ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้าง
สารแบคเทอริโอซินซึ่งแยกได้จากมั่ม

(Screening of bacteriocin - producing Lactic Acid Bacteria from Mum)

จัดทำโดย

นางสาวเปรมวดี จันทน รหัสนักศึกษา 45040798
นางสาวสุรีย์พร รัตนมุง รหัสนักศึกษา 45040819

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..../.../.... **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

(ผศ.ดร. อดิศร เศวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21090

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินซึ่งแยกได้จากมั่ม

Screening of Bacteriocin - Producing Lactic Acid Bacteria from MUM

นางสาวเปรมวดี จันทน 45040798

นางสาวสุรีย์พร รัตนมุง 45040819

T097028

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548

ปพ.
ป7139
2548

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....97028
วัน,เดือน,ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เปรมวดี จันทน และ สุรีย์พร รัตนมุง 2548 : การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถ สร้างสารแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถแยกได้จากมั่ม (Screening of bacteriocin - producing Lactic Acid Bacteria from Mum). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกเชื้อได้จากมั่มจำนวน 7 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆในจังหวัดขอนแก่น พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 70 สายพันธุ์ จากนั้นนำมาตรวจสอบหาเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินโดยวิธี colony spot-on-lawn กับเชื้ออินดิเคเตอร์ 6 ชนิด พบว่ามี 14 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้จึงคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดีที่สุดมา 5 สายพันธุ์ และนำมาทดสอบดูการยับยั้งกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 19 ชนิดพบว่ามี 2 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้มากสุดคือ สายพันธุ์ A5-4 และสายพันธุ์ A6-5 ที่สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus lactis subsp. cremoris* TUA 1344 และ *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885 จากมากไปน้อยตามลำดับ จากการตรวจสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่าสายพันธุ์ A5-4 มีรูปร่างท่อนต่อกันเป็นสาย ส่วนสายพันธุ์ A6-5 มีรูปร่างกลมเกาะกัน 4 เซลล์ และเมื่อมาทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตโดยชุดตรวจสอบ API 50 CHL พบว่าแบคทีเรีย กรดแลคติกสายพันธุ์ A5-4 พบว่ามีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* 99.9% และสายพันธุ์ A6-5 มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 99.8% โดยสายพันธุ์ A6-5 มีประสิทธิภาพในการผลิตสารยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 มากที่สุดเท่ากับ 409,600 AU/ml นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวยังสามารถยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ คือ *Listeria innocua* ATTC 33090 และ *Listeria innocua* LTH 3096 ทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ได้ด้วยเนื่องจากเชื้อในกลุ่มดังกล่าวมีความสัมพันธ์กัน ซึ่งหวังว่าต่อไปในอนาคตจะได้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ดีที่สุดซึ่งจะนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อเพื่อใช้ในการพัฒนากระบวนการผลิตมั่มที่มีคุณภาพทางจุลชีววิทยาที่ดีในอนาคต

เปรมวดี จันทน
สุรีย์พร รัตนมุง
ลายเซนต์นักศึกษา

ลายเซนต์อาจารย์ที่ปรึกษา

25/3/47
วัน/ เดือน/ ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำปัญหาพิเศษ "เรื่องการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินซึ่งแยกได้จากมั่ม" คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ที่กรุณาสละเวลาอันมีค่ามาคอยแนะนำและชี้แนวทาง ให้คำปรึกษาและคอยดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างมาก รวมทั้งแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้มีความถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น และช่วยให้ปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี

ปรมวดี จันทน

สุรีย์พร รัตนมุง

22 กุมภาพันธ์ 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูป	จ
บทที่	
1. บทนำ	1
2. วารสารปริทัศน์	3
2.1 มั่ม	3
2.1.1 ชนิดของมั่ม	3
2.1.2 วิธีทำมั่ม	4
2.1.3 หน้าที่ของส่วนผสมต่างๆในมั่ม	4
2.1.4 คุณสมบัติทางเคมีของมั่ม	5
2.1.5 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์มั่ม	6
2.1.6 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร	8
2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก	8
2.3 กลไกการหมักของแบคทีเรียแลคติก	10
2.4 บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีต่ออาหารหมัก	12
2 5 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแลคติก	14
2.6 แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก	16
2.7 สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของแบคเทอริโอซิน	18
2.8 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน	18
2.9 กระบวนการสังเคราะห์แบคเทอริโอซิน	19
2.10 การทำงานของแบคเทอริโอซิน	20
2.11 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน	21
2.12 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซิน	21
2.13 การใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.14 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน 26
3. อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง 29
3.1 อุปกรณ์ 29
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 29
3.3 สารเคมี 30
3.4 ตัวอย่างอาหาร 30
3.5 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง 31
4. ผลการทดลอง 34
4.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากมั่ม 34
4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากมั่มโดยวิธี Colony Spot-on -lawn 35
4.3 การตรวจยืนยันการสร้างสารแบคทอริโอซินของเชื้อที่คัดเลือกและการทดสอบความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิต 42
4.4 การศึกษาสัณฐานวิทยาและชนิดของเชื้อโดยใช้ Carbohydrate fermentation test ของ API 50 CHL 44
5. สรุปผลการทดลอง 48
เอกสารอ้างอิง 49
ภาคผนวก
ภาคผนวก ก 53
ภาคผนวก ข 55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1.ตารางแสดงคุณค่าทางอาหารของมั่ม	6
2. ตารางแสดงเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารดิบ	8
3 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ	17
4. การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ	25
5. ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์	36
6. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสายพันธุ์ A2-10, A3-3, A5-4, A6-5 และ A7-3	40
7. ผลการสร้างแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ทั้ง 19 สายพันธุ์	41
8. แสดงผลการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินที่มีผลต่อเชื้อในกลุ่มเชื้ออินดิเคเตอร์	43
9. แสดงการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ของสายพันธุ์ A5-4	45
10. แสดงการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ของสายพันธุ์ A6-5	46
11.แสดงชนิดน้ำตาล 49 ชนิดใน API 50 CHL	47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

รูปที่	หน้า
1.การทำงานของแบคเทอริโอซินต่อเซลล์เป้าหมาย	20
2. ลักษณะแบคทีเรียแลคติกที่เจริญบน MRS medium + 0.5 % $CaCO_3$	34
3. ลักษณะการ streak plate ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบน MRS medium	55
4. ชุดทดลอง API 50 CHL	55
5. การปิเปตอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกอยู่ลงใน strip test	56
6. การปิดด้วยพาราฟินออยล์ เพื่อให้อยู่ในสภาพไร้อากาศ	56
7. ลักษณะการหมักน้ำตาลที่ 0 ชั่วโมง	57
8. ลักษณะการหมักน้ำตาลที่ 48 ชั่วโมงของเชื้อสายพันธุ์ A5-4	57
9. ลักษณะการหมักน้ำตาลที่ 48 ชั่วโมงของเชื้อสายพันธุ์ A6-5	58

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์เกี่ยวกับนม และนมหมัก ผักและผลไม้ดอง และอาหารหมักพื้นเมืองในท้องถิ่นต่าง ๆ เช่น ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ส้มฟัก ปลาร้า มั่ม เป็นต้น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะใช้มั่มเป็นตัวอย่างในการทดลอง มั่มเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ประเภทไส้กรอกหมักแห้ง เป็นอาหารพื้นบ้านของไทยทางภาคอีสาน มีรสชาติเปรี้ยวเนื่องจากเกิดกรดแลคติกขึ้นในผลิตภัณฑ์ กรรมวิธีการผลิตยังคงใช้การผลิตแบบชาวบ้านจึงมีผลทำให้คุณภาพของอาหารหมักที่ผลิตในแต่ละครั้งไม่แน่นอน ขึ้นอยู่กับสภาวะในการผลิตและชนิดของจุลินทรีย์ที่มีบทบาทในกระบวนการผลิต ซึ่งบทบาทที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติก คือการให้กลิ่นรสและการรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารนั้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังมีความสามารถในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่มีผลต่อคุณภาพ และความปลอดภัยของอาหาร เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล และแบคเทอริโอซิน

จากคุณสมบัติต่างๆ ของสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นนี้ ล้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารได้เป็นเวลานาน โดยสารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับการสนใจในการศึกษาวิจัยมากที่สุด คือ แบคเทอริโอซินเพราะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง รวมทั้งยังเป็นผลผลิตจากจุลินทรีย์ที่มีการศึกษาและวิจัยแล้วว่า ไม่มีอันตรายต่อร่างกาย และเป็นเชื้อชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS (General Recognized as Safe) สามารถเติมในอาหารได้ โดยเติมในรูปของแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ เช่นไนซิน และใช้ในรูปของการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินลงไปในอาหาร

จากประโยชน์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นที่จะทำการคัดเลือกหาแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากมั่ม และนำเชื้อที่คัดเลือกมาทดสอบดูการยับยั้งจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้แก่ จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสีย และกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากมั่ม
2. ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซิน และปริมาณแบคเทอริโอซินที่เชื้อสามารถสร้างได้
3. วินิจฉัยเป็นสายพันธุ์ที่ดีที่สุดโดยดูลักษณะสัณฐานของเซลล์และดูการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 มั่ม

มั่ม เป็นผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักชนิดหนึ่งที่มีการลดขนาดบดหยาบ คือ เนื้อถูกลดขนาดลง แต่ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในระดับเส้นใยกล้ามเนื้อเช่นเดียวกับผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม กุนเชียง ไส้กรอกอาหารเช้า (pork sausage) ไส้กรอกซาลามี (salami) เป็นต้น โดยมั่มเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อประเภทเนื้อหมักพื้นบ้านแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย และนิยมทำมากในจังหวัดขอนแก่น กาฬสินธุ์ มหาสารคาม อุดรธานี ร้อยเอ็ด เป็นต้น นิยมบริโภคทั้งดิบและสุก โดยการนำไปทำให้สุกโดยการปิ้ง ย่าง อบ นึ่ง หรือลวกน้ำร้อน การผลิตมั่มส่วนมากยังเป็นแบบดั้งเดิม ไม่มีการใช้เครื่องมือที่ทันสมัย มักจะทำบริโภคกันภายในครัวเรือนเป็นส่วนมาก หรือเป็นอุตสาหกรรมขนาดเล็กภายในครอบครัว ส่งจำหน่ายตามตลาดใกล้ๆ ในท้องถิ่น โดยวัตถุดิบที่เป็นส่วนประกอบในมั่มจะแตกต่างกันไปในแต่ละพื้นที่ ได้แก่ เนื้อวัว เครื่องในสัตว์ ข้าวคั่ว ข้าวเจ้าหุงสุกหรือข้าวเหนียวนึ่ง กระเทียม ตระไคร้ และเกลือ ส่วนประกอบทั้งหมดจะถูกนำมานวดผสมให้เข้ากันแล้วบรรจุในไส้ หรือกระเพาะปัสสาวะของหมูหรือวัว นำผึ่งแดดเพื่อให้ผิวนอกแห้งแล้วจึงนำไปแขวนหมักไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-3 วัน จะได้มั่มที่มีกลิ่นรสที่เป็นเอกลักษณ์เฉพาะ คือมีรสเปรี้ยว เนื่องจากเกิดการหมักของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในเนื้อตามธรรมชาติ จุลินทรีย์ที่ตรวจพบว่ามีบทบาทต่อการผลิตกรดแลกติกในผลิตภัณฑ์ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum, Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus brevis, Lactobacillus leichanni* และ *Pediococcus cerevisiae* เป็นต้น (สุดใจ และเยาวลักษณ์, 2530) แบคทีเรียที่เจริญในระหว่างการหมักมั่ม ในวันแรกของการหมักพบ *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum* เจริญอย่างรวดเร็วและลดจำนวนลงในวันที่ 2-4 ของการหมัก พีเอชของมั่มในช่วงแรกเป็น 4.6 - 5.3 และเมื่อตั้งหมักไว้ถึง 7 - 14 วัน พบว่ามี *Pediococcus cerevisiae* อยู่มากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ (เยาวลักษณ์, 2536)

2.1.1 ชนิดของมั่ม

2.1.1.1 มั่มแบ่งตามภาชนะบรรจุได้เป็น 3 ชนิด (เยาวลักษณ์, 2536)

1. มั่มข้อ บรรจุในไส้หมูสด หรือไส้วัวสดที่ล้างสะอาดแล้วผูกมัดเป็นปล้องขนาด 4-5 นิ้ว ผึ่งแดดให้ผิวนอกของไส้แห้ง แขวนผึ่งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1-2 วัน จึงรับประทานได้ มั่มข้อที่แห้งดีสามารถเก็บไว้รับประทานได้นาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. มั่มพก บรรจุในไส้สุด หรือไส้ติ่งของวัว มีขนาดใหญ่ น้ำหนัก 1 - 4 กิโลกรัมต่อพก แขวนผึ่งลมไว้ มั่มจะเกิดการหมักให้รสเปรี้ยวภายใน 2 - 3 วัน มั่มจะแห้ง และน้ำหนักจะลดลงเรื่อยๆ มั่มพกที่แห้งได้ที่พอเหมาะ สามารถเก็บไว้รับประทานได้นาน 1 - 3 เดือน โดยไม่เน่าเสีย และความเปรี้ยวไม่เพิ่มมากขึ้น ความชื้นประมาณร้อยละ 30-40

3. มั่มหม้อ บรรจุในหม้อ มีราคาถูกที่สุด เนื่องจากมีการเติมปอดผสมรวมกับเนื้อ ม้ามและตับ บรรจุในหม้ออัดให้แน่น ตั้งหมักไว้ 1-2 วันแล้วจึงนำมารับประทาน

2.1.2.2 มั่มแบ่งตามวัตถุดิบที่เป็นองค์ประกอบได้ 3 ชนิด คือ

1. มั่มเนื้อ ใช้เนื้อวัวเพียงอย่างเดียวผสมกับเครื่องปรุงอื่นๆ

2. มั่มเครื่องใน อาจใช้เครื่องในอย่างใดอย่างหนึ่ง หรือหลายอย่างผสมกัน เช่น ตับ ปอด และม้าม หรือในบางท้องที่จะใช้เนื้อวัวร่วมด้วย แต่สัดส่วนของเนื้อวัวจะน้อยกว่าเครื่องใน

3. มั่มเนื้อผสมเครื่องใน จะใช้เนื้อวัวร่วมกับเครื่องในต่างๆ โดยสัดส่วนของเนื้อวัวจะน้อยกว่าเครื่องใน

2.1.2 วิธีทำมั่ม

1. ทำความสะอาดไส้หรือกระเพาะวัวโดยจะขยำด้วยเกลือแล้วล้างออกแช่ไว้ในน้ำจนกว่าจะใช้บรรจุ

2. ผสมเนื้อวัวบดและตับบด เกลือ กระเทียม ข้าวคั่ว และข้าวสุก ให้เข้าด้วยกันหมัก ส่วนผสมไว้ในหม้อปิดด้วยผ้าขาวบาง แล้วทิ้งไว้ให้ข้ามคืน

3. คลุกส่วนผสมให้เข้ากันดีอีกครั้งหลังจากที่หมักไว้ 1 คืน หลังจากนั้นจึงบรรจุใส่ไส้ที่เตรียมไว้ มัดปลายด้วยเชือก ถ้าเป็นมั่มข้อก็มัดเป็นปล้องขนาด 3-4 นิ้ว

4. แขวนในที่ที่มีอากาศถ่ายเท ปล่อยให้เกิดการหมักเป็นเวลา 3-4 วัน หรือบางท้องถิ่นที่ไม่มีการหมักมั่มในหม้อข้ามคืน แต่จะนำส่วนผสมมาบรรจุในลำไส้ แล้วจึงนำมั่มมาผึ่งแดดเป็นเวลา 3-4 วัน ในระหว่างการหมักเพื่อลดความชื้นในมั่ม

