การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

SCREENING OF INHIBITORY SUBSTANCE PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA AGAINST *Listeria monocytogenes* IN MEAT PRODUCTS

ณัฐณีวัลย์ เจริญรักษ์
NATTANEEWAN CHAROENRAK

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2555

KMITL-2012-SC-M 020-027

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อ

SCREENING OF INHIBITORY SUBSTANCE PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA AGAINST *Listeria monocytogenes* IN MEAT PRODUCTS

T123001

ณัฐณีวัลย์ เจริญรักษ์

NATTANEEWAN CHAROENRAK

เลขหมู่.........

เลขทะเบียน 123001

วัน,เดือน,ปี 10 ต.ค. 2555

b.

i.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2555

KMITL-2012-SC-M-020-027

SCREENING OF INHIBITORY SUBSTANCE PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA AGAINST *Listeria monocytogenes* IN MEAT PRODUCTS

NATTANEEWAN CHAROENRAK

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF

MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2012

KMITL-2012-SC-M-020-027

COPYRIGHT 2012

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อ Screening of Inhibitory Substance Producing Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes* in Meat Products
นักศึกษา	นางสาวณัฐณีวัลย์ เจริญรักษ์
รหัสประจำตัว	51068304
ปริญญา	วิทยาศาตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.สุขใจ	ชูจันทร์	
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์	
รศ.ดร.สุนีย์	นิธิสินประเสริฐ	
รศ.ดร.สุรีย์	นานาสมบัติ	

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 25 เมษายน พ.ศ. 2555 เวลา 13.00 – 16.00 น.
สถานที่สอบ ณ ห้อง 317 ชั้น 3 อาคารปฏิบัติการใหม่

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศุษณี ธนะบริพัฒน์)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
วันที่...๒๒...**เดือน**...มิ.ย....**พ.ศ**....๕๕....

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อ
นักศึกษา	นางสาวณัฐณีวัลย์ เจริญรักษ์
รหัสประจำตัว	51068304
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2555
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้มีจุดประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกและ *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลส (coagulase-negative staphylococci) จากเนื้อวัว เนื้อหมู เบคอน แหนม และไส้-กรอกอีสานทั้งหมด 50 ตัวอย่าง เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทยโดยได้แยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 403 ไอโซเลต และ coagulase-negative staphylococci ทั้งหมด 19 ไอโซเลตเพื่อนำมาศึกษาคุณลักษณะสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมด 11 ชนิดด้วยเทคนิค agar spot test พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 184 ไอโซเลต (จากจำนวน 403 ไอโซเลต) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด ในจำนวนทั้งหมดนี้พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 25 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส แต่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส ตลอดจนไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ซึ่งไม่ก่อให้เกิดการสะสมสารไบโอเจนิกเอมีนในอาหารหมัก หลังจากที่ทดสอบ agar well diffusion พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำให้เกิดโซนการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* จำนวน 2 ไอโซเลต (จากจำนวน 25 ไอโซเลต) คือ ไอโซเลต LS0602 ซึ่งแยกได้จากแหนมและไอโซเลต LT0904 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกอีสานจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดนี้มาจำแนกชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตนี้มีความสามารถสูงสุดในการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกและกรดแลคติกคือทนได้ที่พีเอชต่ำถึง 1.5 ทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีได้ดีที่ความเข้มข้นสูงสุดถึงร้อยละ 11 และร้อยละ 4-5 ตามลำดับ และจากผลการจำแนกชนิดด้วยการทดสอบทางชีวเคมีและการทดสอบ

ทางชีววิทยาระดับโมเลกุลทำให้สามารถจำแนกได้ว่าแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตดังกล่าวคือเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS 0602 และเชื้อ *Lactobacillus brevis* LT0904 ส่วนการคัดเลือกเชื้อ *Staphylococcus* พบว่ามีเชื้อ *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสเพียง 1 ไอโซเลต (จากจำนวนทั้งหมด 19 ไอโซเลต) ที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส เอนไซม์ในเตรทรีดักเทส และเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส คือ ไอโซเลต SC0903 ที่แยกได้จากเนื้อวัวสดซึ่งเป็นไอโซเลตเดียวที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase และจากผลการทดสอบทางชีวเคมีสามารถจำแนกได้ว่าไอโซเลต SC0903 คือเชื้อ *Staphylococcus xylosus* แต่ผลการทดสอบทางชีววิทยาระดับโมเลกุลได้ระบุว่าเชื้อไอโซเลตนี้คือ *Staphylococcus epidermidis* ดังนั้นจึงได้คัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มาใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และเชื้อ *L. brevis* LT0904 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 25-42 องศาเซลเซียสและที่ระดับพีเอชต่างกัน (พีเอช 4-8) ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งแตกต่างกัน (12,800 AU ต่อมิลลิลิตรเท่ากัน) การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส (30-40 กรัมต่อลิตร) และทริปโตน (10 กรัมต่อลิตร) ในอาหาร MRS สูตรปกติจะช่วยกระตุ้นการผลิตสารยับยั้ง การเติม K_2HPO_4 (5 กรัมต่อลิตร) ทำให้เชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงถึง 25,600 AU ต่อมิลลิลิตรขณะที่ยีสต์สกัด (20 กรัมต่อลิตร) และ K_2HPO_4 (20 กรัมต่อลิตร) ในอาหารเหลว MRS มีผลทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งที่ผลิตโดย เชื้อ *L. brevis* LT0904 สูงถึง 25,600 AU ต่อมิลลิลิตร นอกจากนี้สารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 จะถูกกระตุ้นในอาหารเหลว MRS ที่เติม KH_2PO_4 ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร แทน K_2HPO_4 ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร จากนั้นนำสารยับยั้งในส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำไดอะไลซิส และการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก และนำมาศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์พบว่าสารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงสุด 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ส่วนสารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ไม่สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อได้รับความร้อนที่อุณหภูมิสูงสุด 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สารยับยั้งจากเชื้อทั้งสองมีความคงตัวในสภาวะที่มีพีเอช 2-7 และคงตัวต่อเอนไซม์ต่าง ๆ (เอนไซม์ทริปซิน เปปซิน แอลฟา-อะไมเลส ไลเปส และปาเปน) นอกจากนี้สารยับยั้งจากเชื้อทั้งสองยังสามารถยับยั้ง *List. monocytogenes* ในอาหารเหลว MRS ได้ดีจึงได้ทดลองใช้สารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อทั้งสองในการควบคุมการเจริญของ *List. monocytogenes* ในหมูบดที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

และในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าสารยับยั้ง (ร้อยละ 4) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ให้ผลดีกว่าการเติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ในการลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ทั้งหมดในหมูบดแช่เย็น (4 องศาเซลเซียส) ส่วนการเติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนม พบว่าเติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับการเติมกล้าเชื้อ *L. Plantarum* LS0602 สามารถลดจำนวน *List. monocytogenes* ในแหนมได้ถึง 1.5 log cycle หลังจากที่หมักครบ 3 วัน

คำสำคัญ : สเตรปฟีโลคอกคัส แบคทีเรียกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม กล้าเชื้อ

Thesis Title	Screening of Inhibitory Substance Producing Lactic Acid Bacteria Against *Listeria monocytogenes* in Meat Products
Student	Nattaneewan Charoenrak
Student ID	51068304
Degree	Master of Science
Program	Biotechnology
Year	2012
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Suree Nanasombat

ABSTRACT

The aims of this study were to screen lactic acid bacteria (LAB) and coagulase negative staphylococci (CNS) from 50 samples of raw beef, raw pork, bacon, nham and saigrokisan (Thai fermented pork sausages) to select the most suitable strains for use as meat starter cultures. The 403 LAB and 19 coagulase-negative staphylococci isolates were characterized. The 184 LAB isolates inhibited growth of at least one of 11 indicator organisms by agar spot test. Twenty-five LAB isolates were nitrate reductase positive, nitrite reductase and catalase negative and amino acid decarboxylase negative which may not accumulate biogenic amine in fermented foods. After performing agar well diffusion test, two LAB isolates (the isolate S0602 isolated from nham and T0904 isolated from saigrokisan) which produced inhibition zone against *Listeria monocytogenes* were selected for identification. These two LAB isolates had the highest ability to resist the lowest pH (pH 1.5) of hydrochloric and lactic acids, and tolerate the highest concentration of sodium chloride (11% w/v) and bile salts (4-5% w/v). From the results of biochemical and molecular identifications, they were identified as *Lactobacillus plantarum* LS0602 and *Lactobacillus brevis* LT0904. The only one of 19 selected CNS isolates with catalase, nitrate and nitrite reductase positive was the isolate SC0903 isolated from raw beef. This bacterium was amino acid decarboxylase negative. The results of biochemical test revealed that it was *Staphylococcus xylosus*, but the results of molecular

identification showed that it was *Staphylococcus epidermidis*. Therefore, the only two LAB isolates (*L. plantarum* LS0602 and *L. brevis* LT0904) were selected for use in the next experiment.

The optimization of temperature, pH and medium components for production of inhibitory substances by *L. plantarum* LS0602 and *L. brevis* LT0904 to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* were studied. No significant differences in activity of inhibitory substances were observed when both strains were cultured in MRS broth at 25-42 °C and pH 4-8 (12,800 AU/ml). Increased concentration of glucose (30-40 g/l) and tryptone (10 g/l) in normal formulation of MRS broth stimulated the production of inhibitory substances. Maximum activity of the inhibitory substances produced by *L. plantarum* LS0602 (25,600 AU/ml) was recorded in MRS broth with 5g/l K_2HPO_4, while 20 g/l yeast extract and 20 g/l K_2HPO_4 in MRS broth resulted in an increase of inhibitory substance activity by *L. brevis* LT0904. In addition, inhibitory substance produced by *L. brevis* LT0904 was stimulated in MRS broth with 2g/l K_2HPO_4 replaced by 2g/l KH_2PO_4. Then, the inhibitory substances in cell-free supernatant were partially purified by ammonium sulfate precipitation, dialysis and trichloroacetic acid precipitation, and subsequently tested for their stability to heat, pH and enzymes. The inhibitory substances from *L. plantarum* LS0602 and *L. brevis* LT0904 were not inactivated after treatment at highest temperature of 85°C for 30 min and 72°C for 30 min, respectively. The inhibitory substances from both strains maintained full stability at pH 2-7 and after treatments with α-amylase, lipase, papain, pepsin and trypsin. They also exhibited strong inhibitory activity against *List. monocytogenes* in MRS broth. Then, these inhibitory substances were used to control the growth of *List. monocytogenes* in ground pork during storage at 4°C and nham during fermentation at 30°C. The inhibitory substances (4%) produced by *L. plantarum* LS0602 were more effective to reduce the number of total bacterial and total presumptive *List. monocytogenes* counts in chilled ground pork than those produced by *L. brevis* LT0904, whereas the inhibitory substances (4%) in combination with *L. plantarum* LS0602 starter culture could reduce the number of total presumtive *List. monocytogenes* in nham for 1.5 log cycle after 3-day fermentation.

Keywords: *Staphylococcus*; lactic acid bacteria; cured meat product; starter culture

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาของอาจารย์ รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ได้ให้ความรู้ ให้คำชี้แนะ ช่วยแก้ไขปัญหาต่าง ๆ ให้แก่ข้าพเจ้าเพื่อให้วิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ซึ่งให้ความรู้ ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้คำชี้แนะและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ รศ. สุขใจ ชูจันทร์ และ รศ.ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ซึ่งเป็นคณะกรรมการสอบหัวข้อวิทยานิพนธ์และได้กรุณาให้คำแนะนำอีกทั้งยังเสียสละเวลาให้คำปรึกษาจนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลง

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย บัณฑิตคณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการสาขาชีววิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกด้านเอกสารและติดต่อประสานงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่คอยช่วยเหลืออำนวยความสะดวกด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

ขอบคุณพี่ เพื่อน และน้อง ๆ สาขาชีววิทยาที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้า

และสุดท้ายต้องกราบขอบพระคุณบิดามารดาของข้าพเจ้าที่คอยให้กำลังใจ ให้การสนับสนุนในทุกด้าน พร้อมทั้งช่วยเหลือและเสียสละเพื่อข้าพเจ้าเสมอมา

ณัฐณีวัลย์ เจริญรักษ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ IV

กิตติกรรมประกาศ VI

สารบัญ VII

สารบัญตาราง XI

สารบัญรูป XV

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์การทดลอง 3

1.3 ขอบเขตการทดลอง 4

1.4 ขั้นตอนการทดลอง 4

บทที่ 2 หลักการและทฤษฎี 6

2.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม 6

2.1.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์ 6

2.1.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม 7

2.2 กล้าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมัก 7

2.2.1 คุณสมบัติของกล้าเชื้อ 7

2.2.2 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหาร 9

2.3 แบคเทอริโอซิน 11

2.3.1 การทำโปรตีนให้เข้มข้นและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ขั้นต้น (concentration and primary purification of proteins) 12

2.3.2 การคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะผลผลิตและปัจจัยในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ 13

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง 21
3.1 อุปกรณ์ 21
3.1.1 ตัวอย่างเนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์บ่ม 21
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์...21
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ...21
3.1.4 สารละลายและสารเคมี 22
3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์ 23
3.2 วิธีการทดลอง 24
3.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์...........................24
3.2.2 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก
ทั้งหมด และMicrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์.............26
3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ 27
3.2.4 การคัดเลือก coagulase negative Staphylococci ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อ
การใช้เป็นกล้าเชื้อ...34
3.2.5 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก และ Coagulase-negative
Staphylococcus ที่คัดเลือกด้วยการทดสอบกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน
ด้วยวิธี agar well diffusion...37
3.2.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์
ของยีน 16S rDNA 38
3.2.7 การผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกและการประยุกต์
ใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม 41
3.2.8 การศึกษาการนำสารยับยั้งมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ
Listeria monocytogenes ในอาหารเหลว 46
3.2.9 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อ
โดยใช้สารยับยั้งที่ผลิต โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก 47

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ....50

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์....51

4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม....51

4.2 การตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด และจำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม....52

4.3 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ....54

4.3.1 ผลการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี Agar spot test....54

4.3.2 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้....55

4.3.3 การทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดี และโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก....58

4.4 การคัดเลือก *Staphylococcus* ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ....60

4.4.1 การแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus*....60

4.4.2 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Staphylococcus* ที่คัดแยกได้....61

4.4.3 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณลักษณะทางชีวเคมี....60

4.5 การจำแนกชนิดของ Coagulase-negative *Staphylococcus* ที่คัดแยกได้จากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม....63

4.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา....63

4.5.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อจำแนกชนิดของ Coagulase-negative *Staphylococcus* โดยใช้ชุดทดสอบ API Staph....64

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.6 ผลการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก และ Coagulase-negative *Staphylococcus* ที่คัดเลือกด้วยการทดสอบกิจกรรมของสารยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion 64
4.7 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA 65
4.7.1 ผลการวิเคราะห์ลำดับจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอีเล็กโตโพเรซีส....65
4.7.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอร์เรส 65
4.7.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์....67
4.8 ผลการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกและการประยุกต์....67
ใช้เป็นสารยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อ 67
4.8.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง....67
4.8.2 การศึกษาการทำสารยับยั้งให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ของสารยับยั้ง....75
4.8.3 ผลของอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารยับยั้งบริสุทธิ์ในการยับยั้งของการเจริญ *Listeria monocytogenes*....79
4.9 ผลการนำสารยับยั้งมาใช้ในการต้านการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว 82
4.10 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อโดยใช้สารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก 81
4.10.1 การศึกษาผลของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็น....84
4.10.2 การศึกษาผลของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในแหนม 88

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 92
บรรณานุกรม 96
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารเคมี 107
ภาคผนวก ข วิธีการทดลองเพิ่มเติมและรายละเอียดเกี่ยวกับสารเคมี 111
ภาคผนวก ค วิธีการคำนวณ 128
ภาคผนวก ง ผลการทดลองในหมูและแหนม 129

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ความแตกต่างของแบคทีเรีย gram-positive, catalase-positive 10

2.2 แบคเทอริโอซินทีผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก 12

2.3 วิธีการและเทคนิคที่ใช้เพื่อตกตะกอนโปรตีนจากสารละลาย 14

2.4 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ 20

3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลต 40

4.1 คุณลักษณะทางเคมีของเนื้อวัวสด เนื้อหมูสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน 51

4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก และ Micrococcaceae ในเนื้อหมู เนื้อวัว เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน 53

4.3 การสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส และการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ของแบคทีเรียกรดแลคติก 56

4.4 การทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก 59

4.5 การแยกเชื้อ *Staphylococcus* และ *Micrococcus* ของแบคทีเรียในวงศ์ Micrococcaceae 61

4.6 การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรทรีดักเทสไ นไตรท์รีดักเทส และการมีกิจกรรมของเอนไซม์amino acid decarboxylaseของ*Staphylococcus*ที่คัดเลือก 63

4.7 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* 68

4.8 พีเอชที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* 69

4.9 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน 70

4.10 การทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในขั้นตอนต่าง ๆ 84

4.11 ผลของความคงตัวของสารแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ 81

4.12 ค่าพีเอชของหมูบดที่เก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน 86

4.13 กิจกรรมของสารยับยั้งในการต้านการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 87

4.14 ค่าพีเอชของแหนมที่หมักที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 90

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.15 กิจกรรมของสารยับยั้งในการต้านการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน 90

ข.1 ส่วนประกอบของสารคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH strips) และทั้ง 50 ชนิด และผลการทดสอบ 111

ข.2 ส่วนประกอบของสารเคมีชนิดแห้ง (API staph strips) ทั้ง 20 ชนิด 115

ข.3 สารเคมี (Reagents) ที่ใช้ได้กับชุดทดสอบโปรตีน quick start bradford เมื่อใช้วิธีการมาตรฐาน* 118

ข.4 ปริมาตรของตัวอย่างหรือสารละลายโปรตีนและปริมาตรของสีย้อมที่ใช้ ในการวิเคราะห์ 119

ข.5 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร) 120

ข.6 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (สารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS0602) 122

ข.7 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (สารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus brevis* LT0904) 118

ข.8 การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อใช้ในการตกตะกอนโปรตีน 125

ง.1 จำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน (ครั้งที่ 1) 130

ง.2 จำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน (ครั้งที่ 2) 131

ง.3 จำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน (ครั้งที่ 3) 132

ง.4 จำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน 133

ง.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน 134

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ง.6 จำนวนจุลินทรีย์ในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน (ครั้งที่ 1) 135

ง.7 จำนวนจุลินทรีย์ในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน (ครั้งที่ 2) 136

ง.8 จำนวนจุลินทรีย์ในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน (ครั้งที่ 3) 137

ง.9 จำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน 138

ง.10 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในแหนมในระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน 139

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 ผลของความเข้มข้นเกลือต่อการละลายของโปรตีน....15
2.2 โครงสร้างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้กันมากในการตกตะกอนโปรตีน....17
2.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการไดอะไลซิส....19
4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก....66
4.2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA....66
4.3 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว TrypticSoybroth (TSB)....83
4.4 ผลการเปลี่ยนแปลง (ก) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (ข) จำนวน*List.monocytogenes* ทั้งหมด ที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก....85
4.5 ผลการเปลี่ยนแปลง (ก) จำนวน *List. monocytogenes*ทั้งหมด (ข) จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ที่เติมสารยับยั้งร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก....89
ข.1 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานให้ได้ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ....121
ข.2 กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน (ก) คือ ครั้งที่ 1 (ข) คือ ครั้งที่ 2 (ค) คือ ครั้งที่ 3....123
ข.3 ความยาวของถุงไดอะไลซิสที่ใช้ในการทดลอง....126

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กล้าเชื้อ (starter culture) เป็นจุลินทรีย์ที่เติมในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเนื่องจากช่วยพัฒนาคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (Leroy และคณะ. 2006) มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Jiménez-Colmenero และคณะ. 2001) และยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้ออื่นที่ไม่ต้องการ (Hugas และ Monfort. 1997) โดยกล้าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมักมักมีคุณสมบัติหลายประการเช่น ความเป็นโพรไบโอติก (Leroy และคณะ. 2006) มีกิจกรรมการสลายโปรตีนและไขมัน การไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลส มีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรทรีดัก-เทส และไนไตรท์รีดักเทส (Holzapfel. 1998) เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative staphylococci ก็มีคุณสมบัติหลายประการที่เหมาะสำหรับการเป็นกล้าเชื้อซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มที่มีคุณภาพและปลอดภัย (Hugas และ Monfort. 1997) ด้วยเหตุนี้จึงควรคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative staphylococci สายพันธุ์ใหม่จากเนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและเนื้อสัตว์บ่มเช่น เนื้อหมูสด เนื้อวัวสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน ซึ่งมีสมบัติเหมาะสมหลายประการดังที่กล่าวมาเพื่อจำแนกชนิดและนำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนต่อไป

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมหรือรูปร่างท่อน ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมักคาร์โบไฮเดรต พบได้ทั่วไปในแหล่งที่อุดมด้วยสารอาหารเช่น ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์เนื้อและอื่น ๆ (Axelsson. 2004) ได้มีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สามารถผลิตสารยับยั้งที่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้แก่ *Aeromonas hydrophila, Brochothrix* spp., *Listeria monocytogenes, Listeria innocua* และ *Staphylococcus aureus* (Castro และคณะ. 2011 ; Lewus และคณะ. 1991) แบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์มีกลไกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยการผลิตกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไลโซไซม์ ไดอะซิทิล และแบคเทอริโอซิน (Halzapfel. 1995)

แบคเทอริโอซินเป็นสารยับยั้งที่สำคัญโดยจัดเป็น ribosomally-systhesized peptides หรือโปรตีนที่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ สารนี้ถูกผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียหลายกลุ่ม แบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้กว้าง (Gálvez และคณะ. 2007) มีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีศักยภาพสูงในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้แก่ *Enterococcus faecium* (ผลิต enterocin) *Lactococcus lactis* (ผลิตไนซิน) *Lactobacillus sakei* (ผลิต sakacin) *L. plantarum* (ผลิต

plantaricin) และ *Pediococcus acidilactici* (ผลิต pediocin) เป็นต้น (Aymerich และคณะ. 2000 ; Enan และคณะ. 2002 ; Hugas และคณะ. 2002)

แบคทีเรีย *Lactobacillus* spp. ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินเคยถูกแยกได้จากหลายแหล่ง เช่น เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ (*L. plantarum* UG1 ที่แยกได้จากไส้กรอกแห้งซึ่งผลิต plantaricin UG1) (Enan และคณะ. 1996) นมและผลิตภัณฑ์นม (*L. plantarum* AMA-K ที่แยกได้จากนมที่หมักตามธรรมชาติซึ่งผลิตแบคเทอริโอซิน AMA-K และ *L. plantarum* KLDS1.0391 ที่แยกได้จากครีมหมัก ซึ่งผลิต plantaricin MG) (Todorov และคณะ. 2007 ; Gong และคณะ. 2010)

แบคเทอริโอซินเป็นสารปฐมภูมิ (primary metabolites) เพราะการสร้างแบคเทอริโอซินเริ่มขึ้นในช่วงต้นของระยะ exponential (early exponential phase) และเสร็จสิ้นสมบูรณ์ในช่วงปลายของระยะ exponential หรือช่วงต้นของระยะ stationary (early stationary phase) การผลิตแบคเทอริโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติกได้รับผลกระทบจากปัจจัยหลายประการได้แก่ ค่าพีเอช อุณหภูมิ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Drosinos และคณะ. 2006) เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีผู้ศึกษาวิจัยกันมากเกี่ยวกับการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก โดยมีจุดประสงค์ในการส่งเสริมให้เชื้อสร้างแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุด สำหรับการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินที่ทำกันมากได้แก่ การ optimization สารอาหารที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อการเจริญรวมทั้งค่าพีเอช และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อให้ได้กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์สูงสุด การศึกษาการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ การศึกษาความคงตัวของแบคเทอริโอซินต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ การศึกษากลไกการทำงาน (mode of action) และการศึกษากิจกรรมการต้านจุลินทรีย์ (activity spectrum) รวมทั้งการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ (González และคณะ. 1994 ; Ogunbanwo และคณะ. 2003 ; Todorov และคณะ. 2011)

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ สามารถก่อให้เกิดโรค listeriosis ซึ่งเป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากการติดเชื้อจากการรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนแบคทีเรียชนิดนี้ *List. monocytogenes* เคยถูกพบว่าปนเปื้อนในน้ำนมดิบ เนยแข็งชนิดอ่อน (soft cheeses) เนื้อสด และเนื้อแช่แข็ง เนื้อไก่และผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ตลอดจนผลไม้และผัก (Jay และคณะ. 2005) ได้มีรายงานเกี่ยวกับการปนเปื้อนในเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อหลายประเทศ เช่น ในเนื้อวัวสด เนื้อหมูสด ไส้กรอกสดชนิดแห้ง และชนิดรมควันในประเทศบัลกาเรีย (Karakolev. 2009) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มที่ผ่านการปรุงสุก ผลิตภัณฑ์เนื้อบ่มชนิดแห้งและไส้กรอกหมัก ที่มีการนำเข้าและส่งออกของประเทศสวิสเซอร์แลนด์ (Jemmi และคณะ. 2002) ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคจึงจำเป็นต้องศึกษาเกี่ยวกับการควบคุมการเจริญของ *List. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อ ในระยะ 10 ปีที่ผ่านมาผู้บริโภคมีความต้องการลดการใช้สารเคมีในอาหารงานวิจัยส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาสารต้านจุลินทรีย์จากธรรมชาติโดยเฉพาะสาร

แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่ใช้ในการหมักอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกมีสมบัติที่เหมาะสมหลายประการสำหรับใช้เป็นสารถนอมอาหารเช่น เป็นสารที่ได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าเป็นสารที่ปลอดภัย (recognized as safe substances) ไม่เป็นพิษต่อยูคาริโอติกเซลล์ (eukaryotic cells) ถูกย่อยโดย digestive proteases ซึ่งมีผลเล็กน้อยต่อจุลินทรีย์ในลำไส้ ทนต่อความร้อนและสภาพพีเอชที่ไม่เหมาะสมได้ดี มีกิจกรรมต้านจุลินทรีย์ได้หลายชนิดทั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย มีกลไกทำลายเชื้อ (bacterial mode of action) ที่ส่งผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ ไม่มีความต้านทานข้าม (no cross resistance) ต่อยาปฏิชีวนะ (Gálvez และคณะ. 2007) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อมาประยุกต์ใช้ในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีการรายงานถึงประสิทธิภาพที่ดีของแบคเทอริโอซินหรือแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินในการต้านเชื้อ *List. monocytogenes* ในเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อได้แก่ ไส้กรอกหมักแห้ง (Työppönen (née Erkkilä) และคณะ. 2003) ไส้กรอกดิบ (merguez) (Benkerroom และคณะ. 2003) และเนื้อวัว (Vignolo และคณะ. 1996) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* และ *L. brevis* มาประยุกต์ใช้ในเนื้อหมูบดแช่เย็นและแหนมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes*

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1.2.1 เพื่อศึกษาคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของเนื้อหมูสด เนื้อวัวสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน

1.2.2 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative staphylococci ที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

1.2.3 เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และสมบัติทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

1.2.4 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

1.2.5 เพื่อศึกษาการทำสารยับยั้งให้บริสุทธิ์และศึกษาความคงทนของสารยับยั้ง

1.2.6 เพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้สารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในการควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* หมูบดและแหนม

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

ศึกษาคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของเนื้อหมูสด เนื้อวัวสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสานได้แก่ พีเอช ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) และปริมาณไนไตรท์ตกค้าง จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative staphylococci โดยแบคทีเรียกรดแลคติกคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ คัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือโซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดี คัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่สร้างอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส ส่วน coagulase-negative staphylococci ต้องทดสอบการไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส โดยทั้งแบคทีเรียกรดแลคติก และสเตรปฟิโลคอกคัส ต้องผ่านทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส พร้อมทั้งจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกและ coagulase-negative staphylococci ที่คัดเลือกได้เพื่อนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยสารยับยั้ง จากนั้นศึกษาเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งและนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำไดอะไลซิส และการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก แล้วนำสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาศึกษาผลของอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารเหลวก่อนนำมาศึกษาผลของสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนซึ่งผลิตจากแบคทีเรียที่คัดเลือกต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในหมูบดแช่เย็นและการศึกษาสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในแหนม

1.4 ขั้นตอนการดำเนินงาน

1.4.1 การศึกษาคุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของเนื้อหมูสด เนื้อวัวสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน (ชนิดละ10 ตัวอย่าง) ที่สุ่มตัวอย่างมาจากตลาดสดในเขตลาดกระบัง กรุงเทพฯ และจังหวัดสมุทรปราการ โดยนำมาวิเคราะห์ค่าพีเอช ปริมาณน้ำอิสระ (a_w) และปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

1.4.2 การคัดเลือกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative staphylococci ที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ

1.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และคุณสมบัติทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

1.4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมได้แก่ อุณหภูมิ พีเอช และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารยับยั้งโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

1.4.5 การศึกษาการทำสารยับยั้งให้บริสุทธิ์และศึกษาความคงทนของสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์

1.4.6 การศึกษาการนำสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาประยุกต์ใช้เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* หมูบดและแหนม

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

2.1.1 จุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบอาหารที่เกิดการเน่าเสียได้ง่าย หลังจากที่สัตว์ถูกฆ่าและเอาอวัยวะภายในออกแล้ว เนื้อสัตว์ยังคงมีสภาวะทางจุลินทรีย์เหมือนกับในช่วงก่อนฆ่า บริเวณผิวนอกของสัตว์ เช่น ขน หนัง ตามปกติจะมี ดิน ทราย และน้ำซึ่งมีจุลินทรีย์ปะปนอยู่ และในลำไส้และกระเพาะ จะปรากฏว่าพบจุลินทรีย์ค่อนข้างสูงถึงแม้ว่าในสัตว์ที่มีสุขภาพอนามัยแข็งแรงสมบูรณ์เป็นปกติดีนั้น อาจมีจุลินทรีย์ในตับ ไต ต่อมต่าง ๆ และม้าม ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้อาจเข้าสู่กล้ามเนื้อได้จากระบบหมุนเวียนโลหิต แต่ส่วนใหญ่ที่พบในการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อาจเริ่มเกิดขึ้นจากกระบวนการฆ่าตั้งแต่กระบวนการแทงคอเอาเลือดออก โดยจุลินทรีย์จากอวัยวะภายในและจากระบบหมุนเวียนโลหิตถูกกระจายไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับสิ่งแวดล้อมภายนอกเป็นต้นว่า ขั้นตอนในการดำเนินการ เครื่องมือ ผู้ดำเนินการ เป็นต้น (สัญชัย. 2543)

การสำรวจสภาวะที่เสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ของเนื้อสัตว์ขณะถูกฆ่าและเนื้อสัตว์ที่ขายตามท้องตลาดจากสุขภาพสัตว์ หนัง อวัยวะภายใน มูล และจุลินทรีย์ในปาก พบว่าซากสัตว์ที่อาจเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในกระบวนการตัดแต่งซาก สำหรับวัวและแกะนั้น การปนเปื้อนของจุลินทรีย์เริ่มตั้งแต่หนังและขนของสัตว์ซึ่งมักพบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิด และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์อย่างเช่น *Pseudomonas, Acinetobacter*, *Moraxella*, *C. perfringens, S. aureus, Salmonella* spp., *E. coli, Campylobacter* spp., *Y. enterocolitica, L. monocytogenes* และ *A. hydrophila* (Gill และ Jones. 1995) และสามารถแบ่งจุลินทรีย์ตามชนิดที่พบบ่อยในเนื้อสัตว์ได้ดังนี้

ก) แบคทีเรีย ได้แก่ *Pseudomonas, Alcaligenes, Micrococcus, Streptococcus, Sarcina, Leuconostoc, Lactobacillus, Proteus, Flavobacterium, Bacillus, Clostridium, Escherichia* และ *Salmonella* เป็นต้น

ข) ยีสต์ ได้แก่ *Candida, Debaryomyces, Rhodotorula* และ *Torulopsis* เป็นต้น

ค) เชื้อรา ได้แก่ *Alternaria, Aspergillus, Cladosporium, Geotrichum, Monilia, Mucor, Penicillium, Rhizopus, Sporotrichum* และ *Thamnidium* เป็นต้น

2.1.2 จุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มได้แก่ ไส้กรอกอีสาน แหนม ปลาร้า เป็นต้น ผ่านกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติจากกิจกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก โดยไม่มีการควบคุมคุณภาพการหมักจากการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรีย แต่ในระยะหลังได้มีการศึกษาเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อนำกล้าเชื้อไปใช้ในการผลิตอาหารหลายชนิดรวมถึงในกลุ่มอาหารหมักพื้นเมือง (De Vuyst และ Vandamme. 1994 ; Hammes และ Knauf. 1994) ทั้งนี้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการผลิตกล้าเชื้อสำหรับพัฒนาการหมักผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพในเช่น ไส้กรอกที่หมักตามธรรมชาติมักจะพบแบคทีเรียกรดแลกติกพวก *Lactobacillus* เจริญเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะ *L. plantarum, L. brevis, L. alimentarius* และ *L. carvatus* ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการหมักไส้กรอกที่มีการเติมซูโครสและนมผงร่วมด้วยและบ่อยครั้งที่จะใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้เป็นกล้าเชื้อซึ่งจะให้กลิ่นรสที่ดีและช่วยในการถนอมอาหาร โดย *L. sake* และ *L. curvatus* เจริญได้ดีที่ค่า a_w ต่ำ โดยจะพบว่าเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่า 25 องศาเซลเซียสและที่อุณหภูมิสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส พบ *L. plantarum* เจริญในไส้กรอกที่หมักตามธรรมชาติ (Kröckel. 1995) ในการหมักด้วยวิธีดั้งเดิม ส่วนใหญ่จะใช้ไนเตรทเป็นสาร curing agent และพบจุลินทรีย์พวก nitrate-reducing micrococci ได้แก่ *Micrococcus varians, Staphylococcus carnosus, Staphylococcus xylosus* หรือ *Staphylococcus piscifermentans* ซึ่งมีความสำคัญในการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพสีเหมาะสม และมีความปลอดภัยโดยจะช่วยยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum* เนื่องจากการปล่อยให้เกิดการหมักเองโดยจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติทำให้โอกาสที่จะได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเหมาะสมมีน้อย ดังนั้นในอุตสาหกรรมการผลิตไส้กรอกหมักส่วนใหญ่จึงนิยมเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียลงไป (Marshall และ Bal'A. 2001)

2.2 กล้าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมัก

2.2.1 คุณสมบัติของกล้าเชื้อจุลินทรีย์

2.2.1.1 การผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นเปปไทด์ที่ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นหรือผลิตโดยแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียซึ่งเจริญแข่งขันกันกับสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินซึ่งแบคทีเรียก่อโรคที่มักถูกยับยั้งได้แก่ *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* (Holzapfel. 1998) ทั้งนี้จึงนำแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินมาใช้ในอุตสาหกรรมเนื้อสัตว์ซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่เป็นการป้องกันอาหารโดยธรรมชาติ แบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินส่วน

ใหญ่นิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกเช่น *L. sakei, L. curvatus, L plantarum L. brevis L. plantarum* ซึ่งมักพบการผลิตสารแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังมี *Enterococcus faecium* ที่นิยมใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็งและไส้กรอก (Leroy และคณะ. 2006)

2.2.1.2 กิจกรรมการสลายโปรตีน (proteolytic activity)

ในแบคทีเรียแกรมบวกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีกิจกรรมการสลายโปรตีนปริมาณน้อย แต่อาจจะพบปริมาณสูงในกิจกรรมแบคทีเรียในกลุ่ม Lactobacilli ของเอนไซม์เปปติเดสภายนอกเซลล์มากกว่าภายในเซลล์ นอกจากนี้สามารถแยก *Lactococcus lactis* ที่ผลิตได้ในผลิตภัณฑ์นม ส่วนในแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเนสได้ แต่ยังไม่สามารถอธิบายถึงกิจกรรมการสลายโปรตีน (Holzapfel. 1998)

2.2.1.3 กิจกรรมการสลายไขมัน (lipolytic activity)

ในแบคทีเรียแกรมบวกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีกิจกรรมการสลายไขมัน แต่มีในปริมาณน้อย พบในแบคทีเรียกลุ่ม mesophilic และ thermophilic ซึ่งเป็นกิจกรรมของเอนไซม์เอส-เทอเรส สำหรับแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* เช่น *S. piscifermentans* และ *S. carnosus* ที่นำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในไส้กรอกพบว่ามีกิจกรรมดังกล่าวเช่นกัน (Holzapfel. 1998)

2.2.1.4 เอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลส (amino acid decarboxylase)

การมีกิจกรรมของเอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลสของแบคทีเรียจะทำให้เกิดการสะสมของไบโอเจนิกเอมีน (biogenic amine) ซึ่งถ้ามีสารไบโอเจนิกเอมีนในปริมาณสูงก็ทำให้เกิดสารพิษในอาหาร เช่นการเน่าเสีย การทำให้อาหารมีคุณลักษณะที่ไม่ต้องการ เช่นในแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดอย่าง *L. curvatus* และ *L. plantarum* แต่ไม่พบกิจกรรมของเอนไซม์นี้ใน *L. sake, S. carnosus* และ *S. piscifermentans* (Holzapfel. 1998)

2.2.1.5 การสร้างเอนไซม์ในเตรทและในไตรท์รีดักเทส (nitrate and nitrite reductase)

การสร้างเอนไซม์ในเตรทและในไตรท์รีดักเทสอาจมีส่วนช่วยให้เกิดสีชมพูในผลิตภัณฑ์เนื้อเช่น แบคทีเรียในสายพันธุ์ *Lactobacillus* และ *Weissesell* ที่สามารถสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดหรือพบเพียงเอนไซม์ในไตรท์รีดักเทส *L. farciminis, L. suebicus, L. sake* และ *W. viridescens* ที่สร้างได้นอกจากนี้ยังพบในกล้าเชื้อ *Micrococcus* และ *Staphylococcus* spp. (Holzapfel. 1998)

2.2.1.6 กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส (catalase activity)

เอนไซม์คะตะเลสจะทำหน้าที่ในการยับยั้งหรือไฮโดรไลท์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น การสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มมีกลิ่นหืนและสีที่เปลี่ยนแปลงไป แบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้แก่ *Micrococcus* และ *Staphylococcus* spp. ซึ่งมีคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อ เพราะมีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสสูงโดยเฉพาะในช่วงระยะเวลาในการหมักไส้กรอก ส่วนในแบคทีเรียกรดแลคติกจะพบกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสได้น้อย (Holzapfel. 1998)

2.2.1.6 มีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก (probiotic)

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์มีชีวิตที่ถูกใช้ในร่างกายคนและสัตว์ ทำให้สุขภาพร่างกายดี เนื่องจากการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ แบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติกที่ดี นิยมนำมาเป็นกล้าเชื้อทั้งในอาหารคนและสัตว์ กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lb. sakei* Lb 3 และ *P. acidilactici* PA-2 ซึ่งนิยมใช้กันในทางการผลิต สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารและลำไส้ และยังช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้หลายชนิด (Leroy และคณะ. 2006)

2.2.2 แบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ

2.2.2.1 แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*

แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* ลักษณะรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.5 ไมโครเมตร พบทั้งที่อยู่เดี่ยว ๆ เป็นคู่ หรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มไม่สม่ำเสมอ (คล้ายพวงองุ่น) ติดสีแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ดำรงอยู่ได้ในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobes) โคโลนีลักษณะขุ่น อาจเป็นสีขาว ครีม หรือเป็นสีเหลืองถึงส้ม สร้างเอนไซม์คะตะเลส เซลล์ถูกทำให้แตกโดยไลโซสตาฟิน (lysostaphin) แต่ไม่ถูกทำให้แตกโดยไลโซไซม์ (lysozyme) เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นร้อยละ 10 มักแยกเชื้อได้จากผลิตภัณฑ์อาหาร ฝุ่น และน้ำ บางชนิดเป็นเชื้อโรคฉวยโอกาสทั้งในมนุษย์และสัตว์ สามารถผลิตสารภายนอกเซลล์ได้ (Holt และคณะ. 1994) และยังมีคุณสมบัติอื่นดังตารางที่ 2.1

แบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* ส่วนใหญ่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase-negative) ซึ่งสามารถทนต่อเกลือและกรดได้ดีโดยพบปริมาณมากในช่วงแรกของการบ่มเนยแข็งซึ่งคิดเป็นร้อยละ 5-25 ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ผิวเนยแข็งและถูกแทนที่ด้วย coryneform bacteria หลังจากบ่มได้ 15 วันโดย *S. equorum* มักพบบ่อยว่าเกี่ยวข้องกับการบ่มในเนยแข็งหลายชนิด แต่แบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* ชนิดอื่นเช่น *S. caprae, S. vitulinus, S. xylosus, S. saprophyticus, S. lentus, S. sciuri* และ *S. succinus* supsp. *casei* สามารถเกี่ยวข้องกับการบ่มเนยแข็งด้วยเช่นกัน จากการศึกษาเมื่อเร็ว ๆ นี้ ได้แนะนำว่า *S. equorum* โดยเฉพาะ *S. equorum* subsp. *linens* และ *S. succinus* subsp. *casei* สามารถนำมาทำเป็นกล้าเชื้อสำหรับ smear ripened cheeses และ typical Swiss semi-hard cheeses (Irlinger. 2008)

ในด้านการแพทย์พบว่าแบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* บางชนิดเป็นแบคทีเรียก่อโรคเต้านมอักเสบในโคกระบือและเป็นแบคทีเรียที่พบบ่อยที่สุดที่เป็นสาเหตุของการติดเชื้อ ขณะที่ *S. epidermidis* เกี่ยวข้องกับผู้ป่วยที่มีปัจจัยการเกิดโรคเนื่องจากการติดเชื้อภายในโรงพยาบาล (nosocomial infection) เช่น ผู้ป่วยที่ปลูกถ่ายอวัยวะ แต่เดิมแบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* ชนิดที่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (cogulase-positive) เพราะได้ถูกพิจารณาว่าเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ฉวย

โอกาส ขณะที่แบคทีเรียสกุล *Staphyloccus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสไม่ได้เป็นแบคทีเรียก่อโรคเพราะไม่พบรายงานเกี่ยวข้องอย่างโรคอาหารเป็นพิษทั้งในนมและผลิตภัณฑ์นม แต่อย่างไรก็ตามการรายงานดังกล่าวต้องเปลี่ยนแปลงไปเพราะมีหลักฐานเพิ่มขึ้นที่ได้แสดงให้เห็นว่า *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสทำให้เกิดโรคจากการสร้างสารเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) ดังนั้นจึงมีการคัดแยกแบคทีเรียดังกล่าวเพื่อตรวจสอบและพบว่า *S. lugdunensis* และ *S. caprae* เป็นแบคทีเรียก่อโรค ส่วนชนิดอื่นที่คัดแยกได้น้อยหรือจำแนกชนิดได้ยากเช่น *S. cohnii, S. saccharolyticus, S. simulans, S. pasteuri, S. warneri, S. xylosus* และ *S. equorum* และบางชนิดเช่น *S. xylosus, S. equorum, S. caprae* และ *S. sciuri* เป็นที่ทราบกันดีว่าใช้ในการผลิตเนยแข็งและใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหาร (Irlinger. 2008)

