ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การคัดเลือกเชื้อทนเกลือของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักไทย

(Screening Halotolerant bacteriocin-producing lactic acid isolated from thai fermented foods)

จัดทำโดย

นางสาวปาจรีย์ ฤทธิ์นอก
นายณัฐพงษ์ อัมพลพ

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 24 / 03 / 49 **อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ**

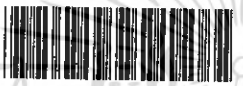
(ผศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกเชื้อทนเกลือของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักไทย

(Screening Halotolerant bacteriocin-producing lactic acid isolated from thai fermented foods)



นางสาวปาจรีย์ ฤทธิ์นอก
นายณัฐพงษ์ อัมพลพ

ปพ.
ป5ค21
ส5ค7
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วัน,เดือน,ปี.....

รายงานปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาอุตสาหกรรมเกษตร
โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปาจรีย์ ฤทธิ์นอก และ ณัฐพงษ์ อัมพลพ. 2548. : การคัดเลือกเชื้อทนเกลือของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักไทย (Screening Halotolerant bacteriocin-producing lactic acid isolated from thai fermented foods). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ , 44 หน้า

แบคทีเรียกรดแลคติคและแบคเทอริโอซินนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ เป็นวิธีการที่เลียนแบบมาจากการรักษาสมดุลของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆ การถนอมอาหารโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติคเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัย จากคุณสมบัติต่างๆของสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นนี้ ล้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารได้เป็นเวลานาน ในการทดลองได้ทำการศึกษาวิจัยการเจริญเติบโตและการสร้างแบคเทอริโอซินของ *Lactococcus lactis* N 100, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 จากตัวอย่างแหนม (Swetwiwathana and Lotong, 1999) และ *Lactobacillus plantarum* RS 49 และ RS 54 จากไส้กรอกอีสานใน MRS Broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 % ผลปรากฏว่า *Lactococcus lactis* N 100 และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 จากตัวอย่างแหนม (Swetwiwathana and Lotong, 1999) สามารถเจริญได้ในความเข้มข้นเกลือ 0, 2.5, 5.0 และ 7.5% สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในความเข้มข้นเกลือ 10.0 % ขณะที่ *Lactobacillus plantarum* RS 49 และ RS 54 จากไส้กรอกอีสานสามารถเจริญได้ในความเข้มข้นเกลือ 0, 2.5 และ 5.0 % สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในความเข้มข้นเกลือ 7.5 และ 10.0 % และสร้างแบคเทอริโอซินได้โดยมีโดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 1,600 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU /ml^{-1})

ปาจรีย์ ฤทธิ์นอก
ณัฐพงษ์ อัมพลพ
ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

21/03/49
วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การนำเสนอปัญหาพิเศษเรื่อง การคัดเลือกเชื้อทนเกลือของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอรโอซินที่แยกได้จากอาหารหมักไทย สำเร็จลงด้วยดี คณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์ เป็นอย่างสูงที่ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษของคณะผู้จัดทำและสละเวลาอันมีค่ามาแนะนำ ให้คำปรึกษาและดูแลเอาใจใส่เป็นอย่างมาก รวมทั้งช่วยปรับปรุงแก้ไขรายงานฉบับนี้ให้ถูกต้องเสร็จสมบูรณ์ไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่ให้กำลังใจและกำลังทรัพย์ในการทำงานครั้งนี้ ขอบคุณเพื่อนๆ ที่ช่วยให้คำปรึกษา ให้คำชี้แนะ ความช่วยเหลือและกำลังใจด้วยดีเสมอมา

ปาจรีย์ ฤทธิ์นอก

ณัฐพงษ์ อับพลพ

24 มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์	2
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก	3
2.2 แบคทีเรียทนเกลือ	5
2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก	6
2.4 เชื้อแบคทีเรียในจีเนียสลิสทีเรีย	18
บทที่ 3 อุปกรณ์ สารเคมี เชื้อจุลินทรีย์ และวิธีการทดลอง	
3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง	19
3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	21
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์การทดลอง	27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	34
เอกสารอ้างอิง	35
ภาคผนวก	41

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1	การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ	10
ตารางที่ 2	แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งแยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ	13
ตารางที่ 3	แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งถูกยับยั้งโดย แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ	14
ตารางที่ 4	ผลการทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ	15
ตารางที่ 5	แสดงผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ(0%,2.5%,5.0%,7.5%,10.0%) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	28
ตารางที่ 6	ผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7.5 %	29
ตารางที่ 7	ผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10.0 %	29
ตารางที่ 8	แสดงผลการศึกษาค่า pH การเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%)เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	30
ตารางที่ 9	แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L.innocua* ของเชื้อ N 100 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	32
ตารางที่ 10	แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L.innocua* ของเชื้อ 536 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	32
ตารางที่ 11	แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L.innocua* ของเชื้อ RS 49 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	33
ตารางที่ 12	แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L.innocua* ของเชื้อ RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) บ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	33

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	แบบจำลองการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก	11
ภาพที่ 2	การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามธรรมชาติทั่วไปและมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักชนิดต่างๆเช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ชีอิ้ว แหนม ไส้กรอก สัตว์น้ำที่แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก ผักและผลไม้ดองต่างๆ (Pot et al.,1994)โดยแบคทีเรียดังกล่าวทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติเฉพาะตัวในแต่ละผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ยังช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและอาหารเสื่อมเสียที่ปนเปื้อนมาในผลิตภัณฑ์ ด้วยสารเมแทบอไลซ์ (metabolite) ที่สร้างขึ้น เช่น กรดอินทรีย์(organic acids) คาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) เอทานอล (ethanol) ไดอะซีทิล (diacetyl) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) รวมทั้งการทำให้เกิดการแข่งขันในการใช้สารอาหารและพื้นที่สำหรับการเจริญกับจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต (Adam, 1999 ; Franz et al.,1998) ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคเทอริโอซินได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวาง สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ(biopreservation)ซึ่งเป็นวิธีที่เลียนแบบมาจากการรักษาสมดุลย์ของจุลินทรีย์กลุ่มต่างๆในธรรมชาติ จึงไม่มีสารพิษตกค้างเหมือนการใช้วิธีทางเคมี (Schillinger et al., 1996 ; Yildirim and Johnson, 1998 ; Rodriguez et al.,2003)ดังนั้น FDA จึงกำหนดให้การถนอมอาหารโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกหรือไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่งที่ถูกสร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นวิธีการที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS) (Eckner,1992) โดยการใช้งานอาจใช้ในรูปของแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ กึ่งบริสุทธิ์หรือเซลล์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเป็นเชื้อตั้งต้น(starter cultures)ในกระบวนการผลิตอาหารหมัก (Fields, 1996) นอกจากนี้ยังมีการนำแบคเทอริโอซิน โดยเฉพาะไนซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารประเภทต่างๆ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดซึ่งปนเปื้อนและมีผลต่อคุณภาพรวมถึงความปลอดภัยของอาหาร เช่น *Staphylococcus* sp., *Listeria* sp., *Clostridium* sp., และ *Bacillus* sp. (De Vuyst and Vandamme, 1994)

จากคุณสมบัติต่างๆของสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นนี้ ล้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารได้เป็นเวลานาน ในการศึกษาวิจัยนี้เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกและการผลิตแบคเทอริโอซินในความเข้มข้นเกลือที่ระดับต่างๆ รวมทั้งศึกษาถึงสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทนเกลือโดยมีวัตถุประสงค์เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดและเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์

1.เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลกติกและการผลิตแบคเทอริโอซินในความเข้มข้นเกลือที่ระดับต่างๆ

2.เพื่อศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* ของแบคเทอริโอซินที่เชื้อแต่ละสายพันธุ์สร้างขึ้นในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.1. คุณลักษณะและคุณสมบัติทั่วไป แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria)ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือเป็นท่อนยาว ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophilic)ไม่มีไซโทโครม มีปริมาณของเบส G+C น้อยกว่า 50 โมลเปอร์เซ็นต์ (mol%) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) แต่อาจพบการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลสได้ (pseudocatalase enzyme) โดยเฉพาะในสภาวะการเจริญที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลอยู่น้อย สามารถทนต่อสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด – เบส (pH) ต่ำกว่า 5 อุณหภูมิสูงกว่า 37-40 องศาเซลเซียส รวมทั้งต้องการสารประกอบไนโตรเจนที่มีความซับซ้อนเพื่อใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนและวิตามินสำหรับการเจริญและการสร้างอินทรีย์ (Pot et al., 1994; Ringo and Gatesoupe, 1998) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกต้องการพลังงานสำหรับการเจริญจากกระบวนการหมัก (fermentation) คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ เช่น น้ำตาลกลูโคสซึ่งกระบวนการหมักสามารถแบ่งได้เป็น 2 ลักษณะ (Litchfield, 1996; Holzapfel and Wood, 1995) คือ

ก. homofermentation เป็นกระบวนการหมักกลูโคสแล้วได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก เช่น ที่พบใน *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งกลไกการเกิดกรดแลคติคจะเป็นไปตาม glycolysis (Embden-Meyerhof-Parnas) pathway คือ การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) แล้วจึงเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์ แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) (Schlegel, 1993; Holzpfel and Wood, 1995)

