให้เชื้อได้หลงเหลือถึงลำไส้ โดยเชื้อจะไปยึดเกาะติดบริเวณผนังลำไส้ยึดพื้นที่ไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมายึดติด ทำให้ผู้บริโภคอาหารโพรไบโอติกเข้าไปมีภูมิต้านทานต่อโรคมากขึ้นและมีสุขภาพดีขึ้นอีกด้วย

....

....

.... (รศ. ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์) ....

นักศึกษา อาจารย์ที่ปรึกษา วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การทำโครงงานปัญหาพิเศษในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ต้องกราบขอบพระคุณ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษา ที่ท่านได้กรุณาสละเวลาให้คำปรึกษา เสนอแนะ และดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างดี รวมทั้งแก้ไขข้อบกพร่องของโครงงานให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ที่เป็นกำลังใจและสนับสนุนในด้านต่างๆให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี และขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่ให้กำลังใจและคอยช่วยเหลือ และสุดท้ายขอขอบพระคุณผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือในการแนะนำ ติชมและให้กำลังใจในการจัดทำโครงงานทุกๆท่าน

คณินทรา สุวรรณมานนท์
ชมพูนุท ขาวนวล
พิมลพรรณ ทองอุ่น
7 มกราคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญภาพ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 แบคทีเรียกรดแลคติก	
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก	2
2.2 ผลิตภัณฑ์ที่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติก	3
2.3 บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีต่ออาหาร	4
2.4 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก	6
บทที่ 3 แบคเทอริโอซิน	
3.1 แบคเทอริโอซิน	9
3.2 แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก	9
3.3 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน	10
3.4 การทำงานของแบคเทอริโอซิน	11
3.5 ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร	12
3.6 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร	13

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 โพรไบโอติก

4.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติก 15

4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก 16

4.3 กลไกการทำงานของโพรไบโอติก 21

4.4 ประโยชน์ของโพรไบโอติก 22

บทที่ 5 อุปกรณ์และวิธีการ

5.1 สถานที่ทำการทดลอง 24

5.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง 24

5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 25

5.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดลอง 26

5.5 วิธีการทดลอง 26

บทที่ 6 ผลการทดลอง

6.1 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในกระเพาะอาหาร 32

6.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในระบบทางเดินอาหาร 33

6.3 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. innocua* ได้ 34

6.4 ศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* M 13 36

บทที่ 7 สรุปผลการทดลอง 38

เอกสารอ้างอิง 39

ภาคผนวก 41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 แนวทางการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตอาหารหมักชนิดต่างๆ	4
2.2 โครงสร้างของไดอะซิทิล	7
2.3 โครงสร้างของอะซีทัลดีไฮด์	7
3.1 สารพันธุกรรมที่เสียรูปร่าง	11
3.2 โครงสร้างของไนซิน	13
4.1 ขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก	17
4.2 ขั้นตอนการทำพันธุวิศวกรรมของจุลินทรีย์โพรไบโอติก	20
5.1 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับ pH แตกต่างกัน	27
5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีแตกต่างกัน	28
5.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแบคเทอริโอซิน	29
5.4 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพการอยู่รอดในกระเพาะเทียม	30
5.5 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพการอยู่รอดในลำไส้เทียม	31
6.1 เชื้ออินดิเคเตอร์ *L. innocua* ถูกยับยั้งด้วยแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก 536	34
6.2 เชื้ออินดิเคเตอร์ *L. innocua* ถูกยับยั้งด้วยแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก M13	34
6.3 กราฟการเปรียบเทียบแสดงจำนวนเชื้อที่อยู่รอดในสภาวะที่แตกต่างกันของเชื้อ 536 ในกระเพาะและลำไส้เทียม	37
6.4 กราฟการเปรียบเทียบแสดงจำนวนเชื้อที่อยู่รอดในสภาวะที่แตกต่างกันของเชื้อ M13 ในกระเพาะและลำไส้เทียม	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 อาหารหมักชนิดต่างๆ วัตถุดิบและกล้าเชื้อที่ใช้	3
3.1 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมัก	10
4.1 แสดงคุณสมบัติของโพรไบโอติคในมนุษย์และสัตว์	16
4.2 แบคเทอริโอซิจากแบคทีเรียกรดแลคติก	18
4.3 ผลดีของโพรไบโอติคที่มีต่อสุขภาพและกลไกที่เกี่ยวข้อง	22
6.1 แสดงผลการตรวจสอบการทนกรดที่ระดับ pH ต่าง ๆ ของกลุ่มแบคทีเรียแลคติก	32
6.2 แสดงผลการตรวจสอบการทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติก	33
6.3 แสดงการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ของเชื้อ 536	35
6.4 แสดงการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ของเชื้อ M13	35
6.5 แสดงจำนวนเชื้อที่อยู่รอดในสภาวะแตกต่างกันของเชื้อ 536 และ M13 ในกระเพาะและลำไส้เทียม	36
ผ.1 แสดงผลการทดลองที่ได้จำนวนเชื้อที่อยู่รอดในสภาวะแตกต่างกันของเชื้อ 536 และ M13 ในกระเพาะและลำไส้เทียม	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาของปัญหา

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria , LAB) เป็นแบคทีเรียที่พบอยู่ในอาหาร และธรรมชาติทั่วไป มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการแปรรูปอาหารโดยกระบวนการหมัก ผลของ LAB ต่อผลิตภัณฑ์จะชักนำให้เกิดกลิ่นและเนื้อสัมผัสที่ดี ควบคู่ไปกับ ประสิทธิภาพในการถนอมอาหาร และ ผลของการใช้แบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ เนื่องจาก pH ในผลิตภัณฑ์ลดลง และ เมื่อ pH ในผลิตภัณฑ์ลดลง จะไปรบกวนสมดุลทางธรรมชาติของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ไม่ให้สามารถเจริญเติบโตได้

นอกจากนั้นแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ยังสร้างสารยับยั้งชนิดหนึ่ง เรียกว่า แบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นที่ยอมรับว่ามีผลต่อคุณภาพ และความปลอดภัยของอาหาร เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้ง จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้ดี ทนความร้อนสูง และข้อได้เปรียบที่สำคัญคือ เป็นสารที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคในหลายๆด้าน เช่น ไม่มีผลข้างเคียง ไม่ก่อให้เกิดภาวะภูมิแพ้ในผู้บริโภค และยังมีคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์สุขภาพที่ให้คุณประโยชน์ต่อร่างกาย โดยช่วยปรับสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้และส่งผลดีต่อสุขภาพอีกด้วย ปัญหาพิเศษนี้จึงสนใจศึกษาการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน และทดสอบคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก เพื่อเป็นแนวทางในกระบวนการผลิตอาหารโพรไบโอติกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

เพื่อทดสอบความทนต่อกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ที่ความเข้มข้นในระดับ pH ต่าง ๆ รวมถึงทดสอบการทนต่อความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับต่าง ๆ ของกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่ทนกรดในกระเพาะอาหารเพื่อใช้เป็นสายพันธุ์ในการผลิตอาหารโพรไบโอติกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่2
แบคทีเรียกรดแลคติก

2.1 แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลคติก หมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่มีความสามารถการผลิตกรดแลคติก และมีความสามารถในการหมักนมให้เกิดตะกอนได้ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสำคัญ คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างสปอร์ มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรต ให้เป็นกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นแท่งยาว , รูปร่างกลม บางครั้งพบเป็นแท่งโค้ง ถ้าเป็นแท่งสั้น มักเป็น Coryneform coccobacilli บางทีต่อกันเป็นสายโซ่ บางครั้งเคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ สามารถย้อมติดสีแกรมบวก เป็นพวกเฟอร์เมนเททีฟแบคทีเรีย (fermentative bacteria) ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสแล้วผลิตกรดแลคติก แต่ไม่สามารถหมักแลคเตสได้ แต่จะมีผลพลอยได้จาการหมัก คือ อะซิเตต (acetate) , เอทานอล (ethanol) คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) , ฟอร์เมต (formate) หรือซัคซิเนต (succinate) แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่เจริญได้ดีในสภาพมีอากาศเล็กน้อย ไม่มีการรีดิวส์ไนเตรต ไม่สลายเจลาตินและเคซีน ไม่สร้างอินโดล และ ไฮโดรเจนซัลไฟด์ แต่จะมีบางสายพันธุ์ที่สามารถสลายเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ได้ด้วยเอนไซม์ซูโดคะตะเลส (pseudocatalase enzyme) และปฏิกิริยาต่อเบนซิดีน (benzidin) นั้นจะให้ผลลบ บางเชื้อสามารถให้รงควัตถุสีเหลือง ส้ม สนิมเหล็ก หรือแดงอิฐ เป็นพวกที่มีความซับซ้อนต่อการเลือกอาหาร เพื่อใช้ในการเจริญต้องการอาหารทั้งกรดอะมิโน เปปไทด์ อนุพันธ์กรดนิวคลีอิก วิตามิน เกลือแร่ กรดไขมัน หรือ เอสเตอร์ของกรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรต โดยเชื้อแต่ละ สายพันธุ์จะมีความจำเพาะต่อความต้องการอาหารที่แตกต่างกัน สามารถเจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ 2- 53 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีและเหมาะสมที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ 5.5-6.2 แต่เชื้อสามารถเจริญได้ดีที่พีเอชประมาณ 5.0 หรือต่ำกว่านี้ อัตรา การเจริญจะลดลงเมื่อพีเอชเป็นกลาง หรือ เป็นด่าง โมลร้อยละของ G+C ของ DNA อยู่ในช่วง 32-53 (Bd , Tm) (กิตติชัย และคณะ, 2541)

ในปัจจุบันพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถจำแนกได้ 12 สกุล คือ *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissella* (Wood and Holzapfel , 1997) โดยเชื้อในกลุ่มนี้แบ่งออกตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 Homofermentative lactic acid bacteria

เชื้อในกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล ไปเป็นกรดแลคติกในปริมาณมากกว่าร้อยละ 95 เชื้อในกลุ่มนี้ ได้แก่ สายพันธุ์ *Lactobacilli* เช่น *L. acidophilus* , *L. bulgaricus* , *L. plantarum* และ *Pediococcus* เช่น *P. cerevisiae* , *P. pentosaceus* เป็นต้น

2.1.2 Heterofermentative lactic acid bacteria

เป็นกลุ่มที่หมักย่อยน้ำตาลกลูโคสแล้วผลิตกรดแลคติกเพียงร้อยละ 50 ส่วนอีกครึ่งหนึ่งจะเป็นสารในกลุ่มแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ กรดอินทรีย์อื่นๆ เป็นต้น

แบคทีเรียกรดแลคติกตามธรรมชาติพบได้ทั่วไปในอาหารหมักหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปนเปื้อนมาจากผลิตผลทางการเกษตร และเครื่องมือที่เกี่ยวข้องกับการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตร จึงได้มีการพัฒนาถึงการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ เพื่อเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการผลิตอาหารหมักหลายชนิด แสดงในตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 อาหารหมักชนิดต่างๆ วัตถุดิบและกล้าเชื้อที่ใช้

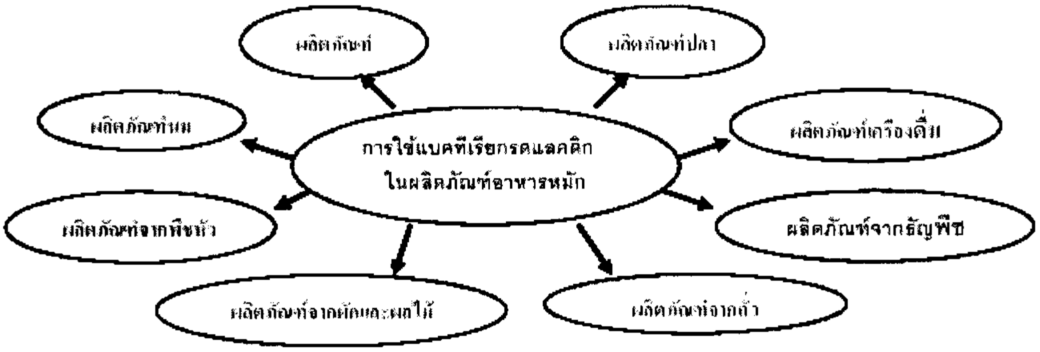
Products	Raw materials	Starter cultures
Beer	Cereals	Yeast
Wine	Grape juice	Yeast
Bread	Grains	Yeast, lactic acid bacteria
Soy sauce	Soybean	Mould (*Aspergillus*)
		Lactic acid bacteria
Sauerkraut, Kimchi	Cabbages	Lactic acid bacteria
Fermented sausage	Meat	Lactic acid bacteria
Pickled vegetable	Cucumber, olive	Lactic acid bacteria
Fermented milk	Milk	Lactic acid bacteria
Cheese	Milk	Lactic acid bacteria

