สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย *Pediococcus pentosacaceus* TISTR 536

Optimization for bacteriocin production by *Pediococcus pentosacaceus* TISTR 536

กรกนก เอี่ยมสำอาง
สุพิชญา รักบัว
อรพรรณ ทองพิระ

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม
คณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2559

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย *Pediococcus pentosacaceus* TISTR 536

Optimization for bacteriocin production by *Pediococcus pentosacaceus* TISTR 536

กรกนก เอี่ยมสำอาง

สุพิชญา รักบัว

อรพรรณ ทองพิระ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
เลขทะเบียน 148859
วัน.เดือน.ปี 30 พ.ย. 2560

b.12871495
.1.....

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

Optimization for production bacteriocin by *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

จัดทำโดย

กรกนก เอี่ยมสำอางค์ รหัสนักศึกษา 55080072

สุพิชญา รักบัว รหัสนักศึกษา 55080136

อรพรรณ ทองพิระ รหัสนักศึกษา 55080138

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

....

(รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อปัญหาพิเศษ สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินโดย *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

ชื่อนักศึกษา กรกนก เอี่ยมสำอางค์ รหัสนักศึกษา 55080072

สุพิชญา รักบัว รหัสนักศึกษา 55080136

อรพรรณ ทองพิระ รหัสนักศึกษา 55080138

หลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม

พ.ศ. 2559

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

สภาวะที่เหมาะสมของการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลกติคสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 โดยเปรียบเทียบระหว่างอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างกัน (0, 0.1 และ 0.5%) และในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth โดยบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งชนิดอาหารมีผลต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซิน พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 มีในอาหาร GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างๆ (0, 0.1 และ 0.5%) ให้ผลได้ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่พบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS หลังบ่มคือ 8.82 CFU/ml และในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP มีความเข้มข้นของ Tween 80 0% พบปริมาณเชื้อ 8.97 CFU/ml ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 0.1 และ 0.5% พบปริมาณเชื้อ 8.92 CFU/ml ส่วนความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 เชื้อสามารถผลิต แบคเทอริโอซิน โดยมีค่า bacteriocin activity ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% เท่ากับ 12800 และ 3200 AU/ml ตามลำดับ ในเรื่องความสามารถในการทนร้อนของแบคเอทริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 นั้น จากการศึกษาพบว่า pediocin PA-1 สามารถทนความร้อนได้ถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

คำสำคัญ : แบคเทอริโอซิน แบคทีเรียกรดแลคติกแลคติก *Pediococcus sup.*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special problem title	Optimization for production bacteriocin by *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536
Student name	Kornkanok Iamsamang Student ID 55080072
	Supichaya Rukbua ID 55080136
	Orapun Tongpira ID 55081038
Program	Bachelor of Science in Industrial Fermentation Technology
Year	2016
Advisor	Assoc.Prof.Dr. Adisorn Swetwiwathana

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีด้วยความช่วยเหลือของ รองศาสตราจารย์ ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ อันเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการทำวิจัย อีกทั้งยังช่วยแก้ปัญหาต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นระหว่างการดำเนินงานวิจัยอีกด้วย ขอขอบคุณ คุณอัสนีย์ วิจิตระกะ นักวิทยาศาสตร์ และคุณณัฐฐินี จรกา สำหรับข้อแนะนำและความช่วยเหลือในทุก ๆ ด้านในการทำวิจัย นอกจากนี้ขอขอบคุณเพื่อน ๆ ในห้องปฏิบัติการทุกคนที่เป็นกำลังใจ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์เรื่องนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบิดามารดา และครอบครัว ซึ่งเปิดโอกาสให้ได้รับการศึกษาเล่าเรียนตลอดจนคอยช่วยเหลือและให้กำลังใจผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

กรกนก เอี่ยมสำอาง
สุพิชญา รักบัว
อรพรรณ ทองพิระ
6 พฤษภาคม 2559

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
กิตติกรรมประกาศ	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	VI
สารบัญภาพ	VII
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา	1
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)	3
2.2 สกุลต่างๆของแบคทีเรียกรดแลคติก	4
2.3 ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียกรดแลคติก	6
2.4 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)	7
2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง	12
2.6 Tween 80	12
2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	15
3.1 วัตถุดิบและสารเคมี	15
3.2 อุปกรณ์	15
3.3 เครื่องมือ	16
3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	16
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์	19
4.1ศึกษาผลการเจริญ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (pediocin PA-1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ	19
4.2 ศึกษาการผลิตกรด และค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 (0, 0.1, 0.5%) เปรียบเทียบกับอาหาร MRS broth	20
4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

4.4 ศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (pediocin PA-1) 24

บทที่ 5 สรุปผลและข้อเสนอแนะ 26

บรรณานุกรม 28

ภาคผนวก 30

ภาคผนวก ก 30

ภาคผนวก ข 34

ภาคผนวก ค 38

ภาคผนวก ง 39

ประวัติผู้เขียน 57

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ.....	9
2	แบคเทอริโอซินที่สำคัญที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก.....	11
3	ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ.....	21

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมทั้งแบคเทอริโอซินซึ่งจะให้ผลยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง เชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (รูปบน) จะทำให้เกิด บริเวณยับยั้งกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (รูปล่าง).....	8
2	ภาพแสดงกลไกการยับยั้งเซลล์แบคทีเรียของแบคเทอริโอซินต่างๆ.....	12
3	การเจริญเติบโตของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth, GYP broth, GYP broth + Twee80 0.1% และ GYP broth + Twee80 0.5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	20
4	การผลิตกรด และค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536.....	22
5	ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/ml) ของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP และ MRS.....	24
6	ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/ml) ของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP ที่มีความเข้มข้น Tween80 ต่างๆ (0,0.1 และ 0.5%) และ MRS ที่อุณหภูมิ 100 °C นาน 10 นาที 20 นาที และ 121 °C นาน 15 นาที.....	25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แบคเทอริซิน คือ สารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีนที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้าง การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อนทำให้อาหารยังคงอุดมไปด้วยคุณค่าของสารอาหาร (อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550) จากข้างต้นจึงเป็นอีกทางเลือกของผู้ประกอบการต่างๆในการเลือกใช้สารกันเสียที่ผลิตจากจุลินทรีย์แทนสารกันเสียทางเคมี ทำให้แบคเทอริโอซินถูกนำมาใช้และเป็นที่รู้จักมากขึ้น ปัจจุบันได้มีการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน โดยทั่วไปส่วนใหญ่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (De Man-Rogosa-Sharpe broth)

จากการศึกษาของปัทมา และลสิตาภรณ์ (2548) พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ คือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* NCDO 497, *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* IO-1 JCM 7638 ที่ผลิต Nisin A, Nisin Z และ Pediocin PA-1 ซึ่งเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญของเซลล์ที่สูงที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% มีค่าใกล้เคียงกัน การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชแสดงให้เห็นว่าการเจริญยิ่งมาก ค่า pH สุดท้ายก็ยิ่งน้อยเนื่องจากมีการผลิตกรดได้มาก ส่วนการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์พบว่า มีค่า Bacteriocin Activity สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับค่า Bacteriocin Activity ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างๆ จะพบว่าค่า Bacteriocin Activity ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% มีค่าใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มากที่สุด แต่ในการผลิตแบคเทอริโอซินในระดับอุตสาหกรรมมีค่าใช้จ่ายของอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ค่อนข้างสูงจึงไม่คุ้มค่ากับการลงทุนจึงทำให้ในปัจจุบันได้เริ่มมีการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ GYP แทน MRS และอีกทางเลือกหนึ่งที่เข้ามามีบทบาทมากคือ การใช้ Tween 80 เป็นส่วนผสมร่วมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP เนื่องจาก Tween 80 สามารถช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ โดยจะไปช่วยลดแรงตึงผิวระหว่างพื้นที่ผิวของของแข็งกับของเหลว และยังมีราคาถูกกว่าอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการศึกษา

1.2.1 เพื่อศึกษาการเจริญและการความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (pediocin PA-1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth (Glucose Yeast extract

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Peptone broth) (อรนุช, 2530) ที่ความเข้มข้นของ tween 80 ต่างๆ (0,0.1 และ 0.5%) เปรียบเทียบกับอาหาร MRS broth (De Man-Rogosa-Sharpe broth)(Merck, Germany)

1.2.2 เพื่อศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (pediocin PA-1) ที่มีอุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10, 20 นาที และ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 สามารถลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตแบคเทอริโอซิน

1.3.2 เป็นแนวทางในการศึกษาวิจัย ในการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้มีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับอาหาร MRS broth

1.3.3 ทราบถึงประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

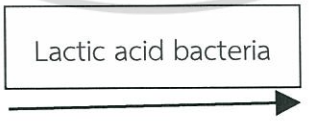
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก (gram-positive) มีรูปร่างกลมหรือ เป็นแท่ง (cocci หรือ rods) ไม่มีการสร้างสปอร์ (non sporeforming) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) แหล่งที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ เนื้อและผลิตภัณฑ์ ผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมักดองต่างๆ เป็นต้น

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นเชื้อที่สามารถหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม อื่นๆได้ โดยผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆออกมา เช่น กรดอะซิติก เอทานอล สารประกอบอะโรมาติก แบคเทอริโอซิน และอีกหลายเอนไซม์ (Emiliano Salvucci*et al*, 2015) จากชนิดและปริมาณผลิตภัณฑ์ที่เชื้อผลิตได้นี้ จึงจัดแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มฮอมอเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) และกลุ่มเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททฟ (heterofermentative) โดยกลุ่มแรกสามารถผลิตกรดแลคติกจากการหมักย่อยน้ำตาลดังกล่าวได้สูงประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลืออีก 5 เปอร์เซ็นต์ จะผลิตกรดแอซิติก (aceticacid) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย สำหรับแบคทีเรียกลุ่มหลัง ภายหลังจากการหมักย่อยน้ำตาลดังกล่าวแล้ว จะผลิตกรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ และอีก 50 เปอร์เซ็นต์ผลิตกรดแอซิติก กรดฟอร์มิก (formic acid) รวมทั้งเอทธานอล (ethanol) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์

แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศอย่างยิ่ง (strickly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการเฟอร์เมนต์น้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน เป็นเชื้อที่ต้องการอาหารค่อนข้างสลับซับซ้อนและอุดมสมบรูณ์ (complex and enrichment media) โดยใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจนเชื้อจะเติบโตได้ในอาหารที่มี Growth factor และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอทิน (Biotin) ริโบฟลาวิน (Riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น

Lactic acid bacteria มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดแลคติกในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในปฏิกิริยาต่อไปนี้



$C_2H_{12}O_6$ → $2C_3H_6O_3$

น้ำตาล **กรดแลคติก**

ในขณะที่ Lactic acid bacteria เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น ทำให้ pH ของอาหารหมักดองลดลงพร้อมกับรสเปรี้ยวของกรดจะสูงขึ้น ในสภาพเช่นนี้จะมีผลช่วยยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและก่อโรค (ขวัญนภา ขวัญเมือง และคณะ, 2556)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2 สกุลต่างๆของแบคทีเรียกรดแลคติก

การจัดจำแนกและใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์กับของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ทำให้สามารถจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็นสกุลต่างๆดังนี้ *Aerococcus, Alloiococcus , Bifidobacterium , Carnobacterium , Enterococcus , Lactobacillus, Lactococcus , Leuconostoc , Pediococcus , Streptococcus , Tetragenococcus, Vagococcus*, และ *Weissella*

สกุลต่าง ๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติก มีคุณสมบัติและลักษณะตาง ๆ ดังนี้

2.2.1 *Aerococcus* เป็นแบคทีเรียรูปกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.0 – 2.0 ไมโครเมตรมีการเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ติดสีแกรมบวกไม่เคลื่อนที่ (Non-motile) ต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe (สามารถเจริญได้ในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน) แต่เจริญได้ดีในที่มีออกซิเจนน้อย ในการผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ทำให้อาหาร Blood agar มีสีเขียวไม่สามารถสร้างอาหารเองได้ผลิตกรดแต่ไม่สรางแก๊สจากการใช้คาร์โบไฮเดรตหลายชนิดไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) หรือสร้างได้น้อยมาก ไม่สลายเจลาติน และไม่รีดิวซ์ไนเตรท เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ดีที่พีเอช 9.6 ในอาหารที่มีเกลือแกง 10 เปอร์เซ็นต์และในเกลือน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์มักก่อโรคทางเดินอาหาร และก่อให้เกิดโรคในกุ้งมังกรเช่น *Aerococcus viridians* (Wood, B.J. and W.H. Holzapfel., 1995)

2.2.2 *Alloiococcus* เป็นแบคทีเรียรูปกลม มักพบอยู่เป็นคู่หรือเรียงตัวเป็นสี่เซลล์เชื้อพวกนี้จะมีลักษณะคล้ายคลึงกับเชื้อ *Aerococci* และ *Streptococci* ซึ่งแยกได้จากน้ำในหูชั้นกลางในคน อย่างไรก็ตามเชื้อชนิดนี้ต่างจากเชื้อ 2 กลุ่มดังกลาวในเรื่องของความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลสได (Wood, B.J. and W.H. Holzapfel., 1995)

2.2.3 *Bifidobacterium* เป็นแบคทีเรียรูปท่อน ขนาด 0.5–1.3 x 1.5 – 8 ไมโครเมตร บางครั้งอาจจะพบในลักษณะโค้งยาว และแตกแขนงเรียงตัวกันเป็นโคโลนีเดี่ยว เป็นคู หรือเป็นรูปตัววีบางครั้งอาจจะอยู่เป็นสายยาว ไม่เคลื่อนที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ บางชนิดเจริญได้ในที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 10 เปอร์เซ็นต์จะไม่เจริญที่มีพีเอชต่ำกวา 4.5 หรือมากกวา 8.5 ในการหมักคาร์โบไฮเดรตจะให้กรดแอซีติก และกรดแลคติก ในอัตราสวน 3 โมลาร์ต่อ 2 โมลาร์เจริญได้ดีในที่อุณหภูมิ 37 – 41 องศาเซลเซียส พบเชื้อในปากและลำไส้ของแมลง สิ่งปฏิกูลอาจจะติดเชื้อในคนแต่ไม่ทำให้เกิดโรค (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

2.2.4 *Carnobacterium* เป็นแบคทีเรียรูปกลมหรือท่อน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.5–0.7x1.0 – 2.0 ไมโครเมตร เซลล์มีการเรียงตัวเป็นคู่ หรืออยู่เดี่ยว บางครั้งมีการเรียงตัวเป็นสายสั้น มีการหมักแบบ Heterofermentative ให้แลคเตต สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส พบในผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา และพบว่า *C. piscicola* เป็นเชื้อก่อโรคในปลาแซลมอล (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5 *Enterococcus* เป็นแบคทีเรียรูปกลม หรือ รูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.6-2.0×0.6-2.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นคู่ หรือสายสั้น เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา ไม่มีแคปซูล มีการใช้อากาศแบบ Facultative anaerobe เจริญได้ในช่วงพีเอช 4.2-4.6 ต้องการอาหารที่สมบรูณ์ ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C สามารถเจริญในที่มีพีเอช 9.6 ที่มีเกลือแกงสูงถึง 65 เปอร์เซ็นต์ และในที่มีเกลือน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์ และยังสามารถหมักน้ำตาลแลคโทสได้ (Perumal Venkatesh, 2006) สามารถพบตามธรรมชาติทั่วไปแต่จะพบมากได้ในระบบทางเดินอาหารของคน และสัตว์ เป็นจุลินทรีย์ก่อโรคและเป็นสาเหตุของโรคระบาดในคน เช่น โรคโลหิตเป็นพิษ โรคเยื่อบุหัวใจอักเสบ โรคทางเดินปัสสาวะอักเสบ และการติดเชื้อของแผลผ่าตัด