ข. heterofermentation เป็นกระบวนการหมักที่จะเกิดกรดแลคติกเพียงบางส่วน ที่เหลือเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือกรดแอซีติก เช่นที่พบใน *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus bifermentans*,*Lactobacillus fermentum*,*Leuconostoc lactis*,*Leuconostoc mesenteroides* แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับ glycolysis pathway กลไกการเกิดกรดแลคติคและสารอื่นๆ นั้นจะเป็นไปตาม pentose phosphate pathway และ glycolysis pathway (Schlegel, 1993; Holzpfel and Wood, 1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก ในระยะแรก Orla-Jensen (1991) ได้จัดหมวดหมู่แบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปแบบของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ และโครงร่าง (configuration) ของกรดแลคติกที่สร้างขึ้น ออกเป็น 4 สกุล ได้แก่ *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* ซึ่งต่อมาได้มีการนำเอาความรู้ทางด้านสรีรวิทยา ชีวเคมีและพันธุศาสตร์มาช่วยในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น องค์ประกอบของผนังเซลล์ (Kandler and Weiss, 1986), ชนิดและปริมาณของกรดไขมันภายในเซลล์ (Schleifer, 1987), เทคนิค SDS-PAGE ของโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์ (Pot et al. 1993), ความเหมือนกันของดีเอ็นเอ (DNA homology) (Johnson, 1984), การศึกษาความแตกต่างของพลาสมิดที่อยู่ภายในเซลล์ (plasmid profile) (Josephson and Nielsen, 1988), ลำดับเบสของ ribosomal RNA (Saiki et al.,1998) ดังนั้นจึงทำให้สามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกจาก 4 สกุลข้างต้นออกเป็นสกุลใหม่ๆ เพิ่มขึ้น เช่น สกุล *Streptococcus* ถูกแบ่งออกเป็น 4 สกุล คือ *Enterococcus*, *Lactococcus* *Streptococcus* และ *Vagococcus* ส่วน *Pediococcus halophilus* ถูกแยกออกมาอยู่ในสกุลใหม่คือ *Tetragenococcus halophilus* นอกจากนี้ยังมีการแยกสกุล *Carnobacterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างท่อนออกมาจากสกุล *Lactobacillus* เป็นต้น (Stiles and Holzapfel, 1997) ต่อมา Axelsson (1998) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางฟีโนไทป์(phenotype)และลักษณะอื่นๆออกเป็น 12 สกุลคือ *Aerococcus*(*A.*), *Carnobacterium*(*C.*), *Enterococcus* (*E.*), *Lactobacillus* (*Lb.*), *Lactococcus* (*Lc.*), *Leuconostoc*(*Ln.*), *Oenococcus*(*O.*), *Pediococcus*(*P.*), *Streptococcus*(*S.*), *Tetragenococcus*(*T*), *Vagococcus*(*V.*) และ Weissella(*W.*) โดยในจำนวนนี้พบว่า 11 สกุล (ยกเว้น *Aerococcus*) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งถูกระบุว่ามีความสำคัญและเกี่ยวข้องกับอาหาร (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.1.3. แหล่งที่พบ สามารถพบแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในอาหารประเภทต่างๆ เช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ผักและผลไม้ นมและผลิตภัณฑ์ อาหารที่ผ่านกระบวนการหมักชนิดต่างๆ นอกจากนี้ยังพบในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร สิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ รวมถึงในน้ำเสียจากแหล่งต่างๆ อีกด้วย (Pot et al., 1994 ; Sarkar and Banerjee, 1996; Stiles and Holzapfel, 1997) สำหรับในปลาที่มีชีวิต Ringo and Gatesoupe(1998) ได้รวบรวมผลการศึกษาถึงชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในบริเวณส่วนต่างๆ ของปลาแต่ละชนิด ซึ่งพบว่าในบริเวณระบบทางเดินอาหารของปลาจะพบแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*, *Carnobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* อาศัยอยู่ นอกจากนี้ยังพบอีกว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดที่อาจทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำ ได้แก่ *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Vagococcus* และ *Carnobacterium* โดยแบคทีเรียเหล่านี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะทำให้เกิดโรคที่อวัยวะภายในของสัตว์น้ำ เช่น ไต ตับ ม้าม ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสกุลจะทำให้เกิดโรคในสัตว์น้ำแต่ละชนิดที่ต่างกันออกไป จึงเห็นได้ว่าปลาและสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ที่ยังมีชีวิตอยู่และที่ผ่านกระบวนการหมักเป็นแหล่งที่อยู่สำคัญสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก

2.1.4. ความสำคัญ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติซึ่งน่าสนใจทั้งในด้านเศรษฐกิจ รวมถึงสุขภาพอนามัยของมนุษย์และสัตว์ เช่น ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแล็กโทส การสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีน ความสามารถในการต้านทานต่อแบคเทอริโอฟาจ (bacteriophage) การสร้างแบคเทอริโอซินและคุณสมบัติทางด้านอิมมูโนวิทยา (McKay et al., 1983) ช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านโภชนาการของอาหาร กระตุ้นกระบวนการสร้างวิตามิน ป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องทางเดินปัสสาวะ ลดระดับคอเลสเตอรอล (cholesterol) ในกระแสเลือด ลดความเป็นพิษจากสารก่อมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก (Gilliland, 1990) นอกจากนี้ De Vuyst and Vandamme (1994) ได้กล่าวถึงความสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกต่ออุตสาหกรรมอาหารหมักไว้ว่า เป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อให้เกิดโรค ไม่สร้างสารพิษหรือผลผลิตที่เป็นพิษ มีคุณสมบัติที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อยและสามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดี จึงไม่ต้องการกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน มีการเจริญที่รวดเร็วจึงใช้ระยะเวลาในกระบวนการผลิตสั้น เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นเวลานาน การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียและแบคทีเรียอื่นๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการผลิต

2.2 แบคทีเรียทนเกลือ (Halotolerant bacteria)

Halotolerant bacteria : คือแบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์แต่ไม่ได้ต้องการโซเดียมคลอไรด์

halophilic หรือ halotolerant bacteria เป็นแบคทีเรียชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นสูงหรือเป็นที่รู้จักกันคือ halobacteria แบคทีเรียที่จัดเป็นชนิด halotolerant สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีเกลือสูงแต่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะแวดล้อมที่มีเกลืออำสูง ส่วน halophilic คือแบคทีเรียที่ต้องการเกลือไปใช้ในการเจริญเติบโต

Rastelli (2005) แยกแบคทีเรียสกุล *Carnobacterium* sp. จากแฮมหมักแห้งเป็น halotolerant bacteria แกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase enzyme) และเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase enzyme) ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างท่อนสั้นและมีรายงานการตรวจพบ *Marinilactibacillus psychrotolerans* ในแฮมหมักแห้งซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเกลือสูง อุณหภูมิต่ำ(0-3 ^{0}C) และ pH ปานกลาง *Marinilactibacillus psychrotolerans* ถูกพบเป็นครั้งแรกโดย Ishikawa et al. (2003) ซึ่งแบคทีเรียชนิดนี้มาจากพื้นที่บริเวณทะเลเขตร้อนของประเทศญี่ปุ่น พบในผลิตภัณฑ์นมและเนยแข็ง *M. psychrotolerans* มีลักษณะที่เป็น halophilic lactic acid bacterium

Marinilactibacillus psychrotolerans (Ishikawa et al., 2003) เป็น lactic acid bacterium แบคทีเรียชนิดนี้แยกมาจากสิ่งมีชีวิตในทะเล (ฟองน้ำ,การเน่าเปื่อยของสาหร่ายทะเล และเปลือกของสัตว์ทะเล) สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีเกลือ(halophilic) และสามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่มีเกลือ (halotolerant) เข้มข้นของเกลือ 3.2 - 3.8 % (w/v) pH 8.2-8.3 พบอยู่ในสิ่งมีชีวิตที่มีอยู่ในทะเล ซึ่งเรียกว่า " marine lactic acid bacterium " *Marinilactibacillus* เป็นแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโต เป็น halophilic และ halotolerant เป็น alkaliphilic เล็กน้อย

Amano (1962) กล่าวว่าในอาหารหมักประเภทปลาพบว่า จุลินทรีย์ที่ติดมากับเกลือ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในขบวนการหมัก แบคทีเรียที่พบในเกลือสินเธาว์มีพวก *Micrococcus* ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ และ *Corynebacterium* 20 เปอร์เซ็นต์ และ *Bacillus* อีกประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณทั้งหมด ส่วนในเกลือทะเลพบกลุ่มฮาโลไฟล์ ซึ่งติดมาจากน้ำทะเล เช่น *Halobacterium*, *Serratia Salinaria*, *Serratia cutirubra* นอกจากนี้ยังพบ *Micrococcus* และ *Sarcina* อีกด้วย ส่วน *Bacillus* ที่พบในเกลือทะเลส่วนใหญ่เป็น *Bacillus subtilis* และ *Bacillus megaterium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือมากกว่า 10 เปอร์เซ็นต์

2.3 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคซึ่งปะปนมากับอาหาร เช่น *B. cereus*, *Clostridium botulinum*, *Cl .perfringens*, *S .aureus*, *Listeria monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (Abee et al., 1995; Franz et al., 1998; De Vuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติกและกรดแอซีติก รวมทั้งยังมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติกและกรดแอซีติก แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก (formic acid) , กรดไขมันอิสระ (free fatty acid), แอมโมเนีย (ammonia), เอทานอล (ethanol), ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide), ไดอะซีทิล (diacetyl), อะซีโตอิน (acetoin), อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde), เบนโซเอต (benzoate), เอนไซม์ที่มี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก(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) นอกจากนี้การที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อมคือ จะทำให้เกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหารและการใช้พื้นที่สำหรับการเจริญ (Adams, 1999) โดยสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่

