การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เย็น

Selection of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria with Production of Antibacterial Compounds to Control Pathogens in Chilled Seafood Products

นุชรี ตันติสุวรรณโณ

Nucharee Tuntisuwanno

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University
2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย เพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เย็น

ผู้เขียน นางสาวนุชรี ตันติสุวรรณโณ

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

.....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....

(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

.....กรรมการ

(ดร.อัจฉรา เพิ่ม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ .....

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ .....

(นางสาวนุชรี ตันติสุวรรณโณ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....นุชรี ตันติสุวรรณโณ.....

(นางสาวนุชรี ตันติสุวรรณโณ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียเพื่อควบคุมเชื้อก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เย็น
ผู้เขียน นางสาวนุชรี ตันติสุวรรณโณ
สาขาวิชา จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

จากแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 159 ไอโซเลท ที่แยกได้จากอาหารทะเล ได้แก่ กุ้ง หอย ปู หมึก และปลาชนิดต่างๆ จำนวน 25 ตัวอย่าง เมื่อนำมาคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แกรมบวก ได้แก่ *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 และ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 และแกรมลบ ได้แก่ *Escherichia coli* PSU 95 *Pseudomonads aeruginosa* ATCC 27853 *Vibrio parahaemolyticus* PSU 1681 และ *Salmonella* Typhi โดยวิธี Agar spot assay พบว่า มีแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท FSK-L 5101 POL-20108 HYL-20104 L-SQ-L 25104 และ L-SH-L 25104 ที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้ดี นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ 4 องศาเซลเซียส (Psychrotrophic lactic acid bacteria) หลังจากนั้นทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งโดยวิธี agar well diffusion โดยไอโซเลท L-SH-L 25104 และ L-SQ-L 25104 สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 เมื่อทำการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลคติก โดยศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ16S rDNA พบว่า ไอโซเลท L-SQ-L 25104 จัดอยู่ในสกุล *Carnobacterium divergens* มีค่า99 % similarilty และ L-SH-L 25104 จัดอยู่ในสกุล *Carnobacterium maltaromaticum* มีค่า 99 % similarity ทั้งนี้แบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลท ดื้อต่อยา penicillin G ampicillin และ ceftriazone แต่มีความไวต่อการตอบสนองของยา vancomycin chloramphenical และ erythromycin ไม่มีการสร้างโปรตีน hemolysin และไม่มีกิจกรรมการสร้าง tyramine และ histamine จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 พบว่าสามารถผลิตสารยับยั้งได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร M17+G ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5-7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สารยับยั้งที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน ทนความร้อน 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30นาที ทนต่อพีเอช 5.0-7.0 และสูญเสียกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ภายหลังจากทดสอบด้วยเอนไซม์ proteinase K protease trypsin α-chymotrypsin lipase และ α-amylase เมื่อนำสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 มาทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี broth microdilution assay พบว่ามีค่าเท่ากับ 64

Au/mL แต่ไม่สามารถฆ่า *L. monocytogenes* ATCC 15313 ได้ เมื่อนำ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 มาเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. monocytogenes* ATCC 15313 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งคิดเป็นร้อยละ 98 โดยจำนวนของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ลดลงประมาณ 1-2 log CFU/mL ภายหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง และได้นำสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้และเซลล์ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 จำนวน 10^4 CFU/mL มาทดสอบกับเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 จำนวน 10^3 CFU/mL ในกุ้งขาวสด (*Litopenaeus vannamei*) โดยเก็บแช่เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน พบว่ากุ้งแช่เย็นที่เติมเชื้อ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ประมาณ 2-3 log CFU/mL ในวันที่ 3-7 ของการเก็บ ในขณะที่การใช้สารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน สามารถลดได้ประมาณ 1 log CFU/mL ในช่วง 7 วันของการเก็บรักษา

Thesis Title Selection of Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria with Production of Antibacterial Compounds to Control Pathogens in Chilled Seafood Products

Author Miss Nucharee Tuntisuwanno

Major Program Microbiology

Academic Year 2014

ABSTRACT

One hundred and fifty-nine isolates of lactic acid bacteria (LAB) from 25 chilled seafood samples such as shrimp oyster crab squid and fish were examined for their antimicrobial activity against the gram positive of indicator bacteria: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 and *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 and the gram negative: *Escherichia coli* PSU 95, *Pseudomonads aeruginosa* ATCC 27853, *Vibrio parahaemolyticus* PSU 1681 and *Salmonella* Typhi by agar spot assay. Five LAB isolates: FSK-L 5101, POL-20108, HYL-20104, L-SQ-L 25104 and L-SH-L 25104 that showed strong inhibitory activity were further analysed to examine their psychrotrophic characteristics (ability to grow at 4 ºC). All of these isolates were further selected and determined for producing antimicrobial substances by agar well diffusion assay. L-SH-L 25104 and L-SQ-L 25104 inhibited the growth of indicator strains, especially *L. monocytogenes* ATCC 15313. Both isolates were identified by sequencing of 16S rDNA gene boundary region . These isolates were identified into 2 different LAB species: L-SQ-L 25104 as *Carnobacterium divergens* (99% similar to *Carnobacterium divergens*) and L-SH-L 25104 as *Carnobacterium maltaromaticum* (99 % similar to *Carnobacterium maltaromaticum*). They were resistant to antibiotics as follows: penicillin G, ampicillin and ceftriazone. However, they were susceptible to antibiotics as follows: vancomycin, chloramphenical and erythromycin. Non of isolates did not produce hemolysin, tyramine and histamine. *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 could produce the highest antimicrobial substances in M17+G medium pH 6.5-7 at 25 °C could produce the

highest antimicrobial substances level, which had 64 Au/mL. The bacteriocin-like substance was heat resistant about 80 °C for 30 min, and it tolerated pH 5-7. The activity of bacteriocin-like substance was lost completely by proteinase K, protease, trypsin, α-chymotrypsin, lipase and α-amylase. In addition, the activity of bacteriocin-like substance from *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 exhibited antibacterial activity againt *L. monocytogenes* ATCC 15313 by microdilution assay at the level of 64 Au/mL. However, it could not kill *L. monocytogenes* ATCC 15313. The mixed cultures between *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 and *L. monocytogenes* ATCC 15313 were investigated for 72 hours. The result showed that the inhibition of *C. maltaromaticum* against the *L. monocytogenes* ATCC 15313 was 98% for 72 hours. Lactic acid bacteria reduced indicator bacteria about 1-2 log CFU/mL after 24-36 hours. In addition, the bacteriocin-like substance and *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 (10^4 CFU/mL) were cultured together with *L. monocytogenes* ATCC 15313 (10^3 CFU/mL) in raw shrimps (*Litopenaeus vannamei*) during 1 week of storage at 5°C. The result demonstrated that *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 reduced the growth of *L. monocytogenes* ATCC 15313 2-3 log CFU/mL during 3 -7 days of storage. On the other hand, the bacteriocin-like substance reduced *L. monocytogenes* ATCC 15313 1 log CFU/mL during 1 week of storage.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(5)
Abstract	(7)
กิตติกรรมประกาศ	(9)
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพ	(13)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
บททรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	24
ขอบเขตการวิจัย	24
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	25
วัสดุ อุปกรณ์	25
วิธีการทดลอง	29
3. ผลการทดลอง	40
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	70
5. สรุปผลการทดลอง	82
เอกสารอ้างอิง	85
ภาคผนวก	103
ก	103
ข	109
ค	111
ง	118
จ	121
ฉ	123
ช	124
ซ	127
ประวัติผู้เขียน	136

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การจัดแบ่งกลุ่มแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก	14
3.1 จำนวนแบคทีเรียสร้างกรดในอาหารทะเลแช่เย็นที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง BSM ที่เติม 0.004% Bromcresol purple บ่มที่ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน	40
3.2 ผลการยับยั้งต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ*V. parahaemolyticus* PSU 1681 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay	42
3.3 ผลการยับยั้งของสารที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar well diffusion method ต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S.* Typhi	47
3.4 ผลการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ	49
3.5 ผลของพีเอช อุณหภูมิ และเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารยับยั้งที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104	61
3.6 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดย *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	65
3.7 จำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เหลือรอดในกุ้งขาวแช่เย็นเมื่อเก็บในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	68
ค. แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาการติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น	111
ง. การเจริญของแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ในอาหาร BSM broth เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน	118
จ. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ (Analysis report and Blast N report)	121
ฉ. ผลการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ	123

ตารางที่ **หน้า**

ซ. ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313*V. parahaemolyticus* PSU **16816** *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay 127

รายการภาพ

ภาพที่		หน้า
3.1	วงใสการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 จากไอโซเลท L-SQ-L 25104 และ L-SH-L 25104 ทดสอบโดยวิธี agar spot assay	41
3.2	การเจริญของแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ในอาหาร BSM brothเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 °C เป็นเวลา 7 วัน	44
3.3	ความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของแบคทีเรียแลคติก ไอโซเลท L-SH-L 25104 L-SQ-L 25104 และ POL-20108 โดยวิธี agar well diffusion	46
3.4	Phylogenetic tree ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท L-SH-L 25104 และ L-SQ-L 25104	48
3.5	ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดย *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 และ *C. divergens* L-SQ-L 25104 บนอาหาร Columbia blood agar ที่เติมเลือดมนุษย์ 5% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	51
3.6	HPLC chromatogram ของ standard tyramine และ histamin	52
3.7	HPLC chromatogram ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104	52
3.8	HPLC chromatogram ของ *C. divergens* L-SQ-L 25104	52
3.9	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร BSM APT M17+G และ MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	53
3.10	การเจริญของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ในอาหาร BSM APT M17+G และ MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	54
3.11	กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BSM APT M17+G และ MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	54
3.12	การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการเจริญของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BSM APT M17+G และ MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 15 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	56

รายการภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
3.13	กิจกรรมการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของ *C. maltaromaticum*L-SH-L 25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BSM APT M17+G และMRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 15 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 6 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง	57
3.14	กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว M17+G ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 6.0 6.5 และ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	58
3.15	การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และการเจริญของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว M17+G ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 6.0 6.5 และ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง	59
3.16	กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่ปรับค่าพีเอช 5 6 7 8 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง	60
3.17	กิจกรรมการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 63 80 100 เป็นเวลา 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที	62
3.18	กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่ทดสอบกับ proteinase K protease trypsin α-chymotrypsin lipase และ α-amylase บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง	63
3.19	ผลการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 จาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน โดยวิธี broth microdilution assay	64
3.20	การศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)	64

รายการรูป (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

3.21 จำนวน *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 และ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 66

3.22 การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 และ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง 67

3.23 ปริมาณ *L. monocytogenes* ATCC 15313 *C. maltaromaticum* และแบคทีเรียทั้งหมด ที่พบหลังจากการเก็บรักษากุ้งที่สภาวะต่าง ๆ 69

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ปัจจุบันอุตสาหกรรมอาหารทะเลเป็นสินค้าส่งออกทางเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย เนื่องจากการส่งออกของอาหารทะเลมีมูลค่าสูงถึง 2.5 พันล้านดอลลาร์สหรัฐในปี 2008 เวียดนาม จีน และอินเดีย ถือเป็นคู่แข่งที่สำคัญมากของไทยในตลาดนี้ โดยเฉพาะสินค้ากุ้งสดแช่เย็น แช่แข็ง เนื่องจากกุ้งของเวียดนามและอินเดียมีขนาดใหญ่กว่าไทย (THAIFEX, 2013) และการแข่งขันยังคงสูงขึ้นอย่างต่อเนื่อง การผลิตสินค้าที่มีคุณภาพตรงกับความต้องการของลูกค้าและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคเป็นข้อกำหนดพื้นฐานสำคัญสำหรับผู้ผลิต ซึ่งความต้องการอาหารทะเลได้ทวีความสำคัญมากขึ้นในระดับโลก เนื่องจากอาหารทะเลอุดมไปด้วยคุณค่าทางโภชนาการและรสชาติอร่อยถูกปากผู้บริโภค

ผู้บริโภคส่วนใหญ่นิยมเลือกซื้ออาหารพร้อมรับประทาน (Ready-to-eat) รวมไปถึงอาหารทะเลสดที่มีการบรรจุบนถาดโฟมห่อด้วยฟิล์มพลาสติกใสและเก็บรักษาในตู้แช่เย็นที่อุณหภูมิ 0-4 องศาเซลเซียส ในซูเปอร์มาร์เก็ต ซึ่งอาจพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโดยเฉพาะ *Listeria monocytogenes* เนื่องจากสามารถอยู่รอดในที่อุณหภูมิต่ำได้ ซึ่งทำให้มีโอกาสเสี่ยงที่เชื้อจะมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อมีการเก็บรักษาอาหารที่อุณหภูมิต่ำ (Freitag *et al*., 2009) จากการรายงานของ Dorsa *et al*. (1993) พบว่า *Listeria monocytogenes* มี generation time ที่สั้นและเจริญในอาหารทะเลได้ดีกว่าอาหารประเภทเนื้ออื่น ๆ Lovett *et al*. (1990) พบว่า เมื่อเก็บรักษากุ้งในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส *L. monocytogenes* จะเพิ่มจำนวนขึ้นจาก 10^3 CFU/g เป็น 10^6-10^7 CFU/g เมื่อเก็บไว้เป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ จะทำให้ผู้บริโภคเสี่ยงต่อการเกิดโรค listeriosis เกิดอาการท้องร่วง แท้งในหญิงตั้งครรภ์ และเกิดการเสียชีวิตในบางราย (European Food Safety Authority, 2013) อีกทั้ง *L. monocytogenes* ยังเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้อาหารทะเลเน่าเสีย ซึ่งก่อให้เกิดความเสียหายทางเศรษฐกิจเป็นอย่างมาก (Norhana *et al*, 2010) นอกจากนี้อาหารทะเลยังอาจพบเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆ ที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสียและแบคทีเรียที่ก่อโรคอื่น ๆ เช่น *Escherichia coli Salmonella* sp. *Staphylococcus aureus Bacillus cereus* และ *Vibrio parahaemolyticus* (Calo-Mata *et al*., 2008; Mejlholm *et al*., 2008)

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญเกี่ยวกับความปลอดภัยต่อการบริโภคมากขึ้น จึงได้มีการคิดค้นหาสารกันเสียชีวภาพตามธรรมชาติที่มีความปลอดภัย ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก เพราะเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ซึ่งมนุษย์บริโภคมาเป็นเวลานานนับพันปี (Cleveland *et al*., 2001) ดังนั้นผู้บริโภคส่วนใหญ่จึงยอมรับว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักเป็น food-grade organism มีความปลอดภัย (Generally

Recognized as safe, GRAS) (Adam, 1999) แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้ง ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล และ แบคเทอริโอซิน ซึ่งสารเหล่านี้มีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร (Deegan *et al*., 2006)

ปัจจุบันแบคทีเรียแลคติกและแบคเทอริโอซินได้รับความสนใจและศึกษากันอย่างกว้างขวางโดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารด้วยวิธีการทางชีวภาพ (biopreservation) ในอุตสาหกรรมอาหารหลายชนิด เช่น เนื้อสัตว์ นม เครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ เป็นต้น โดยการนำไปใช้อาจอยู่ในรูปของแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์กึ่งบริสุทธิ์ หรือใช้เซลล์จุลินทรีย์ที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเป็นเชื้อตั้งต้น (starter culture) ในกระบวนการผลิต (Field *et al*., 1996) และแม้ว่าสารกันเสียชีวภาพจะมีการนำมาใช้เป็นส่วนใหญ่ในอาหารหมัก แต่สามารถนำมาใช้กับอาหารที่ไม่ใช่อาหารหมักได้ เช่น อาหารทะเล โดยเฉพาะแบคทีเรียแลคติกที่ทนอุณหภูมิต่ำได้ มีการศึกษาที่ประสบความสำเร็จในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่มีการยับยั้งเชื้อ *Listeria* spp. โดยสายพันธุ์ที่แตกต่างของแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่มาจากแบคทีเรียแลคติกจีนัส *Carnobacterim* และ *Lactobacillus* ซึ่งเกิดจากการผลิตแบคเทอริโอซิน (Matamoros *et al*., 2009) และเพื่อที่จะพัฒนาเทคโนโลยีของสารกันเสียชีวภาพเพื่อปรับปรุงคุณภาพและยืดอายุการเก็บรักษาและคงคุณค่าทางอาหารของอาหารทะเล

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Listeria monocytogenes* และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตและสมบัติของสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ รวมทั้งการนำไปประยุกต์ใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในระดับห้องปฏิบัติการ

บทตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB)

1.1 ลักษณะทั่วไป

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) หรือ ท่อน (rod) ไม่สร้างสปอร์ จัดเป็นพวก microaerophilic หรือ facultative anaerobic ไม่มีไซโตโครม (cytochrome) ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) มีค่าปริมาณ G+C น้อยกว่า 55 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย จีนัสต่าง ๆ ได้แก่ *Streptococcus Lactococcus Enterococcus Pediococcus Tetragenococcus Leuconostoc Lactobacillus Weissella Carnobacterium Aerococcus Vagococcus* และ *Oenococcus* (Stiles and Holzapfel, 1997) แบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนอาหารที่มีน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกประมาณ 50% และผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล อะซิทัลดีไฮด์ และกรดอินทรีย์ (Stiles and Holzapfel, 1997) แบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย มักใช้ในการหมักและถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรือเติมแบคทีเรียแลคติกในรูปกล้าเชื้อ (starter culture) ลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุม ตัวอย่างของจีนัสที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus Streptococcus Pediococcus Lactobacillus* และ *Carnobacterium* (Stiles and Hastings, 1991)

1.2 แหล่งที่พบ

แบคทีเรียแลคติกมักพบได้ในอาหารหมักหลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแลคติกที่ปนเปื้อนมาจากผลิตผลทางการเกษตรและเครื่องมือที่เกี่ยวกับการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตร นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ (สุพรรษา, 2550) ปัจจุบันได้มีการพัฒนาการใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักหลายชนิด เช่น ไส้กรอกหมัก ผลิตภัณฑ์นมหมัก (ปิ่นมณี, 2547)

1.3 สภาวะและความต้องการสารอาหารในการเจริญ

มีความต้องการสารอาหารค่อนข้างซับซ้อนและอุดมสมบูรณ์ (complex and enrichment media) เพาะเลี้ยงได้ยากเนื่องจากต้องการอาหารที่มีความเหมาะสมในการเจริญ (fastidious microorganism) โดยใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อจะเจริญได้ในอาหารที่มี growth factor และวิตามินหลายชนิด เช่น ไบโอติน (biotin) ริโบฟลาวิน (riboflavin) และส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศอย่างยิ่ง (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน น้ำตาลเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของแบคทีเรียชนิดนี้ ซึ่งมีความสามารถในการใช้น้ำตาลได้หลายประเภทตั้งแต่ monosaccharide disaccharide จนถึง polysaccharide เป็นต้น อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญโดยทั่วไป 30–40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมโดยปกติ 5.5–5.8 หรือต่ำกว่า แบคทีเรียดังกล่าวมีความสามารถทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปได้ดี ทนต่อสภาพความเป็นกรดสูง สภาวะความเป็นกรดสูงนี้จะมีผลกระทบต่อการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ หรือกำจัดกลุ่มจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร

หากจัดแบ่งแบคทีเรียแลคติกตามการใช้อาหารและการสร้างสาร (Axelsson, 1993) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

1.3.1 Homofermentative lactic acid bacteria หมายถึง แบคทีเรียแลคติกที่หมักน้ำตาลกลูโคส ทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวสโดยอาศัยเอนไซม์ aldolase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วให้กรดแลคติกประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าการหมักคาร์โบไฮเดรตโดยผ่าน glycolysis pathway (Embden–Meyerhof–Parnas pathway) แบคทีเรียแลคติกกลุ่มนี้ไม่ต้องการ thiamine ในการเจริญ ได้แก่ *Pediococcus Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด

1.3.2 Heterofermentative lactic acid bacteria หมายถึง แบคทีเรียแลคติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดแลคติกร้อยละ 50 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20–25 กรดอะซิติกและเอธานอลร้อยละ 20–25 โดยผ่าน phosphoglyconate pathway หรือ phosphoketolase pathway แบคทีเรียแลคติกกลุ่มนี้ต้องการ thiamine ในการเจริญ สร้างเอนไซม์ phosphoketolase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ aldolase ได้แก่ *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด

1.4 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก

ในปี ค.ศ. 1919 ได้มีการริเริ่มจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรียแลคติก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิดและความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ สามารถแบ่งแบคทีเรียแลคติกออกเป็น 7 จีนัส ได้แก่ *Batabacterium Thermobacterium Streptobacterium Streptococcus Betacoccus Microbacterium* และ *Tetranococcus* (พิเชษฐ์, 2548) ต่อมา Wood และ Holzapfel ในปี ค.ศ. 1995 ได้จัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกเป็น 9 จีนัส ได้แก่ *Bacillus Batabacterium Enterococcus Lactobacillus Lactococcus Leuconostoc Pediococcus Streptococcus*และ *Sporolactobacillus* (Wood and Holzapfel, 1995)

ในปัจจุบันนี้ได้มีการนำความรู้ทางด้านอณูพันธุศาสตร์เข้ามาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับจีนัสและสปีชีส์ โดยพิจารณาความแตกต่างของชนิดกรดนิวคลีอิกบนดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology) และความใกล้ชิดทางสายวิวัฒนาการ (phylogeny) โดยดูจากลำดับเบสบน ribosomal RNA ทำให้การจัดจำแนกมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น Stiles and Holzapfel (1997) และ Axelesson (1993) ซึ่งโดยสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก ออกเป็น 12 จีนัส ดังนี้

1.4.1 *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน เซลล์จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (homofermentative) ต้องการอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ มีหลายสปีชีส์ที่ก่อโรคในคน หรือสัตว์ เจริญที่อุณหภูมิ 20-42 องศาเซลเซียส ปัจจุบัน ประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มีปริมาณ G+C ระหว่าง 34-46 โมลเปอร์เซ็นต์ (Hardie and Whiley, 1995)

1.4.2 *Vagococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกออกมาจากจีนัส *Streptococcus* เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Vagococcus fluvialis V. carniphilus V. fessus V. lutrae V. salmoninarum* และ *V. elongates* (Lawson, 2007)

1.4.3 *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม หรือไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ มักใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตนม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส มีปริมาณ G+C ระหว่าง 34-43 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus garvieae L. plantarum L. raffinolactis L. piscium* และ *L. lactis* (Teuber, 1995)

1.4.4 *Aerococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียใน Family Streptococcaceae เซลล์มีรูปร่างกลม ไม่มีการเคลื่อนที่ มีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ โดยทั่วไปจึงพบเซลล์อยู่เป็นคู่หรือ 4 เซลล์ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย เป็นพวก homofermentative แต่มีบางสายพันธุ์ที่มีการสร้างเอนไซม์ที่มีสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลสเทียม (pseudocatalase) แบคทีเรียที่พบในจีนัสนี้ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* (Williams *et al*., 1953) และ *A. urinae* (Aguirre and Collins, 1992)

1.4.5 *Leuconostoc*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะมีลักษณะกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative การเจริญต้องการอาหารที่ซับซ้อน มีปริมาณ G+C ระหว่าง 37-40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Dellagio *et al*., 1995)

1.4.6 *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมครอน สามารถแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งครั้งที่ 2 ในทิศทางตั้งฉากของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส ทนต่อความเข้มข้นเกลือสูง บางสปีชีส์ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพในเบียร์ และไวน์ มีปริมาณ G+C ระหว่าง 34-44 โมลเปอร์เซ็นต์ ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici P. domonosus P. dextranicus P. inopinatus P. parvulus* และ *P. pentosaceus* (Stlies and Holzapfel, 1997)

1.4.7 *Tetragenococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* สปีชีส์เดิม คือ *P. halophilus* อย่างไรก็ตามได้นำมาจัดจำแนกใหม่เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ และมีลำดับเบสบนยีน 16s rRNAใกล้เคียงกับจีนัส *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Stlies and Holzapfel, 1997)

1.4.8 *Oenococcus*

ประกอบด้วยสปีชีส์เดียว คือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenos* ด้วยสมบัติการทนกรด และทนเอทานอลในปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอโดยการศึกษา DNA hybridization และลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบว่าแตกต่างจากสปีชีส์อื่นของ *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellagio *et al*., 1995)

1.4.9 *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด และมีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยา เนื่องจากมีปริมาณ G+C ภายในสปีชีส์แตกต่างกันมาก คือ ระหว่าง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือเป็นโซ่ ในการเจริญต้องการอาหารที่ซับซ้อน บางสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส บางสายพันธุ์สามารถใช้เป็นโพรไบโอติกได้เป็นอย่างดี พบได้ทั่วไปในมนุษย์ สัตว์ และผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักชนิดต่าง ๆและเครื่องดื่ม พบในพืชเพียงเล็กน้อย เช่น หญ้าหมัก และผักดอง โดยทั่วไปไม่เป็นพิษ (Harrigan, 1998)

1.4.10 *Carnobacterium*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อนคล้าย Lactobacilli ซึ่งก่อนหน้านี้เคยจำแนกไว้ในกลุ่ม Lactobacilli ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน ยาว 1.1-3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีอะซิเตท และไม่สร้างกรดโอลิ-อิก มีปริมาณ G+C ประมาณ 33.0-37.2 โมลเปอร์เซ็นต์ พบได้ในเนื้อสัตว์ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ ปลา และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก (Schieifer and Ludwing, 1995) ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) กรดแอซีติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

จีนัส *Carnobacterium* พบได้ในอาหารและสิ่งแวดล้อมทั่วไป ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ มีทั้งหมด 9 สปีชีส์ ได้แก่ *C. divergens C. alterfunditum C. funditum C. gallinarum C. inhibens C. maltaromaticum C. mobile C. pleistocenium C. viridans* อีกทั้งยังมีรายงานว่า *Carnobacterium divergens* และ *C. maltaromaticum* มีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา (Leisner *et al*., 2007)

1.4.11 *Enterococcus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเซลล์เป็นรูปไข่ พบการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่หรือเป็นสายโซ่สั้น ๆ ต้องการอาหารซับซ้อนสำหรับการเจริญ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส บางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 9.6 ประกอบด้วย 20 สปีชีส์ มีปริมาณ G+C ประมาณ 37.0-40.0 โมลเปอร์เซ็นต์ (Jay, 1996)

1.4.12 *Weissella*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจีนัสเดียวที่มีทั้งรูปร่างกลม และเป็นท่อน ซึ่งเดิมจำแนกอยู่ในจีนัส *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ได้แก่ *Weissella paramesenteroides W. kandleri W. confusa W. halotolerans W. halotolerans* และ *W. viridescens* นอกจากนี้ยังมีสปีชีส์ที่แยกใหม่คือ *W. hellenica* (Stlies and Holzapfel,1997)

2. สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกจะผลิตกรดแลคติก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสแบบ homofermentation การหมักโดยแบคทีเรียแลคติกยังได้ กรดอะซิติก เอทธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมักแบบ heterofermentation จะเกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ควบคู่กับการลดลงของค่าพีเอช มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) การยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากแบคทีเรียแลคติกจึงอาศัยกลไกหรือผลของการผลิตกรดอินทรีย์จากการหมักน้ำตาลซึ่งมีผลให้ค่าพีเอชของอาหารลดลง (Davidson และ Hoover, 1993) นอกจากกรดอินทรีย์แล้วยังพบว่า แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิลคาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Ouwehand and Vesterlund, 2004) สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆที่แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตได้มีดังนี้

2.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กระบวนการหมักของแบคทีเรียแลคติกจะได้กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก การสะสมของกรดอินทรีย์ ส่งผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยอาศัยฤทธิ์ของกรดที่ไม่แตกตัวในกรดอ่อน เนื่องจากกรดอินทรีย์เมื่ออยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจะละลายในไขมันทำให้สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ ทำให้เซลล์เป้าหมายมีสภาพเป็นกรด กรดอินทรีย์ที่สะสมภายในเซลล์จะแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออน (hydrogen ion) เป็นจำนวนมาก ไฮโดรเจนอิ-ออนจะไปรบกวนกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์ จะขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ค่าคงที่การแตกตัว (pKa) และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ กรดอ่อนจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่ค่าพีเอชต่ำ ถึงแม้ว่ากรดแลคติก และ กรดอะซิติก จะมีผลต่อการยับยั้งในวงกว้าง รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ยีสต์ และรา (De Vuyst and Vandamme, 1994) แต่ในสภาวะพีเอชต่ำ กรดอะซิติกซึ่งมีค่า pKa สูง (pKa = 4.74) จะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดแลคติกที่มีค่า pKa ต่ำ (pKa = 3.85) ทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่ากรดแลคติก (Davidson and Hoover, 1993; Lindgren and Dobrogosz, 1990)

กรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสีย (Tramer, 1966) รวมทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ เช่น *S. aureus Salmonella* และ *E. coli* ที่ก่อโรคในลำไส้ (Chung and Goepfert, 1970; Park *et al*.,1973) รวมถึง *Listeria monocytogenase* (Gonzalez-Fandos and Dominguez, 2006) ส่วนกรดอะซิติก มีผลต่อการลดจำนวนของ *Salmonella* ในการผลิตเนยแข็งที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 5.4 (Chung and Goepfert, 1970)

กรดอะซิติกที่ผลิตโดย *Leuconostoc citrovorum* มีฤทธิ์ในการยับยั้ง Phychrotrophic bacteria และ *Salmonella* (Davidson and Hoover, 1993) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้ง *Salmonella* Thyphimurium โดยการใช้กรดแลคติก และ กรดอะซิติกร่วมกัน ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง (Rubin, 1973) เช่นเดียวกับ Adam and Hall (1988) พบว่ากรดแลคติก และกรดอะซิติก สามารถทำงานส่งเสริมกันโดยยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Salmonella* ได้

2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งในระหว่างที่แบคทีเรียแลคติกมีการเจริญนั้น จะมีการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกไม่มีเอนไซม์ catalase ที่จะเร่งปฏิกริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำ จึงทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เชื้อสร้างขึ้นถูกสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และสามารถยับยั้งหรือทำลายการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994) โดยกิจกรรมการยับยั้งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สายพันธุ์ของแบคทีเรียและปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่างของอาหาร โดยเมื่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แพร่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วจะสามารถทำปฏิกริยากับแสงสว่างหรือออกซิเจน เกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นอันตราย เช่น hydroxyl radical ซึ่งเป็นสารออกซิแดนซ์ที่รุนแรง สามารถทำลายกรดนิวคลีอิก โปรตีนและชีวโมเลกุลอื่น ๆของสิ่งมีชีวิตได้ (Juven and Pierson, 1996; Ocana *et al*., 1999) นอกจากนี้ยังพบว่า สามารถทำให้ระบบต่าง ๆภายในเซลล์มีการเปลี่ยนแปลง โดยยับยั้งกระบวนการขนส่งสาร กระบวนการหายใจและการเจริญของเชื้อได้อีกด้วย เช่น จากการรายงานของ Zalan และคณะ (2005) พบว่า แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มายับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ *L. monocytogenes B. cereus* และ *E. coli* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. bulgaricus* และ *L. lactis* สามารถยับยั้ง *S. aureus* (Dahiya and Speck, 1968) และมีรายงานการยับยั้งของ *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารที่อุณหภูมิต่ำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. plantarum* ระหว่างการเก็บรักษาหอยนางรมโดยการแช่แข็ง (Price and Lee, 1970) เป็นต้น

2.3 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซส (hexose)โดยกระบวนการหมักแบบ heterofermentative ของแบคทีเรียแลคติก โดยแบคทีเรียแลคติกกลุ่มนี้จะทำให้เกิดสภาพไร้ออกซิเจนโดยการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเกิด decarboxylation นอกจากนี้พบว่าการสะสมของ

คาร์บอนไดออกไซด์ในไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์จะมีผลต่อสมบัติในการเลือกผ่านของเมมเบรน ดังนั้น จึงทำให้คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก อย่างไรก็ตามพบว่า คาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10% (v/v) จะช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียได้ถึง 50% (Wagner and Moberg, 1989) และเมื่อใช้ความเข้มข้น 20-50% จะสามารถยับยั้งราได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990)

2.4 ไดอะซิติล (Diacetyl)

ไดอะซิติลหรือ 2, 3-butanedione เป็นสารที่ให้กลิ่นรสในเนย เนยแข็งและผลิตภัณฑ์นมอื่น ๆนอกจากนั้นยังพบในไวน์ขาว และไวน์แดง บรั่นดี กาแฟคั่ว หญ้าหมักและอาหารหมักชนิดอื่น ๆ (De Vuyst and Vandamme, 1994) และพบฤทธิ์ในยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ไดอะซิติลเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของ pyruvate ทั้งแบบใช้ออกซิเจนและไม่ใช้ (Hugenholtz, 1993) ไดอะซิติลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบยีสต์และราได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้งกลไกการยับยั้งของไดอะซิติลเกิดจาก ไดอะซิติลจะไปทำปฏิกิริยากับ arginine-binding protein ของแบคทีเรียแกรมลบจึงมีผลต่อการใช้อาร์จินิน (arginine) ภายในเซลล์

ไดอะซิติลความเข้มข้นมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทั่วไป ความเข้มข้นของไดอะซิติลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป เช่น Jay (1982) รายงานว่า ไดอะซิติลที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ และที่ระดับความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ยกเว้นกลุ่มแบคทีเรียแลคติก เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า ไดอะซิติลความเข้มข้น 334 ppm จะมีผลในการยับยั้ง*Yersinia Aeromonas E. coli Salmonella* และ *Listeria* (Motlagh *et al*., 1991) ไดอะซิ-ติลจะให้ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่ค่าพีเอชน้อยกว่า 7 ถึงแม้ว่า ไดอะซิติลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่การนำไปใช้ต้องใช้ในปริมาณค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) เพื่อหวังผลในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์แต่มักจะนิยมใช้เป็น aseptic agent ในการทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องมือต่าง ๆในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่า เนื่องจากไดอะซิติลเป็นสารที่ระเหยได้เร็ว

2.5 รูเทอริน (Reuterin)

Lactobacillus reuteri เป็นแบคทีเรียแลคติกที่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์หลายชนิด *L. reuteri* สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ที่เรียกว่า

รูเทอริน เมื่อเจริญในสภาวะไม่มีอากาศ และแหล่งอาหารประกอบด้วยกลูโคสและกลีเซอรอล หรือกลีเซอรอลดีไฮด์ รูเทอรินไม่ใช่โปรตีน เนื่องจากไม่ถูกทำลายจาก proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคเทอริโอซิน ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นของรูเทอรินค่อนข้างกว้างสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย โปรโตซัวและไวรัส แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญจากรูเทอริน ได้แก่ *Salmonella Shigella Clostridium Staphylococcus* และ *Listeria* เป็นต้น ซึ่งกลไกในการยับยั้งเกิดจากรูเทอริน จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลุ่มซัลฟไฮดริล เช่น เอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส (ribonucleotide reductase) ทำให้ไม่เกิดการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต ส่งผลให้เซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้

2.6. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)

แบคเทอริโอซินเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีการใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร แบคทีเรียแลคติกหลายชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีน (ประกอบด้วยกรดอะมิโน 30-60 โมเลกุล) แบคเทอริโอซินสามารถกำจัดและยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีสปีชีส์เดียวกันหรือสปีชีส์ใกล้เคียงกัน โดยส่วนใหญ่จะไม่มีผลต่อเซลล์ที่ผลิต (Garneau *et al*., 2002) กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากการทำให้เกิดรูที่ฟอสโฟไลปิดในเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์เป้าหมาย แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้เช่น *L. monocytogenes B. cereus C. botulinum* และ *S. aureus* เป็นต้นในปัจจุบันมีรายงานว่าแบคทีเรียแลคติกหลายชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ ได้แก่ *Streptococcus Lactobacillus Pediococcus Lactococcus* และ*Leuconosto* เป็นต้น (De Vuyst and Vandamme, 1994) แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้าง การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อนทำให้อาหารยังคงอุดมไปด้วยคุณค่าของสารอาหารซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคต้องการโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นสารถนอมอาหาร เช่น ไนซิน เป็นแบคเทอริโอซินที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายและได้รับการรับรองโดยองค์การอนามัยโลก (WHO) ให้ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารและอนุญาตให้ใช้ในประเทศต่าง ๆถึง 47 ประเทศทั่วโลก (Delves-Broughton, 1990) กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไนซินเกิดจากไนซินทำให้เกิดรูและขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และการสลายตัวของ ATP ทำให้เซลล์เกิดการตายในที่สุด

การยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคเทอริโอซิน และการใช้ประโยชน์ของแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกนั้นมีสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร เนื่องจากเป็นที่ยอมรับว่า เป็นสารที่ปลอดภัยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยประเภทโปรติเอสจึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร มักจะทนต่อพีเอชและความร้อน บางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้างสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร เช่น *L. monocytogenes* และ *C. botulinum* แบคเทอ-

ริโอซินมักถูกควบคุมการสร้างโดยพลาสมิดจึงง่ายต่อการทำ genetic manipulation นอกจากนี้ แบคเทอริโอซินช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้นโดยช่วยเพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคอาหาร

2.6.1 สมบัติของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียต่างชนิดกันมักมีสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพที่แตกต่างกัน เช่น มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน และมีกลไกการทำลายจุลินทรีย์เป้าหมายที่แตกต่างกัน เป็นต้น โดยที่ Tagg และคณะ (1976) เป็นผู้เริ่มต้นในการกำหนดลักษณะของแบคเทอริโอซิน คือมีสมบัติหลัก ๆ ดังต่อไปนี้

1. เป็นโปรตีน

ด้วยเหตุที่แบคเทอริโอซินต้องเป็นโปรตีน ดังนั้นการทดสอบว่าสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจเป็นแบคเทอริโอซินหรือไม่ จึงมักทำการทดสอบโดยการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ในการทำลายสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจ ซึ่งถ้าเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถทำลายสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจได้ ก็แสดงว่าสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจเป็นโปรตีน ดังนั้นสารดังกล่าวจึงน่าที่จะเป็นแบคเทอริโอซิน ซึ่งสารแบคเทอริโอซินหลายชนิดสามารถถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น pepsin trypsin และ protease เป็นต้น เช่นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* ถูกลดกิจกรรมการยับยั้งด้วยเอนไซม์ proteinase K papain trypsin chymotrypsin pronase pepsin และ protease (Todorov and Dicks, 2005)

2. ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยทำลายจุลินทรีย์ (bacteriocidal) หรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (bacteriostatic)

แบคเทอริโอซินบางชนิดจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการทำลายจุลินทรีย์ เช่น plantaricin KW 30 ซึ่งผลิตโดย *L. plantarum* KW 30 (Kelly et al., 1996) และ acidocin J 1229 ซึ่งผลิตโดย *L. acidophilus* JCM 1229 (Tahara and Kanatani, 1996) เป็นต้น ในขณะที่แบคเทอริโอซินบางชนิดจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหยุดการเจริญของจุลินทรีย์แต่ไม่ทำลายจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. saka* 148 (Sobrino *et al*., 1991) เป็นต้น

3. สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ

คุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ที่จำเพาะของแบคเทอริโอซินทำให้แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารยับยั้งอื่น ๆที่แบคทีเรียแลคติกผลิต เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แบบไม่จำเพาะ การที่แบคเทอริโอซินสามารถไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ เนื่องจากก่อนที่แบคเทอริโอซินจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน (sensitive strain)ได้ แบคเทอริโอซินต้อง

ไปจับกับตำแหน่งที่จับจำเพาะ (specific binding site หรือ specific receptor) ซึ่งมักอยู่ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน เช่น จากการศึกษา pediocin AcH ซึ่งผลิตจาก *Pediococcus acidilactici* พบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Pediococcus Enterococcus Staphylococcus Bacillus Propionibacterium Listeria Lactobacillus Leuconostoc Brochothix Clostridium botulinum* E เป็นต้น โดยการที่ pediocin AcH มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้นั้น เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีโมเลกุลของกรด lipoteichoic ซึ่งเป็น receptor ของ pediocin AcH ส่งผลให้เกิดการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกขึ้น ในขณะที่ในแบคทีเรียแกรมลบจะไม่มี lipoteichoic ทำให้ไม่สามารถดูดซับ pediocin AcH ได้ จึงไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ (Ray, 1992; Bhunia *et al*., 1991)

4. สังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรม

เนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นโปรตีน ดังนั้นในการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินต้องผ่านกระบวนการ transcription และ translation เพื่อถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin gene) โดยยีนสำหรับแบคเทอริโอซินอาจเป็นยีนที่อยู่ในพลาสมิดหรือโครโมโซมก็ได้ ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่อยู่ในพลาสมิด เช่น coagulin ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Bacillus coagulans* I_4 (Hyronimus *et al*., 1998) เป็นต้น และตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีน สำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่ในโครโมโซม ได้แก่ plantaricin D ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* BFE 905 (Franz et al., 1998) และ plantaricin KW 30 ซึ่งผลิตโดย *L. plantarum* KW 30 (Kelly *et al*., 1996) เป็นต้น

2.6.2 การจัดจำแนกแบคเทอริโอซิน (Classification of bacteriocins)

การจัดจำแนกแบคเทอริโอซินสามารถทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนก เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน มวลโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน โครงสร้างทางเคมีของแบคเทอริโอซินและกลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

Klaenhammer (1998) แบ่งแบคเทอริโอซินตามความสามารถในการยับยั้งเป็น 2 ชนิด คือ

1. **แบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งในช่วงแคบ (narrow inhibitory spectrum)**

เป็นแบคเทอริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัสเดียวกัน เช่น lactocin 27 จากเชื้อ *Lactobacillus halveticus* LP27 มีกิจกรรมยับยั้งเฉพาะ *Lactobacillus* ส่วนเชื้อ *Lactococcus lactis subp. cremoris* 346 ยับยั้งเฉพาะ *Lactococci caseicin* 80 และเชื้อ *Lactococci caseicin* B109 ยับยั้งแบคทีเรียในจีนัสอื่นได้เล็กน้อย เช่น lactocin F ยับยั้ง *Lactobacilli* และ *Enterococcus faecalis*

2. แบคเทอริโอซินบางชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งในช่วงกว้าง (broad inhibitory spectrum)

แบคเทอริโอซินบางชนิด นอกจากสามารถยับยั้งแบคทีเรียในจีนัสเดียวกันแล้ว ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกอื่น ๆได้ด้วย เช่น ไนซิน จะมีประสิทธิภาพในการใช้มากกว่า โดยพบว่า ไนซินมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายชนิด รวมถึงกลุ่มที่ก่อโรคด้วย โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร เช่น *L. monocytogenes* โดยไม่ก่อให้เกิดอันตรายกับเชื้อประจำถิ่นชนิดอื่น หรือ pediocin AcH ที่ผลิตจากเชื้อ *P. acidilactici* สามารถยับยั้ง *Pediococcus Lactobacillus Leuconostoc Staphylococcus Listeria Bacillus Enterococcus* และ *Clostridium* ได้

นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งแบคเทอริโอซินตามลักษณะโครงสร้าง มวลโมเลกุล และความคงตัวต่อความร้อน ได้เป็น 4 ชนิด (Ouwehand and Vesterlund, 2004)

ตารางที่ 1 การจัดแบ่งกลุ่มแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

กลุ่ม (Class)	กลุ่มย่อย	ลักษณะ
I		แบคเทอริโอซินขนาดเล็กกว่า 5 กิโลดาลตัน ทนความร้อน
II		แบคเทอริโอซินขนาดเล็กกว่า 10 กิโลดาลตันทนความร้อน 100-121 องศาเซลเซียส
	IIa	ออกฤทธิ์ต่อ *Listeria* ประกอบด้วย -Y-G-N-G-V-X-C-บริเวณด้านปลายเอ็น (N-terminal)
	IIb	การออกฤทธิ์ต้องการการทำงานร่วมกันของเปปไทด์ 2 สาย
	IIc	การออกฤทธิ์ต้องการหมู่ไธออล
III		แบคเทอริโอซินขนาดใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตัน ไม่ทนความร้อน
IV		แบคเทอริโอซินที่มีคาร์โบไฮเดรตและ/หรือไขมันเป็นองค์ประกอบร่วม

ที่มา : Ouwehand and Vesterlund (2004)

1. Lantibiotic (Class I) มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อน เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็กกว่า 5 กิโลดาลตัน และมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบประมาณ 19-37 โมเลกุล ซึ่งประกอบด้วย dehydroalanine และ dehydrobutyrine และกรดอะมิโนชนิด thioether ซึ่งประกอบด้วย lanthionine และ methyllanthionine ตัวอย่างการสร้างแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้โดยแบคทีเรียแลคติกเช่น Nisin A ผลิตโดย *L. lactis* ATCC 11454 (Rogers, 1928) Lactocin S

ผลิตโดย *L. sake* L45 (Mortvedt, 1991) Lacticin 481 ผลิตโดย *L. lactis* CNRZ 481 (Piard *et al*., 1990)และ Carnocin UI49 ผลิตโดย *C. piscicola* (Stoffel *et al*., 1992)

2. Non-lantibiotic (Class II) ขนาดเล็ก เป็นแบคเทอริโอซินที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 15,000 ดาลตัน มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มย่อยได้แก่

Class IIa เป็นแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* (antilisterial bacteriocins) กลุ่มย่อยนี้มีลำดับกรดอะมิโนบางส่วนเหมือนกัน (38-55 เปอร์เซ็นต์) โดยเฉพาะที่ด้านปลายเอ็น (N-terminal)มีรูปแบบของกรดอะมิโนเป็น Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Gys บางครั้งเรียกกลุ่มย่อยนี้ว่า แบคเทอริโอซินในตระกูล Pediocin (Ennahar *et al*., 2000) และมักฆ่าเซลล์เป้าหมายโดยการไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายให้เสียหาย ซึ่งส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด เนื่องจากเกิดการสูญเสียการควบคุมการผ่านเข้าสู่เซลล์และออกจากเซลล์ของสารอาหารและไอออนชนิดต่าง ๆ

Class IIb เป็นแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน ประกอบด้วย เปปไทด์ 2 ชนิดที่ทำงานเสริมฤทธิ์กัน ถ้าเหลือตัวใดตัวหนึ่งมักจะไม่มีแอคติวิตี หรือมีแอคติวิตีเหลือเล็กน้อยเท่านั้น ตัวอย่างของกลุ่มนี้ คือ แลคตาซินเอฟ (lactacin F) และแลคโตคอกซินจี (lactococcin G) แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ทำให้เกิดรู (pore) ที่เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมายและต้องอาศัยแบคเทอริโอซินสองชนิดทำงานร่วมกัน

Class IIc การออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ต้องอาศัยหมู่ไธออล ประกอบด้วยแบคเทอริโอซินที่ไม่สามารถถูกจัดให้อยู่ใน ชนิด IIa และ IIb ได้ แบคเทอริโอซินในกลุ่มย่อยนี้เป็นแบคเทอริโอซินที่ไม่มีกรดอะมิโน cysteine เช่น Lactacin B ผลิตโดย *L. acidophilus* N2 (Barefoot and Klaenhammer, 1983)

3. Non-lantibiotic (Class III) เป็นแบคเทอริโอซินที่เป็นโปรตีนขนาดใหญ่ (มากกว่า 30 กิโลดาลตัน) ไม่ทนความร้อนจึงแตกต่างจาก class I และ II ตัวอย่างของกลุ่มนี้คือ เฮลเวติซิน J (helveticin J) และเอนเทอโรไลซิน A (enterolysin A)

4. Complex bacteriocin (Class IV) : Klaenhammer (1993) ได้เสนอให้มีการแบ่งกลุ่มแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นอีก 1 class คือ class IV ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่มีโครงสร้าง glycoprotein หรือ lipoprotein ด้วยนอกเหนือจากส่วนที่เป็นโปรตีน แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ เช่น Lactocin 27 ผลิตโดย *L. helveticus* LP27 ซึ่งจะมีส่วนของไกลโคโปรตีนในโครงสร้าง ส่วน Leucocin S ผลิตโดย *Leuconostoc paramesenteroides* OX (Lewus *et al*., 1992) และ Pediocin SJ-1 ผลิตโดย *Pediococcus acidilactici* SJ-1 (Schved *et al*., 1993)

2.6.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติก

ในการสร้างแบคเทอริโอซิน อาหารเลี้ยงเชื้อควรมีสารอาหารที่จำเป็นอย่างครบถ้วน เพื่อที่จะทำให้เชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ในปริมาณสูงสุด ไม่ขัดขวางต่อการปลดปล่อยแบคเทอริโอซินออกจากเซลล์ และอาหารเลี้ยงเชื้อต้องไม่มีผลต่อแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (Tagg *et al*., 1976) ดังนั้นจึงมีปัจจัยที่ต้องคำนึงถึงในการสร้างแบคเทอริโอซินดังต่อไปนี้

1. ชนิดของจุลินทรีย์

แบคเทอริโอซินสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติกหลายสายพันธุ์ ในปี ค.ศ.1994 (Yang and Ray, 1994) ค้นพบแบคเทอริโอซิน 2 ชนิด คือ ไนซิน และ leuconocin L ซึ่งแบคเทอริโอซินดังกล่าวได้มาจากแบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแลคติกที่สร้างเพดดิโอซิน AcH ต่อมา De Vuyst and Vandamme (1992) ได้คัดแยก *L. lactis* พบว่ามี 21 สายพันธุ์สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้และอีก 6 สายพันธุ์ไม่สร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งสายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินได้นั้นจะมีภูมิคุ้มกันเพื่อไม่ให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตออกมาทำลายตัวเอง นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบความต้านทานของไนซิน โดยนำแบคทีเรียแลคติก 2 สายพันธุ์คือ *L. lactis* N8 และ *L. lactis* LAC 48 มาทำให้กลายพันธุ์โดยใช้พลาสมิดที่มียีนไนซินใส่ในแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ชนิด เมื่อทำการทดสอบพบว่า ความต้านทานของไนซินเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ดั้งเดิม (Quiao, 1997)

2. องค์ประกอบต่าง ๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ในการผลิตแบคเทอริโอซินจะต้องคำนึงถึงแหล่ง ปริมาณคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน และปริมาณฟอสเฟต ตลอดจนปริมาณสารยับยั้งและสารลดแรงผิวต่าง ๆที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยสารที่เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อแบคเทอริโอซิน ดังนี้

2.1 แหล่งคาร์บอน

แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้แหล่งคาร์บอนในการผลิตแบคเทอริโอซินได้แตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น ไนซิน Z ที่ผลิตขึ้นจาก *L. lactis* IO-I เมื่อทำการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซโลส (Matsusaki, 1996) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสจะให้แอคติวิตีของไนซิน Z สูงสุดเท่ากับ 4,000 IU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้น้ำตาลไซโลสจะให้ค่าแอคติวิตีของไนซิน Z เท่ากับ 3,000 IU/mL ส่วนแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดในการผลิตเพดดิโอซิน AcH (Pediocin AcH) ได้แก่ น้ำตาลกลูโคส ซูโครส ไซโลส และกาแลคโตส (Biswas, 1991)

2.2 แหล่งไนโตรเจน

Kim *et al*. (1997) ได้ทำการศึกษาพบว่า ปริมาณการผลิตไนซินจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจน ถึงแม้อัตราการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณไนโตรเจนก็ตาม

นอกจากนี้ยังพบว่าชนิดของแหล่งไนโตรเจนมีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินด้วย โดย De Vuyst and Vandamme (1992) ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบผลของแหล่งไนโตรเจนโดยใช้ cotton-seed meal yeast extract และ fish meal พบว่าการใช้ cotton-seed meal จะให้แอคติวิตีของแบคเทอริโอซิน 2,500 IU/mL และเมื่อใช้ yeast extract และ fish meal จะให้แอคติวิตีของแบคเทอริโอซิน 2,000 IU/mL

2.3 สารอนินทรีย์ต่าง ๆ

โดยพบว่า ทั้งไอออนที่มีประจุลบ เช่น สารประกอบฟอสเฟต และไอออนที่มีประจุบวก เช่น แมกนีเซียมไอออน (Mg^{+2}) และแคลเซียมไอออน (Ca^{+2}) มีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ด้วย ซึ่งมีรายงานการใช้สารอนินทรีย์ต่าง ๆ ดังนี้

2.3.1 ฟอสเฟต

จากการทดลองของ De Vuyst and Vandamme (1992) พบว่า ฟอสเฟตช่วยเพิ่มปริมาณการผลิตไนซินจากเชื้อ *L. lactis* NIZO 22186 โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.8 จะให้แอติวิตีของไนซินสูงสุด แต่จะไม่มีผลต่อการผลิตไนซินจากสายพันธุ์ *L. lactis* IO-1 (Matsusaki *et al*., 1996)

2.3.2 แมกนีเซียมไอออน (Mg^{2+})

แมกนีเซียมไอออน สามารถเพิ่มการสร้างเพดดิโอซิน AcH (Biswas, 1991) และการสร้างไนซินของเชื้อ *L. lactis* ATCC 11454 แต่ไม่สามารถเพิ่มการสร้างไนซินของเชื้อ *L. lactis* IO-1 ได้ (Matsusaki, 1996) นอกจากนี้การเติมแคลเซียมคลอไรด์ 0.1 โมลต่อลิตร ยังช่วยเพิ่มปริมาณไนซิน Z แต่ไม่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ หรือการสร้างแลคเตทจากน้ำตาลไซโลสและกลูโคสในการเพาะเลี้ยงแบบรวดเดียวที่มีการควบคุมค่าความเป็นกรดด่าง

2.3.3 Tween 80

Tween 80 สามารถส่งเสริมการสร้างแบคเทอริโอซินได้ในบางสภาวะ โดย tween 80 จะมีสมบัติในการลดแรงตึงผิวโดยจะป้องกันการดูดซับของแบคเทอริโอซินบนผิวเซลล์และการรวมกันของแบคเทอริโอซิน (Biswas, 1991) พบว่าในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน และมีการเติม tween 80 รวมทั้งแมกนีเซียมไอออน พบว่า ชีวมวลและแอคติวิตีของเพดดิโอซิน AcH ที่สร้างจากเชื้อ *P. acidilactici* จะได้ปริมาณสูงสุด นอกจากนี้ tween 80 ยังช่วยเพิ่มการสร้าง lactocin S (Mortvedt, 1991) และ amylovorin L 471 (De Vuyst *et al*., 1996)

2.3.4 เอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (protease)

โดยพบว่า ไนซินจะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ alpha-chymotrypsin, nisinase และ lactocin 27 จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K, pepsin และ subtilisin นอกจากนี้ piscicocin V1 และ divercin V41 จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ pronase E proteinase K และ trypsin เป็นต้น

3. แบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารทะเลแช่เย็นเน่าเสีย

3.1 *Listeria monocytogenes*

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่ผู้ป่วยมีอัตราการเสียชีวิตสูงจึงมีความสำคัญต่อความปลอดภัยด้านอาหารและสุขภาพของผู้บริโภคกระบวนการแปรรูปอาหารที่ใช้ความร้อนการแช่แข็งการทำแห้งหรือสารฆ่าเชื้อ (sanitizing compounds) เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เซลล์ *L. monocytogenes* เกิดการบาดเจ็บซึ่งเซลล์เหล่านั้นสามารถอยู่รอดได้ในผลิตภัณฑ์อาหารและกลับมามีศักยภาพในการก่อโรคได้อีกครั้ง (สุลาวดี และคณะ, 2555)

L. monocytogenes เป็นแบคทีเรียชนิด Gram-positive มีแฟลกเจลลา (flagella) ช่วยให้สามารถเคลื่อนที่ได้ ทำให้เกิดโรค Listeriosis อาจทำให้สตรีมีครรภ์แท้งได้ และอาจมีผลต่อระบบทางเดินอาหารทำให้เกิดอาการคลื่นไส้อาเจียนและท้องเดิน เนื่องจากเชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 3 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหารทะเลแช่เย็น เพราะปกติอาหารทะเลจะเก็บในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิต่ำซึ่ง *L. monocytogenes* สามารถเจริญได้ บางครั้งผู้บริโภคไม่ปรุงอาหารให้สุกซึ่งทำให้มีผลต่อระบบทางเดินอาหาร

จากการรายงาน FAO ปี 1999 ซึ่งระบุว่า *L. monocytogenas* พบบ่อยในผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภค แต่ยังไม่มีระบุชัดเจนยืนยันถึงปริมาณที่ตรวจพบ จากข้อมูลที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาแซลมอนรมควัน มีรายงานว่าพบในปริมาณ 10-100 CFU/g แต่ไม่บ่อยครั้ง แม้ว่าในผลิตภัณฑ์พร้อมบริโภคจะมีประมาณ *L. monocytogenas* ต่ำ แต่เนื่องจาก *L. monocytogenas* สามารถเจริญได้ดีในสภาวะแช่เย็นและทนต่อสภาวะแวดล้อมต่าง ๆได้ดี ดังนั้นแม้ว่าพบ *L. monocytogenas* ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เย็นปริมาณต่ำ แต่เชื้ออาจเพิ่มปริมาณได้เมื่อเก็บรักษาไม่ถูกต้องหรือระหว่างการทำละลาย อาจส่งผลอันตรายต่อผู้บริโภคได้

Martin-Visscher *et al*. (2008) รายงานว่า *C. maltaromaticum* UAL307 ที่แยกได้จากเนื้อหมู มีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก รวมถึง *L. monocytogenas* ซึ่งสารที่มีความสามารถในการยับยั้งนี้ระบุว่าเป็นแบคเทอริโอซิน piscicolin 126 carnocyclin Aและ carnobacteriocin BM1

นอกจากนี้การใช้แบคเทอริโอซิน (Nisin) ร่วมกับ ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA) และ sodium diacetate (SD) จะสามารถลดจำนวน *L. monocytogenas* ในตัวอย่างกุ้งได้ถึง 1.32-1.36 log CFU/g หลังจากเก็บตัวอย่างที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน (Wan Norhana *et al*., 2012)

3.2. *Escherichia coli*

สามารถเจริญในอาหารต่าง ๆของมนุษย์ได้ เช่น เนื้อสัตว์ นม สัตว์ปีก และอาหารทะเลการเจริญของ *E. coli* จะเจริญที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียสโดยอุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 35-37 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิภายในร่างกายของสัตว์เลือดอุ่น เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหาร

ประเภทที่มีปริมาณน้ำมากเน่าเสีย ซึ่งจัดอยู่ในประเภทที่มีค่า a_wสูงได้แก่ อาหารสดทั้งหลาย เช่น เนื้อสัตว์ อาหารทะเล และผักสด เป็นต้น ซึ่ง *Escherichia coli*จะเจริญได้ในอาหารที่มีค่า a_w= 0.96 อีกทั้งยังทนสภาพความเป็นเกลือสูงสุดที่ 6.5 %

ลัญจกร (2548) ได้รายงานว่า สมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์จากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnossus* SN11 พบว่าการเตรียมแบคเทอริโอซินที่มีความเข้มข้น 0.8 mg/mL และ 1.0 mg/mL สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* ลงได้ 2 log CFU/mL และสามารถลดปริมาณเชื้อ *E. coli* และ *S. lactis* ลงได้ 1 log CFU/mL

3.3. *Vibrio parahaemolyticus*

Vibrio parahaemolyticus เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง พบในแหล่งธรรมชาติ เช่น น้ำทะเล และน้ำกร่อย แยกได้จากน้ำทะเลทั่วโลก พบได้ในกุ้ง หอย ปลา และปูหลายชนิด ก่อโรคอาหารเป็นพิษหรือทางเดินอาหารอักเสบ ส่วนใหญ่สายพันธุ์ที่แยกได้จากผู้ป่วยผลิตสารพิษชนิดทนความร้อนเรียกว่า thermostable direct hemolysin พบระบาดในเปรู เมื่อปี 1999 และแพร่กระจายไปกว้างขวางหลายร้อยประเทศ ทำให้มีผู้เสียชีวิตนับพันราย ทำให้ตระหนักถึงความปลอยภัยของอาหารมากขึ้น

แบคทีเรียแลคติกนอกจากจะสามารถแยกได้จากอาหารหมักและนมแล้ว ยังสามารถแยกได้จากเครื่องในปลากระพง ซึ่งพบแบคทีเรียแลคติก 87 ไอโซเลท เมื่อทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติก พบว่า 16 ไอโซเลท สามารถทนเกลือที่มีความเข้มข้น 500 mg/L มี 2 ไอโซเลท สามารถทนกรดที่พีเอช 1 2 3 ได้ตั้งแต่ 0.5-5 ชั่วโมง เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน แป้ง ไขมัน พบว่ามี 60 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันได้ และแบคทีเรียแลคติก 28 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. 7 ไอโซเลท *Lactococcus* sp. 3 ไอโซเลท และ *Streptococcus* sp. 18 ไอโซเลท (กมลทิพย์ และ วัชรี, 2542)

3.4. *Staphylococcus aureus*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะกลมเรียงตัวเป็นกลุ่มคล้ายพวงองุ่น หรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่โคโลนีมีสีเหลือง เจริญได้ดีในสภาพมีออกซิเจนมากกว่าในสภาวะไม่มีออกซิเจน ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 35-40 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชหรือความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 7-7.5 ส่วนค่า a_w (ปริมาณน้ำอิสระในอาหารที่จุลินทรีย์นำไปใช้ในการเจริญ) ต่ำสุดสำหรับการเจริญในสภาพมีออกซิเจนประมาณ 0.86

มีผู้ศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่ได้จากฟาร์มปลาสามารถผลิตสารยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *S. aureus*ได้ ซึ่งได้แก่ *L. lactis* USC-39 *E. faecium* USC-46 and *E. mundtii* USC-51 พบว่ามีการผลิตแบคเทอริโอซินมากที่สุด และสามารถผลิตไฮโดรเจน-

เปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ในการยับยั้งได้ และพบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดีเมื่อมีพีเอชในช่วง 3.5-5.5 และสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีเมื่อมีพีเอชในช่วง 3.5-4.5 และแบคเทอริโอซินยังมีความสามารถในการยับยั้งได้เมื่อให้ความร้อน 60 องศาเซลเซียส 100 นาที และ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในอาหารหมักและอาหารที่ผ่านความร้อนได้ (Carmen *et al.*, 2005)

3.5. *Salmonella* spp.

เชื้อ *Salmonella* spp. แพร่กระจายในอาหารหลายชนิด โดยอาหารที่มักพบการปนเปื้อนของเชื้อซึ่งก่อให้เกิดโรค Salmonellosis ในคน คือ ไข่ สัตว์ปีก นม และผลิตภัณฑ์จากเนื้อโดยทั่วไปการเกิดโรคนี้ จะเกิดจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อในจำนวนที่มากพอสมควร ซึ่งปริมาณที่ทำให้เกิดโรค อยู่ในช่วง 10^7-10^8 CFU/g แต่จากการรายงานการพบการปนเปื้อนของเชื้อในอาหาร พบว่า *S.* Typhimurium เพียง 1-100 CFU/g สามารถก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ (Martinez-Lorenzo *et al.*, 2001) โดยอาการของอาหารเป็นพิษจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนแล้วประมาณ 6-48 ชั่วโมง และจะมีอาการอยู่ระหว่าง 1-5 วัน

3.6. *Enterococcus* sp.

Enterococci เป็นแบคทีเรียแกรมบวก พบได้ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และคน (Tannock and Cook, 2002; Fisher and Phillips, 2009) นอกจากนี้ยังพบได้ในสัตว์น้ำ (Rice *et al.*, 1995; Valdivia *et al.*, 1996; Laukova and Juris,1997; Manero and Blanch, 1999; Quigg *et al.*, 2009) Enterococci สามารถอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมของน้ำทะเล และทนความเข้มข้นของเกลือได้สูง (Hardwood *et al.*, 2000) จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้พบได้ในหอย ลำไส้ปลา (Petersen and Dalsgaard, 2003) ซึ่งสปีชีส์หลักที่พบได้บ่อย ได้แก่ *Enterococcus faecalis* และ *Enterococcus faecium* (Thapa *et al.*, 2006) แต่แบคทีเรียเหล่านี้เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารทะเลเน่าเสีย เช่น ในกุ้งต้ม และกุ้งสด (Dalgaard *et al.*, 2003; Mejlholm *et al.*, 2008) นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อชนิดนี้เกี่ยวข้องกับความปลอดภัยในอาหารทะเลสด ซึ่งเคยมีการระบาดและก่อโรคในคน แบคทีเรียชนิดนี้เป็นสาเหตุของการติดเชื้อในโรงพยาบาลและยังมีส่วนก่อให้เกิดเยื่อบุหัวใจอักเสบ และการติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ(Fisher and Phillips, 2009)

3.7. *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonads เป็นแบคทีเรียสำคัญที่เป็นสาเหตุของอาหารเน่าเสีย ซึ่งทำความเสียหายทางเศรษฐจิจเป็นอย่างมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเนื้อสัตว์ เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้

สามารถทนอุณหภูมิต่ำได้ดี(Psychrotolerant)(Dainty and Mackey,1992; Varnam and Sutherland, 1995) และพบในปลาสดด้วย (Gram and Huss, 1996) มีการตรวจพบแบคทีเรียชนิดนี้ในนมและอาหารทะเล ซึ่งพบว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีการเจริญในที่อุณหภูมิต่ำ และเป็นแบคทีเรียที่เจริญได้อย่างรวดเร็ว จึงส่งผลต่อคุณภาพของปลาแช่เย็น (Koutsoumanis and Nychas, 2000)

4. การศึกษาเกี่ยวกับการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อนำมาประยุกต์ใช้ในอาหารทะเลแช่เย็น

กุ้งเป็นอาหารทะเลที่พบการเน่าเสียบ่อยครั้ง ซึ่งเป็นผลมาจากการเจริญของจุลินทรีย์และอาจพบแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ เช่น *L. monocytogenes* และ *Salmonella* ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ถูกกักกันสินค้า ก่อความเสียหายทางเศรษฐกิจ (Ababouch *et al*, 2005) นอกจากนี้แบคทีเรียทั้งสองอาจก่อให้เกิดโรค listeriosis และ salmonellosis ในผู้ที่บริโภคกุ้ง ดังนั้นการลดจำนวนของแบคทีเรียดังกล่าวจึงเป็นสิ่งที่มีความน่าสนใจ (Wan Norhana *et al*, 2012)

L. monocytogenes สามารถอยู่รอดได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีพีเอชเป็นกรด (Driscoll *et al*, 1996) อุณหภูมิต่ำ (Gill and Reichel, 1989) ความเข้มข้นเกลือสูง (Farber and Peterkin, 1991) ซึ่งทำให้แบคทีเรียชนิดนี้ยากต่อการควบคุมในอาหาร ปัจจุบันพบว่าการติดเชื้อ *L. monocytogenes* สามารถรักษาได้ด้วยยาปฏิชีวนะ แต่พบว่าการดื้อยาเริ่มมีมากขึ้นเรื่อย ๆ (Saldar and Armstrong, 2003) ดังนั้นการควบคุม *L. monocytogenes* ในอาหารกลายเป็นสิ่งที่กังวลในระดับอุตสาหกรรม ปัจจุบันมีการใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นเพื่อควบคุมแบคทีเรียในอาหาร เช่น อาหารทะเล (Nilsson *et al*, 2004)

Nisin เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactococcus lactis* ซึ่งมีการใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพตั้งแต่ปี ค.ศ.1940 (Mattick and Hirsch, 1947) Nisin ถูกอนุมัติให้ใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพ ซึ่งมีการใช้กันมากกว่า 50 ประเทศ (Surekha and Reddy, 2000) โดยนำมาใช้ถนอมอาหาร รวมทั้งในอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง ขนมหวาน นม โยเกิร์ต เครื่องดื่มผ่านการหมัก ผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลารมควัน รวมถึงผักกระป๋อง Nisin มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วงกว้าง โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก จะมีความคงตัวที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที มีความไวต่อเอนไซม์ pancreatin และ α-chymotrypsin โดยองค์การอนามัยโลกและองค์การอาหารโลก (FAO/WHO) กำหนดให้บริโภคได้ไม่เกิน 30,000 IU ต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวต่อวัน โดยไม่มีผลกระทบต่อความปลอดภัย (Daeschel, 1990)

จากการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่า การใช้ Nisin ร่วมกับเกลือของกรดอินทรีย์สามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์นม และสามารถลดจำนวนแบคทีเรียก่อโรคใน

ผลิตภัณฑ์ได้ (Delves-Broughton *et al*, 1996) ปัจจุบันผู้บริโภคมีความต้องการอาหารสด และอาหารในกลุ่ม lightly preserved ดังนั้นผู้ทำการทดลองจึงใช้Nisinร่วมกับเกลือของกรดอินทรีย์เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา และยับยั้ง *L. monocytogenes Salmonella* ในกุ้งแช่เย็น (Wan Norhana *et al*, 2012)

วรายุทธ และคณะ (2007) ได้คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากตัวอย่างแหนม แบคเทอริโอซินดังกล่าวเป็นโปรตีนมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 10 kDa สามารถทนความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงถึง 1280 Au/mL และเมื่อตรวจหาตำแหน่งยีนสำหรับแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติก พบว่า ยีนดังกล่าวเป็นยีนที่น่าจะอยู่บนพลาสมิด

Tahiri *et al*. (2009) รายงานว่า *Carnobacterium divergens* strain M35 ที่คัดแยกได้สามารถผลิตแบคเทอริโอซินในกลุ่ม class IIa (divergicin M35) จากการทดลองพบว่าปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *C. divergens* strain M35 กลับไม่มีผลต่อการผลิตของแบคเทอริโอซิน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการผลิตแบคเทอริโอซินไม่ได้ขึ้นอยู่กับการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน คือ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ชนิดของแหล่งคาร์บอน พบว่า อาหารที่ดีที่สุดสำหรับการผลิต divergicin M35 คือ อาหาร SCH (Snow crab hepatopancreas) ที่พีเอช 7

Matamoros *et al*. (2009) พบว่า psychrotrophic lactic acid bacteria ที่แยกได้มีสมบัติเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรคได้ดี ซึ่งถูกระบุว่าเป็น *Leuconostoc gelidum* 3 ไอโซเลท *Lactococcus piscium* 2 ไอโซเลท *Lactobacillus fuchuensis* 1 ไอโซเลท และ *Carnobacterium alterfunditum* 1 ไอโซเลท ซึ่งทุกไอโซเลทไม่มีการผลิต histamine และ tyramine หลังจากนั้นได้ทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลทที่มีสมบัติคล้ายกับแบคเทอริโอซิน จากการวิจัยครั้งนี้ผู้ทำการทดลองเห็นว่า แบคเทอริโอซินที่คัดเลือกได้อาจจะนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพกับผลิตภัณฑ์อาหารทะเลได้ ผู้วิจัยได้กล่าวอีกว่า งานที่จะต้องทำต่อไปคือ การนำมาประยุกต์ใช้จริง อาจมีการใช้ร่วมกับกระบวนการอื่น ๆ เพื่อปรับปรุงคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารทะเลแช่เย็น

Chahad *et al*. (2011) ได้เก็บตัวอย่างปลากะพงขาว และปลากะพงแดงมาคัดเลือกแบคทีเรียแลคติก พบว่า จีนัส *Enterococus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรคและแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียได้ดี เช่น *Bacillus* sp. *Vibrio anguillarum Aeromonas salmonicida Aeromonas hydrophila* โดยเฉพาะ *Listeria monocytogenes* ซึ่งสารยับยั้งแบคทีเรียดังกล่าวมีสมบัติเป็นโปรตีน ทนความร้อนได้ถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งเป็นสมบัติของ แบคเทอริโอซิน และได้จัดจำแนกประเภทของแบคเทอริโอซินที่ได้ พบว่าเป็น heat-resistant small class IIa bacteriocins และระบุชนิดโดยวิธีทางโมเลกุล พบว่าเป็นกลุ่มของ

enteriocin นอกจากนี้ผู้ทำการทดลองยังกล่าวว่า แบคเทอริโอซินที่ได้จะเป็นทางเลือกหนึ่งในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เย็น

Nanasombat *et al*. (2012) รายงานว่า แบคทีเรียแลคติกที่พบในกุ้ง และหอยมีจำนวน 3.0×10^4–3.0×10^6 CFU/g แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดี โดยเฉพาะ *L. monocytogenes* สารยับยั้งดังกล่าวมีสมบัติเป็นโปรตีน ซึ่งคาดว่าจะเป็นแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ยังทนต่อสภาวะความเป็นกรดต่ำ ๆ ทนเกลือน้ำดี และความเข้มข้นของเกลือได้ถึง 10 % แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ระบุว่าเป็น *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus faecalis* ผู้วิจัยกล่าวว่า สมบัติดังกล่าวเหมาะที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหารทะเลหมักเพื่อเป็นโปรไบโอติก หรือใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพในอาหารทะเลสด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากอาหารทะเลแช่เย็น
2. จัดจำแนกชนิดและศึกษาสมบัติบางประการของแบคทีเรียแลคติกและสารยับยั้งที่ได้จากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้
4. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* โดยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน
5. การนำสารยับยั้งและแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ไปประยุกต์ใช้ยับยั้ง *L. monocytogenes* ในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ

ความสำคัญและประโยชน์จากงานวิจัย

1. คัดเลือกได้แบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจากอาหารทะเลแช่เย็นได้
2. ทราบสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งให้ได้ปริมาณสูง
3. สามารถเก็บรักษาอาหารทะเลได้ในระยะเวลาที่นานขึ้นและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ขอบเขตของการวิจัย

เก็บตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นที่จำหน่ายใน super market ตามห้างสรรพสินค้าและตลาดสดที่วางจำหน่ายในเขตเทศบาลนครหาดใหญ่และเขตเทศบาลคอหงศ์ จังหวัดสงขลา มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสและ 35 องศาเซลเซียส ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ แล้วนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบการผลิตสารยับยั้งโดยวิธี agar spot และ agar well diffusion assay กับแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ได้แก่ *S. aureus* ATCC 29213 *L. monocytogenes* ATCC 15313 *E. coli* PSU 95 *V. parahaemolyticus* PSU 1681 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S.* Typhi หลังจากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งได้สูง จัดจำแนกชนิดแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทดสอบสมบัติของแบคทีเรียแลคติก ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง ทดสอบสมบัติของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ และทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *L. monocytogenes* ในกุ้งแช่เย็นในระดับห้องปฏิบัติการ

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นที่ใช้แยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก

ตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ กุ้ง หอย หมึก และ ปลา ที่จำหน่ายใน super market ของห้างสรรพสินค้าและตลาดสดในเขตเทศบาลนครหาดใหญ่และเขตเทศบาลคอหงส์ จังหวัดสงขลา

2. ตัวอย่างกุ้งที่ใช้ทดสอบ

กุ้งขาวสด (*Litopenaeus vannamei*) โดยคัดเลือกกุ้งที่มีขนาดเท่า ๆกัน น้ำหนักประมาณ 20 กรัมต่อตัว

3. แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบได้แก่ *S. aureus* ATCC 29213 *L. monocytogenes* ATCC 15313 *E. coli* PSU 95 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *V. parahaemolyticus* PSU 1681 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

	บริษัทผู้ผลิต
MRS broth with the pH adjusted to 7.0 (MRS-7m)	Difco
Triptic soy agar (TSA)	Merck
Triptic soy broth (TSB)	Merck
Bacteriocin screening medium (BSM)	-
Improved medium	-
Columbia blood agar	Oxoid
All purpose tween medium (APT)	Difco
M17 Agar medium	Difco
de Man Rogasa and Sharpe Broth (MRS broth)	Difco
de Man Rogasa and Sharpe Broth (MRS broth)	Difco

Muller-Hinton agar plates (MHA)	Merck
Plate Count Agar (PCA)	Merck

5. สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
สีสำหรับย้อมแกรม	LABCHEM
โซเดียมคลอไรด์	LABCHEM
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	Merck
แคลเซียมคาร์บอเนต	Merck
อินดิเคเตอร์ Bromcresol purple	Ajex Finechem
โซเดียมไฮดรอกไซด์	Merck
กรดไฮโดรครอริก	Merck

5.1 เอนไซม์

α- amylase	Sigma
Proteinase K	Sigma
α- chymotrypsin	Sigma
Trypsin	Sigma
Protease	Sigma
Lipase	Sigma

5.2 ยาปฏิชีวนะ

penicillin G (10 μg)	Oxoid
vancomycin (30 μg)	Oxoid
ampicillin (10 μg)	Oxoid
tetracyclines (30 μg)	Oxoid
chloramphenicol (30 μg)	Oxoid
ceftriaxone (30 μg)	Oxoid
gentamicin (10 μg)	Oxoid
erythromycin (15 μg)	Oxoid

6. เครื่องมือและอุปกรณ์

ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)	Venticell
หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave)	Tomy, Japan
เครื่องชั่งสาร (Balance)	BEC THAI
ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)	Satorius, USA
เตาแม่เหล็ก (Hot plate & Stirrer)	Corning
อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Memmert, USA
เครื่องผสม (Vortex mixer)	Labnet, USA
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Nikon, USA
ตู้เย็น	Senden intercool
ออโต้ปิเปต (Autopipette) ขนาด 1-10 µL	LIO LAB
ออโต้ปิเปต(Autopipette) ขนาด 20-200 µL	LIO LAB
เวอร์เนีย คาลิเปอร์ (Vernia caliper)	Made in China
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge)	Sorvall
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow cabinet)	Thermo scientific
UV Spectrophotometer	Shimadzu, Japan
Stomacher	SEWARD
เครื่องวัด McFarland	BIOSAN, USA
เครื่องอ่าน Microtiter plate	BIO-RAD
เครื่อง HPLC	Agilent Technologies
เครื่องวัดพีเอช	Beckman
เครื่องUitrafiltration	Amicon, USA
โถไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)	Beckton Dickinson
จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish)	Pyrex
Membrane filter ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร	Sartorius Biolab
Millipore Corporation Ultrafiltration	Amicon, USA
Microtiter plate	Thermo scientific
กระบอกฉีดยา (Syringe)	NIPRO, Thailand
ถุงมือ	SRI TRANG GLOVES
ที่ตั้งหลอดทดลอง (Test tube rack)	
ขวดแก้ว (ดูแรน) บรรจุขนาด 250 mL	
ขวดแก้ว (ดูแรน) บรรจุขนาด 500 mL	
ขวดแก้ว (ดูแรน) บรรจุขนาด 1000 mL	

หลอดทดลองขนาด 16 × 100 mm
หลอดทดลองขนาด 13 × 150 mm
ปิเปต ขนาด 1 mL
ปิเปต ขนาด 5 mL
ปิเปต ขนาด 10 mL
กระดาษรองสำหรับชั่งสาร
ตะเกียงแอลกอฮอล์
ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)
เข็มเขี่ยเชื้อ (Needle)
ปากคีบ (Forceps)
หลอด Centrifuge
Sterile plastic bag
ช้อนตักสาร
กระดาษอะลูมิเนียมฟอยล์
กระจกสไลด์
Magnetic bar
Parafilm
ลูกยาง
กรรไกร
หลอดดักก๊าซ
มีด

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็น

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็น ได้แก่ กุ้ง หอย หมึก ปู และ ปลา ชนิดต่างๆ ที่จำหน่ายใน super market ของห้างสรรพสินค้า ตลาดสดในเขตเทศบาลนครหาดใหญ่ และเขตเทศบาลคอหงส์ จังหวัดสงขลา ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อแล้วบรรจุในกล่องโฟมที่บรรจุน้ำแข็ง นำมายังห้องปฏิบัติภาคจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์ โดยทำการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียทันที หรือถ้าไม่วิเคราะห์ทันทีให้นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง (Fang *et al*., 2003)

2. การแยกและนับจำนวนแบคทีเรียสร้างกรดจากอาหารทะเลแช่เย็น

ชั่งตัวอย่างอาหารทะเล 25 g ใส่ในถุงพลาสติกแล้วเท Tryptone broth 225 mL ใส่ในถุงพลาสติกนำไปตีปั่นด้วยเครื่อง stomacher 1-2 นาที ให้เข้ากันจะได้ระดับความเจือจางที่ระดับ 10^{-1} นำมาเจือจางที่ระดับ 10^{-2} 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} โดยใช้ Tryptone broth ปริมาตร 9 mL ใช้ปิเปตขนาด 1 mL ดูดตัวอย่างจากระดับความเจือจาง 10^{-2} ถึง 10^{-6}ลงในจานอาหารจานละ 1 mL ระดับความเจือจางละ 2 จาน จากนั้นเติมอาหาร Bacteriocin Screening Medium (BSM) ที่เติม 0.004% Bromcresol purple (Coventry *et al*., 1996; Eijsink *et al*.,1996; Faye *et al*., 2000; Martinez *et al*., 2000; Tichaczek, *et al*., 1992) ลงในจานอาหารปริมาตร 20 mL เขย่าให้เข้ากัน นำไปบ่มที่ 35 และ8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ นับจำนวนแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ 30-300 CFU/mL จากนั้นสุ่มคัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเหลือง รูปกระสวย ขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน นำโคโลนีมา streak ลงบนอาหาร BSM agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำโคโลนีเดี่ยวมาเก็บในอาหาร BSM agar 3 mL โดยใช้ needle stab เพื่อนำไปตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกต่อไป

3. การตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้

นำเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดที่แยกได้ในข้อ 2 มาย้อมแกรม (ภาคผนวก ข) เพื่อดูการติดสีแกรม รูปร่างและการเรียงตัว และทำการทดสอบเอนไซม์คะตะเลส โดยหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3% ลงบนสไลด์ 1 หยด แล้วเขี่ยเชื้อแบคทีเรียสร้างกรดจาก BSM agar slant ลงไป 1 loop อ่านผลทันที คะตะเลสบวก จะมีฟองอากาศเกิดขึ้น และคะตะเลสลบ จะไม่มีฟองอากาศ

เกิดขึ้น แล้วทำการเก็บเชื้อที่ติดสีแกรมบวก และให้ผลคะตะเลสลบไว้ ทำการเก็บเชื้อโดยใช้ needle stab ลงในหลอดอาหาร BSM agar 3 mL เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

4. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

4.1 เตรียมเชื้อแบคทีเรียแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ในข้อ 3 ทั้งหมดมาเลี้ยงในอาหาร BSM broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ

4.2 การเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เตรียม inoculum ด้วยการเขี่ยเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ATCC 15313 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 บน Tryptic soy agar (TSA) แต่สำหรับ *V. parahaemolyticus* PSU 1681 เลี้ยงในอาหาร TSA ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อพบการเจริญของแบคทีเรีย เขี่ยเชื้อโคโลนีเดี่ยว 3-5 โคโลนีลงในอาหาร Tryptic soy broth (TSB) สำหรับ*V. parahaemolyticus* PSU 1681 เลี้ยงในอาหาร TSB ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5% บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อเจริญอยู่ในช่วง log phase หลังจากนั้นนำมาปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFaland ในอาหาร Tryptic soy broth สำหรับ*V. parahaemolyticus* PSU 1681 นำมาปรับความขุ่นในอาหาร Tryptic soy broth ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ 1.5% ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 CFU/mL

4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้ง

ศึกษาด้วยวิธี agar spot assay (ดัดแปลงจาก Fleming *et al*., 1975) โดยทำการดูดเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหาร BSM broth มา 2 ไมโครลิตร spot ลงบนผิวอาหาร BSM agar ทำ 2 ซ้ำ บ่มเชื้อใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ หลังจากนั้นเททับด้วย TSA soft agar 0.7 % ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ประมาณ 10^6 CFU/mL ปริมาตร 8 มิลลิลิตร สำหรับ *V. parahaemolyticus* PSU 1681 ใส่ในอาหาร TSA soft agar 0.7 % ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์1.5% ปริมาตร 8 มิลลิลิตร เททับ

บนผิวอาหาร BSM ที่หยดเชื้อแลคติกไว้เบา ๆ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งด้วยการวัดขนาดวงใสการยับยั้ง (clear zone) โดยวัดจากขอบเชื้อแบคทีเรียแลคติกจนสุดขอบวงใสโดยใช้เวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier caliper) คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ไว้ทำการทดสอบในการทดสอบอื่น ๆ ต่อไป เก็บใน 15% ของ glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

4.4 การทดสอบสมบัติการทนอุณหภูมิต่ำของแบคทีเรียแลคติก (ดัดแปลงจาก Matamoros *et al*., 2009)

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาทำการเพาะเลี้ยงใน BSM broth ที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 0 1 2 3 และ 7 วัน เก็บตัวอย่างมาวัดความขุ่นเพื่อดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm

5. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี agar well diffusion (ดัดแปลงจาก Schillinger and Lucke, 1989)

5.1 การเตรียมส่วนใสที่ต้องการทดสอบ

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ มาทดสอบการยับยั้งอีกครั้งโดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารเหลว BSM บ่มในอุณหภูมิที่ 20 องศาเซลเซียส ใน anaerobic jar และนำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใส (culture supernatant) มาทำให้เข้มข้น 5 เท่า โดยวิธี ultrafiltration นำส่วนใสที่ได้มาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 เพื่อกำจัดการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์ โดยปรับพีเอชด้วย 1N NaOH ทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำมากรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.2ไมโครเมตร

5.2 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ทดสอบกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แกรมบวก ได้แก่ *S. aureus* ATCC 29213 *L. monocytogenes* ATCC 15313 และ *E. faecalis* ATCC 29212 แบคทีเรียอินดิเคเตอร์แกรมลบ ได้แก่ *E. coli* PSU 95 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *V. parahaemolyticus* PSU 1681 และ *S.* Typhi ที่มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^6 CFU/mL ในอาหาร TSA soft agar 8 mL ยกเว้น *V. parahaemolyticus* PSU 1681 ที่เติมลงในอาหาร TSA soft agar ที่มีเกลือ

โซเดียมคลอไรด์ 1.5% ปริมาตร 8 mL แล้วเท TSA soft agar ที่เตรียมไว้บนอาหาร TSA ที่มีปริมาตร 20 mL และทำการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 mm

นำส่วนใสที่ได้จากข้อ 5.1 หยดลงไป 80 ไมโครลิตร บนอาหาร TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสเพื่อดูความสามารถในการยับยั้งโดยใช้ vernier caliper หน่วยการวัดเป็น mm (Schillinger and Lucke., 1989)

6. การเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ (Lee *et al*., 2011)

ทำการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยการเปรียบเทียบลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA มาใช้ในการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกได้ถึงในระดับสปีชีส์ โดยเลือกไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งส่งไปยัง Macrogen Service Center Advancing through Genomics ประเทศเกาหลี เพื่อหาลำดับเบสของ DNA (DNA sequence) จากนั้นนำข้อมูลลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูล GenBank ในเว็บไซต์ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST ซึ่งทำให้สามารถทราบชนิดของแบคทีเรียแลคติกได้

7. การศึกษาสมบัติของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

7.1. ทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (Chahad *et al*, 2012)

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาวิเคราะห์โดย agar diffusion method โดยใช้ยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด ซึ่งเป็นตัวแทนของยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการรักษาคน ได้แก่ penicillin G (10 μg) ceftriaxone (30 μg) chloramphenicol (30 μg) tetracyclin (30 μg) vancomycin (30 μg) ampicillin (10 μg) gentamicin (10 μg) erythromycin (15 μg) ทำการ swab แบคทีเรียแลคติกที่ปรับความขุ่นได้ 0.5 McFarland ลงบนอาหาร Muller-Hinton agar plates ปริมาตร 25 mL วางแผ่นยาดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสและแสดงผลการทดสอบโดยใช้สัญลักษณ์ ดังนี้ ความต้านทาน (Resistance; R) ความไวปานกลาง (Moderate Susceptibility; MS) และความไวต่อสารปฏิชีวนะ (Susceptibility; S) (Clinical and Laboratory Standard Institute, 2012) นำผลการทดลองที่ได้เทียบกับ *Lactobacillus* species (Mathur and Singh, 2005)

7.2. ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Argyri *et al.*, 2013)

นำแบคทีเรียแลคติกมา streak บน Columbia Blood Agar (Oxoid) ที่เติมเลือดมนุษย์ 5% (v/v) นำจานอาหารไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส บันทึกผลหลังจากบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดูการเกิดวงใสบนอาหาร สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอาหาร แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่ม Beta haemolysis มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ เกิดวงใสรอบโคโลนี กลุ่ม Alpha haemolysis เกิดวงใสสีเขียวรอบโคโลนี และกลุ่ม gamma haemolysis โคโลนีของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง

7.3. ทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีน (Tapingkae *et al.*, 2010)

เป็นการทดสอบการสร้างสารพวก biogenic amines โดยวิธี high-performance liquid chromatography(HPLC) โดยจะใช้ histamine dihydrochloride และ tyramine hydrochlorideเป็น biogenic amine standards ทำการสกัดสารไบโอเจนิกเอมีนจาก supernatant ในอาหาร Improved medium (Bover-Cid and Holzapfel, 1999) และทำอนุพันธ์สารไบโอเจนิกเอมีนที่สกัดได้ด้วย dansyl chloride เพื่อวิเคราะห์ปริมาณไบโอเจนิกเอมีนโดยใช้เครื่อง HPLC 1200 (Agilent) ใช้คอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB C_{18} column (ภาคผนวก ช)

8. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง (ดัดแปลงจากวิธี Tahiri, *et al.*, 2009)

8.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตสารยับยั้ง

นำ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 มาเลี้ยงในอาหาร BSM broth บ่มอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญ ตามข้อ 4.4 แล้วถ่ายโอนเชื้อปริมาตร 4 mL ลงในอาหารเหลว ได้แก่ Bacteriocin screening medium (BSM) All Purpose Tween (APT) M17 medium + Glocose 0.5 g/L (M17+G) และ de Man Rogasa and sharpe broth ที่ปรับพีเอชเท่ากับ 7 (MRS-7m) ปริมาตร 400 mL บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบที่เวลา 0 6 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญโดยการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm แล้วทำการเตรียม culture supernatant ดังข้อ 5.1 เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี broth microdilution assay (ดัดแปลงจากวิธี จุไรรัตน์, 2550)

โดยนำ culture supernatant ทำการเจือจางแบบ 2 fold dilution ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น แล้วทำการผสมแต่ละความเข้มข้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยการดูด culture supernatant

125 µl ผสมกับ TSB ปริมาตร 125 µl ความเข้มข้นละ 3 หลุม และเติม 50 µl suspension ของ *L. monocytogenes* โดยให้มีเชื้อประมาณ 10^4 CFU/หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่ 655 nm ด้วย microplate reader โดยรายงานในหน่วย Arbitary Unit ต่อมิลลิลิตร (Au/mL) ซึ่งคำนวณจากการนำค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ไม่พบการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 (Dilution factor) คูณกับ 1,000 ไมโครลิตร หารด้วยปริมาตรส่วนใสที่เติมลงไปทดสอบ

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (Au/mL)} = \frac{\text{1,000 ไมโครลิตร} \times \text{Dilution factor}}{\text{125ไมโครลิตร}}$$

8.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง

นำ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 มาเลี้ยงในอาหาร BSM broth บ่มอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แล้วถ่ายโอนเชื้อปริมาตร 4 mL ลงในอาหารเหลว BSM APT M17+G และ MRS-7m ปริมาตร 400 mL บ่มที่อุณหภูมิ 15 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบที่เวลา 0 6 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญโดยการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm แล้วทำการเตรียม culture supernatant ตามข้อ 5.1 เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี broth microdilution assay ตามข้อ 8.1 กิจกรรมของแบคเทอริโอซินมีหน่วยเป็น (Au/mL)

8.3 พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง

นำ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 เลี้ยงในอาหาร M17+G บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด (จากการทดลอง 8.2) ถ่ายโอนเชื้อ 4 mL ลงในอาหาร M17+G ปริมาตร 400 mL ซึ่งมีการปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5.5 6.0 6.5และ 7.0 แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบที่เวลา 0 6 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง ศึกษาการเจริญโดยการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm แล้วทำการเตรียม culture supernatant ตามข้อ 5.1 เพื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี broth microdilution assay ตามข้อ 8.1 กิจกรรมของแบคเทอริโอซินมีหน่วยเป็น (Au/mL)

9. การศึกษาสมบัติของสารยับยั้ง

นำ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 มาเพาะเลี้ยงใน M17+G ปริมาตร 400 mL ที่มีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ใน anaerobic jar เป็นเวลา 30 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกเอาส่วนใส (culture supernatant) มาทำให้เข้มข้นขึ้น 5 เท่า โดยวิธีการ ultrafiltration นำส่วนใสมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 แล้วนำมาทดสอบสมบัติบางประการในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ดังนี้

9.1. พีเอชต่อความคงตัวของสารยับยั้ง (จุไรรัตน์, 2550)

นำ culture supernatant ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 มาปรับพีเอชให้เท่ากับ 2 3 4 5 6 7 และ 8 โดยปรับพีเอชด้วย 1N NaOH หรือ 1N HCl และส่วนใสที่ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับพีเอชกลับให้เป็น 6.5 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำมากรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี agar well diffusion assay ดังข้อ 5 และวิธี broth microdilution assay (ดังข้อ 8.1) มีหน่วยเป็น (Au/mL)

9.2. ความร้อนต่อความคงตัวของสารยับยั้ง (Chahad *et al.*, 2012)

นำ culture supernatant ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ที่ปรับพีเอช 6.5 มาผ่านความร้อน 63 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลคติกที่ไม่ผ่านความร้อนเป็นชุดควบคุม ทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำมากรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี agar well diffusion assay ดังข้อ 5 และวิธี broth microdilution assay (ดังข้อ 8.1) มีหน่วยเป็น (Au/mL)

9.3. ชนิดของเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารยับยั้ง (Nanasombat *et al.*, 2012)

นำ culture supernatant ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ที่ปรับพีเอช 6.5 มาผสมกับเอนไซม์ proteinase K protease trypsin α-chymotrypsin lipaseและ α-amylase ปรับความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 1 mg/mL โดยนำ culture supernatant ที่ผสมเอนไซม์

บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำมากรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี agar well diffusion assay ดังข้อ 5 และวิธี broth microdilution assay (ดังข้อ 8.1) มีหน่วยเป็น (Au/mL) เปรียบเทียบกับ culture supernatant ที่ไม่ผสมเอนไซม์ เป็นชุดควบคุม

10. การหาค่า Minimal Inhibitory Concentration (MIC) ของสารยับยั้ง

10.1 การทดสอบหาค่า MIC ต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 (ดัดแปลงจาก จุไรรัตน์, 2550)

โดยนำ culture supernatant ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ทำการเจือจางแบบ 2 fold dilution ทั้งหมด 10 ความเข้มข้น แล้วทำการผสมแต่ละความเข้มข้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยการดูด culture supernatant 125 µl ผสมกับ TSB ปริมาตร 125 µl ความเข้มข้นละ 3 หลุม และเติม 50 µl suspension ของ *L. monocytogenes* โดยให้มีเชื้อประมาณ 10^4 CFU/หลุม นำไปบ่ม 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดความขุ่นที่ 655 nm ด้วย microplate reader แล้วทำการอ่านค่า MIC ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นต่ำสุดของ culture supernatant ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยรายงานในหน่วย Arbitary Unit ต่อมิลลิลิตร (Au/mL)

10.2. การทดสอบค่า Minimal Bactericidal Concentration (MBC)

จากการหาค่าความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทำให้เชื้อไม่เจริญในอาหารเหลวนั้น สามารถนำมาหาค่า MBC ได้ โดยนำหลุมที่ทำการทดสอบจากการหาค่า MIC ที่ไม่มีการเจริญไป spot บนอาหาร Trypticase soy agar (TSA) ถ้าความเข้มข้นของ culture supernatant ที่สามารถฆ่าเชื้อได้ก็จะไม่พบการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ แต่ถ้าเชื้อไม่ตายก็จะพบการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

11. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน (ดัดแปลงจาก ศิรินาถ, 2540)

นำแบคเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 มาเพาะเลี้ยงใน M17+G ที่พีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้

แบคทีเรียอยู่ในช่วง log phase ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFaland และเจือจางแบบ 10 fold dilution เพื่อให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเหลือประมาณ 10^6 CFU/mL แล้วเติม *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFaland และเจือจางแบบ 10 fold dilution ให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^4 CFU/mL เพาะเลี้ยงร่วมกันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการนับจำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่รอดชีวิตบนอาหารแข็ง TSA agar และนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกบนอาหาร MRS agar ย้อมสีแกรมดูรูปร่าง เปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งทำการทดลองโดยการเลี้ยง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ในอาหารเหลว TSB ที่ไม่มี *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 และคำนวณร้อยละการยับยั้งดังสูตร

$$\text{ร้อยละการยับยั้ง} = \frac{100 \times (\text{CFU/mL in control}) - (\text{CFU/mL in associative culture})}{(\text{CFU/mL in control})}$$

12. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกและสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ (Wan Norhana *et al.*, 2012)

12.1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

นำ *L. monocytogenes* ATCC 15313 มาเลี้ยงใน Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 10 mL บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไป centrifuge 8,000×g 15 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บเซลล์ นำตัวเซลล์มาละลายใน 0.85% Normal saline solution (NSS) ที่ปราศจากเชื้อ ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFaland จะทำให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^8 CFU/mL และเจือจางแบบ 10 fold dilution ให้เหลือเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/mL

12.2. การเตรียมเซลล์แบคทีเรียแลคติก และสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน

นำแบคเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว M17+G ปริมาตร 400 mL ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บเซลล์ นำตัวเซลล์มาละลายในน้ำ 0.85% Normal saline solution (NSS) ที่ปราศจากเชื้อ ปรับความเข้มข้นเซลล์ให้เท่ากับ 0.5 McFaland ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อ 10^8 log CFU/mL สำหรับส่วนใส (culture supernatant) ที่แยกได้จากการหมุนเหวี่ยง จะนำมาทำให้เข้มข้น 5 เท่า โดยวิธี ultrafiltration และปรับให้ได้พีเอช 6.5 ทำให้ปราศจากเชื้อโดยนำมากรองผ่านแผ่นกรองที่มีขนาดรู 0.22 ไมโครเมตร

12.3. การเตรียมตัวอย่างกุ้งเพื่อใช้ในการทดสอบ

คัดเลือกกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ที่มีขนาดเท่า ๆกัน น้ำหนักประมาณ 20 กรัมต่อตัว ใช้กุ้งแต่ละกลุ่ม 500 กรัม ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ตัดหัว ปอกเปลือก และล้างด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นนำกุ้งมาผ่าน UV ในตู้ biosafety cabinet ด้านละ15 นาที ทำทั้ง 2 ด้านของกุ้ง เพื่อลดจำนวนเชื้อประจำถิ่นที่ติดมากับกุ้ง และแบ่งกลุ่มของกุ้งเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่1 inoculate *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 กับ *L. monocytogenes* ATCC 15313
กลุ่มที่ 2 inoculate culturesupernatant กับ *L. monocytogenes* ATCC 15313
กลุ่มที่ 3 inoculateเฉพาะ *L. monocytogenes* ATCC 15313
กลุ่มที่ 4 uninoculate ที่ผ่าน UV เป็นชุดควบคุม

12.4. การinoculateเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313ในกุ้ง

นำกุ้งกลุ่มที่ 1 2 และ 3 แช่ในสารละลายเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เตรียมตามข้อ 12.1 เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งจะทำให้ *L. monocytogenes* ATCC 15313 เกาะติดบนตัวกุ้งประมาณ 10^3 CFU/g จากนั้นเทสารละลายส่วนเกินออกไป แล้วนำกุ้งในกลุ่มที่ 1 มาหยดกับ สารละลายของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ปริมาตร 3 mL ต่อกุ้ง 1 ตัว ซึ่งจะทำให้แบคทีเรียแลคติกติดบนตัวกุ้งประมาณ 10^4 CFU/g และนำกุ้งกลุ่มที่ 2 มาหยดด้วย culture supernatant บนผิวกุ้งปริมาตร 3 mL ต่อกุ้ง 1 ตัว (เตรียมตามข้อ 12.2) เก็บในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ ถุงละ 25 กรัม

12.6. การเก็บตัวอย่างในตู้เย็น

นำตัวอย่างกุ้งทั้ง 4 กลุ่มไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน นำกุ้งมาวิเคราะห์จำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 *C. maltaromaticum* L-SH-L

25104 และเชื้อแบคทีเรียอื่น ๆทั้งหมด และพีเอชหลังจากการเก็บในตู้เย็น ที่เวลา 0 3 และ7 วัน

12.7. การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรีย

นำตัวอย่างของกุ้งทั้ง 4 กลุ่ม ถุงละ 25 กรัม มาเติม 225 mL 0.85% NSS ปราศจากเชื้อ ก่อน stomacher หลังจากนั้นทำ serial dilution ตั้งแต่ที่ระดับความเจือจาง 10^{-1} - 10^{-6} ด้วย NSS และดูดมา 0.1 mL ของแต่ละระดับความเจือจาง เพื่อ spread plate บนอาหาร TSA MRS และ PCA บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 2 ซ้ำ เพื่อหาจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 และแบคทีเรียทั้งหมด ตามลำดับ

12.8. การวัดพีเอช

นำตัวอย่างกุ้งแต่ละกลุ่มใน stomacher bag มาหาค่าพีเอช โดยใช้เครื่องวัดพีเอช

12.9. สถิติ

นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดวิเคราะห์โดยใช้ตารางค่าสถิติ One Way ANOVA โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกและนับจำนวนแบคทีเรียสร้างกรดจากอาหารทะเลแช่เย็น

จากการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารทะเล ได้แก่ กุ้ง หอย ปู หมึก และปลา ชนิดต่างๆ จำนวน 4 6 2 5 และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง บนอาหาร BSM ที่เติม 0.004% Bromcresol purple โดยสุ่มเลือกโคโลนีสีเหลือง รูปกระสวย ที่มีขนาดและรูปร่างแตกต่างกัน พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียสร้างกรดได้ทั้งหมด 266 ไอโซเลท โดยมาจากการเจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จำนวน 126 ไอโซเลท และมาจากการเจริญที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จำนวน 140 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1)

จากการนับจำนวนแบคทีเรียสร้างกรดในอาหารทะเลแช่เย็นที่เลี้ยงบนอาหาร BSM agar พบว่า แบคทีเรียสร้างกรดอยู่ในช่วงระหว่าง $3.0x10^5$ ถึง $1.4x10^8$ CFU/g จากการทดลองพบว่าจำนวนแบคทีเรียสร้างกรดที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จะอยู่ในช่วง $3.4x10^5$ ถึง $2.6x10^7$ CFU/g และจำนวนแบคทีเรียสร้างกรดที่บ่มอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จะอยู่ในช่วง $3.0x10^5$ ถึง $1.38x10^8$ CFU/g (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 จำนวนแบคทีเรียสร้างกรดในอาหารทะเลแช่เย็นที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง BSM ที่เติม 0.004% Bromcresol purple บ่มที่ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ

อาหารทะเล	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียสร้างกรด (CFU/g) บ่มที่อุณหภูมิ (°C)		จำนวน(ไอโซเลท) บ่มที่อุณหภูมิ (°C)	
		8	35	8	35
กุ้ง	4	$3.4x10^5$-$8.6x10^6$	$3.4x10^5$-$1.8x10^7$	30	10
หอย	6	$3.0x10^5$-$1.3x10^7$	$5.5x10^5$-$1.6x10^7$	30	30
ปู	2	$2.6x10^6$-$1.4x10^8$	$3.6x10^6$-$2.6x10^7$	10	16
หมึก	5	$8.1x10^6$-$3.5x10^5$	$3.4x10^6$-$4.4x10^5$	30	20
ปลา	8	$7.3x10^6$-$9.3x10^6$	$3.4x10^5$-$4.3x10^6$	40	50
				140	126
รวม	25	$3.0x10^5$-$1.4x10^8$	$3.4x10^5$-$2.6x10^7$	266	

2. การตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้

จากแบคทีเรียสร้างกรดจำนวน 226 ไอโซเลทที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น เมื่อนำมาทดสอบการสร้างเอนไซม์ catalase พบว่า ไม่มีการสร้างเอนไซม์ จำนวน 164 ไอโซเลท จึงนำไอโซเลทดังกล่าวมาทำการย้อมแกรม พบว่า ติดสีแกรมบวก จำนวน 159 ไอโซเลท โดยมีรูปร่าง กลม 61 ไอโซเลท แท่งสั้น 68 ไอโซเลท และแท่งยาว 30 ไอโซเลท แต่ละไอโซเลทมีการเรียงตัวที่แตกต่างกัน แสดงในตารางภาคผนวก ค.

3. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

นำแบคทีเรียแลคติกจำนวน 159 ไอโซเลท มาคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *E. coli* PSU 95 *S. aureus* ATCC 29213 *L. monocytogenes* ATCC 15313 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *V. parahaemolyticus* PSU 1681 และ *S.* Typhi โดยวิธี agar spot assay

ผลการยับยั้งของสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกแสดงให้เห็นว่า มีแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้ดี ได้แก่ ไอโซเลท FSK-L 5101 POL-20108 HYL-20104 L-SQ-L 25104 และ L-SH-L 25104 โดยพบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ได้ดี (ดังภาพที่3.1) ยับยั้งได้ปานกลางใน *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Salmonella* Typhi ยับยั้งได้น้อยใน *V. parahaemolyticus* PSU 1681 และไม่มีไอโซเลทใดที่สามารถยับยั้ง *E. coli* PSU 95 และ *S. aureus* ATCC 29213 ได้ (ตารางที่ 3.2)

ภาพที่3.1 วงใสการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของไอโซเลท L-SQ-L 25104 และ L-SH-L 25104 ทดสอบโดยวิธี agar spot assay

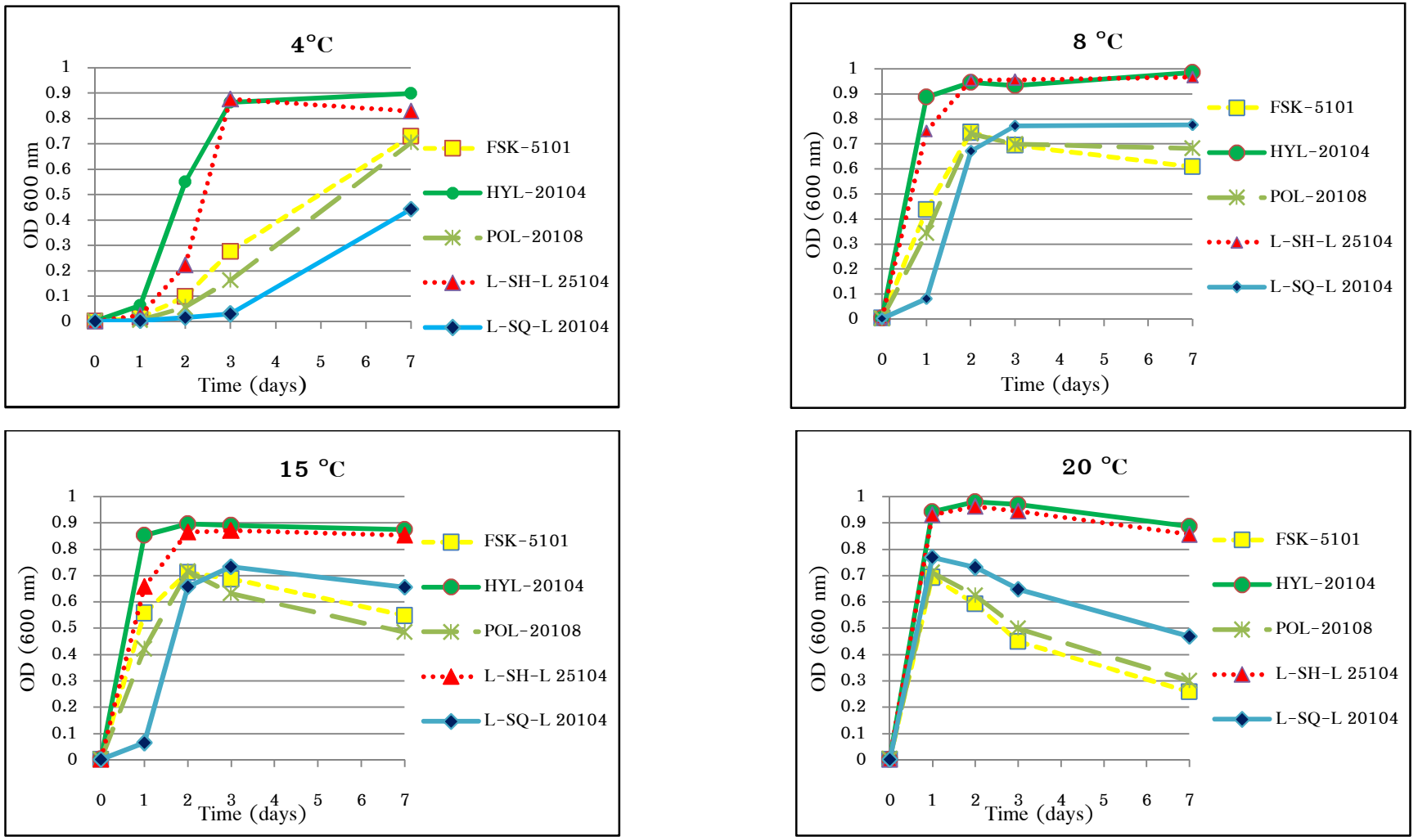
ตารางที่ 3.2 ผลการยับยั้งต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *V. parahaemolyticus* PSU 1681 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay

อาหารทะเล	ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)				
		E. faecalis ATCC 29212	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S.* Typhi	*L.monocytogenes* ATCC 15313	*V.parahaemolyticus* PSU1681
ปลา	FSK-L 5101	11.250±0.500	8.450±0.450	8.050±0.650	14.250±0.550	6.125±0.225
ปู	POL-20108	11.025±0.225	9.075±0.025	8.400±1.400	13.750±0.100	5.950±1.200
หอย	HYL-20104	12.250±0.050	10.950±0.450	10.925±0.225	14.125±0.725	5.075±0.675
หมึก	L-SQ-L 25104	11.400±0.100	9.875±0.075	11.950±1.250	14.625±0.025	2.825±0.125
กุ้ง	L-SH-L 25104	10.600±0.200	10.075±0.675	8.925±0.925	14.225±0.025	3.500±0.750

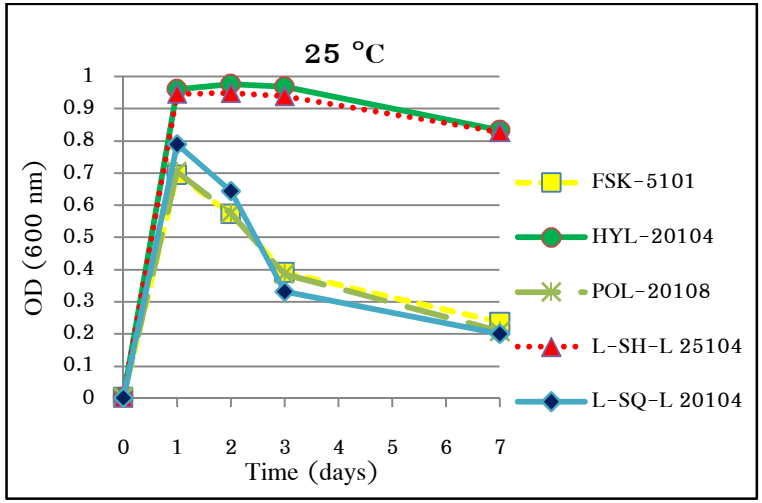
การทดสอบ Psychrotrophic lactic acid bacteria

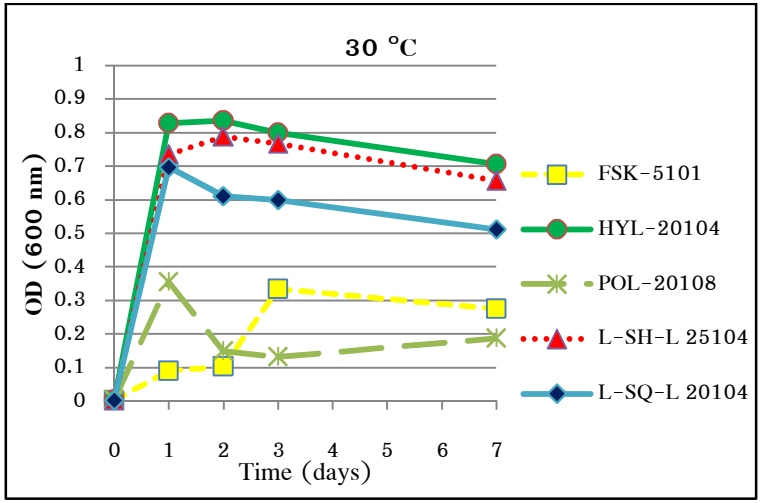
นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 5 ไอโซเลท ได้แก่ FSK-L 5101 POL-20108 HYL-20104 L-SQ-L 25104 และ L-SH-L 25104 ไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM broth และบ่มที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ 1 2 3 และ7 วัน มาวัดความขุ่นเพื่อดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm พบว่า ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำที่ 4 ถึง 35 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3.2) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวมีสมบัติเป็น psychrotrophic lactic acid bacteria กล่าวคือ เป็นแบคทีเรียที่ทนที่อุณหภูมิต่ำ แต่สามารถเจริญได้ดีที่ 20-30 องศาเซลเซียส

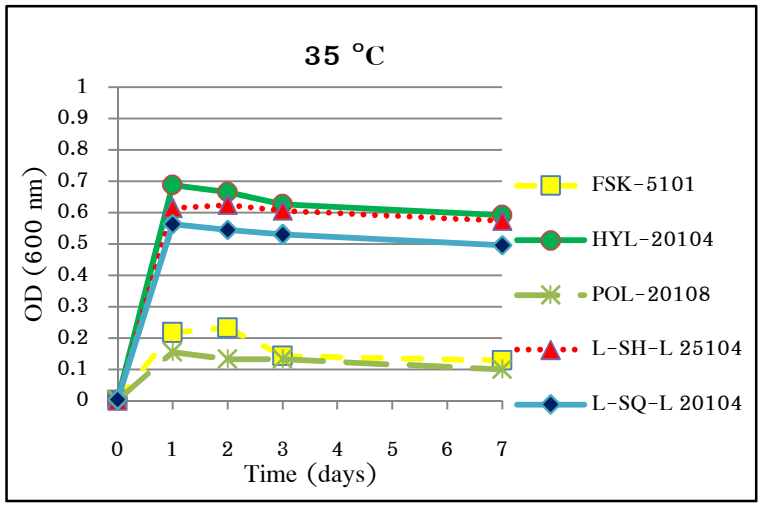
ผลการทดลองพบว่า ไอโซเลท HYL-20104 และ L-SH-L 25104 สามารถเจริญได้ในช่วงกว้างและเจริญได้เร็วกว่าไอโซเลทอื่น ๆ สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ พบว่าจะอยู่ในช่วง 20-25 องศาเซลเซียส และทุกไอโซเลทจะเจริญได้ลดลงในช่วงอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3.2 และภาคผนวก ง.) ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 3.2 การเจริญของแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ในอาหาร BSM broth เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 °C เป็นเวลา 7 วัน







ภาพที่ 3.2 การเจริญของแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ในอาหาร BSM broth เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 °C เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

4. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี agar well diffusion

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลท ได้แก่ FSK-L 5101 POL-20108 HYL-20104 L-SQ-L 25104 และ L-SH-L 25104 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน anaerobic jar เพื่อป้องกันการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นำส่วนใส (culture supernatant) มาทำให้เข้มข้น 5 เท่า โดยวิธี ultrafiltration และปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 เพื่อกำจัดการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์ แล้วทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *L. monocytogenes* ATCC 15313 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ*V. parahaemolyticus* PSU 1681 โดยวิธี agar well diffusion พบว่า ไอโซเลท L-SH-L 25104 และ L-SQ-L 25104 สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 (ตารางที่ 3.3 และภาพที่ 3.3) ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลท นี้ไปใช้ในการศึกษาในการทดลองต่อไป

ภาพที่ 3.3 ความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท L-SH-L 25104 L-SQ-L 25104 และ POL-20108 โดยวิธี agar well diffusion

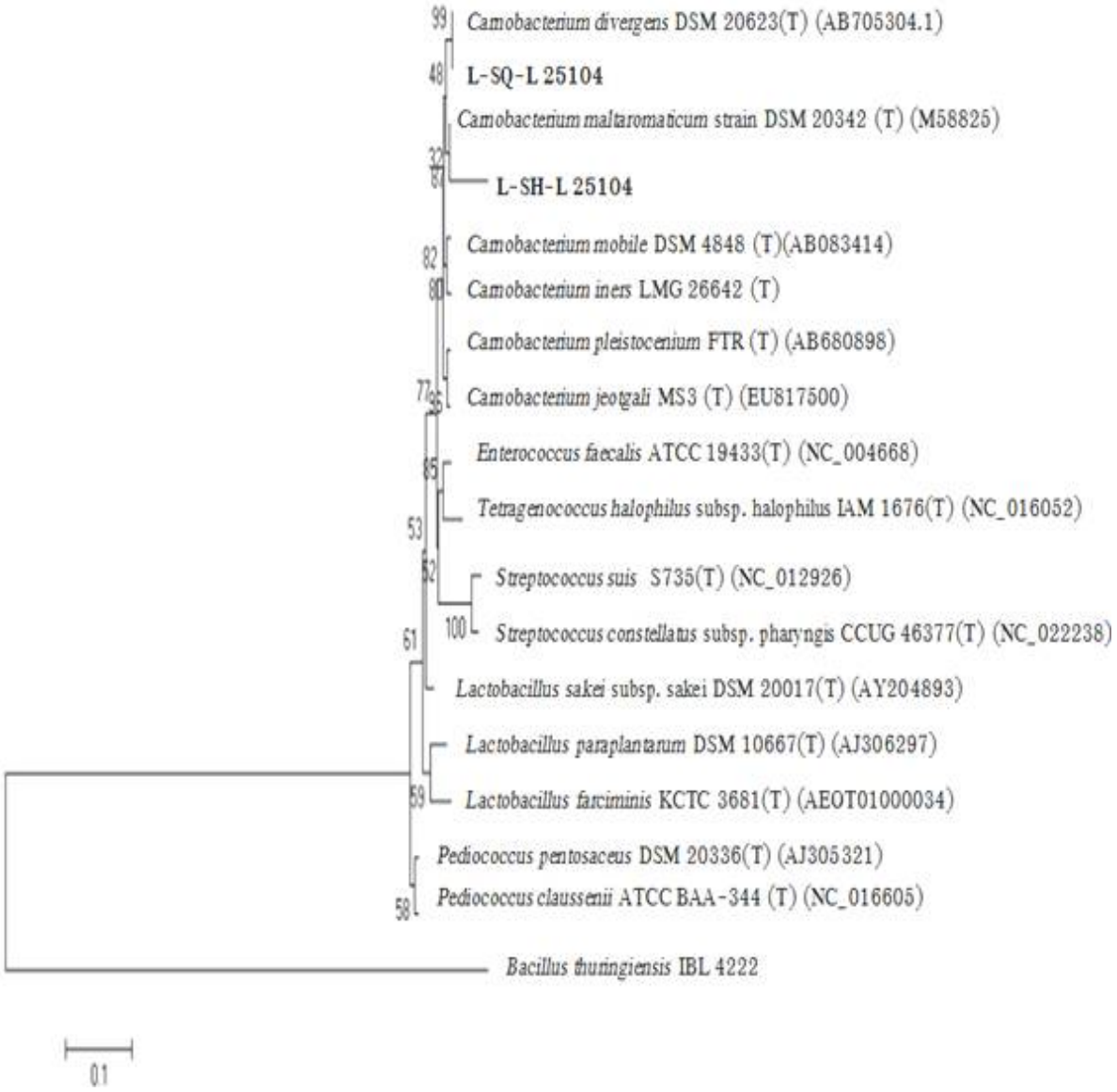
ตารางที่ 3.3 ผลการยับยั้งของสารที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar well diffusion method ต่อเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 และ *S.* Typhi

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (mm)			
	E. faecalis ATCC 29212	*P. aeruginosa* ATCC 27853	*S.* Typhi	*L. monocytogenes* ATCC 15313
FSK- 5101	-	-	-	12.38±0.13
HYL-20104	-	-	-	10.75±0.50
L-SQ-L 25104	12.00±0.50	14.25±0.15	12.80±0.30	14.60±0.40
L-SH-L 25104	10.50±0.00	11.78±0.48	12.50±0.50	13.25±0.75

หมายเหตุ: (-) คือ ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง

5. การเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียทั้งสองไอโซเลทมาเทียบเคียงสายพันธุ์ด้วยวิธีทางพันธุศาสตร์โมเลกุล ด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis พบว่า L-SH-L 25104 ที่แยกได้จากกุ้ง มีความใกล้เคียงกับ *Carnobacterium maltaromaticum* (99 % similar to *Carnobacterium maltaromaticum*) และไอโซเลท L-SQ-L 25104 ที่แยกได้จากหมึก มีความใกล้เคียงกับ *Carnobacterium divergens* (99% similar to *Carnobacterium divergens*) แสดงดังภาพที่ 3.4 และภาคผนวก จ.2



ภาพที่ 3.4 Phylogenetic tree ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท L-SH-L 25104 และ L-SQ-L 25104

6. การศึกษาสมบัติของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

6.1 การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

เมื่อทำการ swab แบคทีเรียแลคติกที่ปรับความขุ่นได้ 0.5 McFarland ลงบนจานอาหาร Muller-Hinton agar (MHA) ปริมาตร 25 mL วางแผ่นยา chloramphenicol (30 µg) penicillin G (10 µg) ceftriaxone (30 µg) tetracyclin (30 µg) vancomycin (30 µg) ampicillin (10 µg) gentamicin (10 µg) erythromycin (15 µg) หลังจากบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง วัดเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสและจัดเป็นการดื้อยา (Resistance; R) ความไวต่อยาปานกลาง (Intermediate susceptible; I) และความไวต่อยา (Susceptible) อ้างอิงตาม Clinical and Laboratory Standard Institute (2012) นำผลการทดลองที่ได้เทียบกับเปอร์เซ็นการดื้อยาในกลุ่ม *Lactobacillus* species (Mathur and Singh, 2005) ดังแสดงในตารางที่ 3.4 และภาคผนวก ฉ

ตารางที่ 3.4 ผลการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ		การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย		
กลุ่ม	ชื่อ	*Lactobacillus* species (Resistance)	*Carnobacterium divergens* L-SQ-L 25104	*Carnobacterium maltaromaticum* L-SH-L 25104
1. ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ของแบคทีเรีย				
Penicillin	penicillin G	64.0%	R	R
	ampicillin	47.5%	R	R
Cephalosporins	ceftriazone	80.0%	R	R
Glycopeptides	vancomycin	65.0%	S	S

ตารางที่ 3.4 ผลการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (ต่อ)

ยาปฏิชีวนะ		ความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรีย		
กลุ่ม	ชื่อ	*Lactobacillus* species (Resistance)	*Carnobacterium divergens* L-SQ-L 25104	*Carnobacterium maltaromaticum* L-SH-L 25104
2. ยับยั้งการสร้างโปรตีน				
Aminoglycosides	gentamicin	79.0%	R	I
Tetracyclines	tetracycline	42.5%	R	S
Single antibiotics	chloramphenical	11.0%	S	S
Macrolides	erythromycin	17.5%	S	S

หมายเหตุ R = Resistance
I = Intermediate susceptible
S = Susceptible

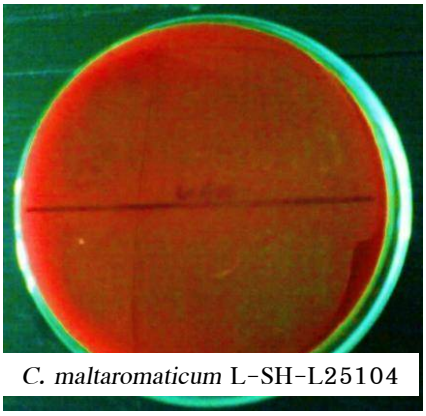
การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มยับยั้งการสร้างผนังเซลล์แบคทีเรียพบว่าทั้ง 2 ไอโซ-เลทดื้อต่อ penicillin G ampicillin และ ceftriazone แต่ไวต่อยา vancomycin

การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะกลุ่มยับยั้งการสร้างโปรตีน พบว่า *Carnobacterium divergens* L-SQ-L 25104 ดื้อต่อ gentamicin และ tetracycline แต่ไวต่อยา chloramphenical และ erythromycin สำหรับ *Carnobacterium maltaromaticum* L-SH-L 25104 ไวต่อยา tetracycline chloramphenical และ erythromycin ไวต่อยาระดับปานกลางกับยา gentamicin

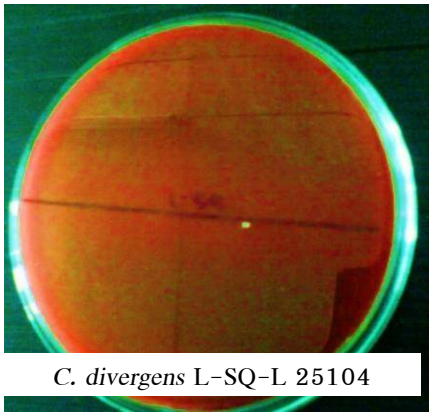
6.2 ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

เมื่อนำ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 และ *C. divergens* L-SQ-L 25104 มา streak ลงบนอาหาร Columbia blood agar ที่เติมเลือดมนุษย์ 5% (v/v) บ่มภายใต้สภาวะ anaerobic ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

พบว่าโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ชนิด ไม่สร้างโปรตีน hemolysin ที่ไปย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทำให้ไม่เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม gamma haemolysis ดังแสดงในภาพที่ 3.5



C. maltaromaticum L-SH-L25104

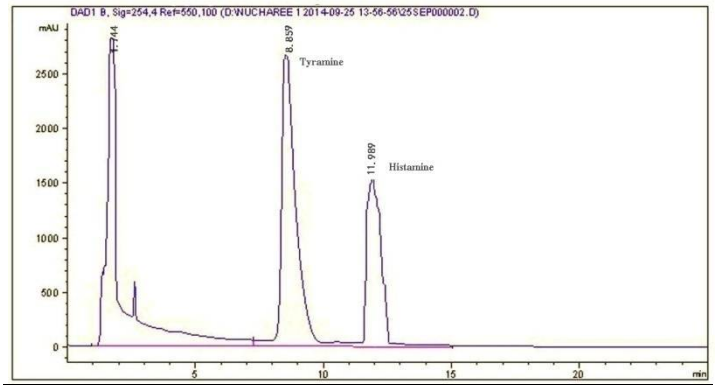


C. divergens L-SQ-L 25104

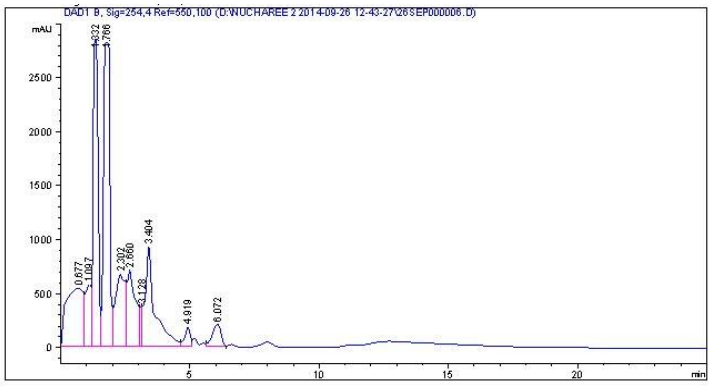
ภาพที่ 3.5 ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงโดย *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 และ *C. divergens* L-SQ-L 25104 บนอาหาร Columbia blood agar ที่เติมเลือดมนุษย์ 5% (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

6.3 ทดสอบการสร้างไบโอจีนิกเอมีน

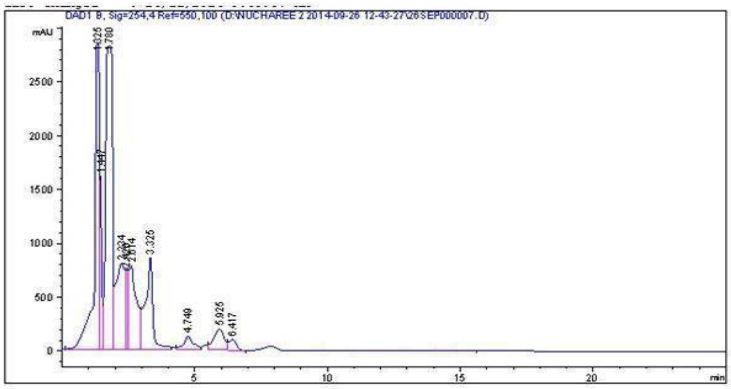
การทดสอบการสร้างสารพวก biogenic amines โดยวิธี high-performance liquid chromatography (HPLC) พบว่าทั้ง *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 และ *C. divergens* L-SQ-L 25104 ไม่มีการสร้าง tyramine และ histamine (ภาพที่ 3.7 และ 3.8) เมื่อเทียบกับ standard (ภาพที่ 3.6)



ภาพที่ 3.6 HPLC chromatogram ของ standard tyramine และ histamine



ภาพที่ 3.7 HPLC chromatogram ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104



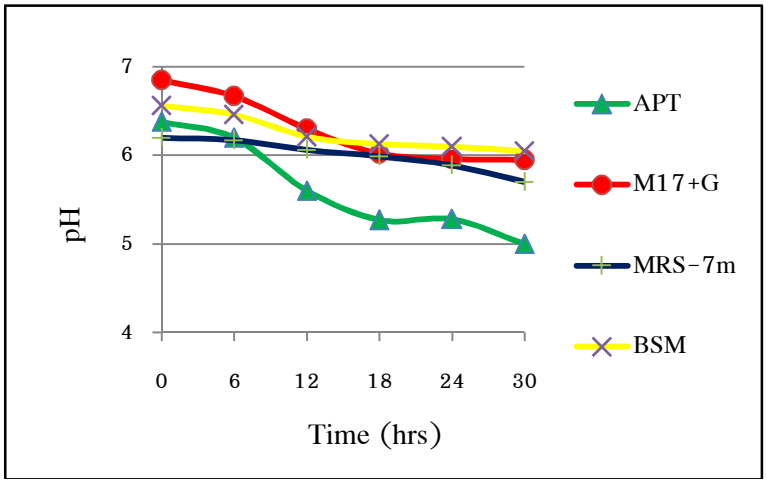
ภาพที่ 3.8 HPLC chromatogram ของ *C. divergens* L-SQ-L 25104

7. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง

7.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง

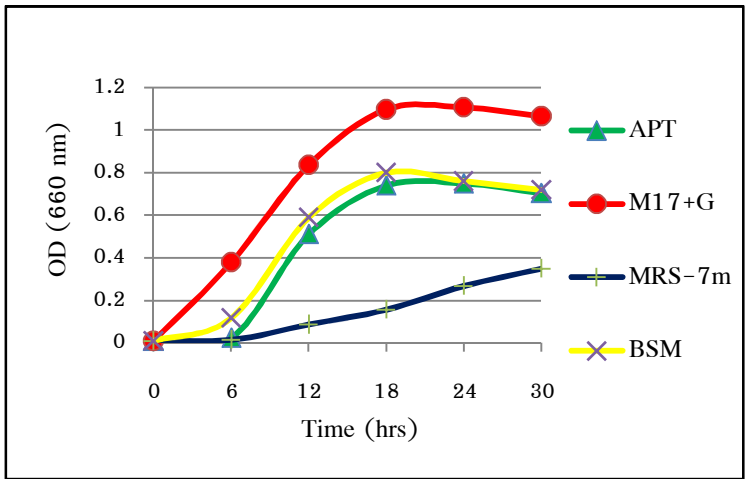
ในการทดลองนี้ได้คัดเลือก *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่ยังมีการศึกษากันน้อย จึงเลือกมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง ซึ่งได้นำไอโซเลทดังกล่าวเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BSM APT M17+G MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ศึกษาการเจริญโดยการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm วัดพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช และทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี broth microdilution assay ที่เวลา 0 6 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง

พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ในอาหารชนิดต่าง ๆ เมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมง พีเอชของอาหารจะค่อย ๆต่ำลง ซึ่งพบว่าพีเอชของอาหารจะอยู่ในช่วง 5-6 โดยอาหารที่มีพีเอชต่ำสุด คือ APT รองลงมาคือ MRS-7m M17+G และ BSM ตามลำดับ (ภาพที่ 3.9)



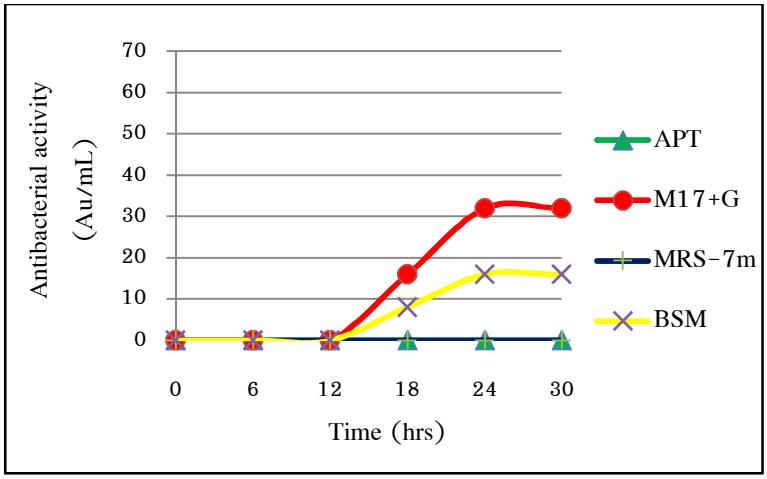
ภาพที่ 3.9 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร BSM APT M17+G และ MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

สำหรับการเจริญของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารต่าง ๆ พบว่า เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร M17+G รองลงมาคือ BSM APT และ MRS-7m ตามลำดับ (ภาพที่ 3.10)



ภาพที่ 3.10 การเจริญของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ในอาหาร BSM APT M17+G และ MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

สำหรับกิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 พบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ในอาหาร M17+G จะมีกิจกรรมการยับยั้งดีที่สุด รองลงมาคือ อาหาร BSM โดยกิจกรรมที่ได้หลังจากเพาะเลี้ยงครบ 30 ชั่วโมง จะเท่ากับ 32 Au/mL และ 16 Au/mL ตามลำดับ (ภาพที่ 3.11)



ภาพที่ 3.11 กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร BSM APT M17+G และ MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

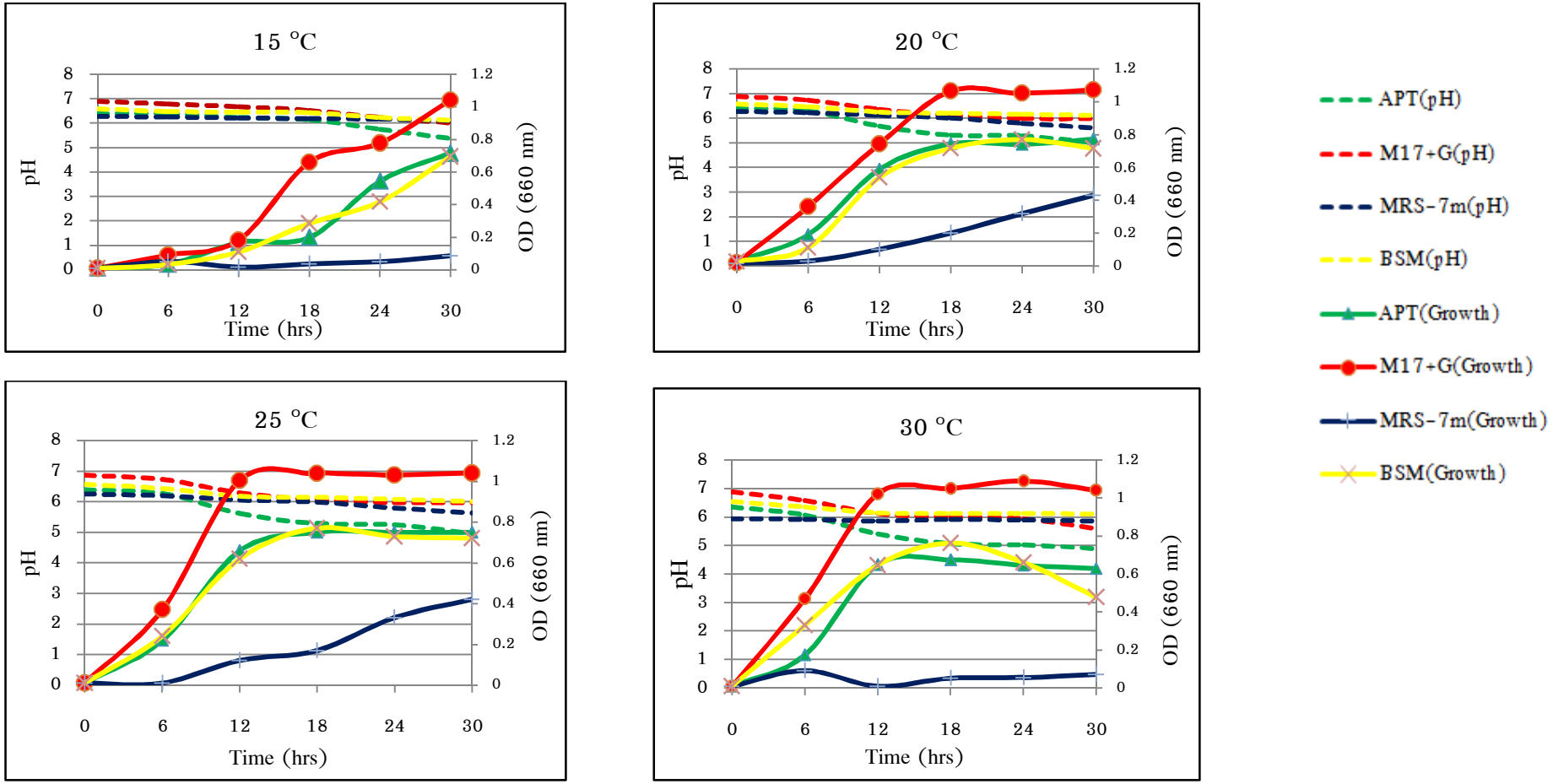
7.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BSM APT M17+G และ MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 15 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส ศึกษาการเจริญโดยการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm วัดค่าพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช และทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี broth microdilution assay เก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบที่เวลา 0 6 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง

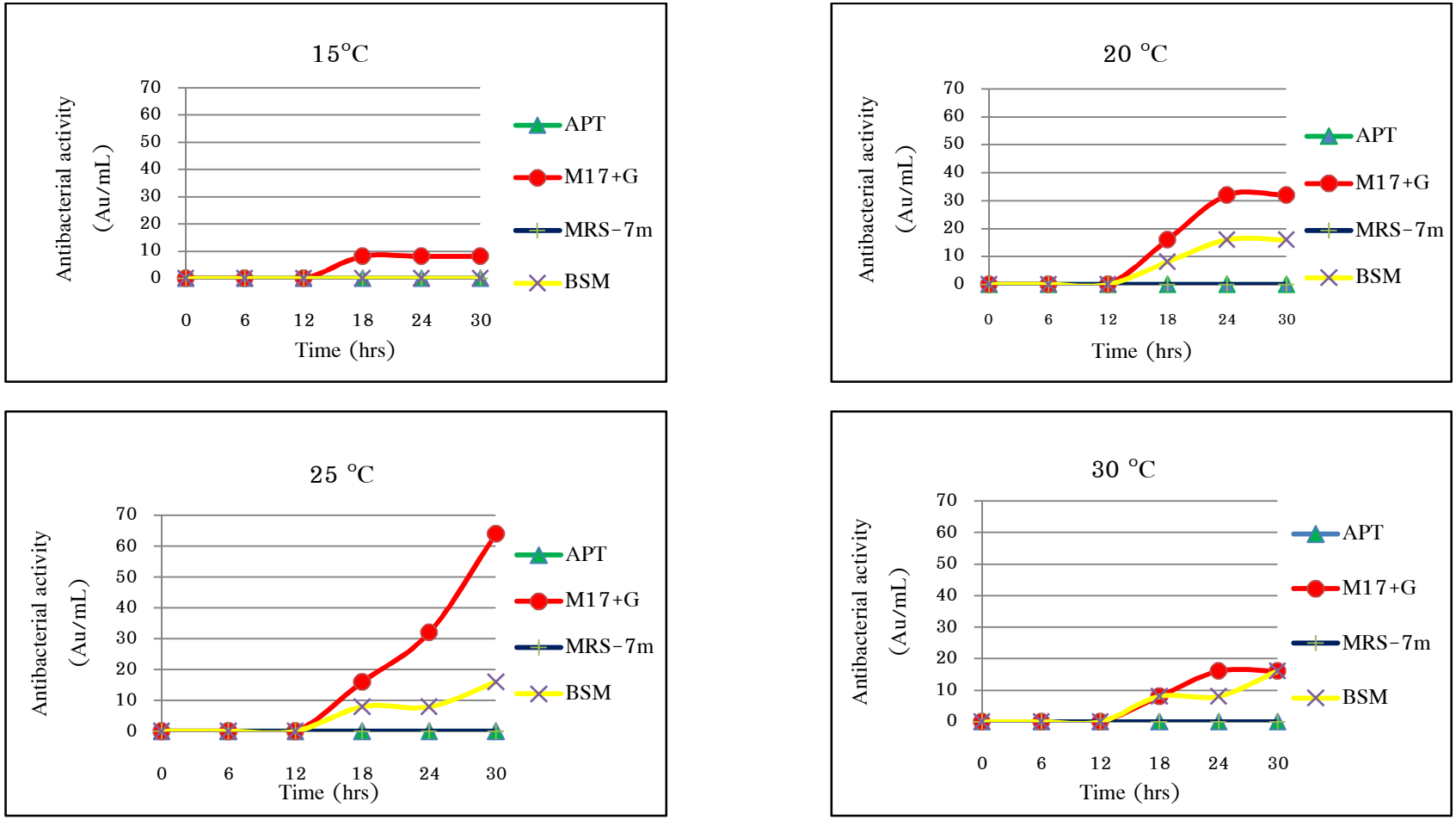
พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ในอาหารชนิดต่าง ๆ เมื่อเวลาผ่านไป 30 ชั่วโมง พีเอชของอาหารจะค่อย ๆต่ำลง ซึ่งพีเอชจะอยู่ในช่วง 4.89-6.13 โดยอาหารที่มีค่าพีเอชต่ำสุด คือ APT รองลงมาคือ MRS-7m M17+G และ BSM ตามลำดับ (ภาพที่ 3.12)

สำหรับการเจริญของ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารต่าง ๆ พบว่า เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร M17+G รองลงมาคือ BSM APT และ MRS-7m ตามลำดับ และอุณหภูมิที่ทำให้ *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 เจริญได้เร็วจะอยู่ในช่วง 20-30 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3.12)

สำหรับกิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 พบว่าเมื่อเพาะเลี้ยง *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ในอาหาร M17+G บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส จะมีกิจกรรมการยับยั้งดีที่สุด คือเท่ากับ 64 Au/mL (ภาพที่ 3.13) รองลงมา คือ อาหาร M17+G บ่มที่อุณหภูมิ 20 30 และ 15 องศาเซลเซียส โดยจะมีกิจกรรมการยับยั้ง คือเท่ากับ 32 16 และ 8 Au/mL ตามลำดับ สำหรับอาหาร BSM พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งน้อยกว่าอาหาร M17+G โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งอยู่ที่ 16 Au/mL เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส สำหรับในอาหาร APT และ MRS-7m ไม่พบกิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ทุกอุณหภูมิ (ภาพที่ 3.13)



ภาพที่ 3.12 การเปลี่ยนแปลงพีเอชและการเจริญของ *Carnobacterium maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BSM APT M17+G และ MRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 15 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

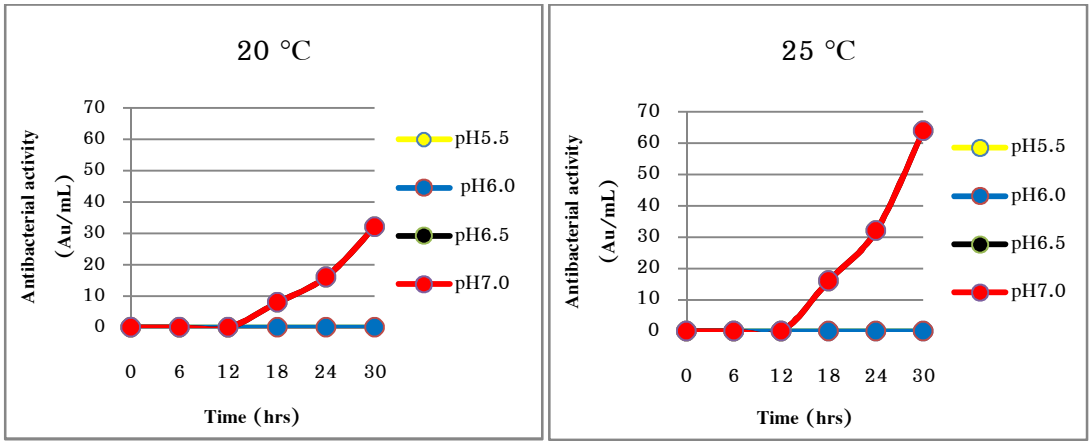


ภาพที่ 3.13 กิจกรรมการยับยั้ง*Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของ *Carnobacterium maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว BSM APT M17+G และMRS-7m บ่มที่อุณหภูมิ 15 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0 6 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง

7.3. พีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง

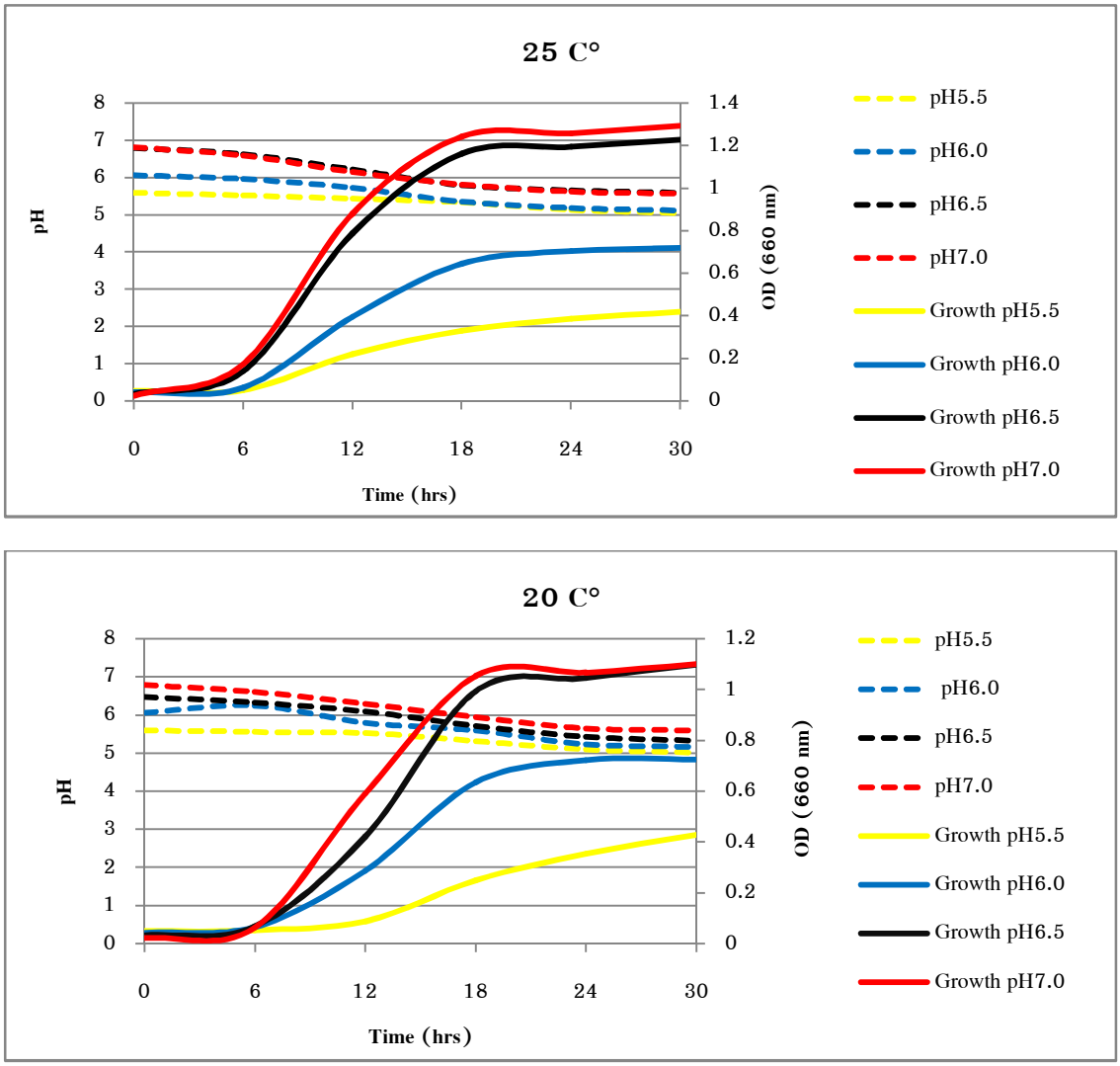
เมื่อนำ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว M17+G ซึ่งเป็นอาหารที่ดีที่สุดสำหรับการผลิตสารยับยั้ง (จากการทดลองที่ 7.2) มาปรับพีเอชในอาหารเริ่มต้นเป็น 5.5 6.0 6.5 และ 7 (พีเอชปกติของอาหาร) บ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เนื่องจากเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารยับยั้ง (จากข้อ 7.2) วัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 nm วัดพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช และทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี broth microdilution assay เก็บตัวอย่างเพื่อทดสอบที่เวลา 0 6 12 18 24 และ 30 ชั่วโมง

จากการทดลองพบว่า เมื่อเพาะเลี้ยง *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ในอาหาร M17+G ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5 และ 7 จะมีกิจกรรมของการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เท่ากัน สำหรับที่พีเอชอื่น ๆไม่พบการผลิตแบคเทอริโอซิน และกิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินจะดีที่สุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส รองลงมา คือ ที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ซึ่งมีค่าสูงสุด เท่ากับ 64 และ 32 Au/mL ตามลำดับ (ภาพที่ 3.14)



ภาพที่ 3.14 กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว M17+G ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 6.0 6.5 และ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

สำหรับพีเอชเริ่มต้นและอุณหภูมิที่เหมาะสมที่มีผลต่อการเจริญของ *Carnobacterium maltaromaticum* L-SH-L 25104 พบว่า ทั้งพีเอช 6.5 และ 7 มีการเจริญที่ใกล้เคียงกันมาก แต่อุณหภูมิที่ทำให้ไอโซเลทนี้เจริญได้ดีที่สุด คือ 25 องศาเซลเซียส (ภาพที่ 3.15)



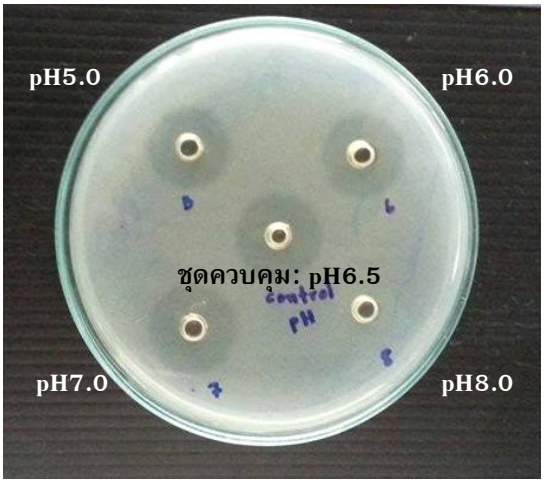
ภาพที่ 3.15 การเปลี่ยนแปลงของพีเอช และการเจริญของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว M17+G ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 6.0 6.5 และ 7 บ่มที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 ชั่วโมง

ดังนั้นจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 พบว่า จะสามารถผลิตสารยับยั้งได้ดีเมื่อ เพาะเลี้ยงในอาหาร M17+G ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5-7 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งมีกิจกรรมของการยับยั้งสูงสุดที่เท่ากับ 64 Au/mL

8. การศึกษาสมบัติของสารยับยั้ง

8.1 ผลของพีเอชต่อกิจกรรมของสารยับยั้ง

เมื่อนำส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ในอาหารเหลว M17+G ทำการปรับพีเอชด้วย 1N NaOH และ 1N HCl ให้มีพีเอชเท่ากับ 2 3 4 5 6 7 และ 8 แล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับค่าพีเอชทั้งหมดให้เป็น 6.5 แล้วนำไปหากิจกรรมของสารยับยั้งที่เหลืออยู่ พบว่า สารยับยั้งที่ผลิตได้จาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 สามารถทนต่อ pH ได้ในช่วง 5 ถึง 7 และ ยังคงมีกิจกรรมของสารยับยั้งเท่ากับ 64 Au/mL ซึ่งสารยับยั้งที่ผลิตได้นี้ มีสมบัติในการทนต่อความเป็นกรดอ่อน ๆจนถึงความเป็นกลางได้ แต่ไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดที่พีเอชต่ำ ๆได้ (ตารางที่ 3.5 และภาพที่ 3.16)



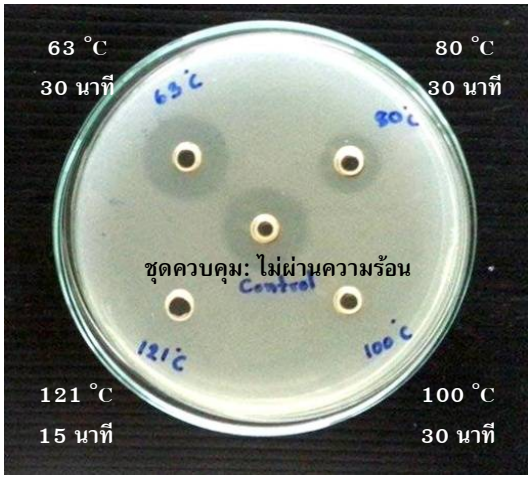
ภาพที่ 3.16 กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่ปรับค่าพีเอช 5 6 7 8 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.5 ผลของพีเอช อุณหภูมิ และเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารยับยั้งที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104

ชุดทดสอบ	กิจกรรมของสารยับยั้ง (Au/mL)
ชุดควบคุม	64
พีเอช	
2	0
3	0
4	0
5	64
6	64
7	64
8	0
อุณหภูมิ	
63 องศาเซลเซียส 30 นาที	64
80 องศาเซลเซียส 30 นาที	32
100 องศาเซลเซียส 30 นาที	0
121 องศาเซลเซียส 15 นาที	0
เอนไซม์	
Proteinase K	0
Protease	0
Trypsin	0
α-chymotrypsin	0
Lipase	0
α-amylase	0

8.2 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารยับยั้ง

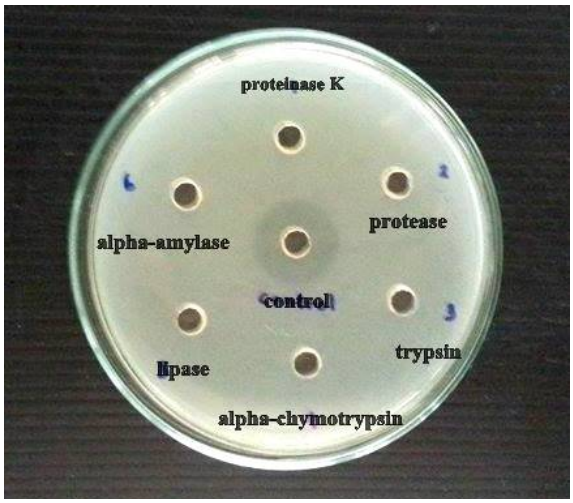
จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารยับยั้งโดยนำ culture supernatant มาทดสอบสมบัติการทนต่อความร้อนที่ระดับต่าง ๆ กัน คือ ที่อุณหภูมิ 63 80 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่า สารยับยั้งที่ผลิตได้จาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 สามารถทนต่อความร้อนได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แต่กิจกรรมของสารยับยั้งลดลงจาก 64 Au/mL เป็น 32 Au/mL (ดังตารางที่ 3.5 และภาพที่ 3.17)



ภาพที่ 3.17 กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 63 80 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

8.3 ผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมของสารยับยั้ง

เมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ proteinase K protease trypsin α-chymotrypsin lipase และ α-amylase โดยใช้ความเข้มข้นของเอนไซม์แต่ละชนิดที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำไปหาค่ากิจกรรมของสารยับยั้งที่เหลืออยู่ ซึ่งพบว่าสารยับยั้งที่ผลิตได้เสียสภาพเมื่อผสมกับเอนไซม์ที่ทดสอบทุกชนิด (ตารางที่ 3.5 และภาพที่ 3.18)

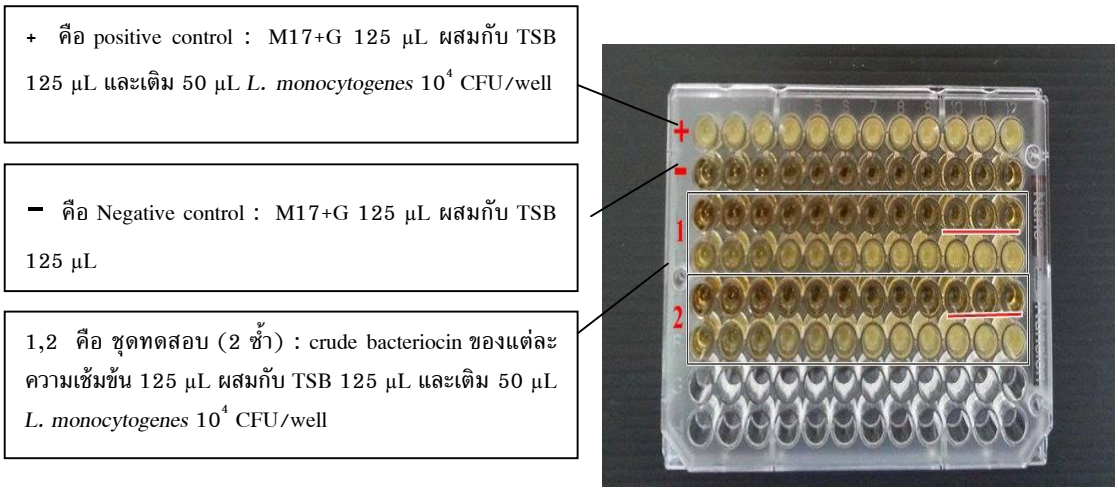


ภาพที่ 3.18 กิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่ทดสอบกับ proteinase K protease trypsin α-chymotrypsin lipase และ α-amylase บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

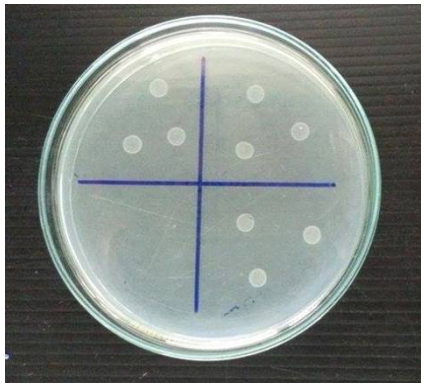
9. การหาค่า MIC ของสารยับยั้งที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตสารยับยั้งที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน ดังการทดลองที่ 7 และเก็บส่วนใสที่ได้มาทำให้เข้มข้น 5 เท่า โดยวิธี ultrafiltration แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี broth microdilution assay พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 64 Au/mL (ภาพที่ 3.19)

เมื่อนำผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 มาทำการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) พบว่า สารยับยั้งที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ มีการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเป็นจุดสีขาวเล็ก ๆ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาพที่ 3.20)



ภาพที่ 3.19 ผลการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 จาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่ผลิตสารยับยั้งที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน โดยวิธี broth microdilution assay



ภาพที่ 3.20 การศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)

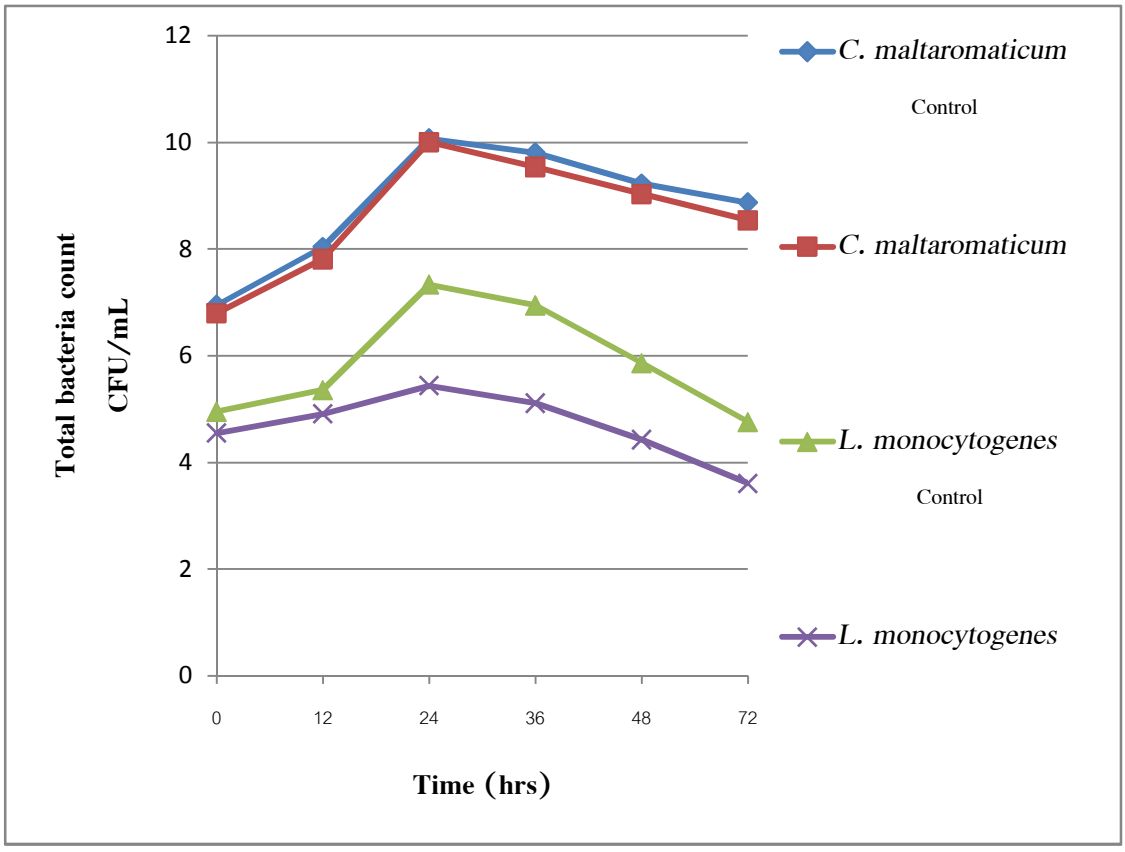
10. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เมื่อนำ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 มาเพาะเลี้ยงใน M17+G ที่พีเอชเริ่มต้น 7 และบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อให้แบคทีเรียอยู่ในช่วง log phase แล้วทำการปรับให้แบคทีเรียแลคติกเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/mL แล้วเติม *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เลี้ยงในอาหาร TSB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับให้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/mL เพาะเลี้ยงร่วมกันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน และทำการนับจำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เหลือทุก ๆ 12 ชั่วโมง พบว่าจะเริ่มมีการยับยั้งภายหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ซึ่งมีกิจกรรมการยับยั้งคิดเป็นร้อยละ 98 โดยจำนวนของ *L. monocytogenes* ATCC 15313ลดลงประมาณ 1-2 log CFU/mL (ตารางที่ 3.6) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และหลังจากนั้นกิจกรรมการยับยั้งจะค่อย ๆลดลงตามเวลาที่เพิ่มขึ้น

ตารางที่ 3.6 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดย *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

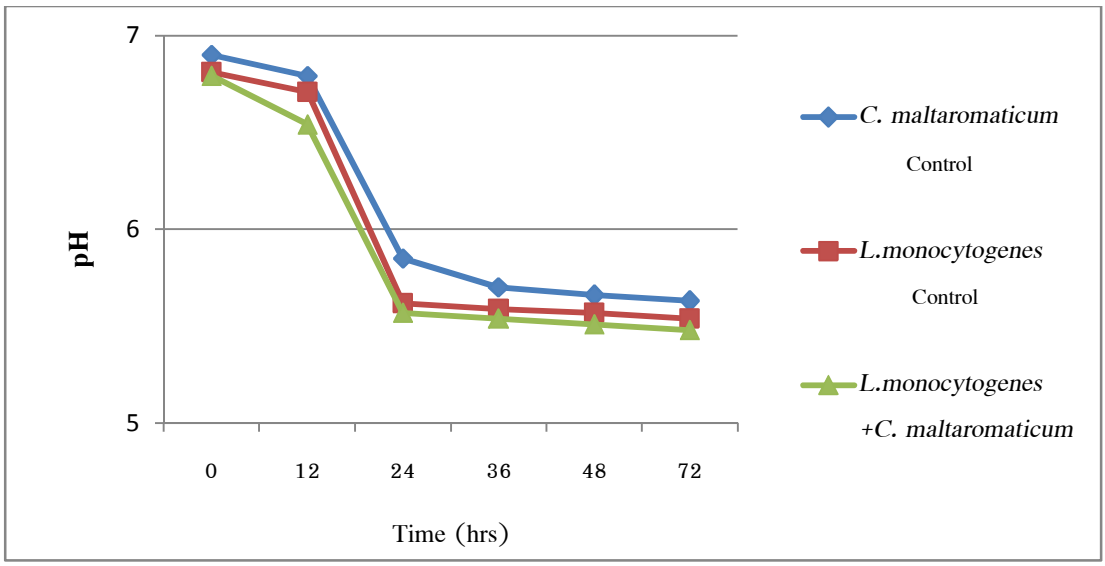
เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 (CFU/mL)		ร้อยละการยับยั้ง
	L. monocytogenes ATCC 15313	*L. monocytogenes* ATCC 15313 + *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104	
0	$9.0 \pm 0.05 \times 10^4$	$3.5 \pm 0.01 \times 10^4$	61.10
12	$2.3 \pm 0.02 \times 10^5$	$8.1 \pm 0.03 \times 10^4$	64.16
24	$2.2 \pm 0.01 \times 10^7$	$2.7 \pm 0.04 \times 10^5$	98.74
36	$8.8 \pm 0.05 \times 10^6$	$1.3 \pm 0.02 \times 10^5$	98.56
48	$7.3 \pm 0.06 \times 10^5$	$2.7 \pm 0.03 \times 10^4$	96.37
72	$5.8 \pm 0.07 \times 10^4$	$3.3 \pm 0.05 \times 10^3$	92.87

เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *L. monocytogenes* ATCC 15313 และ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 พบว่าการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 จะมีการเพิ่มจำนวนที่น้อยกว่า *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เป็นชุดควบคุม (ภาพที่ 3.21) ซึ่งแสดงให้เห็นว่า *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 15313ได้ สำหรับจำนวนของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่ทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *L. monocytogenes* ATCC 15313 พบว่ามีจำนวนของแบคทีเรียแลคติกมีความใกล้เคียงกันกับชุดควบคุมที่เป็นแบคทีเรียแลคติก อย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกยังคงเจริญได้ดีแม้ว่าจะมีการเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *L. monocytogenes* ATCC 15313



ภาพที่ 3.21 จำนวน *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 และ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกัน ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของพีเอชหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่า พีเอชจะค่อย ๆ ลดลงหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันที่เวลา 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป ทั้งชุดควบคุมและชุดการทดสอบของการเพาะเลี้ยงร่วมกัน มีการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่ใกล้เคียง จากพีเอชเริ่มต้น 6.79 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันครบ 72 ชั่วโมงพบว่า พีเอชที่ได้จะอยู่ที่ประมาณ 5.48 (ภาพที่ 3.22)



ภาพที่ 3.22 การเปลี่ยนแปลงพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่าง *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 และ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

11. การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกและสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ

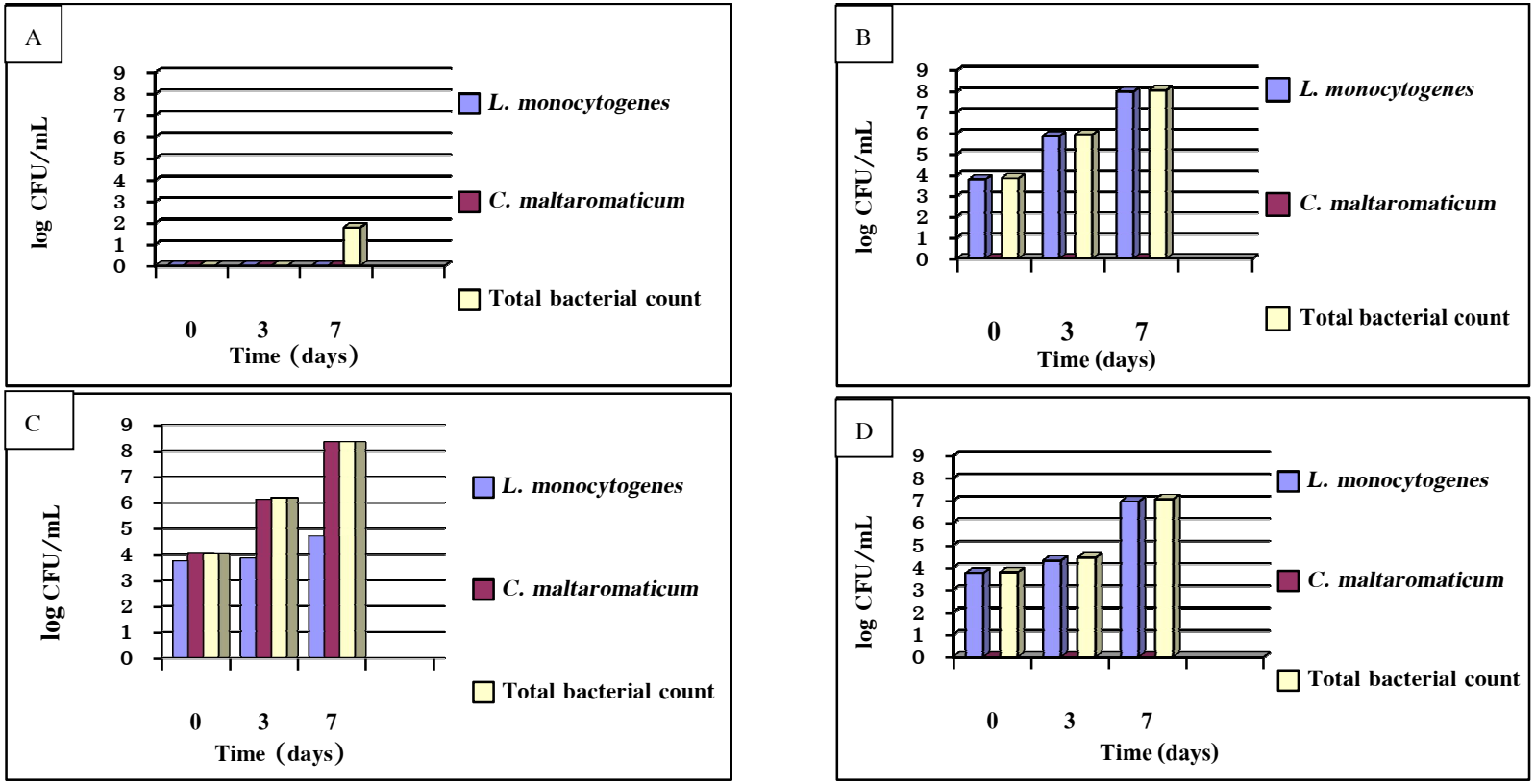
จากการทดลองพบว่า เมื่อนำแบคทีเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ซึ่งมีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 10^4 CFU/mL มาเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ซึ่งมีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/mL ในกุ้งขาว และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ตั้งแต่วันที่ 3-7 ได้ประมาณ 2-3 log CFU/mL เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 3.7 และภาพที่ 3.23) สำหรับการใช้ culture supernatant พบว่า จะสามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ตั้งแต่ 3-7 วัน ได้ประมาณ 1-2 log CFU/mL เมื่อเทียบกับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวเซลล์แบคทีเรียแลคติกจะทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ในกุ้งขาวแช่เย็นที่ดีกว่า

ตาราง 3.7 จำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ที่เหลือรอดในกุ้งขาวแช่เย็น เมื่อเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

ชุดทดลอง	จำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 (log CFU/mL) ที่ระยะเวลาต่างๆ (วัน)		
	0	3	7
Uninoculate (Negative control)	–[a]	–[a]	–[a]
Innoculate (Positive control)	3.83 ± 0.03[c]	5.88 ± 0.03[b]	7.98 ± 0.04[c]
L. monocytogenes + *C. maltaromaticum*	3.75 ± 0.05 [b]	3.84 ± 0.04[a]	4.70 ± 0.04[a]
L. monocytogenes + culture supernatant	3.76 ± 0.02[b]	4.31 ± 0.05[a]	6.95 ± 0.03[b]

หมายเหตุ : (-) ไม่พบการเจริญของ *L. monocytogenes* ATCC 15313

: ค่าตัวอักษรภาษาอังกฤษในแต่ละคอลัมน์ หมายถึง ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่นที่ 95% ($p < 0.05$)



รูปที่ 3.23 ปริมาณ *L. monocytogenes* ATCC 15313 *C. maltaromaticum* และแบคทีเรียทั้งหมด ที่พบหลังจากการเก็บรักษากุ้งที่สภาวะต่าง ๆ

A: กุ้งที่ไม่มีการเติมเชื้อที่ผ่าน UV เป็นชุดควบคุมทางบวก

B: กุ้งที่เติมเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 เป็นชุดควบคุมทางลบ

C: กุ้งที่เติม *C. maltaromaticum* และ *L. monocytogenes* ATCC 15313

D: กุ้งที่เติม culture supernatant และ *L. monocytogenes* ATCC 15313

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรีย และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น โดยส่วนใหญ่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก (รุ่งโรจน์ และคณะ, 2554) การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็น โดยทำการนับจำนวนและแยกแบคทีเรียสร้างกรด โดยใช้อาหาร Bacteriocin screening medium (BSM agar) ที่เติม 0.004% Bromcresol purple คัดเลือกแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีเหลืองรูปกระสวย เนื่องจากการสร้างแลคติกของแบคทีเรียแลคติก ทำให้เกิดการเปลี่ยนสีของ Bromcresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลือง จากการทดลองสามารถแยกแบคทีเรียสร้างกรดทั้งหมดได้ทั้งสิ้น 266 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1) เมื่อนำไอโซเลทดังกล่าวมาทำการตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และการติดสีแกรม พบว่า เป็นแบคทีเรียแลคติกทั้งสิ้น 159 ไอโซเลท โดยมีรูปร่าง กลม 61 ไอโซเลท แท่งสั้น 68 ไอโซเลท และแท่งยาว 30 ไอโซเลท แต่ละไอโซเลทมีการเรียงตัวที่แตกต่างกัน (ภาคผนวก ค)

จากการนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกในอาหารทะเลแช่เย็นที่เลี้ยงบนอาหาร BSM agar พบว่า แบคทีเรียสร้างกรดอยู่ในช่วงระหว่าง $3.0x10^5$ ถึง $1.4x10^8$ CFU/g (ตารางที่ 3.1) ซึ่งเมื่อเทียบกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่า จำนวนแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดที่พบในทางเดินอาหารของกุ้ง จะอยู่ในช่วง 20-1.2×10^5 CFU/g และโดยเฉลี่ยจะพบปริมาณแลคติกสูงสุดที่บริเวณลำไส้ส่วนต้น (มณฑกานต์, 2547) และการทดลองของ Nanasombat *et al*. (2012) ที่พบปริมาณแบคทีเรียแลคติกในกุ้งและหอย ในช่วง $3.0x10^4$-$3.0x10^6$ CFU/g แสดงให้เห็นว่าปริมาณแบคทีเรียแลคติกในอาหารทะเลมีความแตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ของ Cahill *et al*. (1990) พบว่าแบคทีเรียที่พบในสิ่งแวดล้อมมีผลต่อชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในลำไส้มาจากสิ่งแวดล้อมและอาหาร ดังนั้นนักวิจัยหลายท่านจึงสรุปว่า จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับสัตว์น้ำสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อมโดยรอบ เช่น หอยจะกินอาหารโดยการกรองอาหารจากน้ำที่มันอาศัยอยู่ ดังนั้นแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำก็จะเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารของหอย และพบว่ามีแบคทีเรียแลคติกประมาณ 10^3-10^5 CFU/g (Cook, 1991) แบคทีเรียแลคติกอาศัยอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ และสามารถพบได้ใน ปลาสด กุ้งสด (Nair and Surendran, 2004) พบในระบบทางเดินอาหารของปลาทะเล (Buntin *et al*., 2008) และพบในหอย (Shiflett *et al*., 1966) นอกจากนี้ Mauguin and Novel (1994) ยังรายงานว่าพบ

แบคทีเรียแลคติก เช่น *Lactobacillus Lactococcus* และ *Carnobacterium* ในอาหารทะเล ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียแลคติกเป็นเชื้อประจำถิ่นในสัตว์ทะเลเจริญอยู่ในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เจ้าบ้าน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก จะสามารถผลิตสารเพื่อกำจัดหรือยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เช่น แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์ (Verschuere *et al*., 2000)

ผลการยับยั้งของสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็นโดยวิธี agar spot พบว่ามี 5 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ FSK-L 5101 POL-20108 HYL-20104 L-SQ-L 25104 และ L-SH-L 25104 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไม่มีไอโซเลทใดที่สามารถยับยั้ง *E. coli* PSU 95 และ *S. aureus* ATCC 29213 ได้ และจะยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Salmonella* Typhi ได้ดี และทุกไอโซเลทยับยั้ง *V. parahaemolyticus* PSU 1681ได้น้อย (ตารางที่ 3.2) จากการทดลองได้จำกัดการเกิดกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยใช้อาหาร BSM agar ซึ่งมีปริมาณกลูโคสเพียง 0.2% และการนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน ใน anaerobic jar เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแลคติกนั้นก็ยังสามารถผลิตสารอื่น ๆที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ เช่น เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซิติล และแบคเทอริโอซิน (Blom and Mortvedt, 1991)

จากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 5 ไอโซเลท เมื่อนำไปทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร BSM broth และบ่มที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส บ่มเป็นเวลา 1 2 3 และ 7 วัน หลังจากนั้นนำมาวัดความขุ่นเพื่อดูการเจริญของเชื้อแบคทีเรียโดยวัดด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 600 nm พบว่า ทุกไอโซเลท สามารถเจริญได้ในช่วงกว้างตั้งแต่ 4 องศาเซลเซียส ไปจนถึงอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.2 และภาคผนวก ง.) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวมีสมบัติเป็น psychrotrophic lactic acid bacteria หมายถึง แบคทีเรียที่เจริญทนอุณหภูมิต่ำ แต่สามารถเจริญได้ดีที่ 20-30 องศาเซลเซียส (Samarzija *et al*., 2012) สำหรับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ พบว่าจะอยู่ในช่วง 20-25 องศาเซลเซียส ซึ่งแบคทีเรียกลุ่ม psychrotrophic lactic acid bacteria มีความน่าสนใจ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งจะมีโอกาสแข่งขันกับแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในสภาวะที่อยู่ในอุณหภูมิต่ำได้ (Matamoros *et al*., 2009)

จากการศึกษาผลการยับยั้งของสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar well diffusion method พบว่าส่วนใสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท POL-20108 ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้เลย อีกทั้งไอโซเลท FSK-5101 และ HYL-20104 ที่ยับยั้งได้เพียง *L. monocytogenes* ATCC 15313 เท่านั้น (ตารางที่ 3.3) ทั้งที่จากผลการทดสอบด้วย agar spot method ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์หลายชนิด แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นอาจมาจากสารอื่น ๆที่ตัวเซลล์แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งได้หลายชนิด นอกจากนี้การทดสอบโดยวิธี agar well diffusion method ได้นำส่วนใสมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 เพื่อกำจัดกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้น ซึ่งพบว่า ไอโซเลท L-SH-L 25104 และ L-SQ-L 25104 ยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดี (ตารางที่ 3.3) แสดงให้เห็นว่า ผลการยับยั้งส่วนใหญ่ไม่ได้มาจากผลของกรดอินทรีย์ อาจเป็นเพราะการใช้อาหาร BSM ซึ่งมีปริมาณกลูโคสเพียง 0.2% ทำให้การเกิดกรดอินทรีย์น้อยลง และมีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกไปบ่มใน anaerobic jar ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท L-SH-L 25104 และ L-SQ-L 25104 สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่จะยับยั้งได้ดีกับแกรมบวก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองก่อนหน้านี้ที่พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ เพราะบริเวณ outer membrane ของแบคทีเรียแกรมลบ จะมีการสกัดกั้นแบคเทอริโอซินในการป้องกันการแทรกซึมเข้าสู่เซลล์เมมเบรน (Stevens *et al*., 1991 ; Savadogo *et al*., 2004) ดังนั้นจึงคาดว่าสารที่แบคทีเรียแลคติกผลิตออกมาอาจมาจากแบคเทอริโอซินหรือแบคเทอริโอซินร่วมกับสารอื่น ๆที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า ไอโซเลท L-SH-L 25104 และ L-SQ-L 25104 มีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (ตารางที่ 3.3 และภาพที่ 3.3) จึงเลือกทั้ง 2 ไอโซเลท นี้ไปจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ โดยวิธีพันธุศาสตร์โมเลกุล ด้วยวิธี 16S rDNA sequence analysis พบว่า L-SH-L 25104 ที่แยกได้จากกุ้ง มีความเหมือนกับ *Carnobacterium maltaromaticum* (99 % similar to *Carnobacterium maltaromaticum*) และไอโซเลท L-SQ-L25104 ที่แยกได้จากหมึก มีความเหมือนกับ *Carnobacterium divergens* (99% similar to *Carnobacterium divergens*) (ภาพที่ 3.4) ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้สามารถพบได้ในอาหารประเภท เนื้อ อาหารทะเล และสามารถเจริญได้ในพื้นที่หลากหลาย เช่น

