สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ผลของ Tween 80 ต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางชนิด (Effect of Tween 80 on growth and bacteriocin production of some lactic acid bacteria)

จัดทำโดย

นางสาวปัทมา อยู่เกษ **รหัสนักศึกษา45040796**

นางสาวลลิตาภรณ์ ใคร่ครวญ **รหัสนักศึกษา45040806**

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

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

(ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ผลของ Tween 80 ต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางชนิด (สายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pediocin PA-1)

Effect of Tween 80 on growth and bacteriocin production of some lactic acid bacteria

T097062

นางสาวปัทมา อยู่เกษ รหัสนักศึกษา 45040796
นางสาวลลิตาภรณ์ ใคร่ครวญ รหัสนักศึกษา 45040806

ปก
ว.E2211
ส347
เลขหมู่ .....
หนังสือ 57062
เล่ม .....

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัทมา อยู่เกษ และลสิตาภรณ์ ใคร่ครวญ. ผลของ Tween 80 ต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางชนิด (Effect of Tween 80 on growth and bacteriocin production of some lactic acid bacteria). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์, 72 หน้า

บทคัดย่อ

จากผลของ Tween 80 ความเข้มข้นต่างๆ (0 , 0.1 , 0.5 และ 1.0 %) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 , *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 และ *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IO-1 JCM 7638 เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยบ่มที่อุณหภูมิ °ซ. เป็นเวลา ชม. พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% ให้ผลได้ใกล้เคียงกับในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มากที่สุด เมื่อเทียบกับที่ความเข้มข้นอื่นๆ โดยสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่พบใน MRS หลังบ่ม คือ 8.22 CFU/ml และในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% เป็นส่วนประกอบ พบปริมาณเชื้อ 8.15 CFU/ml ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มี Tween 80 ที่ความเข้มข้น 0 , 0.5 , 1.0% มีอัตราการเจริญของเซลล์เพียง 7.70 , 7.95 , 8.08 CFU/ml ตามลำดับ สำหรับ *Lc. lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 พบปริมาณเชื้อใน MRS หลังบ่ม คือ 8.19 CFU/ml และในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% พบปริมาณเชื้อ 8.08 CFU/ml ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มี Tween 80 ที่ความเข้มข้น 0 , 0.5 , 1.0% มีอัตราการเจริญของเซลล์เพียง 7.96 , 7.94 , 7.78 CFU/ml ตามลำดับ และ *Lc lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 พบปริมาณเชื้อใน MRS หลังบ่ม คือ 8.24 CFU/ml และในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% พบปริมาณเชื้อ 8.21 CFU/ml ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มี Tween 80 ที่ความเข้มข้น 0 , 0.5 , 1.0% มีอัตราการเจริญของเซลล์เพียง 8.16 , 8.05 , 8.06 CFU/ml ตามลำดับ

ส่วนความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin activity) ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์นั้นก็มีแนวโน้มในทางเดียวกับการเจริญของเซลล์ ยกเว้นสายพันธุ์ *Lc lactis* subsp *lactis* IO-1 JCM 7638 กล่าวคือ เชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lc. lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 ผลิตสารแบคเทอริโอซิน โดยมีค่า Bacteriocin activity ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% เท่ากับ 17066.67 และ 16000.00 Au/ml^{-1} ตามลำดับ *P pentosaceus* TISTR 536 ผลิตสารแบคเทอริโอซิน โดยมีค่า Bacteriocin activity ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

MRS และอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP โดยมีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% เท่ากับ 12800.00 และ 12800.00 (Au/ml)^{3} ตามลำดับ แต่ *Lc. lactis* subsp *lactis* IO-1 JCM 7638 ผลิตสารแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% เป็นส่วนประกอบ คือ 25600.00 และ 6400.00 (Au/ml)^{4} ตามลำดับ

จากการศึกษานี้สรุปได้ว่า สามารถใช้ GYP ร่วมกับ 0.1% Tween 80 เป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อสำหรับเก็บเกี่ยวเซลล์แบคทีเรียแลคติกแทน MRS ได้ แต่การใช้อาหาร GYP ร่วมกับ 0.1% Tween 80 เพื่อหาความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมกับสายพันธุ์อื่นๆอีกต่อไป

ปัทมา อยู่เกษ ....

ลลิตาภรณ์ ไกรวาณิ ..../...../.....

ลายมือชื่อนักศึกษา ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา วัน / เดือน / ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง พ.ศ.2548 โดยมี ผศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา

ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องจากได้รับคำแนะนำคำปรึกษาและการแก้ไขปัญหาต่าง ๆ จากอาจารย์ที่ปรึกษา ขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูงที่ให้กำลังใจเสมอมา นอกจากนี้ต้องขอขอบพระคุณ ดร. วริพัสย์ อารีกุล ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าในการเข้าฟังการนำเสนอโครงร่างปัญหาพิเศษ ให้คำแนะนำแก้ไขและเพิ่มเติมข้อมูลให้รายงานฉบับนี้ถูกต้องและสมบูรณ์มากขึ้น จึงขอขอบพระคุณมา ณ โอกาสนี้ด้วย

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่สนับสนุนด้านกำลังทรัพย์และกำลังใจที่มีค่ายิ่ง สุดท้ายนี้ก็ขอขอบคุณตัวเองและคู่ปัญหาพิเศษที่รับผิดชอบและช่วยกันทำให้ปัญหาพิเศษครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ปัทมา อยู่เกษ

ลสิตาภรณ์ ใคร่ครวญ

21 กุมภาพันธ์ 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญตารางภาคผนวก	ช
สารบัญตารางภาคผนวก(ต่อ)	ซ
สารบัญภาพ	ฌ
สารบัญภาพภาคผนวก	ญ
บทนำ	
1. บทนำ	1
2. วารสารปริทัศน์	2
2.1 แบคทีเรียแลคติก	2
2.1.1 คุณลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป	2
2.1.2 แหล่งที่พบ	3
2.1.3 ความสำคัญ	3
2.2 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก	3
2.2.1 กรดอินทรีย์	4
2.2.2 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์	4
2.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์	5
2.2.4 ไดอะซีทิล	5
2.2.5 อะซีทัลดีไฮด์	5
2.3 แบคเทอริโอซิน	5
2.4 การใช้ประโยชน์แบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร	14
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างและกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน	19
2.6 การศึกษาถึงแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินในประเทศไทย	21
2.7 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน	24
2.8 เชื้อแบคทีเรียในจีเนียสลิสทีเรีย (Genus Listeria)	28
2.9 Tween	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ(ต่อ)

เรื่อง		หน้า
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง		32
3.1 อุปกรณ์		32
3.2 สารเคมี		32
3.3 เชื้อจุลินทรีย์		32
3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง		33
3.5 ศึกษาผลของ Tween 80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ใน GYP broth ของกล้าเชื้อแบคทีเรีย แลคติก สายพันธุ์ ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pedocin PA-1		33
3.6 ขั้นตอนการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้ง เชื้อ *Listeria innocua*		34
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง		35
4.1 ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 ต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้า		35
4.2 ผลการศึกษาของ Tween 80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pedocin PA-1		38
5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ		39
เอกสารอ้างอิง		40-48
ภาคผนวก		49
ภาคผนวก ก	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	49-51
ภาคผนวก ข	ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 ต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้า	52-64
ภาคผนวก ค	ผลการศึกษาของ Tween 80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pedocin PA-1	65-67
ภาคผนวก ง	ภาพแสดงวิธีการทดลองและภาพแสดงผลการทดลอง	68-72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ	7
2	แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งแยกได้จากอาหารชนิดต่าง ๆ	13
3	แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งแยกได้จากปลาและผลิตภัณฑ์	14
4	แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและทีทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งถูกยับยั้งโดย แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่าง ๆ	16
5	ผลการทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่าง ๆ	17
6	การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับวิธีการถนอมอาหารแบบต่าง ๆ	18
7	การเปรียบผลการใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 และน้ำคลั่นเป็น ตัวทำเจือจางในการหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน	31
8	จำนวนการเจริญของเซลล์สูงสุด (Log CFU/ml) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ	36
9	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ	37
10	ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/ml)[a] ของแบคทีเรียแลคติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางที่		หน้า
ตารางภาคผนวก ข1 :	แสดงการคำนวณปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ของผลการทดลองครั้งที่ 1	52
ตารางภาคผนวก ข2 :	แสดงการคำนวณปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ของผลการทดลองครั้งที่ 2	53
ตารางภาคผนวก ข3 :	แสดงการคำนวณปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ของผลการทดลองครั้งที่ 3	54
ตารางภาคผนวก ข4 :	แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 ของผลการทดลองครั้งที่ 1	55
ตารางภาคผนวก ข5 :	แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 ของผลการทดลองครั้งที่ 2	56
ตารางภาคผนวก ข6 :	แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 ของผลการทดลองครั้งที่ 3	57
ตารางภาคผนวก ข7 :	แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 ของผลการทดลองครั้งที่ 1	58
ตารางภาคผนวก ข8 :	แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-I JCM 7638 ของผลการทดลองครั้งที่ 2	59
ตารางภาคผนวก ข9 :	แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638ของผลการทดลองครั้งที่ 3	60
ตารางภาคผนวก ข10 :	ผลการคำนวณของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536	61
ตารางภาคผนวก ข11 :	แสดงผลการคำนวณของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497	62
ตารางภาคผนวก ข12 :	แสดงผลการคำนวณของ *Lactococcus lactis* subsp *lactis* IO-1 JCM 7638	63
ตารางภาคผนวก ข13 :	แสดงค่าของ pH ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus TISTR 536*	64
ตารางภาคผนวก ข14 :	แสดงค่าของ pH ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497	64
ตารางภาคผนวก ข15 :	แสดงค่าของ pH ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638	64

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตารางภาคผนวก(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

ตารางภาคผนวกที่ ค1 : ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินของ *Pediococcus pentosaceus TISTR 536* ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ 65

ตารางภาคผนวกที่ ค2 : ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ 66

ตารางภาคผนวกที่ ค3 : ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แบบจำลองการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซิน ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก	12
2	การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ คัดเลือกไว้ด้วยวิธี critical dilution assay	28
3	สูตรโครงสร้างของ Tween 80	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพภาคผนวก

ภาพที่ หน้า

ภาพผนวกที่ ง1 : แสดงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth และ GYP broth ที่ทำการในการเพาะเชื้อแบคทีเรียแลคติก 68

ภาพผนวกที่ ง2 : แสดงลักษณะการบ่มเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ Spread plate แล้วใน Candle jar 68

ภาพผนวกที่ ง3 : แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 68

ภาพผนวกที่ ง4 : แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 69

ภาพผนวกที่ ง5 : แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 69

ภาพผนวกที่ ง6 : แสดงลักษณะของอัตราส่วนระดับการเจือจางต่าง ๆ ในหลอด Appendorf เพื่อทำการตรวจหา Bacteriocin activity 69

ภาพผนวกที่ ง7 : แสดงลักษณะของ Bacteriocin activity ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 70

ภาพผนวกที่ ง8 : แสดงลักษณะของ Bacteriocin activity ของเชื้อ *Lactococcus lactus subsp. lactis* NCDO 497 70

ภาพผนวกที่ ง9 : แสดงลักษณะของ Bacteriocin activity ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 70

ภาพผนวกที่ ง10 : *Pediococcus pentosaceus* 71

ภาพผนวกที่ ง11 : *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* 71

ภาพผนวกที่ ง12 : *Listeria monocytogenes* 72

ภาพผนวกที่ ง13 : *Listeria monocytogenes* 72

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ในอดีตการศึกษาถึงการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินนั้น โดยทั่วไปส่วนใหญ่จะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกดังกล่าว แต่เนื่องจากว่ามีราคาสูง ส่งผลให้ต้นทุนทางด้านราคาก็สูงมากขึ้นด้วยเช่นกัน จึงทำให้ในปัจจุบันนั้นได้เริ่มมีการลองเปลี่ยนทางเลือกใหม่ โดยการเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GYP เข้ามามีบทบาท และทางเลือกอีกทางหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทมากในขณะนี้ก็คือ การใช้ Tween 80 เป็นส่วนผสมร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP เนื่องจากว่า Tween 80 นั้นสามารถช่วยในการเจริญของเชื้อได้ โดยจะไปช่วยลดแรงตึงผิว (ST) ระหว่างพื้นผิวของของแข็งกับของเหลว และยังมีราคาถูกกว่าอีกด้วย

นอกจากนี้ Tween 80 ยังจัดเป็น generally recognized as safe (GRAS) ซึ่งด้วยเหตุนี้เองจึงทำให้ Tween 80 ได้กลายมามีบทบาทอีกตัวหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ กล่าวคือ ได้มีการนำ Tween 80 มาใช้เป็นตัว emulsifier เช่น Polysorbate 80 หรือนำมาใช้ในลักษณะที่เป็น Food additive เช่น ผลิตภัณฑ์พวก Ice Cream , Cottage Chesse , Shortenings , Whipped และ Toppings เป็นต้น

วัตถุประสงค์

ศึกษาผลของการเจริญและการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 (Nisin A) , *Lactococcus lactis* subsp *lactis* NCDO 497 (Nisin Z) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (Pediocin PA-1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีอยู่ในเชิงการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 แบคทีเรียแลคติก

2.1.1 คุณลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือเป็นท่อนยาว ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophilic) ไม่มีไซโทโครม มีปริมาณเบส G+C น้อยกว่า 50 เปอร์เซ็นต์โมล ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) แต่อาจพบการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลสได้ (pseudocatalase enzyme) โดยเฉพาะในสภาวะการเจริญที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่น้อย สามารถทนต่อสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ต่ำกว่า 5 อุณหภูมิสูงกว่า 37-40 องศาเซลเซียส รวมทั้งต้องการสารประกอบไนโตรเจนที่มีความซับซ้อนเพื่อใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนและวิตามินสำหรับ การเจริญและการสร้างกรดอินทรีย์ (Pot *et al*., 1994 ; Ringo and Gatesoupe, 1998) โดยแบคทีเรียแลคติกต้องการพลังงานสำหรับการเจริญจากกระบวนการการหมัก (*Fermentation*) คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคส ซึ่งกระบวนการหมักสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ (Litchfield, 1996 ; Holzapfel and Wood, 1995) คือ

2.1.1.1 Homofermentation เป็นกระบวนการหมักกลูโคสแล้วได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก เช่น ที่พบใน *Enterococcus faecalis* , *Lactobacillus casei* , *Lactobacillus delbrueckii* , *Lactobacillus plantarum* , *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งกลไกการเกิดกรดแลคติกจะเป็นไปตาม glycolysis (Embden – Meyerhof – Parnas) pathway คือ การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) แล้วจึงเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์ แล็กเทตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) (Schlegel , 1993 ; Holzapfel and Wood , 1995)

2.1.1.2 Heterofermentation เป็นกระบวนการหมักที่จะเกิดกรดแลคติกเพียงบางส่วน ที่เหลือเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือกรดแอซีติก เช่นที่พบใน *Lactobacillus brevis* , *Lactobacillus bifermentans* , *Lactobacillus fermentum* , *Leuconostoc lactis* , *Leuconostoc mesenteroides* เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับ glycolysis pathway ซึ่งกลไกการเกิดกรดแลคติกและสารอื่น ๆ นั้นจะเป็นไปตาม pentose phosphate pathway และ glycolysis pathway (Schlegel , 1993 ; Holzapfel and Wood , 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 แหล่งที่พบ ตามปกติสามารถพบแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในอาหารประเภทต่าง ๆ เช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ผักและผลไม้ นมและผลิตภัณฑ์ อาหารที่ผ่านกระบวนการหมักชนิดต่าง ๆ นอกจากนี้ยังพบในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร สิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงในน้ำเน่าเสียจากแหล่งต่าง ๆ อีกด้วย (Pot *et al.*, 1994 ; Sarkar and Banerjee, 1996 ; Stiles and Holzapfel, 1997)