ที่มา : Hansen (2002)

2.2 ผลิตภัณฑ์ที่ใช้แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารหมักจากผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด (ภาพที่ 2.1) ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต , ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง เช่น กิมจิ ผักกาดดอง , ผลิตภัณฑ์ปลา เช่น ปลาร้า ปลาส้ม ปลาแจ่ว , ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



<u>ภาพที่ 2.1</u> แนวทางการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตอาหารหมักชนิดต่างๆ

ที่มา : ปิ่นมณี (2004)

2.3 บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีต่ออาหารหมัก

2.3.1 เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ

จากการศึกษาถึงข้อมูลในกลุ่มของธัญพืช พบว่าคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นมาจากกิจกรรมการหมักที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต โดยเฉพาะการเพิ่มองค์ประกอบของกรด อะมิโนที่จำเป็น นอกจากนั้นคุณค่าทางด้านโปรตีนในอาหารที่มีส่วนของธัญพืชและถั่วยังเพิ่มขึ้นด้วย องค์ประกอบของวิตามินบางชนิดยังพบได้ในระหว่างการหมักเพราะมีจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์วิตามินที่มีความจำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในอาหารที่ผ่านการหมักสูงกว่าอาหารที่ไม่ผ่านการหมัก เช่น เทมเป้จากข้าวสาลี พบว่ามีปริมาณของไนอะซิน ไรโบฟลาวิน และ ไทอะมินเพิ่มขึ้นภายหลังการหมัก (Wang and Hesseltin ,1981)

2.3.2 แบคทีเรียกรดแลคติกมีกิจกรรมการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด

มีรายงานโดย และ ว่าการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักนั้นจะช่วยยับยั้งการเกิดคอเลสเตอรอลได้ นอกจากนั้นยังมีผลในการลดน้ำหนักได้ประมาณ 2.3-2.7 กิโลกรัม ภายใน 3 สัปดาห์ซึ่งจะต้องบริโภคผลิตภัณฑ์พร้อมกับการออกกำลังกายอยู่เสมอ นอกจากนั้นในโยเกิร์ตยังมีองค์ประกอบของสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ดังนั้นการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีเชื้อ *Lactobacillus acidophillus* จะช่วยให้คอเลสเตอรอลในเลือดลดลงกว่า การบริโภคนมที่ไม่มีเชื้อดังกล่าว (Marvin, 1981) การบริโภคคีเฟอร์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทหนึ่ง มีผลดีต่อสุขภาพหลายประการ เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการหลายประการ และยังส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารดีขึ้น โดยเฉพาะการย่อยแลคโทส (Hertzler and Clancy, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.3 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้นตลอดจนเก็บรักษาได้ นานขึ้น โดยปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งคือ การสร้างกรดและการลดลงของค่าพีเอช กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียทั้งกรดแลคติก และกรดแอซิตริก นอกจากนั้นยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นและมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ,แบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ประเภทพอลีเปปไทด์โครงสร้างทางเคมีเกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว มีคุณสมบัติ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ จะให้คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันไป ทั้งคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างโมเลกุล สมบัติทางพันธุกรรมและสมบัติทางชีวเคมี (Klaenhammer, 1988; Hiller and Davision, 1991; Stiles and Hastings, 1991) ตัวอย่างสารที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์

2.3.4 กิจกรรมในการป้องกันมะเร็ง

แบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophillus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่ การศึกษาถึงการบริโภคอาหารประเภทเนื้อแดง พบว่าทำให้ระดับของเอนไซม์ β- procacinogen ไปเป็น carcinogen ในส่วนปลายของลำไส้ ผลของ *L. acidophillus* สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ได้ทำให้โอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งของผู้บริโภคลดลง (Adam and Moss, 1995; Marvin, 1981)

2.3.5.ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

มีการศึกษาที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยมีความไวต่อ microphage และ lymphocyte ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin (IgA)และผลิต gamma interferon ซึ่งผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อก่อโรค (pathogens) และยังมีคุณสมบัติเป็น antitumor โดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophillus* (Adam and Moss, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

2.4.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญ ได้แก่ กรดแลคติกเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต เกิดจากการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแลคติก โดยใช้เอนไซม์lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลคติกจะสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อสภาพภายในเซลล์มีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลคติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็น ไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการ metabolism ต่างๆ ภายในเซลล์

2.4.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ และยังพบอีกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถรวมตัวกับสารอื่นๆและเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับ ไทโอไซยาเนต โดยมีเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เป็นตัวเร่ง ได้ผลิตผลที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ

2.4.3 คาร์บอนไดออกไซด์

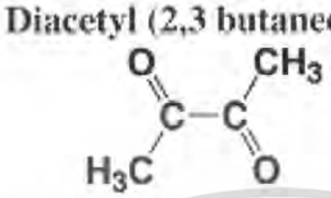
ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตส่วนใหญ่ที่เกิดจากกระบวนการการหมักน้ำตาลแบบ Heterofermentative โดยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นนี้จะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆ ทำให้เกิดสภาวะ anarobe ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน โดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์ และ รอบๆเซลล์ลดลง มีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย

2.4.4 ไดอะซิทิล

ไดอะซิทิล หรือ 2 ,3 butanedione (ภาพที่2.2) เป็นผลผลิตจากกระบวนการ metabolism ของไพรูเวต โดยแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มี หรือ ไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วย จะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น diacetyl และ acetone โดย diacetyl สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก่อให้เกิดโรค และที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจาก diacetyl จะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบ โดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine-binding protein



<u>ภาพที่ 2.2</u> โครงสร้างของไดอะซิทิล

ที่มา :http://www.thewinemerchantinc.com/educational/WineAcid.html

2.4.5 อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde)

สารดังกล่าวเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการ metabolism ของคาร์โบไฮเดรตแบบ Heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับ acetaldehyde (ภาพที่2.3) ออกมานอกเซลล์ โดยผลของ acetaldehyde ต่อจุลินทรีย์ต่างๆนั้นยังไม่มีการรายงานการศึกษาวิจัยมากนัก เพียงแต่มีการรายงานว่า acetaldehyde ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เช่น *E. coli* , *S. aureus* และ *Salmonella typhimurium* ได้

<u>ภาพที่ 2.3</u> โครงสร้างของ อะซีทัลดีไฮด์

ที่มา : http://core.ecu.edu/phys/flurchickk/AtomicMolecularSystems/molecularStructures /molecularStructures.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบอินทรีย์ประเภทพอลีเปปไทด์ โครงสร้างทางเคมี เกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกัน มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะให้คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันไป ทั้งคุณสมบัติการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างโมเลกุล สมบัติทางพันธุกรรมและคุณสมบัติทางชีวเคมี (Klaenhammer, 1988; Hiller and Davision, 1991; Stiles and Hastings, 1991) นอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน เช่น โปรติเอส , ทริปซิน เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
แบคเทอริโอซิน

3.1 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นสารอินทรีย์ประเภทพอลีเปปไทด์ โครงสร้างทางเคมีเกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก แล้วมีฤทธิ์ยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ แบคเทอริโอซินเป็นสารเมตาบอไลท์ปฐมภูมิ (primary metabolite) และมีตำแหน่งจำเพาะที่จะจับกับเชื้อโรค (binding site) เนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบพวกโปรตีนที่ไวต่อ proteolytic enzyme เช่น เปปซิน , ทริปซิน ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่พบในกระเพาะอาหารและตับอ่อน โดยที่ไม่มีผลต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microbial flora) ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร

3.2 แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก จะมีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียได้หลายชนิด เซลล์เป้าหมายมีการต้านทานน้อย และ ไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อเข้าทำลาย โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ (ตารางที่ 3.1) นอกจากนี้การความคุมการสร้างสารแบคเทอริโอซินภายในเซลล์ ถูกควบคุมได้ทั้งจากพลาสมิดและโครโมโซม โดย แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ที่มีผลต่อคุณภาพ และ ความปลอดภัยของอาหาร เช่น *B .cereus* , *Cl. botulinum* , *Cl. perfringens* , *S. aureus* , *L. monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่3.1 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมัก

แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Camocin LV17	*Carnobacterium pisicola* LV17	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Pisicolin 61	*Carnobacterium pisicocoa* LV17	เนื้อวัว
Enteriocin 6E	*Enterococcus faecium* 6E	เนย
Enteriocin 226NWC	*Enterococcus faecalis* 226	เนยที่ทำจากหางนมของกระบือ
Acidocin A	*Lactobacillus acidophilus* TK2901	น้ำนมวัวหมัก
Bavaricin MN	*Lactobacillus bavaricus* MN	เนื้อวัว
Plantaricin C19	*Lactobacoccus plantarum* C19	แตงกวาดอง
Sakacin A	*Lactobacillus sake* LB706	เนื้อวัว
Nisin	*Lactobacoccus lactis* BB24&G18	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Camocin 44A	*Leuconostoc carnosum* LA44A	ไส้กรอกหมักแบบเวียนนา
Leucosin B-Talla	*Leuconostoc carnosum* Talla	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Leucosin A-UAL 187	*Leuconostoc gelidum* UAL 187	เนื้อวัวในถุงปรับสภาวะอากาศ
Mesenterocin Y105	*Leuconostoc mesenteroides* Y105	น้ำนมแพะ

ที่มา : ปริยานุช (2549)

3.3 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน

Klaenhammer (1988) ได้แบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน โดยพิจารณาจากโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลรวมถึงคุณสมบัติด้านอื่นๆ ออกเป็น 3 กลุ่ม คือ

3.3.1 กลุ่ม lantibiotic

เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่ลักษณะเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง19-38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักน้อยกว่า 5000 ดาลตัน มีชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนทั่วไป เช่น dehydeobutyrine , dehydroalanine มีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลกุล ที่เรียกว่า lanthionine และ β-methyl lathionine และเป็นแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการทนความร้อนสูง เช่น nisin , mersacidin

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.2.กลุ่ม non- lantibiotic ที่มีขนาดเล็ก

มวลโมเลกุลมีขนาดเล็กกว่า 15,000 ดาลตัน และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสนาน 30 นาที หรือ 121องศาเซลเซียส นาน 15นาที เช่น diplococcin , lactococcin A , lactococcin A , lactocin 27 , lactacin B , lactacin F , Sakacin A , Pediocin PA-1 เป็นต้น

3.3.3.กลุ่ม non- lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่

มวลโมเลกุลมีขนาดใหญ่กว่า 15,000 ดาลตัน และไม่ทนความร้อน ถูกทำลายด้วยความร้อนที่อุณหภูมิ 60-100 องศาเซลเซียส นาน10-15นาที เช่น helveticin J , acidophilucin A , lacticin A และB , caseicin 80 เป็นต้น

3.4 การทำงานของแบคเทอริโอซิน

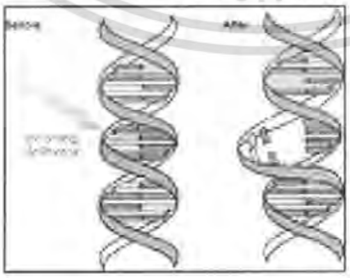
แบคเทอริโอซินจะไปมีผลในการถนอมอาหาร โดยทำหน้าที่ควบคุมการเจริญ หรือทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุ ของการเน่าเสียของอาหาร ซึ่งลักษณะในการทำงานของแบคเทอริโอซินจะเป็นไปในลักษณะ ดังต่อไปนี้

3.4.1. การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์

โดยแบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุล จะมาร่วมกัน ทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์เสียสภาวะสมดุลไป

3.4.2. การทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่าง หรือหน้าที่ต่างไปจากเดิม

เช่น การเปลี่ยนแปลงของ DNA ในเซลล์ ดังแสดงในภาพที่3.1



ภาพที่3.1 สารพันธุกรรมที่เสียรูปร่าง

ที่มา : http://earthobservatory.nasa.gov/Library/UVB/

3.4.3. ทำให้เอนไซม์บางชนิดเสียคุณสมบัติไป ไม่สามารถทำงานได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