2.2.6 *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียรูปทอน ติดสีแกรมบวก อาจเปลี่ยนเป็นแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและมีกรดมากขึ้น โดยทั่วไปไม่เคลื่อนที่ ถ้ามีจะใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบตัว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส แต่อาจมีบางสายพันธุ์สลายเพอร์ออกไซด์ได้ โดยใช้เอนไซม์ซูโด-คะตะเลส (Pseudocatalase) ส่วนใหญ่ไม่สร้างสีแต่อาจจะมีสีเหลืองส้มจนถึงสีแดงอิฐต้องการอาหารที่ซับซ้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมตอการเจริญโดยทั่วไป 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงอุณหภูมิในการเจริญ 5-53 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมโดยปกติ 5.5-5.8 หรือต่ำกวา และโดยทั่วไปเจริญที่พีเอช 5.0 หรือต่ำกว่าในพีเอชที่เปนกลาง หรือเริ่มเป็นด่างแบคทีเรียพวกนี้พบในนม ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์เนื้อ เบียร์ ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ดองและผักดอง (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

2.2.7 *Lactococcus Lactococcus* เป็นแบคทีเรียที่แยกมาจากแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* โดยมีรูปกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 – 1.2 X 0.5 – 1.5 ไมโครเมตร อยู่เป็นคู่และต่อเป็นสายยาวไม่เคลื่อนที่ และไม่มีแคปซูล ใช้อากาศแบบ Facultative anaerobe ต้องการสารอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 – 30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและในที่มีเกลือแกง 0.5 เปอรเซ็นต์ พบได้ในนม และผลิตภัณฑ์ธัญพืชต่างๆ (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

2.2.8 *Leuconostoc Leuconostoc* เป็นแบคทีเรียรูปกลม หรือยาว อยู่เปนคู่ ๆ หรือเป็นสายสั้นๆ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 – 0.7 X 0.7 – 1.2 ไมโครเมตร บางครั้งอาจจะพบเป็นรูปทอนสั้นต่อกันเป็นสายยาว ไม่เคลื่อนที่ โคโลนีมีขนาดเล็กต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 20 – 30 องศาเซลเซียส ในการหมักกลูโคสจะให้กรดและแก๊ส เจริญในอาหาร GYP ที่มีพีเอช 4.4 – 5.0 พบได้ทั่วไปในพืช นม และผลิตภัณฑ์อื่นๆ ไม่ก่อโรคในพืช และสัตว์ เชื้อที่สามารถแยกได้จากคน ได้แก่ *L. citreum L. pseudomesenteroides L. lactis*และ *L. oenos* (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

2.2.9 *Pediococcus* เป็นแบคทีเรียรูปกลมขนาด 10-20 ไมโครเมตร เรียงตัวอยู่เป็นคู่หรือสี่เซลล์ พบน้อยมากที่อยู่เดี่ยวๆ หรือเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ต้องการออกซิเจนน้อยในการเจริญ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส มีการหมักอาหารแบบ Homofermentative ผลการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส แมนโนส และซอร์บิทอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกิดกรดแต่ไม่เกิดแก๊ส ไม่ย่อยแป้งและเจลลาติน ไม่รีดิวซ์ไนเตรท ต้องการอาหารที่ซับซ้อน สามารถพบเชื้อนี้ได้ในอาหารหมักดองที่มีเกลือสูง เช่น ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว น้ำปลา บูดู ปลาร้า *Pediococcus* (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548) ชนิดที่มีความสำคัญในด้านอาหารหมัก ได้แก่เชื้อ *P. damnosus, P. parvulus, P. pentosaceus, P. inopinastus*และ *P. acidilactici*

2.2.10 *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียรูปกลม หรือรูปไข่ มีขนาด 0.5 – 2.0 ไมโครเมตร เซลล์เรียงตัวกันเป็นสายไม่เคลื่อนที่ไม่สร้างสปอร์ต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe ต้องการอาหารที่สมบูรณ์ในกระบวนการหมักจะให้แลคเตต ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส สามารถสลายเซลล์เม็ดเลือดแดงได้โคโลนีสีเขียว อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 24 – 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ของเชื้อนี้เป็นปรสิตของสัตว์มีกระดูกสันหลัง พบได้ในช่องปากและระบบทางเดินหายใจตอนบนบางชนิดจะก่อโรคในคนและสัตว์ ชนิดที่มีความสำคัญในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้แก่เชื้อ *S. lactis , S. cremoris*และ *S. thermophiles* (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

2.2.11 *Tetragenococcus* *Tetragenococcus* เป็นแบคทีเรียสกุลใหม่ที่แยกจาก *Tetragenococcus halophilus* เป็นแบคทีเรียที่เจริญในเกลือ และผลิตฮิสตามีน (histamine) ซึ่งทำการแยกได้จากซอสที่สกัดจากตับของปลาหมึกโดยใช้วิธี DNA – DNA hybridization และจากการทดลองนี้สามารถพบแบคทีเรีย *T. muriaticus* สายพันธุ์ X – 1 (JCM 1000) ซึ่งเป็นสายพันธุใหม่ (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

2.2.12 *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียรูปกลม รูปไข่ หรือทอนสั้น มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 – 1.2 X 0.5 – 2.0 ไมโครเมตร เซลล์อยู่แบบเดี่ยว หรือเป็นคู่หรือสายสั้นๆ ติดสีแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา ใช้อากาศแบบ Facultative anaerobe จะมีการผลิตกรดในการหมักคาร์โบไฮเดรต แต่ไม่เกิดแก๊ส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 25 – 35 องศาเซลเซียส แยกได้จากน้ำ หรือจากปลาแซลมอล (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

2.2.13 *Weisella* เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จาก *Leuconostoc paramesenteroides* ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc*

2.3 ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการผลิตอาหารหมักดองแล้ว ยังมีบทบาทอื่นๆ ที่สำคัญ เช่น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่เชื้อ *Bacillus subtilis, Micrococcus pyogenes, Escherichia coli, Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น นอกจากการสร้างกรดแลคติกที่ทำให้พีเอชของอาหารลดลง ยังสามารถผลิตสารต่างๆ ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นอีกด้วย ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่นกลายเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ เช่น ในน้ำนมดิบไฮโดรเจอเพอร์ออกไซด์ ที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรียสร้ากรดแลคติก สามารถทำปฏิกิริยากับไทโอไซยาเนต (Thiocyanate) โดยมีเอนไซม์แลกโทเพอร์ออกซิเดส (Lactoperoxydase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาได้ผลิตผลที่มารถยับยั้งจุลินทรีย์ และช่วยยืดอายุรักษาน้ำนมดิบได้

2.3.2 ไดอะซิติล (Diacetyl) ไดอะซิติลชนิด 2,3 – butanedione เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลคติก ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวตที่เป็นสารตัวกลาง (Intermediate) แบคทีเรียสร้างแลคติกทั้งสกุล *Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc* และ *Pediococcus* สามารถสังเคราะห์ไดอะซิติลได้ ไดอะซิติลเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยในผลิตภัณฑ์ที่มีไดอะซิติลเข้มข้น 200 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ และแบคทีเรียแกรมลบ แต่เมื่อมีความเข้มข้น 300 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคที่เรียกรดแลคติกส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกจะถูกยับยั้งที่มีความเข้มข้นสูงกว่า 350 ไมโครลิตร ต่อ มิลลิลิตร

2.3.3 รูทีรีน (Reuterin) เป็นสารที่ไม่ใช่โปรตีน มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง ผลิตโดยแบคทีเรียพวก *Lactobacillusreuterin* รูทีรินสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โพรโทซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella, Shigella, Clostridium, Staphylococcus, Listeria, Candida* และ *Trypanosoma* จึงอาจใช้รูทีรินในการถนอมอาหารและอาหารสัตว์ โดยช่วยลดจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

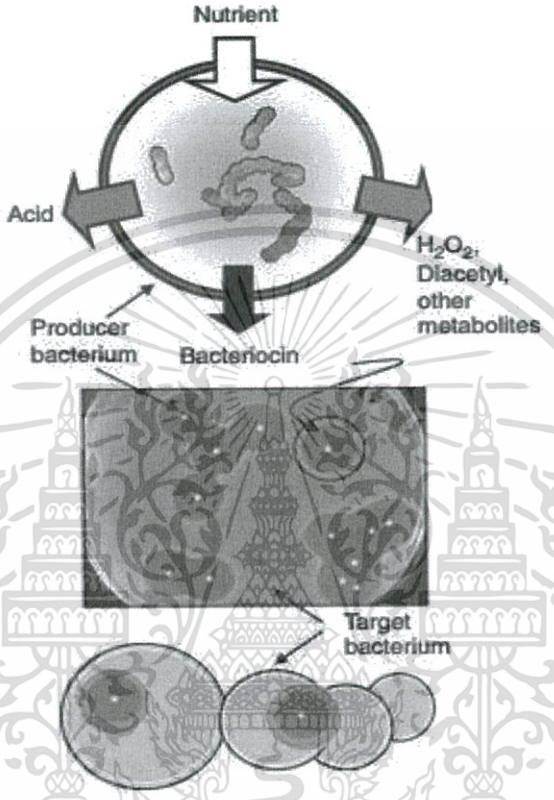
2.3.4 แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) แบคเทอริโอซิน คือ สารโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็ว ผลิตจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Lactobacillus fermentum, L. helveticus, L.acidophilus, L. plantarum, Pediococcus acidilactici* และ *P. pertosaceus* แบคเทอริโอซินต่างชนิดกัน จะมีคุณสมบัติทางเคมีต่างกัน การเข้ายับยั้งและความสามารถในการทำลายแบคทีเรียต่างกันแบคเทอริโอซิน จะมีผลยับยั้งในการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น เชื้อ *L. monocytogenes* แบคเทอริโอซินจึงเป็นสารที่น่าสนใจในการนำไปใช้เป็นสารกันเสีย สำหรับการถนอมอาหาร

2.4 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคทีริโอซินหมายถึงเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย แบคทีริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotics) คือแบคทีริโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกันแบคทีริโอซินสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบและแกรมบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลายสปีชีส์กลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้มักแยกมาจากอาหาร ดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการประยุกต์ทางด้านอาหาร การสร้างแบคทีริโอซินนี้มีข้อดีแก่แบคทีเรียแลคติกเองคือแบคทีริโอซินสามารถฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในแหล่งอาหารนั้นๆรูปที่ 1



ภาพที่ 1 แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด รวมทั้งแบคเทอริโอซินซึ่งจะให้ผลยับยั้งแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง เชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (รูปบน) จะทำให้เกิด บริเวณยับยั้งกับแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (รูปล่าง)

ที่มา : Deegan (2006)

ในบรรดาแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่น สกุล *Lactobacillus* หรือ group N / Streptococci ที่เรียกว่าไนซิน (Nisin ซึ่งมาจากคำว่า group N-inhibiting substance) มีการนำไปใช้ในการถนอมอาหารมากที่สุด โดยมีการทดลองใช้ไนซินในอาหารสด และอาหารแปรรูปหลายชนิด เช่น เนยแข็งสวิส น้ำมะเขือเทศ ซุปข้าวโพด และเบียร์ พบว่าไนซิน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และป้องกันการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* ซึ่งทนความร้อน การใช้ไนซินจึงช่วยลดความร้อนที่ต้องใช้ในการฆ่าเชื้อ และฆ่าสปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป เช่น อาหารกระป๋อง ไนซินยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่อยู่ในอาหารแต่จะไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา (พงษ์เทพ วิไลพันธ์ , 2546) รายงายว่าใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การศึกษาวิจัยทางด้านสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปอาจจะมีความสับสนหรือไม่แน่ใจระหว่างแบคเทอริโอซิน และสารปฏิชีวนะ ได้สรุปความต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะไว้ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคเทอริโอซิน	สารปฏิชีวนะ
การนำไปใช้	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากแบคเทอริโอซิน	ผลิตโดยผ่านกระบวนการที่เป็น secondary metabolite
ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่มีความหลากหลาย	น้อย	มาก
การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
กลไกในการต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	โดยปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	โดยการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
ลักษณะของปฏิกิริยาบนเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา: พงษ์เทพ วิไลพันธ์ (2546)

2.4.1 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน (Zacharof *et al.*, 2012) โดยพิจารณาจากชนิดของกรดอะมิโน มวลโมเลกุล โครงสร้างพื้นฐาน และพันธะต่างๆภายในโมเลกุล รวมถึงคุณสมบัติในการทนความร้อน ทำให้สามารถจัดแบ่งแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกได้เป็น 3 ประเภท

1. กลุ่ม Lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่มีลักษณะเป็นสายเพปไทด์ขนาดเล็กประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19-38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5000 ดาลตัล ซึ่งกระบวนการสร้างสายเพปไทด์ภายในเซลล์ต้องผ่านกระบวนการที่เรียกว่า posttranslation modification โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตัวก่อนที่จะส่งออกภายนอกเซลล์ จึงทำให้ในสายเพปไทด์มีกรดอะมิโนที่แตกต่าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากกรดอะมิโนที่พบโดยทั่วไป เช่น didehydroalanine และ didehydrobutyrine ซึ่งเกิดจากกระบวนการ dehydration ของ serine และ threconine ตามลำดับ นอกจากนี้ภายในสายเพปไทด์แต่ละสายยังมีโครงสร้างลักษณะเป็นวงแหวนย่อยๆ ที่เกิดจากการสร้าง thioether bridge ระหว่าง lanthionine หรือกรดอะมิโนซีสเทอีนกับกรดอะมิโน didehydrobulyrine ที่มีชื่อเรียกว่า β-methyl lanthionine ซึ่งแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้เป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่มีคุณสมบัติในการทนวามร้อน เช่น nisin A ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* ATCC 11454เป็นต้น

2. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน เป็นเบคเทอริโอซินกลุ่มที่มีขนาดโทมเลกุลเล็ก โดยภายในโมเลกุลจะประกอบด้วยกรดอะมิโนจำนวนระหว่าง 20-60 โมเลกุล เป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่ทนความร้อนได้ดีและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้น้อยชนิด เมื่อเปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณของเบส G+C ต่ำ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก Listeria และ Clostridium ได้ดี ซึ่งสามารถแบ่งแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