2.1.3 ความสำคัญ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติซึ่งน่าสนใจทั้งในด้านเศรษฐกิจ รวมถึงสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์ เช่น ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแล็กโทส การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ความสามารถในการต้านทานต่อแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) การสร้างแบคเทอริโอซินและคุณสมบัติทางด้านอิมมูโนวิทยา (McKay *et al.*, 1983) ช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านโภชนาการของอาหาร กระตุ้นกระบวนการสร้างวิตามิน ป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องทางเดินปัสสาวะ ลดระดับคอเลสเทอรอล (cholesterol) ในกระแสเลือด ลดความเป็นพิษจากสารก่อมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (Gilliland, 1990) นอกจากนี้ De Vuyst และ Vandamme (1994) ได้กล่าวถึงความสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกต่ออุตสาหกรรมการหมักไว้ว่า เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่สร้างสารพิษหรือผลผลิตที่เป็นพิษ มีคุณสมบัติที่ต้องการอกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อยและสามารถทนต่อสภาวะที่ที่ออกซิเจนได้ดี จึงไม่ต้องการกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน มีการเจริญที่รวดเร็วจึงใช้ระยะเวลาในกระบวนการผลิตสั้น เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นเวลานาน จึงมีขั้นตอนและวิธีการสำหรับการเลี้ยงเชื้อในการขยายขนาดการผลิตอยู่แล้ว สามารถใช้สารตั้งต้นในการผลิตที่มีราคาถูก การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียและแบคทีเรียอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการผลิต นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดยังสามารถสร้างและหลั่งโปรตีนออกมาภายนอกเซลล์ได้

2. 2 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งปะปนมากับอาหาร เช่น *B cereus, Clostridium botulinum, C perfringens, S. aureus, Listeria monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (Abee , 1995 ; Franz *et al.*, 1998 ; DeVuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติกและ กรดแอซีติก รวมทั้งยังมีสารชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติกและกรดแอซีติก แต่มีผลใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid), แอมโมเนีย (ammonia), เอทานอล (ethanol), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide), ไดอะซีทิล (diacetyl), อะซีโตอิน (acetoin), อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde), เบนโซเอต (benzoate), เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (bacteriolytic enzyme) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (De Vuyst and Vandamme , 1994 ; Abee , 1995 ; Franz et al., 1998 ; McMullen and Stiles, 1996 ; Schillinger et al., 1996 , Eckner , 1992) นอกจากนี้การที่ มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จะเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อมคือ จะทำให้เกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหารและการใช้พื้นที่สำหรับการเจริญ (Adams, 1999) โดยสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่

2.2.1 กรดอินทรีย์ กรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ กรดแลคติกซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเป็นผลที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะมีการเปลี่ยนไพรูเวต (pyruvate) ไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรด-เบส ในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลคติกสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อเจอสภาพภายในเซลล์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลคติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ต่าง ๆ ภายในเซลล์ (De Vuyst and Vandamme , 1994)

2.2.2 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ โดยยังพบอีกว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นอกจากจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยตรงแล้วยังสามารถไปรวมตัวกับสารอื่น ๆ และเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย (De Vuyst and Vandamme , 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 คาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentation โดยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบ ๆ ทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจนโดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสภายในเซลล์ และรอบ ๆ เซลล์ลดลงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย (De Vuyst and Vandamme , 1994)

2.2.4 ไดอะซีทิล หรือ 2, 3-butanedione เป็นผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของไพรูเวต โดยแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วยจะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไดอะซีทิลและอะซีโตอิน โดยไดอะซีทิลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไดอะซีทิลจะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบโดยไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine-binding protein (De Vuyst and Vandamme , 1994)

2.2.5 อะซีทัลดีไฮด์ โดยสารดังกล่าวจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเมแทบอลิซึม ของคาร์โบไฮเดรตแบบ heterofermentation ของแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและขับ acetaldehyde ออกมาภายนอกเซลล์ ส่วนผลของ acetaldehyde ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นั้นยังไม่มีรายงานการศึกษามากนัก เพียงแต่มีการรายงานว่า *acetaldehyde* ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10-100 ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เช่น *E. coil*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Typhimurium ได้ (De Vuyst and Vandamme , 1994)

2.3. แบคเทอริโอซิน

2.3.1 ประวัติความเป็นมาและความหมายของแบคเทอริโอซิน

ในระยะเริ่มต้นของการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินพบว่า *E coil* V สามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีนออกมายับยั้งการเจริญของ *E coil* ได้ และเรียกสารดังกล่าวว่า colicins ต่อมามีการค้นพบสารที่มีลักษณะคล้าย colicin ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวกจึงมีการเรียกสารกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) โดยในระยะแรกพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีคุณสมบัติในการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำลายเฉพาะแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ในสปีชีย์ (species) เดียวกันเท่านั้น (Jacob *et al*., 1953) ต่อมา Tagg *et al*. (1976) ได้ให้คำกำจัดความของแบคเทอริโอซินว่าเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีลักษณะดังนี้ (1) มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินออกมา (2) การออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการยับยั้งเกิดการตาย (bactericidal mode of action) (3) มีตำแหน่งที่จำเพาะในการยึดจับกับเซลล์เป้าหมาย (4) ยีนที่ควบคุมการสร้างและการต้านทานของเซลล์ต่อแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นอยู่บนพลาสมิด (plasmid) (5) เซลล์ที่สร้างจะถูกทำลายขณะที่มีการปลดปล่อยแบคเทอริโอซินออกนอกเซลล์ แต่พบว่ามีผลการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินชนิดต่าง ๆ ที่ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับคำกำจัดความข้างต้น เช่น leucocin A – UAL 187 และ leucocin S สามารถยับยั้งได้เฉพาะการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทดสอบได้เท่านั้น (Hastings and Stiles , 1991 ; Lewus and Montville. , 1992) ไนซิน (nisin) ซึ่งสร้างจาก *Lc. lactis* สามารถทำลาย *S. aureus* และเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ (Andersson , 1986) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการสร้าง แบคเทอริโอซินภายในเซลล์ของแบคทีเรียเหมือนกับการสร้างโปรตีนทั่วที่ผลิตจากไรโบโซม ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการลอกแบบ (transcription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่น ไนซิน , lactocin , helveticin J , lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin , lacticin 481 , lactococcins , pediocins , sakacin A และ lactacin B (De Vuyst and Vandamme , 1994 ; Joerger and Klaenhammer , 1986 ; Stiles and Hastings , 1991 ; Lyon and Glatz , 1993) ดังนั้นคำนิยามของแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันคือ สารประกอบโปรตีนซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีความไวต่อสารดังกล่าวและไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (Konisky , 1982 ; De Vuyst and Vandamme , 1994)

ในการศึกษาวิจัยทางด้านสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยทั่วไปอาจจะมีความสับสนหรือไม่แน่ใจระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ ซึ่ง Cleveland และคณะ (2001) ได้สรุปความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะไว้ ดังแสดงในตารางที่ 1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคเทอริโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตโดยผ่านกระบวนการที่เป็น secondary metabolite
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	โดยปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	โดยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ลักษณะของปฏิกิริยาบนเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นสารพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา : Cleveland และคณะ (2001)

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยชนิดกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกนมบวก (Jack *et al.*, 1995) โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบได้มีการศึกษากันในด้านต่างๆ ได้แก่ โครงสร้างของโปรตีน กิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมาย กระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ที่ผลิต กลไกการเข้าทำลายและตำแหน่งของการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมายรวมถึงระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เป้าหมาย ตัวอย่างเช่น colicins ซึ่งผลิตโดย *E. coli* และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ชนิดอื่นๆ หรือ microcins ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ (De Vuyst and Vandamme , 1994) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกพบว่ามีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบคือ มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้หลายชนิดรวมทั้งเซลล์เป้าหมายจะมีการต้านทานน้อยและไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลาย นอกจากนี้การควบคุมการผลิตภายในเซลล์ถูกควบคุมได้ทั้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากพลาสมิดและโครโมโซม (Tagg *et al.*, 1976) โดยในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ได้หลายชนิด โดยเฉพาะแบคเทอริโอซิน ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวเป็นสายเพปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็กและในแบคเทอริโอซิน บางชนิด เช่น ไนซิน อาจพบกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบในโปรตีนปกติทั่วไป เช่น dehydroalanine , dehydrobutyrine โดย แบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลรวมถึงมีโครงสร้างของโมเลกุลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) ที่แตกต่างกันด้วย (Kleinkauf and von Dohren , 1987) โดย Montville และ Kaiser (1993) ได้รวบรวมชนิดของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชนิดต่าง ๆ ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินไว้ได้แก่ *Acetobacter* , *Actinobacillus* , *Bacillus* , *Brevibacterium* , *Clostridium* , *Enterococcus* , *Erwinia* , *Haemophulus* , *Haloferax* , *Lactobacillus* , *Lactococcus* , *Listeria* , *Leuconostoc* , *Pseudomonas* , *Pediococcus* , *Salmonella* , *Propionibacterium* , *Serratia* , *Staphylococcus* , *Shigella* , *Streptococcus* และ *Yersinia*

2.3.2 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน

Klaenhammer (1993) ได้แบ่งประเภทของแบคเทอริโอซินโดยพิจารณาจากชนิดของกรดอะมิโน มวลโมเลกุล โครงสร้างพื้นฐานและพันธะต่าง ๆ ภายในโมเลกุล รวมถึงคุณสมบัติด้านอื่น ๆ เช่น คุณสมบัติในการทนความร้อน ทำให้สามารถจัดแบ่งแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกได้เป็น 4 กลุ่ม คือ

1. กลุ่ม Lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่ลักษณะเป็นสายเพปไทด์ขนาดเล็กประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19-38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน ซึ่งกระบวนการสร้างสายเพปไทด์ภายในเซลล์ต้องผ่านกระบวนการที่เรียกว่า post-translation modification โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตัวก่อนที่จะส่งออกภายนอกเซลล์ จึงทำให้ในสายเพปไทด์มีกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนที่พบโดยทั่วไป เช่น didehydroalanine และ didehydrobutyrine ซึ่งเกิดจากกระบวนการ dehydration ของ serine และ threonine ตามลำดับ นอกจากนี้ภายในสายเพปไทด์แต่ละสายยังมีโครงสร้างลักษณะเป็นวงแหวนย่อย ๆ ที่เกิดจากการสร้าง thioether bridge ระหว่าง lanthionine หรือกรดอะมิโนซีสเทอีนกับกรดอะมิโน didehydrobutyrine ที่มีชื่อเรียกว่า β-methyl lanthionine ซึ่งแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้เป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน โดย Twomey และคณะ (2002) ได้รวบรวมตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ไว้ เช่น nisin A ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* ATCC 11454 , nisin Z ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* N8 , lactocin S ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สร้างจาก *Lactobacillus sake* L45 , plantaricin W ที่สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* LMG 2379 , cytolysin ที่สร้างจาก *Enterococcus faecalis* FA22

2. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่มีขนาดของโมเลกุลเล็ก โดยภายในโมเลกุลจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวนระหว่าง 20-60 โมเลกุล เป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่ทนความร้อนได้ดีและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้น้อยชนิด (narrow spectrum) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณของเบส G+C ต่ำ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก Listeria และ Clostridium ได้ดี (Hechard and Sahl , 2002) ซึ่งสามารถแบ่งแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

ก. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่สามารถทำลาย *Listeria* sp. ได้ดี ซึ่งในบางครั้งถูกเรียกว่ากลุ่ม pediocin-like bacteriocins โดยพบว่าในขั้นตอนแรกแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จะถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะที่เป็นสายเพปไทด์ตั้งต้น (precursor peptide) ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยการตัดสายเพปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกัน ได้เป็นสายเพปไทด์ที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ที่ปลายด้าน N ในสายเพปไทด์ของแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดในกลุ่มนี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะเหมือนกัน (conserved N-terminal sequence) ได้แก่ Try-Gly-Asn-Gly-Val และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซีสเทอีน 2 โมเลกุลที่อยู่ค่อนมาทางปลายด้าน N ของสายเพปไทด์ในแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีความเหมือนกันถึงระหว่าง 40-70 เปอร์เซ็นต์ (Nes and Holo , 2000) ซึ่งตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น pediocin AcH ที่สร้างจาก *Pediococcus acidilactici* H , sakacin A ที่สร้างจาก *Lactobacillus sake* Lb 706 , mundticin ที่สร้างจาก *Enterococcus mundtii* AT06 และ piscicocin V1a ที่สร้างจาก *Carnobacterium piscicola* V1 (Ennahar *et al.*, 2000)

ข. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน (two-peptide bacteriocin) ซึ่งสายเพปไทด์อาจแสดงกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายเพียงเส้นใดเส้นหนึ่งหรือทั้งสองเส้น แต่ในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายจะมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเพปไทด์ทั้งสองเส้น เช่น brochocin A และ B ที่สร้างจาก *Brochothrix campestris* ATCC 43754 , enterocin 1071A และ B ที่สร้างจาก *Enterococcus faecalis* BFE 1071 , lactococcins G α และ β ที่สร้างจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactococcus lactis LMG 2081 , plantaricin E และ F ที่สร้างจาก *Lactobacillus plantarum* C-11 (Garneau *et al.*, 2002)

3. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่และไม่ทนความร้อน เป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่มที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า 15,000 ดาลตัน และเป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่มีคุณสมบัติไม่ทนต่อความร้อน เช่น helveticins J , acidophilucin A , lactacins A , lactacins B (Klaenhammer , 1993)

4. กลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่น ๆ เช่น ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต

2.3.3 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซิน เกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมารวมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่าง ที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) ดังแสดงในแบบจำลองภาพที่ 1 โดยรูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ (Klaenhammer , 1993 ; Abee , 1995 ; Jack *et al.*, 1995 ; Ennahar *et al* ., 2000) ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคเทอริโอซิน เช่น colicins ที่สร้างจาก *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ จะเป็นโปรตีนขนาดใหญ่ประมาณ 40-70 กิโลดาลตัน และยีนที่ควบคุมการสร้าง colicins จะอยู่บน พลาสมิด โดย *E coli* จะสร้าง colicins แล้วปลดปล่อยออกสู่ภายนอกเซลล์ในช่วงการเจริญระยะ exponential (Montville and Kaiser, 1993) เมื่อศึกษาโครงสร้างแบบ 3 มิติของ colicins พบว่าโครงสร้างของโปรตีนภายในโมเลกุลจะจัดเรียงตัวเป็น 3 กลุ่ม ซึ่งแต่ละกลุ่มจะมีกิจกรรมและหน้าที่ต่างกันออกไปในแต่ละขั้นตอนของการทำลายแบคทีเรียเป้าหมาย (Brunden *et al.*, 1984) ซึ่งกลไกการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแบ่งเป็น 3 ขั้นตอนคือ (1) บริเวณตรงกลางโมเลกุลของ colicins จะทำหน้าที่ในการจับกับตำแหน่งที่จำเพาะบนผิวเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย (2) บริเวณปลายด้าน N (N-terminal) จะทำหน้าที่เคลื่อนย้ายโมเลกุลของ colicins ผ่านเยื่อหุ้มของเซลล์เป้าหมาย (3) บริเวณปลายด้าน C (C-terminal) จะทำหน้าที่ในการทำลายเซลล์เป้าหมาย (Montville and Kaiser, 1993 ; Postle and Skare, 1988) ซึ่งสาเหตุที่ทำให้เซลล์เป้าหมายของ colicins ตายเกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่วและทำให้เกิดการสูญเสียแรงในการขับเคลื่อนโปรตอนผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งจะเหมือนกับที่พบในแบคเทอริโอซินชนิดอื่น ๆ นอกจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

