การคัดแยกและจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคทเรริโอซินจากแหนมปลา

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIOCIN-PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA FROM MINCED FERMENTED FISH (NHAM PLA)

นพดล เมตตาเมธา

NOPPADOL METTAMETHA

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาจุลินทรีย์อาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี

พ.ศ. 2551

KMITL-2003-Ai-M-054-264

การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากแหนมปลา

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIOCIN - PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA FROM MINCED FERMENTED FISH (NHAM PLA)

T 081371

นภดล เมตตาเมธา

NOPPADOL METTAMETHA

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 81371
วัน,เดือน,ปี 11 มิ.ย. 2551

.b.....
.i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสุขาภิบาลอาหาร
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2008-AI-M-054-264

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF BACTERIOCIN – PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA FROM MINCED FERMENTED FISH (NHAM PLA)

NOPPADOL METTAMETHA

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE PROGRAM IN FOOD SANITATION
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
2008

เอกสารนี้เป็น[illegible]ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

KMITL-2008-AI-M-054-264

COPY RIGHT 2008

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากแหนมปลา

Isolation and Identification of Bacteriocin-producing Lactic Acid Bacteria from Minced Fermented Fish (Nham Pla)

ชื่อนักศึกษา นายนภดล เมตตาเมธา

รหัสประจำตัว 46067915

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา สุขาภิบาลอาหาร

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.ดร.ประภาพร	ขอไพบูลย์	
รศ.ดร.อดิศร	เสวตวิวัฒน์	
ผศ.ดร.ศศิวิมล	ชื่นอิ่ม อาเหมัด	
รศ.สมใจ	ศิริโภค	

วัน / เดือน/ ปี ที่สอบ 26 พฤษภาคม 2551 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ ห้องสัมมนา D 213 อาคารเจ้าคุณทหาร

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว

(รศ.ดร.รวีวรรณ ชินะตระกูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ 27 **เดือน** พฤษภาคม **พ.ศ.** 2551

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากแหนมปลา
นักศึกษา	นายนภดล เมตตาเมธา
รหัสประจำตัว	46067915
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	สุขาภิบาลอาหาร
พ.ศ.	2551
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รองศาสตราจารย์ ดร.อดิศร เสวตวิวัฒน์

บทคัดย่อ

จากการศึกษาผลิตภัณฑ์แหนมปลาพร้อมบริโภคที่จำหน่ายทั่วไป จำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อทำการศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลคติก (LAB) และคุณสมบัติทางเคมี พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ อยู่ในช่วง $1.7 \times 10^{7} - 4.4 \times 10^{9}$ CFU/g ค่า pH 4.69 – 5.15 ปริมาณกรดแลคติก 0.72 – 1.13% ความชื้น 67.42 – 76.04% และค่า a_w 0.742 – 0.825 ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้ 100 ไอโซเลท จากแหนมปลาจำนวน 10 ตัวอย่าง เพื่อนำมาทดสอบหาแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยวิธี direct agar spot method บนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM พบแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งหมด 36 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียแลคติก 12 ไอโซเลทที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบดีที่สุด มาตรวจสอบยืนยันการสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารเหลว MRS broth ศึกษาผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ 23 ชนิด โดยวิธี spot-on-lawn พบว่ามีเพียงแบคทีเรียแลคติก 2 ไอโซเลท คือ NP3.8 และ NP5.4 ที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ ไอโซเลท NP3.8 ผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีคือ *Bacillus coagulans* JCM 2257 และ *Listeria innocua* ATCC 33090 มีความเข้มข้น 1,600 AU/ml ส่วน ไอโซเลท NP5.4 ผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีโดยเฉพาะ *Lactobacillus. sakei* JCM 1157 มีความเข้มข้น 3,200 AU/ml สารยับยั้งที่สร้างจาก NP3.8 และ NP5.4 สูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิด และที่อุณหภูมิ 121 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที เมื่อปรับ pH เป็น 6.5 แต่สารยับยั้งที่ผลิตได้เมื่อมีให้ความร้อนสูงยังคงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ เมื่อปรับ pH เป็น 3.0 ซึ่งจากคุณสมบัติของสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลท คือการถูกทำลายประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และการทนความร้อนของสารยับยั้งที่ pH ต่ำ จึงยืนยันได้ว่าสารยับยั้งที่ผลิตจาก NP3.8 และ NP5.4 อยู่ในกลุ่มของแบคเทอริโอซิน เมื่อนำมาหาความสัมพันธ์ของแบคทีเรียแลคติกโดยชุด

ทดสอบ API 50 CH พบว่า มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (NP3.8) และมีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (NP5.4)

เมื่อทำการทดลองใช้แบคทีเรียแลคติก 2 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการทำผลิตภัณฑ์แหนมปลา เปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ พบว่า *Lb. plantarum* (NP3.8) ทำให้เกิดกระบวนการหมักที่รวดเร็วที่สุด นอกจากนี้การใช้กล้าเชื้อที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน 2 สายพันธุ์ คือ *Lb. plantarum* (NP3.8) เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมปลาไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ในการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของรสชาติเปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ แต่แสดงผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$) โดยมีความชอบมากกว่าแหนมปลาที่ใช้ *Lc. lactis* subsp. *lactis* (NP5.4) เป็นกล้าเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Isolation and Identification of Bacteriocin - producing Lactic Acid Bactereria from Minced Fermented Fish (Nham Pla)
Student	Mr. Noppadol Mettametha
Student ID	46067915
Degree	Master of Science
Program	Food Sanitation
Year	2008
Thesis Adivisor	Assoc.Prof. Dr. Adisorn Swetwiwathana

ABSTRACT

Ten samples of retailed ready to eat fermented minced fish (Nham Pla) sold in various markets were studied for the amount of lactic acid bacteria (LAB) and some chemical properties. It was revealed that the amount of LAB for these ready to eat samples were among $1.7 \times 10^7 - 4.4 \times 10^9$ CFU/g with some chemical properties of pH from 4.69-5.15, percentage of lactic acid from 0.72-1.13, relative humidity of the products from 67.42-76.04% and a_w from 0.742-0.825. 100 strains of isolated LAB from the 10 samples of Nham Pla were tested for the production of antagonistic activity by direct agar spot method on bacteriocin screening medium (BSM). The results revealed that 36 isolates were shown being mostly active against bacterial indicators. 12 from these 36 isolates which showed the best antagonistic activity on selected indicators were later confirmed for their bacteriocin production in the MRS broth with 23 indicator strains by using spot-on-lawn method. The results implied that supernatants from only 2 isolates of NP3.8 and NP5.4 exhibited the best activity against most indicators especially *Bacillus coagulans* JCM 2257 and *Listeria innocua* ATCC 33090 with 1,600 AU/ml, and *Lactobacillus sakei* JCM 1157 with 3,200 AU/ml, respectively. The antimicrobial produced by each strain was lost the activity by various protease treatments and autoclaving at pH 6.5, but the activity of the produced was seemly heat stable when each supernatant was adjust to pH 3.0. According to these characteristics, thus, the obtained antimicrobial substances in the culture supernatant of these 2 isolates were defined as bacteriocin. Each of these both strains was preliminarily identified as *Lb. plantarum* (NP3.8) and *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (NP5.4) by using API 50 CH test kit.

When used these 2 strains of bacteriocin-producing LAB as starter cultures for Nham Pla production compared to the natural fermentation samples, only *Lb. plantarum* (NP3.8) could

be exerted most rapid fermentation period. Among the 2 bacteriocin-producing LAB as starter cultures, *Lb. plantarum* (NP3.8) exhibited non significant ($P>0.05$) in organoleptically preferable to the naturally fermented products, but revealed significantly ($P\leq0.05$) more preferable than using *Lc. lactis* subsp. *lactis* (NP5.4) as starter.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำวิทยานิพนธ์ในหัวข้อเรื่อง การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากแหนมปลา สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ ที่ได้ช่วยแก้ไขตรวจทานวิทยานิพนธ์ และ ให้คำปรึกษาปัญหาต่างๆ ที่เกิดกับงานวิจัย ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. ประภาพร ขอไพบูลย์ ผศ.ดร. ศศิวิมล ชื่นอิ่มอาเหมีด และ รศ. สมใจ ศิริโภค ให้ความกรุณาเป็นอาจารย์กรรมการ ช่วยแนะนำให้คำปรึกษาและสละเวลาอันมีค่าสำหรับการแนะนำแก้ไขรายงานให้มีความถูกต้อง และสมบูรณ์ดียิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ รศ. สมใจ ศิริโภค และภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร ที่ให้คำปรึกษางานวิจัย เอื้อเฟื้อวัสดุอุปกรณ์เครื่องมือ และสถานที่ทำการวิจัยจนสำเร็จลุล่วงตลอดการทดลอง ตลอดจนขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการทุกท่านที่คอยเอื้ออำนวยความสะดวกในการเบิกอุปกรณ์ อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ธุรการทุกท่าน ที่คอยช่วยเหลือประสานงานต่าง ๆ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณบิดา มารดา ญาติพี่น้องและเพื่อนนักศึกษาสาขาสุขาภิบาลอาหาร ที่คอยเป็นกำลังใจ และช่วยสนับสนุนมาโดยตลอด

นภดล เมตตาเมธา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....I

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....III

กิตติกรรมประกาศ.....V

สารบัญ.....VI

สารบัญตาราง.....VIII

สารบัญภาพ.....X

บทที่ 1 บทนำ.....1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....1

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง.....2

1.3 ขอบเขตของการทดลอง.....2

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ.....3

บทที่ 2 ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....4

2.1 อาหารหมักดอง.....4

2.2 แบคทีเรียแลคติก.....5

2.3 การหมักของแบคทีเรียแลคติก.....6

2.4 กล้าเชื้อจุลินทรีย์.....11

2.5 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ โดยแบคทีเรียแลคติก.....15

2.6 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน.....19

2.7 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน.....20

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซิน.....21

2.9 การใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร.....22

2.10 สารไนซิน (Nisin).....26

2.11 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....30

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง.....35

3.1 ตัวอย่างแหนมปลา.....35

3.2 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์.....36

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....36
3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง.....37
3.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ.....37
3.6 สถานที่ดำเนินการทดลอง.....38
3.7 วิธีดำเนินการทดลอง.....38

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล.....46
4.1 การศึกษาสมบัติทางเคมีของแหนมปลา.....46
4.2 การศึกษาปริมาณแบคทีแลคติกในแหนมปลา.....47
4.3.การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้.....49
4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่มีต่อเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ.....55
4.5 การทดสอบยืนยันว่าสารที่ผลิตได้เป็นแบคเทอริโอซิน.....57
4.6 การทดสอบการทนความร้อนของแบคเทอริโอซิน.....58
4.7 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อทดสอบ
ในอาหารเหลว.....60
4.8 การทดสอบการย่อยสารคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลคติก.....64
4.9 การทดสอบทางด้านการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลา.....67

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....71

บรรณานุกรม.....74

ภาคผนวก.....80
ก. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ.....81
ข. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ.....83
ค. แบบประเมินผลทางด้านประสาทสัมผัส.....95

ประวัติผู้เขียน.....96

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 ชนิดของอาหารหมักดองในแต่ละภาค....4

2.2 ผลิตภัณฑ์เนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการผลิต....13

2.3 ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินกับสารปฏิชีวนะ....15

2.4 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้จากอาหาร....23

2.5 การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ....24

2.6 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก ที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร....26

3.1 แสดงรหัสแหนมปลา ตราผลิตภัณฑ์และสถานที่ผลิต....35

3.2 เชื้อทดสอบที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้ง....38

3.3 เชื้อทดสอบที่ใช้ศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้ง จำนวน 21 ชนิด....42

3.4 สเกลฮีโดนิกที่ใช้ในการทดสอบการยอมรับของวิธีทดสอบฮีโดนิก แบบ 9 – จุด (9 points hedonic scale)....44

4.1 ค่า pH ปริมาณกรดแลคติก ความชื้น และค่า a_w ของแหนมปลาจากแหล่งผลิตต่าง ๆ....46

4.2 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลาผลิตต่าง ๆ ที่เจริญบนอาหาร MRS agar + 0.5% $CaCO_3$....48

4.3 ผลของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 8 ชนิด....50

4.4 ลักษณะรูปร่าง การติดสีย้อมแกรม และความสามารถในการสร้าง catalase ของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้....54

4.5 ประสิทธิภาพของสารจากแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 23 ชนิด....56

4.6 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารยับยั้งที่ได้จาก NP3.8 และ NP5.4....58

4.7 ผลการทดสอบการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินที่ได้จาก NP3.8 และ NP5.4....59

4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Lis. innocua* ATCC 33090 เมื่อมีการใส่สาร NP3.8 ลงไปทดสอบในอาหารเหลว TSB+0.6% YE แสดงผลเป็นค่า $\log_{10}$CFU/ml....60

4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Lb. sakei* JCM 1157 เมื่อมีการใส่สาร NP5.4 ลงไปทดสอบในอาหารเหลว MRS broth แสดงผลเป็นค่า $\log_{10}$CFU/ml....62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่ หน้า

4.10 ผลการย่อยสารคาร์โบไฮเดรต ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้.....66
โดยชุดตรวจ API 50 CH

4.11 การตรวจวิเคราะห์ค่า pH และ ปริมาณกรดแลคติก ของแหนมปลา 3 สูตร.....67

4.12 ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของรสชาติผลิตภัณฑ์แหนมปลาทั้ง 3 สูตร.....68

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

2.1 รูปตัวอย่างผลิตภัณฑ์แหนมปลา.....5

2.2 แสดงกลไกการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรียแลคติก แบบ Homofermentative และแบบ Heterofermentative.....8

2.3 ปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก.....18

2.4 แสดงแบบจำลองการทำให้เกิดรู ในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซิน.....20

2.5 ภาพโครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน Z.....27

2.6 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไนซิน.....28

2.8 กลไกการทำให้เกิดรูในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยไนซิน.....29

4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างแหนมปลาเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar + 0.5% $CaCO_3$.....47

4.2 ผลของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Lis. innocua* ATCC 33090 โดยวิธี direct colony spot method.....49

4.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก NP3.8 ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Lis. innocua* ATCC 33090 โดยวิธี spot-on-lawn 57

4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Lis. innocua* ATCC 33090 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว TSB+0.6%YE ผสมส่วนใสที่ได้จาก NP3.8 ลงไป 2% เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....61

4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Lb. sakei* JCM 1157 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS broth ผสมส่วนใสที่ได้จาก NP5.4 ลงไป 2% เปรียบเทียบกับชุดควบคุม.....63

4.6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ NP3.8.....65

4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ NP5.4.....65

4.8 แหนมปลา รหัส 010 คือแหนมปลาที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP3.8.....69

4.9 แหนมปลา รหัส 020 คือแหนมปลาที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP5.4.....69

4.10 แหนมปลา รหัส 030 คือแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ.....69

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไทยมีมากมายหลายชนิด ซึ่งล้วนอาศัยการหมักที่เป็นไปตามธรรมชาติโดยอาศัยเชื้อที่ติดมากับวัตถุดิบที่ใช้ แต่ต้องควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสม อาหารหมักเหล่านี้ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ส้มฟัก ปลาร้า ข้าวหมาก ผักผลไม้ดอง เป็นต้น ซึ่งการหมักดองส่วนใหญ่เกิดจากจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก จัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตในอาหารให้เป็นกรดแลคติก อาหารจึงมีรสเปรี้ยวและมีค่า pH ลดลง จึงมีผลช่วยในการถนอมอาหาร

จากคุณสมบัติต่าง ๆ ของสารที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น ล้วนมีบทบาทต่อการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้ สารเหล่านี้ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซีทิล คาร์บอนไดออกไซด์ แบคเทอริโอซิน และสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ยังไม่ระบุว่าเป็นสารประเภทใด (unidentified antagonistic substance) เป็นต้น โดยสารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับการศึกษาวิจัยมากที่สุด คือ แบคเทอริโอซิน เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ซึ่งมนุษย์บริโภคมาเป็นเวลานานแล้ว ดังนั้นผู้บริโภคส่วนใหญ่จึงยอมรับว่าแบคทีเรียแลคติก ที่แยกได้จากอาหารหมักเป็น food-grade organism ที่ปลอดภัย (general recognized as safe, GRAS) สามารถใช้เติมในอาหารได้ โดยอาจจะเติมในรูปของสารบริสุทธิ์ หรือในรูปแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ (Rodriguez *et al.*, 2002)

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก ส่วนใหญ่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับแบคทีเรียแลคติกชนิดที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้น มีรายงานว่าแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก บางชนิดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ทำให้มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียแลคติก ที่ผลิตแบคเทอริโอซินได้จากผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง เพื่อหาแนวทางในการนำมาใช้เป็น natural food preservative (Adams and Nicolaides, 1997) จึงมีการริเริ่มใช้ประโยชน์จากสารเหล่านี้เพื่อประโยชน์ในด้านการถนอมอาหารในอุตสาหกรรมการหมักต่าง ๆ แทนการใช้สารเคมีกันเสียในอาหาร เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก ไนเตรท และไนไตรท์ เป็นต้น ซึ่งถ้ามีการสะสมอยู่ในร่างกายของผู้บริโภคเป็นเวลานานจะทำให้เกิดอันตรายได้ นอกจากอาหารจะปลอดภัยแล้วแบคทีเรียแลคติกที่ยังมีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เหลืออยู่ในอาหารช่วยทำให้เกิดความสมดุลของลำไส้ และมีผลในการป้องกันโรคท้องร่วงจากเชื้อก่อโรคหลายชนิด ซึ่งเรียกแบคทีเรียที่ใช้ประโยชน์ดังกล่าวว่า "โปรไบโอติก" (probiotic)

จากประโยชน์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกดังกล่าว การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นเพื่อทำการคัดเลือกหาแบคทีเรียแลคติกจากแหนมปลา และนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัย และเป็นแนวทางในการผลิตแบคเทอริโอซินสำหรับใช้ในการถนอมอาหารแทนสารเคมีซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการทดลอง

1. เพื่อศึกษาสมบัติทางเคมีบางประการ และปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลา
2. คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ และศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่มีต่อเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ
3. ทดสอบยืนยันว่าสารยับยั้งที่ผลิตได้เป็นแบคเทอริโอซิน โดยศึกษาการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน การทนความร้อนของแบคเทอริโอซิน และศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารเหลว
4. จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุด
5. ทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส เพื่อดูการยอมรับแหนมปลาที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินได้ เปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ

1.3 ขอบเขตของการทดลอง

1. ใช้ตัวอย่างแหนมปลาพร้อมบริโภคจากแหล่งผลิตต่าง ๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง มาศึกษาสมบัติทางเคมีของแหนมปลา คือ ค่า pH ปริมาณกรดแลคติก ความชื้น ค่า a_w และศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลา ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 100 ไอโซเลท
2. คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยวิธี direct colony spot method และศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่มีต่อเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ โดยวิธี spot-on-lawn
3. การทดสอบคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้นเบื้องต้น โดยศึกษาคุณสมบัติการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน การทนความร้อนของแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที และที่ 121 ^{o}C เป็นเวลา 15 นาที และศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดที่ได้ผลการดีที่สุด ในอาหารเหลว TSB+0.6% Yeast Extract หรือ MRS broth
4. วินิจฉัยสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุด ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ในเชิงพาณิชย์ ไม่อนุญาตให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ทดสอบทางด้านประสาทสัมผัส เพื่อดูการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลา โดยใช้วิธีทดสอบฮีโดนิก แบบ 9 จุด (9 points hedonic scale)

1.4 ผลที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างแหนมปลา ที่สร้างแบคเทอริโอซินมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค และแบคทีเรียแลคติกบางชนิดที่มีผลเสียต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น สี กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัส

สามารถนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ ไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการควบคุมคุณภาพการผลิตแหนมปลา ให้มีคุณภาพของผลิตภัณฑ์สม่ำเสมอและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 อาหารหมักดอง

การหมักดองเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทำให้สามารถยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้เป็นเวลานานขึ้น เพื่อเก็บไว้บริโภคนอกฤดูกาล ดังนั้นจึงสามารถจัดได้ว่า การหมักดองเป็นกรรมวิธีการหนึ่งในการถนอมอาหารและแปรรูปอาหารได้เช่นเดียวกัน อาหารหมักเหล่านี้ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ส้มฟัก ปลาร้า ข้าวหมาก ผัก และผลไม้ดอง เป็นต้น (พัศมัย, 2543)

2.1.1 อาหารหมักดองของแต่ละภาค

อาหารหมักดอง เป็นที่นิยมของคนทุกภาคของประเทศไทย และหาบริโภคได้ง่าย อาหารหมักดองที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละภาคพอแยกได้ดัง ตารางที่ 2.1

ตารางที่ 2.1 ชนิดของอาหารหมักดองในแต่ละภาค

ภาค	ชนิดของอาหารหมักดอง
เหนือ	แหนม ปลาร้า ปลาส้ม ปลาเจ่า กระเทียมดอง ขนมจีน ใบเมี่ยง ถั่วเน่า ลูกท้อดอง
ใต้	หมูอวน หอยดอง กุ้งจ่อม กุ้งส้ม น้ำบูดู น้ำเคย น้ำปลา ปลาหมัก ปลาแป้งแดง ไตปลา ขนมจีน กึงฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ตั้งฉ่าย เกี้ยมฉ่าย ลูกเนียงดอง สะตอดอง ลูกเหรียงดอง
ตะวันออก	หอยดอง กุ้งดอง น้ำปลา กะปิ ปลาเจ่า ปลาส้ม ขนมจีน กึงฉ่าย เกี้ยมฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย
ตะวันออกเฉียงเหนือ	กุ้งจ่อม ปลาจ่อม ปลาส้ม ปลาร้า แหนมหมู แหนมเนื้อ ไส้กรอกเปรี้ยว เค็มบักนัท ขนมจีน ผักเสี้ยนดอง กุ้ยฉ่ายดอง ต้นหอมดอง
กลาง	กุ้งจ่อม กุ้งส้ม กุ้งเจ่า ปลาเจ่า ปลาจ่อม ปลาส้ม ส้มฟัก หอยดอง น้ำปลา ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว ขนมจีน กึงฉ่าย เกี้ยมฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ผักหนามดอง ถั่วงอกดอง มะเขือดอง

ที่มา : พัศมัย (2543)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.2 แหนมปลา

แหนมปลา หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำปลาสด มาขอดเกล็ด แยกก้าง แล่เอาเฉพาะเนื้อ อาจแช่น้ำซาวข้าว แล้วนำมาสับหรือบดให้ละเอียด เติมเกลือ ข้าวเจ้าสุกหรือข้าวเหนียวนึ่งกระเทียม ผสมให้เข้ากัน อาจเติมพริกสด ห่อเป็นมัด หรือบรรจุในภาชนะบรรจุที่เหมาะสม หมักจนมีรสเปรี้ยว(ภาพที่ 2.1) (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, มผช.๔๗๑/๒๕๔๗)

(www.nectec.or.th/course ware/siamculture/otop_tis/tcps471_47.pdf)

ภาพที่ 2.1 รูปตัวอย่างผลิตภัณฑ์แหนมปลา

2.1.3 เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร

อาหารหมักพื้นเมืองที่เป็นผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ได้แก่ แหนม กะปิ ปลาร้า ปลาจ่อม ส้มฟัก บูดู เป็นต้น (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2536)

ยีสต์ต่อกรัม	น้อยกว่า 1×10^4
ราต่อกรัม	น้อยกว่า 500
MPN *E. coli*	น้อยกว่า 10
Staph. aureus ต่อกรัม	น้อยกว่า 100
C. perfringens ต่อ 0.01 กรัม	ไม่พบ
Salmonella sp. ต่อ 25 กรัม	ไม่พบ
พยาธิ	ไม่พบ

2.2 แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียแลคติกจัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae มีลักษณะเป็นท่อนยาว ท่อนสั้นหรือกลม ติดสีย้อมแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophillic) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (strictly

anaerobe) เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน (Frazier and Westhoff, 1988)

แบคทีเรียแลคติก (LAB) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ตามธรรมชาติทั่วไป เช่น เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ ผัก ผลไม้ นมและผลิตภัณฑ์ ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร รวมถึงสิ่งขับถ่ายของมนุษย์และสัตว์ (Stiles and Holzapfel, 1997) โดยแบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร รวมถึงสุขภาพของมนุษย์และสัตว์หลายประการ เช่น ความสามารถในการย่อยสลายน้ำตาลแลคโตส การสร้างเอนโซม์ย่อยโปรตีน ช่วยปรับปรุงคุณภาพด้านโภชนาการของอาหาร กระตุ้นกระบวนการสร้างวิตามิน ป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องทางเดินปัสสาวะ ลดระดับคลอเลสเตอรอลในกระแสเลือด ลดความเป็นพิษจากสารก่อมะเร็ง กระตุ้นภูมิคุ้มกันให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเนื้องอก นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการหมักชนิดต่าง ๆ คือเป็นแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค และไม่สร้างสารพิษ มีคุณสมบัติที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย และสามารถทนต่อสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดี จึงไม่ต้องการกระบวนการผลิตที่ซับซ้อน มีการเจริญที่รวดเร็วจึงใช้ระยะเวลาในกระบวนการผลิตสั้น เป็นแบคทีเรียที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมาเป็นเวลานาน จึงมีขั้นตอนและวิธีการสำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อในการผลิต และสามารถใช้เป็นสารตั้งต้นในการผลิตที่มีราคาถูก (De Vuyst and Vandamme, 1994)

แต่เดิมจัดกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกไว้เพียง 4 สกุล ได้แก่ *Pediococcus, Leuconostoc, Streptococcus* และ *Lactobacillus* (Frazier and Westhoff, 1988) แต่ในปัจจุบันเมื่อใช้ความรู้ทางด้านชีวโมเลกุล (molecular biology) ได้จัดแบคทีเรียแลคติกออกเป็นสกุลต่างๆ เพิ่มขึ้น ได้แก่ *Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oneococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissella* (Axelsson, 2004)

2.3 การหมักของแบคทีเรียแลคติก

การหมัก หมายถึง กระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารประกอบอินทรีย์ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน โดยอาศัยกิจกรรมของเอนไซม์ หรือตัวเร่งทางชีวเคมี ซึ่งผลิตมาจากจุลินทรีย์ชนิดที่จำเพาะ สำหรับความหมายของคำว่า อาหารหมัก (fermented foods) หมายถึงกลุ่มอาหารที่พิเศษกลุ่มหนึ่ง ซึ่งส่วนประกอบของอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมันถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในสภาพที่ดีเหมาะสมต่อผู้บริโภค โดยอาศัยกระบวนการหมัก แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ คือ สภาพธรรมชาติของอาหาร ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สำหรับอาหารหมักจำเป็นอย่างยิ่งที่เราจะต้องควบคุมชนิดของจุลินทรีย์ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการ

เจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นไปตามต้องการ (วราวุฒิ, 2538) แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สามารถนำไปใช้ ในกระบวนการหมักจะถูกใช้โดยแบคทีเรียแลคติกประเภท heterofermentative lactobacillus เช่น *Lactobacillus brevis* และประเภท homofermentative lactobacillus เช่น *Lactobacillus plantarum* และ ประเภท homofermentative cocci เช่น *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus acidilactici* จุลินทรีย์ ดังกล่าวข้างต้น สามารถใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตในการผลิตกรด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก และมีผลทางอ้อมต่อกลิ่น รสชาติ และลักษณะเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์ โดยผลิตภัณฑ์สุดท้ายจะมีปริมาณกรดแลคติกทั้งหมดเป็น 0.5 – 1.0% (คิดเทียบกับกรดแลคติก) และมีค่า pH เท่ากับ 4.45 – 4.55

การทำงานของแบคทีเรียแลคติกจะก่อให้เกิดกรดอย่างช้า ๆ ปฏิกิริยาการหมักเริ่มตั้งแต่การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติก จนทำให้ความเป็นค่า pH ของอาหารลดลง สามารถแบ่งแบคทีเรียแลคติกตามลักษณะการหมักออกเป็น 2 ประเภท คือ homofermentation และ heterofermentation

