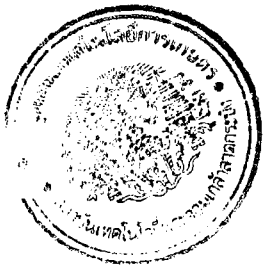


ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากปลาร้า

Screening of Lactic acid bacteria Producing Bacteriocin from Fish Fermented Food : (Plara)

โดย

นางสาววรภัค สอนคำหาร

นางสาวอัญรัตน์ สีผ่องใส

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..... 16 มิ.ย. 64 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(อ.ดร. เสาวลักษณ์)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....

( )

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่.....เดือน.....พ.ศ. .....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากปลาร้า

Screening of Lactic acid bacteria Producing Bacteriocin from Fish Fermented Food : (Plara)

T096797

นางสาววรภัค สอนคำหาร

นางสาวอัญรัตน์ สีผ่องใส

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ. ศ. 2544

ปพ.
จ232ก
2544

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....96797
วัน.เดือน.ปี.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วรภัค สอนคำหาร และ อัญรัตน์ สีผ่องใส 2543 : การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากปลาร้า (Screening of Lactic acid bacteria Producing Bacteriocin from Fish Fermented Food : (Plara)). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์อดิศร เสวตวิวัฒน์, 42 หน้า

จากการทดลองการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากปลาร้าในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS+0.7% $CaCO_3$ ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ10% พบว่าที่ความเข้มข้นของเกลือ 7.5% จะมีเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเจริญได้ดีมากที่สุดโดยสังเกตได้จากลักษณะของโคโลนีจะเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆได้อย่างชัดเจนและลักษณะของบริเวณใส (Clear zone) ล้อมรอบโคโลนีจะเห็นได้อย่างเด่นชัด เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้ 60 สายพันธุ์มาทำการทดสอบการสร้างสารแบคเทอริโอซินกับเชื้ออินดิเคเตอร์ 4 เชื้อ คือ *S. aureus, B. cereus, E. faecalis* และ *L. innocua* พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้ไม่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวที่ใช้เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ในการทดสอบนี้ได้

วรภัค สอนคำหาร อัญรัตน์ สีผ่องใส		16 มี.ค. 2544
ลายมือชื่อนักศึกษา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	วัน/ เดือน/ ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำปัญหาพิเศษเรื่อง "การแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากปลาร้า" ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์อดิศร เสวตวิวัฒน์ เป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้เกียรติเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ ซึ่งมีส่วนอย่างมากในกาทำให้ปัญหาพิเศษเรื่องนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยดี และขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์นิตยา พิระภัทรุ่งสุริยา และ ดร.ประพันธ์ ปิ่นศิโรดม ที่กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่ามาเป็นกรรมการสอบปัญหาพิเศษนี้ ขอกราบขอบพระคุณ บิดา และมารดา เป็นอย่างยิ่งที่คอยให้การสนับสนุนไม่ว่าจะในด้านกำลังใจและกำลังทรัพย์ และขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจตลอดมา

วรภัค สอนคำหาร
อัญรัตน์ สีผ่องใส
มีนาคม 2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญตาราง	จ
สารบัญรูป	ฉ
บทที่	
1. บทนำ	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
2. วารสารปริทัศน์	3
2.1 อาหารหมัก	3
2.2 ตัวอย่างกรรมวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมัก	3
2.4 การหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์	7
2.5 เชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม	8
2.6 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก	13
3. อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง	16
3.1 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง	16
3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ	17
3.3 สารเคมี	17
3.4 จุลินทรีย์	17
3.5 ขั้นตอนและวิธีการทดลอง	18
3.6 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากปลาร้า	18
3.7 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินยับยั้ง *S. aureus, B. cereus, E. faecalis* และ *L. innocua*	18
3.8 การเตรียมเชื้ออินดิเคเตอร์	18
4. ผลการทดลอง	23
4.1 ความเข้มข้นของเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีผลต่อการตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกในปลาร้า	23
4.2 ผลการทดลองขั้นตอนที่ 2	29
4.3 ข้อเสนอแนะ	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
5. สรุปผลการทดลอง	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก	34
ภาคผนวก ก	35
ภาคผนวก ข	38
ภาคผนวก ค	39
ประวัติผู้เขียน	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์อาหารหมักและระยะเวลาที่ใช้ในการหมักครั้งที่ 1	4
2. อัตราส่วนของผลิตภัณฑ์อาหารหมักและระยะเวลาที่ใช้ในการหมักครั้งที่ 2	4
3. ผลิตผลหลักที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารคาร์โบไฮเดรตโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถเจริญในผลิตภัณฑ์	6
4. ตัวอย่างกลุ่มเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียในการหมักแบบ Homo และ Heterofermentative lactic acid bacteria	12
5. เปรียบเทียบการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS	23
6. เปรียบเทียบการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ปลาร้า	5
2. การใช้น้ำตาลของพวก homofermentative lactic acid bacteria	10
3. การใช้น้ำตาลของพวก heterofermentative lactic acid bacteria	11
4. โครงสร้างไนซิน	15
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium	20
6. ลักษณะของ Clear zone	20
7. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Deep tubes+lactic acid bacteria	21
8. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Deep tubes+lactic acid bacteria+MRS broth	21
9. การเจริญของเชื้อ *L. innocua* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE	22
10. การเจริญของเชื้อ *B. cereus* และ *E. faecalis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB	22
11.จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ความเข้มข้นของเกลือ 5%	25
12. จำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ความเข้มข้นของเกลือ7.5%25	25
13. การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณเกลือ 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-1}	26
14. การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณเกลือ 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-2}	26
15. การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณเกลือ 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-3}	27
16. การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณเกลือ 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-1}	27
17. การเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณเกลือ 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-1}	28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

อาหารหมักพื้นเมืองของไทยมีมากมายหลายชนิด ซึ่งล้วนอาศัยการหมักที่เป็นไปตามธรรมชาติโดยอาศัยเชื้อที่ติดมากับวัตถุดิบที่ใช้ โดยทั่วไปการหมักขึ้นอยู่กับเชื้อที่ติดมา และต้องควบคุมสภาวะการหมักที่เหมาะสม อาหารหมักเหล่านี้ ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ส้มฟัก ปลาร้า ข้าวหมาก ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง เป็นต้น ซึ่งในการทดลองครั้งนี้จะนำปลาร้ามาเป็นตัวอย่างในการทำการทดลอง การหมักดองส่วนใหญ่เป็นการหมักดองที่เกิดจากเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียในตระกูล *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Pediococcus, Leconosnostoc* เป็นต้น โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตในอาหารให้เป็นกรดแลคติก อาหารจึงมีรสเปรี้ยว และความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารก็ลดลง จึงมีผลช่วยในการถนอมอาหารได้ การเปลี่ยนแปลงโดยกลุ่มแบคทีเรียแลคติกนี้จะทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น ที่อาจก่อให้เกิดโทษต่อร่างกาย นอกจากกรดแลคติกที่มีผลในการถนอมอาหารแล้ว แบคทีเรียแลคติกยังสามารถสร้างสารอื่นๆ อีกหลายชนิดในกระบวนการหมัก ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ ดังนั้นการที่อาหารหมักดองสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานนั้น ไม่ใช่เพียงเพราะกรดแลคติกที่ทำให้ความเป็นกรดด่างของอาหารลดลงเท่านั้น แต่สารอีกหลายชนิดที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักก็มีส่วนช่วยในการถนอมอาหารด้วย สารเหล่านี้ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล คาร์บอนไดออกไซด์ แบคเทอริโอซิน และสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ยังไม่ระบุว่าเป็นสารประเภทใด (Un-identified antagonistic substance) เป็นต้น (วิเชียร, 2534)

จากคุณสมบัติต่างๆ ของสารที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นนี้ ล้วนมีบทบาทในการถนอมอาหารเพื่อทำให้สามารถอาหารเพื่อทำให้สามารถเก็บอาหารได้เป็นเวลานานๆ โดยสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับการสนใจในการ ศึกษาวิจัยมากที่สุด คือ แบคเทอริโอซิน และสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ยังไม่ระบุว่าเป็นสารประเภทใด (Un-identified antagonistic substances) เพราะมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างกว้างขวาง รวมทั้งยังเป็นผลผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ที่มีการศึกษา และวิจัยแล้วว่า ไม่มีอันตรายต่อร่างกาย และเป็นเชื้อชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับว่าเป็น GRAS (General Recognized as Safe) สามารถใช้เติมในอาหารได้ โดยอาจเติมในรูปของสารบริสุทธิ์ หรือในรูปของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้ จึงมีการริเริ่มใช้สารเหล่านี้เพื่อประโยชน์ในด้านการถนอมอาหารในอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ ซึ่งมีจำนวนมาก และก้าวหน้าสูงในปัจจุบัน แต่มักมีปัญหาการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหาร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เน่าเสีย และทำให้เกิดโรคเสมอ การศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทำให้คุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งดังกล่าวน่าจะเป็นหนทางที่ดี ในการหาสารที่ใช้ทดแทนสารกันบูด ประเภทสารเคมี เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก ไนเตรต และไนไตรต์ เป็นต้น ซึ่งอาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ จากประโยชน์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกดังที่ได้กล่าวมาแล้วนั้น การศึกษานี้จึงได้มุ่งเน้นเพื่อทำการคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากปลาร้าและนำเชื้อที่คัดแยกความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ

นอกจากนี้ปลาร้าเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ต้องใช้เกลือในการหมักปริมาณค่อนข้างสูง ดังนั้นการศึกษานี้จึงได้ทำการหาปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมที่จะเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่นิยมในการตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกควบคู่ไปด้วย ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงต่อไป

วัตถุประสงค์

1. หาปริมาณความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสมในการเติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ในการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแลคติก
2. เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากปลาร้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
วารสารปริทัศน์

1. อาหารหมัก

การหมักเป็นวิธีการถนอมอาหารที่มนุษย์รู้จักกันมานาน โดยช่วงเริ่มต้นมีจุดประสงค์เพียงเพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตผลทางการเกษตร ให้ยาวนานขึ้น ป้องกันการเน่าเสีย ซึ่งยึดหลักที่ว่าการเก็บเกี่ยว และการเก็บรักษาที่ถูกวิธีจะทำให้ผลิตผลนั้นมีการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และลักษณะเฉพาะทางประสาทสัมผัสไปในทางที่ดี และเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค แต่ต่อมาได้มีการขยายการผลิตมากขึ้นจนถึงระดับการค้าตั้งแต่ระดับตลาดย่อยไปจนถึงระดับการค้าระหว่างประเทศ ซึ่งอาหารหมักของไทยมีมากมายหลายชนิด โดยอาศัยการหมักที่เป็นธรรมชาติ และอาศัยเชื้อที่ติดมากับวัตถุดิบที่ใช้โดยทั่วๆไปการหมักจะขึ้นกับเชื้อที่ติดมา และต้องควบคุมสภาวะการเจริญที่เหมาะสม (วิเชียร, 2534) อาหารหมักดองเหล่านี้แบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1.อาหารหมักดองจากพืช ประกอบด้วย :

1.1 ผัก ได้แก่ กระเทียมดอง ขิงดอง ก๊งฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ใบเมี่ยง ตังฉ่าย และ ผักกาดดอง

1.2 ผลไม้ ได้แก่ ท้อดอง มะม่วงดอง และอื่นๆ

1.3 โกโก้และกาแฟ

1.4 ธัญญพืช ได้แก่ ขนมจีนหมัก

1.5 ถั่วเหลือง ได้แก่ ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว

2.อาหารหมักดองจากสัตว์

2.1 ผลิตภัณฑ์จากนม ได้แก่ นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เนยแข็ง และเนยเหลว

2.2 ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ ได้แก่ แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว

2.3ผลิตภัณฑ์จากปลา ได้แก่ กะปิ กุ้งจ่อม ไตปลา น้ำปลา น้ำเคย ปลาจ่อม ปลาส้ม ปลาเจ่า ปลาทูเค็ม ปลาหมัก ส้มฟัก ปลาร้า และหอยดอง

ตัวอย่างกรรมวิธีการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมักได้แก่ ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาส้มฟัก และปลาเจ่า

- ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาส้ม การจัดผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดอยู่ในกลุ่มเดียวกันเพราะผลิตภัณฑ์ทั้ง 3 ชนิดเป็นการหมักโดยใช้เกลือผสมอาหารที่เป็นคาร์โบไฮเดรตมีกรรมวิธีการผลิตที่คล้ายกัน โดยเฉพาะปลาจ่อมและปลาส้มจะแตกต่างกันที่ส่วนผสมของเกลือและคาร์โบไฮเดรต รวมทั้งระยะเวลาการหมักเท่านั้น ปลาน้ำจืดสดหรือแช่แข็งจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพด้านกลิ่นรสดีกว่าปลาทะเล เพราะการหมักเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี การนำปลาที่แช่แข็งแล้วไปทำ ทำให้ขาดจุลินทรีย์บางชนิดที่ช่วยในการย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีทำ

1. การเตรียมปลาผสมเกลือ

นำปลามาตัดแต่ง อาจจะต้องขอดเกล็ด ตัดหัว ควักไส้ และเอาไขมันออก ล้างน้ำ ผึ่งให้สะเด็ดน้ำในกรณีปลาส้ม โดยมากผู้ผลิตมักจะไม่เอาหัวออก นำปลามาผสมเกลือบรรจุให้แน่นในภาชนะ เช่น โอ่ง หรือไห โดยอัตราส่วนปลากับเกลือดังแสดงใน ตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์อาหารหมักและระยะเวลาที่ใช้ในการหมักครั้งที่ 1