ก. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่สามารถทำลาย *Listeria* sp. ได้ดี ซึ่งในบางครั้งถูกเรียกว่ากลุ่ม pediocin-like bacteriocins โดยพบว่าในขั้นตอนแรกแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จะถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะที่เป็นสายเพปไทด์ตั้งต้น ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยการตัดสายเพปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกลุติดกันได้เป็นเพปไทด์ที่สมบรูณ์และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ที่ปลายด้าน N ในสายเพปไทด์ของแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดในกลุ่มนี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนเป็นลักษณะจำเพาะเหมือนกัน ได้แก่ Try-Gly-Asn-Gly-Val และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซีสเทอีน 2 โมเลกุลที่อยู่ต่อปลายด้าน N ของสายเพปไทด์ในแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดมีความเหมือนกันถึงระหว่าง 40-70 เปอร์เซ็นต์ (Zacharof *et al*, 2012) ซึ่งตัวอย่างของแบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น pediocin PA-1, sakacin A เป็นต้น

ข. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน ซึ่งสายเพปไทด์อาจแสดงกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายเพียงเส้นหนึ่งหรือสองเส้น แต่ในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายจะมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเพปไทด์ทั้งสองสาย เช่น brochocin A และ B

3. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่และไม่ทนความร้อน เป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่มที่มีขนาดโมเลกุลใหญ่กว่า 15000 ดาลตัล และเป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่มีคุณสมบัติไม่ทนต่อความร้อน เช่น helveticins

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

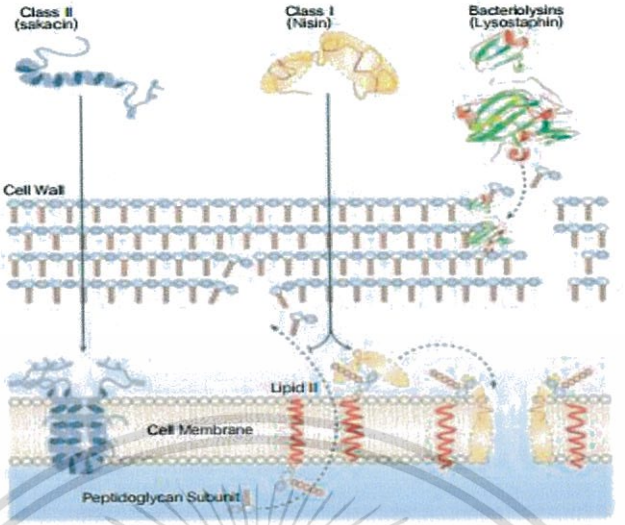
ตารางที่ 2 แบคเทอริโอซินที่สำคัญที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

Bacteriocin	Bacteriocin Producing Strain
Lactacin F	*L. johnsonii spp.*
Lactacin 705	*L. casei spp.*
Lactacin G	*L. lactis spp.*
Lactococcin MN	*Lactococcus lactis var cremoris*
Nisin	*Lactococcus lactis spp.*
Leucocin H	*Leuconostoc spp.*
Plantaricin EF, Plantaricin W, Plantaricin JK, Plantaricin S	*L. plantarum spp.*

ที่มา: Zacharof *et al.* (2012)

2.4.2 กลไกการออกฤทธิ์ แบคเทอริโอซินมีกลไกการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกันโดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ดังแสดงในภาพที่ 2 แบคเทอร์โอซินจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยอาศัยแรง electrostatic และแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะเหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์เป้าหมาย โดยกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่มีการศึกษามากที่สุดคือ ไนซิน ซึ่งไนซินจะทำให้เกิดรู และขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวยสมดุลของ pH เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และการสลายตัวของ ATP ทำให้เซลล์เกิดการตายที่สุด แบคเทอริโอซิน กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กจะออกฤทธิ์โดยการสร้างรูบนเยื่อหุ้มเซลล์เช่นกัน เป็นผลให้เกิดการแยกตัวของเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการรั่วไหลของกรดอะมิโนและไอออน รวมทั้ง ATP ภายในเซลล์ (Deean, 2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 ภาพแสดงกลไกการยับยั้งเซลล์แบคทีเรียของแบคเทอริโอซินต่างๆ

ที่มา : http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n10/images/nrmicro1273-f2.gif

2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง

ได้แก่ ค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกลูโคสและปริมาณโซเดียมคลอไรด์ พบว่า ค่าความเป็นกรดด่างจะมีผลต่อการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้ง โดยที่ pH 5.5 สารยับยั้งจะมีกิจกรรมสูงที่สุดและจะลดลงเมื่อค่าความเป็นกรดด่างสูงหรือต่ำกว่าค่าที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยที่ pH 3 การสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่ำหรือไม่พบการยับยั้งเลยที่ pH 9 และเมื่อดูที่ปัจจัยของน้ำตาลกลูโคสที่ 2% เชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งที่มีค่ากิจกรรมสูงที่สุดและค่ากิจกรรมจะลดลงเมื่อปริมาณน้ำตาลน้อยกว่า 1% หรือมากกว่า 5% และที่ปริมาณเกลือสูงถึง 5% การสร้างสารยับยั้งจะลดลง ทั้งนี้สภาวะที่มีกลูโคสและเกลือในปริมาณที่สูงอาจมีผลต่อค่า osmotic pressure ของอาหารทำให้เชื้อสามารถเจริญได้น้อย อีกทั้งโซเดียมคลอไรด์ยังมีคุณสมบัติเป็น antimicrobial อีกด้วย ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญจะมีผลต่อการสร้างสารยับยั้งด้วย (สุธิดา เชื้อพานิช และคณะ, 2552)

2.6 Tween 80

Tween 80 จัดเป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่งแบบ non – ionic มีชื่อทางเคมีว่า Polyoxyethylene sorbitan monooleate Polyethylene glycol sorbitan monooleate Polysorbate 80

มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{12}H_{10}ClNO_3$

จากการรายงานของ Nissen-Meyer *et al.*, 1992 พบว่า Tween 80 นอกจากจะช่วยลดการยึดจับกันระหว่าง แบคเทอริโอซินกับผิวสัมผัสด้านในอุปกรณ์แล้ว ยังอาจเกี่ยวข้องกับความคงตัวของโครงสร้าง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภายในโมเลกุล แบคเทอริโอซิน และความไวของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายต่อการถูกทำลายโดยโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน โดยพบว่า Tween 80 สามารถทำให้ค่ากิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายเพิ่มขึ้นจากเดิมประมาณ 2-10 เท่า

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัทมา อยู่เกษ และลสิตาภรณ์ ไร่ครวญ (2548) ได้ทำการศึกษาผลของ Tween 80 ที่ความเข้มข้นต่างๆ (0, 0.1, 0. และ 1.0%) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ต่อการเจริญ และการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NCDO 497 และ *Lactococcus lactis* subsp. *lacti* IO-1 JCM 7638 เทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์มีการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 0.1% ให้ผลได้ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มากที่สุด ส่วนความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มีแนวโน้มในทางเดียวกับการเจริญของเซลล์

ศิริรัตน์ หงส์เอก และคณะ (2552) ศึกษาถึงการเจริญและกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ Tryptic soy broth ที่เติม 3% Yeast extract (TSBYE), MRS broth ไม่มีกลูโคส (MRSNG), MRS broth สูตรปกติ (MRS), และอาหารน้ำมะพร้าว (CWB) พบว่าสายพันธุ์ CP7-3 เจริญเร็วและเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าสายพันธุ์ CP3-1 ในทุกอาหารเลี้ยงเชื้ออายุของ LAB ที่สร้างแบคเทอริโอซินที่ผลต่อการออกฤทธิ์ โดยช่วงการเจริญของ LAB สูงสุดแบคเทอริโอซินมีค่า $B.U._{max}$ การยับยั้ง *S. aureus* และ *B. cereus* สูงสุดด้วยเช่นกัน และลดลงในช่วงท้ายของการเจริญ LAB ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีน้ำตาลในส่วนประกอบ (TSBYE และ MRSNG) pH คงที่ (6.0) แบคเทอริโอซิน CP3-1 มีค่าการยับยั้ง *S. aureus* สูงสุดเท่ากับ 2.96±0.09 B.U./ml ที่ 30 ชั่วโมง และ 4.08±0.05 B.U./ml ที่ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ แต่สามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้น้อย สำหรับแบคเทอริโอซิน CP7-3 ในอาหาร TSBYE สามารถยับยั้งได้ทั้ง *B. cereus* และ *S. aureus* แต่ค่า$B.U._{max}$ อยู่ในระดับต่ำ (1.71±0.05B.U./ml ที่ 30 ชั่วโมง และ 3.82±0.04 B.U./ml ที่ 30 ชั่วโมง ตามลำดับ) LAB ที่เลี้ยงในอาหาร MRS และ CWB ให้ค่าการยับยั้ง *B. cereus* และ *S. aureus*มีค่า $B.U._{max}$ อยู่ในระดับสูง (3.6-4.6B.U./ml) ซึ่งมีผลมาจากจำนวนเซลล์แบคทีเรียแลคติกที่มากกว่ากรดแลคติกทำให้ pH ต่ำลง และสารแบคเทอริโอซิน

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

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ธนาภรณ์ พฤษธิสาริกร และคณะ (2558) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน Lacnegacin โดย *Lactococcus lactis* KA-FF 1-4 แยกได้จากปลาหมัก สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินให้ชื่อว่า Lacnegacin สารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการฆ่าเชื้อกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก และเชื้อก่อโรค เช่น *Bacillus cereus, Enterococcus durans, Listeria innocua, Micrococcus liteus, Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium, *S. aureus, S. equinus, S. salivarius* และ *Escherichia coli* O157:H7 งานวิจัยเพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และพีเอช พบว่าเชื้อผลิตสารยับยั้งสูงสุดในช่วง stationary phase และด้วยการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypton Glucose Yeast Extract สูตรดัดแปลง อุณหภูมิ 30°C และพีเอช 7 ให้อัตราการผลิตสูงสุดเป็น 1066.67 ยูนิตต่อมิลลิลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งสูงกว่าสภาวะการเพาะเลี้ยงในอาหาร De Man Rogosa and Sharpe (MRS) ประมาณ 6 เท่า

สุธิดา เชื้อพานิช และคณะ (2552) ทำการศึกษาแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* KU – F2 คัดแยกได้จากสับปะรดสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรค *Listeria monocytogenes* โดยมีค่ากิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 สูงถึง 12,800 AU/ml การสร้างแบคเทอริโอซินมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเชื้อและมีผลกระทบจากหลายปัจจัยเช่น ความเป็นกรดด่าง ปริมาณเกลือ และน้ำตาลกลูโคส โดยการเจริญในอาหารเหลว MRSที่มีค่าพีเอช 5.8 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีค่ากิจกรรมยับยั้งสูงที่สุด เช่นเดียวกับในสภาวะที่มีกลูโคส 2% หรือโซเดียมคลอไรด์ 0-2%(12,800 AU/ml) อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรมยับยั้งจะลดลงอย่างเห็นได้ชัดในสภาวะที่ไม่มีน้ำตาล (400 AU/ml) หรือมีน้ำตาล 0.5% และ 5%(3,200 U/ml) และปริมาณเกลือ 5% (800AU/ml) เป็นที่น่าสังเกตว่าปัจจัยใดมีผลกระทบต่อการเจริญจะมีผลกระทบต่อการสร้างสารยับยั้งด้วย สารแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจะมีค่ากิจกรรมยับยั้งเพิ่มขึ้น 4 เท่า (51,200 AU/ml) และประสิทธิภาพการยับยั้งจะสูญเสียไปในสภาวะที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่จะมีความเสถียรต่อค่าพีเอชต่ำ (pH 2-3) และความร้อนที่ 63 องศาเซลเซียส 30 นาที

รุ่งโรจน์ ศรีรักษา และคณะ (2555) ทำการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคของหัวเชื้อคีเฟอร์โดยวิธี swab-paper disk พบว่าคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด คือ Kefir BT 1 , Kefir BT 2 ,Kefir BT 3 ,Kefir BT 4 ,และKefir BT5 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis, Escherichia coli, Pseudomonas fluoresens* และ*Staphylococcus aureus* โดย Kefir BT 4 มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อ *P. fluoresens*สูงสุดที่ 16.3 ± 0.58 มิลลิเมตร เมื่อนำสารสกัดส่วนใสปราศจากเซลล์ (cell free supermatant)ของเชื้อคีเฟอร์ทั้ง 5 ชนิด ไปทดสอบคุณสมบัติพบว่าสามารถทนความร้อนสูงได้ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 10 นาที แต่ไม่สามารถทนความร้อนได้ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัตถุดิบและสารเคมี

3.1.1 วัตถุดิบ

เชื้อจุลินทรีย์ แบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

เชื้อจุลินทรีย์ แบคทีเรียแลคติก *Enterococcus faecalis*

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Glucose Yeast extract Peptone broth (GYP)

De Man-Rogosa-Sharpe broth (MRS) (Merck, Germany)

3.1.3 สารเคมี

95% Alcohol (Commercial Grade)	(องค์การสุราไทย, ประเทศไทย)
$FeSO_4.7H_2O$	
$MgSO_4.7H_2O$	
$MnSO_4.4H_2$	
Sodium Chloride	(Carlo erba, Italy)
Tween 80	(Merck, Germany)
Agar	(Merck, Germany)
$CaCO_3$	(Merck, USA)
น้ำกลั่น	

3.2 อุปกรณ์

หลอดเซนตริฟิวจ์ (Centrifuge tube) ขนาด 15 มิลลิลิตร	(NUNC)
หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์	(Micro centrifuge tube)
ขนาด 1.5 มิลลิลิตร	(NUNC)
จานเพาะเชื้อพลาสติก (Petri dish) ขนาด 15 มิลลิลิตร	(Italmar, Thailand)

เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่นๆ

หลอดทดลองขนาด (Test tube) 16x150 มิลลิเมตร

หลอดทดลองขนาด (Test tube) 13x100 มิลลิเมตร

บีกเกอร์ขนาด (Beaker) 50,250,600และ 1000 มิลลิลิตร

กระบอกตวง (Cylinder) ขนาด 100,250 และ1000มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 เครื่องมือ

เครื่องชั่ง	(Balance)(Mettler Toledo, Germany)
ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)	(Heraeus, Germany)
ตู้บ่มเชื้อ (Incobater) อุณหภูมิ 30องศาเซลเซียส	(Heraeus, Germany)
ตู้บ่มเชื้อ (Incobater) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	(Heraeus, Germany)
ตู้แช่แข็ง (Freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส	(Sanyo, Japan)
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar air flow)	(BossTech, Thailand)
ไมโครเวฟ (Microwave)	(Electrolux, China)
อ่างควบคุมอุณหภูมิ(Water bath)	(Memmert, Germany)
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Autoclave)	(Tommy, Japan)
ไมโครปิเปต (Micropipette) ขนาด 100-1000 และ 20-200 ไมโครลิตร	(Brand, Germany)
เครื่องเขย่าสาร (Vortex Mixer)	(Scientific Industrirs, USA)
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง	(inolab, Germany)
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	(Nikon ECLIPSE E200, China)
เครื่องตีปั่น (Stomacher)	(IUL instruments, Spain)
เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)	