2.3.1 กลไกการหมักของแบคทีเรียแลคติก

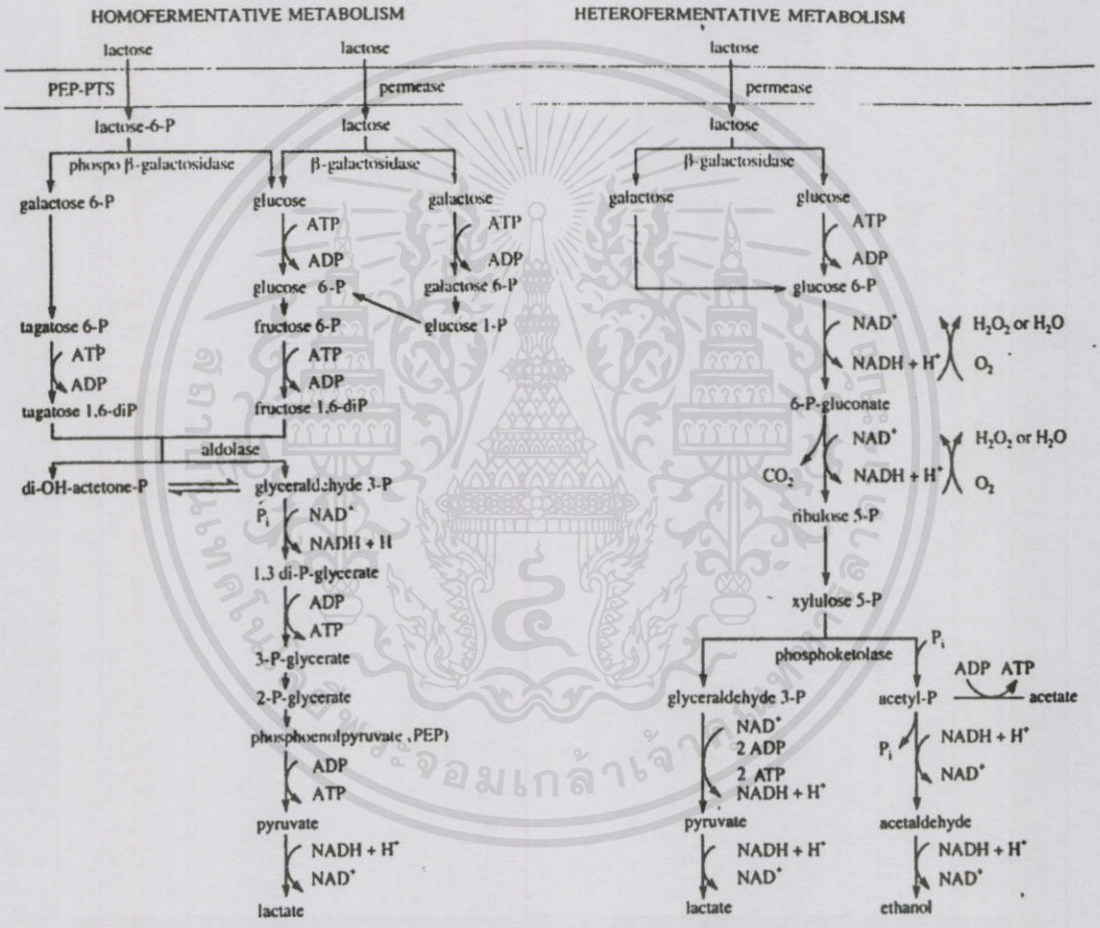
แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นท่อนสั้นหรือยาวไม่สร้างสปอร์ รูปร่างกลมแบบเดี่ยวหรือเกาะกันเป็นคู่ อาจเรียงต่อกันเป็นสาย ในบางกรณีอาจมีเซลล์เกาะติดกัน 4 เซลล์ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติก มีรูปร่างกลมหรือมีรูปร่างท่อนขนาดสั้น ดังนั้นการจำแนกชนิดจึงทำได้ค่อนข้างยาก และรูปร่างของเซลล์ยังเปลี่ยนไปตามสภาวะแวดล้อม เช่นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ไม่สามารถสังเคราะห์ฮีม ไม่มีเอนไซม์ catalase ต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโต เช่น วิตามินบี และกรดอะมิโน ต้องการอาหารที่มีแป้งชนิดที่ใช้ในการหมักได้ มีโคโลนีขนาดเล็ก มีความสามารถในการทนกรดได้ดี ชอบอาศัยในแหล่งที่มีสารอาหารที่ใช้ในการหมักเช่น พืช สัตว์ นมและผลิตภัณฑ์ และสิ่งปฏิกูล เป็นต้น โดยที่แบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 2.2)ได้แก่

ก. Homofermentative lactic acid bacteria

คือแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติก 85 – 95% ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย ขั้นตอนการสร้างกรดแลคติกเริ่มจากน้ำตาลแลคโตส จะผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติกโดยอาศัยเอนไซม์ที่มีอยู่ในบริเวณเยื่อหุ้มไซโตพลาสซึม ที่เรียกว่า Phosphenol –Piruvate – Dependent Phosphotransferase System (PEP-PTS) ทำให้ น้ำตาลแลคโตสเกิดปฏิกิริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) อยู่ในรูปของ lactose-6-phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ phospho-β-galactosidase ไฮโดรไลซ์เป็น galactose-6-phosphate กับ glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของผลงานทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กระบวนการต่าง ๆ ของ Embden-Meyerhof-Parnas pathway (EMP pathway) จนได้เป็น lactate ในขั้นตอนสุดท้าย ซึ่งจะเปลี่ยนมาจากไพรูเวต โดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ส่วน galactose-6- phosphate จะเข้าสู่กระบวนการต่างๆใน D-tagatose-6-phosphate pathway ได้เป็น tagatose-1,6-diphosphate และเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone phosphate ท้ายสุดเอนไซม์ tagatose-1,6-aldolase จะเปลี่ยนเป็น glyceraldehydes-3-phosphate โดยเอนไซม์ triosephosphate isomerase โดยที่ glyceraldehydes-3-phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway และเปลี่ยนไปเป็น lactate ในที่สุด



ภาพที่ 2.2 แสดงกลไกการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยแบคทีเรียแลคติก แบบ Homofermentative และ แบบ Heterofermentative

ที่มา : De Vuyst and Vandamme (1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียแลคติก โดยเอนไซม์ PEP-PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป glucose-6-phosphate จะเข้าสู่ EMP pathway ได้เป็น lactate ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลล์เมมเบรนได้เลย หลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดยเอนไซม์ galactokinase ได้เป็น galactose-1-phosphate จากนั้นเข้าสู่ Leloir pathway จนได้เป็น glucose-1-phosphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ hexokinase phosphoglucomutase เปลี่ยนเป็น glucose-6-phosphate ซึ่งเป็นตัวกลางใน EMP pathway เปลี่ยนเป็น lactate ในที่สุด เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีกระบวนการหมักแบบนี้ได้แก่ *Lb. bulgaricus*, *Lb. casei*, *Lb. plantarum* และ *Lb. acidophilus* เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme, 1994)

ข. Heterofermentative lactic acid bacteria

หมายถึงแบคทีเรียแลคติก ที่สามารถหมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกได้ในปริมาณต่ำ และได้สารประกอบอื่นๆ เช่น เอทธิลแอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ และกรดอะซิติก เช่นแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus vaccinosterus*, *Lb. blevis* และ *Leuconostoc* sp. เป็นต้น

แบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติกประมาณ 50% ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและเอทธิลแอลกอฮอล์20–25% และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20 – 25% ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc mesenteroides* (Tamine, 1981) แบคทีเรียแลคติกกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซิส จึงทำให้ไม่สามารถย่อย fructose-6-phosphate ได้เป็น triose-phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกิริยา decarboxylate ได้เป็น pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เปลี่ยนเป็น pentose-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase ไปเป็น triose-phosphate และ acetyl-phosphate โดย triose-phosphate จะเปลี่ยนเป็น lactate ได้ ส่วน acetyl-phosphate จะเปลี่ยนเป็น acetyldehyde และ ethanol นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกอาจจะใช้กระบวนการอื่น ๆ ในการผลิตสารต่างๆเช่น กรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และ กลีเซอรอล เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme, 1994)

เนื่องจากแบคทีเรียแลคติก พวกนี้จะขาด aldolase จึงต้องเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคส ไปเป็น ribose แล้วต่อไปเป็น xylulose – 5P และ CO_2 โดยวิถี 6P – Gluconate pathway (หรือ Phosphoketolase pathway) แบ่งเป็น 2 พวก คือ

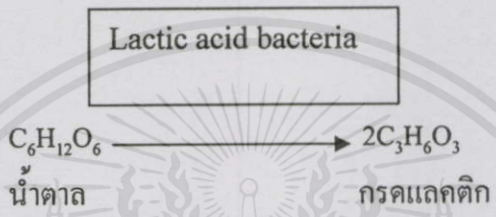
พวก Facultative heterofermenter เป็นพวกที่สามารถหมักน้ำตาล hexose ผ่านวิถี EMP ไปเป็นกรดแลคติกได้ แต่พวกนี้มี inducible phosphoketolase ซึ่งสามารถหมักน้ำตาล pentose ไปเป็นกรดแลคติก และกรดอะซิติก ได้แก่ *Lb. plantarum, Lb. casei, Lb. sakei*

พวก Obligate heterofermenter เป็นพวกที่ใช้วิถี phosphoketolase pathway เพียงอย่างเดียวในการหมักน้ำตาล hexose ได้แก่ *Lb. brevis, Lb. fermentum, Lb. kefir*

พวก heterofermentative lactic acid bacteria เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสจะสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสแล้วเกิดเป็นก๊าซ CO_2 ในหลอดดักก๊าซ ในขณะที่พวก homofermentative lactic acid bacteria ไม่เกิดก๊าซ

2.3.2 หลักการผลิตกรดแลคติกจากแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติก ในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังแสดงในปฏิกิริยาต่อไปนี้



ในขณะที่แบคทีเรียแลคติกเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้ pH ของอาหารหมักดองลดลงพร้อมกับความเป็นกรดจะสูงขึ้น ในสภาพเช่นนี้จะมีผลช่วยยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและก่อโรคได้ (Doyle *et al.*, 1997)

คุณสมบัติของกรดแลคติก

1. เป็นสารที่ได้จากธรรมชาติและมีอยู่ทั่วไปในเนื้อสัตว์ มีการผลิตกรดแลคติกโดยการเปลี่ยนแปลงไกลโคเจนให้เป็นกรดแลคติก

2. เป็นสารที่ไม่เป็นพิษและรับรองความปลอดภัย ในฐานะที่ใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารในประเทศสหรัฐอเมริกา

3. มีความเป็นกรดอ่อนๆ ต่างจากกรดชนิดอื่นๆ ทำให้ทำปฏิกิริยากับเนื้อสัตว์แล้วไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและทางเคมีของเนื้อสัตว์มากนัก เช่น สี กลิ่น เป็นต้น

4. ไม่กลบหรือลบกลิ่นรสของสารให้กลิ่นอื่น ๆ เมื่อใส่ลงในอาหาร

5. มีบทบาทเด่นชัดในการถนอมอาหาร และควบคุมปริมาณจุลินทรีย์

6. กรดแลคติกละลายน้ำได้ดี ทำให้ซึมเข้าไปในเนื้อสัตว์ได้อย่างรวดเร็ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4 กล้าเชื้อจุลินทรีย์

การใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์เพื่อแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้น เริ่มภายหลังจากได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีเพื่อใช้กับผลิตภัณฑ์นมหมักอย่างได้ผลดีแล้ว โดยเริ่มใช้กล้าเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* หมักไส้กรอกเป็นครั้งแรกในประเทศสหรัฐอเมริกาในปี 1955 กล้าเชื้อใช้เป็นไลโอฟิลไลส์มีชื่อทางการค้าว่า ACCEL และในปี 1958 American Meat Institute Foundation ของสหรัฐอเมริกา ได้ยอมรับการใช้กล้าเชื้อดังกล่าว จึงมีการใช้กล้าเชื้อชนิดนี้ในโรงงานแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์กันอย่างแพร่หลายในประเทศยุโรป และอเมริกา (Bacus and Brown, 1981) เนื่องจากสารไนเตรทเป็นองค์ประกอบอย่างหนึ่งในการแปรรูปเนื้อสัตว์ ซึ่งถูกรีดิวส์ไปเป็นไนไตรท์ และไนตรัสออกไซด์ตามลำดับแล้ว ไนตรัสออกไซด์จะมีผลในการตรึงสีเนื้อสัตว์ คือเปลี่ยนจากไมโอโกลบินซึ่งมีสีแดงอมม่วง ไปเป็นไนตริกออกไซด์ไมโอโกลบินซึ่งมีสีแดง และเมื่อถูกความร้อนจะเปลี่ยนไปเป็นไนโตรซิลฮีโมโครม ซึ่งมีสีชมพูของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่นสีของไส้กรอกและแฮม เป็นต้น การรีดิวส์ไนเตรทเป็นไนไตรท์นั้นเกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ ซึ่ง *P. cerevisiae* ไม่สามารถทำกิจกรรมนี้ได้ ดังนั้นจึงมักใช้กล้าเชื้อ *Micrococcus* spp. เช่น *Micrococcus varians* ซึ่งสามารถรีดิวส์ไนเตรทได้ควบคู่กันไป (Niinivaara *et al.*, 1964)

มีการเลือกใช้ *Pediococcus cerevisiae* ในระยะเริ่มแรกแทนที่จะใช้ *Lactobacillus* spp. เนื่องจากเมื่อผลิตเป็นกล้าเชื้อไลโอฟิลไลส์ *Pediococcus* spp. มีชีวิตอยู่รอดได้นานกว่า ต่อมามีการค้นพบวิธีการเติมสารต่างๆ เพื่อป้องกันการตายและการบาดเจ็บของจุลินทรีย์ในขณะผลิตเป็นกล้าเชื้อ จึงได้มีการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ รวมทั้ง *Lactobacillus* spp. ส่วนใหญ่จะใช้เฉพาะกลุ่มที่เป็น Homofermentative เช่น *Lb. plantarum* สำหรับกลุ่ม Heterofermentative เช่น *Lb. brevis* นั้นเนื่องจากขณะหมัก ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เชื้อผลิตขึ้นจะทำให้ผลิตภัณฑ์ไส้กรอกแตกได้

จากการทบทวนการจำแนกชนิดของแบคทีเรียสกุล *Pediococcus* spp. ในปี 1976 ได้ยกเลิกชื่อ *Pediococcus cerevisiae* และแบ่งชื่อที่อยู่ในสปีชีส์นี้ออกเป็น 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus acidilactici* (Schleifer, 1986)

2.4.1 คุณสมบัติของกล้าเชื้อ (นภา, 2535)

1. สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในวัตถุดิบ และผลิตกรดได้ในระยะเวลาและปริมาณที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ชนิดนั้น ๆ

2. ผลิตสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของอาหารหมักชนิดนั้น ๆ

3. อยู่ในสภาพที่เมื่อนำไปเป็นกล้าเชื้อ จะสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดี

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]ใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. คุณสมบัติที่สำคัญมากที่สุดคือ การปลอดจาก phage ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงปัญหานี้ได้หลายวิธี ได้แก่

- เตรียมกล้าในรูปเชื้อผสมโดยมีเหตุผลในการนำไปใช้ หากเชื้อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งถูกทำลาย จะยังคงเหลือสายพันธุ์อื่น ๆ ที่ไม่มีความเฉพาะกับ phage ชนิดนั้นพอที่จะดำเนินกิจกรรมการหมักต่อไปได้
- ใช้เชื้อแต่ละสายพันธุ์สลับหมุนเวียนกันไป
- คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่ต้านทานต่อ phage เช่นการใช้สายพันธุ์ผ่าเหล่า (phage resistant mutant)
- เตรียมกล้าเชื้อโดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่ยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของ phage
- ถ้ามีการเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อก่อนใช้งาน (bulk starter) ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของ phage

2.4.2 ประโยชน์ของการใช้กล้าเชื้อ (นภา, 2535)

การใช้กล้าเชื้อในการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร มีผลดีหลายประการด้วยกัน ได้แก่

1. ลดระยะเวลาในการหมัก เช่นการใช้กล้าเชื้อ ACCEL หมักไส้กรอกหลายชนิดจะลดระยะเวลาการหมักจากที่ใช้อยู่เดิมประมาณ 150 ชั่วโมง ให้เหลือเพียง 32 – 48 ชั่วโมง
2. สามารถควบคุมกระบวนการหมัก และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น
3. ลดการสะสมไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง เพราะการเติมกล้าเชื้อทำให้มีการผลิตกรดเป็นไปอย่างรวดเร็ว มีผลให้ไนไตรท์ที่เกิดจากการรีดิวส์ไนเตรทสลายตัวไปเป็นไนตรัส-ออกไซด์ จึงทำให้ปริมาณสะสมของไนไตรท์ลดลง การเกิดไนโตรซามีนจึงลดลงด้วย
4. กล้าเชื้อ *Pediococcus* spp. และ *Micrococcus* spp. ผลิตเอนไซม์ pseudocatalase สามารถเกิดปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจน เป็นการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้หมดไป ซึ่งสารนี้มีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์ซีด ไม่น่ารับประทาน
5. ลดระดับสารฮีสตามีนในอาหารหมัก การหมักโดยใช้เชื้อจากธรรมชาติ ซึ่งมีจุลินทรีย์ปนกันอยู่หลายชนิด จุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ฮีสทิดีนคาร์บอกซิเลส จะเปลี่ยนฮีสทิดีนเป็นฮีสตามีน การเติมกล้าเชื้อลงไปทำให้การหมักเกิดเร็วขึ้น จึงเป็นการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์เหล่านี้
6. ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ซึ่งปัจจุบันเป็นวัตถุประสงค์หลักของการใช้กล้าเชื้อ ในการแปรรูปผลิตภัณฑ์อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ผลิตภัณฑ์เนื้อสดและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการผลิต

ผลิตภัณฑ์	แบคทีเรียแลคติก
Semi-dry fermented sausages	
Lebanon bologna	mixture of *Pediococcus cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum*
Summer sausage	*P. cerevisiae* ; mixture of *P. cerevisiae* and *Lb. plantarum*
Cervelat	*P. cerevisiae* ; mixture of *P. cerevisiae* and *Lb. plantarum*
Thuringer	*P. cerevisiae*
Teewurst	*Lactobacillus* sp.
Pork roll	*P. cerevisiae*
Dry fermented sausages	
Pepperoni	mixture of *P. cerevisiae* and *Lb. plantarum*
Dry sausage	*P. cerevisiae*
European dry sausage	*Micrococcus* sp. ; mixture of *Micrococcus* sp. and *Lactobacillus* sp.
Salami	*Lb. plantarum* ; mixture of *Micrococcus* sp. and *Lactobacillus* sp.
Hard salami ; genoa	*Micrococcus* sp. ; mixture of *Micrococcus* sp. and *P. cerevisiae* ; mixture of *Micrococcus* sp. and *Lb. plantarum*
Fermented snack sausage	
Hot bar sausage	*P. cerevisiae*
Processed meat products	
Bacon	lactic acid bacteria, *Lb. plantarum*
Canned ham	radiation-killed *P. cerevisiae*
Country style ham	*P. cerevisiae*
Frankfurters	*Micrococcus* sp.

ที่มา : Smith and Palumbo (1981)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2(ต่อ)

ผลิตภัณฑ์	แบคทีเรียแลคติก
Fresh meat	
Ground beef	mixture of *Streptococcus lactis* and *Leuconostoc citrovorum*; *S. diacetilactis* ; *Lb. bulgaricus* ; *Lc. lactis* ; *Lb. brevis* ; *P. cerevisiae*
Beef longissimus dorsi steak	mixture of *Streptococcus lactis* and *Leuconostoc citrovorum*
Fermented poultry sausages	
Semi-dry turkey sausage	*P. cerevisiae*
Dry turkey sausage	*P. cerevisiae* ; mixture of *P. cerevisiae* and *Lb. plantarum*

ที่มา : Smith and Palumbo (1981)

2.4.3 การศึกษาการใช้กล้าเชื้อในประเทศไทย

ในประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์เนื้อหมักหลายชนิดด้วยกัน ซึ่งการผลิตในเชิงการค้านั้นยังคงใช้เชื้อจากธรรมชาติ แต่ได้มีการศึกษาทดลองหมักผลิตภัณฑ์หลายชนิดด้วยเชื้อบริสุทธิ์เช่น การเติมเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* จะทำให้ปลาเจ่าที่หมักเป็นเวลา 5 วัน มี pH และ ปริมาณกรดใกล้เคียงกับปลาเจ่าที่หมักโดยวิธีธรรมชาติเป็นระยะเวลา 10 วัน การเติม *P. cerevisiae* หรือ *Lb. brevis* ทำให้การหมักปลาส้มได้เร็วขึ้น สำหรับไตปลา กุ้งจ่อมและหอยแมลงภู่ดองนั้น พบว่าการหมักโดยใส่เชื้อ *P. halophilus* สามารถลดระยะเวลาการหมักและได้ผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรสไม่ต่างจากการหมักด้วยเชื้อจากธรรมชาติ (จินดารัตน์, 2522 ; นาถสุดา, 2522)

จากการศึกษาการปรับปรุงคุณภาพ และกรรมวิธีการหมักแหนม โดยเติมกล้าเชื้อผง *Lactobacillus* spp. และ *Pediococcus* spp. โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างการใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus* sp. L1 และ *Pediococcus* sp. P55 เชื้อใดเชื้อหนึ่ง กับกล้าเชื้อผสมของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด โดยทดสอบการยอมรับของผู้นิยมบริโภคแหนม 10 ท่าน พบว่าผู้ทดสอบให้การยอมรับแหนมที่หมักโดยเติมกล้าเชื้อผสม มากกว่าแหนมที่หมักโดยไม่เติมเชื้อผง และมีความชอบด้านเนื้อสัมผัสและความเปรี้ยวของแหนมที่เติมกล้าเชื้อผสม มากกว่าแหนมที่ไม่เติมเชื้อผง โดยมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ แต่ความชอบทางด้านสีและกลิ่นนั้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ส่วนแหนมที่เติมเชื้อผง L1 หรือ P55 เพียงชนิดเดียวไม่มีผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากแหนมที่ไม่เติมเชื้อผงเลยไม่ว่าด้านใดๆ จึงสรุปได้ว่าผู้บริโภคยอมรับแหนมที่หมักโดยใช้เชื้อผงผสมมาก

ที่สุด เมื่อนำกล้าเชื้อผสมไปให้ผู้ผลิตแหนมทดลองใช้ พบว่าผู้ผลิตยอมรับว่าแหนมที่เติมกล้ามีรสเปรี้ยว มีเนื้อสัมผัสและสีดีกว่าแหนมที่หมักโดยไม่ได้เติมกล้าเชื้อ การศึกษาเหล่านี้จึงเป็นแนวทางที่จะได้มีการส่งเสริมให้มีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการผลิตแหนมต่อไป (Lotong and Swetwiwathana, 1990)

2.5 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมการหมัก และทำให้เกิดกลิ่นรสเฉพาะตัวในอาหารหมักดองแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย และจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปะปนมากับอาหาร เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Clostridium perfringens, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenese* รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (O' Sullivan *et al*., 2002)

ตารางที่ 2.3 ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินกับสารปฏิชีวนะ

ลักษณะและคุณสมบัติ	แบคเทอริโอซิน	สารปฏิชีวนะ
1. การนำไปใช้งาน	ทางอาหาร	ทางการแพทย์
2. กระบวนการสังเคราะห์	ผลิตจากไรโบโซม	ผลิตผ่าน secondary metabolite
3. ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่หลากหลาย	น้อย	มาก
4. การสร้างระบบภูมิคุ้มกันตนเองของเซลล์ผู้ผลิต	มี	ไม่มี
5.การต่อต้านของเซลล์เป้าหมาย	ปรับสภาพองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์	การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม
6. ปฏิกิริยาต่อเซลล์เป้าหมาย	ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์	ทำลายเยื่อหุ้มเซลล์หรือโครงสร้างภายในเซลล์
7. ความเป็นพิษหรือผลข้างเคียง	ยังไม่มีรายงาน	มี

ที่มา : Cleveland *et al*.(2001)

ซึ่งสารที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นมา เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวส่วนใหญ่ เป็นกรดแลคติกและกรดอะซีติก รวมทั้งยังมีสารชนิดอื่นๆที่เกิดขึ้นในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติกและกรดอะซีติก แต่มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เช่นกัน ได้แก่ formic acid, free fatty acid, ammonia, ethanol, hydrogen peroxide, diacetyl, acetoin, acetaldehyde, benzoate,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bacteriolytic enzyme และ bacteriocin รวมถึงสารที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (Abee *et al.*, 1995 ; Adams, 1999) นอกจากนี้การมีแบคทีเรียแลคติกเจริญอยู่ร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ จะเป็นการควบคุมแบคทีเรียเหล่านั้นโดยทางอ้อม คือทำให้เกิดการแข่งขันกันในการใช้สารอาหารและใช้พื้นที่สำหรับการเจริญ โดยแบคเทอริโอซินจัดเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ที่มีความแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งสามารถสรุปความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินกับสารปฏิชีวนะได้ (ตารางที่ 2.3)

แบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้เพิ่มคุณภาพในการเก็บรักษา (keeping quality) และเพิ่มความปลอดภัยของอาหาร (food safety) ซึ่งมีปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้ คือ

2.5.1 Organic acids

สาร organic acids หลายชนิดถูกนำมาใช้เติมลงในอาหาร แต่ไม่ได้มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ทั้งหมด ซึ่งสาร organic acids ส่วนใหญ่ที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้แก่ acetic, lactic, propionic, sorbic และ benzoic acid ส่วน citric, caprylic, fumalic และ organic acids อื่น ๆ มีความสามารถในการยับยั้งในขอบเขตที่จำกัด แต่ถูกนำมาใช้ในแง่ของรสชาติมากกว่า ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ organic acids ขึ้นอยู่กับ pH โดยจะมีความสัมพันธ์กับ pH ซึ่งกรดที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์จะอยู่ในรูป undissociated ดังนั้นการจะเลือกใช้ organic acids ในการถนอมอาหารจะต้องพิจารณาถึงค่า pH และ pKa ของกรดชนิดนั้นๆ ซึ่งโดยปกติ organic acids ที่นำมาใช้ในอาหารจะมีค่า pH ต่ำกว่า 5.5 และมีค่า pKa ส่วนใหญ่อยู่ในช่วง 3.0 – 5.0 สำหรับกลไกการยับยั้งจุลินทรีย์นั้น organic acids ที่อยู่ในรูป undissociated จะสามารถเข้าสู่เซลล์เมมเบรน และ lipid bilayer ได้ง่ายขึ้น โดยปกติสภาพภายในเซลล์ กรดจะอยู่ในรูป associated เนื่องจากภายในเซลล์มีค่า pH สูงกว่าภายนอกเซลล์ แบคทีเรียจึงพยายามรักษาค่า pH ภายในเซลล์ให้มีค่าใกล้เคียงกับความเป็นกลาง เพื่อป้องกันการเปลี่ยนรูปโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และ phospholipids โปรตอนจาก organic acids จะทำให้ความเป็นกรดภายในไซโต-พลาสซึมเพิ่มสูงขึ้น จึงต้องมีการกำจัดกรดที่มากเกินไปออกสู่ภายนอกเซลล์ โปรตอนถูกขับออกภายนอกเซลล์ผ่านทางเซลล์เมมเบรน โดยอาศัยความต่างศักย์ไฟฟ้า เรียกว่า proton motive force (PMF) การขับโปรตอนภายในเซลล์ซึ่งเกิดจาก organic acids ออกสู่ภายนอกเซลล์จำเป็นต้องใช้พลังงานในรูป ATP ดังนั้นการไหลเข้าสู่เซลล์อย่างต่อเนื่องของโปรตอน ทำให้พลังงานภายในเซลล์ถูกนำมาใช้ในการกำจัดโปรตอนจนหมด ขณะเดียวกันก็เกิดการรบกวนการผ่านเข้าออกของสารในเซลล์เมมเบรน ทำให้แบคทีเรียขาดพลังงานและตายในที่สุด (Doyle *et al.*, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

2.5.1.1 Lactic acid

lactic acid มีค่า pKa = 3.79 เป็นผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักอาหาร โดยแบคทีเรียแลคติก ซึ่ง lactic acid สามารถยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างสปอร์ และ *Staphylococcus aureus* ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของกรดแลคติก ขึ้นอยู่กับชนิดของอาหาร และจุลินทรีย์เป้าหมาย มีรายงานเพียงไม่กี่ฉบับที่รายงานเกี่ยวกับกลไกที่จำเพาะของ lactic acid ต่อการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร ซึ่งกลไกหลักเหมือนกับ organic acid ทั่วไปคือ มีผลต่อการขนส่งของโปรตอนผ่าน cytoplasmic membrane (Doyle *et al.*, 1997)

2.5.1.2 Acetic และ Propionic acid

แบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์สามารถผลิต acetic และ propionic acid ได้ในปริมาณน้อย acetic และ propionic acid มีค่า pKa สูงกว่า lactic acid จึงมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีกว่า lactic acid กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของ acetic และ propionic acid จะเหมือนกับ lactic acid คือรบกวนการทำงานของเซลล์เมมเบรน โดยจะไปทำให้ electrochemical potential เป็นกลาง นอกจากนี้ acetic acid ยังเป็นสาเหตุที่ทำให้โปรตีนเสียสภาพ ทำให้ค่า pH ภายในเซลล์ลดลง และยับยั้งการขนส่งกรดอะมิโนได้ด้วย (Doyle *et al.*, 1997)