2.1.3 หน้าที่ของส่วนผสมต่างๆในมั่ม

2.1.3.1 เนื้อสัตว์ เป็นส่วนผสมหลักของมั่ม ให้คุณค่าทางอาหาร ซึ่งในเนื้อสัตว์จะมีโปรตีนอยู่ประมาณ 18-20% ไขมัน 0.9% คาร์โบไฮเดรต 1.2% (Lawrie, 1979) ซึ่งทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียอื่นๆเจริญได้ นอกจากนี้เนื้อสัตว์จะทำให้อาหารมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ดีเนื่องจากโปรตีนจะทำหน้าที่ห่อหุ้มไขมันและตรึงน้ำ ทำให้ส่วนผสมไม่แยกออกจากกันทั้งก่อนและหลังให้ความร้อน และโปรตีนก็จะจับกันเป็นก้อนเมื่อถูกความร้อนทำให้มีลักษณะกึ่งแข็ง นอกจากนี้เนื้อสัตว์ยังมีสาร myoglobin ซึ่งเป็นสารที่มีสีแดงจะเป็นตัวทำให้อาหารมีสีแต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้ myoglobin มีสีคล้ำ ดังนั้นมั่มจึงมีสีคล้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.2 ข้าวคั่วและข้าวสุก ทำหน้าที่เป็น fillers ซึ่งมีหน้าที่หลักคือเพิ่มปริมาณ เป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิต และมีผลต่อเนื้อสัมผัส เนื่องจากแป้งซึ่งเป็นองค์ประกอบของข้าวคั่วหรือข้าวสุกจะทำหน้าที่ดูดน้ำ เมื่ออาหารได้รับความร้อนจะทำให้แป้งเกิด gelatinisation ทำให้มีความเหนียว จึงทำให้อาหารมีเนื้อสัมผัสหนืดขึ้น นอกจากนี้ยังเป็นแหล่งคาร์โบไฮเดรต ซึ่งจุลินทรีย์จะใช้เป็นแหล่งพลังงานโดยเปลี่ยนให้เป็นกรดอินทรีย์ แอลกอฮอล์

2.1.3.3 เกลือ นิยมใช้สัดส่วน 2-10 % ทำหน้าที่ดังนี้ (Adam และ Moss, 1995)

1. ให้รสชาติ ทำให้มีรสเค็มและช่วยปรับปรุงกลิ่น รสของเนื้อและส่วนผสมอื่นๆให้ดีขึ้น

2. ทำหน้าที่ในการละลาย myofibrin protein และ sarcoplasmic protein ซึ่งโปรตีนเหล่านี้จะทำหน้าที่ห่อหุ้มไขมันและตรึงน้ำ

3. มีส่วนช่วยเสริมปัจจัยอื่นในการช่วยถนอมอาหาร พบว่าปริมาณเกลือ 2.5-3.5 % จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นสาเหตุการเสื่อมเสียของอาหารหมักในระยะแรกๆ ของการหมัก ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกจะทนเกลือได้จึงมีการเจริญแล้วผลิตกรดแลคติกออกมาช่วยในการถนอมอาหารหมัก แต่เกลือมีข้อเสียคือจะเร่งการหืนทำให้อายุของการเก็บอาหารหมักสั้นลง

2.1.3.4 เครื่องเทศ เช่นกระเทียม ทำหน้าที่กำจัดการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการหมัก และยังทำให้เกิดกลิ่นที่น่ารับประทาน แต่มีข้อเสียคืออาจมีจุลินทรีย์ปนเปื้อนมากับเครื่องเทศส่งผลอาหารเสื่อมเสียได้และถ้าใช้เครื่องเทศในปริมาณสูงถึง 10 % ของส่วนผสมทั้งหมดจะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ มีการทดลองพบว่าเมื่อหมักเนื้อสัตว์โดยไม่ผสมกระเทียมจะเกิดกรดแลคติกในอัตราค่อนข้างต่ำ แต่ถ้าหมักโดยผสมกระเทียมจะเกิดการหมักเร็วขึ้น และพบว่าปริมาณที่เกิดขึ้นมีมากกว่าการหมักโดยไม่มีกระเทียมเป็นส่วนประกอบ (ณรงค์ และทัศนีย์, 2525-2526)

2.1.4 คุณสมบัติทางเคมีของมั่ม

ได้มีการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของมั่มโดย (Phitapol et al., 1993) พบว่าในมั่มที่มีปริมาณน้ำตาลอินเวอสร้อยละ 0-11.8 จะสามารถผลิตกรดแลคติกได้ร้อยละ 0.7-4.4 ดังตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 คุณค่าทางอาหารของมั่ม

ส่วนประกอบทางเคมี	Phitapol et al. (1993)
ความชื้น (%)	33.8 - 74.7
โปรตีน (%)	11.3 - 39.3
ไขมัน (%)	1.4 – 16.3
เส้นใย (%)	0.1 – 1.5
เถ้า (%)	3.1 – 9.7
น้ำตาลอินเวอสร์(%)	0 – 11.8
Lactic acid (%)	0.7 – 4.4
pH	4.0 – 4.5
Aw	0.90

ที่มา : Phitapol et al., (1993)

2.1.5 การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์มั่ม (เยาวลักษณ์, 2536)

การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์มั่มสามารถเกิดการปนเปื้อนได้จากวัตถุดิบที่นำมาทำการผลิต หรืออาจปนเปื้อนจกขั้นตอนการผลิต เนื่องจากการผลิตมั่มเป็นการผลิตแบบพื้นบ้านและการบริโภคนิยมบริโภคมั่มในลักษณะดิบซึ่งไม่ผ่านการให้ความร้อน ดังนั้นจะสามารถเกิดอันตรายต่อผู้ที่บริโภคจากจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *Staphyococcus aureus* และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ได้แก่ *Salmonella sp.* และ *E. coli* อาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ แบ่งได้ 2 ชนิด คือ

2.1.5.1 Food Intoxication หมายถึงอาหารเป็นพิษที่เกิดจากอาหารปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย บางชนิดที่สามารถเจริญและสร้างสารพิษลงในอาหาร ซึ่งถ้าผู้บริโภคบริโภคอาหารที่มีสารพิษปริมาณมากจะทำให้เกิดอาการโรคอาหารเป็นพิษได้ เชื้อแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่

- Staphyococcus aureus

เป็นจุลินทรีย์มีอยู่ตามธรรมชาติและสามารถพบทั่วไปในสัตว์และส่วนต่างๆของร่างกายมนุษย์ เช่น บนผิวหนัง ในปาก คอ สิว และโดยเฉพาะทางจมูก จุลินทรีย์พวกนี้เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางสาธารณสุขและยังเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถอยู่ในธรรมชาติได้ดีชนิดหนึ่ง โดยจะเจริญในอาหารแล้วสร้างสารพิษที่เรียกว่า enterotoxin ออกมาสะสมอยู่ในอาหาร ซึ่งสารพิษนี้มีอยู่ 5 ชนิดด้วยกัน คือ A, B, C, D และ E แต่ละชนิดจะมีความเป็นพิษแตกต่างกัน (สุมณฑา, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในมั่ม สามารถเกิดการปนเปื้อนได้จากวัตถุดิบที่นำมาทำการผลิตมั่ม คือเนื้อวัว ซึ่งจะพบจุลินทรีย์ชนิดนี้ในเนื้อสัตว์โดยที่ไม่เกี่ยวข้องกับการปนเปื้อนมาจากคน อาจเกิดการปนเปื้อนจากเขา ขน ผิวหนัง หรือจากบาดแผลของสัตว์ก็ได้ การปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดนี้ยังสามารถปนเปื้อนได้จากขั้นตอนการผลิต และผู้ที่ทำการผลิต เนื่องจากการผลิตมั่มยังเป็นการผลิตแบบพื้นบ้าน ดังนั้นการปนเปื้อนจะเกิดในระหว่างขั้นตอนการขัดไส้จากมือ ผิวหนัง บาดแผล หรืออาการไอ จามของผู้ที่ทำการผลิตได้ ซึ่งการป้องกันการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดนี้คือ การให้ความรู้ทางด้านสุขาภิบาลแก่ผู้ที่ทำการผลิตมั่ม ในการผลิตต้องระวังไม่ให้เกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนี้มากขึ้น สามารถทำได้โดยการสวมถุงมือในระหว่างการผลิต และต้องทำการรักษาความสะอาดบริเวณที่ทำการผลิตด้วย (สุมาลี, 2541)

2.1.5.2 Food Infection หมายถึง แบคทีเรียที่ปนเปื้อนลงในอาหารแล้วเจริญเติบโตเพิ่มปริมาณมากขึ้น เมื่อผู้บริโภคบริโภคอาหารที่มีเชื้อเหล่านี้ปนเปื้อนอยู่ เชื้อแบคทีเรียจะเข้าไปทำลายระบบทางเดินอาหาร โดยทำให้เกิดอาการปวดท้อง ท้องเดิน แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคเหล่านี้ ได้แก่ *Salmonella* sp. และ *E. coli*

- *Salmonella* sp.

เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ในเนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ สัตว์ปีก ปลา อาหารทะเล น้ำนม และผลิตภัณฑ์น้ำนม ไข่ สัตว์พวกแกะแทะ และยังสามารถพบได้จากของเสียจากการขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ เชื้อ *Salmonella* sp. ทุกชนิดทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ซึ่งมีชื่อเรียกว่า Salmonellosis typhoid fever และ paratyphoid ผู้บริโภคจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง อ่อนเพลียและท้องเดิน 2-3 วัน โดยจะเกิดขึ้นภายหลังจากได้รับเชื้อ 12-24 ชั่วโมง (สุมณฑา, 2544)

การปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella sp.* ในมั่มสามารถปนเปื้อนได้จากเนื้อวัวที่ใช้ในการผลิต ควรป้องกันโดยการรักษาสุขลักษณะที่ดีของผู้ที่ทำการผลิต สถานที่ทำการผลิตต้องมีการสุขาภิบาลที่ดี และก่อนที่จะทำการบริโภคมั่มต้องนำมาทำให้สุกโดยการ ปิ้ง ย่าง อบ หรือลวกน้ำร้อนก่อนรับประทาน (สุมณฑา, 2544)

- *Enteropathogenic Escherichia coli*

เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถพบได้ทั่วไปตามธรรมชาติโดยเฉพาะในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น พบได้ตามอุจจาระ และสิ่งสกปรกต่างๆ ดังนั้นจุลินทรีย์นี้จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของมูลสัตว์และความไม่ถูกสุขลักษณะของ น้ำ อาหาร และการสุขาภิบาลของสถานที่ต่างๆ เชื้อชนิดนี้สร้างสารพิษที่เป็น enterotoxin 2 ชนิด คือ heat stable และ heat labile

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อชนิดนี้สามารถเข้าไปในลำไส้เล็ก และสร้าง enterotoxin ภายในลำไส้เล็กทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหารได้ (สุมาลี, 2541)

การปนเปื้อนของเชื้อ *Enteropathogenic Escherichia coli* ในมั่มสามารถปนเปื้อนได้จากไส้ที่นำมาทำการบรรจุ สามารถป้องกันการเกิดโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากเชื้อชนิดนี้ คือนำมั่มไปทำให้สุกก่อนการรับประทาน

2.1.6 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร

เนื่องจากมั่มเป็นอาหารพื้นบ้านและยังไม่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย จึงยังไม่มีการระบุมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ มั่มจัดเป็นอาหารดิบ ซึ่งอาหารดิบหมายถึงอาหารที่ยังบริโภคไม่ได้ต้องผ่านการทำให้สุก ได้แก่ เนื้อสด และไส้กรอกอีสาน เป็นต้น การเปรียบเทียบคุณภาพผลิตภัณฑ์สามารถเปรียบเทียบได้จากเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารตามประกาศของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข ลงวันที่ 24 สิงหาคม 2536 (ดังตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารดิบ

จุลินทรีย์	จำนวน	จุลินทรีย์	จำนวน
MPN E. *coli* /g	≤ 50	*Salmonella* sp. / 25 g	0
V. *parahaemolyticus* / g	≤ 200	*C. perfringens* / 0.01 g	0
S. aureus / g	≤ 200	*V. cholerae* / 25 g	0
B. cereus / g	≤ 200	Yeasts / g	-

ที่มา : กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (2536)

2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria: LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ (nonmotile) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase negative) ไม่สร้างสปอร์ (non-sporc forming) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาพบว่ามีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มนี้ได้จากการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก ตัวอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus* และ *Leuconostoc* (Sharp, 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.1 แบคทีเรียแลคติกซึ่งจำแนกเป็น 12 สกุล มีลักษณะสำคัญในแต่ละสกุลดังนี้ (ดวงพร, 2530)

1. Streptococcus เซลล์มีรูปร่างกลม หรือไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอนจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักชนิดเดียวเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายชนิดเป็นปรสิตในคนหรือสัตว์และบางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคได้เจริญที่อุณหภูมิ 20-41 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์

2. Vagococcus เป็นแบคทีเรียแลคติกที่เคลื่อนที่ได้บางสายพันธุ์เท่านั้น สกุลนี้พบเพียง 2 ชนิด คือ *Vagococcus flauvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน Streptococci กลุ่ม N และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค

3. Lactococcus เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างกลม หรือไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียสแต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส พบในแหล่งต่างๆ เช่น ผักกาด กั๋ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ

4. Enterococcus เซลล์มีรูปไข่จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้นๆ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ และบางสปีชีส์ทำให้เกิดโรคได้

5. Pediococcus เซลล์รูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.38-1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางในระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกัน ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L (+) จากการหมักกลูโคส บางสปีชีส์ทำให้เบียร์และไวน์เน่าเสีย

6. Tetragenococcus มีลักษณะการแบ่งตัวเป็นเหมือน Pediococcus เนื่องจากเดิมคือสปีชีส์ *P halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมอยู่สูงถึงร้อยละ 18 และมีลำดับเบสบน16s rRNA ใกล้เคียงกับสกุล Enterococcus และ Carnobacterium มากกว่าสกุลเดิม

7. Aerococcus มีลักษณะการแบ่งตัวเป็นเหมือน Pediococcus ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococus viridans* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. hormari* และ *P. urinae - equi* โดย *A. viridans* ทำให้กุ้งลอบเสตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน

8. Leuconostoc ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์นี้ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารซึ่งมีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม Lactobacilli แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชนิด D (-) , เอทานอล, คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง

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

10. Weissella รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม มีลักษณะคล้าย Leuconostoc มีสปีชีส์เดิมอยู่ในสกุล Leuconostoc และ Lactobacillus

11. Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมี และสรีระเนื่องจากความแตกต่างของ mol % G+C ภายในสกุลสูงคือระหว่าง 32-35 พบในแหล่งต่างๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์ สัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บาง สปีชีส์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่ม

1. กลุ่ม Obligately homofermentative lactbacilli หมักน้ำตาลแลกโตสเป็นกรดแลคติกโดยวิถี Emden - Meyerhof - parnas pathway (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1, 6 biphostphae – adolase แต่ไม่ผลิต phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตไม่ได้ มี 18 สปีชีส์

2. กลุ่ม Facultatively hetrofermentative lactbacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง adolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้ มี 18 สปีชีส์

3. กลุ่ม Obligately hetrofermentative lactbacilli หมักย่อยน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสผ่านวิถี EMP ฟอสโฟกลูโคเนตเป็นแลคเทต, เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ มี 19 สปีชีส์