ตารางที่ 2.1 ความแตกต่างของแบคทีเรีย gram-positive, catalase-positive

ชนิดของจุลินทรีย์	การสร้างเอนไซม์คะตะเลส	โมดิไฟล์ออกซิเดส	aerotolerance	ความต้านทานต่อ		
				เบซิตราซิน (0.04U)[a]	ฟูราโซลิโดน (100 μg)[a]	ไลโซสตาฟิน (200 μg)
Staphylococcus	+[b]	-[c]	FA	R	S	S
Micrococcus	+	+	A[d]	S	R	R[e]
Rothia	±	-	FA	R/S	R/S	R
Aerococcus	-[f]	-	FA[g]	S	S	R
Enterococcus	-[f]	-	FA	R	S	R

A คือ strict aerobe, FA คือ facultative anaerobe, R คือ resistant, S คือ sensitive

[a] สำหรับเบซิตราซิน คือ มีโซนใสขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร (susceptible) สำหรับฟูราโซลิโดน คือ มีโซนใสขนาดมากกว่าหรือเท่ากับ 15 มิลลิเมตร (susceptible)

[b] *S. aureus* subsp. *anaerobius* และ *S. saccharolyticus* เป็น catalase-negative และเจริญในสภาวะที่มีอากาศเท่านั้น

[c] *S. sciuri, S. lentus* และ *S. vitulus* จัดเป็น microdase-positive

[d] *Kocuria (Micrococcus) Kristinae* เจริญในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe)

[e] บางสายพันธุ์ของ *Micrococcus, Arthrobacter agilis* และ *Kocuria* ที่ไวต่อไลโซสตาฟิน

[g] เจริญได้ดีในสภาวะ reduced oxygen tension และจะไม่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

ที่มา : Forbes และคณะ (2007)

2.2.2.2 แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติกรวมถึงกลุ่มของจุลินทรีย์หลากหลายซึ่งมีสมบัติด้านเมทาบอลิก (metabolic property) ที่คล้ายคลึงกันคือสามารถผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมักคาร์โบไฮเดรต แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างสปอร์และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ทนต่อกรด และสามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ใช่แบคทีเรียก่อโรค (ยกเว้นบางสปีชีส์ที่ก่อโรค) ซึ่งทราบกันดีว่ามีความปลอดภัยได้แก่ *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Oenococcus, Enterococcus* และ *Leuconostoc* เมื่อพิจารณาสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นที่ทราบกันดีว่าแบคทีเรียประเภทนี้มีทั้งพวกที่หมักคาร์โบไฮเดรตได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ (homofermenters) และพวกที่หมักคาร์โบไฮเดรตแล้วให้ผลิตภัณฑ์หลายชนิดเช่น กรดอะซิติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และกรดฟอร์มิกซึ่งเรียกว่า heterofermenters แบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ในอาหารหลายชนิดรวมถึงนมและผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนม พืช และผัก ธัญพืช เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยได้มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสปีชีส์มาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมักสำหรับคนและสัตว์และอาหารที่มาจากวัตถุดิบทางการเกษตร ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่นี้อาจปนเปื้อนมากับวัตถุดิบตามธรรมชาติหรือจงใจเติมกล้าเชื้อเพื่อใช้ควบคุมการหมัก กิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรียกรดแลคติกช่วยส่งเสริมคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส (organoleptic) คุณสมบัติด้านการไหลของอาหาร (rheological) และคุณสมบัติทางด้านโภชนาการ (nutritional) ของผลิตภัณฑ์ซึ่งผ่านการหมัก โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียดังกล่าวมักอาศัยอยู่บริเวณระบบทางเดินอาหารและลำไส้ตลอดจนระบบทางเดินปัสสาวะทั้งของมนุษย์และสัตว์ ในสภาพแวดล้อมนี้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่สำคัญซึ่งทำหน้าที่หลายประการที่เกี่ยวข้องกับการส่งเสริมสุขภาพได้แก่ ช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน สมดุลลำไส้ และความต้านทานต่อจุลินทรีย์ก่อโรค จากเหตุผลดังกล่าวแบคทีเรียกรดแลคติกบางสปีชีส์ถูกนำมาใช้เป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกและเติมในผลิตภัณฑ์อาหารหลากหลายชนิด ดังนั้นการใช้โปรตีนของแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปของกล้าเชื้อโพรไบโอติกจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งทางด้านการค้า จึงเป็นเหตุให้งานวิจัยทางด้านพันธุศาสตร์ (genetics) สรีรวิทยา (physiology) และการนำไปประยุกต์ใช้ได้รับความสนใจตลอด 25 ปีที่ผ่านมา (Mayo และคณะ. 2010)

2.3 แบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นสารต้านจุลินทรีย์ซึ่งเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียโดยสารนี้มักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน มีรายงานว่าแบคเทอริโอซินบางชนิดมี

ศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ได้แก่ *Clostridium botulinum*, *Bacillus* spp., *Enterococcus fuecalis*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* โดยแบคเทอริโอซินได้ถูกจำแนกต่อไปในฐานะกลุ่มของสารต้านจุลินทรีย์ที่มีความหลากหลาย (a heterogenous group of antibacterial compounds) ซึ่งถูกผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่มใหญ่และมีหลายสปีชีส์ แบคทีเรียกรดแลคติกหลายสายพันธุ์ด้วยกันที่ผลิตแบคเทอริโอซินแสดงในตารางที่ 2.2 ซึ่งแบคเทอริโอซินมีความผันแปรมากในด้านกลไกการยับยั้ง (mode of action) กิจกรรมสเปรกตรัม (activity spectrum) น้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สมบัติทางชีวเคมี (biochemical properties) และแหล่งกำเนิดทางพันธุกรรม (genetic origin) (Carolissen-Mackay และคณะ. 1996)

ตารางที่ 2.2 แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก	ชนิดของแบคเทอริโอซิน	แหล่งที่มา
L. lactis BB24	Nisin	ไส้กรอกสเปน
L. lactis WNC20	Nisin Z	ไส้กรอกหมักของไทย
L. sakei 148	Lactocin S	ไส้กรอกสเปน
L. sakei L45	Lactocin S	ไส้กรอกสเปน
L. sakei LTH673	Sakacin K	ไส้กรอกสเปน
L. sakei I151	Sakacin P	เนื้อวัว
L. sakei Lb706	Sakacin A	เนื้อวัว
L. sakei MN	Bavaricin MN	เนื้อวัว
L. curvatus LTH1174	Curvacin A	ไส้กรอกเยอรมัน
L. curvatus FS47	Curvaticin FS47	เนื้อวัว
Lb curvatus L442	Curvaticin L442	ไส้กรอกกรีก

ที่มา : Castellano และคณะ (2008)

2.3.1 การทำโปรตีนให้เข้มข้นและการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ขั้นต้น (concentration and primary purification of proteins)

การศึกษาการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์มีความสำคัญเนื่องจากโปรตีนที่บริสุทธิ์เกี่ยวข้องกับการหาแหล่งที่เหมาะสมซึ่งมีโปรตีนที่สนใจอยู่ปริมาณมากเช่น ยีสต์เป็นแหล่งที่อุดมด้วยเอนไซม์ของวิถีไกลโคไลติก (glycolytic pathway) (Price และ Nairn. 2009) การทำให้โปรตีนเข้มข้นด้วยการตกตะกอนมีความสำคัญในกระบวนการ downstream processing ของโปรตีนที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด เทคนิคนี้ทำได้โดยตรงและใช้เครื่องมือไม่มาก ในหลายกรณีการทำให้

ตกตะกอนจะทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ได้ระดับหนึ่ง (ชนิดของโปรตีนที่แตกต่างกันโดยทั่วไปต้องการความเข้มข้นของสารที่ใช้ในการตกตะกอนต่างกันที่จะให้ผลในการขจัดสารนั้นออกจากสารละลายได้มีการบันทึกไว้ถึงการได้กลับคืนในระดับสูงของกิจกรรมทางชีววิทยา) มีข้อเสียบางประการที่เกี่ยวข้องกับเทคนิคได้แก่

- สารที่ใช้หลายชนิดในการตกตะกอนทำให้เกิดการกัดกร่อนสูงโดยเฉพาะอุปกรณ์ที่ทำจากสเตนเลสเช่น โรเตอร์ของเครื่องปั่นเหวี่ยง

- การตกตะกอนโปรตีนมักไร้ประสิทธิภาพในกรณีที่มีความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้นในระดับต่ำ กรณีดังกล่าวอาจมีการได้กลับคืน (recovery of protein) ในระดับต่ำ

- สารบางอย่างเช่น อะซิโตน (acetone) และไดเอทิลอีเทอร์ (diethylether) เป็นสารที่ไวไฟและเป็นอันตราย นอกจากนี้ยังมีเอทานอลซึ่งมีราคาค่อนข้างแพง

- สารหลายชนิดที่ใช้ในการตกตะกอนเช่น ตัวทำละลายอินทรีย์ส่วนใหญ่หลังจากใช้แล้วต้องนำไปกำจัดอย่างระมัดระวัง

- ในหลายกรณีควรขจัดสารที่ตกค้างในตะกอนโปรตีนที่ได้ก่อนที่จะนำไปผ่านกระบวนการขั้นต่อไปตัวอย่างเช่น แอมโมเนียมซัลเฟตควรถูกขจัดออกจากตะกอนโปรตีนที่ถูกนำไปละลายอีกครั้ง (โดยการทำไดอะไลซีส) ก่อนที่สารละลายโปรตีนจะถูกนำไปผ่าน ion exchange column (Walsh. 2002)

ในระหว่างขั้นตอนเริ่มต้นของการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ โปรตีนที่ต้องการจะอยู่ในสารละลายที่เจือจางดังนั้นมีของเหลวปริมาณมากที่จะต้องจัดการ ซึ่งสิ่งนี้เป็นจริงในกรณีที่โปรตีนถูกปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการหมักโดยจุลินทรีย์หรือระหว่างการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ ดังนั้นจึงต้องทำให้สารสะลายเหล่านั้นเข้มข้นเพื่อให้มีปริมาตรที่ง่ายต่อการจัดการมากขึ้นในขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์มีความสำคัญเนื่องจากโปรตีนที่บริสุทธิ์เกี่ยวข้องกับการหาแหล่งที่เหมาะสมซึ่งมีโปรตีนที่สนใจอยู่ปริมาณมากเช่น ยีสต์เป็นแหล่งที่อุดมด้วยเอนไซม์ของวิถีไกลโคไลติก (glycolytic pathway) (Price และ Nairn. 2009)

การทำซีรั่มโปรตีนให้บริสุทธิ์เป็นตัวอย่างหนึ่งของกระบวนการที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมซึ่งประกอบด้วยการตกตะกอนโปรตีนหลายขั้นตอน สารที่ใช้ในการตกตะกอนโดยทั่วไปมักเป็นเอทานอลและแอมโมเนียมซัลเฟต วิธีการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ที่ทำได้ในห้องปฏิบัติการได้แก่ การตกตะกอน (precipitation) การทำไดอะไลซิส การทำอัลตร้าฟิวเตรชัน (ultrafiltration) และ ion-exchange chromatography (Walsh. 2002)

2.3.2.1 การตกตะกอนโปรตีน (protein precipitation)

การตกตะกอนโปรตีนสำเร็จได้โดยการแยกโปรตีนที่ละลายได้ให้อยู่ในสถานะที่ไม่ละลาย ซึ่งตะกอนโปรตีนที่ไม่ละลายนี้สามารถถูกขจัดออกได้โดยหลายวิธี วิธีการตกตะกอนนี้สามารถใช้ในการขจัดสิ่งที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อาจมาขัดขวางในขั้นตอนการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ช่วง downstream ขั้นต่อไปทั้งนี้การตกตะกอนให้ผลทั้งในด้านการทำให้เข้มข้นและทำให้บริสุทธิ์ ดังนั้นการตกตะกอนมักใช้ช่วงแรกของการทำให้บริสุทธิ์ในขั้นตอน downstream โดยช่วยทำให้ปริมาตรลดลงและช่วยเพิ่มความบริสุทธิ์ของโปรตีนก่อนที่จะทำในขั้นตอนต่อไปนี้ (SAFCbiosciences. 2006) ข้อได้เปรียบหลัก ๆ ของการตกตะกอนโปรตีนก็คือวิธีนี้สามารถทำได้ง่ายและสะดวก นอกจากนี้สิ่งที่ใช้ในการตกตะกอนควรเลือกสารที่มีความคงตัวซึ่งละลายน้ำได้ การที่จะทำให้โปรตีนอยู่ในรูปที่ไม่ละลายน้ำทำได้โดยการเปลี่ยนคุณลักษณะของประจุที่ผิวหรือการเปลี่ยนแปลงของลักษณะตัวทำละลาย ถ้าหากความเข้มข้นเริ่มต้นของโปรตีนที่ต้องการยิ่งเพิ่มมากขึ้นเท่าใดประสิทธิภาพของการตกตะกอนก็จะยิ่งสูงขึ้นเท่านั้น (SAFCbiosciences. 2006) การตกตะกอนโปรตีนสามารถทำได้โดยใช้สารจำพวกเกลือที่เป็นกลาง ตัวทำละลายอินทรีย์ พอลิเมอร์ที่มีมวลโมเลกุลสูงหรือการปรับพีเอชให้เหมาะสม (ตารางที่2.3) (Walsh. 2002)

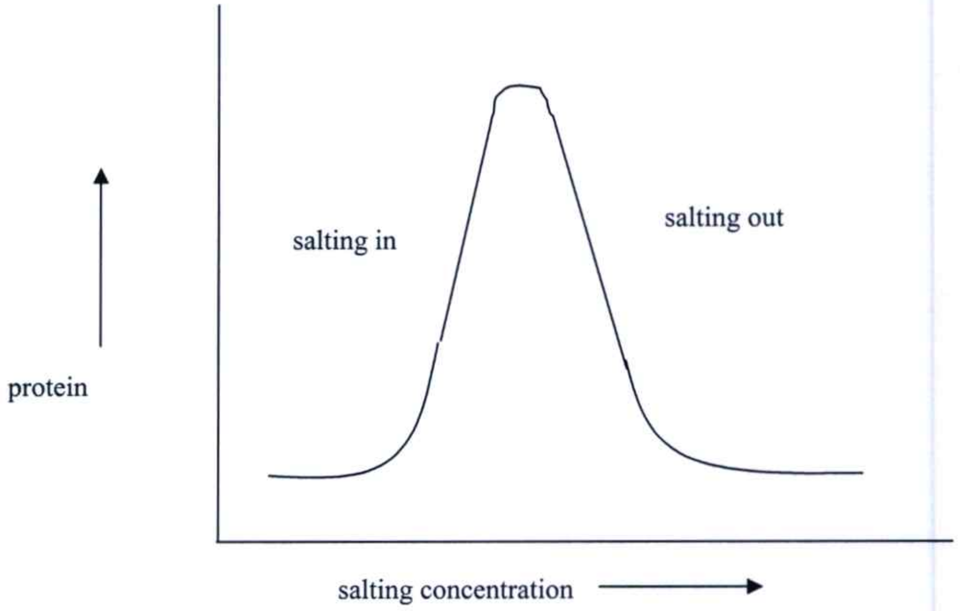
ตารางที่ 2.3 วิธีการและเทคนิคที่ใช้เพื่อตกตะกอนโปรตีนจากสารละลาย

การตกตะกอนโปรตีน	ข้อควรทราบ
การเติมเกลือที่เป็นกลาง	สารที่ใช้คือ แอมโมเนียมซัลเฟต
การเติมตัวทำละลายอินทรีย์	สารที่ใช้คือ เอทานอล หรือ อะซิโตน
การเติมพอลิเมอร์อินทรีย์	สารที่ใช้คือ พอลิเอทิวลีนไกลคอล (Polyethylene glycol)
การตกตะกอนแบบสัมพรรคภาพ (Affinity precipitation)	การเติมลิแกน (ligand) มักเป็นแอนติบอดีซึ่งตกตะกอนโปรตีนเป้าหมายจากสารละลายโดยพื้นฐานของการกระทำระหว่างโมเลกุล (bio-specific molecular interaction)
การปรับพีเอชของสารละลาย	โปรตีนบางชนิดตกตะกอนออกจากสารละลายที่ค่า PI ของสารนั้น
การเสียสภาพโปรตีนแบบคัดเลือก	วิธีนี้ใช้ตกตะกอนโปรตีนที่ปนเปื้อนออกจากโปรตีนที่สนใจ ถ้าโปรตีนที่สนใจเสถียรมากกว่าโปรตีนที่ปนเปื้อนในสภาพที่มีปัจจัยที่เอื้ออำนวยให้เสียสภาพ (เช่นสภาพที่มีพีเอชไม่เหมาะสมหรืออุณหภูมิที่เหมาะสม)

ที่มา : Walsh (2002)

ก) การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

การทำโปรตีนให้เข้มข้นด้วยการตกตะกอนเป็นวิธีเก่าแก่วิธีหนึ่งที่ทราบกันดีทั้งนี้การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นวิธีการตกตะกอนโปรตีนที่นิยมใช้กันมากที่สุด การที่นิยมใช้เกลือที่เป็นกลางกันมากเนื่องจากสามารถในการละลายได้สูง เป็นวิธีการที่เสียค่าใช้จ่ายไม่มาก ไม่ทำให้โปรตีนส่วนใหญ่เสียสภาพและมีผลทำให้เกิดความเสถียรของโปรตีนหลายชนิด การเติมเกลือที่เป็นกลางเพียงปริมาณเล็กน้อยลงในสารละลายโปรตีนมักจะช่วยเพิ่มความสามารถในการละลายของโปรตีนซึ่งเรียกว่า ผลของ salting in อย่างไรก็ตามการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเกินระดับที่เหมาะสมจะส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของโปรตีนในสารละลายและในที่สุดจะเร่งให้โปรตีนตกตะกอนออกมาซึ่งเรียกว่า salting out (รูปที่ 2.1) ที่ความเข้มข้นสูงของเกลือนั้นจะแข่งขันกันโมเลกุลของโปรตีนในการจับกับน้ำสิ่งนี้ช่วยส่งเสริมการกระทำระหว่างโปรตีนกับโปรตีนซึ่งเป็นการกระทำที่พบมากของกลุ่มโมเลกุลที่ไม่ชอบน้ำที่อยู่บนผิวของโมเลกุลโปรตีนที่อยู่ติดกัน การเพิ่มขึ้นของการกระทำระหว่างโปรตีนในที่สุดก็จะเป็นผลให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน (Walsh. 2002)



รูปที่ 2.1 ผลของความเข้มข้นเกลือต่อการละลายของโปรตีน การเพิ่มความเข้มข้นของเกลือจากความเข้มข้นเริ่มต้นที่ต่ำมักจะช่วยเพิ่มการละลายโปรตีน (salting in) และถ้าเพิ่มความเข้มข้นขึ้นต่อไปจนสูงกว่า ระดับที่เหมาะสมจะทำให้ความเสถียรของโปรตีนลดลงจนทำให้เกิดการตะกอนออกจากสารละลายในที่สุด (salting out)

ที่มา : Walsh (2002)

เมื่อโปรตีนอยู่ในสภาวะที่มีเกลือสูงมีแนวโน้มที่จะตกตะกอนออกจากสารละลาย แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นสารที่พบว่ามีประโยชน์ในกรณีนี้ บ่อยครั้งที่สามารถนำโปรตีนซึ่งถูกทำให้ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาละลายในบัฟเฟอร์ซึ่งช่วยรักษากิจกรรมทางชีวภาพของโปรตีน แม้ว่าไม่จริงเสมอไปด้วยเหตุนี้จึงใช้วิธีการตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตในการทำให้โปรตีนบริสุทธิ์ ปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้ควรเพียงพอต่อการให้โปรตีนส่วนใหญ่ตกตะกอน เริ่มแรกควรทดลองดูก่อนว่าโปรตีนที่สนใจนั้นตกตะกอนที่ระดับความเข้มข้นที่เท่าใดบ้าง หากปริมาณของแอมโมเนียมซัลเฟตสูงจะเพิ่มความหนาแน่นของสารละลายและทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีนได้ยาก และสารละลายเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตมีสภาวะเป็นกรดเมื่อตกตะกอนแล้วจึงสำคัญมากที่การทำสารละลายโปรตีนควรใช้บัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเป็นกลางและบัฟเฟอร์ควรมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 0.05-0.1 โมลาร์ (Copeland. 1994) อย่างไรก็ตามกระบวนที่ทันสมัยอาศัยวิธีการอื่นที่ไม่ใช่วิธีการตกตะกอน (Walsh. 2002)

แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นเกลืออนินทรีย์โดยทั่วไปที่ใช้ตกตะกอนโปรตีนซึ่งมีประโยชน์ดังนี้ได้แก่ 1) ที่จุดอิ่มตัว แอมโมเนียมซัลเฟตมีโมลาริตี้สูงเพียงพอที่จะทำให้โปรตีนส่วนใหญ่เกิดตกตะกอน 2) สารละลายนี้ไม่ได้มีความร้อนปริมาณมากจึงทำให้ความร้อนที่เกิดขึ้นกระจายออกไปได้ง่าย 3)สารละลายอิ่มตัวของแอมโมเนียม (ความเข้มข้น 4.04 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส) ซึ่งมีความหนาแน่น (1.235 กรัมต่อลูกบาศก์เมตร) จะไม่รบกวนการตกตะกอนของโปรตีนส่วนใหญ่โดยการปั่นเหวี่ยง 4) สารละลายแอมโมเนียมซัลเฟตที่เข้มข้นโดยทั่วไปแบคเทอริโอสเตติก (bacteriostatic) 5) ในสารละลายนี้แอมโมเนียมซัลเฟตช่วยป้องกันการเสียสภาพของโปรตีนส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเซลล์เจริญอยู่ (cell culture medium) ถ้ามีสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เช่น pluronic F-68® จะไม่สามารถตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตได้ดังนั้นจึงควรตกตะกอนโปรตีนโดยใช้วิธีอื่นเช่นตกตะกอนด้วยโซเดียมคลอไรด์และ PEG (SAFCbiosciences. 2006)

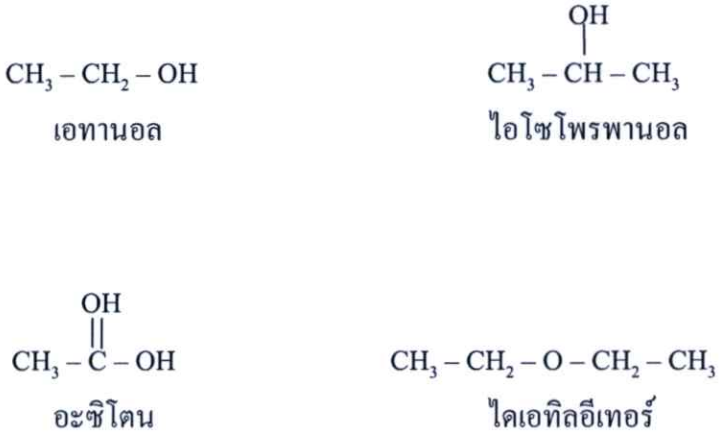
ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตที่ใช้เพื่อตกตะกอนโปรตีนผันแปรขึ้นอยู่กับโปรตีนที่ตกตะกอน โดยทั่วไปการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตควรทำที่อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส ตัวอย่างเช่น การตกตะกอนโปรตีนโดยค่อย ๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นที่ละน้อยเริ่มตั้งแต่ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 พร้อมทั้งคนตลอดเพื่อละลายและทิ้งไว้ให้เกิดสภาวะสมดุลในระหว่างการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตแต่ละความเข้มข้นขั้นตอนนี้จะได้โมเลกุลใหญ่ (macromolecule) เช่น ไรโบโซม ชิ้นส่วนของเยื่อหุ้มและแม้แต่โปรตีนที่เสียสภาพ จากนั้นจะเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มมากขึ้นขั้นต่อไปจนได้ความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟตเป็นร้อยละ 50 ซึ่งจะทำให้โปรตีนที่เราสนใจตกตะกอนออกมา “salted-out” และเก็บเกี่ยวด้วยการปั่นเหวี่ยง ส่วนใสที่ได้อาจมีโปรตีนที่ปนเปื้อนรวมอยู่ด้วยซึ่งจะเททิ้งไป ส่วนตะกอนที่ได้สามารถถูกนำมาละลายอีกครั้งในสารละลาย

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

บัฟเฟอร์ที่เหมาะสมปริมาตรน้อยในการทำให้บริสุทธิ์ขั้นต่อไปซึ่งโดยทั่วไปจะทำไดอะไลซิส (dialysis) (SAFCbiosciences. 2006)

ข) การตกตะกอนโปรตีนด้วยตัวทำละลายอินทรีย์

การเติมตัวทำละลายอินทรีย์หลายชนิดลงในสารละลายโปรตีนสามารถส่งเสริมการตกตะกอนโปรตีนได้ การเติมตัวทำละลายช่วยลดค่าคงที่ของศักดิ์ไฟฟ้าของสารละลายโปรตีนในน้ำ ในทางกลับกันสิ่งนี้ช่วยส่งเสริมการดึงดูดของศักดิ์ไฟฟ้าซึ่งเพิ่มขึ้นระหว่างโมเลกุลที่มีประจุตรงข้ามกันในสารละลายโปรตีน การเพิ่มของการกระทำเช่นนั้นระหว่างโปรตีนที่มีประจุตรงข้ามจะทำให้โปรตีนเกิดการตกตะกอน ตัวทำละลายอินทรีย์ที่มักใช้เพื่อส่งเสริมการตกตะกอนโปรตีนได้แก่สารจำพวก เอทานอล ไอโซโพรพานอล (isopropanol) อะซิโตน (acetone) และ ไดเอทิล-อีเทอร์ (diethylether) (รูปที่ 2.2) การตกตะกอนโปรตีนโดยการใช้ตัวทำละลายอินทรีย์นั้นไปทำให้จุดเยือกแข็งของสารละลายลดต่ำลงเพื่อรักษาสภาพอุณหภูมิของสารละลายให้ต่ำกว่า 0 องศา-เซลเซียส (Walsh. 2002)



รูปที่ 2.2 โครงสร้างของตัวทำละลายอินทรีย์ที่ใช้กันมากในการตกตะกอนโปรตีน

ที่มา : Walsh (2002)

ค) การตกตะกอนโปรตีนด้วยสารพอลิเมอร์อินทรีย์

การตกตะกอนโปรตีนอาจทำได้โดยการเติมสารพอลิเมอร์อินทรีย์ (organic polymer) เช่น พอลีเอทิลลีนไกลคอล (polyethylene glycol) การเติมสารพอลิเมอร์นี้มักเพิ่มความหนืดให้แก่สารละลายส่งผลให้การเก็บเกี่ยวสารที่ตกตะกอนทำได้ยากขึ้น การเก็บเกี่ยวโดยทั่วไปมักใช้การปั่นเหวี่ยง (centrifugation) หรือ การกรอง (filtration) สารที่ตกตะกอนสามารถถูกนำมาละลายอีกครั้งด้วยของเหลว (resuspending liquid) ปริมาตรน้อยการทำเช่นนี้ช่วยทำให้สารเข้มข้นขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ (Walsh. 2002)

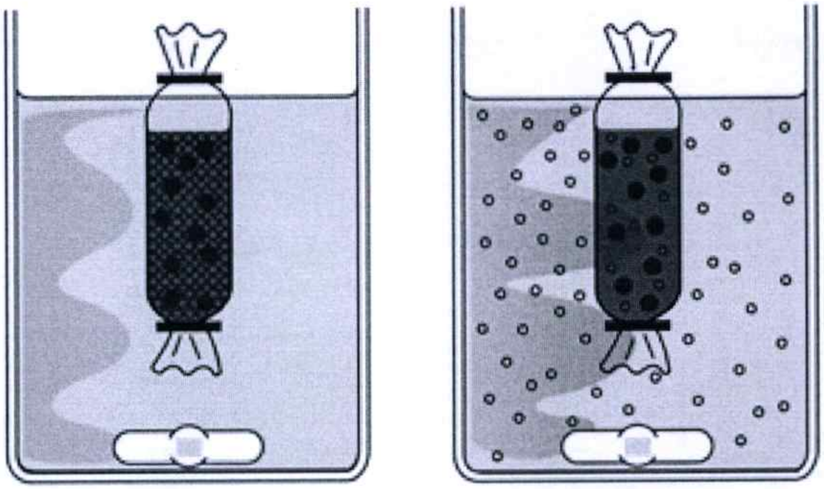
123001

ง) การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซีติก (trichloroacetic acid precipitation)

โปรตีนส่วนใหญ่จะตกตะกอนออกจากสารละลายเมื่ออยู่ในสภาพที่มีกรดไตรคลอโร-แอซิติกความเข้มข้นสูง วิธีการนี้ทำได้รวดเร็วและง่ายโดยทำให้โปรตีนเสียสภาพซึ่งไม่สามารถกลับคืนสภาพเดิมได้ ด้วยเหตุนี้จึงควรใช้วิธีการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกเพียงเพื่อวิเคราะห์โปรตีนที่ไม่จำเป็นต้องให้มีการเปลี่ยนกลับไปเป็นโปรตีนรูปร่างเดิม (Copeland. 1994)

2.3.2.2 การทำไดอะไลซิส (dialysis)

การทำสารละลายโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการไดอะไลซิสเป็นวิธีการหนึ่งที่เก่าแก่เพื่อแยกองค์ประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าจากสารละลาย วิธีการนี้ขึ้นอยู่กับการมีเมมเบรนที่ทำด้วยเซลลูโลสที่คัดเลือกเอาเฉพาะสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย (ตามที่กำหนดหรือตามขนาดของรูเมมเบรน) เท่านั้นที่จะสามารถผ่านรูเมมเบรนได้ แต่จะกั้นไม่ให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านได้ การจำกัดขนาดน้ำหนักโมเลกุลที่จะผ่านได้ (molecular weight cut-off) หมายถึง ขนาดน้ำหนักโมเลกุลของตัวถูกละลายในขนาดที่กำหนดนั้นถูกกักเก็บไว้ในเมมเบรนได้ถึงร้อยละ 90 เมมเบรนนี้มีขายทั่วไปเป็นม้วน ถุงไดอะไลซิสโดยทั่วไปมีให้เลือกหลายขนาด ขึ้นอยู่กับเส้นผ่านศูนย์กลางและน้ำหนักโมเลกุล (หาซื้อได้จากบริษัท Spectrum ประเทศสหรัฐอเมริกา) ถ้าเมมเบรนยิ่งมี molecular weight cut-off สูงเท่าใดโมเลกุลของตัวถูกละลายขนาดเล็กจะยิ่งเคลื่อนที่ผ่านเมมเบรนได้เร็วเท่านั้น อย่างไรก็ตามควรจำไว้ว่า molecular weight cut-off เหล่านี้แค่เป็นตัวแทนของขนาดน้ำหนักของโมเลกุลที่น้อยที่สุดโดยปริมาณที่จะถูกจำกัด แต่ไม่มีค่าเข้มงวด (sharp cut-off) ดังนั้นจึงควรใช้ขนาด molecular weight cut-off ที่ใหญ่กว่าเพื่อให้เกิดสมดุลอย่างรวดเร็ว แต่ขนาด molecular weight cut-off จะมีค่าน้อยกว่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนที่ต้องการกักเก็บไว้ในเมมเบรน ในการใช้ถุงไดอะไลซิส (dialysis tubing) ควรทำให้ถุงไดอะไลซิสเปียกก่อนเพื่อจะได้ยืดหยุ่น จากนั้นปิดปลายด้านหนึ่งแล้วใส่ตัวอย่างโปรตีนลงในถุงและปิดปลายอีกด้านหนึ่ง (ต้องมีช่องว่างระหว่างสารละลายโปรตีนกับคลิปหรือปมที่ปิดเพื่อให้มีอากาศช่วยพยุงตัวถุงไดอะไลซิสให้ลอยขณะอยู่ในบัฟเฟอร์) แล้วใส่ลงในบัฟเฟอร์ที่มีส่วนประกอบของโมเลกุลสุดท้ายที่ต้องการของโปรตีน (Copeland. 1994) (ตามรูปที่ 2.3) การทำไดอะไลซิสนอกจากจะขึ้นอยู่กับ molecular weight cut-off แล้ว ขนาดของถุงก็มีความสำคัญซึ่งเส้นผ่านศูนย์กลางของถุงไดอะไลซิสยิ่งมีขนาดใหญ่มากเท่าใดความยาวของถุงที่ใช้จะยิ่งสั้นลงได้ อย่างไรก็ตามการเกิดสภาวะสมดุลในถุงที่อ้วนสั้นจะช้ากว่าถุงที่ผอมและยาว (Doonan. 2004)



รูปที่ 2.3 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการไดอะไลซิส
ที่มา : Spectrumlabs (2012)

2.3.2.3 การทำให้เข้มข้นโดยการทำอัลตร้าฟิวเทรชัน (ultrafiltration)

การทำอัลตร้าฟิวเทรชันเป็นวิธีที่รวดเร็วและสะดวกสำหรับทำให้สารละลายโปรตีนเข้มข้นขึ้นวิธีอัลตร้าฟิวเทรชันเป็นวิธีที่ทำกันอย่างกว้างขวางทั้งในห้องปฏิบัติการและระดับอุตสาหกรรมซึ่งสามารถใช้เทคนิคไมโครฟิวเทรชันได้อย่างมีประสิทธิภาพในการขจัดตัวเซลล์ทั้งหมดหรือเศษเซลล์ออกจากสารละลาย โดยเมมเบรนฟิวเตอร์ (membrane filters) ที่ใช้ในกระบวนการไมโครฟิวเทรชันโดยทั่วไปมีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 0.1-10 ไมโครเมตร ซึ่งรูของเมมเบรนนั้นสามารถกักเก็บตัวเซลล์ทั้งหมดและสารที่มีอนุภาคขนาดใหญ่ไว้ได้ แต่ไม่สามารถกั้นการผ่านของสารประกอบโมเลกุลใหญ่เช่นโปรตีน ในกรณีของเมมเบรนที่ใช้ทำอัลตร้าฟิวเทรชันนี้รูของเมมเบรนจะมีเส้นผ่านศูนย์กลางระหว่าง 1-20 นาโนเมตรซึ่งมีขนาดเล็กเพียงพอในการกักเก็บโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลต่ำ โดยเมมเบรนที่หาซื้อได้จะมี molecular mass cut-off อยู่ในช่วง 1-300 กิโลดาลตัน (kDa) ซึ่งทั่วไปแล้ว molecular mass cut-off ขนาด 3, 10, 30, 50 และ 100 กิโลดาลตันนิยมใช้กันมากที่สุด (Walsh. 2002)

2.3.2 การคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะผลผลิตและปัจจัยในการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

หลังจากที่ทำให้เซลล์แตกเพื่อให้ได้สารสกัดหยาบจำเป็นต้องใช้การทำให้บริสุทธิ์หลายวิธีเพื่อให้ได้โปรตีนที่บริสุทธิ์และอยู่ในรูปที่ทำงานได้ อย่างไรก็ตามไม่ว่าจะใช้วิธีการทำให้บริสุทธิ์

วิธีใดก็ตามจำเป็นต้องจดบันทึกความก้าวหน้าของวิธีการที่ใช้ในทางที่เหมาะสมซึ่งจะต้องสร้างตารางแสดงการทำให้บริสุทธิ์ซึ่งจะบันทึกข้อมูลดังต่อไปนี้ได้แก่ ขั้นตอนที่เกี่ยวข้อง ปริมาณโปรตีนทั้งหมด กิจกรรมทั้งหมด (total activity) กิจกรรมจำเพาะ (specific activity) เช่น กิจกรรมต่อหน่วยน้ำหนักของโปรตีน ผลผลิต (yield) คือ การได้กลับคืนของกิจกรรมที่แสดงออกเป็นร้อยละของสารสกัดเริ่มต้น และปัจจัยการทำให้บริสุทธิ์ (purification factor) ซึ่งก็คือ ปัจจัยซึ่งทำให้กิจกรรมจำเพาะเพิ่มขึ้น (Price และ Nairn. 2009)

ในการศึกษาการทำโปรตีนให้บริสุทธิ์จำเป็นต้องคำนวณหาค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ผลผลิต (yield) และปัจจัยการทำให้บริสุทธิ์ (purification factor) จากข้อมูลค่าปริมาณโปรตีน (total protein) และค่ากิจกรรมทั้งหมด (total activity) ดังนั้นเพื่อที่จะแสดงให้เห็นถึงหลักการที่เกี่ยวข้องให้พิจารณาข้อมูลการทำเอนไซม์ให้บริสุทธิ์โดยวิธี ion-exchange ดังต่อไปนี้

ขั้นตอนที่ 1 ในสารสกัดหยาบมีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 940 มิลลิลิตร และกิจกรรมทั้งหมดคือ 56,780 ยูนิต (units) (กิจกรรม 1 ยูนิต หมายถึง สารตั้งต้น (substrate) ปริมาณ 1 ไมโครโมล ถูกใช้ไปต่อนาที) ตามตารางที่ 2.4

ขั้นตอนที่ 2 ในสารสกัดที่สกัดด้วยวิธี ion-exchange charomatography มีปริมาณโปรตีนทั้งหมด 53 มิลลิกรัมและกิจกรรมทั้งหมดคือ 47,640 ยูนิต

ตารางที่ 2.4 การทำโปรตีนให้บริสุทธิ์

ขั้นตอน	โปรตีนทั้งหมด (total protein) (มิลลิกรัม)	กิจกรรมทั้งหมด (total activity) (ยูนิต)	กิจกรรมจำเพาะ (specific activity) (ยูนิตต่อมิลลิกรัม)	ผลผลิต (yield)	ปัจจัยการทำให้บริสุทธิ์ (purification factor)
สารสกัดหยาบ	940	56,780	60.4	100	1.0
ion-exchange	53	47,640	899	83.9	14.9

ที่มา : Price และ Nairn (2009)

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างเนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์บ่ม

เนื้อหมูสด เนื้อวัวสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน ชนิดละ 10 ตัวอย่างรวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ซึ่งได้จากตลาดสดในเขตลาดกระบัง กรุงเทพ ฯ และจังหวัดสมุทรปราการ

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งมีจำนวนทั้งหมด 11 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076, *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 และ *Yersinia enterocolitica* DMST 9380 จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Enterococcus faecium* TISTR 1283 และ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Vibrio parahaemolyticus* OYI แยกได้จากหอยนางรม

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ Plate Count Agar (PCA พีเอช 7.0±0.2,), Mannitol Salt Agar (MSA พีเอช 7.4±0.2, Difco), de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS, พีเอช 7.2±0.2, Difco), MRS Agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5, MRS Agar ที่เติมกลูโคสร้อยละ 0.2, MRS broth, MRS Agar ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) 1 กรัมต่อลิตร, MRS ที่เติมกรดอะมิโนร้อยละ 0.1 (ได้แก่ L-tyrosine, L-histidine monohydrochloride, L-ornithine monohydrochloride และ L-lysine monohydrochloride, Merck), Brain Heart Infusion Broth (BHI พีเอช 7.4±0.2, Merck), BHI Agar, Gibson 's Semi Tomato Juice Medium, Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE soft Agar, 7.1±0.2), Tryptic Soy Broth/Agar (TSB/TSA พีเอช 7.1±0.2, Difco), Nutrient Agar (NA), Mueller Hinton Agar (MHA, พีเอช 7.1±0.2, Difco), PALCAM Listeria Selective Agar (PALCAM พีเอช 7.2±0.2, Difco) ที่เติม selective agents, API 50 CHL Medium, API

STAPH PLUS 25 MEDIA 25 และ buffered *Listeria* enrichment broth (BLEB พีเอช 7.3±0.2, Difco)

3.1.4 สารละลายและสารเคมี

สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่างได้แก่ สารละลายเปปโทนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ และสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองได้แก่ กลีเซอรอล แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ (H_2O_2) สารละลายกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 85 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 โมลาร์ เกลือน้ำดี (porcine bile salt) 87 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ตกค้างได้แก่ โพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ไตรไฮเดรต (potassium ferrocyyanide trihydrate) ซิงอะซิเตตไดไฮเดรต (zinc acetate dihydrate) กรดอะซิติก (glacial acetic acid) ไดโซเดียมเตตระ-บอเรตดีคาไฮเดรต (disodium tetraborate decahydrate) N-1-naphthylene diamine dihydrochloride และกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น สารเคมีสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสได้แก่ สารละลาย NIT 1 (กรดซัลฟานิลิค 0.8 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) สารละลาย NIT 2 (ไดเมทิลแนฟทิลลามีน 0.6 กรัม ในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) สารเคมีสำหรับย้อมแกรมได้แก่ คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) แกรมไอโอดีน (gram's iodine) เอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 และซาฟรานีน (safranin) สารเคมีสำหรับวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ตกค้างได้แก่ โพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] ซิงค์อะซิเตท [$(CH_3COO)_2 \ Zn \cdot 2H_2O$] กรดอะซิติก ไดโซเดียมเตตระบอเรต [$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$] ซัลฟานิลามายด์ ($C_6H_8N_2O_2S$) N-1-naphthylenediamine dihydrochloride และโซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$) และสารเคมีสำหรับทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase test) ได้แก่ โค-แอกกูเลสพลาสมา สารเคมีสำหรับการทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ได้แก่ pyridoxal-5-phosphate, thiamine และ bromocresol purple สารเคมีสำหรับแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* ได้แก่ ฟูราโซลิโดน ไลโซสตาฟีน และ N,N,N,N-tetramethyl-p-phenylenediamine สารเคมีสำหรับการทำสารยับยั้งให้บริสุทธิ์ได้แก่ แอมโมเนียม-ซัลเฟต (Prolabo, บริษัท VWR international ประเทศฝรั่งเศส) กรดไตรคลอโรแอซิติก (analytic reagent grade บริษัท Fisher Scientific ประเทศอังกฤษ) สารเคมีสำหรับการเติมลงในหมูบดและแหนมได้แก่ ไนซิน (nisin, บริษัท Danisco ประเทศเดนมาร์ก)

สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ได้แก่ บัฟเฟอร์ PCR ไดออกซี -นิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ไพร์เมอร์ FDNA ไพร์เมอร์ RDNA อะกาโรส (agarose) เจลสตาร์

(gelstar) และสีย้อมดีเอ็นเอ (tracking dye) IPTG (บริษัท Amresco ประเทศสหรัฐอเมริกา) *Tag* DNA polymerase (บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เอนไซม์คะตะเลส (catalase, จาก bovine liver บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) เอนไซม์ทริปซิน (trypsin, จาก porcine pancreas บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) เอนไซม์เปปซิน (pepsin จาก porcine gastric mucosa บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (α-amylase จาก *Aspergillus oryzae* บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) เอนไซม์ปาเปน (papain จาก carica papaya บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี) และเอนไซม์ไลเปส (lipase จาก hog pancreas บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา)

ชุดทดสอบ (Kit) ต่าง ๆ สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative staphylococci โดยวิธีทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CH kit และ API STAPH kit ตามลำดับ ชุดทดสอบสำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ได้แก่ ชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอสำหรับแบคทีเรียแกรมบวก (MasturePure™ Gram Positive DNA Purification kit บริษัท EPICENTRE® ประเทศสหรัฐอเมริกา) ชุดทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (QIAquick PCR purification kit บริษัท Qiagen ประเทศเยอรมนี) ชุดสำหรับโคลนผลิตภัณฑ์ PCR (QIAGEN PCR Cloning kit บริษัท Qiagen ประเทศเยอรมนี) ชุดทดสอบสำหรับวิเคราะห์โปรตีน (บริษัท Bio-Rad laboratories ประเทศสหรัฐอเมริกา) ได้แก่ สีย้อม (1X Dye reagent ; ประกอบด้วยเมทานอลและกรดฟอสฟอริก) bovine serum albumin (BSA)

