3

14608

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

Antagonistic Activity of Lactic acid bacteria from Fermented Food

T097015

นางสาวจิรัชญา สุดดี

นางสาวอาริสา พนมเชิงศักดิ์

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2538

ปพ.
ว52ก
2538

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....97015.....
วัน,เดือน,ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

(Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria from Fermented Food)

โดย

นางสาวจิรัชญา สุดดี

นางสาวอาริสา พนมเริงศักดิ์

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

วิชชุลย์ อาริยุล 28/3/38 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(วิชชุลย์ อาริยุล)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....

(ผศ.ดร.วราวุฒิ ครุส่ง)

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ 31 เดือน มี.ค. พ.ศ. 38

ACC. NO.....
Date Received 23 มี.ค. 2538
Call No.....

ฝผ.
TS274
2537

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9 มี.ค. 2541

จิรัชญา สุดดี และ อาริสา พนมเริงศักดิ์. 2538. : การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจากแบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (Antagonistic Activity of Lactic Acid Bacteria from Fermented Food). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยี-การเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อ.วริพัสย์ อารีกุล, 69 หน้า.

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติคจากผลิตภัณฑ์ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และผักกาดดอง สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคได้จำนวน 32 สายพันธุ์ มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (Bacilli) และรูปกลม (Cocci) เมื่อทำการทดสอบปริมาณการสร้างกรดพบว่าจำนวน 16 สายพันธุ์ จะสร้างกรดในปริมาณที่ต่ำกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ ที่มีพีเอชอยู่ระหว่าง 4.06 ถึง 4.82 ส่วนอีก 16 สายพันธุ์จะสร้างกรดในปริมาณที่มากกว่า 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมีพีเอชอยู่ในช่วง 3.58 ถึง 4.10 การศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อของแบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bacillus subtilis* แต่พบบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Sarcina lutea* และ *Staphylococcus aureus* ได้ ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบอยู่ในช่วง 7.50-13.67 มิลลิเมตร ซึ่งส่วนใหญ่เกิดเนื่องจากกรดแลคติคร่วมกับเมตาบอไลท์อื่นๆ นอกจากนี้ยังพบเมตาบอไลท์บางชนิดที่ให้ผลการยับยั้งที่พีเอช 7 แต่ถูกยับยั้งกิจกรรมที่พีเอชเป็นกรด ส่วนแบคทีเรียแลคติคที่สร้างแบคทีริโอซินที่ทนต่อความร้อนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ได้แก่ สายพันธุ์ C2.2 มีผลในการยับยั้ง *B. subtilis* และ *E. coli* ขณะที่สายพันธุ์ C2.4 และ L4.4 มีผลในการยับยั้งเฉพาะ *E. coli* เท่านั้น ในการตรวจสอบความไวของเชื้อทดสอบต่อสารเมตาบอไลท์ที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติค พบว่า *S. lutea* และ *B. cereus* เป็นเชื้อทดสอบที่มีความไวต่อกรดแลคติค และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากที่สุด ตามลำดับ

_____	_____	28 มิถุนายน 2538
ลายมือชื่อนักศึกษา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	วัน/เดือน/ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานปัญหาพิเศษฉบับนี้ สามารถสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีนั้น คณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์วริพัสย์ อารีกุล เป็นอย่างสูง ที่กรุณาเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไข ปัญหาพิเศษฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ผศ.ดร.ประภาพร ขอไพบูลย์ และอาจารย์วิไล สนธิเพิ่มพูน ที่ให้ความช่วยเหลือด้านการศึกษาอย่างดียิ่งตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร.วิเชียร ลีลาวัชรมาศ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ อาจารย์ อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม และ อาจารย์ สมชาย ไกรรักษ์ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและสารเคมีต่างๆ ขอขอบคุณ หน่วยบริการเชื้อพันธุ์ (Merck) ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์จุลินทรีย์ที่ใช้ในโครงการปัญหาพิเศษนี้

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในระหว่างการปฏิบัติงาน รวมทั้ง เพื่อนๆ น้องๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจอย่างดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และสมาชิกในครอบครัวที่ให้การสนับสนุน แนะนำ ตลอดจนเป็นกำลังใจ ทำให้ประสบความสำเร็จในครั้งนี้

จิรัชญา สุดดี

อาริสา พนมเริงศักดิ์

28 มีนาคม 2538

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ช

สารบัญรูป ..... ซ

บทที่

1. บทนำ 1
2. วารสารปริทัศน์ 3
   - 2.1 แบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 3
   - 2.2 Antagonistic Activity 8
   - 2.3 การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติค 22
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 27
   - 3.1 อุปกรณ์ 27
   - 3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี 28
   - 3.3 วิธีการทดลอง 28
4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 32
   - 4.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ 32
   - 4.2 การตรวจสอบผลของเมตาบอไลท์ต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ 33
   - 4.3 การตรวจสอบการสร้างกรดแลคติคของแบคทีเรีย – แลคติค 36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	4.4 การตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น	38
5.	สรุปผลการทดลอง	44
เอกสารอ้างอิง		46
ภาคผนวก		55
ประวัติผู้เขียน		69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติคที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่างๆ	5
2.2	แสดงคุณสมบัติของแบคทีริโอซินต่างๆ ที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติค	14
4.1	ผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ด้วยกรดแลคติคที่ความเข้มข้นต่างๆ	33
4.2	ผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ	34
4.3	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์กรดแลคติคและพีเอชของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติค	37
4.4	แสดงการตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจากแบคทีเรียแลคติค	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	นิเวศวิทยาของแบคทีเรียแลคติด	6
2.2	แสดงผลของความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดที่ไม่แตกตัว และจำนวนกรดทั้งหมดต่อจุลินทรีย์ในหญ้าหมัก	9
2.3	แสดงความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดที่ไม่แตกตัวและช่วงพีเอชในหญ้าหมัก	10
ง.1.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแลคติค (% W/V) กับบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์	67
ง.2.	กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (% W/V) กับบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์	68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

แบคทีเรียแลคติคเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตอาหารหมัก โดยพบปะปนกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นในอาหาร ดังนั้นการผลิตอาหารหมักจึงต้องมีการปรับสภาวะต่างๆ ให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับกรรมวิธีในการจัดการวัตถุดิบและการส่งเสริมการหมักของจุลินทรีย์ในขั้นตอนการผลิต โดยมีการเติมสารอาหารและปรับสภาวะไม่ให้มีอากาศ

เดิมจุดประสงค์ของการหมักจะเน้นเพื่อการถนอมอาหาร แต่เนื่องจากความเจริญและก้าวหน้าของเทคโนโลยี ทำให้เกิดความต้องการอาหารที่มีคุณภาพสูงขึ้น ซึ่งส่งผลให้มีการพัฒนากระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพในการผลิต ด้วยการใช้หัวเชื้อ (Starter Culture) ในการผลิตอาหารหมัก โดยทั่วไป คุณภาพแรกที่ต้องการในอาหารหมัก คือ กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และ ลักษณะปรากฏ หัวเชื้อที่เลือกใช้จึงต้องให้คุณสมบัติในการปรับปรุงคุณภาพในด้านดังกล่าว นอกจากนี้ยังต้องมีกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสีย ซึ่งมักปะปนกับวัตถุดิบทางการเกษตร และก่อให้เกิดผลเสียทางเศรษฐกิจกับอุตสาหกรรมอาหารหมัก รวมทั้งผลิตภัณฑ์จะต้องมีความปลอดภัย ให้คุณค่าทางโภชนาการ และส่งเสริมสุขภาพ

แบคทีเรียแลคติคในอุตสาหกรรมอาหารหมัก มีผลต่อการถนอมอาหาร โดยสามารถสร้างกรดอินทรีย์ เพื่อให้อาหารมีค่าพีเอชลดลงจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด นอกจากนี้ยังมีสารประกอบจากกระบวนการเมตาบอไลท์และการสร้างแบคทีริโอซิน ซึ่งช่วยเพิ่มศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาคุณสมบัติการสร้างสารต่างๆ รวมทั้งแบคทีริโอซินของแบคทีเรียแลคติคจะช่วยทำให้สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อและมีความสำคัญในการพัฒนาเทคโนโลยีการหมัก เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ดี มีลักษณะเดียวกัน คุณภาพสม่ำเสมอ และปลอดภัยในการบริโภค ดังนั้นในการทดลองนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อ

1. ตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติค
2. ตรวจสอบผลการยับยั้งการเจริญของสารที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติค ที่มีต่อเชื้อ *Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Sarcina lutea* และ *Staphylococcus aureus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

แบคทีเรียแลคติคเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่ม Lactobacillus Pediococcus Lactococcus Streptococcus และ Leuconostoc นิยมใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักประเภทนม เนื้อสัตว์ ผัก-ผลไม้ และธัญพืช โดยมีจุดประสงค์เพื่อเป็นการถนอมอาหาร ต่อมามีการพัฒนาเทคโนโลยีทางการแปรรูปและเทคนิคในการถนอมอาหารขึ้น ทำให้บทบาทในการใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติคลดลง แต่อย่างไรก็ตาม การถนอมอาหารโดยวิธีการหมักยังคงมีความสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดใหม่ เนื่องจากการใช้แบคทีเรียแลคติคจะทำให้ได้อาหารที่มีกลิ่น รส เนื้อสัมผัส แปลกใหม่และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

แบคทีเรียแลคติค สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์ต่างๆ ได้แก่ กรดแลคติค, กรดอะซิติก มีผลให้พีเอชของอาหารลดลง หรือกล่าวคือ สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานของแบคทีเรีย (Gilliland,1985; Daeschel,1989) นอกจากนี้จากการศึกษาผลของเมตาบอไลท์ต่างๆ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซททิล และสารปฏิชีวนะ เช่น แบคทีริโอซิน ไนซิน ไดโพลคอคซิน พบว่าสารประกอบเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญของพวกจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Clostedium* sp. *Salmonella* sp. และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น

2.1 แบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

2.1.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติค

แบคทีเรียแลคติคมีลักษณะสำคัญคือ ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมบวก สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติค จำแนกออกเป็น 2 ตระกูลตามรูปร่าง คือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactobacillaceae มีรูปร่างแท่ง (rod) และ Streptococcoaceae มีรูปร่างกลม (cocci) หรือรูปไข่ (ovoid) แบคทีเรียแลคติคแบ่งออกเป็น 5 สกุล คือ Streptococcus Leuconostoc Pediococcus Micrococcus และ Lactobacillus ซึ่งต่อมา Sandine (1988) ได้เสนอชื่อแบคทีเรียแลคติคบางสายพันธุ์จากสกุลเดิมคือ Streptococcus เป็น Lactococcus และได้รับการยอมรับจาก International Union of Microbiological Societies หรือแบ่งตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่มคือ Homofermentation สามารถหมักน้ำตาลคาร์บอน 6 ตัวให้กรดแลคติค 85-95 % และกลุ่ม Heterofermentation สามารถหมักน้ำตาลคาร์บอน 6 ตัว ให้กรดแลคติคประมาณ 50 % ส่วนที่เหลือเป็นกรดอะซิติก คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล (Lawrence และ Terence, 1979)

2.1.2 แหล่งที่พบ

แบคทีเรียแลคติคที่ใช้เป็นหัวเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่างๆ ได้แก่ เชื้อในสกุล Lactobacillus Lactococcus Pediococcus Streptococcus และ Leuconostoc ซึ่งแต่ละสายพันธุ์ของเชื้อเหล่านี้จะให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัว ทั้งกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และลักษณะปรากฏ ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่ใช้ในการผลิตอาหารหมักแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 2.1 ซึ่งแสดงสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 แสดงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติคที่ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่างๆ

Table 1
Applications of Lactic Acid Bacteria

Food product	*Lactic acid bacteria used*
Acidophilus milk	*Lb. acidophilus*
Balao balao	*Lactobacillus* spp.
Breads	*Lb. brevis, Lb. plantarum, Lb. fermentum, Leuc. mesenteroides, S. thermophilus*
Bulgarian buttermilk	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
Burong dalag	*Leuc. mesenteroides, P. pentosaceus, Lb. plantarum*
Butter	*L. lactis* subsp. *cremoris*
Buttermilk	*L. lactis* subsp. *lactis, L. lactis* subsp. *cremoris, Leuc. lactis, Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris*
Cacao	Various strains
Cheeses	*L. lactis* subsp. *lactis, L. lactis* subsp. *cremoris, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lb. delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. casei, Lb. helveticus, Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp.
Coffee	Various strains
Crackers	*Lb. plantarum, Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii, Lb. delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. casei, Lb. brevis, Lb. fermentum*
Cucumbers (pickles)	*Lb. plantarum, Lb. brevis, P. pentosaceus*
Cured ham	*Lb. casei, Lb. plantarum*
Feed additives	*Lb. acidophilus, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lb. delbrueckii* subsp. *lactis, Lb. reuteri*
Fermented fish products	Various strains
Fermented milks	*Lb. acidophilus, Lb. bifidus, Lb. casei, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
Gari	*Leuconostoc* spp.
Green olives	*Lb. plantarum, Lb. brevis, P. pentosaceus*
Kefir	*L. lactis* subsp. *lactis, Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
Kenkey	*Lactobacillus* spp.
Kimchi	Various strains
Kishk	*Lb. brevis, Lb. casei, Lb. plantarum*
Kisra	*Lactobacillus* spp.
Koumiss	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*
Lactic acid	*Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*
Lactic butter	*L. lactis* subsp. *cremoris*
Lebanon bologna	*P. acidilactici*
Magon	*Lactobacillus* spp.
Miso	*Lactobacillus* spp.
Sauerkraut	*Lb. plantarum, Lb. brevis, Leuc. mesenteroides, P. pentosaceus*
Sausages, meats	*Lb. plantarum, Lb. casei, Lb. curvatus, Lb. reuteri, Lb. sake, P. pentosaceus, P. acidilactici*
Shoyu	*Lactobacillus* spp.
Silage starters	*Lb. plantarum, P. acidilactici*
Sour bread	*Lb. sanfrancisco, Lb. brevis*
Sour cream	*L. lactis* subsp. *cremoris*
Sour pumpernickel	*Leuc. mesenteroides*
Soy sauce	*Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*
Sweet dough	*Lb. brevis, Lb. plantarum, Lb. fermentum, Leuc. mesenteroides* subsp. *cremoris, L. lactis* subsp. *cremoris*
Taette	*L. lactis* subsp. *lactis* var. *taette*
Tempeh	*Lactobacillus* spp.
Wine	*Lb. plantarum, Lb. hilgardii, P. damnosus, Leuc. mesenteroides, Leuc. oenos*
Yakult	*Lb. casei*
Yoghurt	*Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus, S. thermophilus*

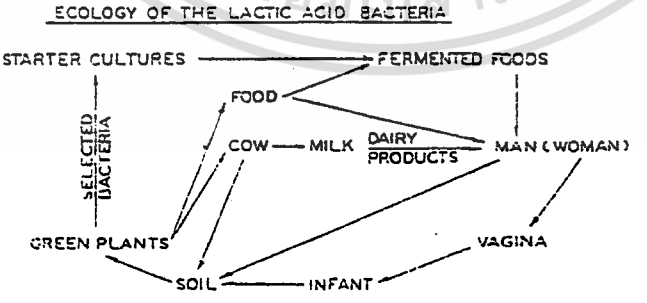
ที่มา : De Vuyst และ Vandamme (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลุ่ม *Lactococcus* sp. ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารหมัก ได้แก่ *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* *L. lactis* spp. *lactis* *L. lactis* spp. *lactis var. diacetylactis* เนื่องจากจะสร้างสารที่ให้กลิ่นรสเฉพาะในผลิตภัณฑ์ และมักพบแบคทีเรียแลคติคเหล่านี้ในอุตสาหกรรมนมหมัก รวมกับการใช้เชื้อจุลินทรีย์อื่น ส่วนเชื้อในกลุ่ม *Leuconostoc* sp. ที่พบใช้ในผลิตภัณฑ์นมหมัก โดยทำให้เกิดกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides* spp. *cremoris* นอกจากนี้พบ *Leu. oenos* ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม ขณะที่แบคทีเรียแลคติคในกลุ่ม *Pediococcus* sp. ได้แก่ *Ped. pentosaceus* *Ped. acidilacticii* และ *Ped. halophilus* และกลุ่ม *Lactobacillus* sp. มักพบในอุตสาหกรรมอาหารหมักทั่วไป ได้แก่ *L. acidophilus* *L. cremoris* *L. plantarum* *L. casei* และ *L. delbrueckii* เป็นต้น