ชนิดของผลิตภัณฑ์	อัตราส่วน(โดยน้ำหนัก) ปลา : เกลือ	ระยะเวลาที่ทิ้งไว้ (การหมักครั้งที่1)
*ปลาร้า	3 :1	1 คืน - หลายเดือนหรือจนกว่าต้องการทำปลาร้า
ปลาจ่อม	7: 3	2 วัน
ปลาส้ม	7 : 3	5 วัน

ที่มา : พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล 2541. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

2.การหมัก

นำปลาหมักเกลือที่เตรียมไว้มาผสมกับคาร์โบไฮเดรต และส่วนผสมอื่น เช่น กระเทียม เคล้ากันให้ทั่วแล้วบรรจุในภาชนะ เช่นไห หรือ โอ่งปากแคบ ปิดไหด้วยซีกไม้ไผ่ขัด อัดให้แน่นอีกครั้ง หมักไว้ตามเวลาที่กำหนด ดังแสดงในตารางที่ 2

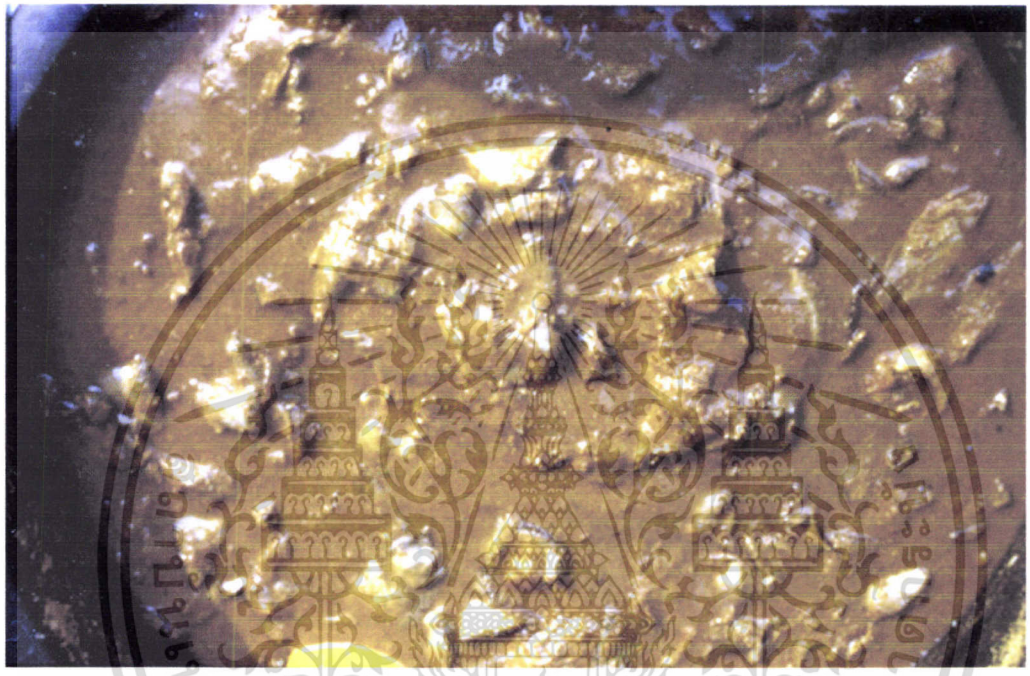
ตารางที่ 2 แสดงอัตราส่วนของผลิตภัณฑ์อาหารหมักและระยะเวลาที่ใช้ในการหมักครั้งที่ 2

ชนิดของผลิตภัณฑ์	อัตราส่วน (โดยน้ำหนัก)	ระยะเวลาการหมัก
*ปลาร้า	ปลาเกลือ : ข้าวคั่วบดหรือรำ 10 : 1	3 - 12 เดือน
ปลาจ่อม	ปลาเกลือ : ข้าวคั่วบุบหรือสุก 10: 3 อาจผสมกระเทียม ลงไปด้วยร้อยละ 1- 5	3 - 7 วัน
ปลาเจ่า	ปลาเกลือ : ข้าคั่วบุบหรือข้าวสุก 10 : 3-3.5 อาจผสมกระเทียมลงไปด้วยร้อยละ 1 -5	7 - 10 วัน

ที่มา : พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล 2541. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ

*เป็นตัวอย่างที่ใช้ในการทำการทดลองครั้งนี้ ดังแสดงในรูปที่1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 1 แสดงผลิตภัณฑ์ปลาหมัก คือ ปลาร้า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มาตรฐาน

ในปัจจุบันยังไม่มีหน่วยงานใดกำหนดมาตรฐานของปลาร้า การผลิตส่วนใหญ่เป็นลักษณะครัวเรือนปริมาณไม่มาก เช่นเดียวกับ น้ำปลาและกะปิ แต่อย่างไรก็ตามคุณภาพที่สำคัญของผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมัก ได้แก่ กลิ่นเฉพาะของผลิตภัณฑ์น้ำหมัก ได้แก่ กลิ่นเฉพาะของผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะบอกว่าเป็นกลิ่นหอม ปลาน้ำจืดเป็นวัตถุดิบที่ดีกว่าปลาทะเล ไม่ควรใช้ปลาที่ผ่านการแช่เข็งแล้วมาทำ จะได้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ดี นอกจากนี้ คุณภาพอย่างอื่นที่ควรคำนึง คือ ต้องปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค เช่น *Samoneila spp., Clostridium spp.* และพยาธิ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยต่อการบริโภคผลิตภัณฑ์เหล่านี้ จึงมีการแนะนำให้ผ่านความร้อนก่อนการบริโภค

การเก็บรักษา

ปลาร้าเมื่อหมักได้ที่แล้ว ควรนำออกจากไหที่หมักบรรจุในขวดโหลเก็บในอุณหภูมิห้องได้ ขวดหรือภาชนะที่นำมาใช้ควรสะอาดและแห้งเพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อน หากจะยืดอายุการเก็บรักษาสามารถนำภาชนะที่เก็บปลาร้าเก็บไว้ในที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ในตู้เย็น

ปัจจุบันมีการพัฒนาการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์ และเทคโนโลยีมากขึ้น มีการศึกษากลไกการเปลี่ยนแปลงระหว่างการหมักเหล่านั้น และพบว่าการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวเกิดจาก กระบวนการหมักทางจุลชีววิทยา โดยเชื้อจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกเชื้อแบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีทั้งพวก homofermentative และ heterofermentative lactic acic bacteria ทั้งนี้ขึ้นกับผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ผลิตผลหลักที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารคาร์โบไฮเดรตโดยเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเจริญในผลิตภัณฑ์

แบคทีเรีย	**ผลิตผลหลักของการหมัก**
Homofermentative Lactic Acid Bacteria (Lactococci, some Lactobacilli etc.)	กรดแลคติก
Heterofermentative Lactic Acid Bacteria (Leucostoc and some Lactobacilli)	กรดแลคติก, เอธานอล, คาร์บอนไดออกไซด์
Bacillus species (particularly in the presence of nitrate)	กรดแลคติก, เอธานอล, คาร์บอนไดออกไซด์
Clostridium species	กรดบิวทาริก, กรดแลคติก, อะซิโตน, บิวทานอล

ที่มา : Frazier, W.C., and Westhoff, D.E. 1979

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. การหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ (Daly, 1973)

การทำงานของแบคทีเรียแลคติกจะก่อให้เกิดกรดขึ้นช้าๆ ปฏิกิริยาการหมักจึงเริ่มตั้งแต่การเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรดแลคติก จนทำให้ความเป็นกรดด่างของอาหารลดลง ซึ่งสามารถแบ่งวิธีการหมักเพื่อให้เกิดกรดโดยจุลินทรีย์ได้ 2 วิธีใหญ่ๆคือ

2.1 การหมักที่เกิดจากเชื้อจุลินทรีย์ในธรรมชาติ

กรรมวิธีนี้ขึ้นกับโอกาสของการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ ถ้าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์มีเพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง ก็จะไม่ได้กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัสผลิตภัณฑ์ตามต้องการ ในการพยายามให้เกิดการหมักที่ใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ back slopping ทำได้โดยหมักเนื้อที่สภาวะเหมาะสมก่อนในลักษณะ batch จากนั้นจึงเติมลงในเนื้อที่ต้องการหมักในลักษณะของ starter (Daly, 1973) อย่างไรก็ตามข้อเสียในการหมักโดยวิธีนี้ได้แก่

- ใช้เวลานาน โดยทั่วไปประมาณ 3 - 7 วัน เป็นการสิ้นเปลืองทั้งแรงงานคน และเวลา
- มาตรฐานคุณภาพของผลิตภัณฑ์ในแต่ละครั้งไม่เท่ากัน เพราะขึ้นกับโอกาสการปนเปื้อนของเชื้อ
- back slopping สามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการเจริญได้ดีเท่ากับเชื้อที่ต้องการ โดย Jensen (1942) กล่าวว่า วิธีนี้ไม่ใช้ในการค้าระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่

2.2 การหมักที่เกิดจากเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

ในปี 1940 Jensen และ Paddock (1940) พบว่า เชื้อจุลินทรีย์พวกเชื้อ *Lactobacillus* สามารถใช้เป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นได้ Deibel (1974) กล่าวว่าเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่ใช้ในไส้กรอกหมักควรมีลักษณะดังนี้

- สามารถเจริญได้ในสภาวะไร้อากาศ ภายในชิ้นเนื้อผลิตภัณฑ์ได้
- สามารถใช้น้ำตาลที่เติมลงไป และทำให้ผลิตกรดในผลิตภัณฑ์ได้
- ทนต่อเกลือ และสามารถเจริญเติบโตได้เร็วในภาวะที่มีเกลืออย่างน้อย 6.0 เปอร์เซ็นต์
- ต้องไม่เป็นอันตรายต่อร่างกายมนุษย์

3.เชื้อแบคทีเรียแลคติก

เชื้อแบคทีเรียแลคติกจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae มีลักษณะทั้งที่เป็นท่อนยาว ท่อนสั้น หรือกลม แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ในการเจริญเติบโตส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophillic) บางชนิดเป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน (Frazier และ Westhoff, 1979) มีความต้องการอากาศที่ซับซ้อน และค่อนข้างสมบูรณ์ในการเจริญ (Prescott และ Dunn, 1959) แหล่งพลังงาน ได้จากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน ต้องการแหล่งไนโตรเจนรวมทั้งวิตามิน และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

growth factor หลายชนิดในการเจริญ เช่น rioflavin, biotin และกรดอะมิโนต่างๆ สำหรับความต้องการ organic growth factor เช่น adenine, guanine และ uracil ของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ ส่วนเกลืออนินทรีย์ที่จุลินทรีย์กลุ่มนี้บางชนิดต้องการในการเจริญ ได้แก่ แมงกานีส โปแตสเซียม และฟอสเฟต (Tittsler และ คณะ, 1952)

เชื้อแบคทีเรียแลคติกพบทั่วไปในอาหาร เช่น อาหารหมัก ผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์นม ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ และสัตว์ สายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคจะอยู่ในสายพันธุ์ Streptococci แบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญอย่างมากในอุตสาหกรรมอาหาร และอาหารสัตว์ โดยมีบทบาทที่สำคัญคือ ผลิตกรดแลคติกได้เป็นจำนวนมาก และ สร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ที่ก่อให้เกิดอาหารเน่าเสีย และอาหารเป็นพิษได้ (ภาคผนวก ค)

เชื้อแบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งตามลักษณะการหมักได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Homofermentative lactic acid bacteria

คือ แบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ให้กรดแลคติก 85-95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิตริกและคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย ขั้นตอนการสร้างแลคติกเริ่มจากน้ำตาลแลคโตสจะผ่านเข้าสู่เซลของแบคทีเรียแลคติกโดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโทพลาสซึม ที่เรียกว่า Phosphenol - Pyruvate- Dependent Phosphotranferase System (PEP-PTS) ทำให้แลคโตสเกิด ปฏิกริยาเติมหมู่ฟอสเฟต (Phosphorylation) อยู่ในรูป lactose-6-phoaphate จากนั้นจะถูกเอนไซม์ phospho-β- galactosidase ไฮโดรไลซ์ได้เป็น galactose-6-phosphate กับ glucose ซึ่งกลูโคสจะผ่านเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ของ Embden- Meyerhof-Parnas Pathway : (EMP Pathway) จนได้เป็น lactate ในขั้นตอนสุดท้ายซึ่งเปลี่ยนมาจากไพรูเวต โดยเอนไซม์ lactic dehydrogenase ส่วน galactose-6-phosphate จะเข้าสู่กระบวนการต่างๆ ใน D-tagatose--6-phosphate pathway ได้เป็น tagatose-1,6-diphosphate และเปลี่ยนเป็น dihydroxyacetone phosphate ท้ายสุดโดยเอนไซม์ tagatose-1,6-aldolase ซึ่งจะเปลี่ยนเป็น glyceraldehyde-3-phoaphate โดยเอนไซม์ triosephosphate isomerase ซึ่ง glyceraldehyde-3-phosphate เป็นสารตัวกลางในกระบวนการ EMP pathway และเปลี่ยนเป็น lactate ในที่สุด

น้ำตาลกลูโคสจะสามารถเข้าสู่เซลของแบคทีเรียแลคติก โดยอาศัยเอนไซม์ PEP-PTS ทำให้กลูโคสอยู่ในรูป glucose-6-phosphate ซึ่งจะเข้าสู่ EMP pathway ได้เป็น lactate ในที่สุด ส่วนน้ำตาลกาแลคโตสจะสามารถซึมผ่านเข้าสู่เซลเมมเบรนได้เลย หลังจากถูกเติมหมู่ฟอสเฟตโดย