2.5.2 Hydrogenperoxide (H_2O_2)

Hydrogenperoxide เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึม ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีอากาศโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน ซึ่งอาจเกิดได้หลายทางดังปฏิกิริยา (ภาพที่ 2.3)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้น ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหาร เพราะแบคทีเรียแลคติกไม่มีเอนไซม์คะตาเลสที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ การสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารชนิดอื่นกลายเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น ในน้ำนมดิบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำปฏิกริยากับไทโอไซยาเนต (thiocyanate) โดยมีเอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เป็นตัวเร่งได้ผลิตผลที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาน้ำนมดิบ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

81371

$$NADH + H^+ + O_2 \xrightarrow{NADH:H_2O_2\ oxidase} NAD^+ + H_2O_2$$

$$2NADH + 2H^+ + O_2 \xrightarrow{NADH:H_2O\ oxidase} 2NAD^+ + 2H_2O$$

$$NADH + H^+ + H_2O_2 \xrightarrow{NADH\ peroxidase} NAD^+ + 2H_2O$$

$$2O_2^- + 2H^+ \xrightarrow{superoxide\ dismutase} H_2O_2 + O_2$$

$$2H_2O_2 \xrightarrow{Mn^{2+}\text{-}pseudocatalase} 2H_2O + O_2$$

$$pyruvate + phosphate + O_2 \xrightarrow[TPP,FAD]{pyruvate\ oxidase} acetyl\text{-}phosphate + CO_2 + H_2O_2$$

$$\alpha\text{-}glycerophosphate + O_2 \xrightarrow{\alpha\text{-}glycerophosphate\ oxidase} dihydroxyacetone\text{-}phosphate + H_2O_2$$

$$lactate + O_2 \xrightarrow{L\text{-}lactate\ oxidase} pyruvate + H_2O_2$$

$$lactate + O_2 \xrightarrow[D\ lactate\ dehydrogenase]{NAD\text{-}independent} pyruvate + H_2O_2$$

ภาพที่ 2.3 ปฏิกิริยาการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก

ที่มา :De Vuyst and Vandamme (1994)

2.5.3 Diacetyl

Diacetyl (2,3 – butanedione) เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ pyruvate diacetyl เป็นสารที่ทำให้เนยมีกลิ่นหอม ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียแลคติกเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วยจะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารตัวนี้จะเปลี่ยนต่อไปเป็น diacetyl และ acetoin โดย diacetyl สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ ผลในการยับยั้งของสารในกลุ่มนี้จะมีผลแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจาก diacetyl จะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบ โดยเข้าไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ arginine-binding protein (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.5.4 Acetaldehyde

Acetaldehyde เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารคาร์โบไฮเดรต แบบ heterofermentation ของแบคทีเรียแลคติก ในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ทำให้เกิดการสร้างและสาร acetaldehyde ออกมาภายนอกเซลล์ โดยผลของ acetaldehyde ต่อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ นั้งยังไม่มีการศึกษาวิจัยมากนัก เพียงแต่มีรายงานว่า acetaldehyde ที่มีความเข้มข้นระหว่าง 10 – 100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหารได้ เช่น *E. coli* , *Staph. aureus* และ *Sal. Typhimurium* (De Vuyst and Vandamme, 1994)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปใช้ในรูปแบบอื่นๆ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.5 Bacteriocins

Bacteriocin คือสารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียชนิดหนึ่ง แล้วสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน ทั้งในรูปการยับยั้งการเจริญและการทำลาย ในปัจจุบัน แบคเทอริโอซินกำลังได้รับความสนใจ มีแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ เช่น *Lb. fermentum*, *Lb. acidophilus*, *Lb. plantarum*, *Pediococcus acidilactici* และ *P. pentosaceus* แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดจะมีคุณสมบัติทางเคมีต่างกัน แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด รวมถึงเชื้อก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* ทำให้แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการใช้เป็นสารถนอมอาหารได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

2.6 การจัดแบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นสายเปปไทด์ ของโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารเคมี ในปี ค.ศ. 1993 Klaenhammer ได้แบ่งประเภทของแบคเทอริโอซิน โดยพิจารณาจากโครงสร้างพื้นฐานของโมเลกุล มวลโมเลกุล รวมถึงคุณสมบัติด้านอื่น ๆ ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

2.6.1 กลุ่ม lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่มีลักษณะเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19 – 38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน มีชนิดของกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนทั่วไป เช่น dehydrobutyrine, dehydroalanine มีวงแหวนที่เกิดจากพันธะระหว่างโมเลกุลของสารประกอบซัลเฟอร์ ภายในโมเลกุลที่เรียกว่า lanthionine และ β-methyl lanthionine เป็นแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการทนความร้อน เช่น nisin และ mersacidin

2.6.2 กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็ก โดยมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 15,000 ดาลตัน และทนต่อความร้อนได้ดี โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อย ได้แก่

1. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่สามารถทำลายเชื้อ *Listeria* sp. ได้ดี โดยขั้นแรกจะถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะที่เป็น precursor peptide ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยการตัดบางส่วนของสายเปปไทด์ออก ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกันได้เป็นสายเปปไทด์ที่สมบูรณ์ ตัวอย่างเช่น pediocin PA – 1 และsakacin A

2. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ 2 สาย ที่แตกต่างกัน (two-peptide bacteriocin) โดยในการทำลายเซลล์เป้าหมายอย่างมีประสิทธภาพสูงสุด ต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเปปไทด์ดังกล่าว ตัวอย่างเช่น brococin C, enterocin L50, lactococcins G

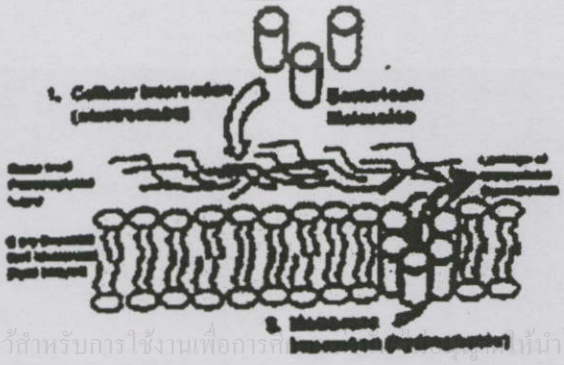
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.3 กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่ โดยมีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 15,000 ดาลตัน และไม่ทนความร้อน ตัวอย่างเช่น helveticins J, acidophilcin A , lactacins A และ lactacins B

2.6.4 กลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารชนิดอื่นๆ เช่น ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต

2.7 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซิน เกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลร่วมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างในบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมาย โดยจะมีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel – stave) รูปแบบดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างไปตามชนิดของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเปปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวก จะเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ออกสู่ภายนอก เช่นกรดอะมิโน สารให้พลังงานและไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ในกรณีที่เป็นสปอร์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็วในระหว่างที่สปอร์เกิดการงอกออกมาและยังพบว่าไนซิน ที่มีความเข้มข้นสูงๆ สามารถยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในผนังเซลล์ของ *Bacillus stearothermophilus* และ *E. coli* ได้ (Davidson and Hoover, 1993 ; Muriana, 1996) ส่วนแบคเทอริโอซินในกลุ่ม non lantibiotic มีขนาดเล็กและทนความร้อน พบว่า ในขั้นตอนแรกปลายด้าน N – terminal ของโมเลกุลแบคเทอริโอซินซึ่งมีประจุบวก จะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งประจุลบโดยแรงทางไฟฟ้าสถิต (electrostatic binding) หลังจากนั้นปลายด้าน C – terminal ในโมเลกุลแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น hydrophobic จะทำปฏิกิริยากับ acyl group ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al.*, 2000) (ภาพที่ 2.4)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 2.4 แสดงแบบจำลองการทำให้เกิดรู ในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซิน

ที่มา: Ennahar *et al.*(2000)

ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์เป้าหมายโดยแบคเทอริโอซิน นอกจากจะมีผลในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายแบบฆ่าทำลาย (bactericidal) แล้วยังอาจมีผลทำให้เกิดการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) ได้ด้วย เช่น ที่พบใน leuconocin S แบคเทอริโอซินจะมีผลต่อเซลล์ในลักษณะใดนั้น มักจะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของแบคเทอริโอซิน สภาพแวดล้อม รวมถึงชนิดและปริมาณของเซลล์เป้าหมาย

2.8 ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของแบคเทอริโอซิน

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำงาน ของแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่ มีการศึกษากันมากในไนซิน ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินทางการค้า นิยมใช้กันอย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร (Daeschel, 1993) โดยมีปัจจัยดังนี้

2.8.1 ชนิดของแบคทีเรียเป้าหมาย โดยแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกันไป เช่น ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด enterocin 1146 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sakei* และ *Listeria* sp. ส่วน piscicocin V1 และ divercin V41 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lis. monocytogenes* , *Lis. innocua* และ *C. tyrobutyricum*

2.8.2 สภาวะที่ก่อให้เกิดการเสียสภาพทางชีวภาพของแบคเทอริโอซิน จะเหมือนกับโปรตีนทั่วไป ได้แก่ อุณหภูมิ เอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจนโลหะหนัก การกวนที่รุนแรงและมากเกินไป การฉีกขาดของแบคเทอริโอซินเนื่องจากการแช่แข็งและการละลาย เช่น ไนซินถูกทำลายด้วยเอนไซม์ α-chymotrypsin และ nisinase ส่วน lactocin B ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K

2.8.3 การรวมตัวกันของแบคเทอริโอซินกับองค์ประกอบของอาหาร หรือส่วนประกอบอื่นๆ ของอาหารที่เติมลงไป พบว่า เกลือไนเตรต กรดอินทรีย์ สารจับโลหะ และสารอิมัลซิไฟเออร์มีส่วนช่วยให้ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้ดียิ่งขึ้น ส่วนไขมัน เนยฟอสฟอลิปิด โปรตีน และสารในกลุ่มฟีนอลจะมีผลในการลดกิจกรรมของไนซิน

2.8.4 ค่า pH ของสารละลายหรือตัวกลาง ซึ่งจะมีผลต่อความสามารถในการละลายและกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซินสามารถละลายและคงตัวได้ดีในสภาพที่เป็นกรด โดยค่า pH เท่ากับ 2.5 และ 5 ไนซินจะสามารถละลายได้ 12 และ 4% ตามลำดับ แต่ไม่สามารถละลายได้ในสภาวะที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง นอกจากนี้ในสภาพที่เป็นกรดไนซินยังสามารถทนต่อความร้อนได้ดี โดยที่ค่า pH เท่ากับ 2.5 ไนซินสามารถทนต่อการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100^{o}C ได้ โดยไม่สูญเสียกิจกรรม และที่อุณหภูมิ 121^{o}C จะมีการสูญเสียกิจกรรมเพียงเล็กน้อย ส่วน lactocin 481 มีกิจกรรมและคงตัวได้ดีที่ค่า pH 4.5 หรือ 7 แต่ไม่คงตัวที่ค่า pH เท่ากับ 2 นอกจากนี้ diplococcin จะมี

กิจกรรมและความคงตัวได้ดีที่ค่า pH เท่ากับ 5 โดยสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100°C ได้นานถึง 1 ชั่วโมง

การผลิตแบคเทอริโอซินโดยกรรมวิธีการหมักนั้นย่อมมีข้อจำกัด ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของปริมาณต่ำที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ความไม่เสถียรทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต และปัญหาของการปรับตัวในกรณีของจุลินทรีย์ดื้อต่อแบคเทอริโอซินซึ่งเกิดขึ้นได้อยู่ตลอดเวลา เพราะฉะนั้นเทคนิคทางพันธุวิศวกรรมจึงถูกนำมาพิจารณาเพื่อแก้ไขปัญหาที่ประสบกันอยู่ ความชาญฉลาดในการเลือกเซลล์เจ้าบ้านเพื่อการโคลนนิ่งที่เป็นแบคทีเรียแลคติกชนิดที่พบได้ในอาหาร ก็ย่อมจะเป็นการประกันได้ถึงความปลอดภัยของการใช้แบคทีเรียพันธุวิศวกรรม ที่สร้างขึ้นมีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินได้หลายชนิดพร้อมๆกัน ซึ่งมีความจำเพาะต่อจุลินทรีย์ปนเปื้อนต่างชนิดและต่างสายพันธุ์ได้ในขณะเดียวกัน และในอาหารได้หลากหลายยิ่งขึ้น นอกจากนี้แล้ววิทยาศาสตร์ขั้นสูงด้านเทคโนโลยีวิศวกรรมโปรตีน ก็เป็นอีกหนทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้เพื่อพัฒนาโครงสร้างของแบคเทอริโอซินได้โดยตรง ให้เป็นไปตามที่มนุษย์ต้องการได้ เช่นการเปลี่ยนหน่วยย่อยกรดอะมิโนไลซีนด้วยโมเลกุลของกลูโคสใน Pediocin PA-1 ก็สามารถทำให้กิจกรรมยับยั้งของแบคเทอริโอซินชนิดนี้เพิ่มขึ้นได้ (สาโรจน์, 2547)

2.9 การใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหาร

ในปัจจุบันการถนอมอาหารด้วยการใช้แบคทีเรียแลคติก จัดเป็นวิธีการที่ปลอดภัย (generally recognized as safe หรือ GRAS) โดยแบคทีเรียแลคติกจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์ โดยการไปแข่งขันในการใช้สารอาหาร รวมทั้งสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดออกมา (Schillinger *et al.*, 1996) ซึ่งในกลุ่มของสารดังกล่าว พบว่าแบคเทอริโอซินโดยเฉพาะไนซิน ได้มีการผลิตขายภายใต้ชื่อการค้าว่า Nisaplin เป็นแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวในปัจจุบัน ที่ได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO เนื่องจากไนซินมีค่า LD_{50} สูงถึง 7 กรัมต่อน้ำหนักร่างกาย 1 กิโลกรัม ซึ่งมีค่าเทียบเท่ากับเกลือที่บริโภคกันในชีวิตประจำวัน และไนซินจะทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์ที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ นอกจากนี้ไนซินก็ไม่สามารถทำลายแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่มีประโยชน์ในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ ปัจจุบันพบว่ามีการใช้ไนซินในอุตสาหกรรมการแปรรูปและการถนอมอาหารชนิดต่างๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก (De Vuyst and Vandamme, 1994) โดยอุตสาหกรรมอาหารที่มีการใช้ไนซินกันมาก ได้แก่

2.9.1 อุตสาหกรรมการผลิตเนย การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 3.75 – 12.50 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างกรดบิวทิวริค เช่น *Clostridium butyricum* และ *C. tyrobutyricum* ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์เนย มีกลิ่น และรสชาติผิดปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสาร[illegible]ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ตารางที่ 2.4 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก ที่แยกได้จากอาหาร

แบคเทอริโอซิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Carnocin LV17	*Carnobacterium piscicola* LV17	เนื้อวัวที่บรรจุในถุงสุญญากาศ
Piscicolin 61	*Carnobacterium piscicola* LV61	เนื้อวัว
Enterocin 226NWC	*Enterococcus faecalis* 226	เนยที่ทำจากหางนมของกระบือ
Enterocin 6E	*Enterococcus faecium* 6E	เนย
Acidocin A	*Lactobacillus acidophilus* TK9201	น้ำนมวัวหมัก
Bavaricin MN	*Lactobacillus bavaricus* MN	เนื้อวัว
Curvaticin FS47	*Lactobacillus curvatus* FS47	เนื้อวัวบด
Plantaricin C19	*Lactobacillus plantarum* C19	แตงกวาดอง
Sakacin	*Lactobacillus sakei* LB 706	เนื้อวัว
Nisin	*Lactobacillus lactis* BB24 & G18	ไส้กรอกหมักแบบแห้ง
Carnocin 44A	*Leuconostoc carnosum* LA44A	ไส้กรอกแบบเวียนนา
Leucocin B-Talla	*Leuconostoc carnosum* Talla	เนื้อวัวแปรรูปที่บรรจุถุงสุญญากาศ
Leucocin A-UAL 187	*Leuconostoc gelidum* UAL 187	เนื้อวัวบรรจุในถุงปรับสภาวะบรรยากาศ
Mesenterocin Y 105	*Leuconostoc mesenteroides* Y 105	น้ำนมแพะ

ที่มา : Muriana (1996)

2.9.2 อุตสาหกรรมการผลิตนมพร้อมดื่ม การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 80 ยูนิต/มล. สามารถลดค่า F_0 สำหรับการฆ่าเชื้อ *Clostridium botulinum* ในผลิตภัณฑ์นมรสช็อคโกแลตจาก 11 นาที ลงมาเหลือ 3 นาที

2.9.3 อุตสาหกรรมเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้นระหว่าง 100 – 500 ยูนิต/กรัมของอาหาร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* , *Staph. aureus* และแบคทีเรียแลคติกบางชนิดที่ปนเปื้อนมากับเนื้อวัวสดได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้ไนซินในการยับยั้งการเจริญของ *Clostridium botulinum* และ *C. sporogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักทดแทนการใช้สารไนเตรต เพื่อป้องกันหรือลดการเกิดสารไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง

2.9.4 อุตสาหกรรมอาหารบรรจุกระป๋อง ในผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำ การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 2.5 ppm ในถั่วบรรจุกระป๋องสามารถลดความร้อนที่ใช้ในการ

ฆ่าเชื้อลงได้ 60% ส่วนในผลิตภัณฑ์อาหารกระป๋องที่เป็นกรด การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 100 – 200 ยูนิต/กรัม สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Clostridium pasteurianum*, *C. butyricum*, *Bacillus thermoacidurans*, *B. coagulans* และ *B. macerans* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของอาหารบรรจุกระป๋องได้

2.9.5 อุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ การใช้ไนซินที่มีความเข้มข้น 100 – 1,000 ยูนิต/ลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc oenos* และ *Pediococcus damnosus* ซึ่งสร้างสารในกลุ่ม malolactic, glycerol, butyleneglycol และ tartaric acid เป็นสาเหตุทำให้ไวน์มีรสชาติทางประสาทสัมผัสเปลี่ยนแปลงไป โดยที่ไนซินไม่มีผลต่อการเจริญของยีสต์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักไวน์

ตารางที่ 2.5 การใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่างๆ

ชนิดของแบคเทอริโอซิน	ลักษณะการประยุกต์ใช้งาน	แบคทีเรียที่ต้องการควบคุม / ผลที่ได้รับ
Enterocin 4	ใช้ *Enterococcus faecalis* INIA 4 ซึ่งผลิต enterocin 4 เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเนย	*Listeria monocytogenes*
Nisin A	ใช้เติมลงไปในกระบวนการผลิตเนย	*Listeria monocytogenes*
Leucocin A	ใช้ *Leuconostoc gelidum* UAL 187 ซึ่งผลิต leucocin A ผสมลงในเนื้อที่เก็บรักษาไว้ในสภาวะสุญญากาศ	ยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sakei* ได้นาน 8 สัปดาห์
Lactocin 705	ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อบด	*Listeria monocytogenes*
Pediocin AcH	ใช้ *Pediococcus acidilactici* ซึ่งผลิต pediocin AcH เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตไส้กรอกไก่แบบเปรี้ยว	*Listeria monocytogenes*
Pediocin	ถ่ายทอดยีนที่ควบคุมการสร้าง pediocin ไปสู่ *Saccharomyces cerevisiae*	ช่วยในการถนอมอาหารอบและไวน์
Enterocin	เติมลงในแฮม เนื้อไก่ เนื้อหมู และไส้กรอก	*Listeria monocytogenes*

ที่มา : Cleveland *et al.* (2001)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ

การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินชนิดต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร สามารถดำเนินการได้ใน 3 ลักษณะ คือ (ตารางที่ 2.5)

1. การเติมแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน ลงไปเป็นเชื้อเริ่มต้นหรือเป็นเชื้อที่มีส่วนร่วมในกระบวนการหมัก

2. การเติมแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์ ลงไปเป็นสารถนอมอาหาร

3. การเติมผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียแลคติก ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินลงไปเป็นส่วนประกอบในการะบวนการผลิตอาหาร ซึ่งมีการทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ ในการถนอมอาหาร

การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินเป็นสารกันเสียในอาหารมีข้อดีหลายประการ คือ (อรอนงค์, 2550)

1. ช่วยยืดอายุการเก็บของอาหาร

2. ช่วยในการรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่างๆ

3. ลดความเสี่ยงจากการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในอาหาร

4. ลดค่าใช้จ่ายจากการเน่าเสียของอาหาร

5. ลดการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร

6. ช่วยลดการใช้ความร้อนในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร ทำให้รักษาคุณค่าของสารอาหาร และวิตามินในอาหาร

7. เป็นที่ต้องการของโรงงานและผู้บริโภค โดยแนวทางที่โรงงานอุตสาหกรรมอาหารในยุโรปนิยมในปัจจุบัน คือ ไม่ใช้สารปรุงแต่ง ลดกระบวนการแปรรูปอาหาร เพื่อให้อาหารสดใหม่

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก มีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร กล่าวคือ (O' Sullivan *et al.*, 2002) (ตารางที่ 2.6)

1. เป็นที่ยอมรับว่าเป็นสารที่ปลอดภัย

2. ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต

3. สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยประเภทโปรติเอส จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร

4. มักจะทนต่อ pH และความร้อน

5. บางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้าง สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร เช่น *Listeria monocytogeneses* และ *Clostridium botulinum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. มักถูกควบคุมการสร้างโดยพลาสมิด จึงง่ายต่อการทำ genetic manipulation

7. ช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้น เช่น เพิ่มความปลอดภัย และรสชาติดีขึ้น

8. มีแอคติวิตี้จำเพาะสูง (specific activity)

ตารางที่ 2.6 ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร

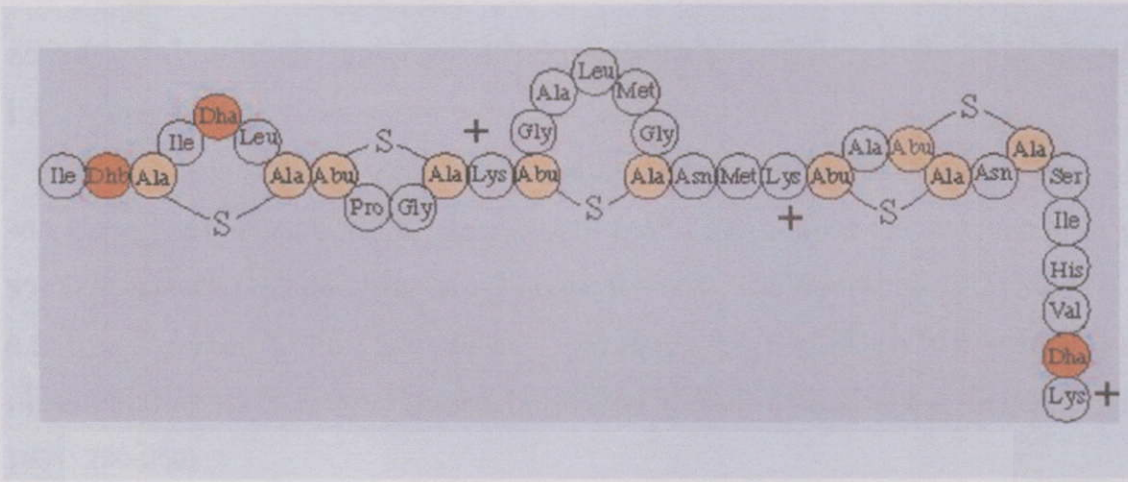
แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก	ฤทธิ์ในการยับยั้ง (inhibition spectrum)
Lactococcus sp.	
Nisin	Broad spectrum
Lacticin 3147	Broad spectrum
Lacticin 481	Medium spectrum
Lactococcin A, B และ M	Narrow spectrum
Lactobacillus sp.	
Lactocin 27	Narrow spectrum
Sakacin A	Narrow spectrum
Sakacin B	Narrow spectrum
Plantaricin C	Broad spectrum
Pediococcus sp.	
Pediocin A	Broad spectrum
Pediocin PA – 1/AcH	Broad spectrum
Leuconostoc sp.	
Leucocin A – UAL 187	Broad spectrum
Enterococcus sp.	
Enterocin A	Narrow spectrum
Carnobacterium sp.	
Carnocin U149	Broad spectrum
Piscicolin 126	Broad spectrum
Divercin V41	Broad spectrum

ที่มา : O' Sullivan *et al.* (2002)

2.10 สารไนซิน (Nisin)

เป็นสารแบคเทอริโอซินชนิดเดียวที่นิยมใช้ในทางการค้าอย่างแพร่หลาย ผลิตโดย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 หน่วย มี lanthionine 1 หน่วย และ β-methyllanthionine 4 หน่วย (ภาพที่ 2.5)

ห้องสมุดโดยพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือเผยแพร่ ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2.5 ภาพโครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน Z

หมายเหตุ: สีส้มอ่อน = lanthionine residues, สีส้มเข้ม = dehydrate residues,
Dha = didehydroalanine, Dhb = didehydrobutyrine,
Ala-S-Ala = lanthionine, Abu-S-Ala = β-methyllanthionine

ที่มา: Kramer (2005) http://cble.chem.uunl/biomem/naomi.htm

ไนซินมีประจุสุทธิเป็นบวก มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (amphiphilic) โดยที่ปลาย N เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และที่ปลาย C เป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) ไนซินแบ่งออกได้เป็น ไนซิน A และไนซิน Z โดยไนซินZ ผลิตมาจาก *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 ซึ่งจะต่างจากไนซิน A ที่กรดอะมิโนตำแหน่งที่ 27 โดยเป็นฮิสทีดีนในไนซิน A และแอสพาราจีนในไนซิน Z (De Vuyst and Vandamme, 1994)

ไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจากสารไนซินจะไปมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่มีสาร lipopolysaccharide เป็นส่วนประกอบ จึงมีความต้านทานต่อสารไนซินได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Venema *et al.*, 1995) แต่ก็มีรายงานว่าสารไนซิน สามารถยับยั้ง *Salmonella* sp. และแบคทีเรียแกรมลบชนิดอื่นๆ เมื่อนำมาใช้ร่วมกับ chelating agent เช่น สาร EDTA ซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ทำให้เซลล์มีความไวต่อสารแบคเทอริโอซินมากขึ้นนอกจากนี้ *E. coli* จะไวต่อสารไนซิน เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกถูกทำลาย ความสารถในการยับยั้ง และค่าความเข้มข้นน้อยที่สุดในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของไนซิน Z เมื่อเทียบกับไนซิน A มีค่าใกล้เคียงกัน (Hugenholtz and De Veer, 1991)

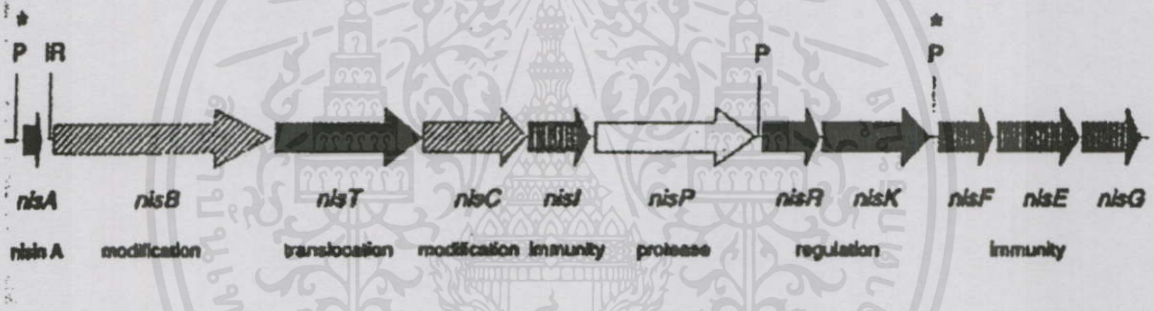
สารไนซินไม่ละลายในสภาวะที่เป็นกลางและเบส มีรายงานว่าสารไนซินจะละลายอยู่ในช่วง 57.0 มก./มล. ที่ pH 2.0 ประมาณ 1.5 มก./มล. ที่ pH 6.0 และลดลงเหลือ 0.25 มก./มล. ที่ pH 8.5 แต่ไนซิน Z จะละลายได้ดีกว่า ไนซิน A ที่ pH สูงขึ้น เนื่องจากมีแอสพาราจีน รวมตัวกับน้ำได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับฮิสทีดีนในไนซิน A (Liu and Hanson, 1990)

ไนซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 115.6°C pH 2.0 แต่ที่ pH 5.0 จะสูญเสียประสิทธิภาพไป 40% และจะสูญเสียมากกว่า 90% ที่ pH 6.8 (Tramer, 1966) ความคงตัวของสารละลายไนซินต่อความร้อน และการเก็บรักษาไม่ได้ขึ้นกับค่า pH เท่านั้น แต่ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ เช่น อุณหภูมิ องค์ประกอบทางเคมีและโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย (Hall, 1966)