2.1.3 ประโยชน์ของการใช้แบคทีเรียแลคติค

ในระบบนิเวศวิทยา มีความเกี่ยวพันกันระหว่างการใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารสัตว์เพื่อส่งเสริมสุขภาพของสัตว์และส่งผลมาถึงมนุษย์ เมื่อยาปฏิชีวนะที่ผสมในอาหารสัตว์นั้นเป็นชนิดที่ใช้ร่วมกับมนุษย์ จะทำให้เกิดการดื้อยาของจุลินทรีย์ในทางเดินอาหารของมนุษย์ตามธรรมชาติ แบคทีเรียแลคติคมีความสำคัญโดยเป็นตัวบ่งชี้ ถึงกลไกการป้องกันสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่พบอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ ความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์เหล่านี้ต่อมนุษย์แสดงดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 นิเวศวิทยาของแบคทีเรียแลคติค

ที่มา : Sandine (1972)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการสร้างสารต่างๆ โดยแบคทีเรียแลคติค ที่ใช้เป็นหัวเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารจึงก่อให้เกิดประโยชน์ คือ

2.1.3.1 แบคทีเรียแลคติคสามารถสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติค กรดอะซิติค และสารประกอบจากกระบวนการเมตาบอไลท์ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

2.1.3.2 แบคทีเรียแลคติคสามารถสร้างสารที่ให้กลิ่นรส และเนื้อสัมผัสเฉพาะตัวกับอาหารหมัก เช่น ไดอะเซททิล อะเซทาลดีไฮด์ 2,3 บิวเทนไดออล ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่มีลักษณะเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค

2.1.3.3 แบคทีเรียแลคติคสามารถสร้างแบคทีริโอซิน ที่เป็นสารประกอบเปปไทด์ เช่น ไนซิน ไดโพลคอคซิน และริวทีริน เป็นต้น ซึ่งมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการได้ และสามารถใช้แทนยาปฏิชีวนะที่ใช้กับมนุษย์ จึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคไม่เกิดการดื้อยา นอกจากนั้นสารเหล่านี้สามารถย่อยสลายได้โดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน เช่น ทริปซิน แพนครีเอทิน เอนไซม์จากน้ำลายและกระเพาะอาหาร จึงไม่ทำให้เกิดอาการดื้อยาในมนุษย์หรือสัตว์เลี้ยง

2.1.3.4 แบคทีเรียแลคติค สามารถส่งเสริมคุณค่าทางโภชนาการ และสุขภาพแก่ผู้บริโภคอาหารหมัก กล่าวคือ แบคทีเรียแลคติคจะย่อยสลายสารโมเลกุลใหญ่ หรือโพลิเมอร์ให้เป็นสารโมเลกุลเล็ก ทำให้ผู้ป่วยหรือผู้บริโภคได้รับสารอาหารมากขึ้น นอกจากนี้ยังสร้างสารที่ช่วยลดระดับคลอเรสเตอรอลในเลือด (antichoresterol) และสารยับยั้งการแพร่กระจายของเนื้องอก (antitumor) ได้อีกด้วย (Gilliland,1990)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Antagonistic activity

เมตาบอไลท์ที่สำคัญและสารยับยั้งการเจริญที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติค ได้แก่

2.2.1 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่ไม่เป็นสารประกอบเปปไทด์ (Nonpeptide inhibitors)

2.2.1.1 กรดอินทรีย์

การสะสมของกรดอินทรีย์ และผลของการลดลงของพีเอชในช่วงเริ่มต้นของการหมัก (lag phase) จะมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถทนกรด เช่น *Pseudomonas* sp. *E. coli* และ *Bacillus* sp. เป็นต้น โดยยับยั้งกิจกรรมและการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคหรือทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารที่ปะปนมากับวัตถุดิบ กรดอินทรีย์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ประกอบด้วยกรดอินทรีย์ที่มีคาร์บอนมากกว่า 4 อะตอมขึ้นไป ในทางชีวเคมีเมื่อโมเลกุลของกรดอินทรีย์มีขนาดใหญ่ขึ้นจะทำให้พีเอชเพิ่มขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ค่าพีเอชที่ต่ำลง ค่าคงที่ของการแตกตัว (pKa) และความเข้มข้นของกรด จะเป็นตัวกำหนดกิจกรรมในการยับยั้งของกรดแลคติคและกรดอะซิติก ณ ค่าพีเอชช่วงหนึ่งๆ กรดที่มีค่า pKa สูงจะมีสัดส่วนของกรดที่ไม่แตกตัวอยู่มากและส่งผลให้ยับยั้งจุลินทรีย์ได้มากกว่า เช่น กรดอะซิติก (pKa 4.74) จะมีสัดส่วนของกรดที่ไม่แตกตัวมากกว่ากรดแลคติค (pKa 3.85) ประมาณ 2-4 เท่า ที่พีเอชในช่วง 4.0-4.6 ส่งผลให้กรดอะซิติกยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้มากกว่ากรดแลคติค กรดไลโปฟิลิค (lypophilic acid) ได้แก่ กรดแลคติคและกรดอะซิติก ที่อยู่ในรูปกรดที่ไม่แตกตัว จะสามารถซึมผ่านผนังเซลล์จุลินทรีย์เข้าไป แล้วเกิดการแตกตัวภายในเซลล์ให้ไฮโดรเจนไอออน ทำให้พีเอชภายในเซลล์ลดลง มีผลขัดขวางปฏิกิริยาที่สำคัญภายในเซลล์ซึ่งจำเป็นต่อการอยู่รอด เช่น การขัดขวางการขนส่งสารต่างๆ ภายในเซลล์และปฏิกิริยาการหายใจ อย่างไรก็ตามยังมีจุลินทรีย์ที่ทนกรดและพีเอชต่ำๆ ได้ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียที่สร้างกรด (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ Lindgren (1990) ยังพบว่าความเข้มข้นของกรดที่ไม่แตกตัวจะมีความสัมพันธ์กับค่า pKa ดังรูปที่ 2.2 แสดงความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดที่ไม่แตกตัว (The minimal inhibitory concentration of and undissociated acid; MIC_{undiss}) ของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียซึ่งส่วนใหญ่จะมีค่าคงที่ เมื่อพีเอชระหว่างการหมักมีค่า 4.2-5.4 แต่ในขณะที่ความเข้มข้นในการยับยั้งของกรดทั้งหมดจะสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว แสดงว่าประสิทธิภาพของความเข้มข้นของกรดที่ไม่แตกตัวมีมากกว่ากรดที่แตกตัว เนื่องจากเซลล์จุลินทรีย์จะมีกลไกในการป้องกันการนำโปรตอนเข้าไปภายในเซลล์

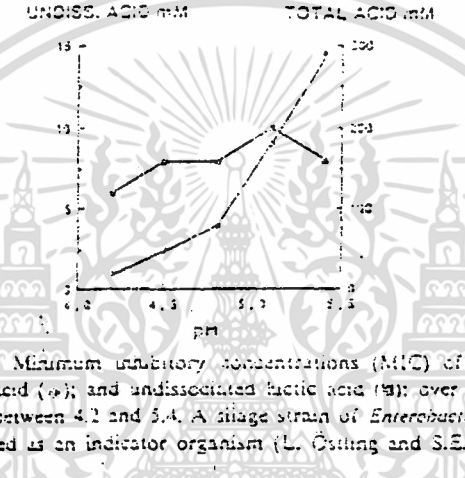


Fig. 5 Minimum inhibitory concentrations (MIC) of total lactic acid (●); and undissociated lactic acid (■); over a pH range between 4.2 and 5.4. A silage strain of *Enterobacter* sp. was used as an indicator organism (L. Gelling and S.E. Lin-

รูปที่ 2.2 แสดงผลของความเข้มข้นต่ำที่สุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดที่ไม่แตกตัว และจำนวนกรดทั้งหมดต่อจุลินทรีย์ในหญ้าหมัก

ที่มา : Lindgren (1990)

ความไวต่อกรดอินทรีย์จะมีความแตกต่างกันในแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ดังรูปที่ 2.3 แสดงให้เห็น MIC_{undiss} ที่มีผลต่อเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในการผลิตหญ้าหมัก จากข้อมูลแสดงค่า MIC_{undiss} จะมีค่าค่อนข้างคงที่ ณ พีเอชระหว่าง 4.5-5.2 โดยที่ค่าพีเอชที่ต่ำกว่า 4.5 MIC_{undiss} และการลดลงของค่า MIC_{undiss} ที่พีเอชสูงกว่า 5.2 มีผลเนื่องมาจากความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ทั้งหมด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

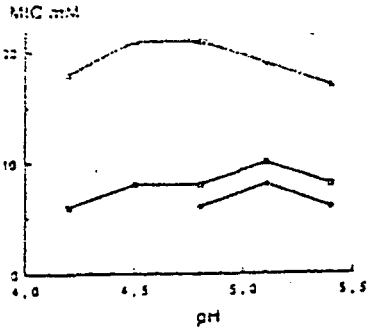


Fig. 7 Minimum inhibitory concentration (MIC) of undissociated lactic acid over a pH range against silage bacteria; ●, *Clostridium tyrobutyricum*; ■, *Enterobacter* sp.; ▲, *Propionibacterium shermanii* (L. Ösdling, A. Jonsson and S.E. Lindgren, unpublished results).

รูปที่ 2.3 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดที่ไม่แตกตัวและช่วงพีเอชในหญ้าหมัก

ที่มา : Lingren และคณะ (1990)

Mather และ Babel (1959) ได้รายงานผลการยับยั้งของกรดอะซิติก และกรด-แลคติคในปริมาณที่เท่ากัน พบว่ากรดอะซิติดจะให้ผลการยับยั้งมากกว่ากรดแลคติด และกรดอะซิติดซึ่งผลิตโดย *Leu. citrovorum* สามารถยับยั้งแบคทีเรียพวก Psychrotroph และ Salmonella ได้ จากบทบาทที่สำคัญของกรดอินทรีย์ดังกล่าว จึงได้มีการนำไปใช้ร่วมกับการถนอมอาหาร การเติมหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติคหรือสารสกัดของจุลินทรีย์เหล่านี้ลงในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ เช่น นม เนื้อสัตว์ ไข่ และอาหารทะเล ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาได้ โดยการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป็นผลจากการสะสมของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ และสารยับยั้งอื่นๆ Gilliland และ Speck (1972) ได้ทำการทดลองกับ *Staphylococcus aureus* และ Salmonella พบว่าเชื้อดังกล่าวถูกยับยั้งการเจริญโดย Lactic Streptococci ในนม สามารถยับยั้ง Salmonella อยู่ในช่วงระหว่าง 88.2 ถึง 93.4 % ส่วน *Stap. aureus* อยู่ระหว่าง 98.1- 98.9 % การยับยั้งนี้เกิดขึ้นเนื่องจากผลของการสร้างกรดอินทรีย์ และผลจากส่วนประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยในน้ำหางนม

Hutton และคณะ (1991) ทำการศึกษาการใช้ *Pediococcus acidilactici* ร่วมกับน้ำตาลเดกซ์โตรสในสลัดไก่ หรือเรียกกระบวนการนี้ว่า " Wisconsin Process " พบว่าสามารถป้องกันการสร้างสารพิษ Botulinum Toxin ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Ped. acidilactici* จะหมักน้ำตาลเดกซ์โตรสได้กรดแลคติค มีผลทำให้พีเอชลดลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พอที่จะยับยั้งการสร้างสารพิษได้ ทั้งยังสามารถลดความเสี่ยงต่อการสร้างสารพิษ Botulinum ในผลิตภัณฑ์เบคอน และสามารถลดปริมาณการเติมไนไตรท์ลง (Tanaka และคณะ, 1980)

2.2.1.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

แบคทีเรียแลคติคสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาพที่มีอากาศ เช่น กลุ่ม Lactobacillus สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้โดยผ่านวิถีทางไพรูเวท โดยใช้เอนไซม์ L-lactate oxidase เอนไซม์ NAD-independent D-lactate dehydrogenase และ เอนไซม์ NADH oxidase เกิดเป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สามารถสะสมได้ เนื่องจากเชื้อในกลุ่ม Lactobacillus ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส ในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ปริมาณการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของแบคทีเรียแลคติคนั้น ขึ้นอยู่กับปริมาณออกซิเจน และความแตกต่างนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรีย การยับยั้งจุลินทรีย์จะแปรผันตามปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สูงขึ้น โดยเกิดจากผลของการออกซิไดส์อย่างรุนแรงภายในเซลล์ และการทำลายโครงสร้างของเอนไซม์ภายในเซลล์

Dahiya และ Speck (1968) ทำการศึกษา *Lb. bulgaricus* พบว่ามีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Stap. aureus* ได้ในอาหารที่มีพีเอช 7.0 และเก็บไว้ในอุณหภูมิไม่เกิน 5 องศาเซลเซียส โดยปริมาณการสร้างกรดจะผกผันกับปริมาณการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Juffs และ Babel (1975) ที่ทำการทดลองเติมหัวเชื้อผสมของ *Leu. cremoris* และ *L. lactis* ลงในน้ำนมที่มีการใส่จุลินทรีย์กลุ่ม psychrotroph หลายชนิด พบว่าการยับยั้งการเจริญขึ้นกับ ชนิดของหัวเชื้อที่ใช้ ชนิดและปริมาณของ Psychrotroph อุณหภูมิ และเวลา ซึ่งเป็นผลมาจากการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสามารถสรุปได้ว่า การเก็บที่อุณหภูมิต่ำจะเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้น รวมทั้งความสัมพันธ์ของการสร้างกรดกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะผกผันกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Price และ Lee (1970) ศึกษาผลของการใช้ *Lactobacillus* sp. เติมลงในหอยนางรมที่พบการปนเปื้อนของ *Pseudomonas* sp. พบว่า *Lactobacillus* sp. จะเพิ่มจำนวนขึ้นขณะที่ *Pseudomonas* sp. จะลดจำนวนลง และสามารถสรุปได้ว่า การยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* sp. เป็นผลเนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 2-8 μg/ml อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในน้ำนมดิบจะพบระบบเอนไซม์ Lactoperoxidase system (LPS) ซึ่งเมื่อรวมกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาพที่มีอากาศ จะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ และผลของระบบเอนไซม์ LPS นั้น ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ แบคทีเรียแกรมบวกจะมีความต้านทานมากกว่า ขณะที่แบคทีเรียแกรมลบ เช่น *E. coli* *Salmonella* sp. *Pseudomonas* sp. จะมีความไวต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กลไกการยับยั้งแบคทีเรียโดยระบบเอนไซม์ LPS จะมีความซับซ้อนไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจน แต่ผลสำคัญที่เกิดขึ้นคือ การเกิดออกซิเดชั่นที่บริเวณกลุ่ม sulhydryl (SH-group) ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอไลท์ต่างๆ เช่น เอนไซม์ hexokinase glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase และ aldolase

2.2.1.3 ไดอะเซททิล (Diacetyl)

ไดอะเซททิลและ 2,3-butandione มีความสำคัญในการสร้างกลิ่นหอมในผลิตภัณฑ์นมหมัก ส่วนใหญ่พบได้จากแบคทีเรียแลคติคที่ใช้ซิเตรทได้ เช่น *Leu. cremoris* *L. lactic* ssp.*lactic* var.*diacetylactis* *L. lactic* ssp. *diacetylactis* โดยกลไกการเปลี่ยนซิเตรทไปเป็นไพรูเวท และมีวิธีการสร้างไดอะเซททิลขึ้น จะทำให้เกิดกลิ่นเนย (butter flavour) ในผลิตภัณฑ์นมหมัก และใช้เป็นสารปรุงแต่งกลิ่นในอาหารได้ นอกจากนี้สารดังกล่าวสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Mycobacterium tubercolosis*