3.5.1. อาหารปลอดภัย

เนื่องจาก แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค และ แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้สามารถทำให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหาร และ เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

3.5.1.1. แบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

อาหารปลอดภัย นับเป็นความต้องการของผู้ผลิต และ ผู้บริโภค แต่ก็ยากที่จะหลีกเลี่ยงสภาวะของอาหารเป็นพิษ เนื่องจาก จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค แบคทีเรียที่เป็นเชื้อโรคในอาหารสามารถเติบโตได้ในอุณหภูมิเย็น เช่น *Clostridium botulinum* , *Bacillus cereus* , *Listeria monocytogenes* เป็นต้น โดยเฉพาะอย่างยิ่ง โรคอาหารเป็นพิษ ลิสเทอริโอซิส (Listeriosis) ซึ่งเกิดจากเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่พบมากในอาหารประเภทเนยแข็ง นม และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ การปนเปื้อนของเชื้อโรคดังกล่าว พบได้ง่ายในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ และสามารถแยกเชื้อดังกล่าวได้ในดิน จากอาหารสัตว์ และจากสภาพแวดล้อมของโรงงานผลิตอาหาร ด้วยเหตุนี้เองจึงเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้บริษัทผู้ผลิตอาหารจำเป็นต้องกำหนดมาตรฐานคุณภาพของวัตถุดิบให้ปราศจากเชื้อโรคปนเปื้อนเหล่านี้

3.5.1.2. แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

เป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่สามารถทำให้อาหารเสื่อมเสีย และ ไม่สามารถเก็บอาหารนั้นเอาไว้บริโภคเป็นระยะเวลานานได้ ซึ่งจัดได้ว่าเป็นจุลินทรีย์ประเภทที่ชอบและทนอุณหภูมิต่ำได้ดี จึงสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิตู้เย็น และก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารตามมา จุลินทรีย์ ที่เป็นดรรชนีบ่งชี้ในกรณีนี้ คือ *Brochothrix thermophacta* ซึ่งใช้กำหนดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์อาหารแช่แข็ง ได้แก่ เนื้อวัวที่บรรจุแบบสุญญากาศ เนื้อหมู เนื้อแกะ ตลอดจนเนื้อสัตว์แปรรูป เช่น แฮมแผ่น และ คอร์นบีฟ และจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งก็คือ แบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารหลายชนิดเสื่อมเสีย เช่น นม ผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ผัก ผลไม้ ขนมหวาน เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ และอาหารหมักดอง อาการเสื่อมเสียที่มักพบในอาหาร คือ การเป็นเมือก และรสชาติที่ผิดแผกไป ทั้งนี้และทั้งนั้น ก็จะมีลักษณะที่แตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับแบคทีเรียกรดแลคติก สภาพความเป็นกรด เป็นด่างของอาหาร ตลอดจนสภาพซึมได้ของออกซิเจนจากบรรจุภัณฑ์ที่ใช้ในการห่อหุ้มอาหารนั้น ปัจจัยเหล่านี้เองทำให้ผู้ผลิตอาหารจำเป็นต้องตื่นตัวในเรื่องของการถนอมรักษาอาหารเพื่อยืดอายุในการเก็บรักษาให้ยาวนานยิ่งขึ้น และ ความปลอดภัยในการบริโภคอาหารนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2 Identity

ทำให้อาหารเกิดกลิ่นรสเฉพาะ เนื่องจาก กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดกลิ่นรสเฉพาะขึ้น และถ้ากลิ่นรสที่เกิดขึ้นเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคแล้ว ก็ทำให้สามารถควบคุมการผลิตได้

3.6 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

เนื่องจาก ความต้องการลดปริมาณการใช้สารเคมีเพื่อการถนอมอาหาร เช่น กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก , ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ , ไนเตรต และ ไนไตรท์ จึงมีการใช้สารที่ผลิตจากธรรมชาติมากขึ้น เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร

แบคเทอริโอซินที่ยอมรับให้ใช้ในการถนอมอาหาร คือ ไนซิน ซึ่งมีโครงสร้างจำลองดังแสดงในภาพที่ 3.2 ในปัจจุบัน มีการนำไนซินซึ่งผลิตจาก *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ทดแทนการใช้ไนเตรต ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และเนื่องจากสมบัติในการทนความร้อนและทนพีเอชที่เป็นกรดของไนซิน จึงนิยมนำไนซินเติมลงในอาหารกระป๋องก่อนกระบวนการให้ความร้อน เพื่อป้องกันการสร้างสปอร์ของเชื้อ Clostridium และยังเป็นการประหยัดพลังงานในกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน

ภาพที่ 3.2 โครงสร้างของไนซิน

ที่มา : http://www.profoodinternational.com/nisin-profood.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
โพรไบโอติค

โพรไบโอติก (Probiotics) หมายถึง แบคทีเรียในสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่ ในรูปที่เป็นอาหารหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร เมื่อรับประทานด้วยปริมาณที่พอเหมาะจะส่งเสริมสุขภาพของผู้บริโภค เช่น โยเกิร์ตและนมเปรี้ยวหลากหลายยี่ห้อในท้องตลอด แต่ไม่นับรวมถึงนมเปรี้ยวพร้อมดื่มประเภทยูเอชที เพราะไม่มีแบคทีเรียกรดนมเหลืออยู่ เนื่องจากผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อที่ความร้อนสูง นอกจากผลิตภัณฑ์สำหรับคนแล้ว ในปัจจุบัน ยังมีโพรไบโอติกสำหรับเสริมสุขภาพของปศุสัตว์และประมง ออกจำหน่ายด้วยเป็นที่ทราบกันดีว่า โดยปกติแล้วแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้ในอุตสาหกรรมนมเปรี้ยวส่วนใหญ่ คือแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli* และ *Streptococci* แต่จากการศึกษาคุณสมบัติในการส่งเสริมสุขภาพของแบคทีเรียในลำไส้จากอดีตจนถึงปัจจุบันพบว่าความจริงแล้ว *Bifidobacteria* สามารถเป็นอีกหนึ่งทางเลือกในอุตสาหกรรมประเภทนี้ ประเทศญี่ปุ่นซึ่งเป็นหนึ่งในผู้นำในทางการศึกษาแบคทีเรียในลำไส้ ได้เป็นผู้บุกเบิกในการผลิตโยเกิร์ตและนมเปรี้ยวที่ได้จากหมักของ *Bifidobacteria* ซึ่งแม้ว่ารสชาติจะไม่ดีเท่าผลิตภัณฑ์ที่หมักจาก *Lactobacilli* แต่ด้วยประโยชน์ที่มากกว่า จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจสำหรับผู้รักสุขภาพ และในเมืองไทยก็มีโยเกิร์ตที่หมักโดย *Bifidobacteria* วางจำหน่ายแล้วนอกจากใช้ในอุตสาหกรรมอาหารแล้ว โพรไบโอติกก็ยังถูกใช้ในการรักษาโรคทางเดินอาหาร ในการทดลองทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย อาทิ การใช้ *Lactobacillus rhamnosus* GG ในการบรรเทาและป้องกันอาการท้องร่วงในเด็กทารก การใช้ *Bifidobacteria* และ *Lactobacilli* รวมกันในการรักษาอาการท้องร่วงอย่างรุนแรง และช่วยลดอัตราการเจ็บป่วยด้วยโรคทางเดินอาหารและการเสียชีวิตในทารกที่คลอดก่อนกำหนด นอกจากนี้ยังมีหลักฐานจากงานวิจัยทางการแพทย์อีกหลายชิ้นที่ยืนยันว่า *Bifidobacteria* สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายได้อย่างมีประสิทธิภาพ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.1 คุณสมบัติของจุลินทรีย์โพรไบโอติค (วาสนา, 2549) มีดังนี้

- ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกว่าเป็นที่ยอมรับและมีความปลอดภัย(GRAS= Generally Recognized as Safe) ไม่ทำให้เกิดโทษและไม่เป็นพิษ
- มีการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของน้ำย่อยที่กระเพาะและทนน้ำดีที่ลำไส้เล็กภายในทางเดินอาหารของเซลล์เจ้าบ้าน
- เป็นเซลล์มีชีวิตและจำนวนมากพอที่จะเดินทางไปถึงทางเดินอาหารส่วนท้ายได้สามารถมีชีวิตและมีกิจกรรมของเซลล์ในระบบทางเดินอาหารได้
- สามารถแข่งกับจุลินทรีย์ก่อโรคในการยึดเกาะบริเวณเยื่อบุผนังทางเดินอาหารได้
- มีความสามารถในการผลิตสารต่างๆ ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นที่บุกรุกหรือก่อให้เกิดโทษและสารที่สร้างขึ้นสามารถเพิ่มความต้านทานต่อสภาวะการทนเชื้อภายในลำไส้
- ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถสังเคราะห์สารที่จำเป็นและนำไปใช้ประโยชน์ได้เช่น วิตามินและกรดอะมิโน
- กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันในสิ่งมีชีวิต
- มีความคงตัวและมีอัตราการรอดชีวิตสูงในสภาพการเก็บรักษาระยะเวลานาน
- ไม่ถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหาร
- ไม่เป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม ไม่ทำให้เกิดการแพ้
- เป็นสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ และราคาไม่แพง
- ไม่เกิดการตกค้าง
- มีความสามารถในการเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิที่กว้าง คือ ระหว่าง 20 -60 °C
- สร้างกรดได้ดีเพื่อช่วยช่วยปรับสภาวะในระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์พวกโคลิฟอร์ม เช่น กรดแลคติก
- เจริญได้ง่ายและเติบโตได้ในอาณาบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย
- เพิ่มจำนวนได้เร็ว คือ มีค่า Generation time สูง และมีความสามารถในการยังชีพอยู่ได้ในลำไส้
- เป็นตัวยับยั้งที่ดีซึ่งแบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างสาร anti *E. coli* factor ได้มาก เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *E. coli*
- สามารถต้านทานยาปฏิชีวนะได้หลายชนิดที่มักพบหรือใช้ในการผสมอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติค

จุลินทรีย์ที่สามารถใช้เป็นโพรไบโอติคได้ จะต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (GRAS = Generally Recommgnized as Safe) ต่อมนุษย์และสัตว์ และต้องแสดงให้เห็นผลดีกว่าการไม่เติมโพรไบโอติคได้ชัดเจน โดยแบ่งเป็นโพรไบโอติคสำหรับมนุษย์และสัตว์ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงคุณสมบัติของโพรไบโอติคในมนุษย์และสัตว์

โพรไบโอติคสำหรับมนุษย์ จุลินทรีย์ที่มีอยู่ควรมีคุณสมบัติดังนี้	**โพรไบโอติคสำหรับสัตว์ จุลินทรีย์ที่มีอยู่ควรมีคุณสมบัติดังนี้**
-จะต้องทนต่อสภาพแวดล้อมในลำไส้เล็ก ทางเดินอาหารตลอดจนทางเดินลมหายใจ	-ส่งเสริมการเจริญเติบโต
-ลดคอเรสเตอรอลได้	-เพิ่มประสิทธิภาพการใช้อาหาร
-ยับยั้งสารก่อมะเร็งทั้งทางตรง และทางอ้อม โดยการกระตุ้นให้เกิดระบบภูมิคุ้มกัน	-ควบคุมสุขภาพในวัยอ่อน-วัยรุ่นให้แข็งแรงโดยเฉพาะการป้องกันโรคในทางเดินอาหาร
-สามารถใช้น้ำตาลแลคโทสได้ ทำให้การดูดซับแคลเซียมและวิตามินได้ดี	-ช่วยย่อยสลายปัจจัยที่มีผลต่อโภชนาการ เช่น ตัวยับยั้งทริปซิน (trypsin inhibitor) กรดไฟติค (phytic acid) กลูโคซิโนเลท (glucosinolates)

ที่มา: วิเชียร (2541)

จุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์ที่สามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติคได้ประกอบด้วย แบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในกรณีที่ต้องการหาเชื้อสายพันธุ์ใหม่มาใช้เป็นโพรไบโอติคจะต้องมีการพิสูจน์ให้เห็นถึงความปลอดภัยอย่างชัดเจนเสียก่อน ซึ่งต้องใช้เวลานานมากๆ และลงทุนสูงด้วยปัจจัยต่อจากความปลอดภัยก็คือ แหล่งของจุลินทรีย์ ซึ่งเป็นไปได้ 2 กรณีคือ กรณีแรกใช้แหล่งจุลินทรีย์จากสถาบันหรือหน่วยงานหรือศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์โดยตรง หรืออีกกรณีหนึ่งก็คือใช้จุลินทรีย์ที่แยกได้เองจากมนุษย์, สัตว์ หรืออาหารหมักดองต่างๆ แหล่งของจุลินทรีย์จะสำคัญหรือไม่ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์การนำไปใช้ เช่น ต้องเป็นจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติยึดเกาะกับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผนังทางเดินอาหารของมนุษย์หรือสัตว์หรือไม่ ถ้าไม่จำเป็นก็ง่ายขึ้น แต่ถ้าต้องการมีคุณสมบัติให้ยึดเกาะกับผนังทางเดินอาหารได้ ก็จำเป็นต้องค้นหาจุลินทรีย์ที่มีความเหมาะสม

4.2.1 ขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติค ดังแสดงตามที่ภาพที่ 4.1 ดังนี้

เชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งต่าง ๆ
↓
แยกกลุ่ม
↓
ความคงตัว ต้องมากกว่า 3 เดือน
↓
แยกจนทราบสายพันธุ์
↓
ทนต่อสารเสริมต่างๆ ที่จะผสม
↓
ความคงทนต่อการแปรรูป
↓
ความคงทนต่อการเก็บ
↓
ทนต่อความเป็นกรดต่ำ, น้ำย่อยต่าง ๆ ในทางเดินอาหาร
↓
ต่อต้านต่อยาปฏิชีวนะ
↓
เกาะติดกับเนื้อเยื่อเซลล์ลำไส้เล็ก
↓
ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์
↓
ทำลายจุลินทรีย์ที่มีโทษ
↓
น่าจะเป็นสายพันธุ์โปรไบโอติค
↓
ทดสอบจนมั่นใจ

<u>**ภาพที่ 4.1**</u> ขั้นตอนการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติค

ที่มา: วิเชียร (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
85421

4.2.2 ปัจจัยที่สำคัญในการคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติค

- จุลินทรีย์โพรไบโอติคจะต้องไม่ถูกทำลายด้วยกลไกการป้องกันตัวเองของมนุษย์หรือสัตว์
- จุลินทรีย์นั้นจะต้องทนต่อน้ำย่อย เช่น อะไมเลส (ย่อยแป้งเป็นน้ำตาล) ไลโซไซม์, เปปซิน (ย่อยโปรตีนเป็นกรดอะมิโน) ไลเปส (ย่อยน้ำมันเป็นกรดไขมันอิสระ) กรดในกระเพาะ ความเข้มข้นของน้ำดีในตับ และเมือกในลำไส้เล็ก
- จุลินทรีย์นั้นจะต้องสามารถยึดเกาะผนังทางเดินอาหารภายในร่างกายมนุษย์และสัตว์ได้เป็นเวลานานพอที่จะคอยทำหน้าที่ปกป้องสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ให้แข็งแรงและปลอดโรค
- จุลินทรีย์โพรไบโอติคสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุโรคต่อมนุษย์และสัตว์ได้ซึ่งเราเรียกว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารดังกล่าวได้ ดังสรุปไว้ในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แบคเทอริโอซิจากแบคทีเรียกรดแลคติก

Lactic Acid bacteria	Bacteriocins
Lactobacillus	caseicin, curvacin, brevicin, plantaricin, fermenticin, lactacin, lactocin, helveticin
Lactococcus	Diplosoccin, nisin, lactococcins, lacticin, lactostrepcins
Leuconostoc	carnocin, mesenterocin, leucocin, louconocin
Pediococcus	pediocin

ที่มา : วิเชียร (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมปรับปรุงจุลินทรีย์โพรไบโอติคให้มีคุณสมบัติที่ดีขึ้น เทคนิคพันธุ-วิศวกรรม สามารถช่วยให้จุลินทรีย์โพรไบโอติคมีคุณสมบัติตามที่เราต้องการได้ เช่น ใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่พบในบ้านเรา เนื่องจากอยู่ในสภาพสิ่งแวดล้อมที่เหมาะสม ถ้าหากนำเข้ามาจากต่างประเทศ จะทำให้ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์โพรไบโอติคนั้นๆ ไม่ถึง 100% เพราะสภาพแวดล้อมของเรากับประเทศที่ผลิตแตกต่างกันดังนั้นจึงสมควรเลือกใช้ จุลินทรีย์โพรไบโอติคที่พบในบ้านเรา และเรามีนักวิทยาศาสตร์ตามสถาบันต่างๆ คอยให้ความร่วมมือในการปรับปรุงคุณสมบัติให้เป็นไปตามที่ประสงค์ได้ ในระยะแรกคงไม่ต้องใช้เทคนิคพันธุ-วิศวกรรม เพียงแต่ใช้ จุลินทรีย์โพรไบโอติค เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในอาหารหมักดองบ้านเรา เชื้อราที่ใช้ผลิตซีอิ๊ว (ราเขียว) ผลิตกรดมะนาว (ราดำ) และยีสต์ที่ผลิตแอลกอฮอล์ ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยอยู่แล้ว ระยะต่อมาถ้าต้องการปรับปรุงสายพันธุ์ให้มีประสิทธิภาพสูงขึ้น ก็สามารถใช้เทคนิคพันธุวิศวกรรมเข้ามาช่วยเทคนิคพันธุ-วิศวกรรมสามารถสรุปให้เห็นได้อย่างย่อๆดังนี้

<u>อุปกรณ์</u>

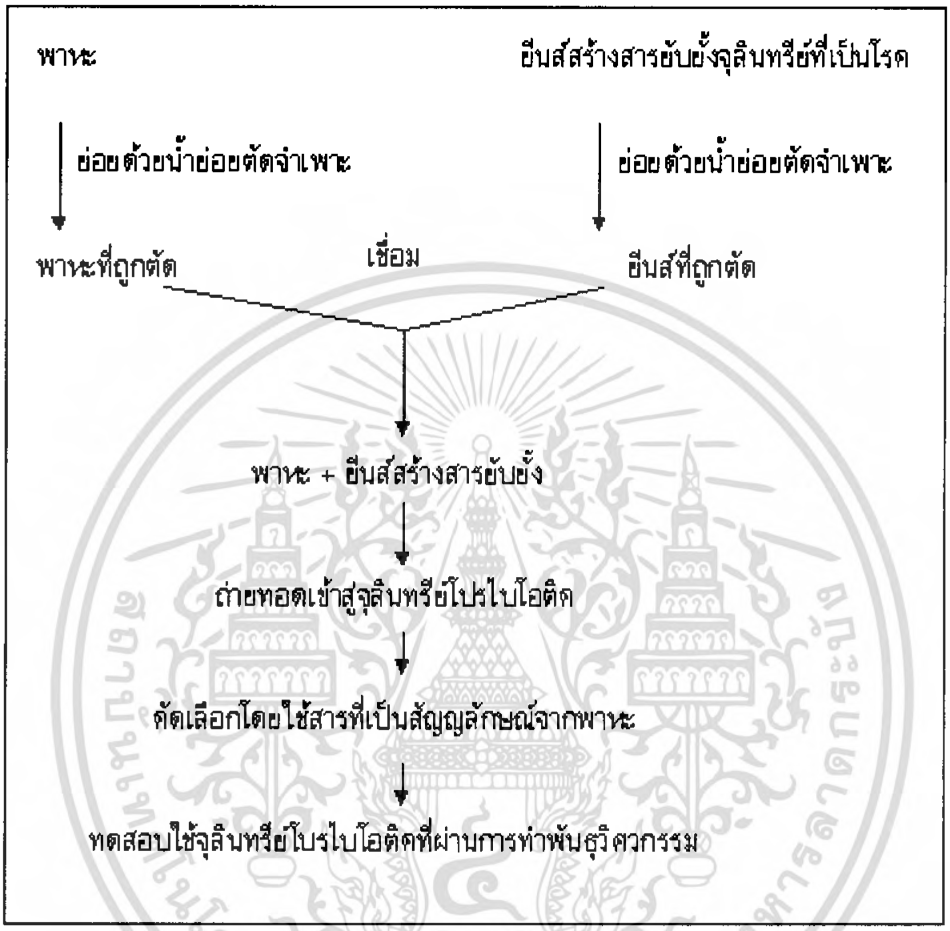
a) ตัวพาหรือพาหะ(vector)
b) ยีนส์ ซึ่งมีคุณสมบัติตรงตามวัตถุประสงค์
c) น้ำย่อยตัดจำเพาะ(endonucleases)

<u>เทคนิคการถ่ายทอดยีน แบ่งเป็น 3 วิธี</u>

a) ใช้สารละลายแคลเซียมคลอไรด์ ทำให้ผนังเซลล์บางลงหรือเกิดเป็นรูพรุน เพื่อให้ยีนที่เราต้องการ และพาหะผ่านเข้าไปได้
b) ใช้กระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์สูงๆ เช่น 1,000-2,500 โวลต์ กระตุ้นเซลล์ให้เกิดรูพรุนเพื่อให้ยีนที่เราต้องการ และพาหะผ่านเข้าไปได้
c) ใช้การสกัดผนังเซลล์ที่หุ้มจุลินทรีย์ด้วยน้ำย่อย เช่น ไลโซโซม์, อะไมเลส หรือกลูคาเนส ออกบางส่วนเปรียบเสมือนการทำให้เซลล์โป๊ เพื่อทำให้ยีนที่เราต้องการและพาหะผ่านเข้าไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ยอมรับการถ่ายทอดยีนที่ต้องการ และพาหะ การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติคที่ผ่านการทำพันธุวิศวกรรมว่ามีคุณสมบัติตามที่ต้องการหรือไม่ ในที่นี่ก็คือสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นโรคได้นั่นเอง ซึ่งปกติไม่สามารถสร้างสารยับยั้งได้ ขั้นตอนทั้งหมดสามารถสรุปได้ตามภาพที่ 4.2 ดังนี้



<u>ภาพที่ 4.2</u> ขั้นตอนการทำพันธุวิศวกรรมของจุลินทรีย์โพรไบโอติก

ที่มา : วิเชียร (2541)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 กลไกการทำงานของโพรไบโอติค

- **แย่งที่ยึดเกาะกับจุลินทรีย์ก่อโรคบนเยื่อบุทางเดินอาหาร** โดยปกติแล้วโพรไบโอติคเป็นจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารอยู่แล้ว โดยจุลินทรีย์เหล่านี้มีความสามารถในการต่อต้านการยึดเกาะของจุลินทรีย์ก่อโรคที่สัตว์ได้รับเข้ามาใหม่ โดยกระบวนการแก่งแย่งเพื่อขจัดออก (Competitive Exclusion) นอกจากนี้จุลินทรีย์ยังผลิตสารที่เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ก่อโรคที่สัตว์รับเข้าไป
- **แย่งสารอาหารกับจุลินทรีย์ที่ก่อโรค** เชื่อว่ากลไกการยับยั้งไม่ให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคไม่ให้เพิ่มจำนวนภายในระบบทางเดินอาหาร เกิดขึ้นโดยการแย่งที่ยึดเกาะบนเยื่อบุทางเดินอาหารเพียงอย่างเดียว แต่จุลินทรีย์น่าจะแย่งอาหารในบริเวณที่ยึดเกาะไม่ให้เหลือพอที่จุลินทรีย์ที่ก่อโรคใช้เป็นอาหารในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวน
- **ผลิตสารต้านการเจริญเติบโตต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ** สารต้านจุลินทรีย์ที่โพรไบโอติคสร้างขึ้นเพื่อต่อต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคมีอยู่หลายชนิด เช่น Bacteriocin และสารยับยั้งอื่นๆเช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดบางชนิด
- **กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกันโรคของสัตว์** โพรไบโอติคกระตุ้นภูมิต้านทานโรคได้โดย

  -กระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอม

  -กระตุ้นการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดพึ่งพาเซลล์

  -กระตุ้นการทำงานของ Secretory immune system โดยการหลั่ง Antibody เช่น IgA มาจับกับเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคไม่ให้เกาะกับเยื่อบุทางเดินอาหาร
- **สร้างน้ำย่อยช่วยในการย่อยอาหาร** เช่น Amylase, Protease และ Lipase
- **สร้างวิตามินหรือสารอาหารบางประการ** เช่น Vitamin B3, Vitamin B5, Vitamin B6, Vitamin B12, Folic acid, Biotin (vitamin H), Vitamin K
- **สร้างสารต่อต้านสารพิษ**
- **ช่วยเปลี่ยนสารอาหารบางประเภท (โดยการหมัก) ในอาหาร**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ประโยชน์ของโพรไบโอติคที่มีต่อสุขภาพ แสดงดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 ผลดีของโพรไบโอติคที่มีต่อสุขภาพและกลไกที่เกี่ยวข้อง