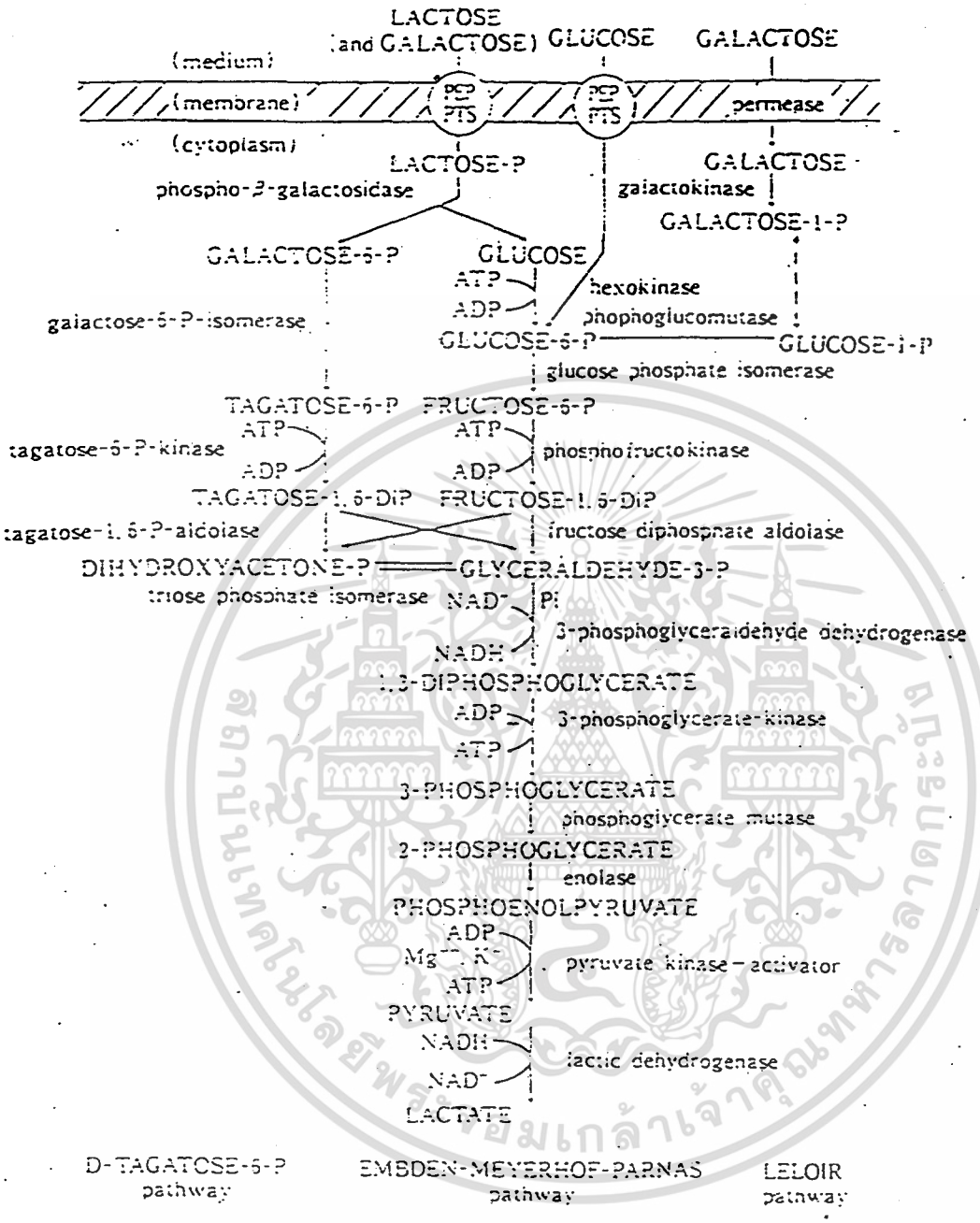
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอนไซม์ 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 *L.bulgaricus, L.casei , L.plantarum* และ *L.acidophilus* เป็นต้น (Lawrence และ Terence, 1979) (ดังแสดงในรูปที่ 2)

2. Heterofermentative lactic acid bacteria

เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6อะตอมให้กรดแลคติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนน้ำตาลที่เหลือเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกและเอธิลอัลกอฮอล์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ และสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc mesenteoids* (Tamine, 1981)แลคติกแอซิดแบคทีเรียกลุ่มนี้จะไม่มีเอนไซม์ aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์หนึ่งในกระบวนการไกลโคไลซิส จึงทำให้ไม่สามารถย่อย fructose-6-phosphate ได้เป็น triose-phosphate จึงต้องออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate ได้เป็น 6-phosphogluconate จากนั้นเกิดปฏิกริยา decarboxylate ได้เป็น pentose-phosphate กับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่ง pentose-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่ triose-phosphate และ acetyl-phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase โดยที่ triose-phosephate จะเปลี่ยนเป็น lactate ได้ ส่วน acetyl-phosphate จะเปลี่ยนเป็น acetyldehyde และ ethanol นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกอาจจะใช้กระบวนการอื่นๆ ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่นกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอล เป็นต้น (ดังแสดงในรูปที่ 3)

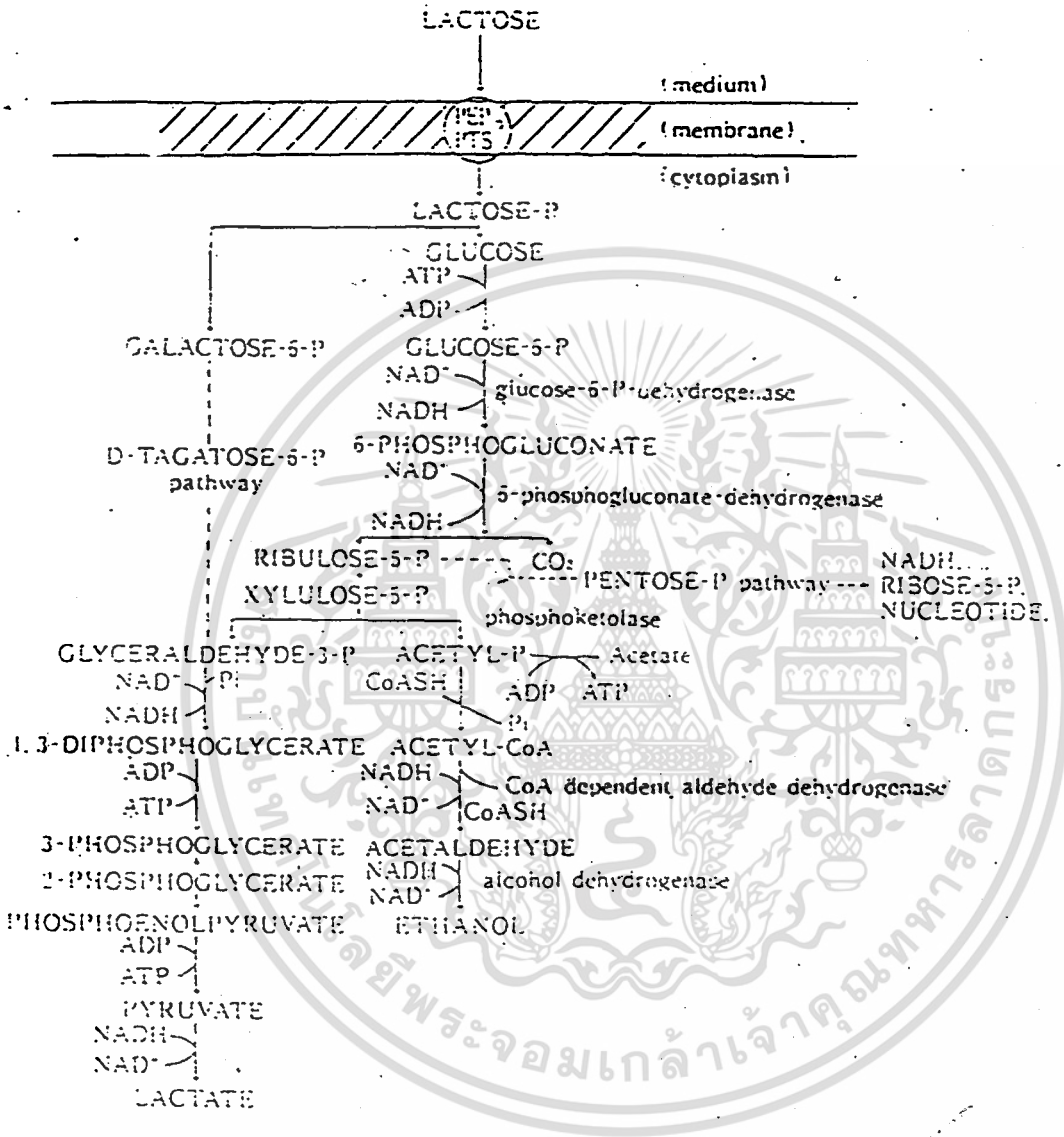
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่2 แสดงการใช้น้ำตาลของพวก homofermentative lactic acid bacteria

ที่มา : Lawrence และ Terence, 1979

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่3 แสดงการใช้น้ำตาลของพวก heterofermentative lactic acid bacteria

ที่มา : Tamine, 1981

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 แสดงตัวอย่างกลุ่มเชื้อแบคทีเรียแลคติกในการหมักแบบ Homo และHeterofermentative lactic acid bacteria

Homofermentative			Heterofermentative		
Organisms	Lactate Config uration	%G +C	Organisms	Lactate configuration	%G +C
Lactobacillus			*Lactobacillus*		
L. acidophilus	DL	36.7	*L. brewis*	DL	42.7-46.4
L. bulgaricus	D(-)	50.3	*L. buchneri*	DL	44.8
L. casei	L(+)	46.4	*L.cellobiosus*	DL	53
L. coryniformis	DL:	45	*L. confusus*	DL	44.5-45.0
L. curvatus	DL	43.9	*L. coprophilus*	DL	41.0
L.delbrueckii	D(-)	50	*L fermentum*	DL	53.4
L. helveticus	DL	39.3	*L. hilgardii*	DL	40.3
L. jugurti	DL	36.5-39.0	*L. sanfrancisco*	DL	38.1-39.7
L. jensenii	D(-)	36.1	*L. trichodes*	DL	42.7
L. lactis	D(-)	50.3	*L. viridescens*	DL	35.7-42.7
L. leichmannii	D(-)	50.8	*Leuconostoc*		
L. plantarum	DL	45	*L. cremoris*	D(-)	39-42
L. salivarius	L(+)	34.7	*L. dextranicum*	D(-)	38-39
Pediococcus			*L. lactis*	D(-)	43-44
P. acidilactici	DL	44.0	*L. mesenteroides*	D(-)	39-42
P. cerevisiae	DL		*L. oenos*	D(-)	39-40
P. pentosaceus	DL	38	*L. paramesenteroides*	D(-)	38-39
Streptococcus			*L. gelidum*	D(-)	37
S. bovis	D(-)	38-42	*L. carnosum*	D(-)	39
S. themophilus	D(-)	40	*Carnobacterium*		
Lactococcus			*C. divergens*		33.0-36.4
L. lactis subsp. lactis	D(-)	38.4-38.6	*C. mobile*		35.5-37.2
L. lactis subsp cremoris	D(-)	36.9-40.0	*C. gallinarum*		34.3-36.4
L.lactis subsp hordniae		35.2	*C. piscicola*		33.7-36.4
L.garvieae		38.3-38.7			

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Homofermentative			Heterofermentative		
Organisms	Lactate Config uration	%G +C	Organisms	Lactate Config uration	%G +C
L. plantarum		36.9-38.1			
L. raffinolactis		40.0-43			
Vagococcus					
V. fluvialis		33.6			
V. salmoninarum		36.0-36.5			

ที่มา : Fermented Foods and Related Products of Fermentation

การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ผลการถนอมอาหารของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ระหว่างการผลิต และการเก็บรักษาอาหารหมักที่สำคัญ คือสภาวะกรด โดยเกิดขึ้นในอาหารระหว่างการหมัก การสร้างกรดนี้ จะเป็นขั้นตอนแรกของการหมักโดยการเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรต ในอาหารไปเป็นกรดอินทรีย์ (กรดแลคติก และกรดอะซิติก) โดยเกิดขึ้นพร้อมกับการลดลงของความเป็นกรดด่างของอาหารมีบทบาทสำคัญในการเพิ่มอายุการเก็บ และความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สุดท้าย นอกจากนี้เชื้อแบคทีเรียแลคติกยังสามารถผลิตและปลดปล่อยสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นนอกเหนือไปจากกรดแลคติก และกรดอะซิติก สารเหล่านี้จะยับยั้งได้หลายชนิด และมีผลสำคัญช่วยในการถนอมอาหาร โดยสารเหล่านี้จะผลิตออกมาในปริมาณที่น้อยกว่ากรดแลคติก และ กรดอะซิติก ซึ่งสารเหล่านี้ได้แก่ กรดฟอร์มิก กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย เอธานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล อะซิโตอิน 2,3-บิวทาไดออล อะซิทัลดีไฮด์ เบนโซเอท เอนไซม์แบคเทอริโอไลติก แอนติไบโอติก และแบคเทอริโอซิน (Klaenhammer, 1988; Lindgren และ Dobrogosz,1990;Schilling,1990 และPiard และ Desmazeaud,1991)จากสารเหล่านี้จะขอกล่าวถึงแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารที่ได้ทำการวิจัยในครั้งนี้

1. แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินจัดเป็นสารต่อต้านจุลชีพ (antimicrobial substances) ที่มีโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นสารประเภทโปรตีน และอาจมีคาร์โบไฮเดรตร่วมอยู่ด้วย มีขนาดใหญ่กว่าสารปฏิชีวนะและมีฤทธิ์ในการฆ่าหรือทำลายแบคทีเรียที่มีภูมิรับไว (susceptible bacteria) และจำเพาะต่อบริเวณรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin receptor) บนเซลแบคทีเรียด้วย (Tagg,Dajanii และ Wannamaker, 1976) อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินที่สร้างจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์กัน จะมีผลต่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การยับยั้งในกลุ่มแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน มีลักษณะทางชีวเคมี พันธุศาสตร์ คล้ายคลึงกัน แต่แตกต่างกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ต่างชนิดกัน

การศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียที่สร้างสารแบคเทอริโอซินเริ่มศึกษาใน *E.coli* ที่สร้างสารโคลิซิน (colicins) ซึ่งได้มีการศึกษาอย่างละเอียดถึงกลไกการทำงาน (mode of action) ผู้ถูกอาศัย (host range) ลักษณะทางพันธุกรรม (genetic determination) การทำให้บริสุทธิ์ (purification) เป็นต้น ได้มีการศึกษาการสร้างต่อต้านจุลินทรีย์ที่สร้างโดยพวกแบคทีเรียแลคติกเช่น *L.fermentum* (Deklerk,1967;Deklerk และ Smit,1967), .*L helveticus* (Upreti และ Hindsdill,1973), *L.acidophillus* (Barefoot และKlaenhammer,1983;1984) และ *L.plantarum* (Daeschel,Mckenny และ McDonald,1990)

ในปี 1988 Klaenhammer ได้แบ่งสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่สร้างโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก เป็น 2 ประเภท ตามลักษณะผลการยับยั้งจุลินทรีย์ (antyimicrobial spectrum) คือ

1. สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ ในกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน เช่น แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด

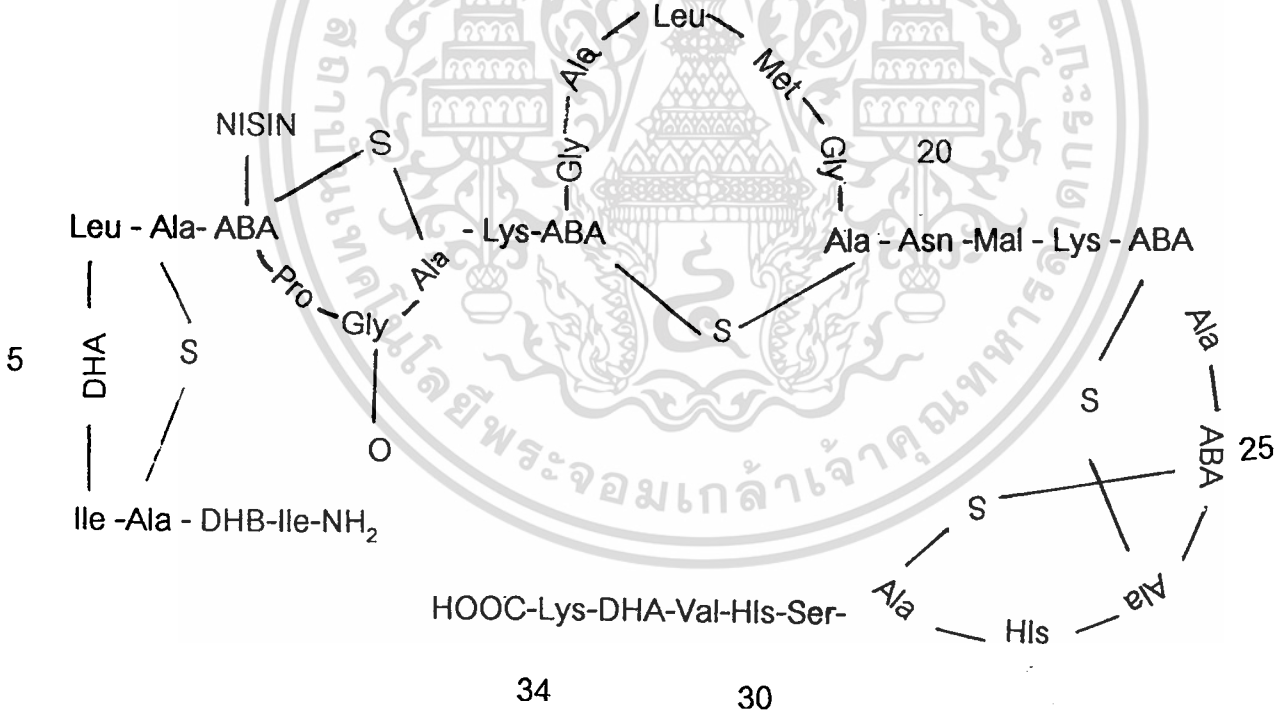
2. สารต่อต้านจุลินทรีย์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด โดยมีผลยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคเช่น *Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes*

ในบรรดาแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียชนิดต่างๆ แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียพวก *Lactobacillus* หรือ group *N Streptococci* ที่เรียกว่าไนซิน (มาจาก group N - inhibiting substsances) มีการนำไปใช้ในการถนอมอาหารมากที่สุด โดยมีการทดลองใช้ไนซินในอาหารสดและอาหารแปรรูปหลายชนิด เช่น เนยแข็งสวิส น้ำมะเขือเทศ ซุปข้าวโพด meat slurries และเบียร์ พบว่าไนซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวก และสามารถป้องกันการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* ซึ่งทนความร้อนสูง การใช้ไนซินจึงช่วยลดความร้อนที่ต้องใช้ในการฆ่าเชื้อ และฆ่าสปอร์ของ *Clostridium botulinum* ในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูป เช่นอาหารทะเลกระป๋องทำให้รักษาคุณค่าทางอาหาร และลักษณะเนื้อสัมผัสของอาหารนั้นไว้ ทั้งยังช่วยลดค่าใช้จ่ายในการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนสูง

ในปี 1928 Roger ได้รายงานผลการยับยั้งการเจริญของ *Streptococcus lactis* ที่มีต่อเชื้อ *L.bulgaricus* โดยพบว่า *Streptococcus lactis* สร้างสารที่เป็นโพลีเปปไทด์ ต่อมาภายหลังเรียกชื่อนี้ว่า ไนซิน (Nicin) มีลักษณะเป็นโมเลกุลโพลีเปปไทด์สายตรง มีการต่อกันด้วยพันธะซัลเฟอร์ระหว่าง alanine กับ alanine เรียกว่า lanthionine และ aminobutyric acid (ABA) กับ alanine เรียกว่า β-methyl lanthionine (ดังแสดงในรูปที่ 4) ไนซินมีจำนวนกรดอะมิโน 29 ถึง 34 มีน้ำหนักโมเลกุล 7,000 ถึง 10,000 ดาลตัน ถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โปรตีน เช่นเอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ pancreatin เอนไซม์จากน้ำลายหรือกระเพาะ ยกเว้น เอนไซม์เรนเนท มีคุณสมบัติในการละลายได้ดีที่ความเป็นกรดด่างต่ำ และคงตัวที่ความเป็นกรดด่าง 2.0 กล่าวคือสามารถนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดยไม่สูญเสียกิจกรรม แต่อย่างไรก็ตามการทำงานของไนซินยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด คาดว่าไนซินจะมีผลต่อไซโตพลาสมิกเมมเบรนโดยการจับอิออนบวก ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ของไนซินจะอยู่ในช่วงแคบ คือ จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Streptococcus* , *Lactobacillus* , *Bacillus* . และ *Clostridium* ปัจจุบันไนซินใช้เป็นยาปฏิชีวนะที่ยอมรับในการเติมลงในผลิตภัณฑ์อาหาร (Liu และ Hanson, 1990)



รูปที่4 แสดงโครงสร้างไนซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

1. เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1.1 เครื่องแก้ว

- ปิเปต (pipette) ขนาด 0.1,1และ10 มิลลิลิตร
- หลอดทดลอง (test tubes) ขนาด 16x150
- บีกเกอร์ (beaker) ขนาด 250,1000 และ2000 มิลลิลิตร
- กระบอกตวงขนาด 250 มิลลิลิตร
- จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
- แท่งแก้วคน (stirring rod)
- แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (spreader)
- ลวดเขี่ยเชื้อ (loop)
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

1.2 ช้อนตักสาร

1.3 เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง

1.4 ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ของ Jouan

1.5 ตู้ปลอดเชื้อ (larminar flow)

1.6 ตู้แช่เย็น

1.7 autoclave รุ่น SS-320

1.8 กระบอกใส่ปิเปต (pipette container)

1.9 ที่ใส่หลอดทดลอง (rack)

1.10 ตะเกียงแอลกอฮอล์

1.11 ขวดน้ำกลั่น

1.12 ลูกยาง

1.13 เครื่องวัดpH

1.14 เครื่องไมโครเวฟ

1.15 water bath

1.16 vortex

1.17 ตู้บ่มเชื้อ ของ memmert

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

2.1 peptone จาก casein ของบริษัท Merck, Germany

2.2 Meat extract ของบริษัท Merck, Germany

2.3 Yeast extract ของบริษัท Merck, Germany

2.4 D-glucose ของบริษัท Merck, Germany

2.5 Tween-80 ของบริษัท Merck, Germany

2.6 Agar ของบริษัท Merck, Germany

2.7 Tryptone ของบริษัท Merck, Germany

3.สารเคมี

3.1 Di-Potassium Hydrogen Phosphate ของบริษัท Merck, Germany

3.2 di-Ammonium hydrogen citrate ของบริษัท Merck, Germany

3.3 Citric acid diammonium Salt ของบริษัท Merck, Germany

3.4 potassium dihydrogen Phosphate ของบริษัท Merck, Germany

3.5 Sodium acetate ของบริษัท Merck, Germany

3.6 Manganese sulphate ของบริษัท Merck, Germany

3.7 Magnesium sulfate ของบริษัท Merck, Germany

3.8 Calciumcabornate ของบริษัท Merck, Germany

3.9 sodiumchloride ของบริษัท Merck, Germany

4. จุลินทรีย์

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้มาจาก

- เชื้อที่แยกใหม่จากอาหารหมักคือ ปลาร้า

จุลินทรีย์ทดสอบกลุ่มแบคทีเรียได้จาก ห้องปฏิบัติการทดลอง ได้แก่

Listeria innocua

Bacillus cereus

Staphylococcus aureus

Enterobacter faecalis

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

96797

ขั้นตอนและวิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากปลาร้า

1.1 เตรียมตัวอย่างปลาร้าเจือจาง 1 : 10 , 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} และ 10^{-5} ในการเตรียมระดับความเจือจาง 10^{-1} จะชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ แล้วเติมน้ำยาสำหรับเจือจาง 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่นไฟฟ้าหรือ stomacher

1.2 ทำการเจือจางตัวอย่างระดับ 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} ตามลำดับ

1.3 ปีเปตแต่ละระดับความเจือจางจากข้อ 2 ใส่ในจานเพาะเชื้อ MRS medium (ภาคผนวก ก) (ดังรูปที่ 5) ที่มีปริมาณ เกลือโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0 , 2.5 , 5 , 7.5 และ 10 % โดยแต่ละระดับทำ 2 ซ้ำ ยกเว้นที่ระดับ 10^{-1}, 10^{-2} จานเพาะเชื้อละ 0.1 มิลลิลิตร

1.4 ใช้แท่งแก้วรูปตัว L เกลี่ยตัวอย่างอาหารแต่ละระดับความเจือจางให้ทั่วจาน

1.5 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่มไว้ใน candle jar เป็นเวลา 24 ชม.

1.6 คัดเลือกโคโลนีของเชื้อที่มีบริเวณใส (clear zone) (ดังรูปที่ 6) ล้อมรอบโคโลนีเก็บไว้ในหลอดทดลองด้วย MRS deep tube (ภาคผนวก ก) จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.และนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อไว้สำหรับการทดสอบแบคเทอริโอซิน (ดังรูปที่ 7)

2.. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้าง Bacteriocin ยับยั้ง *S. aureus* , *L.innocua E. faecalis* และ *B. cereus*

วันที่1 นำหลอดตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้เท MRS broth หลอดละ 5 มิลลิลิตร (ดังรูปที่ 8) แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

วันที่2 นำ loop เขี่ยเชื้อแลคติกจากตัวอย่างข้างต้น มาทำการ spot ลงบน BSM medium (ภาคผนวก ก) ซึ่งแบ่งไว้ 4 ช่องๆ ละ 1 ตัวอย่างเชื้อ โดยทำหลอดละ 4 จานเพาะเชื้อ แล้วนำจานเพาะเชื้อไปบ่มเพาะเชื้อใน candle jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชม.