Jay (1982) ได้ทำการทดสอบไดอะเซททิลถึงผลในการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ พบว่าเมื่อพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ผลของการเสริมฤทธิ์ (Synergistic effect) ระหว่างไดอะเซททิลและพีเอช จะทำให้ยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบมีความไวมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแลคติคและ *Clostridium* sp. จะสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านทานต่อผลของ Synergistic effect นอกจากนี้ในการทดลองของ Motlagh และคณะ (1991) พบว่าที่ความเข้มข้นของไดอะเซททิล 344 μg/ml สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* *L. ivanovii* *L. innocua* *Salmonella anatum* *S. typhimurium* *Yersinia enterocolitica* *E. coli* *Acromonas hudrophila* นอกจากนี้ยังพบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์ภายหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ผลของไดอะเซททิลต่อการยับยั้งเชื้อยีสต์ แบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก พบว่าที่ความเข้มข้นของไดอะเซททิล 200 μg/ml สามารถยับยั้งยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติคจะต้องใช้ความเข้มข้นที่ 300 μg/ml ขณะที่การใช้แบคทีเรียแลคติคจะต้องใช้ความเข้มข้นมากกว่า 350 μg/ml จึงจะให้ผลที่สมบูรณ์ (Jay, 1982)

2.2.2 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่เป็นสารประกอบเปปไทด์ (Peptide / Protein inhibitors)

แบคทีเรียแลคติคสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นหลายชนิดนอกเหนือจากสารประกอบเมตาบอไลท์แล้ว ได้มีการรายงานผลการยับยั้งของสารประกอบกลุ่มโปรตีนจากแบคทีเรียแลคติคที่เรียกว่า แบคทีริโอซิน (Bacteriocin) โดยพบการสร้างครั้งแรกใน *Lactobacillus fermentum* ซึ่งมีผลในการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ที่ใกล้เคียงกันและมีกลไกในการทำปฏิกิริยาตรงบริเวณ Lipocarbohydrate (De Klerk และ Smit, 1967)

แบคทีริโอซิน เป็นสารโพลีเปปไทด์ที่สร้างได้จากแบคทีเรียแลคติคหลายชนิด ได้แก่ *Lactobacillus* sp. *Pediococcus* sp. *Streptococcus thermophilus* *Leuconostoc* sp. และ *Lactococcus* sp. โดยส่วนใหญ่แบคทีริโอซินจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันและมีลักษณะทางชื่อเคมี รวมทั้งลักษณะทางพันธุศาสตร์ที่คล้ายคลึงกัน ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติของแบคทีริโอซินต่างๆ ที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 แสดงคุณสมบัติของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติค

Table 4
Properties of Characterized Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria

Bacteriocin	*Producing microorganism*	*Inhibitory spectrum*	*Inactivating enzymes*	*pH-range (most active)*	*Number of amino acids*	*Molecular mass*	*Genetic determinants*
Lantibiotics							
Nisin A Nisin Z	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454, 6F3, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186	Gram-positive bacteria	α-chymotrypsin nisinase	2·0–7·0 (2·0)	34	3353	conjugative transposon Tn *5201*, Tn *5276* (70 kb)
Lacticin 481	*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 481	lactic acid bacteria, *Clostridium tyro-butyricum*, *Staphylococcus carnosus*	α-chymotrypsin, pronase, ficin, proteinase k	2·0–8·0 (7·0)	27	2901	plasmid (60–80 MDa)?
Lactocin S	*Lactobacillus sake* L45	carnobacteria, lactobacilli, pediococci, lactococci	trypsin, protease type XIV	(<5·5)	37	3778	plasmid (32·7 MDa)
Non-lantibiotic small heat-stable bacteriocins							
Diplococcin	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 346	lactococci	α-chymotrypsin, trypsin, pronase	5·0–11·0	51	5300	plasmid (54 MDa)
Lactococcin A	*Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LMG 2130	lactococci	trypsin, endo-proteinase Glu-C		54	5778	plasmid (36 MDa)
Lactocin 27	*Lactobacillus helveticus* LP27	lactobacilli	trypsin, pronase		>100	12400	chromosomal DNA?
Lactacin B	*Lactobacillus acidophilus* N2	lactobacilli	proteinase K	(5·0)		6500	chromosomal DNA
Lactacin F	*Lactobacillus acidophilus* 11088	lactobacilli, *Enterococcus faecalis*	trypsin, ficin, proteinase K		57	6300	episomal plasmid
Sakacin A	*Lactobacillus sake* Lb 706	lactobacilli, enterococci, carnobacteria, *Listeria monocytogenes*	trypsin, pepsin, α-chymotrypsin, pronase E, proteinase K, collagenase	2·0–9·0	41	±6000	plasmid (60 kb)

(continued)

ตารางที่ 2.2 (ต่อ) แสดงคุณสมบัติของแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติค

Table 4—*contd.*

Bacteriocin	*Producing microorganism*	*Inhibitory spectrum*	*Inactivating enzymes*	*pH-range (most active)*	*Number of amino acids*	*Molecular mass*	*Genetic determinants*
Sakacin P	*Lactobacillus sake* LTH673	lactobacilli, carno bacteria, *Enterococcus faeculis*, *Brochotrix thermosphacta*, *Listeria monocytogenes*	proteinase K, trypsin		41	±5000	
Pediocin AcH	*Pediococcus acidlactici* E, F, H, M	pediococci, lactobacilli leuconostocs, *Brocho trix thermosphacta*, propionibacteria, bacilli, enterococci, staphylococci, listeriae, clostridia	trypsin, α-chymotrypsin, papain, ficin	2·5–9·0	44	4628	conjugative plasmid (7·4 MDa)
Pediocin PA-1	*Pediococcus acidilactici* PAC-1·0	pediococci, lactobacilli, leuconostocs, listeriae	protease, papain, α-chymotrypsin	2·0–10·0 (4·0–7·0)	44	4629	plasmid (62 MDa)?
Leucocin A-UAL-187	*Leuconostoc gelidum* UAL 187	lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes*	protease, trypsin	2·0–3·0	37	3932	plasmid (7·6 MDa)
Non-lantibiotic large heat-labile bacteriocins							
Helveticin J	*Lactobacillus helveticus* 481	lactobacilli	trypsin, pronase, ficin, proteinase K, pepsin, subtilisin		333	37511	chromosomal DNA
Caseicin 80	*Lactobacillus casei* B80	*Lactobacillus casei* B 109	trypsin, α-chymotrypsin, pronase, proteinase K, pepsin	3·0–9·0 (<5·2)		40000–42000	

ที่มา : De Vuyst and Vandamme (1994)

แบคทีริโอซินสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ตามลักษณะผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial spectrum)

แบบที่ 1 มีผลการยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกัน เช่น กลุ่มแบคทีเรียแลคติค และกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด เป็นต้น

แบบที่ 2 มีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ที่กว้างกว่าโดยมีผลการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น

แบคทีเรียแลคติคที่ต่างสายพันธุ์กันจะสร้างแบคทีริโอซินที่มีลักษณะคล้ายคลึงกัน แต่มีความแตกต่างกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ การแบ่งชนิดของแบคทีริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรีย-แลคติคในกลุ่มต่างๆ ได้แก่

2.2.2.1 กลุ่ม Lactococcus

เริ่มมีการใช้เพื่อยับยั้งครั้งแรกในช่วง ค.ศ.1930 โดยใช้ในหัวเชื้อของการผลิตเนยแข็งในอุตสาหกรรม พบว่ามีผลในการยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน (Whitehead, 1933; Mattick และ Hirsch, 1944) แบคทีริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรีย Lactococcus ได้แก่ ไนซิน (nisin) diplococcin และ lactostrepcins

Mattick และ Hirsch (1947) เป็นผู้ตั้งชื่อ " ไนซิน " ที่เติมมาจากคำว่า " N inhibitory substance " เป็นสารที่ผลิตจากแบคทีเรีย *L. lactis* ssp. *lactis* สามารถใช้ผลิตในทางการค้าในช่วงปี ค.ศ. 1950 และใช้ชื่อทางการค้าว่า " Nisaplin " สารประกอบของไนซินสามารถแยกย่อยได้เป็น 5 ชนิด คือ Nisin A, B, C, D และ E Nisin A จะมีประสิทธิภาพดีที่สุดและมักผลิตในทางการค้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไนซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,500 ดาลตันและอาจเกิดเป็นไดเมอร์ (dimer)ได้ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลถึง 7,000 ดาลตัน สามารถถูกย่อยโดยเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน (Proteolytic enzyme) เช่น เอนไซม์ trypsin, pancreatin, α-chymotrypsin, เอนไซม์จากน้ำลาย และเอนไซม์จากกระเพาะ ยกเว้น เอนไซม์เรนเนท คุณสมบัติการละลายของไนซินขึ้นกับพีเอช โดยที่พีเอช 2.5 มีความสามารถในการละลาย 12 % และที่พีเอช 5.0 สามารถละลายได้ 4.0 % แต่ในสภาพธรรมชาติและสภาพต่างจะไม่สามารถละลายได้ เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการแปรรูปอาหารและพีเอชที่คงตัวของไนซินในอาหาร พบว่า อาหารที่เป็นกรดต่ำ (พีเอช 6.1-6.9) หรือที่ เป็นกรดสูง (พีเอช 3.3-4.5) การให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 3 นาที จะทำลายไนซินได้ 25-50 % (Heinemann และคณะ, 1965) และไนซินจะคงตัวที่พีเอช 2.0 หลังจากผ่านความร้อน 115.6 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมินี้ที่พีเอช 5.0 และพีเอช 6.8 สามารถทำลายไนซิน 40 % และ 90 % ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตาม ไนซินจะมีผลในการยับยั้งกิจกรรมจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดีที่สุดที่พีเอชของสารละลาย 6.5-6.8 (Hurst, 1981)

ผลการยับยั้งของไนซินจะอยู่ในช่วงแคบโดยมีผลเฉพาะต่อแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้งแบคทีเรียแลคติคได้แก่ *Bacillus* sp. *Clostridium* sp. *Lactobacillus* sp. *Streptococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์หรือราได้ ไนซินจัดเป็น Cationic polypeptide จึงมีพฤติกรรมการจับอิออนบวกได้ (surface active cationic detergent) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่นโดยการดูดซึม (adsorption) บนผิวเซลล์ Ramseier (1960) ได้ทำการศึกษาพบว่า ไนซินถูกดูดซึมโดยเซลล์ที่มีความไวของ *Cl. butyricum* (sensitive vegetative cell) ในขณะที่เซลล์ที่ต้านทาน (resistant cell) จะไม่สามารถดูดซึมได้ ไนซินจึงมีผลต่อไซโตพลาสมิดเมมเบรน (cytoplasmic membrane) และสารที่ปล่อยจากไซโตพลาสมิดเมมเบรน ดังนั้นในสปอร์ที่กำลังงอก ไซโตพลาสมิดจึงถูกทำลายทันที (Lueck,1980) กรดอะมิโนไม่อิ่มตัวในโมเลกุลของแข่งขันกันจับซับสเตรทกับเอนไซม์ในกลุ่ม sulfhydryl containing enzyme เช่น Coenzyme A (Gross และ Morell, 1970) นอกจากนี้ไนซินที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลต่อการยับยั้งของการสังเคราะห์ Peptidoglycan ใน *B. stearothermophilus* หรือ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

97015

E. coli (Linnett และ Strominger,1973) ในปัจจุบันไนซินเป็นสารปฏิชีวนะที่เป็นที่ยอมรับในการเติมในผลิตภัณฑ์อาหารหรือเป็น Food additive เนื่องจากมีคุณสมบัติในการยับยั้งการงอกของสปอร์แบคทีเรีย

ไดโพลคอคซิน สร้างโดย *Lactococcus lactis* spp. *cremoris* บางสายพันธุ์ Davey และ Richardson (1981)ได้ทดสอบการสร้างไดโพลคอคซินใน *L. lactis* spp. *cremoris* จำนวน 150 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 11 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถสร้างได้ ไดโพลคอคซินถูกทำลายโดยเอนไซม์ trypsin α-chymotrypsin และ pronase (Oxford, 1994; Davey และ Pearce, 1982) และมีผลการยับยั้งในช่วงแคบๆ โดยเฉพาะสายพันธุ์ของ *L. lactis* spp. *cremoris* และ *L. lactis* spp. *lactis* ซึ่งจะยับยั้งการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียนั้น ในบางกรณีหัวเชื้อที่สร้างแบคทีริโอซินได้ ก็ไม่เป็นที่ต้องการในการผลิตผลิตภัณฑ์หมัก เนื่องจาก *L. lactis* spp. *cremolis* จะเจริญและยับยั้งเชื้ออื่นๆ ในการใช้หัวเชื้อผสม (Davey และ Richardson, 1981)

Kozak และคณะ (1978)ได้ทำการศึกษา *L. lactis* จำนวน 67 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถผลิตไนซินได้ เพื่อตรวจสอบผลการยับยั้ง Streptococci ที่พีเอช 4.6 พบว่า *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* จำนวน 12 สายพันธุ์ และ *L. lactis* ssp. *cremoris* จำนวน 1 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้งที่เรียกว่า " lactostrepcins " ที่มีช่วงในการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์อื่น รวมทั้ง Lactococcus *B. cereus* Streptococcus group A, C และ G บางสายพันธุ์ของ Leuconostoc และ Lactobacillus (Zajdal และ Dobrzanski,1983)

2.2.2.2 กลุ่ม Lactobacillus

โดยทั่วไปแบคทีริโอซินที่สร้างโดย Lactobacillus มีผลการยับยั้งในช่วงแคบ เนื่องจากสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากจึงต้องมีการกำจัดออกก่อนทำการทดลอง เพื่อไม่ให้มีผลต่อการทดสอบแบคทีริโอซินนั้น แบคทีริโอซินที่พบในเชื้อกลุ่มนี้ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactacin B เป็นแบคทีริโอซินที่ Barefoot และ Klaenhamme (1983) ค้นพบโดยทำการศึกษาจากเชื้อ *Lb. acidophilus* N2 พบว่าสามารถสร้าง Lactacin B ที่มีความแตกต่างจาก *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์อื่นๆ คือเป็นโพลีเปปไทด์ที่มีขนาดใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 6,200 ดาลตัน สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติคพวก *Lb. bulgaricus* *Lb. leichmannii* *Lb. helveticus* และ *Lb.lactis* มีความไวต่อเอนไซม์ protinase K ที่ไม่มียูเรีย มีคุณสมบัติในการคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่พีเอช 5.0 ส่วน *Lb. acidophilus* 11088 (NCK 88) สามารถสร้าง Lactacin F ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 56 ชนิด มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2,500 ดาลตัน มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สามารถถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ protinase K trypsin ficin และ subtilisin นอกจากนี้ Lactacin F ยังมีผลร่วมกับพีเอชในการยับยั้ง *Lb. lactis* *Lb. bulgaricus* *Lb. leichmannii* *Lb. fermentum* 1750 *Lb.helveticus* และ *Enterococcus faecalis* 19433 (Muriana และ Klaenhammer, 1991; Barefoot และ Klaenhammer, 1983)

Lb. helveticus LP27 สามารถสร้าง Lactocin 27 ที่ประกอบด้วย Glycoprotein ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 12,400 ดาลตัน จึงจะให้ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์อย่างสมบูรณ์ แบคทีริโอซินชนิดนี้มีความไวต่อเอนไซม์ trypsin และ pronase แต่ทนต่ออุณหภูมิที่ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยไม่สูญเสียกิจกรรม ผลการยับยั้งจุลินทรีย์จะอยู่ในช่วงแคบ เช่น *Lb. acidophilus* และ *Lb.helveticus* กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์คาดว่า จะอยู่ในช่วงท้ายของขั้นตอนการสังเคราะห์โปรตีนในช่วงปลาย แต่ไม่มีผลในขั้นตอนการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) หรือ อาร์เอ็นเอ (RNA) (Upreti และ Hinsdill, 1975) นอกจากนี้ *L. fermenti* 466 มีการผลิตสารที่คล้าย lactocin 27 แต่สามารถทนต่อความร้อนอุณหภูมิ 96 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และมีความไวต่อ ทริปซิน (trypsin) เปปซิน (pepsin) ต้านทานต่อยูเรีย และ เอนไซม์ไลโซไซม์ (Lysozyme) (De Klerk และ Smit, 1967; Upreti และ Hinsdill, 1973)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขณะที่ *Lb. plantarum* ที่มีความสำคัญในการหมักผักดอง สามารถสร้าง lactolin ที่ถูกย่อยโดย proteolytic enzyme รวมทั้งลดกิจกรรมได้โดยเอนไซม์ lipase และ α-amylase พบว่ามีผลในการยับยั้ง *Leu. mesenteroides* 8015 *Lb. plantarum* และ *Pediococcus damnosus* 1832 (Kodama, 1952) นอกจากนี้ *Lb. plantarum* C-11 ที่แยกได้จากแตงกวาดองสามารถสร้างแบคทีริโอซินที่เรียกว่า " plantaricin A " ซึ่งมีผลในการยับยั้ง *Leu. paramesenteroides* *Ped. pentosaceus* และ *Lb. plantarum* ที่มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และมีประสิทธิ-ภาพในการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์อื่นได้ดีที่พีเอช 4.0-6.5 (Daeshel และคณะ, 1990)