3.4 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

3.4.1 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากแหนมและได้รับการยืนยันว่าสามารถผลิต pediocin PA-1 (Swetwiwwathana, 2005)

3.4.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด คือ อาหารเหลว MRS (De Man-Rogosa-Sharpe broth) (Difco™), GYP (Glucose Yeast extract Peptone broth) (สูตรองค์ประกอบอาหารเลี้ยงเชื้อดังภาคผนวก ก)

3.4.3 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำมา Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS + 1.5% agar + 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยมา 1 โคโลนี ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

3.4.4 ศึกษาการเจริญและความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536

ถ่ายกล้าเชื้อที่ได้จากข้อ 3.4.3 ลงในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MRS และ GYP ที่เติม Tween 80 0, 0.1 และ 0.5% บรรจุอยู่ 500 มิลลิลิตร ทำการหมักโดยควบคุมอุณหภูมิ 30 องศา จากนั้นเก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง (0, 6, 12 และ 18) จนครบ 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาค่าเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ค่าพีเอช จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต และความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน

3.4.4.1) การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต โดยวิธี Agar spot (ภณิดา เกื้อสุวรรณ , 2014)

นำตัวอย่างน้ำหมักมาทำการเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ให้มีค่าอัตราการเจือจางที่เหมาะสม นำตัวอย่างที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารแข็ง MRS agar ที่มีการเติม $CaCO_3$ 0.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

3.4.5 **ศึกษาความเข้มข้นและการทนร้อนของแบคเทอริโอซิน**

1.ทำการเพาะเลี้ยงเชื้ออินดิเคเตอร์ตามชนิดอาหารและสภาพการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อของเชื้ออินดิเคเตอร์นั้นๆ

2. ถ่ายเชื้ออินดิเคเตอร์ (*Enterococcus faecalis*) ปริมาณ 0.2% ลงในอาหาร MRS soft agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่หลอมเหลวใน water bath 50 องศาเซลเซียส ทำการ vortex mixer อย่างรวดเร็วและเทให้ทั่วผิวหน้าอาหาร NA agar รอจนอาหารแข็งตัว

3. ถ่ายเชื้อที่ได้จากข้อ 3.4.3 ลงในฟลาสก์ขนาด 1000 มิลลิลิตร ที่มีอาหาร MRS broth, GYP broth ที่ไม่เติม 0.1%Tween80, GYP broth +0.1% Tween80 และ GYP broth +0.5% Tween80 บรรจุอยู่ฟลาสก์ละ 500 มิลลิลิตร ทำการหมักในตู้บ่มอุณหภูมิที่สภาวะนิ่งที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักทุกๆ 6 ชั่วโมง (0, 6, 12, 18) และ 24 ชั่วโมง

4. ทำการเหวี่ยงปั่นแยกเชื้อ และนำส่วนที่ได้ปรับค่าพีเอชเป็น 6.3-6.5 นำส่วนใสที่ได้แบ่งออกเป็น4 หลอดๆละ 5 มิลลิลิตร ดังนี้

หลอดที่ 1: นำไปกรองด้วย 0.20 µl pore-size sterile polysuifone memnrane (Cica, Tokyo)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

148859

หลอดที่ 2: นำไปให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

หลอดที่ 3: นำไปให้ความร้อนโดยการต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

หลอดที่ 4: นำไปให้ความร้อนโดยการฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. นำส่วนใสที่ผ่านการกรอง และให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ เก็บในหลอดปราศจากเชื้อ และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดสอบแบคเทอริโอซิน

6. ทำการเจือจาง แบบ 2 fold dilutionในระดับที่เหมาะสม นำตัวอย่างที่เจือจางหยดลงบนอาหารที่เททับด้วยเชื้ออินดิเคเตอร์ ปริมาตร 10 µl ทำการบ่มเพาะเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมของเชื้ออินดิเคเตอร์

7. อ่านผลการยับยั้งเชื้อตามระดับความเจือจางที่ทำการทดสอบหาแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้ (1:0, 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 และ 1:256 นำค่าความเจือจางที่ยับยั้งได้สูงสุดมาคำนวณหาค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน เป็นค่า arbitrary unit (AU) ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

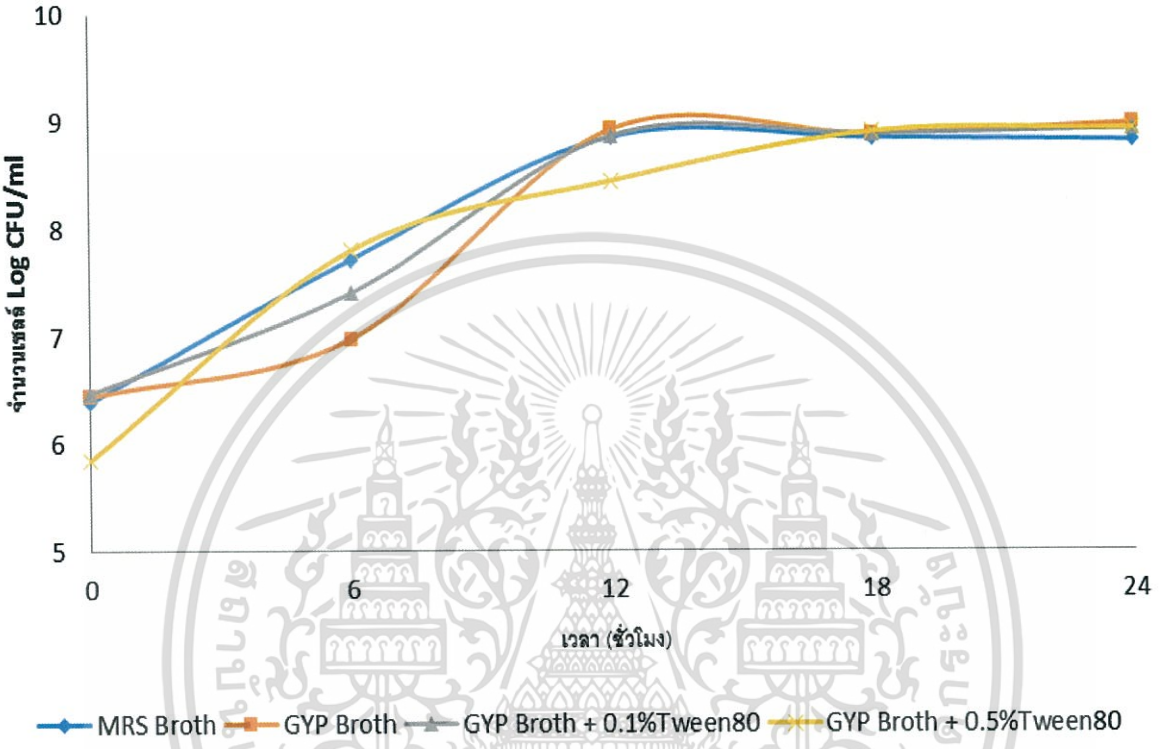
4.1 ศึกษาผลการเจริญ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (pediocin PA-1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ tween 80 ต่างๆ (0,0.1,0.5 %) เปรียบเทียบกับอาหาร MRS broth

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP และอาหารเหลว MRS (ภาพที่ 1) พบว่าการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลวทั้งสองชนิด (GYP และ MRS) มีการเจริญเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง โดยที่อาหารเหลว GYP ที่ไม่มีการเติม Tween 80 และมีการเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ และในอาหารเหลว MRS มีจำนวนของแบคทีเรียแลคติกเท่ากับ 8.97 ± 0.00, 8.92 ± 0.00, 8.92± 0.00 และ 8.82 ± 0.04 log cfu/ml ตามลำดับ เมื่อทำการเพาะเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมง ซึ่งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวทั้งสองชนิดนี้มีค่าใกล้เคียงกัน จึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากอาหารเหลว GYP เป็นการประยุกต์ปรับสูตรอาหารให้มีส่วนประกอบของสารอาหารใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (ปัทมา อยู่เกษ และ ลสิตา ภรณ์ ไร่ครวญ, 2548) แบคทีเรียแลคติกจึงสามารถเจริญเติบโตได้ใกล้เคียงกับอาหารเหลว MRS

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 (0, 0.1, 0.5%) เปรียบเทียบกับอาหาร MRS broth (ภาพที่ 3) พบว่าเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีการเจริญเป็นเดียวกัน ซึ่งการเจริญของเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ มีช่วงการเจริญอยู่ที่ 5.85 – 8.92 Log CFU/ml การเจริญของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่มีความเข้มข้นของ Tween 80 (0 0.1 และ 0.5%) มีค่าใกล้เคียงกับการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth อีกนัยหนึ่งคือ มีการเจริญที่ไม่แตกต่างกันที่เป็นเช่นนี้ เนื่องจากในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS นั้นเชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ดี และมีการใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกอย่างกว้าง (ฐิติรัตน์, 2555) อาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 ต่างๆ (0 ,0.1 ,0.5 %) เป็นการประยุกต์ปรับสูตรอาหารให้มีส่วนประกอบของสารอาหารใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (ปัทมา, 2548) ทั้งหมดนี้จึงนำมาเป็นข้อสนับสนุนผลการศึกษาการเจริญ *P. pentosaceus* TISTR 536 (pediocin PA-1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ tween 80 ต่างๆ (0,0.1,0.5 %) เปรียบเทียบกับอาหาร MRS broth ว่าผลการศึกษาที่ได้นี้เป็นไปตามสมมุติฐานและสามารถเชื่อถือได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่3 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth, GYP broth, GYP broth + Twee80 0.1% และ GYP broth + Twee80 0.5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



4.2 ศึกษาการผลิตกรด และค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween 80 (0, 0.1, 0.5%) เปรียบเทียบกับอาหาร MRS broth

การผลิตกรดในรูปกรดแลคติก และค่าพีเอชของเชื้อแบคทีเรียแลคติก TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP และ MRS แสดงในภาพที่ 4 พบว่าปริมาณกรดแลคติก และพีเอชของเชื้อ TISTR 536 มีความสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียแลคติก คือ ปริมาณกรดแลคติกสูงขึ้นตามจำนวนของแบคทีเรีย แลคติกที่เพิ่มขึ้น ในขณะที่ค่าพีเอชลดลง (ภาพที่ 4ก 4ข 4ค และ 4ง) โดยชั่วโมงที่ 24 ในอาหารเหลว GYP ที่ไม่มีการเติม Tween 80 และมีการเติม Tween 80 ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีปริมาณกรดแลคติกสูงสุด เท่ากับ 1.11±0.08%, 1.06±0.02% และ 1.03±0.06% ตามลำดับ และส่งผลให้ค่าพีเอชลงต่ำลงจาก 6.37±0.04 เป็น 4.62±0.11 เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณกรด แลคติกและค่าพีเอชของอาหารเหลว MRS พบว่าปริมาณกรดแลคติกสูงสุด เท่ากับ 1.39±0.06% และมีค่าพีเอชลดลงจาก 6.21 ± 0.02 เป็น 4.13 ± 0.15 จะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบอาหารเหลว GYP กับอาหารเหลว MRS มีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน เนื่องจากการปรับค่าพีเอชในอาหารเหลวGYP ให้มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับอาหารเหลว MRS จึงทำให้ค่าพีเอชของเชื้อ *P.*

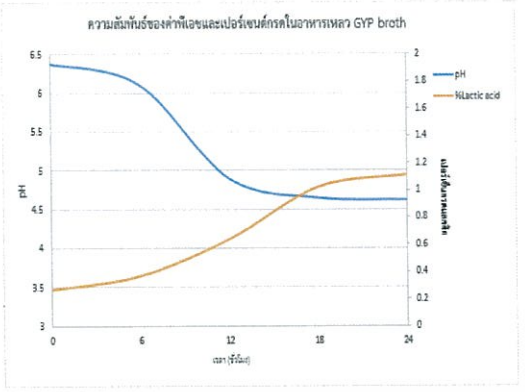
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

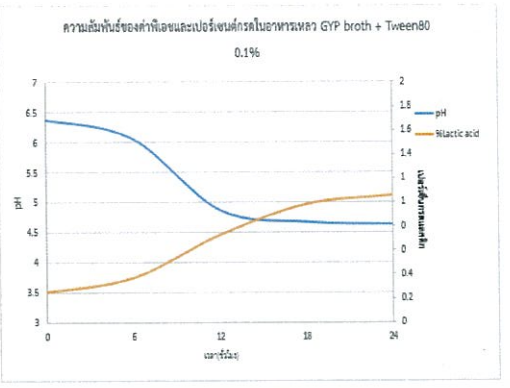
pentosaceus TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP กับอาหารเหลว MRS มีค่าใกล้เคียงกันจึงไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

ตารางที่ 3 ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

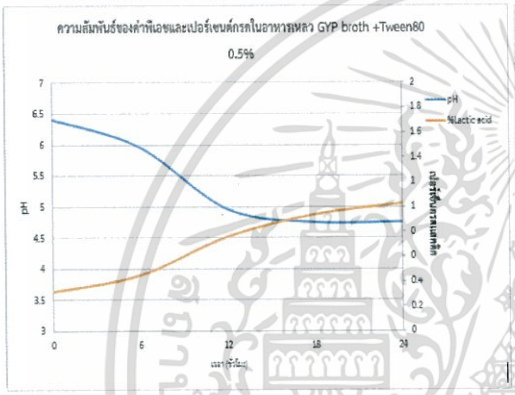
Hrs.	MRS	GYP	GYP+0.1%Tween80	GYP+0.5%Tween80
0	6. 21 ±0.02	6.37 ± 0.04	6.38 ± 0.05	6.4 ± 0.00
6	5.92 ± 0.14	6.1 ± 0.08	6.07 ± 0.10	5.96 ± 0.01
12	4.71 ± 0.05	4.89 ± 0.07	4.87 ± 0.11	4.96 ± 0.01
18	4.32 ± 0.11	4.65 ± 0.12	4.67 ± 0.08	4.75 ± 0.00
24	4.13 ± 0.15	4.62 ± 0.11	4.63 ± 0.12	4.76 ± 0.01

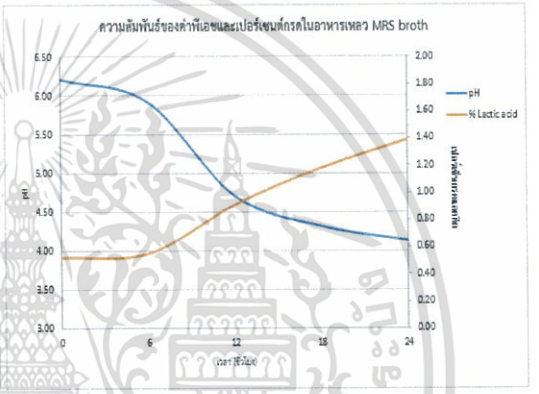
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้





(ก) (ข)





(ค) (ง)

ภาพที่4 การผลิตกรด และค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติก *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP ที่ไม่เติม Tween80 (ก) GYP ที่เติม 0.1%Tween80 (ข) GYP ที่เติม 0.5%Tween80 (ค) อาหารเหลว MRS (ง)