วันที่3 นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดมาดูการเจริญของเชื้อที่ทำการ spot (ภาคผนวก ข) เอาไว้

การเตรียมเชื้ออินดิเคเตอร์

วันที่1 เตรียมหลอดอาหารเหลว TSB (ภาคผนวก ก) และ TSBYE (ภาคผนวก ก) ขอถ่ายเชื้อ *L.innocua, E.faecalis,S.aureus* และ *B.cereus* จากห้องแลบ แล้วนำหลอดเชื้อทั้งหมดไปบ่มเพาะเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

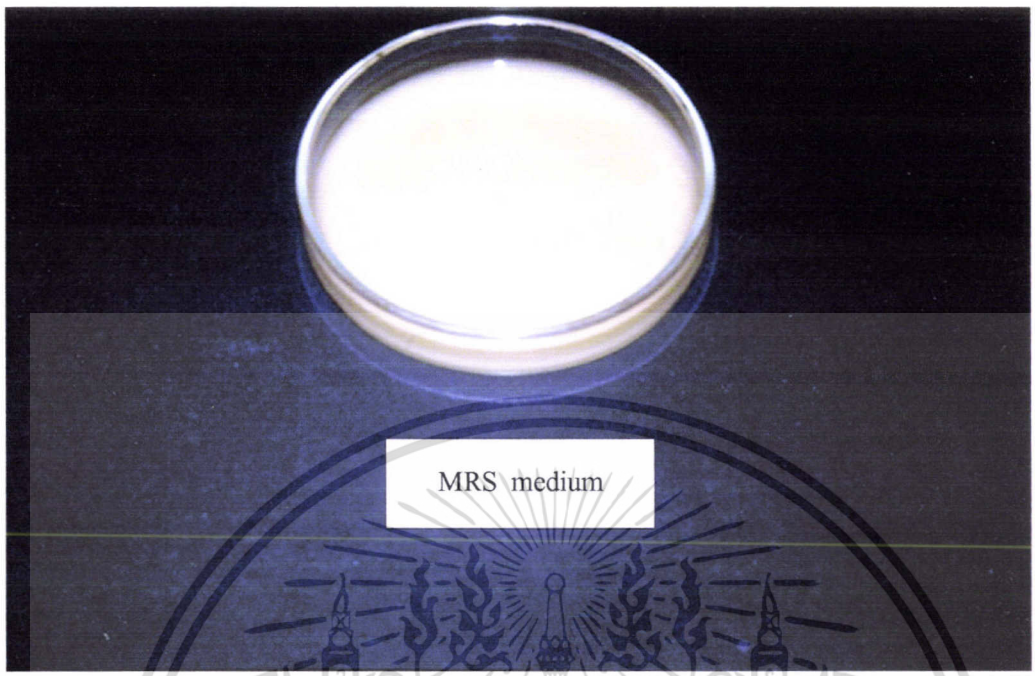
วันที่2 ตรวจสอบดูการเจริญของเชื้ออินดิเคเตอร์ว่ามีการเจริญหรือไม่โดยดูจากความขุ่น (ดังรูปที่ 9 และ รูปที่10) ถ้าไม่มีนำเชื้ออินดิเคเตอร์มาถ่ายใส่ใหม่ ถ้ามีเชื้อขึ้นแล้วให้ทำการต่อเชื้อลงในหลอดอาหารเหลวใหม่แล้วนำไปบ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชม.

วันที่3 หลอม soft agar(ภาคผนวก ก) เพื่อให้วุ้นหลอมเหลวและเก็บไว้ใน water bath อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

- นำเชื้ออินดิเคเตอร์ถ่ายลงใน soft agar โดยให้มีเชื้อใน soft agar 2% (soft agar 5ml ถ่ายเชื้อ0.1 ml) โดยเชื้อ *L.innocua* ให้ถ่ายลงใน TSBYE +0.7%agar(ภาคผนวก ก) *E.faecalis, S.aureus* และ *B.cereus* ให้ถ่ายลงใน TSB+0.7%agar (ภาคผนวก ก) ผสมให้เข้ากันด้วยmixer
- ถ่าย soft agar ที่มีอินดิเคเตอร์ผสมอยู่หลอดละ 5 มิลลิลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี spot ของแบคทีเรียแลคติกเจริญอยู่ให้วุ้นกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ (seeding)
-รอจนวุ้นชั้นบนแข็งตัวดีจึงนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส โดยที่seeding ที่เป็น *L.innocua* ให้บ่มในสภาพ microaerophillic

วันที่4 ดูผลการสร้างแบคเทอริโอซิน ถ้ามีรอบโคโลนีแบคทีเรียแลคติกที่เจริญนั้นจะมีโซนใส (Clear zone)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

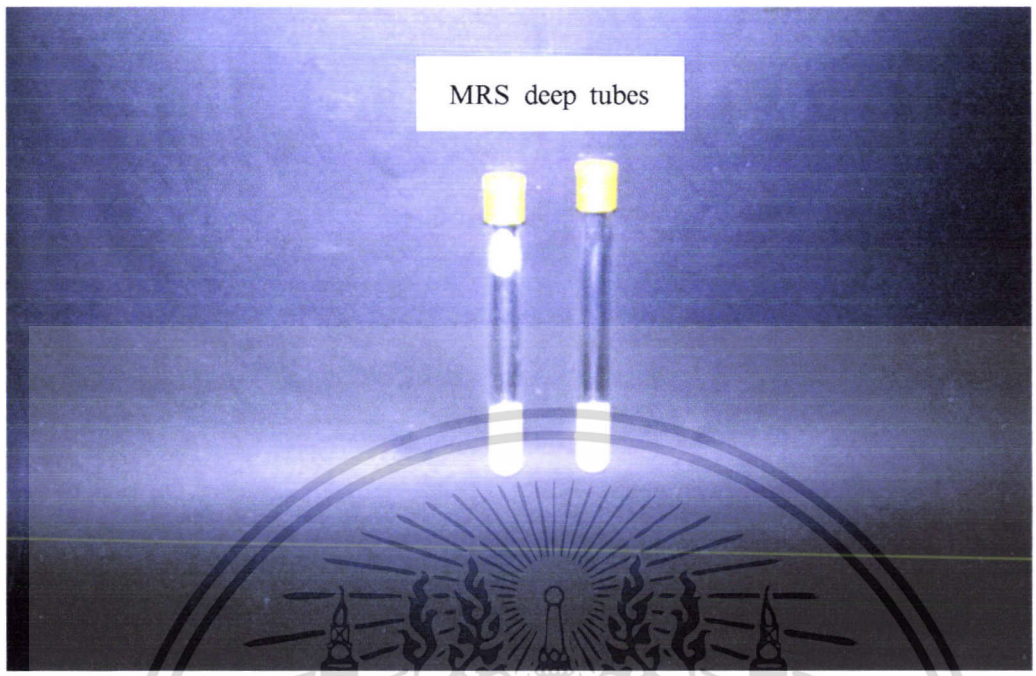


รูปที่ 5 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS medium

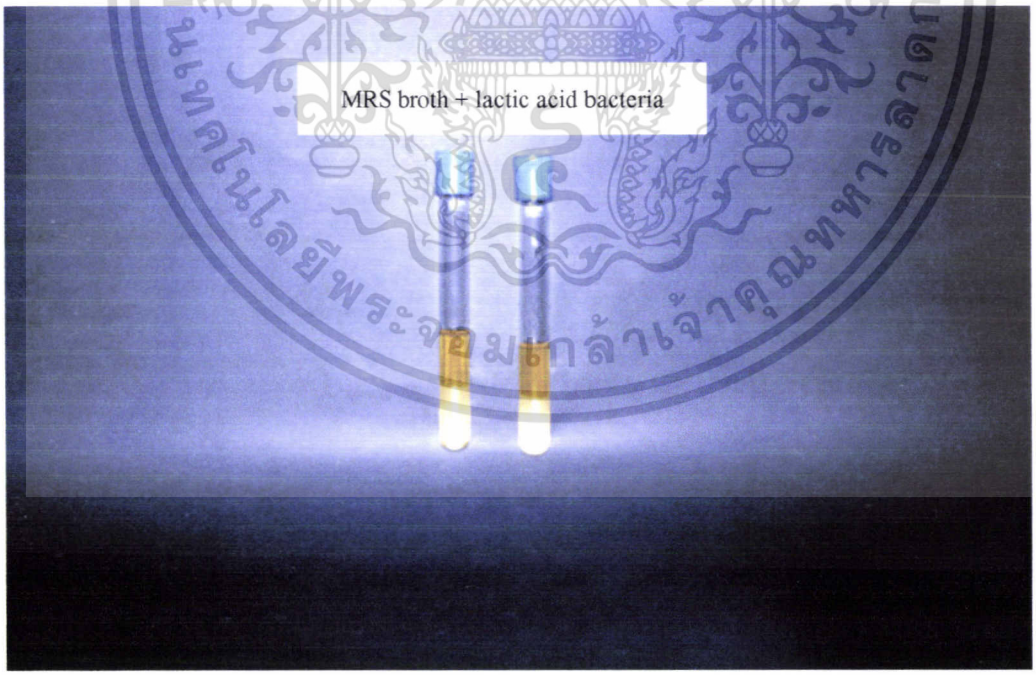
รูปที่ 6 แสดงลักษณะของ Clear zone

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17517



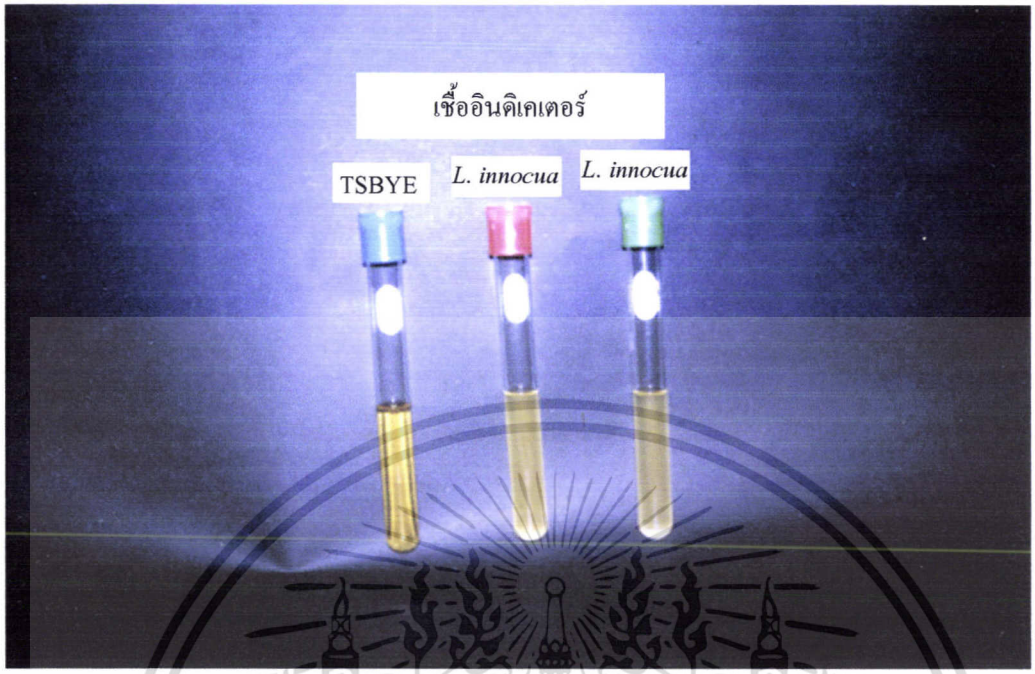
รูปที่ 7 แสดง อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Deep tubes + lactic acid bacreria



รูปที่ 8 แสดงอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Deep tubes + lactic acid bacreria + MRS broth

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง



รูปที่ 9 แสดงการเจริญของเชื้อ *L. innocua* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSBYE

รูปที่10 แสดงการเจริญของเชื้อ *B. cereus*,และ *E. faecalis* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการทดลอง

ความเข้มข้นของเกลือในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีผลต่อการตรวจหาปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกในปลาร้า

ตารางที่ 5 : เปรียบเทียบการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือในระดับต่างๆ จากตัวอย่างปลาร้า 3 แหล่ง จำนวน 6 ตัวอย่าง

% เกลือ	ความเข้มข้น (cfu / g)				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
0	*	*	*	*	*
2.5	*	*	*	$4x10^5$	$1x10^6$
5	*	*	*	$5x10^5$	$4x10^6$
7.5	*	*	*	$20x10^5$	$12x10^6$
10	*	*	*	$4x10^5$	$3x10^6$

* หมายถึง ไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้เนื่องจากเชื้อขึ้นแน่นจานเพาะเชื้อ

ตารางที่ 6 : เปรียบเทียบการตรวจนับเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติกในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือในระดับต่างๆจากตัวอย่างปลาร้า 3 แหล่ง จำนวน 6 ตัวอย่าง

% เกลือ	ความเข้มข้น (cfu/g)				
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
0	*	*	> 300	$302x10^5$	$143x10^6$
2.5	*	*	> 300	$155x10^5$	$76x10^6$
5	*	*	> 300	$140x10^5$	$44x10^6$
7.5	*	*	> 300	$32x10^5$	$14x10^6$
10	*	*	> 300	$24x10^5$	$8x10^6$

* หมายถึง ไม่สามารถนับจำนวนโคโลนีได้เนื่องจากเชื้อขึ้นแน่นจานเพาะเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกในปลาร้า โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 0 , 2.5 , 5,7.5 , และ 10 % พบว่าจากตารางที่ 5 เชื้อแบคทีเรียแลคติกจะสามารถเจริญได้ดีในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 5 % เนื่องจากสามารถเริ่มนับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) ได้จำนวนมาก(ดังภาพที่ 11) และแบคทีเรียแลคติกจะสามารถเจริญได้ดีที่สุดในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 7.5 % เนื่องจากสามารถนับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) ได้จำนวนมากที่สุด (ดังภาพที่ 12)