ระหว่างการเก็บรักษาอาหารสดในตู้เย็น การเก็บรักษาในสภาวะสูญญากาศ เป็นต้น (Groth Laursen *et al*., 2005)

Ringo and Gatesoupe (1998) ได้รวบรวมผลการศึกษาถึงชนิดของแบคทีเรียแลคติกในบริเวณส่วนต่าง ๆ ของปลาแต่ละชนิด ซึ่งพบว่าในบริเวณระบบทางเดินอาหารของปลาจะพบแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus Carnobacterium Streptococcus* และ *Leuconostoc* อาศัยอยู่ การทดลองของ Martin-visscher *et al*. (2008) ซึ่งสามารถแยก *C. maltaromaticum* UAL307 ได้จากเนื้อหมู โดยแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก รวมทั้ง *Listeria* sp. ผู้ทำการทดลองพบว่า *C. maltaromaticum* UAL307 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้หลายชนิด ซึ่งถูกระบุว่าเป็น piscicolin 126 carnobacteriocin BM1 และ carnocyclin A นอกจากนี้ Grajek *et al*. (1996) รายงานว่า *C. divergens* สามารถผลิตแบคเทอ-ริโอซิน ที่ชื่อว่า divercin V41 สำหรับการทดลองของ Tahiri *et al*. (2009) พบว่า *C. divergens* ผลิตแบคเทอริโอซิน ที่ชื่อว่า divergicin M35

รูปแบบการดื้อยาต่อยาปฏิชีวนะ 8 ชนิดของ *Carnobacterium maltaromaticum* L-SH-L 25104 และ *Carnobacterium divergens* L-SQ-L25104 พบว่า ดื้อต่อยา penicillin G ampicillin และ ceftriazone นอกจากนี้ *Carnobacterium divergens* ยังดื้อต่อ gentamicin และ tetracycline ทุกไอโซเลทไวต่อยา vancomycin chloramphenical และ erythromycin ส่วน *Carnobacterium maltaromaticum* ไวต่อยา tetracycline (ตารางที่ 3.4) ความไวต่อยาปฏิชีวนะนี้สอดคล้องกับ Matamoros *et al*. (2009) ซึ่งรายงานว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 7 สายพันธุ์ได้แก่ *Leuconostoc gelidum* (3 สายพันธุ์) *Lactococcus piscium* (2 สายพันธุ์) แยกมาจากปลาแซลมอน *Lactobacillus fuchuensis* แยกมาจากปลาตะเพียนทะเล และ *Carnobacterium alterfunditum* แยกมาจากปลาหางไก่ โดยแบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์ไวต่อยา chloramphenical tetracycline และ erythromycin ยกเว้น *Lactococcus piscium* ดื้อต่อยา erythromycin ปานกลาง และทุกสายพันธุ์ดื้อต่อยา vancomycin kanamycin colistin และ nalidixic acid

Temmerman *et al*. (2003) ได้คัดแยกโพรไบโอติก 268 ไอโซเลทจากผลิตภัณฑ์โพรไบโอทิกพบว่ามี 187 ไอโซเลท ที่มีการดื้อต่อสารปฏิชีวนะโดยพบการดื้อต่อ kanamycin (79 เปอร์เซ็นต์) vancomycin (65 เปอร์เซ็นต์) tetracycline (26 เปอร์เซ็นต์) penicillin G (23 เปอร์เซ็นต์) erythromycin (16 เปอร์เซ็นต์) และ chloramphenical (11เปอร์เซ็นต์) การดื้อต่อสารปฏิชีวนะนี้ได้รับการยืนยันว่าเป็นการดื้อที่พบโดยทั่วไปไม่เป็นการดื้อที่ผิดปกติ

นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไม่มีการสร้างโปรตีน hemolysin (รูปที่ 3.5) ที่ไปย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทำให้ไม่เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง

(gramma-hemolysis) และผลการทดลองนี้สอดคล้องกับ Chahad *et al*. (2012) ที่ได้รายงานว่า แบคทีเรียแลคติกในกลุ่มของ Enterococci ที่แยกมาจากปลา และหอย ไม่ทำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มีสมบัติด้านความปลอดภัยต่อร่างกายมนุษย์

ไบโอเจนิกเอมีน เป็นสารประกอบอินทรีย์ของคาร์บอนมีหมู่อะมิโนเป็นหมู่ฟังก์ชัน มีสมบัติเป็นเบส น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ทนความร้อน (Arena and Manca de Nadra, 2001; Shakila *et al*., 2001) เกิดจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชันของกรดอะมิโน ด้วยเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสที่ผลิตจากจุลินทรีย์ และเมื่อร่างกายได้รับไบโอเจนิกเอมีนในปริมาณสูง จะส่งผลให้เกิดอาการแพ้ได้หลายแบบ เช่น เกิดผื่นคัน ลมพิษ ปากบวม และมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง วิงเวียน หน้าแดง หัวใจเต้นเร็ว ความดันโลหิตต่ำ เป็นต้น (Pereira *et al*., 2001) โดยมักพบการสร้างไบโอเจนิกเอมีนในแบคทีเรียแลคติกสกุล *Lactobacillus Lactococcus Leuconostoc Pediococcus Streptococcus* และ *Enterococcus* (Suzzi and Gardini, 2003)

จากการทดลองพบว่า *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 และ *C. divergens* L-SQ-L25104 ไม่มีกิจกรรมการสร้าง tyramine และ histamine (ภาพที่ 3.7 และ 3.8) ซึ่งเป็น biogenic amines ที่พบมากในอาหารทะเล ซึ่งเป็นสารที่เป็นอันตรายส่งผลต่อสุขภาพ ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จึงมีสมบัติด้านความปลอดภัย

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างขึ้นในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียแลคติก ดังนั้น ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติกจึงมีผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซินด้วย (พงษ์เทพ, 2546) จากการศึกษาพบว่า แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่สร้างและมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่สร้าง โดยเฉพาะที่พบในแบคทีเรียแลคติก (De Vuyst and Vandamme, 1992) ดังนั้น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมในการเจริญจึงมีความสำคัญต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน (complex medium) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินคืออุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิต (Hurst,1981; De Vuyst and Vandamme, 1992) เช่น แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Carnobacterium piscicola* และ *C. divergens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำมีอัตราการสร้างสูงสุดเมื่อเซลล์เจริญอยู่ในช่วงต้นของการเจริญในระยะ stationary เมื่อเจริญใน MRS broth และที่อุณหภูมิ 20 องศา-เซลเซียส จะสร้างแบคเทอริโอซินสูงกว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Pilet *et al*., 1995)

สำหรับการเจริญของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่คัดเลือกได้มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารต่างๆ พบว่า เจริญได้ดีที่สุดในอาหาร M17+G ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหาร

เท่ากับ6.5-7 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และพบว่ามีกิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 สูงสุดที่เท่ากับ 64 Au/mL (ภาพที่ 3.14) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของพงษ์เทพ (2546) ที่ได้ศึกษาการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M17 broth ให้ผลการเจริญของเซลล์และการสร้างแบคเทอริโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อ สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้าชนิดอื่น ๆ โดยอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 broth ที่มีพีเอชเริ่มต้น 6.0-9.0 ให้ผลการเจริญของเซลล์และการผลิตแบคเทอริโอซินสูงกว่าสภาวะอื่น ๆที่ทำการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า การผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 broth เป็นแบบที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ โดยจะมีการผลิตแบคเทอริโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *E. faecium* NKR-5-3

จากการทดลองพบว่า *C. maltaromaticum* L-SH-L25104 ที่คัดเลือกได้จะมีการผลิตสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินสูงสุด ในช่วงที่เซลล์เจริญอยู่ในระยะคงที่ (secondary metabolite production) ซึ่งสอดคล้องกับ Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn (2000) ที่พบใน pediocin AcH และmesenteroicin 5 ที่ผลิตจาก *Pediococcus acidilactici* H และ *Leuconostoc mesenteroides* UL5105 (Biswas *et al*., 1991; Lewus *et al*., 1991) รวมถึงแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lactobacillus lactis* subsp.โดยจะมีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุด เมื่อเซลล์เจริญอยู่ในระยะคงที่เช่นกัน

การทดลองที่ผ่านมาพบว่า การผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่มักเป็นแบบที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ (De Vuyst and Vandamme, 1994) โดยเฉพาะการผลิตแบคเทอริโอซินที่พบใน *E. faecium* BFE 900 (Franz *et al*., 1996) *E. faecium* FAIR-E 198 (Sarantinopoulos *et al*., 2002) *E. faecium* A2000 (Pantev *et al*., 2002) และ *E. faecium* RZS C5 (Leroy and De Vuyst, 2002; Foulquie Moreno *et al*., 2003) ที่มีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุด เมื่อแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวเจริญอยู่ในช่วงต้นของการเจริญในระยะคงที่ นอกจากนี้ยังพบการผลิตแบคเทอริโอซินแบบที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ในแบคทีเรียแลคติกอีกหลายชนิด เช่น *Leuconostoc carnosum* 4010 (Budde *et al*., 2003) *Leuconostoc mesenteroides* L124 และ *Lactobacillus curvatus* L442 (Mataragas *et al*., 2003)

อย่างไรก็ตามสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ ก็ไม่ได้ให้ผลผลิตแบคเทอริโอซินที่ดีที่สุดเสมอไป ตัวอย่างเช่น *C. divergens* M35 มีการผลิตแบคเทอริโอซินในแบบที่ไม่ได้มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ (Bogovic-Matijasic and Rogelj, 1998; Kim *et al*, 1997) ซึ่ง Parente and Ricciardi (1999) รายงานว่า ผลผลิตของแบคเทอริโอซินมีปัจจัยต่อการผลิตมากมาย ได้แก่ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน

ไนโตรเจน และฟอสฟอรัส จากการทดลองพบว่า *C. divergens* M35 ผลิต divergens M35 ได้ดีในอาหาร Snow Crab Hepatopancreas medium (SCH) แต่เจริญได้ไม่ดีในอาหาร M17 + G

ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการทดลองของ Parente and Hill (1992) ที่พบว่า *E. faecium* DPC 1146 สามารถเจริญและผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 broth ผสม 0.5 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส ได้ดีกว่าใน Elliker broth และ skim milk โดยสาเหตุที่ M17 broth เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของ *E. faecium* ถึงแม้ว่าจะมีปริมาณของน้ำตาลน้อยกว่า APT broth Elliker broth และ MRS broth นั้นเนื่องจากมีการศึกษาพบว่า การเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติกต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณของสารสกัดจากยีสต์และโปรตีนโมเลกุลเล็ก ๆ ที่ผ่านการย่อยสลายบางส่วนในปริมาณสูง (Parente and Hill, 1992; De Vuyst *et al*., 1996) รวมทั้งยังพบอีกว่าการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซิน มักถูกจำกัดด้วยปริมาณของแหล่งไนโตรเจนมากกว่าแหล่งของคาร์บอน (Parente and Ricciardi, 1999) โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 broth ประกอบด้วยแหล่งของสารประกอบไนโตรเจนที่ได้จากการย่อยสลายโปรตีนจากแหล่งต่าง ๆ เช่น เนื้อ นม ถั่วเหลือง มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 5 ชนิดที่นำมาทดลอง นอกจากนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวยังประกอบด้วยสาร beta-glycerophosphate ซึ่งทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์ช่วยป้องกันการลดลงของค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดจากการใช้น้ำตาลแลกโตสและกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียในสกุล Streptococci และ Enterococci (Merck, 2000) นอกจากองค์ประกอบทางด้านสารอาหารที่เหมาะสมแล้ว M17 broth ยังไม่มีส่วนผสมของ Tween 80 เหมือนกับในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียแลคติกโดยทั่วไป ซึ่งเป็นข้อดีอีกประการหนึ่ง เนื่องจากมีการรายงานว่า Tween 80 จะมีผลทำให้ขั้นตอนของการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ยุ่งยากขึ้น (Muriana and Klaenhammer, 1991)

จากการทดลองพบว่า *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่คัดเลือกได้ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.13) อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติก Rammelsberg และ Dadler (1990) ศึกษาผลของอุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงต่อการผลิต caseicin 80 จากเชื้อ *Lactobacillus casei* B80 ที่อุณหภูมิ 15 20 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถผลิต caseicin 80 ได้ดีที่สุด ในขณะที่ Graciela *et al.* (1995) ศึกษาการผลิต lactocin 705 จากเชื้อ *L. casei* CRL705 พบว่าที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด

จากผลการศึกษาการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของ *E. faecium* NKR-5-3 ที่อุณหภูมิระหว่าง 25-45 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M-MRS broth+2% glucose พบว่า *E. faecium* NKR-5-3 สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสได้สูงสุด และการเจริญของเชื้อจะลดลงเมื่ออุณหภูมิในการบ่มเชื้อเพิ่มสูงขึ้น ส่วนการสร้างแบคเทอริโอซินพบว่า ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ทำให้มีสภาวะเป็นกลางจะมีค่าสูงสุด เมื่อทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อจะลดลง เมื่ออุณหภูมิในการบ่มเชื้อเพิ่มสูงขึ้น (พงษ์เทพ, 2546)

ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินของ *E. faecium* NKR-5-3 ที่ทำการศึกษาได้ พบว่าสอดคล้องกับการทดลองของ Franz *et al*. (1996) ซึ่งเลือกใช้อุณหภูมิที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นอุณหภูมิสำหรับศึกษาการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของ *E. faecium* BFE 900 และการทดลองของ Leroy and De Vuyst (2002) ซึ่งพบว่า *E. faecium* RZS C5 จะมีการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินได้ดีเมื่อเจริญที่อุณหภูมิระหว่าง 25-35 องศาเซลเซียส ภายใต้การควบคุมค่าความเป็นกรด-เบสให้อยู่ที่ 6.5 ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ และพบว่าผลผลิตของเซลล์และแบคเทอริโอซินจะลดลงเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่า การเจริญของ *E. faecium* L50 และการสร้าง enterocin P และ enterocin Q จะสูงสุดเมื่อเซลล์มีการเจริญที่อุณหภูมิ 47 และ 37-47 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Cintas *et al*., 2000) ส่วนการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติกที่อุณหภูมิต่ำพบว่า *Carnobacterium piscicola* UAL26 สามารถสร้างแบคเทอริโอซินเมื่อเจริญที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งถือเป็นจุดเด่นของแบคทีเรียดังกล่าวในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับอาหารที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (Gursky *et al*., 2002)

ซึ่งจากผลการศึกษาการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่คัดเลือกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M 17+G ที่มีค่าพีเอชริ่มต้นระหว่าง 6.5-7.0 พบว่า มีค่ากิจกรรมสูงสุด (ภาพที่ 3.14) แต่อย่างไรก็ตามพบว่า พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ยังขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาใช้ด้วย (Parente and Ricciardi, 1999)

จากการศึกษาผลของพีเอช ต่อกิจกรรมของสารยับยั้งที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน โดยนำส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตร M17+G มาทำการปรับ pH ให้มีความแตกต่างกัน คือ 2 3 4 5 6 7 และ 8 ด้วย 1N NaOH และ 1N HCl แล้วตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับค่า pH ทั้งหมดให้เป็น 6.5 แล้วหาค่ากิจกรรมยับยั้งที่เหลืออยู่ พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 สามารถทนต่อพีเอช 5 ถึง 7 และ แบคเทอริโอซินยังคงมีกิจกรรมเท่ากับ 64 Au/mL (ภาพที่

3.16 และตารางที่ 3.5) ซึ่งแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้มีสมบัติในการทนต่อความเป็นกรดอ่อนจนถึงความเป็นกลางได้ โดยระดับของพีเอช ที่ต่ำกว่า 5 หรือมากกว่า 7 จะทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูญเสียไป ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากโมเลกุลของแบคเทอริโอซินถูกย่อยสลายไป (Osmanagaoglu *et al*., 2001)

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน โดยนำมาทดสอบสมบัติการทนต่อความร้อนในระดับต่าง ๆ กัน คือ ที่ระดับอุณหภูมิ 63 80 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าสารยับยั้งที่ผลิตได้จาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่คัดเลือกได้ นั้นสามารถทนต่อความร้อนได้สูงสุดที่ระดับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะ 30 นาที แต่กิจกรรมของสารยับยั้งจะลดลงจาก 64 Au/mL เป็น 32 Au/mL (ตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.17) ซึ่งคุณสมบัติความคงทนต่อความร้อนนี้มีความสำคัญถ้านำแบคเทอริโอซินไปใช้เป็นสารถนอมอาหารหรือใช้ในการผสมในอาหารสัตว์ (Ogunbanwo *et al*., 2003)

กิจกรรมของสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้สูญเสียไปเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ proteinase K protease trypsin α-chymotrypsin lipase และ α-amylase ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มที่ย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตได้ แสดงว่าสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นนั้นเป็นสมบัติของสารประกอบประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน (ตารางที่ 3.5 และภาพที่ 3.18) ซึ่งแบคเทอริโอซินที่ได้อาจจัดอยู่ในกลุ่ม heterogeneous จากการทดลองให้ผลใกล้เคียงกับการทดลองของ Nanasombat *et al*. (2012) ที่พบว่าแบคเทอริโอซินที่ได้ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ α-amylase และเอนไซม์ย่อยโปรตีน pepsin protease และ trypsin ซึ่งชี้ให้เห็นว่าแบคเทอริโอซินนี้อาจจะมีองค์ประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนแต่ไม่มีองค์ประกอบของไขมัน ซึ่งถือว่าจัดอยู่ในกลุ่ม heterogeneous

อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดของสารยับยั้งดังกล่าวนี้ต่อไป นอกจากนี้การศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความคงทนของสารยับยั้งที่ระดับพีเอชและอุณหภูมิต่าง ๆ จะนำไปสู่การใช้ประโยชน์ในด้านอาหารต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากความสามารถในการคงตัวของแบคเทอริโอซินนั้นมีความแตกต่างกัน สมใจ และคณะ (2550) รายงานการสร้างแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักประเภทเนื้อในประเทศไทย พบว่าไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *S. aureus* นั้น พบว่าเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* โดยสามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่มีสมบัติที่ดี กล่าวคือทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที มีความคงตัวดีในช่วงพีเอช 4 ถึง 7 Ferchichi *et al*., (2001) พบว่าแบคเทอริโอซินจาก *Lactococcus lactis* MMFII ที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์นมสามารถทนอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส

เป็นเวลา 30 นาที และมีความคงตัวที่ระดับพีเอช 4 ถึง 8 Ikeda *et al.* (1982) พบว่าแบคเทอริโอซินจาก *Streptococcus mutans* C3603 มีความคงตัวที่ระดับพีเอช 1.0 ถึง 12.0 และพบว่าทนอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีที่ค่าพีเอช 2.0 ถึง 7.0 รวมถึงทนอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีที่ค่าพีเอช 4.0 เป็นต้น จากการศึกษานี้สามารถคัดแยกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่มีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์และสามารถสร้างแบคเทอริโอซินเพื่อการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยเฉพาะ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่มีความสำคัญในอาหารทะเลแช่เย็น ซึ่งจะทำให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ในการใช้ผลิตหรือใช้ในการถนอมอาหารให้มีความปลอดภัย

จากการศึกษาสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จาก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 พบว่า สามารถทนต่อพีเอชได้ในช่วง 5 ถึง 7 มีสมบัติในการทนต่อความเป็นกรดอ่อน ๆจนถึงความเป็นกลางได้ แต่ไม่สามารถทนต่อความเป็นกรดที่พีเอชต่ำ ๆได้ ทนต่อความร้อนได้สูงสุดที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส องค์ประกอบของแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งอาจจัดอยู่ในกลุ่ม heterogeneous นอกจากนี้ยังมีกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดี โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ซึ่งสอดคล้องกับ Martin-visscher *et al.* (2008) ที่รายงานว่า *C. maltaromaticum* UAL307 ที่แยกได้จากเนื้อหมู มีกิจกรรมการยับยั้ง *Listeria* species ได้สูง และถูกระบุว่าแบคเทอริโอซินที่พบ เป็น piscicolin 126 และ carnobacteriocin BM1 ซึ่งแบคเทอริโอซินทั้งสองชนิดจัดอยู่ในกลุ่มของ type IIa bacteriocins นอกจากนี้ยังค้นพบแบคเทอริโอซินชนิดใหม่ที่ชื่อว่า carnocyclin A ซึ่งผู้ทำการทดลองเชื่อว่า *C. maltaromaticum* UAL307 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้หลายชนิด แต่อย่างไรก็ตามจากข้อมูลที่มีนี้ก็ยังไม่สามารถจำแนกกลุ่มได้อย่างชัดเจน เนื่องจากว่า การจัดจำแนกกลุ่มนั้นจำเป็นต้องทราบถึงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน และลำดับกรดอะมิโนจากมวลโมเลกุลดังกล่าว เพื่อสืบค้นว่าลำดับกรดอะมิโนของแบคเทอริโอซินตรงกับข้อมูลที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลลำดับโปรตีนหรือไม่ จากการศึกษาสมบัติของแบคเทอริโอซินนี้ทำให้มีข้อสัณนิฐานว่า แบคเทอริโอซินที่ได้นี้อาจจะอยู่ในกลุ่มของ type IIa bacteriocins เนื่องจากเป็นกลุ่มที่สามารถยับยั้ง *Listeria* sp. ได้ดีและทนต่ออุณหภูมิสูง แต่ก็อาจจัดอยู่ในกลุ่มที่ IV bacteriocin เนื่องจากแบคเทอริโอซินที่ได้นี้มีโครงสร้างซับซ้อน (complex bacteriocin) ซึ่งกลุ่มนี้มีส่วนประกอบที่สำคัญประกอบด้วยโปรตีนและสารประกอบอื่น ได้แก่ ไขมันและคาร์โบไฮเดรต ซึ่งเกี่ยวข้องกับกิจกรรมการยับยั้งของจุลินทรีย์ (Klaenhammer, 1993; Ross *et al.* , 2002)

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน และเก็บส่วนใสที่ได้มาทำให้เข้มข้น 5 เท่า โดยวิธี ultrafiltration แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี broth microdilution assay พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 64 Au/mL

(ภาพที่ 3.19) เมื่อนำผลการทดสอบหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด (MIC) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ATCC 15313 มาทำการศึกษาหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC) พบว่า สารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ (รูป 3.20) เมื่อเปรียบเทียบการทดลองของ จุไรรัตน์ (2550) พบว่า *L. plantarum* JR21ที่แยกได้จากอาหารหมักไทย มีความสามารถในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* และแสดงกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดที่ค่า MIC เท่ากับ 20 Au/mL ด้วย broth microdilution assay

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 มาเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *L. monocytogenes* ATCC 15313 เพาะเลี้ยงร่วมกันที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่าจะเริ่มมีผลการยับยั้งภายหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ซึ่งมีกิจกรรมการยับยั้งคิดเป็นร้อยละ 98 โดยจำนวนของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ลดลงประมาณ 1-2 log CFU/mL (ตารางที่ 3.6 และภาพที่ 3.21) เมื่อเทียบกับการทดลองของ ศิรินาถ(2540) ที่เพาะเลี้ยง *Streptococcus* sp. SN61 ร่วมกับ *L. monocytogenes* 018 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT พีเอชเริ่มต้น 6.7 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สามารถยับยั้งเชื้อได้ 93.78 เปอร์เซ็นต์ โดยจำนวนของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ลดลงประมาณ 2 log CFU/mL สำหรับการเพาะเลี้ยงร่วมกันครั้งนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ากิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากสารยับยั้งชนิดใดหรืออาจเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างสารยับยั้งหลายชนิด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลคติกยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยร่วมกัน คือ ปริมาณกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารยับยั้งอื่น ๆ (Gilliand and Spect, 1997)

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกและสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่าจำนวนของ *L. monocytogenes* ATCC 15313 (ชุดควบคุม) ในกุ้งขาวมีการเพิ่มจำนวนขึ้นหลังจากทำการเก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 7 วัน แต่การใช้ตัวเซลล์แบคทีเรียแลคติกจะทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ประมาณ 2-3 log CFU/mL เมื่อเทียบกับชุดควบคุม สำหรับการใช้สารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน จะสามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ได้ประมาณ 1 log CFU/mL เมื่อเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.23) แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวเซลล์แบคทีเรียแลคติกจะทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ในกุ้งขาวแช่เย็นที่ดีกว่า อาจเป็นเพราะเซลล์แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งออกมาตลอดเวลาทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ดีกว่า นอกจากนี้ยังพบการรายงานว่า *Carnobacteria* เป็นแบคทีเรียที่สามารถทนต่อความเย็นและเจริญได้ดีในที่อุณหภูมิต่ำ ดังนั้นจะมักพบแบคทีเรียกลุ่มนี้ในผลิตภัณฑ์แช่เย็น เช่น ผลิตภัณฑ์เนื้อ หรือ ผลิตภัณฑ์ปลา ซึ่งถือเป็นจุดเด่น

ของแบคทีเรียดังกล่าวในการนำไปประยุกต์ใช้สำหรับอาหารที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ (Leisner *et al.*, 2007; Laursen *et al.*, 2005) นอกจากนี้มีรายงานว่าแบคทีเรียแลคติก*Lactobacillus plantarum Carnobacterium maltaromaticum C. piscicola C. divergens C. gallinarum* and *C. inhibens, Streptococcus* sp. *Leuconostoc* เป็นต้น เป็นแบคทีเรียแลคติกที่ไม่ก่อโรคในมนุษย์ (Yang *et al.*, 2007; Huber *et al.*, 2004; Ringo *et al.*, 2001; Joborn *et al.*, 1999; Ringo and Gatesoupe, 1998) และยังมีรายงานอีกว่าแบคทีเรียกลุ่ม *C. maltaromaticum* และ *C. divergens* มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์น้อยมากหรือไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ (Brillet *et al.*, 2005; Nilsson *et al.*, 1999) ดังนั้นการนำแบคทีเรียแลคติกมาใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพในอาหารทะเลจึงมีความน่าสนใจ และเป็นทางเลือกหนึ่งที่มีความปลอดภัยกับผู้บริโภค

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากตัวอย่างอาหารทะเล ได้แก่ กุ้ง หอย ปู หมึก และปลา ชนิดต่าง ๆ จำนวน 4 6 2 5 และ 8 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งสิ้น 159 ไอโซเลท เมื่อนำมาคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่า มีแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้ดี ได้แก่ ไอโซเลท FSK-L 5101 POL-20108 HYL-20104 L-SQ-L 25104 และ L-SH-L 25104 ซึ่งยับยั้งได้ดีใน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ ตั้งแต่ 4 องศาเซลเซียส ไปจนถึงอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็น psychrotroph lactic acid bacteria หลังจากนั้นทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อโดยวิธี agar well diffusion ซึ่งไอโซเลท L-SH-L 25104 และ L-SQ-L 25104 สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 เมื่อนำ L-SQ-L 25104 และ L-SH-L 25104 มาจัดจำแนก โดยวิธี 16S rDNA sequence analysis พบว่า ไอโซเลท L-SH-L 25104 มีความใกล้เคียงกับ *Carnobacterium maltaromaticum* (99 % similar to *C. maltaromaticum*) และไอโซเลท L-SQ-L 25104 มีความใกล้เคียงกับ *Carnobacterium divergens* (99% similar to *C. divergens*)

การศึกษาสมบัติของแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ การทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลคติก ศึกษาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และการสร้างสารพวก biogenic amines พบว่า การดื้อต่อสารปฏิชีวนะนี้ได้รับการยืนยันว่าเป็นการดื้อที่พบโดยทั่วไปไม่เป็นการดื้อที่ผิดปกติ ไม่สร้างโปรตีน hemolysin ที่ไปย่อยสลายเม็ดเลือดแดงทำให้ไม่เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดง และไม่มีกิจกรรมการสร้าง tyramine และ histamine เป็น biogenic amines ซึ่งแสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มีสมบัติด้านความปลอดภัยต่อร่างกายมนุษย์

ในการทดลองนี้ได้คัดเลือก *Carnobacterium maltaromaticum* L-SH-L 25104 ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้ง พบว่า จะสามารถผลิตสารยับยั้งได้ดีเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร M17+G ที่ปรับพีเอชเริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6.5-7 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ซึ่งมีกิจกรรมสูงสุดที่เท่ากับ 64 Au/mL

จากการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารยับยั้งที่ผลิตได้ ที่ระดับอุณหภูมิ 63 80 100 เป็นเวลา 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่า culture supernatant ที่ผลิตได้จาก *C. maltaromaticum* ที่คัดเลือกได้ นั้นสามารถทนต่อความร้อนได้สูงสุด

ที่ระดับอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นระยะ 30 นาที แต่กิจกรรมของของสารยับยั้งลดลงจาก 64 Au/mL เป็น 32 Au/mL อีกทั้งยังมีสมบัติในการทนต่อพีเอช 5 ถึง 7 ทนต่อความเป็นกรดอ่อนจนถึงความเป็นกลางได้ และจะสูญเสียกิจกรรมอย่างสมบูรณ์ภายหลังจากทดสอบด้วยเอ็นไซม์ proteinase K protease trypsin α-chymotrypsin lipase และ α-amylase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์กลุ่มที่ย่อยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรตได้ แสดงว่าสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นนั้นเป็นสมบัติของสารประกอบประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งถือได้ว่ามีสมบัติคล้ายกับแบคเทอริโอซิน และอาจจัดอยู่ในกลุ่ม heterogeneous อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดของสารยับยั้งดังกล่าวนี้ต่อไป

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104ที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารที่เหมาะสมกับการผลิตสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน และทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี broth microdilution assay พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 64 Au/mL แต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อได้ (MBC)

เมื่อนำ *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 ที่คัดเลือกได้มาเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าจะยับยั้งภายหลังการเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง ซึ่งมีกิจกรรมการยับยั้งคิดเป็นร้อยละ 98 โดยจำนวนของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ลดลงประมาณ 1-2 log CFU/mL หลังจากนั้นศึกษาการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่า เมื่อนำแบคทีเรียแลคติก *C. maltaromaticum* L-SH-L 25104 มาเพาะเลี้ยงร่วมกันกับ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ในกุ้ง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จะสามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ตั้งแต่วันที่ 3-7 ได้ประมาณ 2-3 log CFU/mL สำหรับการใช้สารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซิน พบว่า จะสามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ATCC 15313 ตั้งแต่ 3-7 วัน ได้ประมาณ 1 log CFU/mL แสดงให้เห็นว่าการใช้ตัวเซลล์แบคทีเรียแลคติกจะทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ในกุ้งแช่เย็นที่ดีกว่า อาจเป็นเพราะเซลล์แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งออกมาตลอดเวลาทำให้มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ดีกว่า

ข้อเสนอแนะ

1. อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อระบุชนิดของสารยับยั้งสารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินที่ได้นี้ต่อไป อาจมีการจัดจำแนกกลุ่มนั้นจำเป็นต้องทราบถึงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน และลำดับกรดอะมิโนจากมวลโมเลกุลดังกล่าว เพื่อสืบค้นว่าลำดับกรดอะมิโนของแบคเทอริโอซินตรงกับข้อมูลที่มีรายงานอยู่ในฐานข้อมูลลำดับโปรตีนหรือไม่
2. ศึกษาการทำสารยับยั้งที่ผลิตได้นี้ให้มีความบริสุทธิ์เพิ่มมากขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เพื่อเป็นแนวทางในการใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหาร
3. ควรศึกษาการประยุกต์ใช้สารที่มีสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินและแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการลดจำนวน normal flora เพื่อดูบทบาทของ normal flora ที่อยู่ในตัวอย่างอาหารทะเล

เอกสารอ้างอิง

กมลทิพย์ กาฬสมุทร และวัชรี ส้มแก้ว. 2542. การแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากเครื่องในปลากระพง. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 37.

จุไรรัตน์ ร่วมพันธ์. 2550. การคัดเลือกและศึกษาสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากอาหารหมักพื้นบ้าน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 36-37.

ดวงพร คันธโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ โอเดียนสโตร์.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2547. แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง. วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม. 3(1): 12-18.

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบในปลาร้า. วิทยานิพนธ์ดุษฎีบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 1-166.

พิเชษฐ์ สุวรรณ์. 2548. การผลิตกรดแลคติกจากไคตินโดยเซลล์ตรึงแบคทีเรียกรดแลคติก. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตมหาวิทยาลัยเชียงใหม่. หน้า 4-36.

มณฑกานต์ ทองสม. 2547. แบคทีเรียแลกติกในระบบทางเดินอาหารของกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 53-56.

ยุทธนา กิ่งชา. 2010. การศึกษาความเป็นไปได้ในการนำเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียซึ่งมีความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซินไปใช้ในการควบคุมการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenas*ในแหนม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยธรรม-ศาสตร์. หน้า 3-15.

รุ่งโรจน์ ศรีรักษา, ศิริรัตน์ ดีศีลธรรม, อนุชิตา มุ่งงาม และเกษศิรินทร์ ศักดิ์วิวัฒกุล. 2554. ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียและคุณสมบัติการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากคีเฟอร์. งานประชุมวิชาการ ความงามตามธรรมชาติและสุขภาพดีผ่านวิถีวิทยาศาสตร์. หน้า 231-235.

ลัญจกร จันทร์อุดม. 2548. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11.วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร. หน้า 1-17.

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 24.

สมใจ ศิริโภค. 2550. การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมักและการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

สุพรรษา อุไรพันธ์. 2550. บทบาทของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 8-24.

สุลาวดี เขียวชม, ฆรณี ตุ้ยเต็มวงศ์ และประเวทย์ ตุ้ยเต็มวงศ์. 2555. การส่งเสริมการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่บาดเจ็บด้วยสารสกัดเมมเบรนบนชุดทดสอบกระดาษ. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. หน้า 130-141.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก (Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria). วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 23(2): 148-149.

Ababouch, L., Gendhini, G. and Ryder, J. 2005. Causes of detentions and rejections in international fish trade. FAO Fish. Tech. 473.

Adam, M.R. 1999.Safety of Industrial Lactic Acid Bacteria. Journal of Biotechnology. 68 (3): 171-178.

Adams, M.R. and Hall, C.J. 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. Int. J. Food Sci. Technol. 23: 287-292.

Aguirre, M. and Collins, M.D. 1992. Phylogenetic Analysis of Some *Aerococcus*-like Organisms for Urinary Tract Infection of *Aerococcus urinae* sp. nov. Journal of General Microbiology. 138: 401-405.

Anacarso, I., Messi, P., Condo, C., Iseppi, R., Bondi, M., Sabia, C. and Niederhausern, S. 2014. A bacteriocin-like substance produced from *Lactobacillus pentosus* 39 is a natural antagonist for the control of *Aeromonashydrophila* and *Listeria monocytogenas* in fresh salmon fillets. LWT-Food Science and Technology. 55: 604-611.

Arena, M.E. and Manca de Nadra, M.C. 2001.Biogenic amine production by *Lactobacillus*. J. Appl. Microbiol. 90: 158-162.

Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.E., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro test. Food Microbiology. 33:282-291.

Axellsson, L. T. 1993. Lactic Acid Bacteria: classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria. (ed. Salminen, S. and Wright, A. V.). Marcel Dekker. New York. p. 1-64.

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

Bhunia, A. K., Johnson, M. C., Ray, B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of Pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacteria strains. J. Appl. Bacteriol. 70: 25-33.

Biswas, S.R. 1991. Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin, Pediocin AcH by *Pediococcus acidilactici* H. Applied and Envirion-mental Microbiology. 57(4): 1265-1267.

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocinAcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1265-1267.

Blom, H. and Mortved,t C. 1991. Anti-microbial substances produced by food associated microorganisms. Biochemical Society Transactions. 19: 694-698.

