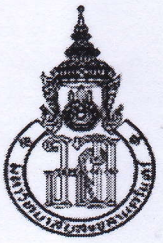


การผลิตแบคเทอริโอซินโดย *Enterococcus faecalis* TS9S17 และการใช้ในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก

Production of Bacteriocin by *Enterococcus faecalis* TS9S17 and Application to Inhibit *Listeria monocytogenes* in Peeled Cooked Shrimp

รติยา ก้องก่ำ

Ratiya Kongkum

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Biotechnology
Prince of Songkla University
2558

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตแบคเทอริโอซินโดย *Enterococcus faecalis* TS9S17 และการใช้ในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก

ผู้เขียน นางสาวรติยา ก้องก่ำ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง ของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ

.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....รติยา ก้องกำ.....

(นางสาวรติยา ก้องกำ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....รติยา ก้องกำ่า.....

(นางสาวรติยา ก้องกำ่า)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตแบคเทอริโอซินโดย *Enterococcus faecalis* TS9S17 และการใช้ในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก

ผู้เขียน นางสาวรติยา ก้องก่ำ

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

ปีการศึกษา 2557

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินและสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากป่าชายเลนและการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก โดยแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 คือ *Enterococcus faecalis* TS9S17 และ *Enterococcus faecalis* TS9S19 เมื่อนำแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์นี้มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่า มีประสิทธิภาพยับยั้งเฉพาะ *Listeria monocytogenes* เมื่อเลี้ยงเชื้อทั้งสองในอาหาร MRS pH 6.5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เชื้อผลิตแบคเทอริโอซินได้ 40 AU/มิลลิลิตร แต่ในช่วงแรกของการผลิต *Ent. faecalis* TS9S17 มีค่ากิจกรรมแบคเทอริโอซินสูงกว่า จึงนำ *Ent. faecalis* TS9S17 ไปศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต เมื่อใช้น้ำนึ่งปลาทูน่า 13.5 กรัมต่อลิตร แทนเปปโทน หรือใช้น้ำนึ่งปลาทูน่า 26.5 กรัมต่อลิตร แทนเปปโทน เนื้อสกัดและยีสต์สกัดในอาหาร MRS พบว่า เชื้อผลิตแบคเทอริโอซินได้ 40 AU/มิลลิลิตร เช่นกัน ดังนั้นจึงหาสภาวะที่เหมาะสมของสภาพแวดล้อมโดยใช้อาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่า 26.5 กรัมต่อลิตร และปรับ pH ของอาหาร จาก pH 6.5 เป็น 7.0 พบว่า *Ent. faecalis* TS9S17 ผลิตแบคเทอริโอซินได้เพิ่มขึ้นเป็น 80 AU/มิลลิลิตร และเมื่อเปลี่ยนอุณหภูมิในการบ่มจาก 37 องศาเซลเซียส เป็น 25 องศาเซลเซียส เชื้อผลิตแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นเป็น 160 AU/มิลลิลิตร แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalils* TS9S17 ทำงานได้ดีที่ pH 6 และทำงานได้ที่ pH ช่วงกว้างตั้งแต่ 2-12 ทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 60 นาที และยังคงมีค่ากิจกรรมเล็กน้อยหลังจากได้รับความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เมื่อนำตัวเซลล์และแบคเทอริโอซินของ *Ent. faecalis* TS9S17 มาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน พบว่า การใช้ตัวเซลล์ของ *Ent. faecalils* TS9S17 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งดีกว่าการใช้แบคเทอริโอซิน และเมื่อวิเคราะห์ปริมาณของอินโดลภายในเวลา 15 วันของการเก็บรักษา พบว่า กุ้งปอกเปลือกปรุงสุกที่ไม่มีการเติมและมีการเติมตัวเซลล์ของ *Ent. faecalils* TS9S17 และ *L. monocytogenes* มีค่าอินโดลไม่แตกต่างกัน (1.11-1.27 ไมโครกรัม/100 กรัม)

Thesis Title	Production of Bacteriocin by *Enterococcus faecalis* TS9S17 and Application to Inhibit *Listeria monocytogenes* in Peeled Cooked Shrimp
Author	Miss Ratiya Kongkum
Major Program	Biotechnology
Academic Year	2014

ABSTRACT

The purposes of this study were to investigate the to optimize a bacteriocin production and properties of bacteriocin of lactic acid bacteria isolated from the mangrove forest as well as application in peeled cooked shrimp. They were *Enterococcus faecalis* TS9S17 and *Enterococcus faecalis* TS9S19 which produced bacteriocin to inhibit *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157. When the bacteriocin was tested against pathogenic bacteria, it could inhibit only *Listeria monocytogenes*. *Ent. faecalils* TS9S17 showed higher bacteriocin activity than *Ent. faecalils* TS9S19 did during early growth phase. *Ent. faecalils* TS9S17 was selected for optimization of bacteriocin production. When it was grown in the MRS medium with an initial pH 6.5 at 37 °C for 24 h, it produced bacteriocin activity 40 AU/ml. When 13.5 g/l of tuna condensate was used instead of peptone and 26.5 g/l of tuna condensate was used instead of peptone, beef extract and yeast extract in the MRS medium, it also produced bacteriocin activity of 40 AU/ml. Therefore, the modified MRS medium with 26.5 g/l of tuna condensate was used to optimize the environmental conditions. When the pH of the modified medium was changed from pH 6.5 to 7.0, it produced bacteriocin 80 AU/ml. When the incubation temperature was changed from 37 °C to 25 °C, it produced bacteriocin 160 AU/ml. The bacteriocin showed highest activity at pH 6 and remained active over a wide pH range (2-12). It was active after heating at 60 °C for 60 min and still had a little activity after heating at 121 °C for 15 min. The cells and crude bacteriocin from *Ent. faecalils* TS9S17 were applied to peeled cooked shrimp inoculated with *L. monocytogenes* and stored at 4 °C for 28 days. The results show that the bacteriocin producing strain was more effective than crude bacteriocin to inhibit *L. monocytogenes* in peeled cooked shrimp. The sterile peeled cooked shrimp and the shrimp inoculated with *Ent. faecalis* TS9S17 and *L. monocytogenes* showed no different in indole content at 4 °C for 15 days (1.11-1.27 µg/100g).

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. อรัญ หันพงศ์กิตติกูล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ให้คำแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิจัย และการตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. ศุภศิลป์ มณีรัตน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และรองศาสตราจารย์ ดร. อดิศร เสวตวิวัฒน์ กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัย ที่สละเวลาอันมีค่าในการให้ข้อคิดเห็น เสนอแนะ และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (NRU) และบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ด้วยความรักและเคารพยิ่ง ขอขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกท่านสำหรับกำลังใจอันอบอุ่นและการให้ความช่วยเหลือที่มีให้มาโดยตลอด และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่ให้การช่วยเหลือในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

รติยา ก้องก่ำ

สารบัญ

		หน้า
สารบัญ……..		(8)
รายการตาราง……		(9)
รายการภาพประกอบ……..		(10)
ตัวย่อและสัญลักษณ์……..		(12)
บทที่		
1.	บทนำ	1
	บทนำต้นเรื่อง	1
	การตรวจเอกสาร……	3
	วัตถุประสงค์……	24
2.	วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ	25
	วัสดุอุปกรณ์……	25
	วิธีการทดลอง……	27
3.	ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	37
	1. การยืนยันผลการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก…..……	37
	2. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก……	38
	3. การเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน……...……	40
	4. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน……	41
	5. คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17	49
	6. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน…….	57
	7. การยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก……..	58
4.	สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ……	63
	เอกสารอ้างอิง…….....	66
	ภาคผนวก……..	78
	ประวัติผู้เขียน……	88

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก…….	8
2	การแบ่งกลุ่มแบคเทอริโอซินโดยทั่วไป……...	11
3	กลไกการทำลายของแบคเทอริโอซิน……...	12
4	องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาล……..…..	17
5	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนึ่งปลาทูน่า……..	17
6	คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกสกุล *Enterococcus* sp.	18
7	ผลการทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่าง ๆ…..……	21
8	องค์ประกอบของอาหาร MRS สูตรดัดแปลง……..…	31
9	กิจกรรมการยับยั้ง *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ของสารละลายส่วนใสจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17 และ *Enterococcus faecalis* TS9S19…….	38
10	กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของสารละลายส่วนใสจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17 และ *Enterococcus faecalis* TS9S19……	40
11	องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนึ่งปลาทูน่า……..…….	44
12	กิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในอาหารเหลว MRS ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจน……	45
13	ผลการทำบริสุทธิ์ (บางส่วน) ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17……..	53
14	pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานและความคงตัวต่อ pH ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17……	54
15	ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Entrococcus faecalis* TS9S17 ……	57

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของ lantibiotic ชนิด A และ B ……	9
2	กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน……	13
3	กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)……	34
4	การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส…..	42
5	การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Enterococcus faecalis* TS9S19 และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส…..	43
6	ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ การผลิตแบคเทอริโอซินและการเปลี่ยนแปลง pH ของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในอาหารสูตรต่างๆ…….	50
7	ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ การผลิตแบคเทอริโอซินและการเปลี่ยนแปลง pH ของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในอาหาร modified MRS 3……..	51
8	ผลของ pH เริ่มต้นต่อการเจริญ การผลิตแบคเทอริโอซินและการเปลี่ยนแปลง pH ของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในอาหาร modified MRS 3……..	52
9	ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17 ……..	56
10	การเจริญของ *Listeria monocytogenes* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Enterococcus faecalis* TS9S17 และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเหลว MRS + BHI….	59
11	การยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส……	61
12	การยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* โดย *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส……	61
13	ปริมาณอินโดลในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส…	62
14	กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส……	81
15	กราฟมาตรฐาน BSA……..	83
16	กราฟมาตรฐานอินโดล……..	85

ตัวย่อและสัญลักษณ์

Aer.	=	*Aerococcus*
B.	=	*Bacillus*
Bro.	=	*Brochothrix*
C.	=	*Clostridium*
Car.	=	*Carnobacterium*
E.	=	*Escherichia*
Ent.	=	*Enterococcus*
L.	=	*Listeria*
Lb.	=	*Lactobacillus*
Lc.	=	*Lactococcus*
Leu.	=	*Leuconostoc*
O.	=	*Oenococcus*
Ped.	=	*Pediococcus*
S.	=	*Staphylococcus*
Sal.	=	*Salmonella*
Strep.	=	*Streptococcus*
T.	=	*Tetragenococcus*
V.	=	*Vibrio*
Vago.	=	*Vagococcus*
W.	=	*Weissella*

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

กุ้งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่ผู้บริโภคนิยมรับประทานและเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจของประเทศไทย โดยรูปแบบผลิตภัณฑ์ที่แปรรูป เช่น กุ้งปรุงสุกและปอกเปลือกบรรจุภายใต้สภาวะดัดแปลงบรรยากาศ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความนิยมในประเทศแถบยุโรป และในการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะต้องคำนึงถึงปัญหาต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งปัญหาทางด้านจุลินทรีย์ ในมาตรฐานสินค้าเกษตรนั้นได้กำหนดปริมาณของการปนเปื้อนจุลินทรีย์บางชนิดในผลิตภัณฑ์กุ้งปรุงสุก ได้แก่ *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. ที่อาจเกิดการปนเปื้อนจากน้ำที่ใช้ในกระบวนการผลิต การจัดการทางสุขลักษณะที่ไม่เหมาะสมในระหว่างกระบวนการผลิต และการปนเปื้อนจากวัตถุดิบ เป็นต้น ซึ่งแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบบ่อยในผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้รายงานการตรวจพบเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* ที่ปนเปื้อนในกุ้งสดแช่เยือกแข็งและกุ้งที่ผ่านความร้อนก่อนแช่เยือกแข็ง (Hosseini *et al.*, 2004) และยังมีการตรวจพบเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์กุ้งปอกเปลือกปรุงสุกอีกด้วย (Sigrun *et al.*, 2006) ถ้าหากผลิตภัณฑ์มีการปนเปื้อนแบคทีเรียก่อโรคเหล่านี้ก็จะเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์นั้นสามารถใช้เทคนิคต่างๆ เช่น การเติมเกลือ การเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำ การบรรจุภายใต้สภาวะดัดแปลงบรรยากาศ และอาจมีการเติมสารเติมแต่งอาหารโดยเฉพาะกรดอินทรีย์ลงในผลิตภัณฑ์ (Fall *et al*., 2010a) แต่การเติมกรดอินทรีย์ไม่สามารถยับยั้งหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคได้หมด และถ้าหากใช้ในปริมาณมากอาจส่งผลต่อผลิตภัณฑ์ในเรื่องกลิ่นรส และทำให้สิ้นเปลืองค่าใช้จ่าย และนอกจากนี้มักมีการเติมสารซัลไฟท์ (sulfiting agent) ซึ่งสารชนิดนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและยังยับยั้งกระบวนการเมลาโนซิส (melanosis) หรือกระบวนการที่ทำให้เกิดจุดดำบนเปลือกกุ้งได้ (Lu, 2009; Nirmal and Benjakul, 2009) แต่อย่างไรก็ตามสารดังกล่าวทำให้เกิดการแพ้จึงไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

การใช้กรดอินทรีย์และการเติมซัลไฟท์ ในการยืดอายุการเก็บรักษาวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์กุ้งนั้นอาจไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นการใช้วิธีการทางชีวภาพจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารทะเลได้นานขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้สารแบคเทอริโอซิน (Yin *et al*., 2007) ซึ่งเป็นสารประเภทโปรตีน มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรีย

เป้าหมายและผลิตจากแบคทีเรียแลกติกซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe, GRAS) (De Vugst and Vandamme, 1994; Saito, 2004; Savadogo *et al*., 2004)

การวิจัยนี้จึงมีจุดมุ่งหมายเพื่อทดสอบประสิทธิภาพแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากป่าชายเลนที่ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน รวมถึงการนำตัวเซลล์และแบคเทอริโอซินที่ได้ไปใช้ในผลิตภัณฑ์กุ้งปรุงสุกพร้อมบริโภค

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (Gram positive bacteria) ไม่สร้างสปอร์ มีรูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือเป็นท่อนยาว ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเล็กน้อย ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) สามารถทนต่อสภาวะ pH ต่ำกว่า 5 ทนอุณหภูมิสูงกว่า 37-40 องศาเซลเซียส รวมทั้งต้องการสารประกอบไนโตรเจนเพื่อใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนและวิตามินสำหรับการเจริญและการสร้างกรดอินทรีย์ (Pot *et al*., 1993; Ringo and Gatesoupe,1998) สามารถจำแนกแบคทีเรียแลกติกโดยอาศัยความแตกต่างของลักษณะทางฟีโนไทป์และลักษณะอื่น ๆ ออกเป็น 12 สกุล คือ *Aerococcus (Aer.), Carnobacterium (Car.), Enterococcus (Ent.), Lactobacillus (Lb.), Lactococcus (Lc.), Leuconostoc(Leu.), Oenococcus (O.), Pediococcus (Ped.), Streptococcus (Strep.), Tetragenococcus (T.), Vagococcus (Vago.)* และ *Weissella (W.)* (Axelsson, 1998) แบคทีเรียแลกติกต้องการพลังงานสำหรับการเจริญจากกระบวนการหมัก (fermentation) แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เช่น น้ำตาลกลูโคสซึ่งกระบวนการหมักสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ลักษณะ (Holzapfel and Wood, 1995; Litchfield, 1996; Calo-Mata *et al.,* 2008) ดังนี้

1.1 โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ เป็นกระบวนการหมักกลูโคสแล้วได้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติกซึ่งพบใน *Ent. faecalis*, *Lb. casei, Lb. delbrueckii, Lb. plantarum, Lc. lactis* ซึ่งกลไกการเกิดกรดแลกติกจะเป็นไปตามกระบวนการไกลโคไลซิส คือ การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดไพรูวิก และเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดแลกติกโดยเอนไซม์แลกเทตดีไฮโดรจีเนส (Schlegel, 1993; Holzapfel and Wood, 1995)

1.2 เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ เป็นกระบวนการหมักที่จะเกิดกรดแลกติกเพียงบางส่วน ที่เหลือเป็นเอทิลแอลกอฮอล์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์หรือกรดอะซิติกซึ่งพบใน *Lb. brevis, Lb. bifermentans, Lb. fermentum, Leu. lactis*, *Leu. mesenteroides* เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับกระบวนการไกลโคไลซิส ซึ่งกลไกการเกิดกรดแลกติกและสารอื่น ๆ นั้นจะเป็นไปตามวิถีเพนโตสฟอสเฟตและกระบวนการไกลโคไลซิส (Schlegel, 1993; Holzapfel and Wood, 1995)

แบคทีเรียแลกติกสามารถพบได้ในระบบนิเวศ เช่น ดิน น้ำ พืชและสัตว์ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้จะมีส่วนช่วยในกระบวนการหมัก แต่ในอาหารที่ไม่ได้ผ่านกระบวนการหมักก็สามารถพบได้เช่นกัน เช่น ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ อาหารทะเล ผักผลไม้ ธัญพืช

น้ำเสีย อวัยวะสืบพันธุ์ ลำไส้และระบบทางเดินหายใจของคนและสัตว์ มีการใช้แบคทีเรียแลกติกอย่างแพร่หลาย โดยการใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นในอุตสาหกรรมอาหารสำหรับการผลิตอาหารหมักดองจาก นม (โยเกิร์ต เนยแข็ง) เนื้อ (ไส้กรอก) ปลา ธัญพืช (ขนมปังและเครื่องดื่ม เช่น เบียร์) ผลไม้ (กระบวนการหมักไวน์) และผัก (กะหล่ำปลีดอง กิมจิหมัก) แบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่จะพิจารณาว่าเป็น GRAS (generally recognized as safe) คือได้รับการยอมรับโดยทั่วไปว่าเป็นที่ปลอดภัยซึ่งรับรองโดยองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (Calo-Mata *et al.,* 2008) แบคทีเรียแลกติก สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยผลิตกรดแลกติกออกมาทำให้ค่า pH ลดลง (Daeschel, 1989) และผลิตสารประกอบต่างๆ แบ่งออกเป็นสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลต่ำ (low-molecule-mass, LMM) เช่นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) ไดอะซิทิล (2,3-butanedione) สารประกอบที่ไม่สามารถระบุคุณลักษณะได้ (uncharacterized compounds) และสารประกอบที่มีมวลโมเลกุลสูง (high-molecule-mass, HMM) เช่น แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) โดยสารประกอบเหล่านี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและยังมีคุณสมบัติเป็นสารถนอมอาหาร ซึ่งจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสียทำให้สามารถเก็บอาหารได้นานขึ้น (Ammor *et al*., 2006)

2. แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus* sp.

2.1 คุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus* sp.

Enterococcus sp. เป็นแบคทีเรียรูปกลม หรือรูปไข่ จัดเรียงตัวเซลล์เป็นคู่ หรือสายสั้น ๆ เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา ไม่มีแคปซูล สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน เจริญได้ในช่วง pH เท่ากับ 4.2-4.6 ต้องการอาหารที่สมบูรณ์ ส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ *Enterococcus* sp. เป็นแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญในที่มี pH เท่ากับ 9.6 ที่มีเกลือสูงถึง 65 เปอร์เซนต์ และในที่มีเกลือน้ำดี 40 เปอร์เซนต์ และยังสามารถหมักน้ำตาลแลกโทสได้ พบได้ในธรรมชาติและมูลสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง (บุษกร อุตรภิชาติ, 2548)

ในทางการแพทย์ *Enterococcus* sp. มีบทบาทที่สำคัญต่อการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) และการติดต่อจากผู้ป่วยผ่านทางการสัมผัส ซึ่งโรคติดเชื้อ *Enterococcus* sp. แบ่งตามระบบ ได้แก่ โรคติดเชื้อของทางเดินปัสสาวะ โรคติดเชื้อในช่องท้องและอุ้งเชิงกราน การติดเชื้อของบาดแผล และเนื้อเยื่ออ่อน โรคลิ้นหัวใจอักเสบและการติดเชื้อในกระแสเลือด และนอกจากนี้ *Enterococcus* sp. มักจะมีคุณสมบัติดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ vancomycin (vancomycin-resistant enterococci หรือ VRE) ampicillin และ aminoglycoside (อนุวัฒน์ กีระสุนทรพงษ์, 2542; จักรพันธ์ พิมาน และคณะ, 2554)

กลไกการดื้อต่อยาปฏิชีวนะมี 2 ลักษณะ คือการที่เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะโดยธรรมชาติของตัวเชื้อเองและการที่เชื้อดื้อต่อยาปฏิชีวนะภายหลังจากเชื้อสัมผัสโดยตรงหรือทางอ้อมกับยาปฏิชีวนะ เช่น กลไกหลักการดื้อต่อยา penicillin เกิดจากการเปลี่ยนแปลงที่ penicillin binding protein (PBP) และนอกจากนั้นเชื้อบางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์ β lactamase มาทำลายยา สำหรับกลไกที่เชื้อดื้อต่อยาในกลุ่มอะมิโนไกลโคไซด์ในระดับสูง เกิดจากการสร้างเอนไซม์ aminoglycoside modifying สำหรับสายพันธุ์ที่ดื้อต่อยา vancomycin เกิดจากการที่ vancomycin ไปจับที่ผนังเซลล์ของเชื้อทำให้เกิดเปลี่ยนแปลงของยีนที่ใช้กำหนดการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนจาก D-alanyl-D-alanine ไปเป็น D-alanyl-D-lactate ทำให้ vancomycin ไม่สามารถไปยับยั้งการสร้างเปปทิโดไกลแคนซึ่งเป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ได้ (อนุวัฒน์ กีระสุนทรพงษ์, 2542)

2.2 คุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* TS9S17

แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Ent. faecalis* TS9S17 มีรูปร่างกลม คัดแยกจากป่าชายเลนโดย นายนรภัทร หวันเหล็ม (Hwanhlem *et. al*., 2014) ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ซึ่งจะนำ *Ent. faecalis* TS9S17 ไปทดสอบและยืนยันว่าการยับยั้งที่เกิดขึ้นเกิดจากสารประกอบประเภทโปรตีน โดยนำสารละลายส่วนใส (cell free supernatant, CFS) ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์นี้ไปทำปฏิกิริยาด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) และแอลฟ่า ไคโมทริปซิน (α-chymotrypsin) เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากเติมแอลฟ่า ไคโมทริปซิน ลงในสารละลายส่วนใส ไม่พบวงใสของการยับยั้ง แสดงให้เห็นว่าสารที่แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ผลิตขึ้นเป็นสารประเภทโปรตีน

เมื่อนำ *Ent. faecalis* TS9S17 ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้ง *Ent. faecalis* LPS04, *Lb. plantarum* D6SM3, *Lb. sakei*, *Strept. salivarius* LD219, *B. cereus* DMST 5040, *Bro. thermosphacta* DSM 20171, *L. monocytogenes* (hospital strain) และ *L. monocytogenes* DMST 17303

3. สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก

3.1 กรดอินทรีย์

กรดอินทรีย์ที่สำคัญคือกรดแลกติก ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตซึ่งจะมีการเปลี่ยนไพรูเวตเป็นกรดแลกติกโดยเอนไซม์แลกติกดีไฮโดรจีเนสและเกิดสภาวะเป็นกรดที่สะสมทำให้ค่า pH ในบริเวณนั้นลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่ากรดแลกติก

สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ได้ และเมื่อพบสภาวะภายในเซลล์ที่มีค่า pH สูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดแลกติกจะเกิดการแตกตัวได้เป็นไฮโดรเจนไอออน ซึ่งจะไปมีผลต่อกระบวนการเมทาบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

3.2 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

เมื่อแบคทีเรียแลกติกเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน เชื้อจะมีการผลิตไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในระหว่างกระบวนการถ่ายเทอิเล็กตรอน ซึ่งพบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับไขมันที่อยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ นอกจากนี้ยังมีผลในการทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์สามารถไปรวมตัวกับสารอื่น ๆ แล้วเกิดเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ขึ้นมาได้อีกด้วย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

แบคทีเรียแลกติกจะผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในกระบวนการหมักน้ำตาลแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ซึ่งก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะไปแทนที่ก๊าซออกซิเจนในสภาวะแวดล้อมรอบ ๆ ทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ต้องการใช้ออกซิเจนไม่สามารถเจริญได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

3.4 ไดอะซีทิล (diacetyl)

แบคทีเรียแลกติกเป็นจะผลิตไดอะซีทิลในกระบวนการเมทาบอลิซึมของไพรูเวททั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เมื่อแบคทีเรียแลกติกเจริญในสภาวะที่มีซิเตรตอยู่ด้วยจะมีการผลิตไพรูเวตออกมาในปริมาณมาก ซึ่งสารนี้จะถูกเปลี่ยนเป็นไดอะซีทิลและอะซีโตอิน โดยไดอะซีทิลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย ซึ่งผลในการยับยั้งของสารกลุ่มนี้จะมีต่อผลแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (De Vuyst and Vandamme, 1994)

3.5 อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde)

แบคทีเรียแลกติกแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟจะผลิตอะซีทัลดีไฮด์ในระหว่างกระบวนการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตในสภาวะที่ไม่มีเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส ทำให้เกิดการสร้างและขับสารอะซีทัลดีไฮด์ออกมาภายนอกเซลล์ มีการรายงานว่าอะซีทัลดีไฮด์ เข้มข้นระหว่าง 10-100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคในอาหาร เช่น *E. coli, S. aureus* และ *Sal. typhimurium* ได้ (De Vuyst and Vandamme, 1994)

4. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซมมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายในช่วงแคบ และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Tagg *et al.,* 1796) แบคเทอริโอซินสามารถผลิตได้ทั้งจากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายสายพันธุ์

จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบจะมีโมเลกุลขนาดใหญ่และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้น้อยชนิดกว่าที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก (Jack *et al*., 1995) โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแกรมลบมีการศึกษากันในด้านต่าง ๆ ได้แก่ โครงสร้างของโปรตีน กิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมาย กระบวนการสังเคราะห์ภายในเซลล์ที่ผลิต กลไกการเข้าทำลายและตำแหน่งของการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย รวมถึงระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์เป้าหมาย เช่น colicins ซึ่งผลิตโดย *E. coli* และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae ชนิดอื่น ๆ หรือ microcins ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรีย ในกลุ่ม Enterobacteriaceae และมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบชนิดต่างๆ (De Vuyst and Vandamme, 1994) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกพบว่ามีคุณสมบัติที่น่าสนใจกว่าที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมลบคือ มีคุณสมบัติในการทำลายแบคทีเรียที่แตกต่างกันได้หลายชนิด นอกจากนี้การควบคุมการผลิตภายในเซลล์ถูกควบคุมได้ทั้งจากพลาสมิดและโครโมโซม และแบคเทอริโอซินที่สร้างจากกลุ่มแบคทีเรียแลกติกซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเป็นที่ได้รับความนิยมมากที่สุด ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกดังแสดงในตารางที่ 1

การทดสอบสารแบคเทอริโอซินทำได้โดยการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและใช้สารยับยั้งโปรตีนเพื่อยับยั้งการผลิตสารแบคเทอริโอซิน แบคเทอริโอซินมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แบบฆ่าทำลาย (bactericidal) แบบหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) หรือแบบฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตก (bacteriolytic) อีกทั้งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะด้วยการจับกับตำแหน่งเฉพาะซึ่งอยู่บริเวณผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ (Tagg *et al*., 1976)

4.1 การจัดกลุ่มของแบคเทอริโอซิน

Klaenhammer (1993) แบ่งประเภทของแบคเทอริโอซินโดยพิจารณาจากชนิดของกรดอะมิโน มวลโมเลกุล โครงสร้างพื้นฐานและพันธะต่าง ๆ ภายในโมเลกุล รวมถึงคุณสมบัติด้านอื่น ๆ เช่น คุณสมบัติในการทนความร้อน ทำให้สามารถจัดแบ่งแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2 คือ

ตารางที่ 1. แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก

Table 1. Bacteriocin produced by lactic acid bacteria.