12. Carnobaterium 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

2.3 กลไกการหมักของแบคทีเรียแลคติก

เนื่องจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างต่างๆกันคือเป็นท่อนสั้นและยาวไม่มีสปอร์ รูปร่างกลมเดี่ยวหรือเกาะกันเป็นคู่ หรือวางเรียงกันเป็นสายในบางกรณีอาจมีเซลล์เกาะติดกัน 4 เซลล์ ดังนั้นการจำแนกชนิดจึงทำได้ค่อนข้างยาก นอกจากนี้รูปร่างของเซลล์ยังเปลี่ยนไปตามสภาวะแวดล้อม เช่น อาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น และเชื้อกลุ่มนี้ไม่สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สังเคราะห์ ไม่มีเอนไซม์ catalase ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต เช่น วิตามินบี และกรดอะมิโน ต้องการอาหารที่มีแป้งชนิดที่ใช้ในการหมักได้ มีโคโลนีขนาดเล็กมีความสามารถในการทนกรดได้ดี ชอบอาศัยในแหล่งที่มีสารอาหารที่ใช้ในการหมัก เช่น พืช สัตว์ นมและผลิตภัณฑ์ และสิ่งปฏิกูล เป็นต้น ดังนั้นการวินิจฉัยเชื้อในกลุ่มนี้จึงมักอาศัยการหมักย่อยน้ำตาลคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆในการวินิจฉัยเบื้องต้น

2.3.1 เชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งตามลักษณะการหมักน้ำตาลได้ 2 กลุ่ม คือ

1. Homofermentative lactic acid bacteria

คือ แบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้ กรดแลคติกในปริมาณร้อยละ 85-95 ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย ขั้นตอนการสร้างกรดแลคติกเริ่มจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติกโดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึมที่เรียกว่า Phosphenol - Piruvate - Dependent Phosphotranferase System (PEP-PTS) ทำให้แลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphsrylation) อยู่ในรูป lactose - 6 - phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ phospho-B-galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น galactose-6-phosphate กับ glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆของ Emden - Meyerhof - parnas pathway (EMP) จนเป็น lactate ในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเปลี่ยนมาจากไพรูเวต โดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ส่วน galactose-6-phosphate จะเข้าสู่กระบวนการต่างๆใน D - tagalose - phosphate pathway ได้เป็น tagalose - 1, 6 - diphosphate และเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone phosphate ท้ายสุดโดยเอนไซม์ tagalose - 1, 6 - diphosphate ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phosphate โดยเอนไซม์ trisephosphate isomerase ซึ่ง glyceraldehydes-3-phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway และเปลี่ยนเป็น lactate ในที่สุด

น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียแลคติก โดยเอนไซม์ PEP - PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป glucose - 6 - phosphate ซึ่งจะเข้าสู่ EMP pathway ได้เป็น lactaseในที่สุด ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารซึมผ่านเข้าสู่เซลล์เมมเบรนได้เลยหลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ galactokinase ได้เป็น galactose-1-phosphate จากนั้นเข้าสู่ Leloir pathway จนได้เป็น glucose-1- phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ hexokinase phosphoglucomutase เปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางใน EMP pathway เปลี่ยนเป็น lactate ในที่สุด เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ได้แก่ *L bulgalicus, L. casei , L. plantarum, L. acidophilus* เป็นต้น (Lawrence Terence, 1979)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. Heterofermentative lactic acid bacteria

หมายถึง Lactic acid bacteria ที่สามารถหมักให้กลายเป็นกรดแลคติกได้ในปริมาณต่ำและมีสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ เอทิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก แบคทีเรียที่อยู่ในประเภทนี้ เช่น *Lactobacillus vaccinosterus*, *L. brevis*, *Leuconostoc* sp.

เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมให้กรดแลคติกในปริมาณร้อยละ 50 ส่วนส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและเอทิลแอลกอฮอล์ 20-25 เปอร์เซนต์ และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซนต์ ตัวอย่างเช่น *Leu. mesenteroids* (Taminc, 1981) แลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มนี้จะไม่มีเอนไซม์ adolase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการไกโคลไลซิส จึงทำให้ไม่สามารถย่อย fructose – 6 – phosphate ได้เป็น triose – phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ glucose – 6 – phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา decarboxylate ได้เป็น pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่ง pentose - phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่ triose - phosphate และ acetyl - phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่ triose - phosphate จะเปลี่ยนเป็น lactate ได้ ส่วน acetylphosphate จะเปลี่ยนเป็น acetyldehyde และ ethanol นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกอาจจะใช้กระบวนการอื่นๆในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอล เป็นต้น

2.4 บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีต่ออาหารหมัก

1. เพิ่มคุณค่าทางด้าน โภชนาการ จากการศึกษาถึงข้อมูลในกลุ่มของธัญพืช พบว่าคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นมาจากกิจกรรมการหมักที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต โดยเฉพาะการเพิ่มองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น นอกจากนั้นคุณค่าทางด้านโปรตีนในอาหารที่มีส่วนของธัญพืชและถั่วยังเพิ่มขึ้นด้วย องค์ประกอบของวิตามินบางชนิดยังพบได้ในระหว่างการหมัก เช่น ในเทมเป้จากข้าวสาลี พบว่าปริมาณของไนอะซิน ไรโบฟลาวิน และไทอะมินเพิ่มขึ้นภายหลังการหมัก (Wang and Hesseltin,1981)

2. แบคทีเรียกรดแลคติกมีกิจกรรมในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด มีรายงานโดย Adam และ Moss (1995) ว่าการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักจะช่วยยับยั้งการเกิดคอเลสเตอรอลได้ นอกจากนั้นยังมีผลในการลดน้ำหนักได้ประมาณ 2.3-2.7 กิโลกรัม ภายใน 3 สัปดาห์ ซึ่งจะต้องบริโภคผลิตภัณฑ์พร้อมกับการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนั้นในโยเกิร์ตยังมีองค์ประกอบของสารที่ยับยั้งการสังเคราะห์คลอเลสเทอรอล ดังนั้นการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* จะช่วยให้คอเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดลงกว่าการบริโภคนมที่ไม่มีเชื้อดังกล่าว (Marvin, 1981) การบริโภคคีเฟอร์ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทหนึ่งมีผลดีต่อสุขภาพหลายประการ เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการหลายประการ และยัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย ช่วยให้ระบบการย่อยอาหารดีขึ้น โดยเฉพาะการย่อยแลคโทส (Hertzler and Clancy, 2003)

3. กิจกรรมในการป้องกันมะเร็ง แบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่ การศึกษาถึงถึงการบริโภคอาหารประเภทเนื้อแดงพบว่าทำให้ระดับของเอนไซม์ β-glucuronidase, azoreductase และเอนไซม์ introreductase เพิ่มสูงขึ้นกว่าการบริโภคอาหารประเภทผักและเอนไซม์เหล่านี้ยังเกี่ยวข้องกับการเพิ่มความเปลี่ยนแปลงของ procacinogen ไปเป็น carcinogen ในส่วนปลายของลำไส้ ผลของ *Lactobacillus acidophiluis* สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ได้ทำให้โอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งของผู้บริโภคลดลง (Adam and Moss, 1995; Marvin, 1981)

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

5. ทำให้จุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในลำไส้มีความคงทน ทำให้ไม่เกิดการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคพวก *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp., *Shigella* spp. *Enteropahogenic* ในกลุ่ม *E. coli* เข้ายึดเกาะบริเวณผนังลำไส้และแย่งอาหาร

6. การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้นตลอดจนเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยปัจจัยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งคือ การสร้างกรดและการลดลงของค่าพีเอช กรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียทั้งกรดแลคติก และกรดอะซิติก นอกจากนั้นยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆที่เกิดขึ้นและมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน

จะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติหลายอย่างที่น่าสนใจในด้านเศรษฐกิจได้แก่ ความสามารถในการใช้แลคโตส กิจกรรมที่เกี่ยวกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน กลไกการป้องกัน bacteriophage การผลิตแบคเทอริโอซิน และระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย เป็นต้น

นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักชนิดต่างๆคือ เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่สร้างสารพิษ มีคุณสมบัติที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อยและสามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีจึงไม่ต้องการกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน มีการเจริญที่รวดเร็วจึงใช้ระยะเวลาในกระบวนการผลิตสั้น เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมมาเป็นเวลานานจึงมีขั้นตอนและวิธีการสำหรับการเลี้ยงเชื้อในการขยายขนาดการผลิตอยู่แล้ว และสามารถใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีราคาถูก เช่น นม โปรตีนนม พืช เศษเหลือ และ hydrolysed starch (De Vuyst and Vandamme, 1994) นอกจากนี้การเจริญของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียแลคติกในกระบวนการหมักจะช่วยขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และจุลินทรีย์ปนเปื้อนชนิดอื่นๆ

ในด้านการแปรรูปและการถนอมอาหารแบคทีเรียแลคติกมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักดองชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียดังกล่าวทำให้เกิดกลิ่นรส และรสชาติเฉพาะตัวในแต่ละผลิตภัณฑ์ ทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว เนื่องจากกรดแลคติกที่เชื้อนี้สร้างขึ้น ส่งผลให้ค่า pH ในอาหารลดลง มีผลช่วยในการถนอมอาหาร เกิดสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อเชื้ออื่นๆที่ไม่ต้องการที่ปนเปื้อนในอาหาร นอกจากนี้การเจริญของแบคทีเรียแลคติกในกระบวนการหมักจะช่วยขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (*B. stearothermophilus, Cl. butyricum, Cl. Pasteurianum* เป็นต้น) และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (*B. cereus, Cl. botulinum, Cl. perfringens, S. aureus, L. monocytogenes*) เป็นต้น ที่ปนเปื้อนมากับอาหาร (O 'Sullivan et al., 2002) นอกจากนี้การที่มีแบคทีเรียแลคติกเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆจะเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อมคือ ทำให้เกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหารและการใช้พื้นที่สำหรับการเจริญ โดยสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแลคติก

2.5 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแลคติก (สุมณฑา, 2544)

2.5.1.กรดอินทรีย์ (organic acid)

กรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ กรดแลคติก เป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรต เกิดจากการเปลี่ยนไพรูเวตไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลคติกจะสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อเจอสภาพภายในเซลล์ที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลคติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการ metabolism ต่างๆภายในเซลล์

2.5.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide)

แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน ในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ และยังพบ อีกว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถรวมตัวกับสารอื่นๆและเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กับไทโอไซยาเนต โดยมีเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เป็นตัวเร่งได้ผลิตผลที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ

2.5.3. คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbondioxide)

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตส่วนใหญ่ที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ Heterofermentative โดยแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นนี้จะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนโดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรดด่างภายในเซลล์และรอบๆเซลล์ลดลงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย

2.5.4. ไดอะซีทิล (Diacetyl)

ไดอะซีทิลหรือ 2,3 butanedione เป็นผลผลิตจากกระบวนการ metabolism ของไพรูเวต โดยแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วยจะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็น diacetyl และ acetone โดย diacetyl สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจาก diacetyl จะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบโดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine-binding protein

2.5.5. อะซีทัลดีไฮด์ (Acetaldehyde)

สารดังกล่าวเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการ metabolism ของคาร์โบไฮเดรตแบบ Heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับ acetaldehyde ออกมาภานอกเซลล์ โดยผลของ acetaldehyde ต่อจุลินทรีย์ต่างๆนั้นยังไม่มีรายงานการศึกษาวิจัยมากนัก เพียงแต่มีการรายงานว่า acetaldehyde ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหารเช่น *E. coli*, *S aureus* และ *Salmonella typhimurium* ได้

2.5.6. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นสารอินทรีย์ประเภทพอลีเปปไทด์ โครงสร้างทางเคมีเกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลที่แตกต่างกันมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะให้คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันไป ทั้งคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น น้ำหนักโมเลกุล โครงสร้างโมเลกุล สมบัติทางพันธุกรรมและสมบัติทางชีวเคมี (Klaenhammer, 1988; Hiller and Davision, 1991; Stiles and Hasting, 1991) นอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (protease, protease K, trypsin เป็นต้น)

2.6 แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

การศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินมีจุดเริ่มจากการศึกษา colicin ซึ่งสร้างโดย *E. coli* โดยมีการศึกษาอย่างละเอียดทั้งด้านกลไกการทำงาน (mode of action) ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic determination) ความสามารถในการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ (antimicrobial spectrum) และการทำให้บริสุทธิ์ นับแต่นั้นมาการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกก็เป็นไปอย่างกว้างขวาง

การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (ตารางที่ 3) ได้ดำเนินการมาหลายสิบปีและได้มีการนำคุณสมบัติที่ดีของแบคเทอริโอซินมาใช้ในการถนอมและรักษาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ ทั้งในส่วนของอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์ จากการศึกษาพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่มีขนาดโมเลกุลต่างกัน ถึงกระนั้นความหมายของแบคเทอริโอซินก็ไม่ใคร่แน่นอนแล้วแต่ว่าจะถูกตีความไปในทิศทางใด แต่ก็มีผู้ที่ให้คำจำกัดความเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินไว้เช่น Tagg และคณะ(1976) อธิบายว่า "แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และสามารถออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้" ทางด้าน Klaenhammer (1993) กล่าวว่า แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีน หรือสารประกอบโปรตีนที่มีผลยับยั้งโดยตรงต่อจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินชนิดนั้นๆ นอกจากนี้แบคเทอริโอซินยังมีขนาดโมเลกุลต่างๆกันอีกทั้งสมบัติทางชีวเคมี ความสามารถในการออกฤทธิ์และกลไกในการออกฤทธิ์ก็แตกต่างกันไป ในปัจจุบันได้มีการนำเอาความรู้และเทคนิคทางพันธุศาสตร์มาใช้เพื่อการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกรวมถึงใช้ศึกษาถึงลักษณะของแบคเทอริโอซินในระดับโมเลกุลด้วย จากการศึกษาเหล่านี้ทำให้สามารถเข้าใจถึงกลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินได้มากยิ่งขึ้น (Jack และคณะ, 1999)

การหมักแหนมนั้น Swetwiwathana และLotong (1999) ได้เริ่มทำการแยกเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์กลับในการหมักแหนม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อซาลโมเนลลาที่เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตแหนม และจากงานวิจัยพบว่าได้เชื้อกลุ่มที่สามารถผลิตสารยับยั้งที่ชื่อว่าแบคเทอริโอซินหลายสายพันธุ์แต่สายพันธุ์เป็นที่น่าสนใจ คือ *Pediococcus pentosaceus* ที่สร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารยับยั้งแบคเทอริโอซินที่ชื่อว่า pediocin PA-1ซึ่งสาร pediocin PA-1ของเชื้อนี้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus carnosus* ที่เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่สำคัญในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อของยุโรปหลายชนิด เช่น ซาลามี โดยที่เชื้อ *S.carnosus* นี้ได้มีการตรวจพบว่าเป็นตัวสำคัญในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อ และเป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสที่มีผลทางอ้อมกับการคงสีชมพูแดงของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มีการเติมไนเตรท ไนไตร์ทให้คงทน ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพในการนำเชื้อ *P pentosaceus* TISTR536ในการหมักแหนมเทียบกับแหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อและแหนมที่หมักด้วยเชื้อ*P. pentosaceus*JCM 5890ที่ไม่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ *S. anatum* ควบคู่ไปด้วยในการทดลอง (Swetwiwathana และคณะ, 2001และ 2003) ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้ยิ่งเชื่อมั่นว่าเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P.pentosaceus*TISTR 536 น่าจะเป็นทางเลือกที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักแหนม เพื่อพัฒนาคุณภาพแหนมให้คงอยู่ในด้านรสชาติและลักษณะสัมผัสของผลิตภัณฑ์ รวมถึงความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *S. anatum* และการศึกษาดังกล่าวน่าจะเป็นรูปแบบของการนำไปสู่การพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก รวมถึงอาหารหมักพื้นเมืองของไทยอีกหลายชนิดในอนาคต