Bogovic-Matijasic, B. and Rogelj, I. 1998. Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221-production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. Process Biochemistry. 33: 345-352.

Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 53: 33-41.

Brillet, A., Pilet, M. F., Prevost, H., Cardinal, M. and Leroi, F. 2005. Effect of inoculation of *Carnobacterium divergens*V41, a biopreservative strain against *Listeria monocytogenes* risk, on the microbiological, and sensory quality of cold-smoked salmon. Int J Food Microbiol. 104: 309-324.

Budde, B.B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A.G. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for used as a protective culture for vacuum-packedmeats: culture isolation, bacteriocin identification, and meat application experiments. Int. J. Food Microbiol. 83: 171-184.

Buntin, N., Chanthachum, S. and Hongpattarakere, T. 2008. Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics. Songklanakarin Journal of Science Technology. 30: 141-148.

Byczkowski, J. and Gessner, T. 1988. Biological role of superoxide ion-radical. Int. J. Biochem. 20: 569-580.

Cahill, M.M. 1990. Bacterial flora on fishes: a review. Microb. Ecol. 19: 21-41.

Calo-Mata, P., S.Arlindo, K. Boehme, T. Miguel, A. Pascola, and J. Barros-Velazquez. 2008. Current applications and future trends of lactic acid bacteria and their bacteriocins for the biopreservation of aquatic food products. Food Bioprocess Technology. 1: 43-63.

Carmen, A., Campos, C., Rodriguez, **J.**,Pilar, C.,Marta, P., **and** Jorge, B. 2005. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot. Journal of Food Protection. 39: 356-364.

Centers for Disease Control and Prevention, U.S.A. Available from URL: www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/listeriosis_t.htm. Retrieved 17 October 2007.

Chahad, O.B., El Bour, M.,PilarCalo, M., Boudabous, A., Jorge Barros, V. 2011. Discovery of novel biopreservation agents with inhibitory effects on growth of food-borne pathogens and their application to seafood products.Research in Microbiology. 1-11.

Chaiyakosa, S., Charernjiratragul, W., Umsakul, K. and Vuddhakul, V. 2007. Comparing the efficiency of chitosan with chlorine for reducing *Vibrio parahaemolyticus* in shrimp. Food Control. 18: 1031-1035.

Chung, K.C. and Geopfert. J.M. 1970. Growth of *Salmorella* at low pH. J. Food Sci. 35: 326- 328.

Cintas, L.M., Casaus, P., Herranz, C., Havarstein, L.S., Holo, H., Hernandez, P.E. and Nes, I.F. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the *sec*-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. J. Bacteriol. 182: 6806-6814.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., and Chikindas, M. L. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. A review, Int. J. Food Microbiol. 71: 1-20.

Cook, D.W. 1991. Microbiology of bivalve molluscan shellfish. In Microbiology of Marine Food Products, F. Ward and C. Hackney, editors. Van Nostrand Reinhold, New York, U.S.A., pp. 19-35.

Coventry, M. J., Wan, J., Gordon, J. B., Mawson, R. F., and Hickey, M. W. 1996. Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB286 and partial characterization. Journal of Applied Bacteriology. 80: 91-98.

Daba, H., Lacroix, C., Huang, J., Simard, R.E., Lemieux, L., 1994. Simple method of purification and sequencing of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* UL5. J. Appl. Bacteriol. 77, 682-688.

Daeschel, M.A. 1990. Application of Bacteriocin in Food System.In Biotechnology and Food Safty, D.D. Bills and S.-D.Kung, editors. Butterwort-Heinemann, Boston., pp.91-104.

Daeschel, M.A. 1993. Applications and interactions of bacteriocins from lactic acid bacteria in foods and beverages. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria, D.G. Hoover and L.R. Steenson, editors. Academic Press, Inc., New York., pp. 63-91.

Dahiya, R.S. and Speck, M.L. 1968. Hydrogen peroxide formation by lactobacilli and its effect on *Staphylococcus aureus*. J. Dairy Sci. 5: 1568-1572.

Dainty, R.H., Mackey, B.M., 1992. The relationship between the phenotypic properties of bacteria from chill-stored meat and spoilage processes. Society for Applied Microbiology Symposium.21: 103- 114.

Davidson, P.M. and D.G. Hoover. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 127-160. *In* S. Salminen and A. V. Wright, eds. Lactic Acid Bacteria.Marcel Dekker, Inc., New York.

Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hilla, C., and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. International Dairy Journal. 16(9): 1058-1071.

Dellagio, F., Dicks, L.M.T. and Torriani, S. 1995. The Genus *Leuconostoc*. Microbiology. 2: 235-278.

Delves, J. 1990. Nisin and Its uses as a food preservative.Food Technology. 44: 100-117.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J., 1996. Applications of the bacteriocin, nisin. Antonie van Leeuwenhoek. 69: 193-202.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. J. Gen. Microbiol. 138: 571-578.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. Microbiology, Genetic and Application. 140: 91-142.

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

Dorsa, W. J., Marshall, D. L., Moody, M. W., and Hackney, C. R. 1993. Low temperature growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in precooked crawfish tail meat. Journal of Food Protection. 56(2): 106-109.

EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). 2011. EFSA Journal. 9(3): 1-378.

Eijsink, V. G. H., Brurberg, M. B., Middelhoven, P. H., and Nes, I. F. 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. Journal of Bacteriology. 178: 2232-2237.

Ennahar, S.K., Sonomoto, A. and Sashihara,T. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. FEMS Micribiol.Rev. 24: 85-106.

Fang, T.J, Wei, Q.K., Liao, C.W., Hung, M.J. and Wang, T.H. 2003. Microbiological quality of 18 °C ready-to-eat food products sold in Taiwan. International Journal of Food Microbiology.80: 241- 250.

Farber, J.M., Peterkin, P.I., 1991. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. Microbiol. 55: 476-511.

Faye, T., Langsrud, T., Nes, I. F., and Holo, H. 2000. Biochemical and genetic characterization of propionicin T1, a new bacteriocin from Propionibacterium thoenii. Applied and Environmental Microbiology. 66: 4230-4236.

Ferchichi M., Frère, J., Mabrouk, K. and Manai, M. 2001. Lactococcin MMFII, a novel class IIa bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* MMF II, isolated from a Tunisian dairy product. FEMS Microbiol. 205: 49-55.

Fisher, K., Phillips, C. 2009. The ecology, epidemiology and virulence of *Enterococcus*. Microbiology 155, 1749-1757.

Fleming, H.P., Etchells, J.L. and R.L. 1975. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. Appl. Microbiol. 30:1040-1042.

Forntaine E.A., Clajdon, E. and Tayler-Robinson, D. 1996. *Lactobacilli* from women with without bacterial vaginosis and observation on the significance of hydrogen peroxide. Curr. Mirobiol. 60: 253-260.

Foulquie Moreno, M.R., Callewaert, R., Devreese, B., Van Beeumen, J. and De Vuyst, L. 2003. Isolation and biochemical characterisation of enterocins produced by *Enterococci* from different sources. J. Appl. Microbiol. 94: 214-229.

Franz, C.M.A.P., Du Toit, M., Olasupo, N.A., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1998. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad. Lett. Appl. Microbiol. 26: 231-235.

Franz, U., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1996. Production and characterization of enterocin 900, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* BFE 900 from black olives. Int. J. Food Microbiol.29: 255-270.

Freitag, N.E., Port, G.C., Miner, M.D. 2009. *Listeria monocytogenes*-from saprophyte to intracellular pathogen. Nature Reviews. Microbiology. 7: 623-628.

Garneau, S., MartinN. I. and Vederas, J. C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie. 84: 577-592.

Gill, C.O., Reichel, M.P., 1989. Growth of the cold-tolerant pathogens *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonashydrophila* and *Listeria monocytogenes* on high pH-beef packaged under vacuum or carbon dioxide. Food Microbiol. 6: 223-230.

Gilliland, S.E. and Speck, M.L. 1997. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative culture. J. Food Prot. 40: 820-823.

Gilmour. W., Graham. M., Domselaar, G., Tyler, S., Kent, H., Trout-Yakel, M., Larios, O., Allen, V., Lee, B. and Nadon, C. 2010. High-throughput genome sequencing of two *Listeria monocytogenes* clinical isolates during a large foodborne outbreak. Bio Med Center.11: 120.

Gonzalez-Fandos, E. and. Dominguez, J.L. 2006. Efficacy of lactic acid against *Listeria monocytogenes* attached to poultry skin during refrigerated storage. J. Appl. Microbiol. 101(6): 1331-1339.

Grajek, W., Bobowicz-Lassocinda, T. and Sip, A. 1996. Production of bacteriocin by *Carnobacterium divergens* grown in culture media containing hydrolysates of whey, casein and malt roots.Polish Journal of Food and Nutrition Sciences. 46(5):75-84.

Gram, L. and Huss, H.H., 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology 33: 121-137.

GrothLaursen, B., Baya, L., Cleenwerck, L., Vancanneyt, M., Swingsb, J., Dalgaard, P. and Jorgen Leisner, J. 2005. *Carnobacterium divergens* and *Carnobacterium maltaromaticum* as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. Systematic and Applied Microbiology. 28: 151-164.

Gursky, L.J.J., Rivard, D.R., Stiles, M.E. and McMullen, L.M. 2002. Production of antibacterial compounds by *Carnobacterium piscicola* UAL26 is temperature dependent. Book of Abstracts of Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Application. 1-5 September 2002. Egmondann Zee, The Netherland: Abstract No. C17.

Hardie, J.M. and Whiley, R.A. 1995. The Genus *Streptococcus*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2: 55-124.

Hardwood, V.J., Whitlock, J. and Withighton, V., 2000. Classification of antibiotic resistance patterns of indicator bacteria by discriminant analysis: use in predicting the source of fecal contamination in subtropical waters. Appl. Environ. Microbiol. 66, 3698-3704.

Harrigan, W.F. 1998. Laboratory Method in Food. Microbiology Applied Microbiology and Biotechnology. 3: 346-348.

Hoover, D.G. and Harlander, S.K. 1993. Screening methods for detecting bacteriocin activity. In Bacteriocins of lactic acid bacteria, D.G. Hoover and L.R Steenscr, editors. Academic press, California, USA., pp.23-39.

Huber, I., Spanggaard, B., Appel, K. F., Rossen, L., Nielsen, T. and Gram, L. 2004. Phylogenetic analysis and *in situ* identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). J Appl Microbiol, 96: 117-132.

Hugenholtz, J. 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. 12: 165-178.

Hurst, A. 1981. Nisin, In D. Perlman and A.I. Laskin, eds. Adv. Appl. Microbiol. Academic Press, Inc., New York. pp. 85-123.

Hyronimus, B., Le Marrec, C. and Urdaci, M. C. 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I_4 . J. Appl. Microbiol. 85: 42-50.

Ikeda, T., Iwanami, T., Hirasawa, M C., Watanabe, M., McGhee, J.R. and Shiota, T. 1982. Purification and certain properties of a bacteriocin from *Streptococcus mutans.* Infect. Imm. 35: 861-868.

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

Jay, J.M. 1996. Modern Food Microbiology. International Thomson Publishing. 71: 110-113.

Joborn, A., Dorsch, M., Olsson, J. C., Westerdahl, A. and Kjelleberg, S. 1999. *Carnobacterium inhibens* sp. nov., isolated from the intestine of Atlantic salmon *(Salmosalar)*. Int J Syst Bacteriol. 49: 1891-1898.

Leisner, J.J, Laursen, B.G., Prevost, H., Drider, D. and Dalgaard, D. 2007.*Carnobacterium* : positive and negative effects in the environment and infoods. FEMS Microbiol. 31: 592-613.

Juven, B and Pierson, M. D. 1996. Antibacterial effects of H_2O_2 and methods for its detection and quantitation. J. Food Prot. 59: 1233-1241.

Kelly, W. J., Asmundson, R. V. and Huang, C. 1996. Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 81: 657-662.

Kim, W.S., Hall, R.J. and Dunn, N.W. 1997. Improving Nisin Production by Increasing Nisin Immunity Resistance Genes in the Producer Organism *Lactococccus lactis*. J. Appl. Microbiol Applied. 50: 429-433.

Kim, W. S., Hall, R. J. and Dunn, N. W. 1997. The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis*. Applied Microbiology and Biotechnology. 50: 429-433.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. 12: 39-86.

Klaenhammer, T.R. 1998. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 70: 337-349.

Kong, S. and A. J. Davison. 1980. The role of interactions between O_2, H_2, OH^-, e^- and O_2^- in free radical damage to biological systems. Arch. Biochem. Biophys. 204: 18-29.

Koutsoumanis, K. and Nychas, G.J., 2000. Application of a systematic experimental procedure to develop a microbial model for rapid fish shelf life predictions. International Journal of Food Microbiology 60: 171-184.

Laukova, A. and Juris, P., 1997. Distribution and characterization of *Enterococcus* species in municipal sewages. Microbios 89, 73-80.

Laursen, B. G., Bay, L., Cleenwerck, I., Vancanneyt, M., Swings, J., Dalgaard, P. and Leisner, J. J. 2005.*Carnobacterium divergens*and *Carnobacterium maltaromaticum*as spoilers or protective cultures in meat and seafood: phenotypic and genotypic characterization. Syst Appl Microbiol. 28: 151-164.

Lawson, L. 2007.*Vagococcus elongates* sp. Isolated from a Swine-manure Storage Pit. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 52: 751-754.

Lee, H., Hongsup, Y., Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, H.S., Holzapfel, W. 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from Kimchi. International Journal of Food Microbiology. 145: 155-161.

Leisner, J.J, Laursen, B.G., Prevost, H., Drider, D. and Dalgaard, P. 2007,*Carnobacterium* :positive and negative effects in the environment and in foods, FEMS Microbiol Rev. 31: 592-613.

Leroy, F. and De Vuyst, L. 2002.Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZS C5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. Int. J. Food Microbiol.72: 155-164.

Lewus, C.BK., Kaiser, A. and Montville, T.J. 1991. Inhibition of food-borne bacterialpathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1683-1688.

Lewus, C.B., SunS. and T.J. Montville. 1992. Production of an amylase-sensitive bacteriocin by and atypical *Leuconostoc paramesenteroides* strain. Appl. Environ. Microbiol.58: 143-149.

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

Lorian, V. 1996.Antibiotics in laboratory medicine. 4th Edn., London, William and Wilkins. pp: 1-49.

Lovett, J., Francis, D. W. and Bradshaw, J. G. 1990. Outgrowth of *Listeria monocytogenes* in foods.In A.J. Miller, J.L. Smith and G.A. Somkuti, editors. Foodborne listeriosis. New York, U.S.A., pp. 183-187.

Manero, A. and Blanch, A.R., 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. Appl. Environ. Microbiol. 65, 4425-4430.

Mathur, S., Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. International Journal of Food Microbiology. 105: 281- 295.

Martin-Visscher, A., Belkum, J., Garneau-Tsodikova, S., Randy, M., Whittal, Zheng, J., McMullen, M., and Vederas, C. 2008. Isolation and Characterization of Carnocyclin A, a Novel Circular Bacteriocin Produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307. Applied and Environmental Microbiology. 75(15): 4756-4763.

Martinez-Lorenzo, M.J., Meresse, S., Chasteller, C. de.and Gorvel., J.P. 2001. Unusual intracellular trafficking of *Salmonella typhimurium* in human melanoma cell. Cellular Microbiology 3(6): 407-416.

Martinez-Cuesta, M. C., Buist, G., Kok, J., Hauge, H. H., Nissen-Meyer, J., Pelaez, C., and Requena, T. 2000.Biological and molecular characterization of a two-peptide lantibiotics produced by *Lactococcus lactis* IFPL105. J. Appl. Microbiol. 89: 249-260.

Matamoros, S., Pilet, M.F.,Gigout, F., Prevost, H. and Leroi F. 2009. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. Food Microbiology 26: 638-644.

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.

Matsusaki, M. 1996. Lantibiotic Nisin Z Fermentative Production by *Lactococcus lactis* IO-I.Relationship between Production of the Lantibiotic and Lactate and Cell Growth. Applied Microbiology and Biotechnology 45: 36-40.

Mattick, A.T.R., Hirsch, A. 1947. Further observations on an inhibitory substance(nisin) from lactic streptococci. Lancet. 2: 5-8.

Mauguin, S. and Novel, G. 1994. Characterization of lactic acid bacteria isolated from seafood. Journal of Applied Bacteriology. 76: 616-625.

Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M.B., Boknaes, N., Koort, J., Bjorkroth,

J. and Dalgaard, P. 2008. Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). Int. J. Food Microbiol. 124: 250-259.

Merck. 2000. Microbiology Manual2000. Merck KgaA, Darmstadf. pp. 148.

Mortvedt, Cl. 1991. Purification and Amino Acid Sequence of Lactic S a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus sake* L45. Applied and Environmental Microbiology 57: 1829-1834.

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

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

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

Naghmouchia, K., Kheadra, E., Lacroixc, C. and Fliss, I. 2007. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. Food Microbiology. 24: 718-727

Nair, P.S. and Surendran, P.K. 2004. Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from fish and prawn. Journal of Culture Collections. 4: 48-52.

Nanasombat, S., Phunpruch, S. and Jaichalad, T. 2012. Screening and identification of lactic acid bacteria from raw seafoods and Thai fermented seafoods for their potential use as starter cultures. Songklanakarin J. Sci. Technol. 34 (3): 255-262.

Niku-Paavola, M.L., Latva-Kal, K., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. and Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. Journal of Applied Microbiology, 86: 29-35.

Nilsson, L., Ng,Y.Y., Christiansen, J.N., Jorgensen, B.L., Grotinum, D. and Gram, L. 2004. The contribution of bacteriocin to inhibition of *Listeria monocytogenes* by *Carnobacterium piscicola* strains in coldsmoked salmon systems. J. Appl. Microbiol. 96: 133-143.

Nilsson, L., Gram, L. and Huss, H.H. 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes*on coldsmoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. J. Food Prot.62: 336-342.

Norhana, M.N.W., Poole, S.E., Deeth, H.C., Dykes, G.A. 2010. Prevalence, persistence and control of *Salmonella* and *Listeria* in shrimp and shrimp products: a review. Food Control 21: 343-61.

Ocana, V. S. De Ruizz Holgado, A. P. and Nader-Macfas, M.E. 1999. Selection of vaginal H_2O_2-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. Curr. Microbiology. 38: 279-284.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. Afr. J. Biotechnol. 2(8): 219-227.

O'Driscoll, B., Gahan, C.G.M., Hill, C., 1996. Adaptive acid tolerance response in *Listeria monocytogenes*: isolation of an acid-tolerant mutant which demonstrated increased virulence. Appl. Environ. Microbiol. 62: 1693-1698.

Osmanagaoglu, O. 2003. Behaviour and biological control of bacteriocin-producing *Leuconostocs* Associated with Spoilage of Vacuum-Packaged Sucuk. Turk. J. Vet. Anim. Sci.27: 471-480.

Osmanagaoglu, O., Beyatli, Y. and Gunduz, U. 2001. Isolation and characterization of pediocin producing *Pediococcus pentosaceus* Pep1 from vacuum-packed sausages. Turk. J. Biotechnol.25: 133-143.

Ouwehand A.C. and S. Vesterlund. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 375-395. *In* S. Salminen, A. Von Wright and A. Ouwehand, eds. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., New York.

Pantev, A., P. Kabadjova, R. Valcheva, M. Dalgalarrondo, H. Rabensona, T. Haertle, J.M. Chobert and I. Ivanova. 2002. Biological and physico-chemical characterization of antibacterial substance produced by *Enterococcus faecium* A2000. Book of Abstracts of Seventh Symposium on Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Application. 1-5 September 2002. Egmondann Zee, The Netherland: Abstract No. C25.

Parente, E. and Hill, C. 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium*inhibitory to *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 55: 497-502.

Parente, E. and Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Applied Microbiology and Biotechnology. 52: 628-638.

Park, H.S., Marth, E.H. and Olson, N.F. 1973. Fate of enterophatogenic strains of *Escherichia coli* during manufacture and ripening of Camembert cheese. J. Milk Food Technol. 36: 543-546.

Pereira, C.I., Barreto Crespo, M.T. and San Romao, M.V. 2001. Evidence for proteolytic activity and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus*and *L. homohiochii*. Int. J. Food. Microbiol.68: 211-216.

Petersen, A. and Dalsgaard, A. 2003. Antimicrobial resistance of intestinal *Aeromonas*spp. And *Enterococcus* spp. in fish cultured in integrated broiler-fish farms in Thailand. Aquaculture 219, 71-82.

Piard, J.-C., F. Delorme, G. Giraffa, J. Commissaire and M. Desmazeaud. 1990. *Cited by* L.D. Vuyst and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, p. 117. *In* L.D. Vuyst and E.J. Vandamme.Bactreiocin of Lactic Acid Bacteria. Chapman and Hall, Glasgow, UK.

Pilasombat, K., Sakpuarum, T., Wajjwalku, W., Nitisinprasert, N., Swetwiwathana, A., zendo, T., Fujita, K., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. Purification and amino acid sequence of a bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine. Songklanakarin J. Sci. Technol. 28: 121-131.

Pilet, M.F., Dousset, X., Barre, R., Novel, G., Desmazeaud, M. and Piard, J.C. 1995. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens*isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot.58: 256-262.

Price, R.J. and Lee, J.S. 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. J. Milk Food Technol. 33: 13-18.

Quiao, M. 1997. Isolation of a *Lactococcus lactis* Strain with High Resistance to Nisin and Increased Nisin Production. Biotechnology Letter. 19: 199-202.

Quigg, A., Broach, L., Denton, W. and Miranda, R., 2009. Water quality in the Dickinson Bayou watershed (Texas, Gulf of Mexico) and health issues. Mar. Pollut. Bull. 58, 896-904.

Randy, M., Whittal, Jing Zheng, Lynn, L., McMullen, M., John, C., Vederas, J., Leisner, J., Laursen, B. G., Prevost, H., Drider, D. and Dalgaard, P. 2007.*Carnobacterium*: positive and negative effects in the environment and in foods. FEMS Microbiol. 31: 592-613.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. 2000. A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis*subsp. *lactis*isolated from Thai fermented foods. ScienceAsia.26: 195-200.

Ray, B. 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as food preservative. In Food Biopreservation of Microbial Origin. Pp. 177-205. (Ray, B. and Daeschel, M. eds.) CRC Press. USA.

Rice, E.W., Messer, J.W., Johnson, C.H., Reasoner, D.J., 1995. Occurrence of high-level aminoglycoside resistance in environmental isolates of *enterococci*. Appl. Environ. Microbiol. 61, 374-376.

Ringo, E. and Gatesoupe, F.J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture. 160: 177-203.

Ringo, E., Wesmajervi, M.S., Bendiksen, H.R., Berg, A., Olsen, R.E., Johnsen, T., Mikkelsen, H., Seppola, M., Strom, E. and Holzapfel, W. H. 2001. Identification and characterization of *Carnobacteria* isolated from fish intestine. Syst Appl Microbiol. 24: 183-191.

Rogers, L.A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. J. Bacteriol. 16: 321-325.

Ross, R.P., Morgan, S. and Hill, C. 2002. Preservation and fermentation: past, present and future. Int.J. Food Microb.79: 3-16.

Rubin, H.E. 1973. Taxicological model for a two-acid system. Appl. Environ. Microbiol.36: 623-624.

Saldar, A., Armstrong, D., 2003. Antimicrobial activities against 84 Listeria monocytogenes isolated from patients with systemic listeriosis at a comprehensive cancer center (1955-1997). J. Clin. Microbiol. 41: 483-485.

Samarzija, D., Zamberlin, S., Pogcic, T. 2012. Psychrotrophic bacteria and milk and dairy products quality. Mljekarstvo *62*(2): 77-95.

Sarantinopoulos, P., Leroy, F., Leontopoulou, E., Georgalaki, M.D., Kalantzopoulos, G., Tsakalidou, E. and De Vuyst, L. 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* FAIR-E 198 in view of its application as adjunct starter in Greek Fetacheese making. Int. J. Food Microbiol.72: 125-136.

Schillinger, U. and Lucke,F. K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and environmental microbiology, 1901-1906.

Schieifer, K.H. and Ludwing, W. 1995. Phylogenetic Relationship of Lactic Acid Bacteria. Blackie Academic & Professional. 13: 125-130.

Schinik, B. 1999. Habitats of Prokaryotes.In Joseph W. Lengeler. Gerhard Drews Hans G. Schlegel, Blackwell Science (Eds.), U knizi: Biology of Prokaryotes. Blackwell Science, New York. pp. 763-801.

Schved, F., Lalazar, A., Henis, Y.and Juven., B.J. 1993. Purification, partial characterization and plasmid-linkage of pediocin SJ-1, A bacteriocin produce by *Pediococcus acidilactici*. J. Appl. Bacteriol. 74: 67-77.

Shakila, R.J., Vasundhara, T.S. and Kumudaually, K.V. 2001. A comparison of the TLC - densitometry and HPLC method for the determination of biogenic amines in fish and fishery products. Food Chem. 75: 255-259.

Shiflett, M. A., Lee, J. S. and Sinnhuber, R. O. 1966.Microbial flora of irradiated dungeness crab meat and pacific oysters. Applied and Environmental Microbiology. 14: 411-415.

Silva, M., Jacobus, N.V., Deneke, C. and Gorbach, S.L..1987. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. Antimicrobial. Agents Chemother, 31: 1231-1233.

Sobrino, O. J., Rodriguez, J. M., Moreira, W. L., Sanz, B. and Hernandez, P. E. 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. J. Food Microbiol. 13: 1-10.

Stile, M.E. and Hastings, H. 1991. Lactic Acid Bacteria of Foods and their Current Taxonomy. International of Food Microbiology 36: 1-29.

Stlies, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic Acid Bacteria of Foods and their Current Taxonomy. International Journal of Food Microbiology. 36: 1-29.

Stoffels, G. Nissen-Meyer, J., Gudmundsdottir, A., Sletten, K., Holo, H. and Nes, I.F. 1992. Purification and characterization of a new bacteriocin isolated from a *Carnobacterium*s p. Appl. Environ. Microbiol. 58: 1417-1422.

Surekha, M., Reddy, S.M., 2000.Preservatives.Classification and properties. In: Robinson, R.K., Batt, C.A., Patel, C. (Eds.), Encyclopedia of Food Microbiology. New York Academic Press, pp. 1710-1717.

Suzzi, G. and Gardini, F. 2003. Biogenic amines in dry fermented sausages: A review. Int. J. Food. Microbiol. 88: 41-54.

Su, Y.C., Liu, C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiology. 24: 549-558.

Tagg, J.R., Dajani, A.S., and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. The Journal of Applied Bacteriology. 40: 722-756.

Tahara, T. and Kanatani, K. 1996. Isolation, partial characteristization and mode of action of acidocin J 1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. J. Appl Microbiol. 81: 669-677.

Tahiri, I., Desbiens, M., Lacroix, C., Kheadr, E. and Fliss, I. 2009. Growth of *Carnobacterium divergens* M35 and production of Divergicin M35 in snow crab by-product, a natural-grade medium. LWT-Food Science and Technology. 42: 624-632.

Tannock, G.W., Cook, G., 2002. *Enterococci* as members of the intestinal microflora of humans. In: Gilmore, M.S. (Ed.), The *Enterococci:* Pathogenesis, Molecular Biology and Antibiotic Resistance. ASM Press, Washington, DC, pp. 101-132.

Tapingkaea, W., Tanasupawatb, S., Parkinc, L., Benjakula, S. and Visessanguan, W.2010. Degradation of histamine by extremely halophilic archaea isolated from highsalt-fermented fishery products. Enzyme and Microbial Technology. 46: 92-99.

Teuber, M. 1995. The Genus *Lactococcus*. Blackie Academic & Professional. 3: 173-234.

Thapa, N., Pal, J. and Tamang, J.P. 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayas. Int. J. Food Microbiol. 107: 33-38.

Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. 2005. Lactobacillus plantarun isolated from molasses produces bacteriocin active against Gram negative bacteria. Enz. Microbiol. Technol. 36: 318-326.

THAIFEX - World of Food Asia. 2013. The top meeting place for global players of the food and beverage industry. Retrieved November 20, 2013, from http://www.koelnmesse. com.

Tichaczek, P., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F., and Hammes, W. P. 1992. Characterization of the bacteriocinscurvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH1174 and sakacin P from *Lactobacillus sake* LTH673. Systems of Apply Microbiology. 15: 460-468.

Tramer, J. 1966. Inhibitiory effect of *Lactobacillus acidophilus*.Nature. 211: 204-205.

Upreti, G.C. and R.D. Hinsdill. 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Cited by* L.D. Vuyst and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, p. 111. *In* L.D. Vuyst and E.J. Vandamme, eds. Bactreiocin of Lactic Acid Bacteria. Chapman and Hall, Glasgow, UK.

Valdivia, E., Martin-Sanchez, I., Quirantes, R., Martinez-Bueno, M., Galvez,A.,Maqueda, M., 1996. Incidence of antibiotic resistance and sex pheromone response among *enterococci* isolated from clinical human samples and from municipal waste water. J. Appl. Bacteriol. 81, 538-544.

Varnam, A.H. and Sutherland, J.P., 1995. Meat and Meat Products:Technology. Chemistry and Microbiology. Chapman & Hall, London.

Verschuere, L. Rombaut, G., Sorgelooos, P. and Verstraete, W. 2000.Probiotic bacteria as biological control agent in aquaculture.Microbial. Mol. Biol. R. 64: 655-671.

Wagner, M. K. and L. J. Moberg. 1989. Present and future use of traditional antimicrobials. Food Tech. 43: 143-147.

Wan Norhana, M.N., Susan Poole, E., Hilton Deeth, C. and Gary Dykes, A. 2012. Effects of Nisin, EDTA and salts of organic acid on *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* and native microflora on fresh vacuum packaged shrimps stored at 4 ˚C. Food Microbiology 31: 43-50.

Williams, R.E.O., Hirch, A. and Cowan, S.T. 1953. *Aerococcus* a New Bacterial Genus. Journal of General Microbiology. 8: 475-480.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. Journal of General Microbiology. 12: 161-162.

Yang, G., Bao, B., Peatman, E., Li, H., Huang, L. and Ren, D. 2007. Analysis of the composition of the bacterial community in puffer fish *Takifugu obscures*. Aquaculture. 262: 183-191.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Factors influencing Production of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. Food Microbiology. 11: 281-291.

Zalan, Z., Nemeth, E., Barath, A. and Halasz, A. 2005. Influence of growth medium on hydrogen peroxide and bacteriocin production of Lactobacillus strains. Food Technol. Biotechnol. 43: 219-225.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. MRS (de Man Rogasa and sharpe) broth

Peptone	10.00	g
Meat extract	10.00	g
Yeast extract	5.00	g
Glucose	10.00	g
Tween 80	1.00	g
K_2HPO_4	2.00	g
Sodium acetate	2.00	g
di-Ammonium citrate	0.20	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. MRS (de Man Rogasa and sharpe) agar

Peptone	10.00	g
Meat extract	10.00	g
Yeast extract	5.00	g
Glucose	10.00	g
Tween 80	1.00	g
K_2HPO_4	2.00	g
Sodium acetate	2.00	g
di-Ammonium citrate	0.20	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	g
Agar	15.00	g

Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Tryptic soy broth (TSB)

Tryptone	17.0	g
Soytone	3.0	g
Dextrose	2.5	g
Sodium chloride	5.0	g
Dipotassium phosphate	2.5	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Tryptic soy agar (TSA)

Tryptone	17.0	g
Soytone	3.0	g
Dextrose	2.5	g
Sodium chloride	5.0	g
Dipotassium phosphate	2.5	g
Agar	15.00	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.3 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. Bacteriocin screening medium (BSM)

tri-Ammonium citrate	2.00	g
Beef extract	2.00	g
Tryptone	10.00	g
Tween 80	1.00	g
Yeast extract	4.00	g
K_2HPO_4	8.70	g
KH_2HPO_4	8.00	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.20	g
$MnSO_4.4H_2O$	0.05	g
Glucose	2.00	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. M17 medium + Glocose

di-Sodium β-glucophosphate	19.00	g
Beef extract	5.00	g
Lactose	5.00	g
Glucose	10.00	g
Soy peptone	5.00	g
Tryptone	2.50	g
Yeast extract	2.50	g
Acorbic acid	0.50	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.25	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.2 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. APT broth

Enzymatic digest of casein	10	g
Yeast extract	7.5	g
Sodium chloride	5	g
Potassium phosphate	5	g
Sodium citrate	5	g
Dextrose	10	g
Polysorbate 80	0.2	g
Magnesium sulfate	0.8	g
Manganese chloride	0.14	g
Ferrous sulfate	0.04	g
Sodium carbonate	1.25	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.7 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Plate Count Agar (Standard Methods Agar)

Peptone	5	g
Yeast extract	2.5	g
Dextrose	1.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. Tryptone Broth

Casein enzymic hydrolysate	10	g
Sodium chloride	5	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.5 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. Mueller Hinton Agar

Beef extract	2	g
Acid hydrolysate of casein	17.5	g
Starch	1.5	g
Agar	17	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.3 ± 0.1 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

11. Columbla blood agar

Special peptone	23.0	g
Starch	1.0	g
Sodium chloride	5.0	g
Agar	10.0	g
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.3 ± 0.2 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที และเติมเลือดมนุษย์ 5% (v/v)

12. Improved medium (Bover-Cid and Holzapfel, 1999)

Glucose	0.5	g
Tryptone	5.0	g
Yeast extract	5.0	g
Beef extract	5.0	g
Sodium chloride	2.5	g
Ammonium citrate	2.0	g
Thiamine (B1)	0.01	g
Pyridoxal-5-phosphate	0.05	g
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	g
$MnSO_4$	0.05	g
$FeSO_4$	0.04	g
K_2HPO_4	2.0	g
$CaCO_3$	0.1	g
Bromocresol purple	0.06	g
Amino acid (histidine or tyrosine)	10.0	g
Tween 80	1.0	mL
Distilled water	1,000	mL

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.3 ± 0.05 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 115 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและการวิเคราะห์สมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก

1. Crystal violet

สารละลาย A ละลาย Crystal violet 2.0 กรัม ใน 96% ethyl alcohol ปริมาตร 2 มิลลิลิตร สารละลาย B ละลาย ammonium oxalate 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร

2. Gram iodine

บดไอโอดีน 1.0 กรัม และ potassium iodine 2.0 กรัม เข้าด้วยกันแล้วค่อย ๆเติมน้ำกลั่นลงไปผสมจะกระทั่งไอโอดีนละลาย เติมน้ำกลั่นปริมาตร 300 มิลลิลิตร เก็บในขวดสีชา

3. Safranin

ละลาย Safranin 0.25% (w/v) ใน 95% ethyl alcohol ปริมาตร 10 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 มิลลิลิตร

4. น้ำยาทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (ร้อยละ 3 H_2O_2)

สารละลาย H_2O_2 (ร้อยละ 35) 8.6 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร เมื่อเตรียมเสร็จให้นำไปใส่ในขวดสีชาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. สารละลาย 1N NaOH

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้นประมาณ 1.0 N ปริมาตร 250 มิลลิลิตร จึงต้องชั่ง NaOH มา 10 กรัม ใส่ในบีกเบอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วเทลงไปในขวดวัดปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นบรรจุอยู่แล้วประมาณ 50 มิลลิลิตร จากนั้นค่อย ๆ เติมน้ำกลั่นลงไปให้มีปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร

6. สารละลาย 1N HCl

เตรียมจากกรด HCl เข้มข้น 37 % (w/w) ที่มีความเข้มข้น 12.06 N ประมาณ 20.00-21.00 มิลลิลิตร โดยใช้ปิเปตขนาด 25 มิลลิลิตร ดูดไปใส่ในขวดวัดปริมาตร ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีน้ำกลั่นอยู่พอประมาณ (100 มิลลิลิตร) จากนั้น ค่อยเติมน้ำลงไปให้มีปริมาตรครบ 250 มิลลิลิตร

วิธีการย้อมสีแกรม (ดวงพร, 2537)

1. ทำการเกลี่ยเชื้อ (smear) ที่ต้องการย้อมสีบนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบาง ๆไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry)

2. ตรึงเชื้อ (fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ โดยการผ่านสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้วไปบนเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง เพื่อไม่ให้เชื้อหลุดออกขณะย้อมสี

3. หยด Crystal violet บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง

4. หยด Gram iodineบนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาทีแล้วเทสีทิ้ง

5. หยดเอทิลแอลกฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด จากนั้นทำการหยดสี Safraninบนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง ล้างน้ำสะอาด และซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การทดสอบคะตะเลส (ดวงพร, 2537)

1. เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งอายุระหว่าง 18-24 ชั่วโมง ด้วย loop ที่ลนไฟแล้ว เกลี่ยเชื้อลงบนแผ่นสไลด์

2. หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อ สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

สังเกตผล ถ้าหากเกิดฟองก๊าซขึ้น แสดงว่าได้ผลบวก (จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์แคตะเลส)

ถ้าหากเกิดไม่ฟองก๊าซขึ้น แสดงว่าได้ผลลบ (จุลินทรีย์ไม่ผลิตเอนไซม์แคตะเลส)

ข้อควรระวัง อย่าให้ลูปโลหะสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ อาจทำให้เกิดผลบวกเท็จ

ภาคผนวก ค

ตาราง ค. แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาการติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง BSM ที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ

ชนิดอาหารทะล	ไอโซเลทที่แยกได้ที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			Catalase test
			การติดสีแกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	
ปลากะพง	FSR-L1903	35	บวก	แท่งสั้น	สายยาว	-
	FSR-L1904		บวก	แท่งสั้น	สายยาว	-
	FSR-L1906		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	FSR-L1908		บวก	แท่งสั้น	สายยาว	-
	FSR-L1909		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	FSR-L19011		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	FSR-L19012		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	FSR-L19013		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	FSR-L19014		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	FSR-L19015		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	FSR-L19016		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	FSR-L19020		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	L-FSR-L25103	8	บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
หอยหวาน	HYL 20104	35	บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	HYL 20106		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	HYL 20107		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	HYL-L5101		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	HYL-L5102		บวก	แท่งยาว	เป็นคู่	-
	HYL-L5103		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	HYL-L5104		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	HYL-L5106		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	HYL-L5107		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	HYL-L5108		บวก	แท่งยาว	เป็นคู่	-
	L-HY-L 25101	8	บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-HY-L 25102		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-HY-L 25103		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-

ตารางที่ ค. (ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาการติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง BSM ที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ

ชนิดอาหารทะล	ไอโซเลทที่แยกได้	ที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			Catalase test
			การติดสีแกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	
หอยหวาน	L-HY-L 25104	8	บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HY-L 25105		บวก	แท่งยาว	กระจาย	-
	L-HY-L 25106		บวก	แท่งยาว	กระจาย	-
	L-HY-L 5102		บวก	แท่งสั้น	กระจาย	-
	L-HY-L 5103		บวก	แท่งสั้น	กระจาย	-
	L-HY-L 5104		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-HY-L 5105		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-HY-L 5106		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-HY-L 5107		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-HY-L 51010		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
ปูม้า	POL 20101	35	บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	POL 20102		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	POL 20103		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	POL 20106		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	POL 20107		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
	POL 20108		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
	POL 20109		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	POL 201010		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	POL 201011		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	POL 201012		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	POL 201013		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	POL 201014		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	POL 201015		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	POL 201016		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-

ตารางที่ ค. (ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาการติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง BSM

ชนิดอาหารทะล	ไอโซเลทที่แยกได้	ที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			Catalase test
			การติดสีแกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	
ปูม้า	L-POL 25101	8	บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
	L-POL 25102		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
	L-POL 25104		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-POL 25107		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-POL 25108		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-POL 251010		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
ปลาหมึก	SQ-C 11103	35	บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	SQ-C 11104		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	SQ-C 11105		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	SQ-C 11106		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	SQ-C 11107		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	SQ-C 11108		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	SQ-C 11109		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	SQ-C 111010		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	SQ-L 5101		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	SQ-L 5102		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	SQ-L 5103		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	SQ-L 5104		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	SQ-L 5105		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	SQ-L 5106		บวก	แท่งยาว	เป็นคู่	-
	SQ-L 5107		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	SQ-L 5108		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	SQ-L 5109		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	SQ-L 51010		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-

ตารางที่ ค. (ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาการติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง BSM ที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ

ชนิดอาหารทะล	ไอโซเลทที่แยกได้ที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			Catalase test
			การติดสีแกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	
ปลาหมึก	L-SQ-L 25108	8	บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-SQ-L 25104		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
	L-SQ-L 25103		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-SQ-L 30107		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-SQ-L 30108		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-SQ-L 30109		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-SQ-L 10101		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
	L-SQ-L 10107		บวก	กลม	เป็นสาย	-
ปลาโอญี่ปุ่น	FSO-B 21103	35	บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	FSO-B 21104		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	FSO-B 21105		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	FSO-B 21108		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	FSO-B 21109		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	L-FSO-B 31103	8	บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
ปลาจาระเม็ด	FSJ-L 5101	35	บวก	กลม	เป็นสาย	-
	FSJ-L 5102		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	FSJ-L 5103		บวก	แท่งยาว	เป็นคู่	-
	FSJ-L 5104		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	FSJ-L 5105		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	FSJ-L 5106		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	FSJ-L 5107		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	FSJ-L 5108		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	L-FSJ-L 10101	8	บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-

ตารางที่ ค. (ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาการติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง BSM ที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ

ชนิดอาหารทะล	ไอโซเลทที่แยกได้ที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			Catalase test
			การติดสีแกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	
ปลาจาระเม็ด	L-FSJ-L 10108	8	บวก	กลม	เป็นสาย	-
	L-FSJ-L 10109		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
กุ้งก้ามกราม	SHK-L 5101	35	บวก	กลม	เป็นสาย	-
	SHK-L 5102		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	SHK-L 5103		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	SHK-L 5104		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	SHK-L 5105		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	SHK-L 5106		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	SHK-L 5107		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	SHK-L 5108		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	SHK-L 5109		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	SHK-L 51010		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L- SHK-L 10101	8	บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L- SHK-L 10102		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L- SHK-L 10103		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L- SHK-L 10104		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L- SHK-L 10105		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L- SHK-L 10106		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L- SHK-L 10107		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	L- SHK-L 10108		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
	L- SHK-L 10109		บวก	กลม	เป็นคู่	-
หอยลาย	HYL-L 5101		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-

ตารางที่ ค. (ต่อ) แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาการติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง BSM ที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ

ชนิดอาหารทะล	ไอโซเลทที่แยกได้	ที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			Catalase test
			การติดสีแกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	
หอยลาย	HYL-L 5102	35	บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	HYL-L 5103		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	HYL-L 5104		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	HYL-L 5105		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	HYL-L 5106		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	HYL-L 5107		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	HYL-L 5108		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	HYL-L 5109		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	HYL-L 51010		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HYL-L10101	8	บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HYL-L10102		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HYL-L10103		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HYL-L10104		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HYL-L10105		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HYL-L10106		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HYL-L10107		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HYL-L10108		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	L-HYL-L10109		บวก	กลม	เป็นคู่	-
	L-HYL-L101010		บวก	กลม	เป็นคู่	-
ปลาเก๋า	FSK 5101	35	บวก	กลม	เป็นสาย	-
	FSK 5102		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	FSK 5103		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	FSK 5104		บวก	แท่งสั้น	เป็นสาย	-
	FSK 5105		บวก	กลม	เป็นสาย	-

ตารางที่ ค. (ต่อ)แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาการติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ catalase ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น ที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง BSM ที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 3-7 วัน ตามลำดับ

ชนิดอาหารทะล	ไอโซเลทที่แยกได้ที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)		ลักษณะทางสัณฐานวิทยา			Catalase test
			การติดสีแกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	
ปลาเก๋า	FSK 5106	35	บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	FSK 5107		บวก	แท่งยาว	เป็นคู่	-
	FSK 5108		บวก	แท่งยาว	เป็นคู่	-
	FSK 5109		บวก	แท่งยาว	เป็นสาย	-
	FSK 51010		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	L-FSK-L 5102	8	บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-FSK-L 5103		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-FSK-L 5106		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
	L-FSK-L 5107		บวก	แท่งสั้น	เป็นคู่	-
	L-FSK-L 5108		บวก	แท่งยาว	เป็นคู่	-
	L-FSK-L 5109		บวก	กลม	เป็นสาย	-
กุ้งขาว	L-SH-L 25103	8	บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	L-SH-L 25104		บวก	แท่งสั้น	เดี่ยว	-
	L-SH-B 31107		บวก	แท่งยาว	เดี่ยว	-
	L-SH-B 31109		บวก	กลม	เป็นสาย	-
	L-SH-B 31110		บวก	กลม	เป็นคู่	-

หมายเหตุ: - หมายถึง คะตะเลสเป็นลบ

ภาคผนวก ง

ตาราง ง. การเจริญของแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ในอาหาร BSM broth เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4 องศาเซลเซียส (OD 600 nm)					
เวลา (วัน)	FSK-5101	HYL-20104	POL-20108	L-SH-L 25104	L-SQ-L 20104
0	0.003	0.003	0.002	0.003	0.003
1	0.016	0.063	0.006	0.024	0.005
2	0.099	0.55	0.057	0.222	0.016
3	0.276	0.863	0.163	0.876	0.030
7	0.729	0.899	0.705	0.829	0.444

8 องศาเซลเซียส (OD 600 nm)					
เวลา (วัน)	FSK-5101	HYL-20104	POL-20108	L-SH-L 25104	L-SQ-L 20104
0	0.004	0.004	0.002	0.003	0.003
1	0.437	0.888	0.343	0.751	0.081
2	0.746	0.945	0.741	0.953	0.671
3	0.694	0.933	0.698	0.956	0.772
7	0.609	0.985	0.683	0.967	0.776

15 องศาเซลเซียส (OD 600 nm)					
เวลา (วัน)	FSK-5101	HYL-20104	POL-20108	L-SH-L 25104	L-SQ-L 20104
0	0.002	0.004	0.002	0.002	0.002
1	0.558	0.853	0.421	0.659	0.065
2	0.712	0.896	0.716	0.865	0.659
3	0.687	0.890	0.633	0.871	0.734
7	0.548	0.875	0.485	0.853	0.656

ตาราง ง. การเจริญของแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ในอาหาร BSM broth เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

20 องศาเซลเซียส (OD 600 nm)					
เวลา (วัน)	FSK-5101	HYL-20104	POL-20108	L-SH-L 25104	L-SQ-L 20104
0	0.003	0.002	0.004	0.003	0.002
1	0.693	0.943	0.711	0.930	0.770
2	0.592	0.980	0.625	0.962	0.731
3	0.450	0.971	0.500	0.945	0.649
7	0.258	0.887	0.301	0.856	0.469

25 องศาเซลเซียส (OD 600 nm)					
เวลา (วัน)	FSK-5101	HYL-20104	POL-20108	L-SH-L 25104	L-SQ-L 20104
0	0.003	0.004	0.003	0.002	0.002
1	0.693	0.959	0.703	0.945	0.788
2	0.572	0.975	0.574	0.948	0.644
3	0.390	0.968	0.385	0.938	0.331
7	0.235	0.833	0.207	0.826	0.200

30 องศาเซลเซียส (OD 600 nm)					
เวลา (วัน)	FSK-5101	HYL-20104	POL-20108	L-SH-L 25104	L-SQ-L 20104
0	0.003	0.004	0.004	0.003	0.003
1	0.090	0.828	0.355	0.735	0.697
2	0.103	0.836	0.149	0.788	0.611
3	0.335	0.800	0.132	0.767	0.600
7	0.276	0.707	0.187	0.656	0.511

ตาราง ง. การเจริญของแบคทีเรียแลคติก 5 ไอโซเลท ในอาหาร BSM broth เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 4 8 15 20 25 30 และ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน (ต่อ)

35 องศาเซลเซียส (OD 600 nm)					
เวลา (วัน)	FSK-5101	HYL-20104	POL-20108	L-SH-L 25104	L-SQ-L 20104
0	0.003	0.003	0.003	0.002	0.004
1	0.218	0.688	0.156	0.615	0.563
2	0.233	0.666	0.134	0.625	0.545
3	0.144	0.627	0.134	0.606	0.530
7	0.130	0.592	0.100	0.574	0.497

ภาคผนวก จ

ตาราง จ.1 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ (Analysis report)

1. Analysis Report

Name	Read Length (Normal)	Read Length (Q16)	Read Length (Q20)	GC Content
L-SH_25104_contig_1	**1455**	**1372**	**1372**	**53.264604810996566**
L-SH_25104_F	909	898	895	53.90539053905391
L-SH_25104_R	731	708	700	52.804377564979475

1. Analysis Report

Name	Read Length (Normal)	Read Length (Q16)	Read Length (Q20)	GC Content
L-SQ_25104_contig_1	**1514**	**1406**	**1406**	**52.90620871862616**
L-SQ_25104_F	954	932	931	53.144654088050316
L-SQ_25104_R	749	742	742	52.7369826435247

ตาราง จ.2 การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ (BlastN Report)

- Query name : L-SQ_25104_contig_1
- Query length : 1514

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
7	1487	Carnobacterium sp. NFU35-25 gene for 16S rRNA, partial sequence	AB705304.1	1486	1	1482	2730	1478	0.0	1481	1482	99	Plus/Plus
5	1487	Carnobacterium sp. MKJ37 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	DQ343755.1	1485	1	1484	2728	1477	0.0	1482	1484	99	Plus/Plus
14	1487	Carnobacterium sp. 'eilaticum 021211' 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JQ780608.1	1479	1	1475	2717	1471	0.0	1474	1475	99	Plus/Plus
4	1487	Carnobacterium divergens gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: Ni799	AB598939.1	1515	14	1497	2708	1466	0.0	1479	1485	99	Plus/Plus
11	1487	Carnobacterium divergens strain NBRC 15683 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	NR_113798.1	1481	1	1479	2697	1460	0.0	1473	1479	99	Plus/Plus
4	1487	Uncultured Carnobacterium sp. clone OTUM8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU826659.1	1529	3	1487	2697	1460	0.0	1477	1485	99	Plus/Plus
14	1487	Carnobacterium divergens strain LCR15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HQ259724.1	1479	1	1475	2695	1459	0.0	1470	1475	99	Plus/Plus
24	1450	Carnobacterium divergens isolate MF 109 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY543016.1	1427	1427	1	2636	1427	0.0	1427	1427	100	Plus/Minus
24	1450	Carnobacterium divergens isolate MF 176 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY543037.1	1427	1427	1	2630	1424	0.0	1426	1427	99	Plus/Minus
24	1450	Carnobacterium divergens isolate MF 156 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY543021.1	1428	1428	1	2619	1418	0.0	1425	1428	99	Plus/Minus

- Query name : L-SH_25104_contig_1
- Query length : 1455

Query		Subject					Score			Identities			
Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
1	1455	Carnobacterium maltaromaticum LMA28 complete genome	HE999757.2	3650416	526504	527956	2675	1448	0.0	1453	1455	99	Plus/Plus
1	1455	Carnobacterium maltaromaticum strain Z3_S_MRS15 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KC213911.1	1476	22	1474	2675	1448	0.0	1453	1455	99	Plus/Plus
1	1455	Carnobacterium maltaromaticum strain Z_T_MRS_22 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KC213866.1	1464	10	1462	2675	1448	0.0	1453	1455	99	Plus/Plus
1	1455	Uncultured Carnobacterium sp. clone BJ07179E4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM215040.1	1477	1	1453	2675	1448	0.0	1453	1455	99	Plus/Plus
1	1455	Carnobacterium sp. ARCTIC-P2 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY573049.1	1527	11	1463	2675	1448	0.0	1453	1455	99	Plus/Plus
1	1453	Carnobacterium maltaromaticum strain Z2_T_MRS_39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KC213877.1	1458	8	1458	2671	1446	0.0	1451	1453	99	Plus/Plus
1	1453	Carnobacterium maltaromaticum strain Z2_T_MRS_36 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	KC213875.1	1460	10	1460	2671	1446	0.0	1451	1453	99	Plus/Plus
1	1455	Carnobacterium maltaromaticum strain S_T_MRS_45 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JX860581.1	1474	22	1474	2671	1446	0.0	1452	1455	99	Plus/Plus
1	1455	Carnobacterium maltaromaticum strain S_T_MRS_49 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JX860574.1	1474	22	1474	2671	1446	0.0	1452	1455	99	Plus/Plus
1	1455	Carnobacterium maltaromaticum strain S_T_MRS_50 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	JX860573.1	1474	22	1474	2671	1446	0.0	1452	1455	99	Plus/Plus

ภาคผนวก ฉ

ตาราง ฉ. ผลการทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

ยาปฏิชีวนะ	Clear zone ที่มีการยับยั้ง (mm)		
	S. aureus ATCC 25923	*Carnobacterium divergens*	*Carnobacterium maltaromaticum*
Ampicillin	33.25±0.00	12.23±0.67	21.10±1.13
Penicillin G	35.05±0.35	12.48±0.04	21.93±0.88
Chloramphenicol	21.35±0.35	19.53±0.32	19.88±1.24
Gentamicin	15.72±0.67	12.28±0.04	9.75±0.21
Tetracyclin	23.83±0.10	25.80±0.71	4.50±0.14
Erythromycin	21.18±0.53	23.25±0.64	25.63±0.53
Vancomycin	12.28±0.39	15.3±0.99	17.35±0.92
Ceftriaxone	21.25±0.21	-	-

หมายเหตุ : - คือ ไม่ Clear zone ของการยับยั้ง

ภาคผนวก ช

การวิเคราะห์ไบโอเจนิกเอมีน

1. เครื่องมือและอุปกรณ์

1.1 เครื่องโครมาโตรกราฟีของเหลวสมรรถนะสูง (High Performance Liquid Chromatography; HPLC) ของAgilent 1200 System
1.2 คอลัมน์ Zorbax Eclipse XDB C_{18} column (150 mm × 4.6 mm, particle size 5 μm)
1.3 เครื่องแยกสารแบบหมุนเหวี่ยง
1.4 วอร์เท็กมิกเซอร์
1.5 โซนิเคเตอร์
1.6 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ

2. สารเคมี

2.1 น้ำ DI (Deionized water)
2.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 2 N
2.3 สารละลายกรดเปอร์คลอริกความเข้มข้น 0.4 N
2.4 สารละลายกรดอะซิติก เข้มข้น 0.1%
2.5 สารละลายอิ่มตัวโซเดียมไบคาร์บอเนต
2.6 สารละลายแอมโมเนีย เข้มข้น 25%
2.7 สารละลาย 1,7 diaminoheptane(internal standard, Sigma) โดยละลาย10 ml ลงในน้ำ DI
2.8 สารละลาย densyl chloride (fluka) เตรียมโดยละลาย densyl chloride 10 mg ในอะซิโตน 1 ml (ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งและเก็บให้พ้นแสง)
2.9 สารละลายมาตรฐานไทรามีน และ ฮีสตามีน (Sigma) เตรียมโดยละลาย tyramine และ histamine 100 mg ในน้ำ DI 1 ml (ควรเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 1 เดือน) โดยจะเตรียมสารละลายมาตรฐานความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 mg/ml
2.10 สารละลายเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) นำอะซิโตไนไตรผสมกับกรดกรดอะซิติก 0.1% (สารละลาย A) และน้ำDI ผสม กรดอะซิติก 0.1%(สารละลาย B) ไปกรองโดยเครื่องกรองสุญญากาศ กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นทำการไล่อากาศโดยเครื่องโซนิเคเตอร์เป็นเวลา 15 นาที

3. สภาวะของเครื่อง

สารละลายเฟสเคลื่อนที่

อะซิโตไนไตรผสมกับกรดกรดอะซิติก 0.1% v/v (สารละลาย A)

น้ำDI ผสม กรดอะซิติก 0.1% v/v (สารละลาย B)

เวลา (นาที)	สารละลาย A	สารละลาย B
0	45	55
25	10	90
30	10	90
32	0	100
35	45	55
38	45	55

อัตราการไหล (flow rate) 1.5 ml/min, อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

ปริมาตรที่ฉีดตัวอย่าง 20 ไมโครลิตร/ตัวอย่าง

ตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร

4. วิธีวิเคราะห์

การวิเคราะห์ไบโอเจนิกเอมีนในตัวอย่างโดยใช้ internal standard

4.1. ทำการสกัดไบโอเจนิกเอมีนในอาหารเลี้ยงเชื้อ Improved medium ที่ทำการเก็บตัวอย่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดหลอดเซนตริฟิวจ์ ปั่นที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.2. นำส่วนใสปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดเซนตริฟิวจ์ เติม internal standard (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ มิกเซอร์

4.3. เติมสารละลายกรดเปอร์คลอริก ความเข้มข้น 0.4 M ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ มิกเซอร์ เป็นเวลา 5 นาที

4.4. ปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.5. สกัดซ้ำอีกครั้งด้วย 10 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดเปอร์คลอริก ความเข้มข้น 0.4 M แล้วปั่นที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที นาน 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

4.6. นำส่วนใสที่ทำการสกัดแล้วมา 300 ไมโครลิตร (หรือ standard 0-100 mg/mL) เติมสารละลายอิ่มตัวของโซเดียมไบคาร์บอนเนต ปริมาตร 90 ไมโครลิตร และเติม 2N NaOH ปริมาตร 60 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ มิกเซอร์

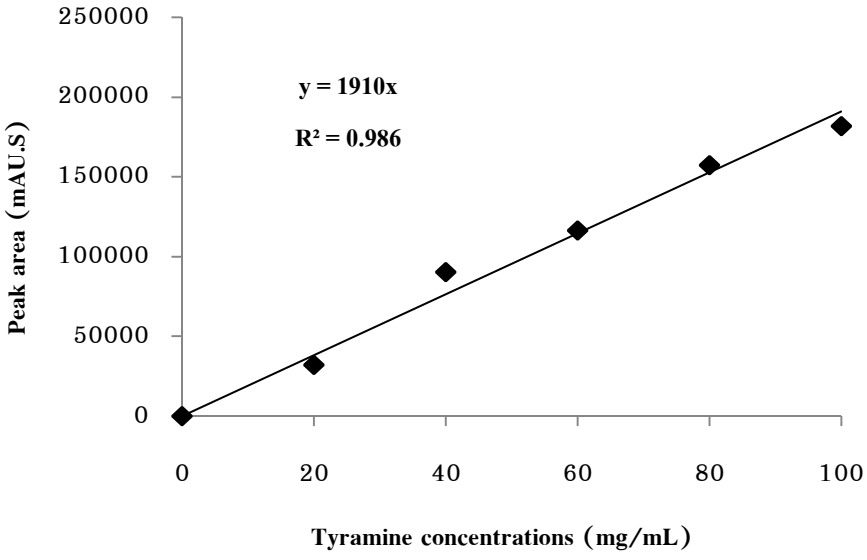
4.7. เติมสารละลาย dansyl chloride ปริมาตร 600 ไมโครลิลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ มิกเซอร์ เป็นเวลา 30 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที

4.8. เติมสารละลายแอมโมเนียมความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องวอร์เท็กซ์ มิกเซอร์ เป็นเวลา 30 วินาที นำ ไปปั่นที่ความเร็ว 3,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที

4.9. ทำการกรองส่วนใสด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมครอน

4.10. นำสารละลายที่ผ่านการกรองแล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC จำนวน 20 ไมโครลิตร ทำการตรวจวัดที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร วัดหาพื้นที่พีคที่ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร เวลาในการวิเคราะห์ 55 นาที

4.11. นำพื้นที่พีค (peak area) ของตัวอย่างต่อพื้นที่พีค internal standard ไปอ่านค่าไทรามีนและฮีสตามีนจากกราฟมาตรฐาน



ภาคผนวก ซ

ตาราง ซ ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *V. parahaemolyticus* PSU 16816 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)						
	E. coli PSU 95	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*Salmonella* Typhi	*P. aeruginosa* ATCC 278535	*V. parahaemolyticus* PSU 16816	*L. monocytogenes* ATCC 15313
FSR-L1903	–	–	–	–	–	–	–
FSR-L1904	–	–	–	–	–	–	–
FSR-L1906	–	–	–	–	–	4.25±0.05	9.25±0.01
FSR-L1908	–	–	–	–	–	–	–
FSR-L1909	–	–	–	–	–	–	–
FSR-L19011	–	–	–	–	–	–	–
FSR-L19012	–	–	–	–	–	–	–
FSR-L19013	–	–	–	–	8.25±0.05	–	10.25±0.05
FSR-L19014	–	–	–	–	–	–	–
FSR-L19015	–	–	–	–	–	–	–
FSR-L19016	–	–	–	–	–	–	–
FSR-L19020	–	–	–	–	–	–	–
L-FSR-L25103	–	–	–	–	–	–	–
HYL 20104	–	–	12.25±0.05	10.93±0.23	10.95±0.23	5.08±0.68	14.13±0.72
HYL 20106	–	–	–	–	–	–	–
HYL 20107	–	–	–	–	–	–	11.13±0.70
HYL-L5101	–	-	–	–	–	–	–
HYL-L5102	–	–	–	–	–	–	10.25±0.05
HYL-L5103	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L5104	–	-	6.25±0.07	–	–	–	–

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ตาราง ซ (ต่อ) ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *V. parahaemolyticus* PSU 16816 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)						
	E. coli PSU 95	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*Salmonella* Typhi	*P. aeruginosa* ATCC 278535	*V. parahaemolyticus* PSU 16816	*L. monocytogenes* ATCC 15313
HYL-L5106	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L5107	–	–	–	–	–	5.13±0.75	8.13±0.72
HYL-L5108	–	–	–	–	–	–	–
L-HY-L 25101	–	–	–	–	–	–	–
L-HY-L 25102	–	–	–	–	–	–	–
L-HY-L 25103	–	–	–	–	–	–	–
L-HY-L 25104	–	–	–	–	–	–	9.13±0.72
L-HY-L 25105	–	–	–	–	–	–	–
L-HY-L 25106	–	–	–	–	–	–	–
L-HY-L 5102	–	–	–	–	5.15±0.95	–	–
L-HY-L 5103	–	–	–	–	–	–	–
L-HY-L 5104	–	–	–	–	–	5.00±0.95	8.55±0.80
L-HY-L 5105	–	–	–	–	–	–	–
L-HY-L 5106	–	–	–	–	–	–	–
L-HY-L 5107	–	–	5.55±0.80	6.55±0.80	–	–	8.70±0.90
L-HY-L 51010	–	–	–	–	–	–	–
POL 20101	–	–	–	–	–	–	–
POL 20102	–	–	–	–	–	–	–
POL 20103	–	–	–	–	–	–	–
POL 20106	–	–	–	–	–	–	–
POL 20107	–	–	–	–	–	–	–

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ตาราง ซ (ต่อ) ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *V. parahaemolyticus* PSU 16816 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)						
	E. coli PSU 95	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*Salmonella* Typhi	*P. aeruginosa* ATCC 278535	*V. parahaemolyticus* PSU 16816	*L. monocytogenes* ATCC 15313
POL 20108	–	–	11.03±0.05	8.40±1.4	9.075±0.45	5.95±1.2	13.750±0.1
POL 20109	–	–	–	–	–	–	–
POL 201010	–	–	–	–	–	5.10±0.80	9.37±0.45
POL 201011	–	–	–	–	–	–	–
POL 201012	–	–	–	–	–	6.7±0.95	–
POL 201013	–	–	–	–	–	–	–
POL 201014	–	–	–	–	–	–	–
POL 201015	–	–	–	–	–	–	8.37±0.50
POL 201016	–	–	–	–	–	–	–
L-PO-L 25101	–	–	–	–	–	–	–
L-PO-L 25102	–	–	–	–	–	–	–
L-PO-L 25104	–	–	–	–	–	–	–
L-PO-L 25107	–	–	6.37±0.45	–	–	–	9.15±0.30
L-PO-L 25108	–	–	–	–	–	–	–
L-PO-L 251010	–	–	–	–	–	–	–
SQ-C 11103	–	–	–	–	–	–	–
SQ-C 11104	–	–	–	–	–	–	–
SQ-C 11105	–	–	–	–	–	–	–
SQ-C 11106	–	–	–	–	–	–	–
SQ-C 11107	–	–	–	–	–	–	–

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ตาราง ซ (ต่อ) ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *V. parahaemolyticus* PSU 16816 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี Agar spot assay

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)						
	E. coli PSU 95	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*Salmonella* Typhi	*P. aeruginosa* ATCC 278535	*V. parahaemolyticus* PSU 16816	*L. monocytogenes* ATCC 15313
SQ-C 11108	–	–	–	–	–	–	–
SQ-C 11109	–	–	–	–	–	–	–
SQ-C 111010	–	–	–	–	–	–	–
SQ-L 5101	–	–	–	–	–	–	–
SQ-L 5102	–	–	–	–	–	–	–
SQ-L 5103	–	–	–	–	–	–	–
SQ-L 5104	–	–	–	–	–	–	10.37±0.45
SQ-L 5105	–	–	–	–	–	–	–
SQ-L 5106	–	–	–	–	–	–	–
SQ-L 5107	–	–	–	–	–	5.15±0.95	–
SQ-L 5108	–	–	–	–	–	–	–
SQ-L 5109	–	–	–	–	–	–	–
SQ-L 51010	–	–	–	–	–	–	–
L-SQ-L 25108	–	–	–	–	–	–	–
L-SQ-L 25104	–	–	11.4±0.1	11.95±1.3	9.88±0.08	2.8±0.03	14.62±0.03
L-SQ-L 25103	–	–	6.90±0.3	-	-	-	10.62±0.03
L-SQ-L 30107	–	–	–	–	–	–	–
L-SQ-L 30108	–	–	–	–	–	–	–
L-SQ-L 30109	–	–	–	–	–	–	–
L-SQ-L 10101	–	–	–	–	–	–	–

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ตาราง ซ (ต่อ) ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *V. parahaemolyticus* PSU 16816 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี Agar spot assay

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)						
	E. coli PSU 95	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*Salmonella* Typhi	*P. aeruginosa* ATCC 278535	*V. parahaemolyticus* PSU 16816	*L. monocytogenes* ATCC 15313
L-SQ-L 10107	–	–	–	–	–	–	–
FSO-B 21103	–	–	–	–	–	–	–
FSO-B 21104	–	–	–	–	–	–	–
FSO-B 21105	–	–	–	–	–	–	–
FSO-B 21108	–	–	–	–	–	–	–
FSO-B 21109	–	–	–	–	–	–	–
L-FSO-B 31103	–	–	–	–	–	–	–
FSJ-L 5101	–	–	–	–	–	–	–
FSJ-L 5102	–	–	–	–	–	–	–
FSJ-L 5103	–	–	–	–	–	–	–
FSJ-L 5104	–	–	–	–	–	–	–
FSJ-L 5105	–	–	–	–	–	–	–
FSJ-L 5106	–	–	–	–	–	–	–
FSJ-L 5107	–	–	–	–	–	–	–
FSJ-L 5108	–	–	–	–	–	–	–
L-FSJ-L 10101	–	–	–	–	–	–	–
L-FSJ-L 10108	–	–	–	–	–	–	–
L-FSJ-L 10109	–	–	–	–	–	–	–
SHK-L 5101	–	–	–	–	–	–	–
SHK-L 5102	–	–	–	–	–	–	–

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ตาราง ซ (ต่อ) ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *V. parahaemolyticus* PSU 16816 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)						
	E. coli PSU 95	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*Salmonella* Typhi	*P. aeruginosa* ATCC 278535	*V. parahaemolyticus* PSU 16816	*L. monocytogenes* ATCC 15313
SHK-L 5103	–	–	–	–	–	–	–
SHK-L 5104	–	–	–	–	–	–	–
SHK-L 5105	–	–	–	–	–	–	10.37±0.45
SHK-L 5106	–	–	–	–	–	–	–
SHK-L 5107	–	–	–	–	–	–	–
SHK-L 5108	–	–	–	–	–	–	7.45±0.70
SHK-L 5109	–	–	–	–	–	–	–
SHK-L 51010	–	–	–	–	–	–	–
L- SHK-L 10101	–	–	–	–	–	–	–
L- SHK-L 10102	–	–	7.50±0.6	–	–	–	–
L- SHK-L 10103	–	–	–	–	–	–	–
L- SHK-L 10104	–	–	–	–	–	–	–
L- SHK-L 10105	–	–	–	–	–	–	–
L- SHK-L 10106	–	–	–	–	–	–	–
L- SHK-L 10107	–	–	–	–	–	–	–
L- SHK-L 10108	–	–	–	–	–	–	–
L- SHK-L 10109	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5101	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5102	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5103	–	–	–	–	–	–	–

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ตาราง ซ (ต่อ) ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *V. parahaemolyticus* PSU 16816 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)						
	E. coli PSU 95	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*Salmonella* Typhi	*P. aeruginosa* ATCC 278535	*V. parahaemolyticus* PSU 16816	*L. monocytogenes* ATCC 15313
HYL-L 5104	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5105	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5106	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5107	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5108	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5109	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 51010	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10101	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10102	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10103	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10104	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10105	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10106	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10107	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10108	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10109	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L101010	–	–	–	–	–	–	–
FSK 5101	–	–	11.25±0.5	8.0±0.45	8.45±1.4	6.125±0.23	14.25±0.55
FSK 5102	–	–	–	–	–	–	–
FSK 5103	–	–	–	–	–	–	–

หมายเหตุ : – หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ตาราง ซ (ต่อ) ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *V. parahaemolyticus* PSU 16816 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)						
	E. coli PSU 95	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*Salmonella* Typhi	*P. aeruginosa* ATCC 278535	*V. parahaemolyticus* PSU 16816	*L. monocytogenes* ATCC 15313
FSK 5104	–	–	–	–	–	–	–
FSK 5105	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5102	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5103	–	–	–	–	6.41±0.45	5.37±0.45	–
HYL-L 5104	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5105	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5106	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5107	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5108	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 5109	–	–	–	–	–	–	–
HYL-L 51010	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10101	–	–	–	–	–	5.37±0.20	8.37±0.45
L-HYL-L10102	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10103	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10104	–	–	–	–	–	5.50±0.20	9.0±0.2
L-HYL-L10105	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10106	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10107	–	–	–	–	–	–	9.20±0.45
L-HYL-L10108	–	–	–	–	–	–	–
L-HYL-L10109	–	–	–	–	–	–	–

หมายเหตุ : – หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ตาราง ซ (ต่อ) ผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 *V. parahaemolyticus* PSU 16816 *S. aureus* ATCC 29213 *E. faecalis* ATCC 29212 *P. aeruginosa* ATCC 27853 *S.* Typhi และ *E. coli* PSU 95 ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น โดยวิธี agar spot assay

ไอโซเลท	ขนาดวงใสการยับยั้งอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)						
	E. coli PSU 95	*S. aureus* ATCC 29213	*E. faecalis* ATCC 29212	*Salmonella* Typhi	*P. aeruginosa* ATCC 278535	*V. parahaemolyticus* PSU 16816	*L. monocytogenes* ATCC 15313
L-HYL-L101010	–	–	–	–	–	–	8.75±0.20
FSK-L 5101	–	–	5.90±0.90	5.10±0.70	–	–	–
FSK-L 5102	–	–	–	–	–	–	–
FSK-L 5103	–	–	6.37±0.20	–	–	–	–
FSK-L 5104	–	–	–	–	–	–	–
FSK-L 5105	–	–	–	–	–	–	–
FSK 5106	–	–	–	–	–	–	–
FSK 5107	–	–	–	–	–	–	–
FSK 5108	–	–	–	–	–	–	–
FSK 5109	–	–	–	–	–	–	–
FSK 51010	–	–	–	–	–	–	–
L-FSK-L 5102	–	–	6.65±0.5	–	–	–	7.70±0.90
L-FSK-L 5103	–	–	–	–	–	–	–
L-FSK-L 5106	–	–	5.75±0.3	–	–	–	8.60±0.70
L-FSK-L 5107	–	–	–	–	–	–	–
L-FSK-L 5108	–	–	–	–	–	–	–
L-FSK-L 5109	–	–	–	–	–	–	–
L-SH-L 25103	–	–	–	–	–	–	–
L-SH-L 25104	–	–	10.6±0.2	8.93±0.93	10.08±0.68	3.5±0.75	14.23±0.03
L-SH-B 31107	–	–	–	–	–	–	–
L-SH-B 31109	–	–	–	–	–	–	8.30±0.6
L-SH-B 31110	–	–	–	–	–	–	7.37±0.45

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นุชรี ตันติสุวรรณโณ

รหัสนักศึกษา 5510220059

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษา
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2554

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สัญญาเลขที่ SCI 5301425

ทุนอุดหนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ พ.ศ. 2556

การตีพิมพ์และเผยแพร่ผลงาน

Tuntisuwanno, N., Charernjiratrakul, W., Bovornruengroj, N. and Borvornruengroj, P. 2014. Selection of biopreservative produced lactic acid bacteria from chilled seafood products. The 2nd International Conference on Food and Applied Bioscience 50th Chang Mai University Anniversary, Chiang Mai, Thailand, 6-7 February 2014, pp. 90-91.