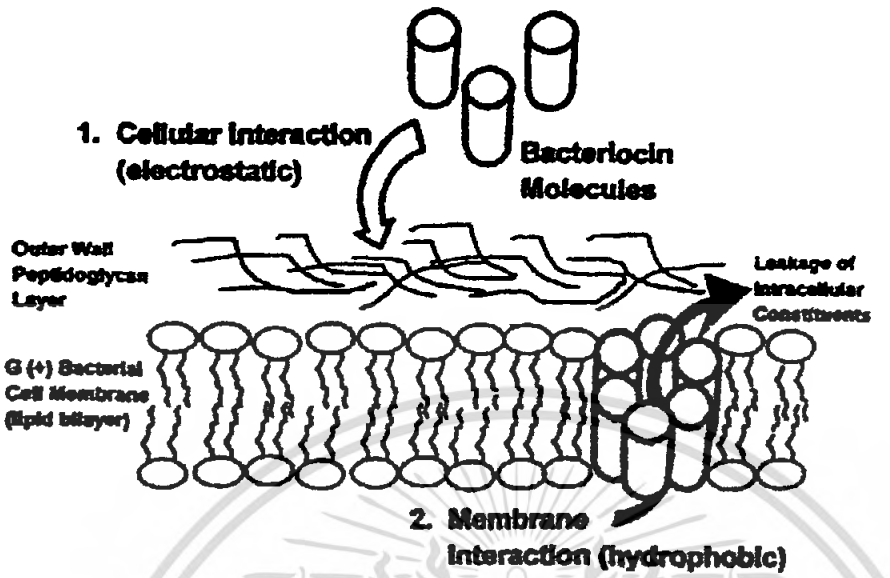
นี้ colicins ยังสามารถยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอของเซลล์เป้าหมาย (Nes and Holo, 2000) รวมถึงยังทำให้เซลล์เป้าหมายเกิดการเสียโครงรูปไป (Schaller *et al.*, 1981)

ส่วนไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lc lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเพปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกและมีขั้นตอนในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย คือ การเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ ในกรณีที่เป็นสปอร์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วในระหว่างที่สปอร์เกิดการงอกออกมาและยังพบว่าไนซินที่ความเข้มข้นสูง ๆ สามารถยับยั้งการสร้างเพปทิโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* และ *E. coli* ได้ (Davidson and Hoover, 1993 ; De Vuyst and Vandamme, 1994)

นอกจากนี้ในแบคเทอริโอซินกลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อนพบว่าในขั้นตอนแรกปลายด้าน N ของโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งมีประจุลบโดยแรงทางไฟฟ้าสถิตย์ (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al.*, 2000)

แบคเทอริโอซินนอกจากจะมีผลในการฆ่าทำลายเซลล์เป้าหมาย (bactericidal) แล้วยังอาจมีผลในการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วย ดังเช่นที่พบใน leuconocin S ซึ่งแบคเทอริโอซินจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้นมักขึ้นอยู่กับ ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน สภาพแวดล้อม ชนิดและปริมาณของเป้าหมาย (De Vuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคัดแยกได้จากอาหารชนิดต่าง ๆ รวมถึงที่คัดแยกได้จากปลาและผลิตภัณฑ์ ดังแสดงในตารางที่ 2 และตารางที่ 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 แบบจำลองการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

(Model of pore formation on cell membrane of target strain by bacteriocin from lactic acid bacteria.)

ที่มา : Muriana (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งแยกได้จากอาหารชนิดต่าง ๆ

แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Carnocin LV17	*Carnobacterium piscicola* LV17	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Carnocin UI49	*C piscicola* UI149	ปลา
Carnocin CP5	*C. piscicola* CP5	เนยเหลว
Piscicolin 61	*C. piscicola* LV61	เนื้อวัว
Enterocin 226NWC	*Enterococcus faecalis* 226	เนยที่ทำจากหางนมของกระบือ
Enterocin 6E	*Enterococcus faecium* 6E,	เนย
Enterocin 01	E. *faecium* NA 01	น้ำนมเปรี้ยวของประเทศไนจีเรีย
Enterocin RZS C5	*E. faecium* RZS C5,	เนยและอาหารสัตว์ที่ได้จากการหมัก
Enterocin CRL 35	*E. faecium* CRL35	เนย
Acidocin A	*Lactobacillus acidophilus* TK9201	น้ำนมวัวหมัก
Bavaricin MN	*Lb bavaricus* MN	เนื้อวัว
Curvaticin FS47	*Lb. curvatus* FS47	เนื้อวัวบด
Curvaticin 13	*Lb. curvatus* SB13	ไส้กรอกแบบกึ่งแห้ง
Plantaricin C19	*Lb. plantarum* C19	แตงกวาดอง
Plantaricin F	*Lb. plantarum* BF001	ปลาแล่
Sakacin A	*Lb. sake* LB 706	เนื้อวัว
Sakacin 148	*Lb. sake* 148	ไส้กรอกหมักแบบแห้งของประเทศสเปน
Sakacin P	*Lb. sake* LTH673	เนื้อวัว
Curvacin A	*Lb curvatus* LTH1174	ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์
Nisin	*Lactococcus lactis* BB24 & G18	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Carnosin 44A	*Leuconostoc carnosum* LA44A	ไส้กรอกแบบเวียนนา
Carnocin 54	*Ln. carnosum* LA54A	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Leucocin B-Talla	*Ln. carnosum* Talla	เนื้อวัวแปรรูปที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Leucocin A-UAL 187	*Ln gelidum* UAL187	เนื้อวัวแปรรูปที่บรรจุในสภาพปรับสภาวะบรรยากาศ
Mesenterocin Y 105	*Ln mesenteroides* Y105	น้ำนมแพะ
Mesenterocin 52	*Ln. mesenteroides* FR 52	น้ำนมวัวดิบ

ที่มา : รวบรวมและดัดแปลงจาก Muriana (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งแยกได้จากปลาและผลิตภัณฑ์

แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ	แหล่งที่มา
Carnocin UI49	*Carnobacterium piscicola*	เนื้อปลาสด	Stoffels *et al.* (1992)
Divercin V41	*Carnobacterium divergens* V41	ปลาหมึกแช่เย็น	Pilet *et al.* (1995)
Piscicocin V1	*C piscicola* V1	ปลาหมักแช่เย็น	Pilet *et al* (1995)
Plantaricin F	*Lactobacillus plantarum* BF001	ปลาดุกแปรรูปแช่เย็น	Fricourt *et al.* (1994)
-	*C piscicola* SF668	ปลาแซลมอนรมควันแช่เย็น	Duffes *et al* (1999)
-	*Enterococcus faecium*	เนื้อปลาคอลแล่ดองเกลือ	Ben Embarek *et al* (1994)
-	*Leuconostoc mesenteroides*	ปลาแมกคาเรลรมควัน	Kelly *et al.* (1996)
-	*Pediococcus acidilactici*	ลำไส้ปลาขี่สกเทศ	Halami *et al* (1999)

หมายเหตุ เครื่องหมาย – หมายถึงยังไม่ได้มีการตั้งชื่อแบคเทอริโอซินที่พบ

ที่มา : พงษ์เทพ (2547)

2.4 การใช้ประโยชน์แบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันการถนอมอาหารโดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์โดยการไปแข่งขันในการใช้สารอาหาร รวมทั้งสร้างสารยับยั้งบางชนิดออกมา (Schillinger *et al*, 1996) ซึ่งในกลุ่มของสารยับยั้งพบว่าแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะไนซินเป็นสารที่ได้รับการยอมรับทั้งในด้านความปลอดภัยโดย FDA (Eckner, 1992) และ FAO/WHO (Schillinger *et al*, 1996) ซึ่งพบว่าไนซินมีการผลิตขายในทางการค้ารวมทั้งมีการใช้ในประเทศต่าง ๆ ประมาณ 50 ประเทศ (Gould, 1996 ; Hurst and Hoover, 1993) ตามปกติแบคเทอริโอซินจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Staphylococcus aureus* , *Listeria monocytogenes* , *Clostridium botulinum* (McMullen and Stiles , 1996 ; Schillinger et al, 1996) *C tyrobutyricum* , *Bacillus stearothermophilus* , *C thermosaccharolyticum* (Gould, 1996) , B. licheniformis (Beasley and Saris, 2002) และแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (Davidson and Hoover, 1993) ส่วนการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella* พบว่าได้ผลไม่ชัดเจนยกเว้นในกรณีที่ใช้ร่วมกับสารจับอนุมูลของโลหะ (chelating agent) ที่ยอมให้ใช้ในอาหาร ได้แก่ EDTA , EGTA ซึ่งสารดังกล่าวจะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายทำให้เซลล์มีความไวต่อ แบคเทอริโอซินมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(Stevens *et al.*, 1991 ; Cutter and Siragusa, 1995) โดยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่าง ๆ ได้รวบรวมไว้ดังแสดงในตารางที่ 4

ส่วนการนำแบคเทอริโอซินไปใช้งานนั้นอาจดำเนินการได้ใน 3 ลักษณะคือ (1) การเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินลงไปเป็นเชื้อตั้งต้นหรือเชื้อที่มีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก (2) การเติมแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ลงไปเป็นสารถนอมอาหาร (3) การเติมผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินลงไปเป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตอาหาร (Schillinger *et al*, 1996) ซึ่ง Davidson and Hoover (1993) ได้รวบรวมความเข้มข้นของไนซินที่ใช้สำหรับยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่น *Bacillus* ที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 0.04-2.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *C.sporogenes* ที่อยู่ในเนื้อหมูจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 5-75 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร *L. monocytogenes* ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวจะถูกยับยั้งที่ความเข้มข้น 1-7 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยปริมาณของไนซินที่ใช้จะขึ้นอยู่กับชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเชื้อตั้งต้นและค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น นอกจากนี้ Cleveland และคณะ (2001) ได้รวบรวมการทดลองที่ใช้ประโยชน์แบคเทอริโอซินเป็นสารถนอมอาหารรวมทั้งการประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการอื่น ๆ ในการถนอมอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 5 และตารางที่ 6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและทีทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่าง ๆ

แบคทีเรียกรดแลคติก	แหล่งที่คัดแยก	แบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง
Carnobacterium piscicola CP5	เนยเหลว	*Carnobacterium* , *Listeria* , *Enterococcus*
C. piscicola JG126	แฮมที่เสื่อมคุณภาพ	*Listeria monocytogenes*
Enterococcus mundtii	ผัก	*L. monocytogenes* , *Clostridium botulinum*
E faecalis 226	หางนม	*L. monocytogenes*
E faecalis EFS2	เนย	*L. innocua*
Lactobacillus delbrueckii	เนยเหลือง	*L. monocytogenes* , *Staphylococcus aureus* , *E faecalis* , *E. coli* , *Yersinia enterocolitica*
Lb. plantarum BFE905	สลัด	*L. monocytogenes*
Lb. plantarum WHE92	เนย	*L. monocytogenes*
Lb. plantarum UG1	ไส้กรอกอบแห้ง	*L. monocytogenes* , *Bacillus cereus* , *Clostridium perfringens* , *C. sporogens*
Lb. plantarum SA6	ไส้กรอกหมัก	*Lactobacillus*
Lb. bavaricus	แป้งขนมปัง	*L. monocytogenes*
Lactococcus lactis subsp *cremoris* R	ทีชหัว	*Clostridium* , *Staphylococcus* , *Listeria* , *Leuconostoc*
Lc Lactis subsp *lactis*	กะหล่ำปลีดอง	*L. monocytogenes*
Lc. Lactis subsp. *lactis*	ถั่วงอก	*L. monocytogenes* Scott A
Lc Lactis DPC3147	เมล็ดธัญพืช	*Clostridium* , *Enterococcus* , *Listeria* , *Leuconostoc*
Lc Lactis	ไส้กรอกหมักอบแห้ง	*L monocytogenes*
Leuconostoc mesenteroides Y105	นมแพะ	*L. monocytogenes*
Ln carnosum Ta11A	เนื้อวัว	*L. monocytogenes*
Streptococcus sp	ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก	*Clostridium* sp., *L. monocytogenes*

ที่มา : รวบรวมและดัดแปลงจาก Cleveland และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ผลการทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่าง ๆ

ชนิดของแบคเทอริโอซิน	ลักษณะการประยุกต์ใช้งาน	ผลที่ได้
Nisin A	ใช้เติมลงในขั้นตอนการผสมเนื้อสัตว์	ลดจำนวนแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์
Pediocin AcH	ใช้พ่นลงบนผิวหน้าของเนยแข็งในช่วงเริ่มต้นการบ่ม	ยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes*
Enterocin 4	ใช้ *Enterococcus faecalis* INIA 4 ซึ่งผลิต enterocin 4 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* Ohio แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L .monocytogenes* Scott A
Lmocin M-18	ใช้ *Brevibacterium lines* ซึ่งผลิต lmocin M-18 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	ลดจำนวนของ *L. ivanovii* และ *L. monocytogenes* ลง 100 เท่า
Nisin A	ใช้เติมลงไปในกระบวนการผลิตเนย	ยับยั้งการเจริญของ *L .monocytogenes* ได้นาน 8 สัปดาห์
Piscicolin 126	ใช้เติมลงในแฮมบด	ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีกว่าการใช้ในชีน
Leucocin A	ใช้ *Leuconostoc gelidum* UAL 187 ซึ่งผลิต leucocin A ผสมลงในเนื้อที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะสุญญากาศ	ยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sake* ได้นาน 8 สัปดาห์
Lactocin 705	ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อบด	ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*
Pediocin AcH	ใช้ *Pediococcus acidilactici* ซึ่งผลิต pediocin AcH เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตไส้กรอกไก่แบบเปรี้ยว	ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้
Pediocin	ถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้าง pediocin ไปสู่ *Saccharomyces cerevisiae*	ช่วยในการถนอมอาหารอบและไวน์
Pediocin AcH	เติมลงในไก่สด	ควบคุมการเจริญของ *L monocytogenes* ได้นาน 28 วัน อุณหภูมิ 5 °C
Enterocin	เติมลงใน แฮม เนื้อไก่ เนื้อหมู และไส้กรอก	ควบคุมเจริญของ *L. monocytogenes* ได้

ที่มา : Cleveland และคณะ , (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C7062

ตารางที่ 6 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับวิธีการถนอมอาหารแบบต่าง ๆ

ชนิดของแบคเทอริโอซิน	ลักษณะการประยุกต์ใช้งาน	ผลที่ได้
Nisin A	N_2 , CO_2 , อุณหภูมิต่ำ	ยืดระยะพักตัว และยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes*
Nisin A	เอนไซม์แล็กโทเพอร์ออกซิเดส , อุณหภูมิต่ำ	ลดจำนวนของ *L. monocytogenes*
Nisin A	การผสมแบคเทอริโอซินกับแคลเซียมอัลจิเนต	เพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายของไนซิน
Nisin	เอสเทอร์ของกรดไขมัน	ยับยั้งการเจริญของ *L .monocytogenes* , *Bacillus cereus* , *Lactobacillus plantarum* , *Staphylococcus aureus*
Nisin	คาร์บอนไดออกไซด์	*L. monocytogenes* และ *L. monocytogenes* ที่สามารถต้านทานต่อไนซินได้
Nisin	สนามไฟฟ้า	ยับยั้งการเจริญของ *B. cereus*
Nisin	การปรับบรรยากาศ	มีประสิทธิภาพดีกว่าการใช้ไนซินเพียงอย่างเดียว
Pediocin AcH	ปรับความดัน , อุณหภูมิสูง	ลดจำนวน *L. monocytogenes* , *S. aureus* , *E. coli* O157 H7 , *Lactobacillus sake* , *Leuconostoc mesenteroides*
Pediocin AcH	โซเดียมไดอะซิเตรต	ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ทั้งที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิต่ำ
Pediocin AcH	สารลดแรงตึงผิว	มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* สูงขึ้น