ผลลัพธ์ที่มีต่อสุขภาพ	กลไกที่เกี่ยวข้อง
1.ช่วยให้เกิดการย่อยน้ำตาลแลคโตสได้ในบุคคลที่มีภาวะแพ้น้ำตาลแลคโตส(Lactose intolerance)	1.กิจกรรมของเอนไซม์แลคเตสจากเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติคหรือจากการปล่อยเอนไซม์แลคเตสและเอนไซม์เบตากาแลคโต-ซิเดส จากเชื้อจุลินทรีย์สร้างกรดแลคติค
2.ต่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคที่เกี่ยวข้องกับลำไส้	1.ป้องกันการกลับมาเจริญหรือขยายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค 2.มีกลไกที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย 3.ช่วยทำให้ช่วงเวลาในการมีอาการท้องร่วงสั้นลงและช่วยให้หายจากอาการท้องร่วงเร็วขึ้น
3.ป้องกันการเกิดสารก่อมะเร็ง	1.มีกิจกรรมป้องกันการก่อกลายพันธุ์ของยีนโดยการจับกับสารที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ 2.ลดกิจกรรมของเอนไซม์ในลำไส้มนุษย์และสัตว์ที่จะก่อให้เกิดสารก่อมะเร็ง เช่น เบต้ากลูคูโรนิเดส, ไนโตรรีดักเทส 3.ลดความผิดปกติของต่อมเยื่อบุผิวในลำไส้ของสัตว์ 4.กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน
4.ลดผลกระทบของสารพิษจากการเจริญของแบคทีเรียที่มากเกินไปในลำไส้เล็ก	1.ลดเมตาบอลิซึมที่ให้สารพิษ เช่น ไดเมทธิลเอมีนจากจุลินทรีย์ที่มีอยู่ปกติในลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) ผลดีของโพรไบโอติคที่มีต่อสุขภาพและกลไกที่เกี่ยวข้อง

ผลลัพธ์ที่มีต่อสุขภาพ	กลไกที่เกี่ยวข้อง
5.ปรับเปลี่ยนระบบภูมิคุ้มกัน	1.ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของแอนติเจนทั้งชนิดที่เฉพาะเจาะจงและชนิดที่ไม่เฉพาะในการป้องกันการติดเชื้อจากสิ่งแปลกปลอมและเนื้องอก 2.ช่วยเพิ่มระบบภูมิคุ้มกันที่มีผลมาจากแอนติเจนชนิดที่เฉพาะเจาะจง 3.ช่วยลดสภาวะต่างๆที่เกิดขึ้นจากการอักเสบ 4.ช่วยปรับปรุงโรคผิวหนังที่เกิดจากภูมิแพ้ในเด็กทารกให้ดีขึ้น
6.ผลต่อไขมันในเลือด และโรคหัวใจ	1.ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเกลือน้ำดี (bile salt) 2.ลดระดับของคลอเรสเตอรอล
7.ลดกิจกรรมของ *Helicobactor pyroli* ซึ่งจะทำให้เกิดแผลเปื่อยในทางเดินอาหาร	1.สารยับยั้งที่ได้จากแบคทีเรียสร้างกรดแลคติกในการหมักผลิตภัณฑ์นมมีผลต่อต้าน *H. pyroli*
8.ป้องกันการติดเชื้อของระบบขับถ่าย	1.เชื้อโพรไบโอติกจะเข้ายึดเกาะที่เซลล์ของระบบขับถ่ายป้องกันการยึดเกาะของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ 2.ช่วยทำให้ช่วงเวลาในการมีอาการท้องร่วงสั้นลงและช่วยให้หายจากอาการท้องร่วงเร็วขึ้น 3.ช่วยในการเพิ่มการผลิตแอนติบอดี 4.ทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสม สำหรับเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค เช่น มีความเป็นกรดด่างต่ำ สร้างแบคเทอริโอซินและผลิตกรดไขมันสายสั้น

ที่มา : วาสนา (2549)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
อุปกรณ์ และ วิธีการ

5.1 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาเทคโนโลยีการหมัก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

5.2 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

5.2.1 อุปกรณ์

- หม้อสแตนเลส
- ถุงร้อน
- หนังยาง
- ช้อนตักสาร
- ที่ใส่หลอดทดลอง (Rack)
- ตะเกียงแอลกอฮอล์
- ขวดน้ำกลั่น
- จุกยาง
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)
- ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- Eppendrof
- Tip สีเหลือง
- Foggy
- ไฟแช็ค
- Membrane ขนาด 0.2 ไมครอน

5.2.2 เครื่องแก้ว

- ปิเปต (pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร, 5 มิลลิลิตร และ 10 มิลลิลิตร
- Autopipette 2-20 μl
- Autopipette 100-200 μl
- หลอดทดลอง (test tubes) ขนาด 16×150 พร้อมฝา
- บิกเกอร์ (beaker) ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- จานเพาะเชื้อ (plate)
- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- แท่งแก้วรูปตัวแอล
- ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

5.2.3 เครื่องมือ

- เครื่องชั่งน้ำหนัก (Balance)
- Autoclave
- Hot plate
- Water Bath
- pH – meter
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (vortex)
- เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge)
- candle jar
- เตาแก๊ส
- เตาอบไมโครเวฟ
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (larmina flow)
- ตู้แช่เย็น

5.3 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. MRS Broth (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
2. Tryptic Soy Broth (Merck KGaA Darmstadt Germany)
3. Peptone (Merck KGaA Darmstadt Germany)
4. Meat extract (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
5. Yeast extract (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
6. Agar (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
7. NaCl (LAB – SCAN analytical sciences Thailand)
8. KCl (LAB – SCAN analytical sciences Thailand)
9. $NaHCO_3$ (LAB – SCAN analytical sciences Thailand)
10. Pepsin (Merck, USA)
11. Pancreatin (Merck, USA)
12. Bile salt (Sigma Chemical, USA)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่จัดทำไว้สำหรับเผยแพร่เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

13. NaOH (LAB – SCAN analytical sciences Thailand)

14. HCl ความเข้มข้น 37% (LAB – SCAN analytical sciences Thailand)

15. Ethanol 95%

16. Ethanol 70%

5.4 เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดลอง

1. *Lactobacillus lactis* N 100 - ผลิต Nisin Z แยกได้จากแหนม
2. *Lactobacillus plantarum* A 5 - Undescribed Bacteriocin แยกได้จากหม้ำ
3. *Lactobacillus plantarum* NF 3 - ผลิต Plataricin W แยกได้จากแหนมปลา
4. *Lactobacillus plantarum* RS 54 - ผลิตสารในกลุ่ม Pediocin แยกได้จากไส้กรอกอีสาน
5. *Pediococcus pentosaceus* M 13 - ผลิต Pediocin PA-1 แยกได้จากหม้ำ
6. *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 - ผลิต Pediocin PA-1 แยกได้จากแหนม
7. *Listeria innocua* LTH 3096

5.5 วิธีการทดลอง

5.5.1 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญในช่วง pH ต่าง ๆ ได้ดีที่สุด

โดยนำเชื้อจากข้อ 5.4 มาทำการเลี้ยงในอาหารที่ปรับ pH 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 ด้วยกรด HCl 37% ตามขั้นตอนดังภาพที่ 5.1

5.5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถทน Bile salt ที่ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ได้ดีที่สุด

โดยนำเชื้อจากข้อ 5.4 มาทำการเลี้ยงในอาหารที่เติม Bile salt ที่มีระดับความเข้มข้น 0%, 0.3%, 0.6% และ 1.0% ตามขั้นตอนดังภาพที่ 5.2

5.5.3 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแบคเทอริโอซิน เพื่อยับยั้งการเจริญของ *L. innocua*

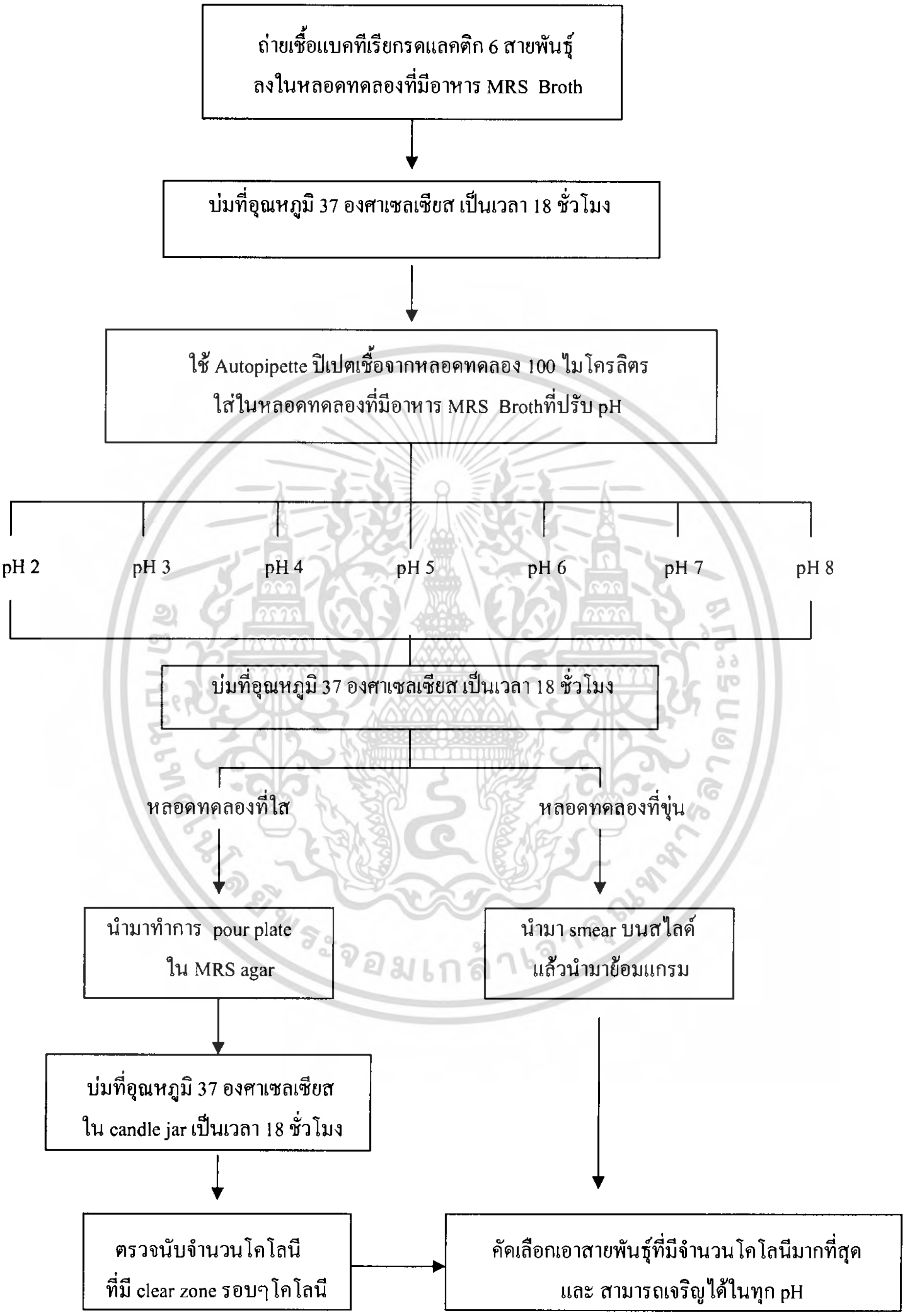
โดยคัดเลือกเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีในระดับ pH ต่ำ ๆ จากข้อ 5.5.1 และเชื้อที่สามารถทน Bile salt ได้ในระดับความเข้มข้นสูง ๆ จากข้อ 5.5.2 มาทั้งหมด 3 สายพันธุ์เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *L. innocua* ตามขั้นตอนดังภาพที่ 5.3

5.5.4 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพการอยู่รอดในกระเพาะ และ ลำไส้เทียม

โดยนำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.5.3 มาทดสอบการอยู่รอดในสารละลายกระเพาะเทียม และสารละลายลำไส้เทียมที่ระดับ pH 2, pH 7 และ pH 2 ที่มีการเติม Skimmed milk ตามขั้นตอนดังภาพที่ 5.4 และ 5.5 ตามลำดับ

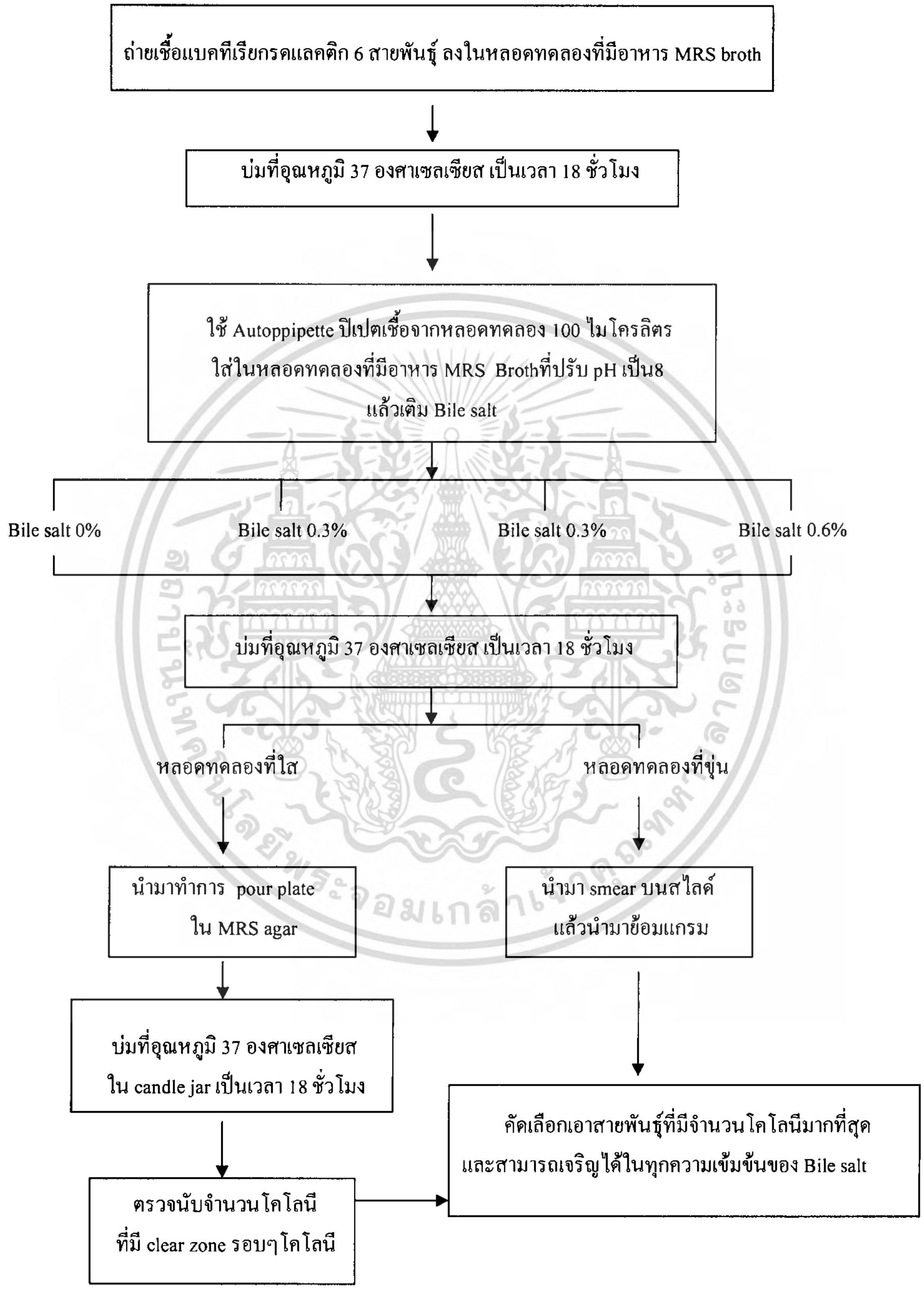
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5.1 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับ pH แตกต่างกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5.2 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีแตกต่างกัน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พที่ 5.3 การทดสอบการยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตแบคเทอริโอซิน

่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกการทนกรดและทน Bile salt ได้ดีในขั้นตอนที่ 5.1 และ 5.2 มา 3 สายพันธุ์ลงในหลอดทดลอง ที่มีอาหาร MRS Broth เพื่อศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินอีกครั้งในสภาวะกรดและความเข้มข้นของ Bile salt ที่เท่ากัน

↓

บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

↓

ตีปั่นเชื้อให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex

↓

ใช้ปิเปตแก้วดูดเชื้อในอาหาร MRS Broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงใน Eppendrof

↓

นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยง 5000 รอบ / นาที เป็นเวลา 15 นาที

↓ กรองผ่านด้วย Membrane ขนาด 0.2 ไมครอน

ดส่วนใสด้วย Autopipette ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใน Eppendrof เพื่อทำการเจือจางแบบ 2 fold dilution

→ หยดลงใน plate ช่องละ 10 μL.

ปิเปตเชื้อ *L. innocua* ที่เลี้ยงในอาหาร TSB 14 μL. ใส่ใน TSA soft agar ปริมาตร 7 ml. ที่หลอมอยู่ใน water bath

↓

ตีปั่นเชื้อเข้ากันด้วยเครื่อง vortex

↓

เตรียมอาหาร NA ใน plate → เทราดลงบนอาหาร NA

↓

ทำให้หน้า plate แห้ง

↓

แบ่ง plate ออกเป็น 8 ส่วน เท่า ๆ กัน

↓

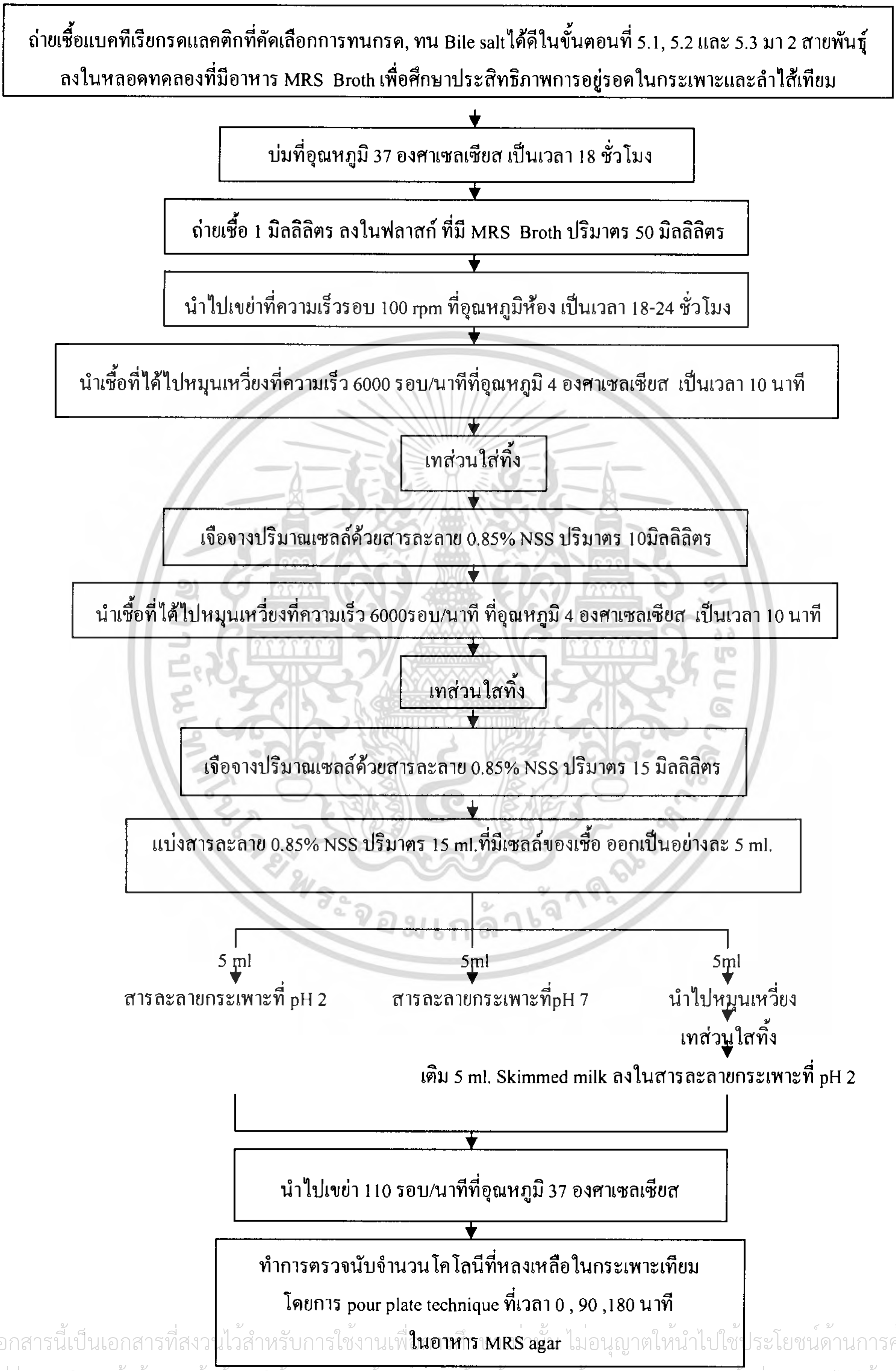
บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

↓

ตรวจการยับยั้ง *L. innocua* จาก clear zone ที่เกิดขึ้น
คำนวณค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นเป็น AU/ml.

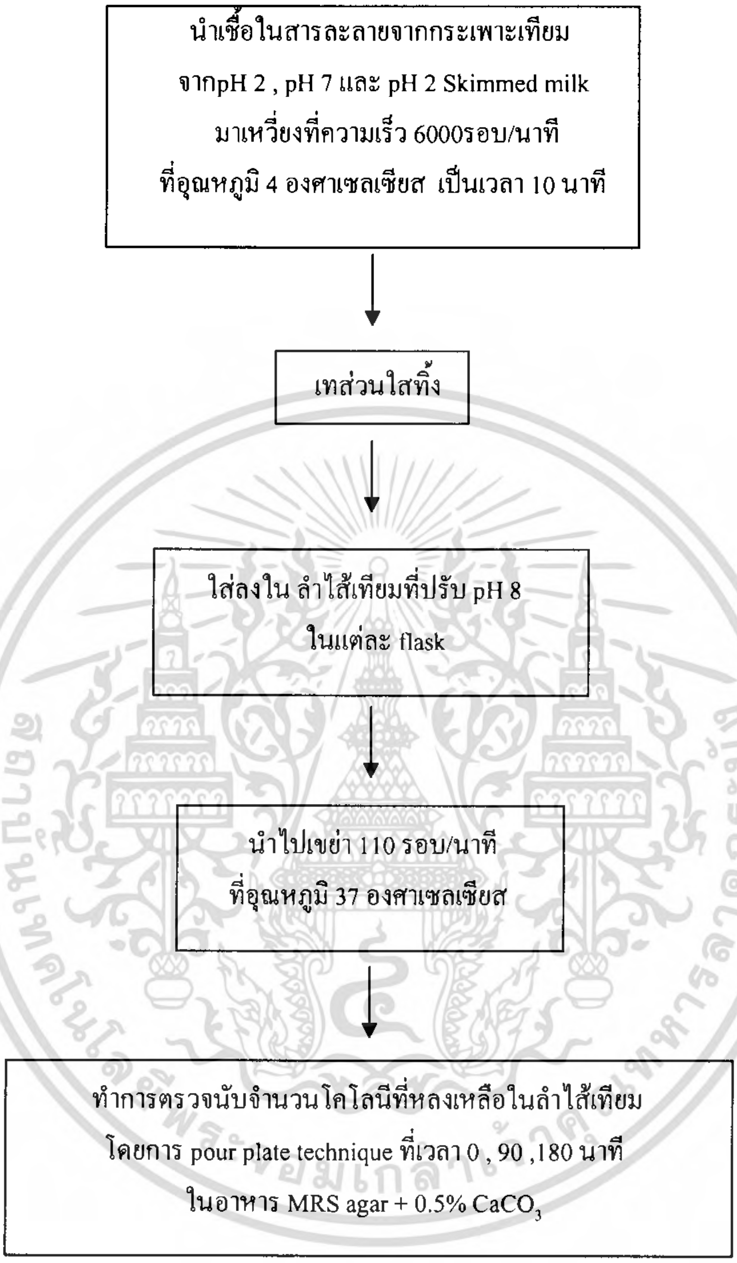
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5.4 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพการอยู่รอดในกระเพาะเทียม