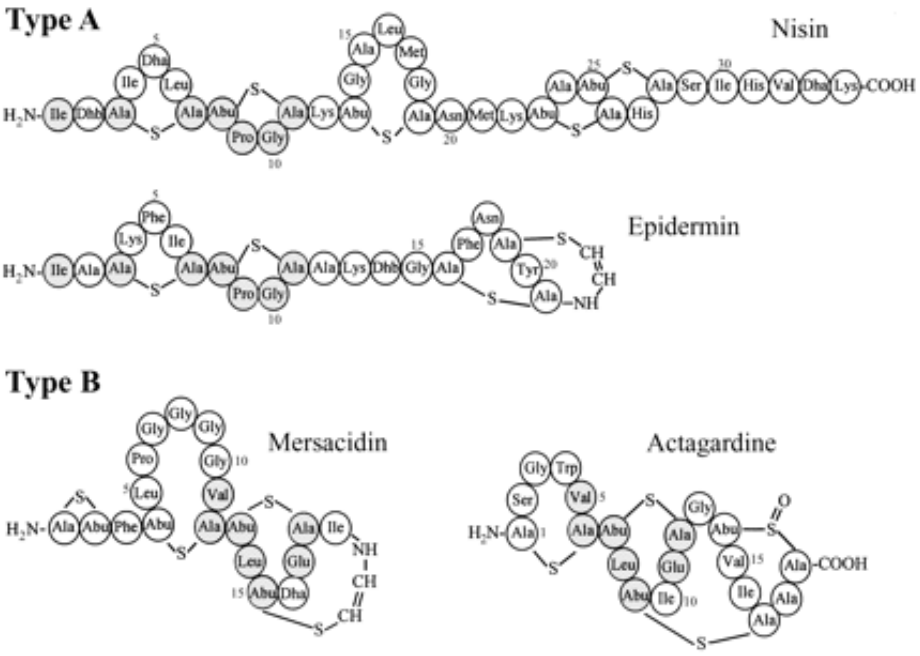
Producer	Bacteriocin
Lc. lactis ATCC 11454	nisin
Lb. sakei DSMZ 6333	sakacin A
Lb. plantarum C 11	plantaricin JK (PlnJ, PlnK)
	plantaricin EF (PlnE, PlnF)
Lb. gasseri LA 39	gassericin A
Ent. faecium H41B	enterocin A
	enterocin P
Ent. faecalis LMG 2333	enterolysin A
Ent. faecalis YI17	bacteriocin 31
Ent. faecium T136	enterocin B
Leu. mesenteroides Y105	mesentericin B105
Ped. acidilactici PAC-1.0	pediocin PA1
Strep. thermophilus SPi13	termophilin 13 (ThmA/ThmB)
Strep. pyogenes FF22	estreptococcin A-FF22

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bodaszewska-Lubas และคณะ (2012), Güllüce และคณะ (2013)

1. กลุ่ม lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่มีลักษณะเป็นสายเปปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบไปด้วยจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19-38 โมเลกุล โดยทั่วไปมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ดาลตัล ซึ่งกระบวนการสร้างสายเปปไทด์ภายในเซลล์ต้องผ่านกระบวนการที่เรียกว่า post-translation modification โดยจะมีการเปลี่ยนแปลงกรดอะมิโนบางตัวก่อนที่จะส่งออกภายนอกเซลล์ จึงทำให้ในสายเปปไทด์มีกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนที่พบโดยทั่วไป เช่น ไดดีไฮโดรอะลานีน และไดดีไฮโดรบิวทีรีน ซึ่งเกิดจากกระบวนการดีไฮเดรชันของซีรีนและทรีโอนีนตามลำดับ และภายในสายเปปไทด์แต่ละสายยังมีโครงสร้างที่เกิดจากการสร้าง thioether bridge ระหว่างหมู่ซัลฟ์ไฮดริลของกรดอะมิโนซีสเทอีนกับกรดอะมิโนไดดีไฮโดรอะลานีน หรือกรดอะมิโนซีสเทอีนกับกรดอะมิโนไดดีไฮโดรบิวทีรีน ซึ่งแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จะแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อย ดังแสดงในภาพที่ 1 คือ

-lantibiotic ชนิด A จะมีโครงสร้างเป็นเกลียว เช่น nisin จากเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis*, Pep5 จากเชื้อ *S. epidermidis* 5 และ epidermin จากเชื้อ *S. epidermidis* Tü3298 เป็นต้น

-lantibiotic ชนิด B จะมีโครงสร้างเป็นทรงกลม เช่น mersacidin จากเชื้อ *Bacillus* sp., เป็นต้น



ภาพที่ 1. โครงสร้างของ lantibiotic ชนิด A และ B

Figure 1. Structure of type A and type B lantibiotics.

ที่มา: Brötza และ Sahlb (2000)

2. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดเล็กและทนความร้อน มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 15,000 ดาลตัล เป็นแบคเทอริโอซินกลุ่มที่มีขนาดของโมเลกุลเล็ก โดยภายในโมเลกุลจะประกอบไปด้วยกรดอะมิโนจำนวนระหว่าง 20-60 โมเลกุล เป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่ทนความร้อนได้ดีและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้น้อยชนิด (narrow spectrum) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินในกลุ่ม lantibiotic โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณเบส G-C ต่ำ ซึ่งสามารถแบ่งแบคเทอริโอซิกลุ่มนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

- กลุ่ม lla. เป็นกลุ่มแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็กกว่า 10,000 ดาลตัล สามารถทำลาย *Listeria* sp. ได้ดี ซึ่งในบางครั้งถูกเรียกว่ากลุ่ม pediocin-like bacteriocins โดยพบว่าในขั้นตอนแรกแบคเทอริโอซินกลุ่มนี้จะถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะที่เป็นสายเปปไทด์ตั้งต้นที่ยังไม่

สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยการตัดสายเปปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกันได้เป็นสายเปปไทด์ที่สมบูรณ์และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ที่ปลายด้าน N ในสายเปปไทด์ของแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดในกลุ่มนี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะเหมือนกัน (conserved N-terminal sequence) ได้แก่ Try-Gly-Asn-Gly-Val และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซีสเทอีน 2 โมเลกุลที่อยู่ค่อนมาทางปลายด้าน N ของสายเปปไทด์ เช่น pediocin AcH ที่สร้างจาก *Ped. acidilactici* H, sakacin A ที่สร้างจาก *Lb. sake* Lb 706, mundticin ที่สร้างจาก *Ent. mundtii* ATO6 และ piscicocin V1a ที่สร้างจาก *Car. piscicola* V1

- กลุ่ม llb. กลุ่มแบคเทอริโอซินที่ประกอบด้วยสายเปปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน (two-peptide bacteriocin) ซึ่งสายเปปไทด์อาจแสดงกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายเพียงเส้นใดเส้นหนึ่งหรือทั้งสองเส้น แต่ในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายจะมีประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเปปไทด์ทั้งสองเส้น

-กลุ่ม llc. เป็นแบคเทอริโอซินที่มีการส่งผ่านสารออกมาภายนอกกระบวนการ *sec* (*sec*-dependent pathway) ซึ่งแตกต่างจากแบคเทอริโอซินกลุ่มอื่นๆ เช่น acidocin B

3. กลุ่ม non lantibiotic ที่มีขนาดใหญ่และไม่ทนความร้อน เป็นแบคเทอริโอซินในกลุ่มที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า 30,000 ดาลตัล และเป็นแบคเทอริโอซินชนิดที่มีคุณสมบัติไม่ทนต่อความร้อน เช่น helveticins J, acidophilucin A, lactacins A, lactacins B

4. กลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่น ๆ เช่น ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต เช่น lactocin 27 จากเชื้อ *Lb. helveticus* LP27

4.2 กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายของแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษากลไกการทำงานของแบคเทอริโอซินที่ผ่านมาพบว่าแบคเทอริโอซินต่างชนิดกันอาจมีกลไกการทำงานที่ต่างกัน แบคเทอริโอซินบางชนิดมีกลไกการทำงานแบบที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียเป้าหมายตายโดยไม่มีการแตกสลายของเซลล์ในขณะที่แบคเทอริโอซินบางชนิดมีกลไกการทำงานแบบที่ทำให้เซลล์แบคทีเรียเป้าหมายแตกสลาย (bacteriolytic mode of action) การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคเทอริโอซินเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินแต่ละโมเลกุลมาร่วมกันทำให้เกิดเป็นรูหรือช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์เป้าหมายซึ่งรูดังกล่าวจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออนสูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ (Klaenhammer, 1993)

ตารางที่ 2. การแบ่งกลุ่มแบคเทอริโอซินโดยทั่วไป

Table 2. Classification of bacteriocin.

Class	Characteristics	Produced by lactic acid bacteria
I. Lantibiotics	Modified, heat stable< 5 kDa	
Ia. Linear	Pore forming, cationic	nisin, lacticin 481, plantaricin C
Ib. Globular	Enzyme inhibitors, no cationic	marsacydin alametycin
II. Non- Lantibiotics	Heat stable, <15 kDa	
IIa. Pediocin-like	Anti-listeria, YGNGV consensus	pediocin PA1/AcH, enterocin A,
IIb. Multi-component	Two peptides	lactococcin G, plantaricin S,
IIc. sec-dependent bactriocins	Produce by the cell' s general *sec*-pathway	carno-bacteriocin A lacticin Q
III. Large proteins	Heat labile protein bacteriocins, >30 kDa	lactococcin B
IV. Complex bacteriocin	Mixture of proteins, lipids and carbohydrates in bacteriocin molecule	leucocin S, mesenterocin

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bodaszewska-Lubas และคณะ (2012); Garcia และคณะ (2010)

โดยทั่วไปแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบมีโครงสร้างผนังเซลล์ต่างกันที่ชั้นของเปปทิโดไกลแคน ซึ่งในผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยชั้นเปปทิโดไกลแคนที่หนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ แต่แบคทีเรียแกรมลบจะประกอบด้วยชั้นลิโพพอลิแซ็กคาร์ไรด์หุ้มอีกชั้นหนึ่ง โดยปกติชั้นเปปทิโดไกลแคนของแบคทีเรียจะมีโครงสร้างหลักเป็นพอลิแซ็กคาร์ไรด์ที่สลับกันระหว่าง N-acetylglucosamine และ N-acetylmuramate (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2533)

ดังนั้นแบคเทอริโอซินกลุ่ม lantibiotic เช่น nisin สามารถยับยั้งแบคทีเรียโดยการจับกับลิปิด II บนผนังเซลล์ ส่งผลให้หยุดการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคน และเกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วนแบคเทอริโอซินกลุ่ม non lantibiotic เช่น lactococcin A จะสร้างรูบนบนเยื่อหุ้มเซลล์โดยการจับกับ receptor mannose phosphotransferase system (Man-PTS) เมื่อผนังเซลล์ของแบคทีเรียมีโครงสร้างไม่สมบูรณ์ ส่งผลให้แบคทีเรียตายได้ ดังแสดงในภาพที่ 2a และในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบของแบคเทอริโอซินเกิดขึ้นโดยการควบคุมและยับยั้งกระบวนการสังเคราะห์ DNA RNA และโปรตีน เช่น microcin B17 (MccB17) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ DNA gyrase microcin J25 (MccJ25) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ RNA polymerase

และ microcin C7-C51 (MccC7-C51) ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ aspartyl-tRNA synthatase ดังภาพที่ 2b (Cotter *et al.,* 2012)

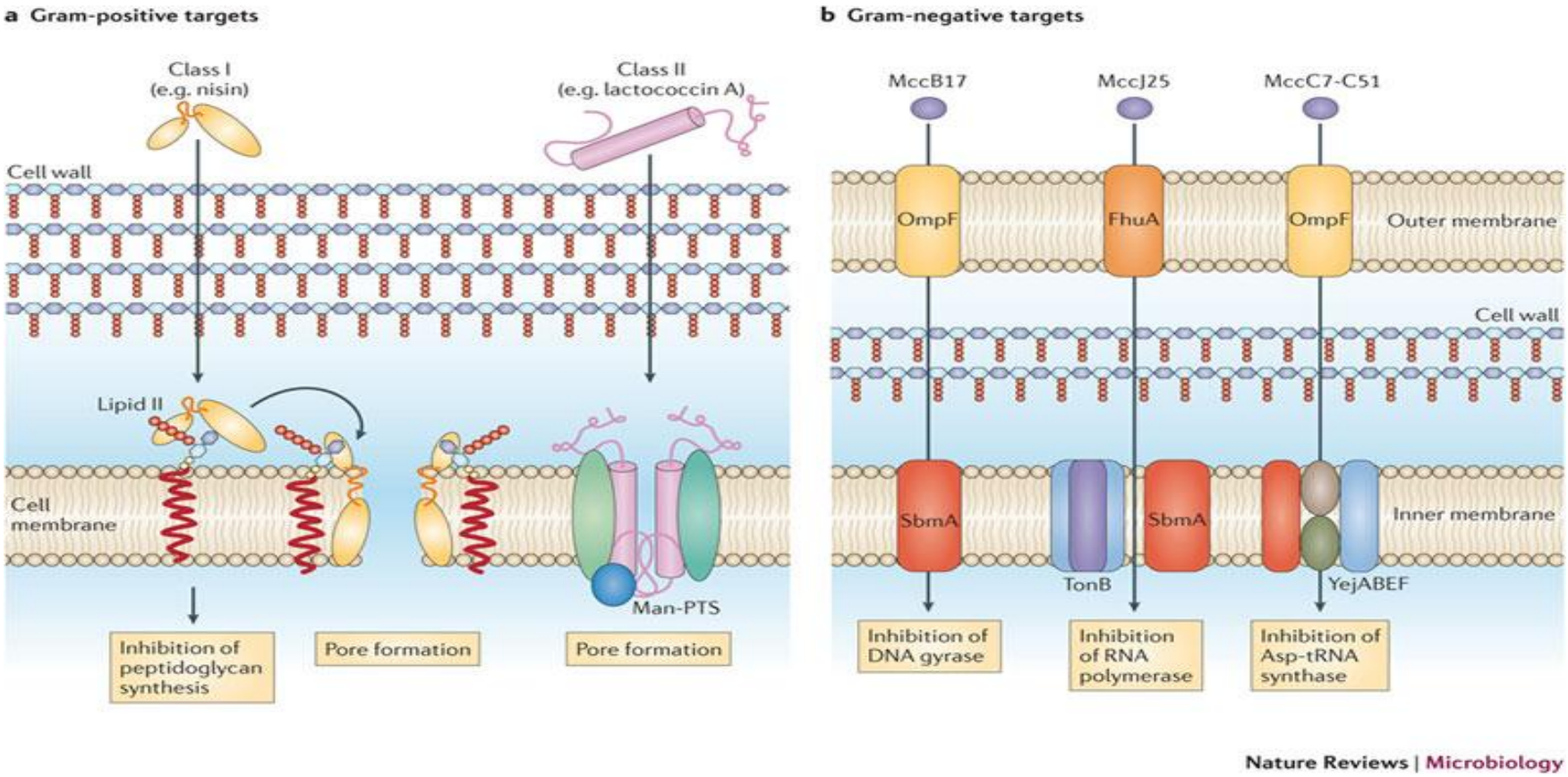
นอกจากนี้แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียด้วยการรบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่มีหน้าที่คือ osmotic barrier จะช่วยป้องกันไม่ให้สารต่างๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป และยังเกี่ยวข้องกับระบบขนส่งเพื่อนำสารเข้าและออกภายในเซลล์ โดยมีผลต่อ Proton motive force ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมดุลของโพแทสเซียมของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยเมื่อมีการผ่านเข้าไปในเซลล์มากขึ้นทำให้แรงดันในเซลล์ไม่สมดุล ส่งผลให้เซลล์แตกและตาย สำหรับตัวอย่างกลไกการทำลายผนังเซลล์แบคทีเรียของแบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3. กลไกการทำลายของแบคเทอริโอซิน

Table 3. Mode of action of a bacteriocin.

Bacteriocin	Class	Mode of action
Nisin	Ia Linear lantibiotic	Combines lipid II-mediated pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis
Mersacidin	Ib Globular lantibiotic	Inhibits transglycosylation during cell wall biosynthesis
Plantaricin C	Ia/Ib Globular pore-forming	lantibiotic Shares structural/functional features with both nisin and mersacidin
Nukacin ISK-1	Ia/Ib Globular non-pore-forming	lantibiotic Binds to lipid II-accumulating cell wall precursors
Lactococcin 972	III Heat-sensitive	Binds to lipid II blocking the incorporation of cell wall precursors at the septum

ที่มา: Roces และคณะ (2012)



ภาพที่ 2. กลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน

Figure 2. Mechanism of bacteriocin to inhibition target cell.

ที่มา: Cotter และคณะ (2012)

4.3 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

จากการศึกษาพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่สร้างและมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเจริญของเซลล์แบคทีเรียที่ผลิต (primary metabolites) โดยเฉพาะแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก ดังนั้นชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะแวดล้อมในการเจริญจึงมีความสำคัญต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน (complex medium) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินคืออุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Hurst,1981; De Vuyst and Vandamme, 1992)

4.3.1 ชนิดของแบคเทอริโอซิน

ชนิดของแบคเทอริโอซินส่งผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย เนื่องจากแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่แตกต่างกันไป เช่น nisin สามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก enterocin 1146 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lb. sake* และ *Listeria* spp. (De Vuyst and Vandamme, 1994)

4.3.2 องค์ประกอบต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อ

องค์ประกอบต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อนั้นเป็นปัจจัยที่ควรคำนึงถึงเป็นอันดับแรก ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อควรมีสารอาหารที่จำเป็นอย่างครบถ้วน เพื่อที่จะได้ผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุด ไม่ขัดขวางต่อการปลดปล่อยแบคเทอริโอซินจากตัวเซลล์ อีกทั้งต้องไม่มีผลต่อความไวของแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบแบคเทอริโอซิน (ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543) มีการศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบต่างๆของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินต่างๆดังนี้

การผลิตแบคเทอริโอซิน ST311LD จาก *Ent. faecium* ST311LD จะมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 12,800 AU/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมทริปโทนเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตร แซคคาโรส 5 เปอร์เซนต์ หรือ 10 เปอร์เซนต์ และวิตามินซีเข้มข้น 1 ppm นอกจากนี้การใช้น้ำนมถั่วเหลืองซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเลี้ยงเชื้อพบว่ามีค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นเท่ากับ 3,200 AU/มิลลิลิตร ขณะที่การใช้กากน้ำตาลซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน 10 เปอร์เซนต์ ในการเลี้ยงเชื้อส่งผลให้ไม่มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินแต่มีการเจริญที่ดี การเพิ่มปริมาณของโพแทสเซียมจะไม่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน และการเติมกลีเซอรอล 1 กรัมต่อลิตรจะยับยั้งการผลิตแบคเทอริโอซิน ST311LD (Todorov and Dicks, 2005)

การผลิต enterocin A จาก *Ent. faecium* สายพันธุ์ a_2, a_5, a_{17} และ a_{19} สามารถเจริญได้แต่ไม่ผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารที่ใช้เนยแข็ง 70 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอน แต่เชื้อ

เหล่านี้สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุดในอาหารที่มีเนยแข็ง 70 กรัมต่อลิตร ผสมกับยีสต์สกัด 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน (Mirhosseini and Emtiazi, 2011)

การผลิต enterocin AS-48 จาก *Ent. faecalis* A-48-32 จะมีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 360 AU/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อ 8 เปอร์เซนต์ ในอาหารที่ประกอบด้วย Esprion-300 ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจน 5 เปอร์เซนต์ กลูโคส 1 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และปรับ pH เท่ากับ 6.55 (Ananou *et al*., 2008)

การผลิต lactocin 705 จาก *Lb. casei* 705 CRL705 จะมีปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่ประกอบด้วย tween 80 0.5-2.0 เปอร์เซนต์ กลูโคส 2.0 เปอร์เซนต์ ทริปโทน 1.0 เปอร์เซนต์ ยีสต์สกัด 2.0 เปอร์เซนต์ และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.05 เปอร์เซนต์ และการเติมโซเดียมคลอไรด์ 3.0 เปอร์เซนต์ และโซเดียมไนไตรท์ 0.02 เปอร์เซนต์ ไม่มีผลต่อการผลิต แต่เมื่อใช้โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตแทน tween 80 พบว่าการผลิต lactocin มีเพียงเล็กน้อย เมื่อเลี้ยงในอาหาร BHI ELLiker และ M 17 จะให้ผลผลิตเล็กน้อยเช่นกัน (Vignolo *et al*., 1995)

การผลิต nisin จากเชื้อ *Lc. lactis* supsp. *lactis* NIZO 22186 จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อเติมฟอสเฟตและเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เท่ากับ 6.8 (Devuyst and Vandamme, 1993) และนอกจากนี้การผลิต pediocin ACH จาก *Ped. acidilactici* จะมีปริมาณสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนและมีการเติม tween 80 และ แมกนีเซียม (Biwas *et al*., 1995)

4.3.3 สภาวะที่ใช้ในการหมัก

อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยงและ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก Yusuf และ Hamid (2012) ศึกษาเกี่ยวกับอุณหภูมิและ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *Ent. faeciums* B3L31 พบว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินคือ อุณหภูมิในการบ่ม 37 องศาเซลเซียส และเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีค่า pH เท่ากับ 8 สำหรับสภาวะที่เหมาะสมต่อเจริญของเชื้อคือ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มี pH เท่ากับ 9 ในขณะที่ Herranz และคณะ (2001) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต enterocin P ที่ผลิตจาก *Ent. faecium* P13 โดยการหมักแบบกะไร้อากาศและควบคุม pH คงที่ ภายใต้อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส พบว่าการเลี้ยง *Ent. faecium* P13 ในอาหาร MRS ที่มีการเติมกลูโคส และมีค่า pH เท่ากับ 7 มีค่าการเจริญสูงสุด และเมื่อปรับ pH เท่ากับ 6 ส่งผลให้มีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 1,949 BU/มิลลิลิตร ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้น 4 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับค่ากิจกรรมที่ไม่มีการควบคุม pH จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าค่า pH มีผลต่อค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

4.3.4 สภาวะที่ส่งผลให้แบคเทอริโอซินเสียสภาพและค่ากิจกรรมลดลง

การเสียสภาพของแบคเทอริโอซินเหมือนกับโปรตีนทั่วไปที่อาจถูกทำลายด้วย อุณหภูมิ เอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การเกิดปฏิกิริยาการเติมออกซิเจน โลหะหนัก การกวนที่รุนแรงและมากเกินไป การฉีกขาดของโมเลกุลแบคเทอริโอซินเนื่องจากการแช่แข็งและการละลาย เป็นต้น เช่น helveticin J ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ทริปซิน โปรเนส ฟิซิน เปปซิน โปรติเนส เค และซับทิลิซิน (De Vuyst and Vandamme, 1994) piscicocin V1 และ divercin V41 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์โปรเนส อี โปรติเนส เค และทริปซิน สามารถทนต่อความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 นาที (Pilet *et al*., 1995)

4.4 การผลิตแบคเทอริโอซินโดยใช้แหล่งอาหารราคาถูก

ในการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกมักจะใช้ต้นทุนค่อนข้างสูง เนื่องจากอาหารสำเร็จรูปที่ใช้มีราคาค่อนข้างแพง ดังนั้นในการผลิตในระดับอุตสาหกรรม จำเป็นต้องศึกษาหาแหล่งของสารอาหารที่ราคาถูกมาใช้ในการผลิต แต่ทั้งนี้ต้องคำนึงถึงปริมาณสารอาหารต่างๆที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อว่ามีครบถ้วนหรือไม่ และสารอาหารนั้นต้องไม่มีสารพิษที่เป็นอันตายต่อเชื้อ และจะต้องมีปริมาณมากพอและสามารถจัดหาง่าย ตัวอย่างการนำสารอาหารที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิตแบคเทอริโอซิน ได้แก่ การใช้กากน้ำตาลและซูโครสแทนที่กลูโคส และใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร MRS ที่ใช้เลี้ยง *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) เพื่อผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่าการแทนที่แหล่งคาร์บอนด้วยซูโครสเข้นข้น 1 เปอร์เซนต์ และการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเจือจาง 50 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งไนโตรเจน ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญสูงสุด และพบว่าการไม่เติมแมงกานีสซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตไม่มีผลต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซิน อย่างไรก็ตามเมื่อไม่เติมสารประกอบบัฟเฟอร์ (แอมโมเนียมอะซิเตท โซเดียมซิเตรท และไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต) และ tween 80 ส่งผลให้การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินลดลง (ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543) สำหรับองค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าดังแสดงดังตารางที่ 4 และ 5

4.5 แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกสกุล *Enterococcus* sp.

แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกสกุล *Enterococcus* sp. ได้มีการศึกษาวิจัยจากแหล่งที่มาต่างๆกัน รวมถึงจุลินทรีย์เป้าหมายหลักที่แบคเทอริโอซินเหล่านี้สามารถยับยั้งได้ คือ *L. monocytogenes* ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 4. องค์ประกอบทางเคมีของกากน้ำตาล

Table 4. Chemical composition of molasses.

Composition	
Total protein (%)	0.2
Total sugar (%)	58
Total solid (mg/l)	300.91
Magnesium (mg/l)	29.49
Iron (mg/l)	4.58

ที่มา : ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543)

ตารางที่ 5. องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนึ่งปลาทูน่า

Table 5. Chemical composition of tuna condensate.

Composition	Before separate protein and lipid	After separate protein and lipid
pH	5.8	4.5
COD (mg/l)	116,573	90,000
Total solid (mg/l)	83,450	68,450
Colloid (mg/l)	7,760	5,840
Ash (mg/l)	3.10	2.44
Total protein (%)	7	4.0
Oil and grease (%)	2.1	1.0
Total sugar (%)	18	18
Magnesium (mg/l)	-	0.07
Manganese (mg/l)	-	63.66
Phosphorus (mg/l)	-	45.05
Iron (mg/l)	-	6.89

ที่มา : ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543)

ตารางที่ 6. คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกสกุล *Enterococcus* sp.

Table 6. Characterization of bacitracin produced by *Enterococcus* sp.