ที่มา : Cleveland และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างและกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่ถูกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจึงมีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซินด้วย นอกจากนี้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายก็ถูกควบคุมโดยปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับเซลล์เป้าหมายของและสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องเช่นกัน

2.5.1 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่สร้างและมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่สร้าง (pimary metabolites) โดยเฉพาะที่พบในแบคทีเรียกรดแลคติก (De Vuyst and Vandamme , 1992) ดังนั้นชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมในการเจริญจึงมีความสำคัญต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน (complex medium) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินคืออุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียที่สร้าง (Hurst , 1981 ; De Vuyst and Vandamme , 1992) เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Carnobacterium piscicola* และ *C. divergens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบความเย็นมีอัตราการสร้างสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในช่วงต้นของการเจริญในระยะ stationary เมื่อเจริญใน MRS broth และที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส จะสร้างแบคเทอริโอซินสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Pilet et al., 1995) และพบว่าการสร้างแบคเทอริโอซินใน *L. monocytogenes* สามารถถูกกระตุ้นให้เพิ่มมากขึ้นด้วยแสงอัลตราไวโอเลต (Mayr-Harting *et al.*, 1972) ใน *Bacillus megaterium* สามารถถูกกระตุ้นด้วย mitomycin C ส่วนในแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่า *Lactobacillus acidophilus* N2 จะสามารถสร้าง lactacin B ได้ในระยะเวลาเร็วขึ้นเมื่อเจริญใน MRS broth ที่มี *Lb. leichmannii* ATCC 4749 เจริญร่วมอยู่ด้วย (Hoover and Harlander, 1993) นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่น ๆ ที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซินอีก เช่น การสูญเสียความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียที่ผลิตการที่เซลล์ผู้ผลิตถูกทำลายด้วยแบคเทอริโอฟาจ การสร้างแบคเทอริโอซินถูกยับยั้งโดยจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่เจริญปะปนอยู่ (Daeschel, 1993)

2.5.2 ปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรม (activity) ของแบคเทอริโอซิน

การศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ทำการศึกษากันมากในไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและมีการผลิตขายในทางการค้าแล้ว โดย Daeschel (1993) ได้สรุปถึงปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินไว้ ดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. จำนวนและชนิดของแบคทีเรียเป้าหมาย โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะสมารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกันออกไป เช่น ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก enterocin 1146 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lb. sake* และ *Listeria* spp. (De Vuyst and Vandamme ; 1994) , piscicocin V1 และ divercin V41 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* , *L. innocua* และ *Clostridium tyrobutyricum* (Pilet *et al.*, 1995)

2. สภาวะที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพทางชีวภาพของกิจกรรมแบคเทอริโอซินซึ่งจะเหมือนกับโปรตีนทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิ เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน โลหะหนัก การกวนที่รุนแรงและมากเกินไป การฉีกขาดของโมเลกุลแบคเทอริโอซิน เนื่องจากการแช่แข็งและการละลาย เช่น ไนซินถูกทำลายด้วยเอนไซม์ α-chymotrypsin และ nisinase , lactocin 27 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ trypsin และ pronase , lactacin B ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K , gelveticin J ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ *trypsin pronase ficin proteinase K pepsin* และ subtilisin (De Vuyst and Vandamme ; 1994) piscicocin V1 และ divercin V41 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ pronase E proteinase K trypsin และสามารถทนต่อความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที (Pilet *et al.*, 1995) acidocin J1132 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ pronase proteinase K trypsin และสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 80-100 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที (Tahara *et al.*, 1996)

3. การรวมตัวกันของแบคเทอริโอซินกับองค์ประกอบของอาหารหรือส่วนประกอบอื่น ๆ ของอาหารที่เติมลงไป โดยพบว่า เกลือ ไนไตรต์ กรดอินทรีย์ สารจับโลหะ และ สารอิมัลซิไฟเออร์ มีส่วนช่วยให้ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีขึ้น ส่วนไขมัน เนย ฟอสโฟลิพิด โปรตีน และสารในกลุ่มฟีนอล จะมีผลในการลดกิจกรรมของไนซิน

4. ค่าความเป็นกรด-เบสของสารละลายหรือตัวกลาง ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการละลายและกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2.5 และ 5 ไนซินสามารถละลายได้ 12 และ 4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ แต่ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะที่เป็นกลางหรือเบส นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรด ไนซินยังสามารถทนต่อความร้อนได้ดี (Hurst and Hoover, 1993; Hurst, 1981) โดยที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2.5 ไนซินสามารถทนต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้โดยไม่สูญเสียกิจกรรม และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสจะมีการสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อย ส่วน lacticin 481 มีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบส 4.5 หรือ 7 แต่ไม่คงตัวที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 2 (Piard, 1994) diplococcin มีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ 5 โดยสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ได้นานถึง 1 ชั่วโมง (Davey, 1994)

2.6. การศึกษาถึงแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินในประเทศไทย

อาภัสรา (2537) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักผลไม้ดอง แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ได้จำนวน 50 สายพันธุ์ โดยทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีอายุ 36 ชั่วโมงให้เป็นกลางพบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากหน่อไม้ดอง สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี tube test และเมื่อนำสารต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์พบว่าสารดังกล่าวเป็นไลโพโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 และ 43,000 ดาลตัน รวมทั้งเมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต พบว่าจะให้ผลการทดสอบด้วยวิธีการทางประสาทสัมผัสสูงกว่าโยเกิร์ตที่จำหน่ายในท้องตลาด

จันทวดี (2538) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากน้ำลายอุจจาระและโยเกิร์ต โดยใช้วิธี streak plate และ cylinder plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกัน 3 ชนิด ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ให้ผลดีที่สุด และสามารถคัดแยก *Lactobacillus* spp. ที่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi TISTR 292, *Sarcina lutea* ATCC 9341, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้จำนวน 38 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้มีจำนวน 1 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้ดี โดยแบคเทอริโอซินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 40 กิโลดาลตัน และคุณสมบัติที่ทนต่อความร้อนและเอนไซม์พาแพน แต่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K และ trypsin

ศิรินาถ (2539) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักดองประเภทต่าง ๆ 4 ชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์ประมงที่ผ่านกระบวนการหมัก ผักดอง แหนม ไส้กรอก นมเปรี้ยวและโยเกิร์ต ด้วยวิธี deferred method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตรวจวัดกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้กับแบคทีเรียทดสอบที่เป็นชนิดแกรมลบและแกรมบวก จำนวน 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี spot on lawn และ agar well diffusion ซึ่งพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีจำนวน 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*, *Streptococcus lactis* SN 33, *S. lactis* SN 48, *Streptococcus* sp. SN61 และ *S. lactis* SN62 โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนแต่ถูกยับยั้งกิจกรรมโดยเอนไซม์ pronase-E, proteinase-K, trypsin และ α-chymotrypsin นอกจากนี้ *Lb casei* subsp. *rhamnosus* ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ *S. aureus* ในส้มฟักได้ภายในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

วิลาวัณย์ และ อังคณา (2541) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* จากไส้กรอกเปรี้ยว พบว่าคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 83 สายพันธุ์ โดยเป็น *Lactobacillus* 57 สายพันธุ์ และ *Pediococcus* 26 สายพันธุ์ ในจำนวนนี้มี 81 สายพันธุ์ ที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* Typhimurium 3292 และ *Salmonella* Enteritidis 3294 ได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar spot test แต่เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแล้วแยกส่วนใสมาปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้เป็นกลางและกำจัดผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ด้วยเอนไซม์คะตะเลส พบว่าไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* ที่นำมาทดสอบได้ เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี well diffusion assay

Ostergaard *et al.* (1998) ได้ทดลองแยกแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria innocua* จากผลิตภัณฑ์ประมงหมักของประเทศไทย โดยพบว่าสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 44 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้พบว่า 43 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้ และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่น ๆ ได้ด้วย ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากผลของแบคเทอริโอซินซึ่งสายพันธุ์ที่คัดแยกได้สร้างขึ้น โดยจากผลการทดลองยังพบอีกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 44 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ ซึ่งในจำนวนนี้ 37 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้สัตว์น้ำเกิดการเน่าเสีย เช่น *Aeromonas* sp. ได้ ซึ่งผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบนั้นคาดว่าเกิดจากผลของกรดแลคติกที่แบคทีเรียที่คัดแยกได้สร้างขึ้น โดยเมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่าทั้ง 44 สายพันธุ์อยู่ในสกุล *Lactobacillus* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส สามารถทนเกลือได้สูงถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จาก ข้าว มันฝรั่ง และข้าวฟ่างได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชลัท (2542) ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากตัวอย่างน้ำนมโคดิบในแหล่งต่าง ๆ ของประเทศไทย โดยใช้วิธี agar well diffusion และ direct plating ซึ่งพบว่า direct plating ให้ผลในการคัดแยกที่ดีกว่าวิธี agar well diffusion โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* CO1 , *Streptococcus thermophilus* FO4 , *Bacillus cereus* ATCC 11778 , *E. coli* TISTR 887 และ *Micrococcus luteus* TISTR 884 ได้จำนวน 45 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้เมื่อจัดจำแนกชนิดของสายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินได้สูงสุดพบว่าเป็น Lactococcus lactis subsp. lactis และเมื่อศึกษาคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ของแบคเทอริโอซินที่ได้พบว่ามีความใกล้เคียงกับไนซินแซด

Swetwiwathana and Lotong (1999) นำ *Pediococcus* spp. 5 สายพันธุ์ และ Lactobacillus spp. 4 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้จากแหนม มาทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar spot method ซึ่งพบว่ามี *Pediococcus* spp. จำนวน 3 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของ *Listeria innocua* และ *Enterococcus faecalis* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella* Anatum และ *E. coli* ได้

Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2000) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดองจำนวน 11 ตัวอย่าง และทดสอบความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินด้วยวิธี swab-paper disc technique โดยสามารถคัดเลือก *Lactobacillus lactis* subsp. lactis ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* ได้จากตัวอย่างต้นหอมดอง และพบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวมีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายโดยการฆ่า (bactericidal mode of action) โดยที่ไม่ได้ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายแตก (lysis) และ *Lb. lactis* subsp. lactis ที่ได้มีการสร้างแบคเทอริโอซินสูงสุดในการเจริญระยะ staionary

Nitisinprasert *et al.* (2002) คัดแยก *Lactobacillus reuteri* KUB-AC16 E011 ได้จากลำไส้ของไก่ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวสามารถสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ซึ่งมีคุณสมบัติดื้อยาปฏิชีวนะได้หลายสายพันธุ์

Noonpakdee *et al* (2003) คัดแยก *Lc Lactis* WNC 20 ที่สามารถสร้างแบคทเอริโอซินได้จากตัวอย่างแหนม โดยแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* , *Clostridium perfringens* , *Bacillus cereus* , *Staphylococcus aureus* และ แบคทีเรียกรดแลคติกด้วยกันเองอีกหลายชนิด เมื่อทำการจำแนกชนิดของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซินดังกล่าวโดยการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายชนิดต่าง ๆ กับแบคทีเรียอ้างอิง *Lc. Lactis* subsp. lactis DL11 ที่สามารถสร้างไนซินและการเพิ่มจำนวนชุดของยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบว่าแบคเทอริโอซินที่ทำการศึกษาเป็นไนซิน แซด

จากที่กล่าวมาแล้วจะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคเทอริโอซินมีส่วนสำคัญในการใช้เป็นสารถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ ดังนั้นการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากตัวอย่างปลาร้าของประเทศไทย ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน รวมทั้งการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมาจัดจำแนกชนิด ศึกษาคุณสมบัติด้านต่าง ๆ ของแบคเทอริโอซินที่ได้ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซิน การทำแบคเทอริโอซินให้เป็นสารบริสุทธิ์ และการนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแบคทีเรียที่มีผลต่อคุณภาพของอาหาร จึงเป็นการศึกษาวิจัยที่จะก่อให้เกิดการเรียนรู้และสร้างองค์ความรู้พื้นฐาน รวมถึงการประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ ซึ่งเป็นทางเลือกที่กำลังได้รับความสนใจและน่าจะปลอดภัยมากกว่าการถนอมอาหารด้วยวิธีการใช้สารเคมีซึ่งอาจมีผลต่อความปลอดภัยและสุขภาพของผู้บริโภค

2.7. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน

2.7.1 การคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดจากตัวอย่างปลาร้า ทำการเจือจางตัวอย่างปลาร้าลงครั้งละ 10 เท่าอย่างต่อเนื่องกัน ด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อ ทำการคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดจากตัวอย่างที่เจือจางแล้วโดยใช้วิธีการเทเพลต (pour plate) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ บรอมครีซอลเพอร์เพิล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ทำการบ่มเชื้อภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนต่ำ (microaerophilic) โดยใช้วิธี candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48-72 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนีและอาหารเลี้ยงเชื้อรอบ ๆ โคโลนีเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งเจริญอยู่ในจานเพาะเชื้อมาเขี่ยเชื้อซ้ำบน MRS agar เพื่อให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ไว้บน MRS agar แบบผิวเอียง (slant) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและทำการถ่ายเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเดิมทุก 2 สัปดาห์

2.7.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก นำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่สามารถสร้างกรดซึ่งคัดแยกได้จากข้อ 2.7.1 มาศึกษาคุณสมบัติทางจุลชีววิทยาเบื้องต้น ได้แก่ การติดสีแกรม รูปร่าง การ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จัดเรียงตัวของเซลล์และการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) โดยใช้สารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกออกจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดชนิดอื่น ๆ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม ท่อนหรือท่อนสั้น และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ เก็บรักษาไว้บน MRS agar แบบผิวเอียงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 15 วัน หรือเก็บรักษาไว้ใน MRS broth ที่มีกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งปราศจากเชื้อผสมอยู่ 15 เปอร์เซ็นต์ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

2.7.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (indicator strain) ด้วยวิธี flip streak (Spelhaug and Harlander, 1989) โดยการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากขั้นตอนข้างต้น มาขีดเป็นเส้นตรงผ่านกลางผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MRS agar (M-MRS agar) ซึ่งเตรียมตามสูตรของ Tichaczek *et al.* (1992) หลังจากนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใช้ช้อนตักสารด้านปลายแบนที่ปราศจากเชื้อแคะอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งแผ่นจากจานเพาะเชื้อดังกล่าวให้คว่ำหน้าลงบนฝาของจานเพาะเชื้อเดิม จากนั้นนำแบคทีเรียทดสอบ 8 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* JMC 2152, *Listeria innocua* LTH 3096, *Salmonella Choleraesuis* subsp. *choleraesius* ATCC 13076, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Eschericia coli* ATCC 25922, Enterococcus faecalis ATCC 19433, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 และ *Pediococcus pentosaceus* JMC 5885 มาขีดเป็นเส้นตรงแต่ละเส้นลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่กลับด้านไว้บนฝาของจานเพาะเชื้อในลักษณะเส้นตั้งฉากกับแนวที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยถ้าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบชนิดใด จะพบว่าแบคทีเรียทดสอบนั้นจะไม่สามารถเจริญในบริเวณใกล้แนวการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบและคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียทดสอบที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียกรดแลคติกไว้ใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