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 5.5 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพการอยู่รอดในลำไส้เทียม



หมายเหตุ ที่เวลา 0 นาที ของลำไส้เทียม คือ เวลา 180 นาที ในกระเพาะเทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 6

ผลการทดลอง

6.1 การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH ในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในกระเพาะอาหาร

การศึกษาในขั้นตอนดังกล่าวดัดแปลงมาจากวิธีการศึกษาของ Erkkilä และ Petäjä (2000) โดยการปรับ pH ของ MRS broth ให้อยู่ในระดับ 2, 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 ด้วย HCl และ NaOH เพื่อทดสอบการทนกรดของเชื้อเมื่อบริโภคผลิตภัณฑ์เข้าไปสู่กระเพาะอาหาร เนื่องจากกระเพาะอาหารนั้นมีสภาวะเป็นกรด อีกทั้งเมื่อบริโภคอาหารแล้วจะส่งผลให้กระเพาะอาหารมีความเป็นกรดลดลง และมีสภาวะความเป็นกรดด่างที่แตกต่างกันไป ดังนั้นจึงปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มี pH ที่ต่างๆกัน จากนั้นนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ทำการปรับ pH ในระดับต่าง ๆ บ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบ 18 ชั่วโมง จึงตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในแต่ละระดับ pH ของMRS broth โดยการทำ pour plate technique โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + 0.5% $CaCO_3$ แล้วนำไปบ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ (candle jar) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการทนกรดของกลุ่มแบคทีเรียแลคติก และความสามารถสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน ที่ระดับ pH ต่าง ๆ (ตารางที่ 6.1) พบว่า 536 , M13, N100, NF3 และ RS54 สามารถทนความเป็นกรดที่ระดับ pH ต่าง ๆ ได้ดีที่สุด

__ตารางที่ 6.1__ แสดงผลการตรวจสอบการทนกรดที่ระดับ pH ต่าง ๆ ของกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ที่ชั่วโมงที่ 18 โดยมี เชื้อเริ่มต้น 10^6

Culture	ระดับความเป็นกรด						
	pH 2	pH 3	pH 4	pH 5	pH 6	pH 7	pH 8
✓536	15	42	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8
A 5	0	98	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8
✓M 13	34	170	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8
✓NF 3	1	31	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8
✓N 100	101	136	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8
✓RS 54	7	199	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8	> 10^8

__หมายเหตุ__ : เครื่องหมาย ✓ คือ เชื้อที่สามารถทนกรดที่ระดับ pH ต่าง ๆ ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับต่าง ๆ ที่พบได้ในระบบทางเดินอาหาร

การศึกษาในขั้นตอนดังกล่าวดัดแปลงมาจากวิธีการศึกษาของ Gilliland และคณะ (1984) และ Erkkilä และ Petäjä (2000) โดยเตรียม MRS broth ที่ปรับค่า pH เท่ากับ 8 และ ปรับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับ 0 , 0.3 , 0.6 และ 1.0% เนื่องจาก ในลำไส้ของเรามีเกลือน้ำดีหลั่งออกมา ซึ่งมีฤทธิ์เป็นเบส ที่มีความเข้มข้นแตกต่างกันตามอาหารแต่ละชนิดที่ถูกย่อยมาจากกระเพาะอาหาร เพื่อทดสอบการทนเกลือน้ำดีของเชื้อ เมื่อบริโภคผลิตภัณฑ์เข้าไป จึงนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่ทำการปรับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับปริมาณเชื้อที่มีอยู่ในแต่ละระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีใน MRS broth โดยการทำ pour plate technique โดยใช้อาหาร MRS agar + 0.5% $CaCO_3$ บ่มภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ (candle jar) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เพื่อทดสอบการทนเกลือน้ำดีของกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ (ตารางที่ 6.2) พบว่า 536 และ M13 สามารถทนเกลือน้ำดีในระดับความเข้มข้นสูงถึง 1.0% ได้ดี N100 สามารถทนความเข้มข้นของเกลือรองลงมาคือ ระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.6% ส่วน A5, NF3 และ RS54 ทนเกลือดีที่เข้มข้นเพียง 0.3% เท่านั้น

<u>ตารางที่ 6.2</u> แสดงผลการตรวจสอบการทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ของกลุ่มแบคทีเรีย-แลคติก ที่ชั่วโมงที่ 18 โดยมีเชื้อเริ่มต้น 10^6

Culture	ระดับความเข้มข้นของ Bile salt			
	0%	0.3%	0.6%	1.0%
✓536	> 10^8	7.2×10^6	2.5×10^4	170
A 5	> 10^8	2.4×10^2	0	0
N 100	> 10^8	2.5×10^4	30	0
NF 3	> 10^8	3.2×10^3	0	0
✓M 13	> 10^8	6.0×10^6	1.2×10^4	140
RS 54	> 10^8	2.7×10^3	0	0

<u>หมายเหตุ</u> : เครื่องหมาย ✓ คือ เชื้อที่สามารถทนเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่า *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Pediococcus pentosaceus* M 13 สามารถเจริญได้ดีในระดับ pH ต่ำๆ และ สามารถทนเกลือน้ำดีในระดับความเข้มข้นสูงๆได้ จึงนำมาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ต่อไป

6.3 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่แบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของ *L. innocua* ได้

จากผลการศึกษาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Pediococcus pentosaceus* M 13 ผลิตขึ้นโดยดูการยับยั้ง *L. innocua* (ตารางที่ 6.3) พบว่า เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* M 13 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินขึ้นในช่วง pH 5- pH 8 ได้ดีโดยสามารถยับยั้ง *L. innocua* ได้ถึง 64 เท่า (ภาพที่ 6.1 และ 6.2) ในขณะที่ pH 4 ยับยั้งได้ 4 เท่า และ pH 2, pH 3 ไม่มีการยับยั้ง เนื่องจากแบคเทอริโอซินนั้นเป็น primary metabolite กล่าวคือ มีการสร้างเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต ดังนั้นจะพบว่าในระดับ pH 2, pH 3 นั้นเชื้อไม่มีการเจริญเติบโตจึงไม่มีการสร้างแบคเทอริโอซิน ส่วน pH 4 นั้นมีการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อยจึงสามารถยังยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ *L. innocua* ได้เพียง 4 เท่า และสำหรับการศึกษาผลที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่มีต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อทั้งสองพบว่าเชื้อไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ในความเข้มข้นของเกลือน้ำดี 0.3, 0.6 และ 1.0% ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ของ *P. pentosaceus* ไม่สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นของเกลือน้ำดีทั้ง 3 ระดับ ดังผลการทดลองในข้อ 6.2 พบว่าเชื้อไม่สามารถเจริญเติบโตได้ ในขณะที่ Bile salt 0% (ไม่มีการเติมเกลือน้ำดี) นั้นเชื้อสามารถเจริญเติบโตและสร้างแบคเทอริโอซินได้เช่นเดียวกับ pH 8 จากนั้นนำเชื้อ 536 และ M13 มาศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้ต่อไป

ภาพที่ 6.1 เชื้ออินดิเคเตอร์ *L. innocua* ถูกยับยั้งด้วยแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก 536 ที่ pH 8

ภาพที่ 6.2 เชื้ออินดิเคเตอร์ *L. innocua* ถูกยับยั้งด้วยแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก M13 ที่ pH 5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

<u>ตารางที่ 6.3</u> แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L. innocua* ของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

ความเข้มข้น	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
pH 2	-	-	-	-	-	-	-
pH 3	-	-	-	-	-	-	-
pH 4	+	+	+	-	-	-	-
pH 5	+	+	+	+	+	+	+
pH 6	+	+	+	+	+	+	+
pH 7	+	+	+	+	+	+	+
pH 8 (control bile salt 0%)	+	+	+	+	+	+	+
Bile salt 0.3%	-	-	-	-	-	-	-
Bile salt 0.6%	-	-	-	-	-	-	-
Bile salt 1.0%	-	-	-	-	-	-	-

<u>หมายเหตุ</u> : + คือ Positive มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ, - คือ Negative ไม่มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

<u>ตารางที่ 6.4</u> แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L. innocua* ของ *Pediococcus pentosaceus* M13

ความเข้มข้น	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64
pH 2	-	-	-	-	-	-	-
pH 3	-	-	-	-	-	-	-
pH 4	+	+	+	-	-	-	-
pH 5	+	+	+	+	+	+	+
pH 6	+	+	+	+	+	+	+
pH 7	+	+	+	+	+	+	+
pH 8 (control bile salt 0%)	+	+	+	+	+	+	+
Bile salt 0.3%	-	-	-	-	-	-	-
Bile salt 0.6%	-	-	-	-	-	-	-
Bile salt 1.0%	-	-	-	-	-	-	-

<u>หมายเหตุ</u> : + คือ Positive มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ, - คือ Negative ไม่มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

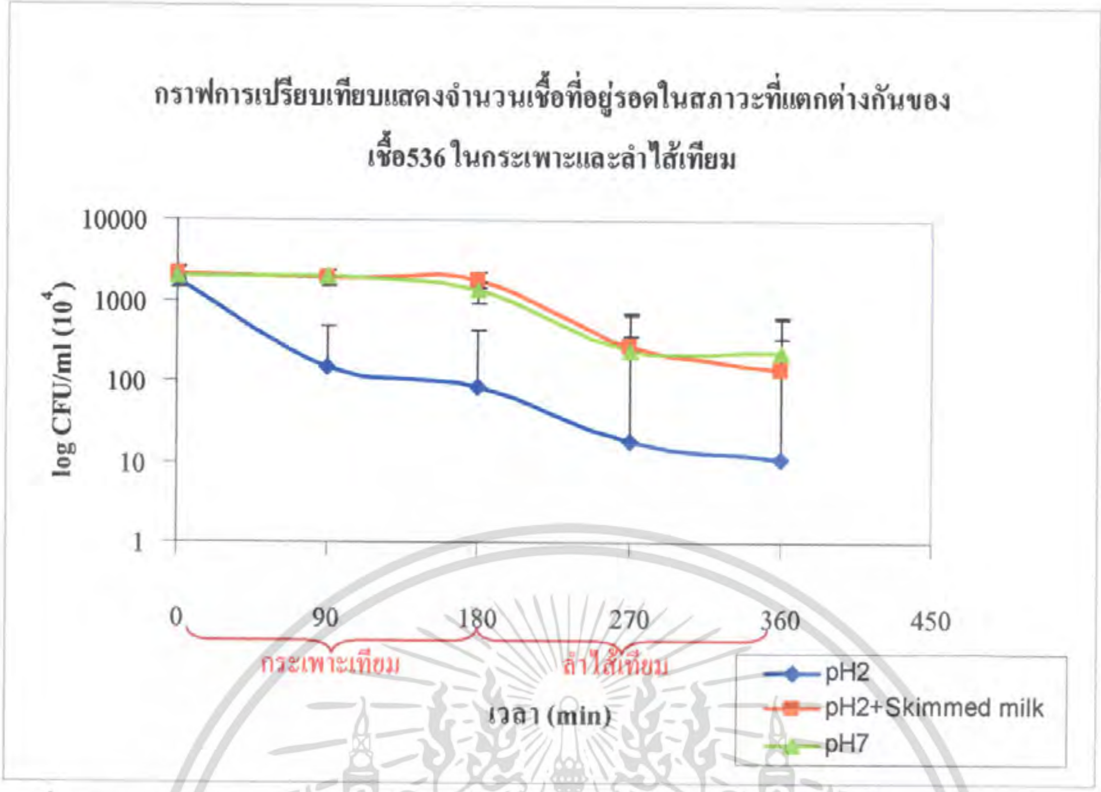
6.4 ศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* M 13

จากการศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 536 และเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก M13 ที่ทนต่อสภาวะกระเพาะเทียมโดยศึกษาในระดับ pH 2, 7 และ skimmed milk (pH 2) ที่ใช้เป็นอาหารที่เวลา 0, 90 และ 180 และผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียม (pH 8) ที่เวลา 0 (180 นาทีของกระเพาะเทียม), 90 และ 180 นาที (ตาราง 6.5) ซึ่งเมื่อนำไปเปรียบเทียบการหลงเหลือของเชื้อในรูปกราฟ (ภาพที่ 6.3 และ 6.4) พบว่าระดับ pH 7 , skimmed milk (pH 2) , pH 2 มีจำนวนเชื้อหลงเหลืออยู่มากไปน้อย ตามลำดับ เนื่องจาก เมื่อบริโภคอาหารแต่ละชนิด จะทำให้ pH ในกระเพาะอาหารมีความแตกต่างกัน ดังนั้น pH 7 มีสภาวะความเป็นกลางจึงไม่เกิดการทำลายเชื้อ ทำให้เชื้อหลงเหลืออยู่มากเพียงพอผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียม สำหรับ skimmed milk (pH 2) มีเชื้อหลงเหลืออยู่ในลำไส้เทียมแต่มากกว่า pH 2 เนื่องจาก skimmed milk ไปห่อหุ้มเชื้อ เชื้อจึงถูกทำลายจากสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะเทียมได้น้อย ดังนั้นเวลานำเชื้อไปใช้เป็นโพรไบโอติกจึงควรบริโภคในสภาวะที่กระเพาะเป็นกลาง (pH 7) หรือ ควรบริโภคอาหาร เช่น นม เพื่อให้เชื้อได้หลงเหลือถึงลำไส้ โดยเชื้อจะไปยึดเกาะติดบริเวณผนังลำไส้ยึดพื้นที่ไม่ให้จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคมายึดติด ทำให้ผู้บริโภคอาหาร โพรไบโอติกเข้าไปมีภูมิต้านทานต่อโรคมากขึ้นและมีสุขภาพดีขึ้นอีกด้วย

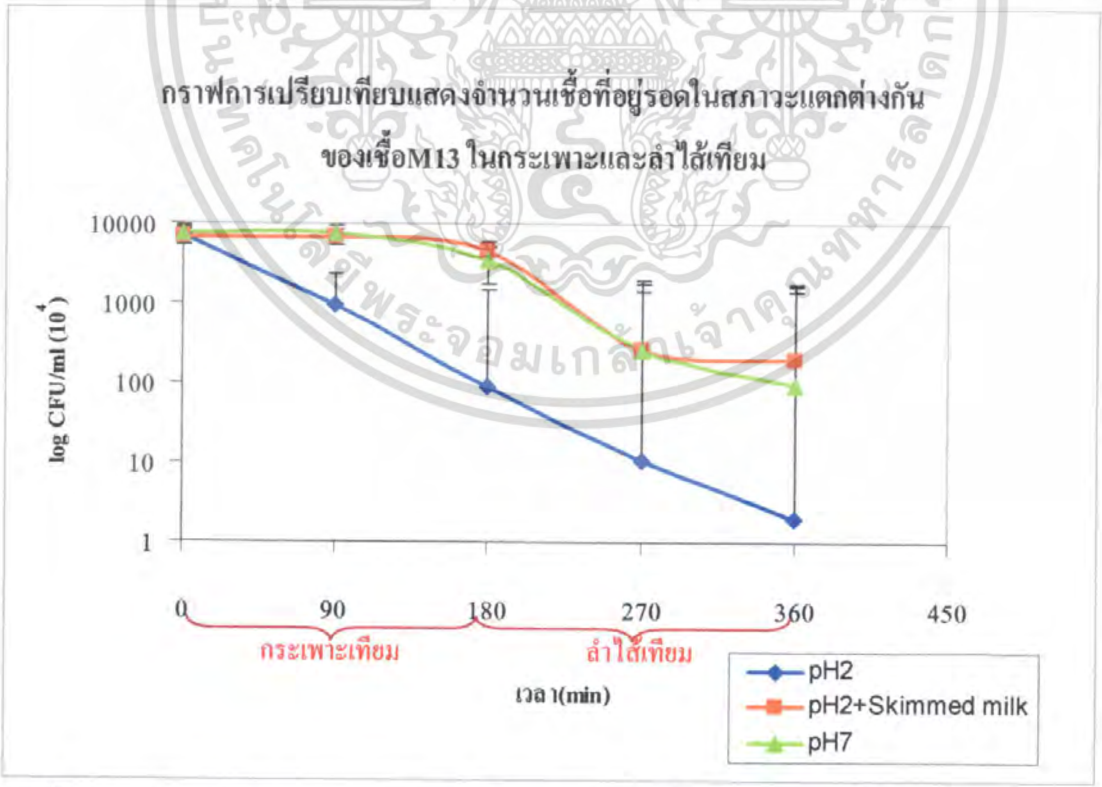
ตารางที่ 6.5 แสดงจำนวนเชื้อที่อยู่รอดในสภาวะแตกต่างกันของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 และ *P. pentosaceus* M13 ในกระเพาะและลำไส้เทียม

เชื้อ	ปัจจัย	จำนวนเชื้อที่อยู่รอด (log CFU/ml. × 10^4)				
		กระเพาะเทียม			ลำไส้เทียม	
		0 นาที	90 นาที	180 นาที	90 นาที	180 นาที
536	pH 2	1743.67	144.67	85.00	18.33	11.00
	pH 2 + skimmed milk	2153.67	1917.00	1832.67	272.67	142.00
	pH 7	2050.00	1979.33	1336.33	248.00	234.00
M13	pH 2	7323.00	955.00	88.33	10.33	2.00
	pH 2 + skimmed milk	6819.00	6743.00	4637.00	252.67	197.67
	pH 7	7665.33	7610.00	3386.00	253.67	93.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 6.3 กราฟการเปรียบเทียบแสดงจำนวนเชื้อที่อยู่รอดในสภาวะที่แตกต่างกันของเชื้อ 536 ในกระเพาะและลำไส้เทียม



ภาพที่ 6.4 กราฟการเปรียบเทียบแสดงจำนวนเชื้อที่อยู่รอดในสภาวะที่แตกต่างกันของเชื้อ M13 ในกระเพาะและลำไส้เทียม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 7
สรุปผลการทดลอง

จากการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินพบว่า *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และ *Pediococcus pentosaceus* M 13 สามารถเจริญได้ดีในระดับ pH ต่ำๆ และ สามารถทนเกลือน้ำดีในระดับความเข้มข้นสูงๆได้ จึงนำมาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ต่อไป

จากนั้นนำเชื้อ 536 และ M13 มาทำการทดสอบการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ *L. innocua* ด้วยแบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียเหล่านี้สร้างขึ้น พบว่า แบคเทอริโอซินจากเชื้อ 536 และ M13 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. innocua* ได้ ดังนั้นจึงนำเชื้อ 536 และ M13 มาศึกษาการทนต่อสภาวะจำลองของกระเพาะและลำไส้ต่อไป

จากการทดลองดูการทนต่อสภาวะกระเพาะและลำไส้เทียมของแบคทีเรียกรดแลคติก 536 และแบคทีเรียกรดแลคติก M13 ที่ได้นำมาผ่านกระเพาะและลำไส้เทียมในระดับ pH 2, 7 และ skimmed milk (pH 2) พบว่า จำนวนเชื้อระดับ pH 7, skimmed milk (pH 2) ทนต่อสภาวะกระเพาะและลำไส้เทียมได้มากที่สุด ส่วนระดับ pH 2 นั้นเชื้อไม่สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดในกระเพาะเทียมได้ สำหรับเชื้อที่หลงเหลือจากกระเพาะเทียมเมื่อผ่านเข้าสู่ลำไส้เทียมแล้วมีอัตราการลดลงน้อยมาก เนื่องจากในลำไส้เทียมมีสภาวะความเป็นด่าง (pH 8) นอกจากนั้นยังสามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 536 สามารถทนต่อสภาวะความเป็นกรดในระดับ pH ต่ำๆ ได้ดีกว่าแบคทีเรียกรดแลคติก M13 เนื่องจาก แบคทีเรียกรดแลคติก 536 สามารถแยกได้จากแหนม ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติก M13 สามารถแยกได้จากหม้ำ ซึ่งแหนมนั้นมีความเป็นกรดมากกว่าหม้ำจึงส่งผลให้แบคทีเรียที่แยกจากแหนมสามารถทนกรดได้ดีกว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

กิตติชัย โหบาง และคณะ . 2541 . การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพ . ปริญญานิพนธ์ ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอม-เกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง หน้า10

ปริยานุช เลิศธัญญาลักษณ์. 2549. กลไกของสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารหมักจากแบคทีเรียแลคติก. สัมมนาปริญญาตรี ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 24

ปิ่นมณี ขวัญเมือง .2547. " แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักดอง" . วารสารครุศาสตร์อุตสาห-กรรม . ปีที่3 ฉบับที่ 1 เดือนตุลาคม 2546 – มีนาคม 2547 . 62-65

วาสนา หมื่นอักษร. 2549. การมีชีวิตรอดของจุลินทรีย์โพรไบโอติก (Bifidobacterium) ในเครื่องดื่มนมพร่องมันเนยและน้ำผลไม้. สัมมนาปริญญาตรี. สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2541. "การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโปรไบโอติค." **วารสารจาร์พา.** 45:51-55.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2547. การศึกษาความเป็นไปได้ในการใช้แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักไทยเพื่อผลิตเป็นกล้าเชื้อในการควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยาของการผลิตอาหารหมักไทยและการผลิตอาหารสัตว์โปรไบโอติก. รายงานวิจัยโครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณ-ทหารลาดกระบัง. 8-12

Adam, M. R. and M. O. Moss. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry.Cambridge : pp. 232-248.

Erkkilä, S., and Petäjä, E. 2000. Screening of Commercial Meat Starter Cultures at Low pH and in the Presence of Bile Salts for Potential Probiotic Use. Meat Science. 55 : 297-300

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gilliland, S. E., and Speck, M. 1977. Deconjugation of Bile Acids by Intestinal Lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 15-18

Hansen, B. E, 2002. Commercial bacterial starter culture for ermented food of the future. Int. J. Food Microbiol.78: 119-131.

Hertzler, S.R. and S.M. Clancy . 2003. Kefir improves lactosedigestion and tolerance in adults with lactose maldigestion. Research. 103 (5) : 582-586

Hiller, A.J. and B. E. Davision. 1991. Bacteriocin as food preservatives. Food Res. Qoart. 51 : 60- 64.

Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. Biochimic. 70:337-349.

Marvin, L. S. 1981. Use of microbial culture : Dairy products. Food Technol. 35 (1) : 79-83.

Stiles, M. E. and J. W. Hastings. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria : Protential for use in meat preservation. Trends in Fod Sci. and Technol. 2 (10) : 247-251.

Wang, H. L. and C. W. Hesseltin. 1981. Use of microbial culture : Legume and cereal products. Food Technol. 35 (1) : 79-83.

Wood, B.J.B. and W. H. Holzapfel. 1997. The lactic bacteria : The Genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional, New York. pp. 7-15.

http://www.thewinemerchantinc.com/educational/WineAcid.html

http://core.ecu.edu/phys/flurchickk/AtomicMolecularSystems/molecularStructures/molecularStructures.html

http://earthobservatory.nasa.gov/Library/UVB/

http://www.profoodinternational.com/nisin-profood.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ตารางที่ ผ.1 แสดงผลการทดลองที่ได้จำนวนเชื้อที่อยู่รอดในสภาวะแตกต่างกันของเชื้อ 536 และ M13 ในกระเพาะและลำไส้เทียม

เชื้อ	ปัจจัย	ครั้งที่	จำนวนเชื้อที่อยู่รอด (log CFU/ml. × 10^4)				
			กระเพาะเทียม			ลำไส้เทียม	
			0 นาที	90 นาที	180 นาที	90 นาที	180 นาที
536	pH 2	1	1720	138	89	19	11
		2	1749	167	73	15	8
		3	1762	129	93	21	14
	pH 2 + skimmed milk	1	2145	1918	1807	278	140
		2	2186	1911	1825	258	125
		3	2130	1922	1866	282	161
	pH 7	1	2028	1989	1330	266	236
		2	2105	1951	1364	204	239
		3	2017	1998	1315	274	227
M 13	pH 2	1	7300	910	90	11	1
		2	7445	981	78	7	1
		3	7224	974	97	13	4
	pH 2 + skimmed milk	1	6800	6835	4680	256	197
		2	6915	6781	4642	247	186
		3	6742	6613	4589	255	210
	pH 7	1	7605	7670	3315	210	95
		2	7680	7542	3377	287	85
		3	7711	7618	3466	264	99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้