Joerger และ Klaenhammer (1986) ได้ทำการทดลองพบว่า *Lb. helveticus* สามารถสร้าง helveticin J ที่มีน้ำหนักโมเลกุลถึง 37,000 ดาลตัน ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ pronase trypsin pepsin fisin protinase K และ subtilisin ที่ทนต่ออุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยไม่ทำลายกิจกรรม แบคทีริโอซินชนิดนี้ สามารถยับยั้ง *Lb. helveticus* สายพันธุ์ 1846 และ 1244 *Lb. bulgaricus* สายพันธุ์ 1373 และ 1489 รวมทั้ง *Lb. lactis* สายพันธุ์ 970

Sakacin A เป็นแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lb. sake* มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ในช่วงแคบ คือ สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* และแบคทีเรียแลคติคหลายชนิด (Schillinger และ Lucke, 1989) ขณะที่ *Lb. sake* L 45 ที่แยกได้จากไส้กรอก-หมักแห้ง พบว่ามีการสร้างแบคทีริโอซิน lactocin S ที่ทนต่อความร้อนระดับปานกลาง และถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ protease และสามารถยับยั้ง Lactobacillus Pediococcus และ Leuconostoc (Mortvedt และ Nes, 1990)

Reuterin สร้างโดย *Lb. reuteri* เป็นแบคทีริโอซินที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ในช่วงกว้าง และมีศักยภาพสูงในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว *Lb. reuteri* เป็น dominant species ที่พบในทุกส่วนของทางเดินอาหารตั้งแต่กระเพาะจนถึงลำไส้ส่วน ilcum ของมนุษย์และสัตว์ รวมทั้งแยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Axellsson และคณะ, 1989)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

14608

2.2.2.3 กลุ่ม Pediococcus

Pediococcus pentosaceus FBB-61 ที่แยกได้จากแตงกวาดอง จะสร้างแบคทีริโอซินที่เรียกว่า pediocin A มีความสามารถในการยับยั้ง *Pediococcus* sp. *S. aureus Cl. botulinum Cl. sporogenes Lb. brevis Lb. plantarum Lb. lactis* ssp. *lactis* ATCC11454 (Daeschel และ Klaenhammer, 1985) ขณะที่ pediocin PA-1 สามารถแยกได้จาก *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 16,500 ดาลตัน ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ pronase papain pepsin และ α-chymotrypsin แต่มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่ม Pediococcus Lactobacillus บางชนิด และ *Leu. mesenteroides* spp. *dextranicum* แต่ไม่มีผลต่อ Lactococcus (Gonzales และ Kunka, 1987) ส่วน pediocin AcH เป็นแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *Ped. acidilactici* H มีน้ำหนักโมเลกุล 27,000 ดาลตัน และถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ trypsin chymotrypsin fisin และ papain สามารถฆ่าเชื้อได้ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยไม่สูญเสียกิจกรรม และทนต่อสารละลายอินทรีย์ มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ดีที่พีเอช 2.5-9.0 (Bhunia และคณะ, 1987; Bhunia และคณะ, 1988) และสามารถยับยั้ง *Listeria* sp. ได้ทุกสายพันธุ์ แต่ไม่ผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ (Motlagh และคณะ, 1991)

ต่อมา Siriporn และคณะ (มปท.) รายงานผลการศึกษาแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Ped. acidilactici* ที่แยกจากการผลิตแหนมพบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค และทำให้ผลิตภัณฑ์เกิดการเน่าเสียหลายชนิด ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก *Listeria monocytogenes L. innocua,L. ivahovii Enterococcus faecalis Clostridium perfringens Staphylococcus aureus Bacillus cereus* และแบคทีเรียแกรมลบ *Salmonella enteritidis* และ *S. derby*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2.4 กลุ่ม Leuconostoc

สารยับยั้งที่แบคทีเรียในกลุ่ม *Leuconostoc* สร้างขึ้นมาได้แก่ กรดแลคติค, กรดอะซิติก และ ไดอะเซททิล นอกจากนี้ยังมีรายงานการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีลักษณะคล้ายแบคทีริโอซิน (Bacteriocin-like-substance) Orberg และ Sandine (1984)ได้ทำการทดลองพบว่า *Leuconostoc* sp. P0184 สามารถยับยั้ง *Streptococcus cremoris* U134 ได้ แต่ไม่มีผลต่อ *S. lactis* ATCC 11454 นอกจากนี้ Tsai และ Sandine (1987) ยังพบการถ่ายทอดดีเอ็นเอโดยวิธีคอนจูเกชั่น (conjugation) ของ *S. lactis* 7962 กับ *L. daxtranicum* ผลการทดลองพบว่าคอนจูแกนท์ของเชื้อผู้รับ *L. daxtranicum* จะสามารถสร้างไนซินและเกิดการหมักน้ำตาลได้บนพลาสมิดที่มีขนาด 17.5 เมกกะดาลตัน ที่สำคัญคือสามารถผลิตไนซินได้ดีกว่า Streptococcus ถึง 1000 เท่า

Orberg และ Sandine (1984) พบว่า สารประกอบที่คล้ายแบคทีริโอซินที่ผลิตขึ้นโดย *Leuconostoc* sp. P0184 สามารถยับยั้ง *Strep. cremoris* U134 แต่ไม่ยับยั้ง *Strep. lactis* (สามารถผลิตไนซิน) ขณะที่ *Leuconostoc* sp. สายพันธุ์ UAL14 ซึ่งผลิตแบคทีริโอซินที่ไม่ทราบชื่อสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* จำนวน 8 สายพันธุ์

2.3 <u>การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติค</u>

แบคทีเรียแลคติคสามารถถนอมอาหารได้ โดยการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งอาหารและเปลี่ยนน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวให้เป็นกรดอินทรีย์ ทำให้อาหารมีพีเอชลดลง และยังผลิตสารเมตาบอไลท์ต่างๆ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซททิล และแบคทีริโอซิน ซึ่งจะส่งเสริมการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ หลายชนิด (Daeschel, 1989)

Gilliland (1972) ได้ทำการศึกษาการใช้หัวเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตผลิตภัณฑ์นม พบว่ามีการลดลงของจำนวนผู้ป่วยจากโรคต่างๆ ที่เกิดจากจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำนมดิบและยังพบว่า จำนวนจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทนความเย็นนั้นมีจำนวนลดลงเช่นกัน ผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อาหารหมักจากแบคทีเรียแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์ที่หมักตามธรรมชาติ และจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นที่รู้จักในฐานะที่เป็นการถนอมอาหารทางชีวภาพ จึงได้มีการคิดค้นกระบวนการผลิตอาหารแบบใหม่เพื่อให้เกิดความพอใจในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากผู้บริโภคนั้น ในปัจจุบันการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับแบคทีเรียแลคติคเหล่านี้ มุ่งเน้นไปที่การนำไปใช้ประโยชน์และพัฒนาให้อาหารนั้นผ่านกระบวนการน้อยที่สุด เพื่อให้เป็นที่พอใจของผู้บริโภค เนื่องจากมีความสะดวกในการรับประทาน มีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น มีลักษณะเป็นธรรมชาติ ดูสด และโดยส่วนใหญ่มักปราศจากการเติมสารเคมีในการถนอมอาหาร แต่เดิมนั้นความรู้เรื่องการใช้สารเคมีในการถนอมอาหารได้มีการพัฒนาด้วยวิธีการลองผิดลองถูก โดยให้ผู้บริโภครับประทานอาหารที่ใช้สารเคมีนั้น ซึ่งถ้าพบว่าไม่มีผู้ป่วยหรือเสียชีวิตก็จะใช้สารเคมีปริมาณนั้นในการถนอมอาหาร แต่อาจเกิดการสะสมในผู้บริโภคและทำให้เกิดอาการเจ็บป่วยหรือเสียชีวิตขึ้นได้ นอกจากนี้จะใช้วิธีเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ แม้ว่าโดยทั่วไปการแช่เย็นจะสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค และจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษ แต่อาจมีความเสี่ยงเนื่องจากยังมีจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคบางชนิด เช่น *L. monocytogenes* *Aeromonas hydrophila* สามารถเจริญได้และสร้างปัญหาให้กับผู้ผลิต ดังนั้นผู้ประกอบการจึงต้องพยายามปรับปรุงกรรมวิธีในการผลิต เพื่อให้เกิดความพอใจของผู้บริโภคมากที่สุด เช่น ต้องเตรียมอาหารที่ปราศจากสารเคมีในการถนอมอาหาร มีการรับประกันอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์และความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเพื่อให้เป็นไปตามความต้องการและความคาดหวังของผู้บริโภค แบคทีเรียแลคติคจึงมีบทบาทมากขึ้นเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่จัดเป็น Food Grade Microorganism และสามารถผลิตสารเมตาบอไลท์ที่มีการสะสมจนถึงระดับที่ยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักและเครื่องดื่มบางชนิด เนื่องจากมีภาพพจน์ ในฐานะที่เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและมีผลดีต่อสุขภาพ เช่น โยเกิต ขนมปังเปรี้ยว (sour dough bread) และไวน์แดง เป็นต้น

การใช้แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติคเพื่อการถนอมอาหารในปัจจุบัน มักใช้ร่วมกับสารถนอมอาหารอื่น การใช้กระบวนการผลิตหรือในรูปการใช้ทดแทน ซึ่งเป็นที่ได้รับความพอใจจากผู้บริโภค เนื่องจากมีการทดสอบว่าปลอดภัยในการบริโภคสารเมตาบอไลท์ ทั้งที่เป็น Primary และ Secondary metabolites ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียแลคติคที่ได้มีการทดสอบความเป็นพิษต่อมนุษย์ โดยการทดลองใช้ไนซิน ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติคมานานกว่า 40 ปี พบว่ามีความปลอดภัยและได้ผลดีในการใช้ จึงจัดเป็นแบบอย่างในการค้นคว้าวิจัย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างต่อเนื่อง และเป็นที่ยอมรับใช้ในการใช้แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติคเป็นสารถนอม-อาหารอย่างหนึ่ง

ไนซินเป็นแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *L. lactis* spp. *lactis* ที่ได้รับการศึกษาอย่างกว้างขวางในการใช้เป็นสารถนอมอาหาร (Hurst, 1983; Delves-Broughton, 1990) Hirsch และคณะ (1951) ได้ทำการศึกษาการใช้หัวเชื้อที่ผลิตไนซินในอาหารเป็นครั้งแรก พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถป้องกันการบวมเกิดกาซและสารระเหยในเนยแข็งสวิสที่มีสาเหตุจาก *Cl. tyrobutyricum* และ *Cl. butyricum* และได้มีการใช้วิธีการที่คล้ายคลึงกันในการยืดอายุการเก็บเนยแข็งแบบสวิสที่ผ่านกระบวนการ (McClintock, 1952)

Tanaka และคณะ (1986) พบว่าพีเอช รวมทั้งปริมาณโซเดียมคลอไรด์และฟอสเฟตมีผลต่อปริมาณไนซินที่ต้องใช้ในการยับยั้ง *Cl. botulinum* ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์ไรซ์ นอกจากนี้ Somers และ Tayler (1987) ได้ทำการทดลองพบว่าปริมาณไนซิน 500-10,000 IU/g มีผลในการชะลอหรือยับยั้งการเจริญและสร้างสารพิษของ *Cl. botulinum* ชนิด A และ B ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งสำหรับใช้ทาที่ผ่านกระบวนการพาสเจอร์-ไรซ์ และต้องใช้ในปริมาณที่สูงขึ้นสำหรับเนยแข็งที่มีความชื้นสูง ประกอบกับมีปริมาณเกลือและฟอสเฟตต่ำ ต่อมาในปี 1990 Delves-Broughton ได้ศึกษาปริมาณการใช้ไนซิน 30-50 IU/ml พบว่าสามารถยืดอายุการเก็บนมพาสเจอร์ไรซ์เป็น 2 เท่า เมื่อทำการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ อุณหภูมิห้องและที่อุณหภูมิสูง ซึ่งเป็นประโยชน์ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์นมในสภาวะที่มีอากาศและอุณหภูมิสูง Shehata และคณะ (1976) ได้ทำการทดลองใช้ไนซินในปริมาณน้อยกับนมกระป๋องที่ผ่านการสเตอริไลซ์และนมช็อคโกแลต พบว่าสามารถลดกระบวนการใช้ความร้อนลงได้ 80 % และผลิตภัณฑ์นั้นสามารถเก็บไว้ได้เป็นเวลา 24 วัน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

นอกจากนี้ ไนซินยังได้รับการรับรองให้ใช้ในผลิตภัณฑ์ผักกระป๋องเพื่อป้องกันการเจริญของ *Cl. botulinum* และทำให้สามารถลดสภาวะในการฆ่าเชื้อแบบสเตอริไลซ์ให้มีความรุนแรงน้อยลง (Campbell และคณะ,1959; Denny และคณะ, 1961) หรือการใช้ไนซินในการแก้ไขปัญหาการอยู่รอดของสปอร์จุลินทรีย์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูงเช่น *B. stearothermophilus* หรือ *Cl. thermosaccharolyticum* ได้ ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เก็บที่อุณหภูมิสูงเกิดการเน่าเสีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อีกทั้งยังสามารถลดอุณหภูมิที่ใช้ในกระบวนการผลิตได้ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องซึ่งใช้ไนซิน เช่น ถั่ว (beans) ในซอสมะเขือเทศ น้ำมะเขือเทศ ซุปต่างๆ นมข้น เห็ด ครีมสไตล์คอร์น และถั่ว (peas) (David และ Hoover, 1993) นอกจากนี้อาจใช้ไนซินในอาหารกระป๋องประเภทที่มีความเป็นกรดสูง เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของ *Bacillus* sp. และ *Cl. pasteurianum* (Delves-Broughton, 1990)

ในผลิตภัณฑ์เนื้อบางชนิด พบว่าการใช้ไนซินร่วมกับสารอื่นสามารถทำให้เกิดประโยชน์อย่างมากดังการทดลองของ Jarvis และ Burke (1976) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการใช้ไนซิน 400 mg/kg ร่วมกับกรดซอร์บิก 0.1 % และไพลีฟอสเฟต 2.5 % (W/W) จะช่วยให้สามารถยืดระยะเวลาในการเก็บไส้กรอกสด ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสได้นานขึ้น ส่วน Caserio และคณะ (1979) และ Hollley (1981) ได้แนะนำการใช้ไนซิน 150-200 mg/kg ร่วมกับไนไตรท์ใน cured meats เพื่อป้องกันการเจริญของ clostridia นอกจากนี้ Rayman และคณะ (1981) ได้ทำการทดลองใช้ไนซินเป็นสารทดแทน หรือใช้ร่วมกับไนไตรท์ใน simulated cooked ham เพื่อยับยั้งการเจริญของ *Cl. sporogenes* PA3679 พบว่าสามารถลดปริมาณการใช้ไนไตรท์จาก 150 ppm เป็น 40 ppm เมื่อใช้ร่วมกับไนซินซึ่งผลิตภัณฑ์ยังคงสีแดงและมีความปลอดภัยในการบริโภค แต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยท่านอื่นๆ ได้แสดงให้เห็นว่าการใช้ไนซินในเนื้อไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร Delves-Broughton (1990) ได้ทำการศึกษาพบว่า ต้องใช้ปริมาณไนซินในระดับสูงเท่านั้น จึงจะมีผลยับยั้ง *Cl. botulinum* ใน cured meats ซึ่งไม่เป็นการประหยัดค่าใช้จ่ายลงเมื่อใช้ในการเติมลงในผลิตภัณฑ์เพราะกิจกรรมของไนซินในผลิตภัณฑ์เนื้อจะลดลง เนื่องจากไนซินเกิดการยึดติดกับอนุภาคของเนื้อทำให้ไม่กระจายตัวและละลายไม่ได้ดี หรือมีการรบกวนจากฟอสโฟลิปิด