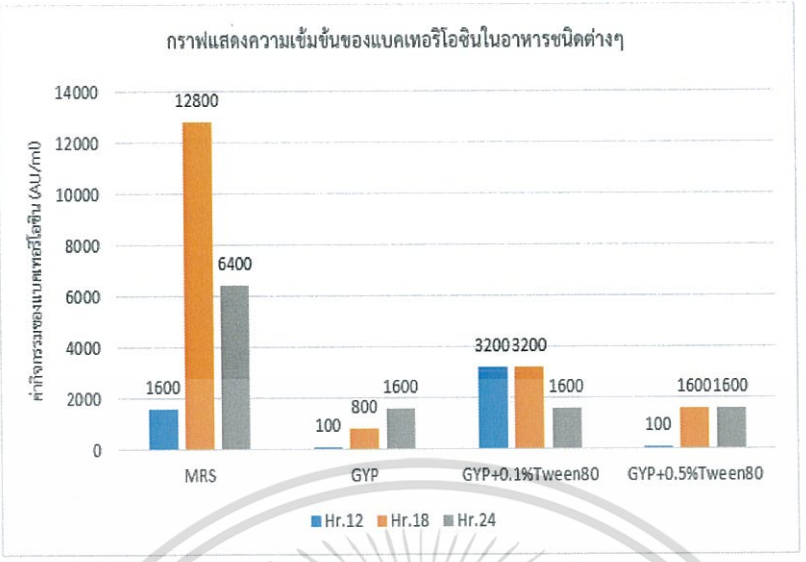
4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน เช่น Tween80 จากการศึกษาผลของ Tween80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว GYP และ MRS ของแบคทีเรียแลคติก (ภาพที่ 5) พบว่าการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween8 0.1% สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุด เท่ากับ 3200 AU/ml ซึ่งใกล้เคียงกับการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเหลว MRS ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้สูงสุด เท่ากับ 12800 AU/ml โดยมีเชื้อ *Enterococcus faecalis* เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ เมื่อเปรียบเทียบความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween 0, 0.1 และ 0.5%พบว่าการผลิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารแบคเทอริโอซินของเชื้อ TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0.1% สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecalis* JCM5803 ได้สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 0% และ 0.5% และมีค่าความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินอยู่ที่ 3200, 1600 และ 1600 AU/ml ตามลำดับ ซึ่งจากการทดลองอาหารเหลว GYP ที่มีความเข้มข้นของ Tween80 0 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ แต่ยังคงผลิตแบคเทอริโอซินได้ไม่สูงมาก จากผลการทดลองที่กล่าวมาสอดคล้องกับงานวิจัยของ ศิริรัตน์ และคณะ, 2552 ได้ทำการศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง คือ Tryptic soy broth+3%Yeast extract (TSBYE) ที่ไม่มีการเติม Tween80 และอาหาร MRS broth พบว่า TSBYE สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ 1.71±0.05 B.U/ml ส่วนในอาหาร MRS broth สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ 3.66±0.03 B.U/ml ซึ่งสรุปได้ว่าอาหารที่เติม Tween80 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ ดังนั้นอาหารเหลว GYP อาจจะมีความสามารถเทียบเท่ากับอาหารเหลว MRS จึงทำให้การผลิตแบคเทอริโอซินและความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP มีค่าน้อยกว่าใกล้เคียงกับอาหารเหลว MRS เนื่องจากอาหารเหลว GYP เป็นการประยุกต์ปรับสูตรอาหารให้มีส่วนประกอบของสารอาหารใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (ปัทมา อยู่เกษ และ ลสิตาภรณ์ ไร่ครวญ, 2548) และเมื่อพิจารณาค่าความเข้มข้นของ Tween80 ซึ่ง Tween80 เป็นสารลดแรงตึงผิวชนิดหนึ่งที่ถูกใช้ผสมในอาหารเหลว GYP ที่อาจจะเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดการผลิตและความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินแตกต่างกัน และจากคุณสมบัติของสารลดแรงตึงผิวอีกอย่างหนึ่งคือมีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อโรค (Tiger Chemical Company, 2004) เมื่อความเข้มข้นของ Tween80 เพิ่มขึ้นจึงอาจจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ของแบคทีเรียได้ และอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน คือ องค์ประกอบภายในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าอาหารทั้งสองชนิด คือ MRS broth และ GYP broth มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth นั้นมีน้ำตาลสูงกว่า GYP broth ทำให้ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินนั้นสูง และจากการทดลองพบว่า GYP broth สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้ แต่ยังคงผลิตแบคเทอริโอซินได้ไม่สูงมาก เนื่องจาก $MgSO_4$ ในสูตรอาหาร GYP broth ที่มีส่วนประกอบ Mg^{2+} สูงกว่าอาหาร MRS broth Mg^{2+} จะทำปฏิกิริยากับประจุลบบนผนังเซลล์แบคทีเรียทดสอบ โดยประจุบวกในอาหารจะแย่งแบคเทอริโอซินจับกับบนส่วนของ phospholipids หรือ peptidoglycan (PG) ของผนังเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายทำให้ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินลดลงสอดคล้องกับงานวิจัยของ Abee และคณะ (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

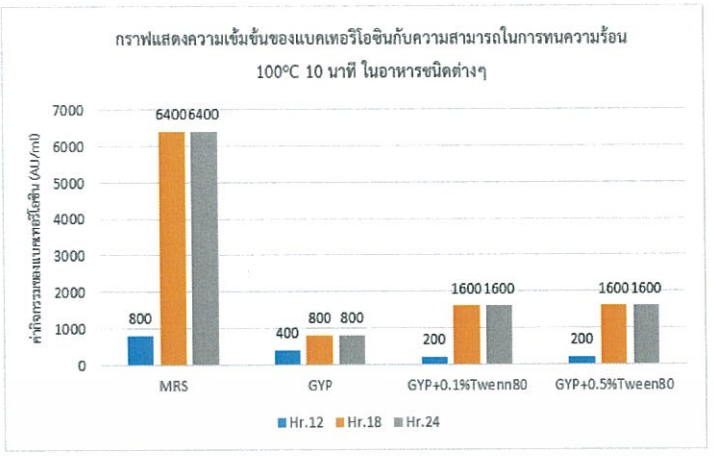


ภาพที่ 5 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/ml) ของเชื้อ *P.pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP และ MRS

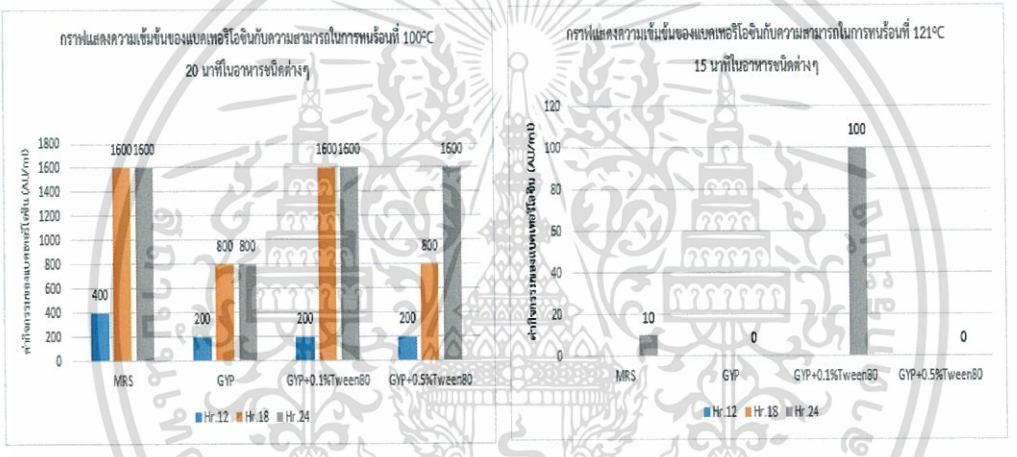
4.4 การทนร้อนของแบคเทอริโอซินของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

ในการศึกษาความสามารถในการทนร้อนของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterococcus* faecalis ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ พบว่า หลังจากการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 และ 20 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าแบคเทอริโอซินของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถทนความร้อนได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (ภาพที่ 6ก, 6ข และ 6ค) เนื่องจากคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินมีความสามารถในการทนความร้อนได้ (M. P. Zacharof et al, 2012) (รุ่งโรจน์ ศรีรักษา, 2555) และ Tween80 มีผลต่อความคงตัวของโครงสร้างภายในโมเลกุลแบคเทอริโอซิน (Nissen-Meyer et al, 1992) ด้วยเหตุสองประการนี้จึงนำมาเป็นข้อสนับสนุน ผลการศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ว่าสามารถเชื่อถือได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข) (ค)

ภาพที่ 6 ความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน (AU/ml) ของเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเหลว GYP ที่มีความเข้มข้น Tween80 ต่างๆ (0,0.1 และ 0.5%) และ MRS ที่อุณหภูมิ 100°C นาน 10 นาที (ก) 20 นาที (ข) และ 121°C นาน15นาที (ค)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผล

ผลการศึกษาการเจริญ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (pediocin PA-1) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ tween 80 ต่างๆ (0,0.1,0.5 %) เปรียบเทียบกับอาหาร MRS broth ที่ 0,6,12,18 และ 24 ชั่วโมง(ตารางที่ 4) พบการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารชนิดอื่น โดยในอาหารเลี้งเชื้อGYP+Tween80 0.1% และ GYP+Tween80 0.5% นั้นมีการเจริญของเซลล์ไม่แตกต่างกันและน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่ไม่ได้ใส่ Tween80 จึงทำให้สรุปได้ว่า Tween80 ไม่ส่งผลต่อการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP แต่การเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มีการเจริญ*ของ Pediococcus pentosaceus* TISTR 536มากกว่า

ผลการศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (pediocin PA-1) มีการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่ความเข้มข้นของ tween 80 ต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยวัดค่า pH ที่ 0,6,12,18 และ 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 4) พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่ความเข้มข้น(0,0.1,0.5 %) มีค่า pH สูงขึ้นตามลำดับ

ผลการศึกษาของ Tween80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารต่างๆ (กราฟ ก ข ค และ ง) พบว่าการผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่เติม Tween80 0.1% สามารถผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecalis* ได้ 3200 AU/ml ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกับการผลิตแบคเทอริโอซิในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ 12800 AU/ml

ผลการศึกษาการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 (pediocin PA-1) ซึ่งมีการทดลอง 4 วิธี คือ การต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที , การต้มที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 20 นาที , Autoclave ที่ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และ การกรองด้วย 0.20 µl pore-size sterile polysuifone memnraneพบว่า แบคเทอริโอซินสามารถทนร้อนได้สูงสุด 100 องศาเซลเซียส 20 นาที

ดังนั้นจากผลการศึกษาทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ GYP สามารถนำมาใช้แทนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เนื่องจากให้ผลการเจริญของเซลล์สูงสุดกว่า เมื่อเติม Tween80 ความเข้มข้น 0.1% พบว่าสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนได้มากกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP ที่ไม่เติม Tween80 และยังเป็นการลดต้นทุนในการผลิตได้เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP มีราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1 ในห้องที่ทำการทดลองควรมีความสว่างที่เพียงพอเพื่อใช้ในการตรวจผลการทดลองเช่น การนับจำนวนเซลล์ การตรวจผลกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

2 เครื่องมือที่ใช้ในการศึกษาทั้งหมดควรมีการฆ่าปลอดเชื้อโดยเฉพาะปีบที่ใช้ในการบ่มควรเป็นปีบที่ไม่มีสนิมเพื่อลดความเสี่ยงที่จะมีการปนเปื้อนข้ามเพราะบริเวณที่เป็นสนิมสามารถทำความสะอาดได้ยาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

ขวัญนภา ขวัญเมือง., มัตติกา จันทร์กลาง., สาวิณีย์ ขันทา. 2556. ผลของการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น Pedicoccus pentosaceus TISTR 536 ต่อเชื้อซัลโมเนลลาในระหว่างการผลิตแหนมแบบดั้งเดิม และ การผลิตแหนมกึ่งแห้ง. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระ จอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ณัฐพันธุ์ ศุภกา. 2012. แบคเทอริโอซิน สารจากธรรมชาติสำหรับการถนอมอาหารเพื่อสุขภาพ. Bio & Nano. 2012: 28-32.

ธนาภรณ์ พฤษธิสาริกร, พุทธาพงศ์ และสุนีย์ นิธิสินประเสริฐ. 2558. สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน Lacnegacin โดย *Lactococcus lactis* KA-FF 1-4. การประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 53. กรุงเทพ ฯ.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2548. มารู้จัก “แบคทีเรียกรดแลคติก”กันเถอะ. วารสารวิทยาศาสตร์ทักษิณ. 2. 19-30.

ปัทมา อยู่เกษ และ ลสิตาภรณ์ ไร่ครวญ. 2548. ผลของ Tween 80 ต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางชนิด. ภาคอุตสาหกรรมเกษตร. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. สถาบันพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. คุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร. วารสารอาหาร. 33(3) : 173-180 น.

ภณิดา เกื้อสุวรรณ., วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และดวงพร คันธโชติ. 2014. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง. ระดับปริญญาโท สาขาวิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

รุ่งโรจน์ ศรีรักษา, ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม, อนุชิตา มุ่งงาม และเกษศิรินทร์ ศักดิ์วิวัฒกุล. ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและ คุณสมบัติการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากคีเฟอร์.วารสารเภสัชศาสตร์อีสาน. 9(1). 2555. 231-235.

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์. สาขาเทคโนโลยีอาหาร. คณะอุตาสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริรัตน์ หงส์เอก, สาวิตรี วทัญญูไพศาล และจันทรพร ผลากล. 2552. การเจริญและกิจกรมของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus acidilactici CP7-3* และ *Weissella confusa CP3-1* ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ.การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 47. กรุงเทพ ฯ.

สุธิดา เชื้อพานิช,นิพนธ์ ทวีชัย,ปทุมพร ฉิมเอนก,วรรณา มาลาพันธุ์. 2552. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินและปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน. การประชุมทางวิชาการของ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 47. กรุงเทพฯ.

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลาและ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้หมักแหนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 23: 145-160

Abee T, Rombouts, F.M., Hugenholtz, J., Guihard, G., and Letellier, L. 1994. Mode of Action of Nisin Z against Listeria monocytogenes Scott A Grow at High and Low Tempeeratures. Appl Environ Microbiol. 60(6): 1962-1968.

Deean, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2005. Bacteriocina : Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension.

Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. International Dairy Journal 16(9): 1058-1071

Meyer, J.N., Holo, H., Håvarstein, L.S., Sletten, K. and Nes, I.F. 1992. A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. Journal of bacteriology. 174(17): 5686-5692.

Salvucci, E., LeBlanc, J.G. and Perez, G. 2015. Technological properties of Lactic acid bacteria isolated from raw cereal material.

Swetwiwathana, A., Lotong, N. 1999. Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from nham (Thai fermented meat). In proceeding of International conference on Asia Network on Microbial, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Ching-Mai, Thailand, 29 Norvember-1 December 1999.