2.7.4 การทดสอบเพื่อยืนยันการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ นำแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนที่ผ่านมาปลูกเชื้อแบบจุด (spot method) ลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ M-MRS หลังจากบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เททับหน้าจานเพาะเชื้อดังกล่าวด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ tryptic soy broth+0.6 % yeast extract+1 % agar (TSBYE soft agar) ซึ่งมีแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดสอบที่คัดเลือกไว้ผสมอยู่ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เททับหน้าแข็งตัวจึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูบริเวณใสซึ่งเกิดขึ้นจากการที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ได้ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

2.7.5 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน

1. นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งคัดเลือกได้จากขั้นตอนข้างต้นมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ M-MRS broth+2 % glucose ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เปลี่ยนแปลงไปและศึกษาจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธีการเทเพลตด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ บรอมครีซอลเพอร์เพิล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2. นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้มาปั่นแยกเซลล์ออกที่ 10,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใส (supernatant) ไปทำให้มีสภาวะเป็นกลาง (neutralize) และปลอดเชื้อ (sterile) โดยผ่านขั้นตอนการทำลายหรือกำจัดสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบซึ่งไม่ต้องการศึกษา เช่น กรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เพื่อให้คงเหลือเฉพาะกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดจากแบคเทอริโอซิน ด้วยวิธีการดังนี้

ก. กรดอินทรีย์ โดยการปรับค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำส่วนใสให้เป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 2.5 โมลาร์

ข. เซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก โดยการกรองผ่านแผ่นเยื่อกรอง (membrane) ที่มีรูขนาด 0.20 ไมครอน

ค. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยการเติมเอนไซม์คะตะเลสลงไปในน้ำส่วนใสให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

นำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสซึ่งมีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อ (cell-free neutralized supernatant หรือเรียกว่า CFNS) จากขั้นตอนที่ผ่านมาไปวัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

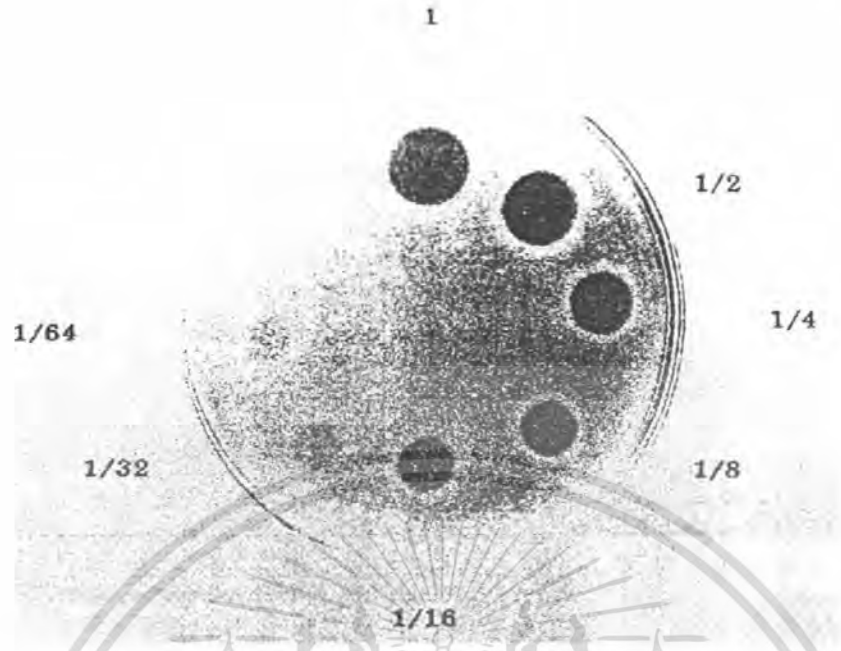
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(bacteriocin activity) ต่อแบคทีเรียทดสอบที่คัดเลือกไว้ 2 ชนิด ได้แก่ *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 และ *Listeria innocua* LTH 3096 โดยใช้เทคนิค critical dilution assay หลังจากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินซึ่งมีค่ากิจกรรมสูงสุดในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิดไว้เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.7.6 การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินด้วยเทคนิค critical dilution assay เป็นวิธีการดัดแปลงจากวิธีการของ Mayr-Harting *et al.* (1972) โดยนำน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนใสที่มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อมาทำให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ นำน้ำส่วนใสในแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ TSATE ที่เททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE soft agar (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) ซึ่งมี *E. faecalis* ATCC 19433 หรือ *L. innocua* LTH 3096 ที่เจริญอยู่ในระยะ log (log phase) ผสมอยู่ประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร รอจนกระทั่งหยดน้ำส่วนใสที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในบริเวณที่หยดน้ำส่วนใสที่มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อในแต่ละความเจือจางลงไป (ภาพที่ 2) ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่อยู่ในน้ำส่วนใสที่มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร (AU ml^{-1}) โดยใช้ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของน้ำส่วนใสที่มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อ ซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบและคูณด้วย 100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



การคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อ

ถ้าปริมาณมาณแบคเทอริโอซิน 10 µl มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน = 64

ถ้าปริมาณมาณแบคเทอริโอซิน 1000 µl มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน = $\frac{64\times1000}{10}$

$= 6{,}400\ \text{AUml}^{-1}$

ภาพที่ 2 การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกไว้ด้วยวิธี critical dilution assay

ที่มา : Mayr-Harting และคณะ (1972)

2.8. เชื้อแบคทีเรียในจีเนียสลิสทีเรีย (Genus Listeria)

การทดลองนี้ได้ทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแลคติก โดยใช้เชื้อ *Listeria innocua* เป็นตัวทดสอบ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่เลือกใช้เชื้อตัวนี้ ก็เพราะไม่เป็นอันตรายต่อผู้ทำการทดลอง และสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *Listeria monocytogenes* โดยอยู่ในจีเนียสเดียวกันน่าจะให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงหรือเหมือนกันถ้าการตรวจสอบให้ผลออกมาว่า แบคเทอริโอซินมีความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria innocua* ก็สามารถกล่าวได้ว่า แบคเทอริโอซินมีความสามารถในยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria monocytogenes* ได้เช่นกัน

Listeria monocytogenes คือเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลิสเตอริโอซีส (Listeriosis) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก แอร์โรฟิลิค ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.5 0.8 -2.5 ไมโครเมตร เซลล์อาจเรียงตัวต่อกันเป็นสาย เคลื่อนที่ได้เล็กน้อยโดยใช้แฟคเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ พบว่าโรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 26 สปีชีส์ รวมทั้งคนและเกิดในนกด้วย แหล่งที่แพร่กระจายเชื้ออาจมาจากสัตว์ป่าที่เป็นโรค แล้วนำโรคมาติดสัตว์เลี้ยงตามบ้านและคน ซึ่งกลไกในการถ่ายทอดเชื้อยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ลักษณะของโรคจะมีอาการทางประสาทในระยะแรก และมีอาการของ acute encephalitis ตามมาด้วยอวัยวะภายในหลายแห่งอาจแสดงอาการของโรคได้ และเมื่อตรวจเลือดจะพบเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรค ถ้าเกิดในผู้ชายจะเป็นโรคไข้สมองอักเสบ ถ้าเกิดในผู้หญิงอาจทำให้เกิดการแท้งบุตรได้ หรือบุตรที่เกิดมาจะมีการพัฒนาทางด้านสมองช้า รวมทั้งอาจแยกเชื้อได้จาก cerebrospinal fluid ด้วยการรักษาทำโดยใช้สารปฏิชีวนะเตตระไซคลินในการรักษา (อภิญญา,2527)

2.9. Tween

Tween จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่ง ซึ่งมีหลายชนิด เช่น

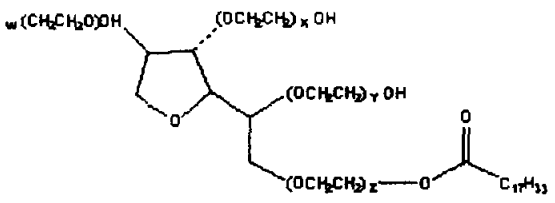
- monolaureate (Tween 20, Tween 21, Span 20)
- monopalmitate (Tween 40, Span 40)
- monostearate (Tween 60, Tween 61, Span 60)
- tristearate (Tween 65, Span 65)
- monooleate (Tween 80, Tween 81, Span 80)
- trioleate (Tween 85, Span 85)

2.9.1 Tween 80 จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวแบบ non-ionic ชนิดหนึ่ง

ชื่อทางเคมี : Polyoxyethylene sorbitan monooleate , Polyethylene glycol sorbitan monooleate solution , Polysorbate80

สูตรโมเลกุล : $C_{12}H_{10}ClNO_3$

สูตรโครงสร้าง : ดังภาพที่ 3



where sum of w, x, y and z = 20

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 3 สูตรโครงสร้างของ Tween 80

ที่มา : www.wellnaturally.com/ingredient/tween80.html-10k

2.9.2 ส่วนประกอบของ Tween80

มี 4 องค์ประกอบที่สำคัญ คือ

1. limonene
2. ethanol
3. glycerol
4. น้ำ (water)

2.9.3 ผลของการใช้ Tween80 ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ

ทั้ง *Azospirilum brasilense Sp7 (motile)* , *Azospirilum brasilense GA38 (non-motile)* *E.coli RP437 (motile)* , *E.coli RP3098 (non-motile)* ที่ทำการ spread บน plate Bacto agar ที่มี tween80 เป็นส่วนผสมนั้นจะพบว่ามีขนาดของเส้นผ่านศูนย์กลาง หรือ motility halo ใหญ่กว่า plate Bacto agar ที่ไม่มี tween80 เป็นส่วนผสม

ที่มา : www.elsevier.com /lcate/jmicmeth

2.9.4 ผลของการใช้ Tween80 ที่มีต่อแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

จากผลทดลองใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween80 ที่ปราศจากเชื้อเป็นตัวทำเจือจางน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นกลางและปลอดเชื้อ ในการหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเปรียบเทียบกับการใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 8 โดยค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบชนิดต่างๆ ทั้ง 8 สายพันธุ์ ที่มีการใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween80 เป็นตัวทำเจือจางจะมีค่าสูงกว่าการใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำเจือจางสำหรับการหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการทดลองขั้นต่อๆไป ซึ่งผลของ Tween80 ต่อค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินนั้นเกิดจากการที่โมเลกุลของแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำมักจะจับกันเองเป็นโมเลกุลที่มีขนาดใหญ่ขึ้น หรือไปจับกับพื้นผิวสัมผัสอื่นที่มีคุณสมบัติซึ่งไม่ชอบน้ำเหมือนกัน เช่น แก้วและโพลีโพรไพลีน โดยพบว่าการใช้ Tween80 จะช่วยลดการจับกันเองหรือการจับกับพื้นผิวสัมผัสอื่นลงได้ (Daeschel *et al.*,1992) โดยจากการทดลองของ Joosten and Nunez (1995) พบว่า Tween80 ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จะให้ผลในการลดการดูดซับของแบคเทอริโอซินกับผิวสัมผัสได้ดีกว่าที่ความเข้มข้น 0.01 และ 0.001 เปอร์เซ็นต์ โดยสามารถลดการดูดซับของไนซินและ enterocin 4 ที่สร้างจาก *E. faecalis* INIA 4 บนผิวด้านในของปิเปตและหลอดทดลองที่ทำจากโพลีโพรไพลีนจาก 15-75 เปอร์เซ็นต์ ลงเหลือน้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการเจือจางแบคเทอริโอซินด้วยน้ำกลั่น นอกจากนี้ Nissen-Meyer *et al.* (1992) รายงานว่า Tween80 นอกจากจะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ช่วยลดการยึดจับกันระหว่างแบคเทอริโอซินกับผิวสัมผัสด้านในของอุปกรณ์แล้ว ยังอาจเกี่ยวข้องกับความคงตัวของโครงสร้างภายในโมเลกุลแบคเทอริโอซินและความไวของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายต่อการถูกทำลายโดยโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน โดยพบว่า Tween80 สามารถทำให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 2-10 เท่า

ตารางที่ 7 การเปรียบเทียบผลการใช้ 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween80 และน้ำกลั่นเป็นตัวทำเจือจางในการหาค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

(Comparison of 0.1 % Tween80 and distilled water as a diluent on bacterocin activity determination)

Indicator strains	Bacteriocin activity (AU ml^{-1})[a]	
	Distilled water	0.1 % Tween 80
Bacillus cereus JCM 2152	800	1,600
Bacillus coagulans JMC 2257	1,600	6,400
Enterococcus faecalis ATCC 19433	6,400	12,800
Lactobacillus plantarum ATCC 14917	1,600	6,400
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JCM 1157	1,600	6,400
Lactococcus lactis subsp. *cremoris* TUA 1344L	800	3,200
Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides* JCM 6124	400	1,600
Listeria innocua ATCC 33090	800	3,200

[a] bacteriocin activity was determined by critical dilution method.

ที่มา : Joosten และ Nunez (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. Appendorf
2. autopipette (eppendrof , Germany)
3. เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง รุ่น (Vortex Mixer VM-300)
4. Hot plate รุ่น เตาไฟฟ้า (Kando , Germany)
5. Candle jar
6. เครื่องวัด pH รุ่น (Inolab pH Level I , Germany)
7. Autoclave รุ่น SS-325 (Tomy SS-325 , Japan)
8. ไมโครเวฟ (LG Intellowave , China)

3.2 สารเคมี

1. Tween80 (Merck , Germany)
2. Sodium acetate (Ajax , India)
3. $MgSO_4 . 7H_2O$ (Ajax , India)
4. $MnSO_4 . 4H_2O$ (Ajax , India)
5. $FeSO_4 . 7H_2O$ (Ajax , India)
6. NaCl (Merck , USA)
7. Agar (Merck , USA)
8. Trypticase soy broth (Merck , USA)
9. TSA soft agar (Merck , USA)
10. $CaCO_3$ (Merck , USA)
11. MRS broth (Merck , USA)
12. น้ำกลั่น

3.3 เชื้อจุลินทรีย์ (SWETWIWATHANA and Lotong , 1999)

1. *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536
2. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497
3. *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638
4. *Listeria innocua* ATCC 33090^T

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

ก. ศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 ต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้า

3.4.1 เลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.4.2 ปิเปตเชื้อแบคทีเรียแลคติก 100 µL ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth control และ GYP broth ที่มีความเข้มข้นของ Tween80 0 , 0.1 , 0.5 และ 1% บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 20 ชั่วโมง

3.4.3 ทำการ spread plate บน plate ที่มี MRS agar + $CaCO_3$ 0.5%
โดยที่ dilution $10^{-1} - 10^{-4}$ ทำการ spread plate 1 plate
และที่ dilution $10^{-5} - 10^{-6}$ ทำการ spread plate 2 plate

3.4.4 นำ plate ที่ spread plate แล้วไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับปริมาณเชื้อที่ขึ้นในแต่ละอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ เปรียบเทียบผลการเจริญของเชื้อที่ขึ้นในอาหารชนิดต่าง ๆ โดยใช้ค่าทางสถิติ

3.4.5 นำเชื้อที่ได้ในข้อ 3.4.2 มาทำการแบ่งใส่หลอดทดลอง หลอดละ 1 ml เพื่อที่จะนำไปใช้ทดสอบหาความเข้มข้น ของแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตได้ในอาหารแต่ละชนิดในข้อ 3.6