Bacteriocin	Source	Mw (kDa)	Target bacteria	Reference
Enterocin 226NWC	*Ent. faecalis* 226	5.8	*L. monocytogenes*	Villani *et al.,* 1993
Enterocin EJ97	*Ent. faecalis* EJ97	5.3	*Bacillus* sp., *Listeria* sp., *S. aureus*	Gálvez *et al.,* 1998
Enterocin SE-K4	*Ent. faecalis* K-4	5.4	*B. subtilis, C. beijerinckii, L. monocytogenes*	Eguchi *et al.,* 2001
Enterolysin	*Ent. faecalis* LMG 2333	35	Enterococci, Pediococci, Lactococci, Lactobacilli	Nilsen *et al.,* 2003
Enterocin RJ-11	*Ent. faecalis* RJ-11	5.0	*B. subtilis*	Yamamoto *et al.,* 2003
Enterocin C	*Ent. faecalis* C901	3.8	-	Maldonado-Barragán *et al.,* 2009
Enterocin AS-48	*Ent. faecalis* UGRA10	7.1	*L. monocytogenes*	Cebrián *et al.,* 2012

enterocin 226NWC ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* 226 ที่คัดแยกได้จากหางนมธรรมชาติที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งมอสซาเรลล่าจากนมกระบือ (Villani *et al.,* 1993) enterocin EJ97 เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* EJ97 ที่คัดแยกจากน้ำเสีย (Gálvez *et al.,* 1998) enterocin SE-K4 เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* K-4 ที่คัดแยกได้จากหญ้าในประเทศไทย (Eguchi *et al.,* 2001) enterocin AS-48 เป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* UGRA10 ที่คัดแยกได้จากชีสในประเทศประสเปน (Cebrián *et al.,* 2012) แบคเทอริ

โอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus* sp. เหล่านี้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3-7 กิโลดาลตัล แต่ enterocin C ที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* LMG 2333 มีน้ำหนักโมเลกุล 35 กิโลดาลตัล (Nilsen *et al.,* 2003)

4.6 การใช้ประโยชน์แบคเทอริโอซินเพื่อปรับปรุงความปลอดภัยในอาหาร

แบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจะทำให้สภาวะหรือสภาพแวดล้อมของผลิตภัณฑ์ไม่เหมาะสมต่อเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร ดังนั้นการนำแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินใช้เป็นเครื่องมือปรับปรุงความปลอดภัยในอาหารและลดความเจ็บป่วยเนื่องจากอาหารเป็นพิษ จึงเป็นวิธีที่น่าสนใจอย่างยิ่ง (O'Sullivan *et al.,* 2002; Babalola, 2007) จะไม่นิยมใช้แบคเทอริโอซินเป็นขั้นตอนแรกในการป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร แต่จะใช้เป็นตัวเสริมในภายหลังเพื่อป้องกันโรคอาหารเป็นพิษ การนำแบคเทอริโอซินไปประยุกต์ใช้ในอาหารมี 3 ประเภท คือ การใช้แบคเทอริโอซินที่บริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในการเติมเป็นส่วนประกอบในอาหาร การใช้เชื้อที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินผสมกับองค์ประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร และการใช้เชื้อที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินเป็นกล้าเชื้อร่วมกับสายพันธุ์อื่นในการหมัก (Deegan *et al.,* 2004) นอกจากนี้ Cleveland และคณะ (2001) ได้รวบรวมการทดลองในการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินเพื่อเป็นสารถนอมอาหาร ดังแสดงในตารางที่ 7 และนำแบคเทอริโอซินประยุกต์ใช้ในอาหารทะเลนั้นได้มีการศึกษาต่างๆดังนี้

Hashimoto และคณะ (2011) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการถนอมอาหารทางชีวภาพของคามาโบโกะ หรือซูริมินึ่ง โดยใช้ piscicolin KH1 ซึ่งผลิตจาก *Car. maltalomaticum* KH1 ในการยับยั้งแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Enterococcus* sp. และ *Leuconostoc* sp. ขณะเก็บรักษาคามาโบโกะ โดย *Leu. mesenteroides* จะผลิตเด็กซ์แทรน (dextran) มีลักษณะเป็นเมือกทำให้ผลิตภัณฑ์ไม่เป็นที่ยอมรับจากผู้บริโภค ทางผู้วิจัยจึงผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกเพื่อควบคุมการปนเปื้อน *Leuconostoc* sp. และ *Enterococcus* sp. ซึ่งจากผลการทดลองพบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Car. maltalomaticum* มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเหล่านี้ แบคเทอริโอซินผ่านการทำบริสุทธิ์โดยกระบวนการโครมาโตกราฟี และแบคเทอริโอซินที่ได้เรียกว่า piscicolin KH1 ในตัวอย่างคามาโบโกะที่เติม piscicolin KH1 และ nisin พบว่า piscicolin KH1 สามารถยับยั้ง *Ent. faecalis* และ *Leu. mesenteroides* ที่ปนเปื้อนในคามาโบโกะหรือซูริมินึ่งได้ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งมากกว่า nisin

Tahiri และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการเปรียบเทียบวิธีการประยุกต์ที่แตกต่างกันของ divergicin M35 เพื่อยับยั้ง *L. monocytogenes* ในปลาแซลมอลรมควันแช่เย็น โดยนำปลาแซลมอนรมควันแช่เย็นเติม divergicin M35 ซึ่งผลิตจาก *Car. divergens* M35, *Car. divergens* ATCC 35677 (สายพันธุ์ที่ไม่สร้างแบคเทอริโอซิน), divergicin M35 ที่ผ่านการทำ

บริสุทธิ์ หรือสารตะกอนแขวนลอยของอาหารเลี้ยงเชื้อของ *Car. divergens* M35 ในอาหาร snow crab hepatopancreas (SCH) medium หรือ MRS broth ซึ่งนำมาทดสอบการยับยั้ง *L. monocytogenes* ขณะเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนของ *L. monocytogenes* ที่นับได้ในปลาแซลมอนรมควันแต่ละชุดการทดลองแตกต่างกัน โดยในชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคเทอริโอซิน พบว่า *L. monocytogenes* เจริญอย่างต่อเนื่องในขณะเก็บรักษาจนมีปริมาณถึง 4.5 log CFU/กรัม หลังจากเก็บรักษาผ่านไป 15 วัน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส *Car. divergens* M35 สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ได้อย่างมีนัยสำคัญซึ่งมีปริมาณ 1.8 และ 2.6 log CFU/กรัม หลังจากการเก็บรักษาในวันที่ 7 และ 10 ตามลำดับ แต่ชุดการทดลองที่เติม *Car. divergens* ATCC 35677 ในตัวอย่าง จะไม่สามารถลดจำนวนของ *L. monocytogenes* ได้ ส่วนการใช้ divergicin M35 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ได้อย่างอย่างรวดเร็ว ลดลงประมาณ 1 log CFU/กรัม และสามารถเก็บรักษาได้ 7 วัน แต่หลังจากนั้นจำนวน *L. monocytogenes* เพิ่มขึ้น 4.3 log CFU/กรัม เมื่อเก็บรักษาได้ 21 วัน ส่วนชุดการทดลองที่นำของเหลวส่วนใสจาก SCH และ MRS มาประยุกต์ใช้ พบว่า *L. monocytogenes* ลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว 0.8 และ 1.0 log CFU/กรัม และคงที่จนถึงวันที่ 15 วันแรกของการเก็บรักษา จากการนำแบคเทอริโอซินมาประยุกต์ใช้ในทุกชุดการทดลองพบว่าสามารถลดจำนวนของ *L. monocytogenes* ได้ต่ำกว่าชุดควบคุมเชิงบวกอย่างมีนัยสำคัญ

Cobo Molinos และคณะ (2009) ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับการส่งเสริมกิจกรรมที่ทำลายจุลินทรีย์โดยใช้ enterocin AS-48 ร่วมกับน้ำมันหอมระเหย สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ และสารกันเสียต่อการยับยั้ง *L. monocytogenes* พบว่า enterocin AS-48 (30-60 ไมโครกรัมต่อกรัม) ผลิตจาก *Ent. faecalis* A-48-32 ใช้ร่วมกับน้ำมันหอมระเหย ได้แก่ ไทม์ เวอร์บีน่า ไทม์ เรด ออริกาโน่สเปน อัจเวน ต้นชา กานพลู และน้ำมันดอกเสจ เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ และน้ำมันหอมระเหยโรสแมรี่เข้มข้น 2 เปอร์เซนต์ สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ประมาณ 0.5-4.0 log CFU/กรัม สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่สกัดจากน้ำมันหอมระเหยและพืชสามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* มากกว่า 3.5 log CFU/กรัม และสารกันเสีย (กรดซิตริกและแลกติก ซูโครสพาร์มิเตท ซูโครสสเตียเรท กรดพาราไฮดรอกซีเบนโซอิกเมทิลเอสเทอร์ (PHBME) และไนซาฟลิน สามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ประมาณ 0.5-4.0 log CFU/กรัม ในสลัดสำเร็จรูปพร้อมรับประทานที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสได้

ตารางที่ 7. ผลการทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการถนอมอาหารชนิดต่าง ๆ

Table 7. Bacteriocins as food preservatives.

Bacteriocin	Application	Mode of action
Nisin A	Incorporation of nisin into a meat binding system	Reduce undesirable bacteria in restructured meat products
Pediocin AcH	Use of a pediocin AcH producer *Lact. plantarum* WHE 92 to spray on the Munster cheese surface at the beginning as the ripening period	Spray prevents outgrowth of *L. monocytogenes* and can be used as an antilisterial treatment
Enterocin 4	Use of an enterocin producer *Ent. faecalis* INIA4 as a starter culture for production of Manchego cheese	Use of an *Ent. faecails* INIA4 starter inhibits *L. monocytogenes Ohio* but not *L. monocytogenes* Scott A
Piscicolin 126	Use of piscicolin 126 to *control L. monocytogenes* in devilled ham paste	More effective than commercially available bacteriocins
Lactocin 705	Use of lactocin 705 to reduce growth of *L. monocytogenes* in ground beef	Lactocin 705 inhibits growth of *L. monocytogenes* in ground beef
Pediocin AcH	Add pediocin preparation to raw chicken	Controlled growth of *L. monocytogenes* at 5-8 °C for 28 days

ที่มา: Cleveland และคณะ (2001)

5. แบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์กุ้งและการยับยั้ง

5.1 แบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์กุ้ง

- *Salmonella* spp. เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการท้องร่วง อาเจียนและมีไข้ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2544; Bremer *et al*., 2003) สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ในวัตถุดิบจำพวกเนื้อ ไก่ไข่ นม และผลิตภัณฑ์นม ปลา กุ้ง ขากบ มะพร้าว ซอสและน้ำสลัด ส่วนผสมการทำเค้กและเนยถั่ว และนอกจากนั้นการจับสัตว์น้ำจากทะเลหรือฟาร์มเลี้ยงสัตว์น้ำอาจเกิดการปนเปื้อนเชื้อ *Salmonella* sp. ได้ (Bremer *et al*., 2003) จากการศึกษาการปนเปื้อนของ *Salmonella* sp. ในกุ้งจากฟาร์มเลี้ยงและกุ้งที่จับจากทะเล ในขั้นตอนต่างๆ ของการผลิตตั้งแต่แพปลา การขนส่ง การแปรรูป จนกลายเป็นผลิตภัณฑ์ ได้มีการตรวจพบ *Sal. derby* ในตัวอย่าง กุ้งสดที่ใช้เป็นวัตถุดิบแต่จะไม่พบเชื้อดังกล่าวในผลิตภัณฑ์ที่ต้มสุกแช่เยือกแข็ง และตรวจพบ *Sal. weltevreden* ในกุ้งจากฟาร์มเลี้ยงจากทุก

ขั้นตอนการผลิตตั้งแต่วัตถุดิบที่เข้ามาในโรงงานระหว่างการแปรรูปและผลิตภัณฑ์ที่เป็นกุ้งสดแช่แข็ง และยังพบว่าการนำระบบ Good Manufacturing Practice มาใช้ในกระบวนการแปรรูปกุ้งสามารถลดจำนวนของแบคทีเรียทั้งหมดที่ระดับ 6 log CFU/กรัม ลงเหลือ 4 log CFU/กรัม ในผลิตภัณฑ์กุ้งสด และลดลงเหลือ 2 log CFU/กรัม ในผลิตภัณฑ์กุ้งต้ม (ผ่องเพ็ญ รัตตกูล และคณะ, 2534) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าตรวจพบ *Salmonella* sp. ประมาณ 24.5 เปอร์เซนต์ ซึ่งเป็นสายพันธุ์ *Sal.* Weltevreden, *Sal.* Tennessee และ *Sal.* Dessau ในตัวอย่างกุ้งบริเวณสามเหลี่ยมปากแม่น้ำโขงเวียดนามทั้งหมด 110 ตัวอย่าง (Tran Thi *et al*., 2005)

- *S. aureus* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องและท้องเดิน (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2544) สามารถตรวจพบตามบริเวณฝี หนอง สิว ผิวหนัง ในจมูก ลำคอและบาดแผล ปนเปื้อนไปกับอาหารโดยการสัมผัส ไอ หรือจาม (Iyer and Jones, 2004; Migirov *et al*., 2005) หากผู้ผลิตมีอาการดังกล่าวอาจทำให้เชื้อนี้ปนเปื้อนมากับผลิตภัณฑ์ได้ อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าตรวจพบ *S. aureus* น้อยกว่า 50 MPN/กรัม ในผลิตภัณฑ์กุ้งดิบและปรุงสุกแช่แข็งจากการทดสอบทั้งหมด 656 ตัวอย่าง ประกอบด้วยกุ้งน้ำจืด 54 ตัวอย่าง กุ้งน้ำจืดที่ปอกเปลือกเอาเส้นเลือดดำออก 29 ตัวอย่าง กุ้งน้ำเค็ม 123 ตัวอย่าง กุ้งน้ำเค็มที่ปอกเปลือกเอาเส้นเลือดดำออก 410 ตัวอย่าง และกุ้งน้ำเค็มปรุงสุก 41 ตัวอย่าง (Singh *et al*., 1987)

- *V. parahaemolyticus* เป็นแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการปวดท้องและคลื่นไส้ บางครั้งอาจมีอาการอาเจียนด้วย (Desmarchelier, 1997; Oliver and Kaper, 1997; Hara-Kudo, 2001) แบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ในทะเล มักจะปนเปื้อนมากับอาหารทะเล มีรายงานว่ามีการตรวจพบ *V. parahaemolyticus* ในกุ้งดิบแช่เยือกแข็ง 41.05 เปอร์เซนต์ และในกุ้งผ่านความร้อนก่อนแช่เยือกแข็ง 1.64 เปอร์เซนต์ ในตัวอย่างอาหารแช่เยือกแข็งเพื่อการส่งออกทั้งหมด 630 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2536 ถึงเดือนเมษายน พ.ศ. 2537 (นิตยา พันธุ์บัวและอารุณี ศรพรหม, 2538) และนอกจากนี้ยังตรวจพบ *Vibrio* spp. 16 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 770 ตัวอย่าง ซึ่งจำแนกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *V. parahaemolyticus*, *V. damsela*, *V. alginolyticus* และ *V. fluvialis* ในตัวอย่างกุ้งที่จับได้บริเวณทางตอนใต้ของประเทศอิหร่าน (Hosseini *et al*., 2004)

-*L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียก่อโรค Listeriosis ซึ่งส่วนใหญ่จะทำให้เกิดโรคได้ง่ายกับมารดาที่กำลังตั้งครรภ์ เด็กทารก และผู้สูงอายุรวมถึงผู้ที่ป่วยเป็นโรคเอดส์ พบโดยทั่วไปในสิ่งแวดล้อมไม่ว่าจะเป็นในแม่น้ำ ดิน สิ่งปฏิกูลต่าง ๆ หรือแม้แต่ในอาหารสัตว์ เชื้อชนิดนี้พบมากในทางเดินอาหารของสัตว์ปีก วัว หมู แกะ ปลา หอย น้ำนมและอาหารแช่แข็ง (Quinlivan *et al*., 1988; Gellin and Broome, 1989; Tappero, *et al*., 1995; Bennet and Lorber, 1996; Craig *et al*., 1996; Silver, 1998; Lurie *et al*., 1999) มีรายงานว่าไม่มีการตรวจพบ *L. monocytogenes* ในกุ้งดิบ

แช่เยือกแข็ง 24 ตัวอย่าง และกุ้งต้มสุกแช่เยือกแข็ง 96 ตัวอย่าง แต่ตรวจพบ *L. innocua* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรคปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างกุ้งดิบแช่เยือกแข็งจำนวน 10 ตัวอย่าง ในช่วง พ.ศ. 2536-2537 (ปรีชา จึงสมานกูล และคณะ, 2538) อย่างไรก็ตาม Sigrun และคณะ (2006) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับการปนเปื้อนของ *L. monocytogenes* ในโรงงานผลิตกุ้งปอกเปลือกสุก (*Pandalus borealis*) 2 โรงงาน พบว่ามีปนเปื้อนของ *Listeria* spp. และ *L. monocytogenes* ในตัวอย่างกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายหรือก่อนสุดท้าย 82 ตัวอย่าง และตรวจพบในสภาพแวดล้อมของการผลิตรวมทั้ง 2 โรงงาน 82 ตัวอย่าง ในการสำรวจทั้งหมด 8 ครั้ง ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1998 ถึง 2001

5.2 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง

มีการศึกษาต่างๆที่เกี่ยวข้องกับการใช้แบคทีเรียแลกติกเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้ง เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยดังนั้นจึงเป็นที่นิยมที่จะนำมาประยุกต์ใช้ สำหรับแบคทีเรียแลกติกที่มีการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในกุ้งมาแล้ว ได้แก่ *Lb. casei* ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *V. parahaemolyticus* ในตัวอย่างกุ้งสด (Moon *et al*., 1982) *Lc. piscium* CNCM I-4031 มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *Bro. thermosphacta* และช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก โดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Fall *et al*., 2010a) นอกจากนี้ *Lc. piscium* CNCM I-4031 ยังมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์กุ้งปอกเปลือกปรุงสุกที่บรรจุภายใต้สภาวะดัดแปลงบรรยากาศ (ไนโตรเจนเข้มข้น 50 เปอร์เซนต์ และคาร์บอนไดออกไซด์เข้มข้น 50 เปอร์เซนต์)โดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกันได้อีกด้วย (Fall *et al*., 2010b)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากป่าชายเลน
2. เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยใช้วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร
3. เพื่อศึกษาสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้
4. เพื่อนำแบคเทอริโอซินและแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ประยุกต์ใช้ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุอุปกรณ์

1. แบคทีเรีย

- แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งคัดแยกได้จากป่าชายเลนโดยนายนรภัทร หวันเหล็ม (Hwanhlem *et al.,* 2014)

- แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 จาก Japan Collection of Microorganisms (JCM)

- แบคทีเรียก่อโรคเพื่อใช้ทดสอบการยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกคือ *S. auerus, V. parahaemolyticus, Salmonella* sp. และ *L. monocytogenes* จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2. กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ขนาด 70-80 ตัวต่อกิโลกรัม ซื้อจากตลาดสดคลองเรียน อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา เก็บไว้ในกล่องโฟมที่มีน้ำแข็งและกุ้งอัตราส่วน 1:1

3. วัสดุเศษเหลือทางการเกษตร

- น้ำนึ่งปลาทูน่า จากบริษัทสงขลาแคนนิ่ง จำกัด อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา นำมาทำแห้งด้วยเครื่อง Freeze-dryer ที่หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ซึ่งน้ำนึ่งปลาทูน่า 1 ลิตร สามารถทำแห้งได้ 62.5 กรัม

- กากน้ำตาล จากห้องปฏิบัติการของภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- Brain Heart Infusion (BHI) broth จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- MRS broth (de Man Rogosa and Sharp) จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- Oxford-Listeria-Selective agar จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- Oxford Listeria Supplement จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- Plate count agar จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- ผงวุ้น (Agar)

5. สารเคมี

- ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3% บริษัทวิทยาศรม จำกัด

- กลีเซอรอล (Glycerol) ยี่ห้อ AnalaR® บริษัท VWR International Ltd., England
- แอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate) ยี่ห้อ Labscan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- เปปโทน (Peptone) จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- เนื้อสกัด (Beef extract) จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- ยีสต์สกัด (Yeast extract) จากบริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
- กลูโคส (Glucose) ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Chemicals Pty., Ltd., Australia
- Tween 80
- แอมโมเนียม ซิเตรท (Ammonium citrate) ยี่ห้อ Panreac บริษัท Panreac Química S.A.U. Spain
- โซเดียม อะซิเตท (Sodium acetate) ยี่ห้อ RANKEM บริษัท RFCL Ltd., New Delhi, India
- แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate) ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Chemicals Pty., Ltd., Australia
- แมงกานีสซัลเฟต (Manganese sulphate) ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Chemicals Pty., Ltd., Australia
- ไดโพแทสเซียม ฟอสเฟต (Dipotassium phosphate) ยี่ห้อ Univar บริษัท Ajax Chemicals Pty., Ltd., Australia
- Bromocresol purple ยี่ห้อ Labchem บริษัท Ajax Finechem, Australia
- กรดไฮโดรคลอริก (HCl) ยี่ห้อ Labscan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ยี่ห้อ Labscan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) ยี่ห้อ Labscan บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- สารเคมีสำหรับวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลตามวิธี ฟีนอลซัลฟูริก (Dubois, *et al.,* 1956)
- สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณเกลือตามวิธี AOAC (2012)
- สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณอิลโดลตามวิธี AOAC (2012)
- สารเคมีวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนตามวิธี Lowry และคณะ (1951)

6. เอนไซม์

- คะตาเลส (catalase) ยี่ห้อ Fluka บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA.
- ทริปซิน (trypsin) ยี่ห้อ Fluka บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., Switzerland
- แอลฟ่า ไคโมทริปซิน (α-chymotrypsin) ยี่ห้อ Fluka บริษัท Sigma-Aldrich Pte Ltd., USA.

7. อุปกรณ์

- หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (autoclave) ยี่ห้อ Tomy รุ่น SS-325
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น MOV 212
- เครื่องชั่งละเอียด 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ A&D รุ่น HF-1200
- เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Sartorius รุ่น BP210s
- เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Orion รุ่น 420A
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ Memmert รุ่น W350
- เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Thermo Scientific Heraeus บริษัท Thermo Fisher Scientific Inc. United States
- เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิแบบตั้งโต๊ะ ยี่ห้อ Eppendorf Centrifuge รุ่น 5415R
- เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-200 บริษัท Hitachi
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044
- กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Nikon รุ่น YS2H
- เข็มและห่วงเขี่ยเชื้อ
- ปากคีบ
- อุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

1.1 การเตรียมแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 จาก glycerol stock 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการศึกษา

1.2 การเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

1.2.1 การเตรียมแบคทีเรียแลกติก ถ่ายเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 จาก glycerol stock 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง

1.2.2 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรค โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *S. auerus, V. parahaemolyticus, Salmonella* sp. และ *L. monocytogenes* จากอาหาร NA slant และจุ่มลงในอาหารเหลว BHI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *V. parahaemolyticus* จุ่มในอาหารเหลว BHI ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 3 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว BHI ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง

2. วิธีวัดกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

ทดสอบกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้ด้วยวิธี agar well diffusion assay ซึ่งดัดแปลงจาก Ammor และคณะ (2006) ดังนี้

2.1 เตรียมสารละลายส่วนใสโดยนำน้ำหมักของแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 ที่มีอายุครบ 18 ชั่วโมง มาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และปรับ pH ให้เป็น 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 6 นอร์มอล และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์และกำจัดเชื้อที่มีในสารละลายส่วนใส

2.2 ดูดเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ที่มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/มิลลิลิตร ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS agar ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มีวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซนต์ (w/v) ทำการ pour plate และเจาะหลุมด้วย sterile tube (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.38 มิลลิเมตร) และในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจะเปลี่ยนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เป็นเชื้อก่อโรคได้แก่ *S. aureus, V. parahaemolyticus, Salmonella* sp. และ *L. monocytogenes* และใช้อาหาร BHI agar ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ที่มีวุ้นเข้มข้น 0.75 เปอร์เซนต์ แทนอาหาร MRS agar

2.3 ดูดสารละลายส่วนใสที่ต้องการวัด และตัวอย่างที่ได้เจือจางครั้งละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (2 fold dilution) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในหลุมที่เจาะไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตค่าการเจือจางสุดท้ายที่ทำให้เกิดวงใส แล้วคำนวณกิจกรรมการยับยั้งดังสูตร

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (AU/มิลลิลิตร)} = \frac{(1000 \times \text{Dilution factor})}{(50 \text{ ไมโครลิตร})}$$

3. การยืนยันผลการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยเลี้ยงแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 ในอาหารเหลว MRS จนครบ 18 ชั่วโมง และนำ

น้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารละลายใสมาเตรียมชุดการทดลองดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 สารละลายใสที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์ออก

ชุดการทดลองที่ 2 สารละลายจากชุดการทดลองที่ 1 ปรับ pH เท่ากับ 6.5 ด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 6 นอร์มอล

ชุดการทดลองที่ 3 สารละลายจากชุดการทดลองที่ 2 เติมเอนไซม์คะตาเลส 300 ยูนิตต่อมิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ 4 สารละลายจากชุดการทดลองที่ 3 เติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน คือ เอนไซม์ทริปซินและแอลฟ่า ไคโมทริปซิน ความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และนำไปบ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง

นำชุดการทดลองทั้งหมด ให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่เหลืออยู่ในสารละลาย และนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 โดยวิธี agar well diffusion assay สังเกตรัศมีวงใสของการยับยั้ง และวัดขนาดวงใสด้วยเวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์ บันทึกผลเป็นค่ารัศมีของการยับยั้งที่ลบด้วยรัศมีของหลุม

4. การเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

ถ่ายเชื้อเริ่มต้น *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มตัวอย่างที่เวลา 0, 4, 8, 12, 18, 24, 30 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวัดค่า pH ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และวัดค่ากิจกรรมด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ และคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ให้ค่ากิจกรรมสูงกว่าเพื่อนำไปศึกษาขั้นต่อไป

5. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน

5.1 คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินได้นำวัสดุเศษเหลือมาใช้เป็นแทนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน โดยวัสดุเศษเหลือที่ใช้ได้แก่ กากน้ำตาลแทนแหล่งคาร์บอน และน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน ซึ่งเบื้องต้นก่อนการศึกษาต้องทำการวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญในวัสดุเศษเหลือ ดังนี้

- วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลโดยวิธีการฟีนอลซัลฟูริก (Dubois, *et al.,* 1956)

- วิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในน้ำนึ่งปลาทูน่าด้วยเครื่อง CN analyzer (หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์)

- วิเคราะห์ปริมาณเกลือในน้ำนึ่งปลาทูน่าโดยวิธี AOAC (2012)

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นของ *Ent. faecalis* TS9S17 ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีการแทนที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน และ pH เท่ากับ 6.5 ดังนี้

ชุดการทดลองที่ 1 อาหารเหลว MRS สูตรทั่วไปที่ประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร เปปโทน 10 กรัมต่อลิตร เนื้อสกัด 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 5 กรัมต่อลิตร tween 80 1 กรัมต่อลิตร แอมโมเนียมซิเตรท 2 กรัมต่อลิตร โซเดียมอะซิเตท 5 กรัมต่อลิตร แมกนีเซียมซัลเฟต 0.1 กรัมต่อลิตร แมงกานีสซัลเฟต 0.05 กรัมต่อลิตร และไดโพแทสเซียมฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตร (De Man *et al.,* 1960)

ชุดการทดลองที่ 2 อาหารเหลว MRS ที่เติมกากน้ำตาลแทนที่กลูโคสในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับปริมาณกลูโคส

ชุดการทดลองที่ 3 อาหารเหลว MRS ที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนที่เปปโทนในปริมาณที่มีไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับเปปโทน

ชุดการทดลองที่ 4 อาหารเหลว MRS ที่เติมกากน้ำตาลแทนที่กลูโคสในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากับปริมาณกลูโคส และเติมน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนที่เปปโทน ในปริมาณที่มีไนโตรเจนทั้งหมดเท่ากับเปปโทน

ซึ่งหลังจากถ่ายเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ลงในอาหารเหลว MRS ทั้ง 4 ชุดการทดลอง ทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จะสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดค่า pH ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และวัดค่ากิจกรรมแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ และคัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเพื่อนำไปศึกษาขั้นต่อไป

5.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นของ *Ent. faecalis* TS9S17 ปริมาณ 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร MRS 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8 โดยใช้แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่คัดเลือกจากข้อ 5.1 และปรับ pH เท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จะสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดค่า

pH ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และวัดค่ากิจกรรมแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ และคัดเลือกสูตรอาหารที่ให้ค่ากิจกรรมแบคเทอริโอซินสูงสุดเพื่อนำไปศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 8. องค์ประกอบของอาหาร MRS สูตรดัดแปลง

Table 8. Composition of Modified MRS.