Swetwiwathana, A., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. "Effect of Garlic on Lactic Acid Bacteriocins of Bacteriocin -producing Lactic Acid Bacteria Associated in Nham (Thai fermented Meat) during Fermentation." The 52nd International Congress. of Meat Science and technology

Venkatesh, P., Balraj, M., Ayyanna, R., Ankaiah, D. and Arul, V. 2006. Physicochemical and biosorption properties of novel exopolysaccharide produced by Enterococcus faecalis.

Wood, B.J. and W.H. Holzapfel. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman & Hall. London , Melbourne.

Zacharof, M.P. and Lovitt, R.W. 2012. Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.

การเตรียมอาหารและสารเคมี

ก.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ DE Man, Rogosa and Sharpe (MRS broth) (Merck, Germany) ใน 1 Liter

Peptone	10	g
Meat extract	8	g
Yeast extract	4	g
Glucose	20	g
Tween 80	1	g
Di-Ammonium hydrogen citrate	2	g
Di-Potassium hydrogen phosphate	2	g
Sodium citrate	5	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.2	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.04	g

(ถ้าต้องการให้อาหารแข็งให้เติมAgar 15 g ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 Liter)

นำส่วนสารทั้งหมดอุ่นและคนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ DE Man, Rogosa and Sharpe (MRS) (Merck, Germany) + 0.5 % $CaCO_3$ + 1.2% Agar ใน 1 Liter

Peptone	10	g
Beef extract	10	g
Yeast extract	4	g
Glucose	20	g
Tween 80	1	g
Di-Ammonium hydrogen citrate	2	g
K_2HPO_4	2	g
Sodium citrate	5	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.2	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.04	g
$CaCO_3$	5	g
Agar	12	g

นำส่วนสารทั้งหมดอุ่นและคนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Glucose Yeast Peptone (GYP broth) (Oxford and IBH Publishing Co., New Delhi) ใน 1 Liter

Glucose	10	g
Yeast extract	10	g
Peptone	10	g
Sodium citrate	10	g
Salt solution	10	ml
pH	6.8	

นำส่วนสารทั้งหมดอุ่นและคนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปปรับ pH ให้ได้ 6.8 แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3.1 การเตรียมสารละลาย Salt Solution ใน 100 ml

$MgSO_4.7H_2O$	4	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.2	g
$FeSO_4.7H_2O$	0.2	g
NaCl	0.2	g

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายน้ำแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 ml

ก.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient (NA Agar) ใน 1 Liter

Peptone	5	g
Beef extract	3	g
Agar	15	g

นำส่วนสารทั้งหมดอุ่นและคนให้เข้ากันจนเป็นเนื้อเดียวกันจากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ก.5 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.1 M NaOH 500 ml

- เตรียมสารละลาย Sodium Hydroxide

ชั่ง NaOH ประมาน 2 g

↓

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นต้มในขวดปริมาตรขนาด 500 ml

- เตรียมสารละลาย $KHC_8H_4O_4$

ชั่ง $KHC_8H_4O_4$ ประมาณ 0.8169 g

↓

ละลายด้วยน้ำกลั่นต้ม 50 ml

↓

นำสารละลาย $KHC_8H_4O_4$ ที่เตรียมไว้

↓

หยดด้วยสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 3 หยด

↓

ไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH จนเป็นสีชมพูอ่อน ซึ่งคือจุดยุติ

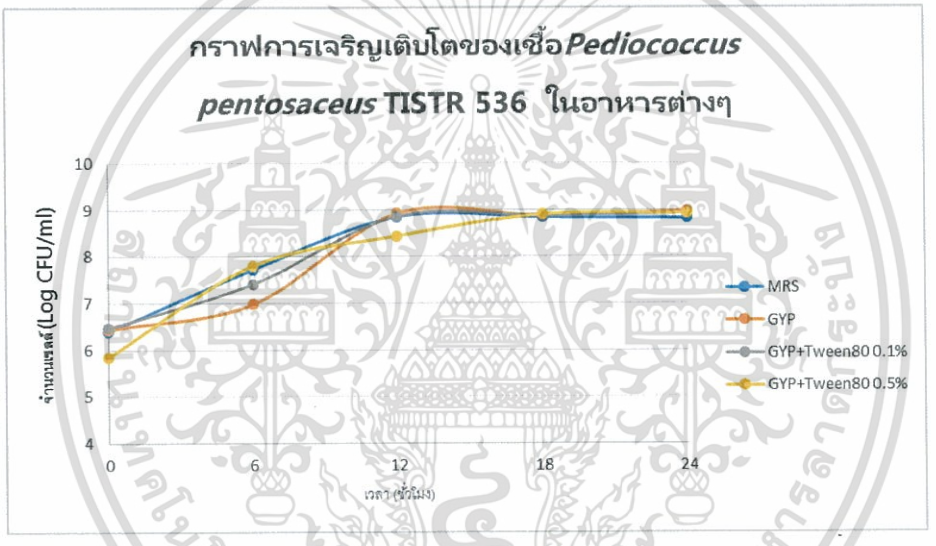
$$\text{Molarity (mol/L)} = \frac{\frac{g\ KHC_8H_4O_4 \times 1000}{ml\ NaOH \times 204.229} \quad \frac{g\ KHC_8H_4O_4 \times 1000}{ml\ NaOH \times 204.229}}{}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

ผลการศึกษาอัตราการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536ในอาหารเลี้ยงเชื้อ GYP broth ที่ความเข้มข้นของ Tween80 ต่างๆ เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth

กราฟผนวก ข.1 การเจริญเติบโตของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth, GYP broth, GYP broth + Twee80 0.1% และ GYP broth + Twee80 0.5% เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ตารางผนวก ข2 แสดงการคำนวณปริมาณเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

Hrs.	MRS	GYP	GYP+Tween80 0.1%	GYP+Tween80 0.5%
0	6.39 ± 0.82	6.44 ± 0.68	6.47 ± 0.68	5.85 ± 0.00
6	7.72 ± 0.20	6.98 ± 0.04	7.41 ± 0.41	7.80 ± 0.00
12	8.85 ± 0.01	8.92 ± 0.00	8.86 ± 0.00	8.44 ± 0.00
18	8.84 ± 0.05	8.88 ± 0.02	8.88 ± 0.16	8.90 ± 0.00
24	8.82 ± 0.04	8.97 ± 0.00	8.92 ± 0.00	8.92 ± 0.00

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข.3 แสดงค่า ความเป็นกรด-ด่าง(pH) ของเชื้อ Pediococcus pentosaceus TISTR 536

Hrs.	MRS	GYP	GYP+0.1%Tween80	GYP+0.5%Tween80
0	6.21 ± 0.02	6.37 ± 0.04	6.38 ± 0.05	6.4 ± 0.00
6	5.92 ± 0.14	6.1 ± 0.08	6.07 ± 0.10	5.96 ± 0.01
12	4.71 ± 0.05	4.89 ± 0.07	4.87 ± 0.11	4.96 ± 0.01
18	4.32 ± 0.11	4.65 ± 0.12	4.67 ± 0.08	4.75 ± 0.00
24	4.13 ± 0.15	4.62 ± 0.11	4.63 ± 0.12	4.76 ± 0.01

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางผนวก ข.4 แสดงผลการศึกษาของ Tween80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS, GYP, GYP + Twee80 0.1% และ GYP broth + Twee80 0.5% ตามลำดับ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecalis* ได้

ตาราง Bacteriocin MRS broth

Hrs.	กรอง										ต้ม 100 องศา 10 นาที										ต้ม 100 องศา 20 นาที										Auto clave									
	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
0																																								
6																																								
12	/	/	/	/	/	/					/	/	/	/	/						/	/	/	/																
18	/	/	/	/	/	/	/	/	/		/	/	/	/	/	/	/	/			/	/	/	/	/	/														
24	/	/	/	/	/	/	/	/			/	/	/	/	/	/	/	/			/	/	/	/	/	/					/									

ตาราง Bacteriocin GYP broth

Hrs.	กรอง										ต้ม 100 องศา 10 นาที										ต้ม 100 องศา 20 นาที										Auto clave									
	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
0																																								
6																																								
12	/	/									/	/	/	/							/	/	/																	
18	/	/	/	/	/						/	/	/	/	/						/	/	/	/	/	/														
24	/	/	/	/	/	/					/	/	/	/	/						/	/	/	/	/	/														

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง Bacteriocin GYP broth +0.1%tween80

Hrs.	กรอง										ต้ม 100 องศา 10 นาที										ต้ม 100 องศา 20 นาที										Auto clave									
	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
0																																								
6	/	/																																						
12	/	/	/	/	/	/	/				/	/	/								/	/	/	/																
18	/	/	/	/	/	/	/				/	/	/	/	/	/					/	/	/	/	/	/														
24	/	/	/	/	/	/					/	/	/	/	/	/					/	/	/	/	/	/					/	/								

ตาราง Bacteriocin GYP broth +0.5%tween80

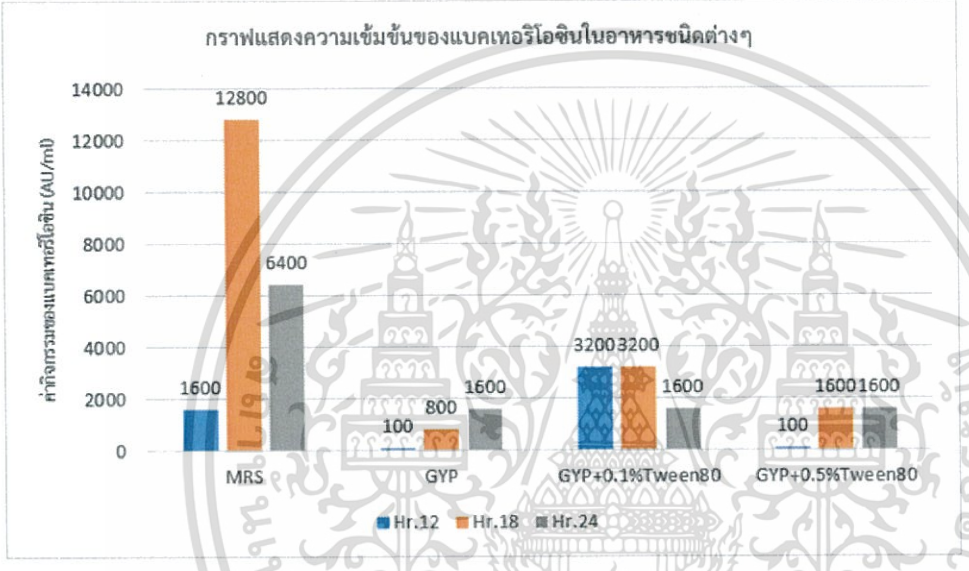
Hrs.	กรอง										ต้ม 100 องศา 10 นาที										ต้ม 100 องศา 20 นาที										Auto clave									
	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:0	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256
0																																								
6																																								
12	/	/									/	/	/								/	/	/																	
18	/	/	/	/	/	/					/	/	/	/	/	/					/	/	/	/	/															
24	/	/	/	/	/	/					/	/	/	/	/	/					/	/	/	/	/	/														

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

ผลการศึกษาของ Tween80 ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหาร GYP broth ของกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ PA – 1

ตารางผนวก ค.1 ค่ากิจกรรมแบคเทอริโอซินของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

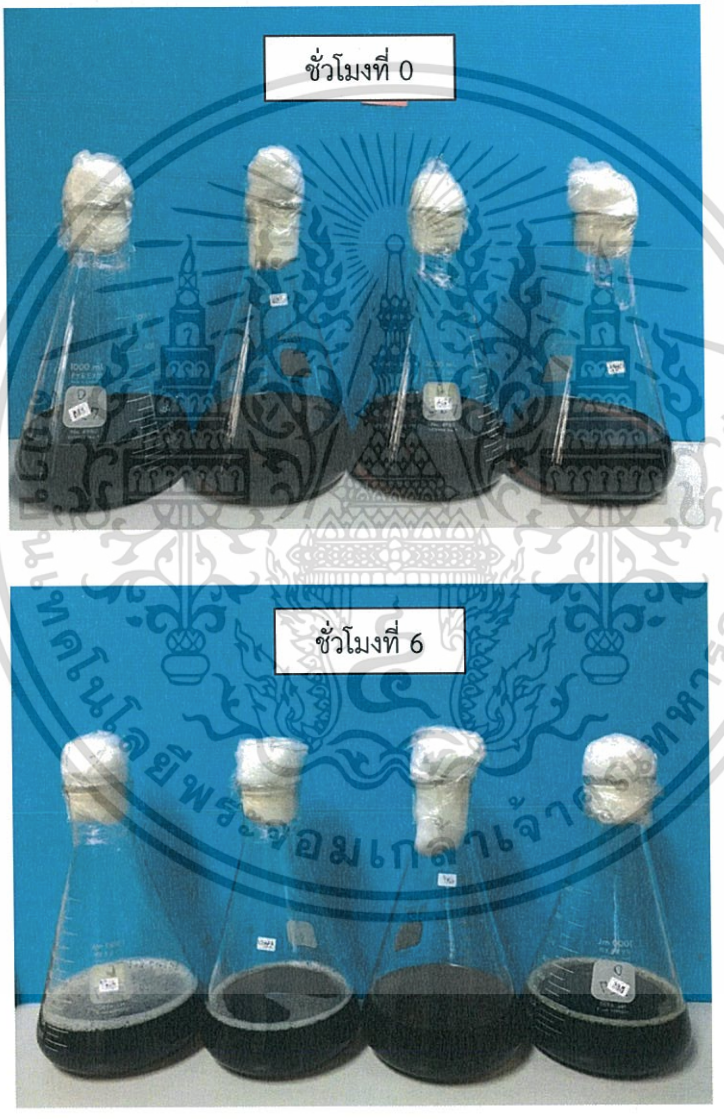


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

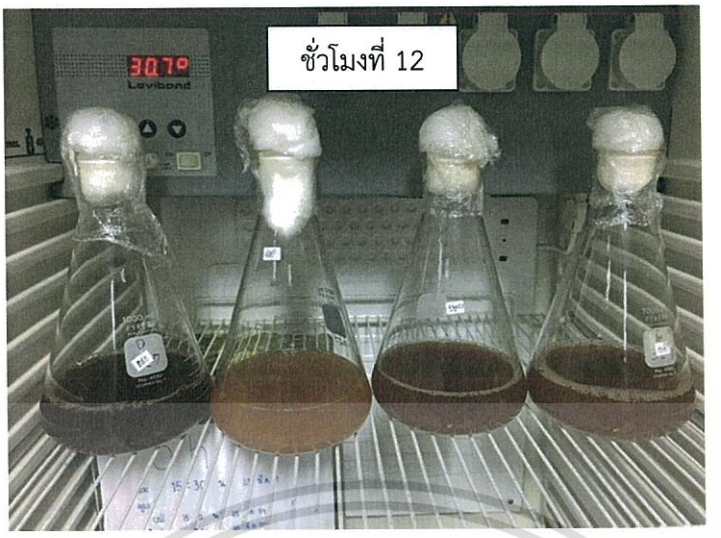
ภาคผนวก ง.