2.3.1. กรดอินทรีย์ กรดอินทรีย์ชนิดที่มีความสำคัญได้แก่ กรดแลคติกซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเป็นผลผลิตที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะมีการเปลี่ยนไพรูเวต (pyruvate) ไปเป็นกรดแลคติกโดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ซึ่งกรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลคติกสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ได้ และเมื่อเจอสภาพภายในเซลล์ที่มีค่าความเป็นกรด-เบสสูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลคติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolism) ต่างๆ ภายในเซลล์(De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.3.2. ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ โดยยังพบอีกว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์นอกจากจะสามารถทำลายจุลินทรีย์ได้โดยตรงแล้วยังไปรวมตัวกับสารอื่นๆและเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.3.3. คาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลแบบ heterofermentation โดยแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบๆ ทำให้เกิดสภาวะ anaerobe ซึ่งไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจนโดยเฉพาะในกลุ่มของเชื้อรา นอกจากนี้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ยังทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสภายในเซลล์ และรอบเซลล์ ลดลงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย(De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.3.4.ไดอะซีทิล หรือ 2,3 – butanedione เป็นผลผลิตจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของไพรูเวต โดยแบคทีเรียกรดแลคติคในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วยจะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นไดอะซีทิลและอะซีโตอิน โดยไดอะซีทิลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไดอะซีทิลจะไปขัดขวางการใช้อาร์จินินของแบคทีเรียแกรมลบโดยไปแทนที่อาร์จินินในการรวมตัวกับarginine-binding protein (De Vuyst and Vandamme, 1994)

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

2.3.6 แบคเทอริโอซิน

2.3.6.1 ประวัติความเป็นมาและความหมายของแบคเทอริโอซิน

ในระยะเริ่มต้นของการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินพบว่า *E. coli* V สามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีนออกมายับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ และเรียกสารดังกล่าวว่า colicins ต่อมามีการค้นพบสารที่มีลักษณะคล้าย colicin ซึ่งสารโดยแบคทีเรียแกรมบวกจึงมีการเรียกสารกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติดังกล่าวว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) โดยในระยะแรกพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นโมเลกุลของโปรตีน ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีคุณสมบัติในการทำลายเฉพาะแบคทีเรียสายพันธ์ต่างๆในสปีชี่(species)เดียวกันเท่านั้น (Jacob et al., 1953) ต่อมา Tagg et al.(1976) ได้ให้คำจำกัดความของแบคเทอริโอซินว่าเป็นสารประกอบโปรตีนที่มีลักษณะดังนี้ (1) มีการออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในชนิดเดียวกันหรือที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินออกมา (2) การออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการยับยั้งเกิดการตาย (bactericidal mode of action) (3) มีตำแหน่งที่จำเพาะในการยึดจับกับเซลล์เป้าหมาย (4) ยีนที่ควบคุมการสร้างและการต้านทานของเซลล์ต่อแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นอยู่บนพลาสมิด (plasmid) (5) เซลล์ที่สร้างจะถูกทำลายขณะที่มีการปลดปล่อยแบคเทอริโอซินออกนอกเซลล์ แต่พบว่ามีผลการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินชนิดต่าง ๆ ที่ให้ผลที่ไม่สอดคล้องกับคำจำกัดความข้างต้น เช่น leucocin A-UAL 187 และ leucocin S สามารถยับยั้งได้เฉพาะการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียทดสอบได้เท่านั้น(Hastings and Stiles, 1991;

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lewus et al., 1992) ไนซิน (nisin) ซึ่งสร้างจาก *Lc. lactic* สามารถทำลาย *S. aureus* และเซลล์ที่ไม่มีผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ (Anderson, 1983) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าการสร้างแบคเทอริโอซินภายในเซลล์ของแบคทีเรียหมือนกับการสร้างโปรตีนทั่วไปที่ผลิตจากไรโบโซมซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการลอกแบบ (transcription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่นไนซิน, lactocin, helveticin J, lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin, lacticin 481, lactococcins, pediocins, sakacin A และ lactocin 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	ทำลายเนื้อเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษของผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cleveland และคณะ (2001)

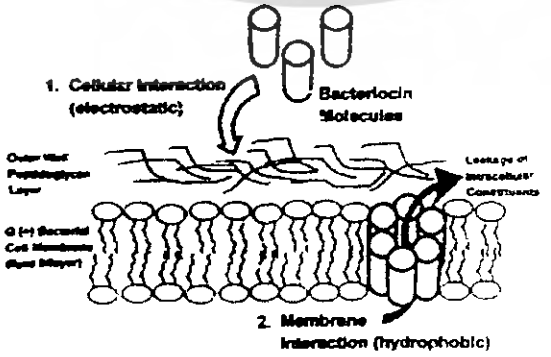
จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยชนิดกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก(Jack et al.,1995) โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบได้มีการศึกษากันในด้านต่าง ๆ ได้แก่ โครงสร้างของโปรตีน กิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมาย กระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ที่ผลิต กลไกการเข้าทำลายและตำแหน่งของการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เป้าหมาย ตัวอย่างเช่น colicins ซึ่งผลิตโดย *E. coli* และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ชนิดอื่น ๆ หรือ microcins ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ (De Vuyst and Vandamme, 1994) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกพบว่ามีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบคือ มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้หลายชนิดรวมทั้งเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เป้าหมายจะมีการต้านทานน้อยและไม่ต้องการตำแหน่งเฉพาะเจาะจงบนเซลล์เป้าหมายเพื่อการเข้าทำลาย นอกจากนี้การควบคุมการผลิตภายในเซลล์ถูกควบคุมได้ทั้งจากพลาสมิดและโครโมโซม (Tagg et al.1976) โดยในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทสำคัญในการสร้างสารซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ ได้หลายชนิด โดยเฉพาะแบคเทอริโอซิน ซึ่งพบว่าสารดังกล่าวเป็นสายเพปไทด์หรือโปรตีนขนาดเล็กและในแบคเทอริโอซินบางชนิด เช่น ไนซิน อาจพบกรดอะมิโนที่ไม่ค่อยพบในโปรตีนปกติทั่วไป เช่น dehydroalanine, dehydrobutyrine โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโนภายในโมเลกุลรวมถึงมีโครงสร้างของโมเลกุลที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน(proteolytic enzymes)ที่แตกต่างกันด้วย(Kleinkauf and von Dohren, 1987) โดย Montville and Kaiser (1993) ได้รวบรวมชนิดของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบชนิดต่าง ๆ ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินไว้ ได้แก่ *Acetobacter*, *Actinobacillus*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Clostridium*, *Enterococcus*, *Erwinia*, *Haemophilus*, *Haloferax*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc*,*Pseudomonas*,*Pediococcus*,*Salmonella*,*Propionibacterium*,*Serratia*,*Staphylococcus*, *Shigella*, *Streptococcus* และ *Yersinia*

2.3.6.2 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซินเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาร่วมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่าง ที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel- stave) ดังแสดงในแบบจำลองภาพที่ 2 โดยรูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ (Klaenhammer, 1993; Abee, 1995; Jack et al., 1995 ; Ennahar et al., 2000) ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคเทอริโอซิน



ภาพที่ 1 แบบจำลองการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

เอกสารนี้มีลิขสิทธิ์ ห้ามนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคเทอริโอซินนอกจากจะมีผลในการฆ่าทำลายเซลล์เป้าหมาย (bactericidal)แล้ว ยังอาจมีผลในการหยุดการเจริญของเซลล์(bacteriostatic)ได้ด้วยดังเช่นที่พบในleuconocin S ซึ่งแบคเทอริโอซินจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้นมักขึ้นอยู่กับ ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน สภาพแวดล้อม ชนิดและปริมาณของเซลล์เป้าหมาย (De Vuyst and Vandamme , 1994) ซึ่งตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งคัดแยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

2.3.6.3การใช้ประโยชน์แบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันการถนอมอาหารโดยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในผลิตภัณฑ์โดยการไปแข่งขันในการใช้สารอาหาร รวมทั้งสร้างสารยับยั้งบางชนิดออกมา (Schillinger et al., 1996) ซึ่งในกลุ่มของสารยับยั้งพบว่าแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะไนซินเป็นสารที่ได้รับการยอมรับทั้งในด้านความปลอดภัยโดย FDA (Eckner, 1992) และ FAO/WHO (Schillinger et al, 1996) ซึ่งพบว่าไนซินมีการผลิตขายในทางการค้ารวมทั้งมีการใช้ในประเทศต่างๆ 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 ซึ่งสารดังกล่าวจะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายทำให้เซลล์มีความไวต่อแบคเทอริโอซินมากขึ้น (Stevens et al., 1991; Cutter and Siragusa, 1995) โดยแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ ได้รวบรวมไว้ดังในตารางที่ 3

ส่วนการนำแบคเทอริโอซินไปใช้งานนั้นอาจดำเนินการได้ใน 3 ลักษณะคือ (1) การเติมแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินลงไปเป็นเชื้อตั้งต้นหรือเชื้อที่มีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก (2) การเติมแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ลงไปเป็นสารถนอมอาหาร (3) การเติมผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินลงไปเป็นส่วนประกอบในกระบวนการผลิตอาหาร (Schillinger et al., 1996) Cleveland และคณะ(2001) ได้รวบรวมการทดลองที่ใช้ประโยชน์แบคเทอริโอซินเป็นสารถนอมอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติคซึ่งแยกได้จากอาหารชนิดต่างๆ

แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Carnocin L V17	Carnobacterium piscicola L V17	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Carnocin UI49	C. piscicola UI49	ปลา
Carnocin CP5	C. piscicola CP5	เนยแหลว
Piscicolin 61	C. piscicola L V 61	เนื้อวัว
Enterocin 226 NWC	Enterococcus faecalis 226	เนยที่ทำจากหางนมของกระบือ
Enterocin 6E	Enterococcus faecium 6E	เนย
Enterocin 01	E. faecium NA 01	น้ำนมเปรี้ยวของประเทศไนจีเรีย
Enterocin RZS C5	E. faecium RZS C5	เนย
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	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Sakacin P	Lb. sake LTH673	เนื้อวัว
Curvacin A	Lb. curvatus LTH1174	ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์
Nisin	Lactococcus lactis BB24 & G18	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Carnosin 44A	Leuconostoc carnosum LA44A	ไส้กรอกแบบเวียนนา
Carnosin 54	Ln. carnosum LA54A	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Leucocin B-Talla	Ln. carnosum Talla	เนื้อวัวแปรรูปในถุงสุญญากาศ
Leucocin A-UAL 187	Ln. gelidum UAL187	เนื้อวัวแปรรูป
Mesenterocin Y105	Ln. mesenteroides Y105	น้ำนมแพะ
Mesenterocin 52	Ln. mesenteroides FR 52	น้ำนมวัวดิบ

ที่มา: รวบรวมและดัดแปลงจาก Muriana (1996)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติคชนิดต่างๆ

แบคทีเรียกรดแลคติค	แหล่งที่คัดแยก	แบคทีเรียที่ถูกยับยั้ง
Carnobacterium piscicola **CP5**	เนยแข็ง	*Carnobacterium,Listeria,Enterococcus*
C. piscicola **JG 126**	แฮมที่เสื่อมคุณภาพ	*Listeria monocytogenes*
Enterococcus mundtii	ผัก	*L. monocytogenes*, *Clostridium botulinum*
E. faecalis **226**	หางนม	*L. monocytogenes*
E. faecalis **EFS2**	เนย	*L. innocua*
Lactobacillus delbrueckii	เนยแข็งอิตาลี	*L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *E. faecalis*, *E. coil*,*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. sporogenes*
Lb. plantarum **SA6**	ไส้กรอกหมัก	*Lactobacillus*
Lb. bavaricus	แป้งขนมปัง	*L. monocytogenes*
Lactococcus lactis	พืชหัว	*Clostridium*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Leuconostoc*
Lc. lactis subsp. *lactis*	กระหล่ำปลีดอง	*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 **Ta 11A**	เนื้อวัว	*L. monocytogenes*
Streptococcus sp.	ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก	*Clostridium* sp. , *L. monocytogenes*

ที่มา: รวบรวมและดัดแปลงจาก Cleveland และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ผลการทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ

ชนิดของแบคเทอริโอซิน	ลักษณะการประยุกต์ใช้งาน	ผลที่ได้
Nisin A	ใช้เติมลงในขั้นตอนการผสมเนื้อสัตว์	ลดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์
Pediocin AcH	ใช้พ่นลงบนผิวหน้าของเนยแข็ง ในช่วงเริ่มต้นของการบ่ม	ยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes*
Enterocin 4	ใช้ *Enterococcus faecalis* INIA 4 ซึ่งผลิต enterocin 4 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* Ohio แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* Scott A
Linocin M -18	ใช้ Brevibacterium lines ซึ่งผลิต linocin M -18 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	ลดจำนวนของ L. ivanovii และ *L. monocytogenes* ลง 100 เท่า
Nisin A	ใช้เติมลงไปในกระบวนการผลิตเนย	ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้นาน 8 สัปดาห์
Piscicolin 126	ใช้เติมลงในแฮมบด	ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายได้ดีกว่าการใช้ไนซิน
Leucocin A	ใช้ *Leuconostoc* gelidum UAL 187 ซึ่งผลิต leucocin A ผสมลงในเนื้อที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะสุญญากาศ	ยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sake* ได้นาน 8 สัปดาห์
Leucocin 705	ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อบด	ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*
Pediocin AcH	ใช้ Pediococcus acidilactici ซึ่งผลิต pediocin AcH เป็นเชื้อตั้งต้น	ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*
Pediocin	ถ่ายยีนที่ควบคุมการสร้าง pediocin ไปสู่ Saccharomyces cerevisiae	ช่วยในการถนอมอาหารอบและไวน์
Pediocin AcH	เติมลงในไก่สด	ควบคุมการเจริญ *L. monocytogenes* ได้นาน 28 วัน ที่อุณหภูมิ 5 °C
Enterocin	เติมลงในแฮม เนื้อไก่ เนื้อหมู และไส้กรอก	ควบคุมการเจริญ *L. monocytogenes*

ที่มา: รวบรวมและดัดแปลงจาก Cleveland และคณะ (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.6.4 การศึกษาถึงแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินในประเทศไทย

อาภัสรา (2537) แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักผลไม้ดอง แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ได้จำนวน 50 สายพันธุ์ โดยทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coil*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* โดยปรับค่าความเป็นกรด-เบสของน้ำเลี้ยงเชื้อที่มีอายุ 36 ชั่วโมงให้เป็นกลางพบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากหน่อไม้ดอง สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี tube test และเมื่อนำสารต่อต้านการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ได้ไปทำให้บริสุทธิ์พบว่า สารดังกล่าวเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 33,000 และ 43,000 ดาลตัน รวมทั้งเมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต พบว่าจะให้ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสสูงกว่าโยเกิร์ตที่จำหน่ายในท้องตลาด

ศิรินาถ (2539) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักประเภทต่างๆ 4 ชนิด เช่น ผลิตภัณฑ์ประมงที่ผ่านกระบวนการหมัก ผักดอง แหนม ไส้กรอก นม เปรี้ยวและโยเกิร์ต ด้วยวิธี deferred method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และตรวจวัดกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้กับแบคทีเรียทดสอบที่เป็นชนิดแกรมลบและแกรมบวก จำนวน 6 สายพันธุ์ ด้วยวิธี spot on lawn และ agar well diffusion ซึ่งพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีจำนวน 5 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactobacillus* casei subsp. *rhamnosus*, *Staphylococcus lactis* SN 33, *S. lactis* SN 48, *Staphylococcus* sp. SN61 และ *S. lactis* SN62 โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนแต่ถูกกิจกรรมโดยเอนไซม์ pronase-E, proteinase-K, trypsin และ α-chymotrypsin นอกจากนี้ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* ยังสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของ *S. aureus* ในถั่วฟักได้ภายในระยะเวลาการหมัก 48 ชั่วโมง

Ostergaard และคณะ(1998) ได้ทดลองแยกแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria innocua* จากผลิตภัณฑ์ประมงหมักของประเทศไทย โดยพบว่าสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 44 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้พบว่า 43 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้ และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ ได้ด้วย ซึ่งสันนิษฐานว่าเกิดจากผลของแบคเทอริโอซินซึ่งสายพันธุ์ที่คัดแยกได้สร้างขึ้น โดยจากผลการทดลองยังพบอีกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 44 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Vibrio cholerae* และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ ซึ่งในจำนวนนี้ 37 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้สัตว์น้ำเกิดการเน่าเสีย เช่น *Aeromonas* sp. ได้ ซึ่งผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบนั้นคาดว่าเกิดจากผลของกรดแลคติกที่แบคทีเรียที่คัดแยกได้สร้างขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โดยเมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียที่คัดแยกได้พบว่าทั้ง 44 สายพันธุ์อยู่ในสกุล *Lactobacillus* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส สามารถทนเกลือได้สูงถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์ และสามารถย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่จากข้าว มันฝรั่ง และข้าวฟ่างได้

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

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

Noonpakdee และคณะ (2003) คัดแยก *Lc. lactis* WNC 20 ที่สามารสร้างแบคเทอริโอซินได้จากตัวอย่างแหนม โดยแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียกรดแลคติคด้วยกันเองอีกหลายชนิด เมื่อทำการจำแนกชนิดของแบคเทอริโอซินดังกล่าวโดยการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายชนิดต่างๆ กับแบคทีเรียอ้างอิง *Lc. lactis* subsp. *lactis* DL11 ที่สามารถสร้างไนซินและการเพิ่มจำนวนชุดยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินด้วยเทคนิค polymerase chain reaction (PCR) พบว่าแบคเทอริโอซินที่ทำการศึกษาเป็นไนซิน แซด (Nisin Z)

แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคเทอริโอซินมีส่วนสำคัญในการใช้เป็นสารถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ ดังนั้นการศึกษาเพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก.สายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากตัวอย่างปลาร้าของประเทศไทย ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ยังไม่มีผู้ทำการศึกษามาก่อน รวมทั้งการนำแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวมาจัดจำแนกชนิด ศึกษาคุณสมบัติด้านต่างๆของแบคเทอริโอซินที่ได้ ศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซิน การนำมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแบคทีเรียที่มีผลต่อคุณภาพของอาหาร จึงเป็นการศึกษาวิจัยที่จะก่อให้เกิดการเรียนรู้และสร้างองค์ความรู้พื้นฐาน รวมถึงการประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพซึ่งเป็นทางเลือกที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

C7063

กำลังได้รับความสนใจและน่าจะปลอดภัยมากกว่าการถนอมอาหารด้วยการใช้สารเคมีซึ่งอาจมีผลต่อความปลอดภัยและสุขภาพของผู้บริโภค

2.4 เชื้อแบคทีเรียในจีเนียสลิสทีเรีย (Genus Listeria)

การศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแลคติก โดยใช้เชื้อ *Listeria innocua* เป็นตัวทดสอบ ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่ที่เลือกใช้เชื้อตัวนี้เพราะไม่เป็นอันตรายต่อผู้ทำการศึกษาวิจัยและมีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับ *Listeria monocytogenes* โดยอยู่ในจีเนียสเดียวกันน่าจะให้ผลการทดสอบที่ใกล้เคียงกันหรือเหมือนกัน ถ้าการตรวจสอบให้ผลออกมาว่า แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria innocua* ก็สามารถกล่าวได้ว่าแบคเทอริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria monocytogenes* ได้เช่นกัน