Composition (g/l)	General MRS (Control)	Modified MRS 1	Modified MRS 2	Modified MRS 3
Glucose	20	20	20	20
Peptone	10	-	-	-
Beef extract	10	10	-	-
Yeast extract	5	5	5	-
Tuna condensate	-	13.5	26.5	26.5

หมายเหตุ : องค์ประกอบอื่นๆเติมตามสูตรอาหาร MRS ทั่วไป (De Man *et al.,* 1960)

5.3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นของ *Ent. faecalis* TS9S17 ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และปรับ pH เท่ากับ 6.5 จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลาที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ทำการสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดค่า pH ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และวัดค่ากิจกรรมด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ และคัดเลือกสภาวะอุณหภูมิที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเพื่อนำไปศึกษาขั้นต่อไป

5.4 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นของ *Ent. faecalis* TS9S17 ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่เหมาะสมจากข้อ 5.2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH เท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 โดยใช้โซเดียมไฮดอกไซด์ เข้มข้น 6 นอร์มอล หรือไฮโรคลอริกเข้มข้น 6 นอร์มอล จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อครบเวลาที่ 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง จะสุ่มตัวอย่างเพื่อวัดค่า pH ค่าการดูดกลืนแสงที่ 650 นาโนเมตร และวัดค่ากิจกรรมแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ และคัดเลือกสภาวะที่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดเพื่อนำไปศึกษาขั้นต่อไป

6. ศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน

6.1 การผลิตและการเตรียมแบคเทอริโอซิน

ถ่ายเชื้อเริ่มต้นของ *Ent. faecalis* TS9S17 ปริมาณ 1 เปอร์เซนต์ ลงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่เหมาะสม ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่ปรับ pH เริ่มต้นให้เหมาะสม และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตตามผลการศึกษาข้างต้น เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สารละลายส่วนใสปรับ pH เท่ากับ 6.5 และตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นกำจัดเกลือออกด้วยการไดอะไลซิส (1,000 ดาลตัล) และนำสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้ทำเป็นผงแห้งด้วยเครื่อง Freeze-dryer (หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์) และเก็บผงแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาใช้จะละลายด้วยน้ำที่ปราศจากไอออน (deionized water) (Du Toit *et al.,* 2000) ทำการวัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินหลังการทำแห้ง เพื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินระหว่างก่อนและหลังการทำแห้ง

6.2 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานของแบคเทอริโอซิน

นำสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้หลังจากไดอะไลซิส (2,560 AU/มิลลิลิตร) ซึ่งมี pH เท่ากับ 6.5 มาปรับ pH ให้เท่ากับ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 จากนั้นวัดค่ากิจกรรมด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ และเลือกค่า pH ที่ให้กิจกรรมสูงสุดเพื่อนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

6.3 ความคงตัวต่ออุณหภูมิต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

นำสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้หลังจากไดอะไลซิส (2,560 AU/มิลลิลิตร) ซึ่งมี pH เท่ากับ 6.5 บ่มนาน 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37, 60, 80 และ 100 องศาเซลเซียส และบ่มที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที (ดัดแปลงจาก Du Toit *et al.,* 2000) เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำสารละลายแบคเทอริโอซินมาวัดค่ากิจกรรมด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

6.4 อุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

นำสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้หลังจากไดอะไลซิส (2,560 AU/มิลลิลิตร) ซึ่งมี pH เท่ากับ 6.5 มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 สัปดาห์ นำสารละลายแบคเทอริโอซินปรับ pH ให้เหมาะสมต่อการทำงานจากตามข้อ 6.2

และวัดค่ากิจกรรมด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

6.5 ความคงตัวที่ pH ต่างๆต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

นำสารละลายแบคเทอริโอซินที่ได้หลังจากไดอะไลซิส (2,560 AU/มิลลิลิตร) ซึ่งมี pH เท่ากับ 6.5 มาปรับ pH ให้มีค่าเท่ากับ 2, 4 , 6, 8, 10 และ 12 นำไปบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (ดัดแปลงจาก Ogunbanwo *et al.,* 2003) หลังจากนั้นนำสารละลายแบคเทอริโอซินปรับ pH ให้เหมาะสมต่อการทำงานตามผลการศึกษาข้อ 6.2 และวัดค่ากิจกรรมด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

7. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* โดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วม

7.1 เลี้ยงเชื้อ *L. monocytogenes* ใน Brain Heart Infusion broth (BHI) จนมีอายุ 18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^6 CFU/มิลลิลิตร

7.2 เลี้ยงเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^6 CFU/มิลลิลิตร

7.3 นำเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 7.1 และ 7.2 อย่างละ 1 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า (4 มิลลิลิตร) + BHI ที่มีความเข้มข้น 2 เท่า (4 มิลลิลิตร) และเททับผิวหน้าด้วยพาราฟินเหลว ส่วนชุดควบคุมจะมีการเติมเชื้อแบคทีเรีย *Ent. faecalis* TS9S17 หรือเชื้อ *L. monocytogenes* เพียงอย่างเดียว บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างของแต่ละชุดการทดลองมาตรวจวัด pH และนับจำนวนแบคทีเรียด้วยวิธี spread plate ความเจือจางละ 3 ซ้ำ แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ซึ่งจะนับจำนวน *L. monocytogenes* โดยใช้อาหาร Oxford-Listeria-Selective agar และนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 ใช้อาหาร MRS agar ที่เติม bromocresol purple 0.004 เปอร์เซนต์

8. การยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก

8.1 เตรียมกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก

นำกุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) ดังภาพที่ 3 มาล้างให้สะอาด ทำการปอกเปลือกและตัดหัวออก ลวกด้วยน้ำเดือดที่ผสมสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ ที่

อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที แช่ด้วยน้ำแข็งทันทีและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (ดัดแปลงจาก Fall *et al*., 2010a)

ภาพที่ 3. กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*)

Figure 3. White shrimp (*Litopenaeus vannamei*).

8.2 เตรียมตัวเซลล์แบคทีเรีย และสารละลายแบคเทอริโอซิน

- นำผงแบคเทอริโอซินละลายด้วยน้ำที่ปราศจากไอออนในอัตราส่วน 0.30 กรัมต่อมิลลิลิตร (2,560 AU/มิลลิลิตร) ปริมาณ 5 มิลลิลิตร และถ่ายลงในขวดสเปรย์ปลอดเชื้อ
- เลี้ยงแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 ใน MRS broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกเอาตัวเซลล์ ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเจือจางเซลล์อย่างเป็นลำดับให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU/มิลลิลิตร และถ่ายเซลล์ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดสเปรย์ปลอดเชื้อ
- เลี้ยงเชื้อ *L. monocytogenes* ใน Brain Heart Infusion (BHI) broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงแยกเอาตัวเซลล์ด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้างเซลล์ด้วยโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นเจือจางเซลล์อย่างเป็นลำดับให้มีปริมาณเซลล์เท่ากับ 10^6 CFU/มิลลิลิตร และถ่ายเซลล์ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงในขวดสเปรย์ปลอดเชื้อ

8.3 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* บนตัวอย่างกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกโดยมีชุดการทดลองดังนี้

1) กุ้งปอกเปลือกปรุงสุกปลอดเชื้อ 125 กรัม (ชุดควบคุม)

2) กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก 125 กรัม + แบคเทอริโอซิน 5 มิลลิลิตร

3) กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก 125 กรัม + *Ent. faecalis* TS9S17 5 มิลลิลิตร

4) กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก 125 กรัม + *L. monocytogenes* 5 มิลลิลิตร

5) กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก 125 กรัม + *L. monocytogenes* 5 มิลลิลิตร + แบคเทอริโอซิน 5 มิลลิลิตร

6) กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก 125 กรัม + *L. monocytogenes* 5 มิลลิลิตร + *Ent. faecalis* TS9S17 5 มิลลิลิตร

ชุดการทดลองที่ 1 เป็นชุดควบคุมคือกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกปลอดเชื้อ 125 กรัม เตรียมโดยนำกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกปริมาณ 125 กรัม เทลงในถาดปลอดเชื้อและฆ่าเชื้อด้วยแสง UV ในตู้ปลอดเชื้อนาน 30 นาที ซึ่งชุดการทดลองที่ 2-6 จะใช้กุ้งปอกเปลือกปรุงสุกฆ่าเชื้อเช่นเดียวกัน

ชุดการทดลองที่ 2 เตรียมโดยสเปรย์สารละลายแบคเทอริโอซินเข้มข้น 0.30 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกปริมาณ 125 กรัม และตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

ชุดการทดลองที่ 3 เตรียมโดยสเปรย์เชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกปริมาณ 125 กรัม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

ชุดการทดลองที่ 4 เตรียมโดยสเปรย์เชื้อ *L. monocytogenes* ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกปริมาณ 125 กรัม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

ชุดการทดลองที่ 5 เตรียมโดยสเปรย์เชื้อ *L. monocytogenes* ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกปริมาณ 125 กรัม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 15 นาที แล้วทำการสเปรย์สารละลายแบคเทอริโอซินเข้มข้น 0.30 กรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 5 มิลลิลิตรลงบนตัวอย่างเดิมและตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

ชุดการทดลองที่ 6 เตรียมโดยสเปรย์เชื้อ *L. monocytogenes* ปริมาณ 5 มิลลิลิตร ลงบนกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกปริมาณ 125 กรัม จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อครบเวลาที่กำหนดทำการสเปรย์เชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงบนตัวอย่างเดิมและตั้งทิ้งไว้ 15 นาที

ตัวอย่างกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกทุกชุดการทดลองจะถูกแบ่งใส่ถุงซิปพลาสติก (LDPE zip lock) ถุงละ 25 กรัม เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน และจะทำการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย วัดค่า pH ในวันที่ 0, 7, 14, 21 และ 28 ซึ่งในการนับจำนวนแบคทีเรียทำโดยนำตัวอย่าง 25 กรัม ใส่ในถุง stomacher เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นทำการตีให้เข้ากันด้วยเครื่อง stomacher blender ประมาณ

2 นาที และเจือจางแบบ ten-fold serial dilution ทำการ spread plate บนอาหาร Plate count agar (PCA) เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด spread plate บนอาหาร Oxford-Listeria-Selective agar เพื่อนับจำนวน *L. monocytogenes* และ spread plate บนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.004 เปอร์เซนต์ เพื่อนับจำนวนแบคทีเรียแลกติก และวิเคราะห์อินโดลตามวิธีของ AOAC (2012) ดังแสดงในภาคผนวก ข

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

9. การยืนยันผลการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

เมื่อนำสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่า สารละลายส่วนใสของทั้ง *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 ที่ปรับ pH เท่ากับ 6.5 มีบริเวณใสของการยับยั้งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่ปรับ pH โดยที่บริเวณใสของการยับยั้งของ *Ent. feacalils* TS9S17 ลดลงจาก 3.45±0.06 มิลลิเมตร เหลือ 2.25±0.02 มิลลิเมตร และบริเวณใสของการยับยั้งของ *Ent. feacalils* TS9S19 ลดลงจาก 3.90±0.04 มิลลิเมตร เหลือ 2.45±0.03 มิลลิเมตร แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งในลักษณะนี้จะมีผลมาจากกรดอินทรีย์และสารประกอบอื่นๆ เมื่อนำสารละลายส่วนใสที่ปรับ pH เท่ากับ 6.5 และเติมเอนไซม์คะตาเลสเข้มข้น 300 ยูนิตต่อมิลลิลิตร มาทดสอบพบว่า กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของ *Ent. feacalils* TS9S17 ไม่ลดลง แต่กิจกรรมการยับยั้งของ *Ent. feacalils* TS9S19 ลดลงเพียงเล็กน้อยจาก 2.45±0.03 มิลลิเมตร เหลือ 2.20±0.02 มิลลิเมตร จากผลการทดสอบสามารถอธิบายได้ว่า การยับยั้งที่เกิดขึ้นไม่มีผลมาจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อนำสารละลายส่วนใสที่ปรับ pH เท่ากับ 6.5 และเติมเอนไซม์ทริปซินและแอลฟ่า ไคโมทริปซินลงไป พบว่า กิจกรรมการยับยั้งที่มีการลดลงและหายไป แสดงว่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ของแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 เกิดจากการทำงานร่วมกันของกรดอินทรีย์และแบคเทอริโอซิน ดังแสดงในตารางที่ 9

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Hwanhlem และคณะ (2014) ที่ได้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ของสารละลายส่วนใสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Lc. lactis* subsp. *lactis* KT2W2L, *Ent. feacalils* KT2W2G, *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 ซึ่งพบว่า กิจกรรมการยับยั้งของเชื้อเหล่าจะลดลงและหายไปเมื่อเติมเอนไซม์ทริปซินและแอลฟ่า ไคโมทริปซิน แสดงให้เห็นว่าสารละลายส่วนใสที่นำมาทดสอบเป็นสารแบคทอริโอซิน

ตารางที่ 9. กิจกรรมการยับยั้ง *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 ของสารละลายส่วนใส จาก *Enterococcus faecalis* TS9S17 และ *Enterococcus faecalis* TS9S19

Table 9. Inhibition activity of cell free supernatants from *Enterococcus faecalis* TS9S17 and *Enterococcus faecalis* TS9S19 against *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157.

Treatment	Inhibition zone (mm)	
	Ent. feacalils TS9S17	*Ent. feacalils* TS9S19
CFS	3.45±0.06	3.90±0.04
CFS +neutral	2.25±0.02	2.45±0.03
CFS + neutral + catalase	2.25±0.08	2.20±0.20
CFS + neutral + catalase + trypsin	0.60±0.35	0.20±0.40
CFS + neutral + catalase + α-chymotrypsin	0.00	0.00

CFS: Cell free supernatant

CFS + neutral: Cell free supernatant adjusted pH to 6.5

CFS + neutral + catalase: Cell free supernatant adjusted pH to 6.5 and treated with catalase

CFS + neutral + catalase + trypsin: Cell free supernatant adjusted pH to 6.5 and treated with catalase and trypsin

CFS + neutral + catalase + α-chymotrypsin: Cell free supernatant adjusted pH to 6.5 and treated with catalase and α-chymotrypsin

2. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก

เมื่อนำสารละลายส่วนใสของเชื้อ *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี agar well diffusion assay ซึ่งแบคทีเรียก่อโรคประกอบด้วย *L. monocytogenes, Salmonella* sp., *S. aureus* และ *V. parahaemolyticus* พบว่า ทั้ง *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เฉพาะ *L. monocytogenes* เท่านั้นดังแสดงในตารางที่ 10 บริเวณใสของการยับยั้งของ *Ent. feacalils* TS9S17 เท่ากับ 2.00±0.28 มิลลิเมตร และบริเวณใสของการยับยั้งของ *Ent. feacalils* TS9S19 เท่ากับ 2.10±0.00 มิลลิเมตร การยับยั้งดังกล่าวเกิดจากกลไกการยับยั้งของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 โดยในการยับยั้ง *L. monocytogenes* ซึ่งเป็น

แบคทีเรียแกรมบวกที่มีชั้นเปปทิโดไกลแคนหนากว่าแบคทีเรียแกรมลบ ดังนั้นแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกโดยการจับกับลิปิด II บนผนังเซลล์ จึงส่งผลให้หยุดการสังเคราะห์เปปทิโดไกลแคนและเกิดรูบนบนเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เซลล์ตาย (Cotter *et al.,* 2012)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าสารละลายส่วนใสของเชื้อ *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกเช่นเดียวกับเชื้อ *L. monocytogenes* ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* นอกจากนี้ พงษ์เทพ วิไลพันธ์ (2546) กล่าวว่าแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่ไม่ถูกยับยั้งด้วยแบคเทอริโอซินนั้น เกิดจากแบคทีเรียแกรมบวกดังกล่าวมีชนิดและปริมาณของกรดไขมันและฟอสโฟลิพิดในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ที่แตกต่างจากแบคทีเรียแกรมบวกที่ถูกยับยั้งด้วยแบคเทอริโอซิน และอาจมีองค์ประกอบของผนังเซลล์บางส่วนที่ขัดขวางการทำงานของแบคเทอริโอซิน โดยมีการทดลองพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ถูกยับยั้งด้วยแบคเทอริโอซินจะถูกยับยั้งได้ด้วยแบคเทอริโอซินเมื่อเซลล์ดังกล่าวอยู่ในลักษณะที่ไม่มีผนังเซลล์ (Schved *et al*., 1994; Ennahar *et al.*, 2000)

ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Elotmani และคณะ (2002) ซึ่งรายงานว่าสารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* R69 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *L. ivanovii* LMA 94 จากการทดลองของ Rehaiem และคณะ (2010) รายงานว่าสารละลายส่วนใสของ *Ent. faecium* MMRA สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus* sp., *Leuconostoc* sp., *Enterococcus* sp. และ *Listeria* sp. ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด ได้แก่ *Hafnia*, *Serratia* และ *E. coli* จากการทดลอง Hwanhlem และคณะ (2014) ซึ่งได้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากป่าชายเลนได้แก่ *Lc. lactis* subsp. *lactis* KT2W2L, *Ent. feacalils* KT2W2G, *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* (hospital strain), *L. monocytogenes* DMST 17303, *Ent. faecalis* LPS04, *Lb. plantarum* D6SM3, *B. cereus* DMST 5040 และ *Bro. thermosphacta* DSM 20171 ได้ และนอกจากนี้ *Ent. feacalils* KT2W2G , *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *Strep. salivarius* LD219 ได้อีกด้วย

ตารางที่ 10. กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของสารละลายส่วนใสจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17 และ *Enterococcus faecalis* TS9S19

Table 10. Inhibition activity of cell free supernatants from *Enterococcus faecalis* TS9S17 and *Enterococcus faecalis* TS9S19 against pathogenic bacteria.

Indicator organisms	Inhibition zone (mm)	
	Ent. feacalils TS9S17	*Ent. feacalils* TS9S19
L. monocytogenes	2.00±0.28	2.10±0.00
Salmonella spp.	-	-
S. aureus	-	-
V. parahaemolyticus	-	-

-: no inhibition

3. การเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 มาศึกษาการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเหลว MRS พบว่า เชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นและเข้าสู่ช่วง log phase ที่ระยะเวลา 4 ถึง 12 ชั่วโมง โดยมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเหลว ซึ่ง pH ลดลงจาก 6.3 เหลือ 5.2 และมี pH ลดลงเท่ากับ 4.5 ที่ 48 ชั่วโมง ในขณะที่การผลิตแบคเทอริโอซินจะเริ่มผลิตตั้งแต่เริ่มต้นของช่วง log phase ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง โดยมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 20 AU/มิลลิลิตร และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในช่วง log phase ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญของเซลล์ โดยการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Ent. faecalis* TS9S17 มีค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง และคงที่จนถึง 30 ชั่วโมง แต่เมื่อถึง 48 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 20 AU/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 4

Ent. faecalis TS9S19 มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงเริ่มต้นและเข้าสู่ช่วง log phase ที่ระยะเวลา 4 ถึง 12 ชั่วโมง และมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่า pH ของอาหารเหลว pH ลดลงจาก 6.4 เหลือ 4.8 ที่ 12 ชั่วโมง และมี pH เท่ากับ 4.4 ที่ 48 ชั่วโมง โดยการผลิตแบคเทอริโอซินจะเกิดขึ้นในช่วงสุดท้ายของ log phase ที่ระยะเวลา 8 ชั่วโมง ซึ่งมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 20 AU/มิลลิลิตร และค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง แต่เมื่อถึง 48 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 20 AU/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 5 จากผลการทดลองศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 จะเห็นได้ว่ากิจกรรมแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเจริญของ

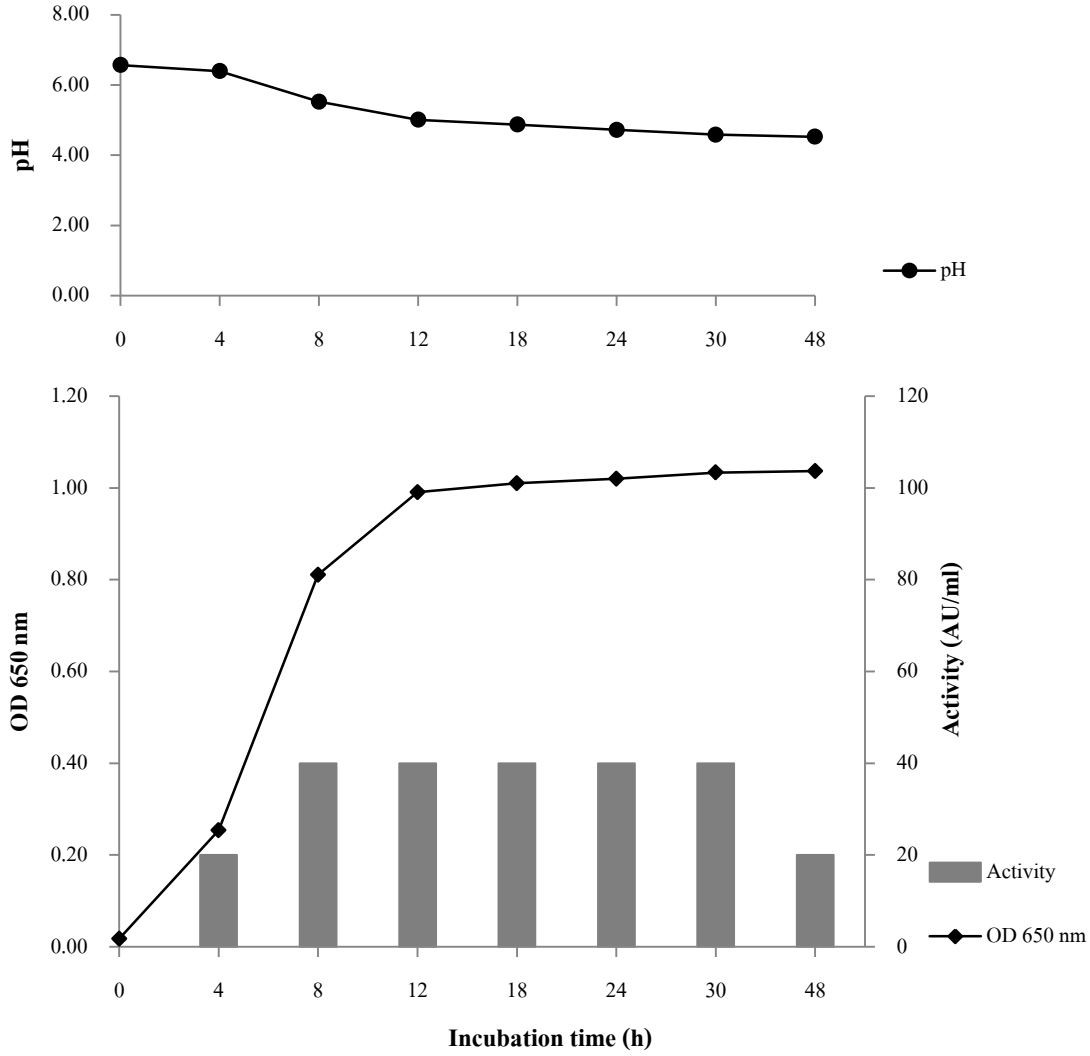
แบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 สายพันธุ์ โดยเมื่อมีการเจริญเพิ่มมากขึ้นกิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินก็เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน และเมื่อการเจริญเริ่มคงที่ในช่วง stationary phase กิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินก็มีค่าคงที่เช่นเดียวกัน แสดงให้เห็นว่าการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีลักษณะแบบมีความสัมพันธ์กับการเจริญ (growth associated production) และเมื่อเปรียบเทียบการผลิต แบคเทอริโอซินระหว่างแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 พบว่า *Ent. faecalis* TS9S17 มีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงกว่า *Ent. faecalils* TS9S19 ในช่วง log phase แต่การผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกทั้งสองสายพันธุ์จะลดลงที่ช่วงสุดท้ายของ stationary phase ซึ่งการลดลงของแบคเทอริโอซินนั้นอาจเกิดจากการย่อยของเอนไซม์ย่อยโปรตีนภายนอกเซลล์ หรือเกิดจากการดูดซับสารเข้าสู่เซลล์ (De Vuyst and Vandamme, 1992; Parente *et al.,* 1994; Todorov *et al.,* 2010) งานวิจัยอื่นๆที่พบว่า แบคเทอริโอซินลดลงเช่นเดียวกัน คือ การผลิต แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Ent. faecalils* RJ-11 (Yamamoto *et al.,* 2003) *Ent. mundtii* ST4SA (Todorov and Dicks, 2009) และ *Ent. faecium* ST5Ha (Todorov *et al.,* 2010)

4. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน

4.1 แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

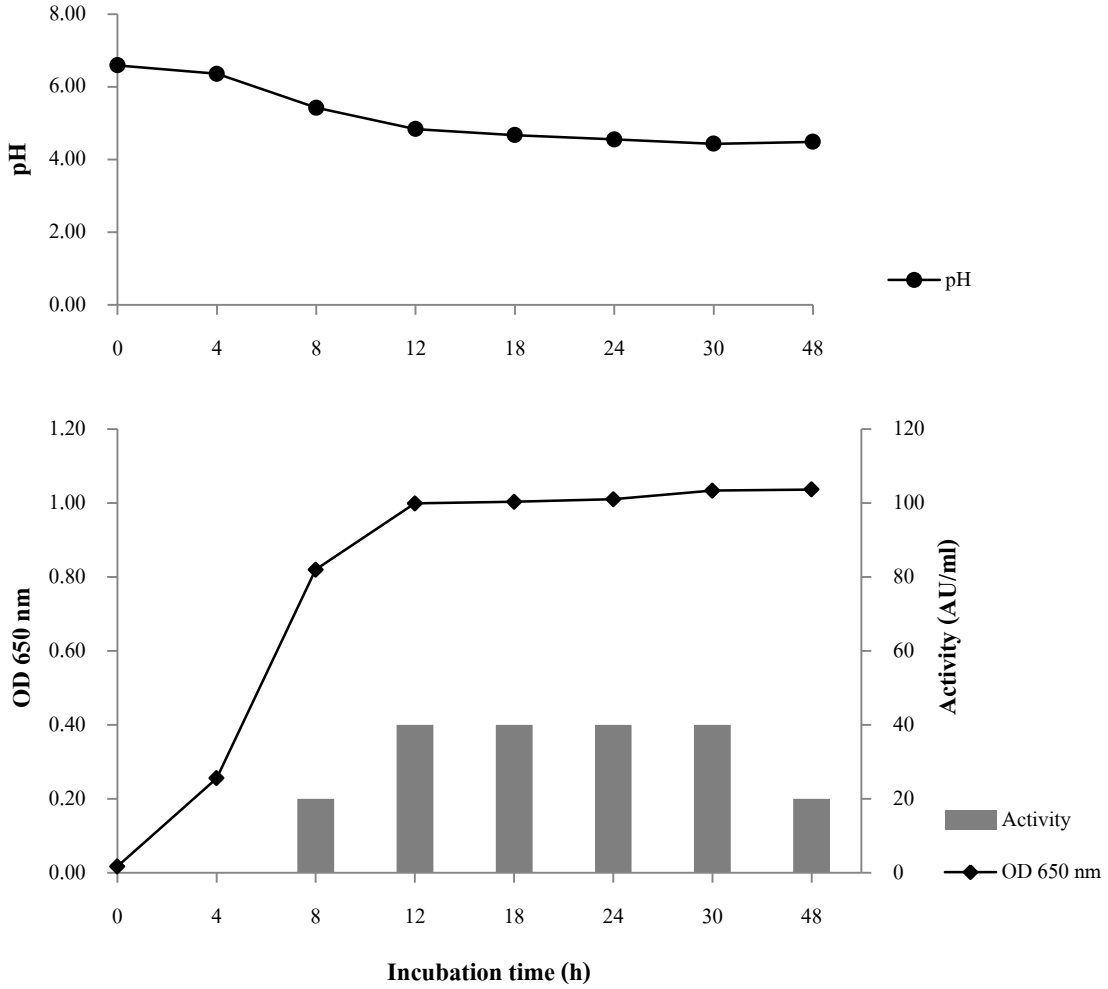
ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินได้นำวัสดุเศษเหลือมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเหลว MRS ซึ่งได้แก่ กากน้ำตาลแทนแหล่งคาร์บอน และน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญในวัสดุเศษเหลือก่อนนำไปศึกษา พบว่า ในกากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมด 956.96 กรัมต่อลิตร ดังนั้นจะต้องแทนกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร ด้วยกากน้ำตาลประมาณ 20 มิลลิลิตรต่อลิตร ซึ่งวิธีการคำนวณปริมาณกากน้ำตาลที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหาร MRS ดังแสดงในภาคผนวก ค

ในอาหาร MRS มีองค์ประกอบของเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร โดยปริมาณไนโตรเจนในเปปโทนมีเท่ากับ 11.5 เปอร์เซนต์ และในการวิเคราะห์ปริมาณไนโตรเจนในน้ำนึ่งปลาทูน่าหลังจากการทำแห้งพบว่า มีเท่ากับ 8.5 เปอร์เซนต์ ดังนั้นจะต้องใช้น้ำนึ่งปลาทูน่า 13.5 กรัมต่อลิตร จึงจะทำให้มีปริมาณไนโตรเจนเท่ากับเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร ซึ่งวิธีการคำนวณปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ใช้เป็นองค์ประกอบของอาหาร MRS ดังแสดงในภาคผนวก ค นอกจากนี้น้ำนึ่งปลาทูน่าประกอบด้วยเกลือประมาณ 11.09 เปอร์เซนต์ และมีองค์ประกอบอื่นๆดังแสดงดังตารางที่ 11



ภาพที่ 4. การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Figure 4. Growth and bacteriocin activity of *Enterococcus faecalis* TS9S17 and change of pH in MRS broth at 37 ºC.