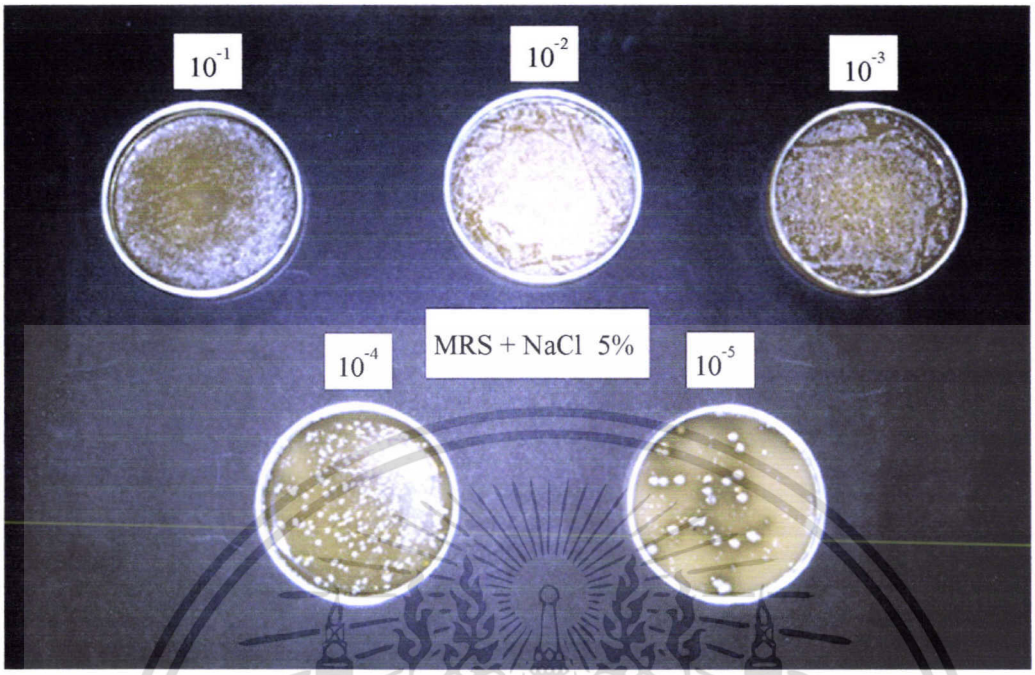
นอกจากนี้ยังพบว่าปริมาณความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ จะมีผลยับยั้งต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติก ดังตารางที่ 6 จะเห็นได้ว่าเมื่อ% เกลือโซเดียมคลอไรด์มากขึ้นจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติกลดลง

ทั้งนี้สาเหตุที่ทำให้เกลือสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติกได้เนื่องจาก

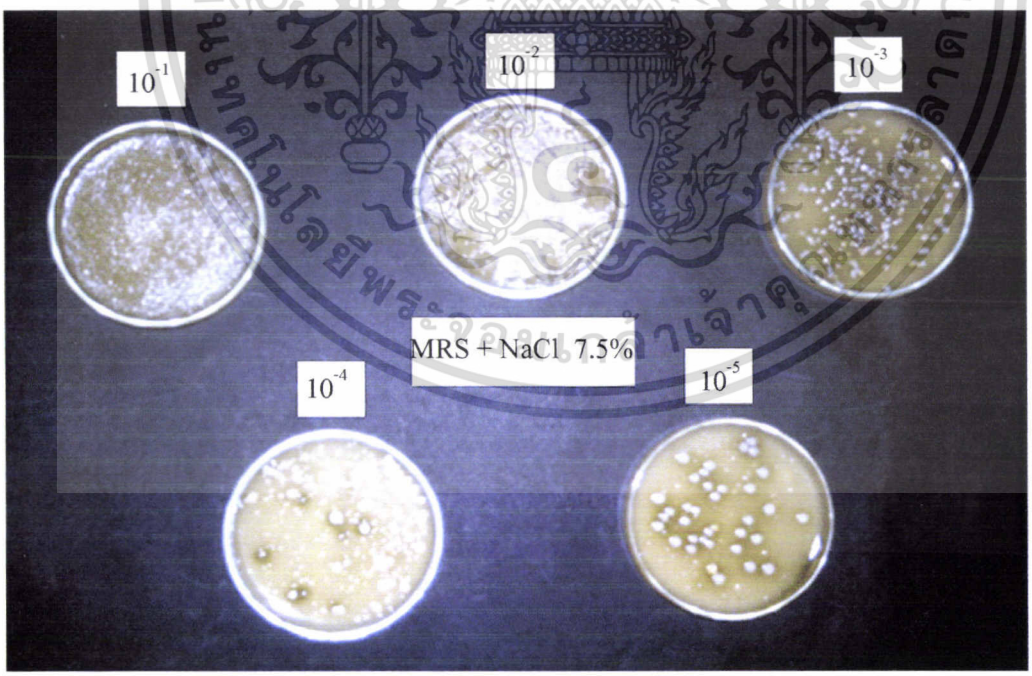
- เกลือทำหน้าที่คล้ายสารพิษต่อเซลล์ของจุลินทรีย์
- เกลือจะลดปริมาณความชื้นทำให้ไม่เพียงพอต่อการเจริญของจุลินทรีย์
- เกลือจะดึงน้ำออกมาจากเซลล์ของจุลินทรีย์โดยอาศัย plasmolysis
- เกลือจะทำลายโพรโทพลาสซึม (protoplasm) ของแบคทีเรีย

ปัจจัยร่วมอื่นๆที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในการทดลองครั้งนี้ คือ สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อจะบ่มในสภาพ microaerophillic ซึ่งเป็นสภาพที่เชื้อจุลินทรีย์ต้องการอากาศในการเจริญน้อยมากหรือไม่มีเลยทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศในการเจริญนั้นไม่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS บนจานเพาะเชื้อได้ และอีกปัจจัยหนึ่งเนื่องจากว่าตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารที่ไม่ได้มีการผ่านการฆ่าเชื้อ ดังนั้นเมื่อปริมาณความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่างมีความเจือจางลดลงจะทำให้ปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ลดลงด้วย (ดังภาพที่13) , (ดังภาพที่ 14) , (ดังภาพที่ 15) , (ดังภาพที่ 16) และ (ดังภาพที่ 17) ตามลำดับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

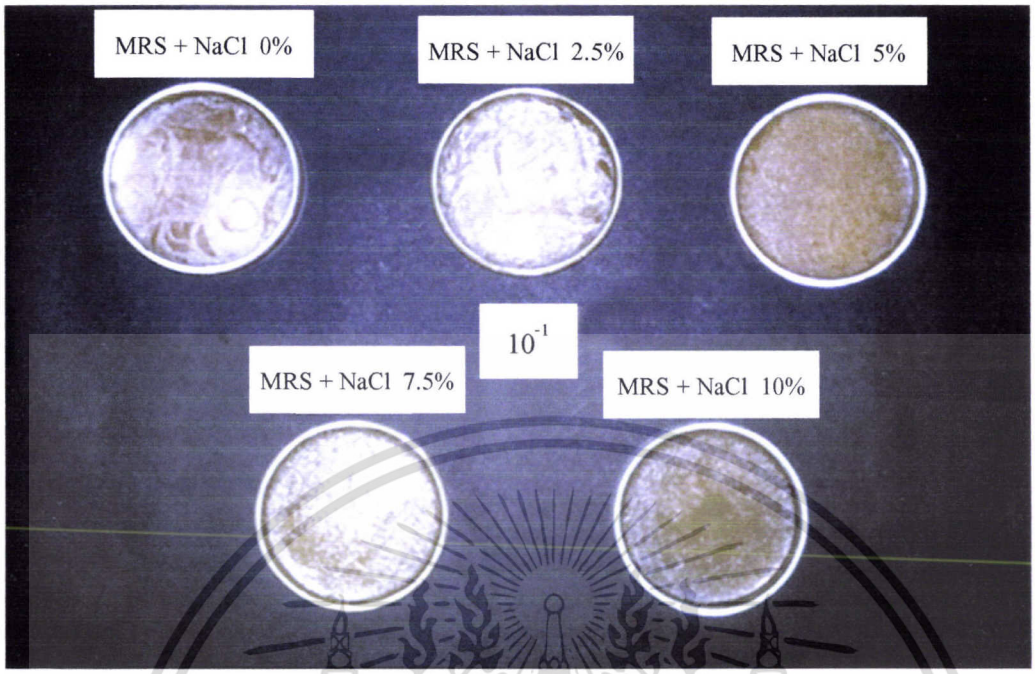


รูปที่ 11 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ความเข้มข้นของเกลือ 5%

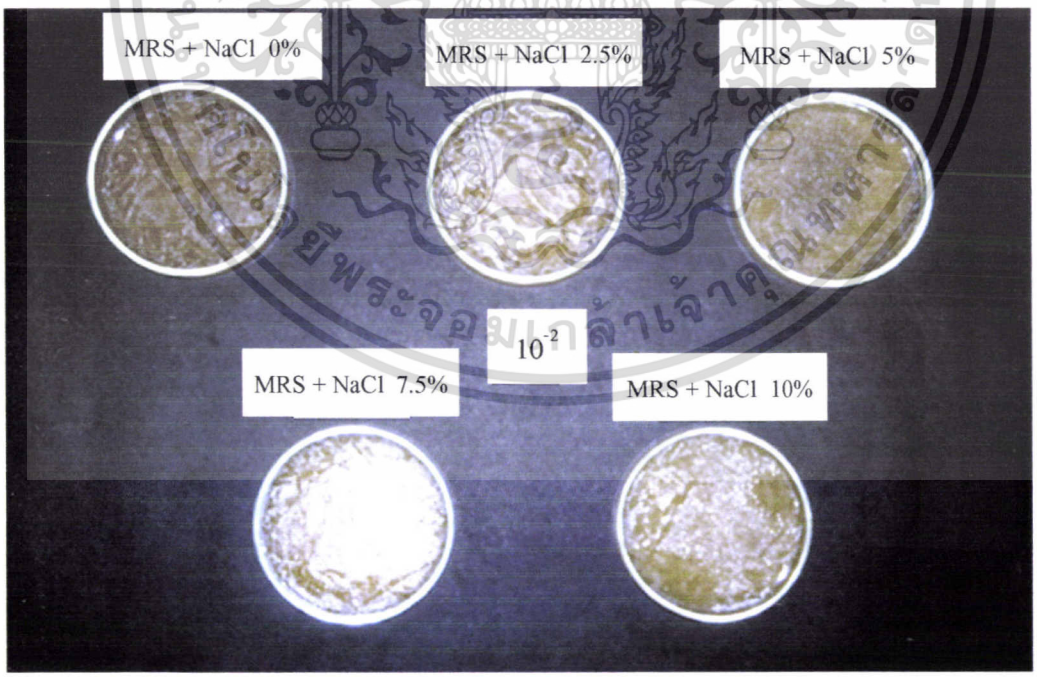


รูปที่ 12 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ความเข้มข้นของเกลือ 7. 5%

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

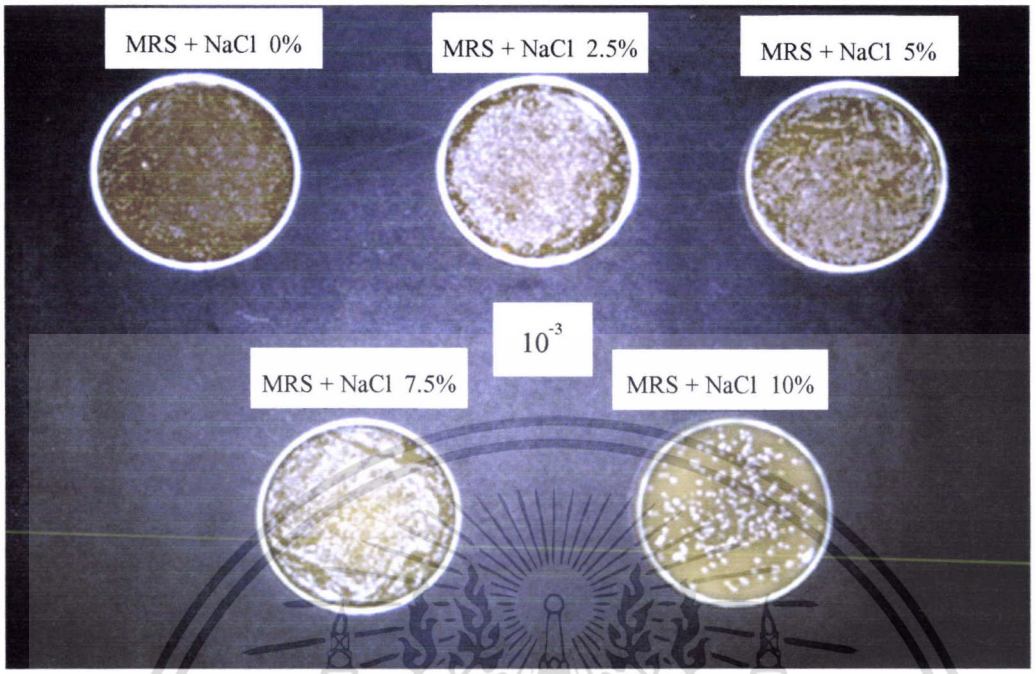


รูปที่ 13 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % เกลือ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-1}

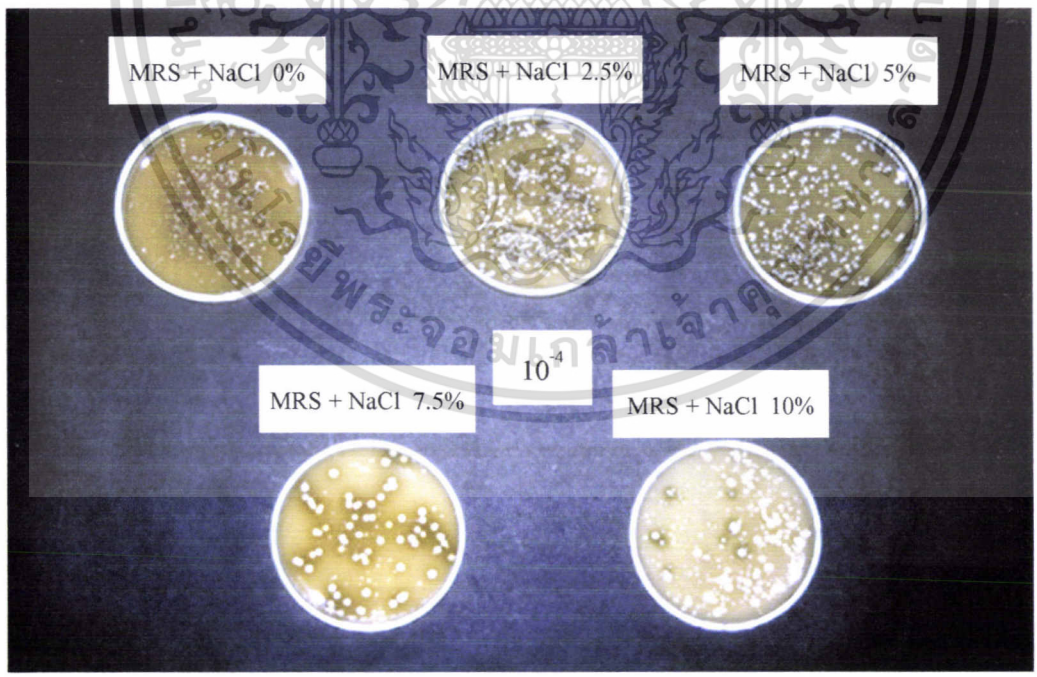


รูปที่ 14 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % เกลือ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-2}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