ไนซินได้รับการรับรองให้ใช้ในการถนอมรักษาเบียร์ เอล (ale) ไวน์ และบรั่นดีจากผลไม้ โดยสามารถยับยั้งการเน่าเสียจากแบคทีเรียแลคติคหรืออะซิติค (Henning และคณะ, 1986b; Ogden และคณะ, 1988; Radler, 1990a, Radler, 1990b) ซึ่งประสบความสำเร็จเนื่องจากไนซินไม่มีผลต่อกิจกรรมของยีสต์ที่ใช้ในการหมัก แต่อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนอกจากไนซินแล้ว ยังไม่มีแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติคชนิดใดที่ได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นสารถนอมอาหารในประเทศสหรัฐอเมริกา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากการใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหารแล้ว อาจใช้หัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักเพื่อให้ทราบผลการหมักที่แน่นอน ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ มีกลิ่นรส เนื้อสัมผัส และลักษณะปรากฏเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค เกิดประโยชน์ทางโภชนาการสูง และมีความปลอดภัย รวมทั้งเป็นการควบคุมแบคทีเรียที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพ และทำให้เกิดการเน่าเสียในผลิตภัณฑ์ แบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ใดที่สร้างแบคทีริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดผลเสียในผลิตภัณฑ์ได้ และมีความเหมาะสมต่อการผลิตผลิตภัณฑ์ ควรเลือกใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักและมีความปลอดภัยสูงขึ้น Goepfert และ Chung (1970) ได้รายงานการใช้หัวเชื้อ lactic streptococci ในผลิตภัณฑ์นมหมักบางชนิด พบว่าสามารถชะลอการเจริญของเชื้อ Salmonellae และ Staphylococci ได้ยังชี้ให้เห็นว่า Salmonellae สามารถเจริญได้ระหว่างกระบวนการผลิตไส้กรอกหมัก (fermented sausage) แต่มีจำนวนลดลงในระหว่างการแช่น้ำเกลือในกระบวนการผลิตเนยแข็ง (curing) นอกจากนี้ Staphylococci ที่มีอยู่ในนมอาจพบการเจริญได้ในระหว่างการผลิต Cheddar หรือ Colby chesse แต่จะลดจำนวนลงในขณะบ่มเนยแข็ง ส่วน Jezeski และคณะ (1969) รายงานผลการยับยั้ง Staphylococci ในระหว่างการผลิต Cheddar chesse และมีจำนวนลดลงในขณะบ่ม นอกจากนี้ Reddy และคณะ (1969) ได้ศึกษาการเสี้ยง *Strep. lactis* ในเนื้อวัวบด (Ground beef) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญและกิจกรรมของแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิต่ำที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อเกิดการเน่าเสีย ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เนื้อวัวบดออกไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

1. หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave)
2. ตู้อบ (Hot air oven)
3. ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)
4. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)
5. อ่างน้ำร้อน (Water bath)
6. เครื่องวัดพีเอช (pH-meter)
7. ตู้ทำความเย็น (Refrigerator)
8. ตู้แช่แข็ง (Freezer)
9. เครื่องเหวี่ยงแยก (Centrifuge)
10. Vortex mixer
11. Spectrophotometer
12. เครื่องชั่งน้ำหนัก
13. กระดาษกรอง Whatman เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร
14. กระดาษกรอง Whatman ขนาดรู 0.22 ไมครอน
15. ชุดกรองเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller-Hinton agar
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ Agar Medium No.11
4. อาหารเลี้ยงเชื้อ Phosphate peptone agar
5. Bromocresol purple
6. โซเดียมเอไซด์ (NaN_3)
7. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)
8. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1.0 และ 5.0 นอร์มอล
9. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก 1.0 นอร์มอล
10. กรดแลคติคเข้มข้น 33 %
11. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 35 %
12. สีย้อมแกรม

3.3 วิธีการทดลอง

3.3.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติคและการเก็บเชื้อ

3.3.1.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

- นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม และผักกาดดองที่จำหน่ายในท้องตลาด มาเจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง Vortex mixer เพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธี Dilution plate count บนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) ที่ประกอบด้วยแคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ Bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมเอไซด์ 0.02 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เลือกโคโลนีที่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี และเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ มาลงอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิเดิมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขี่ยลงจานอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิเดิมจนเกิดโคโลนีเดี่ยว นำมาทำการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา (ภาคผนวก ข)

3.3.1.2 การเก็บเชื้อบริสุทธิ์

การเก็บเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก สามารถทำได้ 2 วิธี คือ
วิธีที่ 1 : เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาแทงลงอาหารแข็ง MRS ที่ประกอบด้วย แคลเซียมคาร์บอเนต 10 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการเขี่ยเชื้อลงในอาหารแข็ง MRS หลอดใหม่ทุกๆ เดือน
วิธีที่ 2 : เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงในนมพร่องมันเนย 10 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนเกิดตะกอนนม หรือเคิร์ด แล้วถ่ายตะกอนนมใส่ขวดที่ปราศจากเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส

3.3.2 การตรวจสอบผลของเมตาบอไลท์ต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

เชื้อแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Bacillus subtilis* (TISTR 008) *B. cereus* (TISTR 035) *E. coli* (TISTR 512) *Staphylococcus aureus* (TISTR 517) และ *Sarcina lutea*

3.3.2.1 การตรวจสอบผลของกรดแลคติค

- นำสารละลายเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์มาเจือจางให้มีความเข้มข้นของเชื้อทดสอบที่ต้องการ ในอาหารแข็งที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ (ภาคผนวก ค) ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันแล้วเทอาหารแข็ง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เตรียมกรดแลคติคที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 % (W/V) โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็นสารละลายสำหรับเจือจาง แล้วนำกระดาษกรอง Whatman สำหรับทดสอบยาปฏิชีวนะ เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.0 mm. ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางลงในจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดูดสารละลายกรดแลคติค 20 ±1 และปล่อยลงบนกระดาษกรอง แล้วคีบกระดาษกรองวางบนจานอาหารแข็งที่มีเชื้อทดสอบอยู่ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ (ภาคผนวก ค) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

3.3.2.2 การตรวจสอบผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

- เตรียมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.025, 0.050, 0.100, 0.300 และ 0.500 % (W/V) แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติคจากแบคทีเรียแลคติค

เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาเหวี่ยงเอาเซลล์ออก วัดพีเอชของน้ำเลี้ยงเชื้อ ดูดตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นที่ต้มไล่กาซคาร์บอนไดออกไซด์ เติมฟีนอล์ฟทาลีน 1-2 หยด ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งถึงจุดยุติ หรือเกิดการเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน คำนวณปริมาณกรดแลคติค โดยสมการ

เปอร์เซ็นต์กรดแลคติค = (N x V x 90.01 x 100) / 100

เมื่อ N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3.4 การตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

3.3.4.1 การเตรียมจานเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบ เพื่อใช้ในการตรวจสอบ ทำเช่นเดียวกับข้อ 3.3.2.1

3.3.4.2 การตรวจสอบการสร้างแบคทีริโอซิน

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติคมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อมาใส่ลงในอาหารเหลว MRS หลอดใหม่ บ่มที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จึงดูดน้ำเลี้ยงเชื้อมาใส่ลงในอาหารเหลว MRS ใหม่อีกครั้ง บ่มที่อุณหภูมิเดิม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

แบ่งน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนที่แยกเซลล์แล้วออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งนำไปกรองด้วยแผ่นกรองขนาดรู 0.22 ไมครอน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ส่วนที่ได้นี้เรียกว่า " Crude " อีกสองส่วน นำไปปรับพีเอชให้เป็นกลาง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 5.0 นอร์มอล จากนั้นนำไปทำการกรองเช่นเดียวกับส่วนที่หนึ่ง เรียกส่วนที่สองนี้ว่า " Control " อีกส่วนหนึ่งนำไปแช่น้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เรียกส่วนที่สามนี้ว่า " Bacteriocin " นำน้ำเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ส่วนเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 18 องศาเซลเซียส

นำกระดาษกรอง Whatman สำหรับทดสอบยาปฏิชีวนะเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ปริมาตรความจุ 20 ไมโครลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว วางลงในจานเพาะ-เลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ดูดน้ำเลี้ยงเชื้อ 20 μl และปล่อยลงบนกระดาษกรอง แล้วคีบกระดาษกรองวางบนจานอาหารแข็ง ที่เตรียมได้จากข้อ 3.3.4.1 บ่มไว้ที่อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ (ภาคผนวก ค) เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งการเจริญโดยดูจากบริเวณใสรอบกระดาษกรอง เปรียบเทียบกันทั้ง 3 ส่วน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

ได้ทำการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักในท้องตลาด 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ตัวอย่างแหนม ไส้กรอกเปรี้ยว น้ำผักกาดดองตัวอย่างที่ 1 และน้ำผักกาดดองตัวอย่างที่ 2 นำมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Dilution plate count บนอาหารแข็ง MRS (ประกอบด้วย Bromocresol-purple 0.0004 % โซเดียมเอไซด์ 0.2 % และแคลเซียมคาร์บอเนต 1.0 %) สุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลคติคที่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี และเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ จากสีม่วงเป็นสีเหลือง มาทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้จำนวนทั้งหมด 32 สายพันธุ์

จากการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลม (cocci) หรือรูปไข่ (ovoid) ติดสีแกรมบวก และกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod) ซึ่งติดสีแกรมบวก สามารถจำแนกเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ดังนี้ จากตัวอย่างแหนม เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มี 6 สายพันธุ์ เป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลมมี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ C1.1, C1.2 C1.4 และ C1.5 ส่วนที่เหลืออีก 2 สายพันธุ์ คือ L1.3 และ L1.6 มีรูปร่างแท่ง ส่วนตัวอย่างที่ได้จากไส้กรอกเปรี้ยว แบ่งเป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลม และรูปร่างแท่งอย่างละ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ C2.2 C2.3, C2.6 และ L2.1, L2.4, L2.5 ตามลำดับ สำหรับน้ำผักกาดดองตัวอย่างที่ 1 และตัวอย่างที่ 2 แยกได้เชื้อบริสุทธิ์ที่มีรูปร่างแท่งทั้งหมด โดยแยกได้ 3 สายพันธุ์จากน้ำผักกาดดองตัวอย่างที่ 1 ได้แก่ L3.1, L3.2 และ L3.3 นอกจากนี้ยังแยกได้จากน้ำผักกาดดองตัวอย่างที่ 2 อีก 7 สายพันธุ์ ได้แก่ L4.1, L4.2, L4.3, L4.4, L4.5, L4.6 และ L4.7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การตรวจสอบผลของเมตาบอไลท์ต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

คุณสมบัติของเมตาบอไลท์ที่ได้ศึกษา ได้แก่ การยับยั้งการเจริญเติบโตโดยกรดแลคติค และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีต่อเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* *B. cereus* *E. coli* *S. lutea* และ *Stap. aureus* ซึ่งคุณสมบัติต่างๆ เหล่านี้จะช่วยส่งเสริมคุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติค และเป็นพื้นฐานในการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรีย-แลคติคต่อไป

ในการศึกษาความเข้มข้นของสารละลายกรดแลคติคที่มีความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 % (W/V) ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ แสดงดังตารางที่ 4.1

Lactic acid	pH	Inhibition Zone (mm.)				
(% W/V)		*B.subtilis*	*B. cereus*	*E. coli*	*S. lutea*	*S. aureus*
0.5	4.7					
1	4.03	7.85		8.17	8.8	
1.5	3.75	7.82		8.57	9.1	7.4
2	3.46	9.3	7.92	9.1	12.2	8.28
2.5	3.22	11.2	8.14	10.86	14.54	9.26

ตารางที่ 4.1 ผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ ด้วยกรดแลคติคที่ความเข้มข้นต่างๆ

นอกจากนี้ได้ศึกษาผลของการยับยั้งการเจริญด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.025, 0.050, 0.100, 0.300 และ 0.500 % (W/V) ได้ผลดังตารางที่ 4.2 และจากผลการทดลองสามารถนำไปเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารเมตาบอไลท์และบริเวณใสรอบกระดาษกรองของเชื้อทดสอบ (รูปที่ ง.1. และ ง.2.)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hydrogen peroxide	Inhibition Zone (mm.)				
(% W/V)	*B. subtilis*	*B. cereus*	*E. coli*	*S. lutea*	*S. aureus*
0.025	7.3	12.4	7.7		
0.05	8	17.54	9.94		9.84
0.1	8.76	20.76	11.12		11.05
0.3	11	25.94	12.92	10.35	17.85
0.5	13.6	30.74	14.86	13.78	20.14

ตารางที่ 4.2 ผลของการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากการศึกษาการใช้กรดแลคติคในการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* บนอาหารแข็ง Agar medium No.11 พบว่า ที่ความเข้มข้นของกรดแลคติค 0.5 % (W/V) ซึ่งพีเอชเท่ากับ 4.70 จะไม่เกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองชิ้น แต่ที่ความเข้มข้น 1.0 % หรือพีเอช 4.03 สามารถยับยั้งการเจริญได้ โดยจะเกิดบริเวณใสขึ้น ขนาด 7.85 มิลลิเมตร และเมื่อศึกษาผลของการยับยั้งการเจริญด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า จะเกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองขนาด 7.3 มิลลิเมตร เมื่อใช้ความเข้มข้น 0.025 % (W/V) ส่วนเชื้อ *B. cereus* ที่เจริญบนอาหารทดสอบ Phosphate peptone agar ที่ความเข้มข้นของกรดแลคติค 1.5 % (W/V) จะไม่พบการเกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรอง แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกรดแลคติคเท่ากับ 2.0 % (W/V) หรือพีเอช 3.46 จะเกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองขนาดเท่ากับ 7.92 มิลลิเมตร และจากการศึกษาผลการยับยั้งการเจริญด้วยไฮโดรเจน-เปอร์ออกไซด์ พบว่าเกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองที่ความเข้มข้น 0.025 % (W/V) ขนาด 12.4 มิลลิเมตร

สำหรับความเข้มข้นของกรดแลคติค 0.5 % (W/V) จะไม่พบการเกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองของ *E. coli* และ *S.lutea* บนอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar แต่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จะพบบริเวณใสรอบกระดาษกรองขึ้น ที่ความเข้มข้นของกรดแลคติคเท่ากับ 1.0 % (W/V) หรือพีเอช 4.03 โดยขนาดของบริเวณใสรอบกระดาษกรองของ *E. coli* และ *S. lutea* มีขนาดเป็น 8.17 และ 8.8 มิลลิเมตร ตามลำดับ และเมื่อศึกษาถึงผลของความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อการยับยั้งการเจริญ พบว่า *E. coli* เกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองที่มีขนาด 7.7 มิลลิเมตร เมื่อความเข้มข้นเท่ากับ 0.025 % (W/V) ขณะที่การเกิดบริเวณใสรอบการกระดาษกรองบนเชื้อ *S. lutea* จะพบที่ความเข้มข้น 0.300 % (W/V) มีขนาดเท่ากับ 10.35 มิลลิเมตร

ขณะที่การศึกษาผลของกรดแลคติคในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* บนอาหาร Mueller-Hinton agar พบว่าไม่เกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองที่ความเข้มข้น 1.0 % W/V อย่างไรก็ตามหากความเข้มข้นเป็น 1.5 % (W/V) หรือพีเอชเท่ากับ 3.75 จะเกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองขนาด 7.4 มิลลิเมตร นอกจากนั้นเมื่อศึกษาผลของการยับยั้งการเจริญด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะไม่เกิดการสร้างบริเวณใสรอบกระดาษกรองที่ความเข้มข้น 0.025 % (W/V) แต่จะเกิดขึ้นที่ความเข้มข้น 0.050 % (W/V) และมีขนาด 9.84 มิลลิเมตร

จากผลการทดลองการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยกรดแลคติค พบว่า *S. lutea* เป็นเชื้อทดสอบที่มีความไวต่อกรดแลคติคมากที่สุด เนื่องจากเมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดแลคติคที่ 1.0 % (W/V) จะพบการเกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองขนาดใหญ่ ส่วน *B. cereus* เป็นเชื้อทดสอบที่มีความต้านทานต่อกรดแลคติคสูงพบว่าที่ความเข้มข้น 2.0 % (W/V)ของกรดแลคติคจึงเกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรองขึ้น ดังนั้นในการเลือกใช้เชื้อทดสอบเพื่อตรวจสอบการสร้างกรดแลคติคที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบนั้น ควรเลือกใช้ *S. lutea* เป็นเชื้อทดสอบที่เหมาะสมที่สุด

ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตโดยใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าเชื้อทดสอบที่มีความไวต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากที่สุด คือ *B. cereus* ความเข้มข้นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.025 % (W/V) จะพบการเกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรอง ที่มีขนาดใหญ่กว่า *B. subtilis* และ *E. coli* ดังนั้นจึงเหมาะสมที่จะเลือกใช้เป็นเชื้อทดสอบในการตรวจการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ของแบคทีเรียแลคติค สำหรับ *S. lutea* สามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ต้านทานต่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.300 % (W/V) ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ค่อนข้างสูง จึงจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *S. lutea* ดังนั้นเชื้อชนิดนี้จึงไม่เหมาะต่อการทดสอบดังกล่าว

4.3 <u>การตรวจสอบการสร้างกรดแลคติคของแบคทีเรียแลคติค</u>

ได้ทำการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติคในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วเหวี่ยงเอาเซลล์ออก ต่อจากนั้นจึงทำการไตเตรทหาความเข้มข้นของกรดเป็นเปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากตารางที่ 4.3 พบว่าสามารถจัดกลุ่มของแบคทีเรียแลคติคตามเปอร์เซ็นต์กรดแลคติคที่สร้าง ได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้ คือ

กลุ่มที่ 1 : สามารถสร้างกรดแลคติคที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5 % มีพีเอชอยู่ในช่วง 4.61-4.82 ได้แก่ C1.4, C1.5, L2.5, A5 และ M7

กลุ่มที่ 2 : เป็นแบคทีเรียแลคติคที่สร้างกรดแลคติค ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 0.5 ถึง 1.0 % มีพีเอชอยู่ในช่วง 4.06-4.62 ได้แก่ C1.1, C1.2, C2.2, C2.3, L2.5, L4.2, L4.4, L4.5, A8, D1 และ T8

กลุ่มที่ 3 : ความเข้มข้นของกรดแลคติคที่สร้างอยู่ระหว่าง 1.0-1.5 % มีพีเอชอยู่ในช่วง 3.77-4.10 ได้แก่ L4.1, L4.3, L4.6, L4.7 และ M4

กลุ่มที่ 4 : กรดแลคติคที่สร้างได้มีความเข้มข้นสูงกว่า 1.5 % และพีเอชอยู่ในช่วง 3.58-3.74 ได้แก่ L1.3, L1.6, L2.1, L2.6, L3.1, L3.2, L3.3, A11, C2, K1 และ M2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างเปอร์เซ็นต์กรดแลคติคและพีเอชของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติค

Lactic acid bacteria	% acidity	pH		Lactic acid bacteria	% acidity	pH
C1.1	0.62	4.6		L4.2	0.88	4.15
C1.2	0.93	4.06		L4.3	1.29	3.92
L1.3	1.6	3.64		L4.4	0.58	4.46
C1.4	0.44	4.61		L4.5	0.93	4.14
C1.5	0.44	4.82		L4.6	1.2	3.94
L1.6	1.6	3.74		L4.7	1.15	3.92
L2.1	1.51	3.69		A5	0.49	4.5
C2.2	0.71	4.37		A8	0.75	4.43
C2.3	0.62	4.5		A11	1.6	3.64
L2.4	0.44	4.63		C2	1.6	3.73
L2.5	0.53	4.62		D1	0.53	4.56
C2.6	1.51	3.74		K1	1.55	3.58
L3.1	2.53	3.7		M2	1.51	3.73
L3.2	1.64	3.61		M4	1.42	3.77
L3.3	1.6	3.68		M7	0.4	4.63
L4.1	1.02	4.1		T8	0.67	4.52

จากผลการตรวจสอบการสร้างกรดแลคติคของแบคทีเรียแลคติคเปรียบเทียบกับตารางที่ 4.1 ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแลคติคกับบริเวณใสที่เกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าที่ความเข้มข้นของกรดแลคติคต่ำกว่า 1.0 % (W/V) หรือพีเอชเท่ากับ 4.03 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ จึงเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียแลคติคกลุ่มที่ 1 และ 2 สร้างกรดแลคติคที่มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 0.40-0.93 % มีพีเอชอยู่ในช่วง 4.06-4.82 น่าจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ ถ้าเป็นผลจากการสะสมเฉพาะกรดแลคติคเพียงอย่างเดียว ขณะที่กลุ่มแบคทีเรียกลุ่มที่ 3 มีการสะสมกรดแลคติค 1.0-1.5 % มีพีเอชอยู่ในช่วง 3.77-4.10 และในแบคทีเรียกลุ่มที่ 4 ซึ่งมีการสะสมกรดแลคติคตั้งแต่ 1.5 % ขึ้นไป มีพีเอชอยู่ในช่วง 3.58-3.74 ทั้งสองกลุ่มนี้มีแนวโน้มที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ 3 และ 4 สายพันธุ์ ตามลำดับ แต่ไม่พบแบคทีเรียแลคติคใดที่สามารถสะสมกรดแลคติคได้ในปริมาณที่จะยับยั้ง *B. cereus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

การตรวจสอบการสร้างสารแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติค โดยดัดแปลงจากวิธี Giraffa และคณะ (1990) นำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติคที่เหวี่ยงเอาเซลล์ออกแล้ว ปรับพีเอชให้เป็นกลาง ต่อจากนั้นจึงกรองด้วยแผ่นเมมเบรนที่มีขนาด 0.22 ไมครอน และแช่ในน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำไปทดสอบกับเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* *B. cereus* *E. coli* *S. lutea* และ *S. aureus* จากตารางที่ 4.3 พบว่าการยับยั้งเชื้อทดสอบส่วนใหญ่เป็นผลมาจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่กรองด้วยแผ่นเมมเบรน (crude)เพียงอย่างเดียว และผลการยับยั้งจากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปรับพีเอชให้เป็นกลางแล้วกรองด้วยแผ่นเมมเบรน (control) เพียงอย่างเดียว พบในสายพันธุ์ C1.4 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *B. subtilis* และ *B. cereus* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแลคติคบางสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้โดยผลของ crude และ control ได้แก่ สายพันธุ์ L2.4 และ L4.4 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *B. subtilis* ขณะที่สายพันธุ์ C2.6 สามารถยับยั้ง *s. aureus* และพบแบคทีเรียแลคติค 3 สายพันธุ์ที่ให้ผลการตรวจสอบแบคทีริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ ได้แก่ สายพันธุ์ C2.2 มีผลในการยับยั้ง *B. subtilis* และ *E. coli* ขณะที่สายพันธุ์ C2.3 และ L4.4 มีผลในการยับยั้งเฉพาะ *E. coli* แบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์เดียวกันจะให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบแต่ละชนิดแตกต่างกัน ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อทดสอบแต่ละชนิดมีความต้านทานต่อสารเมตาบอไลท์ต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติคแตกต่างกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 แสดงการตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบจากแบคทีเรียแลคติค

Lactic acid		*B. subtilis*			*B. cereus*			*E. coli*			*S. lutea*			*S. aureus*	
Bacteria	Crude	Control	Bacteriocin	Crude	Control	Bacteriocin	Crude	Control	Bacteriocin	Crude	Control	Bacteriocin	Crude	Control	Bacteriocin
C1.1															
C1.2	7.6						8.23								
L1.3	9.23			8.6			9.6			8.7					
C1.4		7.7			8.27										
C1.5															
L1.6	9.73			8.6			9.8			10.63			7.95		
L2.1	10.8			9.27			9.1			9.1			8.7		
C2.2	12.15	11.7	10.4	8.7			10.67	9.7	8.9						
C2.3	7.55						10.5	8.4	8.4						
L2.4	9.73	9.27		7.57			9.4								
L2.5	7.55														
C2.6	10.7			9			10.73						8.73	7.5	
L3.1	9.67			9.37			11.5			9.05			8.5		
L3.2	9.4			10.27			10.6						8.53		
L3.3	12.27			9.77			13.67						7.65		
L4.1	8.8			7.87			9.2								
L4.2	8.63			7.77			8.73								
L4.3	10.36			8.1			9.33			8.3					
L4.4	11.77	10.9		9.7			10.17	9.53	9.43						
L4.5	8.9						8.67								
L4.6	9.87			8.37			9.37								
L4.7	9.17			8.2			9.1								
A5	8.57														
A8	8.13														
A11	10.07			9.5			10.07			10.65			8.73		
C2	10.97			8.7			10.63			10.87			8.93		
D1															
K1	10.8			8.3			9.3			9.1			8.27		
M2	9.93			9.37			8.53			9.53			9.12		
M4	10.83			9			9.47								
M7	7.9														
T8															

จากผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียแลคติคจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ C1.1 C1.5 D1 และ T8 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ ในการตรวจสอบการยับยั้งการเจริญจากการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสรอบกระดาษกรอง ถ้าหากพบบริเวณใสที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางต่ำกว่า 7.0 มิลลิเมตร จะไม่ถือว่ามีผลในการยับยั้ง ขณะที่สายพันธุ์ L2.1 K1 M2 L1.6 A11 C2 และ L3.1 รวม 7 สายพันธุ์ มีผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ แบคทีเรียแลคติคจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ L1.3 C2.6 L3.2 L3.3 และ L4.3 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 4 สายพันธุ์ ส่วนแบคทีเรียแลคติคจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ C2.2 L2.4 L4.1 L4.2 L4.4 L4.6 L4.7 และ M4 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. subtilis* *B. cereus* และ *E.coli* แบคทีเรียแลคติคจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ C1.2 C1.4 C2.3 และ L3.5 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 2 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแลคติคอีก 4 สายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เพียงสายพันธุ์เดียว ได้แก่ *B. subtilis* แบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* รองลงมาได้แก่ *E. coli* และ *B. cereus* ขณะที่พบสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *S. lutea* ได้บางสายพันธุ์ โดยมีบริเวณใสอยู่ในช่วง 7.50-13.67 มิลลิลิเมตร

แบคทีเรียแลคติคที่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ เมื่อพิจารณาการสะสมกรดแลคติคพบว่าอยู่ในช่วง 0.44-0.68 % มีพีเอชในช่วง 4.50-4.82 แสดงว่าไม่เกิดผลการยับยั้งจากการสะสมกรดหรือการลดลงของพีเอช เนื่องจากผลต่างๆ เหล่านั้นมีปริมาณน้อยไปที่จะยับยั้งเชื้อทดสอบ ขณะที่แบคทีเรียแลคติคจำนวน 7 สายพันธุ์ ได้แก่ M7 A5 L2.5 A8 L4.2 C1.2 และ L4.5 พบการสะสมกรดแลคติคอยู่ในช่วง 0.40-0.93 % และมีพีเอชในช่วง 4.06-4.65 การสะสมของกรดแลคติคมีปริมาณน้อยและมีพีเอชสูง ซึ่งมีแนวโน้มที่จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ถ้าเป็นผลของการสะสมกรดและการลดลงของพีเอชจากผลการทดลองพบว่ามีการยับยั้งโดยผลของ crude ดังนั้นการยับยั้งน่าจะมีผลมาจากสารเมตาบอไลท์อื่นร่วมอยู่ด้วย เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซททิล สารปฏิชีวนะ ในลักษณะการเสริมฤทธิ์กัน (Synergistic effect) ในสภาพที่เหมาะสมสารเหล่านี้สามารถยับยั้งการเจริญเมื่อสภาวะเป็นกรด แต่ถูกยับยั้งเมื่อสภาวะเป็นกลาง และเมื่อปรับพีเอชให้เป็นกลางจะพบว่าไม่เกิดบริเวณใสรอบกระดาษกรอง จึงคาดว่าน่าจะเป็นผลร่วม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของกรดแลคติคและสารเมตาบอไลท์ เนื่องจากการปรับพีเอชเป็นการที่กรดและด่างทำปฏิกิริยาสะเทินกัน จึงไม่มีผลจากการยับยั้งโดยกรดอินทรีย์รวมอยู่ ดังนั้นในผลของ control จึงไม่พบการเกิดบริเวณใส ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jay (1982) ที่ได้ทำการศึกษาผลของไดอะเซททิลในการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ซึ่งจะเพิ่มขึ้น เมื่อพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ผลของ Synergistic effect ระหว่างพีเอชและไดอะเซททิล พบว่ายีสต์และแบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่แบคทีเรียแลคติคและ *Clostridium* sp. จะมีความต้านทานต่อผล Synergistic effect

แบคทีเรียแลคติคจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ L4.1 L4.7 L4.6 L4.3 และ M4 พบการสะสมกรดแลคติคอยู่ในช่วง 1.02-1.42 % และมีพีเอชอยู่ในช่วง 3.77-4.10 สามารถพบบริเวณใสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบได้แก่ *B. subtilis* *B. cereus* และ *E.coli* ขณะที่สายพันธุ์ L4.3 จะพบบริเวณใสบน *S. lutea* ด้วย โดยมีขนาดบริเวณใสอยู่ในช่วง 7.87-10.86 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบการสะสมกรดแลคติคกับการประเมินค่าจากกราฟมาตรฐานระหว่างบริเวณที่เกิดการยับยั้งของเชื้อทดสอบกับความเข้มข้นของกรดแลคติค พบว่ามีขนาดของบริเวณใสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *B. subtilis* และ *E. coli* ที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐาน มีขนาดเล็กกว่าที่เกิดจากการสร้างสารยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติคที่เป็นผลของ crude ยกเว้น *S. lutea* ที่มีบริเวณใสใหญ่กว่าและไม่น่าที่จะเกิดบริเวณใสกับ *B. cereus* แต่จากผลการทดลองดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า การยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ นอกจากเป็นผลของกรดแลคติคและพีเอชแล้ว น่าจะเป็นผลจากจากเมตาบอไลท์อื่นๆ ร่วมด้วย ขณะที่เชื้อทดสอบ *S. lutea* และ *S. aureus* จะไม่พบผลการยับยั้งหรือเกิดน้อย อาจเนื่องจากมีความต้านทานต่อสารเมตาบอไลท์ต่างๆ สูงกว่าเชื้อทดสอบอื่นๆ

แบคทีเรียแลคติคจำนวน 10 สายพันธุ์ ได้แก่สายพันธุ์ L2.1 M2 K1 L1.3 L1.6 L3.3 A11 C2 L3.2 และ L3.1 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ ยกเว้นสายพันธุ์ L1.3 ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และสายพันธุ์ L3.3 และ L3.2 และไม่สามารถยับยั้ง *S. lutea* โดยพบขนาดใสอยู่ในช่วง 7.65-13.76 มิลลิเมตร มีพีเอชของน้ำเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 3.58-3.74 การสะสมกรดแลคติคอยู่ในช่วง 1.51-1.73 % จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของเชื้อทดสอบสายพันธุ์ต่างๆ แล้ว พบว่าบริเวณใสที่เกิดจากสาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมตาบอไลท์ของแบคทีเรียแลคติคจะมีขนาดใหญ่กว่าบริเวณใสที่คาดคะเนจากกราฟมาตรฐานเป็นส่วนใหญ่ ยกเว้นเชื้อ L2.1 และ M2 ที่พบขนาดบริเวณใสบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ *E. coli* และ *S. lutea* ใกล้เคียงกับขนาดบริเวณใสที่คำนวณได้จากกราฟมาตรฐานของเชื้อนั้นๆ ขณะที่เชื้อ K1 และ L3.1 จะพบบริเวณใสกับ *S. lutea* มีขนาดใกล้เคียงกับค่าที่ประเมินได้จากกราฟมาตรฐาน และสายพันธุ์ L3.2 จะไม่เกิดบริเวณใสโดยผลของสารเมตาบอไลท์จากแบคทีเรียแลคติคกับ *S. lutea* ขณะที่สายพันธุ์ L1.3 พบขนาดบริเวณใสบน *S. lutea* ใกล้เคียงกับค่าที่ประเมินได้จากกราฟมาตรฐาน แต่บนเชื้อ *S. aureus* ไม่พบการยับยั้ง และสายพันธุ์ L1.6 ให้ขนาดบริเวณใสบน *S. aureus* ใกล้เคียงกับค่าที่ประเมินได้จากกราฟมาตรฐาน ขณะที่สายพันธุ์ L3.3 ไม่ให้บริเวณใสบน *S. lutea* แต่ให้บริเวณใสบน *S. aureus* ใกล้เคียงกับค่าที่ประเมินได้จากกราฟมาตรฐาน นอกจากนี้ยังพบบริเวณใสบน *B. cereus* ขณะที่ค่าประเมินได้จากกราฟมาตรฐาน ไม่มีผลการยับยั้ง ดังนั้นการยับยั้งน่าจะมีผลจากการสะสมของกรดและการลดลงของพีเอชร่วมกับสารเมตาบอไลท์อื่นๆ โดยที่ *E. coli* *S. lutea* และ *S. aureus* อาจมีความต้านทานต่อสารเมตาบอไลท์ของแบคทีเรียแลคติคบางสายพันธุ์มากกว่า *B. subtilis* และ *B. cereus* น่าจะเป็นผลจากสารเมตาบอไลท์อื่นร่วมกับกรด