ภาพที่ 5. การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Enterococcus faecalis* TS9S19 และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Figure 5. Growth and bacteriocin activity of *Enterococcus faecalis* TS9S19 and change of pH in MRS broth at 37 ºC.

ตารางที่ 11. องค์ประกอบทางเคมีของน้ำนึ่งปลาทูน่า

Table 11. Chemical composition of tuna condensate.

Composition	
pH	7.20
Total protein (%w/w)	8.50
Salt (%w/w)	11.09
Phosphorus (% w/w)	2.18
Potassium (% w/w)	2.014
Iron (% w/w)	0.0033
Zinc (% w/w)	0.0028
Calcium (% w/w)	0.819
Magnesium (% w/w)	1.945

เมื่อนำเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีการแทนที่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ซึ่ง pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง พบว่า เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรทั่วไป หรือชุดการทดลองที่ 1 จะมีการผลิตแบคเทอริโอซินและมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่เติมกากน้ำตาลปริมาตร 20 มิลลิลิตรต่อลิตร แทนที่กลูโคส (ชุดการทดลองที่ 2) และอาหารเหลว MRS ที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนเปปโทน (ชุดการทดลองที่ 3) พบว่า ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินไม่มีการเปลี่ยนแปลง แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่เติมกากน้ำตาลแทนกลูโคส และน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนเปปโทน (ชุดการทดลองที่ 4) ส่งผลให้การผลิตแบคเทอริโอซินลดลงเหลือ 20 AU/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งการลดลงของค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินอาจเกิดจากกากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าเมื่อใช้ร่วมกันอาจมีสารอาหารบางอย่างที่สามารถยับยั้งการผลิตแบคเทอริโอซินได้ ซึ่งกากน้ำตาลประกอบด้วยโปรตีนทั้งหมด 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของแข็งทั้งหมด 300.91 มิลลิกรัมต่อลิตร แมกนีเซียม (Mg) 29.49 มิลลิกรัมต่อลิตร และเหล็ก (Fe) 4.58 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543) นอกจากนี้ยังมีองค์ประกอบของแร่ธาตุอื่นๆ เช่น อะลูมิเนียม (Al), อะซินิก (As), คอปเปอร์ (Cu), แมงกานีส (Mn) และสังกะสี (Zn) เป็นต้น (Teclu *et al.,* 2009) และอาจมีองค์ประกอบอื่นที่ไม่สามารถระบุได้เนื่องจากกากน้ำตาลเป็นสารประกอบเชิงซ้อน และ

การลดลงของค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 อาจเป็นผลมาจากธาตุเหล็ก เนื่องจาก Tapia-Hernández และคณะ (1990) รายงานว่าแบคเทอริโอซิน mitomycin C ที่ผลิตจาก *Azospirillum brasilense* มีกิจกรรมการยับยั้งลดลงเมื่อเติมเฟอริคคลอไรด์ ($FeCl_3$) Ohkawa และคณะ (1980) พบว่า แบคเทอริโอซิน pyocin S2 ที่ผลิตจาก *Pseudomonas aeruginosa* มีกิจกรรมลดลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่เติมธาตุเหล็ก และนอกจากนี้ Laukova และ Kmet (1993) รายงานว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecium* ที่คัดแยกจากลำไส้ใหญ่มีคุณสมบัติในการทนต่อสารอะซินิก (As) ที่อยู่ในรูปสารประกอบไดโซเดียมอะซิเนทปริมาณ 5 กรัมต่อลิตร ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับผลของกากน้ำตาลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) ในอาหารเหลว MRS พบว่า มีการผลิตแบคเทอริโอซินน้อยกว่าในอาหาร MRS ปกติ

จากผลการทดลองจะทำการคัดเลือกน้ำนึ่งปลาทูน่า 13.5 กรัมต่อลิตร แทนที่เปปโทนและมีกลูโคส ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว MRS เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 12. กิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในอาหารเหลว MRS ที่ใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจน

Table 12. Bacteriocin activity of *Enterococcus faecalis* TS9S17 in MRS that used molasses as a carbon source and tuna condensate as a nitrogen source.

No.	Composition of media		Activity (AU/ml)
	nitrogen source	carbon source	
1	peptone (10 g/l)	glucose (20g/l)	40
2	peptone (10 g/l)	molasses (20ml/l)	40
3	tuna condensate (13.5 g/l)	glucose (20g/l)	40
4	tuna condensate (13.5 g/l)	molasses (20ml/l)	20

4.2 ผลของการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Ent. faecalis* TS9S17 ในอาหารเหลว MRS 4 สูตร ซึ่งประกอบด้วย อาหาร MRS สูตรทั่วไป อาหาร MRS ที่มีการแทนที่เปปโทนด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่า 13.5 กรัมต่อลิตร (modified MRS 1) อาหาร MRS ที่เติมน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็น 26.5 กรัมต่อลิตร แทนที่เปปโทนและเนื้อสกัด (modified MRS 2) และอาหาร MRS ที่เติมน้ำนึ่งปลาทู

น่าปริมาณ 26.5 กรัมต่อลิตร แทนที่เปปโทน เนื้อสกัดและยีสต์สกัด (modified MRS 3) ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่าแต่ละสูตรอาหารส่งผลต่อการเจริญและกิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินแตกต่างกันดังนี้

การเจริญของ *Ent. faecalis* TS9S17 ในอาหารเหลว MRS ทั้ง 4 สูตร จะเข้าสู่ log phase ก่อนชั่วโมงที่ 12 และเข้าสู่ช่วง stationary phase ในชั่วโมงที่ 12 ถึง 48 ซึ่งการเจริญในอาหาร modified MRS 1 จะใกล้เคียงกับการเจริญใน MRS สูตรทั่วไป แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร modified MRS 2 และ modified MRS 3 พบว่า การเจริญจะลดลงและต่ำกว่าการเจริญในอาหาร MRS สูตรทั่วไป ดังแสดงในภาพที่ 6 การผลิตแบคเทอริโอซินในอาหาร MRS สูตรทั่วไป พบว่ามีค่ากิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 12 ถึง 36 ชั่วโมง และค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 20 AU/มิลลิลิตร เมื่อถึง 48 ชั่วโมง แต่การผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารใน modified MRS 1 ค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 20 AU/มิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 ส่วนการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารใน modified MRS 2 ผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 และคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 48 ในขณะที่การผลิตแบคเทอริโอซินในอาหาร modified MRS 3 พบว่ามีกิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 48 ดังแสดงในภาพที่ 6 นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของ pH ดังแสดงในภาพที่ 6 พบว่าการเปลี่ยนแปลง pH ในอาหาร modified MRS 1 modified MRS 2 และ modified MRS 3 มีการลดลงอย่างใกล้เคียงกัน และเมื่อเปรียบเทียบกับ pH ของอาหาร MRS สูตรทั่วไป จะเห็นว่าลดลงต่ำกว่าเล็กน้อย และจากผลการทดลองจึงคัดเลือกอาหาร modified MRS 3 เพื่อใช้ในการการผลิตแบคเทอริโอซิน

ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ได้ศึกษาผลของแหล่งและปริมาณของคาร์บอนและไนโตรเจนต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) โดยเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่เติมซูโครส 1 เปอร์เซนต์ เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคสและเติมน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ไม่เจือจางและเจือจางในอัตราส่วน 1:1 เป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า เชื้อมีการเจริญและผลิตแบคเทอริโอซินเท่ากับในอาหาร MRS สูตรปกติ และเมื่อเติมยีสต์สกัดปริมาณ 0.1, 0.5, 1 และ 2 เปอร์เซนต์ ลงไปอาหารสูตรนี้ พบว่าการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินไม่แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากน้ำนึ่งปลาทูน่าอุดมไปด้วยสารประกอบไนโตรเจนและแร่ธาตุต่างๆที่สำคัญต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

ลัญจกร จันทร์อุดม (2549) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) พบว่าเชื้อสามารถเจริญในอาหาร

MRS สูตรดัดแปลงที่ประกอบด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่าซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนและน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1 และ 4:1 แต่จะไม่ตรวจพบกิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซินหลังจากช่วง stationary phase ซึ่งอาจเกิดจากการย่อยสลายของเซลล์และความคงตัวของแบคเทอริโอซิน

4.3 ผลของอุณหภูมิต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่า 26.5 กรัมต่อลิตร แทนเปปโทน เนื้อสกัดและยีสต์สกัด (modified MRS 3) และปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่า อุณหภูมิของการบ่มมีผลต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินดังนี้

เมื่อเลี้ยง *Ent. faecalis* TS9S17 ในอาหาร modified MRS 3 บ่มที่อุณหภูมิ 25, 30 และ 37 องศาเซลเซียส พบว่า มีการเจริญอย่างรวดเร็วในช่วงแรก ก่อน 12 ชั่วโมง และเข้าสู่ช่วง stationary phase ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยเชื้อมีการเจริญสูงสุดที่อุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิที่ 30 และ 25 องศาเซลเซียส เชื้อมีการเจริญต่ำกว่าเล็กน้อย ดังแสดงในภาพที่ 7 เชื้อมีการผลิตแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ดีกว่าที่อุณหภูมิอื่นๆ โดยมีการผลิตแบคเทอริโอซินเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 และค่ากิจกรรมจะเพิ่มสูงสุดเท่ากับ 80 AU/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ถึง 48 ของการบ่ม แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อมีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ถึง 48 ของการบ่ม และการผลิตแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมง 48 ของการบ่ม สำหรับการเปลี่ยนแปลง pH ของอาหาร modified MRS 3 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่างกันพบว่า pH มีแนวโน้มลดลงใกล้เคียงกัน ดังแสดงในภาพที่ 7

ดังนั้นเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งสอดคลอดกับเชื้อ *Ent. faecalis* KT2W2G ที่เจริญอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่มีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดที่ 25.29 องศาเซลเซียส (Hwanhlem *et al.,* 2014) แต่จะแตกต่างจากเชื้อ *Ent. faecium* B3L3 ที่มีการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิเดียวกันคือ 37 องศาเซลเซียส (Yusuf and Hamid, 2012) ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินอาจเป็นผลมาจากการควบคุมสภาพแวดล้อมของเซลล์และกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเจริญ (Leroy and De Vuyst, 2002)

4.4 ผลของ pH เริ่มต้นต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ในอาหาร modified MRS 3 ที่ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5, 6, 7, 8 และ 9 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และนำมาวัดค่าการเจริญและค่ากิจกรรมการผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่า อาหารที่ปรับ pH เริ่มต้นแตกต่างกันจะส่งผลต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินแตกต่างกันดังนี้

การเจริญของ *Ent. faecalis* TS9S17 เมื่อปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7, 8 และ 9 ดังแสดงในภาพที่ 8 จะเห็นว่า เชื้อเจริญเข้าสู่ช่วง log phase ก่อนชั่วโมงที่ 12 ของการบ่ม และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 เชื้อเริ่มเข้าสู่ช่วง stationary phase โดยที่ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 9 ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญสูงสุด และการเจริญลดลงเมื่อปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 และ 8 ในขณะที่ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 และ 6 ส่งผลให้เชื้อการเจริญมีการเจริญเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยการเจริญที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 5 จะสูงกว่าการเจริญการเจริญที่ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6 การปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 5 พบว่า การผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 20 AU/มิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 36 และไม่พบกิจกรรมในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม เมื่อปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเท่ากับ 6 พบว่า มีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม เมื่อปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 พบว่า มีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุดเพิ่มขึ้นเท่ากับ 160 AU/มิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ถึงชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม เมื่อปรับ pH เริ่มต้นเป็น 8 และ 9 พบว่า ค่ากิจกรรมสูงสุดเท่ากับ 80 AU/มิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 48 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 36 ของการบ่มตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 8 การเปลี่ยนแปลง pH ดังแสดงในภาพที่ 8 พบว่าเมื่อถ่ายเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ลงในอาหาร modified MRS 3 ปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 6, 7, 8 และ 9 ส่งผลให้ค่า pH เริ่มต้นของอาหารในชั่วโมงที่ 0 ลดลงเนื่องจากความเป็นกรดที่ผลิตจากเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 คือ เมื่อถ่ายเชื้อลงในอาหารที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6, 7, 8 และ 9 ส่งผลให้ pH ในชั่วโมงที่ 0 ลดลงเท่ากับ 5.8, 6.5, 7.0 และ 7.4 ตามลำดับ และ pH ของอาหารลดลงอย่างใกล้เคียงกันตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ถึงชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่า *Ent. faecalis* TS9S17 สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสภาวะเป็นด่าง แต่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุดในสภาวะเป็นกลางที่ pH เท่ากับ 7 ซึ่งจะแตกต่างเชื้อ *Ent. faecium* P13 ที่ผลิต enterocin P ซึ่งเจริญได้ดีในสภาวะเป็นกลาง pH เท่ากับ 7 และผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุดในช่วง pH ตั้งแต่ 4.7 ถึง 6.2 แต่มีการยับยั้งการผลิตแบคเทอริโอซินที่ pH เป็นด่างเนื่องจากแบคเทอริโอซินจะมีการรวมกลุ่มกัน และช่วยให้

pH เข้าสู่ค่า pI ซึ่งค่า pI ของ enterocin P มีค่าเท่ากับ pH 8.1 (Herranz *at el.,* 2001) แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. mundtii* QU 2 มีการเจริญสูงสุดที่ pH เท่ากับ 7 แต่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุดที่ pH เท่ากับ 6 (Zendo *et al.,* 2005) ทั้งนี้ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกแต่ละสายพันธุ์จะขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาใช้ (Parente and Ricciardi, 1999)

นอกจากนี้ยังมีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกมีค่าแตกต่างกัน เช่น แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecium* B3L3 มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตอยู่ในช่วง 6 ถึง 8 (Yusuf and Hamid, 2012) แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecium* DB1 มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเท่ากับ 6.5 (Choi *et al.,* 2011) แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lb. casei* มีค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตเท่ากับ 7.2 (Kuma *et al.,* 2012)

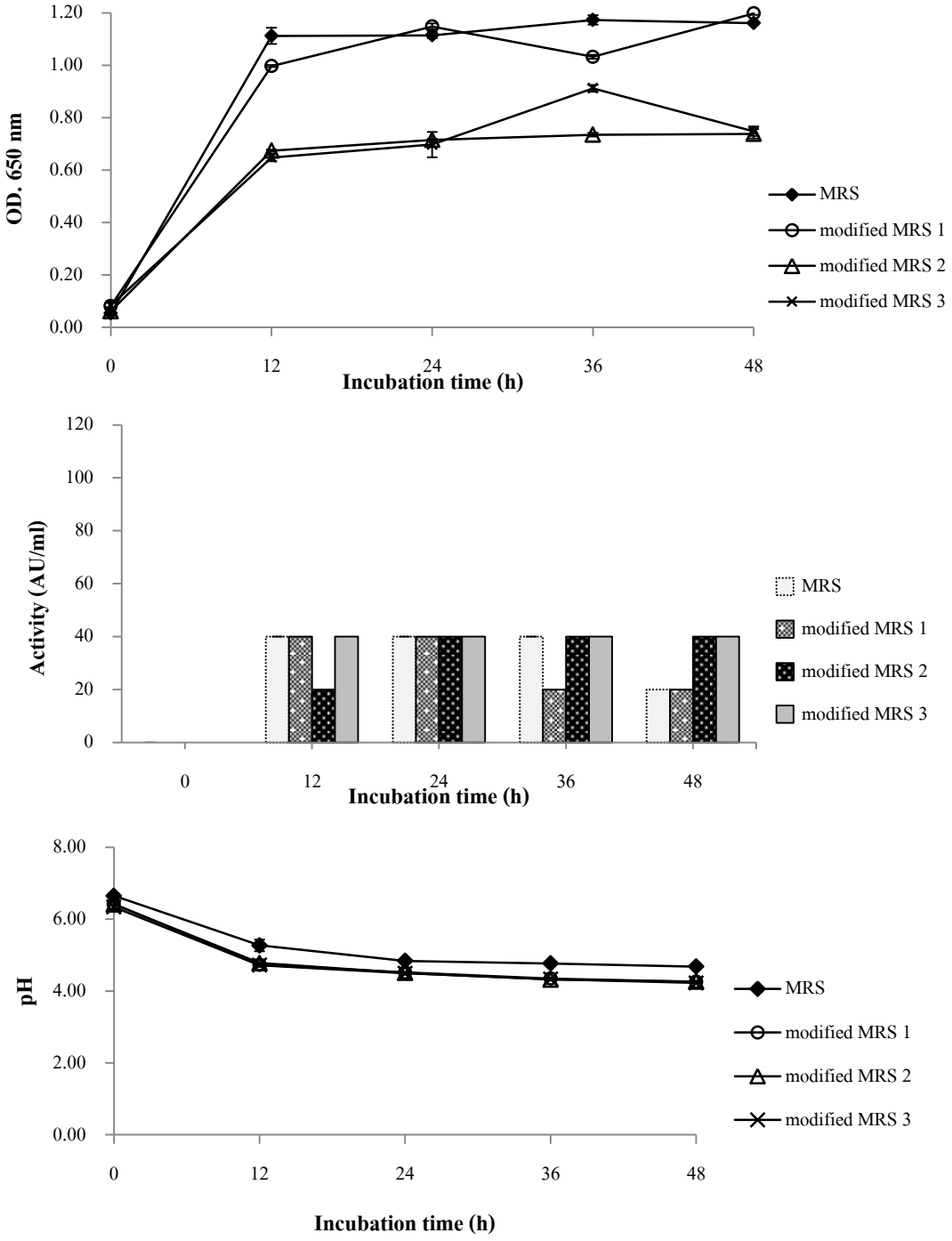
5. คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17

5.1 การผลิตและการเตรียมแบคเทอริโอซิน

เลี้ยงเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ในอาหาร modified MRS 3 ที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 1 ลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24 ชั่วโมง นำน้ำหมักมาปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารละลายส่วนใสตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นกำจัดเกลือออกด้วยการไดอะไลซิส ซึ่งถุงไดอะไลซิสที่ใช้มีขนาดรูเท่ากับ 1,000 ดาลตัล เมื่อนำสารละลายแบคเทอริโอซินหลังจากกำจัดเกลือออกมาวัดค่ากิจกรรมพบว่า ค่ากิจกรรมเพิ่มขึ้นจาก 160 AU/มิลลิลิตร เป็น 2,560 AU/มิลลิลิตร ที่ pH เท่ากับ 6.5 ซึ่งแสดงดังตารางที่ 13

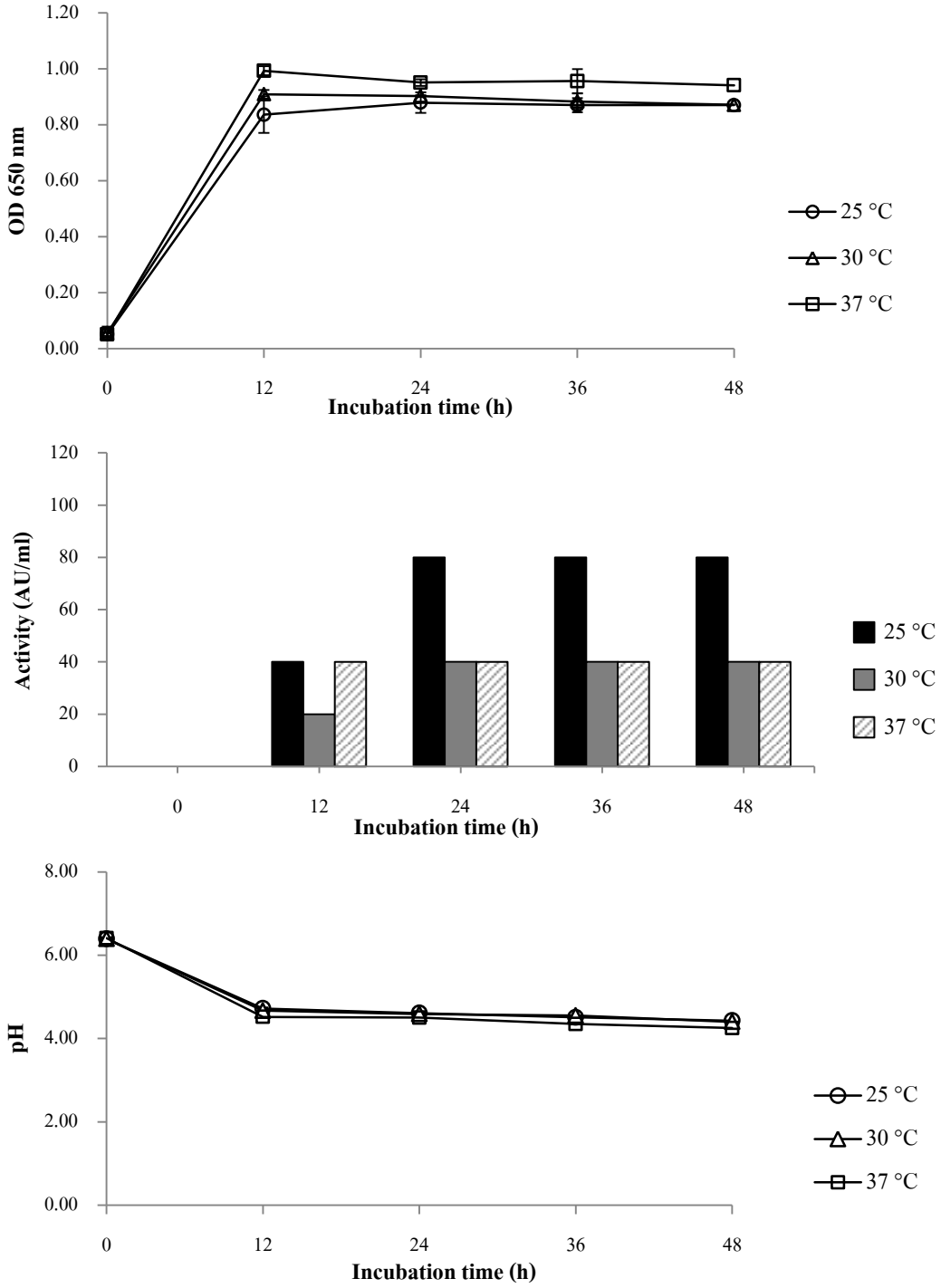
5.2 pH ที่เหมาะสมต่อการทำงาน และผลของ pH ต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

จากการนำแบคเทอริโอซินของ *Ent. faecalis* TS9S17 มาทดสอบ pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานโดยการปรับ pH ของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 3, 4, 5, 6, 7 และ 8 แล้ววัดค่ากิจกรรม พบว่า แบคเทอริโอซินสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH เท่ากับ 6 มีค่ากิจกรรมเท่ากับ 2,560 AU/มิลลิลิตร ซึ่งไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อปรับ pH เป็นด่างเพิ่มขึ้นเท่ากับ 7 และ 8 ส่งผลให้มีค่ากิจกรรมลดลงเป็น 1,280 AU/มิลลิลิตร และ 640 AU/มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อปรับ pH เป็นกรดเท่ากับ 3, 4 และ 5 ส่งผลให้ค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 320 AU/มิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 14 จากผลการทดลองจะเห็นว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 ทำงานได้ดีที่ช่วง pH เป็นกลางมากกว่าเป็นด่างและกรด



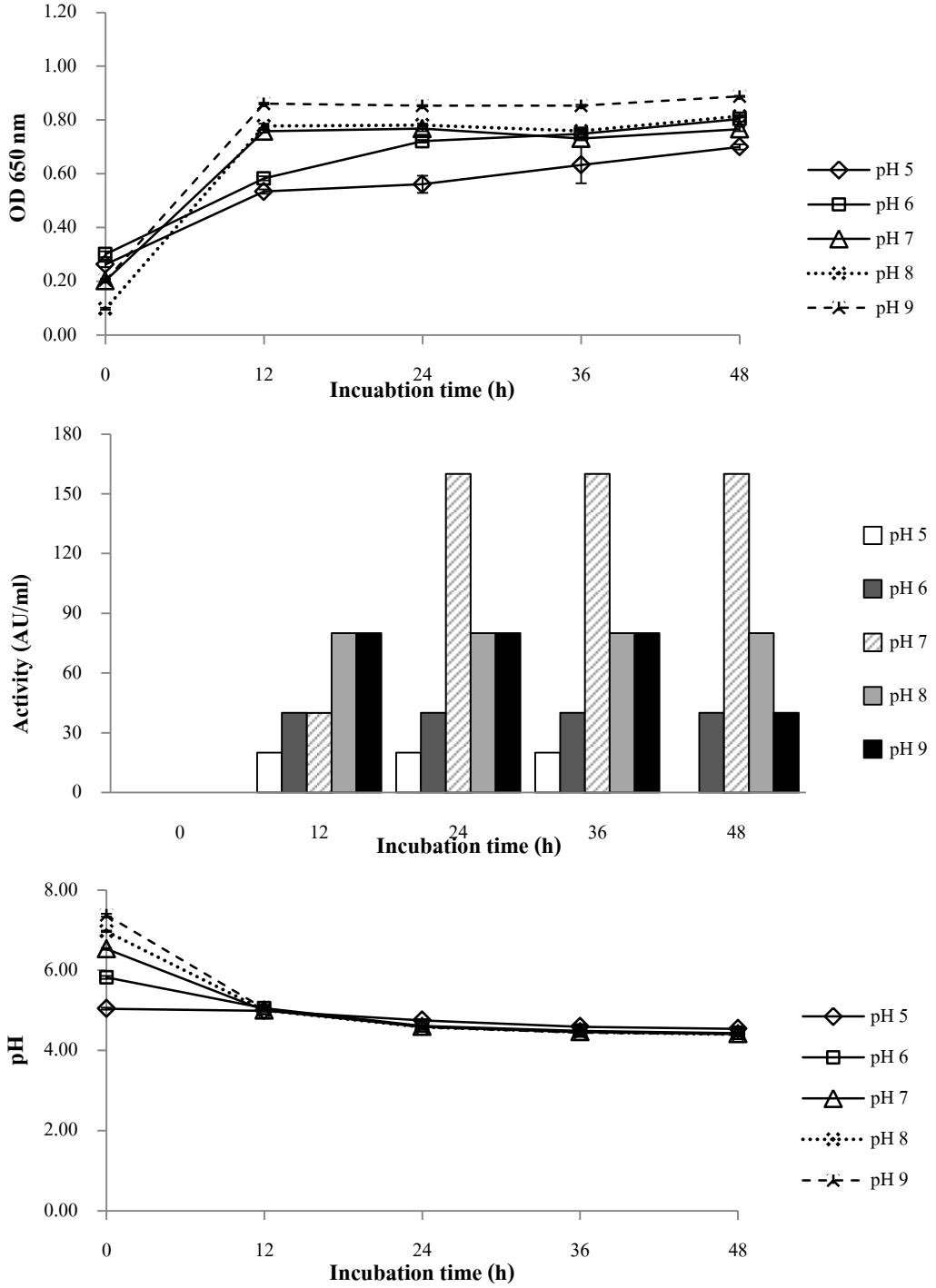
ภาพที่ 6. ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการเจริญ การผลิตแบคเทอริโอซินและการเปลี่ยนแปลง pH ของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในอาหารสูตรต่างๆ

Figure 6. Effect of nitrogen sources on growth, bacteriocin activity and pH change of *Enterococcus faecalis* TS9S17 in different media.



