-1614-

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก

Selection of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods

ศิรินาถ หนูเอก

Sirinat Nooek

เลขหมู่ QR121 ศ64 2540 ศ. 2
เลขทะเบียน.....
- 8 ก.ค. 2540
Order Key 12987
BIB Key 240917

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Food Technology

Prince of Songkla University

2540

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก
ผู้เขียน นางสาวศิรินาถ หนูเอก
สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(ดร. สุกัญญา จันทะชุม)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ดวงพร คันธโชติ)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(ดร. สุกัญญา จันทะชุม)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ดวงพร คันธโชติ)

..... กรรมการ
(อาจารย์สุนิสา ศิริพงศ์วุฒิกร)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

.....
(ดร. ไพรัตน์ สงวนไทร)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก
ผู้เขียน นางสาวศิรินาถ หนูเอก
สาขาวิชา เทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2539

บทคัดย่อ

จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักจำนวน 14 ชนิด สามารถแยกแบคทีเรียแลก-ติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด 86 ไอโซเลต พบว่า 5 ไอโซเลต มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (Staphylococcus aureus, Lactobacillus sake, Escherichia coli, Escherichia coli 0157:H7, Lactobacillus plantarum, Listeria monocytogenes 018 และ Carnobacterium sp. M114-25) ได้สูง

เมื่อศึกษาสมบัติด้านสัณฐานวิทยา และชีวเคมี พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 ไอโซเลต คือ Lactobacillus casei ssp. rhamnosus (SN11), Streptococcus sp. (SN61) และ Streptococcus lactis (SN33, SN48, SN62)

ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH เริ่มต้นและเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญ และ สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11, S. lactis SN33, S. lactis SN48, Streptococcus sp. SN61 และ S. lactis SN62 มีการเจริญ และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีเมื่อเลี้ยงใน อาหารเหลว MRS pH เริ่มต้น 5.5 เวลา 18 ชั่วโมง, APT pH เริ่มต้น 6.7 เวลา 12ชั่ว-โมง, MRS pH เริ่มต้น 6.5 เวลา 12 ชั่วโมง, APT pH เริ่มต้น 6.7 เวลา 18 ชั่วโมง และ APT pH เริ่มต้น 6.7 เวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการ เจริญ พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่ทำการทดลองมีการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ ที่อุณหภูมิ 30°ซ และ 35°ซ ยกเว้น S. lactis SN48 มีการเจริญที่อุณหภูมิ 30°ซ สูงกว่าที่อุณหภูมิ 35°ซ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับค่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ(AU/ml.) ของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่

อุณหภูมิ 30°ซ และ 35°ซ มีค่าไม่แตกต่างกันยกเว้น S. lactis SN62 ที่มีค่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่อุณหภูมิ 30°ซ สูงกว่าที่อุณหภูมิ 35°ซ

ผลของอุณหภูมิ pH และเอนไซม์ ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ พบว่า สารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน โดยยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิ 90°ซ นาน 45 นาที ผลของ pH ต่อความคงตัวของสารยับยั้ง พบว่า สารยับยั้งที่สร้างจาก L. casei ssp. rhamnosus SN11, S. lactis SN33, Streptococcus sp. SN61 และ S. lactis SN62 ยังคงมีกิจกรรมที่ pH 5.0 5.5 6.0 และ 7.0 ส่วนสารยับยั้งจาก S. lactis SN48 จะสูญเสียกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของ E. coli ที่ pH 5.0 5.5 6.0 และ 7.0 แต่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ E. coli 0157:H7 ที่ pH 5.0 สำหรับผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ catalase ต่อความคงตัวของสารยับยั้ง พบว่าเอนไซม์ pronase-E proteinase-K trypsin และ α-chymotrypsin สามารถยับยั้งกิจกรรมของ สารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกทั้ง 5 สายพันธุ์ได้ แสดงว่าสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์เป็นสารโปรตีนหรือสารเปปไทด์ และเป็นแบคเทอริโอซิน และ พบว่าเอนไซม์ catalase ทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งลดลงบ้างเล็กน้อย ยกเว้นกิจกรรมของสารยับยั้งจากเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 และ S. lactis SN48 ที่ยังคงมีอยู่เท่าเดิม

แบคทีเรียแลกติกที่สร้างแบคเทอริโอซินทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้น และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารแบคเทอริโอซิน พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูงถึงร้อยละ 89-99 ส่วนการเลี้ยงเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 ร่วมกับเชื้อ S. aureus ในส้มฟัก พบว่าเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 สามารถชลอการเพิ่มจำนวนของเชื้อ S. aureus ได้ในระยะเวลาหมัก 48 ชั่วโมง

Thesis Title	Selection of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods
Author	Miss Sirinat Nooek
Major Program	Food Technology
Academic Year	1996

Abstract

Eighty-six isolates of lactic acid bacteria, which inhibit indicator organisms such as Staphylococcus aureus, Lactobacillus sake, Escherichia coli, Escherichia coli 0157:H7, Lactobacilus plantarum, Listeria monocytogenes 018 and Carnobacterium sp. M114-25, were obtained from fermented food samples. Fourteen of these samples came from vegetables and seventy-two from fermented meat. Of these eighty-six isolates, five isolates exhibited high antibacterial activity and were further investigated.

The morphological and biochemical characteristics of the five selected isolates were examined and identified as Lactobacillus casei ssp. rhamnosus(SN11), Streptococcus sp.(SN61) and Streptococcus lactis (SN33, SN48, SN62)

The effect of media, pH, temperature and time of incubation on growth and antibacterial activity were investigated. MRS broth with a pH 5.5 showed optimal growth and activity after 18 hrs for L. casei ssp. rhamnosus SN11 and at pH 6.5 after 12 hrs for S. lactis SN48. For all other strains, it was the APT medium with pH 6.7, which gave optimal growth and activity after 12 hrs for S. lactis SN33 and SN62. In the case of Sreptococcus sp. SN61, it took 18 hrs under the same conditions to reach optimal results. With the exception of S. lactis SN48, no differences were observed at either 30 or 35°C. Whereas the growth of S. lactis SN48 was higher at 30°C compared to 35°C, the inhibitory effect was the same.

Most of antibacterial substances were heat resistant and tolerated 90°C for 45 minutes. The activities of these antibacterial substances from all strains ranged from pH 5.0 to 7.0 against all indicator organisms. The only exception was S. lactis SN48, which was not able to inhibit E. coli and E. coli 0157:H7 only at a pH of 5.0. All antibacterial substances were sensitive to protease enzymes such as pronase-E, proteinase-K, trypsin and α-chymotrypsin indicating a protein or peptide structure similar to bacteriocin. The antibacterial substances are therefore bacteriocin-like compounds. The addition of catalase to remove possible hydrogen peroxide interference showed only a slight reduction in the overall activity.

The percent inhibition of 5 selected isolates against the indicator organisms in mixed culture under optimum condition were 89-99. However, mixing L. casei ssp. rhamnosus SN11 with S. aureus led to a 92.66% inhibition after 24 hrs and 95.17% after 48 hrs fermentation in the somfax system.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ ดร.สุกัญญา จันทะชุม ประธานกรรมการที่ปรึกษาที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย การค้นคว้าและการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดวงพร คันธโชติ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำวิจัย อาจารย์สุนิสา ศิริพงศ์วุฒิกร กรรมการผู้แทนคณะอุตสาหกรรมเกษตร และรองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนการศึกษาตลอด 2 ปีการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ชาย และญาติๆทุกคน ด้วยความเคารพยิ่ง ที่ให้กำลังใจในการศึกษามาโดยตลอด ขอขอบพระคุณ พี่ๆน้องๆ และเจ้าหน้าที่คณะอุตสาหกรรมเกษตรตลอดจนทุกๆท่าน ที่มิได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

ศิรินาถ หนูเอก

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(10)
รายการภาพประกอบ	(12)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	17
ขอบเขตของการวิจัย	17
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	18
วัสดุ	18
อุปกรณ์	20
วิธีการ	20
3. ผลและวิจารณ์	28
4. สรุป	75
เอกสารอ้างอิง	78
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก. ตารางผลการศึกษาค่าการเจริญ (OD 660nm) และประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ (AU/ml) ของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	88

หน้า

ภาคผนวก ข. อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบเชื้อ และวิธีการทดสอบ 93