Listeria monocytogenes คือเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลิสเตอริโอซีส (Listeriosis) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก แอร์โรฟิลิค ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่งขนาด 0.5 x 0.8 – 2.5 ไมโครเมตร เซลล์อาจเรียงตัวต่อกันเป็นสาย เคลื่อนที่ได้เล็กน้อยโดยใช้แฟลคเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ พบว่าโรคที่เกิดจากแบคทีเรียชนิดนี้เกิดขึ้นในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมประมาณ 26 สปีชีส์ รวมทั้งคน และเกิดในนกด้วย แหล่งที่แพร่กระจายเชื้ออาจมาจากสัตว์ป่าที่เป็นโรค แล้วนำโรคมาติดสัตว์เลี้ยงตามบ้านและคน ซึ่งกลไกในการถ่ายทอดเชื้อยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ลักษณะของโรคจะมีอาการทางประสาทในระยะแรก และมีอาการของ acute encephalitis ตามมาด้วยอวัยวะภายในหลายแห่งอาจแสดงอาการของโรคได้ และเมื่อตรวจเลือดจะพบเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นสาเหตุของโรค ถ้าเกิดในผู้ชายจะเป็นโรคไข้สมองอักเสบ ถ้าเกิดในผู้หญิงอาจทำให้เกิดการแท้งบุตรได้ หรือบุตรที่เกิดมาจะมีพัฒนาการทางสมองช้า รวมทั้งอาจแยกเชื้อได้จาก cerebrospinal fluid ด้วย การรักษาทำโดยใช้สารปฏิชีวนะเตตระไซคลินในการรักษา (อภิญญา)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์ สารเคมี เชื้อจุลินทรีย์ และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

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

3.1.2 เครื่องแก้ว

- ปิเปต (pipette) ขนาด 0.1 และ 10 มิลลิลิตร
- Autopipette 2 – 20 µl
- Autopipette 100 - 200 µl
- หลอดทดลอง (test tubes) ขนาด 16 x 150 พร้อมฝา
- หลอดฝาเกลียว
- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 50 และ 250 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 1000 มิลลิลิตร
- จานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- แท่งแก้วคนสาร (stirring rod)
- แท่งแก้วรูปตัวแอล
- ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.3 เครื่องมือ

- เครื่องชั่งน้ำหนัก (Balance)
- Autoclave
- Hot plate
- Water Bath
- pH – meter
- เครื่องปั่นเหวี่ยง (vortex)
- ตู้บ่มเชื้อ
- เตาแก๊ซ
- เตาอบไมโครเวฟ
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminа flow)
- ตู้แช่เย็น

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

- MRS Broth (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
- Tryptic Soy Broth (Merck KGaA Darmstadt Germany)
- Peptone (Merck KGaA Darmstadt Germany)
- Beef extract (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
- Yeast extract (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
- Agar (Scharlau Chemis S.A. Barcelona Spain)
- โซเดียมคลอไรด์ (LAB-SCAN analytical sciences Thailand)
- Etanol 95 %
- Etanol 70 %
- Buffer pH 4 and 7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21063

3.1.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำการทดลอง

- *Lactococcus lactis* N 100 จากตัวอย่างแหนม (Swetwiwathana and Lotong, 1999)
- *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 จากตัวอย่างแหนม (Swetwiwathana and Lotong, 1999)
- *Lactobacillus plantarum* RS 49 จากไส้กรอกอีสาน
- *Lactobacillus plantarum* RS 54 จากไส้กรอกอีสาน
- *Listeria innocua* รหัส ATCC 33090^T

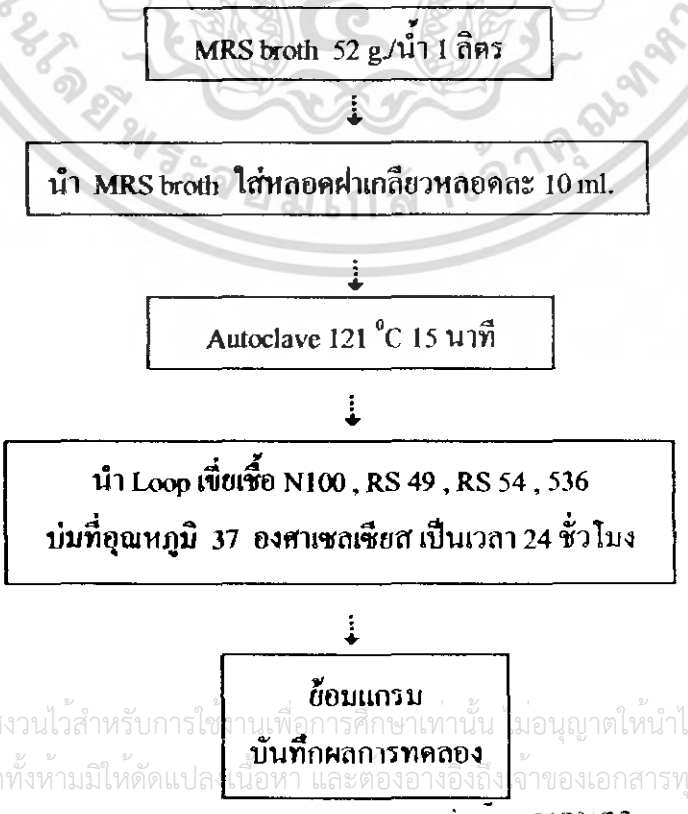
3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.2.1 การเตรียมเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 มาใช้ในการทดลอง

3.2.1.1 เตรียม MRS Broth หลอดละ 10 ml. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อใน Autoclave ที่ 121 ^{0}C 15 นาที

3.2.1.2 นำ Loop เขี่ยเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ถ่ายลงใน MRS Broth 10 ml. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.1.3 ย้อมแกรมดูลักษณะเชื้อที่เจริญเติบโต

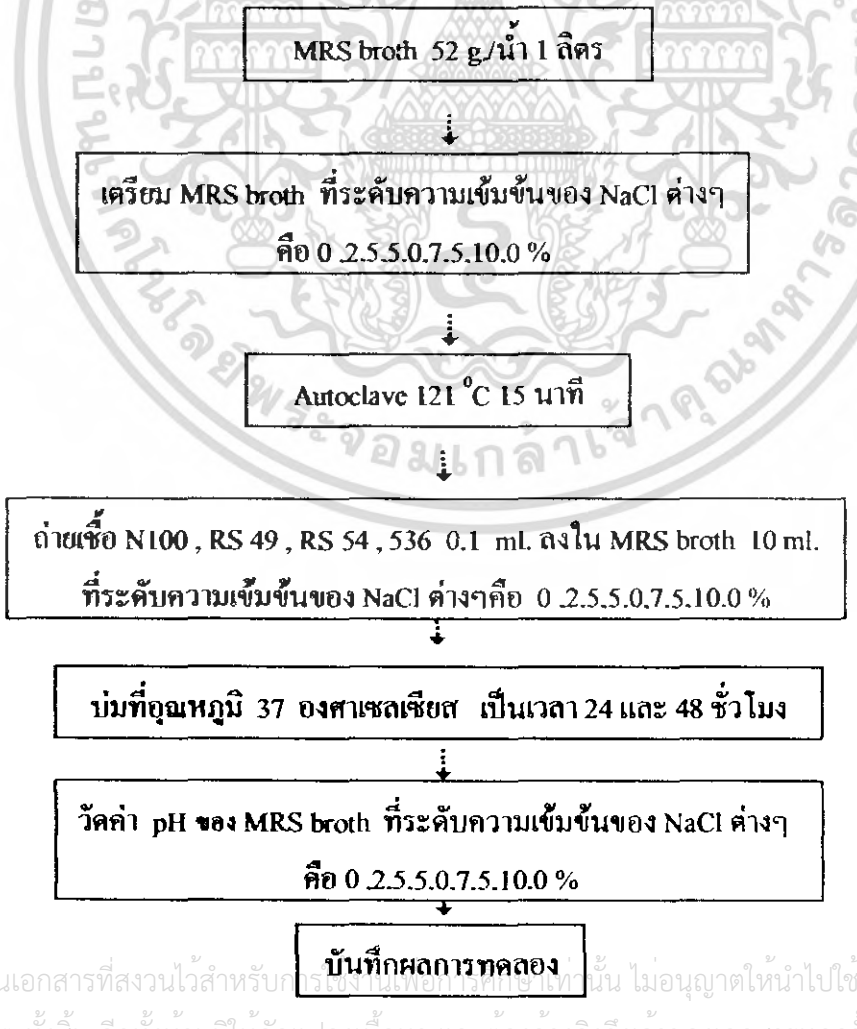


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
หอสมุดกลาง สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

3.2.2 ศึกษาผลของการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5%, 7.5%, 10.0%)

3.2.2.1 เตรียม MRS Broth ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%) หลอดละ 10 ml. นำไปทำให้ปราศจากเชื้อใน Autoclave ที่ 121 ^{0}C 15 นาที

3.2.2.2 ถ่ายเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 จากขั้นตอนที่ 3.2.1.2 มา 0.1 ml. ลงใน MRS Broth 10 ml. ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง ตรวจวัดค่า pH บันทึก ผลการทดลอง ผลที่ Negative หลอดใสไม่พบการเจริญของเชื้อใน 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปศึกษาการมีชีวิตอยู่รอด ส่วนผลที่ Positive หลอดขุ่นเนื่องจากมีการเจริญของเชื้อใน 24 และ 48 ชั่วโมง นำไปตรวจหาแบคเทอริโอซิน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.3 ศึกษาผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L.innocua* ของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%)