3.4.6 นำส่วนที่เหลือในข้อ 3.4.5 ไปทำการวัดค่า pH ด้วย เครื่อง pH meter

3.5 ศึกษาผลของ Tween 80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ใน GYP broth ของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pedocin PA-1

3.5.1 ขั้นตอนการเตรียม plate

3.5.1.1 ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria innocua* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.1.2 หลังจากนั้นปิเปตเชื้อ *Listeria innocua* 10 µl (10^7 cells/ml)ใส่ลงในหลอดทดลองที่มี TSA Soft agar 5 ml ที่อุณหภูมิประมาณ 50 °C แล้วนำไป Vortex

3.5.1.3 นำมาเททับลงบน plate ที่มี NA อยู่แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.1.4 นำ plate ในข้อ 3.5.1.3 ที่ได้ไปทำการระเหยน้ำบนผิวหน้าอาหารก่อนนำมาทำการทดลองในข้อ 3.6

3.6 ขั้นตอนการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua*

3.6.1 นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แบ่งเก็บไว้ 1 ml ในข้อ 3.4.5 มาต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 10 นาที จะได้สารแบคเทอริโอซินที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น

3.6.2 ทำการเจือจางความเข้มข้น โดยการปีเปตแบคเทอริโอซินที่ได้มา 100 µl ใส่ลงในหลอด Appendorf ที่เตรียมไว้ แล้วทำการเจือจาง 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกัน 9 ระดับ ด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ

3.6.3 นำแต่ละความเจือจาง มา 10 µl หยดลงบน plate ที่เตรียมไว้ โดยที่ plate จะกำหนดเป็นหมายเลขตั้งแต่ 1-10 โดยที่ตรงหมายเลข 1 นั้น Drop สารละลายแบคเทอริโอซินที่ไม่ได้ทำการ dilute ส่วนหมายเลข 2-10 จะทำการ Drop เชื้อ dilution ที่ 1:1 , 1:2 , 1:4 , 1:8 , 1:16 , 1:32 , 1:64 , 1:128 และ 1:256 ตามลำดับ

3.6.4 รอจนกระทั่งหยดน้ำส่วนใสที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3.6.5 นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.6.6 สังเกตผลโดยดูจากบริเวณส่วนใสที่เกิดขึ้น (clear zone) จากผลการถูกยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* ในบริเวณที่หยดแบคเทอริโอซินในแต่ละความเจือจาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและการวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการศึกษาจำนวนการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 ต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้า

จากการศึกษาผลการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 ต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้า (ตารางที่ 8) พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบ (สายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pediocin PA-1) จะมีการเจริญสูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 % ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้า กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบจำนวนการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้ากับจำนวนการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth จะพบว่าจำนวนการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 % จะให้จำนวนการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสูงกว่าจำนวนการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่มีความเข้มข้นของ Tween80 0 % , 0.5 และ 1.0 % และยังมีค่าจำนวนการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย แลคติกใกล้เคียงกับจำนวนการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้า หรือกล่าวอีกนัยหนึ่งก็คือมีจำนวนการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน

และจากการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 ต่างๆ (ตารางที่ 9) พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบ (สายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pediocin PA-1) จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 % เมื่อเปรียบเทียบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 % , 0.5 % และ 1 % นั้นแสดงว่า ที่สูตรอาหารดังกล่าว เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งสามสายพันธุ์สามารถผลิตกรดได้มากนั่นเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 จำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติก (Log CFU/ml) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเซลล์ (Log CFU/ml)		
	Pediococcus pentosaceus TISTR 536	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638
MRS	8.22* ± 0.02	8.19 ± 0.02	8.24 ± 0.01
GYP + Tween80 0 %	7.70 ± 0.02	7.96 ± 0.03	8.16 ± 0.01
GYP + Tween80 0.1 %	8.15* ± 0.00	8.08 ± 0.05	8.21 ± 0.01
GYP + Tween80 0.5 %	7.95 ± 0.01	7.94 ± 0.05	8.05 ± 0.04
GYP + Tween80 1.0 %	8.08 ± 0.02	7.78 ± 0.03	8.06 ± 0.02

* จำนวนเซลล์แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ที่มีจำนวนใกล้เคียงกัน

ตารางที่ 9 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)		
	Pediococcus pentosaceus TISTR 536	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638
MRS	4.53 ± 0.06	4.72 ± 0.13	4.59 ± 0.15
GYP + Tween80 0 %	4.42 ± 0.08	4.77 ± 0.09	4.44 ± 0.04
GYP + Tween80 0.1 %	4.39 ± 0.09	4.64 ± 0.03	4.35 ± 0.13
GYP + Tween80 0.5 %	4.42 ± 0.09	4.69 ± 0.03	4.51 ± 0.10
GYP + Tween80 1.0 %	4.40 ± 0.09	4.66 ± 0.03	4.44 ± 0.01

* หมายเหตุ SD = standard deviation (n = 3)

4.2 ผลการศึกษาของ Tween 80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pedocin PA-1

จากการศึกษาผลของ Tween 80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pedocin PA-1 (ตารางที่ 10) จะพบว่า การผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A และ Pedocin PA-1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 % จะสามารถผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* ได้ดีใกล้เคียงกับการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้ามากที่สุด ส่วนสายพันธุ์ที่ผลิต Nisin Z จะได้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าใน GYP + Tween80 0.1 % เมื่อเทียบกับ MRS แต่อย่างไรก็ตาม GYP + 0.1 % Tween80ยังให้ผลการผลิตแบคเทอริโอซินในความเข้มข้นที่มากกว่า GYP ที่มี Tween80 0 % 0.5 % และ 1.0 % กล่าวคือ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสาร แบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* จะพบว่า การผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 % จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria innocua* ได้ดีกว่า การผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 , 0.5 และ 1.0 % และยังดีใกล้เคียงหรือไม่แตกต่างกับการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้า

ตารางที่ 10 ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/ml) ของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/ml)		
	Pediococcus pentosaceus TISTR 536	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638
MRS	12800*	12800*	25600*
GYP + Tween80 0 %	3200	1600	1600
GYP + Tween80 0.1 %	12800*	12800*	6400
GYP + Tween80 0.5 %	6400	6400	800
GYP + Tween80 1.0 %	6400	3200	200

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จันทวดี โล่เสถียรกิจ. 2538. การตรวจสอบและคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* ssp. จากแหล่งต่าง ๆ ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยมหิดล.

ชลัท สานติวรางคณา. 2542. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตไนซินจากน้ำนมโคดิบ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิลาวัฒย์ เจริญจิระตระกูล และ อังคณา สุขบุญ. 2541. ผลการยับยั้งซัลโมเนลลาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากไส้กรอกเปรี้ยว. วารสารสงขลานครินทร์ 20 (4) : 429-436.

ศิรินาถ หนูเอก. 2539. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อาภัสรา กอบกัยกิจ. 2537. การแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อภิญญา ผลิโกมล. 2527. แบคทีเรีย. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 288

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2547. แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาร้า. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพมหานคร.

Abee, T. 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. **FEMS Microbiol. Lett.** 129 : 1-10.

Adams, M.R. 1999. Safety of industrial lactic acid bacteria. **J. Biotechnol.** 68 : 171-178

Andersson , R. 1986 . Inhibition of *Staphylococcus aureus* and spheroplasts of gramnegative bacteria by an antagonistic compound produced by a strain of *Lactobacillus plantarum* . **Int. J. Food Microbiol.** 3 : 149 – 160.

Beasley, S. and P. Saris. 2002. Protection of infant formula against pathogenic *Bacillus licheniformis* using a nisin producer isolated from human milk. Book of Abstracts of Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria : Genetics , Metabolism and Application. 1-5 September 2002. Egmond ann Zee , The Netherland : Abstract No. C10.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ben Embarek , P.K., V.F. Jeppesen and H.H Huss. 1994. Antibacterial potential of *Enterococcus faecium* strains isolated from sous-vide cooked fish fillets. Food Microbiol. 11 : 525-536.

Brunden , K.R., W.A. Cramer and F.S. Cohen. 1984. Purification of a small receptor binding peptide from the central region of the colicin E1 molecule. **J. Biol. Chem.** 259 : 190-196.

Cleveland , J., T.J. Montville, I.F. Nes, and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins : safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 71 : 1-20.

Cutter, C.N and G.R. Siragusa. 1995. Population reductions of gram-negative pathogens following treatments with nisin and chelators under various conditions. **J.Food Prot.** 58 : 977-983.

Daeschel, M.A. 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages, pp. 63-91. In D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Academic Press, Inc., New York.

Daeschel, M.A., J. McFuire and H. Al-Makhlafi. 1992. Antimicrobial activity of nisin adsorbed to hydrophilic and hydrophobic surfaces. **J.Food Prot.** 55 : 731-735.

Davey, G.P. 1994. Diplococoin produced by *Lactococcus lactis* subsp cremoris, pp. 273-290. In L. De Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application.** Blackie-Academic & Professional , London.

Davidson, P.M. and D.G. Hoover. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-160. In S. Salminen and A. von Wright, eds. **Lactic Acid Bacteria**. Marcel Dekker , Inc., New York.

De Vuyst , L. and E.J. Vandamme 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. **J. Gen. Microbiol.** 138 : 571-578.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

De Vuyst, L. and E.J. Vandamme 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91 – 142. In L. De Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetic and Application.** Blackie – Academic & Professional, London.

Duffes, F., Leroi, P. Boyaval and X. Dousset. 1999b. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium* spp. Strain a simulated cold smoked fish system stored at 4oC. **Int. J. Food Microbiol.** 47 : 33-42.

Eckner, K.F. 1992. Bacteriocins and food application. **Dairy, Food and Environ. Sanitation.** 12 : 204-209.

Ennahar, s., T. Sashihara, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2000. Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiol. Rev.** 24 : 85-106.

Franz, C.M.A.P., M. Du Toit, N.A. Plasupo, U. Schillinger and W.H. Holzapfel. 1998. **Plantarcin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad. Lett. Appl. Microbiol.** 26 : 231-235.

Fricourt, B.V., S.F. Barefoot, R.F. Testin and S.S Hayasaka. 1994. Detection and activity of plantaricin F an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. **J. Food Prot.** 57 : 698-702.

Garneau, S., N.I. Martin and J.C. Vederas. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie.** 84 : 577-592.

Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 87 : 175-785.

Gould, G.W. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **J. Food Prot.** 59 : 82-86.

Halami, P.M., C. Arun and R. Joseph. 1999. Characterization of bacteriocinogenic strains of lactic acid bacteria in fowl and fish intestines and mushroom. **Food Biotechnol.** 13(2) : 121-136.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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

Hechard, Y. and H. Sahl. 2002. Mode of action of modified and unmodified bacteriocins from Gram-positive bacteria. **Biochimie.** 84 : 545-557.

Holzapfel , W.H. and B.J.B. Wood. 1995 Lacti acid bacteria in contemporary perspective, pp. 1 – 6 . In W.H. Holzapfel and B.J.B. Wood, eds. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Blackie Academic & Professional, London.

Hoover, D.G. and S.K. Harlander. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity, pp. 23-40. In D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.** Academic Press, Inc., New York.

Hurst, A. 1981. Nisin, pp. 85-123. In D. Perlman and A.I. Laskin, eds. **Adv. Appl. Microbiol.** Academic Press, Inc., New York.

Hurst, A. and D.G. Hoover. 1993. Nisin, pp. 369-394. In A.L. Branen and P.M. Davidson, eds. **Antimicrobial in Foods.** Marcel Dekker, New York.

Jack, R.W., J.R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.** 59 : 171-200.

Jacob, F., A. Lwoff, A. Siminovitch and E.L. Wollman. 1953. Definition de quelques termes relatifs a la lysogenie. **Ann. Inst. Pasteur Paris.** 84 : 222 – 224

Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer. 1986. Characterization and qurification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. Bacteriol.** 167 : 439 – 446.

Joosten, H.M.L.J. and M. Nunez. 1995. Adsorption of nisin and enterocin 4 to polypropylene and glass surfaces and its prevention by Tween80 . **Lett. Appl. Microbiol.** 21 : 389-392.

Kelly, E.J., R.V. Asmundson and C.M. Huang. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. **Int. J. Food Microbiol.** 33 : 20-218.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim, W.S., R.J. Hall and N.W. Dunn. 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 48 : 449-453.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 12 : 39-85.

Kleinkauf, H. and H. von Dohren. 1987. Biosynthesis of peptide antibiotics. **Annu. Rev. Microbiol.** 41 : 259-289.

Konisky, J. 1982 . Colicins and other bacteriocins with established modes of action. **Annu. Rev. Microbiol.** 36 : 125 – 144.

Lewus, S. S. and T.J. Montville. 1992 . Production of an amylase – sensitive bacteriocin by an atypical Leuconostoc paramesenteroides strain. **Appl. Environ. Microbiol.** 58 : 143 – 149.

Litchfield, J.H. 1996. Microbiological production of lactic acid bacteria. **Adv. Appl. Microbiol.** 42 : 45 – 95.

Lyon. W.J. and B.A. Glatz. 1993. Isolation and purification of propionicin PLG – I, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*. **Appl. Environ. Microbiol.** 59 : 83 – 88.

Mayr-Harting, A., A.J. Hedges and R.C.W. Berkeley. 1972. Methods for studying bacteriocins, Vol. 7A, pp.315-422. In T. Bergen and J.R. Norris, eds. **Methods in Microbiology.** Academic Press, Inc., London.

McKay, L.L.,A.S. Dajani and L.W. Wannamaker. 1983. Functional properties of plasmids in lactic streptococci. Antonie van Leeuwenhoek. 49 : 259-274.

McMullen, L.M. and M.E. Stiles. 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation of meats. J. Food {rot. 59 : 64-71.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Montville, T.J. and A.L. Kaiser. 1993. Antimicrobial proteins : classification , nomenclature , diversity and relationship to bacteriocins , pp. 1-22. In D.G. Hoover and L.R. Steenson , eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.** Academic Press , Inc., New York.

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

Nes, I.F. and H. Holo. 2000. Class II antimicrobial peptides from lactic acid bacteria. Biopoly. 55 : 50-61.

Nissen-Meyer, J,. H. Holo, L.S. Havarstein, K. Sletten and I.F. Nes. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. **J. Bacteriol.** 174 : 5686-5692.

Nitisinprasert, S., P. Sukyai, P. Palsuk , V. Nilpinai , K. Doi and K. Sonomoto. 2002. detection on growth inhibition of *Eschericahia coli* and *Salmonella* sp. Resistant to antibiotics by *Lactobacillus reuteri* KUB – AC16 due to the production of lactic acid , acetic acid and bacteriocin like substance. Book of Abstracts of Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria : Genetics , Metaibolism and Application. 1-5 September 2002. Egmond ann Zee , The Netherland : Abstract No. C2.

Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit , K. Sonomoto and S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing Lactococcus lactis WNC 20 strain from nham , a traditional Thai fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** 81 : 137-145.

Ostergaard, A., P.K.B. Embarek , C.W. Neergaard , H.H. Huss and L. Gram. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria from Thai fermented fish products. **Food Microbiol.** 15 : 223-233.

Piard, J.C. 1994. Lacticin 481 : a lantibiotic produced by *Lactococcus lactis* subsp. lactis CNRZ 481 , pp. 251-271. In L. De Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology , Genetic and Application.** Blackie Academic & Professional , London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pilet, M.F., X. Dousset , R. Barre , G. Novel , M. Desmazeaud and J.C. Piard. 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 58 : 256-262.