ภาคผนวก ค. วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเกลือ 100

ภาคผนวก ง. การเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติก 102

ภาคผนวก จ. การเทียบเคียงสกุล และชนิดของแบคทีเรียแลกติกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 104

ประวัติผู้เขียน 112

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1.	ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักดองผลไม้และผักโดยทั่วไป	3
2.	สรุปอาหารหมักดองทั่วทุกภาคของไทยที่มีแบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้อง	5
3.	ชนิดของแบคทีเรียแลกติกและแบคเทอริโอซินที่ผลิต	8
4.	ข้อมูลเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์อาหารหมักและเชื้อแบค-ทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	29
5.	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟัก	35
6.	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	39
7.	ประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ E. coli O157:H7 และ L. monocytogenes 018	46
8.	ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ต่อมิลลิลิตรของส่วนใส(AU/ml) ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้	47
9.	เปรียบเทียบองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ APT และ MRS broth	50
10.	ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	63
11.	ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ณ เวลาต่างๆ	65

ตารางที่ หน้า

12. ผลของ pH ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 66

13. ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ catalase ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 69

14. ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน 71

15. การเปลี่ยนแปลงจำนวนของเชื้อ S. aureus และ L. casei ssp. rhamnosus SN11 ในระหว่างการหมักส้มฟัก 73

รายการภาพประกอบ

ภาพที่		หน้า
1.	กลไกการทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดย แบคเทอริโอซิน	15
2.	การยับยั้งเชื้อ Lactobacillus plantarum โดย แบคทีเรียที่แยกได้จากปลาหมัก(ส้มฟัก)	33
3.	การยับยั้งเชื้อ Carnobacterium divergens UAL-9 โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากไส้กรอกหมัก	34
4.	การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก ส้มฟัก	36
5.	วงใสของการยับยั้งเชื้อ Lactobacillus sake โดยแบคทีเรีย แลกติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก	45
6.	ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus ต่อ มิลลิลิตรของส่วนใส(AU/ml) โดยเชื้อ Lactobacillus casei ssp. rhamnosus SN11	48
7.	ความสัมพันธุ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน	52
8.	การเจริญของเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS pH 5.5 และประสิทธิภาพการยับยั้ง (AU/ml) เชื้อ S. aureus ที่เวลาต่างๆ	53
9.	ความสัมพันธุ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ S. lactis SN48 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน	54
10.	การเจริญของเชื้อ S. lactis SN48ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS pH 6.5 และประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml) เชื้อ E. coli และ E. coli 0157:H7 ที่เวลาต่างๆ	55

ภาพที่ หน้า

11. ความสัมพันธุ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ S. lactis SN33 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน 56

12. การเจริญของเชื้อ S. lactis SN33 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH 6.7 และประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml) เชื้อ L. sake ที่เวลาต่างๆ 57

13. ความสัมพันธุ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ Streptococcus sp. SN61 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน 58

14. การเจริญของเชื้อ Streptococcus sp. SN61ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH 6.7 และประสิทธิภาพการยับยั้ง (AU/ml) เชื้อ L. plantarum และ L. monocytogenes 018 ที่เวลาต่างๆ 59

15. ความสัมพันธุ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ S. lactis SN62 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน 60

16. การเจริญของเชื้อ S. lactis SN62 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH 6.7 และประสิทธิภาพการยับยั้ง (AU/ml) เชื้อ Carno-bacterium sp. M114-25 ที่เวลาต่างๆ 61

17. จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก และ S. aureus ในส้มฟักที่ระยะการหมักต่างๆ 74

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การหมักดอง เป็นวิธีการถนอมอาหารอย่างหนึ่งซึ่งรู้จักมานานแล้ว และพบว่าการหมักดองจะมีจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้องก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของอาหาร โดยการทำงานของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น นอกจากจะทำให้อาหารมีกลิ่นรสที่ต่างออกไปจากเดิมแล้ว ยังทำให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ทำให้อาหารเสียและเป็นพิษ เราจึงสามารถบริโภคอาหารเหล่านี้ได้อย่างปลอดภัย (วิเชียร วรพุทธพร, 2526)

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา แบคทีเรียที่มีความสำคัญที่สุด คือ แบคทีเรียแลกติก (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) แบคทีเรียแลกติกเข้ามาเกี่ยวข้องกับอาหารหมักของไทยทั่วทุกภาค โดยเฉพาะภาคใต้มีอาหารหมักจากแบคทีเรียแลกติกมากถึงประมาณ 21 ชนิด (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ สำหรับการหมักที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแบคทีเรียแลกติกมีบทบาทสำคัญในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และที่ทำให้อาหารเป็นพิษได้ (Larsen, *et al.*, 1993)

สาเหตุที่มีการใช้แบคทีเรียแลกติกมากที่สุดในอุตสาหกรรมอาหาร ก็เพื่อเป็นการถนอมอาหารจากพืชและสัตว์ที่เน่าเสียได้ง่าย โดยแบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหารให้เป็นกรดแลกติกที่ช่วยในการถนอมอาหาร และสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษ (Brink, *et al.*, 1994) แบคเทอริโอซินเป็นสารโปรตีนโมเลกุลใหญ่สามารถทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็ว แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีสมบัติทางเคมีต่างกัน การเข้ายับยั้งและความสามารถในการทำลายแบคทีเรียก็

จะแตกต่างกันไปด้วย และพบว่าสารแบคเทอริโอซินมีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิดรวมทั้ง Listeria monocytogenes จึงเป็นสารที่น่าสนใจที่จะใช้เป็นสารกันเสียในการถนอมอาหาร (อรวินท์ เลาหรัชตนันท์, 2532) เนื่องจากในปัจจุบันผู้บริโภคมีความต้องการในเรื่องความเป็นธรรมชาติ และปราศจากวัตถุเจือปนที่ได้จากการสังเคราะห์ในผลิตภัณฑ์อาหารเพิ่มขึ้น ดังนั้นการนำสารยับยั้งจากธรรมชาติมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร เพื่อลดหรือนำมาใช้แทนสารเคมี จึงเป็นที่สนใจกันมาก ซึ่งในปัจจุบันไนซิน(nisin) เป็นแบคเทอริโอซินชนิดเดียวที่มีการนำไปประยุกต์ใช้ทางการค้าในอุตสาหกรรมอาหาร (Delves-Broughton, 1990 อ้างโดย Brink, *et, al.,* 1994) ดังนั้น การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก จึงเป็นแนวทางที่น่าสนใจต่อการพัฒนาคุณภาพและความปลอดภัยของอาหารต่อไปในอนาคต

งานวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินสูง จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก โดยมีการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน และศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้ในอาหารต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก และประเภทผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตขึ้น เพื่อวัตถุประสงค์ที่สำคัญ 2 ประการคือ เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ที่ต้องการ และเพื่อถนอมอาหาร โดยอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนวัตถุดิบให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา โดยแบคทีเรียแลกติกจะมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักหลายประเภท เช่นผลิตภัณฑ์นมหมัก เนย ผักดอง ไส้กรอกหมัก อาหารหมักพื้นเมือง เช่น น้ำปลา บูดู ปลาร้า แหนม (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) กล่าวว่า ผลิตภัณฑ์อาหารหมักแบ่งออกเป็น 2 ประเภทคือ

1.1 ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช ได้แก่ กะหล่ำปลีดอง กระเทียมดอง ขิงดอง ก๊ง-ฉ่าย ตังฉ่าย ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง ท้อดอง มะม่วงดอง ซีอิ๊ว และเต้าเจี้ยว เป็นต้น ซึ่งพบว่าในกะหล่ำปลีดองมีแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องได้แก่ Leuconostoc mesenteroides และ Lactobacillus plantarum (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2530) ส่วน ในการหมักซีอิ๊ว มีแบคทีเรียแลกติกที่สำคัญ ได้แก่ Pediococcus halophilus, Pediococcus acidilactici var. soya, Streptococcus faecalis และ Lactobacillus delbrueckii (นภา โล่ห์ทอง, 2531 ; พูนสุข ประเสริฐสรรพ์, 2536) และในบรรดาแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในการหมักซีอิ๊วนั้น พบว่าแบคทีเรียแลกติกมีความสำคัญมาก เพราะขณะบรรจุวัตถุดิบลงบ่อหมักแบคทีเรียแลกติกจะผลิตกรดออกมา ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของวัตถุดิบต่ำลง มีผลให้จุลินทรีย์อื่นๆที่เป็นพิษและก่อให้เกิดการเน่าเสียถูกทำลาย (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2522) ในตารางที่1 แสดงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่พบในการหมักดองผักและผลไม้