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เครื่องตีป่นอาหาร (stomacher masticator, บริษัท IUL instrument ประเทศอังกฤษ) เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (AquaLAB, รุ่น Aeries 3 TE ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องวัดพีเอช (pH meter, รุ่น 510 บริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์) เครื่องวัดพีเอชสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (รุ่น Testo 205 ประเทศเยอรมนี) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (รุ่น UV 1601 บริษัท Shimadzu ประเทศญี่ปุ่น) เครื่อง spiral plater (รุ่น Autoplate 4000 ประเทศสหรัฐอเมริกา) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (รุ่น SS-325 บริษัท Tomy ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น Z383K บริษัท Hermle ประเทศเยอรมนี) ตู้ถ่ายเชื้อ (รุ่น ABS 1200 บริษัท Astec microflow ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องนับจำนวนโคโลนี (บริษัท Reichert ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (microplate reader/washer, รุ่น iEM Reader MF บริษัท Labsystems ประเทศสหรัฐอเมริกา) ถุงไดอะไลซีสซึ่งมี MWCO ขนาด 1000 ดาลตัน (dialysis tubing, Sprectra/Por เบอร์ 6 บริษัท Spectrum ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องผสม (kitchenAid, รุ่น model 5K5SS ประเทศสหรัฐอเมริกา) ชุดอุปกรณ์ถ่ายรูปและวิเคราะห์อะกาโรสเจล (gel

documentation รุ่น MD1 1019 บริษัท Syngene ประเทศญี่ปุ่น) อุปกรณ์แยกสารพันธุกรรมด้วยไฟฟ้า (รุ่น Mupid®-exu บริษัท Equipment advance ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (DNA thermal cycler, รุ่น 480 บริษัท Perkin elmer ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องแก้วต่างๆได้แก่ บีกเกอร์ หลอดทดลอง กระบอกตวงและอุปกรณ์ที่จำเป็นเช่น ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อใช้สำหรับตีป่น ลูปเขี่ยเชื้อ จานเพาะเชื้อ ปิเปต ลูกยาง เป็นต้น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของเนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

สุ่มตัวอย่างได้แก่ เนื้อหมูสด เนื้อวัวสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน ชนิดละ 10 ตัวอย่างนำมาวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีได้แก่

3.2.1.1 การวัดค่าพีเอช (pH)

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มมาวัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอชสำหรับอุตสาหกรรม (รุ่น Testo 205 ประเทศเยอรมนี)

3.2.1.2 การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w)

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มมาวัดเพื่อหาค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ด้วยเครื่องวัด water activity (AquaLAB รุ่น Series 3 TE ประเทศสหรัฐอเมริกา)

3.2.1.3 การวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมไนไตรท์ตกค้างในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

นำตัวอย่างเนื้อสัตว์มาและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มมาวิเคราะห์หาปริมาณโซเดียมไนไตรท์ตกค้างโดยวิธีของ Kirk และ Sawyer (1991)

ก) สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

1. ชั่งโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ไตรไฮเดรต (potassium ferrocyanide trihydrate) 109 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

2. ชั่งซิงค์อะซิเตตดีไฮเดรต (zinc acetate dehydrate) 220 กรัม ละลายน้ำแล้วเติมกรดอะซิติกปริมาตร 20 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. ชั่งไดโซเดียมเตตระบอเรตเดคะไฮเตรต (disodium tetraborate decahydrate) 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร

4. ชั่งซัลฟานิลาไมด์ (sulphanilamide) 2 กรัม ละลายในน้ำอุ่นปริมาตร 800 มิลลิลิตรแล้ว ทิ้งให้เย็นและกรอง จากนั้นเติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร (คนตลอดเวลา) ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. ชั่งเอ็น-1-แนปทิลลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (N-1-naphthylene diamine dihydrochloride) 0.25 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่นแล้วใส่ในขวดสีชาและแช่ตู้เย็นเก็บไว้ได้ประมาณ 1 อาทิตย์

6. กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 445 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

ข) การเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรท์เพื่อทำกราฟมาตรฐาน

1. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไนไตรท์ (stock) เตรียมโดยชั่งโซเดียมไนไตรท์ 1.0 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

2. สารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ใช้ในการทดลองควรเตรียมใหม่ทุกวัน โดยสามารถเตรียมได้ดังนี้ ปิเปตสารละลาย stock ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น และนำมาเจือจางอีกครั้ง จากนั้นปิเปตสารละลายปริมาตร 5, 10 และ 20 มิลลิลิตรลงในน้ำ 100 มิลลิลิตร โดยสารละลายที่ได้จะมีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์เป็น 2.5, 5.0 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ค) การเตรียมวัตถุดิบสำหรับวิเคราะห์ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง

เตรียมตัวอย่างวัตถุดิบโดยทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้เครื่องบดซึ่งเป็นวัตถุดิบที่ยังไม่ได้ปรุงให้รีบทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง และวัตถุดิบที่ใช้สามารถเก็บไว้ได้นานถึง 4 วัน โดยเก็บไว้ในภาชนะปิดที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นชั่งวัตถุดิบที่ผ่านการทำให้เป็นเนื้อเดียวแล้ว 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตรแล้วเติมสารละลายไดโซเดียมเตตระบอเรต-เดคะไฮเตรตปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นร้อนปริมาตร 70 มิลลิลิตร (อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส) ลงในบีกเกอร์ แล้วผสมให้เข้ากันและถ่ายใส่ลงในฟลาสก์ที่มีปริมาตร 200 มิลลิลิตร โดยใช้น้ำร้อนปริมาตร 75 มิลลิลิตร และบ่มในอ่างน้ำร้อนนาน 30 นาทีพร้อมทั้งมีการเขย่าสม่ำเสมอ ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ไตรไฮเดรตปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมกับสารละลายซิงค์อะซิเตตดีไฮเดรตปริมาตร 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้ได้เกือบถึง 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น จากนั้นปรับพีเอชของสารละลายให้ได้พีเอช 8.3 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 โมลาร์ หลังจากปรับพีเอชให้ปรับปริมาตรให้ได้ 200 มิลลิลิตร แล้วทิ้งไว้ 30 นาที และกรองเอาสารละลายส่วนใสเพื่อนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

ง) การวัดสี

ปิเปตสารที่กรอง 0.9 มิลลิลิตร ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร เติมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและสารละลายกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 6 มิลลิลิตรและทิ้งไว้ที่มืด 5 นาที จากนั้นเติมสารละลายเอ็น-1-แนปทิลลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ปริมาตร 2 มิลลิลิตรแล้วทิ้งไว้ที่มืด 3 นาที ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตรและวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร และเตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายของตัวอย่าง สำหรับการสร้างกราฟมาตรฐานให้นำสารละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 มิลลิลิตรในแต่ละความเข้มข้นเพื่อเตรียมทำกราฟมาตรฐานที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร (แกน X) และปริมาณของไนไตรท์ (แกน Y)

3.2.2 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด การแยกแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด และ Micrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

3.2.2.1 การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดและจำนวน Micrococcaceae ทั้งหมด

การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด และจำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์บ่ม โดยชั่งตัวอย่างละ 25 กรัมด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อใส่ในถุงพลาสติกปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นอาหารเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จนถึงระดับความเจือจาง 10^{-6} ซึ่งการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดด้วยเทคนิค pour plate ทำได้โดยปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-4} ถึง 10^{-6} ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ปราศจากเชื้อและเติมอาหาร MRS agar (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส) ซึ่งเติมแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งก่อนนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar สำหรับการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ Micrococcaceae ทั้งหมดนั้นให้ใช้เทคนิค spiral plate ด้วยเครื่อง spiral plater ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-4} โดยเครื่อง spiral plater จะดูดตัวอย่างที่ระดับความเจือจางละ 50 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง PCA สำหรับวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ทั้งหมด และลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MSA สำหรับวิเคราะห์หา Micrococcaceae ทั้งหมด แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นตรวจนับจำนวนโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดพร้อมทั้งคำนวณหาจำนวน

จุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด และ Micrococcaceae ทั้งหมด ในรูปของ CFUต่อกรัมของตัวอย่าง

3.2.2.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก และ Micrococcaceae

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของเชื้อที่ขึ้นบนอาหารแข็ง MRS (จาก 3.2.2.1) ที่มีโซนใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี ลากลงบนอาหารแข็ง MRS ส่วนการแยกเชื้อ Micrococcaceae เขี่ยเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง MSA ที่มีลักษณะนูน มีสีขาวขุ่นหรือครีมขุ่น นำมาลากบนอาหารแข็ง MSA ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อได้เชื้อที่บริสุทธิ์แล้วให้เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและ Micrococcaceae ใส่ในอาหารเหลว MRS และ BHI ที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 15 ตามลำดับ ที่บรรจุในหลอดทนความเย็นและเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

การทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีลักษณะเหมาะสมต่อการใช้ไปเป็นกล้าเชื้อต้องทดสอบการมีกิจกรรมของเอนไซม์เช่น กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส การทดสอบกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดี และโซเดียมคลอไรด์ การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase และกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี agar well diffusion การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี ตลอดจนการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

3.2.3.1 การศึกษากิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติก

ก) วิธีการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคที่เรียกรดแลคติก

ทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ลงในอาหารเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งไปและทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมให้เข้ากันและปรับความขุ่นของเซลล์แต่ละสายพันธุ์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 2 ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร

ข) วิธีการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่นำมาทดสอบ

วิธีการเตรียมสารแขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ทดสอบทำได้โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกเช่น *Enterococcus faecium* TISTR 1283, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 ในอาหารเหลว MRS ส่วนแบคทีเรียก่อโรคเช่น *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076, *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Yersinia enterocolitica* DMST 9380 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว nutrient broth (NB) และ *Vibrio parahaemolyticus* OYI เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว stock vc medium (ประกอบด้วยเปปโตน 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 3 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 3 กรัมต่อลิตร โซเดียมคลอไรด์ 20 กรัมต่อลิตร โซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตร พีเอช 7.2) โดยเชื้อส่วนใหญ่นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *Vibrio parahaemolyticus* OYI บ่มที่อุณหภูมิห้อง และ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จากนั้นนำแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งไปและทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมให้เข้ากันและปรับความขุ่นของเซลล์แต่ละสายพันธุ์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^9 CFUต่อมิลลิลิตร

ค) การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar spot test

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar spot test ทำตามวิธีการของ Schillinger และ Lück (1989) ปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ซึ่งหยดสารแขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลตต่อจานเพาะเชื้อ 1 จานทำ 3 ซ้ำ และนำไปบ่มในสภาวะที่ไม่มีอากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยของเชื้อใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งแต่ละชนิด (ทั้งหมด 11 ชนิด) ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076, *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Vibrio parahaemolyticus* OYI, *Yersinia enterocolitica* DMST 9380, *Enterococcus faecium* TISTR 1283, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Vibrio parahaemolyticus* OYI และ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 ซึ่งได้เตรียมไว้ตามวิธีการในข้อ 3.2.3.1 ข) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในอาหาร MRS soft

agar (สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบ) หรือ TSYE soft agar (สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสผสมให้เข้ากันแล้วเทเชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีกลูโคสความเข้มข้นร้อยละ 0.2 ซึ่งได้บ่มไว้แล้วข้างต้น และนำไปบ่มต่ออีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *Vibrio parahaemolyticus* OYI ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกโดยสังเกตจากการเกิดโซนใส (clear zone) รอบ ๆ เชื้อที่คัดแยกบนอาหารแข็ง MRS แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2.3.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ก) การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (catalase test)

การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลสทำตามวิธีการของ Harrigan (1998) ซึ่งทำได้โดยเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตจากหลอดอาหาร MRS มาแตะบนสไลด์ที่สะอาด หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงไป โดยใช้ dropper หรือ pasteur pipette ถ้าเกิดฟองก๊าซขึ้นทันทีให้ผลการทดสอบเป็นบวกแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส แต่ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นลบ

ข) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสโดยวิธี agar plate method

ทำการทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสตามวิธีการของ Papamaloni และคณะ (2002) ซึ่งทำได้โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโพแทสเซียมไนเตรท (KNO_3) ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งแล้วเจาะให้ได้หลุมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลุมนั้น นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยหยดสารละลาย NIT 1 (เตรียมได้จากกรดซัลฟานิลิก 0.8 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) และ สารละลาย NIT 2 (เตรียมได้จากไดเมทิลแนฟทิลลามีน 0.6 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ท่วมผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อถ้ามีไนเตรทจะเกิดสีแดงรอบหลุมที่ใส่สารแขวนลอยของเซลล์ซึ่งได้แสดงกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส

ค) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส

ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสอาศัยวิธีการทดสอบเชิงคุณภาพ (qualitative test) ซึ่งทำได้โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ 1 ลูป ลงในอาหารเหลว MRS (หรือ BHI กรณีเป็น Micrococcaceae) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่มแล้วของแต่ละแต่ละไอโซเลตใส่ในหลอดทดลองปลอด

เชื้อ หลอดละ 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 หลอด สำหรับหลอดที่ 1 ปิเปตสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตรและเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และนำส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ด้วยวิธี griess assay ทันทีโดยนำส่วนใสที่ได้มาเติม griess reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร [เตรียมได้โดยผสมสารละลายซัลฟานิลาไมด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในสารละลายกรดฟอสฟอริกความเข้มข้นร้อยละ 5 ปริมาตร 50 ไมโครลิตรเข้ากับสารละลาย N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ซึ่งเตรียมด้วยน้ำบริสุทธิ์คุณภาพสูง] สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นสีชมพู โดยนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร ส่วนหลอดที่ 2 หลังจากเติมสารละลายโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (พีเอช 7) ปริมาตร 1 มิลลิลิตรแล้วผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสที่ได้มาเติม griess reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรและนำผลค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของหลอดที่ 1 ถ้าหากสีชมพูจางลง (ค่าการดูดกลืนแสงลดลง) แสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวกคือมีการใช้ไนไตรท์ซึ่งเนื่องมาจากกิจกรรมของเอนไซม์ไน-ไตรท์รีดักเทสของจุลินทรีย์ที่ทดสอบ (Priscilla Salome และคณะ. 2009)

3.2.3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase

ในขั้นตอนแรกควรทำการกระตุ้นแบคทีเรียกรดแลคติกที่จะทดสอบเพื่อให้เกิดการชักนำการสร้างเอนไซม์ก่อนการทดสอบจริงโดยนำแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตที่จะทดสอบมาถ่ายเชื้อ (subculture) 5 ครั้งในอาหารเหลว MRS ที่เติมกรดอะมิโนทั้งหมด 5 ชนิดได้แก่ L-tyrosine, L-histidine monohydrochloride, L-orithine monohydrochloride และ L-lysine monohydrochloride กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ Pyridoxal-5-phosphate ความเข้มข้นร้อยละ 0.005 หลังจากการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ในขั้นตอนที่สองทำการทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase (ไม่ก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีน) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการกระตุ้นแล้วตามวิธีการของ Bover-Cid และ Holzapfel (1999) โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตมาลากบนอาหารแข็ง decarboxylase medium (ประกอบด้วย ทริปโตน 5 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม เนื้อสกัด 5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 2.5 กรัม กลูโคส 0.5 กรัม tween 80 1 มิลลิลิตร $MgSO_4$ 0.2 กรัม $MnSO_4$ 0.05 กรัม $FeSO_4$ 0.004 กรัม ammonium citrate 2 กรัม triamine 0.01 กรัม KH_2PO_4 2 กรัม $CaCO_3$ 0.1 กรัม pyridoxal-5-phosphate 0.005 กรัม bromocresol purple 0.06 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม

รวมทั้งกรดอะมิโนทั้งหมด 4 ชนิด ได้แก่ L-tyrosine, L-histidine monohydrochloride, L-ornithine monohydrochloride และ L-lysine monohydrochloride กรดอะมิโนแต่ละชนิดมีความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปรับพีเอชให้ได้ 5.3 ฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) สังเกตการตกตะกอนรอบ ๆ โคโลนี เปรียบเทียบกับ decarboxylase medium ที่ไม่เติมกรดอะมิโน (ชุดควบคุม) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนและตรวจผลการเปลี่ยนแปลงสีของอินดิเคเตอร์ ถ้าหากมีการเปลี่ยนสีเป็นสีม่วงหรือเกิดบริเวณใสรอบ ๆ รอยลาก แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase (มี amino acid decarboxylase activity มากกว่า 350 มิลลิกรัมต่อกรดอะมิโนต่อลิตร) ถ้าหากไม่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณรอบ ๆ รอยลากแสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ชนิดนี้

3.2.3.4 การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

ก) การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ทำตามวิธีการของ Chung และคณะ (1999) โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 โมลาร์ ให้ได้พีเอช 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 จากนั้นปิเปตอาหารที่ปรับพีเอชแล้วในแต่ละระดับปริมาตร 190 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate และเติมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ปรับความขุ่นของเซลล์เท่ากับความขุ่นของ McFarland เบอร์ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ลงในทุกหลุม ปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร (ร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนบ่มและหลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หาค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้ โดยเชื้อที่สามารถเจริญได้จะเพิ่มจำนวนได้จนทำให้เกิดความขุ่นเพิ่มมากขึ้นสังเกตจากค่าดูดกลืนแสงที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับค่าดูดกลืนแสงก่อนบ่ม

ข) การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ ก) โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 85 ให้ได้พีเอช 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 หาค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้

ค) การทดสอบการทนต่อกรดเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก ใช้วิธีการเดียวกันกับข้อ ก) โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่เติม porcine bile ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ

5.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 8 และหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้

ง) การทดสอบการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ ก) โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้

3.2.3.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี

ก) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

1. การย้อมแกรม

ทำการย้อมแกรมโดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตลงในหยดน้ำบนสไลด์แล้วสเมียร์เชื้อให้เป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ บนสไลด์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อนก่อนที่จะหยดคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาทีและล้างออกด้วยน้ำ จากนั้นหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์อีกครั้งและทิ้งไว้อีก 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำแล้วหยดสารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 นาน 30 วินาทีสำหรับชะล้างสีบนรอยสเมียร์และล้างออกด้วยน้ำ หลังจากนั้นหยดซาฟรานีน (safranin) ให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาทีและล้างด้วยน้ำอีกครั้ง ทิ้งให้แห้งแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อศึกษาการเรียงตัวและการติดสีของแบคทีเรีย

ข) การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีเพื่อการจำแนกชนิดถึงระดับจีนัส

1. การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่ปรับความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 2 ซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสและอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

2. การทดสอบการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และร้อยละ 18

ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลต ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์แตกต่างกัน 2 ระดับคือความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และความเข้มข้นร้อยละ 18 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

3. การทดสอบการเจริญที่พีเอช 4.4 และพีเอช 9.6

การทดสอบการเจริญที่พีเอชต่าง ๆ ทำได้โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่มีพีเอช 4.4 และพีเอช 9.6 จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

4. การทดสอบการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส

การทดสอบการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสทำตามวิธีการของ Harrigan (1998) ซึ่งทำได้โดยปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร Gibson 's semi tomato juice medium ผสมให้เข้ากันรอจนอาหารแข็งตัวแล้วปิดทับด้วยอาหาร Nutrient agar ให้มีความหนาประมาณ 3 เซนติเมตร ทิ้งไว้ให้แข็งตัวแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นในอาหารหรืออาหารแยกตัวออกเป็นสองชั้น แสดงว่ามีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลบวก) และถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นในอาหารแสดงว่าไม่มีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลลบ)

ค) การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีเพื่อการจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH (BioMérieux)

API 50 CH คือชุดทดสอบสมบัติทางชีวเคมีทั้งหมด 50 การทดสอบ เพื่อศึกษาปฏิกิริยาเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ที่ทดสอบเพื่อศึกษาการจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และสกุลที่ใกล้เคียง โดยมีอุปกรณ์สำคัญที่จำเป็นดังนี้ (1) API 50 CHL medium เป็นอาหารเหลวที่ประกอบด้วยโพลีเปปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม tween 80 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไดโพแทสเซียมฟอสเฟต (dipotassium phosphate) 2 กรัม โซเดียมอะซิเตท (Sodium acetate) 5 กรัม ไดแอมโมเนียมซิเตรท (diamonium citrate) 2 กรัม $MgSO_4$ 0.20 กรัม $MnSO_4$ 0.05 กรัม bromocresol purple 0.17 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.7-7.1 (2) API 50 CHL strips ซึ่งใช้ในการศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตและอนุพันธุ์ของคาร์โบไฮเดรต (heterosides, polyalcohols และ uronic acids) มี microtube ทั้งหมด 50 หลอดแบ่งออกเป็น 5 ชุดย่อย คือ 0-9, 10-19, 20-29, 30-39 และ40-49 แต่ละชุดมี 10 microtube โดยสารคาร์โบไฮเดรตในแต่ละ strip (ตามตารางที่ ข1 ในภาคผนวก ข) (3)สารละลายมาตรฐาน McFarland Standard เบอร์ 2 (4) mineral oil (5) ถาดรังผึ้ง (6)โปรแกรม API Identification soft ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังนี้

1. การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบ (preparation of the inoculum)

ทำการเตรียมเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ในอาหารเหลว MRS นำมาปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้ง เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 500 ไมโครลิตรเพื่อให้ได้สารแขวนลอยเซลล์เข้มข้น จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์เข้มข้นนี้เติมลงในสารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งได้สารแขวนลอยที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 2 (บันทึกปริมาตรของสารแขวนลอยเซลล์เข้มข้นที่ใช้

ในการปรับความขุ่น สมมุติเท่ากับ V ไมโครลิตร) จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์เข้มข้นปริมาตร V ไมโครลิตร เติมลงในอาหาร API 50 CHL เพื่อให้ได้ความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 2

2. การถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงใน API 50 CH strips

การถ่ายเชื้อที่จะทดสอบทำได้โดยปิเปตอาหาร API 50 CH medium ที่เติมเชื้อที่ต้องทดสอบแล้วนำมาใส่ลงในหลอด (Cupule) ของแต่ละ strips ซึ่งได้แยกเป็น 5 strips ย่อยแล้วคือ strips ที่ 1 (หลอดที่ 0-9) strip ที่ 2 (หลอดที่ 10-19) strip ที่ 3 (หลอดที่ 20-29) strip ที่ 4 (หลอดที่ 30-39) strip ที่ 5 (หลอดที่ 40-49) โดยแตะปิเปตลงด้านข้างของหลอดเพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศโดยเติมอาหาร API 50 CH ลงไปจนเต็มหลอด เติมจนครบทั้ง 50 หลอด จากนั้นหยอดด้วย Mineral oil ให้เต็มหลอดเพื่อทำให้มีสภาพมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยและนำ strip ใส่ลงในถาดรังผึ้งที่เตรียมไว้เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. การอ่านผลการทดสอบ

ทำการอ่านผลในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม โดยจดบันทึกลงในตารางการทดสอบ ถ้าให้ผลบวกแสดงว่ามีการสร้างกรดทำให้ bromocresol purple ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ถ้าให้ผลลบอาหารจะไม่เปลี่ยนสี (สำหรับในหลอดที่ 25 เป็นการทดสอบเอสคูลิน (Esculin) ถ้าผลการทดสอบเป็นบวกอาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นดำ) หลังจากนั้นนำผลการทดสอบที่บันทึกได้มาเข้าโปรแกรม API identification software เพื่อการแปลผลการทดสอบทำให้ทราบชื่อสปีชีส์ของแบคทีเรียที่ทดสอบ

3.2.4 การคัดเลือก coagulase negative staphylococci ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

3.2.4.1 การทดสอบเพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus*

ในการทดสอบเพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* ทำได้โดยทดสอบการผลิตกรดจากกลูโคสและกลีเซอรอล ความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน ความต้านทานต่อเบซิ-ตราซิน และการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส โดยถ้าเป็น *Micrococcus* จะไม่สามารถผลิตกรดจากกลูโคสและกลีเซอรอลได้ ต้านทานต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน แต่จะไวต่อเบซิตราซินและสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้ แต่ถ้าเป็น *Staphylococcus* สามารถสร้างกรดจากกลูโคสและกลี-เซอรอลได้ นอกจากนี้ต้องมีความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน แต่ต้องต้านทานต่อเบซิตรา-ซินและไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส สามารถทดสอบได้ตามขั้นตอนดังนี้

ก) การผลิตกรดจากกลูโคส

การผลิตกรดจากกลูโคสตามวิธีการของ Baker (1984) โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 ลิตร ที่ประกอบด้วย ทริปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 1 กรัม bromocresol purple 0.04 กรัม กลูโคส 10 กรัม วุ้น 2.2 กรัม ปรับให้ได้พีเอช 7.0 และใส่ลงในหลอดทดลองฝาเกลียว ก่อนจะผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นถ่ายเชื้อที่จะทดสอบประมาณ 1-2 ลูปลงในอาหารที่เตรียมไว้และเททับด้วย mineral oil บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการทดลองหากอาหารบริเวณรอบ ๆ เชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลืองเมื่อมองผ่านใต้ก้นหลอดทดลองแสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บ่มต่อจนครบ 5 วัน ก่อนจะบันทึกผลการทดลองเป็นลบ

ข) การผลิตกรดจากกลีเซอรอล

การผลิตกรดจากกลีเซอรอลตามวิธีการของ Baker (1984) โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วย $NH_4H_2PO_4$ 1 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม $MgSO_4.7H_20$ 0.2 กรัม ยีสต์สกัด 2 กรัม กลีเซอรอล 10 มิลลิลิตร bromcresol purple 0.04 กรัม วุ้น 9 กรัม ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร ก่อนผ่านการฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมอิริโทรมัยซิน (erythromycin) ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร 0.04 กรัม จากนั้นเทอาหารลงในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ลากเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ข้างต้น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตผลการทดลองจากการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลืองบริเวณรอบ ๆ เชื้อที่ลากไว้ แสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวกและถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงให้บ่มต่ออีกจนครบ 72 ชั่วโมงก่อนบันทึกผลการทดลองเป็นลบ

ค) การยับยั้งของฟูราโซลิโดน (furazolidone)

การทดสอบการยับยั้งของฟูราโซลิโดนตามวิธีการของ Baker (1984) โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่ต้องการทดสอบ โดยที่ปรับความขุ่นของเซลล์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 ให้มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากัน 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง Mueller Hinton นำแผ่นกระดาษกรองที่มีฟูราโซลิโดนความเข้มข้น 100 ไมโครกรัม วางลงบนกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งที่เกิดรอบแผ่นกระดาษกรอง และพบว่า ฟูราโซลิโดนสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Micrococcus*

ง) ความต้านทานต่อแบซิตราซิน (bacitracin)

การทดสอบความต้านทานต่อแบซิตราซินตามวิธีการของ Baker (1984) โดยใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุ่มลงในเซลล์แขวนลอยของเชื้อที่ต้องการทดสอบ แล้วเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารแข็ง Mueller Hinton นำแผ่นกระดาษกรองที่มีแบซิตราซินความเข้มข้น 0.04 ยูนิต วางลงบนกึ่งกลางของจานเพาะเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตและ

วัดขนาดของโซนที่เกิดจากการยับยั้งรอบกระดาษกรอง โดยแบซิตราซินสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Micrococcus* แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus*

จ) ความไวต่อไลโซสตาฟีน (lysostaphin)

การทดสอบความไวต่อไลโซสตาฟีนตามวิธีการของ Baker (1984) โดยเขี่ยเชื้อที่แยกได้แต่ละไอโซเลตมา 1 ลูปลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 กวนให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเติมสารละลายไลโซสตาฟีนความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ถ้าความขุ่นในของผสมหายไปแสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้ายังขุ่นถือว่าให้ผลการทดลองเป็นลบ

ฉ) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ตามวิธีการของ Bennett และ Lancette (2001) โดยลากเชื้อที่แยกได้แต่ละไอโซเลตลงบนกระดาษกรองที่ชุ่มด้วย N,N,N,N-Tetramethyl-p-phenylenediamine ความเข้มข้น 0.01 กรัมต่อมิลลิลิตร สังเกตผลการทดลองภายใน 30 วินาที ถ้ากระดาษกรองที่มีเชื้ออยู่เปลี่ยนเป็นสีม่วงเข้ม แสดงว่าให้การทดลองเป็นบวกซึ่งมีการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงภายใน 30 วินาทีแสดงว่าให้ผลการทดลองเป็นลบ

3.2.4.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์ตะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส และไนไตรท์รีดักเทส ตามข้อ 3.2.3.2 จากนั้นคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่สร้างเอนไซม์ตะตะเลส ไนเตรทรีดัก-เทส และไนไตรท์รีดักเทส และนำมาทดสอบเพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* ในขั้นตอนต่อไป

3.2.4.3 การทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase

การทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ตามข้อ 3.2.3.3

3.2.4.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase test)

การทดสอบการสร้างเอนไซม์โคแอกกูลเลสตามวิธีการของ Bennett และLancette. (2001) โดยเขี่ยเชื้อจากโคโลนีของ *Staphylococcus* ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว BHI ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร ผสมเชื้อให้เข้ากันดีกับอาหารเหลว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมโคแอกกูเลสพลาสมาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในอาหาร BHI ที่มีเชื้อ *Staphylococcus* เจริญอยู่และนำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง อ่านผลโดยสังเกตการจับตัวเป็นลิ่มของพลาสมา (ให้ผลบวก) แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ให้ผลลบ) และคัดเลือกเฉพาะ *Staphylococcus* ที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase-negative)

3.2.4.5 การจำแนกชนิดของสเตรปฟีโลคอกคัสโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะทางชีวเคมี

ก) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการศึกษาการติดสีแกรมแบคทีเรียโดยการย้อมแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 100 เท่า เพื่อสังเกตรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย

ข) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Staphylococcus*

ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Staphylococcus* โดยใช้ชุดทดสอบ API staph (Biomérieux) : ซึ่งเป็นชุดทดสอบใช้จำแนกแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus, Micrococcus* และ *Kocuria* โดยอาศัยหลักชีวเคมีทั้งหมด 20 การทดสอบ ซึ่ง strip ของ API staph ประกอบหลอด จำนวน 20 หลอดที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) ใช้สำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ สามารถอ่านผลโดยเทียบกับ analytical profile index หรือ identification software โดยมีวิธีการทดสอบตลอดจนการอ่านค่าและแปรผลในภาคผนวก ข

3.2.5 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative *Staphylococcus* ที่คัดเลือกด้วยการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี Agar well diffusion

จากการทดลองได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 10 ไอโซเลต ที่มีสมบัติเหมาะสมในการ โดยพิจารณาสมบัติที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส แต่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส รวมทั้งไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase และสามารถทนต่อกรดและน้ำดีได้ดี และ coagulase-negative *Staphylococcus* จำนวน 1 ไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส และเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส แต่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase เพื่อนำเชื้อที่คัดเลือกมาทดสอบการมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

3.2.5.1 การเตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative *Staphylococcus*

วิธีการทดสอบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Cuozzo และคณะ (2001) ; Schillinger และ Lücke. (1989) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและสเตรปฟิโลคอกคัสที่ต้องการทดสอบแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว MRS และ BHI ปริมาตร 5 มิลลิลิตรตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant)ที่ได้ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จนส่วนใสมีพีเอชเท่ากับ 6.5 และนำไปกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร แล้วเติมเอนไซม์คะตะเลส (จาก bovine liver บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.5.2 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธีการ agar well diffusion

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion (Cuozzo และคณะ. 2001 ; Schillinger และ Lücke. 1989) โดยเชื้อแบคทีเรียสำหรับทดสอบ ได้แก่ *Bacillus cereus* DMST 5040, *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076, *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Vibrio parahaemolyticus* OYI, *Yersinia enterocolitica* DMST 9380 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB ส่วนเชื้อ *Enterococcus faecium* TISTR 1283, *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *Vibrio parahaemolyticus* OYI ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง เพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบและปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหาร MRS soft agar (สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบ) หรือ TSYE soft agar (สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ) ซึ่งมี agar ร้อยละ 0.7 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วเทเชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.2 และ TSYE ซึ่งมี agar ร้อยละ 1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลง ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง แล้วเจาะให้ได้หลุมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำส่วนใสคือสารยับยั้งที่เตรียมไว้มากำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยการเติมเอนไซม์คะตะเลส (จาก bovine liver บริษัท Sigma-Aldrich) ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตรหลุมละ 40 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่ออีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกให้บ่มในสภาวะที่ไม่มีอากาศ) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้น *Vibrio parahaemolyticus* OYI ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง และ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative *Staphylococcus* ที่นำมาทดสอบ โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดรอบ ๆ หลุมที่ได้หยดสารยับยั้งบนอาหาร MRS และ TSYE soft agar

3.2.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

3.2.6.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือก

วิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือกทำตามวิธีการทดลองของชุด MasturePure™ Gram Positive DNA purification kit (บริษัท EPICENTRE® ประเทศสหรัฐอเมริกา)

โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละไอโซเลตลากลงบนอาหารแข็งแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เจริญบนอาหาร ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติม ready-lyse lysosome ปริมาตร 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำหลอดมาทำให้เย็นลงจนได้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย MPC protein precipitation ปริมาตร 175 ไมโครลิตร ลงในสารละลายผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 10 วินาที นำหลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ RNaseA ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม isopropanal ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เขากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาประมาณ 30 ถึง 40 ครั้ง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทิ้งส่วนใสแล้วปิเปตเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและปั่นเหวี่ยง ทิ้งส่วนใสด้านบนและตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จะได้จีโนมิกดีเอ็นเอเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.6.2 การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสทำได้ดังนี้ เตรียมเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ละลายในไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่นแล้วเติมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar) (บริษัท CAMBREX ประเทศสหรัฐอเมริกา) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเทใส่แม่พิมพ์เจลจนกระทั่งแผ่นเจลแข็งย้ายแผ่นเจลลงในอ่าง (gel chamber) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากข้อ 3.2.6.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอและหยอดลงในหลุมแผ่นเจล ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำแผ่นเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตร้าไวโอเลต

3.2.6.3 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอวิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนเป้าหมาย (Target DNA) ในหลอดทดลองโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและซ้ำกันหลายรอบเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ PCR 1 เท่า ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิโมลาร์ ไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรเมอร์ฟอร์เวิร์ด 0.25 ไมโครโมลาร์ ไพร์เมอร์รีเวิร์ด 0.25 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 2.5 ยูนิต (บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา) และจีโนมิกดีเอ็นเอ ปรับปริมาณสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 ไมโครลิตร

จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีสภาวะดังแสดงในตารางที่ 3.1 และเมื่อครบกำหนดเวลานำหลอด PCR ไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสเช่นเดียวกับข้อ 3.2.6.2

ตารางที่ 3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้แต่ละไอโซเลต

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา	
Initial denaturation	94	10 นาที	
Denaturation	94	30 วินาที	35 รอบ
Annealing	55	30 วินาที	
Primer extension	72	90 วินาที	
Final extension	72	10 นาที	

3.2.6.4 การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.2.6.3 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick PCR purification kit (บริษัท qiagen ประเทศเยอรมนี) โดยนำผลิตภัณฑ์ PCR ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเติมสารละลายบัฟเฟอร์ PBI ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใสทิ้ง เติมสารละลายบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งแล้วเทส่วนใสทิ้งและปั่นเหวี่ยงซ้ำเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ใส่หลอดทดลองใหม่และเติมสารละลายบัฟเฟอร์ EB ปริมาณ 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงจะได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์และนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

3.2.6.5 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี big dye terminator reaction ด้วยเครื่อง ABI PRISM® 3700 DNA Analyzer (บริษัท first base ประเทศมาเลเซีย) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลี-

โอไทด์ที่รายงานในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BLAST server ของ National Center Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA

3.2.7 การผลิตสารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกและการนำสารยับยั้งที่ได้ไปประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

จากการทดลองในข้อที่กล่าวมาทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยพิจารณาจากสมบัติที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรท รีดักเทส แต่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส รวมทั้งไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ตลอดจนสามารถทนต่อกรดและน้ำดีได้ดี รวมทั้งมีกิจกรรมการยับยั้งเพื่อต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยสารยับยั้งโดยวิธี agar well diffusion แล้วนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกนี้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ตลอดจนศึกษาการทำสารยับยั้งที่ผลิตได้ให้บริสุทธิ์ และความคงทนของสารยับยั้งต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ รวมทั้งทดลองนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคชนิดที่แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งได้ตามการทดลองในขั้นตอนต่อไปนี้ดังนี้

3.2.7.1 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

ก) การหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง

ทำการศึกษาเพื่อหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมส่งผลให้มีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงสุดซึ่งทำตามวิธีการของ Altuntas และคณะ (2010) โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37, 39 และ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.5.1) และนำสารยับยั้งที่ผลิตได้มาหากิจกรรมของสารยับยั้งดังนี้

ก.1) การวิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้ง

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้วิธี agar well diffusion (Cuozzo และคณะ. 2001 ; Schillinger และ Lücke. 1989) โดยปิเปตสารแขวนลอยของแบคทีเรียก่อโรค (ชนิดที่คัดเลือกแล้วจากผลการทำ agar well diffusion ในข้อ 3.2.5.2 ซึ่งถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบ) ซึ่งได้เตรียมไว้แล้ว (ตามวิธีการในข้อ 3.2.3.1) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร TSYE soft agar (มี agar ร้อยละ 0.7) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งบรรจุอยู่ในหลอดทดลองผสมสารแขวนลอยเซลล์กับอาหารเลี้ยงเชื้อให้เข้ากันดีแล้วเทลงบนอาหาร TSYE soft agar (มี agar ร้อยละ 1.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชั้นแรกที่บรรจุใน

จานเพาะเชื้อซึ่งได้เตรียมไว้ล่วงหน้าแล้ว จากนั้นทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้งแล้วเจาะหลุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วทำสารที่จะวิเคราะห์หากิจกรรมการยับยั้งเช่น ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ละสารละลายโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนมาเจือจางแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilution) จนได้หลาย ๆ ระดับความเจือจางเช่น เจือจางที่ระดับความเจือจาง 1: 2^1, 1: 2^2, 1: 2^3… แล้วปิเปตส่วนใสที่แต่ละระดับความเจือจางนี้ปริมาตร 40 ไมโครลิตร หยดลงในหลุมอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้เจาะไว้แล้ว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยสังเกตการเกิดโซนใสและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดรอบ ๆ หลุมที่ได้หยดสารยับยั้งบนอาหาร TSYE soft agar และคำนวณกิจกรรมของสารยับยั้งตามวิธีการในภาคผนวก ค

ข) การหาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง

ทำการศึกษาเพื่อหาระดับพีเอชที่เหมาะสมส่งผลให้มีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงสุดซึ่งทำตามวิธีการของ Altuntas และคณะ (2010) โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มีพีเอช 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.5.1) และนำสารยับยั้งที่ผลิตได้มาทดสอบเพื่อต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี agar well diffusion เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3.2.7.1 (ก.1) โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณหากิจกรรมของสารยับยั้งตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

ค) การศึกษาผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารสารยับยั้ง

ทำการเปรียบเทียบผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งให้กิจกรรมของสารยับยั้งสูงสุดตามวิธีการของ Todorov และคณะ (2011) ทำได้ดังนี้ โดยปิเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 60 มิลลิลิตรที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหารต่าง ๆ กัน จำนวน 31 สูตรได้แก่ สูตรที่ 1) อาหารเหลว MRS สูตรปกติ (ตามสูตรของ Difco ได้แก่ โปรติโอสเปปโตนเบอร์ 3 (proteose peptone no 3) 10 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด (beef extract) 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด (yeast extract) 5 กรัมต่อลิตร กลูโคสหรือเดกโทรส 20 กรัมต่อลิตร โซเดียมอะซิเตท (sodium acetate) 5 กรัมต่อลิตร ทวีน 80 (tween 80) 1 กรัมต่อลิตร ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (dipotassium hydrogen phosphate) 2 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซิเตท (ammonium citrate) 2 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต (magnesium sulfate) 0.1 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต (manganese sulfate) 0.05 กรัมต่อลิตร) (ชุดควบคุม) สูตรที่ 2-6) อาหาร MRS ปกติที่เติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส มอลโตส และซูโครส จำนวน 20 กรัมแทนน้ำตาลกลูโคส

ตามลำดับ สูตรที่ 7-9) อาหาร MRS ปกติที่เติมกลูโคสเพิ่มเป็น 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ สูตรที่ 10-11) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 ตามลำดับ สูตรที่ 12-13) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมยีสต์สกัดเพิ่มเป็น 10 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่ 14) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 12.5 กรัมต่อลิตร แทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 7.5 กรัมต่อลิตร สูตรที่15) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 20 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 10 กรัมต่อลิตร สูตรที่16) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทริปโตน 10 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 20 กรัมต่อลิตร สูตรที่ 17-19) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเพิ่มเป็น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่ 20-23) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2, 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทนไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต สูตรที่ 24) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตรแทนสูตรปกติที่ไม่เติมวิตามินบี 1 สูตรที่ 25) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมวิตามินบี 12 ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตรแทนสูตรปกติที่ไม่เติมวิตามินบี 12 สูตรที่ 26-28) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มเป็น 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่ 29-31) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมแมงกานีสซัลเฟต 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.5.1) และนำสารยับยั้งที่ผลิตได้มาวิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้ง (AU ต่อมิลลิลิตร) ตามวิธีการข้อ 3.2.7.1 (ก.1)

3.2.7.2 การศึกษาการทำสารยับยั้งที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์

จากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ การหาระดับอุณหภูมิ ระดับพีเอช และส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดและนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารยับยั้ง ซึ่งทำการทดลองโดยทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดในอาหารเหลว MRS ที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสมปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมซึ่งได้ผลการทดลองในข้อ 3.2.7.1 (ก)

ก) ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์

ปริมาตรส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ 200 มิลลิลิตร นำมาแบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังนี้คือ ส่วนที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้ง (AU ต่อมิลลิลิตร) ตามวิธีการข้อ 3.2.7.1 (ก.1) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามวิธีการของ Bradford (ภาคผนวก ข) ส่วนที่ 3 ปริมาตร 188 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

- วิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ในการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (ทำตามวิธีการที่ดัดแปลงของ Ogunbanwo และ คณะ. 2003 ; Doonan. 2004) ซึ่งทำได้โดยเติมส่วนใสปริมาตร 188 มิลลิลิตร ลงในบีกเกอร์ขนาด 500 มิลลิลิตร ซึ่งวางลงบนกระบะน้ำแข็งที่ตั้งอยู่บน stirrer จากนั้นต่อย ๆ เติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ละน้อยร้อยละ 20 (10.6 กรัม) ร้อยละ 25 (2.8 กรัม) ร้อยละ 30 (3 กรัม) ร้อยละ 35 (3 กรัม) ร้อยละ 40 (3.2 กรัม) ร้อยละ 45 (3.2 กรัม) ร้อยละ 50 (3.3 กรัม) ร้อยละ 55 (3.5 กรัม) และร้อยละ 60 (3.5 กรัม) (ปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมดูในภาคผนวก ข) โดยในแต่ละระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียมซัลเฟต เมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟตลงไปแล้วคนจนละลายหมดก่อนแล้วจึงเติมแอมโมเนียมซัลเฟตเพิ่มขึ้นจนถึงระดับความเข้มข้นต่อไป เมื่อสิ้นสุดการเติมแอมโมเนียมซัลเฟตที่ร้อยละ 60 คนจนละลายแล้วคนต่อเนื่องอีก 10 นาที จากนั้นจึงนำสารละลายทั้งหมดไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำตะกอนโปรตีนที่ได้มาละลายโดยเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช 7) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร

ข) สารละลายโปรตีนที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากสารละลายโปรตีนที่ได้ปริมาตร 50 มิลลิลิตร นำมาแบ่งเป็น 3 ส่วนดังนี้คือ ส่วนที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้ง (AU ต่อมิลลิลิตร) ตามวิธีการข้อ 3.2.7.1 (ก.1) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามวิธีการของ Bradford (ภาคผนวก ข) ส่วนที่ 3 ปริมาตร 38 มิลลิลิตร นำไปทำไดอะไลซิสในขั้นตอนต่อไป