ภาพที่ 7. ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ การผลิตแบคเทอริโอซินและการเปลี่ยนแปลง pH ของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในอาหาร modified MRS 3

Figure 7. Effect of temperature on growth, bacteriocin activity and pH change of *Enterococcus faecalis* TS9S17 in modified MRS 3.



ภาพที่ 8. ผลของ pH เริ่มต้นต่อการเจริญ การผลิตแบคเทอริโอซินและการเปลี่ยนแปลง pH ของ *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในอาหาร modified MRS 3

Figure 8. Effect of initial pH on growth, bacteriocin activity and pH change of *Enterococcus faecalis* TS9S17 in modified MRS 3.

ตารางที่ 13. ผลการทำบริสุทธิ์ (บางส่วน) ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17

Table 13. Partial purification steps of bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* TS9S17.

Steps of purification	Total Volume (ml)	Activity (AU/ml)	Protein (mg/ml)	Total activity (AU)	Total protein (mg)	Specific activity (AU/ml)	Yield (%)	Purification (fold)
Cell-free supernatant	1,000	160	2.24	160,000	2,240	71.42	100	1
$(NH_4)_2SO_4$ precipitate	70	2,560	1.78	179,200	125	1,438.20	112	20.13

เมื่อนำแบคเทอริโอซินมาศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซินโดยการนำแบคเทอริโอซินมาปรับ pH เท่ากับ 2, 4, 6, 8, 10 และ 12 จากนั้นบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้องแล้วจึงปรับ pH กลับไปเท่ากับ 6 ตามผลจากการศึกษา pH ต่อการทำงาน และตรวจวัดค่ากิจกรรมคงเหลือ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 14 พบว่า การปรับ pH เท่ากับ 6 ส่งผลให้มีค่ากิจกรรมคงเหลือมากที่สุดเท่ากับ 1,280 AU/มิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมพบว่า ค่ากิจกรรมคงเหลือลดลงครึ่งหนึ่ง ในขณะที่ pH อื่นๆ ยังคงตรวจพบกิจกรมแต่มีค่าน้อยกว่าที่ pH เท่ากับ 6 ซึ่งการลดลงของค่ากิจกรรมอาจเนื่องมาจากการย่อยสลายของโปรตีน การรวมตัวของโปรตีน และความไม่คงตัวของโปรตีน (Parente *et al.,* 1994; Parente and Riccardi, 1994; De Vuyst *et al.,* 1996; Aasen *et al.,* 2000)

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 ทนต่อ pH ในช่วงกว้างตั้งแต่ช่วง pH 2 ถึง 12 และมีความคงตัวสูงสุดที่ pH เท่ากับ 6 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Rehaiem และคณะ (2010) พบว่า ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecium* MMRA มีความคงตัวต่อ pH ตั้งแต่ช่วง pH เท่ากับ 2 ถึง 12 นาน 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากการทดลองของ Du Toit และคณะ (2000) รายงานว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อกลุ่ม Enterococci ซึ่งคัดแยกจากมูลสุกร มีกิจกรรมสูงสุดที่ pH ช่วง 6 ถึง 8 ซึ่งเมื่อปรับ pH เท่ากับ 6 ส่งผลให้แบคเทอริโอซินจาก *Ent. faecium* BFE 1072, *Ent. faecium* BFE

1170, *Ent. faecium* BFE 1228, *Ent. faecalis* 1229 และ *Ent. faecalis* 1263 มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุดเท่ากับ 1,600 AU/มิลลิลิตร หลังจากบ่มนาน 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส Hwanhlem และคณะ (2013) พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* KT2W2L ซึ่งคัดแยกจากป่าชายเลนแสดงกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินในช่วง pH ตั้งแต่ 2 ถึง 10 หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมที่ pH เท่ากับ 12

ตารางที่ 14. pH ที่เหมาะสมต่อการทำงานและความคงตัวต่อ pH ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17

Table 14. Optimum pH and pH stability on activity of crude bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* TS9S7.

Treatments	Bacteriocin activity (AU/ml)
Control	2,560
Optimum pH	
3	320
4	320
5	320
6	2560
7	1280
8	640
pH stability	
2	320
4	320
6	1280
7	320
8	160
10	160
12	160

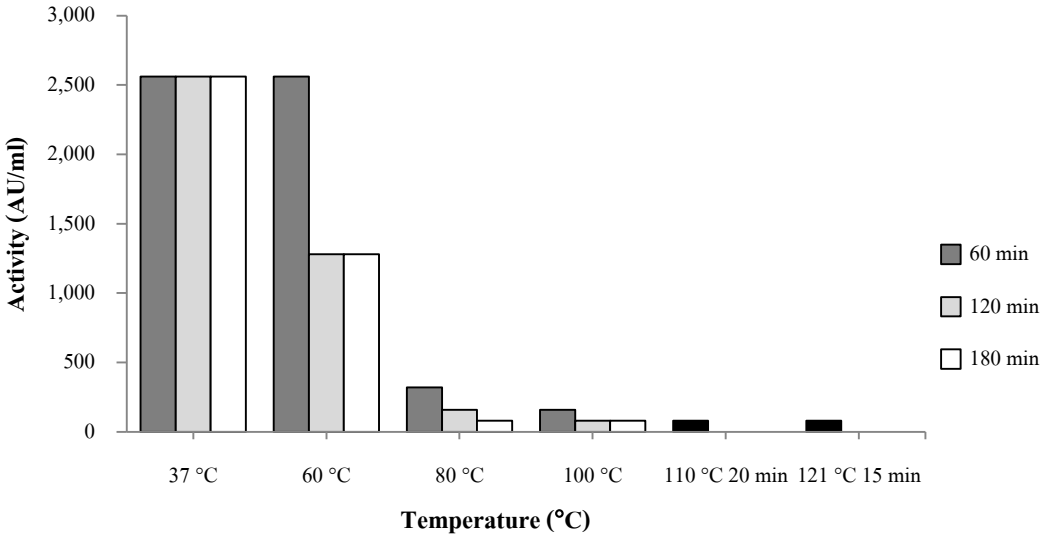
5.3 ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 มาทดสอบความคงตัวต่ออุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยการนำแบคเทอริโอซินไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ และวัดค่ากิจกรรมที่เหลือซึ่งพบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 3 ชั่วโมง แต่เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส พบว่า ในชั่วโมงแรกแบคเทอริโอซินยังคงมีกิจกรรมเท่าเดิม และค่ากิจกรรมลดลงเหลือ 1,280 AU/มิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 2 เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส พบว่า ค่ากิจกกรมเริ่มลดลงเหลือ 320 AU/มิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และลดลงเหลือ 80 AU/มิลลิลิตร เมื่อบ่มครบ 3 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส พบว่า ค่ากิจกรรมเริ่มลดลงเหลือ 160 AU/มิลลิลิตร ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 1 และเมื่อบ่มครบ 3 ชั่วโมง ค่ากิจกรรมลดลงเท่ากับ 80 AU/มิลลิลิตร และตรวจพบค่ากิจกรรมคงเหลือของแบคเทอริโอซินเมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที และการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ค่ากิจกรรมลดลงจาก 2,560 AU/มิลลิลิตร เหลือ 80 AU/มิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 9

การที่แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 ยังคงมีกิจกรรมเหลืออยู่หลังผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 110 และ 121 องศาเซลเซียส แสดงว่า แบคเทอริโอซินดังกล่าวมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ซึ่งเป็นคุณสมบัติสำคัญประการหนึ่งที่ใช้ในการจัดกลุ่มของแบคเทอริโอซินร่วมกับคุณสมบัติด้านอื่น ๆ การทนต่อความร้อนของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 นี้สอดคล้องกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecium* ST5Ha มีความคงตัวที่อุณหภูมิ 25 ถึง 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง และเมื่อผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ยังคงตรวจพบค่ากิจกรรมแต่จะลดลงจาก 10^8 AU/มิลลิลิตร เหลือ 10^4 AU/มิลลิลิตร (Todorov *et al.,* 2010) นอกจากนี้ยังพบคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากจาก *Ent. faecium* BFE 1072, *Ent. faecium* BFE 1170, *Ent. faecium* BFE 1228, *Ent. faecalis* 1229 และ *Ent. faecalis* 1263 (Du Toit *et al.,* 2000) *Ent. faecium* MMRA (Rehaiem *et al.,* 2010) คุณสมบัติในการทนความร้อนของแบคเทอริโอซินมีผลมาจากจำนวนและชนิดของกรดอะมิโน รวมถึงการมีพันธะไดซัลไฟด์ที่เกิดจากกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุล นอกจากนี้ยังมีผลมาจากปัจจัยภายนอกอีกหลายประการ เช่น ค่า pH และองค์ประกอบของสารละลาย เป็นต้น (Liu and Hansen, 1990; De Vuyst and Vandamme, 1994)

การที่แบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติในการทน pH ในช่วงกว้างและทนต่อความร้อนจะเป็นผลดีต่อการนำแบคเทอริโอซินไปประยุกต์ใช้ในอาหารหรือผลิตภัณฑ์ที่มีสภาวะความเป็น

กรดด่างได้หลากหลายประเภท และสามารถใช้ร่วมกับการแปรรูปด้วยกระบวนการที่ใช้ความร้อน อีกทั้งการแปรรูปแบคเทอริโอซินเพื่อการเก็บรักษา เช่น การทำแห้งแบคเทอริโอซิน เป็นต้น



ภาพที่ 9. ผลของอุณหภูมิต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17

Figure 9. Effect of temperature on activity of crude bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* TS9S17.

5.4 ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20, 4 และ 37 องศาเซลเซียส จนครบเวลา 1, 2, 3, 4 และ 5 สัปดาห์ และตรวจวัดค่ากิจกรรมคงเหลือ ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 15 พบว่า ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะคงที่เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 สัปดาห์ แต่ในสัปดาห์ที่ 5 ค่ากิจกรรมจะลดลงเหลือครึ่งหนึ่งแต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นั้นส่งผลให้ค่ากิจกรรมลดลงเหลือครึ่งหนึ่งตั้งแต่สัปดาห์แรกและคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 3 แต่ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 นั้นค่ากิจกรรมจะลดลงอีก ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่ตรวจพบค่ากิจกรรมตั้งแต่สัปดาห์แรกของการเก็บรักษา จากผลการศึกษาเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิมีผลต่อการเก็บรักษาแบคเทอริโอซินในระยะเวลานานๆ ซึ่งการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่ำส่งผลให้แบคเทอริโอซินมีความคงตัวมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิสูง และอีกปัจจัยคือประเภทของแบคเทอริโอซินก็มีผลต่อ

อุณหภูมิและระยะเวลาในการเก็บรักษาด้วย (Ogunbanwo *et al*., 2003; Mojgani *et al*., 2009; Sivakumar *et al*., 2010)

จากผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 สอดคล้องกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecium* MMRA ที่แสดงค่ากิจกรรมคงเหลือหลังจากผ่านกระบวนการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง (lyophylization) และมีค่าคงที่หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลาอย่างน้อย 12 เดือน (Rehaiem *et al.,* 2010) นอกจากนี้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* KT2W2L ไม่มีการเปลี่ยนแปลงค่ากิจกรรมหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ และค่ากิจกรรมลดลงเหลือครึ่งหนึ่ง เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 8 สัปดาห์ แต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ค่ากิจกรรมเริ่มลดลงในสัปดาห์ที่ 3 และคงที่จนถึงสัปดาห์ที่ 6 ของการเก็บรักษา (Hwanhlem *et al.,* 2013) แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lb. fermentum* ยังคงแสดงค่ากิจกรรมหลังจากเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 3 ถึง 5 เดือน และเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ในรูปแบบของของเหลวและแบบแห้ง นาน 1 ปี (Kaur *et al.,* 2013)

ตารางที่ 15. ผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Entrococcus faecalis* TS9S17

Table 15. Effect of storage temperature on activity of crude bacteriocin produced by *Entrococcus faecalis* TS9S17.

Temperature	Bacteriocin activity (AU/ml) at different time (weeks)					
(˚C)	Control	1	2	3	4	5
-20	2,560	2,560	2,560	2,560	2,560	1,280
4	2,560	1,280	1,280	1,280	640	640
37	2,560	0	0	0	0	0

6. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน

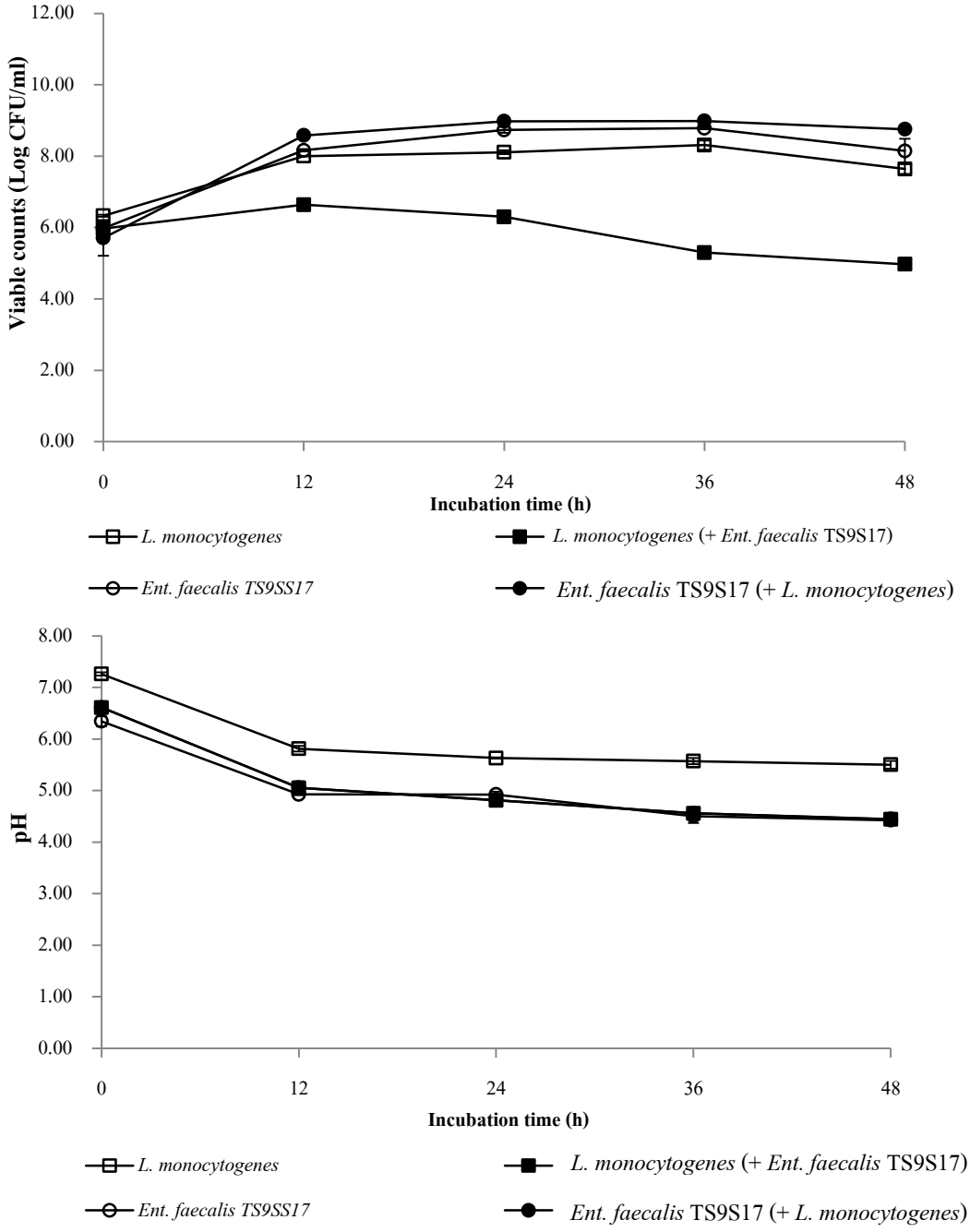
จากการนำ *L. monocytogenes* เลี้ยงร่วมกับ *Ent. faecalis* TS9S17 ในอาหารเหลวผสมระหว่าง BHI และ MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ผลการทดลองดังแสดงในภาพที่ 10 พบว่าใน 12 ชั่วโมงแรกจำนวนของ *L. monocytogenes* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Ent. faecalis* TS9S17 นั้น

เพิ่มสูงขึ้นจาก 5.9 log CFU/มิลลิลิตร เป็น 6.6 log CFU/มิลลิลิตร แต่จำนวนเชื้อจะเริ่มลดลงเหลือ 6.3 log CFU/มิลลิลิตร หลังชั่วโมงที่ 12 และเมื่อครบ 48 ชั่วโมง จำนวนเชื้อลดลงเหลือ 4.9 log CFU/มิลลิลิตร ส่วนในชุดควบคุมที่เลี้ยง *L. monocytogenes* แบบเดี่ยว พบว่าจำนวนเชื้อเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 6.3 ถึง 8.0 log CFU/มิลลิลิตร ภายใน 12 ชั่วโมงแรก และเริ่มคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 36 และจำนวนเชื้อลดลงเล็กน้อยเมื่อครบ 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองจะเห็นว่าการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* สอดคล้องกับการลดลงของ pH ของอาหารซึ่งในชั่วโมงที่ 24 พบว่า pH ลดลงจาก 6.6 เป็น 4.8 และลดลงเหลือ 4.4 Conner และคณะ (1986) พบว่าที่ pH น้อยกว่าหรือเท่ากับ 4.6 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้

7. การยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก

จากการใช้แบคเทอริโอซินยับยั้ง *L. monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกที่ไม่เติมแบคเทอริโอซินนั้น *L. monocytogenes* มีการเจริญเพิ่มขึ้นจาก 4.09 log CFU/กรัม จนถึง 8.88 log CFU/กรัมในวันที่ 21 ของการเก็บรักษา และจะลดลงเหลือ 8.34 log CFU/กรัม ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา ในขณะที่ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกที่เติมแบคเทอริโอซิน *L. monocytogenes* มีการเจริญของเพิ่มขึ้นจาก 3.31 log CFU/กรัม ถึง 9.68 log CFU/กรัม ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา เมื่อนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดพบว่าในชุดการทดลองที่เติมแบคเทอริโอซินมีจำนวนแบคทีเรียต่ำกว่าชุดการทดลองที่ไม่เติมแบคเทอริโอซิน ดังแสดงในภาพที่ 11 และค่า pH ของชุดการทดลองทุดชุดมีค่าอยู่ในช่วง 7.5-7.8 (ไม่แสดงของมูล) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเติมแบคเทอริโอซินไม่มีผลต่อการเจริญของ *L. monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก

เมื่อนำตัวเซลล์ของแบคทีเรีย *Ent. faecalis* TS9S17 เติมในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกร่วมกับ *L. monocytogenes* พบว่า การเจริญของ *Ent. faecalis* TS9S17 ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกทุกชุดการทดลองมีจำนวนค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลา 28 วัน ส่วนการเจริญของ *L. monocytogenes* พบว่าในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกที่เติมเฉพาะ *L. monocytogenes* มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 4.09 log CFU/กรัม จนถึง 8.88 log CFU/กรัม ในวันที่ 21 และลดลงเพียงเล็กน้อยในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา ในขณะที่การเจริญของ *L. monocytogenes* ที่เลี้ยงร่วมกับ *Ent. faecalis* TS9S17 มีจำนวนเพิ่มขึ้นจาก 3.82 log CFU/กรัม เป็น 7.29 log CFU/กรัม ในวันที่ 14 และเจริญเพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนถึง 7.81 log CFU/กรัม ในวันที่ 28 ของการเก็บรักษา ดังแสดงในภาพที่ 12 ค่าของpH ของทุกชุดการทดลอง



ภาพที่ 10. การเจริญของ *Listeria monocytogenes* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Enterococcus faecalis* TS9S17 และการเปลี่ยนแปลงของ pH ในอาหารเหลว MRS + BHI

Figure 10. Growth of *Listeria monocytogenes* co-cultured with *Enterococcus faecalis* TS9S17 and pH change in MRS + BHI broth.

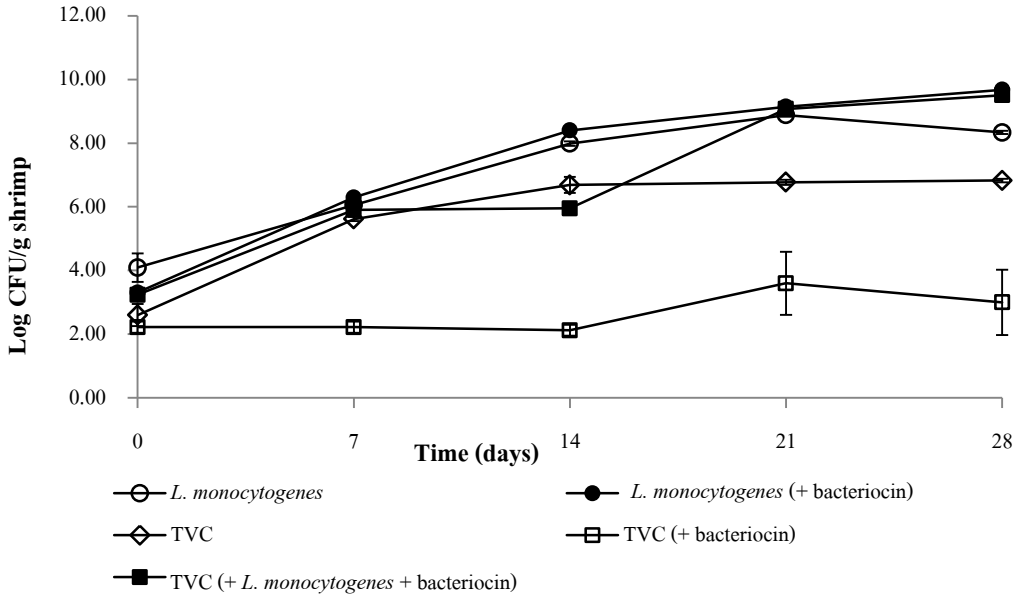
มีค่าอยู่ในช่วง7.3-7.8 (ไม่แสดงข้อมูล) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่เลี้ยงร่วมกับตัวเซลล์ของ *Ent. faecalis* TS9S17 ต่ำกว่าการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่เลี้ยงเดี่ยว

เมื่อเปรียบเทียบผลการยับยั้ง *L. monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก สามารถสรุปได้ว่า การเจริญของ *L. monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกที่มีตัวเซลล์ของ *Ent. faecalis* TS9S17 ต่ำกว่าการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่เติมแบคเทอริโอซิน ดังนั้นจึงใช้ตัวเซลล์ของ *Ent. faecalis* TS9S17 มายับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกและทดสอบคุณภาพทางเคมีด้วยการวิเคราะห์ปริมาณอินโดล

การหาค่าอินโดลเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของอาหารทะเล โดยเฉพาะกุ้ง อินโดลเป็นสารที่เกิดจากการสลายตัวของโปรตีนของแบคทีเรียที่สามารถใช้กรดอะมิโนทริปโตแฟน โดยปกติกุ้งที่เน่าเสียจะมีแบคทีเรียมากกว่า 7 log CFU/กรัม (สุทธวัฒน์ เบญกุล และคณะ, 2557) ซึ่งปริมาณที่ FDA กำหนดจะต้องไม่เกิน 25 ไมโครกรัม/100 กรัม (Mendes *et al.*, 2002) ในชุดการทดลองที่มียับยั้งการเจริญ *L. monocytogenes* ด้วยการเลี้ยงร่วมกับ *Ent. faecalis* TS9S17 ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกเปรียบเทียบกับชุดการทดลองที่ไม่เติมเชื้อหรือชุดควบคุมพบว่าชุดควบคุมมีค่าอินโดลประมาณ 1.11-1.23 ไมโครกรัม/100 กรัม ตลอด 15 วันของการเก็บรักษา ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีการเลี้ยงร่วมระหว่าง *L. monocytogenes* และ *Ent. faecalis* TS9S17 มีปริมาณอินโดลประมาณ1.12-1.27 ไมโครกรัม/100 ตลอด 15 วันของการเก็บรักษาเช่นเดียวกัน เมื่อนำมาเปรียบเทียบระหว่าง 2 ชุดการทดลอง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 99 เปอร์เซนต์ และปริมาณอินโดลทั้ง 2 ชุดการทดลองมีค่าไม่เกิน 25 ไมโครกรัม/100 กรัม ซึ่งแสดงว่ากุ้งปอกเปลือกปรุงสุกยังไม่มีการเน่าเสียเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 15 วัน ดังแสดงในภาพที่ 13