ตารางที่1 ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักดองผลไม้และผักโดยทั่วไป

ชนิดของแบคทีเรียแลกติก	ลักษณะการหมัก
Streptococcus faecalis	โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ
Leuconostoc mesenteroides	เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ
Lactobacillus brevis (Lactobacillus pentoaceticus)	เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ
Pediococcus cerevisiae	โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ
Lactobacillus plantarum (Lactobacillus cucumeris)	โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ

ที่มา : ประสิทธิ์ อติวีรกุล (2527)

1.2 ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ ได้แก่ นมหมัก แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว กะปี กุ้งจ่อมหรือกุ้งส้ม กุ้งเจ่า ปลาเจ่า ปลาส้ม ปลาแป้งแดง ปลาร้า และปลาหมัก (ส้มฟัก) เป็นต้น

ผลิตภัณฑ์นมหมัก มีมากมายหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว และเนยแข็งชนิดต่างๆ สำหรับผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวที่นิยมบริโภคในประเทศไทย ได้แก่ ยาคูลท์ และโยเกิร์ต โดยยาคูลท์มีแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้อง คือ Lactobacillus casei shirota ส่วนโยเกิร์ตจะมีเชื้อผสม 2 ชนิด คือ Streptococcus thermophilus และ Lactobacillus bulgaricus (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536 ; ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536 ; ดุษณี ธนะบริพัฒน์, 2537)

ไส้กรอกหมัก พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทสำคัญในระหว่างการหมักไส้กรอกคือ Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis , Lactobacillus fermentum, Lactobacillus spp., Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc mesenteroides ssp. dextranicum และ Micrococcus spp. (พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์, 2538)

แหนม พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่มีประโยชน์ต่อการหมักแหนม คือ Lactobacillus plantarum และ Pediococcus cerevisiae โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถใช้ข้าวเหนียวสุกที่เติมลงไปในแหนมเป็นแหล่งคาร์บอน และพลังงานในการเจริญ และใช้สารประกอบไนโตรเจน อินทรีย์ ไวตามิน และเกลือแร่ที่มีอยู่ในเนื้อหมูเป็นสารช่วยให้เจริญดีขึ้น (วิชาญ อัณประยูร, 2537)

น้ำปลา กะปี ปลาเจ่า ตลอดจนอาหารหมักที่ใช้ปลาเป็นวัตถุดิบอีกหลายชนิด พบว่า มีแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้อง คือ Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Pediococcus halophilus และ Micrococcus sarcina (นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์, 2529 ; อรพิน ภูมิภมร, 2526 ; ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2521) นอกจากนี้ อรพิน ภูมิภมร (2526) พบว่าในบูดูมีแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องที่ทำให้เกิดกลิ่นรสของบูดู คือ Pediococcus halophilus ส่วน ทองคำ คิมหะมานนท์ (2538) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากปลาหมัก คือ Lactobacillus maltaromicus, Lactobacillus alimentarius, Lactobacillus casei, Pediococcus dextrinicus, Pediococcus halophilus และ Pediococcus pentosaceus โดยแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าว

สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร 4 ชนิด คือ Vibrio parahaemolyticus, Salmonella sp., Staphylococcus aureus และ Escherichia coli ในตารางที่ 2 เป็นตัวอย่างอาหารหมักที่พบในภาคต่างๆ ของประเทศไทย

ตารางที่ 2 สรุปอาหารหมักดองทั่วทุกภาคของไทย ที่มีแบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้อง

ภาค	อาหารหมักดอง	
	พืช	สัตว์
ภาคเหนือ	ขนมจีน ใบเมี่ยง ผักดอง และผลไม้ดอง	แหนม ปลาร้า ปลาจ่อม-ปลาส้ม ปลาเจ่า น้ำปลา
ภาคใต้	ขนมจีน ก๊งฉ่าย ซีเช็กฉ่าย ตั้งฉ่าย เกี๋ยมฉ่าย ผักและผลไม้ดอง หัวไชโป๊ ซีอิ๊วและเต้าเจี้ยว	หมูอวน หอยดอง กุ้งจ่อม กุ้งส้ม น้ำบูดู น้ำเคย น้ำปลา ปลาจ่อม-ปลาส้ม ปลาแป้งแดง ไตปลา ปลาแป้งข้าวหมาก ปลาหมั่ม
ภาคตะวันออก	ขนมจีน ก๊งฉ่าย เกี๋ยมฉ่าย ซีเช็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ผักและผลไม้ดอง	หอยดอง ปลาจ่อม-ปลาส้ม น้ำปลา
ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ	ขนมจีน ผักและผลไม้ดอง	ส้มฟัก กุ้งจ่อม-กุ้งส้ม ปลาจ่อม-ปลาส้ม ปลาร้า แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาเจ่า และน้ำปลา
ภาคกลาง	ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว ขนมจีน ก๊งฉ่าย เกี๋ยมฉ่าย ซีเช็กฉ่าย ตั้งฉ่าย	กุ้งเจ่า กุ้งจ่อม-กุ้งส้ม ปลาเจ่า ปลาจ่อม-ปลาส้ม ปลาร้า หอยแดง

ที่มา : วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534)

2. จุลินทรีย์ที่มีบทบาทต่ออาหารหมัก

ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เป็นผลมาจากกิจกรรมของจุลินทรีย์เพียงไม่กี่ชนิดจากจุลินทรีย์จำนวนมากมายที่รู้จักกันในปัจจุบัน ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแลกติกจัดว่ามีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมอาหารหมัก เพราะนอกจากทำให้เกิดการหมักขึ้นได้ แล้วยังสามารถนำมาใช้เพื่อป้องกันการเน่าเสีย และยืดอายุการเก็บอาหารโดยใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำให้เกิดการหมักดองอาหาร เชื้อแบคทีเรียแลกติกจะผลิตสารหลายอย่างเช่น กรดอินทรีย์ ไดอะเซติล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ซึ่งสารบางชนิดมีผลทำให้รสชาติอาหารดีขึ้นและบางชนิดมีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ด้วย แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักจะอยู่ในสกุล Lactococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus และ Carnobacterium โดยเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้แยกได้จากเมล็ดธัญญพืช พืชสีเขียว ผลิตภัณฑ์จากนม ผักดอง และเนื้อสัตว์ (Nettles and Barefoot, 1993)

แบคทีเรียแลกติกมีลักษณะโดยทั่วไปคือ ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมหรือเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในระหว่างการหมักคาร์โบไฮเดรต เมื่อเร็วๆนี้ได้มีการพิจารณากลุ่มของแบคทีเรียแลกติก และมีข้อเสนอว่า แบคทีเรียแลกติกประกอบไปด้วยแบคทีเรียในสกุล Aerococcus, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus และ Vagococcus การจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกในสกุลต่างๆขึ้นอยู่กับ รูปร่างลักษณะ รูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การใช้อะซิเตต การสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีน การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตกรดแลกติก การเจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนกรดหรือด่าง (Axelsson , 1993)

สำหรับกลุ่ม Streptococcus ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมัก คือ Streptococcusกลุ่มที่สร้างกรดแลกติกเท่านั้น ซึ่งต่อมาในปี 1985 ได้เปลี่ยนเป็นสกุล Lactococcus แต่ยังคงชนิด และสับสปีชีส์ไว้ตามเดิม (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

แบคทีเรียแลกติกแบ่งตามลักษณะการใช้อาหาร และสร้างสารได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (Axelsson, 1993 ; Kandler and Weiss, 1986) คือ

1. โฮโมเฟอร์เมนเททีฟแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดแลกติกได้ประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ไม่ต้องการไธอามีนในการเจริญ สร้างเอนไซม์อัลโดเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส ได้แก่ Lactobacillus sake, Lactobacillus acidilactici, Lactobacillus casei, Pediococcus pentosaceus, Pediococcus dextrinicus และ Streptococcus lactis เป็นต้น

2. เฮทเทอร์โรเฟอร์เมนเททีฟแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตกรดแลกติก กรดอะซิติก แอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมักคาร์โบไฮเดรต ต้องการไธอามีนในการเจริญและสร้างเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส แต่ไม่สร้างเอนไซม์อัลโดเลส ได้แก่ Leuconostoc mesenteroides, Lactobacillus brevis, และ Lactobacillus fermentum เป็นต้น