- วิธีการทำไดอะไลซีส (dialysis)

นำสารละลายโปรตีนส่วนที่ 3 ปริมาตร 38 มิลลิลิตร ใส่ลงในถุงไดอะไลซีสเบอร์ 6 ซึ่งมี MWCO ขนาด 1000 ดาลตัน ซึ่งมีความยาว 14.3 เซนติเมตร ซึ่งได้เตรียมไว้แล้ว (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) และได้เตรียมไว้แล้ว (ตามวิธีการในภาคผนวก ข) จากนั้นปิดด้วยตัวหนีบทั้งสองด้านหัวท้าย และนำถุงไดอะไลซีสใส่ลงในภาชนะทรงกระบอกที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 20 เซนติเมตร ความสูง 32 เซนติเมตร ที่บรรจุสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ (พีเอช 7) ปริมาตร 5 ลิตร และนำแท่งแม่เหล็กที่ปราศจากเชื้อลงในภาชนะดังกล่าวจากนั้นจึงปิดเครื่องกวน (stirrer) ถุงไดอะไลซีสจะลอยและหมุนอย่างอิสระในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ การทำไดอะไลซีสจะทำไดอะไลซีสจะทำที่อุณหภูมิห้อง เมื่อทำไดอะไลซีสครบ 12 ชั่วโมง เปลี่ยนสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ใหม่ (fresh dialysis solution) จากนั้นทำไดอะไลซีสต่อไปจนครบ 24 ชั่วโมง ปิดเครื่องกวนแล้วนำถุงไดอะไลซีสออกมา จากนั้นถอดตัวหนีบออกแล้วเทสารละลายโปรตีนลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร แบ่งสารละลายโปรตีนออกเป็น 3 ส่วนคือ ส่วนที่ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปวิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้ง (AU ต่อมิลลิลิตร) ตามวิธีการข้อ 3.2.7.1 (ก.1) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตาม

วิธีการของ Bradford (ภาคผนวก ข) ส่วนที่ 3 ปริมาตร 26 มิลลิลิตร นำไปตกตะกอนด้วยกรดไตร-คลอโรแอซิติกต่อไป

ค) สารละลายโปรตีนที่ได้หลังจากการทำไดอะไลซีส

นำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนหลังจากการทำไดอะไลซีสในข้อ ข ปริมาตร 26 มิลลิลิตร มาทำการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซีติกตามวิธีการของ Ogunbanwo และคณะ (2003) โดยเติมกรดไตรคลอโรแอซิติกร้อยละ 5 (สารละลายโปรตีน 26 มิลลิลิตร ใช้กรดไตรคลอโรแอซีติก 1.3 กรัม) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและเติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร

ง) สารละลายโปรตีนที่ได้หลังจากการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซีติก

สารแขวนลอยโปรตีนที่ได้จากขั้นตอนในข้อ ค มากแบ่งออกเป็น 2 ส่วนดังนี้คือ สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปวิเคราะห์กิจกรรมของสารยับยั้งตามวิธีการในข้อ 3.2.7.1 (ก.1) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไปหาปริมาตรโปรตีน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ตามวิธีการของ Bradford (ภาคผนวก ข)

3.2.7.3 การศึกษาอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค

จากการทดสอบการทำสารยับยั้งให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ข้างต้นแล้วจึงเลือกขั้นตอนซึ่งให้กิจกรรมของสารยับยั้งเพื่อต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดแล้วนำมาทดสอบความคงตัวต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ดังต่อไปนี้

ก) ความคงตัวของสารยับยั้งต่ออุณหภูมิ

การทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเพื่อต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกดัดแปลงจาก Ogunbanwo และคณะ (2003) ; Castro และคณะ (2011) นำสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 6.5 (เพื่อกำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรด) จากนั้นกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (เพื่อกำจัดจุลินทรีย์) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37, 63, 72 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100 และ 121 เป็นเวลา 15 นาที (ทั้งหมด 8 ชุดทดลอง) ในอ่างน้ำร้อน (water bath) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion ตามข้อ 3.2.7.1 (ก.1)

ข) การทดสอบผลของพีเอชที่มีต่อสารยับยั้ง

การทดสอบผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเพื่อต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกดัดแปลงจาก Ogunbanwo และคณะ (2003) ; Castro และคณะ (2011) นำสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปรับพีเอชเป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก หรือ สารละลายโซเดียม

ไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion ตามข้อ 3.2.7.1 (ก.1)

ค) การทดสอบผลของเอนไซม์ที่มีต่อสารยับยั้ง

การทดสอบผลของเอนไซม์ที่มีต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเพื่อต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกดัดแปลงจาก Lee และคณะ (1999) นำแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับเอนไซม์แต่ละชนิดได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน (จาก porcine pancreas บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) เอนไซม์เพปซิน (จาก porcine gastric mucosa บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส (จาก *Aspergillus oryzae* บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสวิตเซอร์แลนด์) เอนไซม์ไลเปส (จาก hog pancreas บริษัท Sigma-Aldrich ประเทศสหรัฐอเมริกา) และ เอนไซม์ปาเปน (จาก carica papaya บริษัท Merck ประเทศเยอรมนี) ที่ละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเอนไซม์เพปซินให้ละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล และให้น้ำกลั่นเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ยกเว้นเอนไซม์ทริปซินและเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลสนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion ตามข้อ 3.2.7.1 (ก.1)

3.2.8 การศึกษาการนำสารยับยั้งมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว

การทดลองนี้ได้เปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ด้วยสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมทั้ง 2 สายพันธุ์ซึ่งผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธีการที่เหมาะสม (ที่ปริมาตรของสารยับยั้ง 2 ระดับคือ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ 30 มิลลิลิตร) ในอาหารเหลวโดยทำการทดลองตามวิธีของ Pinto และคณะ (2009) ดังนี้ ทำการเติมสารยับยั้งที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ที่ปริมาตร 2 ระดับ (ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และ 30 มิลลิลิตร) ลงในฟลาสก์ที่มีอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อ *Listeria monocytogenes* เจริญอยู่ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบ 4 ชั่วโมง (การเจริญเติบโตของเซลล์อยู่ในระยะ exponential phase ช่วงต้น) นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสุ่มตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโน-เมตร ในระหว่างการบ่มทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง

3.2.9 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์โดยใช้สารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

3.2.9.1 การศึกษาผลของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการต้านการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็น

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของสารยับยั้ง (ร้อยละ 2 และร้อยละ 4) ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมที่คัดเลือกทั้ง 2 สายพันธุ์ ในหมูบดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อการอยู่รอดหรือการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ซึ่งทำการทดลองตามวิธีการดังนี้

ก) การเตรียมสารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มาผลิตสารยับยั้งโดยใช้สภาวะที่เหมาะสมได้แก่อุณหภูมิของการบ่ม ค่าพีเอชและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้ดีที่สุด (ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2.7.1) จากนั้นนำสารยับยั้งที่ผลิตได้มาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการที่เหมาะสมซึ่งจะทำให้กิจกรรมการยับยั้งสูงสุด (ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2.7.2) ก่อนนำมาเติมในหมูบด

ข) การเตรียม *Listeria monocytogenes* (สายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลการทำ agar well diffusion)

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว TSB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งให้เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งไปและทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมให้เข้ากันและปรับความขุ่นของเซลล์แต่ละสายพันธุ์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตรของจุลินทรีย์ก่อโรค

ค) การใช้สารยับยั้งในการควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็น (chilled ground pork)

ทำการเตรียมหมูบดซึ่งประกอบด้วยเนื้อหมูบดร้อยละ 80 และมันหมูร้อยละ 20 ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ นำเนื้อหมูและมันหมูมาล้างให้สะอาดก่อนจึงนำมาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (kitchenaid model 5k5SS) ที่อัตราความเร็ว 2 เป็นเวลา 3 นาที (สุ่มตัวอย่างหมูบด 25 กรัม นำไปวิเคราะห์หาเชื้อ *List. monocytogenes* ตามวิธีของ Hitchins และ Jinneman. 2011) จากนั้นแบ่งส่วนผสมทั้งหมดออกเป็น 6 ส่วนเพื่อนำมาเติมสารยับยั้งทั้งหมด

6 ทรีตเมนต์ดังนี้ ส่วนที่ 1) หมูบดชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง) ส่วนที่ 2) หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมสารยับยั้ง) ส่วนที่ 3) หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร้อยละ 2 ส่วนที่ 4) หมูบดที่สารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร้อยละ 4 ส่วนที่ 5) หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร้อยละ 2 ส่วนที่ 6) หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร้อยละ 4 หลังจากเติมสารยับยั้งและผสมให้เข้ากันดีแล้วใส่ลงในถุงปลอดเชื้อก่อนเติมสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่ได้เตรียมไว้แล้วข้างต้นซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตรลงในหมูบด (ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหมูบด 25 กรัม) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^5 CFU ต่อกรัม นำเนื้อหมูบดทั้งหมดไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 7 และ 10 วันของการเก็บรักษา เพื่อนำมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมด (total presumptive *Listeria monocytogenes*) และทำการวัดค่าพีเอช พร้อมทั้งวิเคราะห์กิจกรรมของสารยับยั้งต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในวันสุดท้ายของการทดลอง การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมดมีดังนี้

การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวน *List. monocytogenes* ทั้งหมดตามวิธีการของ Yousef และ Carlstrom (2003) โดยนำตัวอย่างหมูบดจำนวน 25 กรัม ใส่ถุงตีป่นที่ปลอดเชื้อแล้วเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นตีป่นด้วยเครื่องตีป่นอาหารเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางให้ได้ระดับที่เหมาะสมในการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดให้ทำการเจือจางถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-5} และจำนวนแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมดให้ทำการเจือจางถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-4} โดยใช้เทคนิค spread plate ซึ่งปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับสุดท้าย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในแต่ละระดับความเจือจางลงบนอาหารแข็ง PCA สำหรับการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และอาหาร selective media (PALCAM ที่เติม antimicrobic supplement) สำหรับการหาจำนวน *List. monocytogenes* แล้วใช้แท่งแก้วงอเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับอาหารแข็ง PCA ส่วนจานอาหาร selective media นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรีย *List. monocytogenes* ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมตัวอย่างของหมูบด)

จ) การวัดค่าพีเอช

การวัดหาค่าพีเอชของเนื้อหมูบดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (รุ่น Testo 205)

ฉ) การวิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก

สุ่มตัวอย่างเนื้อหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในวันสุดท้ายของการเก็บรักษามาวิเคราะห์เพื่อหากิจกรรมของสารยับยั้งในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคตามวิธีของ Garriga และคณะ (2002) ดังนี้

นำตัวอย่างหมูบด 10 กรัมใส่ลงในถุงพลาสติกปลอดเชื้อแล้วเติมสารละลายผสมปริมาตร 90 มิลลิลิตร (เตรียมได้จากการนำสารละลายโซเดียมแอซิเดตความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และสารละลาย EDTA ความเข้มข้น 100 มิลลิโมลาร์ ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมลงในบีกเกอร์ที่เติม tritonX 100 ร้อยละ 0.2 และปรับให้มีพีเอช 5) นำไปตีป่นให้เข้ากันด้วยเครื่องตีป่น (stomacher) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นนำไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วนำไปกรองด้วยผ้าขาวบางปลอดเชื้อ สำหรับส่วนใสที่ได้นำมาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (300 กรัมต่อลิตร) และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ (พีเอช 7) และให้ความร้อนอีกครั้งที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำสารยับยั้งที่ได้มาทำการเจือจางแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilutions) และทดสอบกิจกรรมของสารยับยั้งในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคตามข้อ 3.2.7.1 (ก.1) ต่อไป

3.2.9.2 การศึกษาผลของสารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกต่อการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในแหนม

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของสารยับยั้งร้อยละ 4 ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกต่อการอยู่รอดหรือยับยั้งการเจริญของ *List. monocytogenes* ในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งทำการทดลองตามวิธีการดังนี้

ก) การเตรียมสารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มาผลิตสารยับยั้งตามขั้นตอนข้อ 3.2.9.1 ก)

ข) การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและ *Listeria monocytogenes*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ชนิดและ *List. monocytogenes* ในอาหารเหลว MRS และ TSB ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งให้เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งไปและทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมให้เข้ากันและปรับความขุ่นของเซลล์แต่ละสายพันธุ์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 ให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตร

ค) การใช้สารยับยั้งร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อควบคุมการเจริญของ

*Listeria monocytogenes*ในแหนม

ทำการเตรียมแหนมซึ่งประกอบด้วยเนื้อแดงบดร้อยละ70.3 หนังหมูร้อยละ 17.6 กระเทียมร้อยละ 4.4 เกลือป่นร้อยละ 2.0 น้ำตาลทรายร้อยละ 0.4 ผงชูรสร้อยละ 0.1 และข้าวสุกร้อยละ 5.1ตามวิธีการดังนี้คือ นำเนื้อหมูไปล้างให้สะอาดก่อนนำมาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ จากนั้นค่อย ๆ เติมส่วนประกอบเช่น กระเทียม เกลือป่น น้ำตาล ข้าวสุก และผงชูรสลงไปผสมกับเนื้อหมูบดและหนังหมู แล้วผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมด้วยอัตราเร็วเบอร์ 2 เป็นเวลา 5 นาที (สุ่มตัวอย่างหมูบด 25 กรัม นำไปวิเคราะห์หาเชื้อ *List. monocytogenes* ตามวิธีของ Hitchins และ Jinneman. 2011) จากนั้นแบ่งส่วนผสมทั้งหมดออกเป็น 6 ส่วน เพื่อนำมาเติมสารยับยั้งและกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6 ทรีตเมนต์ดังนี้ ส่วนที่ 1) แหนมชุดควบคุม (ที่ไม่เติมสารยับยั้ง) ส่วนที่ 2) แหนมที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ส่วนที่ 3) แหนมที่จะนำมาเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ส่วนที่ 4) แหนมที่จะนำมาเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร่วมกับสารยับยั้งที่ผลิตจากกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร้อยละ 4 ส่วนที่ 5) แหนมที่จะนำมาเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ส่วนที่ 6) แหนมที่จะนำมาเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร่วมกับสารยับยั้งที่ผลิตจากกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร้อยละ 4 หลังจากเติมสารยับยั้งและ/หรือสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์และผสมให้เข้ากันดีแล้ว นำแหนมทุกทรีตเมนต์มาเติมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคที่เตรียมไว้แล้วข้างต้น ซึ่งมีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^9 CFU ต่อมิลลิลิตรลงในแหนมหมู (ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อแหนม 25 กรัม) เพื่อให้มีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10^5 CFU ต่อกรัม แล้วนำตัวอย่างแหนมทั้งหมดที่บรรจุในถุงพลาสติกและมัดให้แน่นไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 2 และ 3 วันของการหมัก เพื่อวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดและจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรค (ตามวิธีการในข้อ 3.2.9.1) และวัดค่าพีเอชพร้อมทั้งวิเคราะห์กิจกรรมของสารยับยั้งต่อการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในวันสุดท้ายของการทดลอง

3.3. การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำได้แก่ ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวน *List. monocytogenes* ทั้งหมดในเนื้อหมูบดแช่เย็น ผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดและจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในแหนม ตลอดจนค่าพีเอชของทั้ง 2 การทดลอง มาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ Completely Randomized Design (CRD) ด้วยวิธี Analysis variance (ANOVA) และ duncan 's multiple range test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละชุดการทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS version 11.5

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

จากการศึกษาคุณภาพทางเคมีของตัวอย่างเนื้อวัว เนื้อหมู เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน รวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง พบว่าเนื้อสดมีค่าพีเอชเป็นกรดเล็กน้อย (ตารางที่ 4.1)โดยค่าพีเอชของเนื้อวัวสด (5.50-5.98) สูงกว่าค่าพีเอชของเนื้อหมูสดเล็กน้อย (5.30-5.52) ขณะที่ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มเช่น เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสานต่ำกว่าค่าพีเอชของเนื้อสด โดยเฉพาะไส้กรอกอีสานมีค่าพีเอชต่ำที่สุด (4.32-4.85) สำหรับค่า a_w ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสของเนื้อสดพบว่ามีค่า a_w ค่อนข้างสูง โดยเนื้อหมูและเนื้อวัวสดมีค่า a_w อยู่ในช่วง 0.991-0.997 ซึ่งสูงกว่าค่า a_w ของเบคอน (a_w 0.979-0.989) แหนม (a_w 0.964-0.972) และไส้กรอกอีสาน (a_w 0.958-0.975) ส่วนปริมาณไนไตรท์ตกค้างพบว่าในเนื้อสดมีปริมาณไนไตรท์ตกค้างบ้างเล็กน้อยในช่วง 0.35-1.41 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งต่างกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มซึ่งพบว่าเบคอนมีปริมาณไนไตรท์ตกค้างมากที่สุดถึง 23.26 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งสูงกว่าปริมาณไนไตรท์ตกค้างที่พบในไส้กรอกอีสานและแหนม (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 คุณลักษณะทางเคมีของเนื้อวัวสด เนื้อหมูสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ค่าพีเอช	ค่า a_w ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส	ปริมาณไนไตรท์ตกค้าง (มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม)
เนื้อวัวสด	10	5.50-5.98	0.991-0.995	0.71-1.41
เนื้อหมูสด	10	5.30-5.52	0.992-0.997	0.35-1.06
เบคอน	10	4.98-5.56	0.979-0.989	0.35-23.26
แหนม	10	4.45-5.20	0.964-0.972	1.40-4.56
ไส้กรอกอีสาน	10	4.32-4.85	0.958-0.975	1.80-4.93
รวม	50	-	-	-

การที่เนื้อสดมีค่าพีเอชเป็นกรดเล็กน้อยอาจเป็นเพราะหลังจากที่สัตว์ตาย กล้ามเนื้อของสัตว์เกิดการเปลี่ยนแปลงโดยไกลโคเจนที่สะสมอยู่ในกล้ามเนื้อสลายตัวภายใต้กระบวนการไกลโคไล-ซิสแบบไม่ใช้ออกซิเจนได้เป็นไพรูเวตและกลายเป็นกรดแลคติกที่สะสมอยู่ในกล้ามเนื้อจึงทำให้

พีเอชของเนื้อสัตว์ลดลง (Feiner. 2006) ซึ่งโดยปกติพีเอชของเนื้อหมูสดอยู่ในระหว่าง 5.6-5.8 (Faustman. 1994) และพีเอชของเนื้อวัวสดอยู่ระหว่าง 5.1-6.2 (Jay และคณะ. 2005) จากการทดลองพีเอชของเนื้อหมูต่ำกว่าพีเอชของเนื้อวัว ทั้งนี้ค่าพีเอชที่แตกต่างกันอาจเกี่ยวข้องกับปริมาณไกลโคเจนที่สะสมอยู่ในกล้ามเนื้อ Blixt และBorch (2001) ได้วัดปริมาณไกลโคเจนเริ่มต้นของเนื้อหมูและเนื้อวัวที่นำมาทดสอบพบว่าเนื้อหมูและเนื้อวัวสดที่มีน้ำหนัก 100 กรัมมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.35 และ 5.45 และมีปริมาณไกลโคเจน 3,960 และ1,548 มิลลิกรัมตามลำดับ ส่วนการที่ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักโดยเฉพาะแหนมและไส้กรอกอีสานมีค่าพีเอชค่อนข้างต่ำอาจเป็นเพราะมีกรดอินทรีย์เช่นกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจากการหมัก คาร์โบไฮเดรตที่ใช้เป็นส่วนผสมในการหมักมีผลทำให้พีเอชลดลงโดยคาร์โบไฮเดรตที่ใช้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณสุดท้ายของกรดแลคติกทั้งนี้มีรายงานว่าการเติมคาร์โบไฮเดรตที่ร้อยละ 0.5-0.7 ทำให้พีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลงต่ำกว่า 5.0 เล็กน้อย การเติมคาร์โบไฮเดรตปริมาณที่มากเกินพอทำให้พีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลงใกล้ 4.5 ซึ่งเห็นได้ชัดหากเติมคาร์โบไฮเดรตเพียงเล็กน้อย (ต่ำกว่าร้อยละ 0.3) พีเอชของผลิตภัณฑ์ก็จะไม่ลดลงมากนัก (Toldrà และคณะ. 2001) และการศึกษาของ Visessanguan และคณะ (2006) พบว่าแหนมที่เก็บไว้อย่างน้อย 36 ชั่วโมงจะมีค่าพีเอช 4.6 และมีน้ำหนักลดลงเนื่องจากมีการสูญเสียน้ำในระหว่างการหมัก การสูญเสียน้ำในแหนมมีความสัมพันธ์กับการลดลงของค่าพีเอช

จากผลการวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรท์ตกค้างในเนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่มพบว่าอยู่ในระดับไม่เกินมาตรฐานซึ่งตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับ 281 (พ.ศ. 2547) ได้กำหนดให้ใช้โซเดียมไนไตรท์เติมในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ไม่เกิน 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม อย่างไรก็ตามถึงแม้จากการทดลองนี้ตรวจไม่พบไนไตรท์ตกค้างเกินมาตรฐาน แต่ก็มีรายงานการตรวจพบไนไตรท์ตกค้างซึ่งสำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคพบโรคอาหารเป็นพิษจากโซเดียมไนไตรท์ เนื่องจากผู้ป่วยรับประทานไส้กรอกที่มีปริมาณไนไตรท์มากถึง 3,137 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553)

4.2 การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด และจำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

จากการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของเนื้อวัว เนื้อหมู เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน พบว่าเนื้อวัวและเนื้อหมูมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุดถึง 1.8×10^9 CFU ต่อกรัม ซึ่งมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในแหนม เบคอน และไส้กรอกอีสาน (1.2×10^5-1.1×10^8 CFU ต่อกรัม) (ตารางที่ 4.2) ส่วนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าในแหนมและเบคอน (1.1×10^6-6.7×10^8 CFU ต่อกรัม) มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดมากกว่าในเนื้อวัวและเนื้อหมู (7.0×10^5-9.3×10^7

ตารางที่ 4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก และ Micrococcaceae ในเนื้อหมู เนื้อวัว เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน

ชนิดตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)	จำนวน Micrococcaceae ทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก		จำนวน Micrococcaceae ที่คัดเลือกได้ (ไอโซเลต)
					คัดเลือก (ไอโซเลต)	สร้างสารยับยั้ง (agar spot test) (ไอโซเลต)	
เนื้อวัว	10	1.2×10^{7}-1.8×10^{9}	7.8×10^{5}-9.3×10^{7}	2.2×10^{4}-9.6×10^{6}	100	21	80
เนื้อหมู	10	3.7×10^{6}-1.7×10^{9}	7.0×10^{5}-4.0×10^{7}	1.8×10^{4}-1.0×10^{7}	70	43	90
เบคอน	10	2.7×10^{6}-5.4×10^{7}	1.1×10^{6}-1.2×10^{7}	< 2,500	100	40	0
แหนม	10	3.2×10^{7}-1.1×10^{8}	2.5×10^{6}-6.7×10^{8}	5.0×10^{3}-2.9×10^{4}	83	47	30
ไส้กรอกอีสาน	10	1.2×10^{5}-1.6×10^{7}	1.7×10^{4}-2.3×10^{7}	4.5×10^{3}-1.2×10^{4}	50	33	50
รวม	50	-	-	-	403	184	250

CFU ต่อกรัม) ส่วนไส้กรอกอีสานพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดน้อยที่สุด (1.7 x 10^4 CFU ต่อกรัม) แต่จำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดที่พบในเนื้อวัวและเนื้อหมูสด (1.8 x 10^4-1.0 x 10^7 CFU ต่อกรัม) สูงกว่าในเบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน โดยแหนมและไส้กรอกอีสานมีจำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดใกล้เคียงกันในช่วง 4.5 x 10^3-2.9 x 10^4 CFU ต่อกรัม ขณะที่เบคอนมีจำนวน Micrococaceae ทั้งหมดน้อยกว่า 2,500 CFU ต่อกรัม

การศึกษาที่ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดจำนวน 403 ไอโซเลต แล้วนำไปศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ส่วน Micrococcaceae ที่คัดแยกได้จำนวน 250 ไอ-โซเลตถูกนำไปทดสอบการผลิตกรดจากกลูโคส การผลิตกรดจากกลีเซอรอล การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟีน และความต้านทานต่อแบซิตราซิน เพื่อแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* ต่อไป

การพบว่าเนื้อวัวและเนื้อหมูที่มีจุลินทรีย์ปนเปื้อนสูงนั้นชี้ให้เห็นถึงสุขลักษณะในการผลิตที่ไม่ดี การปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ในเนื้อสดเกิดขึ้นระหว่างการแปรรูปโดยเริ่มตั้งแต่การฆ่า เมื่อซากสัตว์ถูกปนเปื้อนโดยจุลินทรีย์ที่อาศัยอยู่บนผิวด้านนอก จุลินทรีย์ในทางเดินอาหารและจุลินทรีย์ในระบบน้ำเหลืองของสัตว์เองจากจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมรวมทั้งจากผู้ปฏิบัติการ ทั้งนี้แหล่งที่พบการปนเปื้อนหลัก ๆ มาจากมูลสัตว์ และหนังสัตว์ เช่นแบคทีเรียวงศ์ Micrococcaceae ในสกุล Micrococci และStaphylococci (Hammes และ Knauf. 1994) Siriken และคณะ (2006) ได้ตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของไส้กรอกตุรกีพบแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic bacteria) (10^7CFU ต่อกรัมขึ้นไป) Lactobacilli (10^8CFUต่อกรัมขึ้นไป) และ Micrococci หรือ Staphylococci (10^6CFU ต่อกรัมขึ้นไป)

4.3 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

4.3.1 ผลการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี Agar spot test

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 403 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นทั้งหมด 11 ชนิด ที่ทดสอบด้วยวิธี agar spot test พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างน้อย 1 ชนิด มีจำนวน 184 ไอโซเลต โดยเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบซึ่งถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มากที่สุดคือ *Enterococcus faecium* TISTR 1283 (คิดเป็นร้อยละ 73.37 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ 184 ไอโซเลต) ส่วนเชื้อที่ถูกยับยั้งการเจริญรองลงมาคือ *Bacillus cereus* DMST 5040 คิดเป็นร้อยละ 63.69

การที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้นั้นเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างกรดอินทรีย์ทำให้พีเอชลดลง สร้างสารแบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งมีส่วนในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Adams และMoss. 2008) Schillinger และ Lücke (1989) ได้คัดแยกสายพันธุ์ของเชื้อ *Lactobacillus* จากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ด้วยวิธี agar spot test พบว่า *Lactobacillus sake* จำนวน 19 สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* จำนวน 3 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus curvatus* 1 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อ Lactobacilli อื่นได้

4.3.2 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจำนวน 184 ไอโซเลต มาทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส ไนไตรท์รีดักเทส และการไม่สร้างเอนไซม์ amino acid decarboxylase พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลตที่คัดเลือกไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส ส่วนการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 38 ไอโซเลต (ร้อยละ 20.65 ของแบคทีเรียกรดแลคติก 184 ไอโซเลต) สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส และจากการทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 114 ไอโซเลต (ร้อยละ 61.96 ของแบคทีเรียกรดแลคติก 184 ไอโซเลต)ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase (ตารางที่ 4.3) จากผลการทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติก จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 25 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสและไม่สร้างเอนไซม์ amino acid decarboxylase ซึ่งได้แก่ C0403, C0604, C0605, C0608, C0609, C0610, C0708, P0509, P0510, P0706, P0708, P0804, P0806, B0407, B0410, B0708, B0709, B1002, B1010, S0602, T0701, T0704, T0901, T0903, T0904 มาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส แต่แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ก็สามารถสร้างเอนไซม์คะละเลสแบบแท้จริงหรือเอนไซม์คะตะเลสแบบไม่แท้จริง (pseudocatalase)ได้ (Krökel. 1995) ซึ่งเอนไซม์คะตะเลสช่วยป้องกันการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เร่งให้ผลิตภัณฑ์เกิดกลิ่นหืนและสีซีด (Ammor และ Mayo. 2007) ถึงแม้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสได้แต่ไม่พบการสร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส การที่เป็นเช่นนี้เป็นเพราะมีแบคทีเรียกรดแลคติกเพียงส่วนน้อยที่ช่วยในการปริมาณลดไนเตรทและไนไตรท์ ซึ่ง *L. plantarum* สามารถลดไนเตรทในหลอดทดลองแต่ไม่สามารถทำได้ในสภาวะการหมักเนื้อ และกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสของแบคทีเรียกรดแลคติกมีด้วยกัน 2 แบบ คือ 1) กิจกรรมที่มีฮีม (heme-dependent) ซึ่งได้แอมโมเนียเป็นผลิตภัณฑ์ 2) กิจกรรมที่ฮีมเป็นอิสระ (heme-independent) ซึ่งจะเกิด NO และ N_2O ซึ่งจะไม่พบในแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์

ตารางที่ 4.3 การสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส และการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ Amino acid decarboxylase ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้ง	แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส		แบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์ Amino acid decarboxylase	
		จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต	จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต
เนื้อวัว	21	10	C0403, C0501, C0503, C0604, C0605, C0608, C0609, C0610, C0708, C0904	8	C0403, C0604, C0605, C0608, C0609, C0610, C0708, C0709
เนื้อหมู	43	9	P0509, P0510, P0706, P0708, P0804, P0806, P0808, P0906, P0907	35	P0501, P0504, P0506, P0508, P0509, P0510, P0610, P0603, P0604, P0605, P0607, P0703, P0705, P0706, P0708, P0709, P0802, P0804, P0806, P0901, P0902, P0903, P0904, P0905, P0910, P1001, P1002, P1003, P1004, P1005, P1006, P1007, P1008, P1009
เบคอน	40	13	B0407, B0410, B0708, B0709, B0807, B0808, B0810, B0901, B0905, B0906, B1002, B1006, B1010	11	B0404, B0406, B0407, B0410, B0610, B0708, B0709, B0910, B1002, B1006, B1010

ตารางที่ 4.3 การสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส และการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ Amino acid decarboxylase ของแบคทีเรียกรดแลคติก (ต่อ)

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้ง	แบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส		แบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์ Amino acid decarboxylase	
		จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต	จำนวนไอโซเลต	รหัสไอโซเลต
แหนม	47	1	S0602	42	S0301, S0302, S0303, S0304, S0305, S0306, S0307, S0308, S0309, S0310, S0402, S0403, S0404, S0405, S0406, S0407, S0408, S0409, S0602, S0803, S0804, S0806, S0807, S0810, S0701, S0702, S0703, S0704, S0706, S0707, S0708, S0709, S0710, S0902, S0903, S0904, S0905, S0906, S0907, S0908, S0909, S0910
ไส้กรอกอีสาน	33	5	T0701, T0704, T0901, T0903, T0904	18	T0101, T0102, T0201, T0202, T0204, T0205, T0402,T0405, T0701, T0703, T0704, T0705, T0802, T0901, T0902, T0903, T0904, T0905
รวม	184	38	-	114	-

L. curvatus และ *L. sake*) (Toldrà และคณะ. 2001) และแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ในเตรทรีดักเทสจึงเหมาะที่จะคัดเลือกเพื่อนำไปศึกษาต่อ

4.3.3 การทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดี และเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่พีเอช 1.5-5.0 พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำสุด 1.5 จำนวน 19 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 76.0 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกทั้งหมด 25 ไอโซเลต รองลงมาคือ พีเอช 2.0 จำนวน 3 ไอโซเลต (ร้อยละ 12.0) และพีเอช 2.5 จำนวน 3 ไอโซเลต (ร้อยละ 12.0) (ตารางที่ 4.4)

การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่เจริญที่พีเอชต่ำสุด 1.5 จำนวน 19 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 76.0 ของแบคทีเรียที่คัดเลือก (25 ไอโซเลต) รองลงมาคือพีเอช 2.0 จำนวน 3 ไอโซเลต (ร้อยละ 12.0) พีเอช 3.0 จำนวน 1 ไอโซเลต (ร้อยละ 4.0) และพีเอช 4.0 จำนวน 1 ไอโซเลต (ร้อยละ 4.0) (ตารางที่ 4.4)

การทดสอบการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 11.0 จำนวน 15 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 60.0 ของแบคทีเรียที่คัดเลือก (25 ไอโซเลต) รองลงมาคือสามารถทนเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10.0 จำนวน 6 ไอโซเลต (ร้อยละ 24.0) ความเข้มข้นร้อยละ9.0 จำนวน 1 ไอโซเลต (ร้อยละ 4.0) และความเข้มข้นร้อยละ 7.0 จำนวน 2 ไอโซเลต (ร้อยละ 8.0) (ตารางที่ 4.4)

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 5.0 จำนวน 14 ไอโซเลต ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 56.0 ของแบคทีเรียที่คัดเลือก (25 ไอโซเลต) รองลงมาคือแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ4.0 จำนวน 1 ไอโซเลต (ร้อยละ 4.0) ความเข้มข้นร้อยละ3.0 จำนวน 3 ไอโซเลต (ร้อยละ 12.0) ความเข้มข้นร้อยละ 2.0 จำนวน 6 ไอโซเลต (ร้อยละ 24.0) และ ความเข้มข้นร้อยละ 1.5 จำนวน 1 ไอโซเลต (ร้อยละ 4.0) (ตารางที่ 4.4)

แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกและกรดแลคติกในระดับพีเอชต่ำและความเข้มข้นของเกลือน้ำดีในระดับสูงซึ่งเป็นลักษณะของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดและเกลือน้ำดีที่สามารถมีชีวิตรอดไปจนถึงลำไส้ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยการหลั่งสารหลายชนิดออกมาต่อต้านและยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยจะไปช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โพรไบโอติกที่เจริญเติบโตจะไปแข่งขันกับเชื้อโรคไม่ให้เจริญและไม่ให้เกาะติดผนังลำไส้ ลดโรคที่จะเกิดจากการ

ติดเชื้อในทางเดินอาหาร รักษาสภาวะของโรคภูมิแพ้ ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง และผลิตเอนไซม์ที่จำเป็นต่อร่างกาย (Fuller. 1989 ; Saarela และคณะ. 2000) นอกจากเชื้อที่ทนต่อสภาวะเป็นกรดและเกลือน้ำดีในสำไส้แล้ว ยังต้องทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เติมลงไปในอาหารด้วย ดังนั้นคุณสมบัติดังกล่าวจึงเหมาะสมในการเป็นกล้าเชื้อเพื่อนำไปศึกษาต่อไป

ตารางที่ 4.4 การทนต่อกรดและเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

แหล่งของไอโซเลต	แบคทีเรียกรดแลคติก รหัสไอโซเลต	พีเอชของกรดไฮโดรคลอริก[a]	พีเอชของกรดแลคติก[a]	เกลือโซเดียมคลอไรด์[b]	เกลือน้ำดี[b]
เนื้อวัวสด	LC0403, LC0609	1.5	1.5	11.0	3.0
	LC0604	1.5	1.5	11.0	5.0
	LC0605	1.5	4.0	7.0	5.0
	LC0608	1.5	1.5	11.0	1.5
	LC0610	1.5	-[c]	-[c]	5.0
	LC0708	1.5	3.0	7.0	5.0
เนื้อหมูสด	LP0509	2.0	2.0	10.0	3.0
	LP0510, LP0804, LP0806	1.5	1.5	11.0	5.0
	LP0706, LP0708	2.5	2.0	10.0	2.0
เบคอน	LB0407, LB0410	1.5	1.5	11.0	5.0
	LB0708	1.5	1.5	10.0	2.0
	LB0709	2.5	1.5	10.0	2.0
	LB1002	2.0	1.5	10.0	2.0
	LB1010	2.0	1.5	9.0	2.0
แหนม	LS0602	1.5	1.5	11.0	4.0
ไส้กรอกอีสาน	LT0701, LT0901, LT0904	1.5	1.5	11.0	5.0
	LT0704, LT0903				

[a] พีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

[b] ความเข้มข้นสูงสุดของเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

[c] ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.3.4 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณลักษณะทางชีวเคมี

จากผลการศึกษาการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 10 ไอโซเลตที่มีความสามารถสูงในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีทั้งหมด 10 ไอโซเลตได้แก่ ไอโซเลต LC0604, LC0605, LB0407, LB0410, LP0510, LP0804, LP0806, LS0602, LT0903 และ LT0904 เพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทดสอบทางชีวเคมีเพื่อจำแนกชนิดถึงระดับจีนัส และจำแนกระดับสปีชีส์ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

ก. การย้อมแกรม

จากผลการทดลองย้อมแกรมแบคทีเรียทั้งหมด 10 ไอโซเลต พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สั้น อยู่อย่างเดียว ๆ เรียงกันเป็นสาย และไม่เคลื่อนที่ ยกเว้นไอโซเลต LT0903 ที่มีรูปร่างกลม

ข. การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีเพื่อการจำแนกชนิดถึงระดับจีนัส

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียทั้ง 10 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกไม่ผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส และเจริญที่พีเอช 4.4 แต่จะไม่เจริญที่พีเอช 9.6 ตลอดทั้งทดสอบสามารถเจริญได้ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 แต่ไม่เจริญที่เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 18 เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติก (ยกเว้นไอโซเลต LT0903 ที่ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่สภาวะที่มีพีเอช 9.6 ตลอดทั้งไม่สามารถเจริญได้ที่เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 แต่ไม่เจริญที่เกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 18) (Axellson. 2004) พบว่าได้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 10 ไอโซเลต อยู่ในจีนัสเดียวกันคือ *Lactobacillus* sp.