ภาพแสดงวิธีการทดลองและภาพการแสดงผลการทดลอง

ภาพผนวก ง.1 แสดงถึงฟลาส 1000 ml ที่มีการเลี้ยงเชื้อ *P. pentosaceus* TISTR 536 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS, GYP, GYP+Tween80 0.1% และ GYP+Tween80 0.5% บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้มีการเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง (0,6,12,18,24) ตามลำดับ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



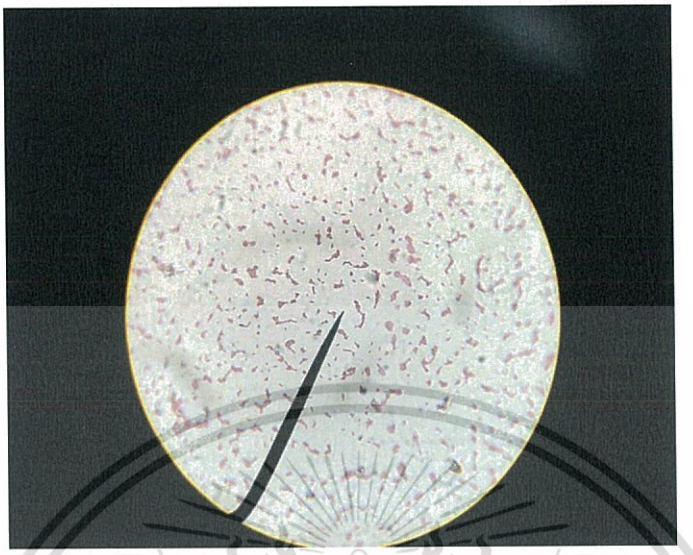
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวก ง.2 แสดงลักษณะผลการไตเตรท เพื่อตรวจหาค่าความเป็นกรด-ด่าง(pH) ที่เปลี่ยนแปลง

ภาพผนวก ง.3 แสดงลักษณะของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่จากการทำ Spot Plate

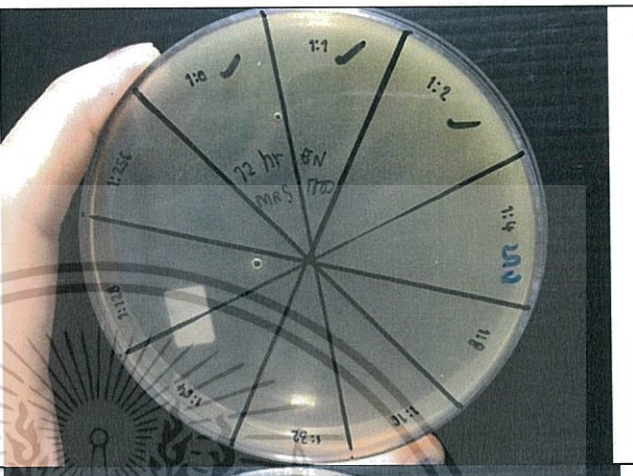
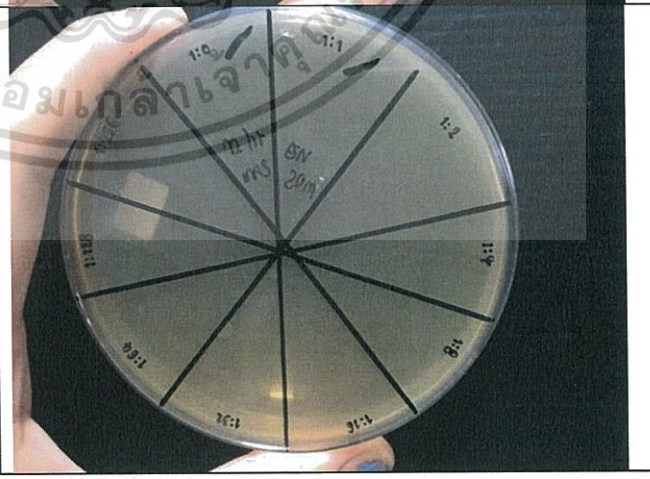
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวก ง.4 แสดงลักษณะของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus*

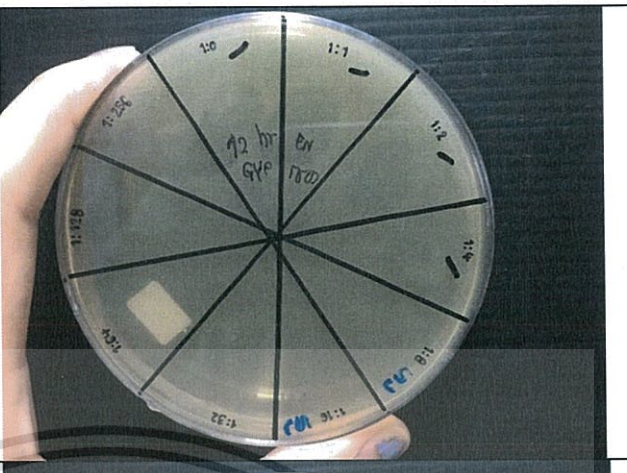


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

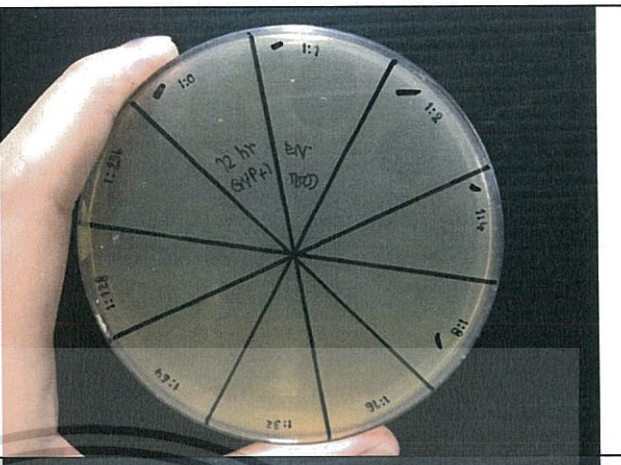
ภาพผนวก ง.5 แสดงความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis*

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
12	MRS กรอง	
12	MRS ต้ม 100°C 10 นาที	
12	MRS ต้ม 100°C 20 นาที	

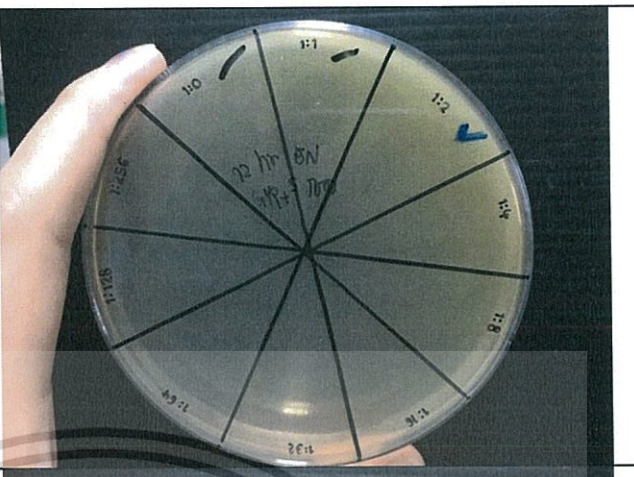
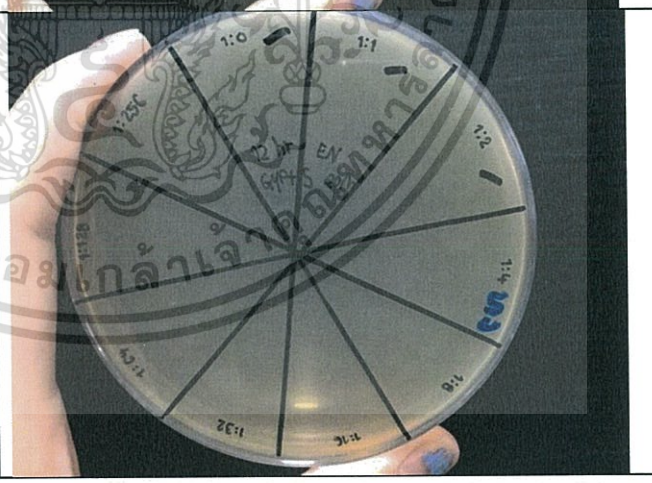
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
12	GYP กรอง	
12	GYP ต้ม 100°C 10 นาที	
12	GYP ต้ม 100°C 20 นาที	

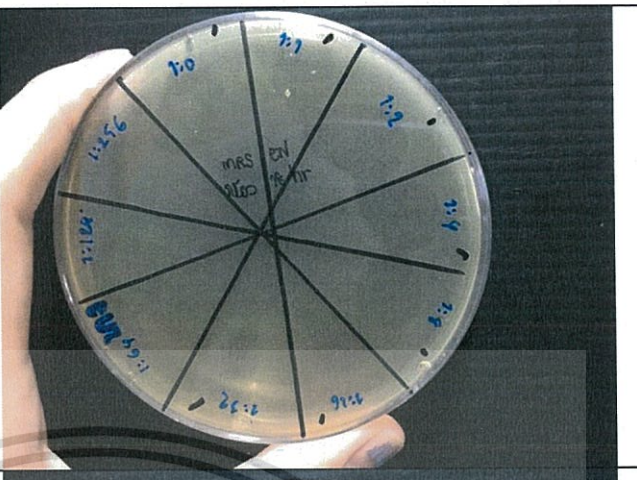
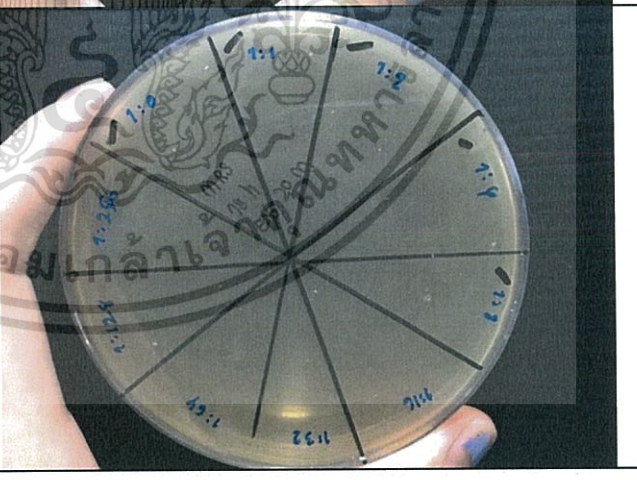
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
12	GYP+Tween80 0.1% กรอง	
12	GYP+Tween80 0.1% ต้ม 100°C 10 นาที	
12	GYP+Tween80 0.1% ต้ม 100°C 20 นาที	

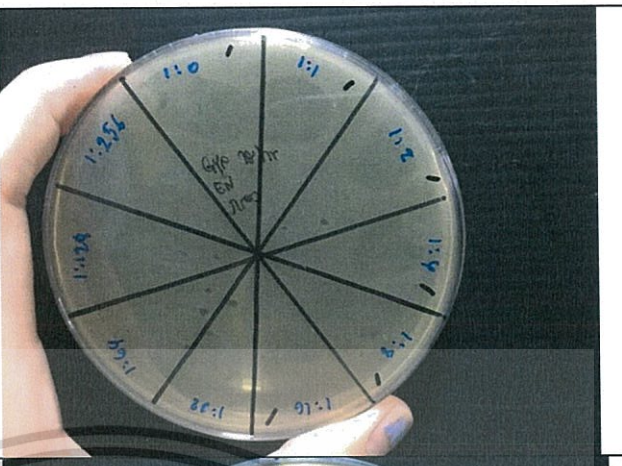
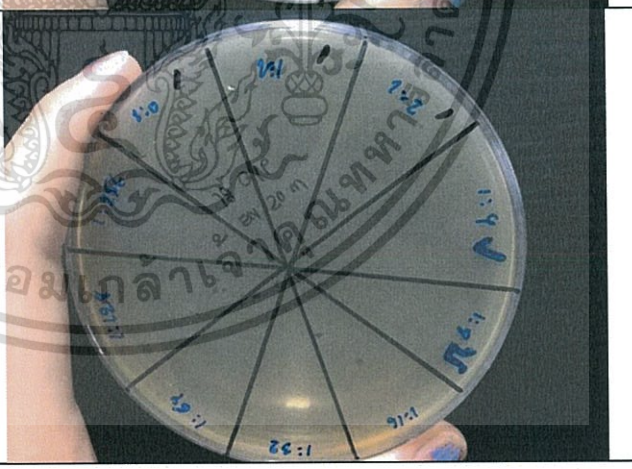
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
12	GYP+Tween80 0.5% กรอง	
12	GYP+Tween80 0.5% ต้ม 100°C 10 นาที	
12	GYP+Tween80 0.5% ต้ม 100°C 20 นาที	

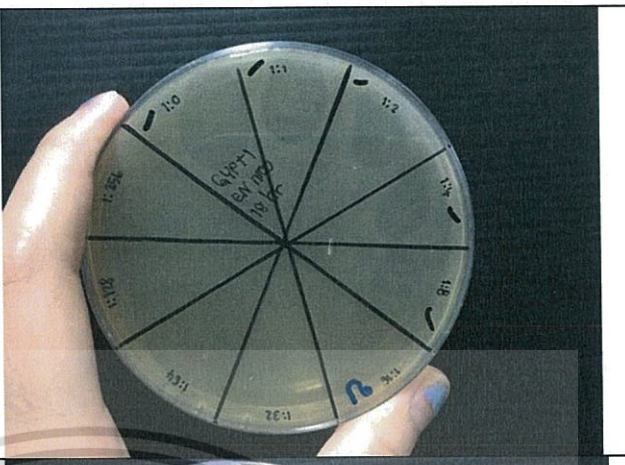
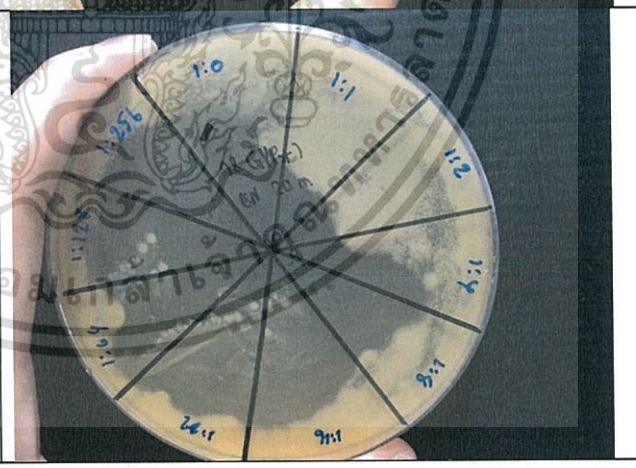
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
18	MRS กรอง	
18	MRS ต้ม 100°C 10 นาที	
18	MRS ต้ม 100°C 20 นาที	