Postle, K. and J.T. Skare. 1988. *Escherichia coli* TonB protein is exported from the cytoplasm without proteolytic cleavage of ins amino terminus. **J. Biol. Chem.** 263 : 11000-11007.

Pot,B., W.Ludwing, K. Kersters and K. Heinz. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria, pp. 13-90. In L. De Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria : Microbiology, Genetics and Applications.** Blackie Acadmic & Professional, London.

Rattanachaikunsopon, P. and P. Phumkhachorn. 2000. A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from Thai fermented foods. **ScienceAsia.** 26 : 195-200.

Ringo, E. and F.J. Gatesoupe. 1998. Lactic acid bacteria in fish : a review. Aquaculture. 160 : 177-203.

Sarkar, P.K. and S. Banerjee. 1996. Antibacterial activity of lactic acid bacterial isolates obtained from natural habitats. **J. Food Sci. Technol.** 33 : 231 – 233.

Schaller, K, R. Dreher and V. Braun. 1981. Structural and functional properties of colicin M. **J. Bacteriol.** 146 : 54-63.

Schillinger, U., R. Geisrn and W.H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. Technol.** 7 : 158-164.

Schlegel, H.G. 1993. **General Microbiology.** Cambridge University Press, Cambridge.

Spelhaug, S.R. and S.K. Harlander. 1989. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*, **J. Food Prot.** 52 : 856-862.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stevens, K.A., B.W. Sheldon, N.A. Klapes and T.R. Klaenhammer. 1991. Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* and others gram-negative bacteria. **Appl. Environ. Microbiol.** 57 : 3613-3615.

Stiles, M.E. and L.W. Hastings. 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria : potential for use in meat preservation : a review. **Trend Food Sci. Technol.** 2 : 247 – 251.

Stiles, M.E. and L.W. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.** 36 : 1 – 29.

Stoffels, G., I.F. Nes and A. Guomumdsdottir. 1992. Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. **J. Appl. Bacteriol.** 73 : 309-316.

Swetwiwathana, A. and N. Lotong. 1999. Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from nham (Thai fermented meat). In Proceeding of **International Conference on Asian Network on Microbial Research** , Thailand Institute of Scientific and Technological Research , Chiang-Mai , Thailand , 29 November-1 December 1999.

Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker. 1976 . Bacteriocins of gram – positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** 40 : 722 – 756.

Tahara, T., M. Oshimura , C. Umezawa and K. Kanatani. 1996. Isolation , partial characterization and mode of action of acidocin J1132 , a two component bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1132. **Appl. Environ. Microbiol.** 62 : 892-897.

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

Twomey, D., R.P. Ross, M.Ryan, B.Meaney and C.Hill. 2002. Lantibiotic produced by lactic acid bacteria : structure, function and application. pp. 165-185. *In* J.S. Roland, J.Kok, T. Abee and G. Schaafsma, eds. **Proceeding of The Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria :**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Genetics, Metabolism and Application, 1-5 September 2002. Egmond aan Zee, The Netherland.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth

glucose	10	g
Yeast extract	10	g
Peptone	10	g
Sodium acetate	10	g
Salt solution	10	ml
น้ำกลั่น	1000	ml
pH	6.8	

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml และปรับ pH ให้ได้ประมาณ 6.8 ปิเปตใส่หลอดทดลอง 5 ml นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

วิธีการเตรียม Salt solution

$MgSO_4 . 7H_2O$	4	g
$MnSO_4 . 4H_2O$	0.2	g
$FeSO_4 . 7H_2O$	0.2	g
NaCl	0.2	g
น้ำกลั่น	100	ml

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 ml

2. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium (MRS broth)

glucose	20	g
Yeast extract	5	g
Peptone	10	g
Sodium acetate	5	g
Beef extract	10	g
Tween 80	1.0	ml
K_2HPO_4	2.0	g
Tri-ammonium citrate	2.0	g

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

$MgSO_4 . 7H_2O$	0.2	g
$MnSO_4 . 4H_2O$	0.2	g
น้ำกลั่น	1000	ml

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ปิเปตใส่หลอดทดลอง 5 ml นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS + 0.5% $CaCO_3$ + 1.2 % Agar

glucose	20	g
Yeast extract	5	g
Peptone	10	g
Sodium acetate	5	g
Beef extract	10	g
Tween 80	1.0	ml
K_2HPO_4	2.0	g
Tri-ammonium citrate	2.0	g
$MgSO_4 . 7H_2O$	0.2	g
$MnSO_4 . 4H_2O$	0.2	g
$CaCO_3$	5.0	g
Agar	12	g
น้ำกลั่น	1000	ml

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml หลอมบน hot plate จนละลาย ถ่ายใส่ขวด นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงเทใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE

Trypticate soy broth	30	g
Yeast extract	6.0	g
น้ำกลั่น	1000	ml

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml ปิเปตใส่หลอดทดลอง 5 ml นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

5. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSAYE Soft Agar

Trypticate soy broth	30	g
Yeast extract	6.0	g
Agar	10	g
น้ำกลั่น	1000	ml

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml หลอมบน hot plate จนละลาย ปิเปตใส่หลอดทดลอง 5 ml นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

6. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ NA

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Agar	15	g
น้ำกลั่น	1000	ml

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 1000 ml หลอมบน hot plate จนละลาย ถ่ายใส่ขวด นำเข้าฆ่าเชื้อใน autoclave ที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ผลการศึกษาอัตราการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 ต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ใช้ในเชิงการค้า

ตารางภาคผนวก ข1 : แสดงการคำนวณปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ของผลการทดลองครั้งที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนโคโลนีที่นับได้				อัตราส่วนจำนวนโคโลนี จำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับโคโลนี/กรัม (cfu/g)
	ซ้ำที่	ระดับความเจือจาง				
		1:10000 (หรือ10^{-4})	1:100000 (หรือ10^{-5})	1:1000000 (หรือ10^{-6})		
MRS	1	>300	>300	160	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	157.5×10^6
	2	>300	>300	155		157,500,000
				ค่าเฉลี่ย= 157.5		
				157.5×10^6		
				157,500,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 %	1	>300	>300	52	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	53×10^6
	2	>300	>300	54		53,000,000
				ค่าเฉลี่ย=53		
				53×10^6		
				53,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 %	1	>300	>300	141	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	139×10^6
	2	>300	>300	137		139,000,000
				ค่าเฉลี่ย=139		
				139×10^6		
				139,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.5 %	1	>300	>300	93	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	91×10^6
	2	>300	>300	89		91,000,000
				ค่าเฉลี่ย=91		
				91×10^6		
				91,000,000		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข2 : แสดงการคำนวณปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ของผลการทดลองครั้งที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนโคโลนีที่นับได้				อัตราส่วนจำนวนโคโลนี จำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับโคโลนี/กรัม (cfu/g)
	ซ้ำที่	ระดับความเจือจาง				
		1:10000 (หรือ10^{-4})	1:100000 (หรือ10^{-5})	1:1000000 (หรือ10^{-6})		
MRS	1	>300	>300	175	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	172×10^6
	2	>300	>300	169		172,000,000
				ค่าเฉลี่ย=172		
				172×10^6		
				172,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 %	1	>300	>300	51	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	48×10^6
	2	>300	>300	45		48,000,000
				ค่าเฉลี่ย=48		
				48×10^6		
				48,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 %	1	>300	>300	144	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	142×10^6
	2	>300	>300	140		142,000,000
				ค่าเฉลี่ย=142		
				142×10^6		
				142,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.5 %	1	>300	>300	89	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	87×10^6
	2	>300	>300	85		87,000,000
				ค่าเฉลี่ย=87		
				87×10^6		
				87,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 1.0 %	1	>300	>300	117	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	115×10^6
	2	>300	>300	113		115,000,000
				ค่าเฉลี่ย=115		
				115×10^6		
				115,000,000		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข3 : แสดงการคำนวณปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ของผลการทดลองครั้งที่ 3

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนโคโลนีที่นับได้				อัตราส่วนจำนวนโคโลนี จำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับโคโลนี/กรัม (cfu/g)
	ซ้ำที่	ระดับความเจือจาง				
		1:10000 (หรือ10^{-4})	1:100000 (หรือ10^{-5})	1:1000000 (หรือ10^{-6})		
MRS	1	>300	>300	167	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	165×10^6
	2	>300	>300	163		165,000,000
				ค่าเฉลี่ย=165		
				165×10^6		
				165,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 %	1	>300	>300	52	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	51×10^6
	2	>300	>300	50		51,000,000
				ค่าเฉลี่ย=51		
				51×10^6		
				51,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 %	1	>300	>300	142	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	141×10^6
	2	>300	>300	140		141,000,000
				ค่าเฉลี่ย=141		
				141×10^6		
				141,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.5 %	1	>300	>300	91	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	89×10^6
	2	>300	>300	87		89,000,000
				ค่าเฉลี่ย=89		
				89×10^6		
				89,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 1.0 %	1	>300	>300	123	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	120×10^6
	2	>300	>300	117		120,000,000
				ค่าเฉลี่ย=120		
				120×10^6		
				120,000,000		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข4 : แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 ของผลการทดลองครั้งที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนโคโลนีที่นับได้				อัตราส่วนจำนวนโคโลนี จำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับโคโลนี/กรัม (cfu/g)
	ซ้ำที่	ระดับความเจือจาง				
		1:10000 (หรือ10^{-4})	1:100000 (หรือ10^{-5})	1:1000000 (หรือ10^{-6})		
MRS	1	>300	>300	163	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	162×10^6
	2	>300	>300	161		162,000,000
				ค่าเฉลี่ย=162		
				162×10^6		
				162,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 %	1	>300	>300	99	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	98.5×10^6
	2	>300	>300	98		98,500,000
				ค่าเฉลี่ย=98.5		
				98.5×10^6		
				98,500,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 %	1	>300	>300	110	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	108×10^6
	2	>300	>300	106		108,000,000
				ค่าเฉลี่ย=108		
				108×10^6		
				108,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.5 %	1	>300	>300	78	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	76×10^6
	2	>300	>300	74		76,000,000
				ค่าเฉลี่ย=76		
				76×10^6		
				76,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 1.0 %	1	>300	>300	67	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	65×10^6
	2	>300	>300	63		65,000,000
				ค่าเฉลี่ย=65		
				65×10^6		
				65,000,000		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข5 : แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 ของผลการทดลองครั้งที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนโคโลนีที่นับได้				อัตราส่วนจำนวนโคโลนีจำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับโคโลนี/กรัม (cfu/g)
	ซ้ำที่	ระดับความเจือจาง				
		1:10000 (หรือ10^{-4})	1:100000 (หรือ10^{-5})	1:1000000 (หรือ10^{-6})		
MRS	1	>300	>300	149	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	148×10^6
	2	>300	>300	147		148,000,000
				ค่าเฉลี่ย=148		
				148×10^6		
				148,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 %	1	>300	>300	86	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	85×10^6
	2	>300	>300	84		85,000,000
				ค่าเฉลี่ย=85		
				85×10^6		
				85,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 %	1	>300	>300	133	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	132×10^6
	2	>300	>300	131		132,000,000
				ค่าเฉลี่ย=142		
				132×10^6		
				132,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.5 %	1	>300	>300	98	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	97×10^6
	2	>300	>300	96		97,000,000
				ค่าเฉลี่ย=97		
				97×10^6		
				97,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 1.0 %	1	>300	>300	59	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	58×10^6
	2	>300	>300	57		58,000,000
				ค่าเฉลี่ย=58		
				58×10^6		
				58,000,000		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข6 : แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 ของผลการทดลองครั้งที่ 3

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนโคโลนีที่นับได้				อัตราส่วนจำนวนโคโลนี จำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับโคโลนี/กรัม (cfu/g)
	ซ้ำที่	ระดับความเจือจาง				
		1:10000 (หรือ10^{-4})	1:100000 (หรือ10^{-5})	1:1000000 (หรือ10^{-6})		
MRS	1	>300	>300	154	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	153×10^6
	2	>300	>300	152		153,000,000
				ค่าเฉลี่ย=153		
				153×10^6		
				153,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 %	1	>300	>300	93	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	92.5×10^6
	2	>300	>300	92		92,500,000
				ค่าเฉลี่ย=92.5		
				92.5×10^6		
				92,500,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 %	1	>300	>300	127	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	126×10^6
	2	>300	>300	125		126,000,000
				ค่าเฉลี่ย=126		
				126×10^6		
				126,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.5 %	1	>300	>300	93	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	91×10^6
	2	>300	>300	89		91,000,000
				ค่าเฉลี่ย=91		
				91×10^6		
				91,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 1.0 %	1	>300	>300	60	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	58×10^6
	2	>300	>300	56		58,000,000
				ค่าเฉลี่ย=58		
				58×10^6		
				58,000,000		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข7 : แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 ของผลการทดลองครั้งที่ 1

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนไดโลนีที่นับได้				อัตราส่วนจำนวนไดโลนี จำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับไดโลนี/กรัม (cfu/g)
	ซ้ำที่	ระดับความเจือจาง				
		1:10000 (หรือ10^{-4})	1:100000 (หรือ10^{-5})	1:1000000 (หรือ10^{-6})		
MRS	1	>300	>300	171	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	170×10^6
	2	>300	>300	169		170,000,000
				ค่าเฉลี่ย=170		
				170×10^6		
				170,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 %	1	>300	>300	150	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	149×10^6
	2	>300	>300	148		149,000,000
				ค่าเฉลี่ย=149		
				149×10^6		
				149,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 %	1	>300	>300	157	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	156.5×10^6
	2	>300	>300	156		156,500,000
				ค่าเฉลี่ย=156.5		
				156.5×10^6		
				156,500,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.5 %	1	>300	>300	114	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	113×10^6
	2	>300	>300	112		113,000,000
				ค่าเฉลี่ย=113		
				113×10^6		
				113,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 1.0 %	1	>300	>300	117	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	116.5×10^6
	2	>300	>300	116		116,500,000
				ค่าเฉลี่ย=116.5		
				116.5×10^6		
				116,500,000		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข8 : แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 ของผลการทดลองครั้งที่ 2

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนโคโลนีที่นับได้				อัตราส่วนจำนวนโคโลนี จำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับ โคโลนี/กรัม (cfu/g)
	ซ้ำที่	ระดับความเจือจาง				
		1:10000 (หรือ10^{-4})	1:100000 (หรือ10^{-5})	1:1000000 (หรือ10^{-6})		
MRS	1	>300	>300	182	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	180 x10^{6}
	2	>300	>300	178		180,000,000
				ค่าเฉลี่ย=180		
				180 x10^{6}		
				180,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 %	1	>300	>300	145	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	143x10^{6}
	2	>300	>300	141		143,000,000
				ค่าเฉลี่ย=143		
				143x10^{6}		
				143,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 %	1	>300	>300	166	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	165x10^{6}
	2	>300	>300	164		165,000,000
				ค่าเฉลี่ย=165		
				165x10^{6}		
				165,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.5 %	1	>300	>300	123	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	122.5x10^{6}
	2	>300	>300	122		122,500,000
				ค่าเฉลี่ย=122.5		
				122.5x10^{6}		
				122,500,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 1.0 %	1	>300	>300	109	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	108x10^{6}
	2	>300	>300	107		108,000,000
				ค่าเฉลี่ย=108		
				108x10^{6}		
				108,000,000		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวก ข9 : แสดงการคำนวณปริมาณ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638ของผลการทดลองครั้งที่ 3