ขณะที่แบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ L1.4 พบการยับยั้งโดยผลของ control เพียงอย่างเดียว เมื่อทดสอบกับ *B. subtilis* และ *B. cereus* ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจากสารเมตาบอไลท์ที่มีสภาวะเหมาะสม จะมีผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่พีเอชเท่ากับ 7 แต่ถูกยับยั้งกิจกรรมเมื่อเป็นกรดซึ่งการทดลองนี้คล้ายคลึงกับผลการทดลองกับไนซิน ซึ่งพบว่าเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์อื่นมากที่สุด ที่พีเอชของสารละลาย 6.5-6.8 โดยจะมีผลต่อการงอกของสปอร์แบคทีเรียมากกว่าเซลล์แบคทีเรีย ช่วงในการยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียจะอยู่ในช่วงแคบ ซึ่งพบว่ามีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Streptococcus* sp. *Staphylococcus* sp. *Bacillus* sp. และ *Lactobacillus* sp. (Lueck, 1980)

แบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ L2.4 มีผลการยับยั้งทั้งโดย crude และ control บนเชื้อทดสอบ *B. subtilis* ส่วนการยับยั้งเชื้อทดสอบอื่นได้แก่ *B. cereus* และ *E. coli* มีผลจาก crude อาจเนื่องจาก L2.4 สร้างสารเมตาบอไลท์ที่มีสภาวะที่เหมาะสมต่อกิจกรรมการยับยั้งทั้งในสภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลาง จึงเกิดผลการยับยั้งทั้ง crude และ control

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขณะที่ *B. cereus* และ *E. coli* ที่ไม่ถูกยับยั้งโดยผลของ control อาจเนื่องจากในสภาพพีเอชที่เป็นกลางผลของกรดจะถูกทำลายเนื่องจากปฏิกิริยาสะเทิน ขณะที่ผลของเมตาบอไลท์ยังคงมีกิจกรรมอยู่ และพบในปริมาณที่น้อยจนไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบดังกล่าวได้ ขณะที่ *B. subtilis* มีความไวต่อสารเมตาบอไลท์นั้นๆ มากกว่า ส่วน L2.6 มีผลการยับยั้งทั้ง crude และ control ต่อ *S. aureus* และมีผลการยับยั้งโดย crude ต่อ *B. subtilis* *B. cereus* และ *E. coli* ผลการทดลองนี้สามารถอธิบายได้คล้ายคลึงกับผลการทดลองที่พบในสายพันธุ์ L2.4 ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลอง ของ Daeshel และคณะ (1990) ที่พบว่าแบคทีริโอซิน plantacin A ที่สร้างจาก *Lb. plantarum* สายพันธุ์ C-11 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์อื่นได้ดีที่พีเอช 4.6-6.5

การตรวจสอบการสร้างแบคทีริโอซินของแบคทีเรียแลคติค พบเพียง 3 สายพันธุ์ได้แก่ สายพันธุ์ C2.2 C2.3 และ L4.4 ที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินที่ทนความร้อน จากผลการทดลองเมื่อเปรียบเทียบการสะสมกรดของสายพันธุ์ C2.2 กับค่าที่ประเมินได้จากกราฟมาตรฐานของ *B. subtilis* *E. coli* และ *B. subtilis* พบว่าการยับยั้งน่าจะเป็นผลมาจากสารเมตาบอไลท์อื่นร่วมกับกรดแลคติค และมีสภาวะที่เหมาะสมในการยับยั้งทั้งสภาวะที่เป็นกรดและเป็นกลาง ยกเว้น *B. subtilis* สามารถต้านทานต่อสารเมตาบอไลท์ในสภาวะที่เป็นกลาง ดังนั้นสารเมตาบอไลท์ที่ไม่ทนความร้อนน่าจะเป็นสารที่มีสภาวะที่เหมาะสมเมื่อเป็นกลาง และแบคทีริโอซินที่ทนความร้อนสามารถมีกิจกรรมได้ในสภาวะที่เป็นกลาง เช่นเดียวกับในสายพันธุ์ C2.3 และ L4.4 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *E. coli* ได้ โดยผลของแบคทีริโอซินซึ่งเชื้อทดสอบดังกล่าว น่าจะมีความไวต่อแบคทีริโอซินที่แบคทีเรียแลคติคทั้ง 2 สายพันธุ์สร้างขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

5.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

จากการแยกเชื้อทดสอบแบคทีเรียแลคติคจากผลิตภัณฑ์แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว และผักกาดดองสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคได้จำนวน 32 สายพันธุ์ เมื่อนำมาตรวจทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีรูปร่างกลม (cooci) หรือรูปร่างไข่ (ovoid) และกลุ่มที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (rod)

5.2 การตรวจสอบผลของเมตาบอไลท์ต่างๆ ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

เชื้อทดสอบที่มีความไวต่อกรดแลคติคมากที่สุด คือ *Sarcina lutea* เมื่อใช้ความเข้มข้นของกรดแลคติคที่ 0.5 % (W/V) ส่วนการตรวจสอบความไวของเชื้อทกสอบต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า *B. cereus* เป็นเชื้อทดสอบที่มีความไวต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากที่สุด ที่ความเข้มข้น 0.025 % (W/V)

5.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติคของแบคทีเรียแลคติค

เมื่อทำการทดสอบปริมาณการสร้างกรด พบว่าแบคทีเรียแลคติคจำนวน 16 สายพันธุ์ จะสร้างกรดในปริมาณที่ต่ำกว่า 1 % ที่มีพีเอชอยู่ระหว่าง 4.10-4.63 และสายพันธุ์ที่เหลือจะสร้างกรดในปริมาณที่มากกว่า 1 % สำหรับสายพันธุ์ที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5 % น่าจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.4 การตรวจสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น

เมื่อทำการทดสอบปริมาณการสร้างกรดแลคติคพบว่าแบคทีเรียแลคติคจำนวน 16 สายพันธุ์ สามารถสะสมกรดในปริมาณที่ต่ำกว่า 1.0 % มีพีเอชในช่วง 4.06-4.82 เป็นช่วงที่มีแนวโน้มที่จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบโดยผลของการสะสมกรดแลคติคและการลดลงของพีเอช ส่วนอีก 16 สายพันธุ์ มีการสะสมกรดแลคติคในปริมาณที่สูงกว่า 1.0 % และมีพีเอชอยู่ในช่วง 3.58-4.10 ซึ่งเป็นช่วงที่มีแนวโน้มที่จะสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เกือบทุกสายพันธุ์ การศึกษาการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจากแบคทีเรียแลคติค จะพบบริเวณใสรอบกระดาษกรองอยู่ในช่วง 7.50-13.67 มิลลิเมตร จากผลการทดลองพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยสามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้มากที่สุด รองลงมาได้แก่ *E. coli* และ *B. cereus* และพบแบคทีเรียแลคติคบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *S. lutea* และ *S. aureus* ซึ่งการยับยั้งส่วนใหญ่มีผลจากกรดแลคติคร่วมกับสารเมตาบอไลท์อื่นๆ ขณะที่การตรวจสอบการยับยั้งโดยแบคทีริโอซินที่ทนต่อความร้อน พบเพียง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ C2.2 C2.3 และ L4.4 โดยที่ C2.2 สามารถยับยั้ง *B. subtilis* และ *E. coli* ขณะที่สายพันธุ์ C2.3 และ L4.4 มีผลในการยับยั้งเฉพาะ *E. coli* นอกจากนี้ยังพบสารเมตาบอไลท์บางชนิดให้ผลการยับยั้งที่พีเอช 7 แต่ถูกยับยั้งกิจกรรมที่พีเอชเป็นกรด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

Barefoot, S.F., and Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidiophilus*. Appl. Env. Microbiol. 45 : 1808-1815.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. 1987. Direct detection of an antimicrobial peptide of *Pediococcus acidilactici* in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. J. Ind. Microbiol. 2 : 319.

_____. 1988. Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 65 : 261-268.

Campbell, L.L., Sniff, E.E., and O'Brien, R.T. 1959. Subtilin and nisin as additives that lower the heat process requirements of canned foods. Food Technol. 13 : 462.

Caserio, G., Ciampella, A., Gennari, M., and Barluzzi, A.M. 1979. Utilization of nisin in cooked sausages and other cured meat products. Industrie Aliment. 18 : 1.

Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food proservatives. Food Technol. 43 : 164.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Daeschel, M.A., and Klaenhammer, T.R. 1985. Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Env.Microbiol. 50 : 1538-1541.

Daeschel, M.A., Mckenney, M.C., and McDonald, L.C. 1990. Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C-11. Food Microbiol. 7 : 91.

Dahiya, R.S., and Speck, M.L. 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 51 : 1568.

Davey, G.P., and Pearce, L.E. 1982. Production of diplococcin by *Streptococcus cremoris* and its transfer to nonproducing group N streptococci. In D. Schlessinger (ed.), Microbiology -1982, pp. 221.Washington, DC. : American Society for Microbiology.

Davey, G.P., and Richardson, B.C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. Appl. Env. Microbiol. 41 : 84.

De Klerk, H.C., and Smit, J.A. 1967. Properties of a *Lactobacillus fermenti*bacteriocin. J. Gen. Microbiol. 48 : 309.

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its use as a food preservative. Food Technol. 44(11) : 100-117.

Denny, C.B., Sharpe, L.E., and Bohrer, C.W. 1961. Effects of tylosin and nisin on canned food spoilage bacteria. Appl. Microbiol. 9 : 108.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

De Vuyst, L., and Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. In L. De Vuyst and E.J. Vandamme (eds.), Bacteriocins, pp.117-129. Great Britain : Blackie Acadamic and Professional.

Gililand, S.E. 1985. Role of starter culture bacteria in food preservation. In S.E. Gilliand (ed.), Bacterial Starter Cultures for Food. pp. 175. Boca Raton, FL : CRC Press.

Gilliland, S.E. 1990. Health and Nutrutuonal Benefits from Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 87 : 175-188.

Gilliland, S.E., and Speck, M.L. 1972. Interactions of food starter cultures and food-borne pathogens: lactic streptococci versus staphylococci and salmonellae. J. Milk Food Technol. 35 : 307-309.

Giraffa, G., Neviani, E. and Veneroni, A. 1990. Use of Conductance to Detect Bacteriocin Activity. J. Food Protect. 53 : 772-776.

Goepfert, J.M. and Chung, K.C. 1970. Behavior of *Salmonella* during the Manufactur and Storage of a Fermented Sausage Product. J. Milk Food Technol. 33 : 185-191.

Gonzales, C.F., and Kunka, B.S. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. Appl.Env. Microbiol. 53 : 2534-2538.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Gross, E., and Morell, J.L. 1970. Nisin. The Assignment of sulfide bridges of ß-methyllanthionine to a novel by bicyclic structure of identical ring size. J. Am. Chem. Soc. 92 : 2919.

Heinemann, B., Voris, L., and Stumbo, C.R. 1965. Use of nisin in processing food products. Food Technol. 19 : 592.

Henning, S., Metz, R., and Hammers, W.P. 1986b. New aspects for the application of nisin to foods based on its mode of action. Int. J. Food Microbiol. 5 : 208-221.

Hirsch, A., Grinsted, E., Chapman, H.R., and Ma ttick, A.T.R. 1951. A note on the inhibition of an anaerobic sporeformer in swiss-type cheese by anisin producing *Streptococcus*. J. Dairy Res. 18:205-206.

Holley, R.A, 1981. Review of the potentail hazard from botulism in cured meats. Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 14 : 183.

Hurst, A. 1981. Nisin. Adv. Appl. Microbiol. 27 : 85-103.

Hurst, A. 1983. Nisin and other inhibitory substances from lactic acid bacteria. In (A.L. Branen and P.M. Davidson (eds.), Antimicrobials in Foods, pp.327. New York : Marcel Dekker.

Hutton, M.T., Chehak, P.A., and Hanlin, J.H. 1991. Inhibition of botulinum toxin production by *Pediococcus acidilactici* in temperature abused refrigerated foods. J. Food Safty. 11 : 255-267.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jarvis, B., and Burke, C.S. 1976. Practical and legislative aspects of the chemical preservation of food. In F.A. Skinner and W.B. Hugo (eds.), Inhibition and Inactivation of Vegetative Microbes, pp. 345. New York : Academic Press.

Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Env. Microbiol. 44 : 525-532.

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

Juffs, H.S., and Babel. F.J. 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactic cultures in milk stored at low temperature. J. Dairy Sci. 58 : 1612-1619.

Kodama, R. 1952. Studied on lactic acid bacteria. II: Lactocin, a new antibiotic substance produced by lactic acid bacteria. J. Antibiot. 5 : 72.

Kozak, W., Bardowski, J., and Dobrzanski, W.T. 1978. Lactostrepsins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. J. Dairy Res. 45:247.

Lawrence, R.C. and Terence, T.D. 1979. The Fermentation of Milk by Lactic Acid Bacteria. In A.T. Bull (ed.), Microbial Technology : Current State Future Prospects, pp. 187-219. Cambridge : Cambridge University Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lindgren, S.E., Axellsson, L.T. and McFeeters, R.F. 1990. Anaerobic L-lactate Degradation by *Lactobacillus plantarum*. FEMS Microbial. Lett. 66: 209-214.

Linnett, P.E., and Strominger, J.L. 1973. Additional antibiotic inhibitors of peptidoglycan synthesis. Antimicrob. Agents Chemother. 4 : 231.

Lueck, E. 1980. Antimicrobial Food Additives. Berlin : inger-Verlag.

Mather, D.W., and Babel, F.J. 1959. Inhibition of certain types of bacterial spoilage in creamed cootage cheese by the use of a creaming mixture prepared with *Streptococcus citrovorus*, J. Dairy Sci. 42:1917.

Mattick, A.T.R., and Hirsch, A. 1994. A powerful inhibitory substance produced by group N streptococci. Nature. 154 : 551.

Mattick, A.T.R., and Hirsch, A. 1947. Further observation on an inhibitor (nisin) from lactic streptococci. Lancet. 2 : 5.

McClintock, M., Serres, L., Marzolf, J.J., Hirsch, A., and Mocquot, G. 1952. Action inhibitrice des sterptocoques producteurs de nisine sur le developpement des sporules anaerobies dans le fromage de Gruyere fondu. J. Dairy Res. 19 : 187.

Mortvedt, C.I., and Nes, I.F. 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. J.Gen.Microbiol. 136:1601.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Motlagh, A.M., Johnson, M.C., and Ray, B. 1991. Viability loss of foodborne pathogens by starter culture metabolites. J. Food Prot. 54 : 873-878.

Muriana, P.M., and Klaenhammer, T.R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. Appl. Env. Microbiol. 57:114-121.

Ogden, K.M., Waites, J., and Hammond, J.R.M. 1988. Nisin and brewing. J. Inst. Brewing. 91 : 390.

Orberg, P.K., and Sandine, W.E. 1984. Common ocurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp. Appl. Env. Microbiol. 48 : 1129.

Oxford, A.E. 1994. Diplococcin, an antibacterial protein elaborated by certain milk streptococci. Biochem. J. 38 : 178.

Price, R.J., and Lee, J.S. 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli, J. Milk Food Technol. 33 : 13.

Ramseier, H.R. 1960. The action of nisin on *Clostridium butyricum*. Arch. Mikrobiol. 37 : 57-94.