ไนซินจะถูกทำลายโดยเอนไซม์ α- chymotrypsin , pancreatin และ subtilopeptidase แต่จะไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ carboxypeptidase A, pepsin และ trypsin (Jarvis and Mahoney, 1969)

2.10.1 การสังเคราะห์ไนซิน

กระบวนการสังเคราะห์ไนซิน เกิดจากกลุ่มยีนที่ประกอบด้วย 11 ยีน คือ *nisABTCIPRKFEG* และ 3 โปรโมเตอร์ คือ *nisA* และ *nisF* promoter ซึ่งเป็น inducible promoter และ *nisR* promoter ซึ่งเป็น constitutive promoter ทำงานร่วมกัน (ภาพที่ 2.6)



ภาพที่ 2.6 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไนซิน

หมายเหตุ : P* = inducible promoter, P = constitutive promoter

ที่มา : Kuipers *et al.* (1995)

nisA กำหนดรหัสไนซิน A ตั้งต้น (nisin A precursor) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 57 โมเลกุล

nisB และ *nisC* กำหนดรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการดัดแปลงโปรตีนภายหลังการแปลรหัส

nisT กำหนดรหัสโปรตีนขนส่งซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม ABC translocator โดยเกี่ยวข้องในการขนส่งไนซินตั้งต้นที่ดัดแปลงแล้ว ออกนอกเซลล์

nisI กำหนดรหัสไลโพโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการป้องกันเซลล์ จากการทำลายโดยไนซินที่ตัวเองผลิตขึ้น

nisP กำหนดรหัสเอนไซม์โปรติเอสภายนอกเซลล์ที่เกี่ยวข้องในการตัด leader peptide ออกจากไนซินตั้งต้น (precursor processing)

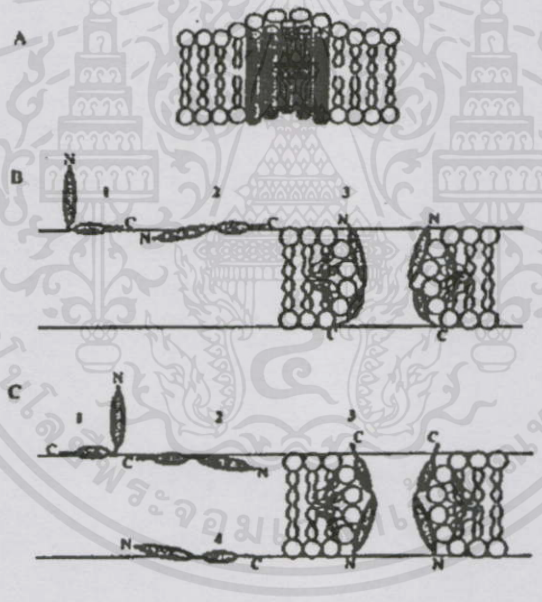
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

nisR และ *nisK* กำหนดรหัสเอนไซม์ histidine kinase (nis K) และ response regulator protein (nis R) โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไนซินในรูปแบบ two-component regulatory system

nisFEG กำหนดรหัสโปรตีนขนส่งซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเอง

2.10.2 กลไกการออกฤทธิ์ของไนซิน

ไนซินทำให้เกิดการสร้างรู ในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่ไวต่อสารไนซิน โดยจะเกิด electrostatic interaction ระหว่างประจุบวกที่ปลาย C ของเปปไทด์ กับประจุลบของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารโมเลกุลเล็ก เช่น กรดอะมิโน โพแทสเซียม กลูตาเมต อนินทรีย์ฟอสเฟต และ ATP ออกนอกเซลล์ เป็นผลทำให้เกิดการสูญเสียแรงขับเคลื่อนของโปรตอน (proton motive force; PMF) และทำให้ความต่างศักย์ลดลง จึงไม่มีการสร้างพลังงานเกิดขึ้น (ภาพที่ 2.7)



ภาพที่ 2.7 กลไกการทำให้เกิดรูในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยไนซิน

A แสดง barrel-stave pore B , C แสดงแบบจำลองการสร้างรู

ขั้นตอนที่ 1 บริเวณปลาย C ของไนซินเข้ามาจับที่เยื่อหุ้มเซลล์ ของแบคทีเรียเป้าหมาย

ขั้นตอนที่ 2 ไนซินแทรกเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ ของแบคทีเรียเป้าหมาย

ขั้นตอนที่ 3 การสร้างรู เริ่มจากการเคลื่อนเข้าของปลาย C หรือปลาย N ของไนซิน

ขั้นตอนที่ 4 ไนซินเคลื่อนเข้าไปด้านใน เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

ที่มา: Bauer and Dick (2005)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.11 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปัจจุบันแบคเทอริโอซิน นักวิทยาศาสตร์ให้ความสนใจอย่างกว้างขวางเนื่องจากเป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติโดยจุลินทรีย์ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะ สารที่รู้จักกันดี เช่น ไนซิน (nisin) (สุมณฑา, 2545) ซึ่งตอนนี้ในประเทศไทยก็มีผู้ที่สนใจศึกษาเกี่ยวกับสารแบคเทอริโอซิน เช่น Swetwiwathana และ Lotong (1999) ได้คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินจากแหนม พบว่ามี 3 สายพันธุ์ที่มาจาก *Pediococcus* spp. คือ TISTR 419, 530, 536 และสายพันธุ์ที่มาจาก *Lactobacillus* spp. คือ TISTR 543 พบว่าสายพันธุ์ที่มาจาก *Pediococcus* spp. เท่านั้นที่มีผลในการยับยั้ง *Listeria innocua* ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบในการทดลอง

Enan *et al.* (1996) ทดลองเชื้อ *Lactobacillus plantarum* UG1 ที่คัดแยกมาจากไส้กรอกแบบแห้ง ผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในหลายไอโซเลท ในสกุล *Lactobacillus, Lactococcus* และจุลินทรีย์ก่อโรคทางด้านอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* และ *Clostridium sporogenes* สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์จะหมดประสิทธิภาพด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และมีการแสดงถึงความสามารถในการทำลายแบคทีเรีย เพราะฉะนั้นสารชนิดนี้จึงคุณสมบัติเป็นแบคเทอริโอซิน และระบุว่าเป็นสาร plantaricin UG1 สารแบคเทอริโอซินชนิดนี้มีความคงตัวในช่วง pH 4.5 – 7.0 มีส่วนที่ถูกทำให้หมดประสิทธิภาพโดยเอนไซม์ amylolytic และมีการทนต่อความร้อน สารนี้ไม่มีผลกระทบโดยเอนไซม์กลุ่ม organic หรือ lipolytic การผลิตสาร plantaricin UG1 ขึ้นอยู่กับค่า pH และอุณหภูมิในการบ่ม จะมีการผลิตสารปริมาณมากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth ปรับเป็น pH 6.5 และมีการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25°C – 30°C ในช่วง exponential ก่อนถึงช่วง stationary growth phase ที่จะมีการผลิตส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ทำการกรองเซลล์แบบ Ultrafiltration ศึกษาคุณสมบัติ plantaricin UG1 มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วงระหว่าง 3 และ 10 KDa การสร้าง plantaricin UG1 พบอยู่ในรหัสของโครโมโซม โดยแบคทีเรียแกรมบวก เมื่อมีการดูดซับ plantaricin UG1 จะมีผลทำลายเซลล์ แต่ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียแกรมลบไม่สามารถดูดซับ plantaricin UG1 ได้ กลไกการทำลายแบคทีเรียของ plantaricin UG1 ไม่ได้ขึ้นอยู่กับช่วงสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ และไม่ได้เป็นสาเหตุทำให้เซลล์แตก

Callewaert *et al.* (2000) ทำการศึกษา *Enterococcus* ที่มีความแตกต่างกัน 2 สายพันธุ์ ที่พบได้ในเนื้อทั่วไป คือ *Enterococcus faecium* CCM 4231 และ *Enterococcus faecium* RZS C13 ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักไส้กรอก เชื้อทั้ง 2 ชนิด ผลิตแบคเทอริโอซินที่ไม่ยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่น และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Listeria* spp. การแข่งขันการเจริญและการยับยั้ง *Listeria* spp. ของเชื้อทั้ง 2 ชนิด มีการตรวจติดตามในระหว่างการหมักไส้กรอก ในระดับห้องปฏิบัติการและการผลิตจริง เชื้อ *Enterococcus* มีการแข่งขันการเจริญในระหว่างการหมักของไส้กรอก และมีการยับยั้งการเจริญ *Listeria* spp. ได้ดี มีการทดลองคุณสมบัติของ *Enterococcus*

มีการสร้างกรดมาก และสร้างแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญ *Lactobacillus* อย่างไรก็ตาม เชื้อ *Enterococcus* ไม่มีการแข่งขันในสภาวะแวดล้อมในเนื้อ ไม่ทำให้เกิดรสชาติที่ไม่ดีในไส้กรอก เชื้อ *Enterococcus* ยังคงสามารถใช้ร่วมกับเชื้อชนิดอื่น เพื่อพิสูจน์ความปลอดภัยของอาหาร

Atrih *et al.* (2001) พบว่า plantaricin C19 เป็นแบคเทอริโอซินแบบ anti-*Listeria* ประสบความสำเร็จในการทำให้บริสุทธิ์โดย วิธีการดูดซับและการปลดปล่อยสารที่ผลิตออกจากเซลล์ที่ pH ต่ำ ร่วมด้วย reverse phase high-performance liquid chromatography (HPLC) ผลของการทำให้บริสุทธิ์ ใน 900-fold ที่เพิ่มขึ้น พบว่ามีประสิทธิภาพเพิ่มขึ้น 15% ของสารเริ่มต้น การวิเคราะห์หาค่าน้ำหนักโมเลกุล โดยวิธี Mass spectrometry พบว่ามีน้ำหนักโมเลกุล 3845.3 มีการจำแนกลำดับรหัสสารโปรตีน พบว่าเป็นกรดอะมิโน 36 ตัว plantaricin C19 เป็นชนิดมีขั้วแบบไม่ชอบน้ำ และพื้นฐานของกรดอะมิโน มีความสอดคล้องกันอย่างดีด้วยคุณสมบัติที่มีขั้วแบบไม่ชอบน้ำ การเปรียบเทียบการเรียงลำดับของกรดอะมิโนของ plantaricin C19 ด้วยลำดับของสารแบคเทอริโอซินชนิดอื่นที่เป็นแบบ anti-*Listeria* ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก แสดงให้เห็นว่า plataricin C19 ใน แถบ N-terminal มีความสอดคล้องที่ลำดับ – YYGNGL – (มีลักษณะเฉพาะโดย valine แทนที่ด้วย leucine เหมือนที่พบในแบคเทอริโอซินชนิดอื่น) การจำแนก plantaricin C19 เหมือนกับแบคเทอริโอซินชนิด pediocin สาร plantaricin C19 แสดงปฏิกิริยายับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria grayi* CIP 6818 ในอาหารเหลว BHI ไม่มีการสูญเสียสาร K^+, Mg^{2+} ภายในเซลล์ หรือการสังเกตวัตถุดูดซับด้วยรังสีอุลตร้าไวโอเลต การดูดซับของ plantaricin C19 โดยเชื้อ *Listeria grayi* CIP 6818 พบว่าลดลงในอาหารที่มีเกลือ

Messi *et al.* (2001) ใช้แบคทีเรียแลคติก 134 ไอโซเลท ที่คัดแยกมาจากไส้กรอกอิตาเลี่ยน นำมาทดสอบการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (แบคเทอริโอซิน) 6% ของแบคทีเรียแลคติก แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอย่างน้อย 1 ชนิด หรือมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ พบว่า *Lactobacillus plantarum* 35d มีการผลิตแบคเทอริโอซินประสิทธิภาพสูง (320 AU ml^{-1}) และมีช่วงกว้างในยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ *Staph. aureus*, *Lis. monocytogenes* และ *A. hydrophila* สารแบคเทอริโอซินมีความทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 120 นาที และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นระยะเวลา 6 เดือน มีการศึกษาประสิทธิภาพในการทำลายแบคทีเรีย พบว่าน้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สกัดออกมาด้วย *n*-butanol มีค่าประมาณ 4.5 KDa

Sabia *et al.* (2002) ใช้เชื้อ Enterococci 118 ไอโซเลท คัดแยกมาจากไส้กรอกอิตาเลี่ยนนำทดสอบการผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ พบว่า 7.6% ของที่นำมาทดสอบ แสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอย่างน้อย 1 ชนิด หรือมีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ เชื้อ *Enterococcus casseliflavus* IM416K1 ผลิตแบคเทอริโอซิน (enterocin 416K1) มีประสิทธิภาพสูงในแบบ anti-*Listeria* แบคเทอริโอซินนี้ทนทานความร้อนที่อุณหภูมิ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารนี้ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

90°C เป็นเวลา 120 นาที และเก็บรักษาไว้ที่ 4°C ได้เป็นระยะเวลานาน 6 เดือน ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซิน และการผลิตสารภูมิคุ้มกันจะมีการเชื่อมต่อด้วยยีนที่อยู่บนพลาสมิดเดียวกัน

Noonpakdee *et al.* (2003) ได้ทำการแยกแบคทีเรียแลคติกในแหนม สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 14,020 ไอโซเลท พบว่า 1 สายพันธุ์ คือ *Lactococcus lactis* WNC 20 ผลิตแบคเทอริโอซินที่ไม่ใช่ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแลคติกแต่ยังยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่นเชื้อ *Listeria monocytogenes, Clostridium perfringens, Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* มีการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีพบว่า แบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที และมีประสิทธิภาพในช่วง pH ที่กว้าง คือ 2 – 10 แบคเทอริโอซินจะหมดประสิทธิภาพ โดยเอนไซม์ α-chymotrypsin และ proteinase K ค่าสปคตรัมการยับยั้งจุลชีพ และคุณสมบัติบางอย่างของแบคเทอริโอซินชนิดนี้ มีค่าใกล้เคียงกับไนซิน การศึกษารหัสพันธุกรรมของแบคเทอริโอซินชนิดนี้ โดยวิธีการ Polymerase chain reaction (PCR) ด้วย nisin gene-specific primer ลำดับของยีนแสดงลำดับใกล้กับ nisin Z แสดงถึงส่วน asparagine ของ histidine ตำแหน่ง 27 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* WNC 20 จะมีการศึกษาเรื่องความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่อไป

Mataragas *et al.* (2003) ศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ การผลิตแบคเทอริโอซิน ผลของค่า pH และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการผลิตและทำให้มีค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์มากที่สุด การสร้างแบคเทอริโอซินที่เหมาะสมในระหว่างการเจริญ มีการศึกษาแบคเทอริโอซิน 2 ชนิด ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก 2 สายพันธุ์ คือ *Leuconostoc mesenteroides* L124 และ *Lactobacillus curvatus* L442 การเพิ่มขึ้นของชีวมวล เป็นผลในการพิสูจน์ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในอาหารที่ควบคุม pH 5.0 และ 5.5 ทั้งอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ และค่า pH มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินทั้ง 2 ชนิด และมีการเพิ่มขึ้นในอัตราการเจริญที่ต่ำ สภาวะในการผลิตแบคเทอริโอซินที่เหมาะสมไม่ได้สร้างขึ้นพร้อมกับการเจริญ โดยค่า pH และ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์คือ ค่า pH 6.0 – 6.5 ที่อุณหภูมิ 30°C ส่วนค่าที่ใช้ในการสร้างแบคเทอริโอซินคือ ค่า pH 5.5 และ อุณหภูมิ 25°C

Swetwiwathana *et al.* (2003) ได้ศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซิน ของแบคทีเรียแลคติกในแหนม พบว่ามี 14 ไอโซเลท ที่สามารถสารยับยั้งจัดอยู่ในกลุ่มแบคเทอริโอซิน แต่มี 6 ไอโซเลท คือ N10, N39, N60, N100, N190 และ TISTR 536 (*Pediococcus pentosaceus)* เป็นสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้มากกว่า 5 ชนิด โดยเฉพาะ N100 (*Lc. lactis*) และ N190 ให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นเชื้อก่อโรคในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus carnosus* ซึ่งเชื้อ *Staphylococcus carnosus* มักนิยมใช้เป็นกล้าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในไส้กรอกหมักหลายชนิดของชาวยุโรป เนื่องจากจะช่วยเพิ่มเรื่องของกลิ่นและสีในผลิตภัณฑ์

Swetwiwathana *et al.* (2004) ศึกษาผลของกระเทียมและไนไตรท์ที่มีผลต่อการผลิต Pediocin PA-1 ของ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 และการเจริญของ *Salmonella* Anatum ในสภาวะการหมักแหนมจำลอง พบว่าแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน Pediocin PA-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์แรกที่ผลิต Pediocin PA-1 ซึ่งแยกได้จากแหนม

Vermeiren *et al.* (2004) ทำการศึกษาแบคทีเรีย 91 ไอโซเลท ที่คัดแยกมาจากผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยมีขั้นตอนการในการคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติสำหรับนำมาใช้ป้องกันเชื้อก่อโรค ในระดับอุตสาหกรรมอาหารประเภทเนื้อสัตว์แบบถนอมอาหาร โดยลำดับแรก ไอโซเลท ที่นำมาทดสอบต้องมีคุณลักษณะ homofermentative , psychrotrophic และทนต่อความเค็ม ลำดับต่อมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *Listeria monocytogenes*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Leuconostoc carnosum* และ *Brochotrix thermosphacta* โดยวิธี agar spot test ผลการทดสอบพบว่า 38% ของไอโซเลทที่ทำการทดสอบสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้งหมด อย่างไรก็ตาม ไอโซเลทที่คัดแยกได้สามารถยับยั้ง 91%, 88% และ74% ตามลำดับ มีการใช้เชื้อ 12 ไอโซเลท ที่ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งมากที่สุดนำมาทดสอบกับเชื้อ *Lis. monocytogenes*, *B. thermosphacta* และ *Leuc. Mesenteroides* ศึกษาการแข่งขันเจริญตามธรรมชาติโดยทำการเปรียบเทียบกับอัตราการเจริญ ความสามารถในการผลิตกรดแลคติก ณ อุณหภูมิ 7°C การเจริญในอาหารเหลวภายใต้สภาวะไร้ออกซิเจน โดยเชื้อทั้ง 12 ไอโซเลท มีการผลิตแบคเทอริโอซินโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ lactocin S สร้างโดย *Lactobacillus sakei* 148 สามารถร่วมกันเจริญเติบโตได้อย่างดี เป็นผลให้ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณที่สูง เชื้อทั้ง 12 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้มีการทดสอบการเจริญในผลิตภัณฑ์เนื้อแฮมแบบทดลองที่มีการผสมเชื้อลงไป โดยต้องไม่มีผลต่อคุณสมบัติทางด้านรสชาติของเนื้อแฮม เชื้อทั้งหมดที่ใช้ทดสอบใส่ลงไปเป็นระยะเวลา 6 วัน ที่อุณหภูมิ 7°C มีอัตราการเจริญจากระดับ 10^5 – 10^6 ไปเป็น 10^7 – 10^8 CFU/g และแบคเทอริโอซินสร้างโดยสายพันธุ์ *Lb. plantarum* มีการเจริญช้าที่สุด มีระดับน้ำตาลกลูโคสของผลิตภัณฑ์เนื้อแฮมแบบทดลองที่ต่ำ (0.09 ± 0.03%) สรุปผลการเจริญของเชื้อเพื่อใช้ในการถนอมอาหาร ผลของการลดปริมาณน้ำตาลกลูโคส มีการผลิตกรดแลคติกในปริมาณที่ต่ำ ผลิตภัณฑ์เนื้อแฮมที่มีการผสมเชื้อด้วยไอโซเลท 13E, 10A, 14A (เชื้อทั้ง 3 ชนิดเป็น *Lb. sakei* subsp. *carnosus* โดย SDS-PAGE) *Lb. sakei* 148 (LS5) และ *Lb. sakei* subsp. *carnosus* SAGA 777 (LS8) ไม่มีผลเสียต่อรสชาติเนื้อแฮม ที่ระยะเวลา 34 วัน โดยเก็บรักษาไว้ในบรรจุภัณฑ์สุญญากาศ อุณหภูมิ 7°C ดังนั้นเชื้อทดสอบเหล่านี้จึงสามารถนำมาใช้ในการถนอมอาหารในผลิตภัณฑ์เนื้อปรุงสุกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Jamuna *et al.* (2005) ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซิน โดยคัดแยกจาก appam batter (LABB) ผักดอง (LABP) และไนซิน พบว่าสารไนซินทางการค้าสามารถยับยั้ง *Clostridium sporogenes* ในขณะที่แบคเทอริโอซินที่คัดแยกจาก *Lactobacillus* คือ LABB

และ LABP มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ทั้ง LABB หรือ LABP สามารถต้านจุลชีพได้ดีกว่า เมื่อนำมาใช้รวมกันกับสารไนซิน พิสูจน์ให้เห็นถึงคุณภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ ความปลอดภัย และยืดอายุการเก็บรักษาของผักสด

Campos *et al.* (2006) ทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติก 25 ไอโซเลท คัดแยกจากเนื้อของปลาฟาร์ม turbot ศึกษาคุณลักษณะทางพันธุศาสตร์ของแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน โดยวิธี PCR ใช้ BAL1/BAL2 16S ribosomal-RNA-targeted primers พบว่าเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* USC-39, *Enterococcus faecium* USC-46 และ *Enterococcus mundtii* USC-51 สร้างแบคเทอริโอซินได้มากที่สุด หมดประสิทธิภาพด้วยเอนไซม์ proteinase K มีการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้ดีในช่วง pH 3.5 – 5.5 หรือ 3.5 – 6.5 และเชื้อ *Staph. aureus* ได้ดีในช่วง pH 3.5 – 4.5 และ 3.5 – 5.5 ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่ทดสอบ ศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินหลังจากทำการต้มสารที่กรองเซลล์ออกแล้ว ที่อุณหภูมิ 100^{o}C เป็นระยะเวลา 60 นาที และ 121 ^{o}C เป็นระยะเวลา 15 นาที พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์สร้างแบคเทอริโอซินที่ทนความร้อนได้ดีเมื่อมีความเป็นกรด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* และจะนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหารในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก หรืออาหารปรุงสุกต่อไป

Héquet *et al.* (2007) ศึกษาสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ที่มีวัตถุประสงค์ของการใส่ลงในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria* มีการศึกษาใช้ *Lactobacillus sakei* 2512 ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria* บนเนื้อแฮมปรุงสุกหั่นสไลด์ โดย challenge test ใช้อาหารเหลว BHI5L200 ที่มีการเลียนแบบคุณค่าทางสารอาหารเหมือนเนื้อแฮม ในการคัดแยกจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับป้องกันเนื้อ พบว่าคัดแยกเชื้อได้ 2 ไอโซเลทจากแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 201 ไอโซเลท สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่ pH 5.8 ในอาหาร BHI5L200 ชนิดแรกคือ *Leuconostoc pseudomesenteroides* 2733 ผลิตแบคเทอริโอซินชนิดใหม่ซึ่งต้องทำให้บริสุทธิ์ และศึกษาคุณสมบัติ ชนิดที่สองคือ *Lactobacillus curvatus* 2711 ผลิตร sakacin X และแสดงให้เห็นว่ามี sakacin T และ sakacin P ในโครงสารของยีน มีการทดลองใช้จุลินทรีย์ผสมในอาหาร BHI5L200 ที่ใส่เชื้อ *Listeria* พบว่าเชื้อทดสอบถูกยับยั้งการเจริญโดย *Lb. sakei* 2512 ได้ดีเช่นเดียวกับ *Lb. curvatus* 2711

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 ตัวอย่างแหนมปลา

นำตัวอย่างแหนมปลาจากแหล่งผลิตต่าง ๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 แสดงรหัสแหนมปลา ตราผลิตภัณฑ์ และสถานที่ผลิต

รหัสแหนมปลา	ตราผลิตภัณฑ์	สถานที่ผลิต
NP1	ตราช้อนทอง	บ. ส. กิจวัฒนาฟู้ด จำกัด 200 ถ. มังกร แขวงป้อมปราบ กรุงเทพฯ โทร. 02-2240189
NP2	แหนมปลากรายเจ๊รดา	โสภณฟู้ด 35/1 ม.3 ต. ถนนขาด อ. เมือง จ. นครปฐม 73000 โทร. 01-9956635, 01-9956884
NP3	แหนมปลากรายนิตยา	NY ฟู้ดส์ 7/8 หมู่ 3 ต. ห้วยจรเข้ อ. เมือง จ. นครปฐม 73000
NP4	แหนมปลากรายแม่สุนี	140/10 หมู่ 2 ถ. มิตรภาพ ต. มิตรภาพ อ. สีคิ้ว จ. นครราชสีมา 30140 โทร. 044-411527 , 411172
NP5	แหนมปลาส้มฟัก เจ้าตำหรับแม่น้อย	กลุ่มแม่บ้านเกษตรเชียงงา 37/3 หมู่ 5 ต. เชียงงา อ. บ้านหมี่ จ. ลพบุรี
NP6	TESCO Minced Fermented Fish	ผลิตโดย ผลิตภัณฑ์อาหารสุนี จำกัด 140/10 หมู่ 2 ถ. มิตรภาพ ต. มิตรภาพ อ. สีคิ้ว จ. นครราชสีมา 30140 โทร. 044-411527 , 411172
NP7	แหนมปลาแม่หงษ์	โรงงานแหนมช้าง 283 หมู่ 4 ต. สวนแตง อ. เมือง จ. สุพรรณบุรี 72210 โทร. 035-548218-9
NP8	แหนมปลาตลาดอุดร	จากตลาดสด จ. อุดรธานี
NP9	ตรา ลีดเดอร์ไพรซ์ (Leader Price)	ผลิตโดย บ.ส. กิจวัฒนาฟู้ดส์ จำกัด 200 ถ. มังกร แขวงป้อมปราบ กรุงเทพฯ โทร. 02-224-0189
NP10	ตรา เอราวัณ	NY FOOD Co.LTD. 7/8 หมู่ 3 ต. ห้วยจรเข้ อ. เมือง จ. นครปฐม 73000

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เก็บตัวอย่างตัวอย่างแหนมปลาพร้อมบริโภคที่มีจำหน่ายจากแหล่งต่าง ๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง จดบันทึกชื่อยี่ห้อ สถานที่ผลิต เก็บรักษาไว้ในถังควบคุมความเย็นด้วยน้ำแข็ง เพื่อทำการตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยาของแหนมปลา

3.2 เครื่องมือและวัสดุอุปกรณ์

3.2.1 ตู้อบความร้อนแห้ง (Fisher, ISOTEMP, USA)

3.2.2 ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิสูง 37°C (Shel-Lab, Model 1565, USA)

3.2.3 ตู้บ่มเพาะเชื้ออุณหภูมิต่ำ 30°C (Shel-Lab, LI20-2, USA)

3.2.4 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Sartorius, CP323S, Germany)

3.2.5 เครื่องชั่งน้ำหนักไฟฟ้าทศนิยม 4 ตำแหน่ง (DENVER, TC-205, USA)

3.2.6 U.V. Spectrophotometer (Shimadzu, UV-1700, Japan)

3.2.7 ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar Flow NUIAURE, NU440-400E, USA)

3.2.8 หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอ (Tomy, ES-315, Japan)

3.2.9 ตู้แช่เยือกแข็ง -20°C (Sanyo, SF-C992 NG, Japan)

3.2.10 เครื่องเหวี่ยงเซลล์อุณหภูมิต่ำ (Sorvall, RC-5C Plus, USA)

3.2.11 เครื่องวัดค่า a_w (Themoconstanter novasina, RS 232, Switzerland)

3.2.12 เครื่องวัดค่า pH (Precisa, PH900, Swiss)

3.2.13 Vortex Mixer (Vortex-2-Genie, USA)

3.2.14 กล้องจุลทรรศน์ (Zeiss, Axiostar, Germany)

3.2.15 อ่างน้ำร้อน (Heto, HMT200, Denmark)

3.2.16 Desiccator

3.2.17 อุปกรณ์เครื่องแก้วชนิดต่าง ๆ สำหรับใช้ในการทดลอง

3.2.18 อุปกรณ์กรองเชื้อแบคทีเรีย (Millipore, USA)

3.2.19 Autopipette และหัว Tip

3.2.20 Anaerobic Jar (Merck, Germany)

3.2.21 เตาไฟฟ้า (E.G.O., Germany)

3.2.22 เข็มเขี่ยเชื้อ และตะเกียงแอลกอฮอล์

3.2.23 หม้อสแตนเลส มีด และเขียง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.3.1 กลีเซอรอล (UNIVAR, Australia)

3.3.2 น้ำมันพาราฟิน (APS, Australia)

3.3.3 โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) (LAB-SCAN, Ireland)