3.2.2.1 เทอาหารแข็ง NA ลงบนจานเพาะเชื้อ (อบฆ่าเชื้อแล้ว) ดรายเพลทให้แห้ง โดยเปิด UV เทหน้าจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง NA ด้วย TSA Solf Agar ที่เติม *L.innocua* 10 µl ดรายเพลทให้แห้ง โดยไม่ต้องเปิด UV

3.2.2.2 นำเชื้อ N100 , RS 49 , RS 54 , 536 ที่ให้ผล Positive ต้มในน้ำเดือด 10 นาที นำมาเจือจางทั้ง 10 ความเข้มข้น (น้ำกลั่นสเตอไรท์ 100 ไมโครลิตร/เชื้อ 100 ไมโครลิตร)

3.2.2.3 นำเชื้อแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ที่เททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA soft agar (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) ซึ่งมี *L.innocua* ที่เจริญอยู่ในระยะ log (log phase) ผสมอยู่ปริมาตร 10 ไมโครลิตร รอจนกระทั่งส่วนที่หยดลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง

3.2.2.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ้าหากมี Clear zone แสดงว่า มีการสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้งการเจริญเติบโต *L.innocua*

3.2.2.5 บันทึกผลการทดลอง

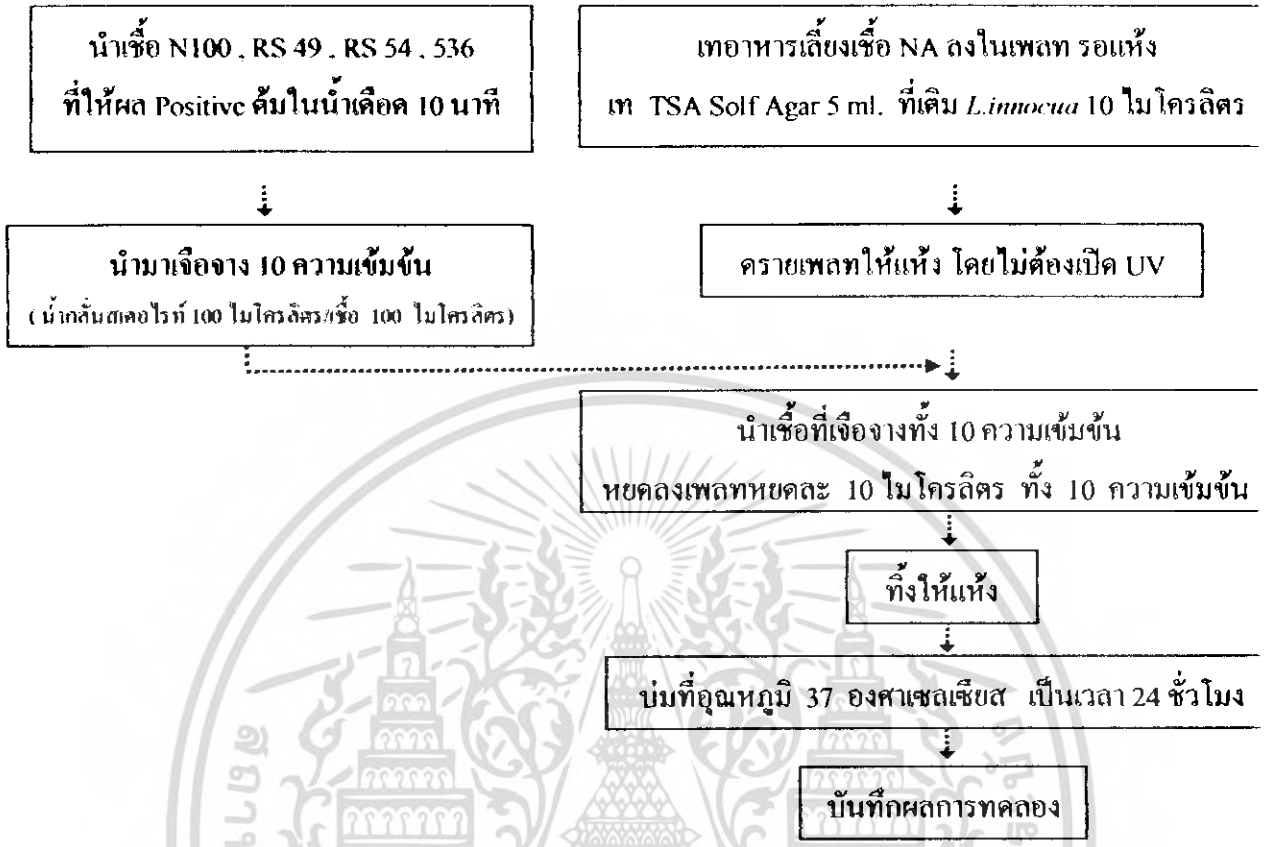
โดยทำการวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินโดยใช้ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของเชื้อซึ่งยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบและคูณด้วย 100

ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน = 16/1x 100

= 1,600 (AU ml^{-1})

ภาพที่ 2 การวัดและคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



3.2.4 ศึกษาผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%)

3.2.4.1 เทอาหารแข็ง MRS Agar ลงบนจานเพาะเชื้อ (อบฆ่าเชื้อแล้ว) ดรายเพลทให้แห้ง โดยเปิด UV

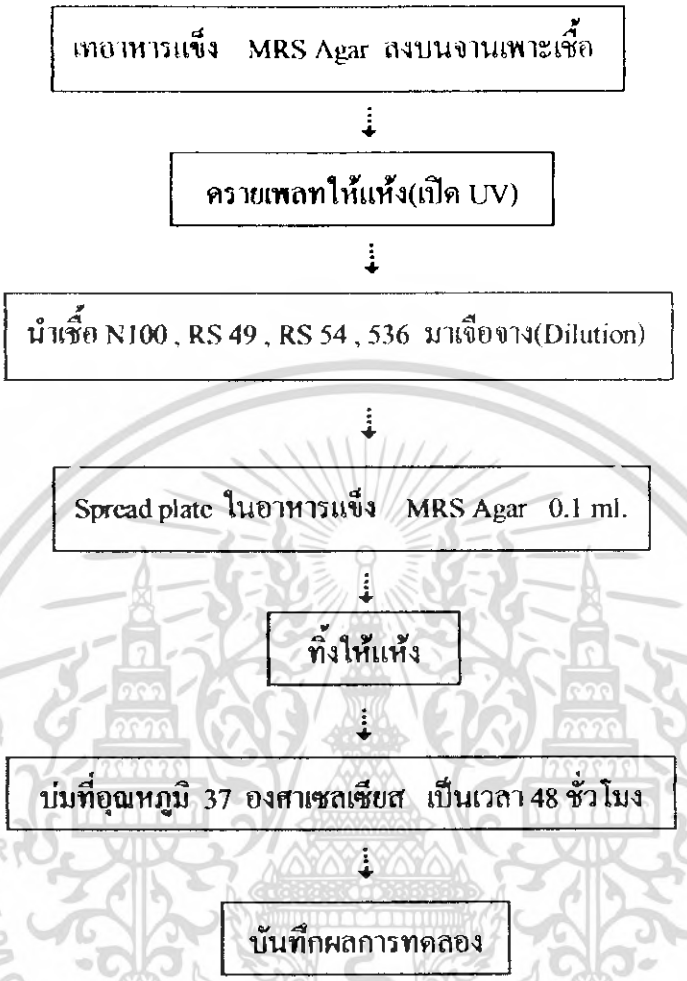
3.2.4.2 นำเชื้อ N100 , RS 49 , RS 54 , 536 ที่ให้ผล Negative มาเจือจาง(Dilution) โดยเมื่อทำการเพาะเชื้อให้เจริญบนอาหารวุ้นในจานเพาะเชื้อแล้วมีจำนวนโคโลนีระหว่าง 30 – 300 โคโลนี

3.2.2.3 นำเชื้อ N100 , RS 49 , RS 54 , 536 ที่เจือจางแล้วมา Spread plate ในอาหารแข็ง MRS Agar 0.1 ml. ทิ้งให้แห้ง

3.2.2.4 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3.2.2.5 บันทึกผลการทดลอง โดยทำการตรวจนับจำนวนโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการ โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทดลอง

ใช้เวลาในการทดลองประมาณ 5 เดือน โดยเริ่มตั้งแต่ 1 มิถุนายน พ.ศ. 2548 ถึง 31 สิงหาคม 2548 และ 1 ธันวาคม 2548 ถึง 15 กุมภาพันธ์ 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แผนการดำเนินการทดลอง

ขั้นตอน	ระยะเวลา					
	มิ.ย.	ก.ค.	ส.ค.	ธ.ค.	ม.ค.	ก.พ.
1. กำหนดหัวข้อและขอบเขตของเนื้อหาที่ต้องการศึกษา	←····→					
2. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้อง และทดสอบเชื้อ	←····	····	····	····	····	····→
3. ศึกษา		←····	····	····	····	····→
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง						←····

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์การทดลอง

4.1 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%)

จากผลการทดลองศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่มีเชื้อเริ่มต้น 4.3×10^{-2} Cfu/ml. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%) โดยดูจากความขุ่นเนื่องจากการเจริญของเชื้อ (ตารางที่ 5) พบว่าเชื้อ N 100 และ 536 ให้ผล Positive ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5% และ 5.0% ให้ผล Negative ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7.5% และ 10.0% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง แต่เมื่อบ่มนานขึ้นเป็น 48 ชั่วโมง พบว่าเชื้อทั้งสองสามารถเพิ่มจำนวนได้มากขึ้นใน MRS Broth ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7.5 % แต่ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10.0% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง เชื้อทั้งสองยังคงไม่สามารถเพิ่มจำนวนจนเห็นความขุ่นได้ ส่วนเชื้อ RS 49 และ RS 54 สามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 2.5% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 ชั่วโมง และสามารถเจริญเติบโตได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 5.0% ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 48 ชั่วโมง แสดงว่าความเข้มข้นของเกลือมีผลต่อการเจริญของชนิดสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่มที่ศึกษากล่าวคือ N 100 และ 536 ที่แยกได้จากแหนมจะเจริญได้ดีกว่าใน MRS Broth ที่มีความเข้มข้นเกลือที่สูง เมื่อเทียบกับ RS 49 และ RS 54 ที่แยกได้จากไส้กรอกอีสาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 แสดงผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ	N100		536		RS 49		RS 54	
โซเดียมคลอไรด์	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+
2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+
5.0%	+	+	+	+	-	+	-	+
7.5%	-	+	-	+	-	-	-	-
10.0%	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีเชื้อเจริญจนหลอดขุ่น