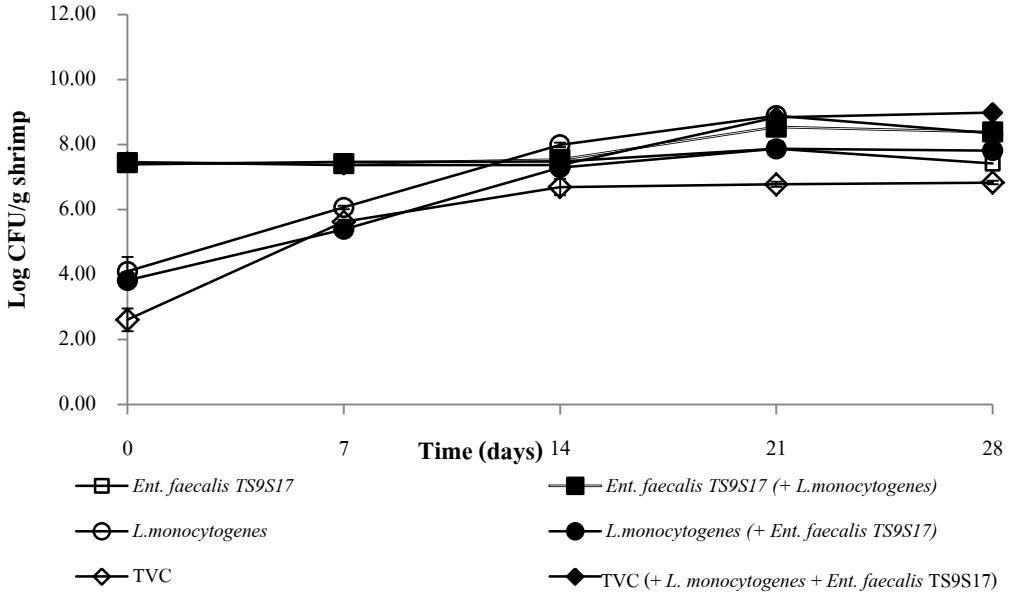
สารอินโดลที่เกิดขึ้นในตัวอย่างกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกไม่ได้เป็นผลมาจากเชื้อ *L. monocytogenes* เนื่องจากผลทดสอบการผลิตอินโดลของเชื้อ *L. monocytogenes* ทุกกสายพันธุ์เป็นลบ (negative) (Hitchins and Jinneman, 2011) แต่อาจเกิดจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นๆ รวมถึงเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ที่เจริญขึ้นในระหว่างการเก็บรักษา มีรายงานการผลิตสารอินโดลจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Ent. faecalis* และแบคทีเรียแกรมบวกและลบอีกหลายสายพันธุ์ เช่น *B. alvei*, *C. limosum*, *V. parahaemolyticus* และ *V. cholerae* เป็นต้น (Lee and Lee, 2010)

การทดลองประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินและแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กุ้ง เช่น การใช้สารถนอมอาหารทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรีย



ภาพที่ 11. การยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

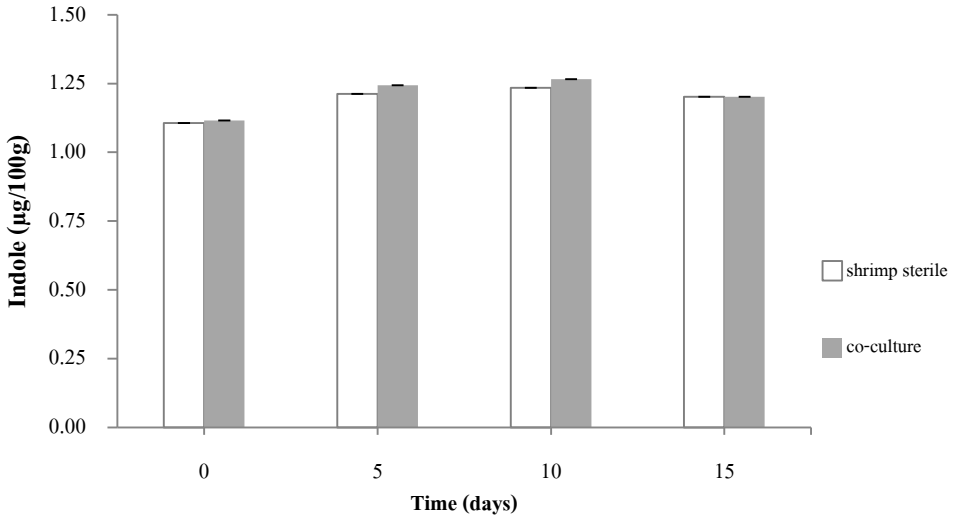
Figure 11. Inhibition the growth of *Listeria monocytogenes* by using crude bacreriocin from *Enterococcus faecalis* TS9S17 in peeled cooked shrimp stored at 4 °C.



ภาพที่ 12. การยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* โดย *Enterococcus faecalis* TS9S17 ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Figure 12. Inhibition the growth of *Listeria monocytogenes* by *Enterococcus faecalis* TS9S17 in peeled cooked shrimp stored at 4 °C.

Lc. lactis subsp. *lactis* KT2W2L ในกุ้งเขตร้อนที่ปอกเปลือก และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะดัดแปลงบรรยากาศ (MAP) สามารถยับยั้งการเจริญของ *Bro. thermophata* DC274 และ *L. innocua* CIP 80.11^{T} ในระยะเวลา 7 วันของการเก็บรักษา (Hwanhlem *et al.,* 2014) นอกจากนี้ยังมีผลิตภัณฑ์อื่นๆที่ใช้สารถนอมอาหารทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก เช่น ปลาแซลมอลรมควัน ซึ่งจากการทดลองของ Vescovo และคณะ (2006) รายงานว่า *Lb. casei* 8 log CFU/กรัม, *Lb. plantarum* 6 log CFU/g และ *Car. piscicola* 6 log CFU/กรัม สามารถลดจำนวนของ *L. innocua* ในปลาแซลมอลรมควันที่มีการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน ในสภาวะสุญญากาศได้



ภาพที่ 13. ปริมาณอินโดลในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

Figure 13. Indole content in cooked peeled shrimp stored at 4 °C.

บทที่ 4

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

1. จากการนำแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 มาทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซินของด้วยวิธี agar well diffusion assay ต่อการยับยั้งแบคทีเรีย *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157 พบว่าแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้

2. *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งประกอบด้วย *L. monocytogenes, Salmonella* sp, *S. aureus* และ *V. parahaemolyticus* พบว่าทั้ง *Ent. feacalils* TS9S17 และ *Ent. feacalils* TS9S19 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้เฉพาะ *L. monocytogenes* เท่านั้น

3. เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Ent. faecalis* TS9S17 และ *Ent. faecalis* TS9S19 มาศึกษาการเจริญเติบโตและการผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่าเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มีการผลิตแบคเทอริโอซินในช่วง log phase แต่ *Ent. faecalis* TS9S17 มีการผลิตแบคเทอริโอซินสูงกว่า *Ent. faecalils* TS9S19

4. ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *Ent. faecalis* TS9S17 โดยนำวัสดุเศษเหลือมาใช้เป็นแทนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเหลว MRS พบว่าวัสดุเศษเหลือที่เหมาะสมต่อการนำมาผลิตแบคเทอริโอซินคือ การนำนึ่งปลาทูน่า 13.5 กรัมต่อลิตร แทน เปปโทนและมีกลูโคส ปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหารเหลว MRS ส่งผลให้ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินมีค่าเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร

5. การศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนคัดเลือกได้ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดยใช้อาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *Ent. faecalis* TS9S17 ในอาหารเหลว modified MRS 3 ที่ใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าปริมาณ 26.5 กรัมต่อลิตร นำมาแทนเปปโทน เนื้อสกัดและยีสต์สกัด เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 40 AU/มิลลิลิตร เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ทำให้ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นเท่ากับ 80 AU/มิลลิลิตร และเมื่อปรับ pH เริ่มต้นเท่ากับ 7 ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นเท่ากับ 160 AU/มิลลิลิตร

6. ในการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 พบว่า แบคเทอริโอซินสามารถทำงานได้ดีที่สุดที่ pH เท่ากับ 6 มีคุณสมบัติทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส มีความคงตัวต่อ pH ในช่วงกว้างตั้งแต่ช่วง pH 2 ถึง 12 และมีความคงตัวต่อการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์

7. จากการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 และแบคทีเรีย *Ent. faecalis* TS9S17 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์กุ้งปอกเปลือกปรุงสุกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน พบว่าการเจริญของ *L. monocytogenes* เลี้ยงร่วมกับตัวเซลล์ของ *Ent. faecalis* TS9S17 ต่ำกว่าการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่เติมแบคเทอริโอซิน จึงคัดเลือกการประยุกต์ใช้ตัวเซลล์ของ *Ent. faecalis* TS9S17 มายับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุกและเมื่อทดสอบคุณภาพทางเคมีด้วยการวิเคราะห์ปริมาณอินโดลพบว่ามีค่าอยู่ในช่วง 1.12-1.27 ไมโครกรัม/100 กรัม

ข้อเสนอแนะ

1. ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *Ent. faecalis* TS9S17 โดยนำวัสดุเศษเหลือมาใช้เป็นแทนแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเหลว MRS ควรใช้วัสดุเศษเหลือหลายชนิดเพื่อเพิ่มทางเลือกในการใช้ประโยชน์จากวัสดุเศษเหลือและการผลิตแบคเทอริโอซิน

2. ในการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 ควรมีการทดสอบความคงตัวต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนหลายชนิด และทดสอบยีนดื้อยา

3. จากการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 และตัวเซลล์แบคทีเรีย *Ent. faecalis* TS9S17 ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์กุ้งปอกเปลือกปรุงสุก เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 28 วัน อาจใช้วิธีการถ่ายเชื้อลงบนตัวอย่างโดยวิธีอื่นๆแทนการสเปรย์ เช่น การแช่ การจุ่ม เป็นต้น นอกจากนี้ในการเก็บรักษาควรใช้เทคโนโลยีเฮอร์เดิล (hurdle technology) ร่วมด้วย เช่น การบรรจุในสภาวะดัดแปลงบรรยากาศ หรือในสภาวะสุญญากาศ เป็นต้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้ง *L. monocytogenes*

4. การนำสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Ent. faecalis* TS9S17 ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก ไม่ประสบผลสำเร็จอาจมีสาเหตุมาจากความเข้มข้นของสารแบคเทอริโอซินนำมาใช้ต่ำเกินไป และจำนวนเชื้อเริ่มต้นของ *L. monocytogenes* มีปริมาณสูงเกินไป ซึ่งตามกฎหมายของสหภาพยุโรปกำหนดให้ผลิตภัณฑ์ประเภทปรุงสุกพร้อมบริโภคมี

จำนวน *L. monocytogenes* ไม่เกิน 100 CFU/มิลลิลิตร (Mejlholm *et al.,* 2008) ดังนั้นในการทดลองจึงควรลดจำนวนเชื้อเริ่มต้นของ *L. monocytogenes* ที่ใช้ในการทดลองเพื่อให้สอดคล้องกับมาตรฐานที่กำหนด และเพิ่มความเข้มข้นของสารละลายแบคเทอริโอซิน

5. หากมีการนำตัวเซลล์แบคทีเรีย *Ent. faecalis* TS9S17 มายับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในกุ้งปอกเปลือกปรุงสุก ควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความปลอดภัยของเชื้อ *Ent. faecalis* ได้แก่ การทนต่อยาปฏิชีวนะ (erythromycin, tetracycline, chloramphenicol, streptomycin และ vancomycin) ทดสอบยีนดื้อยา (virulence gene) การสร้าง biofilm และการย่อยเซลล์เม็ดเลือดแดง (β haemolysis) ซึ่งการทดสอบเหล่านี้เป็นการยืนยันความปลอดภัยต่อผู้บริโภค (Franz *et al*., 2003)

6. ควรศึกษาเกี่ยวกับไบโอเจนิกเอมีน (biogenic amine) ซึ่งเป็นสารพิษในอาหารที่เกิดจากกระบวนการสังเคราะห์ชีวภาพมักพบในอาหารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ (สิรินันท์ ชมภูแสง, 2552)

เอกสารอ้างอิง

จักรพันธ์ พิมาน,วนิดา พัสดุรักษ์, ธัชเวชช์ กิมประสิทธิ์, อลงกต บุญสูงเนิน และจันทิมา พฤกษากร. 2554. การคัดกรองหาเชื้อ *Enterococcus* spp. ที่ดื้อต่อยา vancomycin ในฟาร์มสุกร เขตภาคกลาง. วารสารประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. 2: 132-140.

นิตยา พันธุ์บัว และอารุณี ศรพรหม. 2538. การปนเปื้อนของเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* *ใน* อาหารแช่แข็งเพื่อการส่งออก. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 13: 19-26.

บุษกร อุตรภิชาติ. 2548. "มารู้จักแบคทีเรียกรดแลคติกกันเถอะ". วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ. 2: 18-33.

ปรีชา จึงสมานุกูล, ดวงดาว วงศ์สมมาตร์ และมัณฑนา พันธ์บัวหลวง. 2538. *Listeria* ในกุ้งแช่แข็ง. วารสาร เกษตรพระจอมเกล้า. 13: 8-11.

ผ่องเพ็ญ รัตตกูล, นิรชา วงษ์จินดา และนฤมล แสงทอง. 2534. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Salmonella* ในกุ้ง. รายงานการสัมมนาวิชาการประจำปี 2534. สถาบันวิจัยประมงน้ำจืดบางเขน. 16-18 กันยายน 2534. หน้า. 61-64.

พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่พบในปลาร้า. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภัทรพล จันทราภรณ์. 2543. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดย *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) ที่ถูกตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ลัญจกร จันทร์อุดม. 2549. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2533. การสืบพันธุ์และการเจริญเติบโต. *ใน* ชีววิทยาของแบคทีเรีย. หน้า 64-87. สงขลา: คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สิรินันท์ ชมภูแสง. 2552. ไบโอเจนิกเอมีน : สารพิษจากกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก. วารสารอาหาร. 39: 308-312.

สุทธวัฒน์ เบญจกุล, ก่องกาญจน์ กิจรุ่งโรจน์, สุนิสา ศิริพงศ์วุฒิกร, ปุณณาณี สัมภวะผล, กิติญา วงษ์คำจันทร์ และนันธชา ไฝทอง. 2557. การหาปริมาณอินโดล *ใน* บทปฏิบัติการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภายหลังการจับสัตว์น้ำ (851-421). หน้า 68-71. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2544. คู่มือความปลอดภัยของอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. เฟื่องฟ้าพริ้นติ้ง. กรุงเทพฯ.

อนุวัฒน์ กีระสุนทรพงษ์. 2542. Vancomycin-resistant *Enterococcus* (ออนไลน์). สืบค้นจาก http://www.narst.dmsc.moph.go.th/../Enterococcus%20resistant%5B1%5D.doc (25 กรกฎาคม 2556)

Aasen, I. M., Moreto, T., Katla, T., Axelsson, L. and Storro, I. 2000. Influence of complex nutrients, temperature and pH on bacteriocin production by *Lactobacillus sakei* CCUG 42687. Appl. Microbiol. Biotechnol. 53: 159-166.

Ammor, S., Tauver, G., Dufour, E. and Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolate from the same meat small-scale facility: 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control. 17: 454-461.

Ananou, S., Munoz, A., Galvez, A., Martinez-Bueno, M., Maqueda, M. and Valdivia, E. 2008. Optimization of enterocin AS-48 production on a whey-based substrate. Int. Dairy J. 18: 923-927.

AOAC. 2012. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists, Inc. Gaithersburg.

Axelsson, L. T. 1993. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. *In* Lactic Acid Bacteria. (Salminen, S. and Wrigth, A. V., eds.). p. 1-64. Marcel Dekker. New York.

Babalola, O. O. 2007. Characterization of two isolated lactococcal strains with respect to bacteriocin concentrations. African J. Food Sci. 1: 5-10.

Bennet, J. E. and Lorber, B. 1996. Listeriosis. Clin. Infect. Dis. 24: 1-11.

Biswas, S. R., Ray, P., Johnson, M. C. and Ray, B. 1995. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Environ. Microbiol. 57: 1265-1267.

Bodaszewska-Lubas, M., Brzychczy-Wloch, M., Gosiewski, T. and Heczko, P. B. 2012. Antibacterial activity of selected standard strains of lactic acid bacteria producing bacteriocins – pilot study. Postepy. Hig. Med. Dosw. 66: 787-794.

Bremer, P. J., Fletcher, G. C. and Osborne, C. 2003. *Salmonella* in Seafood. Christchurch, New Zealand.

Brötza, H. and Sahlb, H. G. 2000. New insights into the mechanism of action of lantibiotics—diverse biological effects by binding to the same molecular target. J. Antimicrob. Chemother. 46: 1-6.

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

Cebrián, R., Banos, A., Valdivia, E., Perez-Pulido, R., Martinez-Bueno, M. and Maqueda, M. 2012. Characterization of functional, safety, and probiotic properties of *Enterococcus faecalis* UGRA10, a new AS-48-producer strain. Food Microbiol. 30: 59-67.

Choi , H. Y., Kim, J. S. and Kim, W. J. 2011. Optimization of conditions for the maximum bacteriocin production of *Enterococcus faecium* DB1 using response surface methodology. Korean J. Food Sci. Ani. Resour. 31: 176-182.

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

Cobo Molinos, A., Abriouel, H., Locas Lopez, R., Ben Omar, N., Valdivia, E. and Galvez, A. 2009. Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds and chemical preservatives against *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat salad. Food Chem. Toxicol. 47: 2216-2223.

Conner, D. E., Brackett, R. E. and Beuchat, L. R. 1986. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice. Appl. Environ. Microbiol. 52: 59-63.

Cotter, P. D., Ross, R. P. and Hill, C. 2012. Bacteriocins — a viable alternative to antibiotics? Nat. Rev. Microbiol. 11: 95-105.

Craig, S., Permezel, M., Doyle, L., Mildenhall, L. and Garland, S. 1996. Perinatal infection with *Listeria monocytogenes*. Aus. N. Zeal. J. Obstet. Gynecol. 36: 286-290.

Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technol. 43: 164-167.

De Man, J. D., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. Appl. Bact. 23: 130-135.

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. 1993. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. lactis batch fermentations using a complex medium. Appl. Microbiol. Biotechnol. 40: 17-22.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. (De Vuyst, L. and Vandamme, E. J., eds.). p. 91-142. Chapmand and Hall. New York.

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

Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, P. 2004. Bacteriocins: biological tools for biopreservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16: 1058-1071.

Desmarchelier, P. M. 1997. Pathogenic Vibrios. *In* Foodborne Microorganisms of Public Health Importance, 5th ed, (Hocking, A. D., Arnold, G., Jenson, I., Newton, K. and Sutherland, P., eds.). p. 285 -312. Australian Institute of Food Science and Technology Inc. North Sydney.

Du Bois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., Rebers, P. A. and Smith, F. 1965. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Anal. Chem. 28: 350-356.

Du Toit, M., Franz, C. M. A. P., Dicks, L. M. T. and Holzapfel, W. H. 2000. Preliminary characterization of bacteriocins produced by *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolated from pig faeces. J. Appl. Microbiol. 88: 482-494.

Eguchi, T., Kaminaka, K., Shima, J., Kawamoto, S., Mori, K., Choi, S. H., Doi, K., Ohmomo, S. and Ogata, S. 2001. Isolation and characterization of enterocin SE-K4 produced by thermophilic enterococci, *Enterococcus faecalis* K-4. Biosci. Biotechnol. Biochem. 65: 247-253.

Elotmani, F., Revol-Junelles, A. M., Assobhei, O. and Milliere, J. B. 2002. Characterization of anti-*Listeria monocytogenes* bacteriocins from *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, and *Lactococcus lactis* strains isolated from Raıib, a Moroccan traditional fermented milk. Curr. Microbiol. 44: 10-17.

Ennahar, S., Aoude-Werner, D., Assobhei, O. and Hasselmann, C. 1998. Antilisterial activity of enterocin 81, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* WHE 81 isolated from cheese. J. Appl. Microbiol. 85: 521-526.

Fall, P. A., Leroi, F., Cardinal, M., Chevalier, F. and Pilet, M. F. 2010a. Inhibition of *Brochothrix thermosphacta* and sensory improvement of tropical peeled cooked shrimp by *Lactococcus piscium* CNCM I-4031. Lett. Appl. Microbiol. 50: 357-361.

Fall, P. A., Leroi, F., Chevalier, F., Guerin, C. and Pilet, M. F. 2010b. Protective effect of a non-bacteriocinogenic *Lactococcus piscium* CNCM I-4031 strain against *Listeria monocytogenes* insterilized tropical cooked peeled shrimp. J. Aquat. Food Prod. Tech.19: 84-92.

Franza, C. M. A. P., Stilesb, M. E., Schleifer, K. H. and Holzapfel, W. H. 2003. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. Int. J. Food Microbiol. 88: 105-122.

Gálvez, A.,Valdivia, E., Abriouel, H., Camafeita, E., Mendez, M., Martínez-Bueno, M. and Maqueda, M. 1998. Isolation and characterization of enterocin EJ97, a bacteriocin producedby *Enterococcus faecalis* EJ97. Arch. Microbiol. 171: 59-65.

Garcia, P., Rodrı´guez, L., Rodriguez, A. and Martinez, B. 2010. Food biopreservation: promising strategies using bacteriocins, bacteriophages and endolysins. Trends Food. Sci. Tech. 21: 373-382.

Gellin, B. G. and Broome, C. V. 1989. Listeriosis. J. Am. Med. Assoc. 261: 1313-1320.

Güllüce, M., Karadayı, M. and BarıŞ, Ö. 2013. Bacteriocins: promising natural antimicrobials. Sci. Tech. Educ. 1: 1016-1027.

Hara-Kudo, Y., Nishina, T., Nakagawa, H., Konuma, H., Hasegawa, J. and Kumagai, S. 2001. Improved method for detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafood. Appl. Environ. Microbiol. 67: 5819-5823.

Hashimoto, K., Bari, M. L., Inatsu, Y., Kawamoto, S. and Shima, J. 2011. Biopreservation of Kamaboko (steamed surimi) using piscicolin KH1 produced by *Carnobacterium maltalomaticum* KH1. Jpn. J. Food Microbiol. 28: 193-200.

Herranz, C., Martinez, J. M., Rodriguez, J. M., Hernandez, P. E. and Cintas, L. M. 2001. Optimization of enterocin P production by batch fermentation of *Enterococcus faecium* P13 at constant pH. Appl. Microbiol. Biotechnol. 56: 378–383.

Hitchins, A. D. and Jinneman, K. 2011. Bacteriological analytical manual chapter 10 detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* in foods (Online). Available http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm071400.htm (28 July 2015)

Holzapfel, W. H. and Wood, B. J. B. 1995. Lactic Acid Bacteria in Contemporary Perspective. *In* The Genera of Lactic Acid Bacteria. (Wood, B. J. B. and Holzapfel, W. H., eds.). p. 1-6. Blackie Academic. London.

Hosseini, H., Cheraghali, A. M., Yalfani, R. and Razavilar , V. 2004. Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. Food Control. 15: 187–190.

Hurst, A. 1981. Nisin. Appl. Microbiol. 27: 85-123.

Hwanhlem, N. 2014. Screening, purification and characterization of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from mangrove forest and its application. Ph.D. Dissertation. Prince of Songkla University.

Hwanhlem, N., Chobert, J. M. and H-Kittikun, A. 2014. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents in food: isolation, screening and optimization. Food Control. 41: 202-211.

Hwanhlem, N., Biscola, V., El-Ghaish, S., Jaffres, E., Dousset, X., Haertle, T., H-Kittikun, A. and Chobert, J. M. 2013. Bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from mangrove forests in southern Thailand as potential bio-control agents: purification and characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* KT2W2L. Probiotics Antimicrob. Proteins. Prot. 5: 264-278.

Iyer, S. and Jones, D. H. 2004. Community-acquired methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* skin infection: a retrospective analysis of clinical presentation and treatment of a localoutbreak. J. Am. Acad. Dermatol. 50: 854-858.

Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Microbiol. Rev. 59: 171-200.

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

Kaur, B., Balgir, P., Mittu, B., Chauhan, A. and Kumar, B. 2013. Purification and physicochemical characterization of anti-gardnerella vaginalis bacteriocin HV6b

produced by *Lactobacillus fermentum* isolate from human vaginal ecosystem. Am. J. Biochem. Mol. Biol. 3: 91-100.

Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Biochemie. 70: 337-349.

Kumar, M., Jain, A. K., Ghosh, M. and Ganguli, A. 2012. Statitical optimization of physical parameters for enhanced bacteriocin produce by *L. casei* . Biotechnol. Bioprocess Eng. 17: 606-616.

Laukova, A. and Kmet, V. 1993. Metal ion resistance of the bacteriocin producing enterococci. Asian Australas. J. Anim. Sci 6: 441-445.

Lee, J. H. and Lee, J. 2010. Indole as an intercellular signal in microbial communities. FEMS Microbiol. Rev. 34: 426-444.

Leroy, F. and De Vuyst, L. 2002. Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* RZSC5 is cell density limited and occurs in the very early growth phase. Int. J. Food Microbiol. 72: 155-164.

Litchfield, J. H. 1996. Microbiological production of lactic acid bacteria. Adv. Appl. Microbiol. 42: 45-95.

Liu, W. and Hansen, J. N. 1990. Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. Appl. Environ. Microbiol. 56: 2551-2558.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193: 265-275.

Lu, S. 2009. Effects of bactericides and modified atmosphere packaging on shelf-life of Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*). Food Sci. Technol. 42: 286-291.

Lurie, S., Feinstein, M. and Mamet, Y. 1999. *Listeria monocytogenes* reinfection in a pregnant woman. Brit. J. Obstet. Gynec. 106: 509-510.

Maldonado-Barragán, A., Caballero-Guerrero, B., Jiménez, E., Jimenez-Díaz, R., Ruiz-Barba, J. L. and Rodríguez, J. M. 2009. Enterocin C, a class IIb bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* C901, a strain isolated from human colostrums. Int. J. Food Microbiol. 133: 105-112.

Mejlholm, O., Kjeldgaard, J., Modberg, A., Vest, M. B., Bøknæs, N., Koort, J., Björkroth, 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.

Mendes, R., Huidobro, A. and Caballero, E. 2002. Indole levels in deepwater pink shrimp (*Parapenaeus longirostris*) from the Portuguese coast. Effects of temperature abuse. Eur. Food Res. Tech. 214: 125-130.

Migirov, L., Yakirevitch, A. and Kronenberg, J. 2005. Mastoid subperiosteal abscess: a review of 51 cases. Int. J. Pediatr. Otorhi. 69: 1529-1533.

Mirhosseini, M. and Emtiazi, G. 2011. Optimisation of enterocin a production on a way base substrate. Worl Appl. Sci. J. 10: 1493-1499.

Mojgani, N., Sabiri, G., Ashtiani, M. P. and Torshizi, M. A. K. 2009. Characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus brevis* NM 24 and *L. fermentum* NM 332 isolated from green olives in Iran (Online). Available http://ispub.com/IJMB/6/2/8552 (31 July 2015)

Moon, N. J., Beuchat, L. R., Kinkaid, D. T. and Hays, E. R. 1982. Evaluation of lactic acid bacteria for extending the shelf life of shrimp. J. Food Sci. 47: 897-900.

Nilsen,T., Nes, I. F. and Holo, H. 2003. Enterolysin A, a cell wall-degrading bacteriocin from *Enterococcus faecalis* LMG 2333. Appl. Environ. Microbiol. 69: 2975-2984.

Nirmal, N. P. and Benjakul, S. 2009. Melanosis and quality changes of pacific white shrimp (*Litopenaeus vannamei*) treated with catechin during iced storage. J. Agric. Food Chem. 57: 3578-3586.

O'Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie. 84: 593-604.

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: 219-227.