ตารางที่ 3 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ

แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Carnocin LV17	*Carnobacterium pisicola* LV 17	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Pisicolin 61	*Carnobacterium pisicocoa* LV 16	เนื้อวัว
Enteriocin 6F	*Enterococcus faecium* 6E	เนย
Enteriocin226NWC	*Enterococcus faecalis* 226	เนยที่ทำจากหางนมของกระบือ
Acidocin A	*Lactobacillus acidophilus*TK2901	น้ำนมวัวหมัก
Bavaricin MN	*Lactobacillus bavaricus* MN	เนื้อวัว
Plantaricin C19	*Lactococcus plantarum* C19	แตงกวาดอง
Sakacin A	*Lactobacillus sake* LB 706	เนื้อวัว
Nisin	*Lactococcus lactis* BB24&G18	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Carnosin 44A	*Leucoostoc carnosum* LA44A	ไส้กรอกหมักแบบเวียนนา
Leucosin B-Talla	*Leucoostoc carnosum Talla*	เนื้อวัวแปรรูปที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Leucosin A-UAL 187	*Leuconostoc gelidum* UAL 187	เนื้อวัวบรรจุในถุงปรับสภาวะบรรยากาศ
Mesenterocin Y 105	*Leuconostoc mesenteroides* Y105	น้ำนมแพะ

ที่มา Muriana, (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

97028

2.7 สมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของแบคเทอริโอซิน

2.7.1 ความมีประจุ (Polarity)

ความมีประจุเป็นสมบัติทางฟิสิกส์ที่สำคัญมากเพราะแบคเทอริโอซินที่ดีควรจะมีส่วนที่ละลายน้ำได้ ซึ่งมีความจำเป็นอย่างมากในการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน เพราะส่วนที่เป็นน้ำมักจะเป็นส่วนที่มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่ อย่างไรก็ตามด้านที่ละลายน้ำได้น้อยก็มีความจำเป็นเช่นกัน เพราะจะเป็นส่วนที่ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นแบคเทอริโอซินที่มีสมบัติเป็น cmulsifier จะสามารถออกฤทธิ์ได้ดี แต่ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับว่าจะใช้แบคเทอริโอซินกับอาหารประเภทใดด้วย

2.7.2 จุดเดือด

จุดเดือดของแบคเทอริโอซินมีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์โดยตรง โดยเฉพาะจะมีผลต่อความเสถียรของแบคเทอริโอซินเนื่องจากถ้าในกระบวนการผลิตอาหารจำเป็นต้องใช้ความร้อน ก็อาจทำให้แบคเทอริโอซินสูญเสียฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ และทำให้เกิดกลิ่นรสที่ไม่ดีกับอาหารอีกด้วย

2.7.3 การแตกตัวเป็นอิออน

การแตกตัวเป็นอิออนจะขึ้นกับระดับความเป็นกรด-ด่างของอาหารชนิดนั้นๆ โดยปกติค่าความเป็นกรด-ด่างที่ทำให้แบคเทอริโอซินมีประจุจะทำให้แบคเทอริโอซินออกฤทธิ์ได้น้อยลง แต่ถ้าไม่มีประจุเลยก็ไม่สามารถผ่านผนังเซลล์เข้าไปทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์และทำลายจุลินทรีย์หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เช่นกัน

2.7.4 ปฏิกิริยาทางเคมีของแบคเทอริโอซินกับสารประกอบอื่นๆในอาหาร

แบคเทอริโอซินสามารถทำปฏิกิริยากับส่วนประกอบของอาหาร เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารปรุงแต่งอาหารอื่นๆซึ่งอาจมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการออกฤทธ์ของแบคเทอริโอซินลดลงและอาจเกิดกลิ่นและรสที่ไม่ต้องการได้

2.8 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน

Klaenhammer (1993) ได้แบ่งประเภทของแบคเทอริโอซินโดยพิจารณาจากโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุลรวมถึงคุณสมบัติด้านอื่นๆออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

2.8.1 กลุ่ม lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่ลักษณะเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19-38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน มีชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนทั่วไป เช่น dehydrobutyrinc, dehydroalaninc มีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลกุลที่เรียกว่า lanthionine และ β-methyl

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

lathionine และเป็น แบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ตัวอย่าง เช่น nisin, mersacidin

2.8.2 กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็ก โดยมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 15,000 ดาลตัน และทนต่อความร้อนได้ดี โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

2.8.2.1 กลุ่มแบคเทอริโอซินที่สามารถทำลาย *Listeria* sp. ได้ดี โดยในขั้นแรกจะถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะที่เป็น Precursor peptide ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยการตัดบางส่วนของสายเปปไทด์ออกในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกันได้เป็นสายเปปไทด์ที่สมบูรณ์ ตัวอย่าง เช่น pediocin PA-1, sakacin A

2.8.2.2 กลุ่มแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน โดยในการทำลายเซลล์เป้าหมายอย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเปปไทด์ดังกล่าว ตัวอย่างเช่น brochocin C, enterocin L50, lactococcins G

2.8.3 กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 15,000 ดาลตัน และไม่ทนความร้อน ตัวอย่างเช่น helveticins J, cidophilusin A, lactacins B

2.8.4 กลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่นๆ เช่น ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต และสารปรุงแต่งอาหารอื่นๆในอาหาร

2.9 กระบวนการสังเคราะห์แบคเทอริโอซิน

การสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียจะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นยีนโครงสร้าง (structural gene) และยีนส่วนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซิน (repressor gene) และในบริเวณที่ใกล้เคียงกันจะเป็นที่ตั้งของยีนที่ควบคุมความสามารถในการต้านทานต่อแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้น โดยปกติเมื่อนำแบคทีเรียที่มียีนควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินมาเพาะเลี้ยงพบว่ามีเฉพาะบางเซลล์เท่านั้นที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ เนื่องจากแบคทีเรียส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งไม่ให้มีการผลิตแบคเทอริโอซินโดย repressor gene ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซิน แบคทีเรียเหล่านี้จะสร้างแบคเทอริโอซินได้ก็ต่อเมื่อมีการกดการทำงานของ repressor gene ที่อาจเกิดขึ้นได้หลายวิธี เช่น การกลายพันธุ์ตามธรรมชาติ (spontaneous mutation) หรือจากสารก่อมะเร็ง (carcinogen) เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต รังสีเอกซ์ mitomycin 1- ascorbic acid และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น

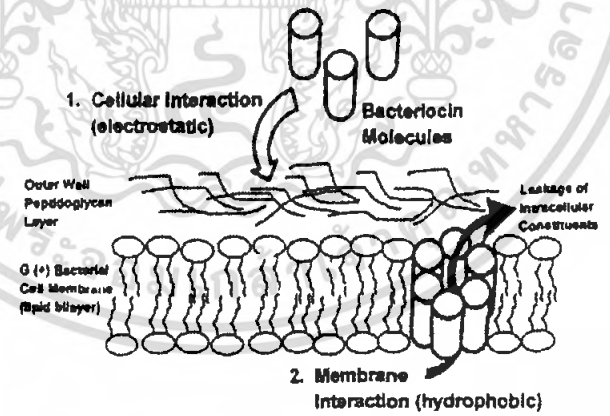
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในขั้นตอนการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินพบว่าเกิดขึ้นในไซโตรพลาสซึม ต่อจากนั้นก็รวมตัวกับ immunity protein ในอัตราส่วน 1:1 โมเลกุลของสารเชิงซ้อนที่เกิดขึ้นนี้จะผ่านเยื่อบุชั้นใน (inner membrane) และสะสมอยู่ในบริเวณ periplasmic space และจะแผ่ขยายไปถึงบริเวณผิวหน้าของแบคทีเรีย ซึ่งที่บริเวณผิวหน้าของแบคทีเรีย สารประกอบเชิงซ้อนดังกล่าวจะจับกับ polysaccharides หรือ O – antigen ของเยื่อบุชั้นนอก (outer membrane) และท้ายที่สุดนี้จะทำให้เกิด crude bacteriocin และถูกขับออกสู่ภายนอกเซลล์

2.10 การทำงานของแบคเทอริโอซิน (พงษ์เทพ, 2546)

แบคเทอริโอซินจะมีผลในการถนอมอาหารโดยทำหน้าที่ควบคุมการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียในอาหาร ซึ่งลักษณะในการทำงานของแบคเทอริโอซินจะเป็นไปในลักษณะต่อไปนี้

2.10.1 การทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ โดยแบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาร่วมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย (ภาพที่ 1) ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์เสียสภาวะสมดุลไป



ภาพที่ 1 การทำงานของแบคเทอริโอซินต่อเซลล์เป้าหมาย
ที่มา : (พงษ์เทพ, 2546)

2.10.2 ทำให้สารพันธุกรรมเสียรูปร่าง หรือหน้าที่ต่างไปจากเดิม

2.10.3 ทำให้เอนไซม์ที่สำคัญบางชนิดเสียคุณสมบัติไป ไม่สามารถทำงานได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทั้งนี้แบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีความต้านทานต่อเซลล์เป้าหมายไม่เท่ากัน อีกทั้งแบคเทอริโอซินชนิดเดียวกันจะออกฤทธิ์ต่อเซลล์เป้าหมายแต่ละสายพันธุ์ได้แตกต่างกันด้วย เช่น Pediocin AcH ออกฤทธิ์ต่อแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด ในขณะที่ Lactococcin สามารถออกฤทธิ์ต่อ *Lactococcus lactis* บางสายพันธุ์เท่านั้น

2.11 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซินเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลร่วมกันทำให้เกิดเป็นรู หรือช่องว่างบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย โดยจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) รูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* พบว่าเป็นสายเปปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกจะเข้าจับกับแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ในกรณีที่เป็นสปอร์พบว่า เยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วในระหว่างที่สปอร์เกิดการงอกออกมาและยังพบว่าไนซินที่ความเข้มข้นสูงๆ สามารถยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* และ *E. coli* ได้ (Davidson and Hoover, 1993; Muriana , 1996) ส่วนในแบคเทอริโอซินกลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน พบว่า ในขั้นตอนแรกปลายด้าน N-terminal ของโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งมีประจุลบโดยแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C-terminal ในโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จะทำปฏิกิริยากับ acyl group ของไขมันใน เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar et al., 2000) ซึ่งแบบจำลองการทำให้เกิดรูในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย

2.12 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซิน

การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซิน ส่วนใหญ่ทำการศึกษากันมากในไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินทางการค้าที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร Daeschel (1993) ได้สรุปปัจจัยดังกล่าวไว้ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
หอสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
จากบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

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

2. สภาวะที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพทางชีวภาพของแบคเทอริโอซินนั้น จะเหมือนกับโปรตีนทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนโลหะหนัก การกวนที่รุนแรงและมากเกินไป การฉีกขาดของโมเลกุลแบคเทอริโอซินเนื่องจากการแช่แข็งและการละลาย เช่นไนซินถูกทำลายด้วยเอนไซม์ α-chymotrysin และ nisinase, lactocin 27 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trysin และ protinase ,lactacin B ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ protinase K

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

4. ค่าความเป็นกรด ด่างของสารละลายหรือตัวกลาง ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการละลายและกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2.5 และ 5 ไนซินจะสามารถละลายได้ 12 และ 4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะที่เป็นกลางหรือเบส นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรดไนซินยังสามารถทนต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C ได้โดยไม่สูญเสียกิจกรรม และที่อุณหภูมิ 121°C จะมีการสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อย ส่วน lacticin 481 มีกิจกรรมละคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่าง 4.5 หรือ 7 แต่ไม่คงตัวที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 2 นอกจากนี้ diplococcin จะมีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่ากับ 5 โดยจะสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C ได้นานถึง 1 ชั่วโมง

2.13 การใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันการถนอมอาหารด้วยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ ด้วยการไปแข่งขันในการใช้สารอาหารรวมทั้งสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด (Schillinger et al., 1996) ซึ่งในกลุ่มของสารดังกล่าว พบว่าแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะไนซินได้มีการผลิตขายภายใต้ชื่อทางการค้าชื่อว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nisaplin เป็นแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวในปัจจุบันที่ได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO เนื่องจากไนซินมีค่า LD_{50} สูงถึง 7 กรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเทียบเท่ากับเกลือที่บริโภคกันในชีวิตประจำวัน และไนซินจะถูกทำให้เสียสภาพ โดยเอนไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ นอกจากนี้ไนซินเองก็ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ ปัจจุบันพบว่ามีการใช้ไนซิน ในอุตสาหกรรมการแปรรูปและการถนอมอาหารชนิดต่างๆ ในมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก (Ecner, 1992; De Vuyst and Vandamme, 1994)

1. อุตสาหกรรมการผลิตเนย การใช้ไนซินที่ความเข้มข้น 3.75-12.50 พีพีเอ็ม สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างกรดบิวไทริก เช่น *C. butyricum* และ *C. tyrobutyricum* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เนยและผลิตภัณฑ์มีกลิ่นรสผิดปกติ
2. อุตสาหกรรมการผลิตนมพร้อมดื่ม การใช้ไนซินที่ความเข้มข้น 80 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สามารถลดค่า F_0 สำหรับการฆ่าเชื้อ *C. botulinum* ในผลิตภัณฑ์นมรสช็อคโกแลตจาก 11 นาทีลงมาเหลือ 3 นาที
3. อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ การใช้ไนซินที่ความเข้มข้นระหว่าง 100-500 ยูนิตต่อกรัมของอาหาร สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*, *S. aureus* และแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดที่ปนเปื้อนมากับเนื้อวัวสดได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไนซินยับยั้งการเจริญของ *C. botulinum* และ *C. sporogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักทดแทนการใช้สารไนเตรต เพื่อป้องกันหรือลดการเกิดสารไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง
4. อุตสาหกรรมอาหารกระป๋อง ในอาหารที่มีความเป็นกรดต่ำ (low acid canned food) การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 2.5 พีพีเอ็ม ในถั่วบรรจุกระป๋อง สามารถลดความร้อนที่ใช้ในการฆ่าเชื้อลงได้ 60 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในอาหารที่เป็นกรด (acid food) การใช้ไนซินที่ความเข้มข้น 100-200 ยูนิตต่อกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของ *C. pasteurinum*, *C. butyricum*, *B. thermoacidurans*, *B. coagulans* และ *B. macerans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียได้
5. อุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ การใช้ไนซินที่ความเข้มข้น 100-1,000 ยูนิตต่อลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc oenos* และ *Pediococcus damnosus* ซึ่งสร้างสารในกลุ่ม malolactic, glycerol, butyleneglycol และ tartaric acid ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้ไวน์มีลักษณะทางประสาทสัมผัสเปลี่ยนแปลงไป โดยที่ไนซินไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหมักแต่อย่างไร