- คือ Negative ไม่พบการเจริญของเชื้อ

4.2 ศึกษาผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%)

จากผลการทดลองศึกษาการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อ N 100, 536,RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 7.5%และ10.0% พบว่าที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 7.5% เชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 บ่มที่ 24 ชั่วโมง สามารถมีชีวิตอยู่รอด 2470000, 2890000, 2200000, 2670000 Cfu/g.ตามลำดับ และเชื้อ RS 49, RS 54 บ่มที่ 48 ชั่วโมง สามารถมีชีวิตอยู่รอด 2350000, 2700000 Cfu/g. ตามลำดับ และที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 10.0 % เชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 บ่มที่ 24 ชั่วโมง สามารถมีชีวิตอยู่รอด 2620000, 3820000, 2200000, 2750000 Cfu/g. ตามลำดับ เชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 บ่มที่ 48 ชั่วโมง สามารถมีชีวิตอยู่รอด 2750000, 3900000, 2250000, 2700000 Cfu/g. ตามลำดับ (ตารางที่ 6 และ 7)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 7.5 %

ระดับเชื้อเริ่มต้น / ความเข้มข้นของ NaCl	จำนวนโคโลนีที่นับได้				ผลการตรวจนับโคโลนี/กรัม
	1:10 (10^{-1})	1:100 (10^{-2})	1:1000 (10^{-3})	1:10000 (10^{-4})	
N100, 48 hr.	>300	>300	285	21	2.47×10^{6}
536, 48 hr.	>300	>300	169	41	2.89×10^{6}
RS 49, 24 hr.	>300	>300	120	32	2.20×10^{6}
RS 49, 48 hr.	>300	>300	130	34	2.35×10^{6}
RS 54, 24 hr.	>300	>300	154	38	2.67×10^{6}
RS 54, 48 hr.	>300	>300	200	34	2.70×10^{6}

หมายเหตุ ปริมาณเชื้อ 536 เริ่มต้น 430 Cfu/g. ปริมาณเชื้อ N100 เริ่มต้น 440 Cfu/g.
ปริมาณเชื้อ RS 49 เริ่มต้น 420 Cfu/g. ปริมาณเชื้อ RS 54 เริ่มต้น 420 Cfu/g.

ตารางที่ 7 ผลการมีชีวิตอยู่รอดของเชื้อที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10.0 %

ระดับเชื้อเริ่มต้น / ความเข้มข้นของ NaCl	จำนวนโคโลนีที่นับได้				ผลการตรวจนับโคโลนี/กรัม
	1:10 (10^{-1})	1:100 (10^{-2})	1:1000 (10^{-3})	1:10000 (10^{-4})	
N100, 24 hr.	>300	>300	283	24	2.62×10^{6}
N100, 48 hr.	>300	>300	240	31	2.75×10^{6}
536,24 hr.	>300	>300	294	47	3.82×10^{6}
536,48 hr.	>300	>300	280	50	3.90×10^{6}
RS 49, 24 hr.	>300	>300	120	32	2.20×10^{6}
RS 49, 48 hr.	>300	>300	110	34	2.25×10^{6}
RS 54, 24 hr.	>300	>300	230	32	2.75×10^{6}
RS 54, 48 hr.	>300	>300	210	33	2.70×10^{6}

หมายเหตุ ปริมาณเชื้อ 536 เริ่มต้น 430 Cfu/g. ปริมาณเชื้อ N100 เริ่มต้น 440 Cfu/g.
ปริมาณเชื้อ RS 49 เริ่มต้น 420 Cfu/g. ปริมาณเชื้อ RS 54 เริ่มต้น 420 Cfu/g.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการศึกษาค่า pH การเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%)

จากผลการทดลองศึกษาค่า pH การเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%) พบว่าค่า pHของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0% (ตารางที่ 8) เริ่มต้นก่อนการบ่มเพาะเชื้อมีค่า pH 5.94, 5.73, 5.67, 5.54 และ 5.57 ตามลำดับ แต่เมื่อบ่มได้ 24 ชั่วโมงค่า pHของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อ N 100 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0% มีค่า pH 4.49, 4.61,5.00, 5.45, 5.49 ที่ 24 ชั่วโมง และ 4.45, 4.43, 4.78, 5.24, 5.38 ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า pHของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อ 536 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0% มีค่า pH 4.12, 4.23,4.46, 4.94, 5.32 ที่ 24 ชั่วโมง และ 4.07, 4.03, 4.19, 4.79, 5.07 ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า pHของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อ RS 49 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0% มีค่า pH 4.78, 4.93,5.14, 5.54, 5.55 ที่ 24 ชั่วโมง และ 4.62, 4.87, 5.06, 5.31, 5.53 ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ค่า pHของอาหารเลี้ยงเชื้อมีเชื้อ RS 54 ที่ความเข้มข้นของเกลือ 0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0% มีค่า pH 4.58, 4.85,5.08, 5.42, 5.49 ที่ 24 ชั่วโมง และ 4.32, 4.73, 4.97, 5.34, 5.52 ที่ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองดังกล่าวแสดงว่าความเข้มข้นของเกลือนอกจากจะมีผลต่อการเจริญของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆที่ทำการศึกษาแล้วยังมีผลต่อการเกิดกรดซึ่งเทียบจาก pH โดยความเข้มข้นของเกลือที่ต่ำการเจริญของเชื้อจะเจริญได้เร็วมีผลทำให้มีการหมักน้ำตาลที่มีใน MRS Broth ไปเป็นกรดแลกติกได้มากส่งผลให้ค่า pH ของ MRS Broth ลดลงได้เร็วขึ้นกว่า MRS Broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง

ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาค่า pH การเจริญเติบโตของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้นของ NaCl	Control	N100		536		RS 49		RS 54	
		24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.
0%	5.94	4.49	4.45	4.12	4.07	4.78	4.62	4.58	4.32
2.5%	5.73	4.61	4.43	4.23	4.03	4.93	4.87	4.85	4.73
5.0%	5.67	5.00	4.78	4.46	4.19	5.14	5.06	5.08	4.97
7.5%	5.54	5.45	5.24	4.94	4.79	5.54	5.31	5.42	5.34
10.0%	5.57	5.49	5.38	5.32	5.07	5.55	5.53	5.49	5.52

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 ผลการศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Linnocua* ของเชื้อ N 100, 536, RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%, 7.5%, 10.0%)

จากผลการทดลองศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L.innocua* ของเชื้อ N 100, 536,RS 49, RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5%, 5.0%, 7.5%, 10.0% (ตารางที่ 9) พบว่า เชื้อ N 100 ที่ 24 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5% และ 5.0% สามารถสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้ง *L.innocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 1,600 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU ml^{-1}) และที่ 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5%, 5.0% และ 7.5 % สามารถสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้ง *L.innocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 1,600 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU ml^{-1}) เชื้อ 536 ที่ 24 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5%,5.0% และ 7.5 % สามารถสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้ง *L.innocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 1,600 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU ml^{-1}) และที่ 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5%, 5.0% และ 7.5 % สามารถสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้ง *L.innocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 1,600 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU ml^{-1}) เชื้อ RS 49 ที่ 24 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 2.5 % สามารถสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้ง *L.innocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 800 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU ml^{-1}) และที่ 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5% และ 5.0 % สามารถสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้ง *L.innocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 800 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU ml^{-1}) เชื้อ RS 54 ที่ 24 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0% และ 2.5 % สามารถสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้ง *L.innocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 1,600 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU ml^{-1}) และที่ 48 ชั่วโมง ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ 0%, 2.5% และ 5.0 % สามารถสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นมายับยั้ง *L.innocua* โดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 1,600 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU ml^{-1}) (ตารางที่ 9, 10, 11 และ 12)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 9 แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L.innocua* ของเชื้อ N 100 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16		1:32		1:64		1:128		1:256		1:512	
เวลา / % NaCl	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.5%	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

- คือ Negative ไม่มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

จากการศึกษาในขั้นตอนดังกล่าวจึงสรุปได้ว่า ความเข้มข้นของเกลือใน MRS Broth มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยที่

ตารางที่ 10 แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *L.innocua* ของเชื้อ 536 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16		1:32		1:64		1:128		1:256		1:512	
เวลา / % NaCl	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7.5%	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

- คือ Negative ไม่มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 11 แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Listeria* ของเชื้อ RS 49 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16		1:32		1:64		1:128		1:256		1:512	
เวลา % NaCl	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5%	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0%	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

- คือ Negative ไม่มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

ตารางที่ 12 แสดงผลการสร้างแบคเทอริโอซินและความสามารถในการยับยั้ง *Listeria* ของเชื้อ RS 54 ที่ระดับความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ (0%, 2.5% , 5.0%,7.5%, 10.0%) ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

ความเข้มข้น	1:1		1:2		1:4		1:8		1:16		1:32		1:64		1:128		1:256		1:512	
เวลา % NaCl	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.	24 hr.	48 hr.
0%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2.5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0%	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ คือ Positive มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

- คือ Negative ไม่มีโซนใสของการยับยั้งเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. **ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์.** คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา.