3.แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน คือสารเปปไทด์ (Yang and Ray, 1994) หรือสารประกอบโปรตีน (Brink, *et al.*, 1994 ; Klaenhammer, 1988 ; Parente and Hill, 1992 ; Pilet, *et al.*, 1994 ; Samelis, *et al.*, 1994) ที่สร้างจากแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรีย ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Brink, *et al.*, 1994 ; Parente and Hill., 1992 ; Pilet, *et al.*, 1994 ; Samelis, *et al.*, 1994 ; Giraffa, *et al.*, 1990) หรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน (Barefoot and Klaenhammer, 1983 ; Kawai, *et al.*, 1994 ; Nettles and Barefoot, 1993) และในตารางที่3 แสดงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ตารางที่ 3 ชนิดของแบคทีเรียแลกติกและแบคเทอริโอซินที่ผลิต

แบคทีเรียแลกติก	แบคเทอริโอซิน	เอกสารอ้างอิง
Lactobacillusus acidophilus	lactacin B	Barefoot and Klaenhammer(1983,1984)
Lactobacillus helveticus	helveticin J	Jeorge and Klaenhammer (1986)
Lactobacillus plantarum	plantaricin A	Daeschel, *et al.* (1986)
Lactococcus lactis ssp. lactis	nisin	Hurst (1983) ;
		Tsai and Sandine (1987)
Pediococcus acidilactici	pediocin AcH	Bhunia, *et al.* (1988) ;
		Ray, *et al.* (1989)
Lactobacillus acidophilus M46	acidocin B	Brink, *et al.* (1994)
Enterococcus faecium	enterocin EL1	Lyon, *et al.* (1995)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Schillinger (1990) ; Brink และคณะ(1994) ; Lyon และคณะ(1995)

Voughan และคณะ (1994) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติก ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้เกิดอาหารเป็นพิษจากอาหารหลายชนิด โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ประมาณ 1000 ไอโซเลต ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ Staphylococcus aureus, Listeria innocua, Pseudomonas fragi และ Lactobacillus bulgaricus พบว่าแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ สามารถยับยั้งการเจริญของอินดิเคเตอร์ได้เพียง 1 ชนิด มีจำนวนน้อยที่จะยับยั้งการเจริญของอินดิเคเตอร์ได้ 2 หรือ 3 ชนิด นอกจากนี้ Mathieu และคณะ (1993) ทำการแยกเชื้อ Leuconostoc spp. ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจำนวน 165 ไอโซเลต พบว่ามีเพียง 1 ไอโซเลต คือ Leuconostoc mesenteroides FR52 ซึ่งแยกได้จากนมดิบ สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซิน เรียกว่า mesenterocin 52 โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ Leuconostoc spp. บางสายพันธุ์ Enterococcus spp. และ Listeria spp. อีกหลายสายพันธุ์ นอกจากนี้ พบว่า mesenterocin 52 มีความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเมื่อทดสอบความคงตัวของ mesenterocin 52 หลังจาก

ให้ความร้อน พบว่าจะมีความเสถียรที่ pH 7.0 หลังจากให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที แต่หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง จะมีความเสถียรที่ pH 4.5 มากกว่าที่ pH 7.0

Larsen และคณะ (1993) ทำการคัดเลือกเชื้อ Lactobacillus bavaricus MI401 จากแป้งหมัก(Sour dough) เพื่อศึกษาถึงคุณสมบัติของสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ พบว่าสารนั้นเป็นสารประกอบโปรตีนที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใกล้เคียงกันได้ นอกจากนี้ยังทนต่อความร้อน แต่ไวต่อ pH ที่เป็นด่าง ซึ่งบ่งชี้ได้ว่า สารประกอบโปรตีนนี้เป็นสารแบคเทอริโอซิน และตั้งชื่อว่า bavaricin A นอกจากนี้ Samelis และคณะ (1994) ได้ทำการแยกเชื้อ Lactobacillus sake 251 จากไส้กรอกหมักแห้งของกรีก และเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS พบว่าสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน ชื่อ sakacin B ซึ่งจะถูกสร้างมากในช่วงปลายของระยะ log phase มีความเสถียรในช่วง pH 2-9 และทนต่อความร้อน

Brink และคณะ (1994) ทำการแยกเชื้อ Lactobacillus จาก แตงกวาดอง, เนยแข็ง, ไส้กรอกหมัก, หญ้าหมัก, ช่องปาก และทางเดินอาหารของมนุษย์ ได้ 1,000 ไอโซเลต และศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น พบว่ามีเพียง 8 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น และได้คัดเลือก Lactobacillus salivarius M7 และ Lactobacillus acidophilus M46 มาศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า Lactobacillus salivarius M7 สร้าง salivaricin B ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Brochothrix thermosphacta, Enterococcus faecalis, และ Lactobacilli อีกหลายชนิดได้ ส่วนเชื้อ Lactobacillus acidophilus M46 สร้าง acidocin B ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ Clostridium sporogenes ได้ โดย acidocin B จะไวต่อเอนไซม์ทริปซิน และมีความคงทนต่ออุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

Pilet และคณะ (1994) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติก จากผลิตภัณฑ์ประมง เพื่อหาเชื้อที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน พบว่ามี 22 ไอโซเลตที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน โดยจากการเทียบเคียง พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Carnobacteria, Lactococci และ Enterococci ซึ่งจากการศึกษาต่อมาพบว่า Carnobacteria V1 และ V41 คือ เชื้อ

Carnobacterium piscicola และ Carnobacterium divergens ตามลำดับ และให้ชื่อแบค-เทอริโอซินจากแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดนี้ว่า piscicocin V1 และ divercin V41

4. ประสิทธิภาพของสารแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น

Hanlin และคณะ (1993) ศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายสายพันธุ์ รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ โดยใช้สารแบคเทอริโอซิน 2 ชนิด คือ pediocin AcH และ nisin ซึ่งทำการศึกษาทั้งการใช้ชนิดเดียว และ 2 ชนิดร่วมกัน พบว่าการใช้สารแบคเทอริโอซิน 2 ชนิดร่วมกัน มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากกว่าการใช้เพียงชนิดเดียว จึงเป็นไปได้ว่าน่าจะมีการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกัน เพื่อสามารถป้องกันการเน่าเสียของอาหารโดยธรรมชาติให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

Berry และคณะ (1991) ทดลองเติมเชื้อแบคทีเรียแลกติก Pediococcus acidilactici สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน จำนวน 10^7 CFU/g ร่วมกับเชื้อ Listeria monocytogenes 10^4 CFU/g ในไส้กรอกเยอรมันที่เก็บในสภาวะสุญญากาศที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ Pediococcus acidilactici สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Listeria monocytogenes ให้อยู่ในระดับต่ำกว่าที่จะทำให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค (10^6 CFU/g) ได้มากกว่า 60 วัน ในขณะที่ไม่มีการเติม Pediococcus acidilactici เชื้อ Listeria monocytogenes จะเพิ่มจาก 10^4 CFU/g เป็น 10^6 CFU/g ในเวลา 60 วัน

Stevens และคณะ (1992) ศึกษาวิธีการใช้ nisin และ chelating agent ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ Salmonella spp. และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ โดยปัจจัยที่นำมาศึกษาคือ ชนิดของ chelating agent, ความเข้มข้นของ nisin, อุณหภูมิในการบ่มเชื้อ และผลกระทบของ bovine serum albumin พบว่า การใช้ nisin 50-100 μg/ml ผสมกับ EDTA หรือ citric acid monohydrate 20 mM. ที่อุณหภูมิ 30-42 องศาเซลเซียส ให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งสูงสุด ส่วนการเติม bovine serum albumin ในสภาวะที่มี nisin และ EDTA จะไม่ลดประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ

Cutter และ Siragusa (1995) พบว่าการใช้ nisin ร่วมกับ chelating agents (EDTA, EGTA, citrate และ phosphate) ในหลอดทดลอง (in vitro) ทำให้ nisin มีประสิทธิภาพในการลดจำนวนของแบคทีเรียแกรมลบ Salmonella typhimurium และ E. coli 0157:H7 ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