Ohkawa, I., Shiga, S. and Kageyama, M. 1980. Effect of iron concentration in the growth medium on the sensitivity of *Pseudomonas aeruginosa* to pyocin S2. J. Biochem. 87: 323-331.

Oliver, J. D. and Kaper, J. B. 1997. *Vibrio* Species. *In* Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers. (Doyle, M., Beuchat, L. R. and Montville, T. J., eds.). p. 228-264. ASM Press. Washington, DC.

Parente, E. and Riccardi, A. 1994. Influence of pH on the production of enterocin 1146 during batch fermentation. Lett. Appl. Microbiol. 19: 12-15.

Parente, E. and Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52: 628-638.

Parente, E., Riccardi, A. and Addario, G. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocins production by *Lactococcus lactis* subsp. lactis 140VWC during batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 388-394.

Piard, J. C. and Desmazeaud, M. 1992. Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria: 2. Bacteriocins and other antibacterial substances. Lait. 72 : 113-142.

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.

Piper, C., Draper, L. A., Cotter, P. D., Ross, R. P. and Hill, C. 2009. A comparison of the activities of lacticin 3147 and nisin against drug-resistant *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* species. J. Antimicrob. Chemother. 64: 546-551.

Quinlivan, J. A., Newnham, J. P. and Dickinson, J. E. 1988. Ultrasound features of congenital listeriosis- A case report. Prenatal Diag. 18: 1075-1078.

Rehaiem, A., Martı´nez, B., Manai, M. and Rodrı´guez, A. 2010. Production of enterocin A by *Enterococcus faecium* MMRA isolated from 'Rayeb', a traditional Tunisian dairy beverage. J. Appl. Microbiol. 108: 1685-1693.

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

Roces, C., Rodriguez, A. and Martinez, B. 2012. Cell wall-active bacteriocins and their applications beyond antibiotic activity. Probiotics Antimicro. Prot. 4: 259-272.

Saito, T. 2004. Selection of useful probiotic lactic acid bacteria from the *Lactobacillus acidophilus* group and their applications to functional foods. Anim. Sci. J. 75: 1-13.

Savadogo, A., Ouattara, C. A. T., Bassole, I. H. N. and Traore, A. S. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from burkina faso fermented milk. Pakistan J. Nutr. 3: 174-179.

Schlegel, H. G. 1993. General Microbiology. Cambridge University Press, Cambridge.

Schleifer, K. H. Kilpper-Balz, R., Kraus, J. and Gehring, F. 1984. Relatedness and classification of *Streptococcus mutans* and 'mutans-like' streptococci. J. Dent. Res. 63: 1047-1050.

Schved, F., Lalazar, A., Lindner, P. and Juven, B. J. 1994. Interaction of the bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* SJ-1 with the cell envelope of *Lactobacillus* spp. Lett. Appl. Microbiol. 19: 281-283.

Sigrun, G., Birna, G., Hjörleifur, E., Karl, G. K. and Már, K. 2006. Contamination of cooked peeled shrimp (*Pandalus borealis*) by *Listeria monocytogenes* during processing at two processing plants. J. Food Protect. 69: 1304-1311.

Silver, H. M. 1998. Listeriosis during pregnancy. Obstet. Gynecol. Surv. 53: 737-740.

Singh, D., Chan, M., Hoon, N. H. and Yon, M. O. 1987. Microbiological quality of frozen raw and cooked shrimps. Food Microbiol. 4: 221-228.

Sivakumar, N., Rajamani and Saif, A. B. 2010. Partial characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus acidophilus* and *Pediococcus acidilactici*. Braz. Arch. Biol. Technol. 53: 1177-1184.

Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722-756.

Tahiri, I., Desbiens, M., Kheadr, E., Lacroix, C. and Fliss, I. 2009. Comparison of different application strategies of divergicin M35 for inactivation of *Listeria monocytogenes* in cold-smoked wild salmon. Food Microbiol. 26: 783-793.

Tapia-Hernández, A., Mascarúa-Esparza, M. A. and Caballero-Mellado, J. 1990. Production of bacteriocins and siderophore-like activity by *Azospirillum brasilense*. Microbios. 64: 73-83.

Tappero, J. W., Schuchat, A., Deaver, K. A., Mascola, L. and Wenger, J. D. 1995. Reduction in the incidence of human listeriosis in the United States: effectiveness of prevention efforts. J. Am. Med. Assoc. 273: 1118-1122.

Teclu, D., Tivchev, G., Laing, M. and Wallisa, M. 2009. Determination of the elemental composition of molasses and its suitability as carbon source for growth of sulphate-reducing bacteria. J. Hazard. Mater. 161: 1157-1165.

Todorov, S. D., Wachsman, M., Tomé. E., Dousset, X., Destro, M. T., Dicks, L. M., Franco, B. D., Vaz-Velho, M. and Drider, D. 2010. Characterisation of an antiviral pediocin-like bacteriocin produced by *Enterococcus faecium*. Food Microbiol. 27: 869-879.

Todorov, S. D. and Dicks, L. M. 2005. Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD, isolated from spoiled black olives. J. Microbiol. 43: 370-374.

Todorov, S. D. and Dicks, L. M. 2009. Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. Anaerobe. 15: 65-73.

Tran Thi, P., Ly Thi Lien, K., Natsue, O., Nguyen Thu, T., Tomomitsu Alexandre, O., Masato, A. and Hideki, H. 2005. Contamination of *Salmonella* in retail meats and shrimps in the Mekong delta,Vietnam. J. Food Protect. 68: 1077-1080.

Vescovo, M., Scolari, G. and Zacconi, C. 2006. Inhibition of *Listeria innocua* growth by antimirobial-producing lactic acid cultures in vacuum-packed cold-smoked salmon. Food Microbiol. 23: 689-693.

Vignolo, G. M., de Kairuz, M. N., de Ruiz Holgado, A. P. and Oliver, G. 1995. Influence of growth conditions on the production of lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL705. Appl. Microbiol. 78: 5-10.

Villani, F., Salzano, G., Sorrentino, E., Pepe, O., Marino, P. and Coppola, S. 1993. Enterocin 226NWC, a bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* 226, active against *Listeria monocytogenes*. J. Appl. Microbiol. 74: 380–387.

Yamamoto, Y., Togawa, Y., Shimosaka, M. and Okazaki, M. 2003. Purification and characterization of a novel bacteriocin produced by *Enterococcus faecalis* Strain RJ-11. Appl. Environ. Microbiol. 10: 5546-5553.

Yin, L. J., Wu, C. W. and Jiang, S. T. 2007. Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. Fish. Sci. 73: 907-912.

Yousef, A. E. and Carlstrom, C. 2003. Lactic Acid Fermentation and Bacteriocin Production: Batch Fermentation, Growth Kinetics and Bacteriocin Bioassay. *In* Food Microbiology: A Laboratory Manual (Yousef, A. E. and Carlstrom, C., eds.). p.231-238. John Wiley & Sons Inc. New York.

Yusuf, M. A. and Hamid, T. H. T. A. 2012. Optimization of temperature and pH for the growth and bacteriocin production of *Enterococcus faecium.* B3L3. IOSR J. Pharm. 2: 49-59.

Zendo, T., Eungruttanagorn, N., Fujioka, S., Tashiro, Y., Nomura, K., Sera,Y., Kobayashi, G., Nakayama, J., Ishizaki A. and Sonomoto, K. 2005. Identification and production of a bacteriocin from *Enterococcus mundtii* QU 2 isolated from soybean. J. Appl. Microbiol. 99: 1181-1190.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

1. Brain Heart Infusion Broth

ประกอบด้วย

Calf brain, infusion from	200	g
Beef heart, infusion from	250	g
Proteose peptone	10	g
Dextrose	2	g
Sodium chloride	5	g
Disodium phosphate	2	g
Final pH (at 25 °C)	7.4±0.2	

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 37 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Listeria Oxford Medium Base

ประกอบด้วย

Peptone, special	23	g
Lithium chloride	15	g
Sodium chloride	5	g
Corn starch	1	g
Esculin	1	g
Ammonium ferric citrate	0.5	g
Agar	10	g
Final pH (at 25 °C)	7.0±0.2	

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 27.75 กรัม ละลายน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 45 ถึง 50 องศาเซลเซียส และเติม Oxford Listeria Supplement ขนาด 1 vial ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปเทบนเพลท

3. MRS broth (de man Rogosa Sharp)

ประกอบด้วย

Proteose peptone	10	g
Beef extract	10	g
Yeast extract	5	g
Dextrose	20	g
Polysorbate 80	1	g
Ammonium citrate	2	g
Sodium acetate	5	g
Magnesium sulphate	0.1	g
Manganese sulphate	0.05	g
Dipotassium phosphate	2	g
Final pH (at 25 °C)	6.5±0.2	

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 55.15 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ถ้าเป็นอาหารแข็งเติมผงวุ้น15 กรัม และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Plate Count Agar (PCA)

ประกอบด้วย

Casein enzymic hydrolysate	5	g
Yeast extract	2.5	g
Dextrose	1	g
Agar	15	g
Final pH (at 25 °C)	7.0±0.2	

ชั่งอาหารสำเร็จรูป 23.5 กรัม ละลายน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร และฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ผสมให้เข้ากันก่อนเทลงในเพลท

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมีสำหรับวิเคราะห์และวิธีวิเคราะห์

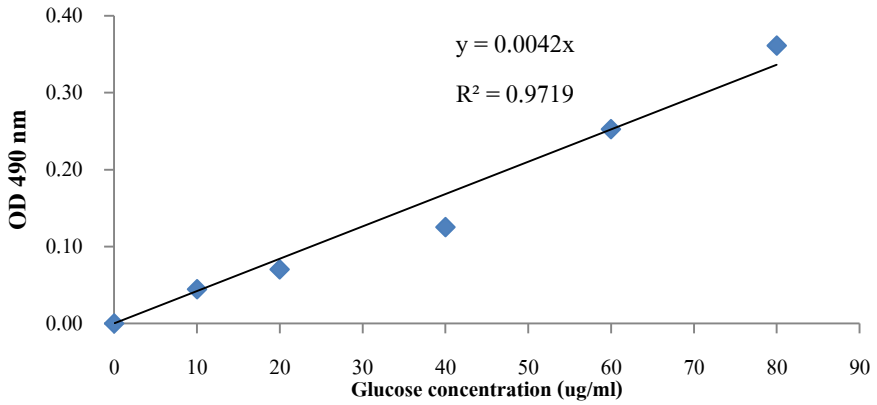
1. การวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาล ตามวิธีฟีนอล-ซัลฟูริก (Dubois, *et al.,* 1956)

สารเคมี

1. กรดซัลฟูริกเข้มข้น 95.5 เปอร์เซนต์
2. ฟีนอล 5 เปอร์เซนต์ โดยน้ำหนัก เตรียมโดยชั่งฟีนอลมา 5 กรัม แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปอีก 95 กรัม
3. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคสมา 0.04 กรัม ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายกลูโคสเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำมาเจือจางจนได้ความเข้มข้นตั้งแต่ 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)

วิธีการ

1. โดยปิเปตสารละลายตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลายฟีนอลเข้มข้น 5 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติมกรดซัลฟูริกเข้มข้น 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
3. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร สำหรับหลอดควบคุมให้ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง จากนั้นคำนวณปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของน้ำตาลกลูโคส (ความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสเป็น 10, 20, 40, 60 และ 80 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)



ภาพที่ 14. กราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคส

Figure 14. Glucose standard curve.

2. การวิเคราะห์ปริมาณเกลือ ตามวิธีของ A.O.A.C. 2012

สารเคมี

1. ซิลเวอร์ไนเตรท ($AgNO_3$) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล
2. แอมโมเนียมไธโอไซยาเนต (NH_4SCN) เข้มข้น 0.1 นอร์มอล
3. สารละลายอิ่มตัวเฟอร์ริกอินดิเคเตอร์ ($FeNH_4(SO_4)_2 . 12H_2O$)

วิธีการ

1. ชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ใส่บีกเกอร์ ใส่ในขวดปรับปริมาตรขนาด 250 มิลลิลิตร
2. เติมกรดไนตริก 20 มิลลิลิตร
3. เติมสารละลายซิลเวอร์ไนเตรท 20 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และ ย่อยบนเตาในตู้ควัน 15 นาที รอจนเย็นและกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1
4. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 มิลลิลิตร แล้วเติมเฟอร์ริกอินดิเคเตอร์ 5 มิลลิลิตร
5. นำไปไตเตรทด้วยสารละลายแอมโมเนียมไธโอซัลเฟต เข้มข้น 0.1 นอร์มอล สังเกตจนสีเปลี่ยนไปเป็นสีน้ำตาลคงตัวบันทึกผลและคำนวณปริมาณเกลือดังสูตร

$$\text{ปริมาณเกลือ (เปอร์เซนต์)} = \frac{0.0058 \times (A - B)}{C}$$

A = ปริมาตรซิลเวอร์ไนเตรท (มิลลิลิตร)

B = ปริมาตรแอมโมเนียมไธโอไซยาเนตที่ใช้ไตเตรท (มิลลิลิตร)

C = น้ำหนักตัวอย่าง (กรัม)

3. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน ตามวิธี Lowry (Lowry *et al.*, 1951)

สารเคมี

1. สารละลาย A : 2 เปอร์เซนต์ โซเดียมคาร์บอเนต (Na_2CO_3) ในโซเดียมไฮดอกไซด์ เข้มข้น 0.1N

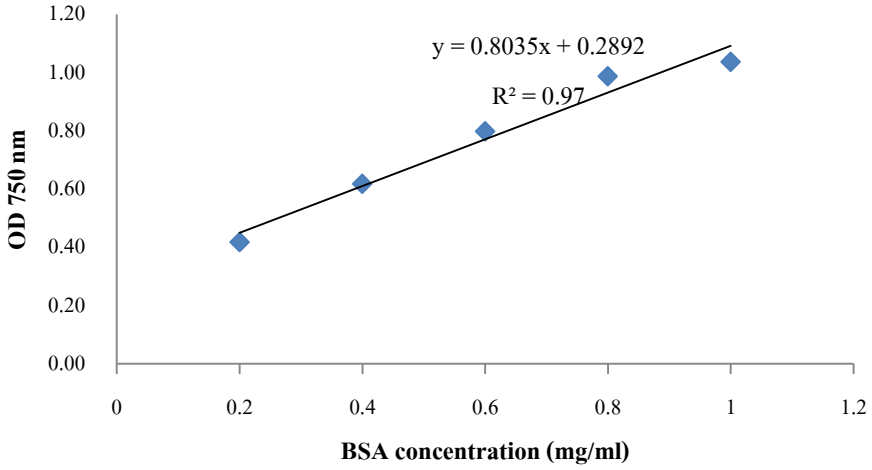
2. สารละลาย B : 0.5 เปอร์เซนต์ คอปเปอร์ซัลเฟต ($CuSO_4.H_2O$) ในสารละลายโซเดียมโพแทสเซียมทาร์เทต (Sodium potassiumtartate)

3. สารละลาย C : สารผสมระหว่างสารละลาย A และสารละลาย B ปริมาตร 50 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร ตามลำดับ

4. สารละลาย D : เจือจาง Folin-Ciocalteau reagent ด้วยน้ำกลั่นอัตราส่วน 1:1

วิธีการ

1. นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการทราบปริมาณโปรตีน 0.5 มิลลิลิตร มาเติมสารละลาย C ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันและวางทิ้งไว้ 10 นาที
2. เติมสารละลาย D ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร
3. เขย่าให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที
4. วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร โดยใช้สาระลายบัฟเฟอร์ที่เตรียมตัวอย่างเป็นแบลงค์ โดยทำตามขั้นตอน 1-4
5. คำนวณปริมาณโปรตีนโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน
6. เตรียมกราฟมาตรฐานโดยใช้ BSA ความเข้มข้น 0.2-1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และทำตามขั้นตอนข้อ 1-4 โดยใช้สารละลายโปรตีนแทนสารตัวอย่าง
7. นำข้อมูลที่ได้เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างค่าดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของปริมาณโปรตีน



ภาพที่ 15. กราฟมาตรฐาน BSA

Figure 15. BSA standard curve.

4. การวิเคราะห์ปริมาณอินโดล ตามวิธีของ A.O.A.C. (2012)

สารเคมี

1. สารให้สี (Color reagent) เตรียมโดยละลาย p-dimethylamino benzaldehyde ปริมาณ 0.4 กรัม ในกรดอะซิติก (HOAC) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมกับกรดฟอสฟาริก (H_3PO_4) ปริมาตร 92 มิลลิลิตร และกรดไฮโรคลอริก ปริมาตร 3 มิลลิลิตร
2. สารละลายไฮโรคลอริกเจือจาง เตรียมโดยละลายไฮโรคลอริก 5 มิลลิลิตร ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3. สารละลายอิ่มตัวโซเดียมซัลเฟต (Na_2SO_4) เตรียมครั้งละ 250 มิลลิลิตร

4. คลอโรฟอร์ม ($CHCl_3$)

5. สารละลายอินโดลมาตรฐาน เข้มข้น 1000 มิลลิกรัมต่อลิตร เตรียมโดยละลายสารอินโดลจำนวน 10 มิลลิกรัม ด้วยเอทธิลแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร

การเตรียมตัวอย่าง

1. ถ้าตัวอย่างเป็นหอยควรใช้ประมาณ 50 กรัม ปูที่เอาน้ำออกใช้ 100 กรัม และกุ้งดิบหรือต้มใช้ 100 กรัม ขึ้นอยู่กับปริมาณอินโดลที่คาดว่าจะมี

2. ชั่งตัวอย่างในถ้วยปั่น (blender jar) เติมน้ำ 100 มิลลิลิตร (ถ้าเป็นตัวอย่างหอยหรือปู) หรือแอลกอฮอล์ 100 มิลลิลิตร (ถ้าเป็นกุ้ง) ปั่นให้เข้ากันหลายๆนาที ถ่ายใส่ขวดกลั่นที่เตรียมไว้ ล้างส่วนที่ติดถ้วยปั่นด้วยสารละลายที่ใช้เพียงเล็กน้อย

วิธีการ

1. วิธีกลั่น

ค่อยๆปล่อยไอน้ำลงในขวดกลั่นเพื่อไม่ให้เกิดฟองมากนัก และรักษาระดับของไอน้ำให้ปริมาตรในขวดกลั่นอยู่ในระดับ 80-90 มิลลิลิตร เก็บสารที่กลั่นได้ 350 มิลลิลิตร ประมาณ 45 นาที (ถ้าใช้แอลกอฮอล์เก็บสารให้ได้ 450 มิลลิลิตร) ล้าง condenser ด้วยแอลกอฮอล์เพียงเล็กน้อย

2. วิธีสกัด

1. ถ่ายสารที่กลั่นได้ลงในกรวยแยก (separating funnel) ขนาด 500 มิลลิลิตร

2. เติมกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง 5 มิลลิลิตร โซเดียมซัลเฟตอิ่มตัว 5 มิลลิลิตร และคลอโรฟอร์ม 25 มิลลิลิตรเขย่า 1 นาที ถ่ายสารที่แยกออกชั้นล่างไว้ในกรวยแยกขนาด 500 มิลลิลิตร อีกอันหนึ่ง

3. เติมคลอโรฟอร์มลงในกรวยแยกอันที่ 1 อีก 20 มิลลิลิตร (ทำ 2 ซ้ำ) รวมของเหลวที่แยกได้ในกรวยแยกอันที่ 2

4. เติมน้ำกลั่น 400 มิลลิลิตร ในกรวยแยกอันที่ 2 แล้วเติมโซเดียมซัลเฟตอิ่มตัว 5 มิลลิลิตร และกรดไฮโดรคลอริกเจือจาง 5 มิลลิลิตร

5. เขย่า 1 นาทีให้แยกชั้น กรองสารละลายชั้นล่างผ่านสำลีลงในกรวยแยกอันที่ 3 (ขนาด 125 มิลลิลิตร)

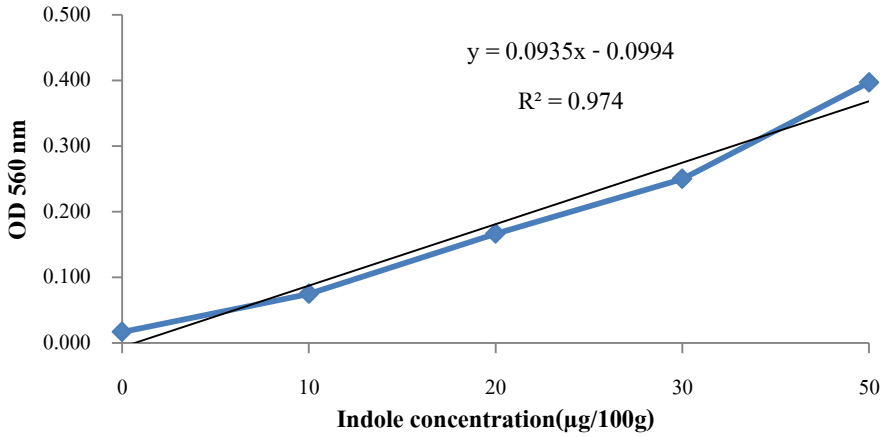
6. เติมคลอโรฟอร์ม 15 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยกอันที่ 2 เขย่าให้เข้ากัน แล้วรวมส่วนที่แยกชั้นล่างโดยกรองผ่ายสำลีลงในกรวยแยกอันที่ 3

3. วิธีทำให้เกิดสี

เติมสารให้สี (Color reagent) 10 มิลลิลิตร ลงในกรวยแยกใบที่ 3 เขย่านประมาณ 2 นาที ชั้นของกรดจะแยกอยู่ด้านล่าง นำชั้นกรดทั้งหมด (ประมาณ 9 มิลลิลิตร) ลงในขวดปรับปริมาตรขนาด 50 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยกรดอะซิติก เขย่าให้เข้ากัน ถ้ามีสารอินโดลจะเห็นสารละลายเป็นสีชมพู นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 560 นาโนเมตร ทำแบลงค์โดยนำสารให้สี (Color reagent) 9 มิลลิลิตร มาปรับปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร ด้วยกรดอะซิติก

4. กราฟมาตรฐานอินโดล

1. นำสารละลายอินโดลมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0, 10, 20, 30 และ 50 มิลลิลิตร (ซึ่งเทียบเท่ากับปริมาณเนื้อสารเป็น 0, 10, 20, 30 และ 50 ไมโครกรัม) มาเติมด้วยน้ำและแอลกอฮอล์
2. นำสารละลายมาตรฐานที่มีปริมาตรตามที่กำหนดไปทำการสกัดดังข้อ 2 (1-7)
3. ทำให้เกิดสีดังข้อ 3
4. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง เพื่อเตรียมเป็นกราฟมาตรฐานซึ่งพลอตระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณสารอินโดล



ภาพที่ 16. กราฟมาตรฐานอินโดล

Figure 16. Indole standard curve.

ภาคผนวก ค
การคำนวณและเปรียบปริมาณน้ำตาลทั้งหมดและไนโตรเจน

จากวิธีการทดลองในข้อ 5.1 คัดเลือกแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน และข้อ 5.2 ผลของแหล่งไนโตรเจนต่อการผลิตแบคเทอริโอซินมีการนำวัสดุเศษเหลือมาใช้เป็นแทนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเหลว MRS ซึ่งได้แก่ กากน้ำตาลแทนแหล่งคาร์บอน และน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบที่สำคัญในวัสดุเศษเหลือก่อนนำไปศึกษา พบว่าปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในกากน้ำตาลมีประมาณ 956.96 กรัมต่อลิตร และปริมาณไนโตรเจนในน้ำนึ่งปลาทูน่ามีประมาณ 8.5 เปอร์เซนต์ มีวิธีการคำนวณและเปรียบเทียบดังนี้

1. การแทนกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร ในอาหาร MRS ด้วยกากน้ำตาลในปริมาณที่มีน้ำตาลทั้งหมดเท่ากัน

   จากการวิเคราะห์พบว่ากากน้ำตาลมีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 956.96 กรัมต่อลิตร สามารถคำนวณปริมาณกากน้ำตาลที่ต้องใช้ด้วยการเทียบบัญญัติไตรยาง ดังนี้

   มีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 956.96 กรัม จากตัวอย่างกากน้ำตาล 1 ลิตร

   ถ้าต้องการน้ำตาลทั้งหมดประมาณ 20 กรัม จะต้องใช้กากน้ำตาล $\frac{20 \times 1}{956.96} = 0.02$ ลิตร

   ดังนั้นจะต้องใช้กากน้ำตาล 0.02 ลิตร หรือ 20 มิลลิลิตร แทนกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

2. การแทนที่ peptone 10 กรัมต่อลิตร ในอาหาร MRS ด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่า

   จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณไนโตรเจนในน้ำนึ่งปลาทูน่ามีประมาณ 8.50 เปอร์เซนต์ และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเปปโทนมีประมาณ 11.5 เปอร์เซนต์ (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) สามารถคำนวณปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ต้องใช้ด้วยการเทียบบัญญัติไตรยาง ดังนี้

   เปปโทนปริมาณ 100 กรัม มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 11.5 กรัม

   เปปโทนปริมาณ 10 กรัม มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด $\frac{11.5 \times 10}{100} = 1.15$ กรัม

   มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.085 กรัม ในน้ำนึ่งปลาทูน่า 1 กรัม

   ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.15 กรัม ต้องใช้น้ำนึ่งปลาทูน่า $\frac{1.15 \times 1}{0.085} = 13.5$ กรัม

   ดังนั้นจะต้องใช้นึ่งปลาทูน่า 13.5 กรัม แทนเปปโทน 10 กรัมต่อลิตร

3. การแทนที่เนื้อสกัด 10 กรัมต่อลิตร ในอาหาร MRS ด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่า

จากการวิเคราะห์พบว่าปริมาณไนโตรเจนในน้ำนึ่งปลาทูน่ามีประมาณ 8.5 เปอร์เซนต์ และปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดในเนื้อสกัด มีประมาณ 11.0 เปอร์เซนต์ (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India) สามารถคำนวณปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ต้องใช้ด้วยการเทียบบัญญัติไตรยาง ดังนี้

เนื้อสกัดปริมาณ 100 กรัม จะมีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 11กรัม

เนื้อสกัดปริมาณ 10 กรัม มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด $\frac{11 \times 10}{100}$ = 1.1 กรัม

มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 0.085 กรัม ในน้ำนึ่งปลาทูน่า 1 กรัม

ถ้าต้องการปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.10 กรัม ต้องใช้น้ำนึ่งปลาทูน่า $\frac{1.10 \times 1}{0.085}$ = 13 กรัม

ดังนั้นจะต้องใช้นึ่งปลาทูน่า 13 กรัม แทนเนื้อสกัด 10 กรัมต่อลิตร

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ สกุล นางสาวรติยา ก้องก่ำ

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5511020010

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2554

ทุนการศึกษาที่ได้รับในระหว่างการศึกษา

- ทุนอุดหนุนการวิจัยจากโครงการวิจัยภายใต้โครงการมหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ (NRU) ปีการศึกษา 2554
- ทุนบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ปีการศึกษา 2555

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

Kongkum, R. and H-Kittikun, A. 2014. Optimization of bacteriocin production by *Enterococcus faecalis*. The 26th Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology and International Conference. Mae Fah Lunag University, Chiang Rai, Thailand. 26-29 November 2014. P. 202.

Kongkum, R. and H-Kittikun, A. 2015. Optimization of bacteriocin production by *Enterococcus faecalis* TS9S17. In Proceedings of the 5th National and International Graduate Study Conference 2015 “Creative Education: Intellectual Capital toward ASEAN”. Princess Maha Chakri Sirindhon Anthropology Centre, Bangkok, Thailand. 16 July 2015. P. 870-879.