ค. การศึกษาสมบัติทางชีวเคมีเพื่อการจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50

จากผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต LC0604, LC0605, LB0407, LP0510, LP0804, LP0806 และ LS0602 มีความเหมือน *Lactobacillus plantarum* ร้อยละ 99.9 (ทั้งหมด 7 ไอโซเลต) ไอโซเลต LB0410 มีความเหมือน *Lactobacillus plantarum* ร้อยละ 99.6 ไอโซเลต LT0903 มีความเหมือน *Lactococus lactis* ssp. *lactis* 1 ร้อยละ 63.3 และ LT0904 มีความเหมือน *Lactobacillus brevis* ร้อยละ 99.6

4.4 การคัดเลือก *Staphylococcus* ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ

4.4.1 การแยก *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus*

จากการทดสอบ Micrococcaceae จำนวน 250 ไอโซเลตที่แยกได้จากเนื้อวัวสด เนื้อหมูสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน เพื่อแยกความแตกต่างของ *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* โดยทดสอบการผลิตกรดจากกลูโคส และกลีเซอรอล ความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน ความต้านทานต่อเบซิตาซิน และการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสซึ่งพบเชื้อที่เป็น *Staphylococcus* มีจำนวน 19 ไอโซเลต (ร้อยละ 7.6 ของ 250 ไอโซเลต) และเชื้อที่เป็น *Micrococcus* มีจำนวน 231 ไอโซเลต (ร้อยละ 92.4) ตามตารางที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 การแยกเชื้อ *Staphylococcus* และ *Micrococcus* ของแบคทีเรียในวงศ์ Micrococcaceae

ตัวอย่าง	Micrococcaceae (ไอโซเลต)	จำนวนไอโซเลต	
		Staphylococcus [a]	*Micrococcus* [b]
เนื้อวัวสด	80	8	72
เนื้อหมูสด	90	4	86
เบคอน	0	0	0
แหนม	30	4	26
ไส้กรอกอีสาน	50	3	47
รวม	250	19	231

[a] *Staphylococcus* สามารถผลิตกรดจากกลูโคส และกลีเซอรอล มีความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน มีความต้านทานต่อแบซิตาซิน และไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้

[b] *Micrococcus* ไม่สามารถผลิตกรดจากกลูโคส และกลีเซอรอล มีความต้านทานต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟิน มีไวต่อแบซิตาซิน และสร้างเอนไซม์ออกซิเดสได้

4.4.2 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของเชื้อ *Staphylococcus* ที่คัดแยกได้

ในการศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ โดยเชื้อ *Staphylococcus* ที่คัดเลือกจำนวน 19 ไอโซเลตพบว่า เชื้อ *Staphylococcus* ทั้ง 19 ไอโซเลตไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลส แต่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสและไนเตรทรีดักเทสได้ โดย *Staphylococcus* 18 ไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase และมีเพียง 1 ไอโซเลต (ร้อยละ 5.26 ของ *Staphylococcus* 19 ไอโซเลต) ที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase คือ ไอโซเลต SC0903 ที่คัดแยกได้จากเนื้อวัวสด (ตารางที่ 4.6)

การที่พบว่า *Staphylococcus* ที่นำมาทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ทั้งหมด เนื่องจาก *Staphylococcus* เป็นแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญดังนั้นเอนไซม์คะตะเลสมักพบในแบคทีเรียที่ใช้ระบบการขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการหายใจเพื่อสร้างพลังงานได้แก่

แบคทีเรียทั้งหมดที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศ (aerobe) และแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีหรือไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) (Kröckel. 1995) Staphylococci มีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสสูงสุดในช่วงเริ่มต้นระยะ Stationary phase ภายใต้สภาวะที่มีอากาศ และที่ความเข้มข้นของกลูโคสในระดับต่ำ (Toldrá และคณะ. 2001) นอกจากนี้ *Staphylococcus* ที่คัดเลือกมาทดสอบยังพบการสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสซึ่งเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นต่อการป้องกันการเน่าเสีย การพัฒนาของสีและการสร้างกลิ่นในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้นั้นสามารถรีดิวซ์สารไนเตรทให้เป็นไนไตรท์และยังนำไนไตรท์กลับมาใหม่ซึ่งถูกเปลี่ยนกลับไปเป็นไนเตรทในปฏิกิริยากับไมโอโกลบินที่จะเกิดขึ้นต่อมา (Toldrá และคณะ. 2001) ทั้งนี้ไนเตรทรีดักเทสจัดเป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ที่ถูกสร้างขึ้นที่ไซโตพลาสมิดเมมเบรนเพื่อเร่งการกระจายของไนเตรทที่ความเข้มข้นของออกซิเจนต่ำหรือภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจนซึ่งไนไตรท์ถูกใช้เป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) และเป็นพลังงานที่ได้จากจุลินทรีย์ (Jessen. 1995) ในการทดลองนี้พบว่า *Staphylococcus* ทั้งหมดที่คัดเลือกมาทดสอบสามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสได้สอดคล้องการศึกษาของ Bonomo และคณะ (2009) ซึ่งได้แยกเชื้อ Staphylococci จากไส้กรอกหมักพบว่า *Staphylococcus equorum* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสสูงสุดเมื่อวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 534 นาโนเมตรเท่ากับ 25.69 ส่วน *Staphylococcus caseolyticus*, *Staphylococcus xylosus* และ *Staphylococcus pulvereri* มีกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทสในช่วง 7.09-22.69 ที่ความยาวคลื่น 534 นาโนเมตร ขณะที่ Essid และคณะ (2007) พบว่า *S. xylosus* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาศึกษาสามารถรีดิวซ์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ที่อุณหภูมิ 25 และ 30 องศาเซลเซียส แต่มีเพียงร้อยละ 66.6 ของ *S. xylosus* ที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทเป็นไนไตรท์ที่อุณหภูมิ 18 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Gøtterup และคณะ (2007) ซึ่งได้ศึกษาความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ไนเตรทและไนไตรท์รีดักเทสของเชื้อ Staphylococci ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม พบว่า *Staphylococcus* บางสายพันธุ์ คือ *S. saprophyticus, S. simulans, S. sciuri* และ *S. carnosus* นั้นสามารถสร้างเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทสและจากการทดลองพบว่า *Staphylococcus* ส่วนใหญ่นั้นมีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ยกเว้น SC0903 เพียงไอโซเลตเดียวที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้ ดังนั้น *Staphylococcus* ไอโซเลตนี้จึงเหมาะสมที่คัดเลือกมาศึกษาต่อไปเนื่องจากไม่มีการสะสมไบโอจีนิกเอมีนในอาหารที่เป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ถูกสร้างขึ้นจากปฏิกิริยาคาร์บอก-ซิเลชัน (decarboxylation) หรือ อะมิเนชัน (amination) ทรานสมิเนชัน (transmination) ของอัลดีไฮด์และคีโทน โครงสร้างทางเคมีของไบโอจีนิกเอเมีนมีทั้งที่เป็น aliphatic (ได้แก่ putrescine, cadaverine, spermine และ spermidine), aromatic (ได้แก่ tyramine และ phenylethylamine) และ heterocyclic (ได้แก่ histamine และ tryptamine) ที่พบในอาหารซึ่งเกิดความเสี่ยงด้านความเป็นพิษและปัญหาทางสุขภาพที่มีสาเหตุมาจากไบโอจีนิกเอมีนจากอาหารที่พบบ่อยเกี่ยวกับ ฮีสตามีน (histamine) (Karovicová และ Kohajdová. 2003) เอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสที่เกี่ยวข้องกับการ

สังเคราะห์สารไบโอจีนิกเอมีนในอาหารส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์จากแบคทีเรียและเอนไซม์นี้มักจะถูกชักนำให้เกิดขึ้นในบางสภาวะเช่น สภาวะที่มีพีเอชเป็นกรด และจากการทดลอง *Staphylococcus* ที่คัดเลือกมาศึกษาทั้ง 19 ไอโซเลตได้ถูกตรวจสอบแล้วว่าไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลส (coagulase-negative *Staphylococcus*) เพื่อประกันว่าเชื้อ *Staphylococcus* ที่จะคัดเลือกมาใช้เป็นกล้าเชื้อนั้นไม่ใช่ *S. aureus* เพราะ *S. aureus* สร้างเอนไซม์โคแอกกลูเลสได้ Cunha และคณะ (2004) ได้ทดสอบการสร้างเอนไซม์แอกกลูเลสของ *Staphylococcus* สปีชีย์ต่าง ๆ เช่นเดียวกันพบเพียง *S. aureus* และ *S. schleiferi* subsp. *coagulans* เท่านั้นที่เป็น Coagulase positive *Staphylococcus* ส่วน *Staphylococcus* สปีชีย์อื่นเช่น *S. epidermidis, S. haemolyticus, S. saprophyticus, S. warneri* และ *S. xylosus* เป็น Coagulase negative *Staphylococcus*

ตารางที่ 4.6 การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรทรีดักเทส ไนไตรท์รีดักเทส และการมีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ของ *Staphylococcus* ที่คัดเลือก

ชนิดของตัวอย่าง	รหัสไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์			
		คะตะเลส	ไนเตรทรีดักเทส	ไนไตรท์รีดักเทส	amino acid decarboxylase
เนื้อวัวสด	SC0204, SC0206, SC0209, SC0608, SC0609, SC0903, SC 0904, SC0907	8	8	1 [a] (SC0903)	7
เนื้อหมูสด	SP0202, SP0204, SP0205, SC0207	4	4	0	4
เบคอน	-	0	0	0	0
แหนม	SS0301, SS0802, SS0804, SS0902	4	4	0	4
ไส้กรอกอีสาน	ST0901, ST0704, ST1001	3	3	0	3
รวม	-	19	19	1	18

[a] ไอโซเลต SC 0903 ที่สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส ไนไตรท์รีดักเทส และการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase

4.5 การจำแนกชนิดของ Coagulase negative *Staphylococcus* ที่คัดแยกได้จากเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

ในการจำแนกชนิดของ Coagulase negative *Staphylococcus* ไอโซเลต SC0903 ซึ่งมีคุณสมบัติต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อได้ทำการศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี

4.5.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Staphylococcus*

จากการศึกษาลักษณะของ *Staphylococcus* ไอโซเลต SC0903 บนอาหารแข็งพบว่ามีลักษณะโคโลนีรูปร่างกลม โค้งนูน ขอบเกลี้ยง สีขาว และผิวเรียบ เมื่อย้อมแกรมและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม อยู่รวมกันเป็นพวงองุ่น

4.5.2 สมบัติทางชีวเคมีของ Coagulase negative *Staphylococcus* ที่คัดเลือก โดยใช้ชุดทดสอบ API Staph

จากผลการทดสอบเพื่อจำแนกชนิดในระดับสปีชีย์โดยใช้ชุดทดสอบ API Staph พบว่า coagulase-negative *Staphylococcus* ไอโซเลต SC0903 เป็น *Staphylococcus xylosus* ร้อยละ 99.9 โดยพบว่าไอโซเลต SC0903 ให้ผลการทดลองเป็นบวกเมื่อใช้สับสเตรตดังนี้คือ D-glucose, D-fructose, D-mannose, D-maltose, D-lactose, D-trehalose, D-mannitol, D-xylitol, D-malibiose, potassium nitrate, B-naphthy phosphate, sodium pyruvate, D-raffinose, D-xylose, D-saccharose และ methyl-αD-glucopyranoside, N-acetyl-glucosamine และ Urea ยกเว้น L-arginine ที่ให้ผลการทดลองเป็นลบ

การจำแนกชนิดของไอโซเลต SC0903 ด้วยชุดทดสอบ API Staph พบว่าให้ค่าความถูกต้องสูงสอดคล้องกับการทดลองของ Cunha และคณะ (2004) ที่พบว่า *Staphylococcus xylosus* สามารถใช้สับสเตรทอย่าง D-xylose, sucrose, D-trehalose, maltose และ mannitol ได้ ขณะที่ Coppola และคณะ (1997) พบว่าสับสเตรทอย่าง raffinose จะให้ผลการทดลองเป็นลบซึ่งไม่สามารถจะนำสับสเตรทดังกล่าวมาใช้ได้

4.6 ผลการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก และ coagulase-negative *Staphylococcus* ที่คัดเลือกด้วยการทดสอบกิจกรรมของแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar well diffusion

จากการทดลองได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 10 ไอโซเลต ที่มีสมบัติเหมาะสมในการโดยพิจารณาสมบัติที่เชื้อสามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส แต่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส รวมทั้งไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase และสามารถทนต่อกรดและน้ำดีได้ดี และ coagulase-negative *Staphylococcus* จำนวน 1 ไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เอนไซม์ไนเตรทรีดักเทส และเอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส แต่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase เพื่อนำเชื้อที่คัดเลือกมาทดสอบการมีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลต คือ LS0602 และLT0904 มีเส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เท่ากับ 6.9 และ 6.2 มิลลิเมตรตามลำดับ โดยทั้ง 2 ไอโซเลตสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เพียงชนิดเดียวคือ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 จากจุลินทรีย์ที่ทดสอบทั้งหมด 11 ชนิด

4.7 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

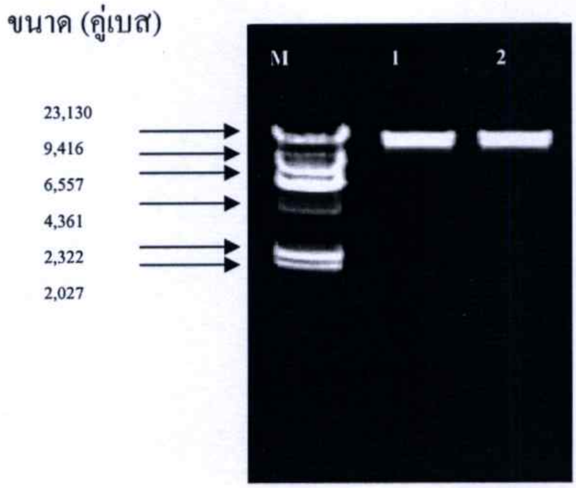
4.7.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส

การวิเคราะห์สำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกคือ ไอโซเลต LS0602 และ LT0904 เริ่มต้นนำแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลตมาสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิสพบแถบจีโนมิกดีเอ็นเอ (รูปที่ 4.1) สูงประมาณแถบ 23.1 กิโลเบสของดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดา แล้วนำมาคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III ซึ่งพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอทั้งสองไอโซเลต มีปริมาณ 60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในขั้นตอนต่อไป

4.7.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

ทำได้โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้แต่ละไอโซเลต (ไอโซเลต LS0602 และ ไอโซเลต LT0904) มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ไอโซเลตละ 1 แถบแล้วนำมาเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*d III พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส ซึ่งตรงกับ

ขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับคือ 1,500 คู่เบส (รูปที่ 4.2) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปทำให้ดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป

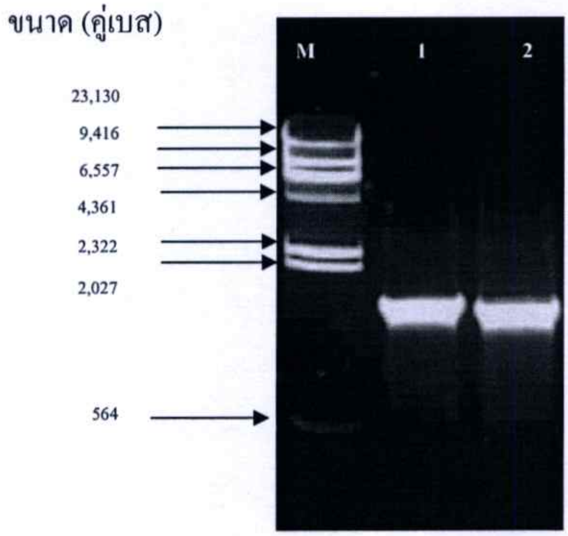


รูปที่ 4.1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต LS0602

2 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต LT0904



รูปที่ 4.2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฝาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII

1 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNAของไอโซเลต LS0602

2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNAของไอโซเลต LT0904

4.7.3 ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์

การทำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณให้บริสุทธิ์ พบว่าแถบดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และมีปริมาณ 60 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร จากการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตคือ ไอโซเลต LS0602 และ ไอโซเลต LT0904 โดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีในระดับจีนัสพบว่าทั้งสองไอโซเลต เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* sp. และเมื่อนำผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 2ไอโซเลตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต LS0602 มีความคล้ายคลึง *Lactobacillus plantarum* ร้อยละ 99 และแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต LT0904 มีความคล้ายคลึง *Lactobacillus brevis* ร้อยละ 99

4.8 ผลการสร้างสารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกและการประยุกต์ใช้เป็นสารยับยั้ง *Listeria monocytogenes*ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บ่ม

4.8.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง

ก) ผลการศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสารยับยั้ง

จากการทดสอบหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งต่อกิจกรรมของสารยับยั้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต คือ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT 0904 ที่ระดับอุณหภูมิต่างกัน 6 ระดับ คือ 25, 30, 35, 37, 39 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิทั้ง 6 ระดับนั้นเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมของสารยับยั้งต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งสูงที่สุด คือ 21.0 และ 18.0 มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.7) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งต่อกิจกรรมของสารยับยั้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* คือ 37 องศาเซลเซียส

ข) ผลการศึกษาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง

สำหรับการทดสอบหาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งต่อกิจกรรมของสารยับยั้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* โดยเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีระดับพีเอชต่างกัน 5 ระดับ คือ พีเอช 4-8 พบว่าที่เชื้อ *L. plantarum* LS0602

และ *L. brevis* LT0904 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีระดับพีเอช 4-8 พบว่าสามารถผลิตสารยับยั้งที่มีกิจกรรมของสารยับยั้งต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งพบว่า เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งสูงที่สุด คือ 10.5 และ 12.0 มิลลิเมตรตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่มีพีเอช 6 และ พีเอช 7 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.8)

ตารางที่ 4.7 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*

อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ (องศาเซลเซียส)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของสารยับยั้ง (AU ต่อมิลลิลิตร)	
	Lactobacillus plantarum LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
25	13.0 (12,800)	11.0 (12,800)
30	15.0 (12,800)	15.0 (12,800)
35	19.0 (12,800)	16.0 (12,800)
37	21.0 (12,800)	18.0 (12,800)
39	18.25 (12,800)	15.0 (12,800)
42	10.83 (12,800)	12.0 (12,800)

จากการทดลองนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งโดยแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 คือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งที่ระดับอุณหภูมินี้ให้กิจกรรมของสารยับยั้งสูงสุด ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Karthikeyan และ Santosh (2009) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (12,800 AUต่อมิลลิลิตร) Altuntas และคณะ (2010) รายงานว่า *Pediococcus acidolactici* 13 มีกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินมากที่สุดถึง 204,800 AU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ Daba และคณะ (1993) ได้ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซินของ *Leuconostoc mesenteroides* susp. *Mesenteroides* UL5 โดยหากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria ivanovii* พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่ในช่วงอุณหภูมิ 37-40 องศาเซลเซียส ซึ่งต่างจาก Drosinos และคณะ (2006) ที่พบว่าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* E ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งใกล้กับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อสายพันธุ์นี้ ส่วนค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 คือ พีเอช 6 และ *L. brevis* LT0904

คือ พีเอช 7 เช่นเดียวกับการรายงานโดยนักวิจัยท่านอื่นซึ่งได้พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* ST23LD มีกิจกรรมสูงสุด (2930 AU ต่อ OD) เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS (biolab) ที่มีพีเอชเริ่มต้นคือ พีเอช 6.5 ขณะที่เชื้อ *L. plantarum* ST341LD มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน 2,850 AU ต่อ OD เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้น (Todorov และ Dicks. 2006) อย่างไรก็ตาม Mataragas และคณะ. 2003 ได้รายงานว่า *L. curvatus* L442 และ *Leuconostoc mesenteroides* L124 มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีพีเอช 5.5 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

จากรายงาน De Vuyst และคณะ (1996) ; Mataragas (2003) ได้กล่าวว่า การผลิตแบคเทอริ-โอซินจะถูกส่งเสริมในสภาวะแวดล้อมระดับที่ต่ำกว่าสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินเกิดขึ้นได้ดีขณะที่มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำ อัตราการเจริญที่เพิ่มขึ้นก็ไม่ได้มีผลทำให้การผลิตแบคเทอริโอซินเกิดได้ดีขึ้นเสมอไป แต่อย่างไรก็ตามนักวิจัยหลายท่านได้รายงานว่าการผลิตแบคเทอริโอซินเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ (Daba และคณะ. 1993 ;Drosinos และคณะ. 2006)

ตารางที่ 4.8 พีเอชที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*

พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของสารยับยั้ง(AU ต่อมิลลิลิตร)	
	Lactobacillus plantarum LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
4	8.67 (12,800)	6.0 (12,800)
5	9.0 (12,800)	8.0 (12,800)
6	10.50 (12,800)	9.0 (12,800)
7	9.50 (12,800)	12.0 (12,800)
8	9.0 (12,800)	8.50 (12,800)

ค) ผลการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง

จากการทดลองหาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งต่อกิจกรรมของสารยับยั้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้ คือ เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในอาหารเหลว MRS (Difco) ชุดควบคุมเปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS ที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบเช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ตลอดจนสารที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ พบว่าเมื่อพิจารณาผลการเติมสารประกอบที่ใช้

เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าการมีกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ใน MRS ชุดควบคุมมีผลทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งเท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 4.9)

ตารางที่ 4.9 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904

ลำดับที่ของสูตรอาหาร	ชนิดและปริมาณของส่วนประกอบอาหาร (กรัมต่อลิตร)		กิจกรรมของสารยับยั้ง (AU/มิลลิลิตร)	
	ส่วนประกอบที่เติมเพิ่ม[a]	ทดแทนส่วนประกอบในอาหารMRS สูตรควบคุม	*Lactobacillus plantarum* LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
1	ชุดควบคุม (MRS, Difco)[b]	-	12,800	12,800
2	Fructose (20)	Glucose (20)	25,600	12,800
3	Mannose (20)	Glucose (20)	51,200	12,800
4	Lactose (20)	Glucose (20)	25,600	12,800
5	Maltose (20)	Glucose (20)	51,200	12,800
6	Sucrose (20)	Glucose (20)	25,600	25,600
7	Glucose (30)	Glucose (20)	102,400	51,200
8	Glucose (40)	Glucose (20)	51,200	102,400
9	Glucose (50)	Glucose (20)	25,600	25,600
10	Tryotone (10)	Proteose peptone (10)	51,200	25,600
11	Tryotone (20)	Proteose peptone (10)	25,600	12,800
12	Yeast extract (10)	Yeast extract (5)	12,800	12,800
13	Yeast extract (20)	Yeast extract (5)	12,800	25,600
14	Tryotone (12.5)+Yeast extract (7.5)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
15	Tryotone (20)+Yeast extract (10)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
16	Tryotone (10)+Yeast extract (20)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
17	K_2HPO_4 (5)	K_2HPO_4 (2)	25,600	12,800
18	K_2HPO_4 (10)	K_2HPO_4 (2)	12,800	12,800
19	K_2HPO_4 (20)	K_2HPO_4 (2)	12,800	25,600
20	KH_2PO_4 (2)	K_2HPO_4 (2)	6,400	51,200
21	KH_2PO_4 (5)	K_2HPO_4 (2)	12,800	6,400
22	KH_2PO_4 (10)	K_2HPO_4 (2)	12,800	12,800
23	KH_2PO_4 (20)	K_2HPO_4 (2)	12,800	12,800
24	วิตามินบี1 (0.001)	0	12,800	12,800
25	วิตามินบี12 (0.001)	0	12,800	12,800
26	$MgSO_4$ (2)	$MgSO_4$ (0.1)	12,800	12,800
27	$MgSO_4$ (5)	$MgSO_4$ (0.1)	12,800	12,800
28	$MgSO_4$ (10)	$MgSO_4$ (0.1)	12,800	12,800
29	$MnSO_4$ (2)	$MnSO_4$ (0.05)	12,800	12,800
30	$MnSO_4$ (5)	$MnSO_4$ (0.05)	12,800	6,400
31	$MnSO_4$ (10)	$MnSO_4$ (0.05)	12,800	6,400

[a] ส่วนประกอบที่เติมเพิ่มทดแทนส่วนประกอบบางอย่างในสูตรอาหาร MRS

[b] อาหาร MRS ประกอบด้วย Proteose peptone no 3 10 กรัมต่อลิตร Beef extract 10 กรัมต่อลิตร Yeast extract 5 กรัมต่อลิตร Dextrose 20 กรัมต่อลิตร Sodium acetate 5 กรัมต่อลิตร Tween 80 1 กรัมต่อลิตร Dipotassium hydrogen phosphate 2 กรัมต่อลิตร Ammonium citrate 2 กรัมต่อลิตร Magnesium sulfate 0.1 กรัมต่อลิตร Manganese sulfate 0.05 กรัมต่อลิตร

แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้ต่างไปจากชุดควบคุมพบว่า การเติม ฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส มอลโตส และซูโครส กิจกรรมของสารยับยั้งสูงกว่าสูตรควบคุม และเมื่อเติมกลูโคส จำนวน 30 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อชนิดนี้มีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงสุดถึง 102,400 AUต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ได้ผลแตกต่างกันคือ เมื่อเติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส และมอลโตส 20 กรัมต่อลิตร พบว่ามีกิจกรรมของสารยับยั้งเท่ากับสูตรควบคุม ซึ่งเติมกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร แต่ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งสูงถึง 25,600 AU ต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมน้ำตาลซูโครส และเมื่อเติมกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อมีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงที่สุดถึง 102,400 AUต่อมิลลิลิตร การที่พบว่าการเพิ่มปริมาณกลูโคสในอาหารเหลว MRS ส่งผลให้กิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 สูงขึ้นซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของนักวิจัยหลายท่านซึ่งพบว่ากลูโคสมีผลกระตุ้นการสร้างแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 เช่น plantaricin UG1 (Enan และคณะ. 1996) plantaricin KW30 (Kelly และคณะ. 1996) และแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* ST16Pa (Todorov และคณะ. 2011) เหตุผลที่กลูโคสที่ระดับความเข้มข้นสูงถึง 30-40 กรัมต่อลิตร ช่วยกระตุ้นการผลิตสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ อาจเป็นเพราะความเข้มข้นของกลูโคสที่เพิ่มขึ้นส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ส่งผลให้เชื้อผลิตสารยับยั้งได้เพิ่มขึ้น ผลการวิจัยของ Papagianni และคณะ (2007) ซึ่งได้ทดลองผลของการเพิ่มปริมาณกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 25-75 กรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการเจริญ การใช้กลูโคสและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactococcus lactis* พบว่าการเติมกลูโคสที่ระดับความเข้มข้น 35 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้ปริมาณชีวมวลและกิจกรรมของไนซินเพิ่มขึ้นสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับการเติมกลูโคสอื่น ๆ นอกจากนี้ Luesink และคณะ (1998) ยังได้พบว่าการเติมกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อช่วยทำให้อัตราการเจริญของ *Lactococcus lactis* สูงกว่าการเติมน้ำตาลชนิดอื่นเช่น ซูโครส ฟรุกโตส กาแลคโตส และมอลโตส และยังแสดงให้เห็นว่าการใช้กลูโคสมีผลทำให้กิจกรรมของเอนไซม์ phosphofructokinase, pyruvate kinase และ lactate dehydrogenase สูงกว่าการเติมกาแลคโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่หมักโดย *L. lactis* ซึ่งเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้เป็นเอนไซม์ที่สำคัญใน Embden-Meyerhoff pathway ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกประเภท homofermentative (Hutkins. 2006) และในการทดลองนี้การเติมน้ำตาลชนิดอื่นความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร แทนกลูโคสในอาหาร MRS ที่ความเข้มข้นเดียวกันเช่น ฟรุกโตส แมนโนส แลกโตส มอลโตส และซูโครส มีผลให้กิจกรรมของสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 สอดคล้องกับการรายงานของ Todorov และ Dicks (2006) ซึ่งได้รายงานว่าการใช้น้ำตาลชนิดอื่นเช่น ซูโครส มอสโตส และแมนโนส แทนกลูโคส มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. plantarum* ST 664BZ เพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกับ Todorov และคณะ (2011) ที่พบว่าการเติมแมนโนส 20 กรัมต่อลิตร แทนกลูโคสในอาหาร MRS ทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* ST16Pa เพิ่มขึ้นสูงสุด (51,200 AUต่อมิลลิลิตร) การที่ใช้น้ำตาลชนิดอื่นเช่น มอลโตสแทนกลูโคส

ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากันสามารถช่วยส่งเสริมการผลิตแบคเทอริโอซินอาจเป็นเพราะมอลโตสซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลคู่ที่ประกอบด้วยกลูโคส 2 โมเลกุลถูกย่อยสลายเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวก่อนเข้ากระบวนการไกลโคไลซิส (glycolysis) ทำให้มีกลูโคสเพิ่มขึ้น Gänzle และคณะ (2007) กล่าวว่าการใช้มอลโตสจะเกิดขึ้นหลังจากกลูโคสถูกใช้หมดไป โดยมอลโตสจะถูกไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ α-glucosidase นอกจากนี้ Sjöberg และ Hahn-Hägerdel. 1989. ได้ศึกษาการหมักแบบเฮทเทอโรติกโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* 65.1 ซึ่งพบว่ามอลโตสถูกย่อยโดยเอนไซม์มอลโตส ฟอสฟอรีเลส (maltose phosphorylase) กลายเป็นกลูโคสและ β-glucose-1-phosphate ทั้งนี้มีเพียงกลูโคสเท่านั้นที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการไกลโคไลซิส ดังเช่นการรายงานของ Stolz และคณะ (1993) พบว่าการหมักน้ำตาลมอลโตสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดที่แยกได้จาก sourdoughได้แก่ *L. sanfrancisco, L. reuteri, L. fermentum* และ *Lactobacillus* spp. ทำให้เกิดการปล่อยโคสออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ระดับความเข้มข้น 13.8 มิลลิโมลาร์หลังจากหมักเป็นเวลา 8 ชั่วโมง อัตราการปลดปล่อยกลูโคสต่อโมลของมอลโตสที่ถูกใช้เป็นสูงถึง 1:1

เมื่อพิจารณาแหล่งไนโตรเจนของส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่า การเติมทริปโตน 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทนโปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ทำให้มีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงกว่าสูตรควบคุม โดยปริมาณทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งสูงที่สุด (51,200 AU ต่อมิลลิลิตร) แต่การเพิ่มปริมาณยีสต์สกัด 10 และ 20 กรัมต่อลิตร (จากเติม 5 กรัมต่อลิตร) ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งเพิ่มขึ้น สำหรับการเติมทริปโตนร่วมกับยีสต์สกัดไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามก็ไม่มีผลในการทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเช่นเดียวกับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เติมทริปโตนแทนโปรติโอสเปปโตน เบอร์ 3 พบว่า การเติมทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งสูงกว่าการเติมทริปโตน 20 กรัมต่อลิตร แต่การเติมยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตรจะทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งสูงสุด 25,600 AUต่อมิลลิลิตร ส่วนการเติมทริปโตนร่วมกับยีสต์สกัดไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของสารยับยั้งเช่นเดียวกัน ในกรณีการเปลี่ยนแปลงไนโตรเจนจากโปรติโอสเปปโตนเป็นทริปโตนก็ช่วยส่งเสริมการผลิตสารยับยั้ง สอดคล้องกับการทดลองของ Todorov และ Dicks (2005) และ Todorov และคณะ (2011) ซึ่งพบว่าการเติมทริปโตนช่วยส่งเสริมกิจกรรมของแบคเทอริโอซินโดยมีส่วนในการกระตุ้นการสร้างแบคเทอริโอซินสูงกว่าการเติมมีทสกัดและยีสต์สกัดเพียงอย่างเดียว การที่ทริปโตนมีส่วนช่วยกระตุ้นการสร้างสารยับยั้งอาจเป็นเพราะทริปโตนประกอบด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าสูงหลายชนิดซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรีย ทริปโตนเป็นสารที่ได้จากการย่อยสลายเคซีน (casein) ด้วยเอนไซม์ ทั้งนี้ทริปโตนประกอบด้วยสารประกอบไนโตรเจน กรดอะมิโน และวิตามินหลายชนิดซึ่งพบมากที่สุด (Acumedia. 2011) มีรายงานว่า bacto-tryptone ประกอบด้วยกรดอะมิโนหลายชนิดเรียงจากมากไปหาน้อยได้แก่ กรดกลูตามิก (ร้อยละ 17.05) โพรลีน (ร้อยละ 7.45) ลูซีน (ร้อยละ

7.11) ไลซีน (ร้อยละ 6.70) กรดเอสพาติก (ร้อยละ 6.11) วาลีน (ร้อยละ 5.0) ไอโซลูซีน (ร้อยละ 4.40) เซอรีน (ร้อยละ 4.29) ฟีนิวอะลานีน (ร้อยละ 3.71) ทรีโอนีน (ร้อยละ 3.58) อาร์จินีน (ร้อยละ 2.86) เมทไธโอนีน (ร้อยละ 2.57) ฮีสติดีน (ร้อยละ 2.02) ไกลซีน (ร้อยละ 1.75) ทริปโตเฟน (0.71) และ ซีสทีน (0.42) (Difco Manual. 1998) และ De Vuyst (1995) กล่าวว่าเซอรีน ซีสที และ ทรีโอนีน เป็นกรดอะมิโนซึ่งช่วยกระตุ้นการผลิตสารยับยั้ง ซึ่งในทริปโตนก็มีกรดอะมิโนดังกล่าวอยู่ด้วยซึ่งอาจส่งเสริมการผลิตสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ส่วนการที่พบว่ากิจกรรมของสารยับยั้งซึ่งผลิตจาก *L. brevis* LT0904 เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของยีสต์สกัดในอาหารเหลว MRS เป็น 20 กรัมต่อลิตร อาจเป็นเพราะยีสต์สกัดประกอบด้วยแหล่งไนโตรเจนที่มีกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการสร้างสารยับยั้ง Aasen และคณะ (2000) กล่าวว่าในยีสต์สกัดมีสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยกรดอะมิโนอิสระและเปปไทด์สายสั้นที่มีกรดอะมิโน 2-3 ตัวต่อกันในสัดส่วนที่มากกว่าโปรตีนไฮโดรไลเซต (protein hydrolysates) ทั้งนี้ Grant และ Pramer (1962) ได้ศึกษาส่วนประกอบของแร่ธาตุรอง (minor element composition) ของยีสต์สกัดพบว่ายีสต์สกัดมีเถ้าร้อยละ 12.87 (1270 ไมโครกรัมต่อกรัมของน้ำหนักแห้ง) ซึ่งประกอบด้วยแร่ธาตุ (เรียงลำดับจากมากไปหาน้อยและมีหน่วยเป็นไมโครกรัมของน้ำหนักแห้ง) ดังนี้ แมกนีเซียม (1270) เหล็ก (150) สังกะสี (74) ทองแดง (71.3) วานาเดียม (43.7) นิกเกิล (18.2) โครเมียม (12.0) โมลิบดินัม (5.9) โคบอลต์ (3.5) อะลูมิเนียม (3.1) เทลเซียม (3.0) แมงกานีส (2.3) แคดเมียม (1.5) แบเรียม (1.3) สตรอนเทียม (1.1) ตะกั่ว (0.8) แกลเลียม (0.09) และ สแตนนัม (0.09) นอกจากนี้ยีสต์สกัดยังประกอบด้วยกรดอะมิโนต่าง ๆ ดังนี้คือ กรดกลูตามิก (ร้อยละ 14.20) กรดแอสพาร์ติก (ร้อยละ 6.69) อะลานีน (ร้อยละ 5.36) ไลซีน (ร้อยละ 5.15) ลูซีน (ร้อยละ 4.69) วาลีน (ร้อยละ 3.79) ไกลซีน (ร้อยละ 3.25) ไอโซลูซีน (ร้อยละ 3.23) อาร์จินีน (ร้อยละ 3.02) ทรีโอนีน (ร้อยละ 2.95) เซอรีน (ร้อยละ 2.84) โพรลีน (ร้อยละ 2.60) ฟีนิวอะลานิน (ร้อยละ 2.53) ทริปโตเฟน (ร้อยละ 1.36) ไทโรซีน (ร้อยละ 1.20) ฮีสติดีน (ร้อยละ 1.20) เมทไธโอนีน (ร้อยละ 1.05) และ ซีสทีน (ร้อยละ 0.74) (Difco Manual. 1998) มีรายงานว่ายีสต์สกัดมีสารที่ประกอบด้วยเพียวรีนและไพริมิดีน เมื่อตรวจสอบด้วย HPLC-UV นอกจากนี้ข้อมูลของการทำ ^{31p} NMR พบว่ายีสต์สกัดประกอบด้วยของผสมของสารประกอบชีวเคมีที่มีฟอสเฟสเป็นส่วนประกอบ (phosphorylate biochemical) เช่น ฟอสโฟโมโนเอสเทอร์ (phosphomonoesters) ฟอสโพไดเอสเทอร์ (phosphodiesters) และ พอลิไดเอสเทอร์ (polyphosphates) นอกจากนี้จากรายงานการวิเคราะห์เพิ่มเติมเพื่อจำแนกชนิดของส่วนประกอบเฉพาะยีสต์สกัดพบว่า มีสารมอโนแซ็กคาไรด์ (monosaccharides) และมอโนนิวคลีโอไทด์ (mononucleotides) ที่มีฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบ นอกจากนี้ยังมีสารกลีเซอรอลฟอสโฟไดเอสเทอร์ (glycerol phosphodiesters) และนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (nucleoside triphosphates) เป็นส่วนประกอบอีกด้วย (Edens และคณะ. 2002)

การเติมสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อเช่น การเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต มากถึง 5 กรัมต่อลิตรแทนไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งสูงที่สุดคือ 25,600 AU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่างกับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ที่การเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 20 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งสูงที่สุดคือ 25,600 AU ต่อมิลลิลิตร สำหรับการเติมโพแทสเซียมได-ไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตรเพิ่มในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *L. brevis* LT 0904 พบว่ามีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงที่สุด 51,200 AU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสูตรควบคุมที่เติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จะเห็นได้ว่าการเพิ่มโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟสที่ระดับสูงกว่า 2 กรัมต่อลิตรไม่มีผลต่อกิจกรรมของสารยับยั้งเพิ่มขึ้น ในการทดลองนี้การเพิ่มความเข้มข้นของได-โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 5 กรัมต่อลิตร ลงในอาหาร MRS (จากเดิม 2 กรัมต่อลิตร ในอาหาร MRS สูตรปกติ) สูตรปกติ (โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร) มีผลทำให้เชื้อ *L. plantarum* LS0602 ผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งให้กิจกรรมสูงขึ้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Von Mollendorff และคณะ (2009) ซึ่งได้พบว่า การเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนไฮโดรเจน-ฟอสเฟตความเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ในอาหาร MRS ทำให้แบคเทอริโอซิน JW3BZ ซึ่งผลิตจาก *L. plantarum* IW3BZ มีกิจกรรมเพิ่มขึ้น 2 เท่า อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช จากการเพิ่มความเข้มข้นของไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต อาจไม่เกี่ยวกับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เนื่องจากอาหาร MRS ทุกสูตร ที่เตรียมจะปรับพีเอชเป็น 6.0 สำหรับ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ขณะที่การเติมโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร ทดแทนไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (2 กรัมต่อลิตร) ในอาหาร MRS สูตรปกติกลับทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 สูงอาจเป็นเพราะโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตช่วยกระตุ้นการผลิตสารยับยั้งได้เช่นเดียวกับไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ทั้งนี้ De Vuyst และ Vandamme (1993) ได้รายงานว่า โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนเป็นแหล่งของฟอสฟอรัสที่ดีที่สุด สำหรับการผลิตไนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* susp. *Lactis* ซึ่งการเพิ่มความเข้มข้นของโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 0-5 ช่วยกระตุ้นการสังเคราะห์ไนซินและเมื่อโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเพิ่มความเข้มข้นมากกว่าร้อยละ 6 ส่งผลให้ระดับกิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลงเนื่องจากการแตกของเซลล์ (cell lysis)

เมื่อพิจารณาสูตรอาหารเหลว MRS ที่เติมวิตามินบี 1 และวิตามินบี 12 เทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมวิตามินดังกล่าวพบว่า เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีกิจกรรมของสารยับยั้งเท่ากับสูตรควบคุมที่ไม่ได้เติมวิตามินคือ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร รวมทั้งการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าในอาหารชุดควบคุมที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร และแมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร ก็ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งสูงขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 เพื่อให้มีการสร้างสารยับยั้งที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดคือ อาหารเหลว MRS ปกติที่เติมกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ควรเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปกติที่เติมกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงสุด

4.8.2 การศึกษาการทำสารยับยั้งให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อกิจกรรมการต้านการเจริญของ *Listeria monocytogenes* โดยสารยับยั้ง

จากการศึกษาเปรียบเทียบวิธีการทำสารยับยั้งให้บริสุทธิ์ดังนี้คือ การนำส่วนใสซึ่งปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) มาผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำตะกอนที่ได้มาละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้วนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการทำไดอะไลซิส และนำมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก พบว่ากิจกรรมของสารยับยั้งจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในขั้นตอนสุดท้ายคือ การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (fraction 2) โดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มีกิจกรรมของสารยับยั้งในการต้านการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ที่ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร และ 409,600 AU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.10) สอดคล้องกับค่ากิจกรรมจำเพาะ (specific activity) ที่เพิ่มสูงขึ้นจาก 80.3 AU ต่อไมโครกรัมของโปรตีนเป็น 1,866 AU ต่อไมโครกรัมของโปรตีนสำหรับสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน fraction 2 และเพิ่มเป็น 1,170.29 AU ต่อไมโครกรัมของโปรตีน (จากเดิม 42.66 AU ต่อไมโครกรัมของโปรตีน) ในส่วน fraction 2 ของเชื้อ *L. brevis* LT0904 และให้ปริมาณการได้กลับคืน (recovery) เท่ากับ ร้อยละ 16 ของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 เมื่อกล่าวถึงปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (purification factor) แล้วจะเท่ากับ 2.91 สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และเท่ากับ 3.41 สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904

จากการทดลองนี้ซึ่งพบว่าสารยับยั้งซึ่งเป็นสารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงกว่าส่วนใสซึ่งปราศจากเซลล์ การที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากในส่วนใสซึ่งปราศจากเซลล์ประกอบด้วยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักปะปนอยู่รวมทั้งสารยับยั้งด้วย แต่เมื่อนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาทำการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้สารยับยั้งซึ่งอาจเป็นโปรตีนตกตะกอนออกมาแยกออกมา สารยับยั้งนี้จึงมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นและทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงขึ้นด้วย Copeland (1994) กล่าวว่า โปรตีนที่อยู่ในสภาวะที่มีเกลือสูง (แอมโมเนียมซัลเฟต) มีแนวโน้มที่จะตกตะกอนออกจากสารละลายเช่นเดียวกันกับ Walsh (2002) ซึ่งกล่าวว่าการเพิ่มความเข้มข้นของเกลือเกินระดับที่เหมาะสมจะส่งผลให้เกิดความไม่เสถียรของโปรตีน ในสารละลายและในที่สุดจะเร่งให้โปรตีนตกตะกอนออกมา (salting out) จึงให้ความเข้มข้นของ

โปรตีนสูงขึ้น ส่วนการที่พบว่าสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการทำไดอะไลซีส (fraction 1) มีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงกว่าส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ และส่วนใสซึ่งผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอาจเป็นเพราะโมเลกุลของสารยับยั้งที่ได้หลังผ่านการทำไดอะไลซีสอาจมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น กิจกรรมการยับยั้งจึงเพิ่มขึ้น Copeland (1994) ได้กล่าวว่าการทำสารละลายโปรตีนให้บริสุทธิ์ (สารยับยั้ง) ด้วยวิธีการไดอะไลซีสมีจุดประสงค์เพื่อแยกสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยออกจากที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่าซึ่งถูกกักเก็บไว้ในถุงเซลลูโลสเมมเบรน ดังนั้นสารยับยั้งซึ่งอาจเป็นสารแบคเทอริโอซินที่เป็นโปรตีนซึ่งมีขนาดโมเลกุลใหญ่จึงถูกดักไว้ในถุงเซลลูโลสเมมเบรน ส่วนสารอื่นซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่าจึงแพร่ผ่านถุงไดอะไลซีสออกมาได้จึงทำให้สารแบคเทอริโอซินมีความบริสุทธิ์มากขึ้น

สำหรับการที่สารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ชนิด มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนโดยการนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต จากนั้นนำมาทำไดอะไลซีส ตามด้วยการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก อาจเป็นเพราะโปรตีนที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากขั้นตอนการทำไดอะไลซีสมีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น หลังจากผ่านการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกจึงทำให้กิจกรรมในการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น Rajalingam และคณะ(2009) ได้กล่าวถึงกลไกการชักนำการตกตะกอนของโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกว่าเกี่ยวข้องกับการที่ประจุลบของไอออนของไตรคลอโรแอซิเตท ทำให้โมเลกุลของโปรตีนเดิม (native conformation of proteins) มีความสถียร การคลี่ออกเพียงบางส่วนของโปรตีนเป็นผลให้เกิดการสัมผัสของพื้นผิวที่ไม่มีขั้วกับตัวทำละลายและเป็นผลให้เกิดการรวมตัวกันระหว่างโมเลกุลโปรตีนซึ่งนำไปสู่การตกตะกอนของโปรตีนในที่สุด

ตารางที่ 4.10 การทำสารยับยั้งที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ

ชนิดของจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	กิจกรรมของ (AU/มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (Total activity, AU)[a]	ความเข้มข้นของโปรตีน (Protein)[b] (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity)[c] (AU/ไมโครกรัม)	ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor)[d]	ปริมาณการได้กลับคืน (% Recovery)[e]
L. plantarum	ส่วนใส	200	102,400	20,480,000	1,275	80.3	1	100
LS0602	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	50	204,800	10,240,000	952	215.1	2.68	50
	ไดอะไลซีส (Fraction 1) (ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต)	38	409,600	15,564,800	639	641	2.98	76
	ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2)	4	819,200	3,276,800	439	1,866	2.91	16

[a] กิจกรรมรวม (Total activity) คือ ผลคูณระหว่างปริมาตรของสารที่นำมาทำให้บริสุทธิ์กับกิจกรรมของสารยับยั้งที่ได้

[b] ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณจากวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford method) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

[c] กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity, AU/ไมโครกรัม) หาได้จากการนำกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/มิลลิลิตร) มาหารด้วยความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

[d] ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) คือการนำค่า Specific activity ที่เพิ่มขึ้นมาหารกัน

[e] ปริมาณร้อยละของการได้กลับคืน (% Recovery) คือ ค่า Total activity คูณ 100 แล้วหารด้วยค่า Total activity เริ่มต้น

ตารางที่ 4.10 การทำสารยับยั้งที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์	ปริมาตร (มล.)	กิจกรรมของ (AU/มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (Total activity, AU)[a]	ความเข้มข้นของโปรตีน (Protein)[b] (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity)[c] (AU/ไมโครกรัม)	ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor)[d]	ปริมาณการได้กลับคืน (% Recovery)[e]
L. brevis	ส่วนใส	200	51,200	10,240,000	1,200	42.66	1	100
LT0602	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	50	102,400	5,120,000	908	112.78	2.64	50
	ไดอะไลซีส (Fraction 1) (ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต)	38	204,800	6,144,000	596	343.62	3.05	76
	ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (Fraction 2)	4	409,600	819,200	350	1,170.29	3.41	16

[a] กิจกรรมรวม (Total activity) คือ ผลคูณระหว่างปริมาตรของสารที่นำมาทำให้บริสุทธิ์กับกิจกรรมของสารยับยั้งที่ได้

[b] ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณจากวิธีการของแบรดฟอร์ด (Bradford method) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

[c] กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity, AU/ไมโครกรัม) หาได้จากการนำกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (AU/มิลลิลิตร) มาหารด้วยความเข้มข้นโปรตีน (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

[d] ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) คือการนำค่า Specific activity ที่เพิ่มขึ้นมาหารกัน

[e] ปริมาณร้อยละของการได้กลับคืน (% Recovery) คือ ค่า Total activity คูณ 100 แล้วหารด้วยค่า Total activity เริ่มต้น

4.8.3 ผลของอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes*

จากการทดสอบหาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของกิจกรรมของสารยับยั้งในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* โดยนำสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (fraction 2) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกัน 8 ระดับดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ 37, 63, 72 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งไม่ลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งเท่ากับ 819,200 AU ต่อมิลลิลิตร) แต่จะมีการสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ตารางที่ 4.11) ส่วนสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีค่ากิจกรรมต่ำกว่าและมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่าสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมของสารยับยั้งไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (มีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งเท่ากับ 409,600 AU ต่อมิลลิลิตร) จะสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีขึ้นไป

ในการทดลองนี้การที่สารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 สามารถทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT 0904 ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ถึง 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ชี้ให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ชนิด สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงในระดับการพาสเจอร์ไรส์แต่ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิในระดับสเตอริไลซ์ (อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส/15 นาที และอุณหภูมิ 121 องศา-เซลเซียส/15 นาที) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำสารยับยั้งดังกล่าวมาใช้ร่วมกับการให้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรส์เพื่อใช้ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร Jay และคณะ (2005) ได้กล่าวว่า การลดลงของการต้านทานความร้อนของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่เกิดขึ้นเมื่อให้ความร้อนในสภาพที่มีสารปฏิชีวนะที่ทนความร้อน ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และสารยับยั้งชนิดอื่น ๆ ได้มีรายงานว่าการที่ใช้ความร้อนร่วมกับสารปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในการควบคุมการเสียของอาหารได้ดีกว่าการใช้ความร้อนเพียงอย่างเดียว อย่างไรก็ตามนักวิจัยหลายท่านได้รายงานว่าแบคเทอริ-โอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงสุดถึง 121 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ตามลำดับ (Ogunbanwo และคณะ. 2003) และ plantaricin MG (ผลิตจาก *L. plantarum* KLDS1.0391) สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงสุด 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (Gong และคณะ. 2010)

สำหรับการศึกษาผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 ต่อความคงตัวของกิจกรรมสารยับยั้ง พบว่าสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคงตัว (ค่ากิจกรรมไม่ลดลง) เมื่อ

อยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 โดยสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตรซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมของสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 (มีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งเท่ากับ 409,600 AU ต่อมิลลิลิตร) ตามตารางที่ 4.11 แต่ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่า 8

การที่สารยับยั้งซึ่งผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ (*L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904) ทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ดีสอดคล้องกับการรายงานของ Noonpakdee และคณะ (2003) ซึ่งพบว่าไนซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* WNC20 ไม่สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งในสภาวะที่มีพีเอช 2-10 แต่กิจกรรมของไนซินจะลดลงเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชเป็นด่าง การที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งของเชื้อทั้ง 2 นี้มีสภาวะที่ค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อยตามที่ Vignolo และคณะ (1995) ได้กล่าวว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไปจะมีความเสถียรที่สภาวะพีเอชเป็นกรดหรือเป็นกลาง ซึ่งชี้ให้เห็นว่าสารแบคเทอ-ริโอซินนี้ปรับตัวต่อสภาพแวดล้อมที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรีย

เมื่อศึกษาผลของเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์ทริปซินที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้สารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรม (ตารางที่ 4.11)

สำหรับการที่สารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ชนิดในการทดลองนี้ไม่สูญเสียกิจกรรมหลังจากทรีตด้วยเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส เอนไซม์ไลเปส เอนไซม์ปาเปน เอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์ทริปซิน ที่นำมาทดสอบผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) ซึ่งพบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* F1 และ *L. brevis* OG1 ไม่สูญเสียกิจกรรมหลังจากทรีตด้วยเอนไซม์ไลเปส และเอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส ส่วนการทดลองของ Noopakdee และคณะ (2003) พบว่าไนซินที่ผลิตจาก *Lactococcus lactis* WNC20 สูญเสียกิจกรรมเมื่อทรีตด้วยเอนไซม์โปรติเนสเค และเอนไซม์แอลฟา-ไคโมทริปซินซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีน (แต่ทนต่อเอนไซม์ปาเปน เอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์แอลฟา-อะไมเลส และเอนไซม์ ไลเปส) ขณะที่การศึกษาของ Gong และคณะ (2010) รายงานว่า plantaricin MG ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์เปปซิน และเอนไซม์ปาเปน ทั้งนี้การที่สารยับยั้งหรือแบคเทอริโอซินถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนบางชนิดอาจเป็นเพราะแบคเทอริโอซินมีโครงสร้างของกรดอะมิโนซึ่งอาจถูกย่อยเอนไซม์ดังกล่าว

ตารางที่ 4.11 ผลของความคงตัวของสารยับยั้งที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์

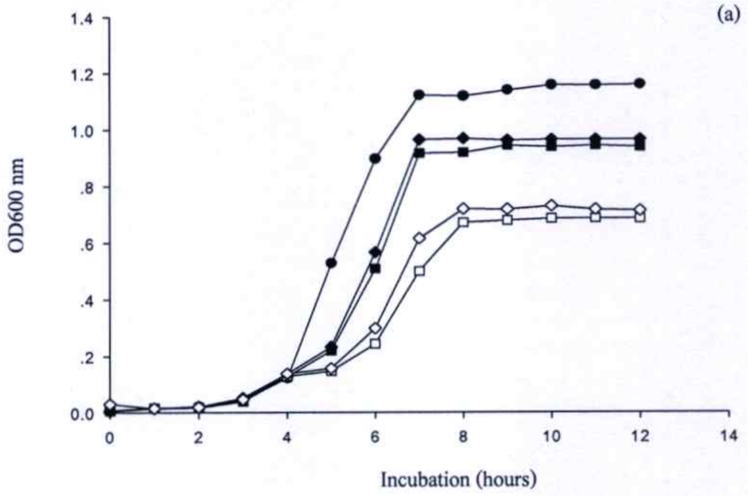
ทรีทเมนต์	กิจกรรมของสารยับยั้ง (AU/มิลลิลิตร)	
	Lactobacillus plantarum LS0602	*Lactobacillus brevis* LT0904
อุณหภูมิ/เวลา (นาที)	819,200	409,600
30 °C/30 (ชุดควบคุม)	819,200	409,600
37 °C/30	819,200	409,600
63 °C/30	819,200	409,600
72 °C/15	819,200	409,600
72 °C/30	819,200	409,600
85 °C/15	819,200	0
85 °C/30	819,200	0
100 °C/15	0	0
121 °C/15	0	0
พีเอช		
2	819,200	409,600
3	819,200	409,600
4	819,200	409,600
5	819,200	409,600
6	819,200	409,600
7	819,200	409,600
8	409,600	204,800
9	204,800	102,400
10	102,400	25,600
เอนไซม์		
ชุดควบคุม (ไม่เติมเอนไซม์)		
α-amylase	819,200	409,600
Lipase	819,200	409,600
Papain	819,200	409,600
Pepsin	819,200	409,600
Trypsin	819,200	409,600

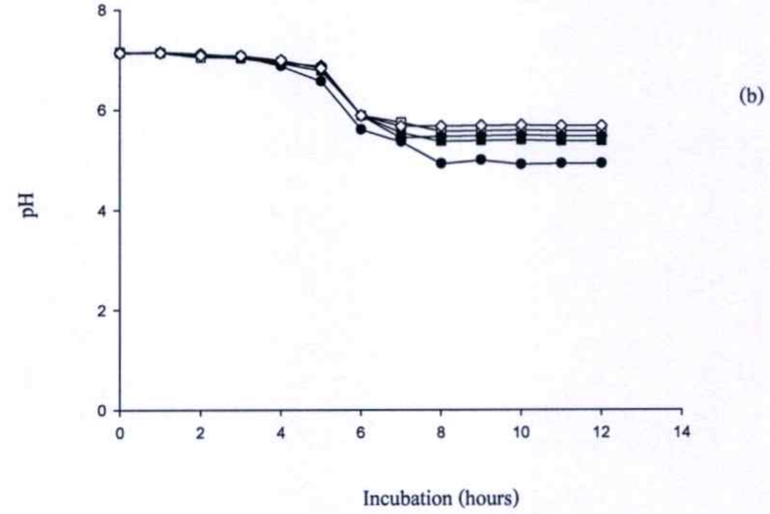
4.9 ผลการนำสารยับยั้งมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว

จากการนำสารยับยั้งที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (fraction 2) จากผลการทดลองในข้อ 4.8.2 (ร้อยละ 16.7 และร้อยละ 23.1) ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ที่ได้คัดเลือก (*L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904) มาเติมลงในอาหารเหลว TSB เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* พบว่าจากการเติมสารยับยั้งเมื่อเชื้อเข้าสู่การเจริญระยะ exponential phase ช่วงต้น (ชั่วโมงที่ 4 ของการบ่ม) สารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 23.1 มีผลยับยั้งการเจริญของ *List. monocytogenes* ได้ดีที่สุดโดยพิจารณาจากค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ที่เพิ่มขึ้นน้อยที่สุด ซึ่งมีค่าต่ำกว่าค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของอาหารเหลว TSB ชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อบ่มจนครบ 7 ชั่วโมง (รูปที่ 4.3a) โดยการเพิ่มขึ้นของค่าการดูดกลืนแสงของชุดการทดสอบค่อย ๆ เพิ่มขึ้นตามเวลาของการบ่มที่เพิ่มขึ้น และการเติมสารยับยั้งที่ความเข้มข้นระดับความสูง (ร้อยละ 23.1ของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์) มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นช้ากว่าการเติมสารยับยั้งที่ความเข้มข้นร้อยละ (16.7) ซึ่งจะเห็นได้ว่า อาหารเหลว TSB ที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 23.1 มีค่าดูดกลืนแสงเพิ่มสูงสุด (OD_{600} เท่ากับ 0.671-0.718) ที่ชั่วโมงที่ 8 ของการบ่ม แต่อาหารเหลว TSB ที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 16.7 มีค่าดูดกลืนแสงซึ่งสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 7 (OD_{600} เท่ากับ 0.961-0.963) เช่นเดียวกับชุดควบคุมซึ่งมีค่าดูดกลืนแสงเพิ่มสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 7 ของการบ่ม (OD_{600} มีค่าเท่ากับ 1.120 ซึ่งสูงกว่าชุดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P<0.05$) เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช พบว่า ค่าพีเอชของอาหารเหลว TSB ที่เติมสารยับยั้งที่ทั้ง 2 ระดับมีค่าพีเอชลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในทุกช่วงเวลาของการบ่มและเมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่ามีค่าพีเอชลดลงอยู่ในช่วงพีเอช 5.4-5.6 จากพีเอชเริ่มต้นคือ พีเอช 7.1 ขณะที่พีเอชของอาหารเหลว TSB ชุดควบคุมมีค่าพีเอชลดลงมากที่สุด (พีเอช 4.9) ซึ่งมีพีเอชน้อยกว่าค่าพีเอชของอาหารเหลว TSB ที่เติมสารยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (รูปที่ 4.3b)

การเติมสารยับยั้ง (ร้อยละ 16.7 และร้อยละ 23.1) จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถทำให้ค่าความขุ่นลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มขึ้นชี้ให้เห็นว่าสารยับยั้งที่เติมอาจมีผลไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ในอาหารเหลว TSB ได้มีนักวิจัยบางท่านเสนอกลไกการยับยั้งการการเจริญของจุลินทรีย์โดยสารแบคเทอริโอซินเช่น การทำให้กิจกรรมของเอนไซม์เปลี่ยนแปลง การยับยั้งการงอกของสปอร์และอื่น ๆ สำหรับกลไกการยับยั้งโดยแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกแม้ว่าแบคเทอริโอซินจะกระทำต่อเซลล์โดยอาศัยหลายกลไกเพื่อให้มีผลในการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ แต่โดยทั่วไปแล้วเป้าหมายก็คือ cell envelope โดยเชื่อกันว่าสิ่ง

ดึงดูดทางศักย์ไฟฟ้าตอนเริ่มต้นระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายและเปปไทด์ของแบคเทอริโอซินเป็นแรงผลักให้เกิดเหตุการณ์ต่อไป (Parada และคณะ. 2007) สำหรับผลการวิจัยนี้จะเห็นได้ว่าสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ขณะที่การทดลองของ González และคณะ (1994) พบว่า plantaricin C ซึ่งผลิตจาก *L. plantarum* สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. sake* CECT906 ได้ถึงร้อยละ 30 ภายในเวลา 5 นาที และการเจริญของ *L. sake* CECT906 จะลดลงถึงร้อยละ 50 ภายในเวลา 60 นาที





รูปที่ 4.3 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว Tryptic Soy broth (TSB) ที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904 (รูป a) การเปลี่ยนแปลงค่าความขุ่น (OD_{600} นาโนเมตร) และ(รูป b) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร TSB ขณะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สัญลักษณ์ : ● ชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง) ■ อาหาร TSB ที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ16.7 □ อาหาร TSB ที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ23.1 ◆ อาหาร TSB ที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ16.7 ◇ อาหาร TSB ที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ23.1

4.10 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อโดยใช้สารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

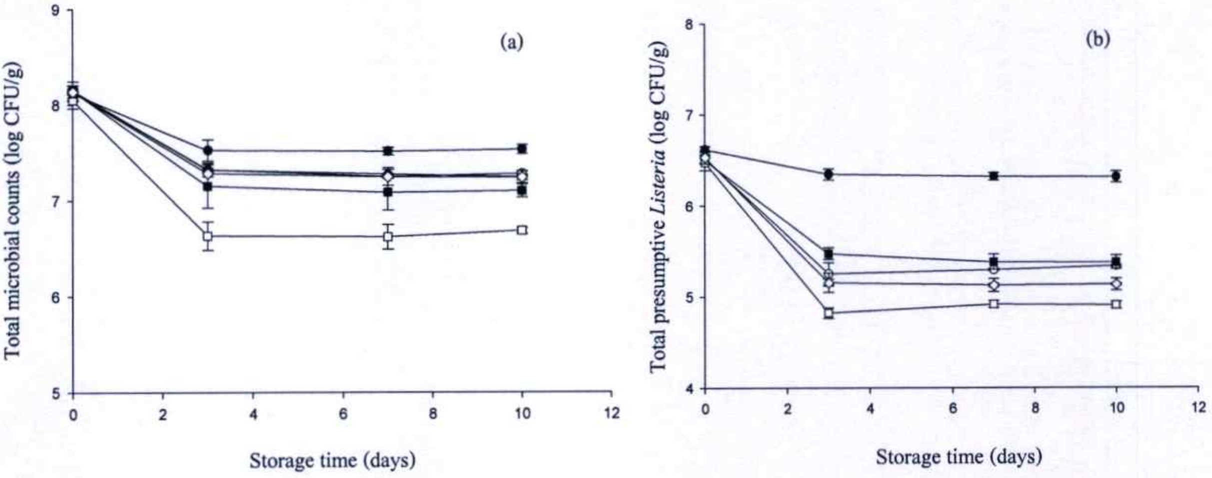
4.10.1 ผลของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็น

ก) การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมดในเนื้อหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

จากการศึกษาผลของสารยับยั้ง (ร้อยละ 2 และ ร้อยละ 4) ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและ *List. monocytogenes* ทั้งหมดในหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดทุกชุดการทดลองลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บรักษาครบ 3 วัน โดยจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดชุดควบคุมที่ไม่เติมสารใด ๆ ลดลงน้อยที่สุด (ลดลง 0.59 log cycle จากจำนวนเริ่มต้น) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดชุดอื่นที่เติมสารยับยั้ง ทั้งนี้หมูบดที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงมากที่สุด (ลดลง 1.42 log cycle) (รูปที่ 4.4 a) หลังจากเก็บรักษาครบ 3 วันและเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาหมูบดเพิ่มขึ้นจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละชุดการทดลองเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่ทุกช่วงเวลาของการเก็บรักษา โดยพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดชุดควบคุมลดลงน้อยกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เติมสารยับยั้งทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกัน และเมื่อเก็บรักษาจนครบ 10 วัน หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.85 log cycle ซึ่งลดลงมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดของชุดการทดลองอื่น ๆ ได้แก่ หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ลดลง 0.25 log cycle) และหมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ที่ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น (ลดลง 0.28-0.29 log cycle) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของสารยับยั้งที่เติมในหมูบดที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าหมูบดที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

เมื่อพิจารณาจำนวน *List.monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็นพบว่าหลังจากเก็บรักษาครบ 3 วัน จำนวนเชื้อ *List monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็นในหมูบดชุดควบคุมลดลงน้อยกว่าจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในหมูบดที่เติมสารยับยั้งทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (รูปที่ 4.4b) โดยหมูบดที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ลดลงมากที่สุดถึง 1.66 log cycle หลังจากนั้นจำนวน *List. monocytogenes* ในหมูบดทุกชุดการทดลองค่อนข้างคงที่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจนครบ 10 วัน และเมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกที่ทำการเก็บรักษา พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 10 วัน จำนวนเชื้อ *List.*

monocytogenes ในหมูบดชุดควบคุมมีจำนวนลดลงเพียง 0.31 log cycle จากจำนวนเริ่มต้นซึ่งต่างจากจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในหมูบดที่เติมสารยับยั้งทุกชุดการทดลอง (ลดลงมากถึง 1.40-1.58 log cycle) และเมื่อพิจารณาผลการเติมสารสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ จะเห็นได้ว่าสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ให้ผลดีกว่าสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ในการลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ทั้งหมดในหมูบดแช่เย็น



รูปที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลง (a) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ (b) จำนวน *List. monocytogenes* ทั้งหมด ในหมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สัญลักษณ์ : ● ชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง) ○ หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ■ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2 □ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4 ♦ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2 ◊ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

ข) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของเนื้อหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของหมูบดแช่เย็นที่เติมสารยับยั้งจากเชื้อทั้งสองและหมูบดชุดอื่น ๆ พบว่าค่าพีเอชของหมูบดทุกชุดการทดลองเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาโดยพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วงพีเอช 5.7-6.0 และเมื่อเก็บรักษาต่อไปจนครบ 10 วันหมูบดทุกชุดการทดลองมีพีเอชลดลงเพียงเล็กน้อย (พีเอช 5.5-5.8) เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของหมูบดตลอดระยะเวลาของการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของหมูบดในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) (ตารางที่ 4.12)

ตารางที่ 4.12 ค่าพีเอชของหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน

ชุดการทดลอง	ค่าพีเอช[a] ± SD			
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 10
T1[b]	6.00 ± 0.01 a	5.80 ± 0.09 a	5.96 ±0.16 a	5.88 ±0.09 a
T2[b]	5.87 ± 0.07 bc	5.84 ± 0.05 a	5.81 ±0.14 ab	5.82 ±0.09 ab
T3[b]	5.92 ± 0.09 ab	5.83 ± 0.16 a	5.71 ±0.07 bc	5.67 ±0.06 bc
T4[b]	5.79 ± 0.06 cd	5.70 ± 0.32 a	5.73 ±0.17 bc	5.79 ±0.11 bc
T5[b]	5.90 ± 0.06 abc	5.77 ± 0.10 a	5.75 ±0.05 abc	5.70 ±0.06 abc
T6[b]	5.72 ± 0.08 b	5.71 ± 0.08 a	5.58 ±0.05 c	5.55 ±0.05 bc

[a] ค่าเฉลี่ยของค่าพีเอชทั้ง 3 ซ้ำ

[b] ชนิดของชุดการทดลอง T1 คือ หมูบดชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง) T2 คือ หมูบดที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคเทอริโอซิน) T3 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2 T4 คือ หมูบดที่สารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* ร้อยละ 4 T5 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2 T6 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

ค) ผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้ง

จากการทดลองหากิจกรรมของสารยับยั้งต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ในหมูบดซึ่งวัดค่ากิจกรรมของสารยับยั้งในวันที่ 10 ของการเก็บรักษาพบว่า สารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 (ที่ร้อยละ 2 และร้อยละ 4) ซึ่งมีในหมูบดชุดที่ 3 และชุดที่ 4 ตามลำดับมีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งสูงสุดเป็น 12,800 AUต่อมิลลิลิตร ขณะที่หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และหมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* (ร้อยละ 2 และร้อยละ 4) พบว่า มีกิจกรรมของสารยับยั้งน้อยกว่า (6,400 AU ต่อมิลลิลิตร)

สารยับยั้งที่เติมลงในหมูบดมีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเซลล์จุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งปนเปื้อนในหมูบดรวมทั้ง *List. monocytogenes* โดยเฉพาะสารยับยั้งที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ให้ผลในการทำลายเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ดี โดยเชื้อดังกล่าวอาจผลิตสารยับยั้งซึ่งอาจเป็นแบคเทอริโอซิน มีรายงานว่า *L. plantarum* หลายสายพันธุ์สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้เช่น *L. plantarum* ST16Pa ซึ่งแยกจากมะละกอ (carica papaya) สร้างแบคเทอริโอซิน ST16Pa (Todorov และคณะ. 2011) *L. plantarum* UG1 ที่แยกได้จากไส้กรอกแห้งสร้าง plantaricin UG1 (Enan และคณะ. 1996) *L. plantarum* LL441 ที่แยกได้จาก cabrales cheese สร้าง plantaricin C (González และคณะ. 1994) *L. plantarum* AMA-K ที่แยกได้จากนมหมักสร้างแบคเทอริโอซิน AMA-K (Todorov

และคณะ. 2007) ในการทดลองนี้สารยับยั้งจาก *L. plantarum* LS0602 อาจมีผลไปทำลายเซลล์ของ *List. monocytogenes* รวมทั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่ปนเปื้อนในเนื้อหมูบด González และคณะ. 1994 ได้แสดงให้เห็น bactericidal mode of action ของ plantaricin C ที่ผลิตโดย *L. plantarum* LL441ในการยับยั้งการเจริญของ *L. sake* CECT906 โดยการทดลองนี้การที่สร้างยับยั้งที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ลดจำนวนของ *List. monocytogenes* ได้สารยับยั้งที่ความเข้มสูง(ร้อยละ 4) สามารถลดจำนวนเชื้อได้ดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ (ร้อยละ 2) ผลงานวิจัยนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Vignolo และคณะ (1996) ซึ่งได้ศึกษาประสิทธิภาพของ Lactocin 705 ที่ผลิตจาก *L. casei* CRL705 (ที่ความเข้มข้น 4200, 8400 และ 16800 AU ต่อมิลลิลิตร) ในการควบคุมการเจริญของ *List. monocytogenes* ในเนื้อวัวบดที่บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่าแบคเทอ-ริโอซินที่ความเข้มข้นสูงสุดสามารถลดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *List. monocytogenes* ลงได้ร้อยละ 40 การเติมสารแบคเทอริโอซินสามารถลดจำนวน *List. monocytogenes* โดยการเติมแบคเทอริ-โอซินที่ความเข้มข้นสูง (16800 AU ต่อมิลลิลิตร) มีผลทำให้การยับยั้งเพิ่มเป็นร้อยละ 93.45 แต่ถ้าเติมแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นต่ำ (4200 AU ต่อมิลลิลิตร) มีการยับยั้งเพียงร้อยละ 44.74

ตารางที่ 4.13 กิจกรรมของสารยับยั้งต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน

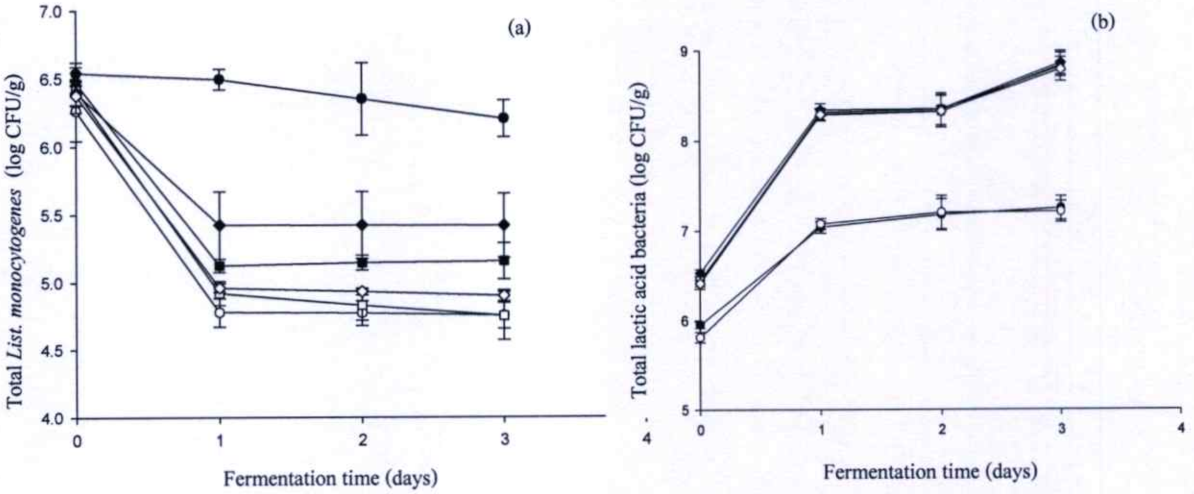
ชุดการทดลอง	กิจกรรมของสารยับยั้ง (AU ต่อมิลลิลิตร)
T1[a]	800
T2[a]	6,400
T3[a]	12,800
T4[a]	12,800
T5[a]	6,400
T6[a]	6,400

[a]ชนิดของชุดการทดลอง T1 คือ หมูบดชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง) T2 คือ หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคเทอริโอซิน) T3 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2 T4 คือ หมูบดที่สารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* ร้อยละ 4 T5 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2 T6 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

4.10.2 ผลของสารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกต่อการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในแหนม

ก) การเปลี่ยนแปลงของจำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในแหนมระหว่างการหมัก

จากการศึกษาผลของสารยับยั้ง (ร้อยละ 4) ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ร่วมการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดเดียวกันที่ผลิตสารยับยั้งเปรียบเทียบกับการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพียงอย่างเดียวต่อการยับยั้งหรือลดจำนวน *List. monocytogenes* ทั้งหมดในแหนมตลอดระยะเวลา 3 วันของการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส พบว่าเมื่อผ่านไป 1 วัน แหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว แหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับการเติมสารยับยั้งร้อยละ 4 และแหนมที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีจำนวน *List. monocytogenes* ลดลงอย่างรวดเร็ว โดยจำนวน *List. monocytogenes* ในแหนมที่เติมไนซิน (ลดลง 1.68 log cycle) และแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ร่วมกับสารยับยั้งร้อยละ 4 (ลดลง 1.5 log cycle) ลดลงมากที่สุด และจำนวน *List. monocytogenes* ในแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904 และแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904 ร่วมกับสารยับยั้งลดลงมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ *List. monocytogenes* ในแหนมชุดควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อระยะเวลาการหมักแหนมผ่านไป 2-3 วันแหนมในทุกชุดการทดลองมีจำนวน *List. monocytogenes* เปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยเท่านั้นและเมื่อหมักครบ 3 วัน พบว่าจำนวน *List. monocytogenes* ในแหนมชุดควบคุมลดลงน้อยที่สุดคือลดลงเพียง 0.2 log cycle ส่วนแหนมชุดที่มีการลดลงของ *List. monocytogenes* มากที่สุด คือแหนมที่เติม *L. plantarum* LS0602 ร่วมกับสารยับยั้งร้อยละ 4 (ลดลง 1.67 log cycle) และแหนมที่เติมไนซิน (ลดลง 1.71 log cycle) (รูปที่ 4.5 a) เมื่อพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมพบว่า จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และแหนมที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับสารยับยั้งร้อยละ 4 เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 6.0-6.05 CFUต่อกรัมในวันแรกของการหมักเป็น 8.25-8.35 CFU ต่อกรัมในวันที่ 3 ของการหมัก และมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P>0.05$) ในแต่ละชุดการทดลองที่กล่าวมา สำหรับแหนมชุดควบคุมและแหนมที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมพบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยกว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมชุดที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและแหนมชุดที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับสารยับยั้งร้อยละ 4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) รูปที่ 4.5b)



รูปที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลง (a) จำนวน *List. monocytogenes* ทั้งหมดและ (b) จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในของแหนมที่เติมสารยับยั้งและแหนมที่เติมสารยับยั้งร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สัญลักษณ์ : ● ชุดควบคุม (ไม่เติมแบคเทอริโอซิน) ○ แหนมที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ■ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 □ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ♦ แหนมที่เติมกล้า *L. brevis* LT0904 ◊ แหนมที่สารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904

ข) การเปลี่ยนแปลงพีเอชของแหนมระหว่างการหมัก

การเปลี่ยนแปลงของพีเอชมีความสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นโดยแหนมทุกชุดการทดลองที่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ค่าพีเอชต่ำกว่าค่าพีเอชของแหนมชุดควบคุมและแหนมที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.14)

ค) ผลการวิเคราะห์หากิจกรรมของสารยับยั้ง

การศึกษากิจกรรมของสารยับยั้งในการยับยั้งการเจริญของ *List. monocytogenes* ในแหนมที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสตลอดระยะเวลา 3 วัน พบว่าในวันที่ 3 ของการหมักได้สุ่มตรวจตัวอย่างเพื่อตรวจหากิจกรรมของสารยับยั้งในแหนม พบว่าแหนมที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม มีกิจกรรมของสารยับยั้งสูงสุด คือ 25,600 AU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมของสารยับยั้งในแหนมที่ชุดการทดลองอื่น ๆ เป็นสองเท่า (ตารางที่ 4.15)

ตารางที่ 4.14 ค่าพีเอชของแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

ชุดการทดลอง	ค่าพีเอช[a] ± SD			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
T1[b]	5.49 ± 0.07 a	5.19 ± 0.07 a	5.00 ±0.15 ab	4.84 ±0.09 a
T2[b]	5.47 ± 0.07 a	5.20 ± 0.05 a	5.02 ±0.14 a	4.86 ±0.09 a
T3[b]	5.41 ± 0.08 a	5.09 ± 0.08 a	4.88 ±0.14 abc	4.69 ±0.06 a
T4[b]	5.46 ± 0.08 a	5.13 ± 0.09 a	4.73 ±0.25 bc	4.52 ±0.11 b
T5[b]	5.43 ± 0.03 a	5.17 ± 0.07 a	4.89 ±0.09 abc	4.80 ±0.06 a
T6[b]	5.52 ± 0.10 a	5.14 ± 0.12 a	4.61 ±0.08 c	4.53 ±0.05 b

[a] ค่าเฉลี่ยของค่าพีเอชทั้ง 3 ซ้ำ

[b] ชนิดของชุดการทดลอง T1 คือ แหนมชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง) T2 คือ แหนมที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมสารยับยั้ง) T3 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 T4 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* T5 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904 T6 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904

ตารางที่ 4.15 กิจกรรมของสารยับยั้งในการต้านการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในแหนมที่หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

ชุดการทดลอง	กิจกรรมของสารยับยั้ง (AUต่อมิลลิลิตร)
T1[a]	12,800
T2[a]	25,600
T3[a]	12,800
T4[a]	12,800
T5[a]	12,800
T6[a]	12,800

[b] ชนิดของชุดการทดลอง T1 คือ แหนมชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง) T2 คือ แหนมที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมสารยับยั้ง) T3 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 T4 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* T5 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904 T6 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904

จากผลการทดลองการที่พบว่าแหนมที่เติมสารยับยั้งอย่างเดียวหรือสารยับยั้งร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (*L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904) มีผลทำให้จำนวน *List monocytogenes* ลดลงได้มากกว่าแหนมชุดควบคุม อาจเป็นผลมาจากสารยับยั้งที่เติมลงไปร่วมกับ

สารยับยั้งที่กล้าเชื้อสร้างขึ้นต่างกับแหนมชุดควบคุมที่กระบวนการหมักเกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์ที่มีในวัตถุดิบตามธรรมชาติ Holzapfel และคณะ (1995) กล่าวว่า แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตผลิตภัณฑ์เมแทบอลิก (metabolic products) ซึ่งมีสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้แก่ กรดอินทรีย์ (กรดแลคติกและกรดอะซิติก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารเมทาบอไลท์ที่มีโมเลกุลต่ำ (รูทีรีน ไดอะซิทิล และกรดไขมัน) และแบคเทอริโอซิน (ไนซินและแบคเทอริโอซินชนิดอื่น) Toldrá และคณะ (2001) ได้กล่าวว่า บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตซึ่งมีผลทำให้เกิดการผลิตกรดในส่วนผสมของเนื้อที่ใช้หมัก ซึ่งกระบวนการหมักทำให้ผลที่ต้องการได้แก่ ทำให้เกิดความคงตัวด้านสุขลักษณะจากการลดลงของค่าพีเอช ซึ่งเป็นผลจากการผลิตกรดอินทรีย์ที่ทำให้เกิดการจับก้อน (coagulation) ของโปรตีนในเนื้อ (พีเอช 5.4-5.5) เป็นผลให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของเนื้อลดลงซึ่งจะช่วยให้มีการสูญเสียน้ำออกจากผลิตภัณฑ์เป็นผลให้ลักษณะเนื้อสัมผัสเป็นที่ต้องการ ในการทดลองนี้การเติมกล้าเชื้อเพียงอย่างเดียวหรือกล้าเชื้อร่วมกับสารยับยั้งให้ผลในการลดจำนวน *List.monocytogenes* ในการผลิตภัณฑ์เนื้อเช่น ไส้-กรอกหมักแห้ง (Työppönen (née Erkkilä). 2003) แหนม (Kincha และคณะ. 2012 และไส้กรอก-แฟรงเฟอร์เตอร์ (Nguyen และคณะ. 2008)

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ของตัวอย่างเนื้อวัว เนื้อหมู เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสานรวมทั้งหมด 50 ตัวอย่าง พบว่าเนื้อวัวและเนื้อหมูมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากที่สุดถึง 1.8 x 10^9CFU ต่อกรัม ส่วนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดพบว่าในแหนมและเบคอน (1.1 x 10^6-6.7 x 10^8CFU ต่อกรัม มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าในเนื้อวัวและเนื้อหมู (7.0 x 10^5-9.3 x 10^7 CFUต่อกรัม) ส่วนไส้กรอกอีสานพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยที่สุด (1.7 x 10^4 CFU ต่อกรัม) แต่จำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดที่พบในเนื้อวัวและเนื้อหมูสด (1.8 x 10^4-1.0 x 10^7 CFU ต่อกรัม) สูงกว่าในเบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน โดยแหนมและไส้กรอกอีสานมีจำนวน Micrococcaceae ทั้งหมดใกล้เคียงกันในช่วง 4.5 x 10^3-2.9 x 10^4 CFU ต่อกรัม ทั้งนี้ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดจำนวน 403 ไอโซเลต ส่วน Micrococcaceae ที่คัดแยกได้จำนวน 250 ไอโซเลต

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 403 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นทั้งหมด 11 ชนิด ที่ทดสอบด้วยวิธี agar spot test มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างน้อย 1 ชนิด มีจำนวน 184 ไอโซเลต โดยเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทดสอบซึ่งถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มากที่สุด คือ *Enterococcus faecium* TISTR 1283 (คิดเป็นร้อยละ 73.37 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ 184 ไอโซเลต) ส่วนเชื้อที่ถูกยับยั้งการเจริญรองลงมาคือ *Bacillus cereus* DMST 5040 ร้อยละ 63.69 แล้วมาทดสอบการสร้างเอนไซม์พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 25 ไอโซเลตที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เอนไซม์ไนไตรท์รีดักเทส และการไม่สร้างเอนไซม์ amino acid decarboxylase แต่พบการสร้างเอนไซม์ไนเตรท จากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบการทนต่อกรดและเกลือน้ำดีได้ดีจึงคัดเลือกมา 10 ไอโซเลต

จากการทดสอบ Micrococcaceae จำนวน 250 ไอโซเลตที่แยกได้จากเนื้อวัวสด เนื้อหมูสด เบคอน แหนม และไส้กรอกอีสาน เพื่อแยกความแตกต่างของ *Staphylococcus* ออกจาก *Micrococcus* โดยทดสอบการผลิตกรดจากกลูโคส และกลีเซอรอล ความไวต่อฟูราโซลิโดนและไลโซสตาฟีน ความต้านทานต่อเบซิตาซิน และการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสซึ่งพบเชื้อที่เป็น *Staphylococcus* มีจำนวน 19 ไอโซเลต (ร้อยละ 7.6 ของ 250 ไอโซเลต) แล้วนำมาศึกษาคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ โดยเชื้อ *Staphylococcus* ทั้ง 19 ไอโซเลตไม่สร้างเอนไซม์โคแอก-กูเลส แต่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสและไนเตรทรีดักเทสได้ ทั้งนี้ *Staphylococcus* 18 ไอโซ-เลตที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase และมีเพียง 1 ไอโซเลต (ร้อยละ 5.26 ของ

Staphylococcus 19 ไอโซเลต) ที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ซึ่งคือ ไอโซเลต SC0903 ที่คัดแยกได้จากเนื้อวัวสด จากผลการทดสอบเพื่อจำแนกชนิดในระดับสปีชีย์โดยใช้ชุดทดสอบ API Staph พบว่า coagulase negative *Staphylococcus* ไอโซเลตที่ SC0903 ซึ่งเป็น *Staphylococcus xylosus* ร้อยละ 99.9

จากการทำสอบได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลติกทั้งหมด 10 ไอโซเลต และ coagulase negative *Staphylococcus* จำนวน 1 ไอโซเลต เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion พบว่ามีเพียงแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* คือไอโซเลต LS0602 และ ไอโซเลต LT0904 ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติที่ได้กล่าวมาแล้วแล้วนำมาจำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าโซเลต LS0602 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* ร้อยละ 99 และแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต LS0907 มีความคล้ายคลึงกับ *Lactobacillus brevis* ร้อยละ 99

จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มาทดสอบกิจกรรมของสารยับยั้งในการต้านการเจริญของเชื้อก่อโรค เริ่มจากศึกษาหาระดับสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งพบว่าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ผลิตสารยับยั้งที่มีกิจกรรมของสารยับยั้งต่อการต้านการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีระดับพีเอชที่เหมาะสมในการสร้างสารยับยั้งอยู่ที่พีเอช 6 และ พีเอช 7 ตามลำดับ และจากการทดลองหาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีการสร้างสารยับยั้งที่มีกิจกรรมการต้านการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดคือ อาหารเหลว MRS ปกติที่เติม กลูโคส จำนวน 30 กรัมต่อลิตร ทริปโตน จำนวน 10 กรัมต่อลิตร และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 5 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ควรเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปกติที่เติมกลูโคส จำนวน 40 กรัมต่อลิตร ทริปโตน จำนวน 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด จำนวน 20 กรัมต่อลิตร และโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีกิจกรรมสารยับยั้งสูงสุด แล้วนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้มาผลิตสารยับยั้งและทำให้บริสุทธิ์โดยผ่านขั้นตอนต่างๆ ปรากฏว่า การตกตะกอนแบคเทอริโอซินด้วยกรดไตร-คลอโรแอซิติกของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ให้กิจกรรมการยับยั้งสูงสุด จากนั้นทดสอบคุณสมบัติของสารยับยั้งดังนี้เช่น การทดสอบหาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของกิจกรรมสารยับยั้งในการต้านการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* โดยนำแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (fraction 2) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกัน พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของสารยับยั้งไม่ลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่า

กิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร) ส่วนสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีค่ากิจกรรมต่ำกว่าและมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่าสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมของสารยับยั้งไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับการศึกษาผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 ต่อความคงตัวในกิจกรรมของสารยับยั้ง พบว่าสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ไม่สูญเสียกิจกรรมของยับยั้งเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 แต่ค่ากิจกรรมของสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอช 8 และเมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ α-amylase เอนไซม์ lipase เอนไซม์ papain เอนไซม์ pepsin และเอนไซม์ trypsin ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของของสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้สารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรมจากนั้นนำสารยับยั้งมาใช้ในการยับยั้งการต้านการเจริญของ *List. monocytogenes* ในอาหารเหลวพบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลตคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเหลวที่มีสารยับยั้งที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปริมาตร ร้อยละ 23.1

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์จุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดแช่เย็นที่เติมสารยับยั้ง (ร้อยละ 2 และ ร้อยละ 4) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 และ *L brevis* LT0904 พบว่าจำนวนจุลิทรีย์ทั้งหมดในหมูบดที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ลดลงมากกว่าทรีตเมนต์อื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดในหมูบดที่เติมสารยับยั้งทั้ง 2 ความเข้มข้นลดลงมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดในหมูบดชุดควบคุมอย่างนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) แต่การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในหมูบดทุกทรีต-เมนต์เปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาและในแต่ละทรีตเมนต์มีค่าการเปลี่ยนแปลงพีเอชไม่แตกต่างกันทางสถิติ (P>0.05)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวน *List. monocytogenes* ทั้งหมดในแหนมที่เติมสารยับยั้งความเข้มข้นร้อยละ 4 ร่วมกับการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกพบว่าจำนวน *List. monocytogenes* ในแหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ลดลงมากกว่าจำนวน *List. monocytogenes* ในแหนมทรีตเมนต์อื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในแหนมชุดที่เติมสารยับยั้งร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในทุกความเข้มข้นมากกว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในแหนมทรีตเมนต์ควบคุมและทรีตเมนต์ที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และการลดลงของพีเอชในแหนมระหว่างการหมักมีความสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่เพิ่มขึ้นแต่ละทรีตเมนต์

จากการทดลองสารยับยั้งที่ได้ผ่านการทำให้บริสุทธิ์บางส่วนเพียงแค่การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (fraction 2) เท่านั้นโดยไม่ได้ทดสอบความปลอดภัยปลอดภัยแก่ผู้บริโภคทั้งนี้การทดลองในขั้นต่อไปควรจำแนกชนิดของสารยับยั้งที่ได้ว่าเป็นแบคเทอริโอซินหรือไม่และควรจำแนกด้วยว่าเป็นชนิดใด และศึกษาถึงความปลอดภัยเมื่อนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารต่อไป

บรรณานุกรม

นิรนาม. **2012. "Ammonium sulfate precipitation of proteins."** [online] Available : http://kuchem.kyoto-u.ac.jp/seika/shiraishi/protocols/as_precipitation.html.

ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์. 2553. **"ไนเตรทและไนไตรท์ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์."** [online]. Available : http://www.dmsc.moph.go.th/chiangmai/index2.htm.

สัญชัย จตุรสิทธา. 2543. **เทคโนโลยีเนื้อสัตว์เนื้อสัตว์.** เชียงใหม่. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

Acumedia. 2011. "Tryptone." [online] Available : www.neogen.com/acumedia/pdf/ProdInfo/7351.pdf.

Adams, M. R. and Moss, M. O. 2008. **Food Microbiology**. UK : The Royal Society of Chemistry.

Altunta, E.G., Cosansu. S. and Ayhan. K. 2010. "Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13." **International Journal of Food Microbiology**. 141 : 28-31.

Ammor, M.S. and Mayo, B. 2007. "Selection criteria for lactic acid bacteria used as function starter cultures in dry sausage production: an update." **Meat Science** 76 : 138-146.

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. Gálvez, A. and Valdivia, E. 2005. Control of *Staphylococcus aureus* in sausage by enterocin AS-48. **Meat Science.** 71 : 549-556.

Andersson, R.E., Daeschel, M.A. and Hassan, H.M. 1988. "Antibacterial activity of plantaricin SIL-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*." **Biochimie**. 70 : 381-90.

Axelsson, L. 2004. " Lactic acid bacteria : Classification and Physiology." 1-66. in Salminen, S., Wright, A.V. and Ouweland, A. **Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects.** New York : Marcel Dekker.

Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M. and Hugas, M. 2000. "Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocins A and B by *Enterococcus faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages." **Journal of Applied Microbiology.** 88 : 686-694.

Baker, J.S. 1984. "Comparison of various methods for differentiation of staphylococci and micrococci." **Journal of Clinical Microbiology**. 19 : 875-879.

Benkerroom, N., Daoudi, A. and Kamal, M. 2003. "Behaviour of *Listeria monocytogenes* in raw sausage (merguez) in presence of a bacteriocin-producing lactococcal strain as a protective culture." **Meat Science.** 63 : 479-484.

Bennett, R.W.and Lancette, G.A. 2001. ***Staphylococcus aureus***. Bacteriological Analytical Manual (BAM). [online]. Available:http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/Laboratory Methods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071429.htm.

Bio-Rad Laboratories, Inc. 2011. **Quick start™ bradford protein assay instruction manual.** Bio-Rad, USA.

Blixt, Y. and Borch. E. 2002. "Comarison of shelf life of vacuum-packed pork and beef." **Meat Science**. 60 : 371-378.

Bonomo, M. G., Ricciardi, A., Sico, M. A. and Salzano, G. 2009. "Technology and safety characterization of coagulase-negative Staphylococci from traditional fermented sausages of Basilicata region (Southern Italy)." **Meat Science**. 83 : 15-23.

Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. "Improve screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria." **International Journal of Food Microbiology**. 53 : 33-41.

Carolissen-Mackay, V., Arendse, A., Hastings, J.W. 1997. "Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria : problems and pointers." **International Journal of Food Microbiology.** 34 : l-16.

Castellano, P., Belfiore, C., Fadda, S. and Vignolo, G. 2008. "A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina." **Meat Science**. 79 : 483-499.

Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A. and Campos, C.A. 2011. "Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages : characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production." **Meat Science.** 87 : 321-329.

Chung, H.S., Kim, Y.B. Chun, S.L and Ji, G.E. 1999. "Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria." **International Journal of Food Microbiology.** 47 : 25-32.