Okereke และ Montville (1991) ทดสอบการยับยั้งการเจริญของ Clostridium botulinum 11 สายพันธุ์ โดยสารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติก 23 สายพันธุ์ พบว่า Pediococcus pentosaceus ATCC 43200, Pediococcus pentosaceus ATCC 43201, Lactobacillus lactis ssp. lactis ATCC 11454, Lactobacillus acidophilus N2, Lactobacillus plantarum Lb 592 และ Lactobacillus plantarum BN สามารถยับยั้ง Clostridium botulinum ทั้ง 11 สายพันธุ์ นอกจากนี้ ยังพบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก Pediococcus pentosaceus ATCC 43200 สามารถยับยั้งการเจริญของ Clostridium botulinum ได้มากที่สุด

Parente และ Hill (1992) ทดสอบประสิทธิภาพของ enterocin 1146 ซึ่งสร้างจากเชื้อ Enterococcus faecium DPC 1146 พบว่า enterocin 1146 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Listeria monocytogenes และ Listeria innocua ได้ดี นอกจากนี้ยังสามารถเก็บรักษา enterocin 1146 ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส โดยไม่สูญเสียกิจกรรม แต่ pH จะมีผลต่อกิจกรรมของ enterocin 1146โดยที่ enterocin 1146 จะมีความเสถียรทั้งที่อุณหภูมิสูง (120 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิต่ำ (4 องศาเซลเซียส) ที่ pH 5 มากกว่าที่ pH 7 เช่นเดียวกันกับ Pucci และคณะ (1988) ที่พบว่าสารแบคเทอริโอซิน PA-1 จากแบคทีเรียแลกติก Pediococcus acidilactici PAC 1.0 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Listeria monocytogenes ได้ และแบคเทอริโอซิน PA-1 ในรูปที่เป็นผงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ Listeria monocytogenes ได้ในช่วง pH 5.5-7.0 ที่อุณหภูมิ 4 และ 32 องศาเซลเซียส

5.ปัจจัยที่มีผลต่อปริมาณการผลิตและกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซิน

5.1 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Geis และคณะ (1983) ได้ทำการเปรียบเทียบการผลิตสารแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิด คือ Lactic broth, M17, BHI medium, Synthetic medium และ Litmus milk ในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย Lactococcus 15 สายพันธุ์ ที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ 5 ชนิดที่ทดสอบ มีผลต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกัน เช่นเดียวกับ Hsieh และคณะ (1996) ที่ได้ศึกษาการสร้างสารแบคเทอริโอซิน propionicin PLG-1 จาก Propionibacterium thoenii ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 6 ชนิด คือ beet molasses ร้อยละ 12.5, corn steep liquor ร้อยละ9, ส่วนผสมของ beet molasses และ corn steep liquor ในอัตราส่วน1:3, 1:1 และ 3:1 และในอาหารเลี้ยงเชื้อ sodium lactate broth พบว่าเชื้อ Propionibacterium thoenii สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินได้สูงสุดในอาหารที่เป็นส่วนผสมของ beet molasses และ corn steep liquor ในอัตราส่วน 3:1 นอกจากนี้ Jimenez-Diaz และคณะ (1993) รายงานว่า plantaricin S ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินจาก Lactobacillus plantarum LPCO10 ที่แยกได้จากมะกอกเขียวหมัก ผลิตได้มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ผสมด้วย NaCl ร้อยละ 4 และจากการทดลองของ Kawai และคณะ(1994) ก็พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ modified MRS broth (DO-MRS) ซึ่งมีการใช้กรดโอเลอิกแทน Tween 80 มีการสร้างสารแบคเทอริโอซินน้อยกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ถึง 2 เท่า

5.2 ระยะการเจริญ

ปริมาณของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรีย ขึ้นอยู่กับระยะการเจริญ โดยพบว่า helveticin J (Joerge and Klaenhammer, 1986) sakacin B (Samelis, *et al.*, 1994) plantaricin S (Jimenez-Diaz, *et al.*, 1993) ถูกผลิตได้มากที่สุดในช่วงกลางหรือปลายของระยะ log phase ของการเจริญ หลังจากระยะนี้แล้วการผลิตก็จะลดลง ส่วนปริมาณของ lactacin B (Barefoot and Klaenhammer, 1983)และ gassericin A (Kawai, *et al.*, 1994) ผลิตได้มากที่สุดในช่วงต้นของระยะ stationary phase สำหรับการสูญเสียกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินที่เกิดขึ้นเมื่อมีการเพาะเลี้ยงไว้เป็นเวลานาน อาจเนื่องมาจากเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งผลิตได้เองจากแบคทีเรียแลกติก และอีกสาเหตุ

อาจเนื่องมาจากการที่สารแบคเทอริโอซินบางชนิดไม่มีความเสถียรภายใต้สภาวะที่ pH ต่ำ ซึ่งจะเกิดขึ้นได้ในช่วงปลายการเจริญ (Schillinger, 1990)

5.3 ความเป็นกรด-ด่าง

Barefoot และ Klaenhammer (1984) ได้ศึกษาผลของ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการผลิต และความเสถียรของสารแบคเทอริโอซิน พบว่า Lactobacillus acidophilus N2 สามารถผลิต lactacin B ได้มากขึ้นเมื่อมีการเพิ่ม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 5.9 เป็น 7.0 และการผลิตลดลงเมื่อ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำกว่า 5.9 ตรงกันข้ามกับการทดลองของ Joerge และ Klaenhammer (1986) ซึ่งพบว่าการผลิต helveticin J โดยเชื้อ Lactobacillus helveticus 481 จะมีมากที่สุดที่ pH 5.5 นอกจากนี้ Parente และ Hill (1992) พบว่า enterocin 1146 จากเชื้อ Enterococcus faecium DPC 1146 มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส และ 40 องศาเซลเซียส ที่ pH 5 มากกว่าที่ pH 7 และ lactacin F จากเชื้อ Lactobacillus acidophilus 88 ผลิตได้มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ pH 7.0 (Muriana and Klaenhammer, 1987)

6. สมบัติของสารแบคเทอริโอซิน

6.1 ความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

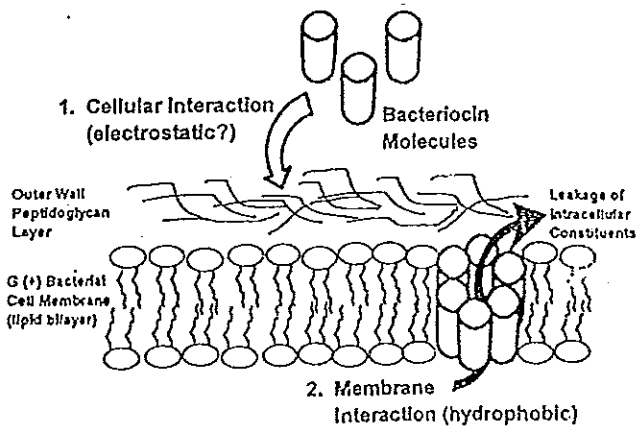
สารแบคเทอริโอซินหลายชนิด ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น pepsin, trypsin และ pronase ยกเว้น nisin จะไม่ถูกยับยั้งกิจกรรมจากเอนไซม์เหล่านี้ แต่ nisin ถูกยับยั้งกิจกรรมได้ด้วยเอนไซม์ ∝-chymotrypsin (Jarvis and Mahoney, 1969) ส่วน enterocin CRL35, enterocin CRL268 และ enterocin 291 ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ ∝-chymotrypsin, pronase E และ protease type IV แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์ trypsin ในขณะที่ enterocin CRL504 ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ ∝-chymotrypsin, pronase E, protease type IV และ trypsin (Farias, *et al.*, 1994) นอกจากนี้ Mathieu และคณะ (1993) พบว่า mesenterocin 52 ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ ∝-chymotrypsin, trypsin, pronase E, proteinase K และ pepsin

6.2 ความสามารถทนต่อความร้อน

สารแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ จะไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน เช่น bavaricin A ยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 60 นาที (Larsen, *et al.*, 1993) เช่นเดียวกันกับ sakacin B (Samelis, *et al.*, 1994) อย่างไรก็ตาม พบว่า helveticin J มีกิจกรรมลดลงที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 30 นาที (Joerger and Klaenhammer,1986) ส่วน mesenterocin 52 มีกิจกรรมเหลืออยู่ ร้อยละ80 ร้อยละ 50 และ ร้อยละ20 ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 15 นาที และ 60 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที ตามลำดับ (Mathieu, *et al.*, 1993) นอกจากนี้ Schillinger (1990) ได้รายงานว่า การที่สารแบคเทอริโอซินถูกทำลายด้วยความร้อน ขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ และปัจจัยอื่น เช่น pH หรือ ionic strength ซึ่งจากการทดลองของ Davey และ Richardson (1981) พบว่าการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส 1 นาที ส่งผลให้ diplococcin ที่บริสุทธิ์สูญเสียกิจกรรมไปร้อยละ 75 ในขณะที่ diplococcin ที่บริสุทธิ์บางส่วนจะทนต่อความร้อนที่ pH ต่ำ แต่มีความเสถียรต่อความร้อนลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น