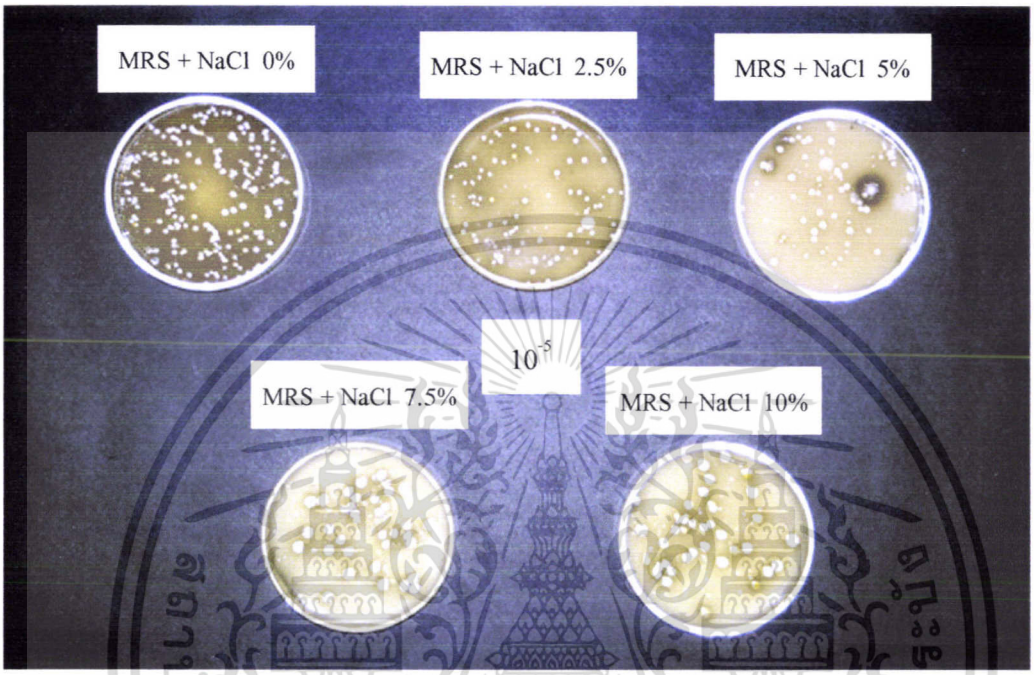


รูปที่ 15 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % เกลือ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-3}



รูปที่ 16 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % เกลือ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-4}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 17 แสดงการเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีปริมาณความเข้มข้น 0, 2.5, 5, 7.5 และ10 % เกลือ ตามลำดับ ที่ความเข้มข้นของสารละลายตัวอย่าง 10^{-5}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

ขั้นตอนที่ 2

จากผลการทดลองการทดสอบแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินพบว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้ไม่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ได้แก่ *S. aureus, B.cereus.E.faecalis*,และ *L.innocua* ได้

ข้อเสนอแนะ

ในการทดลองครั้งนี้พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้ 60 สายพันธุ์ ไม่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ 4 ชนิด เช่น *L.innocua* , *B.cereus* , *S. aureus* , *E. faecalis* ได้ โดยอาจจะมีสาเหตุมาจากชนิดของเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบมีน้อยเกินไป เพราะฉะนั้นในการทดลองครั้งต่อไปควรจะมีการเพิ่มชนิดของเชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบให้มีจำนวนมากขึ้น เพื่อที่จะได้ทราบผลที่ชัดเจนว่าแบคทีเรียแลคติกจะสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ชนิดใดชนิดหนึ่งได้หรือไม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการทดลองนี้แยกมาจากปลาร้าที่นำมาจาก 2 แหล่ง คือ จังหวัดขอนแก่น และจังหวัดมหาสารคาม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อพวกแบคทีเรียแลคติก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารโดยดูจากบริเวณใสรอบๆโคโลนี (Clear zone) พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียแลคติกมากที่สุดคืออาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่% เกลือโซเดียมคลอไรด์ 7.5 % จากการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากปลาร้า ได้จำนวนเชื้อทั้งหมด 60 โคโลนีนำไปเก็บเอาไว้โดยวิธีการstap ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Deep tubes จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้มาทำการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเป็นพิษ ได้แก่ *L. innocua, B. cereus,S. aureus*และ *E. faecalis* พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่นำมาทดสอบไม่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้เนื่องจากว่าในการทำการทดลองครั้งนี้เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบนั้นอาจมีชนิดของเชื้ออินดิเคเตอร์น้อยเกินไปและอาจจะมีการสร้างสารแบคเทอริโอซินได้เมื่อทำการเพิ่มชนิดของเชื้ออินดิเคเตอร์ในการทดลองให้มากขึ้น จากการทดลองในครั้งนี้ไม่พบเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินและควรจะเก็บเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกไว้มาทำการทดสอบในครั้งต่อๆไปในอนาคต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ภาษาไทย

นภา โล่ห์ทอง. 2522 เอกสารประกอบการบรรยายวิชาจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และอักษรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

พูลทรัพย์ วิรุฬหกุล. 2541. ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ ในเอกสารการสอนชุดวิชา ผลิตภัณฑ์อาหาร. สาขาวิชาคหกรรมศาสตร์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช

วิเชียร ลีลามาศ. 2534. อาหารจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในประเทศไทย. แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารของไทย. ครั้งที่ 1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาษาอังกฤษ

Barefoot, S.E. 1984 Puritrification and characterization of *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin , lactocin B. Antimicrob. Agents Chemother. 26: 328-334.

Barefoot, S.E., and Klaenhammer , T.R. 1983. Detection and activity of Lactocin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Envirion. Microbiol. 45:1808-1815.

Collins, M.D., and Jones, D. 1981. The distribution of isoprenoid quinone structural type in bacteria and their taxonomic in plication. Microbiol. Rev. 45 : 316 -354.

Collins, M.D., Farrow, J.A.E., Phillips , B.A., and Kandler ,O. 1983b. Streptococcus garvieae sp. Nov. and *Streptococcus plantarum* sp. Nov. J.Gen.Microbiology. 129 : 3427-3431.

Daly, C., Chance, M.L., Sandine, W.E., and Elliker, P.R. 1973. Control of *Strephylococcus aureus* in sausage by starter culture and chemical acidulation. J. Food. Sci. 38 :426-430

Daeschel, M.A., Mckenny, M.C., and McDonsld, L.C. 1990 . Bacteriocidal activity of *Lactobacillus plantarum* C.-11. Food Microbiol. 7: 91-98.

Davey,G.P. 1981. Mode of action of diplococcin , a bacteriocin from *Streptococcus cremoris* 346. N.Zeal.J.Dairy Sci.Technol. 16 : 187-190.

Deibel, R.H. 1974. Technology of Fermented, Semi-Dried Sausages. In Proc. Meat Ind. Research Conf. Am. Meat Inst. Found., Washington, DC

Deklerk ,H.C. 1967. Bacteriogencinogeny in Lactobacillus fermenti. Nature. (London) 214 : 609.

Deklerk , H.C.,and Smith , J.A. 1967. Properties of Lactobacillus fermenti bacteriocin . J.Gen.Microbiol.. 48: 309-316.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dellaglio, F., Trovatelli, L.D., and Sara, P.G. 1981 Deoxyribonucleic acid and homology anatomy representative strains of the genus *Pediococcus*. Hyg. 1 : 140 - 150

Frazier, W.C., and Wesshoft, D.E. 1979. Food Microbiology. 3d.ed., Tata Mc Graw - Hill Publ. Co., Ltd., New - Delhi. 540pp.

Hamdan , I.Y.., and Mikolajcik, E.M. 1974. Acidollin : an antibiotic produced by Lactobacilli. Appl. Environ. Microbiol . 33(6) : 129.89-1292 .

Hensel, R., Mayr, U., Stetter, K.O., and Kandler , O. 1977. Comparative studies of Lactic acid dehydrogenases in lactic acid bacteria 1. Putrification and Kinetics of the alosteriic L-lactic acid dehydrogenases from *Lactobacillus casei subsp. casei* and *Lactobacillus curvatus* . Arch. Microbiol. 112: 81-93.

Ingram , M., Ottowan , F.J.H.., and Coppock , J.M.B. 1956. The preservation action of acid substances in food . Chem .Ind. 42 : 1154-1165.

Inove , Y.M., Takano , M., and Shibasaki , I. 1980. Antagonistic action of lactic acid bacteria from Nham toward food-deteriorating bacteria . Microbial Utilization of Renewable Resources. 1 : 108-115.

Jensen , L.B. 1942. Microbiology of diacetyl. Appl. Environ. Microbiol. 44 : 525-632

Jensen , L.B., and Paddock, L.S. 1940. Sausage Treatment. US. Patent. 2,225,783.

Kleanhammer ,T.R. 1998. Bacteriocin production by Lactic acid bacteria. Biochemie. 70: 337-349.

Lawrence , R.C., and Terence , T.D. 1979. The fermentation of milk by lactic acid bacteria. In A.T. Bull (ed) Microbial Technology : Current State Future Prospect. Cambbridge University Press. pp. 187 - 219

Lindgren , S.E ., and Dobrogosz , W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol. Rev. 87 : 149-164.

Liu , W., and Hanson , J.N. 1990. Some Chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 2551-2558.

Orla-Jensen , S. 1942. The lactic acid bacteria. Ed.E.Munksguard. 2nd. Ed. Copenhagen. Pp.106-107.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Piard , J.C., and Desazeaud , M. 1991. Inhibiting factor produced by lactic acid bacteria.1. Oxygen metabolites and catabolisim end-products. Lait. 71 :525-541.

Prescott , S.C., and Dunn , C.G. 1959. Industrial Microbiology. 3d ed., Kogagushi Co.. Ltd., Tokyo. 1000 p.

Reddy , G.V, and Ranganathan , B. 1983b. Nutritionnal factors affecting growth and production of antimicrobial activity of *Streptococcus lactis* subsp. Diacetylactsis S1-67/C. J. Food. Prot. 54 : 748

Roger, L.A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16 : 311 -316.

Schillinger, U, 1990. Bacteriocins of lactic acid bacteria . In Biotechnology and Food Safety ,ed. D.D. Bills and S.D.Kung. Butterworth-Heinemann , Boston . pp. 55-74.

Sherman, J.M. 1937. The Streptococococci. Bacteriol. Rev. 1 :3 - 9

Tagg, J.R., Danjanii, A.S., and Wannmaker, L.W. 1976. Bacterocins of gram positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40 : 722-756.

Tamine, A.Y. 1981. Microbiology of starter culture. In R.K. Robinson (ed) Daily Microbiology. Vol. 2 : The Microbiology of Product. London. Applied Science Publishher. Pp. 133 - 156

Tittsler, R.P.., Pederson, C.S., Snell, E.E., Handlin, D., and Nivin, C.F., Jr. 1952. Symposium on the lactic Acid Bacteria. Bact. Rev. 16 : 227 -260

Upreti, G.C.,and Hinsdill, R.D. 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative Lactobacillus . Antimicrob. Agents Chemother. 4 : 487-494.