3.3.4 แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) (Fluka, Switzerland)

3.3.5 สารละลายฟีนอฟทาลีนเข้มข้น 1% (UNIVAR, Australia)

3.3.6 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เข้มข้น 1N (Mecrk, Germany)

3.3.7 สารละลายกรดไฮโดรคลอริค (HCl) เข้มข้น 1 N (Mecrk, Germany)

3.3.8 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% (H_2O_2) (Merck, Germany)

3.3.9 แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4$) (CARLO ERBA, Italy)

3.3.10 แมงกานีสซัลเฟต ($MnSO_4$) (UNIVAR, Auatralia)

3.3.11 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (K_2HPO_4) (CARLO ERBA, Italy)

3.3.12 โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4) (Merck, Germany)

3.3.13 ไดแอมโมเนียมไฮโดรเจนซิเตรต (Merck, Germany)

3.3.14 Tween 80 (Merck, Germany)

3.3.15 แอทธานอล 95%

3.3.16 ชุดสีย้อมแกรมแบคทีเรีย (Merck, Germany)

3.4 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

3.4.1 Trypticase Soy Agar (DIFCO, USA)

3.4.2 Trypticase Soy Broth (DIFCO, USA)

3.4.3 MRS Agar (Merck, Germany)

3.4.4 MRS Broth (Merck, Germany)

3.4.5 Nutrient Agar (DIFCO, USA)

3.4.6 Glucose (UNILAB, Australia)

3.4.7 Beef Extract (BIOMARK, India)

3.4.8 Yeast Extract (Merck, Germany)

3.4.9 Tryptone (Merck, Germany)

3.4.10 BSM Agar (Bacteriocin Screening Medium)

3.4.11 ชุดทดสอบ API 50 CH (BioMérieux, France)

3.5 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.1 *Bacillus cereus* ATCC 11778

3.5.2 *Bacillus circulans* JCM 2504

3.5.3 *Bacillus coagulans* JCM 2257

3.5.4 *Bacillus subtilis* JCM 1465

3.5.5 *Escherichia coli* JM 109

3.5.6 *Enterococcus faecalis* JCM 5803

3.5.7 *Kokuria varians* LTH 1545

3.5.8 *Listeria innocua* ATCC 33090

3.5.9 *Listeria innocua* LTH 3096

3.5.10 *Micrococcus luteus* IFO 12708

3.5.11 *Salmonella* Anatum WHO-BKK

3.5.12 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538

3.5.13 *Staphylococcus carnosus* LTH 2102

3.5.14 *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014

3.5.15 *Lactobacillus sakei* JCM 1157

3.5.16 *Lactococcus lactis* JCM 7638

3.5.17 *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L

3.5.18 *Leuconostoc mesenteroides* JCM 6124

3.5.19 *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885

3.5.20 *Pediococcus pentosaceus* JCM 5890

3.5.21 *Streptococcus salivarius* JCM 5707

3.6 สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติทางจุลชีววิทยา 19 – 1215 และ 19 – 1216 อาคาร 19 ชั้น 12 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์ฟิสิกส์ทางอาหาร ห้อง B 314 คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

3.7 วิธีดำเนินการทดลอง

3.7.1 การศึกษาสมบัติทางเคมีบางประการของแหนมปลา

1. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแลคติก (AOAC, 1984)

- ชั่งตัวอย่างแหนมปลา 3 กรัม ใส่ลงในฟลาสก์ ขนาด 250 มล. เติมน้ำกลั่นลงไป 50 มล. ผสมให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กรองด้วยกระดาษกรอง นำน้ำส่วนใสที่ได้ไปต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

- นำไปไตเตรตกับ standardized sodium hydroxide (0.1 N) จนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน โดยใช้ สาร phenolphthalein 1% (1 – 2 หยด) เป็นอินดิเคเตอร์

- บันทึกผลและนำผลที่ได้ไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (acidity) จากสูตร

$$\% \text{ ความเป็นกรด} = \frac{\text{ml NaOH X Normorlity NaOH X Equivalent wt of acid X 100}}{\text{ml (or gm) sample X 1,000}}$$

2. การวัดค่า pH (AOAC, 1984)

- ชั่งตัวอย่างแหนมปลา 20 กรัม ใส่ลงถุงพลาสติก เติมน้ำกลั่นลงไป 10 มล. ผสมให้เข้ากัน

- นำเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำไปวัดค่า pH ด้วยเครื่อง pH-meter ทำการจดบันทึกผล

3. การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ความชื้น (AOAC, 1984)

- ชั่งกระทงที่พับจากกระดาษอะลูมิเนียมฟอยด์ ด้วยเครื่องชั่งน้ำหนักที่มีความละเอียด 4 ตำแหน่ง

- ชั่งตัวอย่างแหนมปลาประมาณ 2 กรัม ใส่ลงในกระดาษอะลูมิเนียมฟอยด์

- นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 105°C เป็นระยะเวลา 6 – 8 ชั่วโมง นำออกมาตั้งทิ้งไว้ให้เย็นในโถ desiccator นำออกมาชั่งน้ำหนัก จนได้น้ำหนักคงที่ ทำการบันทึกผล

- คำนวณหาเปอร์เซ็นต์ความชื้นของแหนมปลา ดังสมการ

$$\% \text{ ความชื้น} = \frac{\text{น้ำหนักสด – น้ำหนักแห้ง}}{\text{น้ำหนักสด}} \text{ X } 100$$

4. การวิเคราะห์หาค่า water activity (a_w) (ตามคู่มือการใช้งานเครื่อง NOVASINA RS 232)

- นำตัวอย่างแหนมปลาที่บดละเอียดแล้ว ใส่ลงในตลับ sample cup ให้ได้ขีดระดับปริมาณ 80 – 90% ของตลับ

- นำไปวัดค่า water activity ด้วยเครื่องวัดค่า a_w รุ่น Thermoconstanter ทำการบันทึกผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.7.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลา

ชั่งตัวอย่างแหนมปลา 25 กรัม ใส่ลงในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ ใส่สารละลายเกลือเจือจาง (0.85% NaCl) ลงไป 225 มล. ผสมให้เข้ากัน ได้ความเจือจาง 1:10 ทำการเจือจางลง 10 ระดับ จนถึง 1: 10^6 ดูดสารละลายจากแต่ละระดับความเจือจางมา 100 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS agar + 0.5% $CaCO_3$ ใช้แท่งแก้วทำการ spread plate ทำ 2 ซ้ำ นำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง

ตรวจนับโคโลนีที่มีวงใส (clear zone) จากความเจือจางที่เหมาะสม ทำการสุ่มเก็บโคโลนีจากตัวอย่างละ 10 โคโลนี มาขีดลงบนจานอาหารแข็ง MRS agar + 0.5% $CaCO_3$ ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ และเก็บแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ลงใน deep tube ที่ใช้ อาหาร MRS agar + 1% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนเก็บเชื้อในตู้เย็น เพื่อใช้สำหรับปฏิบัติการครั้งต่อไป

3.7.3 การคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้

โดยวิธี direct colony spot method (Fleming *et al.*, 1985) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ

นำแบคทีเรียแลคติกที่เก็บใน deep tube มาเพาะลงใน MRS broth ปริมาตร 5 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นผสมให้เข้ากัน ดูดมา 1 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร BSM agar ที่แบ่งเป็นช่องๆ ช่องละ 1 ตัวอย่าง นำไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

นำเชื้อทดสอบ 8 ชนิด (ตารางที่ 3.2) เพาะเลี้ยงลงใน TSB+0.6% YE หรือ MRS broth เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ตรวจวัดดูการเจริญของเชื้อโดยวัดความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ดูดเชื้อทดสอบมา 2% (100 ไมโครลิตร) ใส่ลงใน 1% soft agar (TSA+0.6% YE หรือ MRS agar) ปริมาณ 5 มล. (5,000 ไมโครลิตร) เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายทั่วถึง

ตารางที่ 3.2 เชื้อทดสอบที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้ง

เชื้อทดสอบ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะในบ่มเชื้อ
1.*Escherichia coli* JM 109	TSB+0.6% YE	37°C aerobic
2.*Enterococcus faecalis* JCM 5803	TSB+0.6% YE	37°C aerobic
3. *Listeria innocua* ATCC 33090	TSB+0.6% YE	37°C aerobic
4. *Salmonella* Anatum WHO-BKK	TSB+0.6% YE	37°C aerobic
5. *Staphylococcus aureus* ATCC 12600	TSB+0.6% YE	37°C aerobic
6. *Lactobacillus sakei* JCM 1157	MRS	30°C anaerobic
7. *Lactococcus lactis* JCM 7638	MRS	30°C anaerobic
8. *Streptococcus salivarius* JCM 5707	MRS	30°C anaerobic

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
เอกสารนี้ถูกสงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของลิขสิทธิ์ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นำเชื้อทดสอบใส่ใน 1% soft agar เทลงบนจานเพาะเชื้อ BSM agar ที่มีแบคทีเรียแลค-ติกที่ต้องทดสอบเจริญเป็นลักษณะโคโลนี โดยใช้เชื้อทดสอบจานละ 1 เชื้อ ทำ 2 ซ้ำ นำไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วอ่านผลโดยดูการเกิดโซนใสรอบ ๆ โคโลนี เลือกโคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS agar + 0.5% $CaCO_3$ มาทดสอบเอนไซม์ catalase ด้วย 3% H_2O_2 และทำการย้อมสีแกรมแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน ส่องตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ รายงานผลการติดสีย้อมแกรม รูปร่างและลักษณะ

3.7.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่มีต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ

โดยวิธี spot-on-lawn (Ennahar *et al.*, 1999) ทำการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 2 ซ้ำ

นำตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกมาเพาะลงใน MRS broth ปริมาตร 5 มล. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นระยะเวลา 18 – 24 ชั่วโมง จากนั้นนำหลอดอาหารที่เพาะเชื้อแล้วมาเหวี่ยงเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C นำของเหลวส่วนที่ใสไปปรับ pH ให้ได้ 6.5 กรองด้วยชุดกรองเมมเบรน (Nitrocellulose Ø 0.45 µm, Millipore, USA) ลงในหลอดปราศจากเชื้อ จากนั้นนำของเหลวที่ได้ใส่ลงในหลอด eppendorf ที่ปราศจากเชื้อ แล้วทำการเจือจางสารละลายที่ผ่านการกรองแบบ 2 fold dilution

นำเชื้อทดสอบ 21 ชนิด (ตารางที่ 3.3) เพาะลงใน 1% soft agar (TSA+0.6%YE หรือ MRS agar) ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับลงบนผิวหน้าอาหาร Nutrient agar ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แล้วแบ่งจานเพาะเชื้อเป็น 10 ช่อง แต่ละช่องต่อ 1 อัตราส่วน ดูดส่วนใสในแต่ละระดับความเจือจางมาจากหลอด eppendorf 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มในที่อุณหภูมิ 30°C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับเชื้อแบคทีเรียแลคติกบ่มในสภาพไร้ออกซิเจน) ตรวจดูการเกิดโซนใส ทำการคำนวณความเข้มข้นของสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกผลิตได้เป็นค่า Arbitary Unit (AU) ต่อมิลลิลิตร จากระดับความเจือจางสูงสุดที่ทำให้เกิดโซนใส คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีที่สุด ไปศึกษาคุณสมบัติต่างๆเพื่อยืนยันว่าสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้น เป็นสารในกลุ่มของแบคเทอริโอซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3.3 เชื้อทดสอบที่ใช้ศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้ง จำนวน 21 ชนิด

เชื้อทดสอบ	อาหารเลี้ยงเชื้อ	สภาวะในบ่มเชื้อ
1. *Bacillus cereus* ATCC 11778	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
2. *Bacillus circulans* JCM 2504	TSB+0.6% YE	30 °C aerobic
3. *Bacillus coagulans* JCM 2257	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
4. *Bacillus subtilis* JCM 1465	TSB+0.6% YE	30 °C aerobic
5. *Escherichia coli* JM 109	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
6. *Enterococcus faecalis* JCM 5803	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
7. *Kokuria varians* LTH 1545	TSB+0.6% YE	30 °C aerobic
8. *Listeria innocua* ATCC 33090	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
9. *Listeria innocua* LTH 3096	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
10. *Micrococcus luteus* IFO 12708	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
11. *Salmonella* Anatum WHO-BKK	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
12. *Staphylococcus aureus* ATCC 12600	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
13. *Staphylococcus carnosus* LTH 2102	TSB+0.6% YE	37 °C aerobic
14. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014	MRS	30 °C anaerobic
15. *Lactobacillus sakei* JCM 1157	MRS	30 °C anaerobic
16. *Lactococcus lactis* JCM 7638	MRS	30 °C anaerobic
17. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L	MRS	30 °C anaerobic
18. *Leuconostoc mesenteroides* JCM 6124	MRS	30 °C anaerobic
19. *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885	MRS	30 °C anaerobic
20. *Pediococcus pentosaceus* JCM 5890	MRS	30 °C anaerobic
21. *Streptococcus salivarius* JCM 57077	MRS	30 °C anaerobic

3.7.5 การทดสอบยืนยันว่าสารยับยั้งที่ผลิตได้เป็นแบคเทอริโอซิน ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) ทำการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 2 ซ้ำ

นำของเหลวส่วนใส ที่กรองเซลล์ออกแล้วได้ผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบกับเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนชนิดต่างๆ โดยทำการละลายให้เอนไซม์มีความเข้มข้น 1 มก./มล. กับสารยับยั้งที่ต้องการทดสอบ คือ α-chymotrypsin, ficin, proteinase K และ trypsin แล้วปรับ pH เป็น 6.5 ส่วน protease type XIII และ pepsin ปรับ pH เป็น 3.0 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

เพื่อให้เอนไซม์ทำปฏิกิริยา นำมาหยดลงบนผิวหน้าอาหาร โดยวิธี spot-on-lawn กับเชื้อทดสอบที่ถูกสารยับยั้งที่ได้ผลดีที่สุด และใช้ส่วนใสที่ปรับ pH 3 กับ pH 6.5 เป็นชุดควบคุมในการทดสอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับแบคทีเรียแลคติกบ่มในสภาพไร้ออกซิเจน)

3.7.6 การทดสอบการทนความร้อนของแบคเทอริโอซิน

โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 2 ซ้ำ

นำของเหลวส่วนใส ที่กรองเซลล์ออกแล้วได้ผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบมาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกปรับ pH เป็น 3.0 และส่วนที่สอง ปรับ pH เป็น 6.5 นำมาทดสอบการทนความร้อนของแบคเทอริโอซิน โดยนำของเหลวส่วนใสทั้ง 2 ส่วน มาต้มให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 ^{o}C เป็นเวลา 10 นาที และที่ 121^{o}C เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็ว จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ หลังจากให้ความร้อนกับเชื้อทดสอบที่ถูกสารยับยั้งที่ได้ผลดีที่สุด โดยวิธี spot-on-lawn เปรียบเทียบกับส่วนใสไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับแบคทีเรียแลคติกบ่มในสภาพไร้ออกซิเจน)

3.7.7 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารเหลว

โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง ๆ ละ 2 ซ้ำ

ทำการทดลองโดยการถ่ายเชื้อทดสอบลงในอาหารเหลว TSB+0.6%YE หรือ MRS broth ใช้ปริมาณของเชื้อที่แตกต่างกัน 3 ระดับ คือ 10^{1}, 10^{2} และ 10^{3} CFU/ml พร้อมด้วยการเติมแบคเทอริโอซินในรูปของส่วนใส (2% supernatant) ที่ปรับเป็น pH 6.5 ในปริมาณที่ต้องการทดสอบลงไป นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C จากนั้นนำมาตรวจติดตามดูการลดลงของเชื้อทดสอบทุกๆ 2 ชั่วโมง ดูดแต่ละระดับความเจือจางใส่ลงในจานเพาะเชื้อ ละ 1 มล. ทำการ pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+0.6% YE แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37^{o}C เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง หรือ MRS agar แล้วทำการบ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง ในสภาพไร้ออกซิเจน ทำการวิธีนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมส่วนใส

3.7.8 การทดสอบย่อยสารคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลคติก

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาทำการทดสอบหาสายพันธุ์ โดยนำแบคทีเรียแลคติกมาขีดให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ บนอาหารแข็ง MRS agar + 0.5% $CaCO_3$ นำไปบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30^{o}C เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ทำการเขี่ยโคโลนีของแบคทีเรียแลคติก 5 – 6 โคโลนีลงในอาหารเหลว API 50 CHL มาหยดในชุดทดสอบ API 50 CH test kit (BioMérieux) ตรวจดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อว่ามี

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ไม่ว่ากรณีใดๆ

การย่อยน้ำตาลแล้วเกิดเป็นกรด นำผลที่ได้ไปอ่านผลหาความสัมพันธ์กับของชนิดเชื้อในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก จาก API 50 CH database

3.7.9 การทดสอบทางด้านการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลา

โดยทำการทดลอง 3 ครั้ง

ทำการศึกษารสชาติที่ยอมรับมากที่สุดของผู้บริโภค โดยพิจารณาปัจจัยคุณภาพทางประสาทสัมผัส คือ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว รสชาติ ความชอบรวม ของแหนมปลาที่หมักโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก เปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทดสอบฮีโดนิก (Hedonic test) ใช้ผู้ทดสอบที่ได้ผ่านการฝึกฝน และชอบบริโภคแหนม จำนวน 30 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) คำนวณโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

วิธีทดสอบฮีโดนิก (hedonic) หมายถึง ความพอใจ โดยสเกลแบบฮีโดนิก มีสเกลทั้งแบบตัวเลข (numerical hedonic scale) และแบบตัวหนังสือ (verbal hedonic scale) ซึ่งมีหลายระดับ เช่น 3 –จุด, 5 – จุด, 7 – จุด และ 9 – จุด ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.3 (ปราณี, 2547)

ตารางที่ 3.4 สเกลฮีโดนิกที่ใช้ในการทดสอบการยอมรับของวิธีทดสอบฮีโดนิก แบบ 9 – จุด (9 points hedonic scale)

สเกลตัวเลข		สเกลตัวหนังสือ
9 – จุด	1	ไม่ชอบเลย (dislike extremely)
	2	ไม่ชอบมาก (dislike very much)
	3	ไม่ชอบปานกลาง (dislike moderately)
	4	ไม่ชอบเล็กน้อย (dislike slightly)
	5	เฉยๆ (neither like nor dislike)
	6	ชอบเล็กน้อย (like slightly)
	7	ชอบปานกลาง (like moderately)
	8	ชอบมาก (like very much)
	9	ชอบเป็นพิเศษ (like extremely)

ที่มา : ปราณี (2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทำการทดลองผลิตภัณฑ์แหนมปลา 3 สูตร โดยมีการใส่แบคทีเรียแลคติก คือ NP3.8 หรือ NP5.4 ที่เจริญในอาหารเหลว MRS broth เชื้อละ 1% ลงไปคลุกเคล้ากับส่วนประกอบในการทำแหนมปลา คือ เนื้อปลากรายบด 85% ข้าวสุก 9% กระเทียมสับ 5% เกลือป่น 0.5% และผงชูรส 0.5% ตามลำดับ แบ่งออกเป็น 3 สูตร คือ สูตร 010 แหนมปลาที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP3.8 สูตร 020 แหนมปลาที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP5.4 และสูตร 030 แหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติโดยไม่มีการเติมแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้

ทำการคลุกเคล้าส่วนประกอบแหนมปลาแต่ละสูตรให้เข้ากันเป็นอย่างดี แล้วตักแบ่งใส่ถุงพลาสติกทำการรัดด้วยหนังยางให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 ^{o}C เป็นระยะเวลา 3 วัน ทำการแบ่งตัวอย่างมาทำการวัดค่า pH และปริมาณกรดแลคติก ในผลิตภัณฑ์แหนมปลา ทุก ๆวัน รวมเป็นระยะเวลา 3 วัน จากนั้นนำแหนมปลามาทำให้สุก ทำการทดสอบด้านการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลา โดยวิธีทดสอบฮีโดนิกต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 การศึกษาสมบัติทางเคมีของแหนมปลา

การศึกษาค่า pH ปริมาณกรดแลคติก ความชื้น และค่า a_w ของแหนมปลาจากแหล่งผลิตต่าง ๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าแหนมปลาทั้ง 10 ตัวอย่าง มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.69 – 5.15 มีปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วง 0.72 – 1.13 % ความชื้น 67.42 – 76.04 % และมีค่า a_w 0.742 – 0.825 (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 ค่า pH ปริมาณกรดแลคติก ความชื้น และค่า a_w ของแหนมปลาจากแหล่งผลิตต่าง ๆ

รหัสแหนมปลา	ค่า pH	กรดแลคติก (%)	ความชื้น (%)	ค่า a_w
NP1	5.10	0.76	74.40	0.760
NP2	5.11	0.76	75.36	0.791
NP3	4.84	0.95	73.99	0.759
NP4	5.15	0.72	75.57	0.796
NP5	4.75	1.04	72.26	0.756
NP6	4.90	0.95	76.04	0.825
NP7	4.88	0.90	67.42	0.742
NP8	5.02	0.81	74.49	0.768
NP9	4.96	0.90	75.17	0.781
NP10	4.69	1.13	68.03	0.744

กระบวนการหมักแหนมปลาตามธรรมชาติ เกิดจากแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ซึ่งสร้างกรดได้ดี ทำให้ค่า pH ของแหนมปลาลดลง การที่ค่า pH และปริมาณกรดแลคติกของแหนมปลาแต่ละยี่ห้อมีค่าแตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากมีระยะเวลาในการหมักแตกต่างกัน ส่วนผสมต่าง ๆ ที่ใช้ในการผลิต คุณภาพของวัตถุดิบแตกต่างกัน รวมถึงจำนวนแบคทีเรียแลคติกและแบคทีเรียชนิดอื่นที่ปนเปื้อนมากับเนื้อปลา ในตอนเริ่มต้นหมักของแต่ละแหล่งผลิตมีปริมาณไม่เท่ากัน

เอกสารนี้สงวนลิขสิทธิ์ ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง หรือนำไปใช้ในการแสวงหาผลประโยชน์ทางการค้าทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สอดคล้องกับการศึกษาของ อดิศร (2533) เกี่ยวกับการหมักแหนมที่ไม่ใช้กล้าเชื้อผลิตภัณฑ์แหนมในวันแรกของการหมักจะพบปริมาณกรดแลคติก 0.31% และมีค่า pH ของแหนม

เท่ากับ 6.41 เมื่อการหมักเกิดขึ้นก็จะมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิดการสร้างกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนมสูงกว่า 1.34% และ pH ของแหนมมีค่าเท่ากับ 4.57 ในวันที่ 5 ของการหมัก ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุที่ทำให้แหนมปลอดภัยจากการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ

ผลิตภัณฑ์แหนมในวันแรกของการหมักจะพบปริมาณความชื้น 64.1% และค่า a_w ของแหนมเท่ากับ 0.906 เมื่อการหมักเกิดขึ้นก็จะมีการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติกเป็นส่วนใหญ่ ทำให้เกิดการสร้างสารต่างๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีเอนไซม์ pseudocatalase จึงสามารถเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นไปเป็นออกซิเจนและน้ำ ปริมาณความชื้นจึงเพิ่มขึ้นเป็น 66.1% และค่า a_w ของแหนมเท่ากับ 0.927 ในวันที่ 5 ของการหมัก

4.2 การศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลา

การนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลาโดยใช้อาหาร MRS agar + 0.5% $CaCO_3$ ซึ่งแบคทีเรียแลคติกจะสร้างกรดอินทรีย์ทำปฏิกิริยากับ $CaCO_3$ เกิดเป็นวงใส (clear zone) ขึ้น พบว่าแหนมปลาทั้ง 10 ตัวอย่าง มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกอยู่ระหว่าง 7.08 – 9.64 $\log_{10}$CFU/g (ตารางที่ 4.2) โคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากแหนมปลา มีรูปร่างโคโลนีกลมนูน สีขาว อาจมีขนาดเล็ก หรือใหญ่ก็ได้ (ภาพที่ 4.1)

ภาพที่ 4.1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างแหนมปลา เจริญบนอาหาร MRS agar + 0.5% $CaCO_3$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลาจากแหล่งผลิตต่าง ๆ ที่เจริญบนอาหาร MRS agar + 0.5% $CaCO_3$

รหัสแหนมปลา	ปริมาณแบคทีเรียแลคติก	
	CFU / g	$\log_{10}$CFU/g
NP1	7.4×10^7	7.87
NP2	9.7×10^7	7.99
NP3	2.3×10^8	8.36
NP4	1.2×10^7	7.08
NP5	4.5×10^8	8.65
NP6	8.3×10^8	8.92
NP7	9.3×10^8	8.97
NP8	1.2×10^8	8.08
NP9	1.3×10^8	8.11
NP10	4.4×10^9	9.64

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลาจำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่าปริมาณแบคทีเรียแลคติก มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดแลคติกและค่า pH ในแหนมปลา (ตารางที่ 4.1)โดยแหนมปลาที่มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูง เมื่อนำมาเทียบกับแหนมปลา ที่มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกต่ำกว่า จะมีปริมาณกรดแลคติกสูงกว่าและมีค่า pH ต่ำกว่า ทั้งนี้เนื่องจากปริมาณเซลล์แบคทีเรียทำให้มีกิจกรรมของแบคทีเรียมากตามไปด้วย ส่งผลให้ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณที่สูงกว่า จากการที่แหนมปลาทั้ง 10 ตัวอย่างมีปริมาณแบคทีเรียแลคติกแตกต่างกัน เนื่องจากเป็นการหมักแหนมปลาอาศัยเพียงแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ตามธรรมชาติเท่านั้น ไม่สามารถควบคุมคุณภาพของแหนมปลาให้มีความสม่ำเสมอได้ หากนำกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์เริ่มต้นที่มีการกำหนดปริมาณที่แน่นอนมาใช้ในการหมักแหนมปลา ก็จะสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ จะได้แหนมปลาที่มีคุณภาพเหมือนกันหรือใกล้เคียงกันในทุกครั้งที่ทำการผลิต สอดคล้องกับการศึกษาของ อัจฉรา และคณะ (2547) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักของไทย พบว่า ปลาแป้งแดง พบแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 9.4×10^5 CFU/g จิ้งจัง 1.0×10^6 CFU/g บูดู 8.0×10^5 CFU/g ไตปลา 4.2×10^6 CFU/g ปลาร้า 5.7×10^7 CFU/g และปลาส้มฟัก 4.4×10^7 CFU/g ตามลำดับ

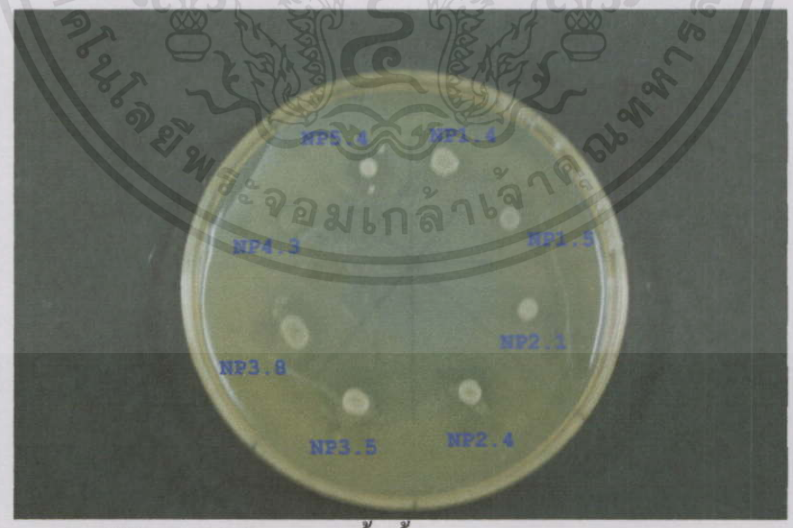
จากนั้นทำการสุ่มคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าวและมีวงใสรอบ ๆ โคโลนี จำนวน 100 ไอโซเลท (ตัวอย่างละ 10 ไอโซเลท) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ

4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้

จากการนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 100 ไอโซเลทมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ 8 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus sakei* JCM 1157, *Lactococcus lactis* JCM 7638, *Streptococcus salivarius* JCM 5707, *Escherichia coli* JM 109, *Enterococcus faecalis* JCM 5803, *Staphylococcus aureus* ATCC 65385, *Salmonella* Anatum WHO-BKK และ *Listeria innocua* ATCC 33090 โดยวิธี direct colony spot method พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก 36 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ (ตารางที่ 4.3) แต่มีขนาดรัศมีของวงใสแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่วัดได้ไม่เท่ากัน (ภาพที่ 4.2) แสดงว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้แตกต่างกัน

จึงทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกไอโซเลทที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากที่สุดมา 12 ไอโซเลท (ตารางที่ 4.3) ได้แก่ NP1.4, NP2.1, NP2.4, NP3.8, NP3.10, NP5.4, NP6.2, NP7.3, NP7.8, NP7.9, NP10.6 และ NP10.7 ซึ่งทำการคัดเลือกโดยดูจากจำนวนเชื้อทดสอบที่ยับยั้งได้ และความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในกลุ่มที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *E. coli*, *Ent. faecalis*, *Staph. aureus* หรือ *Sal.* Anatum รวมถึงคัดเลือกจากขนาดรัศมีของวงใสในการยับยั้งเชื้อทดสอบ โดยแบคทีเรียแลคติกไอโซเลทที่ NP3.8 และ NP5.4 สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้มากถึง 5 ชนิด คือ *Lb. sakei*, *Strep. salivarius*, *Ent. faecalis*, *Staph. aureus* และ *Lis. innocua* โดยมีขนาดรัศมีของวงใสที่กว้างกว่าสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่น



ภาพที่ 4.2 ผลของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Lis. innocua* ATCC 33090 โดยวิธี direct colony spot method

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 ผลของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 8 ชนิด

	แบคทีเรียแลคติก (ไอโซเลท)	เชื้อทดสอบ (แสดงผลเป็นขนาดรัศมีของวงใส หน่วยเป็น มม.)							
		Lb. sakei	*Lc. lactis*	*Strep. salivarians*	*E. coli*	*Ent. faecalis*	*Staph. aureus*	*Sal.* Anatum	*Lis. innocuua*
NP1	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	2.10	3.20	-	-	-	-	-	-
	5	2.06	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	2.13	-	-	-	-	-	-	-
	8	2.10	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
NP2	1	-	2.10	3.03	-	-	-	-	-
	2	2.10	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	10.40	-	-	-	-	-
	5	2.06	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
NP3	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	4.06	-	-	-	-	-
	6	-	-	4.38	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	10.30	-	4.40	-	6.28	4.20	-	6.06
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	10.03	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสแหนมปลา	แบคทีเรียแลคติก (ไอโซเลท)	เชื้อทดสอบ (แสดงผลเป็นขนาดรัศมีของวงใส หน่วยเป็น มม.)							
		Lb. sakei	*Lc. lactis*	*Strep. salivarians*	*E. coli*	*Ent. faecalis*	*Staph. aureus*	*Sal.* Anatum	*Lis. innocuua*
NP4	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	2.20	-	-	-	-	-	-
	4	-	2.10	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	4.20	-	-	-	-	-
NP5	1	-	2.06	-	-	-	-	-	-
	2	-	2.00	-	-	-	-	-	-
	3	-	2.12	-	-	-	-	-	-
	4	6.06	-	20.20	-	10.06	10.03	-	20.02
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	2.06	-	-	-	-	-	-
	7	-	2.03	-	-	-	-	-	-
	8	-	2.00	-	-	-	-	-	-
	9	-	2.10	-	-	-	-	-	-
	10	-	2.20	-	-	-	-	-	-
NP6	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	4.24	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสแหนมปลา	แบคทีเรียแลคติก (ไอโซเลท)	เชื้อทดสอบ (แสดงผลเป็นขนาดรัศมีของวงใส หน่วยเป็น มม.)							
		Lb. sakei	*Lc. lactis*	*Strep. salivarians*	*E. coli*	*Ent. faecalis*	*Staph. aureus*	*Sal.* Anatum	*Lis. innocuua*
NP7	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	2.24	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	2.06	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	2.12	-	-	-	2.00	-	-
	9	-	2.20	-	-	-	2.12	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
NP8	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-
NP9	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	2.06	-	-	-	-	-	-
	4	-	-	-	-	-	-	-	-
	5	-	2.03	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 (ต่อ)

รหัสแหนมปลา	แบคทีเรียแลคติก (ไอโซเลท)	เชื้อทดสอบ (แสดงผลเป็นขนาดรัศมีของวงใส หน่วยเป็น มม.)							
		Lb. sakei	*Lc. lactis*	*Strep. salivarians*	*E. coli*	*Ent. faecalis*	*Staph. aureus*	*Sal.* Anatum	*Lis. innocuua*
NP10	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	-	4.18	-	-	-	-	-	-
	5	-	-	-	-	-	-	-	-
	6	-	-	-	2.12	-	2.03	-	-
	7	-	-	-	2.06	-	2.00	-	-
	8	-	-	4.24	-	-	-	-	-
	9	-	-	4.20	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-	-

เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกนอกจากจะสามารถสังเคราะห์แบคเทอริโอซินได้แล้ว ยังสามารถสร้างสารอื่นๆที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้อีกหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิทิล ดังนั้นในการทดลองนี้การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน ต้องมีการควบคุมปัจจัยดังกล่าวที่อาจมีผลให้ผลการทดลองคลาดเคลื่อนได้ โดยใช้อาหารแข็ง BSM (Bacteriocin Screening Medium) (Tichaczek *et al.*, 1992) โดยเพิ่มสารอาหารในกลุ่มที่เป็น buffering agent เพื่อจำกัดผลของสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ นอกจากแบคเทอริโอซิน

จากการนำแบคทีเรียแลคติก 36 ไอโซเลท ที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ มาย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้าง catalase (ตารางที่ 4.4) พบว่าเชื้อทั้ง 36 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีทั้งรูปร่างเป็นท่อนสั้น ท่อนยาว ทรงกลมรูปไข่ และทรงกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์ นอกจากนี้ทุกไอโซเลทไม่สร้างเอนไซม์ catalase จึงยืนยันได้ว่าเชื้อทั้ง 36 ไอโซเลท ที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบน่าจะเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก (Axelsson, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ลักษณะรูปร่าง การติดสีย้อมแกรม และความสามารถในการสร้าง catalase ของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้

ลำดับ	ตัวอย่าง	รูปร่างลักษณะเซลล์	การติดสีแกรม	catalase test
1	NP1.4	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
2	NP1.5	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
3	NP1.7	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
4	NP1.8	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
5	NP2.1	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
6	NP2.2	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
7	NP2.4	ทรงกลมรูปไข่	แกรมบวก	-
8	NP 2.5	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
9	NP3.5	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
10	NP3.6	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
11	NP3.8	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
12	NP3.10	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
13	NP4.3	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
14	NP4.4	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
15	NP4.10	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
16	NP5.1	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
17	NP5.2	ทรงกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์	แกรมบวก	-
18	NP5.3	ทรงกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์	แกรมบวก	-
19	NP5.4	ทรงกลมรูปไข่	แกรมบวก	-
20	NP5.6	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
21	NP5.7	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
22	NP5.8	ทรงกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์	แกรมบวก	-
23	NP5.9	ทรงกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์	แกรมบวก	-
24	NP5.10	ทรงกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์	แกรมบวก	-
25	NP6.2	ทรงกลมรูปไข่	แกรมบวก	-
26	NP7.3	ทรงกลมรูปไข่	แกรมบวก	-
27	NP7.5	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
28	NP7.8	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
29	NP7.9	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
30	NP9.3	ทรงกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์	แกรมบวก	-
31	NP9.5	ทรงกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์	แกรมบวก	-
32	NP10.4	ท่อนยาว	แกรมบวก	-
33	NP10.6	ทรงกลมรูปไข่	แกรมบวก	-
34	NP10.7	ทรงกลมรูปไข่	แกรมบวก	-
35	NP10.8	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-
36	NP10.9	ท่อนสั้น	แกรมบวก	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่มีต่อเชื้อทดสอบชนิดต่าง ๆ

จากการนำสารยับยั้งเชื้อทดสอบที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก 12 ไอโซเลท ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบเบื้องต้นได้ดี (ตารางที่ 4.3) ได้แก่ไอโซเลท NP1.4, NP2.1, NP2.4, NP3.8, NP3.10, NP5.4, NP6.2, NP7.3, NP7.8, NP7.9, NP10.6 และ NP10.7 มาทดสอบยืนยันความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 21 ชนิด รวมถึงแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ โดยวิธี spot-on-lawn แบบ 2 fold dilution (ภาพที่ 4.3) พบว่ามีเพียงส่วนใสจากแบคทีเรียแลคติก NP3.8 และ NP5.4 ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ (ตารางที่ 4.5) โดยไอโซเลท NP 3.8 ยับยั้งได้ 16 ชนิด และยับยั้ง *B. coagulans* JCM 2257 และ *Lis. innocua* ATCC 33090 ได้ดีที่สุด (1,600 AU/ml) แต่ไม่สามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778, *B. subtilis* JCM 1465, *E. coli* JM 109, *M. luteus* IFO 12708 และ *Sal.* Anatum WHO-BKK ได้ รวมทั้งไม่ยับยั้งตัวเอง และไม่ยับยั้งแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท NP5.4

ในขณะที่ไอโซเลท NP5.4 สามารถผลิตสารในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 19 ชนิด ยับยั้งโดยเฉพาะสามารถยับยั้ง *Lb. sakei* JCM 1157 ได้ดีที่สุด (3,200 AU/ml) และสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *B. subtilis* JCM 1465, *B. cereus* ATCC 1178 และ *Lis. innocua* LTH 3096 แต่ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* JM 109, *Sal.* Anatum WHO-BKK และ *Lc. lactis* JCM 7638 ได้ นอกจากนี้ยังยับยั้งแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท NP3.8 (200 AU/ml) แต่ไม่ยับยั้งตัวเอง

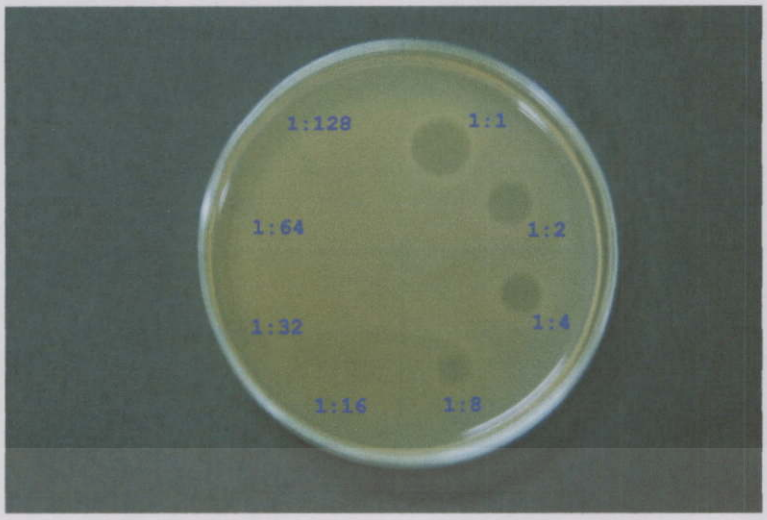
ส่วนอีก 10 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้เหมือนกับการทดลองโดยวิธี direct colony spot method ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าสภาพการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว MRS broth ไม่มีความเหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง มีงายวิจัยของ Schillinger and Luecke (1989) รายงานว่ามีกลุ่มแบคทีเรียแลคติกหลายกลุ่มที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมัก พบว่ามีการสร้างแบคเทอริโอซินโดยวิธี direct colony spot method แต่เมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเหลวหลายชนิดกลับไม่มีการสร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งจากการทดลองนี้เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว และกำจัดเซลล์ออกไปโดยการปั่นเหวี่ยงเซลล์ได้เป็น crude cell-free preparation of bacteriocin แล้วนำไปปรับค่า pH ให้เป็นกลาง เพื่อกำจัดปัจจัยความเป็นกรดไม่ให้เข้ามารบกวนผลการทดลองที่อาจเบี่ยงเบนได้ จากผลการทดลองนี้อาจเป็นไปได้ว่าเชื้อทั้ง 10 ไอโซเลทนั้น อาจมีประสิทธิภาพในการผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีควบคู่ไปกับการเจริญของเซลล์ในอาหาร หรืออาจมีความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่ต่ำเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว ดังนั้นเมื่อใช้แต่ส่วนใสที่เหวี่ยงแยกเซลล์ออกไปมาทดสอบกับเชื้อ ทำให้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ประสิทธิภาพของสารจากแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 23 ชนิด

เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้นของสารยับยั้ง (AU/ml)	
	NP3.8	NP5.4
1. *Bacillus cereus* ATCC 11778	0	400
2. *Bacillus circulans* JCM 2504	800	100
3. *Bacillus coagulans* JCM 2257	1,600	100
4. *Bacillus subtilis* JCM 1465	0	1600
5. *Escherichia coli* JM 109	0	0
6. *Enterococcus faecalis* JCM 5803	400	200
7. *Kokuria varians* LTH 1545	800	100
8. *Listeria innocua* ATCC 33090	1,600	100
9. *Listeria innocua* LTH 3096	200	400
10. *Micrococcus luteus* IFO 12708	0	200
11. *Salmonella* Anatum WHO-BKK	0	0
12. *Staphylococcus aureus* ATCC 6538	100	100
13. *Staphylococcus carnosus* LTH 2102	200	100
14. *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014	800	800
15. *Lactobacillus sakei* JCM 1157	800	3,200
16. *Lactococcus lactis* JCM 7638	100	0
17. *Lactococcus cremoris* TUA 1344L	800	1,600
18. *Leuconostoc mesenteroides* JCM 6124	400	800
19. *Pediococcus pentosaceus* JCM 5885	400	1,600
20. *Pediococcus pentosaceus* JCM 5890	400	800
21. *Streptococcus salivarius* JCM 5707	800	800
22. NP3.8	0	200
23. NP5.4	0	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก NP3.8 ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Lis. innocua* ATCC 33090 โดยวิธี spot-on-lawn

จากผลการทดลองที่ได้จึงคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลท คือ NP3.8 และNP5.4 ไปศึกษาชนิดของสายพันธุ์ และสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น เพื่อพิสูจน์คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินในขั้นตอนต่อไป

4.5 การทดสอบยืนยันว่าสารยับยั้งที่ผลิตได้เป็นแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำสารยับยั้งเชื้อทดสอบที่ได้จากแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท NP3.8 และ NP5.4 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี มาทดสอบยืนยันคุณสมบัติกวามเป็นแบคเทอริโอซิน ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes) (ตารางที่ 4.6) พบว่า ส่วนใสจากแบคทีเรียแลคติก NP3.8 ที่ใช้ *Lis. innocua* ATCC 33090 เป็นเชื้อทดสอบ และ NP5.4 ที่ใช้ *Lb. sakei* JCM 1157 เป็นเชื้อทดสอบ ถูกยับยั้งประสิทธิภาพอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ α- chymotrypsin , ficin และ trypsin หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แต่ไม่ถูกยับยั้งประสิทธิภาพด้วยเอนไซม์ proteinase K ส่วนใสจากแบคทีเรียแลคติก NP3.8 กับ NP5.4 ยังคงเหลือประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบคือ 200 AU/ml เมื่อทดสอบกับเอนไซม์ pepsin ส่วนใสจากแบคทีเรียแลคติก NP3.8 ยังคงเหลือประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบคือ 100 AU/ml ส่วนใสจากแบคทีเรียแลคติก NP5.4 ยังคงเหลือประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบคือ 800 AU/ml และเมื่อทดสอบกับเอนไซม์ protease XIII ส่วนใสจากแบคทีเรียแลคติก NP3.8 กับ NP5.4 ยังคงเหลือประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบคือ 400 AU/ml แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งเชื้อทดสอบที่คัดแยกได้จากแหนมปลา ทั้ง 2 ไอโซเลทมีคุณสมบัติเป็นสารโปรตีน เนื่องจากแบคเทอริโอซินมีโครงสร้างเป็นเปปไทด์สามารถถูก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยโปรตีนประเภทโปรติเอส จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร ทนต่อความร้อนได้สูง ที่ pH ต่ำได้ดี (O' Sullivan *et al.*, 2002)

ตารางที่ 4.6 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารยับยั้งที่ได้จาก NP3.8 และ NP5.4 (วิธี spot-on-lawn แบบ 2 fold dilution)

เอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ		ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ยังเหลือ (AU/ml)	
		NP3.8	NP5.4
Control	pH 3.0	3,200	3,200
Control	pH 6.5	1,600	1,600
α- Chymotrypsin	pH 6.5	0	0
Ficin	pH 6.5	0	0
Proteinase K	pH 6.5	200	200
Trypsin	pH 6.5	0	0
Pepsin	pH 3.0	100	800
Protease XIII	pH 3.0	400	400

NP3.8 ใช้ *Lis. innocua* ATCC 33090 เป็นเชื้อทดสอบ

NP5.4 ใช้ *Lb. sakei* JCM 1157 เป็นเชื้อทดสอบ

สอดคล้องกับการศึกษาของ สมใจ และคณะ (2550) ได้นำเชื้อรหัส FFL17-2 ซึ่งเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* คัดแยกจากแหนมปลาเช่นเดียวกัน มาทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน trypsin ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่ายับยั้งเชื้อได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเอนไซม์

4.6 การทดสอบการทนความร้อนของแบคเทอริโอซิน

จากที่กล่าวถึงคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินดังกล่าวข้างต้น นอกจากคุณสมบัติการเป็นโปรตีนของแบคเทอริโอซินแล้ว คุณสมบัติอีกอย่างหนึ่งคือการทนความร้อนที่ pH ต่ำ ของแบคเทอริโอซิน จึงทำการทดลองการทนความร้อน และค่า pH ต่าง ๆ (ตารางที่ 4.7)

จากผลการทดสอบยืนยันคุณสมบัติการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินโดยวิธี spot-on-lawn แบบ 2 fold dilution พบว่าส่วนใสจากแบคทีเรียแลกติก NP3.8 ที่ใช้ *Listeria innocua* ATCC 33090 เป็นเชื้อทดสอบ ถูกปรับค่า pH เป็น 3.0 และให้ความร้อนสูง ยังคงมีประสิทธิภาพใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

การยับยั้งเชื้อทดสอบอยู่ คือที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที (1,600 AU/ml) และ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที (400 AU/ml)

ตารางที่ 4.7 ผลการทดสอบการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินที่ได้จาก NP3.8 และ NP5.4 (วิธี spot-on-lawn แบบ 2 fold dilution)

ไอโซเลท	ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ยังเหลือ (AU/ml)					
	pH 3.0			pH 6.5		
	ชุดควบคุม	100°C 10 นาที	121°C 15 นาที	ชุดควบคุม	100°C 10 นาที	121°C 15 นาที
NP3.8	3,200	1,600	400	1,600	800	100
NP5.4	3,200	800	200	1,600	400	0

NP3.8 ใช้ *Lis. innocua* ATCC 33090 เป็นเชื้อทดสอบ

NP5.4 ใช้ *Lb. sakei* JCM 1157 เป็นเชื้อทดสอบ

ส่วนใสจากแบคทีเรียแลคติก NP3.8 ที่ปรับค่า pH เป็น 6.5 และให้ความร้อนสูง ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบเช่นกัน คือที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที (800 AU/ml) และ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที (100 AU/ml) แต่ค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบอาจลดลงบ้าง แสดงว่าสารยับยั้งจาก NP3.8 จัดว่าเป็นแบคเทอริโอซินที่ทนความร้อนได้สูง เมื่อมีค่า pH ที่ต่ำ ส่วนใสจากแบคทีเรียแลคติก NP5.4 ถูกปรับค่า pH เป็น 3.0 และให้ความร้อนสูง ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อดสอบอยู่ คือที่ 100 °C เป็นเวลา 10 นาที (800 AU/ml) และ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที (200 AU/ml) ส่วนใสจากแบคทีเรียแลคติก NP5.4 ที่ปรับค่า pH เป็น 6.5 และให้ความร้อน ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ คือที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที (400 AU/ml) แต่เมื่อให้ความร้อนสูงถึง 121 °C เป็นเวลา 15 นาที สารยับยั้งจาก NP5.4 ถูกทำลายประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งการเจริญของทดสอบ เป็นสารโปรตีนที่ทนความร้อนได้สูง และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีในสภาพที่มีความเป็นกรด ดังนั้นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตขึ้นจาก NP3.8 และ NP5.4 จึงจัดได้ว่าเป็นสารในกลุ่มแบคเทอริโอซิน ตามที่ Klaenhammer (1993) ; O'Sullivan *et al.*(2002) ได้ให้คำจำกัดความไว้คือ แบคเทอริโอซินเป็นสายเปปไทด์ของโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ไวต่อสารเคมี และทนความร้อนได้สูง ในสภาวะที่มีค่า pH ต่ำ สอดคล้องกับการศึกษาของ สมใจ และคณะ (2550) ได้นำเชื้อรหัส FFL17-2 ซึ่งเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* คัดแยกจากแหนมปลาเช่นเดียวกัน พบว่าทนความร้อนได้นาน 100°C เป็นเวลา 10 นาที มีความคงตัวดีในช่วง pH 4 – 7

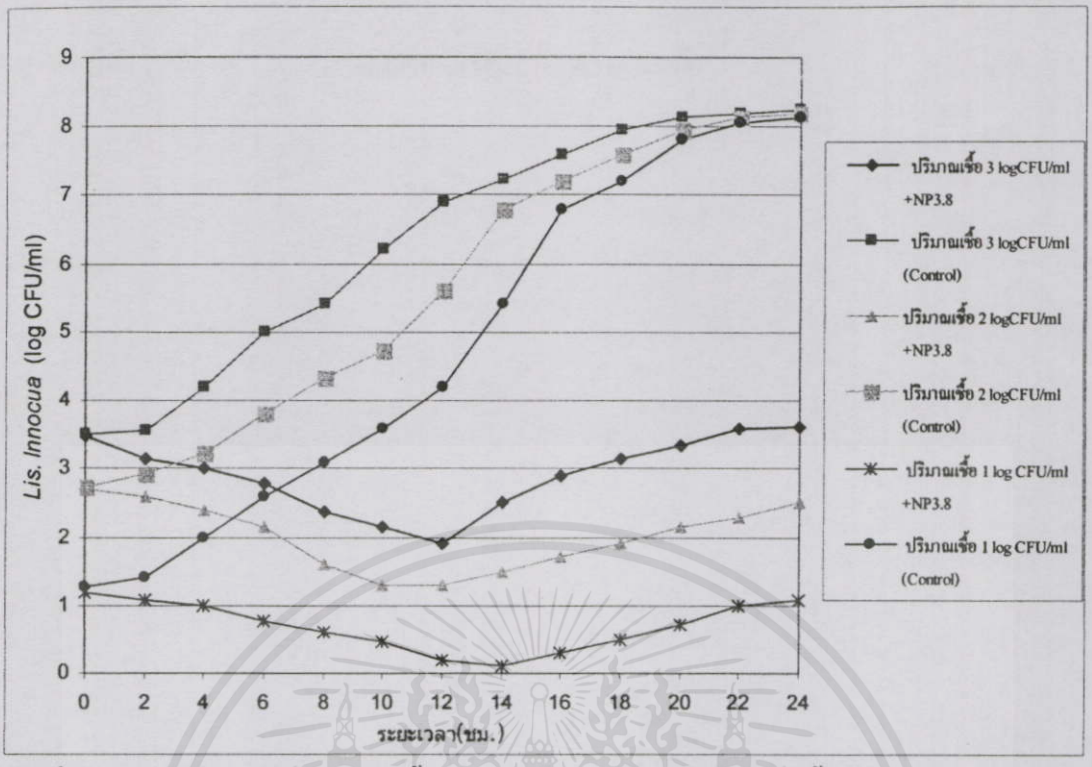
4.7 การศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารหลว

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินจาก NP3.8 ในการลดปริมาณเชื้อ *Lis. innocua* ATCC 33090 โดยใส่ส่วนใสที่มีแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก NP3.8 ลงไป 2% ในอาหารเหลว TSB+0.6% YE ผสมเชื้อ *Lis. innocua* ATCC 33090 ที่ระดับความเข้มข้น 10^1, 10^2 และ 10^3 CFU/ml เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่ไม่มีการใส่ส่วนใสที่มีแบคเทอริโอซิน (ตารางที่ 4.8 และภาพที่ 4.4) พบว่า *Lis. innocua* ATCC 33090 ที่ความเข้มข้น 10^1 CFU/ml ของตัวอย่างที่ใส่ส่วนใสจาก NP3.8 มีเชื้อ *Lis. innocua* ATCC 33090 เริ่มต้นปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ไม่ใส่ส่วนใสจาก NP3.8) คืออยู่ในระดับ 1.18 – 1.26 $\log_{10}$CFU/ml แต่เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณเชื้อทดสอบในชุดที่ใส่ส่วนใสจาก NP3.8 จะลดลงตามลำดับ และมีปริมาณต่ำสุด 0.1 $\log_{10}$CFU/ml ในชั่วโมงที่ 14 หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น

ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Lis. innocua* ATCC 33090 เมื่อมีการใส่สาร NP3.8 ลงไปทดสอบในอาหารเหลว TSB+0.6%YE แสดงผลเป็นค่า $\log_{10}$CFU/ml

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ทดสอบด้วยสาร 2% NP3.8 ในอาหารเหลว TSB+0.6% YE ปริมาตรรวม 100 มล.					
	ปริมาณเชื้อทดสอบ 10^1/ml		ปริมาณเชื้อทดสอบ 10^2/ml		ปริมาณเชื้อทดสอบ 10^3/ml	
	ใส่ NP3.8	Control	ใส่ NP3.8	Control	ใส่ NP3.8	Control
0	1.18	1.26	2.70	2.72	3.49	3.51
2	1.08	1.42	2.60	2.94	3.14	3.56
4	1.00	2.00	2.41	3.24	3.02	4.20
6	0.78	2.60	2.15	3.80	2.79	5.00
8	0.60	3.08	1.60	4.34	2.38	5.40
10	0.48	3.60	1.30	4.72	2.15	6.20
12	0.20	4.20	1.30	5.60	1.90	6.90
14	0.10	5.40	1.48	6.80	2.50	7.23
16	0.30	6.80	1.70	7.20	2.90	7.59
18	0.50	7.20	1.90	7.60	3.14	7.95
20	0.72	7.80	2.15	7.96	3.34	8.15
22	1.00	8.06	2.30	8.14	3.58	8.20
24	1.08	8.14	2.51	8.20	3.62	8.26

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.4 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Lis. innocua* ATCC 33090 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว TSB+0.6% YE ผสมส่วนใสที่ได้จาก NP3.8 ลงไป 2% ที่อุณหภูมิ 30°C เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

1.08 log $_{10}$CFU/ml ในขณะที่ชุดควบคุมปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ระยะแรกจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น เป็น 8.14 log $_{10}$CFU/ml แต่เมื่อใช้ *Lis. innocua* ATCC 33090 ที่ความเข้มข้น 10^2 CFU/ml พบว่ามีเชื้อเริ่มต้นปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุม คืออยู่ในระดับ 2.70 – 2.72 log $_{10}$CFU/ml แต่เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณเชื้อทดสอบในชุดที่ใส่ส่วนใสจาก NP3.8 จะลดลงตามลำดับ และมีปริมาณต่ำสุด 1.30 log $_{10}$CFU/ml ในชั่วโมงที่ 10 หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 2.51 log $_{10}$CFU/ml ในขณะที่ชุดควบคุมปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะแรกจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 8.20 log $_{10}$CFU/ml สำหรับ *Lis. innocua* ATCC 33090 ที่ความเข้มข้น 10^3 CFU/ml พบว่ามีเชื้อเริ่มต้นปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุม คืออยู่ในระดับ 3.49 – 3.51 log $_{10}$CFU/ml แต่เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณเชื้อทดสอบในชุดที่ใส่ส่วนใสจาก NP3.8 จะลดลงตามลำดับ และมีปริมาณต่ำสุด 1.90 log $_{10}$CFU/ml ในชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 3.62 log $_{10}$CFU/ml ในขณะที่ชุดควบคุมปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ระยะแรกจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น เป็น 8.26 log $_{10}$CFU/ml

จึงจัดได้ว่าสารยับยั้งจาก NP3.8 เป็นแบคเทอริโอซินที่สามารถทำลายจุลินทรีย์บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อทดสอบได้ ทำให้เชื้อทดสอบถูกทำลายลงไปมีปริมาณเชื้อลดลงเมื่อผ่านไป