อภิญญา ผลิโกมล. 2542 **แบคทีเรีย.** ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่. 288 น.

อาภัสรา กอบกัยกิจ. 2537. **การแยกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพจากอาหารหมัก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

อังคณา สุขบุญ. 2541. ผลการยับยั้งซัลโมเนลลาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากไส้กรอกเปรี้ยว. **วารสารสงขลานครินทร์** 20 (4) : 429 - 436.

ศิรินาถ หนูเอก. 2539. **การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Abee, T. 1995. Pore-froming 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 bacteria. **J.Biotechnol.** 68: 171-178.

Amano, K. 1962. The influence of fermentation on the nutritive value of fish with special reference to fermented fish products of Southeast Asia, pp. 180-200. In E. Heen and R. Kreuzer, eds. **Fish in Nutrition.** Fishing News (Books) Ltd., London.

Anderson, D.G. and L.L. McKay. 1983. Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci. **Appl. Environ. Microbiol.** 46: 549-552

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, pp. 1-23. In S.Salminen and A.V. wright, eds. **Lactic acid bacteria**. Marcel Dakker, Inc., New York.

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.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

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.

De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacter **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetic and Aplication.** Blackie- Academic & Professional, London. p. 91-142.

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

Ennahar, S., D. Aoude-Werner, O. Assobhei and C. Hasselmann. 1998. Antilisterial activity of enterocin 81 , a bacteriocin produced by *Eenterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. **J.Appl. Microbiol.** 85: 521-526.

Fields, F.O. 1996. Use of bacteriocins in food: Regulatory considerations. **J. Food Prot.** 59: 72-77.

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

Gilliland, S.E. 1990. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 87: 175-185.

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

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

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

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

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ishikawa, M., Nakajima, K., Yanagi, M., Yamamoto, Y., & Yamasato, K. (2003). *Mainilactibacillus phychrotolerans* gen. nov., sp. nov., a halophilic and alkaliphilic marin lactic acid bacterium isolated from marine organisms in temperate and subtropical areas of japan. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 53, 711-720.

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

Jacob, F., 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 purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. bacteriol.** 167: 439-446.

Johnson, J.I. 1984. Bacterial classification **III**. Nucleic acids in bacterial classification, pp. 8-11. In N.R. Krieg and J.G. Holt, eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 1.** Williams, Baltimore.

Josephson, J. and E.W. Nielsen. 1988. Plasmid profiles and bacteriophage sensitivity of bacteria of cheddar starter used for five years without rotation, pp. 219-223. In B.Pot,W. Ludwig, K. Kersters and Karl-Heinz, eds. **Taxonomy of Lactic Acid Bacteria: Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Application.** Blackie Academic & Professional, New York.

Kandler, O, and N. Weiss. 1986. Genus *Lactobacillus beijerinck* 1901, pp. 1209-1234. In P.H.A. Sneath, N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt, eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2.** Williams and Wilkins, Baltimore.

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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lewus, C.B., A. Kaiser and T.J. Montville. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic bacteria isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1683-1688.

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

Litchield, J.H. 1996. Microbiological production of lactic acid bacteria. **Adv. Appl. Microbiol.** 43: 75-80.

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.

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 Prot.** 59: 64-71.

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

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

Ohmomo, S., S. Murata, N. Katayama, S. nitisinprasart, M. Kobayashi, T. Nakajima, M. Yajima and K. Nakanishi. 2000. Purification and some characteristics of enterocin ON-157, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* NIAI 157. **J. Appl. Microbiol.** 88: 81-89.

Orla- Jensen, S. 1991. **The Lactic Acid Bacteria.** Host and Son, Copenhagen.

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

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 *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.** 58: 256-262.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Pot, B., C. Hertel, W. Ludwig, P. Descheemaeker, K. Kersters and K.H. Schleifer. 1993. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, L. *johnsonii* strain by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotides probe hybridization. **J. Gen. Microbiol.** 139: 513-517.

, 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 Academic & Professional, London.

Rastelli, E. 2005. Identification and characterisation of halotolerant bacteria in spoiled dry-cured hams. **Meat Science.** 70: 241-246

Rastelli, E. and N. Deschamps. 2000. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese-isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. **J. Appl. Microbiol.** 88: 449-457.

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.

Rodriguez, J.M., M.I. Martinez., N. Horn and H.M. Dodd. 2003. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Int. **J. Food Microbiol.** 81 : 101-116.

Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, K.B. Mullis and H.A. Erlich. 1998. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. **Science.** 239: 487-494.

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.

Sashihara, T., M. Dan, H. Kimura, H. Matsusaki, K. Sonomoto and A. Ishizaki. 2001. The effect of osmotic stress on the production of nukacin ISK-1 from *Staphylococcus warneri* ISK – 1. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 56 : 496-501.

Schillinger, U., R. Geisen 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.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Schleifer, K.H. 1987. Recent changes in the taxonomy of lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 46 : 201-203.

Stevens, K.A., N.A. Klapes, B.W. Sheldon and T.R.Klaenhammer. 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of gram-negative bacteria. **J. Food Prot.** 55: 763-766.

,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.

and W.H. Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. J. Food Microbiol.** 36 : 1-29.

Swetwiwathana, A. and N. Lotong. 1999. Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from nham (Thai fermented meat). 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.

Tanasupawat, S. and K. Komagata. 1995. Lactic acid bacteria in fermented food in Thailand. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 11: 253-256.

Yildirim, Z. and M.G. Johnson. 1998. Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. **Lett. Appl. Microbiol.** 26: 297-304.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. MRS broth

MRS	52	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. MRS agar

MRS	52	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. NA

Peptone	5	กรัม
Beef extract	3	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

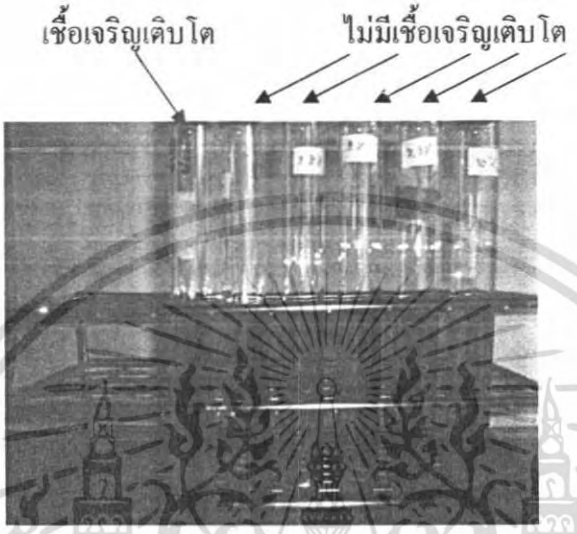
4. TSA soft agar

TSB	30	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Agar	10	กรัม
น้ำกรอง	1	ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

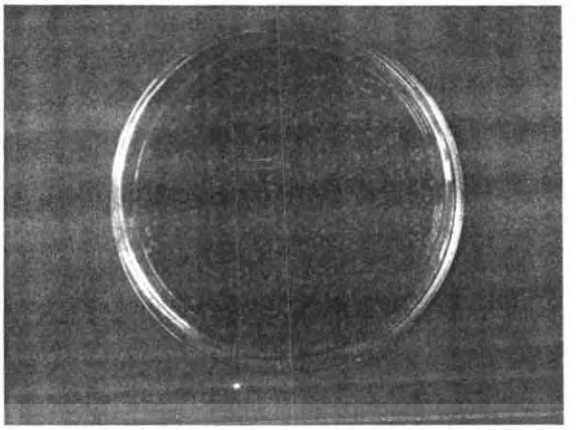
ภาคผนวก ข



ภาคผนวก ข. 1 ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มีเชื้อเจริญเติบโตและไม่มีเชื้อเจริญเติบโต

ภาคผนวก ข. 2 แสดง clear zone ที่เกิดขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาคผนวก ข. 3 แสดงโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาวิจัยการเจริญเติบโตและการผลิตแบคเทอริโอซินของ N100, 536, RS 49 และ RS 54 ใน MRS Broth ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0, 2.5, 5.0, 7.5 และ 10.0 % พบว่า *Lactococcus lactis* N 100 จากตัวอย่างแหนม (Swetwiwathana and Lotong, 1999) และ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 จากตัวอย่างแหนม (Swetwiwathana and Lotong, 1999) สามารถเจริญได้ดีในความเข้มข้นเกลือ 5 % ภายใน 24 ชั่วโมงแต่เจริญได้ช้าในความเข้มข้นเกลือ 7.5% และไม่เจริญเมื่อความเข้มข้นเกลือสูงถึง 10.0 % หลังการบ่ม 48 ชั่วโมง ขณะที่ *Lactobacillus plantarum* RS 49 และ RS 54 จากไส้กรอกอีสาน เจริญได้เร็วที่ความเข้มข้นเกลือ 2.5 % ใน 24 ชั่วโมง แต่เจริญช้าที่ความเข้มข้นเกลือ 5.0 % ใน 48 ชั่วโมง และ ไม่เจริญที่ความเข้มข้นเกลือ 7.5 และ 10 %

สำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินในความเข้มข้นเกลือระดับต่างๆ นั้น พบว่ามีความสามารถในการเจริญเติบโตที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์0, 2.5, 5 และ 7.5 % และมีความสามารถในการทนเกลือที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 10 % และยังสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้โดยมีโดยมีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด 1,600 ยูนิต/มิลลิลิตร (AU /ml^{-1}) โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆในอนาคต ปลอดภัยจาก *Listeria* ซึ่งเป็นเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค ลดการใช้สารเคมีที่เติมลงไปเพื่อถนอมอาหาร ซึ่งถ้าสะสมอยู่ในร่างกายเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงๆในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้