7.กลไกการทำปฏิกริยา

Hoover (1993) ได้รายงานว่า การทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดย nisin เกิดขึ้นได้โดยมีการดูดซับ(adsorption) nisin ไปยัง cell envelope ซึ่งจะเป็นขั้นตอนแรกในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์(cell membrane) ตามด้วยการทำลายกิจกรรม(inactivation) ของ sulfhydryl groups และจากรายงานของ Muriana (1996) พบว่าโมเลกุลของสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีโครงสร้างแบบ α -helical หรือ β -sheet จะไป form poration complexes ในเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการฉีกขาด และเซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ มีผลให้เซลล์แบคทีเรียที่ไวต่อแบคเทอริโอซินถูกทำลายได้ และในภาพที่ 1 แสดงถึงกลไกการทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคเทอริโอซิน



ภาพที่ 1. กลไกการทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคเทอริโอซิน
ที่มา : Muriana (1996)

8.การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอาหาร

ในปี ค.ศ. 1986 Brewing Research Foundation ในประเทศอังกฤษได้รายงานเกี่ยวกับการใช้ nisin ในโรงงานผลิตเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ว่า สามารถป้องกันการปนเปื้อนของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก และใช้ในการล้างเซลล์ยีสต์ที่ใช้แล้ว เพื่อนำกลับมาใช้ได้อีก (cell recycle) โดยที่ไม่ได้ทำลายคุณสมบัติของยีสต์ (ไปรมา ยงมานิตชัย, 2531)

การนำสารแบคเทอริโอซินไปใช้ในเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ จากการทดลองของ Nielsen และคณะ (1990) พบว่าเชื้อ Pediococcus acidilactici สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน สามารถยับยั้งการเจริญของ Listeria monocytogenes ในเนื้อสดที่เก็บในตู้เย็นได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ El-Khateib และคณะ (1993) ที่พบว่า nisin และ Pediocin PO สามารถลดจำนวนของเชื้อ Listeria monocytogenes ในกล้ามเนื้อวัวได้ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง แต่ความสามารถในการยับยั้งต้องขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินด้วย กล่าวคือ ถ้าแบคเทอริโอซินมีความเข้มข้นสูงก็จะยับยั้งเชื้อ Listeria monocytogenes ได้มากด้วย และจากรายงานของ Mcmullen

และ Stiles (1996) ได้มีการเสนอว่า การนำแบคเทอริโอซิน หรือ นำแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินไปใช้ในอาหาร ควรมีการศึกษาถึงสภาวะ และชนิดของแบคเทอริโอซินที่จะนำไปใช้ด้วย เพราะแบคเทอริโอซินบางชนิด เช่น pediocin AcH/PA-1 ที่ใช้ในเนื้ออกไก่ที่เก็บที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วันจะสูญเสียกิจกรรมถึงร้อยละ 98 ในขณะที่แบคเทอริโอซินจาก Pediococcus acidilactici ที่ใช้ในเนื้อที่เก็บที่ 5 องศาเซลเซียส ยังคงมีกิจกรรมอยู่ถึง 28 วัน

สำหรับการนำแบคเทอริโอซินไปใช้ใน นมและผลิตภัณฑ์นม Giraffa และคณะ (1994) ได้รายงานว่าการใช้เชื้อเริ่มต้น Streptococcus thermophilus และ Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus หรือใช้เชื้อ Enterococcus faecium 7C5 สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินในนมเพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Listeria innocua แต่ถ้ามีการใช้เชื้อเริ่มต้นร่วมกับเชื้อ Enterococcus faecium 7C5 จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Listeria innocua ได้อย่างสมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากการเสริมฤทธิ์ (synergistic) กันของ แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้น และ pH ที่ลดลง นอกจากนี้ Dean และ Zottola (1996) ได้ทดลองใช้ nisin เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ Listeria monocytogenes V7 ในไอศครีม full fat (ไขมันร้อยละ 10) และ reduced fat (ไขมันร้อยละ 3) ที่เก็บที่อุณหภูมิ -18 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าในไอศครีม full fat จำนวน Listeria monocytogenes V7 จะลดลง ส่วนในไอศครีม reduced fat ตรวจไม่พบเชื้อ Listeria monocytogenes V7 เลย

วัตถุประสงค์

1. คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก
2. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้
3. ศึกษาสมบัติบางประการของสารแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืชและสัตว์ เพื่อคัดเลือกเชื้อสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินดีที่สุด ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต สมบัติบางประการและประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักได้แก่ ผักกาดดอง กะหล่ำปลีดอง สะตอดอง ผักเสี้ยนดอง ถั่วงอกดอง ผักเสี้ยนและถั่วงอกดอง ส้มฟัก กุ้งส้ม ปลาเปรี้ยว ปลาแป้งแดง แหนม ไส้กรอกหมัก นมเปรี้ยว และ โยเกิร์ต เป็นต้น

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน (Indicator organisms)

2.1 Vibrio parahaemolyticus จากหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

2.2 Staphylococcus aureus จากหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

2.3 Escherichia coli จากหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

2.4 Escherichia coli 0157:H7

2.5 Salmonella sp. จากหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

2.6 Proteus sp. จากหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

2.7 Micrococcus sp. จากหน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม.สงขลานครินทร์

2.8 Botrytis thermosphacta ATCC 11309

2.9 Carnobacterium piscicola A1147-43

2.10 Carnobacterium divergens UAL9

2.11 Lactobacillus sake

2.12 Lactobacillus plantarum จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ คณะอุตสาหกรรม-เกษตร ม. สงขลานครินทร์

2.13 Listeria monocytogenes 018

2.14 Carnobacterium sp. M114-25

2.15 Leuconostoc sp.

3. วัสดุและอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยาประกอบด้วย

3.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (บริษัท Difco)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ BHI (บริษัท Difco)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ M17

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ APT (บริษัท Difco)

3.1.5 อาหารเลี้ยงเชื้อ TSB

3.1.6 อาหารเลี้ยงเชื้อ LPM (บริษัท Difco)

3.1.7 อาหารเลี้ยงเชื้อ MSA (บริษัท Difco)

3.1.8 อาหารเลี้ยงเชื้อ Macconkey (บริษัท Difco)

3.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมี เพื่อการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติก

3.2.1 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณสมบัติทางกายภาพ ได้แก่ สีย้อมแกรม

3.2.2 สารเคมีสำหรับวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมี

3.2.2.1 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 3

3.2.2.2 สารละลายเนสเลอร์รีเอเจนต์

3.2.2.3 สารคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ arabinose cellobiose fructose galactose glucose inulin lactose maltose mannitol mannose melibiose melizitose rhamnose ribose sorbitol sucrose trehalose xylose

Central Library
Prince of Songkla University

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ประกอบด้วย
   1.1 เครื่องชั่ง
   1.2 ตู้ปลอดเชื้อ(Larminar air flow cabinet)
   1.3 Vortex mixer รุ่น 1297 บริษัท Lab-Line Instruments
   1.4 Autoclave รุ่น SS-320 บริษัท Tomy
   1.5 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus Optical Co., Ltd.
   1.6 ตู้บ่มเชื้อ Type B50 บริษัท Memmert Co., Ltd.
   1.7 เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ รุ่น U-2000 บริษัท Hitachi Koki Co., Ltd.
   1.8 เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ H-103N SERIES บริษัท Kokusan.
   1.9 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น 320 บริษัท Mettler Teledo, CO.,Ltd.
   1.10 อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ(loop และ needle)
   1.11 ไมโครปิเปต ขนาด 100 μl ยี่ห้อ Rainin
   1.12 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ(water bath)
   1.13 ตู้อบอากาศร้อน(Hot air oven) Model 350 บริษัท Memmert
2. เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
3. อุปกรณ์อื่นๆ
   3.1 ตู้เก็บเชื้อ อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