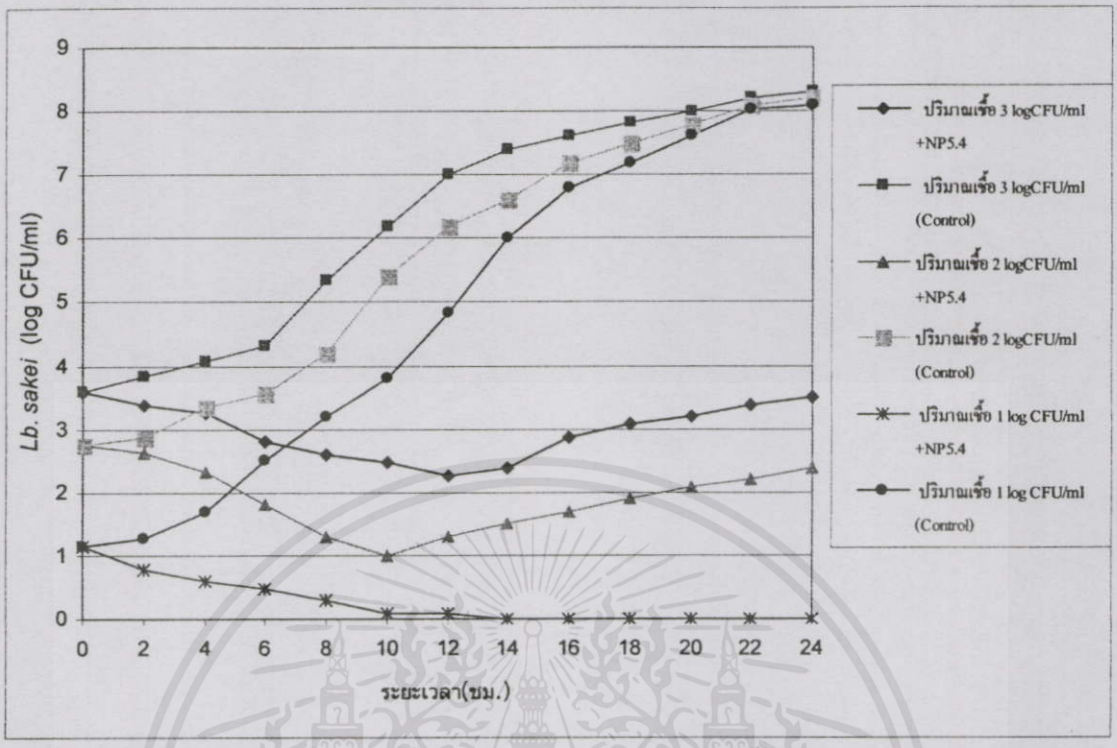
ระยะเวลาหนึ่ง แต่หลังจากนั้นเชื้อทดสอบที่เหลือรอดชีวิตก็อาจจะสามารถเพิ่มจำนวนขึ้นมาใหม่ได้ในอาหารเหลว เมื่อมีการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลานานขึ้น อาจเป็นเพราะแบคเทอริโอซินที่ใช้ทดสอบยังมีปริมาณน้อยเกินไปในการจะใช้ทำลายเชื้อทดสอบให้หมดลงไป

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินจาก NP5.4 ในการลดปริมาณเชื้อ *Lb. sakei* JCM 1157 โดยใส่ส่วนใสที่มีแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก NP5.4 ลงไป 2% ในอาหารเหลว MRS broth ผสมเชื้อ *Lb. sakei* JCM 1157 ที่ระดับความเข้มข้น 10^1, 10^2 และ 10^3 CFU/ml เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ที่ไม่ใส่ส่วนใสที่มีแบคเทอริโอซิน (ตารางที่ 4.9 และภาพที่ 4.5) พบว่า *Lb. sakei* JCM 1157 ที่ความเข้มข้น 10^1 CFU/ml พบว่ามีเชื้อ *Lb. sakei* JCM 1157 เริ่มต้นปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุม (ไม่ใส่ส่วนใสจาก NP5.4) คืออยู่ในระดับ 1.15 $\log_{10}$CFU/ml แต่เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณเชื้อทดสอบในชุดที่ใส่ส่วนใสจาก NP5.4 จะลดลงตามลำดับ และมีปริมาณต่ำสุดเป็น 0 $\log_{10}$CFU/ml ในชั่วโมงที่ 14 – 24 แสดงว่าสาร NP5.4 สามารถทำลายเชื้อทดสอบได้หมด

ตารางที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Lb. sakei* JCM 1157 เมื่อมีการใส่สาร NP5.4 ลงไปทดสอบในอาหารเหลว MRS broth แสดงผลเป็นค่า $\log_{10}$CFU/ml

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ทดสอบด้วยสาร 2% NP5.4 ในอาหารเหลว MRS broth ปริมาตรรวม 100 มล.					
	ปริมาณเชื้อทดสอบ 10^1/ml.		ปริมาณเชื้อทดสอบ 10^2/ml.		ปริมาณเชื้อทดสอบ 10^3/ml.	
	ใส่ NP5.4	Control	ใส่ NP5.4	Control	ใส่ NP5.4	Control
0	1.15	1.15	2.75	2.76	3.58	3.60
2	0.78	1.26	2.64	2.88	3.38	3.83
4	0.60	1.70	2.34	3.34	3.26	4.08
6	0.48	2.50	1.82	3.56	2.82	4.32
8	0.30	3.20	1.30	4.20	2.60	5.34
10	0.10	3.80	1.00	5.40	2.48	6.20
12	0.10	4.82	1.30	6.20	2.26	7.00
14	0	6.00	1.50	6.60	2.40	7.40
16	0	6.80	1.70	7.20	2.88	7.60
18	0	7.20	1.90	7.48	3.09	7.82
20	0	7.60	2.08	7.80	3.21	8.00
22	0	8.04	2.20	8.10	3.39	8.20
24	0	8.10	2.38	8.20	3.51	8.32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่อนุญาตให้ทำซ้ำ ดัดแปลง เผยแพร่ หรือนำไปขายต่อ ในรูปแบบใดๆ ทั้งสิ้น ไม่ว่ากรณีใดๆ โดยไม่ได้รับอนุญาตเป็นลายลักษณ์อักษรจากผู้เขียน



ภาพที่ 4.5 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ *Lb. sakei* JCM 1157 เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS broth ผสมส่วนใสที่ได้จาก NP5.4 ลงไป 2% ที่อุณหภูมิ 30°C เปรียบเทียบกับชุดควบคุม

ในขณะที่ชุดควบคุมปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ระยะแรกจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น เป็น 8.10 log $_{10}$CFU/ml แต่เมื่อใช้ *Lb. sakei* JCM 1157 ที่ความเข้มข้น 10^2 CFU/ml พบว่ามีเชื้อเริ่มต้นปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุม คืออยู่ในระดับ 2.75 – 2.76 log $_{10}$CFU/ml แต่เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณเชื้อทดสอบในชุดที่ใส่ส่วนใสจาก NP5.4 จะลดลงตามลำดับ และมีปริมาณต่ำสุด 1.00 log $_{10}$CFU/ml ในชั่วโมงที่ 10 หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 2.38 log $_{10}$CFU/ml ในขณะที่ชุดควบคุมปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะแรกจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 8.20 log $_{10}$CFU/ml สำหรับ *Lb. sakei* JCM 1157 ที่ความเข้มข้น 10^3 CFU/ml พบว่ามีเชื้อเริ่มต้นปริมาณใกล้เคียงกับชุดควบคุม คืออยู่ในระดับ 3.58 – 3.60 log $_{10}$CFU/ml แต่เมื่อเวลาผ่านไป ปริมาณเชื้อทดสอบในชุดที่ใส่ส่วนใสจาก NP5.4 จะลดลงตามลำดับ และมีปริมาณต่ำสุด 2.26 log $_{10}$CFU/ml ในชั่วโมงที่ 12 หลังจากนั้นปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้นเป็น 3.51 log $_{10}$CFU/ml ในขณะที่ชุดควบคุมปริมาณเชื้อจะเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตั้งแต่ระยะแรกจนถึงชั่วโมงที่ 24 มีปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น เป็น 8.32 log $_{10}$CFU/ml

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จึงจัดได้ว่าสารยับยั้งจาก NP5.4 สามารถทำลายจุลินทรีย์ที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อทดสอบได้ ทำให้เชื้อทดสอบถูกทำลายลงไปมีปริมาณเชื้อลดลงเมื่อผ่านไประยะเวลาหนึ่ง แต่

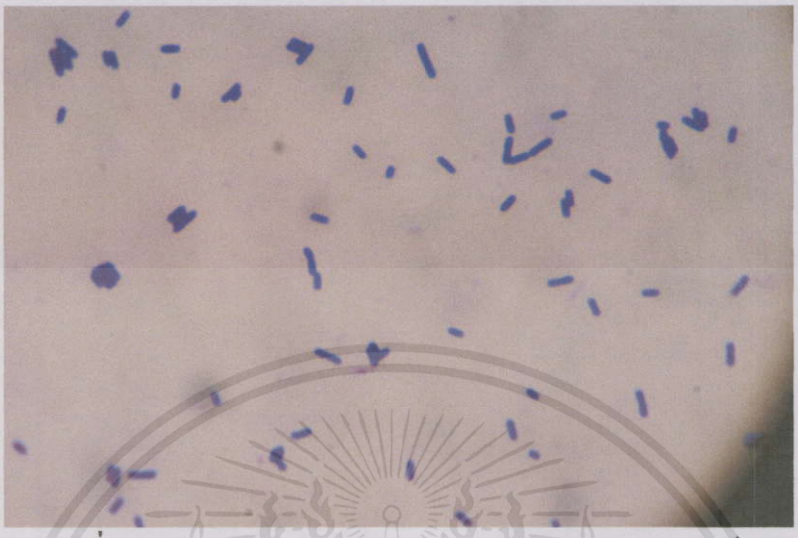
หลังจากนั้นเชื้อทดสอบที่เหลือรอดชีวิตก็สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นมาใหม่ได้ในอาหารเหลว เมื่อมีการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลานานขึ้น อาจเป็นเพราะแบคเทอริโอซินที่ใช้ทดสอบยังมีปริมาณน้อยเกินไปในการจะใช้ทำลายเชื้อทดสอบให้หมดลงไปได้

4.8 การทดสอบการย่อยสารคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลคติก

จากการทดสอบลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท NP3.8 คัดแยกจากแหนมปลากรายนิตยา พบว่ามีลักษณะเซลล์รูปร่างเป็นท่อนยาว ติดสีย้อมแกรมบวก (ภาพที่ 4.6) และไอโซเลท NP5.4 คัดแยกแหนมปลาส้มฟักเจ้าตำหรับแม่น้อย มีลักษณะเซลล์ทรงกลมรูปไข่ ติดสีย้อมแกรมบวก (ภาพที่4.7) จากผลการทดลองการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆ ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท NP3.8 และ NP5.4 (ตารางที่ 4.10) โดยชุดตรวจ API 50 CH ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆอยู่ 49 ชนิด จำนวน 49 ช่อง และมีช่องควบคุมที่ไม่น้ำตาล 1 ช่อง โดยสังเกตการณ์เปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่มีแบคทีเรียแลคติกอยู่หยดลงไปในแต่ละช่องของชุดทดสอบ หลังจากนำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 – 48 ชั่วโมง โดยช่องที่มีการย่อยน้ำตาลแล้วเกิดกรดจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง (+) ถ้าเป็นสีเขียว (?) แสดงว่ามีการหมักย่อยน้ำตาลไม่สมบูรณ์ และช่องที่ไม่เกิดการเปลี่ยนสีแสดงว่าไม่มีการย่อยน้ำตาลเกิดขึ้น (-) นำผลที่ได้ไปอ่านผลหาความสัมพันธ์กับของชนิดเชื้อ ในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก จาก API 50 CH database

เมื่อนำไปหาความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจาก API 50 CH Database พบว่าไอโซเลท NP3.8 มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* 99.9% และไอโซเลท NP5.4 มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 92.6% ซึ่งแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มีความสอดคล้องกับรูปพรรณสัณฐานที่ได้จากการย้อมสีแกรม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.6 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ NP3.8

ภาพที่ 4.7 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ NP5.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.10 ผลการย่อยสารคาร์โบไฮเดรต ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ โดยชุดตรวจ API 50 CH

No.	น้ำตาลทดสอบ	NP3.8	NP5.4	NO.	น้ำตาลทดสอบ	NP3.8	NP5.4
1	Control	-	-	26	Esculin	+	+
2	Glyceral	-	-	27	Salicin	+	+
3	Erythritol	-	-	28	Cellobiose	+	+
4	D-Arabinose	-	-	29	Maltose	+	+
5	L-Arabinose	+	-	30	Lactose	+	+
6	Ribose	+	+	31	Melibiose	-	-
7	D-Xylose	-	+	32	Saccharose	+	+
8	L-Xylose	-	-	33	Trehalose	+	+
9	Adonitol	-	-	34	Inulin	?	-
10	β-Methy-xyloside	-	-	35	Melezitose	+	-
11	Galactose	+	+	36	D-Raffinose	-	-
12	D-Glucose	+	+	37	Amidon	-	?
13	D-Fructose	+	+	38	Glycogene	-	-
14	D-Mannose	+	+	39	Xylitol	-	-
15	L-Sorbose	-	-	40	β-Gentiobiose	?	+
16	Rhamnose	-	-	41	D-Turanose	+	-
17	Dulcitol	-	-	42	D-Lyxose	-	-
18	Inositol	-	-	43	D-Tagatose	-	-
19	Mannitol	+	+	44	D-Fucose	-	-
20	Sorbitol	+	-	45	L-Fucose	-	-
21	α-Methyl-D-mannoside	+	-	46	D-Arabitol	-	-
22	α-Methyl-D-glucoside	-	-	47	L-Arabitol	-	-
23	N-Acetyl glucosamine	+	+	48	Gluconate	?	?
24	Amygdalin	+	?	49	2-Ketogluconate	-	-
25	Arbutin	+	+	50	5-Ketogluconate	-	-

ผล (+) หมายถึงมีการหมักย่อยสารคาร์โบไฮเดรตได้ เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ผล (–) หมายถึงไม่สามารถย่อยสารคาร์โบไฮเดรต ไม่เปลี่ยนสีม่วง

ผล (?) แสดงว่ามีการหมักย่อยน้ำตาลไม่สมบูรณ์ เป็นสีเขียว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.9 การทดสอบทางด้านการยอมรับของผู้บริโภค ต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลา

เมื่อนำ *Lb. plantarum* (NP3.8) และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* (NP5.4) ที่ได้จากการทดลองข้างต้น มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมปลา เปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ พบว่าแหนมปลาสูตร 010 ที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP3.8 ทำให้แหนมปลามีการหมักที่รวดเร็วที่สุด วัดค่า pH ในวันที่ 3 วัดได้ 4.45 และมีปริมาณกรดแลคติก 1.13% ผลิตภัณฑ์แหนมปลาจึงมีสีชมพูและมีรสชาติเปรี้ยวมากที่สุด ส่วนแหนมปลาสูตร 020 ที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP5.4 ทำให้แหนมปลามีการหมักที่ช้าที่สุด วัดค่า pH ในวันที่ 3 ได้ 4.74 และมีปริมาณกรดแลคติก 0.95% ผลิตภัณฑ์แหนมปลาจึงมีสีที่ดูซีดกว่าและมีรสชาติเปรี้ยวน้อยกว่าสูตรอื่นๆ ส่วนแหนมปลาสูตร 030 ที่มีการหมักแบบธรรมชาติ ไม่มีการเติมแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ แหนมปลามีกระบวนการหมักที่ปานกลาง วัดค่า pH ในวันที่ 3 วัดได้ 4.62 และมีปริมาณกรดแลคติก 1.04% ผลิตภัณฑ์แหนมปลามีสีชมพูและมีรสชาติเปรี้ยวพอเหมาะ (ตารางที่ 4.11)

ตารางที่ 4.11 การตรวจวิเคราะห์ค่า pH และ ปริมาณกรดแลคติก ของแหนมปลา 3 สูตร

ผลิตภัณฑ์แหนมปลา	010				020				030			
ระยะเวลาการหมัก (วัน)	0	1	2	3	0	1	2	3	0	1	2	3
ค่าpH	7.36	5.14	4.64	4.45	7.15	5.28	4.93	4.74	7.31	5.30	4.80	4.62
กรดแลคติก (%)	0.45	0.72	0.90	1.13	0.54	0.63	0.76	0.95	0.49	0.68	0.81	1.04

รหัส 010 หมายถึงแหนมปลาที่มีการใส่แบคทีเรียแลคติก NP3.8

รหัส 020 หมายถึงแหนมปลาที่มีการใส่แบคทีเรียแลคติก NP5.4

รหัส 030 หมายถึงแหนมปลาที่มีการหมักแบบธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.12 ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของรสชาติผลิตภัณฑ์แหนมปลา ทั้ง 3 สูตร

การทดสอบ	ผลิตภัณฑ์แหนมปลาแบบต่างๆ		
	010	020	030
สี	7.00 ± 0.76^{a}	5.47 ± 0.68^{b}	6.80 ± 0.74^{a}
กลิ่น	6.37 ± 0.57^{a}	5.43 ± 0.68^{b}	6.57 ± 0.76^{a}
รสชาติ	6.70 ± 0.70^{a}	5.57 ± 0.57^{b}	6.77 ± 0.82^{a}
ความเปรี้ยว	7.23 ± 0.70^{a}	5.80 ± 0.66^{c}	6.70 ± 0.77^{b}
เนื้อสัมผัส	6.97 ± 0.72^{a}	5.63 ± 0.67^{b}	7.17 ± 0.79^{a}
ความชอบโดยรวม	6.90 ± 0.66^{b}	5.73 ± 0.58^{c}	7.60 ± 0.72^{a}

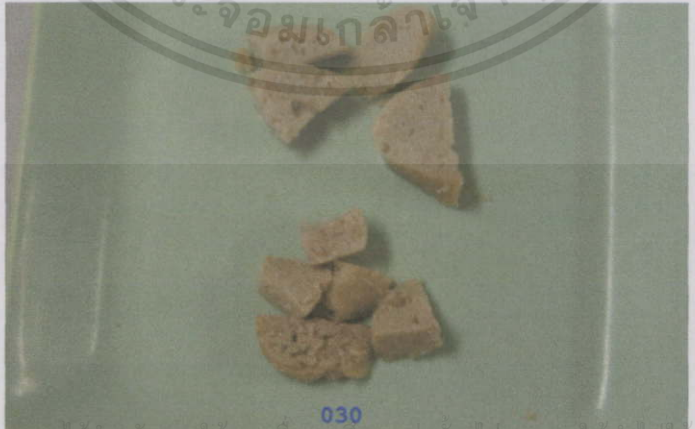
ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากการทดสอบทางด้านการยอมรับของผู้บริโภค ต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลาทั้ง 3 สูตร โดยพิจารณาปัจจัยคุณภาพทางประสาทสัมผัส คือ สี กลิ่น รสชาติ ความเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และความชอบรวม ของแหนมปลาที่หมักโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก เปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักตามธรรมชาติ โดยวิธีทดสอบฮีโดนิก แบบ 9 จุด ใช้ผู้ทดสอบที่ได้ผ่านการฝึกฝน และชอบบริโภคแหนม จำนวน 30 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) คำนวณโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS แสดงผลการวิเคราะห์ด้วยตาราง Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 4.12) พบว่า ค่าความแตกต่างของคะแนนความชอบด้านสี กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 020 มีค่าคะแนนความชอบแตกต่างจากแหนมปลาสูตรที่ 010 และ 030 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) กล่าวคือมีคะแนนความชอบด้านสีในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 010 และ 030 อยู่ที่ 6.80 – 7.00 คะแนน คือมีความชอบด้านสี ในระดับความชอบปานกลาง สำหรับคะแนนความชอบด้านกลิ่นในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 010 และ 030 อยู่ที่ 6.37 – 6.57 คะแนน คือมีความชอบด้านกลิ่นในระดับความชอบเล็กน้อยถึงปานกลาง ส่วนคะแนนความชอบด้านรสชาติในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 020 และ 030 อยู่ที่ 6.70 – 6.77 คะแนน คือมีความชอบด้านรสชาติในระดับความชอบเล็กน้อยถึงปานกลาง และคะแนนความชอบด้านเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 010 และ 030 อยู่ที่ 6.97 – 7.17 คะแนน คือมีความชอบด้านเนื้อสัมผัสระดับความชอบปานกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 4.8 แหนมปลา รหัส 010 คือแหนมปลาที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP3.8

ภาพที่ 4.9 แหนมปลา รหัส 020 คือแหนมปลาที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP5.4



ภาพที่ 4.10 แหนมปลา รหัส 030 คือแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งไม่อนุญาตให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับค่าความแตกต่างของคะแนนความชอบด้านความเปรี้ยวในผลิตภัณฑ์แหนมปลา พบว่าแหนมปลาสูตร 010, 020 และ 030 มีค่าความแตกต่างกัน ทั้ง 3 สูตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยคะแนนความชอบด้านความเปรี้ยวพบว่าในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 010 มีคะแนนความชอบมากที่สุด คือ 7.23 คะแนน รองลงมาได้แก่แหนมปลาสูตร 030 และ 020 ที่มีคะแนนความชอบอยู่ที่ 6.70 และ 5.80 ตามลำดับ ส่วนค่าความแตกต่างของคะแนนความชอบรวมในผลิตภัณฑ์แหนมปลา พบว่าแหนมปลาสูตร 010, 020 และ 030 มีค่าความแตกต่างกัน ทั้ง 3 สูตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยคะแนนความชอบด้านความชอบรวมพบว่าในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 030 มีคะแนนความชอบมากที่สุด คือ 7.60 คะแนน รองลงมาได้แก่แหนมปลาสูตร 010 และ 020 ที่มีคะแนนความชอบอยู่ที่ 6.90 และ 5.73 ตามลำดับ

จากผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของรสชาติผลิตภัณฑ์แหนมปลา ทั้ง 3 สูตร พบว่าแหนมปลาสูตร 010 ที่มีการใส่แบคทีเรียแลคติก NP3.8 ทำให้มีกระบวนหมักเกิดขึ้นรวดเร็วที่สุด ได้ผลิตภัณฑ์แหนมปลามี สีชมพู กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสมีคุณภาพใกล้เคียงกับแหนมปลา สูตร 030 ที่มีการหมักแบบธรรมชาติไม่ได้ใส่แบคทีเรียแลคติก ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่ผลิตภัณฑ์แหนมปลาที่มีการใส่แบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจะมีข้อดีคือ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคที่อาจปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ทำให้เกิดกระบวนการหมักที่รวดเร็วขึ้น ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพสม่ำเสมอและเก็บรักษาได้นานกว่า (นภา , 2535) แต่แหนมปลาสูตร 020 ที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP5.4 มีกระบวนการหมักเกิดขึ้นช้ากว่าสูตรอื่นๆ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มีสีค่อนข้างซีด และมีรสชาติที่เปรี้ยวน้อยกว่าสูตรอื่นๆ จากการทดลองนี้ไม่ได้ทำผลิตภัณฑ์แหนมปลาที่มีการใส่เชื้อผสมของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ชนิดคือ NP3.8 และ NP5.4 ลงในสูตรเดียวกัน เพราะจากการทดลองหาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี spot-on-lawn พบว่าเชื้อ NP5.4 มีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ คือ NP3.8 เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์นี้มาใช้ในแหนมปลาสูตรเดียวกัน อาจผลมีในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติกด้วยกันเองได้ แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ NP3.8 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทำเป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมปลาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลคติก จากผลิตภัณฑ์แหนมปลาพร้อมบริโภคจากแหล่งผลิตต่างๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วง $1.7 \times 10^{7} - 4.4 \times 10^{9}$ CFU/g มีค่า pH 4.69 – 5.15 มีปริมาณกรดแลคติก 0.72 –1.13% ความชื้น 67.42 – 76.04% และค่า a_w 0.742 – 0.825 ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้ 100 ไอโซเลท เมื่อนำมาเมื่อนำมาทดสอบหาแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งกับเชื้อทดสอบ 8 ชนิด โดยวิธี direct colony spot method พบแบคทีเรียแลคติกที่มีแนวโน้มในการสารยับยั้งทั้งหมด 36 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 12 ไอโซเลท ที่ได้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบดีที่สุด ได้แก่ไอโซเลท NP1.4, NP2.1, NP2.4, NP3.8, NP3.10, NP5.4, NP6.2, NP7.3, NP7.8, NP7.9, NP10.6 และ NP10.7 เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลท มาตรวจสอบยืนยันการสร้างรแบคเทอริโอซินในอาหารเหลว MRS broth ทำการเหวี่ยงเซลล์กรองแยกส่วนใสมาทำการปรับค่า pH เป็น 6.5 แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อทดสอบ 23 ชนิด โดยวิธี spot-on-lawn พบว่ามีเพียงแบคทีเรียแลคติก 2 ไอโซเลท คือ NP3.8 คัดแยกมาจากแหนมปลากรายนิตยา และ NP5.4 คัดแยกมาจากปลาส้มฟักเจ้าตำหรับแม่น้อย สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยไอโซเลท NP3.8 สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ถึง 16 ชนิด โดยยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดี คือ *B. coagulans* JCM 2257 และ *Lis. innocua* ATCC 33090 (1,600 AU/ml)

ส่วนไอโซเลท NP5.4 สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 19 ชนิด โดยเฉพาะสามารถยับยั้ง *Lb. sakei* JCM 1157 (3,200 AU/ml) และสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี คือ *B. subtilis* JCM 1465, *B. cereus* ATCC 1178 และ *Lis. innocua* LTH 3096

จากการทดสอบยืนยันคุณสมบัติความเป็นโปรตีนของแบคเทอริโอซิน ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ พบว่าสารที่ผลิตจากเชื้อ NP3.8 และ NP5.4 ถูกยับยั้งประสิทธิภาพอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ α-chymotrypsin, ficin และ trypsin แต่ถูกยับยั้งประสิทธิภาพเพียงบางส่วนด้วยเอนไซม์ proteinase K, pepsin และ protease XIII แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งเชื้อทดสอบที่คัดแยกได้จากแหนมปลา ทั้ง 2 ไอโซเลท นี้มีคุณสมบัติเป็นสารโปรตีน

จากการทดสอบยืนยันคุณสมบัติการทนความร้อนของแบคเทอริโอซิน พบว่าสารที่ผลิตจากเชื้อ NP3.8 ที่ปรับค่า pH เป็น 3.0 และ 6.5 แม้ว่าจะถูกให้ความร้อนสูงที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที และ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที สารยับยั้งยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบอยู่ ส่วนสารที่ผลิตจากเชื้อ NP5.4 ที่ปรับค่า pH เป็น 3.0 และให้ความร้อนสูงที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที และ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที สารยับยั้งยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ส่วนสารที่ผลิตจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อ NP5.4 ที่ปรับค่า pH เป็น 6.5 และให้ความร้อนที่ 100°C เป็นเวลา 10 นาที ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบเช่นเดียวกัน แต่เมื่อให้ความร้อนสูงถึง 121 °C เป็นเวลา 15 นาที สารที่ผลิตจากเชื้อ NP5.4 ถูกทำลายประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ซึ่งจากคุณสมบัติของการถูกทำลายประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และการทนความร้อนของสารยับยั้งที่ pH ต่ำ จึงยืนยันได้ว่าสารยับยั้งที่ผลิตจาก NP3.8 และ NP5.4 น่าจะอยู่ในกลุ่มของแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ เมื่อมีการใส่ส่วนใสที่ผลิตจากเชื้อ NP3.8 และ NP5.4 ลงไปในอาหารเหลว พบว่าทั้ง NP3.8 และ NP5.4 สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อทดสอบในอาหารเหลวได้ โดยเข้าไปทำลายจุลินทรีย์ทดสอบที่บริเวณผนังเซลล์ ทำให้เชื้อทดสอบถูกทำลายลงไปมีปริมาณเชื้อลดลงเมื่อผ่านไประยะเวลาหนึ่ง แต่หลังจากนั้นเชื้อทดสอบที่เหลือรอดชีวิตก็สามารถเพิ่มจำนวนขึ้นมาใหม่ได้ในอาหารเหลว เมื่อมีการบ่มเชื้อเป็นระยะเวลานานขึ้น อาจเป็นเพราะแบคเทอริโอซินที่ใช้ทดสอบยังมีปริมาณน้อยเกินไป ในการจะใช้ทำลายเชื้อทดสอบให้หมดลงไปได้ แต่อาจทดลองบ่มเชื้อทดสอบไว้ที่อุณหภูมิต่ำ แล้วศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงปริมาณของเชื้อทดสอบเมื่อมีการใส่ส่วนใสที่มีแบคเทอริโอซินลงไป ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

การหาความสัมพันธ์ของชนิดจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจาก API 50 CH Database พบว่า ไอโซเลท NP3.8 เซลล์รูปร่างเป็นท่อนยาว แกรมบวก มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* 99.9% และไอโซเลท NP5.4 เซลล์รูปร่างเป็นทรงกลมรูปไข่ แกรมบวก มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 92.6%

จากผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของรสชาติผลิตภัณฑ์แหนมปลา ทั้ง 3 สูตร ใช้วิธีทดสอบฮีโดนิก แบบ 9 จุด โดยมีผู้ชิมผลิตภัณฑ์ทั้งหมด 30 คน พบว่าแหนมปลาสูตร 010 ที่มีการใส่แบคทีเรียแลคติก NP3.8 ทำให้มีกระบวนหมักเกิดขึ้นรวดเร็วที่สุด ได้ผลิตภัณฑ์แหนมปลา มีสีชมพูน่ารับประทาน กลิ่น รสชาติเปรี้ยว และเนื้อสัมผัสมีคุณภาพใกล้เคียงกับแหนมปลาสูตร 030 ที่มีการหมักแบบธรรมชาติโดยไม่ได้ใส่แบคทีเรียแลคติก มีคะแนนอยู่ในระดับความชอบปานกลาง ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) แต่แหนมปลาสูตร 020 ที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP5.4 มีกระบวนการหมักเกิดขึ้นช้ากว่าสูตรอื่น ๆ ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์มีสีค่อนข้างซีด และมีรสชาติที่เปรี้ยวน้อยกว่าสูตรอื่นๆ จึงมีคะแนนอยู่ในระดับความชอบเล็กน้อย มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P\leq0.05$)

ดังนั้นแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ NP3.8 จึงมีความเหมาะสมที่จะนำไปใช้ทำเป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมปลาต่อไป การผลิตแบคเทอริโอซินโดยกรรมวิธีการหมักนั้นย่อมมีข้อจำกัด ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของปริมาณต่ำที่ผลิตได้จากจุลินทรีย์ ความไม่เสถียรทางพันธุกรรมของจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิต และปัญหาของการปรับตัวในกรณีของจุลินทรีย์ดื้อต่อแบคเทอริโอซิน ซึ่งเกิดขึ้นได้อยู่ตลอดเวลา การแก้ไขปัญหานี้ทำได้โดยการใช้เชื้อตั้งต้นในการสร้างแบคเทอริโอซินหลายสายพันธุ์ หากเชื้อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งถูกทำลาย จะยังคงเหลือสายพันธุ์อื่นๆ พอที่จะดำเนินกิจกรรมการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมักและสร้างแบคเทอริโอซินต่อไปได้ ปัจจุบันได้มีการพัฒนาประยุกต์ใช้อนุพันธ์ของแบคเทอริโอซินที่มีการปรับปรุงทางพันธุวิศวกรรม มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร โดยเทคนิคดังกล่าวสามารถเพิ่มความเสถียรและเพิ่มการสร้างแบคเทอริโอซินให้มากขึ้น การสร้างอนุพันธ์ของแบคเทอริโอซินชนิดใหม่จะช่วยเพิ่มคุณสมบัติในการถนอมอาหาร ลดการใช้สารเคมี และส่งผลดีต่อผู้บริโภคต่อไป

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 2536. **เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหาร.**

จินดารัตน์ นิติวัฒนพงษ์. 2522. **การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง ไตปลา และปลาแป้งแดง.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

นภา โล่ห์ทอง. 2535. **กล้าเชื้ออาหารหมัก และเทคโนโลยีการผลิต.** ภาควิชาจุลชีววิทยา. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หจก. ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ : 122 – 144.