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงการใช้ไนซินร่วมกับวิธีการการถนอมอาหารแบบอื่นๆ เช่น การเก็บรักษาภายใต้การปรับสภาวะบรรยากาศด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หรือไนโตรเจน การใช้สนามไฟฟ้า รวมถึงการใช้ไนซินร่วมกับสารบางชนิด เช่น เอนไซม์แลคโตเพอร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ออกซิเดส เอสเทอร์ของกรดไขมัน ซึ่งพบว่าวิธีการดังกล่าวสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของไนซินในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes, B. cereus, S. aureus* ได้ดีขึ้น (Cleveland et al., 2001) ตามปกติไนซินและแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *L. monocytogenes, C. botulinum, C. thermosaccharolyticum, B. stearothermophilus, C. butyricum, S. aureus* และแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดส่วนการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบพบว่าได้ผลไม่ชัดเจนยกเว้นในกรณีที่ใช้ร่วมกับสารจับอนุมูลของโลหะ (chelating agent) ที่ยอมให้ใช้ในอาหาร ได้แก่ EDTA, EGTA ซึ่งสารดังกล่าวจะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายทำให้เซลล์มีความว่องไวต่อแบคเทอริโอซินมากขึ้น สำหรับการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหารสามารถดำเนินการได้ใน 3 ลักษณะคือ

1. การเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินลงไปเป็นเชื้อดั้งต้นหรือเชื้อที่มีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก
2. การเติมแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ลงไปเป็นสารถนอมอาหาร
3. การเติมผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินลงไปเป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งการทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ ในการถนอมอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่าง ๆ (Cleveland et al., 2001)

ชนิดของแบคเทอริโอซิน	ลักษณะการประยุกต์ใช้งาน	แบคทีเรียที่ต้องการควบคุม/ผลที่ได้รับ
Enteriocin 4	ใช้ *Enterococcus faecalis* INIA4 ซึ่งผลิต Enteriocin 4 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	*Listeria monocytogenes Ohio*
Nisin A	ใช้เติมลงไปในกระบวนการผลิตเนย	*Listeria monocytogenes*
Leucocin A	ใช้ *Leuconostoc gelidum* UAL 187 ซึ่งผลิต Leucocin A ผสมลงในเนื้อที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะสุญญากาศ	ยับยั้งการเจริญของ Lactobacillus sake ได้นาน 8 สัปดาห์
Lactocin 705	ใช้ผลิตภัณฑ์เนื้อบด	*Listeria monocytogenes*
Pediocin AcH	ใช้ *Pediococcus acidilactici* ซึ่งผลิต Pediocin AcH เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตไส้ กรอกไก่แบบเปรี้ยว	*Listeria monocytogenes*
Pediocin	ถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้าง Pediocin ไปสู่*Saccharomyces cerevisiae*	ช่วยในการถนอมอาหารอบและไวน์
Pediocin AcH	เติมลงในไก่สด	*Listeria monocytogenes*
Enteriocin	เติมลงในแฮม เนื้อไก่ เนื้อหมู และไส้กรอก	*Listeria monocytogenes*

ที่มา: Cleveland และคณะ (2001)

สำหรับประเทศไทยได้มีการทดลองใช้ประโยชน์จากแบคเทอริโอซินในผลิตภัณฑ์แหนม ซึ่ง Swetwiwathana และLotong (1999) ได้เริ่มทำการแยกเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน เพื่อประโยชน์ในการใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์กลับในการหมักแหนม โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อซาลโมเนลลาที่เป็นปัญหาสำคัญในการผลิตแหนม และจากงานวิจัยพบว่าได้เชื้อกลุ่มที่สามารถผลิตสารยับยั้งที่ชื่อว่า แบคเทอริโอซินหลายสายพันธุ์แต่สายพันธุ์เป็นที่น่าสนใจ คือ *Pediococcus pentosaceus* ที่สร้างสารยับยั้งแบคเทอริโอซินที่ชื่อว่า pediocin PA-1ซึ่งสาร pediocin PA-1 ของเชื้อนี้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *Staphylococcus carnosus* ที่เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ที่สำคัญในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อของยุโรปหลายชนิด เช่น ซาลามี โดยที่เชื้อ *S. carnosus* นี้ได้มีการตรวจพบว่าเป็นตัวสำคัญในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อ และเป็นเชื้อที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสที่มีผลทางอ้อมกับการคงสีชมพูแดงของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มีการเติมไนเตรท ไนไตร์ทให้คงทน ดังนั้นจึงได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพในการนำเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR536ในการหมักแหนมเทียบกับแหนมที่หมักโดยธรรมชาติที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อและแหนมที่หมักด้วยเชื้อ*P. pentosaceus* JCM 5890 ที่ไม่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน รวมถึงศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งและทำลายเชื้อโรคอาหารเป็นพิษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

S. anatum ควบคู่ไปด้วยในการทดลอง (Swetwiwathana และคณะ, 2001และ2003) ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าว ทำให้ยิ่งเชื่อมั่นว่าเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 น่าจะเป็นทางเลือกที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักแหนม เพื่อพัฒนาคุณภาพแหนมให้คงอยู่ในด้านรสชาติและลักษณะสัมผัสของผลิตภัณฑ์ รวมถึงความเชื่อมั่นด้านความปลอดภัยจากแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *S. anatum* และการศึกษาดังกล่าวน่าจะเป็นรูปแบบของการนำไปสู่การพัฒนาคุณภาพของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก รวมถึงอาหารหมักพื้นเมืองของไทยอีกหลายชนิดในอนาคต

2.14 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน

เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากจะสามารถสังเคราะห์แบคเทอริโอซินได้แล้วยังสามารถสร้างสารอื่นๆที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้อีกหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิทิล ดังนั้นในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินจึงต้องมีการกำจัดผลของปัจจัยข้างต้นไม่ให้เข้ามารบกวนผลการทดลองที่อาจจะเบี่ยงเบนได้ เช่น

2.14.1 การกำจัดผลของกรดอินทรีย์

โดยการเตรียมอาหารที่มีส่วนประกอบที่จะทำปฏิกิริยากับกรดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นให้มีสภาพเป็นกลางเสียก่อน โดยการเพิ่มสารอาหารในกลุ่มที่เป็น buffering agents เช่น K_2HPO_4 และ KH_2PO_4 หรือลดปริมาณน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้แบคทีเรียกรดแลคติกเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติกลดน้อยลง (Tichaczek, 1992 and Swetwiwathana & Lotong, 1999) หรือในกรณีของกรดอะซิติกทำโดยบ่มเชื้อในสภาวะ anaerobe เนื่องจากกรดอะซิติกเกิดขึ้นได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น (ในกรณีที่ทดสอบด้วยอาหารแข็ง) หรือถ้าใช้วิธีทดสอบด้วยอาหารเหลวก็กำจัดโดยการนำมาไตเตรตด้วยเบส (NaOH)

2.14.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะกำจัดโดยทำการบ่มเชื้อในสภาพไร้อากาศ เพราะแบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาพที่มีออกซิเจนเท่านั้น หรือโดยการเติมเอนไซม์คะตะเลสที่จะไปสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน ซึ่งโดยปกติแบคทีเรียแลคติกจะไม่มีเอนไซม์คะตะเลสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลาย hydrogenperoxide

นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน ดังนั้นถ้าเติมเอนไซม์ทริปซินซึ่งเป็นเอนไซม์ในกลุ่มโปรตีเอสลงไปด้วยจะมีผลทำให้แบคเทอริโอซินถูกทำลาย จึงไม่มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียทดสอบ ดังนั้นถ้าสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นเป็นแบคเทอริโอซินก็ควรจะให้ผลการทดสอบเป็นลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.14.3 เทคนิคต่างๆที่ได้มีการนำมาเพื่อใช้ทดสอบหาแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซิน สามารถแบ่งวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกโดยใช้การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหลัก ได้แก่

ก. การคัดเลือกแบบที่ให้แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญไปพร้อมกับแบคทีเรียทดสอบ เช่น วิธี Colony direct method โดยการเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารกึ่งแข็งหรือเกลี่ยเชื้อทดสอบบนผิวหน้าอาหารและทำการแต้มแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาทดสอบความสามารถบนอาหารกึ่งแข็งนั้นไปพร้อมๆกัน

ข. การคัดเลือกโดยการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกก่อนเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยจะต้องเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่จะทดสอบความสามารถล่วงหน้าก่อนประมาณ 16 - 24 ชม. แล้วจึงเททับด้วยแบคทีเรียทดสอบ ในอาหารกึ่งแข็งที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และบ่มในสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

นอกจากนี้การแบ่งวิธีที่ใช้ในการคัดเลือกโดยใช้การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นหลักแล้ว ยังแบ่งออกได้โดยดูความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารแข็งและในอาหารเหลวเป็นหลักด้วย ดังนี้

2.14.3.1 การสร้างแบคเทอริโอซินบนอาหารแข็ง

การติดตามการสร้างแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะศึกษาจากการติดตามการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบบนอาหารแข็ง (โดยทั่วไปจะผสมเชื้อลงในอาหารกึ่งแข็งแล้วเททับบนโคโลนีของแบคทีเรียที่ทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน) แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างกรดอินทรีย์ (กรดแลคติกและกรดอะซิติก) และสารต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆอีก (ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิทิล) และอาจจะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทำให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ดังนั้นจึงต้องมีวิธีที่จะกำจัดสารต่างๆเหล่านี้เสียก่อนตามที่กล่าวไปแล้วข้างต้น ตัวอย่างที่ใช้ในวิธีนี้ เช่น Flip streak method และ Colony direct method

2.14.3.2 การสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารเหลว

การสร้างแบคเทอริโอซินอาจสังเกตผลได้ง่ายบนอาหารแข็ง แต่การศึกษาถึงลักษณะปลีกย่อยอื่นๆของแบคเทอริโอซินจะศึกษาในอาหารเหลวเพราะอาหารเหลวง่ายต่อการปรับแต่งสูตรอาหาร และตรวจเช็คผลการทดสอบ เช่น สภาวะที่เหมะสมต่อการเจริญของเซลล์และการสร้างแบคเทอริโอซิน แต่วิธีติดตามการสร้างในอาหารเหลวมีวิธีการทำที่ค่อนข้างยุ่งยากจึงมักใช้ยืนยันผลจากการทดสอบบนอาหารแข็งและใช้ในการศึกษารายละเอียด โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว แล้วใช้น้ำเลี้ยงเชื้อมาทดสอบโดยกำจัดเซลล์ออกโดยการปั่นแยกหรือการกรองจะได้เป็น crude cell-free preparation of the bacteriocin แล้วนำมาไดอะไลซิสเพื่อเป็นการกำจัดสารแปลกปลอมอื่นๆออกไป และปรับสภาพความเป็นกรดด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

NaOH จากนั้นนำสารละลายใสที่ได้ไปหยอดลงบนกระดาษกรอง หรือหลุมที่เจาะลงบนอาหารแข็งเพื่อตรวจผลการยับยั้ง หรือนำไปเติมลงในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อทดสอบแล้วตรวจผลโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง หรือการนับจำนวนเชื้อทดสอบที่เปลี่ยนไปเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. เครื่องแก้วเพื่อการวิเคราะห์ทางเคมี
2. เครื่องฆ่าเชื้อ (Autoclave)
3. ไมโครเวฟ
4. ตู้ปลอดเชื้อ
5. ตู้แช่เย็น
6. ตู้บ่มเชื้อ
7. อ่างน้ำร้อน (Water bath)
8. ตู้เย็น
9. เครื่องตีป่น (Stomacher)
10. เครื่องวัด pH
11. Centrifuge
12. Hot plate
13. Vortex
14. Anaerobic jar หรือ Candle jar
15. Auto pipette ขนาด 2-20, 20-100 และ 100-1000 ไมโครลิตร
16. Trip ขนาด 1 และ 5 มิลลิลิตร
17. หลอด Eppendorf

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Bacteriocin Screening Medium (BSM)
2. Tryptone Soy Broth (TSB) บริษัท Merck, Germany
3. TSB Soft Agar บริษัท Merck, Germany
4. Tryptone Soy Agar Yeast Extract (TSAYE) บริษัท Merck, Germany
5. MRS Soft Agar บริษัท Merck, Germany
6. MRS Deep tubes บริษัท Merck, Germany
7. Agar บริษัท Merck, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมี

1. Calciumcarbonate ($CaCO_3$)
2. Sodium chloride (NaCl)
3. Sodium acetate
4. Citric acid dammonium salt
5. Magnesium sulfate ($MgSO_4\ 7H_2O$)
6. Manganese sulfate
7. Di-potassium hydrogen phosphate ($K_2HPO_4\ 3H_2O$)
8. Potassium dihydrogen phosphate (K_2HPO_4)

3.4 ตัวอย่างอาหาร

มั่ม 7 แหล่งจาก จังหวัดขอนแก่น

จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้จากห้องปฏิบัติการทดลอง ได้แก่

1. *Bacillus coagulans* JCM 2257
2. *Bacillus subtilis* JCM 1465
3. *Bacillus circulans* JCM 2504
4. *Micrococcus luteus* IFO 12708
5. *Enterococcus faecalis* JCM 5803
6. *Leuconostoc mesenteroids* subsp. mesenteroids JCM 6124
7. *Escherichia coli* JM 109
8. *Staphylococcus aureus* subsp. aureus ATCC 12600
9. *Staphylococcus carnosus* LTH 2102
10. *Listeria inoccua* ATTC 33090
11. *Listeria inoccua* LTH 3096
12. *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885
13. *Pediococcus pentosaceus* JCM 5890
14. *Lactobacillus plantarum* ATTC 14917
15. *Lactobacillus plantarum* ATTC 8014
16. *Lactococcus lactis* (IO-1) JCM 7638
17. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18. *Streptococcus salivarius*

19. *Kocuria varian* LTH 1545

20. *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157

3.5 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากมั่ม

1.1 เตรียมตัวอย่างมั่มที่ต้องการตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกโดยใช้กรรไกรตัดเป็นชิ้นเล็กๆ

1.2 ชั่งตัวอย่างอาหารหมักโดยใช้ช้อนสุ่มตักตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก

1.3 เติมสารละลายสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร ลงในตัวอย่างอาหารที่ชั่ง ตีปั่นตัวอย่างและสารละลายเจือจางให้เข้ากันด้วย stomacher ประมาณ1นาที (ขั้นตอนนี้จะได้ตัวอย่างที่เจือจางในระดับ 1:10)

1.4 ทำการเจือจางตัวอย่างอาหารที่ระดับ 10^{-2}-10^{-6}

1.5 ปิเปตตัวอย่างในแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ใส่บน MRS agar + 0.5% Calcium carbonate plate ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเชื้อ ระดับความเจือจางละ 2 จานเพาะเชื้อ

1.6 แท่งแก้วสามเหลี่ยมที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อจากแอลกอฮอล์ เกลี่ยตัวอย่างที่ใส่ไว้ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 5 ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ

1.7.คว่ำจานและทำการบ่มเพาะเชื้อใน Anaerobic jar หรือ Candle jar เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน

1.8 ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญในระดับความเจือจางที่เหมาะสม โดยสังเกตโคโลนีที่มีขอบใส (Clear zone) รอบๆโคโลนี

1.9 สุ่มเลือกโคโลนีที่มีขอบใสตัวอย่างละ10โคโลนี เก็บเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ deep tube ใน MRS agar + 1% Calcium carbonate บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 2 วัน ก่อนเก็บในตู้เย็นเพื่อใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากมั่มโดยวิธี Colony –Spot-on –lawn (Tichaczek et., al, 1992 ; Swetwiwathana and Lotong, 1999)

2.1 นำหลอดเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เก็บใน deep tube มาทำการเติม MRS broth หลอดละ 5 มิลลิลิตร

2.2 เทอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ BSM ลงในจานเพาะเชื้อ (พยายามระเหยหยดน้ำบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM ให้แห้ง)