Rayman, M.K., Aris, B., and Hurst, A. 1981. Nisin: A possible alternative or adjunct to nitrite in the preservation of meats. Appl. Env. Microbiol. 41 : 375.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Reddy, M.S., Vedanuthu, E.R., Washam, C.J. and Reinbold, G.W. 1969. Differential Agar Medium for Separation *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*. J. Appl. Microbial. 18: 755-759.

Sandine, W.E. 1987. Lookinnng Backward and Forward at the Practicial Applications of Genetic Reserches on Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbial Rev. 46 : 205-220.

Sandine, W.E. 1988. New Nomenclature of the Non-Rod-Shaped Lactic Acid Bacteria. Biochemie. 70 : 516-522.

Sandine, W.E., Muralidhara, K.S., Elliker, P.R. and England,D.C. 1972. Lactic Acid Bacteria in Food and Health : A Review with Sppecial Reference to Enteropathogenic *Escherichia coli* as well as Certain Enteric Diseases and Their Treatment with Antibiotics and Lactobacilli. J. Milk Food Technol. 35 : 691-702.

Schillinger, U., and Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Env. Microbiol. 55 : 1901-1906.

Shehata, A.E., Khalafalla, S.M., Magdoub, M.N.I., and Hofi, A.A. 1976. The use of nisin in the production of sterilized milk drinks. Egypt. J. Dairy Sci. 4 : 37.

Somers, E.B., and Taylor, S.L. 1987. Antibotulinal effectiveness of nisin in pasturized process cheese spreads. J. Food Prot. 50:842.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tanaka, N., Traisman, E., Lee, M.H., Cassens, R.G., and Foster, E.M. 1980. Inhibition of botulinum toxin formation in bacon by acid development. J. Food Prot. 43 : 450-457.

Tanaka, N., Traisman, E., Plantingua, P., Finn, L. Flom, W., Meske, L. and Guggisberg, J. 1986. Evaluation of factors involved in antibotulinal properties of psrteurized process cheese spreads. J. Food Prot. 49 : 526.

Upreti, G.C., Hinsdill, R.D. 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrob. Agents Chemother. 4 : 487.

Upreti, G.C., Hinsdill, R.D. 1975. Production and Mode of action of lactocin 27 : Bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. Antimicrob. Agents Chemother. 7 : 139.

Whitehead, H.R. 1933. A substance inhibitihg bacterial growth produces by certain strains of lactic streptococci. Biochem. J. 27 : 1793.

Zajdel, J.K., and Dobrzanski, W.T. 1983. Isolation and preliminary characterization of *Streptococcus cremoris* strain 202 bacteriocin. Acta Microbiol. Pol. 32 : 119.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและน้ำยาเคมี

1. <u>สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง</u>

1.1 MRS medium

Peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม
$MgSO_4$	0.4	กรัม
$MnSO_4$	0.05	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 Agar medium No.11

Peptone	6.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
Beef extract	1.5	กรัม
Tryptone	4.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	12.0-18.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 7.9 $\pm$ 0.1 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 Mueller-Hinton agar

Bacto-casamino acid	17.5	กรัม
Bacto-Beef infusion	30.0	กรัม
Starch	1.5	กรัม
Bacto-agar	17.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 7.4 $\pm$ 0.1 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 Phosphate peptone agar

Peptone	6.25	กรัม
Yeast extract	2.25	กรัม
Glucose	0.75	กรัม
Agar	20.0	กรัม
Phosphate buffer pH 6.5	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 Skimmilk

Skimmilk	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. น้ำยาสำหรับเจือจาง

2.1 Tryptone-salt solution

Tryptone	1.0	กรัม
NaCl	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอช 7.0 $\pm$ 0.1 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 Phosphate buffer pH 6.5

วิธีที่ 1	สารละลาย A :	KH_2PO_4	13.5	กรัม
		น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร
	สารละลาย B :	NaOH	4.0	กรัม
		น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

ผสม สารละลาย A 740 มิลลิลิตร และ สารละลาย B 280 มิลลิลิตร แล้วปรับพีเอชให้ได้ 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

วิธีที่ 2	Calcium diphosphate	9.99	กรัม
	NaOH	1.12	กรัม
	น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

2.3 Phosphate peptone water

Peptone	6.25	กรัม
Yeast extract	2.25	กรัม
Glucose	0.75	กรัม
Phosphate buffer pH 6.5	1,000.0	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 องศาเซลเซียส 30 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 Saline Solution

Nacl	8.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สารเคมีที่ใช้

3.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

1.0 N และ 5.0 N NaOH

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

3.2 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก

1.0 N HCl

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การย้อมสีแบบแกรม

1. <u>การเตรียมสีย้อมแกรม</u>

1.1 Crystal violet

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95 %	20.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันดี เติม 1 % ammonium oxalate in water 80 มิลลิลิตร

1.2 Iodine Solution

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 Decolorizing agent

Alcohol 95 %	1	ส่วน
Acetone	1	ส่วน

1.4 Counterstain : safranin O

Safranin O 25 % ใน Ethyl alcohol 95 %	25	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	75	มิลลิลิตร

2. การย้อมสีแกรม

เชื่อเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เอียงสไลด์ เทสีทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง พร้อมทั้งหยดสารละลาย Decolorizing agent เพื่อล้างสีออก นาน 10-20 วินาที ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น แล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะเซลล์ การจัดเรียงตัว โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกที่ ค

การเตรียมเชื้อทดสอบ

1. <u>อาหารเลี้ยงเชื้อทดสอบที่ใช้ในการตรวจสอบการยับยั้ง</u>

Bacillus subtilis ใช้อาหารทดสอบ Agar medium No.11 สำหรับ *Bacillus cereus* ใช้อาหารทดสอบ Phosphate peptone agar ส่วน *E. coli* *Sarcina lutea* และ *Staphylococcus aureus* ใช้อาหารทดสอบ Mueller-Hinton agar

2. <u>อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อทดสอบ</u>

2.1 การตรวจนับจำนวนโคโลนี

B. subtilis *B. cereus* *E.coli* และ *S. aureus* ใช้การบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วน *S. lutea* ใช้การบ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 การตรวจสอบผลการยับยั้ง

ในการตรวจสอบผลการยับยั้งของ *B. subtilis* และ *B. cereus* ใช้การบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วน *E. coli* และ *S. aureus* จะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ *S. lutea* บ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส

3. สารละลายที่ใช้ในการเตรียมสารละลายเชื้อทดสอบ

สารละลายที่ใช้ในการเตรียมเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์จะแตกต่างกัน ดังนี้คือ *B. subtilis* ใช้สารละลาย Tryptone-salt solution ขณะที่ *B.cereus* ใช้สารละลาย Saline solution และ Phosphate peptone water ส่วน *E. coli* *S. lutea* และ *S. aureus* ใช้สารละลาย Saline solution

4. การเตรียมสารละลายเชื้อทดสอบ

4.1 การเตรียมสารละลายเชื้อ *B. subtilis*

ล้างโคโลนีเชื้อทดสอบจากหลอดอาหารแข็ง ด้วยสารละลาย Tryptone-salt solution ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1-2 มิลลิลิตร ถ่ายใส่บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Agar medium No.11 ในขวดที่เอียงและทิ้งให้แข็ง (slant) เทสารละลายเชื้อทดสอบให้ทั่วผิวหน้าโดยใช้ลูกแก้ว (glass bead) ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ล้างโคโลนีเชื้อทดสอบด้วยสารละลาย Tryptone-salt solution ปริมาณ 50 มิลลิลิตร นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 3,000-5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เทสารละลายใสทิ้ง แล้วเติมสารละลาย Tryptone-salt solution ปริมาตร 50 มิลลิลิตรอีกครั้ง ทำเช่นเดิม จากนั้นเติมสารละลาย Tryptone-salt solution แล้วนำสารละลายเชื้อทดสอบที่ได้ไปกระตุ้นการงอกของสปอร์ โดยแช่ในน้ำร้อนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ทำให้เย็นทันที เก็บสารละลายเชื้อทดสอบ *B. subtilis* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้นานประมาณ 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2 การเตรียมสารละลายเชื้อ *B. cereus*

นำเชื้อทดสอบนี้มา 1 ลูป เพาะเลี้ยงใน Phosphate peptone water 3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติม saline solution 50 มิลลิลิตร เก็บสารละลายเชื้อทดสอบ *B.cereus* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.3 การเตรียมสารละลายเชื้อ *E. coli*

ล้างโคโลนีเชื้อทดสอบจากหลอดอาหารแข็งด้วย saline solution ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว 1-2 มิลลิลิตร ถ่ายใส่บนผิวหน้าอาหารแข็ง Meuller-Hinton agar ที่เอียงและทิ้งให้แข็งในขวดแบน ถ่ายสารละลายเชื้อให้ทั่วผิวหน้าด้วยลูกแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ล้างโคโลนีเชื้อทดสอบด้วย saline solution แล้วทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเชื้อ *B. subtilis* แต่ไม่ต้องแช่ในน้ำร้อน แล้วจึงเก็บสารละลายเชื้อทดสอบ *E. coli* ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.4 การเตรียมสารละลายเชื้อ *S. lutea*

ทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเชื้อทดสอบ *E. coli* แต่บ่มที่อุณหภูมิ 32-35 องศาเซลเซียส เก็บสารละลายเชื้อทดสอบนี้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.5 การเตรียมสารละลายเชื้อ *S. aureus*

ทำเช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายเชื้อทดสอบ *E. coli* เก็บสารละลายเชื้อทดสอบนี้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การตรวจนับจำนวนโคโลนี

นำสารละลายเชื้อทดสอบมาเจือจางให้ได้ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมกับปริมาณเชื้อเริ่มต้น ทำการ pour plate ด้วยอาหารแข็งที่ใช้เลี้ยงเชื้อทดสอบแต่ละสายพันธุ์ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสำหรับแต่ละเชื้อ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนี และคำนวณหาความเข้มข้นของสารละลายเชื้อทดสอบเป็น โคโลนีต่อมิลลิลิตร

6. ความเข้มข้นของเชื้อทดสอบที่ใช้ในการตรวจสอบผลการยับยั้ง

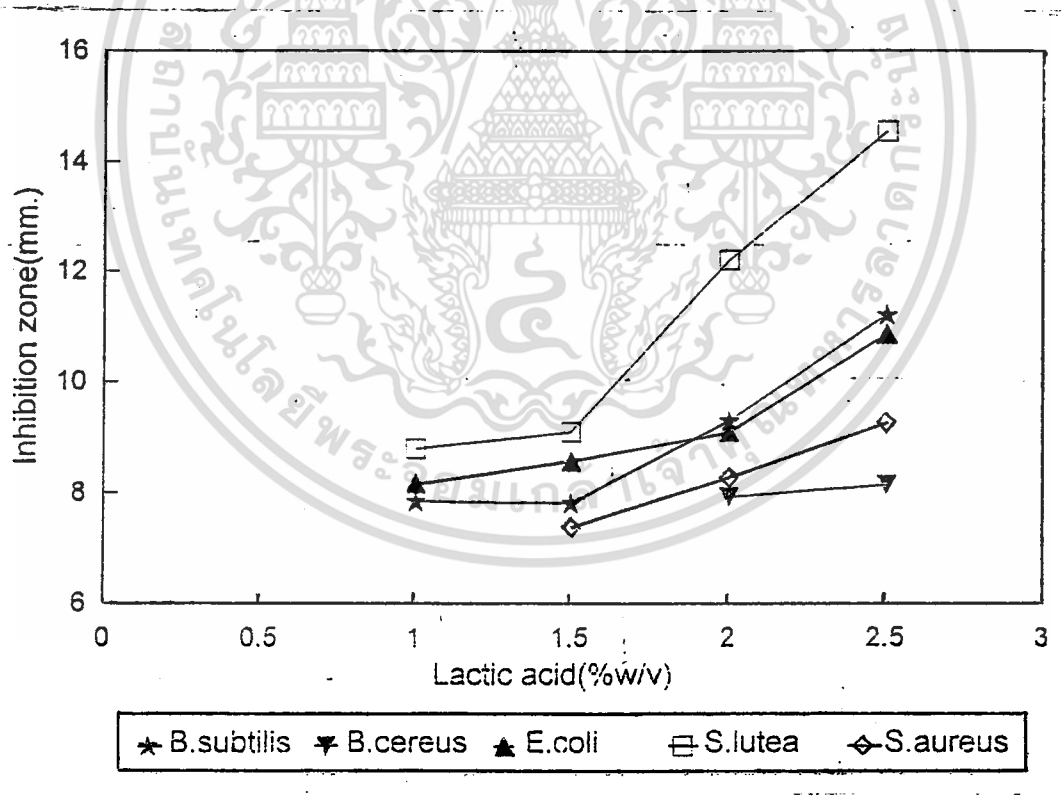
B. cereus เจือจางในอาหารแข็งให้มีความเข้มข้น 10^5 โคโลนีต่อมิลลิลิตร สำหรับ *B. subtilis* *E. coli* *S. letea* และ *S. aureus* เจือจางให้มีความเข้มข้น 10^6 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ง

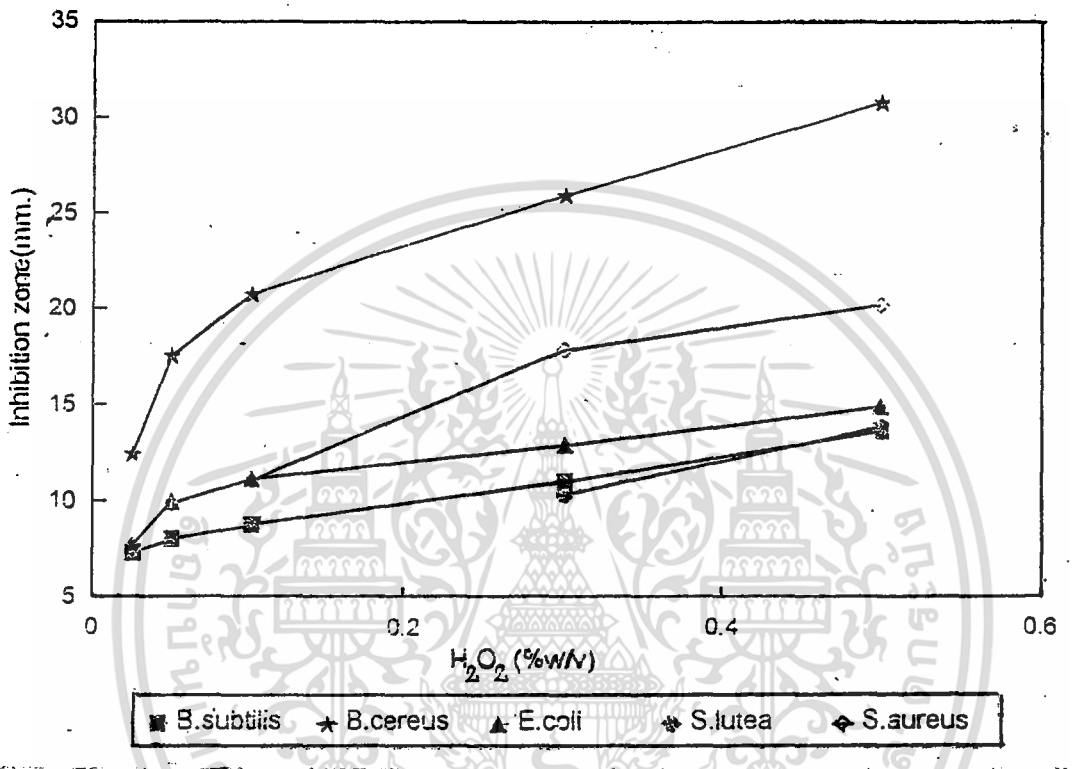
กราฟมาตรฐาน

รูปที่ ง.1. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของกรดแลคติค(% W/V) กับบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง.2. กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮโรเจนเปอร์ออกไซด์ (% W/V) กับบริเวณที่เกิดการยับยั้ง (มิลลิเมตร) ของเชื้อทดสอบทั้ง 5 สายพันธุ์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจิรัชญา สุดดี เกิดวันที่ 22 พฤศจิกายน 2516 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) ในปี พ.ศ.2538 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนสตรีวิทยา กรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ.2534

นางสาวอาริสา พนมเริงศักดิ์ เกิดวันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2516 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) ในปี พ.ศ.2538 คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนสตรีวิทยา กรุงเทพมหานคร ในปี พ.ศ.2534

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้