Copeland, R.A. 1994. **Methods for protein analysis : A practical guide to laboratory protocols.** New York, USA. : Chapman & Hall.

Coppola S, Mauriello G, Aponte M, Moschetti G, Villani F. 2000. "Microbial succession during ripening of Naple-type salami, a southern Italian fermented sausage." **Meat Science.** 56: 321-329.

Cunha, M. L. R. S., Yuri, K. S. and Liciana, V. S. 2004. "Comparison of Methods for the identification of Coagulase negative Staphylococci." **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.** 99 (8): 855-860.

Cuozzo, S.A., Sesma, F.J.M., Pesce de R. Holgago, A.A. and Raya, R.R. 2001. "Methods for the detection and concentration of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." 141-145. in Spencer, J.F.T. and Ragout de Spencer, A. L. **Food Microbiology Protocols.** New Jersey : Humana Press Inc.

Daba, H., Lacroix, C., Huang, J. and Simard, R.E. 1993. "Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 39 (2) : 166-173.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1993. "Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 39 (2) : 166-173.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** UK : Blackie Academic & Professional.

De Vuyst, L. 1995. "Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. Actis NIZO 22186 in a synthetic medium." **Journal of Applied Microbiology.** 78 : 28-33.

De Vuyst, L., Callewaert, R. and Crabbe, K. 1996. "Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth conditions." **Microbiology.** 142 : 817-827.

Difco Manual. 1998. **Difco Laboratories.** Maryland, USA : Division of Becton Dickinson and Company Sparks.

Doonan, S. 2004. "Concentration of extracts." 17-33. in Cutler, P. **Protein Purification Protocols**, 2nd ed. Totowa, New Jersey : Humama Press Inc.

Drosinos, E.H., Mataragas, M. and Metaxopoulos, J. 2006. "Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131." **Meat Science.** 74 : 690-696.

Edens, N.K., Reavers, L.A., Bergana, M. S., Reyzer, I.L., O'Mara, P. Baxter, J.H.and Snowden, M.K. 2002. "Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat adipocytes in vitro." **The Journal of Nutrition.** 132. : 1141-1148.

Enan, G., Essawy, A.A., Uyttendaele, M. and Debevere, J. 1996. "Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1." **International Journal of Microbiology.** 30 : 189-215.

Essid, I., Ismail, H. B., Ahmed, S. B. H., Ghedamsi, R., Hassouna, M. 2007. "Characterization and technological properties of *Staphylococcus xylosus* strain isolated from a Tunisian traditional salted meat." **Meat Science.** 77 : 204-212.

Faustman, L. C. 1994. "Postmortem changes in muscle food." 63-78. in Kinsman, D. M., Kotula, A. W. and Breidenstein, B. C. **Muscle foods : meat, poultry and seafood technology**. New York : Chapman & Hall.

Feiner, G. 2006. **Meat products handbook**. Cambrige, English : Wood Head Publishing Limited.

Forbes, B.A. Sahm, D.F. and Weissfeld, A.S. 2007. **"Bailey & Scott's diagnostic microbiology."** 12th ed. St. Louis : Mosby Elsevier.

Fuller R. 1989. "Probiotics in man and animals." **Journal of Applied Bacteriology**. 66 : 365-378.

Gänzle, M.G., Vermeulen, N. and Vogel, R.F. 2007. "Carbohydrate, peptide and lipid metabolism of lactic acid bacteria in sourdough." **Food Microbiology.** 24 : 128-138.

Grant, C.L. and Pramer, D. 1962. "Minor element composition of yeast extract." **Jounal of Bacteriology.** 84 (4) : 869-870.

Garriga, M., Aymerich, M.T. Costa, S. Monfort, J.M and Hugas, M. 2002. "Bactericidal synergism through bacteriocins and high pressure in a meat model system during storage." **Food Microbiology.** 19 : 509-518.

Gálvez, A., Abriouel, H., López, A.R. and Omar, N.B. 2007. "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation." **International Journal of Food Microbiology.** 120 : 51-70.

Gill, C.O. and Jones, T. 1995. "The presence of *Aeromonas*, *Listeria* and *Yersinia* in carcass processing equipment at two pig slaughter plants." **International Journal of Microbiology.** 12 : 135-141.

Gong, H.S., Meng, X.C. and Wang, H. 2010. "Plantaricin MG active against gram-negative bacteria produced by *L. plantarum* KLDS1.0391 isolated from "Jiaoke", a traditional fermented cream form Chaina." **Food control.** 21 : 89-96.

González, B., Area, p., Mayo, B., Suarez, J.E. 1994. "Detection purification and partial characterization of plantaricin c, a bacteriocin produced by a strain of *Lactobacillus plantarum* of diary origin." **Applied and Environmental Microbiology.** 60 : 2158-2163.

Gøtterup, J., Olsen, K., Knochel, S., Tjener, K., Stahnke, L.H. and Møller, J.K. 2007. "Colour formation in fermented sausage by meat-associated staphylococci with different nitrate and nitrite reductase activities." **Meat Science.** 78 : 492-501.

Hammes, W.P. and Knauf, H.J. 1994. "Starters in the processing of meat products." **Meat Science.** 36 : 155-168.

Harrigan, W.F. 1998. **Laboratory Method in Food and Dairy Microbiology.** 3rd ed. Great Britain : WBC Book.

Hitchins. A.D. and. Jinneman, K. 2001. ***Listeria monocytogenes***. Bacteriological Analytical Manual (BAM). [online]. Available : http://www.fda.gov/food/scienceresearch/ laboratorymethods/bacteriologicalanalyticalmanualbam/ucm071400.htm.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. "**Bergey 's Manual of Determinative Bacteriology.**" USA : William & Wilkins.

Holzapfel, W.H., Geisen, R. and Schillinger, U. 1995. "Biological preservation of food with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes." **Food Microbiology** 24 : 343-362.

Holzapfel, W.H. 1998. "The gram-positive bacteria associated with meat and meat product." 35-74. in Davies, A. and Board, R. **The Microbiology of Meat and Poultry.** London : Blackie Academic & Professional.

Hugas, M. and Monfort, J.M. 1997. "Bacterial starter cultures for meat fermentation." **Food Chemistry.** 59 : 547-554.

Hugas' M., Garriga, M..Pascual, P., Aymerich, M.T. and Monfort, J.M. 2002. "Enhancement of sakacin K activity against *Listeria monocytogenes* in fermented sausages with pepper or manganese as ingredients." **Food Microbiology.** 19 :519–528

Hutkins, R.W. 2006. Microbiology and Technology of Fermentation Feeds. Iowa, USA. Blackwell Publishing.

Irlinger, F. 2008. "Safety assessment of dairy microorganisms : Coagulase-negative staphylococci." **International Journal of Microbiology.** 126 : 302-310.

Jay, J.M., Loessner, M.J. and Golden, D.A. 2005. **Modern Food Microbiology.** New York : Springer Science + Business Media, Inc.

Jeevaratnum, K., Jamuna, M. and Bawa, S.A. 2005. "Biological preservation of food-Bacteriocins of lactic acid bacteria." **Indian Journal of Biotechnology.** 4 : 446-454.

Jensen, B. 1995. "Starter cultute for mest ferment." 135-147. In Platt, G.C. and Cook, P.E. **Ferment Meat.** London : Blackie Academic & Professional.

Jiménez-Colmenero, F., Carballo, J. and Cofrades, S. 2001. "Healthier meat and meat produce : their role as functional food." **Meat Science.** 59 : 5-13.

Jemmi, T., Park, S-Il. and Salmanb, M.D. 2002."Prevalence and risk factors for contamination with *Listeria monocytogenes* of imported and exported meat and fish products in Switzerland, 1992–2000." **Preventive Veterinary Medicine.** 54 : 25-36.

Karakolev, R. 2009. "Incidence of *Listeria monocytogenes* in beef, pork, raw-dried and raw-smoked sausages in Bulgaria." **Food Control.** 20 : 953-955.

Karthikeyan, V. and Santosh. S.W. 2009. "Isolation and partial characterization of bacteriocin produced from Lactobacillus plantarum." **African Journal of Microbiology Research.** 3 (5) : 233-239.

Karovicovà, J. and Kohajdovà., Z. 2003. "Biogenic amine in food." **Chemical Paper**. 59 : 70 -79.

Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Huang, C.M. 1996. " Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum." **The Journal of Applied Bacteriology.** 81 : 657-662.

Kim, W.S., Hall, R.J. and Dunn, N.W., 1997. "The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis."* **Applied Microbiology and Biotechnology.** 50 : 657-662.

Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P., Charoenpornsook, K.,Valyyasevi, Ruud. and Sonomoto, K. 2012. "Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture of Nham, traditional fermented pork sausage." **Food control.** 25 : 190-196

Kirk, R.S. and Sawyer, R. 1991. **Pearson's Composition and Analysis of Foods.** Singapore : Longman Scientific and Technical.

Kröckel, L. 1995. "Bacteria Fermentation of Meats." 69-101. in Campbell-Platt, G. and Cook, P. E. **Advances in fermented meats.** Great Britain : Blackie Academic and Professional.

Lee, H.J., Joo, Y.J., Park, C.S., Kim, S.H., Hwang, I.K., Ahn, J.S., Mheen, T.I. 1999."Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from kimchi." **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 88 : 153-159.

Leroy, F., Verluyten, J. and Vuyst, L.D. 2006. "Funtional meat starter cultures for improved sausage fermentation." **International Journal of Food Microbiology.** 106 : 270-285.

Lewus, C., Kaiser, A. and Montville, T.J. 1991. "Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins form lactic acid bacteria isolated from meat." **Applied and Environmental Microbiology.** 57 : 1683-1688.

Lück, F.K. 2000. "Utilization of microbes to process and preserve meat." **Meat Science.** 56 : 105-115.

Luesink, E.J., van Herpen, R.E., Grossiord, B.P., Kuipers, O.P. and de Vos, W.M. 1998. "Transcriptional activation of glycolytic las operon and catabolite repression of the gal operon in *Lactococcus lactis* are mediated by the catabolite control protein CcpA." **Molecular Microbiology** 30 : 789-798.

Marshall, D.L. and Bal' A, M.F. 2001. "Microbiology of Meat." 151-152. in Hui, Y.H., Nip, W.K., Roger, R.W. and Young. O.A. **Advantage in meat science and application.** New York : Marcell Dekker.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. and Drosinos, E.H. 2003. "Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatas L442*." **Meat Science**. 64 : 265-271.

Matsusaki, H. Endo, N. Sonomoto, K. Ishikazi, A. 1996. "Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 45 : 36-40.

Mayo, B., Aleksandrzak-Piekarczyk, T., Fernández, M., Kowalczyk, M., Álvarez-Martin, P. and Bardowski, J. 2010. Updates in the metabolism of lactic acid bacteria. 3-5. in Mozzi, F., Raya. R.R. and Vignolo, G.M. **Biotechnology of Lactic Acid Bacteria novel application.** Iowa, USA. Wiley-Blackell Publishing.

Mehta, A.M., Patel, K.A. and Dave, P.J. 1983. "Purification and properties of the inhibitory protein isolated from *Lactobacillus acidophilus* AC1." Microbios. 38 : 73-81.

Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Peláez-Martínez, M.C., Sacristán-Pérez-Minayo, G., Fernández. A.J. and de la Torre, A.H. 2010. "The effect of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* against *Liateria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* in Spainsh dry-fermented sausages and frankfurters." **Food control.** 21 : 679-685.

Nguyen, V.T., Gidley, M.J. and Dykes, G.A. 2008. "Potential of nisin-containing bacterial cellulose film to inhibit *Listeria monocytogenes* on processed meats." **Food Microbiology.** 25 : 471-478.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2002. "Isolation of nisin-producing Lactococcus lactis WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermentaed sausage." **International Journal of Food Microbiology**. 81 : 137-145.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. "Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1." **African Journal of Biotechnology.** 2 : 219-227.

Papagianni, M., Avramidis, N. and Filiousis, G. 2007. "Investigating the relationship between the specific glucose uptake and nisin production in aerobic batch and fed-batch glucostat of *Lactococcus lactic*." **Enzyme and Microbial Technology.** 40 : 1557-1563.

Papamaloni, E., Tzanetakis, N., Litopoulou-Tzanetaki, E. and Kotzekidou, P. 2002."Characterization of Micrococcaceae isolated from dry fermented sausage." **Food Microbiology.** 19 : 441-449.

Parada, J.L., Caron, C.R., Medeiros, A.B.P. and Ricardo, C. 2007. "Bacteriocins from lactic acid bacteria : purification, properties and use as biopreservatives." **Brazilian Archives of Biology and Technology.** 50 : 521-542.

Parente. E. and Ricciardi. A., 1994. "Effect of nitrogen and carbohydrate sources on lactic acid and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146." **Agro Food Industry Hi-Tech**. 5 : 35-39.

Pinto, A.L., Fernandes, M., Pinto, C. Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P. and Gibbs, P.A. 2009. "Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood." **International Journal of Food Microbiology.** 129 : 50-58.

Price, N.C. and Nairn, J. 2009. **Exploring protein : a student 's guide to experimental skills and methods.** New York : Oxford University Press.

Priscilla Salome, J., Amutha, R., Jagannathan, P., Josiah, J.J.M., Berchmans, S. and. Yegnaraman, V. 2009. "Electrochemical assay of the nitrate and nitrite reductase activities of *Rhizobium japonicum*." **Biosensors and Bioelectronics.** 24 : 3487-3491.

Rajalingam, D., Loftis, C., Xu, J.J. and Kumar, T.K.S. 2009. "Trichloroacetic acid-induced protein precipitation involves the reversible association of a stable partially structured intermediate." **Protein Science.** 18 : 980-993.

Rajaram, G., Manivasagan, P., Gunasekaran, U., Ramesh, S., Ashokkumar, S. Thilagavathi, B. and Saravanakumar, A. 2010. "Isolation, identification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus lactis* and its antimicrobial and cytotoxic properties." **African Journal of Pharmacy and Pharmacology.** 4 (12) : 895-902.

Saarela M, Mogensen G, Fondén R, Mättö J, Mattila-Sandholm T. 2000. "Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties." **Journal of Biotechnology** 84 : 197-215.

SAFCbioscience. 2006. **Protein purification techniques.** [online] Available : https://docs.google.com/viewer?a=v&q=cache:cgWNieYXiboJ:www.safcglobal.com/etc/medialib/docs/SAFC/Bulletin/t041.pdf+safc+biosciences+protein+purification+techniques&hl=th&gl=th&pid=bl&srcid=ADGEESjXBGc29jMisXWJCVo0u6cGrQKejUtmaS1P9SF4Seqdt65YQY90Kn_rxBvwPjybTOoXqCoduPAVa6fmUW5xmIsJBbSWWPuzDGxtXC8OtgSIY2NhwxRJnn3HxnnCzo1fS-sGeIQ&sig=AHIEtbTEGIurTtww2TL5D4OTkr3RstQ.

Schillinger, U. and Lücke, F.K. 1989. "Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat." **Applied and Environmental Microbiology.** 55(8) : 1901-1906.

Siriken, B., Pamuk, S., Ozakin, C., Gedikoglu, S., Eyigor, M. 2006. "A note on the incidences of *Salmonella* spp., *Listeria* spp and *Escherichia coli* O157:H7 serotypes in Turkish sausages (Soudjouck)." **Meat Science**. 72 : 177-181.

Sjöberg, A. and Hahn-Hägerdal. 1989. "B-Glucose-1-phosphate, a possible mediator for polysaccharide formation in maltose-assimilating *Lactococcus lactis*." **Applied and Environmental Microbiology.** 55 : 1549-1554.

Stolz, P., Böck, G., Vogel, R.F. and Hammes, W.P. 1993. Utilisation of maltose and glucose by lactobacillus isolation from sourgough. FEMS Microbiology Letters. 109 : 237-242.

Spectrumlabs. 2012. Dialysis. [online] Available : http://www.spectrumlabs.com /dialysis/ Fund. htm2012)

Todorov, S.D. and Dicks. L.M.T. 2005. "Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza." **Food Technology and Biotechnology**. 43 : 165-173.

Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2006. "Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine." **Microbiological Research** 161 : 102-108.

Todorov, S.D., Nyati, H. Meincken, M. and Dicks, L.M.T. 2007. "Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe." **Food Control**. 81 : 656-664.

Todorov, S.D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J.G. and Franco, B.D.G.M. 2011. "Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (*Carica papaya)* from isolation to application : Characterization of a bacteriocin." **Food Research International.** 44 : 1351-1363.

Toldrà, F., Sanz, Y and Flores, M. 2001. "Meat fermentation technology." 538-558. in Hui, Y.H., Nip, W.K., Rogers, R.W. and Young, O.A. **Meat Science and Applications**. New York : Marcel Dekker.

Työppönen (née Erkkilä), S. Markkula, A. Petäjä, E., Suihko, M.L. and Mattila-Sandholm, T. 2003. "Survival of *Listeria monocytogenes* in north european type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures " **Food Control.** 14 : 181-185.

Walsh, G. 2002. **Proteins : biochemistry and biotechnology.** England : John Wiley & Sons Ltd.

Yousef, A.E. and Carlstrom, C 2003. **Food Microbiology : A Laboratory Manual.** Hoboken, New York : John Wiley & Sons, Inc.

Vignolo, G., Fadda, S., de Kairuz, M.N., de Ruiz Holgado, A.A.P. and Oliver. G. 1996. "Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by Lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705." **International Journal of Food Microbiology.** 29 : 397-402.

Visessanguan, W., Benjakul, S., Smitionont, T., Kittikun, C., Thepkasikul, P and Panya, A. 2006. "Change in microbiological, biochemical and physic-chemical properties of Nham inoculated with different inculum levels of *Lactobacillus curvatus*." **LWT**. 39 : 814-826.

Von Mollendorff, J.W., Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2009. "Optimization of growth medium for production of bacteriocins produced by *Lactobacllus plantarum* JW3BZ and JW6BZ,

and *Lactobacillus fermentum* JW11BZ and JW15BZ isolated from boza." **Trakia Journal of Science.** 7 : 22-33.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารเคมี

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 Plate count agar (PCA) ประกอบด้วย

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1	กรัม
Agar	15	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 de Man Rogosa and sharpe medium (MRS agar) ประกอบด้วย

Proteose peptone no 3	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัม
Triammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Agar	10	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.3. Mannitol Salt agar (MSA) ประกอบด้วย

Proteose peptone	10	กรัม

1.3. Mannitol Salt agar (MSA) ต่อ

Beef extract	1	กรัม
Sodium chloride	75	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	15	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE Soft Agar) ประกอบด้วย

Tryptic soy broth	30	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Agar	10	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.5 Gibson Semi Solid Tomato Juice Medium ประกอบด้วย

Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	50	กรัม
Skim milk	80	กรัม (ร้อยละ 10)
Nutrient agar (NA)	200	มิลลิลิตร
$MnSO_4.4H_2O$	10	มิลลิลิตร(ร้อยละ 0.4)
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ผสมแมงกานีสซัลเฟต หางนมผง ยีสต์สกัด กลูโคสและน้ำกลั่นเข้าด้วยกันจากนั้นนำอาหารแข็ง NA ที่หลอมละลายแล้วเติมผสมลงไป ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เป็นเวลา 3 วัน

2.การเตรียมสารเคมี

2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความต้านทานแบซิตราซิน

ก) ชั่งแบซิตราซิน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร เตรียมเป็น stock สาร ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ข) ดูดสารละลายจาก stock มา 1 มิลลิลิตร ลงในน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตร

ค) แล้วดูดสารละลายในข้อ ข) มา 8 มิลลิลิตรแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายแบซิตาซินทีมีความเข้มข้น 4 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

2.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความไวต่อฟูราโซลิโดน

ก) ชั่งฟูราโซลิโดน 0.1 กรัม ละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟูราโซลิโดนที่มีความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบความต้านทาน

ก) ชั่งสารละลายไลโซสตาฟีน 1 มิลลิกรัม ละลายในน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร เตรียมเป็น stock สารที่มีความเข้มข้น 250 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ข) ดูดสารจากข้อ ก) มา 1.5 มิลลิลิตรละลายในน้ำกลั่น 13.5 มิลลิลิตร จะได้สารละลายไล-โซสตาฟีนที่มีความเข้มข้น 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

2.4 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

ก) ชั่ง N, N, N, N-Tetramethyl-p-phenylenediamine.2HCl 1กรัม ละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.5 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล

ปิเปตกรดไฮโดรคลอริกปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร

2.6 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

Stock A: ชั่ง KH_2PO_4 13.61 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

Stock B: ชั่ง Na_2HPO_4 14.20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

โดยเตรียมได้ดังนี้

พีเอช	Stock A (มิลลิลิตร)	Stock B (มิลลิลิตร)
6.0	26.32	3.69
7.0	4.8	25.2
7.6	3.9	26.1
8.0	1.59	28.41

2.7 สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์

Stock A: ชั่ง KH_2PO_4 136.1 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร

Stock B: ชั่ง K_2HPO_4 174.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตร โดยเตรียมได้ดังนี้

พีเอช	Stock A (มิลลิลิตร)	Stock B (มิลลิลิตร)
7.0	21.1	28.9

ภาคผนวก ข

วิธีการทดลองเพิ่มเติมและรายละเอียดเกี่ยวกับสารเคมี

1. ส่วนประกอบของสารคาร์โบไฮเดรตใน API 50 CH strips สำหรับการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

ตารางที่ ข.1 ส่วนประกอบของสารคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH strips) ทั้ง 50 ชนิดและผลการทดสอบ

หลอดที่	อักษรย่อ	สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	QTY (mg/cup.)	LS0602	LT0904
0	หลอดควบคุม	ไม่มีคาร์โบไฮเดรต	0	-	-
1	GLY	glycerol	1.64	±	-
2	ERY	erythritol	1.64	-	-
3	DARA	D-arabinose	1.4	-	-
4	LARA	L-arabinose	1.4	+	+
5	RIB	D-ribose	1.4	±	+
6	DXYL	D-xylose	1.4	-	+
7	LXYL	L-xylose	1.4	-	-
8	ADO	D-adonital	1.36	-	-
9	MDX	methyl-ßD-xylopyranoside	1.28	-	-
10	GAL	D-galactose	1.4	+	+
11	GLU	D-glucose	1.56	+	+
12	FRU	D -fructose	1.4	+	+
13	MNE	D-mannose	1.4	+	+
14	SBE	L-sorbose	1.4	-	-
15	RHA	L-rhamnose	1.36	±	±
16	DUL	dulsitol	1.36	-	-
17	INO	inositol	1.4	-	-
18	MAN	D-mannitol	1.36	+	-
19	SOR	D-sorbitol	1.36	+	-
20	MDM	methy-αD -manopyranoside	1.28	+	-
21	MDG	methyl-αD-glucopyranoside	1.28	-	-
22	NAG	N-acetylglucosamine	1.28	+	±
23	AMY	amyldalin	1.08	+	±
24	ARB	arbutin	1.08	+	±

ที่มา : คู่มือการใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

ตารางที่ ข.1 ส่วนประกอบของสารคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH strips) ทั้ง 50 ชนิดและผลการทดสอบ (ต่อ)

หลอดที่	อักษรย่อ	สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	QTY (mg/cup.)	LS0602	LT0904
25	ESC	esuculin ferric cireate	1.16	+	±
26	SAL	salicin	0.152	+	±
27	CEL	D-celibiose	1.04	+	±
28	MAL	D-moltose	1.32	+	-
29	LAC	D-lactose (bovine origin)	1.4	+	-
30	MEL	D-melibiose	1.4	+	-
31	SAG	D-sacharose (sucrose)	1.32	+	±
32	TRE	D-trehalose	1.32	+	+
33	INU	insulin	1.28	-	-
34	MLZ	D-melizitose	1.32	+	-
35	RAF	D-raffinose	1.56	±	-
36	AMD	amido (starch)	1.28	-	-
37	GLYG	glucogen	1.28	-	-
38	XLT	xylose	1.4	-	-
39	GEN	genitiobiose	0.5	±	±
40	TUR	D-turanose	1.32	+	-
41	LYX	D-lyxose	1.4	-	-
42	TAG	D-tagatose	1.4	-	-
43	DFUC	D-fucose	1.28	-	-
44	LFUC	L-fucose	1.28	-	-
45	DARL	D-arabitol	1.4	±	-
46	LARL	L-arabintol	1.4	-	-
47	GNT	potassium gluconate	1.84	±	-
48	2KG	potassium 2-ketogluconate	2.12	-	±
49	5KG	potassium 5-ketogluconate	1.8	±	±

ที่มา : คู่มือการใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

2. การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Staphylococcus* โดยใช้ชุดทดสอบ API staph (BioMérieux)

API staph เป็นชุดทดสอบใช้จำแนกแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus, Micrococcus* และ *Kocuria* โดยอาศัยหลักชีวเคมีทั้งหมด 20 การทดสอบ ซึ่ง Strip ของ API staph ประกอบหลอดจำนวน 20 หลอดที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) ใช้สำหรับทดสอบคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ สามารถอ่านผลโดยเทียบกับ Analytical profile index หรือ Identification software โดยมีอุปกรณ์ดังนี้

1.1 API staph medium ประกอบด้วยยีสต์สกัด 0.5 กรัม bactopeptone 10 กรัม NaCl 5 กรัม แร่ธาตุ 10 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอช 7.0-7.4 กรัม

1.2 API staph strips ประกอบด้วยหลอดจำนวน 20 หลอดที่บรรจุสารเคมีชนิดแห้ง (dehydrated substrates) ได้แก่ ไม่มีซับสเตรท (0), D-glucose (GLU), D-fructose (FRU), D-mannose (MNE), D-maltose (MAL), D-lactose (LAC), D-trehalose (TRE), D-mannitol (MAN), xylitol (XLT), D-melibiose (MEL), potassium nitrate (NIT), ß-naphthyl phosphate (PAL), sodium pyruvate (VP), D-raffinose (RAF), D-xylose (XYL), D-saccharose (SAC), methyl-αD-glucopyranoside (MDG), N-acetyl-glucosamine (NAG), L-arginine (ADH) และ urea (URE) (ตารางที่ ข.2)

1.3. Mineral oil

1.4. สารละลายมาตรฐาน McFarland Standard เบอร์ 0.5

1.5. Reagent kit ประกอบด้วย

ก) สาร VP1 และVP2

ข) สาร NIT1 และNIT2

ค) สาร ZYM A และZYM B

1.6 ถาดรังผึ้ง

1.7 โปรแกรม Identification software หรือ API staph analytical profile index

วิธีการทดสอบ

ก) การเตรียม Strip

เตรียมถาดรังผึ้งที่มาพร้อมชุดทดสอบโดยเติมน้ำกลั่นหรือน้ำ demineralized หรือน้ำที่ไม่มีสารเคมีเจือปนที่อาจจะปล่อยแก๊สเช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำ strip วางลงบนถาด

ข) การเตรียม Strip

เตรียมถาดรังผึ้งที่มาพร้อมชุดทดสอบโดยเติมน้ำกลั่นหรือน้ำ demineralized หรือน้ำที่ไม่มีสารเคมีเจือปนที่อาจจะปล่อยแก๊สเช่น แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วนำ strip วางลงบนถาด

ค) การเตรียมเชื้อ

เลี้ยงเชื้อลงบนอาหาร BHI แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เปิดฝา ampoule API staph medium เขี่ยเชื้อลงในอาหาร เพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 0.5

ง) การถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงใน API staph strip

นำเชื้อที่ต้องทดสอบมาใส่ในหลอด (cupule) โดยเอียงถาดตั้งขึ้นเพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศแล้วใช้ปิเปตหยดสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมไว้ข้างต้นตรงด้านข้างของหลุมทดสอบและเติมให้ครบทุกหลุม หยด mineral oil ลงในช่องที่ขีดเส้นใต้ คือ ADH และ URE แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

จ) การอ่านและแปรผล

หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ให้หยดสารเคมีตามลำดับดังนี้

- หยด VP1 และVP2 ลงในช่อง VP อย่างละ 1 หยด รอ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีชมพู-สีม่วงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก
- หยด NIT1 และNIT2 ลงในช่อง NIT อย่างละ 1 หยด รอ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีแดงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก ถ้าเป็นสีชมพูอ่อน ให้อ่านผลการทดลองเป็นลบ
- หยด ZYM A และZYMB ลงในช่อง PAL อย่างละ 1 หยด รอ 10 นาที ถ้าเปลี่ยนเป็นสีม่วงให้บันทึกการทดลองเป็นผลบวก

ส่วนในหลอดอื่นที่มีสีของสับสเตรทเริ่มต้นก่อนบ่มเป็นสีแดง ถ้าหลังบ่มสีของสับสเตรทเปลี่ยนจากสีแดงเป็นเหลืองให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีให้บันทึกผลการทดลองเป็นลบ ส่วนในหลอด ADH และ URE ซึ่งมีสับสเตรทเริ่มต้นก่อนบ่มเป็นสีเหลือง ถ้าหลังบ่มสีของสับสเตรทเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีแดง-ส้มหรือสีแดง-ม่วงให้บันทึกผลการทดลองเป็นบวก แต่ถ้าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของสีให้บันทึกผลการทดลองเป็นลบ แล้วอ่านค่าแล้วแปรผลต่อไป

การแปรผลโดยใช้โปรแกรม Identification software หรือ API Staph Analytical Profile Index โดยใส่เป็นเครื่องหมายบวกหรือลบ หรือใส่เป็นตัวเลข 7 ตัว (Numerical profile) ซึ่งตัวเลขสามารถคำนวณได้ดังนี้คือ ในกระดาษบันทึกผลจะแบ่งการทดสอบเป็นกลุ่ม ๆ โดยใน 1 กลุ่มจะประกอบด้วย 3 การทดสอบ ให้ค่าเป็น 1, 2 และ 4 เหมือนกันทุกกลุ่ม จากนั้นให้นำเลขของผลการทดสอบในช่องที่เป็นบวกมารวมกัน 1 แถบ strip จะได้ 7 หมายเลขด้วยกัน

ตารางที่ ข.2 ส่วนประกอบของสารเคมีชนิดแห้ง (API staph strips) ทั้ง 20 ชนิด

หลอดที่	อักษรย่อ	สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	QTY (mg/cup.)
0	หลอดควบคุม	ไม่มีคาร์โบไฮเดรต	0
1	GLU	D-glucose	1.56
2	FRU	D-fructose	1.4
3	MNE	D-mannose	1.4
4	MAL	D-maltose	1.4
5	LAC	D-lactose	1.4
6	TRE	D-trehalose	1.32
7	MAN	D-mannitol	1.36
8	XLT	xylitol	1.4
9	MEL	D-melibiose	1.32
10	NIT	potassium nitrate	0.08
11	PAL	ß-naphthyl phosphate	0.0244
12	VP	sodium pyruvate	1.904
13	RAF	D-raffinose	1.56
14	XYL	D-xylose	1.4
15	SAC	D-saccharose (Sucrose)	1.32
16	MDG	methyl-αD-glucopyranoside	1.28
17	NAG	N-acetyl-glucosamine	1.28
18	ADH	L-arginine	1.9.4
19	URE	urea	0.76

ที่มา : คู่มือการใช้ชุดทดสอบ API staph

3. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารยับยั้งที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนด้วยวิธี Bradford

3.1 หลักการ

วิธีการของ Bradford เป็นวิธีการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนซึ่งเกี่ยวกับการจับของสีโคแมส-ซีบริลเลียนบลู G-250 (coomassie brilliant blue G-250) กับโปรตีน สีย้อมมี 3 รูปแบบคือ สารที่ให้ประจุบวก (cationic) มีสีแดง สารที่เป็นกลาง (neutral) มีสีเขียว และสารที่ให้ประจุลบ (anionic) มีสีฟ้าภายใต้สภาวะที่เป็นกรดสีย้อมส่วนใหญ่อยู่ในรูปประจุบวกซึ่งมีสีแดง (doubly protonated red cationic form) (A_{max} = 470 นาโนเมตร) อย่างไรก็ตามเมื่อสีย้อมจับกับโปรตีนแล้วจะถูกเปลี่ยนกลับเป็นรูปแบบที่มีสีฟ้าซึ่งที่มีความเสถียร (stable unpronated form) (A_{max} = 595นาโนเมตร) สารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนที่จับกับสีย้อมซึ่งมีสีฟ้านี้ถูกตรวจพบได้ที่ความยาวคลื่น 595 นา-โนเมตร โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) หรือไมโครเพลตรีดเดอร์ (microplate reader)

H+ H+

แคทอิออน(Cation) ⟷ รูปที่เป็นกลาง (Neutral form) ⟷ แคทอิออน (Anion)

470 นาโนเมตร 650 นาโนเมตร 595 นาโนเมตร

(สีแดง) (สีเขียว) (สีฟ้า)

จากการทดลองกับกรดโพลีอะมิโนชนิดสังเคราะห์ (synthetic polyamino acids) ชี้ให้เห็นว่าสีโค-แมสซีบริลเลียนบลู G-250 จะจับกับกรดอะมิโนชนิดพื้นฐานโดยเฉพาะอาร์จินีนและกรดอะมิโนในรูปอะโรมาติก (aromatic amino acid residues) มีรายงานว่าค่า extinction coefficient ของสารประกอบเชิงซ้อนของสีย้อมกับอัลบูมินคงที่ที่ระดับความเข้มข้นมากกว่า 10 เท่า ดังนั้นอาจนำกฎของเบียร์ (beer's law) มาใช้เพื่อการหาปริมาณโปรตีนที่ถูกต้อง โดยการเลือกอัตราส่วนที่เหมาะสมของปริมาตรสีย้อมกับความเข้มข้นของตัวอย่าง (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2011)

อันตรกิริยาของสารเคมีกับโปรตีนและสารเคมีกับสีย้อมบางชนิดสามารถรบกวนในการวิเคราะห์นี้ได้ การรบกวนที่เกิดจากสารประกอบที่ไม่ใช่โปรตีนนี้เนื่องมาจากความสามารถของสารในการเลื่อน (shift) ระดับความสมดุล (equilibrium level) ของสีย้อมทั้ง 3 รูปแบบ (3 สี) สารรบกวนเช่น สารดีเทอเจนท์บางชนิด ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) และสารละลายบัฟเฟอร์ของโปรตีนพื้นฐาน (basic protein buffers) จะทำให้คุณภาพสีย้อมที่เป็นกลาง (สีเขียว) เกิดความเสถียรโดยการจับกันโดยตรงหรือการเปลี่ยนค่าพีเอช แต่สารเคมีหลายชนิดไม่ได้มีผลกระทบโดยตรงต่อการพัฒนาของสีย้อมเมื่อใช้ตามวิธีการมาตรฐาน สารเคมีที่ใช้กันมากแสดงในตารางที่ ข.3 ในกรณีที่วิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้ไมโครเพลท (micro assay) ต้องใช้ความเข้มข้นของสารต่ำกว่าคือ 1/25 เท่าของความเข้มข้นที่ระบุไว้ในตารางที่ ข.3 เนื่องจากมีอัตราส่วนของปริมาตรตัวอย่างต่อสีย้อมมากกว่าและเนื่องจากยังไม่เคยวิเคราะห์การจับกันทางเคมีของโปรตีนกับสีย้อมทุกรูปแบบจึงเป็นไปได้ว่าสารเคมีบางชนิดในตารางที่ ข.3 อาจจะไปรบกวนการจับกันของโปรตีนบางชนิดซึ่งมีผลเพียงเล็กน้อยหรือไม่ทำให้เกิดการรบกวนเลย อย่างไรก็ตามในกรณีที่ใช้โปรตีนเช่น bovine serum albumin (BSA) และ bovine gamma-globulin สารเคมีดังกล่าวมีผลเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีผลไปรบกวนเลย (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2011)

3.2 การคัดเลือกโปรตีนมาตรฐาน

ในการวิเคราะห์หาโปรตีนใด ๆ นั้นโปรตีนในอุดมคติที่นำมาใช้เป็นสารมาตรฐานคือโปรตีนชนิดที่นำมาวิเคราะห์นั้นต้องผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ แต่ถ้าไม่มีก็โปรตีนในอุดมคติต้องเลือกโปรตีนชนิดอื่นมาใช้เป็นสารมาตรฐาน สารมาตรฐานโปรตีนที่ดีที่สุดที่จะนำมาใช้ควรจะเป็นสารที่ให้ผลผลิตของสีคล้ายกับผลผลิตของสีเมื่อวิเคราะห์กับโปรตีนที่ต้องการทดสอบ การคัดเลือกโปรตีนมาตรฐานโดยทั่วไปทำกันโดยอาศัยประสบการณ์จากการทำปฏิบัติการ อีกวิธีหนึ่ง

ถ้าต้องการทราบเพียง relative protein values อาจใช้โปรตีนที่บริสุทธิ์ชนิดใดก็ได้เป็นสารมาตรฐาน โดยทั่วไปมี 2 ชนิดที่ใช้วิเคราะห์โปรตีนกันมากคือ BSA และแกรมมา-โกลบูลินในการวิเคราะห์โปรตีนด้วยชุดทดสอบ quick start bradford protein assay ดังกล่าวถ้าหากใช้สาร BSA เป็นสารโปรตีนมาตรฐานการพัฒนาของสีย้อมจะเกิดขึ้นมากกว่าการใช้โปรตีนชนิดอื่นร่วมทั้งแกรมมา-โกลบูลิน ดังนั้นสาร BSA มาตรฐานจะเป็นสารที่เหมาะสม ถ้าตัวอย่างมีอัลบูมินเป็นส่วนใหญ่หรือถ้าโปรตีนที่จะวิเคราะห์ให้การตอบสนองที่คล้ายกันต่อสีย้อม สำหรับการตอบสนองของสีซึ่งเป็นลักษณะปกติของโปรตีนหลาย ๆ ชนิด การใช้แกมมา-โกลบูลินจะเหมาะสม (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2011)

3.3 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

ตัวอย่างที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์
2. สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต
3. สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านการทำไดอะไลซิส (fraction 1)
4. สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตผ่านการทำไดอะไลซิส และตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (fraction 2)

3.4 สารเคมีและเครื่องมือที่ใช้

1. สีย้อมความเข้มข้น 1 เท่า (1X dye reagent) : สีย้อมปริมาตร 1 ลิตรซึ่งประกอบด้วยเมทา-นอลและกรดฟอสฟอริก หมายเหตุ : นำสีย้อมความเข้มข้น 1 เท่าซึ่งเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา-เซลเซียสออกมาจากตู้เย็นและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งอุ่นขึ้น ก่อนใช้ควรกลับขวดหลาย ๆ ครั้งก่อนนำสีย้อมมาใช้

2. stock solution ของสารโปรตีนมาตรฐาน (bovine serum albumin; สารมาตรฐาน BSA) ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

3. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer, รุ่นUV 1601 บริษัท shimadzu ประเทศญี่ปุ่น)

3.5 วิธีการวิเคราะห์

ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีมาตรฐานสามารถนี้ได้ 3 แบบคือ ทำในคิวเวตปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือทำในไมโครเพลตปริมาตร 250 ไมโครลิตร ใน

การวิเคราะห์ทั้ง 3 แบบใช้ปริมาตรของตัวอย่างหรือสารละลายโปรตีน และปริมาตรของสีย้อมตามตารางที่ ข.4

ตารางที่ ข.3 สารเคมี (Reagents) ที่ใช้ได้กับชุดทดสอบโปรตีน quick start bradford เมื่อใช้วิธีการมาตรฐาน*

ชนิดของสารเคมี/ความเข้มข้น	ชนิดของสารเคมี/ความเข้มข้น
Acetone, 10%	Ethanol, 10%
Acetonitrile, 10%	Glucose, 20%
Ammonium sulfate, 1 M	Glycerol, 5%
Ampholytes, 3–10, 0.5%	Glycine, 0.1 M
ASB-14, 0.025%	Guanidine-HCl, 2 M
Ascorbic acid, 50 mM	Hank's salt solution
Bis-Tris, pH 6.5, 0.2 M	HCl, 0.1 M
β-mercaptoethanol, 1 M	HEPES, 0.1 M
Calcium chloride, 40 mM	Imidazole, 0.2 M
CHAPS, 10%	Magnesium chloride, 1 M
CHAPSO, 10%	MES, 0.1 M
Deoxycholic acid, 0.2%	Methanol, 10%
DMSO, 5%	Modified Dulbecco's PBS
Dithioerythritol (DTE), 10 mM	MOPS, 0.1 M
Dithiothreitol (DTT), 10 mM	NAD, 2 mM
Eagle's MEM	Nonidet P-40, 0.25%
Earle's salt solution	Octyl β-glucoside, 0.5%
EDTA, 0.2 M	Octyl β-thioglucopyranoside, 1%
EGTA, 0.2 M	PBS
Phenol Red, 0.5 mg/ml	TBP, 5mM
PIPES, 0.2 M	TBS (25 mM Tris, 0.15 M NaCl,
PMSF, 2 mM	pH 7.6), 0.5X
Potassium chloride, 2 M	TCEP, 20 mM
Potassium phosphate, 0.5 M	Thio-urea, 1M
SB 3–10, 0.1%	Tricine, pH 8, 50 mM
SDS, 0.025%	Triethanolamine, pH 7.8, 50 mM
Sodium acetate, pH 4.8, 0.2 M	Tris, 1 M
Sodium azide, 0.5%	Tris-glycine (25 mM Tris, 192 mM
Sodium bicarbonate, 0.2 M	glycine)
Sodium carbonate, 0.1 M	Tris-glycine-SDS, (25 mM Tris,
Sodium chloride, 2.5 M	192 mM glycine, 0.1% SDS),
Sodium citrate, pH 4.8 หรือ 6.4, 0.2 M	0.5x
Sodium hydroxide, 0.1 M	Triton X-100, 0.05%
Sodium phosphate, 0.5 M	Tween 20, 0.01%
Sucrose, 10%	Urea, 4 M

* วิธีนี้ใช้เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนโดยใช้ไมโครเพลท (Micro assay) ต้องใช้ความเข้มข้นของสารเป็น 1/25 เท่าของความเข้มข้นที่ระบุไว้ในตาราง

ตารางที่ ข.4 ปริมาตรของตัวอย่างหรือสารละลายโปรตีนและปริมาตรของสีย้อมที่ใช้ในการวิเคราะห์

อุปกรณ์และปริมาตรที่ใช้ในการวิเคราะห์	ปริมาตรของสารละลายโปรตีนมาตรฐานและตัวอย่าง	ปริมาตรของสีย้อม
คิวเวตขนาด 5 มิลลิลิตร	100 ไมโครลิตร	5 มิลลิลิตร
คิวเวตขนาด 1 มิลลิลิตร	20 ไมโครลิตร	1 มิลลิลิตร
ไมโครเพลต	5 ไมโครลิตร	250 ไมโครลิตร

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีน

สำหรับการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกในการทดลองนี้ทำได้โดยปิเปตตัวอย่างได้แก่ ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต สารละลายโปรตีน fraction 1 และสารละลายโปรตีน fraction 2 ตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่สะอาดแล้วเติมสีย้อมความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (ซึ่งนำออกมาจากตู้เย็นแล้วตั้งทิ้งไว้จนอุณหภูมิสูงขึ้นเท่ากับอุณหภูมิห้องแล้ว) ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer หรือใช้วิธีการกลับหลอด จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที (แต่ไม่เกิน 1 ชั่วโมง) และวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร พร้อมทั้งบันทึกค่าดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนในแต่ละส่วนเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน (สารมาตรฐาน BSA) เพื่อหาความเข้มข้นของสารละลายโปรตีนในตัวอย่างแต่ละส่วนที่นำมาวิเคราะห์

2. การเตรียมกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน

ในการทำกราฟมาตรฐาน (กราฟเส้นตรง) ของสารมาตรฐาน BSA เตรียมที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 125-1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ถ้าใช้แกมมา-โกลบูลินเป็นสารมาตรฐานเตรียมที่ระดับความเข้มข้นระหว่าง 125-1,500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สำหรับการทดลองนี้ใช้สาร BSA ในการเตรียมกราฟมาตรฐานในการใช้ stock solution ของสารมาตรฐาน BSA ความเข้มข้น 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรให้เตรียมตามตารางที่ ข.5 เพื่อเจือจางสารละลายโปรตีนมาตรฐานให้ได้ 8 ระดับความเข้มข้นคือ 2,000, 1,500, 1,000, 750, 500, 250, 125 และ 0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ ข1) สำหรับสารละลายที่ใช้สำหรับการทำการเจือจางนั้นจะใช้สารละลายชนิดเดียวกับที่ใช้เจือจาง ควรใช้น้ำและสีย้อมในการเตรียมตัวอย่าง blank (0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

ในการวิเคราะห์เพื่อเตรียมกราฟมาตรฐานทำได้โดยปิเปตสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่แต่ละระดับความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในหลอดทดลองที่สะอาด เติมสีย้อมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองแต่ละหลอดและผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer หรือกลับหลอด (ในกรณีที่ใช้ไมโครเพลตให้ผสมตัวอย่างโดยใช้ไมโครเพลตมิกเซอร์ (microplate mixer) อีก

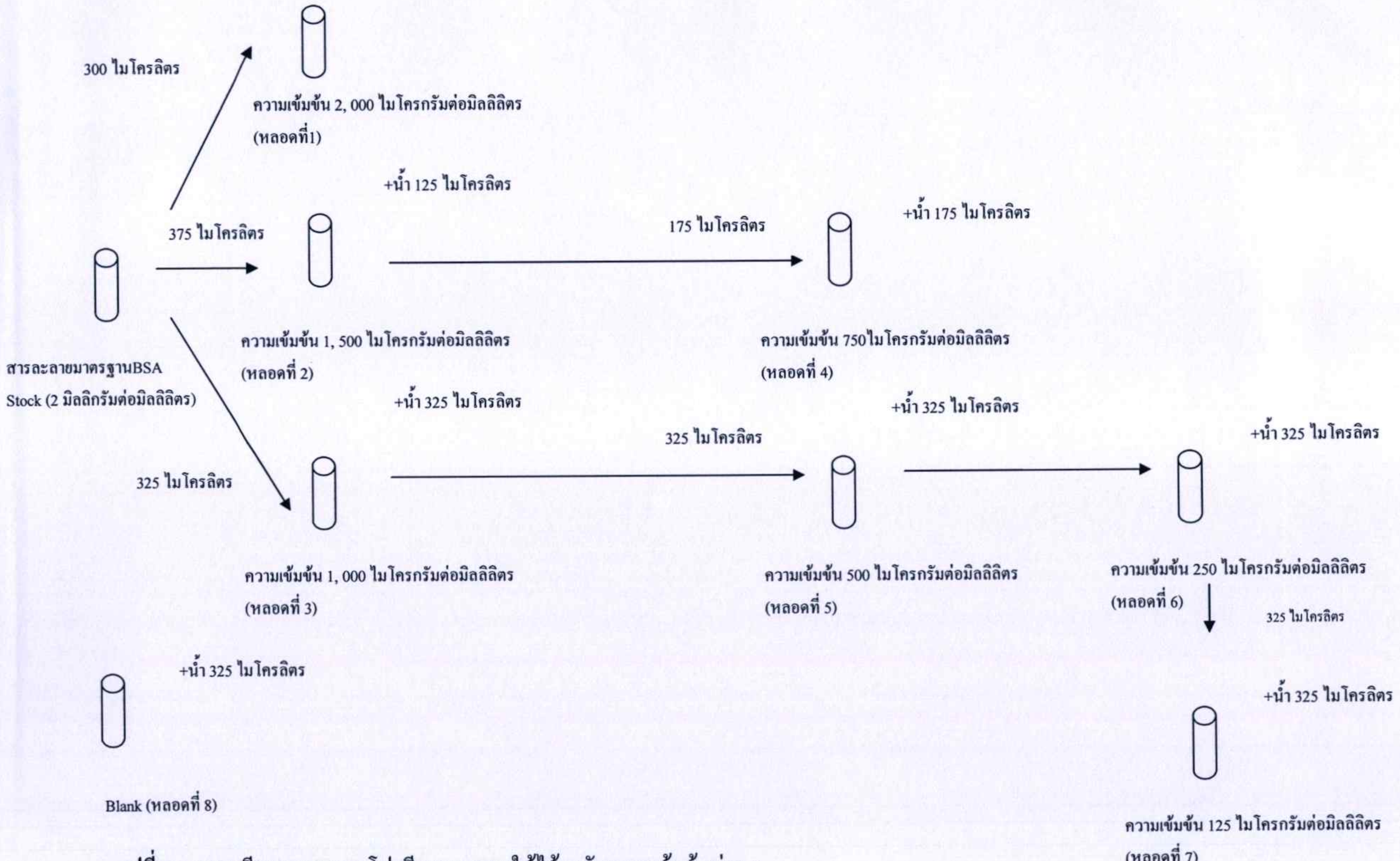
วิธีหนึ่งอาจใช้ปิเปตแบบหลายช่อง (multichannel pipet) เพื่อเติมสีย้อมลงในหลุมแล้วดูดขึ้นลงเพื่อผสมตัวอย่างและสีย้อมให้เข้ากัน โดยเปลี่ยนทิปทุกครั้งเมื่อต้องการทำตัวอย่างต่อไป) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที ไม่ควรบ่มตัวอย่างเกิน 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ปรับเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร ปรับค่าให้เป็นศูนย์โดยใช้ Blank (ไม่ต้องทำในกรณีที่ใช้เครื่อง microplate reader) จากนั้นทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

หมายเหตุ : ถ้าใช้เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ควรมีช่องให้ใส่สารมาตรฐานและตัวอย่างรวมกันและปรับให้ค่าเป็นศูนย์โดยใช้ Blank ทั้ง 2 ตัว ถ้าบัฟเฟอร์มีผลต่อการดูดกลืนแสงควรปรับค่าเป็นศูนย์ โดยใช้คิวเวตที่เติมน้ำและสีย้อมในช่องที่ใส่สารมาตรฐาน (Bio-Rad Laboratories, Inc. 2011)

ตารางที่ ข.5 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน (ปริมาตร 5 มิลลิลิตร)

หลอดที่	ปริมาตรของสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่ใช้ (ไมโครลิตร)	แหล่งของสารละลายโปรตีน (ความเข้มข้น)	ปริมาตรของน้ำที่ใช้เจือจาง (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นของโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)
1	300	Stock (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	0	2,000
2	375	Stock (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	125	1,500
3	325	Stock (2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	325	1,000
4	175	หลอดที่ 2	175	750
5	325	หลอดที่ 3	325	500
6	325	หลอดที่ 5	325	250
7	325	หลอดที่ 6	325	125
8	-	-	325	0

ที่มา Bio-Rad Laboratories, Inc (2011)



รูปที่ ข.1 การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานให้ได้ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

3.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ตารางที่ ข.6 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (สารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS0602)

ตัวอย่าง	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3		ค่าปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เฉลี่ย ±SD
	OD 595 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	OD 595 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	OD 595 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
A	0.830	1,297	0.812	1,257	0.806	1,264	1,273 ± 21.4
B	0.685	1,056	0.667	1,016	0.517	783	952 ± 147.4
C	0.419	612	0.435	629	0.453	676	639 ± 33.2
D	0.321	449	0.309	419	0.318	450	439 ± 17.6

A คือ ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์

B คือ สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

C คือ สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านการทำไดอะไลซิส (fraction 1)

D คือ สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตผ่านการทำไดอะไลซิส และตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (fraction 2)

ตารางที่ ข.7 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายโปรตีนที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วน (สารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus brevis* LT0904)

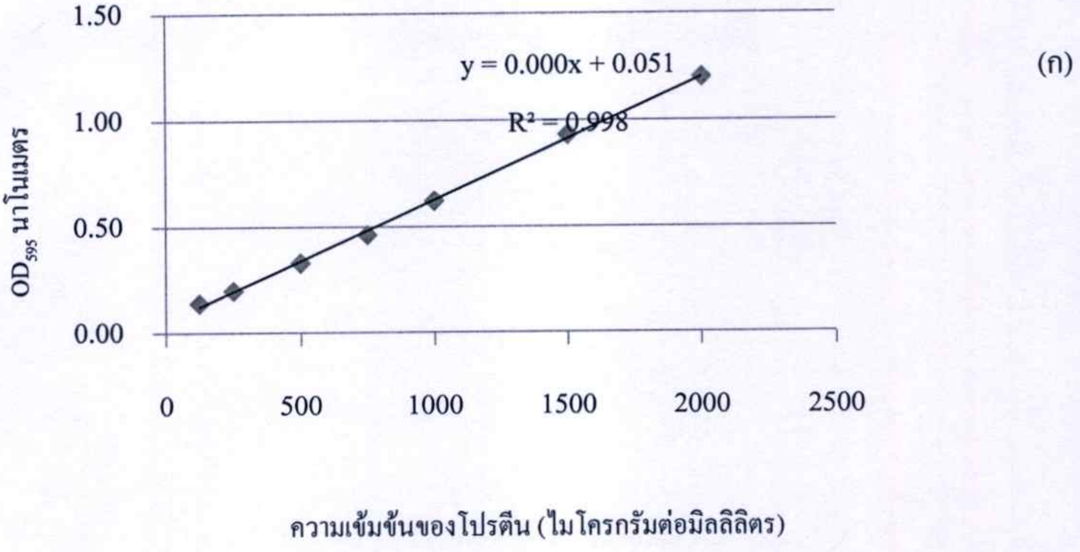
ตัวอย่าง	ซ้ำที่ 1		ซ้ำที่ 2		ซ้ำที่ 3		ค่าปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เฉลี่ย ±SD
	OD 595 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	OD 595 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เฉลี่ย	OD 595 นาโนเมตร	ปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)	
A	0.783	1,219	0.759	1,169	0.775	1,213	1,200 ± 27.3
B	0.594	904	0.611	922	0.586	898	908 ± 12.5
C	0.4	581	0.422	607	0.408	601	596 ± 13.6
D	0.275	372	0.264	344	0.248	334	350 ± 19.7

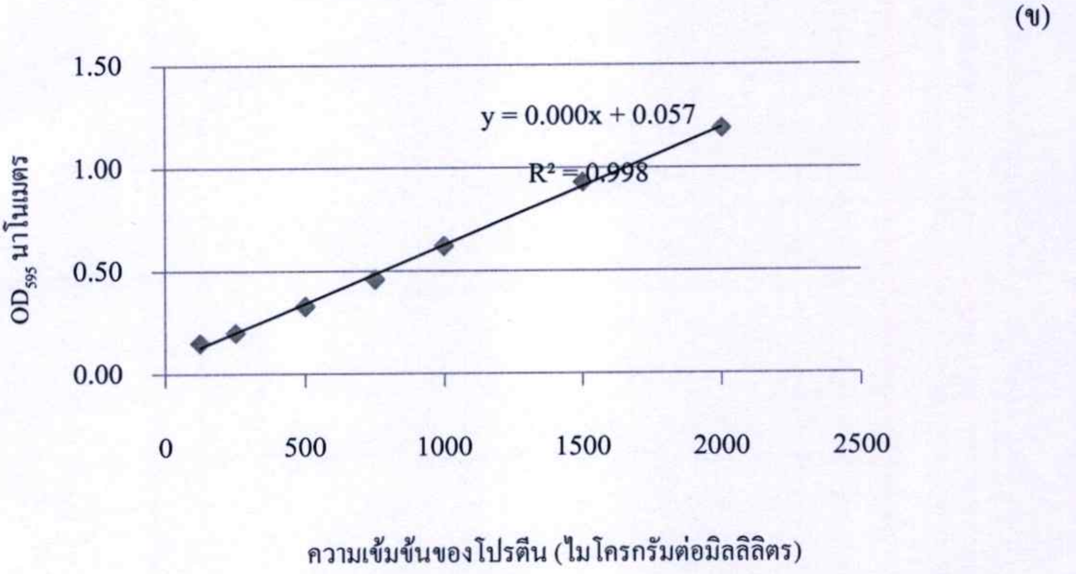
A คือ ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์

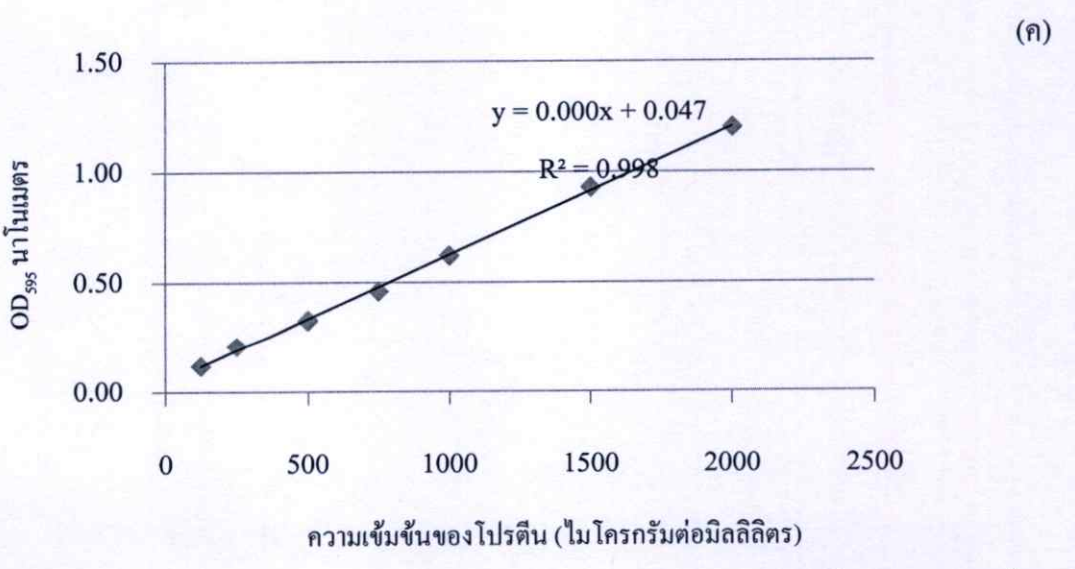
B คือ สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

C คือ สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและผ่านการทำไดอะไลซิส (fraction 1)

D คือ สารละลายโปรตีนที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตผ่านการทำไดอะไลซิส และตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก (fraction 2)







รูปที่ ข.2 กราฟมาตรฐานสารละลายโปรตีน (ก) คือ ครั้งที่ 1 (ข) คือ ครั้งที่ 2 (ค) คือ ครั้งที่ 3

ตัวอย่างการคำนวณหาปริมาณโปรตีน

จากรูปที่ ข.2 (ก) ได้สมการเส้นตรง คือ y = 0.0006x+0.0517 และจากตารางที่ ข5 ในตัวอย่าง A วัดค่า OD_{595} นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.830 (คือค่า y) สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$y = 0.0006x+0.0517$$

$$x = (y-0.0517)/0.0006$$

$$x = (0.830-0.0517)/0.0006 = 1{,}297$$

ดังนั้นในตัวอย่าง A ซ้ำที่ 1 จึงมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1,297 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ ข.2 (ข) ได้สมการเส้นตรง คือ y = 0.0006x+0.0576 และจากตารางที่ ข5 ในตัวอย่าง A วัดค่า OD_{595} นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.812 (คือค่า y) สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$y = 0.0006x+0.0576$$

$$x = (y-0.0576)/0.0006$$

$$x = (0.812-0.0576)/0.0006 = 1{,}257$$

ดังนั้นในตัวอย่าง A ซ้ำที่ 1 จึงมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1,257 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากรูปที่ ข.2 (ค) ได้สมการเส้นตรง คือ y = 0.0006x+0.0475 และจากตารางที่ ข5 ในตัวอย่าง A วัดค่า OD_{595} นาโนเมตร ได้เท่ากับ 0.806 (คือค่า y) สามารถคำนวณได้ดังนี้

$$y = 0.0006x+0.0475$$

$$x = (y-0.0475)/0.0006$$

$$x = (0.806-0.0475)/0.0006 = 1{,}264$$

ดังนั้นในตัวอย่าง A ซ้ำที่ 1 จึงมีความเข้มข้นของโปรตีนเท่ากับ 1,297 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

สรุป สารละลายโปรตีน A โปรตีนความเข้มข้นเท่ากับ (1,297+1,257+1,264)/3 = 1,275 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

4. การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ตารางที่ ข.8 จะใช้ในการกำหนดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม) สำหรับสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยคิดเป็นร้อยละของความอิ่มตัว เมื่อต้องการใช้ตารางเริ่มต้นด้วยการหารายการในคอลัมน์แรกที่ให้ร้อยละความอิ่มตัว เริ่มจากสารละลายตัวอย่าง (เช่น ครั้งแรกจะใช้ที่ร้อยละ 0 ก่อนเติมแอมโมเนียมซัลเฟต) แล้วหารายการในแถวบนสุดที่แสดงถึงร้อยละของความ

อิ่มตัวที่ต้องการ โดยค่าที่ได้จะเป็นค่าที่จุดตัดของแถวและคอลัมน์ที่เป็นจำนวนของแอมโมเนียมซัลเฟต (ของแข็ง) ที่เติมลงในสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง: มีสารละลายปริมาตร 25 มล. ที่ความอิ่มตัวร้อยละ 40 ถ้าหากต้องการที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 จะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟตกี่กรัม

ตอบ ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ความอิ่มตัวร้อยละ 40 ดังนั้นให้ลากไปที่คอลัมน์แรกที่ร้อยละ 0 และความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการคือ ที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 ดังนั้นให้ลากแถวบนไปที่ร้อยละ 80 ที่จุดตัดของแถวและคอลัมน์นี้คือ "26.3" ดังนั้นจะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 26.3 กรัมเพื่อเติมในสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร แต่มีสารละลายเพียง 25 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำนวน 6.6 กรัม

ตารางที่ ข.8 การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

Init %	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.2	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.9	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.8	29.6	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	26.3	29.6	33.5	37.6	41.8

ที่มา : นิรนาม (2012)

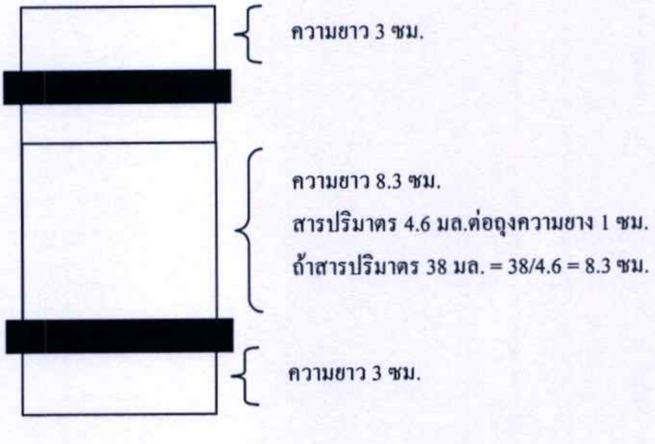
5. การทำไดอะไลซีส

การใช้ถุงไดอะไลซีส (Spectra/Por® เบอร์ 6 ความกว้าง 38 มิลลิเมตร เส้นผ่านศูนย์กลาง 24 มิลลิเมตร และมีปริมาตรต่อความยาวเป็น 4.6 มิลลิเมตรต่อเซนติเมตร) สามารถเตรียมได้ดังนี้

5.1 ใช้สารละลายบัฟเฟอร์เท่ากับ 100 เท่าของปริมาตรตัวอย่างเช่น ตัวอย่าง 10 มิลลิลิตรต้องใช้สารละลายบัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร

5.2 ตัดถุงไดอะไลซีสความยาวโดยประมาณ (1 เซนติเมตรต่อสารละลายโปรตีน 4.6 มิลลิลิตร) โดยตัดให้มีความยาวเพิ่มขึ้นอีกเพื่อให้มีช่องว่างเหนือสารละลาย (head space) เล็กน้อย (เพิ่มพื้นที่ว่างอีกประมาณร้อยละ 10 ของปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด) การกระทำนี้จะทำให้มั่นใจได้ว่าถุงไดอะไลซีสจะลอยอยู่ในสารละลายบัฟเฟอร์และไม่ถูกทำให้เสียหายจากการหมุนของแท่งแม่เหล็ก หลังจากตัดถุงไดอะไลซีสให้แช่เมมเบรนลงในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อล้างสารกันเสียเช่น กลีเซอรีนหรือโซเดียมแอไซด์ (sodium azide) จากนั้นล้างเมมเบรนอย่างทั่วถึงด้วยน้ำกลั่น

5.3 เปิดตัวหนีบถุงไดอะไลซีสโดยคลายตัวล๊อคออก แล้วสอดถุงไดอะไลซิสเข้าไปในตัวหนีบที่เปิดไว้ จากนั้นกดตัวหนีบทั้งสองเข้าด้วยกันเพื่อยึดถุงไดอะไลซีสไว้โดยให้ปลายถุงไดอะ-ไลซีสยื่นออกมาจากตัวหนีบประมาณ 3-5 มิลลิเมตร ตามรูปที่ ข.3



รวมความยาวถุงไดอะไลซิสทั้งหมด 3+8.3+3 = 14.3. ซม.

รูปที่ ข.3 ความยาวของถุงไดอะไลซิสที่ใช้ในการทดลอง

หมายเหตุ : ทั้งนี้ความยาวของถุงไดอะไลซีสอาจปรับได้ตามความเหมาะสม เพราะขึ้นอยู่กับขนาดของถัง และปริมาตรสารละลายบัฟเฟอร์ในถัง

5.4 เติมตัวอย่างลงในถุงไดอะไลซีสทางด้านปากถุง (ส่วนที่เปิดออก) ปรับความยาวของถุงเพื่อให้มีที่ว่างเหนือสารละลายตามต้องการ ก่อนที่จะใช้ตัวหนีบหนีบเพื่อปิดด้านปลายของถุงไดอะไลซีส

5.5 นำถุงไดอะไลซีสไปใส่ลงในบีกเกอร์ที่มีสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 เท่าของสารละลายโปรตีน

5.6 นำแท่งแม่เหล็กที่สะอาดใส่ลงในบีกเกอร์สำหรับทำไดอะไลซีส ควรแน่ใจว่าแท่งแม่เหล็กใหญ่พอที่จะกวนสารละลายทั้งหมดได้ แต่ก็ไม่ควรจะใหญ่เกินไปจนหมุนอย่างอิสระไม่ได้ วางบีก-เกอร์สำหรับทำไดอะไลซีสลงบนเครื่องกวน (Stirrer) แล้วปรับความเร็วของเครื่องกวนให้สูงสุดโดยไม่ทำให้เกิดการดึงถุงลงไปด้านล่าง (Spectrumlabs. 2012)

โดยปกติในการทำไดอะไลซีสจะทิ้งไว้ 1 คืน ในระหว่างการทำไดอะไลซีสสามารถเปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทำไดอะไลซีส (บัฟเฟอร์) เป็นสารละลายใหม่ (fresh dialysate solution) ได้ซึ่งควรให้มีการเกิดไดอะไลซีสอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 2-4 ชั่วโมง หลังจากที่เปลี่ยนบัฟเฟอร์ครั้งสุดท้าย (หมายเหตุ: ในกรณีที่มีการปนเปื้อนมากอาจจำเป็นต้องทำไดอะไลซีสเป็นเวลานานและเปลี่ยนสารละลายบัฟเฟอร์บ่อย ๆ) (Spectrumlabs. 2012)

การเก็บตัวอย่างโปรตีนหลังจากทำไดอะไลซีส (Sample recovery)

จับถุงไดอะไลซีสที่ตัวหนีบและเปิดตัวหนีบออก เทตัวอย่างหรือใช้พลาสเจอร์ปิเปตหรือไซริงค์ดูดตัวอย่างออกมาจากถุงหรืออาจเก็บตัวอย่างเพียงปริมาตรเล็กน้อย โดยการแทงถุงอย่างระมัดระวังด้วยเข็มแบบ 24 gauge hypodermic needle แล้วดูดตัวอย่างออกจากถุงไดอะไลซีสด้วยไซริงค์ (Spectrumlabs. 2012)

การเก็บรักษาเมมเบรน

การเก็บรักษาเมมเบรนแห้งที่อุณหภูมิห้องหรือที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสในถุงพอลีเอทีลีน ส่วนการเก็บเมมเบรนแบบเปียกที่ยังไม่ได้เปิดไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เมื่อเมมเบรนเปียกควรแช่เมมเบรนไว้ในสารละลายชนิดใดชนิดหนึ่งดังนี้คือสารละลายโซเดียมอะไซด์ (sodium azide) ความเข้มข้นร้อยละ 0.05 หรือสารละลายโซเดียมเบนโซเอท (sodium benzoate) ความเข้มข้นร้อยละ 1 หรือสารละลายฟอร์มาลดีไฮด์ความเข้มข้นร้อยละ 1 (หมายเหตุ: เมื่อทำให้เมมเบรนเปียกแล้วไม่ควรปล่อยทิ้งไว้ให้แห้ง เนื่องจากเป็นสาเหตุทำให้รูเมมเบรนเกยทับกันซึ่งไม่สามารถทำให้กลับคืนสภาพเดิมได้ และอายุการเก็บรักษาของเมมเบรนคือ 2 ปี ขึ้นอยู่กับสภาวะที่ใช้เก็บรักษา) (Spectrumlabs. 2012)

ภาคผนวก ค

วิธีการคำนวณหากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

1. คำนวณหา bacteriocin activity โดยวิธี critical dilution assay

วิธี critical dilution assay เป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อวัดกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเมื่อไม่มีสารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบ เมื่อพิจารณาตามหลักการแล้ววิธีการนี้คล้ายกับเทคนิคการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญ (minimum inhibitory concentration) เทคนิคสำหรับวัดค่า antibiotic potency วิธีการ critical dilution assay นี้จะต้องทำการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง (culture) หรือ สารที่ได้จากการหมัก (fermentate) ที่จะนำทดสอบ (ปกติมักทำการเจือจางแบบ 2 เท่า หลาย ๆ ระดับความเจือจาง) และใช้หยดในปริมาณน้อย เช่น 5 ไมโครลิตร) ลงบนผิวหน้าอาหาร soft agar ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อยู่ หลังจากนำจานเพาะเชื้อไปบ่มแล้ว สังเกตบริเวณของการยับยั้งรอบบริเวณที่ได้หยดสารซึ่งได้ทำการเจือจางเพื่อทดสอบถึงการมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ค่า dilution factor สูงที่สุดที่สามารถทำให้เกิดบริเวณการยับยั้งชี้ให้เห็นถึงกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ดังนั้นกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (bacteriocin activity) ซึ่งทราบกันว่าคือค่า arbitrary units (AU) ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้ (Yousef และ Carlstrom. 2003)

$$\frac{\text{AU}}{\text{ml culture}} = \frac{1}{\text{dilution factor ที่สูงสุดที่เกิดการยับยั้ง (DFi)}} \quad \frac{1000}{\text{ปริมาตรของ dilution ที่หยดลงในหลุม (ไมโครลิตร)}}$$

หมายเหตุ : DFi คือ 1 ส่วน dilution factor ที่สูงสุดที่เกิดการยับยั้ง

เช่น ถ้าหยดครั้งละ 5 ไมโครลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้ออินดิเคเตอร์อยู่ดังนั้น AU/ml เท่ากับ 200/DFi ตัวอย่างเช่น ถ้าสารที่ได้จากการหมักซึ่งทำการเจือจางตั้งแต่ระดับความเจือจางที่ $1/2^1$ - $1/2^8$ ทำให้เกิดบริเวณยับยั้งการเจริญ (เช่นวงใส) ที่ทุกระดับการเจือจางตั้งแต่ที่ $1/2^1$ - $1/2^7$ แต่ที่ระดับความเจือจาง $1/2^8$ ไม่เกิดโซนการยับยั้งดังนั้นค่า AU/ml = $200/(1/2^7)$ = 25,600 ซึ่งมีค่า AU จะต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะที่ทดสอบ

ภาคผนวก ง

ผลการทดลองในหมูบดและแหนม

1. จำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน

ผลการทดลองเติมสารยับยั้งในหมูบด (ครั้งที่ 1)

แบคทีเรีย : 1. *Listeria monocytogenes* ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.1×10^9 CFU/ml

ตารางที่ ง.1 จำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน (ครั้งที่ 1)

ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)							
	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด				จำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด			
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 10	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 10
T1	1.3×10^8	4.0×10^7	3.6×10^7	3.7×10^7	4.2×10^6	2.3×10^6	2.1×10^6	1.9×10^6
T2	1.7×10^8	2.1×10^7	1.4×10^7	1.8×10^7	3.6×10^6	1.3×10^5	2.0×10^5	2.2×10^5
T3	1.3×10^8	1.1×10^7	1.0×10^7	1.2×10^7	3.3×10^6	2.6×10^5	2.1×10^5	2.1×10^5
T4	1.0×10^8	5.9×10^6	5.3×10^6	5.1×10^6	3.3×10^6	6.3×10^4	9.2×10^4	8.9×10^4
T5	1.2×10^8	2.0×10^7	2.1×10^7	1.5×10^7	3.3×10^6	2.3×10^5	2.2×10^5	2.3×10^5
T6	1.4×10^8	1.8×10^7	1.8×10^7	1.6×10^7	2.9×10^6	1.5×10^5	1.3×10^5	1.6×10^5

T1 คือ หมูบดชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ หมูบดที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคเทอริโอซิน)

T3 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2

T4 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4

T5 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2

T6 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

ผลการทดลองเติมสารยับยั้งในหมูบด (ครั้งที่ 2)

แบคทีเรีย : 1. *Listeria monocytogenes* ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.4 x 10^9 CFU/ml

ตารางที่ ง.2 จำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน (ครั้งที่ 2)

ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)							
	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด				จำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด			
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 10	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 10
T1	1.1 x 10^8	2.9 x 10^7	3.0 x 10^7	3.0 x 10^7	3.9 x 10^6	1.9 x 10^6	1.9 x 10^6	1.8 x 10^6
T2	1.1 x 10^8	1.8 x 10^7	2.1 x 10^7	2.0 x 10^7	3.4 x 10^6	2.0 x 10^5	1.9 x 10^5	2.1 x 10^5
T3	1.5 x 10^8	1.0 x 10^7	9.0 x 10^6	1.1 x 10^7	3.4 x 10^6	2.9 x 10^5	2.2 x 10^5	2.2 x 10^5
T4	1.4 x 10^8	4.4 x 10^6	3.0 x 10^6	4.9 x 10^6	3.5 x 10^6	7.7 x 10^4	7.7 x 10^4	7.8 x 10^4
T5	1.4 x 10^8	2.1 x 10^7	1.9 x 10^7	1.8 x 10^7	3.3 x 10^6	2.7 x 10^5	1.8 x 10^5	2.4 x 10^5
T6	1.3 x 10^8	2.1 x 10^7	1.7 x 10^7	1.8 x 10^7	3.5 x 10^6	1.3 x 10^5	1.2 x 10^5	1.3 x 10^5

T1 คือ หมูบดชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ หมูบดที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคเทอริโอซิน)

T3 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2

T4 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4

T5 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2

T6 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

ผลการทดลองเติมสารยับยั้งในหมูบด (ครั้งที่ 3)

แบคทีเรีย1. *Listeria monocytogenes* ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.5×10^9 CFU/ml

ตารางที่ ง.3 จำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน (ครั้งที่ 3)

ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)							
	จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด				จำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด			
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 10	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 10
T1	1.6×10^8	3.8×10^7	3.2×10^7	3.5×10^7	4.5×10^6	2.5×10^6	2.3×10^6	2.4×10^6
T2	1.5×10^8	2.5×10^7	1.9×10^7	1.9×10^7	3.0×10^6	2.2×10^5	2.0×10^5	2.2×10^5
T3	1.4×10^8	2.6×10^7	2.0×10^7	1.5×10^7	2.9×10^6	3.5×10^5	3.0×10^5	2.9×10^5
T4	1.0×10^8	3.0×10^6	4.5×10^6	4.4×10^6	2.4×10^6	6.0×10^4	8.0×10^5	7.5×10^5
T5	1.6×10^8	2.2×10^6	1.7×10^6	2.0×10^6	3.3×10^6	3.7×10^5	2.5×10^5	2.4×10^5
T6	1.4×10^8	1.9×10^7	1.8×10^7	1.8×10^7	4.0×10^6	1.5×10^5	1.4×10^5	1.2×10^5

T1 คือ หมูบดชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ หมูบดที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคเทอริโอซิน)

T3 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2

T4 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4

T5 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2

T6 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

ตารางที่ ง.4 จำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน

ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์[a] (log CFU/g) ± SD			
	วันที่ 0	วันที่ 3	วันที่ 7	วันที่ 10
จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด				
T1	8.12 ± 0.08 a	7.53 ± 0.11 a	7.52 ± 0.04 a	7.53 ± 0.05 a
T2	8.15 ± 0.10 a	7.33 ± 0.70 ab	7.25 ± 0.08 b	7.28 ± 0.02 b
T3	8.14 ± 0.04 a	7.15 ± 0.23 b	7.08 ± 0.19 b	7.10 ± 0.07 c
T4	8.05 ± 0.09 a	6.63 ± 0.15 c	6.61 ± 0.12 c	6.68 ± 0.04 d
T5	8.14 ± 0.06 a	7.32 ± 0.02 ab	7.27 ± 0.05 b	7.25 ± 0.06 b
T6	8.14 ± 0.23 ab	7.29 ± 0.03 b	7.25 ± 0.17 b	7.24 ± 0.03 c
จำนวน *Listeria monocytogenes*				
T1	6.62 ± 0.03 a	6.35 ± 0.6 a	6.32 ± 0.04 a	6.31 ± 0.06 a
T2	6.52 ± 0.04 ab	5.25 ± 1.2 c	5.29 ± 0.02 b	5.33 ± 0.09 ab
T3	6.50 ± 0.04 b	5.47 ± 0.6 b	5.38 ± 0.09 bc	5.37 ± 0.08 b
T4	6.48 ± 0.09 b	4.82 ± 0.6 d	4.91 ± 0.04 bc	4.90 ± 0.04 d
T5	6.52 ± 0 ab	5.45 ± 0.01 b	5.33 ± 0.07 b	5.37 ± 0.01 b
T6	6.53 ± 0.07 ab	5.16 ± 0.4 a	5.12 ± 0.02 c	5.13 ± 0.06 c

[a] ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

T1 คือ หมูบดชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ หมูบดที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคเทอริโอซิน)

T3 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2

T4 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4

T5 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2

T6 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

2. ค่าพีเอชในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน

ตารางที่ ง.5 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในหมูบดที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 วัน

ชุดการทดลอง	ครั้งที่	ระยะเวลาในการเก็บรักษา (วัน)			
		0	3	7	10
T1	1	6.05	5.78	6.11	5.99
	2	5.99	5.90	5.80	5.82
	3	6.00	5.73	5.97	5.85
T2	1	5.93	5.87	5.90	5.75
	2	5.88	5.86	5.65	5.93
	3	5.80	5.78	5.88	5.80
T3	1	6.00	5.70	5.77	5.60
	2	5.85	5.78	5.64	5.71
	3	5.94	6.01	5.74	5.71
T4	1	5.85	5.67	5.68	5.86
	2	5.79	5.73	5.60	5.66
	3	5.74	5.72	5.92	5.84
T5	1	5.95	5.83	5.77	5.72
	2	5.84	5.83	5.69	5.63
	3	5.90	5.66	5.79	5.73
T6	1	5.80	5.62	5.62	5.55
	2	5.70	5.72	5.52	5.50
	3	5.65	5.78	5.50	5.59

T1 คือ หมูบดชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ หมูบดที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคเทอริโอซิน)

T3 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2

T4 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4

T5 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2

T6 คือ หมูบดที่เติมสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

3. จำนวนจุลินทรีย์ในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

ผลการทดลองเติมสารยับยั้งร่วมกับสารยับยั้งในแหนม (ครั้งที่ 1)

Starter : 1. *Lactobacillus plantarum* LS0602 ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.4×10^9 CFU/ml

2. *Lactobacillus brevis* LT0904 ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.3×10^9 CFU/ml

แบคทีเรีย : 1. *Listeria monocytogenes* ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.0×10^9 CFU/ml

ตารางที่ ง.6 จำนวนจุลินทรีย์ในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน (ครั้งที่ 1)

ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)							
	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด				จำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
T1	9.9×10^5	1.3×10^7	2.4×10^7	2.5×10^7	4.3×10^6	3.1×10^6	1.1×10^6	1.2×10^6
T2	5.6×10^5	1.4×10^7	2.0×10^7	2.2×10^7	3.2×10^6	4.6×10^4	4.8×10^4	4.6×10^4
T3	2.2×10^7	2.1×10^8	2.1×10^7	5.6×10^8	3.6×10^6	1.2×10^5	1.2×10^5	1.0×10^5
T4	2.1×10^7	2.0×10^8	2.2×10^8	6.3×10^8	3×10^6	6.6×10^4	5.0×10^4	3.5×10^4
T5	1.9×10^7	2.1×10^8	2.1×10^8	6.9×10^8	2.8×10^6	1.5×10^5	1.4×10^5	1.4×10^5
T6	2.1×10^7	2.0×10^8	2.0×10^8	6.3×10^8	4.3×10^6	8.7×10^4	8.2×10^4	7.2×10^4

T1 คือ แหนมชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ แหนมที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมสารยับยั้ง)

T3 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602

T4 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602ร้อยละ 4

T5 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904

T6 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

ผลการทดลองเติมสารยับยั้งร่วมกับสารยับยั้งในแหนม (ครั้งที่ 2)

Starter : 1. *Lactobacillus plantarum* LS0602 ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.6×10^9 CFU/ml

2. *Lactobacillus brevis* LT0904 ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.4×10^9 CFU/ml

แบคทีเรีย : 1. *Listeria monocytogenes* ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.3×10^9 CFU/ml

ตารางที่ ง.7 จำนวนจุลินทรีย์ในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน (ครั้งที่ 2)

ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)							
	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด				จำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
T1	8.8×10^5	1.0×10^7	1.2×10^7	1.4×10^7	3.1×10^6	3.7×10^6	3.1×10^6	1.5×10^6
T2	7.2×10^5	1.1×10^7	1.2×10^7	1.3×10^7	1.2×10^6	7.4×10^4	5.9×10^4	5.5×10^4
T3	3.1×10^6	1.9×10^8	2.2×10^8	8.1×10^8	2.5×10^6	1.3×10^5	1.5×10^5	1.7×10^5
T4	3.4×10^6	1.7×10^8	2.0×10^8	7.7×10^8	2.1×10^6	9.6×10^4	8.1×10^4	7.1×10^4
T5	3.3×10^6	2.1×10^8	2.2×10^8	8.7×10^8	2.6×10^6	2.6×10^5	3.1×10^5	3.8×10^5
T6	3.0×10^6	1.8×10^8	2.1×10^8	7.3×10^8	2.4×10^6	8.8×10^4	8.3×10^4	7.9×10^4

T1 คือ แหนมชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ แหนมที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมสารยับยั้ง)

T3 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602

T4 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4

T5 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904

T6 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

ผลการทดลองเติมสารยับยั้งร่วมกับสารยับยั้งในแหนม (ครั้งที่ 3)

Starter : 1. *Lactobacillus plantarum* LS0602 ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.6×10^9 CFU/ml

2. *Lactobacillus brevis* LT0904 ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.6×10^9 CFU/ml

แบคทีเรีย : 1. *Listeria monocytogenes* ในสารแขวนลอยเซลล์ มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.7×10^9 CFU/ml

ตารางที่ ง.8 จำนวนจุลินทรีย์ในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน (ครั้งที่ 3)

ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ (CFU/g)							
	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด				จำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
T1	8.4×10^5	1.0×10^7	1.2×10^7	1.6×10^7	3.1×10^6	2.6×10^6	3.2×10^6	2.2×10^6
T2	6.9×10^5	1.1×10^7	1.3×10^7	1.5×10^7	1.6×10^6	6.3×10^4	7.3×10^4	7.1×10^4
T3	3.2×10^6	2.2×10^8	2.4×10^8	6.1×10^8	2.8×10^6	1.5×10^5	1.5×10^5	1.7×10^5
T4	3.3×10^6	2.1×10^8	2.1×10^8	6.6×10^8	2.1×10^6	9.1×10^4	7.6×10^4	7.1×10^4
T5	3.5×10^6	2.4×10^8	2.4×10^8	6.2×10^8	2.0×10^6	4.7×10^5	4.2×10^5	3.3×10^5
T6	2.9×10^6	2.1×10^8	2.3×10^8	5.0×10^8	2.0×10^6	9.9×10^4	9.1×10^4	8.7×10^4

T1 คือ แหนมชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ แหนมที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมสารยับยั้ง)

T3 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602

T4 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4

T5 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904

T6 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

ตารางที่ ง.9 จำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

ชุดทดลอง	จำนวนเชื้อจุลินทรีย์[a] (log CFU/g) ± SD			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด				
T1	5.95 ± 0.04 a	7.04 ± 0.06 a	7.18 ± 0.17 a	7.25 ± 0.13 a
T2	5.82 ± 0.06 a	7.08 ± 0.06 a	7.20 ± 0.18 a	7.21 ± 0.12 a
T3	6.05 ± 0.09 b	8.31 ± 0.03 b	8.35 ± 0.03 b	8.35 ± 0.05 b
T4	6.00 ± 0.04 b	8.04 ± 0.06 b	8.18 ± 0.17 b	8.25 ± 0.13 b
T5	6.00 ± 0.04 b	8.04 ± 0.06 b	8.18 ± 0.17 b	8.25 ± 0.13 b
T6	6.00 ± 0.04 b	8.04 ± 0.06 b	8.18 ± 0.17 b	8.26 ± 0.11 b
จำนวน *Listeria monocytogenes*				
T1	6.54 ± 0.08 a	6.49 ± 0.08 a	6.51 ± 0.26 a	6.34 ± 0.13 a
T2	6.46 ± 0.22 b	4.78 ± 0.11 d	4.77 ± 0.09 d	4.75 ± 0.09 d
T3	6.47 ± 0.08 ab	5.12 ± 0.05 c	5.14 ± 0.06 bc	5.15 ± 0.13 bc
T4	6.42 ± 0.17 ab	4.92 ± 0.15 cd	4.83 ± 0.11 d	4.75 ± 0.18 d
T5	6.40 ± 0.09 ab	5.42 ± 0.25 b	5.42 ± 0.25 b	5.41 ± 0.23 b
T6	6.38 ± 0.07 ab	4.96 ± 0.03 cd	4.93 ± 0.02 cd	4.90 ± 0.04 cd

[a]ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

T1 คือ แหนมชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ แหนมที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมสารยับยั้ง)

T3 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602

T4 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4

T5 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904

T6 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

4. ค่าพีเอชในแหนมระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

ตารางที่ ง.10 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในแหนมหระหว่างการหมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 วัน

ชุดการทดลอง	ครั้งที่	ระยะเวลาในการหมัก (วัน)			
		0	1	2	3
T1	1	5.42	5.16	4.82	4.71
	2	5.56	5.14	4.96	4.86
	3	5.49	5.27	5.12	4.94
T2	1	5.55	5.24	4.90	4.78
	2	5.42	5.15	4.99	4.87
	3	5.45	5.19	5.17	4.94
T3	1	5.47	5.18	4.75	4.67
	2	5.45	5.02	4.88	4.61
	3	5.32	5.07	5.02	4.78
T4	1	5.49	5.16	4.58	4.46
	2	5.52	5.03	5.59	4.50
	3	5.37	5.21	5.01	4.61
T5	1	5.45	5.19	4.81	4.72
	2	5.43	5.09	4.88	4.88
	3	5.40	5.22	4.99	4.84
T6	1	5.57	5.17	4.55	4.51
	2	5.41	5.01	4.70	4.64
	3	5.59	5.25	4.59	4.45

T1 คือ แหนมชุดควบคุม (ไม่เติมสารยับยั้ง)

T2 คือ แหนมที่เติมไนซิน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมสารยับยั้ง)

T3 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602

T4 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602ร้อยละ 4

T5 คือ แหนมที่เติมกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904

T6 คือ แหนมที่เติมสารยับยั้งร้อยละ 4 ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4