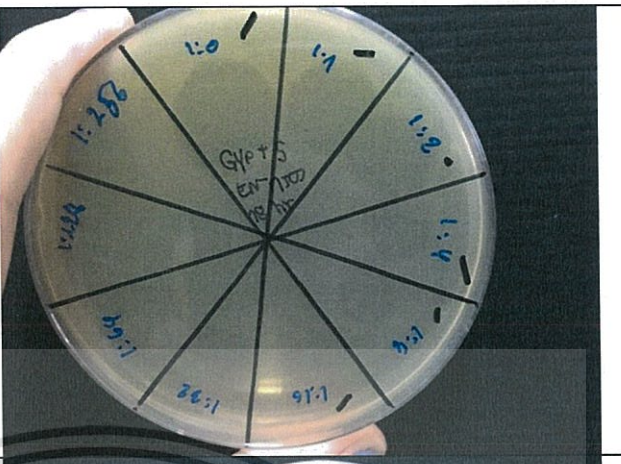
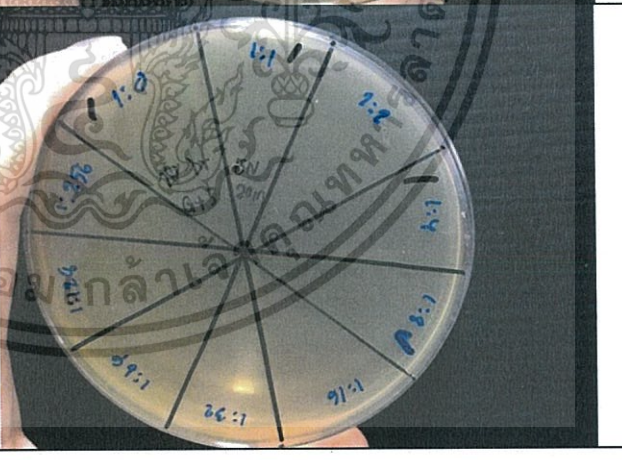
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
18	GYP กรอง	
18	GYP ต้ม 100°C 10 นาที	
18	GYP ต้ม 100°C 20 นาที	

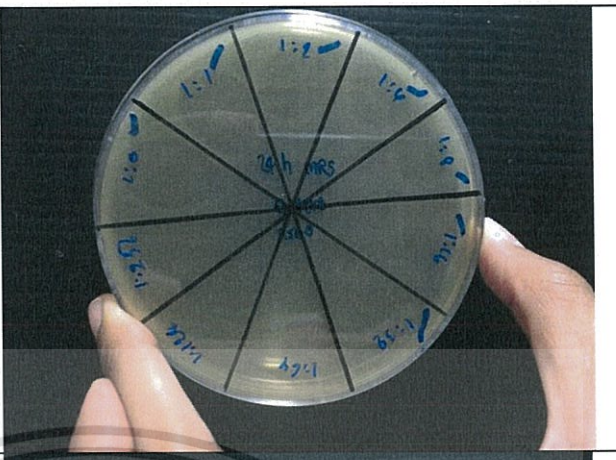
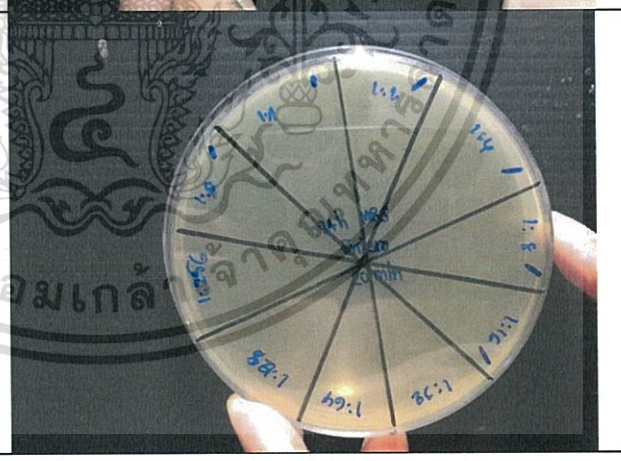
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
18	GYP+Tween80 0.1% กรอง	
18	GYP+Tween80 0.1% ต้ม 100°C 10 นาที	
18	GYP+Tween80 0.1% ต้ม 100°C 20 นาที	

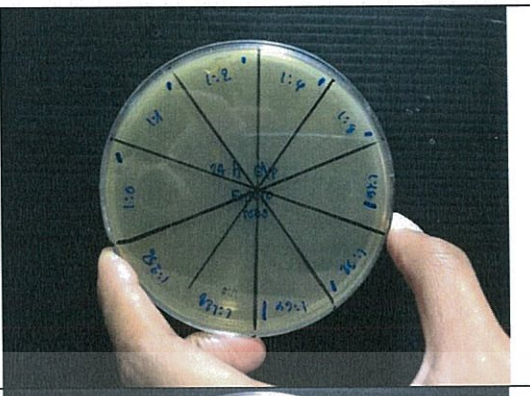
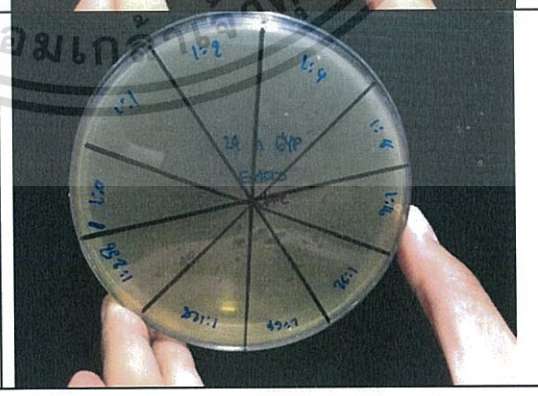
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
18	GYP+Tween80 0.5% กรอง	
18	GYP+Tween80 0.5% ต้ม 100°C 10 นาที	
18	GYP+Tween80 0.5% ต้ม 100°C 20 นาที	

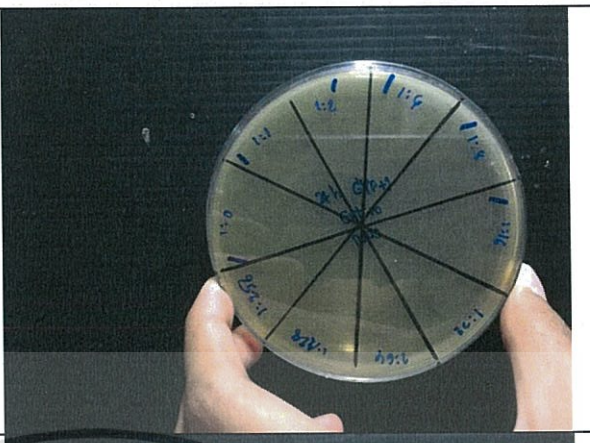
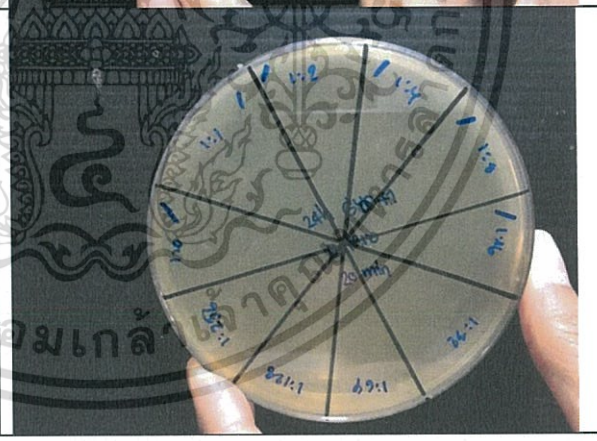
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
24	MRS กรอง	
24	MRS ต้ม 100°C 10 นาที	
24	MRS ต้ม 100°C 20 นาที	

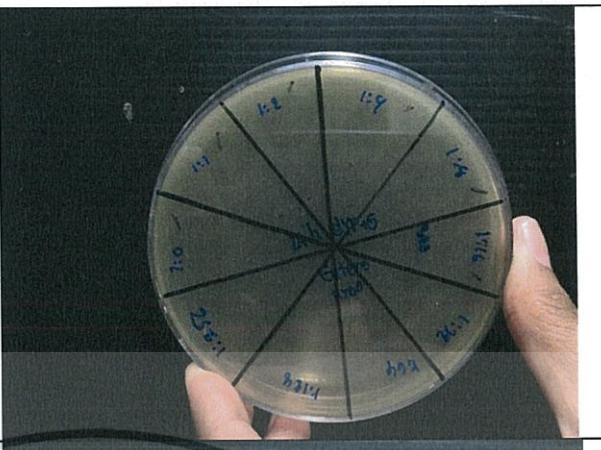
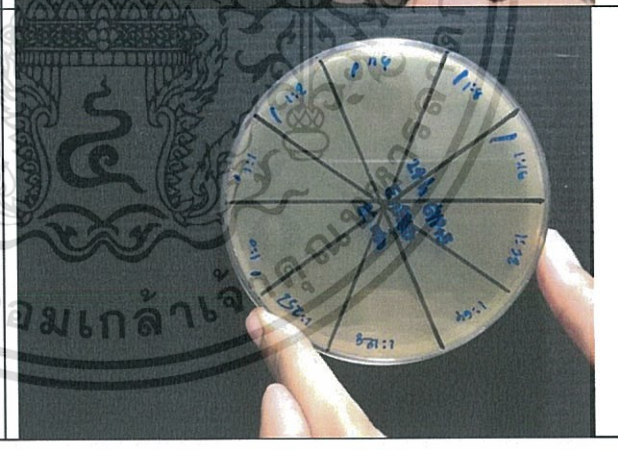
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
24	GYP กรอง	
24	GYP ต้ม 100°C 10 นาที	
24	GYP ต้ม 100°C 20 นาที	
24	GYP Clave 121°C 15 นาที	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

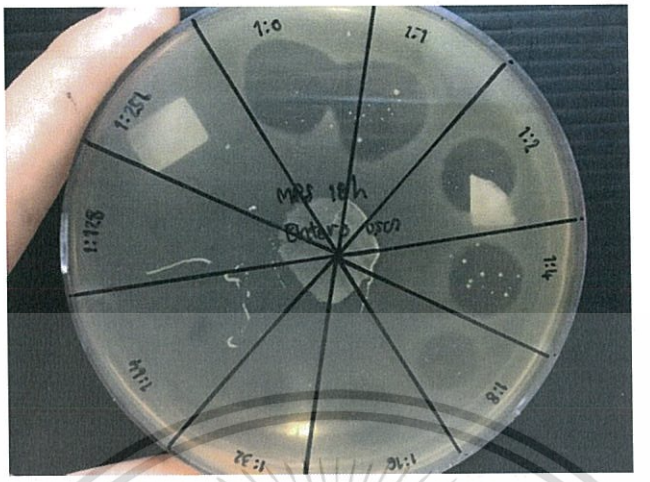
ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
24	GYP+Tween80 0.1% กรอง	
24	GYP+Tween80 0.1% ต้ม 100°C 10 นาที	
24	GYP+Tween80 0.1% ต้ม 100°C 20 นาที	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชั่วโมง	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้ง
24	GYP+Tween80 0.5% กรอง	
24	GYP+Tween80 0.5% ต้ม 100°C 10 นาที	
24	GYP+Tween80 0.5% ต้ม 100°C 20 นาที	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง.6ตัวอย่าง การวัดและการคำนวณค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ

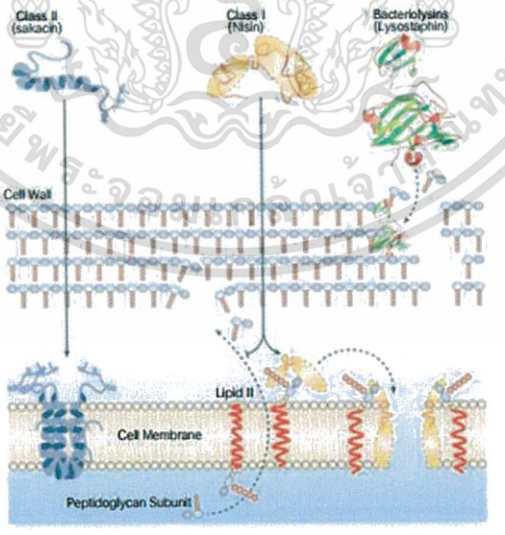


ถ้าปริมาณแบคเทอริโอซิน 10 ไมโครลิตร มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน = 128

ถ้าปริมาณแบคเทอริโอซิน 1000 ไมโครลิตร มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน = $\frac{128 \times 1000}{10}$

= 12800AU/ml

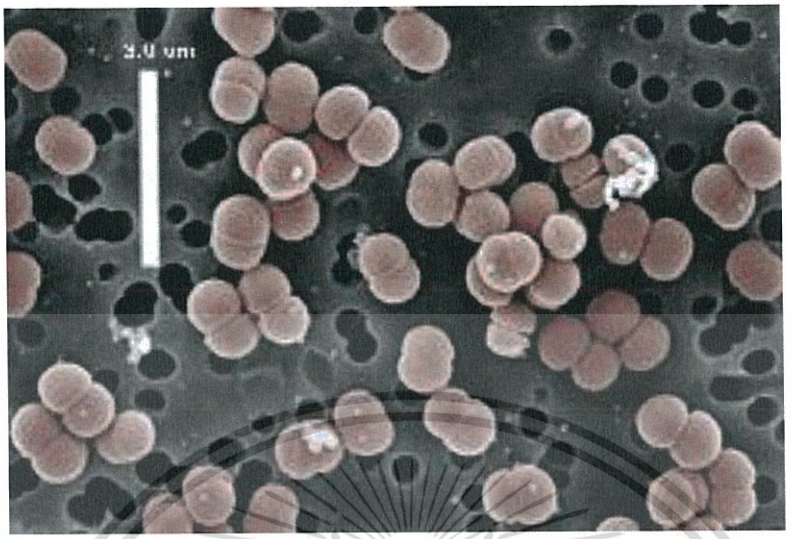
ภาพผนวก ง.7 แสดงกลไกการยับยั้งเซลล์แบคทีเรียของแบคเทอริโอซินต่างๆ



http://www.nature.com/nrmicro/journal/v3/n10/images/nrmicro1273-f2.gif

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวก ง.8เชื้อ Pediococcus pentosaceus TISTR 536



http://genome.jgi.doe.gov/pedpe/pedpe.home.html

ภาพผนวก ง.9 เชื้อ Enterococcus faecalis

https://sciencelife.uchospitals.edu/2015/05/06/in-late-post-surgical-colon-leaks-finger-points-to-microbes/

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวกรกนก เอี่ยมสำอางค์
วัน เดือน ปี เกิด	12 เมษายน 2536
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาคณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต(เทคโนดลยีการหมัก)
ประสบการณ์การทำงาน	ศูนย์วิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์นมและเนื้อสัตว์ กรมปศุสัตว์กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ จังหวัดเชียงใหม่
ผลงานวิจัย	ผลงานวิจัยสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวสุพิชญา รักบัว
วัน เดือน ปี เกิด	15 เมษายน 2537
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาคณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต(เทคโนดลยีการหมัก)
ประสบการณ์การทำงาน	ฝึกงานที่สหกรณ์โคนมในเขตปฏิรูปที่ดินซับสนุ่น จำกัด
ผลงานวิจัย	ผลงานวิจัยสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

ชื่อ-นามสกุล	นางสาวอรพรรณ ทองพิระ
วัน เดือน ปี เกิด	11 ตุลาคม 2536
ประวัติการศึกษา	จบการศึกษาคณะอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต(เทคโนดลยีการหมัก)
ประสบการณ์การทำงาน	ฝึกงานที่สหกรณ์โคนมในเขตปฏิรูปที่ดินซับสนุ่น จำกัด
ผลงานวิจัย	ผลงานวิจัยสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้