2.3 ในช่วงเขี่ยเชื้อแตะเชื้อที่เก็บและเพาะเลี้ยงไว้ในข้อ 1 มาแตะบนผิวหน้า BSM ในข้อ 2 ที่แบ่งเป็นช่องๆ ช่องละ1ตัวอย่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 นำจานเพาะเชื้อที่เขี่ยเพาะเชื้อแล้วทั้งหมดไปบ่มในสภาพ anacrobic ใน anacrobic jar หรือ candle jar ที่อุณหภูมิ 35 ° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.5 เตรียมอาหาร soft agar ในหลอดๆ ละ 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อ ทั้งMRSและ TSAYE soft agar อุ่นไว้ใน water bath 50 °C

2.6 นำเชื้อ indicators ทั้งหมดที่ทำการเพาะเลี้ยงใน broth เป็นเวลา 24 ช.ม. ใส่ใน soft agar ที่อุ่นใน water bath ในข้อ 2.5 ตามชนิดอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้เป็น indicators ในประมาณ 2% เขย่าให้เชื้อกระจายทั่วอาหาร soft agar ด้วย vortex

2.7 นำหลอดเชื้อที่ผสมใน soft agar ในข้อ 2.6 ไปเทลงในจานเพาะเชื้อที่ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่จะทำการตรวจสอบการสร้างแบคเทอริโอซินในข้อ 2.4 ใช้เชื้อ indicator เชื้อละ 1 จาน โดยเกลี่ย soft agar ให้ทั่วจาน

2.8 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปทำการบ่ม โดยสภาวะที่ใช้ในการบ่มขึ้นอยู่กับเชื้อ indicator แต่ละชนิด

2.9 อ่านผลโดยดูการเกิดโซนใสรอบๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ถ้าเชื้อที่เป็น indicator ตัวใดถูกยับยั้งการเจริญจากแบคทีเรียแลคติก จนทำให้เห็นโซนใสรอบๆ โคโลนีของแบคทีเรียแลคติก แสดงว่ามีการตรวจพบแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินได้

2.10 ทำการย้อมแกรมแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน และรายงานผลการติดสี ลักษณะและรูปร่าง

3. การตรวจยืนยันการสร้างสารแบคเทอริโอซินใน MRS broth ของเชื้อที่คัดเลือก และการทดสอบความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิต

3.1 นำเชื้อตัวอย่างที่คัดเลือกมา แล้วเพาะเชื้อลงในอาหาร MRS broth 5 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.2 นำของเหลวในหลอดทดลองมาเหวี่ยงปั่นที่ความเร็วรอบ 5500 rpm นาน 10 นาที อุณหภูมิ 4 °C เมื่อทำการ Centrifuge เสร็จแล้ว นำส่วนของของเหลวใสไปปรับ pH เท่ากับ 6.5

3.3 นำมากรองด้วย sterile membrane filter ลงในหลอดที่ปลอดเชื้อ จากนั้นนำหลอด Eppendrof ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เพื่อนำมาเจือจางสารแบคเทอริโอซินที่ได้ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:256, 1:512

3.4 นำเชื้อ indicator มาถ่ายลงในอาหาร soft agar จากนั้นเทลงในจานเพาะเชื้อทับหน้าอาหาร TSAYE แล้วนำไปบ่ม โดยเชื้อที่เป็นแลคติกบ่มใน Candle jar ส่วนเชื้ออื่นบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C นาน 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 แบ่งจานเพาะเชื้อเป็น 10 ช่อง แต่ละช่องต่อ 1 อัตราส่วน ดูดสารแบคเทอริโอซิน 10 ไมโครลิตร จากหลอด Eppendorf ในแต่ละความเจือจางในข้อ 3.3 มาหยดลงบนจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มตามสภาพของเชื้ออินดิเคเตอร์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6 ตรวจผลความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตได้ต่อมิลลิลิตร โดยดูการเกิดโซนใสของสารแบคเทอริโอซิน จากข้อ 3.5 ว่าถึงระดับความเจือจางที่เท่าไหร่

4. การทดสอบโดยวิธี Api 50 CHL

4.1 นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกไว้มาทำการ streak ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + 0.5% Calcium carbonate แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ใน Candle jar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

4.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ มา 2-3 โคโลนีใส่ลงในอาหารเหลวสำเร็จรูปซึ่งไม่มีน้ำตาลและมี Brom Cresol Purple เป็นอินดิเคเตอร์ซึ่งมีสีม่วงที่พีเอชเป็นกลาง (Api 50 CHL)

4.3 ใช้ Pasture ปิเปตปลอดเชื้อ ดูดเชื้อจากอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 4.2 ลงใน strip test ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ อยู่ 49 ชนิดจำนวน 49 ช่องและมี Control 1 ช่องที่ไม่มีน้ำตาล โดยทุกส่วนจะมีสีม่วงเนื่องจากยังไม่มีการหมักย่อยจากเชื้อแลกติกแอซิดแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ (pH เป็นกลาง) จากนั้นปิดทับด้วย paraffin oil ที่ปราศจากเชื้อเพื่อให้อยู่ในสภาพที่ไร้อากาศ

4.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C ในตู้บ่ม เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

4.5 สังเกตดูการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเชื้อมีการหมักย่อยน้ำตาลแล้วเกิดกรด ส่วนของช่องน้ำตาลที่ถูกหมักย่อยจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง หรือเขียว

4.6 นำผลการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆ ที่ได้ไปอ่านหาความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก จาก Api 50 CH database

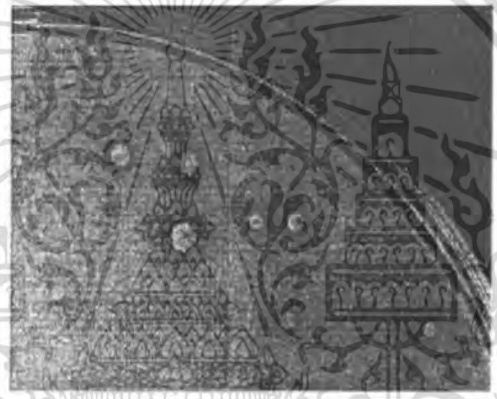
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4

ผลการทดลอง

4.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากมั่ม

นำตัวอย่างมั่มทั้งหมด 7 ตัวอย่างที่ spread plate บนอาหาร MRS + 0.5 % $CaCO_3$ เลือกโคโลนีที่เกิดโซนใส 10 โคโลนีต่อ 1 ตัวอย่างได้เชื้อทั้งหมด 70 สายพันธุ์เก็บไว้ในอาหาร MRS + 1% $CaCO_3$ เก็บไว้เพื่อทดสอบการสร้างสารแบคเทอริโอซินในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 2 ลักษณะแบคทีเรียแลคติกที่เจริญบน MRS medium +0.5 % $CaCO_3$

จากภาพที่ 2 การเกิดโซนใสเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาล 6 คาร์บอนอะตอมให้เกิดกรดแลคติกทำให้เกิดสภาวะกรดส่งผลให้ $CaCO_3$ ละลายทำให้เห็นโซนใสขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากมั่มโดยวิธี Colony – Spot-on –lawn

โดยนำเชื้อที่คัดเลือกจากมั่ม 7 ตัวอย่างทั้งหมด 70 ไอโซเลทมาทดสอบกับเชื้ออินดิเคเตอร์ทั้งหมด 6 สายพันธุ์ได้แก่ *Enterococcus feacalis* JCM 5803, *Lactobacillus plantarum* ATTC 14917, *Lactobacillus sakei* JCM 1157, *Staphylococcus aureus* ATTC 12600, *Escherichia coli* JM 109, *Listeria innoccua* ATTC 33090 โดยวิธี Colony-spot-on-lawn โดยมีเกณฑ์ในการคัดเลือกคือ เลือกโคโลนีที่เกิดโซนใสบริเวณรอบๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ดังตารางที่ 5 จากนั้นทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ไม่ต่ำกว่า 5 สายพันธุ์ มาทั้งหมด 14 สายพันธุ์นำไปตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (ตารางที่ 6) คัดเลือกมา 5 สายพันธุ์ที่มีลักษณะแตกต่างกันเพื่อความหลากหลายของเชื้อที่ศึกษา โดยสายพันธุ์ที่คัดเลือกมาคือ A2-10, A3-3, A5-4, A6-5 และ A7-3 ทดสอบกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 19 ชนิดโดยเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ไม่ต่ำกว่า 18 สายพันธุ์และมีโซนใสรอบโคโลนีไม่ต่ำกว่า 0.5 มิลลิเมตร ดังตารางที่ 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์

ตัวอย่าง	Colony	*L. sakei*	*L. plantaaarum*	*L. inoccua*	*S. aureus*	*E. coli*	*E. faecalis*	ตัวอย่าง	Colony	*L. sakei*	*L. plantaaarum*	*L. inoccua*	*S. aureus*	*E. coli*	*E. faecalis*
A1	1	-	-	-	+	+	-	A2	1	+	+	+	+	-	-
	2	-	-	+	+	+	+		2	-	-	-	+	-	+
	3	-	-	-	+	+	+		3	+	+	-	-	-	+
	4	-	+	+	-	+	+		4	-	+	+	-	-	+
	5	-	+	+	-	+	-		5	++	+	++	-	+	+
	6	+	-	+	+	+	+		6	+	+	+	-	+	-
	7	+	+	-	+	+	+		7	+	+	+	+	-	-
	8	+	+	-	-	+	-		8	+	+	-	+	-	-
	9	-	+	-	-	-	-		9	-	-	-	-	-	-
	10	-	+	-	-	+	+		10	+	++	-	+	+	-

ตารางที่ 5 (ต่อ) ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์

ตัวอย่าง	Colony	*L. sakei*	*L. plantaaarum*	*L. inoccua*	*S. aureus*	*E. coli*	*E. faecalis*	ตัวอย่าง	Colony	*L. sakei*	*L. plantaaarum*	*L. inoccua*	*S. aureus*	*E. coli*	*E. faecalis*
A3	1	-	-	-	-	-	-	A4	1	+	+	-	+	+	+
	2	-	-	-	-	-	+		2	-	-	-	-	-	-
	3	+	-		+	+	+		3	+	+	-	+	-	+
	4	+	-	+	-	+	+		4	-	+	-	+	-	+
	5	+	-	+	-	+	-		5	-	-	-	-	-	-
	6	+	+	+	-	+	+		6	+	+	-	+	-	+
	7	+	-	-	+	+	+		7	+	+	-	+	-	+
	8	+	+	-	-	-	-		8	+	+	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-		9	-	+	-	-	-	-
	10	+	+	+	-	+	+		10	-	+	-	-	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ) ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์

ตัวอย่าง	Colony	*L. sakei*	*plantaarum*	*L. inoccua*	*S. aureus*	*E. coli*	*E. faecalis*	ตัวอย่าง	Colony	*L. sakei*	*plantaarum*	*L. inoccua*	*S. aureus*	*E. coli*	*E. faecalis*
A5	1	+	+	-	-	-	-	A6	1	+	+	-	-	-	-
	2	+	+	-	-	-	-		2	+	+	+	+	+	+
	3	+	-	-	-	+	+		3	+	-	-	-	-	-
	4	++	+	-	+	+	+		4	-	-	-	-	-	-
	5	+	+	+	+	+	+		5	+	+	++	-	+	+
	6	+	+	+	+	+	+		6	+	+	-	-	-	-
	7	+	-	+	-	-	-		7	+	-	-	-	+	+
	8	+	-	-	-	-	-		8	-	-	-	-	-	-
	9	+	-	-	-	-	-		9	-	-	-	-	-	-
	10	+	-	-	-	+	+		10	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 5 (ต่อ) ผลของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทเนื้อกับเชื้ออินดิเคเตอร์

ตัวอย่าง	Colony	*L. sakei*	*L. plantaaarum*	*L. inoccua*	*S. aureus*	*E. coli*	*E. faecalis*
A7	1	+	-	+	-	+	-
	2	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+
	4	+	-	+	+	+	+
	5	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	+	-
	7	-	-	-	-	+	+
	8	+	+	+	+	+	+
	9	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ

- = ไม่เกิด clear zone
+ = มีการยับยั้ง > 0.5-1.0 มิลลิเมตร
++ = มีการยับยั้ง> 1.0-1.5 มิลลิเมตร

ตารางที่ 6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อสายพันธุ์ A2-10, A3-3, A5-4, A6-5 และ A7-3

สายพันธุ์	แกรม	ลักษณะรูปร่าง
A2-10	+	รูปท่อนต่อกันเป็นสาย
A3-3	+	รูปร่างกลม เกาะกัน 4 เซลล์
A5-4	+	รูปร่างท่อนต่อกันเป็นสาย
A6-5	+	รูปร่างกลม เกาะกัน 4 เซลล์
A7-3	+	รูปร่างกลม เกาะกันเป็นกลุ่ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ผลการสร้างแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ทั้ง 19 สายพันธุ์

Indicator stain	Sample				
	A2-10	A3-3	A5-4	A6-5	A7-3
Bacillus coagulans JCM 2257	-	-	+	+	+ +
Bacillus subtilis JCM 1465	+	+	+	+	+
Bacillus circulans JCM 2504	-	++	-	+	-
Micrococcus luteus IFO 12708	-	-	+	+	+
Enterococcus faecalis JCM 5803	+	+	+	++	+
Leuconostoc mesenteroids JCM 6124	+	+	+	+	+
Escherichia coli JM 109	+	+	+	+	+
Staphylococcus aureus ATCC 12600	++	+	+	+	+
Staphylococcus carnosus LTH 2102	+	+	+	++	+
Listeria inoccua ATTC 33090	++	+	+	++	+
Listeria inoccua LTH 3096	+	+	+	+	+
Pediococcus pentosaceus 5885	++	+	+	++	+
Pediococcus pentosaceus 5890	+	+	+	+	+
Lactobacillus plantarum ATTC 14917	+	+	+	++	+
Lactobacillus plantarum ATTC 8014	+	+	+	+	+
Lactococcus lactis (IO-1) 7638	+	+	+	+	+
Lactococcus cremoris 1344	+	+	+	++	+
Streptococcus salivarius	++	+	+	+	+
Kocuria varian LTH 1545	+	+	+	++	+

<u>หมายเหตุ</u>

- = ไม่เกิด clear zone

\+ = มีการยับยั้ง > 0.5-1.0 มิลลิเมตร

\+ + = มีการยับยั้ง> 1.0-1.5 มิลลิเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การตรวจยืนยันการสร้างสารแบคทอริโอซินของเชื้อที่คัดเลือกและการทดสอบความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิต

จากสายพันธุ์ที่คัดเลือกมา 5 สายพันธุ์โดยทดสอบกับเชื้ออินดิแคเตอร์ 19 ชนิดในขั้นตอนที่ 2 นั้น พบว่าสามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดมา 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ A5-4 และ สายพันธุ์ A6-5 จากนั้นมาทำการทดสอบหาความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ เพื่อดูประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ทั้ง 21ชนิด ได้ผลดังตารางที่ 8

จากผลการทดลองขั้นต้นพบว่าสายพันธุ์ A6 -5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ A5–4 เนื่องจากแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นจากสายพันธุ์ A6-5 สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้อยู่แม้ที่ระดับการเจือจางต่ำๆ ซึ่งที่ระดับการเจือจางต่ำสุดที่ยับยั้งได้ คือ 1:4096 ที่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 และเมื่อนำมาคำนวณเป็นยูนิต พบว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเท่ากับ 409,600 Au/ml ซึ่งเป็นค่าที่สูงสุด ขณะที่สายพันธุ์ A5–4 มีฤทธิ์ในการยับยั้งเพียง 100 Au/ml เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อสายพันธุ์ A6-5 และสายพันธุ์ A5-4 มีความสามารถในการยับยั้ง *Listeria innoccua* ได้ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *Listeria monocytogenes* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ ทำให้ทราบว่าเชื้อสายพันธุ์ A6-5 และสายพันธุ์ A5–4 สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ได้เช่นเดียวกัน แต่สายพันธุ์ A6 -5 จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ A5-4 ซึ่งจัดว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ดีตัวหนึ่งในการใช้เป็นแนวทางนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตอาหารให้มีความปลอดภัยทางด้านจุลชีววิทยามากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงผลการทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินที่มีผลต่อเชื้อในกลุ่มเชื้ออินดิเคเตอร์