วิธีการ

วิธีการในการวิจัยประกอบด้วย 7 ขั้นตอน คือ

1. การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น และการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (Indicator organisms) จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก
2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟัก

3. การเทียบเคียงและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูง
4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้
5. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้
6. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน
7. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ S. aureus โดยแบคทีเรียแลกติก L. caesi ssp. rhamnosus SN11 ในส้มฟัก

1. การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น และการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้แก่ กุ้งส้ม ปลาเปรี้ยว ปลาแป้งแดง ไส้กรอกหมัก นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผักเสี้ยนและถั่วงอกดอง ถั่วงอกดอง ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง สะตอดอง จากตลาด อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และส้มฟัก แหนม กะหล่ำปลีดอง จากการเตรียมตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักในห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์ นำตัวอย่างอาหารหมักมาวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง โดยใช้ พีเอชมิเตอร์ และหาปริมาณเกลือ(% NaCl)ตามวิธีการ A.O.A.C. (1980 อ้างโดย NG. M. C., 1987) โดยไตเตรทกับสารละลาย $AgNO_3$ 0.1 นอร์มอล

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยทำการเจือจางตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เพื่อให้มีจำนวนเชื้อประมาณ 50 CFU/g ด้วยสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 และ peptone ร้อยละ 0.1 แล้วทำการ spread บนอาหาร MRS และ PCA นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (ประมาณ 30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเททับหน้าด้วยอาหารวุ้น soft agar (มี agar ร้อยละ 0.75) ที่

เพาะเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่จะทดสอบประมาณ 10^4 -10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่มีวงใสของการยับยั้ง แล้วนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ได้ ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ เก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ 4 องศาเซลเซียส โดยวิธี stab ทำการถ่ายเชื้อทุกๆ 2 สัปดาห์ (ดัดแปลงจาก Pilet, *et al.*, 1994)

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟัก

การเตรียมวัตถุดิบ นำปลาสากมาผ่าเอาก้างออก และขูดเอาเฉพาะส่วนเนื้อบรรจุถุงพลาสติก เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์

การหมัก นำเนื้อปลาผสมกับเครื่องปรุงในอัตราส่วน เนื้อปลา 100 กรัม ข้าวเจ้าสุก 15 กรัม กระเทียม 10 กรัม เกลือ 3 กรัม และพริกไทย 0.5 กรัม (ทองคำ คิมหะมานนท์, 2538) ผสมและนวดให้เป็นเนื้อเดียวกัน เป็นเวลา 45 นาที ด้วยเครื่องปั่นผสม แล้วแยกบรรจุลงในถุงพลาสติกถุงละ 100 กรัม มัดถุงให้สนิท เก็บในภาชนะที่มิดชิด บ่มที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างด้วยวิธีปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ระหว่างการหมักปลา โดยเก็บตัวอย่างส้มฟักที่เตรียมได้ที่เวลา 0 6 12 24 36 48 60 และ 72 ชั่วโมง ครั้งละ 10 กรัม เจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมด้วยสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 และ peptone ร้อยละ 0.1 แล้วทำการ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิด ได้แก่ PCA และ MRS เพื่อหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรียแลกติก บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจนับจุลินทรีย์ และทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ตามวิธีในข้อ 1.

3. การเทียบเคียงและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูง

ทำการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติก ที่คัดเลือกได้ ทางกายภาพ และทางชีวเคมีตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 (Kandler and

Weiss, 1986) และใช้แผนภูมิการจำแนกซึ่งดัดแปลงจาก Schillinger และ Lucke (1989) ดังแสดงในภาคผนวก จ

เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดย นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 1 และ 2 จำนวน 2 loop เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงถ่ายโอนเชื้อปริมาตรร้อยละ 3 ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง นำเซลล์แบคทีเรียปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเททับด้วย soft agar ที่เติมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ประมาณ 10^4 -10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งดีที่สุด 5 สายพันธุ์ โดยการคัดเลือกจะเปรียบเทียบความกว้างของวงใส และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ได้หลายชนิด

นำเชื้อที่คัดเลือกได้ ไปวัดประสิทธิภาพการยับยั้งต่อมิลลิลิตรของส่วนใส เป็นหน่วย Arbitary Unit (AU/ml.) โดยเท soft agar ที่เติมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดประมาณ 10^4 -10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร บนอาหาร MRS เป่าให้แห้ง 1 ชั่วโมงในตู้ปลอดเชื้อ(Larminar air flow carbinet) ทำการเหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 30 นาที และกรองส่วนใสผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นหยดส่วนใสซึ่งนำไปเจือจางด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วที่ระดับความเจือจาง 0, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 เท่า (A) ปริมาตร 20 μl (B_1) ลงบนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ L. sake, L. plantarum, L. monocytogenes 018 และ Carnobacterium sp.M114-25 เรียกวิธีการนี้ว่า Spot on lawn method สำหรับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ S. aureus, E. coli และ E. coli 0157:H7 จะใช้วิธี Agar well diffusion method โดยใช้ส่วนใสที่ปรับระดับความเจือจางต่างๆแล้วปริมาตร 200 μl (B_2) หยดในหลุมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร ปริมาตรวุ้น 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง นำค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ทำให้เกิดวงใสของการยับยั้ง คูณกับ 1,000 μl หารด้วยปริมาตรส่วนใสที่หยด (ดัดแปลงจาก Parente and Hill, 1992)

$$\text{ประสิทธิภาพการยับยั้ง (AU/ml)} = \frac{1000\ \mu l \times A}{B_1 \text{ หรือ } B_2\ \mu l}$$

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

4.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ และเทียบเคียงชนิดของเชื้อแล้ว ตามวิธีการในข้อ 3 หลังจากนั้นถ่ายโอนเชื้อปริมาตรร้อยละ 3 ลงในอาหารเหลว MRS, BHI, M17 และ APT ที่ pH 5.0, pH 5.5 และ pH ปกติ ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมได้ บ่มที่อุณหภูมิห้อง ศึกษาการเจริญโดยวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบที่เวลา 0 1 2 3 4 8 12 18 24 36 และ 48 ชั่วโมงของการบ่มเชื้อ แล้วนำตัวอย่างมาเหวี่ยงแยกเซลล์ เพื่อนำส่วนใสไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ตามวิธีในข้อ 3

4.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก และเทียบเคียงชนิดของเชื้อแล้ว ตามวิธีการในข้อ 3 หลังจากนั้นถ่ายโอนเชื้อปริมาตรร้อยละ 3 ลงในอาหารเหลว ที่มี pH เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 บ่มที่ อุณหภูมิ 30 และ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลาซึ่งเชื้อที่คัดเลือกได้มีการเจริญ และสร้างสารยับยั้งได้ดีที่สุดจากข้อมูลในข้อ 4.1 นำมาวัดการเจริญ โดยวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร แล้วนำตัวอย่างมาเหวี่ยงแยกเซลล์ เพื่อนำส่วนใสไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย ที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ตามวิธีในข้อ 3

๕. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากแบคทีเรียแลก-ติกที่คัดเลือกได้

เตรียมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก และเทียบเคียงชนิดของเชื้อแล้ว ตามวิธีการในข้อ 3 หลังจากนั้นถ่ายโอนเชื้อปริมาตรร้อยละ 3 ลงในอาหารเหลวที่มี pH เริ่มต้นเหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ บ่มที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งที่คัดเลือกได้จากข้อ 4 เหวี่ยงแยกเซลล์แบคทีเรีย ด้วยความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสไปทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองขนาด 0.45 μm หลังจากนั้นแบ่งส่วนใสที่ได้เป็น 3 ส่วน เพื่อศึกษาในข้อต่อไป คือ

5.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

นำส่วนใสส่วนที่หนึ่งไปให้ความร้อนที่ 70 80 90 องศาเซลเซียส เวลา 30 45 และ 60 นาที 100 องศาเซลเซียส เวลา 30 และ 60 นาที และที่ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที(ดัดแปลงจาก Mathieu, *et al.*, 1993)นำส่วนใสหลังการให้ความร้อนมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ตามวิธีการในข้อ 3 และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ส่วนใสที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนในการทดสอบ

5.2 ผลของ pH ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

นำส่วนใสส่วนที่ 2 มาปรับ pH ให้ได้ 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0 ด้วย NaOH หรือ HCl ความเข้มข้น 1 โมล/ลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Samelis, *et al.*,1994) นำส่วนใสหลังการปรับ pH มาทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ตามวิธีการในข้อ 3 และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้บัฟเฟอร์ที่ปรับ pH เป็น 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0 โดยไม่มีส่วนใส และใช้ส่วนใสที่ไม่มีการปรับ pH ในการทดสอบ