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนโคโลนีที่นับได้				อัตราส่วนจำนวนโคโลนี จำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับโคโลนี/กรัม (cfu/g)
	ซ้ำที่	ระดับความเจือจาง				
		1:10000 (หรือ10^{-4})	1:100000 (หรือ10^{-5})	1:1000000 (หรือ10^{-6})		
MRS	1	>300	>300	178	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	177×10^6
	2	>300	>300	176		177,000,000
				ค่าเฉลี่ย=177		
				177×10^6		
				177,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0 %	1	>300	>300	145	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	141×10^6
	2	>300	>300	137		141,000,000
				ค่าเฉลี่ย=141		
				141×10^6		
				141,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1 %	1	>300	>300	167	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	163×10^6
	2	>300	>300	159		163,000,000
				ค่าเฉลี่ย=163		
				163×10^6		
				163,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.5 %	1	>300	>300	103	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	102×10^6
	2	>300	>300	101		102,000,000
				ค่าเฉลี่ย=102		
				102×10^6		
				102,000,000		
GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 1.0 %	1	>300	>300	117	(ใช้เพียงระดับการเจือจางเดียว)	117×10^6
	2	>300	>300	117		117,000,000
				ค่าเฉลี่ย=117		
				117×10^6		
				117,000,000		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ ข10 : ผลการคำนวณของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเชื้อ cfu/ml			Log_{10} cfu/ml			ค่าเฉลี่ย (X)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
MRS	157.5×10^6	172×10^6	165×10^6	8.20	8.24	8.22	8.22
GYP + Tween80 0 %	53×10^6	48×10^6	51×10^6	7.72	7.68	7.71	7.70
GYP + Tween80 0.1 %	139×10^6	142×10^6	141×10^6	8.14	8.15	8.15	8.15
GYP + Tween80 0.5 %	91×10^6	87×10^6	89×10^6	7.96	7.94	7.95	7.95
GYP + Tween80 1.0 %	125×10^6	115×10^6	120×10^6	8.10	8.06	8.08	8.08

ตารางภาคผนวกที่ ข11 : แสดงผลการคำนวณของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเชื้อ cfu/ml			Log_{10} cfu/ml			ค่าเฉลี่ย (X)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
MRS	162×10^6	148×10^6	153×10^6	8.21	8.17	8.18	8.19
GYP + Tween80 0 %	98.5×10^6	85×10^6	92.5×10^6	7.99	7.93	7.97	7.96
GYP + Tween80 0.1 %	108×10^6	132×10^6	126×10^6	8.03	8.12	8.10	8.08
GYP + Tween80 0.5 %	76×10^6	97×10^6	91×10^6	7.88	7.99	7.96	7.94
GYP + Tween80 1.0 %	65×10^6	58×10^6	58×10^6	7.81	7.76	7.76	7.78

ตารางภาคผนวกที่ ข12 : แสดงผลการคำนวณของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638

อาหารเลี้ยงเชื้อ	จำนวนเชื้อ cfu/ml			Log_{10} cfu/ml			ค่าเฉลี่ย (X)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
MRS	170×10^6	180×10^6	177×10^6	8.23	8.26	8.25	8.24
GYP + Tween80 0 %	149×10^6	143×10^6	141×10^6	8.17	8.16	8.15	8.16
GYP + Tween80 0.1 %	156.5×10^6	165×10^6	163×10^6	8.19	8.22	8.21	8.21
GYP + Tween80 0.5 %	113×10^6	122.5×10^6	102×10^6	8.05	8.09	8.01	8.05
GYP + Tween80 1.0 %	116.5×10^6	108×10^6	117×10^6	8.07	8.03	8.07	8.06

ตารางภาคผนวกที่ ข13 : แสดงค่าของ pH ของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า pH			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	(X)	
MRS	4.60	4.50	4.50	4.53	0.06
GYP + Tween80 0 %	4.50	4.35	4.40	4.42	0.08
GYP + Tween80 0.1 %	4.49	4.33	4.35	4.39	0.09
GYP + Tween80 0.5 %	4.52	4.36	4.38	4.42	0.09
GYP + Tween80 1.0 %	4.50	4.34	4.37	4.40	0.09

ตารางภาคผนวกที่ ข14 : แสดงค่าของ pH ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า pH			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	(X)	
MRS	4.86	4.61	4.70	4.72	0.13
GYP + Tween80 0 %	4.87	4.70	4.75	4.77	0.09
GYP + Tween80 0.1 %	4.68	4.62	4.63	4.64	0.03
GYP + Tween80 0.5 %	4.72	4.66	4.68	4.69	0.03
GYP + Tween80 1.0 %	4.69	4.63	4.66	4.66	0.03

ตารางภาคผนวกที่ ข15 : แสดงค่าของ pH ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ค่า pH			ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD.)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	(X)	
MRS	4.45	4.74	4.58	4.59	0.15
GYP + Tween80 0 %	4.45	4.48	4.40	4.44	0.04
GYP + Tween80 0.1 %	4.42	4.43	4.20	4.35	0.13
GYP + Tween80 0.5 %	4.61	4.42	4.51	4.51	0.10
GYP + Tween80 1.0 %	4.45	4.44	4.43	4.44	0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการศึกษาของ Tween 80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่ผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pedocin PA-1

ตารางภาคผนวกที่ ค1 : ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สร้าง Clear zone ถึง dilution ที่			Bacteriocin activity (AU/ml)[a]			ค่าเฉลี่ย (X)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
MRS	1:128 -	1:128 1:256	1:128 1:128	12800	19200	12800	14933.33
GYP + Tween80 0 %	1:32 1:16	1:64 1:128	1:32 1:32	2400	9600	3200	5066.67
GYP + Tween80 0.1 %	1:128 1:128	1:128 1:256	1:128 1:128	12800	19200	12800	14933.33
GYP + Tween80 0.5 %	1:64 1:64	1:64 1:64	1:64 1:64	6400	6400	6400	6400.00
GYP + Tween80 1.0 %	1:64 1:64	1:64 1:128	1:64 1:64	6400	9600	6400	7466.67

ตารางภาคผนวกที่ ค2 : ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สร้าง Clear zone ถึง dilution ที่			Bacteriocin activity (AU/ml)[a]			ค่าเฉลี่ย (X)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
MRS	1:128 1:256	1:128 1:128	1:128 1:256	19200	12800	19200	17066.67
GYP + Tween80 0 %	1:8 1:16	1:8 1:32	1:16 1:16	1200	2000	1600	1600.00
GYP + Tween80 0.1 %	1:256 -	1:128 1:64	1:128 1:128	25600	9600	12800	16000.00
GYP + Tween80 0.5 %	1:64 1:64	1:32 1:64	1:64 -	6400	4800	6400	5866.67
GYP + Tween80 1.0 %	1:32 1:32	1:32 1:16	1:32 1:32	3200	2400	3200	2933.33

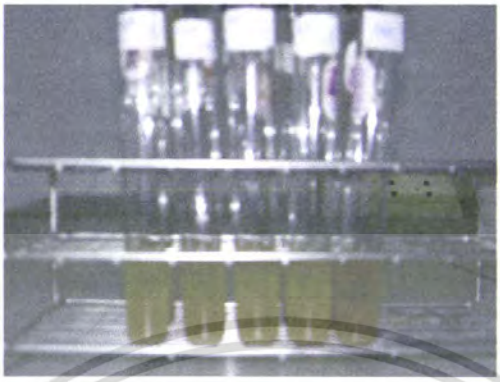
ตารางภาคผนวกที่ ค3 : ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

อาหารเลี้ยงเชื้อ	สร้าง Clear zone ถึง dilution ที่			Bacteriocin activity (AU/ml)*			ค่าเฉลี่ย (X)
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	
MRS	1:256 1 :256	1:256 1:256	1:256 1:256	25600	25600	25600	25600.00
GYP + Tween80 0 %	1:8 1:16	1:16 1:16	1:16 1:16	1200	1600	1600	1466.67
GYP + Tween80 0.1 %	1:16 1:64	1:32 1:64	1:64 1:64	4000	4800	6400	5066.67
GYP + Tween80 0.5 %	1:8 1:8	1:4 1:8	1:8 1:8	800	600	800	733.33
GYP + Tween80 1.0 %	1:2 1:2	1:2 1:4	1:2 1:2	200	300	200	233.33

*** หมายเหตุ** a = Bacteriocin activity ที่ได้จาก Critical dilution method

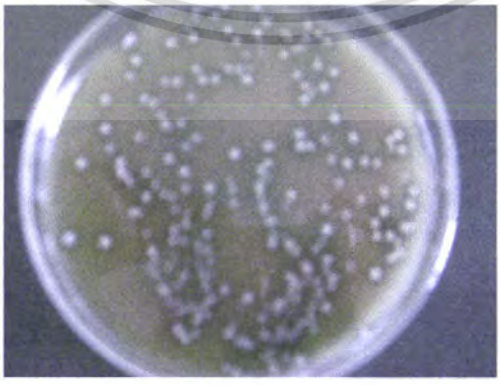
ภาคผนวก ง

ภาพแสดงวิธีการทดลองและภาพแสดงผลการทดลอง



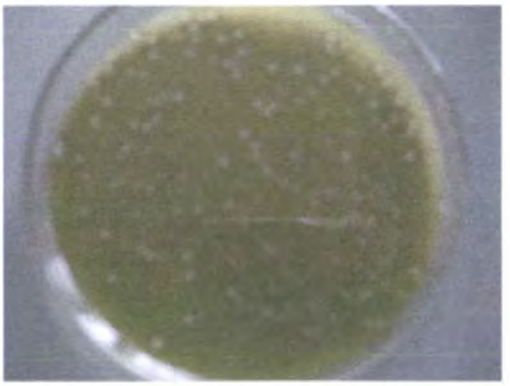
ภาพผนวกที่ ง1 : แสดงลักษณะของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth และ GYP broth ที่ทำการในการเพาะเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ภาพผนวกที่ ง2 : แสดงลักษณะการบ่มเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ Spread plate แล้วใน Candle jar



ภาพผนวกที่ ง3 : แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

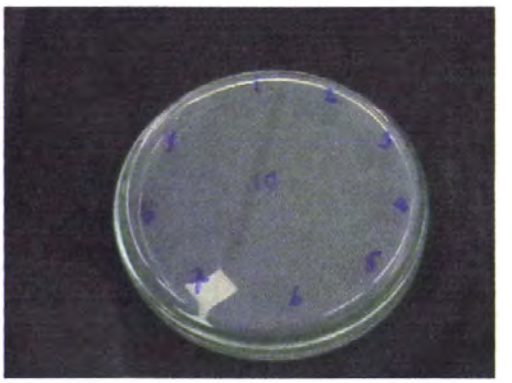


ภาพผนวกที่ ง4 : แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497

ภาพผนวกที่ ง5 : แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638

ภาพผนวกที่ ง6 : แสดงลักษณะของอัตราส่วนระดับการเจือจางต่าง ๆ ในหลอด Appendorf เพื่อทำการตรวจหา Bacteriocin activity

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

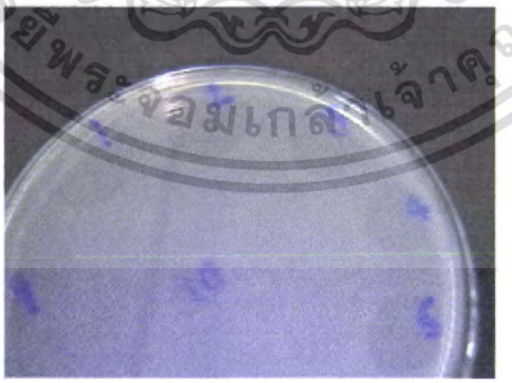


ภาพผนวกที่ ง7 : แสดงลักษณะของ Bacteriocin activity ของเชื้อ

Pediococcus pentosaceus TISTR 536

ภาพผนวกที่ ง8 : แสดงลักษณะของ Bacteriocin activity ของเชื้อ

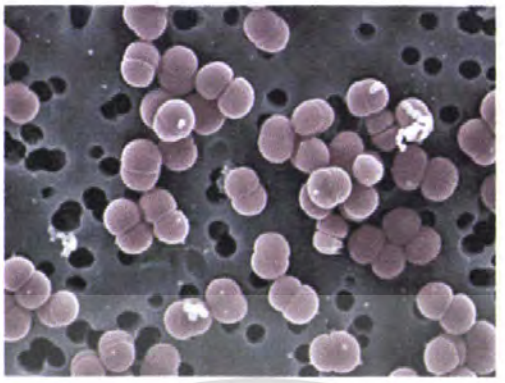
Lactococcus lactis subsp. lactis NCDO 497



ภาพผนวกที่ ง9 :แสดงลักษณะของ Bacteriocin activity ของเชื้อ

Lactococcus lactis subsp. lactis IO-1 JCM 7638

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

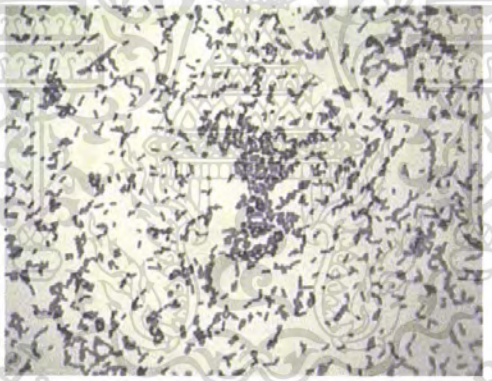


ภาพผนวกที่ ง10 : *Pediococcus pentosaceus*
http://bioweb.usu.edu/microscopy/Research.htm

ภาพผนวกที่ ง11 : *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis*
http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/laccr/laccr.home.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวกที่ ง12 : *Listeria monocytogenes*
http://www.biocentrex.com/html/food_safety_information.html



ภาพผนวกที่ ง13 : *Listeria monocytogenes*
http://medinfo.ufl.edu/year2/mmid/bms5300/images/d7115.jpg

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองจะพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 , *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 , *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 เพื่อใช้ในการผลิต Nisin A , Nisin Z และ Pediocin PA-1 พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญของเซลล์ที่สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างๆ จะพบว่าการเจริญของเซลล์ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% มีค่าใกล้เคียงกัน แต่ในขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 มากเกินไป คือ 0.5 % และ 1% จะไม่ส่งผลต่อการเจริญของเซลล์ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น แต่ถ้ามีความเข้มข้นของ Tween 80 น้อยเกินไป คือ 0 % จะพบว่ามีการเจริญของเซลล์น้อยกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

การเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการบ่ม แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติก ทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้นๆได้ดีเพียงใด โดยที่การเจริญยิ่งมากเท่าไร ค่า pH สุดท้ายก็ยิ่งน้อยลงเท่านั้น เนื่องจากมีการผลิตกรดได้มาก ซึ่งจากผลการทดลอง (ตารางที่) จะพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ จะมีค่า pH ต่ำที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน แต่มีความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างกัน

ส่วนการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบนั้น พบว่าจะมีค่า Bacteriocin Activity ที่สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่า Bacteriocin Activity ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างๆ จะพบว่าค่า Bacteriocin Activity ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% มีค่าใกล้เคียงกัน ยกเว้น สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IO-1 JCM 7638 จะให้ค่า Bacteriocin Activity ที่น้อยกว่า 2 สายพันธุ์ แต่เมื่อเปรียบเทียบในกลุ่มอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ชนิดเดียวกันแต่มีความเข้มข้นของ Tween 80 แตกต่างกัน แต่ก็ยังถือว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% ให้ค่า Bacteriocin Activity ที่สูงที่สุด

ดังนั้นจากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้ จึงสรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก จะให้ผลการเจริญและการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีอยู่ในเชิงการค้า ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% สามารถใช้แทนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีอยู่ในเชิงการค้าได้ ซึ่งเป็นการประหยัดต้นทุนในการใช้จ่ายอีกด้วย เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีอยู่ในเชิงการค้ามีราคาค่อนข้างสูงเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้