เชื้ออินดิเคเตอร์	ระดับความเจือจางของแบคเทอริโอซิน			
	สายพันธุ์ A6-5	ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/ml)	สายพันธุ์ A5- 4	ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/ml)
Bacillus coagulans ICM 2257	1:32	3200	1:0	0
Bacillus cereulans JCM 2504	1:64	800	1:0	0
Bacillus subtilis ICM 1465	1:4	400	1:2	200
Enterococcus faecalis ICM 5803	1:64	800	1:1	100
Escherichia coli JM 109	-	-	-	-
Kokuria varians LTH 1545	1:64	800	1:1	100
Lactobacillus plantarum ATCC 8014	1:4096	409600	1:1	100
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	1:256	25600	1:2	200
Lactobacillus lactis subsp *lactis* IO-1 ICM 7638	1.0	0	1:0	0
Lactobacillus lactis subsp cremoris TUA 13441	1:2048	204800	1:0	0
Listeria innocua ATCC 33090	1:256	25600	1:4	400
Listeria innocua LTH 3096	1:256	25600	1:0	0
Leuconostoc mesenteroids subsp *mesenteroids* JCM 6124	1:128	12800	-	-
Micrococes luteus IFO 12708	1:32	3200	1.1	100
Pediococcus pentosaceus ICM 5885	1 1024	102400	1:2	200
Pediococcus pentosaceus ICM 5890	1:4	400	1.0	0
Staphylococcus aureus subsp *aureus* ATCC 12600	-		1:0	0
Staphylococcus carnosus LTH 2102	1.32	3200	1.2	200
Streptococcus salivarius	1:16	1600	1:0	0
A5 - 4	-	-	-	-
A6 -5	-	-	-	-

หมายเหตุ : ระดับความเจือจางใช้อัตราส่วน คือ อัตราส่วนสาร : อัตราส่วนน้ำกลั่น Sterile

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาคุณสมบัติการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรต และชนิดของเชื้อโดยใช้ชุดตรวจสอบ API 50 CHL

ในการทดลองนี้จะนำเชื้อสายพันธุ์ A5-4 และ A6-5 มาทำการศึกษาคุณสมบัติการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรต และชนิดของเชื้อโดยชุดตรวจสอบ API 50 CHL โดยจะสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกอยู่ที่หยดลงในแต่ละช่องของ strip test หลังจากนำไปบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นนำผลการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่าง ๆ มาหาค่าความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจาก API 50 CHL database ด้วยระบบคอมพิวเตอร์

จากผลการทดสอบโดยวิธี API 50 CHL พบว่าหลังจากทำการบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยช่องที่มีการหมักย่อยน้ำตาลแล้วเกิดกรด จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นเหลือง (+) และเขียว (?) แสดงว่ามีการหมักย่อยน้ำตาลไม่สมบูรณ์ ส่วนช่องที่ไม่เกิดการเปลี่ยนสีแสดงว่าไม่มีการหมักย่อยน้ำตาลเกิดขึ้น (-) จากนั้นนำผลการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆ ดังตารางที่ 9 และ 10 มาหาค่าความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจาก API 50 CHL database ด้วยระบบคอมพิวเตอร์ พบว่าเชื้อสายพันธุ์ A5-4 มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* 99.9 % และเชื้อสายพันธุ์ A6-5 มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 99.8 %

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
24 h	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
48 h	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+	-
	Control	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
24 h	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
48 h	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU
	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
24 h	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
48 h	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG	MLZ

ตารางที่ 9 แสดงการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ของสายพันธุ์ A5-4

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
24 h	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
48 h	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
	Control	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXYL	LXYL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL
	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33
24 h	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
48 h	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-
	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	TRE	INU
	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	
24 h	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
48 h	-	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	2KG	5KG	MLZ

ตารางที่ 10 แสดงการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆที่เวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ของสายพันธุ์ A 6- 5

ตารางที่ 11 แสดงชนิดน้ำตาล 49 ชนิดใน API 50 CHL

0 Control (ไม่มีน้ำตาล)	18 MANitol	36 Starch
1 GLYcerol	19 SORbitol	37 GlycoGen
2 ERYthritol	20 α -Methl-D Mannoside	38 XyLiTol
3 D ARAbinose	21 α -Methl-D Glucoside	39 GENtiobiose
4 L ARAbinose	22 N Acetyl Glucosamine	40 D TURanose
5 RIBose	23 AMYgdalin	41 D LYXose
6 D XYLose	24 ARBuutin	42 D TAGatose
7 L XYLose	25 ESCulin	43 D FUCose
8 ADOnitol	26 SALicin	44 L FUCose
9 β-Methl-D Xyloside	27 CELlicin	45 D Arabitol
10 GALactose	28 MALtose	46 L Arabitol
11 GLUcose	29 LACtose	47 GlucoNaTe
12 FRUctose	30 MELibiose	48 2 Keto Gluconate
13 MANnose	31 Sucrose	49 5 Keto Gluconate
14 SorBose	32 TREhalose	
15 RHAmnose	33 INUlin	
16 DULcitol	34 MELeZitose	
17 INOsitol	35 RAFinose	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกในตัวอย่างมั่มที่ผ่านกระบวนการแปรรูปโดยการหมัก จำนวน 7 ตัวอย่างจากแหล่งต่างๆในจังหวัดขอนแก่น ซึ่งสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 70 สายพันธุ์ และเมื่อนำมาทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินโดยวิธี Colony spot -on –lawn โดยนำมาทดสอบกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 6 ชนิดพบว่ามีจำนวน 14 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด จากนั้นจึงทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์โดยการย้อมแกรมและคัดเลือกเชื้อที่มีรูปร่างลักษณะแตกต่างกันมาทั้งหมด 5 สายพันธุ์ นำมาตรวจยืนยันการสร้างสารแบคเทอริโอซินโดยทดสอบกับเชื้ออินดิเคเตอร์ทั้ง 21 ชนิด พบว่ามี 2 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้มากที่สุดคือไม่ต่ำกว่า 18 ชนิด ได้แก่ สายพันธุ์ A6-5 และ A5-4 จากนั้นนำมาทดสอบระดับความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ทั้ง 21 ชนิดพบว่าสายพันธุ์ A6-5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด รองลงมาคือสายพันธุ์ A5-4 อีกทั้งยังพบว่ามีความสามารถในการยับยั้ง *Listeria innoccua* ได้ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ *Listeria monocytogenes* เป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิน ทำให้ทราบว่าเชื้อสายพันธุ์ A6-5 และสายพันธุ์ A5–4 สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ได้เช่นเดียวกัน แต่สายพันธุ์ A6 -5 จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับสายพันธุ์ A5-4 ซึ่งจัดว่าเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ดีตัวหนึ่งในการใช้เป็นแนวทางนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อเพื่อใช้ในกระบวนการผลิตอาหารให้มีความปลอดภัยทางด้านจุลชีววิทยามากขึ้น จากนั้นนำ 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกมาทำการศึกษาคุณสมบัติการหมักย่อยคาร์โบไฮเดรต และชนิดของเชื้อโดยชุดตรวจสอบ API 50 CHL พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ A5-4 มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* 99.9% และลักษณะทางสัณฐานวิทยามีรูปร่างแท่ง ติดสีน้ำเงิน แกรมบวก และเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ A6-5 มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 99.8 % และลักษณะทางสัณฐานวิทยามีรูปร่างกลมเกาะกัน 4 เซลล์ ติดสีน้ำเงิน แกรมบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2536. เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร. กระทรวงสาธารณสุข. กรุงเทพมหานคร

งามนิต นนทโส. รายงานการวิจัยเรื่องการศึกษาชนิด ปริมาณแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในระหว่างการหมักมั่ม. ทุนสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน หมวดทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2539. 1-4.

ดวงพร คันธโชติ. (2530). จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์ หน้า 140-147. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตว์ กรุงเทพฯ.

ณรงค์ นิยมวิทย์ และ ทัศนีย์ โรจนไพบูลย์. 2525-2526. ผลิตภัณฑ์การหมัก. สถาบันวิจัยและพัฒนาอาหารและผลิตภัณฑ์แห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

พงศ์เทพ วิไลพันธุ์. 2546. แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารอาหาร. ปีที่ 33 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม- กันยายน. 2546. สถาบันค้นคว้าและวิจัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.173-179.

เพ็ญทิพา ปางสุข, นางสาวรัชนีวรรณ แนวเงินดี, นางสาวสุกัญญา ปานนพภา.2547.การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน.ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 22-28

มัทนา แสงจินดาวงษ์, นางดวงเดือน วารีวะนิช, นายพงศ์เทพ วิไลพันธุ์. การใช้ประโยชน์แลคติกแอซิดแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์ประมงที่แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก. รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ทุนอุดหนุนวิจัย มก. ประจำปี 2543. สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 3

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง, กทม.

วารสารอาหาร.ปีที่ 33 ฉบับที่ 3 กรกฎาคม – กันยายน.2546.สถาบันค้นคว้าและวิจัย มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์

ศิรัญญา ศรีภิรมย์, อังคนา มาตย์เสนา. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากปูดอง.ปัญหาพิเศษ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 18-21.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2541. จุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สุมณฑา วัฒนสินธุ์.2544, สมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ของเครื่องเทศและการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร, ใน : *เอกสารประกอบการสัมมนา เรื่อง Food Ingredients: Hydrocolloids and spices.* เมื่อวันที่ 28 สิงหาคม 2544.ณ โรงแรมมารวยการ์เด้น กรุงเทพมหานคร : 41-82

สุรีย์รัตน์ เงินดวง. 2545. การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์. สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 22-35.

ภาษาอังกฤษ

Adams, M.R., and Moss, M.O.1995. Food microbiology. Guiluford University of Surry.

Adams, M.R. 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. Bacterioins: Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation. Int. J. Food Microbials. 71: 15-25.

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. Antimicrobia 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 Bacteriocin : Their Practical Important. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application. Blackie – Academic & Professional, London. : 1-11.

De Vuyst L., and Vandamme E.J., 1994. Screening for Bacteriocin –Producing Strains., Diplococcin produced by *Lactococcus lactis* subsp.*cremoris*. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application. Blackie – Academic & Professional, London :273-276.

Eckner, K.F. 1992. Bacteriocin and Food Application. Diary, Food and Environ. Sanitation. 12: 204-209.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class2 a Bacteriocins : Biosynthesis, Structure and Activity. FEMS Microbial. Rev. 24 : 85-106.

Hastings, J. W. and Stiles, M. E. (1991). Antibiosis of *Leuconostoc gelidum* isolated from meat. *J. Appl. Bacteriol.*, 70, 127-134.

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Hoover D.G. and Steenson L.R., 1993. Bacteriocin of lactic acid bacteriocin : Screening Method for Detecting Bacteriocin Activity:23-37.,Bichemical Method for Purification of Bacteriocin:41-57

Jack, R.W., Tagg J.R., and Ray B., 1999. Bacteriocin of gram-positive bacteria. Microbial. Rev.59 : 171-200

Kekessy, D.A., and Piguet, J. D. 1970. New method for detecting bacteriocin production. Appl. Microbial. 20: 282-283.

Klaenhammer, T.R., 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochimie 70, 337-349.

Klaenhammer, T.R., 1993.Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev., 12: 39-86.

Lawrence, R.C., and Terence, T.D. 1979. Thw fermentation of milk by lactic acid bacteria. In A.T. Bull (ed) Microbial Tachnology : Currrent State Future Prospect. Cammbridge

Lewus, C.B., and Montville, T.J., 1991. Detection of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. J. Microbiol. Meth. 13: 145-150.

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

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

O' Sulivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002. Potential of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria for improvements in Food Safety and Quality. Biochimie. 84: 593-604.

Phithapol B., Varanyanond W., Reungmaneepaitoon S. and Henry, W.(1993). The traditional fermented food of thailand. Institute of food and product develop. Kasetsart University

Spellhaug, S.R., and Harlander, S.K., 1989. Inhibition of Foodborne Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. J.Food Protect.52: 856-862.

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 Lotong N., 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Swetwiwathana, A., Lotong N., Fischer A. and Sonomoto K. 2001 Potential for Use of Isolated Bacteriocin-Producing *Pediococcus pentosaceus* IISATR 536 from Nham (Thai Fermented Meat) to Control the Growth of Salmonella anatum, (An In-Vitro-Study)

Swetwiwathana, A., Lotong, N., Sonomoto, K. and Fischer, A. 2003.Controlling the growth of *Salmonella anatum* II. Effect of Pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic. Fleischwirtchaft International, Germany

Tagg, J.R. and Mcgiven, A.R. 1971. Assay System for Bacteriocins. Appl. Microbiol., 21 : 943-945.

Tagg, J.R., Dajani, A.S., and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-positive Bacteria. Bacteriol. Rev. 40, 722-756.

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

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

Wongklalaung C., and Boonyaratanakornkit M., (1986) Fermented foods in Thailand and semilar products in Asian and elewhere. Institute of food research and product develop Kasetsart university, Bangkok.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. **MRS Deep tubes (MRS broth + 1.2% agar + 0.5% $CaCO_3$)**

   อาหารสำเร็จรูป MRS broth

Agar	1 %
$CaCO_3$	1.2 %

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15นาที) นำมาทำการ mixer ทันทีให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำเย็น

2. **MRS Soft agar**

   MRS broth

Agar	1 %	
น้ำกรอง	1	ลิตร

3. **Bacteriocin Screening Medium (BSM)**

Meat extract	2	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Tween – 80	1	มิลลิลิตร
$MgSO_4 7H_2O$	0.2	กรัม
$Mn SO_4$	0.05	กรัม
$K_2HPO_4 3H_2O$	8.7	กรัม
KH_2PO_4	8	กรัม
Glucose	2	กรัม
Agar	12	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Citric acid diammonium salt	2	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Trytone Soy Broth (TSB)

Trytone	15	กรัม
Soy Peptone	5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15นาที)

5. Trytone Soy Agar Yeast Extract (TSAYE)

Trytone	15	กรัม
Soy Peptone	5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15นาที)