นาถสุดา วิศววงศ์. 2522. **การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง ปลาเจ่า ปลาส้ม และส้มฟัก.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. **หลักการวิเคราะห์อาหารด้วยประสาทสัมผัส.** ภาควิชาเทคโนยีการอาหาร. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.กรุงเทพฯ : 183 – 206.

พัศมัย เอกก้านตรง. 2543. **อาหารหมัก-ดองของไทย.** ฝ่ายโภชนาการชุมชน. สถาบันวิจัยโภชนาการ. มหาวิทยาลัยมหิดล. นครปฐม : 1 – 7.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. **จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูป.** ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. โอเดียนสโตร์. กรุงเทพฯ : 131 – 137.

สมใจ ศิริโภค, ประวัติ อังประภาพรชัย, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. **การคัดเลือกและการจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมักและการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้.** ว.วิทยาศาสตร์ มศว. 23(2) : 93 – 114.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2547. **เทคโนโลยีชีวภาพอาหาร การหมัก และสิ่งแวดล้อม.** ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ : 87 – 95.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. **จุลชีววิทยา.** โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. กรุงเทพฯ. 470 หน้า.

แหนมปลา. [Online]. ค้นหาได้จาก :

http://www.nectec.or.th/course ware/siamculture/otop_tis/tcps471_47.pdf. (12/09/2549).

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. **แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก.** ว. วิทยาศาสตร์ มศว. 23(2) : 145 – 160.

อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2533. **ผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียต่อซาลโมเนลลาในการหมักแหนม.** วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อัจฉรา หนูเพชร, ดวงพร คันธโชติ และวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2547. **การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกสำหรับมนุษย์จากอาหารหมักของไทย.** ว. สงขลานครินทร์ วทท. 26(5) : 659 – 670.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. 1995. **Bacteriocins : Mode of Action and Potentials in Food Preservation and Control of Food Poisoning.** Int. J. Food Microbiol. 28: 169 – 185.

Adams, M.R. and Nicolaides, L.N. 1997. **Review of the Sensitivity of Different Foodborne Pathogens to Fermentation.** Food Control. 8: 227 – 239.

Adams, MR. 1999. **Safety of Industrial Lactic Acid Bacteria.** J. Biotechnol. 68: 171 – 178.

AOAC. 1984. Official Methods of Anlysis. Willium Horwitz(ed) 14th, **Association of Official Analytical Chemist.** Arlington, Virginia, USA. 1,140 p.

Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A.J.G., Lebrihi, A. and Lefebvre, G.2001. **Mode of Action, Purification and Amino Acid Sequence of Plantaricin C19, an Anti-*Listeria* Bacteriocin Produce by *Lactobacillus plantarum* C19.** Int. J. Food Microbiol. 68: 93 – 104.

Axelsson, L. 2004. **Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology.** In: Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A. editors. Lactic Acid Bacteria. 3th Edition. New York. Marcel Dekker: 1 – 23.

Bacus, J.N. and Brown, W.L. 1981. **Use of Microbial Culture : Meat Products.** Food Technol. 35(1) : 74 – 83

Bauer, R. and Dick, L.M.T. 2005. **Mode of Action of Lipid II-Targeting lantibiotics.** Int. J. Food Microbiol. 101 : 207.

Callewaert, R., Hugas, M. and De Vuyst, L. 2000. **Competitiveness and Bacteriocin Production of *Enterococci* in the Production of Spanish-Style Dry Fermentd Sausages.** Int. J. Food Microbiol. 57 : 33 – 42.

Campos, C.A., Rodriguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barros-Velazquez. 2006. **Preliminary Characterization of Bacteriocins from *Lactococcus lactis, Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* Strains Isolated from Turbot (*Psetta maxima*).** Food Research International. 39 : 356 – 364.

Cleveland, J., Montville, T.J., Nes, I.F. and Chikidas, M.L. 2001. **Bacteriocin : Safe, Natural Antimicrobials for Food Preservation.** Int. J. Food Microbiol. 71 : 1 – 20.

Daeschel, M.A. 1993. **Application and Interactions of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria in Foods and Beverages.** In Hoover, D.G. and Steenson, L.R. editors. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Academic Press. Inc. New York : 63 – 91.

Davidson, P.M. and Hoover, D.G. 1993. **Antimicrobial Components from Lactic Acid**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacteria. In Salmine, S. and Von Wright, A. editors. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker. Inc. New York : 127 – 160.

De Vuyst, L. and Vadamme, E.J. 1994. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetic and Application.** Blackie Academic&Professional. London : 91 – 130.

Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. 1997. **Food Microbiology : Fundamentals and Frontiers**. Washington D.C. : America Society for Microbiology.

Enan, G., EI-Essawy, A.A., Uyttendaele, M. and Debevere, J. 1996. **Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 Isolate from Dry Sausage: Characterization, Production and Bactericidal Action of Plantaricin UG1**. Int. J. Food Microbiol. 30: 189 – 215.

Ennahar, S., Zendo, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. **Investigation of Bacteriocin Production and Purification from *Nukadoto* Isolates Displaying Antimicrobial Activity**. Japanese J. Lactic Acid Bacteria. 10 : 29 – 37.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. **Class IIa Bacteriocins : Biosynthesis, Structure and Activity**. FEMS Microbiol. Rev. 24: 85 – 108.

Fleming, H.P., Etchells, J.L.and Costilow, R.L. 1985. **Microbial Inhibition by an Isolate of *Pediococcus* from Cucumber Brines.** Appl. Microbiol. 30 : 1040 – 1042.

Frazier, W.C. and Westhoff, D.C. 1988. **Food Microbiology**. 4th ed. Singaphore:McGraw-Hill Co. 539 pp.

Hall, R.H. 1966. **Nisin and Food Preservation. Process Biochemistry**. 1: 461 – 464.

Héquet, A., Laffitte, V., Simon, L., De Sousa-Caetano, D., Thomas, C.,Fremaux, C. and Berjeaud, J.M. 2007. **Characterization of New Bacteriocinogenic Lactic Acid bacteria Isolated using a Medium designed to Simulate Inhibition of *Listeria* by *Lactobacillus sakei* 2512 on Meat.** Int. J. Food Microbiol. 113: 67 – 74.

Hugenholtz, J. and De Veer, G.J.C.M. 1991. **Application of Nisin A and Nisin Z in Dairy Technology.** In: Jung, G. and Sahl, H-G. editors. Nisin and Novel Iantibiotics. Leiden: ESCOM Science Publishers B.V.: 440 – 447.

Jamuna, M., Babusha, S.T. and Jeevaratnam, K. 2005. **Inhibitory Efficacy of Nisin and Bacteriocins from *Lactobacillus* Isolate Against Food Spoilage and Pathogenic Organisms in Model and Food Systems**. Food Microbiol. 22: 449 – 454.

Jarvis, B. and Mahoney, R.R. 1969. **Inactivation of Nisin by Alpha-Chymotrypsin**. J. of Dairy

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Science. 52: 1448 – 1450.

Klaenhammer, T.R. 1993. **Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic acid Bacteria.** FEMS Microbiol. Rev. 12: 39 – 58.

Kramer, N. **Sensitivity and Resistance of Pathogenic Bacteria for Nisin.** [Online]. Available : http://cble.chem.uunl/biomem/naomi.htm. (Accessed 24/07/2005).

Kuipers, O.P., Beerthnyzen, M.M., Siezen, R.J. and De Vor, W.M. 1995. **Autoregulation of Nisin Biosynthesis in *Lactococcus lactis* by Signal Transduction.** J. Bio Chem. 270: 27299 – 27304.

Lontong, N. and Swetwiwathana, A. 1990. **Production of Salmonella Free Nham.** Annual Report. ASEAN Food Technology and Research Development Project.

Liu, W. and Hansen, J.N. 1990. **Some Chemical and Physical Properties of Nisin, A Small Protein Antibiotic Produced by *Lactococcus lactis*.** Appl. Envi Microbiol. 56: 2551 – 2558.

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 curvatus* L442.** Meat Science. 64: 265 – 271.

Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R. and Manicardi, G. 2001. **Detection and Preliminary Characterization of a Bacteriocin (Plantaricin 35d) Produce by a *Lactobacillus plantarum* strain.** Int. J. Food Microbiol. 64: 193 – 198.

Muriana, P.M. 1996. **Bacteriocins for Control of *Listeria* spp. in Food.** J. Food Prot. 59: 54 – 63.

Niinivaara, F.P., Pohja, M.S. and Komulainen, S.E. 1964. **Some Aspects about using Bacterial Pure Cultures in the Manufacture of Fermented Sausages.** Food Technol. 18: 147 – 153.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K and Panyim, S. 2003. **Isolation of Nisin-Producing *Lactococcus lactis* WNC 20 Strain from Nham, a Traditional Thai Fermented Sausage.** Int. J. Food Microbiol. 81: 137 – 145.

O' Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002. **Potential of Bacteriocins – Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements in Food Safety and Quality.** Biochem. 84: 593 – 604.

Rodrigue, J.M., Martinez, M.I., Horn, N and Dodd, H.M. 2002. **Heterologous Production of**

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. Int. J. Food Microbiol. 80: 101 – 116.

Sabia, C., Manicardi, G., Messi, P. De Niederhäusern and Bondi, M. 2002. **Enterocin 416K1, an Antilisterial Bacteriocin Produced by *Enterococcus casseliflavus* IM 416K1 Isolated from Italian Sausages.** Int. J. Food Microbiol. 75: 163 – 170.

Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, W.H. 1996. **Potential of Antagonistic Microorganisms for the Biological Preservation of Food.** Trends Food Sci. Technol. 7 : 158 – 164.

Schillinger, U. and Luecke, F.K. 1989. **Antibacterial Activity of *Lactobacillus sakei* Isolate from Nham.** Appl. and Microbiol. 55(8): 1901 – 1906.

Schleifer, K.H. 1986. **Gram-Positive Cocci.** In Sneath, P.A. (ed.). Bergy's Mannual of Systematic Bacteriology Vol.2. Williams and Wilkins, Balimore.

Smith, J.L., Palumbo, S.A. 1981. **Microorganism as food additives.** J. Food Prot. 44: 936 – 937.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. **Lactic Acid Bacteria of Foods and Their Current Taxonomy.** Int. J. Food Microbiol. 36 : 1 – 29.

Swetwiwathana, A. and Lotong, N. 1999. **Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Nham (Thai Fermented Meat).** Proceeding of International Conference on ASIAN Network on Microbial Research. November 29 – December 1, 1999. Chiangmai, Thailand.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2003. **Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Nham (Thai Fermented Meat).** The 49th International Congress of Meat Science and Technology Proceeding Volume II. August 2003. Campinas, Sao Paulo, Brazil.

Swetwiwathana, A., Zendo, T., Lotong, N., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2004. **Effeect of Garlic and Nitrite on Pediocin PA-1 Production of *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 and on the Growth of *Salmonella* Anatum in Stimulated Nham Fermentation.** Proceeding of the 1st KMITL International Conference on Integration of Science & Technology for Sustainable Development. August 25 – 26 2004. Bangkok, Thailand.

Tichaczek, P.S., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Vogel, R.E.and Hammes, W.P. 1992. **Characterization of the Bacteriocins Curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and Sakacin P from *L. sakei* LTH 673.** System. Appl. Microbiol. 15: 460 – 468.

ไม่ว่ากรณีใดๆ ซึ่งเนื้อหาทั้งหมดของวิทยานิพนธ์นี้ยังคงอยู่ภายใต้ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Tramer, J. 1966. **Nisin in Food Preservation**. Chemistry & Industry. 11: 446 – 450.

Venema, K., Venema, G. and Kok, J. 1995. **Lactococcal Bacteriocins : Mode of Action and Immunity**. Trends in Microbiol. 3: 299 – 304.

Vermeiren, L., Devlieghere, F. and Debevere, J. 2004. **Evaluation of Meat Born Lactic Acid Bacteria as Protective Cultures for the Biopreservation of Cooked Meat Products.** Int. J. Food Microbiol. 96: 149 – 164.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก.
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. MRS broth (MERCK ชั่ง 52.2 กรัม/ลิตร)

Tryptone	10.0 กรัม
Beef extract	8.0 กรัม
Yeast extract	4.0 กรัม
Glucose	20.0 กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	2.62 กรัม
KH_2PO_4	2.0 กรัม
Sodium acetate	5.0 กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.05 กรัม
Tween80	1.0 มล.

เติม วุ้น 15 กรัม/ลิตร เมื่อต้องการเตรียมเป็นอาหารแข็ง

เติม 0.5% $CaCO_3$ เพื่อต้องการคัดแยกแบคทีเรียแลคติก

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

2. BSM agar (Bacteriocin Screening Medium)

Tryptone	10.0 กรัม
Beef extract	2.0 กรัม
Yeast extract	4.0 กรัม
Glucose	2.0 กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	8.7 กรัม
KH_2PO_4	8.0 กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2.0 กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2 กรัม
$MnSO_4.H_2O$	0.05 กรัม
Tween80	1.0 มล.
Agar	15.0 กรัม

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Tryptic Soy Broth เติม 0.6% Yeast extract (Difco ชั่ง 30 กรัม/ลิตร)

Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17.0 กรัม
Enzymatic digest of soybean meal	3.0 กรัม
Dextrose	2.5 กรัม
Yeast extract	6.0 กรัม
Sodium Chloride	5.0 กรัม
di-Potassium phosphate ($K_2HPO_4.3H_2O$)	2.5 กรัม

เติม วุ้น 15 กรัม/ลิตร เมื่อต้องการเตรียมเป็นอาหารแข็ง
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข.

การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

ภาคผนวก ข. 1 ตารางผลการเปรียบเทียบลักษณะสี ในผลิตภัณฑ์แหนมปลา 3 สูตร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ทางด้านสี

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	71.644	31	2.311	8.218	.000
Intercept	3712.044	1	3712.044	13199.504	.000
TRT	41.689	2	20.844	74.120	.000
REP	29.956	29	1.033	3.673	.000
Error	16.311	58	.281		
Total	3800.000	90			
Corrected Total	87.956	89			

a R Squared = .815 (Adjusted R Squared = .715)

Post Hoc Tests TRT Homogeneous Subsets

ทางด้านสี

Duncan

	N	Subset	
TRT		1	2
020	30	5.4667	
030	30		6.8000
010	30		7.0000
Sig.		1.000	.150

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type III Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .281

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000

b Alpha = .05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

<u>สรุปผล</u> ค่าความแตกต่างของคะแนนความชอบด้านสีในผลิตภัณฑ์ พบว่าแหนมปลาสูตร 020 มีค่าคะแนนความชอบแตกต่างจากแหนมปลาสูตร 010 และ 030 อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยคะแนน

ความชอบด้านสีในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 010 และ 030 อยู่ที่ 6.8 – 7.0 คะแนน คือมีความชอบด้านสีระดับปานกลาง

Descriptive Statistics สูตร 020

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ด้านสี	30	4.00	7.00	164.00	5.4667	.1244	.68145
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 030

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ด้านสี	30	6.00	9.00	210.00	7.0000	.1356	.74278
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 010

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ด้านสี	30	6.00	8.00	204.00	6.8000	.1390	.76112
Valid N (listwise)	30						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข. 2 ตารางผลการเปรียบเทียบลักษณะกลิ่น ในผลิตภัณฑ์แหนมปลา 3 สูตร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ทางด้านกลิ่น

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	50.278	31	1.622	8.268	.000
Intercept	3373.344	1	3373.344	17196.150	.000
TRT	21.956	2	10.978	55.961	.000
REP	28.322	29	.977	4.979	.000
Error	11.378	58	.196		
Total	3435.000	90			
Corrected Total	61.656	89			

a R Squared = .815 (Adjusted R Squared = .717)

Post Hoc Tests TRT Homogeneous Subsets

ทางด้านกลิ่น

Duncan

	N	Subset	
TRT		1	2
020	30	5.4333	
030	30		6.3667
010	30		6.5667
Sig.		1.000	.086

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type II Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .196

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000

b Alpha = .05

<u>สรุปผล</u> ค่าความแตกต่างของคะแนนความชอบด้านกลิ่นในผลิตภัณฑ์ พบว่าแหนมปลาสูตร 020 มีค่าคะแนนความชอบแตกต่างจากแหนมปลาสูตร 010 และ 030 อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยคะแนนความชอบด้านกลิ่นในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 010 และ 030 อยู่ที่ 6.3 – 6.5 คะแนน คือมีความชอบด้านกลิ่นระดับเล็กน้อย ถึงชอบปานกลาง

Descriptive Statistics สูตร 020

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ด้านกลิ่น	30	4.00	7.00	163.00	5.4333	.1240	.67891
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 030

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ด้านกลิ่น	30	6.00	8.00	197.00	6.5667	.1038	.56832
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 010

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ด้านกลิ่น	30	5.00	8.00	191.00	6.3667	.1396	.76489
Valid N (listwise)	30						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข. 3 ตารางผลการเปรียบเทียบลักษณะรสชาติ ในผลิตภัณฑ์แหนมปลา 3 สูตร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ทางด้านรสชาติ

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	51.611	31	1.665	5.161	.000
Intercept	3622.678	1	3622.678	11229.441	.000
TRT	27.289	2	13.644	42.295	.000
REP	24.322	29	.839	2.600	.001
Error	18.711	58	.323		
Total	3693.000	90			
Corrected Total	70.322	89			

a R Squared = .734 (Adjusted R Squared = .592)

Post Hoc Tests TRT Homogeneous Subsets

ทางด้านรสชาติ

Duncan

	N	Subset	
TRT		1	2
020	30	5.5667	
010	30		6.7000
030	30		6.7667
Sig.		1.000	.651

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type II Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .323

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000

b Alpha = .05

<u>สรุปผล</u> ค่าความแตกต่างของคะแนนความชอบด้านรสชาติ ในผลิตภัณฑ์ พบว่าแหนมปลาสูตร 020 มีค่าคะแนนความชอบแตกต่างจากแหนมปลาสูตร 010 และ 030 อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยคะแนนความชอบด้านรสชาติในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 010 และ 030 อยู่ที่ 6.7 คะแนน คือมีความชอบด้านรสชาติในระดับเล็กน้อย ถึงปานกลาง

Descriptive Statistics สูตร 020

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
รสชาติ	30	5.00	7.00	167.00	5.5667	.1038	.56832
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 010

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
รสชาติ	30	6.00	8.00	201.00	6.7000	.1282	.70221
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 030

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
รสชาติ	30	6.00	9.00	203.00	6.7667	.1492	.81720
Valid N (listwise)	30						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข. 4 ตารางผลการเปรียบเทียบลักษณะความเปรี้ยว ในผลิตภัณฑ์แหนมปลา 3 สูตร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ด้านความเปรี้ยว

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	62.778	31	2.025	8.913	.000
Intercept	3894.044	1	3894.044	17139.049	.000
TRT	31.489	2	15.744	69.297	.000
REP	31.289	29	1.079	4.749	.000
Error	13.178	58	.227		
Total	3970.000	90			
Corrected Total	75.956	89			

a R Squared = .827 (Adjusted R Squared = .734)

Post Hoc Tests TRT Homogeneous Subsets

ด้านความเปรี้ยว

Duncan

	N	Subset		
TRT		1	2	3
020	30	5.8000		
030	30		6.7000	
010	30			7.2333
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type II Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .227

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000

b Alpha = .05

<u>สรุปผล</u> ค่าความแตกต่างของคะแนนความชอบด้านความเปรี้ยวในผลิตภัณฑ์ พบว่าแหนมปลาสูตร 010, 020 และ 030 มีค่าความแตกต่างกัน ทั้ง 3 สูตร อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยคะแนนความชอบด้านความเปรี้ยวพบว่าในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 010 มีคะแนนความชอบมากที่สุด คือ 7.2 คะแนน

Descriptive Statistics สูตร 010

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ความเปรี้ยว	30	5.00	7.00	174.00	5.8000	.1213	.66436
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 030

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ความเปรี้ยว	30	6.00	9.00	217.00	7.2333	.1413	.77385
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 010

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ความเปรี้ยว	30	6.00	8.00	201.00	6.7000	.1282	.70221
Valid N (listwise)	30						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข. 5 ตารางผลการเปรียบเทียบลักษณะเนื้อสัมผัส ในผลิตภัณฑ์แหนมปลา 3 สูตร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ด้านเนื้อสัมผัส

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	72.811	31	2.349	9.095	.000
Intercept	3907.211	1	3907.211	15130.298	.000
TRT	41.689	2	20.844	80.718	.000
REP	31.122	29	1.073	4.156	.000
Error	14.978	58	.258		
Total	3995.000	90			
Corrected Total	87.789	89			

a R Squared = .829 (Adjusted R Squared = .738)

Post Hoc Tests TRT Homogeneous Subsets

ด้านเนื้อสัมผัส

Duncan

	N	Subset	
TRT		1	2
020	30	5.6333	
010	30		6.9667
030	30		7.1667
Sig.		1.000	.133

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type II Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .258

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000

b Alpha = .05

<u>สรุปผล</u> ค่าความแตกต่างของคะแนนความชอบด้านเนื้อสัมผัส ในผลิตภัณฑ์ พบว่าแหนมปลาสูตร 020 มีค่าคะแนนความชอบแตกต่างจากแหนมปลาสูตร 010 และ 030 อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยคะแนนความชอบด้านเนื้อสัมผัสในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 010 และ 030 อยู่ที่ 6.9 – 7.2 คะแนน คือมีความชอบด้านเนื้อสัมผัสระดับปานกลาง

Descriptive Statistics สูตร 020

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
เนื้อสัมผัส	30	4.00	7.00	169.00	5.6333	.1221	.66868
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 010

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
เนื้อสัมผัส	30	6.00	8.00	209.00	6.9667	.1312	.71840
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 030

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
เนื้อสัมผัส	30	6.00	9.00	215.00	7.1667	.1445	.79148
Valid N (listwise)	30						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข. 6 ตารางผลการเปรียบลักษณะความชอบรวม ในผลิตภัณฑ์แหนมปลา 3 สูตร

Tests of Between-Subjects Effects

Dependent Variable: ความชอบรวม

Source	Type II Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	77.811	31	2.510	10.937	.000
Intercept	4093.878	1	4093.878	17838.098	.000
TRT	53.356	2	26.678	116.242	.000
REP	24.456	29	.843	3.674	.000
Error	13.311	58	.230		
Total	4185.000	90			
Corrected Total	91.122	89			

a R Squared = .854 (Adjusted R Squared = .776)

Post Hoc Tests TRT Homogeneous Subsets

ความชอบรวม

Duncan

	N	Subset		
TRT		1	2	3
020	30	5.7333		
010	30		6.9000	
030	30			7.6000
Sig.		1.000	1.000	1.000

Means for groups in homogeneous subsets are displayed. Based on Type II Sum of Squares The error term is Mean Square(Error) = .230

a Uses Harmonic Mean Sample Size = 30.000

b Alpha = .05

<u>สรุปผล</u> ค่าความแตกต่างของคะแนนความชอบรวมในผลิตภัณฑ์ พบว่าแหนมปลาสูตร 010, 020 และ 030 มีค่าความแตกต่างกัน ทั้ง 3 สูตร อย่างมีนัยสำคัญ ($P \leq 0.05$) โดยคะแนนความชอบด้านความชอบรวมพบว่าในผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตร 030 มีคะแนนความชอบมากที่สุด คือ 7.6 คะแนน

Descriptive Statistics สูตร 020

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ความชอบรวม	30	5.00	7.00	172.00	5.7333	.1065	.58329
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 010

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ความชอบรวม	30	6.00	8.00	207.00	6.9000	.1208	.66176
Valid N (listwise)	30						

Descriptive Statistics สูตร 030

	N	Minimum	Maximum	Sum	Mean		Std. Deviation
	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Statistic	Std. Error	Statistic
ความชอบรวม	30	6.00	9.00	228.00	7.6000	.1322	.72397
Valid N (listwise)	30						

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค.

แบบประเมินผลทางด้านประสาทสัมผัส

ชื่อผลิตภัณฑ์ ..... วันที่.....

อายุ ..... ปี เพศ ..... เวลา .....

โปรดพิจารณาคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร ให้คะแนนตามเกณฑ์ดังนี้

ไม่ชอบเลย (dislike extremely) = 1

ไม่ชอบมาก (dislike very much) = 2

ไม่ชอบปานกลาง (dislike moderately) = 3

ไม่ชอบเล็กน้อย (dislike slightly) = 4

เฉยๆ (neither like nor dislike) = 5

ชอบเล็กน้อย (like slightly) = 6

ชอบปานกลาง (like moderately) = 7

ชอบมาก (like very much) = 8

ชอบเป็นพิเศษ (like extremely) = 9

รหัสผลิตภัณฑ์	สี	กลิ่น	รสชาติ	ความเปรี้ยว	เนื้อสัมผัส	ความชอบโดยรวม	คะแนนรวม

ข้อเสนอแนะและวิจารณ์ .....

.....

.....

.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขอขอบคุณผู้ประเมินทุกท่าน

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-นามสกุล : นายนภดล เมตตาเมธา

วันเดือนปีที่เกิด : 24 กรกฎาคม 2515

ภูมิลำเนา : กรุงเทพฯ

ประวัติการศึกษา

ปี พ.ศ. 2527 – 2332 : มัธยมศึกษาปีที่ 6 โรงเรียนทวีธาภิเศก กรุงเทพฯ

ปี พ.ศ. 2534 – 2537 : วิทยาศาสตรบัณฑิต เอกจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

ปี พ.ศ. 2546 – 2550 : วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต เอกสุขาภิบาลอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ประวัติการทำงาน

มิ.ย. 2538 – ก.พ. 2540 : ตำแหน่งเจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพ บ. พูนสินทั่งง่วนฮะ จำกัด จ. สมุทรสาคร

มี.ค. 2540 – ส.ค. 2540 : ตำแหน่งเจ้าหน้าที่ควบคุมคุณภาพ บ. บางกอกอินเตอร์ฟูด จำกัด จ. นครปฐม

ม.ค.2541 – ก.พ. 2543 : ตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์การแพทย์(ลูกจ้างชั่วคราว) สถาบันวิจัยสมุนไพร กระทรวงสาธารณสุข จ. นนทบุรี

ส.ค. 2543 – ม.ค. 2547 : ตำแหน่ง หน. แผนกจุลินทรีย์ บมจ. อาหารสยามจำกัด มหาชน จ. ชลบุรี

ม.ค. 2549 – ปัจจุบัน : ตำแหน่ง นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้