Vuyst,L.D., and Vandamme , E.J. 1994. Bacteriocin of lactic acid bacteria Microbiology ,Genetics and Application. Blackie academie & professional. UK. : 539 PP.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

1.สูตรการเตรียม MRS medium

peptone จาก Casein	10 กรัม
Meat extract	8 กรัม
Yeast extract	4 กรัม
D-Gluecose	20 กรัม
Tween-80	1 มิลลิลิตร
Agar	15 กรัม
Di-Potasium Hydrogen Phosphate	2 กรัม
di-Ammonium hydrogen citrate	2 กรัม
Sodium acetate	5 กรัม
Magnesium sulphate	0.2 กรัม
Manganese sulfate	0.04 กรัม
$CaCO_3$	0.7 %
Dw	1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

*MRS เป็นอาหารสำหรับแบคทีเรียแลคติกเนื่องจากเมื่อดูจากสูตรของอาหารจะมีแหล่งของคาร์โบไฮเดรตจากกลูโคส ซึ่งแบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกทำให้อาหารมีความเป็นกรด และจะทำให้มองเห็นบริเวณใส (Clear zone) ล้อมรอบโคโลนีได้อย่างชัดเจนเนื่องมาจาก$CaCO_3$ มีผลในการยับยั้งเชื้อชนิดอื่นที่ไม่ต้องการ

2.การเตรียม MRS Deep tubes

MRS	จากสูตรดังข้อ 1 ข้างต้น
$CaCO_3$	1%
Agar	1.2%

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15 นาที) นำมาทำการ mixer ทันทีให้เข้ากันแล้วแช่ในน้ำเย็น

3. สูตรการเตรียมBSM medium (Bacteriocin Screening Medium)

Glucose	2 กรัม
Meat extract	2 กรัม
Tryptone	10 กรัม
Yeast extract	4 กรัม
Tween - 80	1 มิลลิลิตร
Citric acid diammonium Salt	2 กรัม
$MgSO_4 7H_2O$	0.2 กรัม
$MnSO_4.4H_2O$	0.05 กรัม
$K_2HPO_4.3H_2O$	8.7 กรัม
KH_2PO_4	8 กรัม
Dw	1 ลิตร
Agar	15 กรัม
PH	6.8-7.0

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

* BSM เป็นอาหารที่เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียแลคติก จากสูตรของอาหารจะเห็นว่าปริมาณของน้ำตาลจะน้อยกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และมีการเติมทั้งโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต และไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตลงไปในอาหารด้วยเพื่อที่จะช่วยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้มีสภาวะเป็นกลาง เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM มาทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติกจะสามารถรู้ได้อย่างชัดเจนว่าเมื่อเกิดบริเวณใส (Clear zone) ล้อมรอบโคโลนี คือการสร้างเอนไซม์โปรติเอส ออกมาย่อยเชื้อที่ผสมอยู่ใน soft agar ซึ่งจะเป็นสารพิษต่อเชื้อจุลินทรีย์ไม่ใช่เป็นการสร้างกรดแลคติกเหมือนในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

4. การเตรียม TSB

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB	30 กรัม
น้ำกรอง	1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. การเตรียม TSBYE

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract 0.6%

น้ำกรอง 1 ลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

6.การเตรียม soft agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ Agar 0.7%

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

7.การเตรียม TSBYE Soft agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม

อาหารเลี้ยงเชื้อ Yeast extract 0.6%

น้ำกรอง 1 ลิตร

อาหารเลี้ยงเชื้อ Agar 0.7%

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

8.การเตรียม TSB Soft agar

อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB 30 กรัม

น้ำกรอง 1 ลิตร

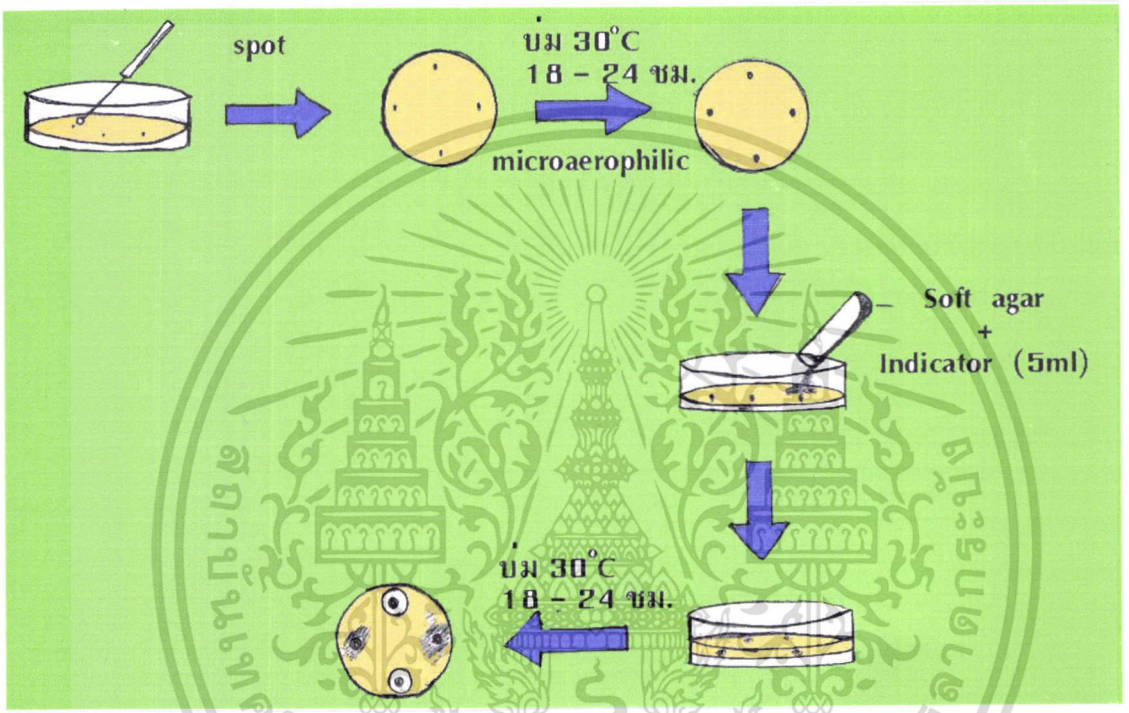
อาหารเลี้ยงเชื้อ Agar 0.7%

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ และความดันมาตรฐาน (15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว, 121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

วิธีการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

แบคทีเรียในตระกูลนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 10 จีนัส

1. *Lactobacillus*

เชื้อจีนัสนี้ถูกค้นพบในปี ค.ศ. 1901 ประกอบด้วย 64 สปีชีส์ Orla Jensen (1942) ได้จัดแบ่งเชื้อในสายพันธุ์นี้โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การใช้แหล่งคาร์บอน ลักษณะการใช้สารอาหาร ช่วงอุณหภูมิสำหรับการเจริญ และผลของการ agglutination และยังแบ่งเชื้อในจีนัสนี้ออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ กลุ่มแรกประกอบด้วย *Streptobacterium* และ *Streptococcus* ซึ่งทั้งหมดจะให้ผลคะตะเลสเป็นลบ ผลผลิตส่วนใหญ่คือ กรดแลคติก ที่เหลือจะเป็นสารอื่นเพียงเล็กน้อย ในกลุ่มที่ 2 ประกอบด้วยกลุ่ม *Betabacterium* และ *Betacoccus* ให้ผลคะตะเลสเป็นลบ แต่จะสร้างก๊าซในปริมาณที่ตรวจสอบได้ และผลผลิตอื่นๆ นอกเหนือจากกรดแลคติก ในกลุ่มที่ 3 คือ *Microbacterium* และ *Tetracoccus* จะให้ผลคะตะเลสเป็นบวก

แบคทีเรียแลคติกในจีนัสนี้อาจพบรูปร่างหลายแบบเช่น coccobacillus, bent, rod, coryneform หรือ Thread-like จะเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ (aerobe) หรือต้องการอากาศเล็กน้อย (microaerophile) มีทั้งพวกที่เป็น homofermentative และ heterofermentative lactic acid bacteria

2. *Carnobacterium*

เชื้อจีนัสนี้ถูกค้นพบโดย Collins และคณะ, 1981 โดยดูลักษณะทางสรีระวิทยา ทางเคมี และชีวเคมี พบว่ามีความเหมือนกับเชื้อในจีนัส Lactobacillus มาก แต่ไม่สามารถเจริญบนอาหารแข็ง หรืออาหารเหลวอะซิเตทได้ เชื้อจีนัสนี้มีอยู่ด้วยกัน 4 สปีชีส์ คือ *Carnobacterium divergens*, *C. gallinarum*, *C. mobile* และ *C. piscicola* จัดเป็นพวก heterofermentative lactic acid bacteria ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างแท่ง อาจพบเดี่ยวๆ เป็นคู่ หรือเป็นสายสั้น สามารถผลิตกรด L-lactic จากน้ำตาลกลูโคสได้

3. *Streptococcus*

เชื้อจีนัสนี้มีลักษณะกลมแบบ cocci หรือรูปรีแบบ oval ไม่สร้างสปอร์ มีขนาดประมาณ 0.5 -1.0 ไมโครเมตร จะพบเป็นคู่ หรือเป็นสาย มีทั้งพวกที่ต้องการอากาศ (aerobe) หรือพวกที่ต้องการอากาศเล็กน้อย (microaerophile) *Streptococcus* จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative lactic acid bacteria คือการหมักคาร์โบไฮเดรต แล้วได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ เป็นแบคทีเรียที่พบมากในฐานะเชื้อก่อโรคในสัตว์ และมนุษย์ ในปาก และระบบทางเดินอาหารของสัตว์ และมนุษย์ ในนมดิบ ผลิตภัณฑ์จากนม และพืช

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. *Lactococcus* (N-*Streptococcus*)

ในปี ค.ศ. 1988 ได้มีการเสนอให้เปลี่ยนจีนัส *Streptococcus* เป็นจีนัส *Lactococcus* โดยยังคง species และ subspecies ไว้ตามเดิม ซึ่งได้รับการยอมรับจาก International Union of Microbiology Societies ตัวอย่างของแบคทีเรียในตระกูลนี้ได้แก่ *Lactococcus lactis subsp.lactis* (*Streptococcus lactis subsp. Lactis*), *L. lactis subsp. Lactis var. diacetylactic* (*S. lactis subsp. diacetylactis*), *L. lactis subsp. cremoris* (*S. lactis subsp. cremoris*) อย่างไรก็ตาม ยังคงปรากฏชื่อ *Streptococcus lactis* ทั้ง 3 subspecies ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 8th edition

5. *Leuconostoc*

เชื้อจีนัส *Leuconostoc* มีอยู่ด้วยกัน 10 สปีชีส์ มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างไปจากเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* อย่างชัดเจน เชื้อแบคทีเรียแลคติกชนิดนี้มีรูปร่างกลม (cocci) จะพบเป็นคู่หรือเป็นสาย มีทั้งพวกที่ไม่ต้องการอากาศ (anerobe) หรือพวกที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) *Leuconostoc* จัดอยู่ในกลุ่ม heterofermentative lactic acid bacteria สามารถพบได้ทั่วๆไปในธรรมชาติ เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญต่อการเริ่มต้นขบวนการหมักพวกผัก มีบางสายพันธุ์ที่ใช้ในอุตสาหกรรม เนื่องจากส่วนใหญ่ *Leuconostoc* จะเจริญในน้ำนมได้ช้า จึงไม่เหมาะสมในการใช้หัวเชื้อเพื่อการผลิตกรด แต่มีสมบัติพิเศษที่สามารถเมตาโบไรท์ได้เป็นสารพวกไดอะซิติล (Acetyl) จึงมักนิยมใช้เพื่อผลิตเป็นสารที่มีกลิ่นหอม (นภา โลห์ทอง, 2522)

6. *Pediococcus*

เชื้อจีนัสนี้มีรูปร่างกลม (cocci) ซึ่งอาจอยู่เป็นคู่ (pairs) หรือกลุ่ม (tetrads) จัดเป็นพวกที่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) และเป็น homofermentative lactic acid bacteria มีลักษณะพิเศษคือสามารถสร้าง racemic (DL) lactic acid จากน้ำตาลกลูโคส แบคทีเรียพวกนี้มักพบในอาหารพวกผัก เนื้อ (ไส้กรอกเปรี้ยว) เป็นต้น

7. *Aerococcus*

เชื้อจีนัสนี้ จะมีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อในจีนัส *Pediococcus* มาก โดยผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยา และ สรีระวิทยา ของเชื้อในจีนัส *Aerococcus* และ *Pediococcus* ยังคลุมเครือไม่สามารถแยกออกจากกันได้ชัดเจน เชื้อในจีนัสนี้มี 1 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridans* (Dellagio และคณะ, 1981) พบว่า *A. viridans* และ *P. urinaeequi* จะมีฟีโนไทป์ที่เหมือนกันมากและพบว่า DNA : DNA hybridization มีความสัมพันธ์กันมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8.*Trtragenococcus*

ในปี 1990 พบว่าเชื้อ *P. halophilus* มี 16S ที่ต่ำกว่าเชื้ออื่นๆในกลุ่ม *Pediococcus* และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมดพบว่าเชื้อนี้มี phylogenetic ที่มีความใกล้เคียงกับเชื้อในจีนัส *Enterococcus* และ Carnobacterium มากกว่าเชื้อในจีนัส *Pediococcus*หรือ *Lactobacillus* ดังนั้นจึงมีการจัดใหม่เป็น Tetragenococcus halophilus

9. Bafidobacterium

เชื้อในจีนัสนี้มีการค้นพบในปี 1900 ที่แยกจากอุจจาระเด็กทารกสุขภาพสมบูรณ์ที่ดื่มนมมารดาแต่เดิมเรียกว่า Bacillus bifidus communis ต่อมาเมื่อการศึกษาอย่างกว้างขวางจึงตั้งชื่อว่า *Bafidobacterium bifidum* สามารถพบได้หลายรูปร่าง เช่นรูปตัว Y , V, bent , club จะไม่พบในลักษณะที่เป็นสายยาว เจริญได้ใน obligatate anaerobe จัดเป็นพวก heterofermentative lactic acid bacteria ลักษณะพิเศษของ *Bafidobacterium* คือสามารถทำให้กรดแลคติก 1 โมล และกรดอะซิติก 1.5 โมล จากน้ำตาลกลูโคส 1 โมล เชื้อในกลุ่มนี้มีความสำคัญมากในระบบอาหาร

10. *Enterococcus*

ในปี 1973 Sherman ได้มีการเปลี่ยน *Streptococcus faecalis* , *S.faecium* , *S.faecium subsp. cassiliflavus* และ *S.avium* เป็นกลุ่ม *Enterococcus* เนื่องจากเชื้อทั้งหมดมีแอนติเจนชนิด group D ซึ่งไม่พบใน *Streptococcus* สปีชีส์อื่น ส่วน*S.bovis* , *S. equinus* นั้นก็มีแอนติเจนชนิด group D แต่ไม่จัดอยู่ในจีนัส *Enterococcus* เนื่องจากคุณสมบัติบางประการแตกต่างไปจากเชื้อในกลุ่ม *Enterococcus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นางสาววรภัค สอนคำหาร เกิดวันที่ 4 มีนาคม พ.ศ. 2521 ที่จังหวัดขอนแก่น สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนขอนแก่นวิทยายน เมื่อปีพุทธศักราช 2540

นางสาวอัญรัตน์ สีผ่องใส เกิดวันที่ 4 สิงหาคม พ.ศ. 2522 ที่จังหวัดราชบุรี สำเร็จการศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนเบญจมราชูทิศราชบุรี เมื่อปีพุทธศักราช 2540

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้