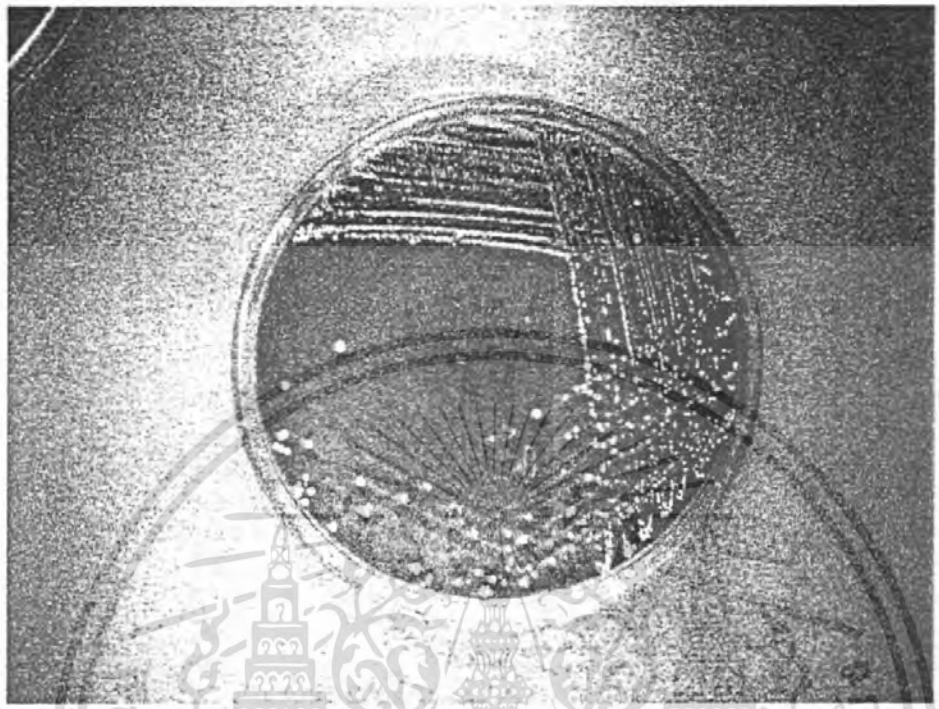
6. TSB Soft Agar

TSBจากข้อ4		
Agar	1 %	
น้ำกรอง	1	ลิตร

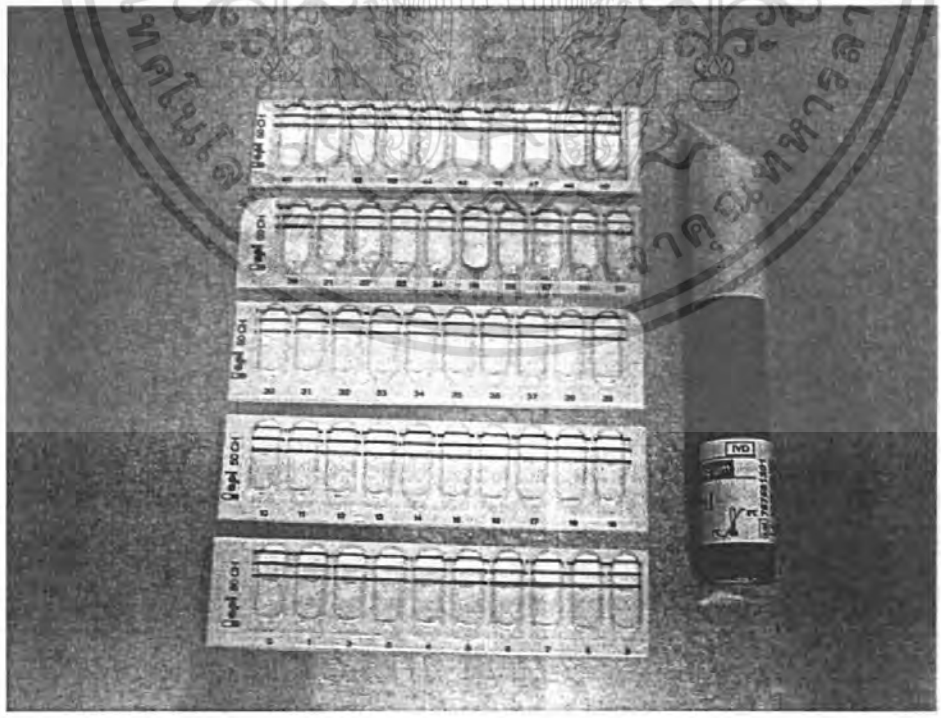
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

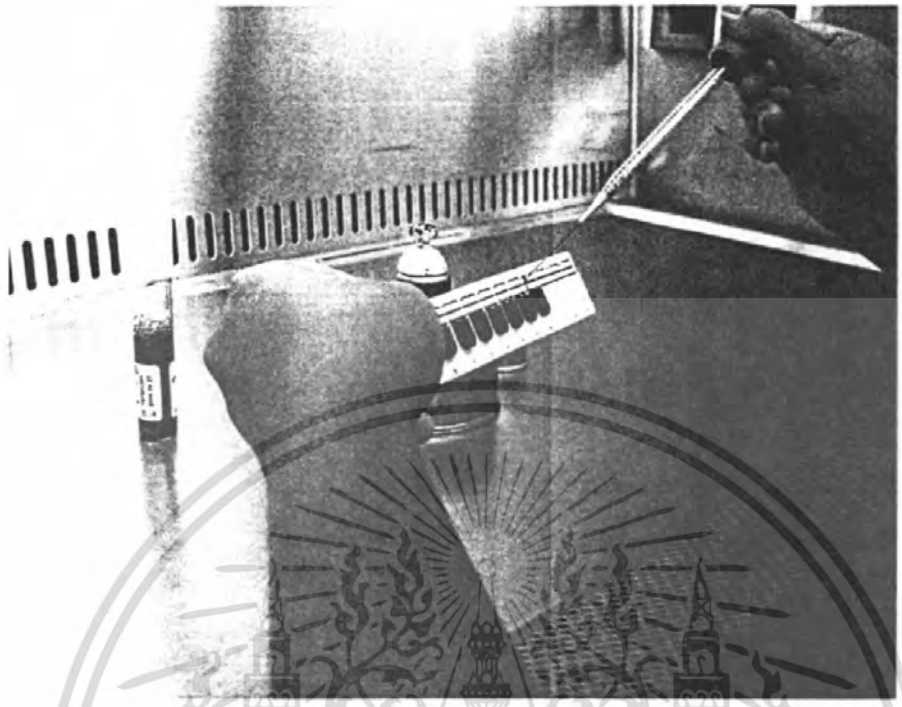


ภาพที่ 2 ลักษณะการ streak plate ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบน MRS medium

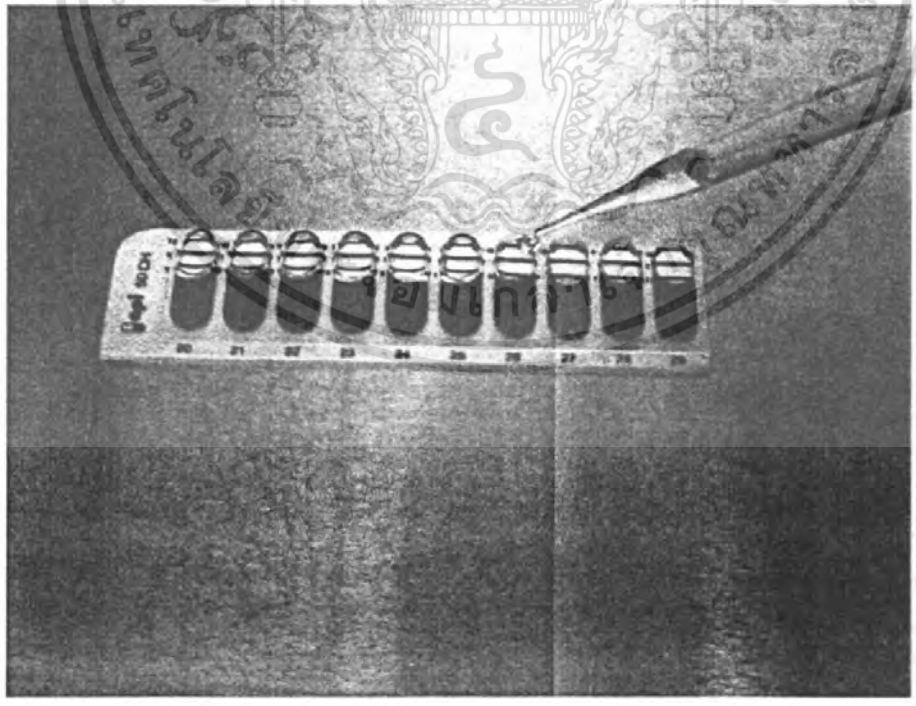


ภาพที่ 3 ชุดทดลอง API 50 CHL

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

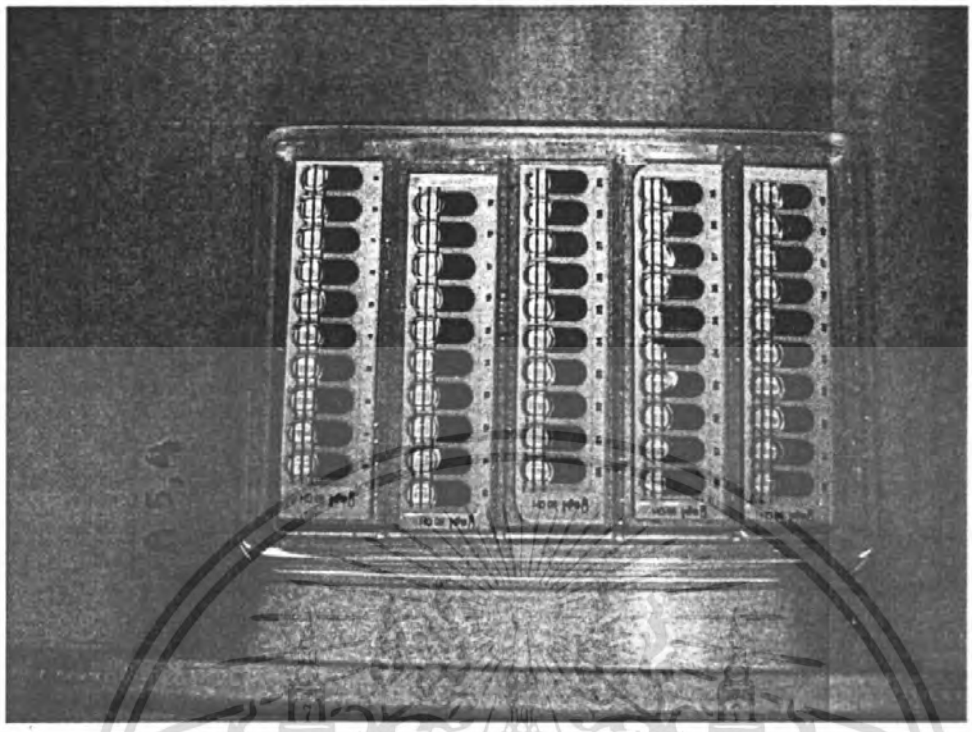


ภาพที่ 4 การปิเปตอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกอยู่ลงใน strip test

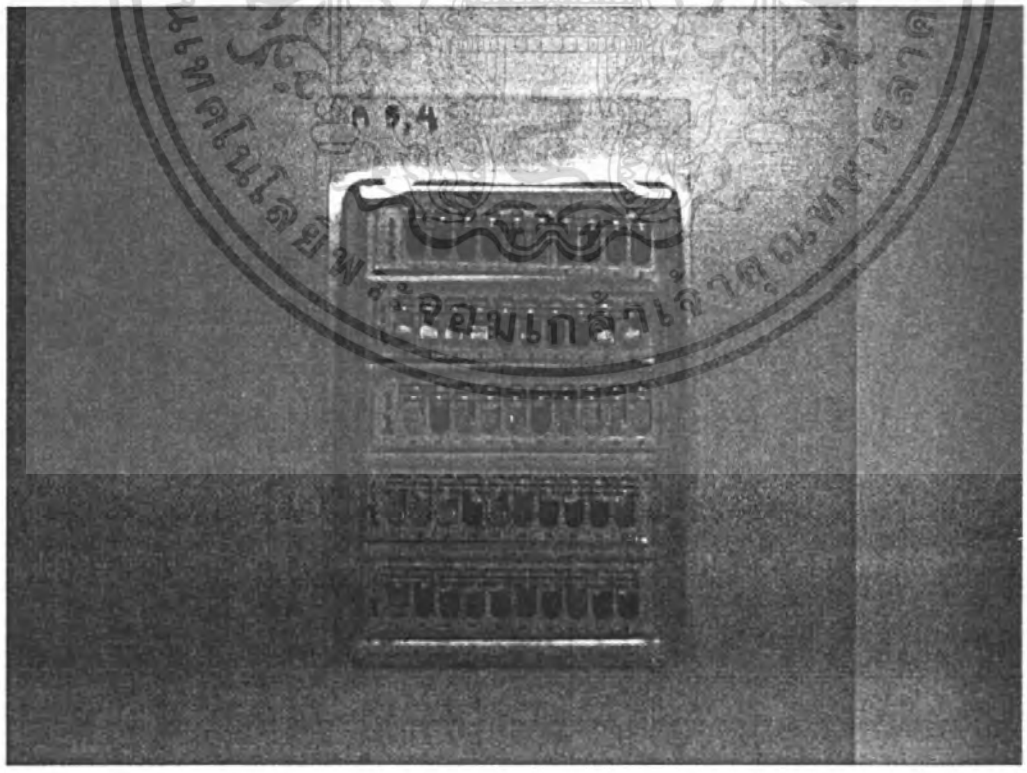


ภาพที่ 5 การปิดด้วยพาราฟินออยล์ เพื่อให้อยู่ในสภาพไร้อากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

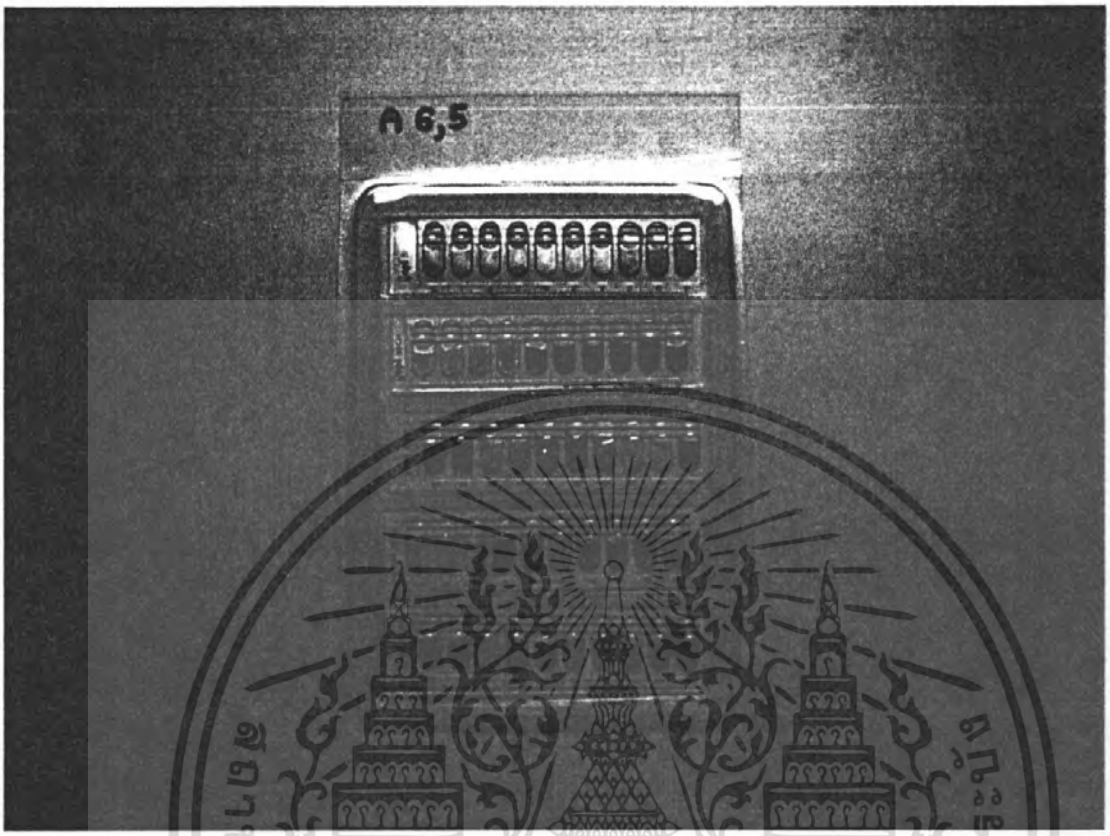


ภาพที่ 6 ลักษณะการหมักน้ำตาลที่ 0 ชั่วโมง



ภาพที่ 7 ลักษณะการหมักน้ำตาลที่ 24-48 ชั่วโมงของเชื้อสายพันธุ์ A5-4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 8 ลักษณะการหมักน้ำตาลที่ 24-48 ชั่วโมงของเชื้อสายพันธุ์ A6-5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้