5.3 ผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

นำส่วนใสส่วนที่ 3 ผสมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน pronase E ใน Tris-HCl 20 mM. pH 7, proteinase K ใน Tris-HCl 20 mM. pH 7.6, trypsin ใน sodium phosphate 20 mM. pH 8.2, α-chymotrypsin ใน Tris-HCl 20 mM. pH 8 , pepsin ใน citrate buffer pH 3 และเอนไซม์ catalase ใน$(NH_4)_2SO_4$ 2.7 M. pH 6.5 โดยให้ความ

เข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 45 นาที ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส(ดัดแปลงจาก Pilet *et al.*, 1994) นำส่วนใสหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ ตามวิธีการในข้อ 3 และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ บัฟเฟอร์ เอนไซม์ในบัฟเฟอร์ที่ไม่มีส่วนใส และใช้เฉพาะส่วนใสในการทดสอบ

6. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมี pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยให้มีปริมาณเริ่มต้นประมาณ 10^7 CFU/ml และเติมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในปริมาณเริ่มต้น 10^5-10^6 CFU/ml บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ และเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารแบคเทอริโอซิน ทำการนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่รอดชีวิตบนอาหารแข็ง selective medium คือ MSA, LPM และ Macconkey สำหรับเชื้อ S. aureus, L. monocytogenes และ E. coli ตามลำดับ สำหรับแบคทีเรียแลกติกที่สร้างแบคเทอริโอซิน ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เป็นแบคทีเรียแลกติก ตรวจนับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่รอดชีวิตบนอาหารแข็ง โดยการย้อมสีแกรมดูรูปร่างที่แตกต่างกัน (ดัดแปลงจาก Gonzalez, *et al.*, 1993) เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งทำการทดลองโดยโดยเลี้ยงแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในอาหารเหลวที่ไม่มีแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินสูง

การคำนวณค่าร้อยละการยับยั้ง

$$\% \text{ inhibition} = 100 \times \frac{(\text{CFU/ml in control}) - (\text{CFU/ml in associative culture})}{(\text{CFU/ml in control})}$$

7. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ S. aureus โดยแบคทีเรียแลกติก L. casei ssp. rhamnosus SN11 ในส้มฟัก

เตรียมส้มฟักตามวิธีการในข้อ 3 แบ่งส้มฟักเป็น 3 ชุดทดลอง คือ ชุดทดลองที่หมักส้มฟักตามธรรมชาติ(ชุดควบคุม) ชุดทดลองที่เติมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ S. aureus 10^3 CFU/g และชุดทดลองที่เติมแบคทีเรียแลกติก L. casei ssp. rhamnosus

SN11 10^6 CFU/g ร่วมกับ S. aureus 10^3 CFU/g บ่มส้มฟักทั้ง 3 ชุดทดลองที่อุณหภูมิห้อง และเก็บตัวอย่างด้วยวิธีปลอดเชื้อ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลินทรีย์ระหว่างการหมักส้มฟัก โดยเก็บตัวอย่างส้มฟักที่เวลา 0 6 12 24 และ 48 ชั่วโมง ครั้งละ 10 กรัม เจือจางตัวอย่างให้เหมาะสมด้วยสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 และ peptone ร้อยละ 0.1 ทำการ spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 2 ชนิดได้แก่ MRS และ MSA เพื่อตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก และจำนวนเชื้อ S. aureus คำนวณค่าร้อยละการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ตามสูตรในข้อ 6

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

1. การวิเคราะห์ข้อมูลเบื้องต้น และการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่นำมาคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติก ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีทั้งหมด 14 ชนิด คือ ส้มฟัก แหนม และกะหล่ำปลีดองเตรียมได้จากห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ กุ้งส้ม ไส้กรอกหมัก สะตอดอง ผักเสี้ยนและถั่วงอกดอง ผักกาดดอง ถั่วงอกดอง ผักเสี้ยนดอง ปลาเปรี้ยว ปลาแป้งแดง นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต เก็บตัวอย่างจากตลาดอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา นำตัวอย่างอาหารหมักมาวัดค่า pH และ ปริมาณ NaCl ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4 และพบว่าผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่เก็บจากแหล่งต่างๆจำนวน 14 ชนิด สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด 86 ไอโซเลต โดยแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืชจำนวน 14 ไอโซเลต และเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ จำนวน 72 ไอโซเลต (ตารางที่ 4)

การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียแลกติก ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ พบในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 10 ชนิด ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 4 ชนิด คือ ปลาเปรี้ยว ปลาแป้งแดง นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต ไม่สามารถตรวจพบเชื้อดังกล่าวได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปลาเปรี้ยวและปลาแป้งแดงในขณะเก็บตัวอย่างมีค่าความเป็นกรด-ด่างต่ำประมาณ 3 และค่า ปริมาณเกลือ NaCl สูงประมาณร้อยละ 13 ซึ่งไม่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียแลกติก โดยจะเห็นได้จากอาหารหมักที่ตรวจพบแบคทีเรียแลกติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีค่า pH อยู่ระหว่าง 3.72-5.07 และมีปริมาณเกลืออยู่ระหว่างร้อยละ 1.5-3.8 เท่านั้น หรืออาจเป็นเพราะผลิตภัณฑ์มีอายุการหมักนานทำให้ตรวจไม่พบแบคทีเรียแลกติก แต่จะพบยีสต์แทนโดยเฉพาะปลาแป้งแดงตรวจพบยีสต์มาก ซึ่งอาจเนื่องจากมีแป้งและข้าวหมากในส่วนผสมด้วย ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟัก และร้อยละของแบคทีเรีย

ตารางที่ 4 ข้อมูลเบื้องต้นของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก และเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ

ตัวอย่างอาหาร	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	pH	% NaCl	เชื้อที่คัดเลือกได้	เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ
ส้มฟัก	24	5.07	ND	SN1	L. sake
ส้มฟัก	24	5.07	ND	SN2	UAL-9
ส้มฟัก	24	5.07	ND	SN3	UAL-9
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN4	UAL-9
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN5	UAL-9
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN6	Leuconostoc sp.
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN7	Leuconostoc sp.
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN8	Leuconostoc sp.
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN9	Leuconostoc sp.
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN10	S. aureus
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN11	S. aureus
ส้มฟัก	24	5.07	ND	SN12	Salmonella sp.
ส้มฟัก	24	5.07	ND	SN13	Salmonella sp.
ส้มฟัก	24	5.07	ND	SN14	Salmonella sp.
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN15	S. aureus
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN16	S. aureus
ส้มฟัก	48	4.41	ND	SN17	S. aureus
ส้มฟัก	60	4.31	ND	SN18	Micrococcus sp.
ส้มฟัก	60	4.31	ND	SN19	Micrococcus sp.
ส้มฟัก	60	4.31	ND	SN20	UAL-9
ส้มฟัก	72	4.16	ND	SN21	M114-25
แหนม	24	4.80	ND	SN22	E. coli

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	pH	%NaCl	เชื้อที่คัดเลือกได้	เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ
แหนม	24	4.8	ND	SN23	E. coli
แหนม	24	4.8	ND	SN24	E. coli
แหนม	24	4.8	ND	SN25	E. coli
แหนม	48	4.32	ND	SN26	M114-25
แหนม	48	4.32	ND	SN27	A1147-43
แหนม	48	4.32	ND	SN28	A1147-43
แหนม	48	4.32	ND	SN29	M114-25
ส้มฟัก	24	5.01	2.5	SN30	Micrococcus sp.
ส้มฟัก	24	5.01	2.5	SN31	Micrococcus sp.
ส้มฟัก	24	5.01	2.5	SN32	Micrococcus sp.
ส้มฟัก	24	5.01	2.5	SN33	L. plantarum
ส้มฟัก	24	5.01	2.5	SN34	L. plantarum
ส้มฟัก	24	5.02	2.5	SN35	L. plantarum
ส้มฟัก	24	5.02	2.5	SN36	M114-25
ส้มฟัก	24	5.02	2.5	SN37	Leuconostoc sp.
ส้มฟัก	48	4.68	2.9	SN38	UAL-9
ส้มฟัก	48	4.68	2.9	SN39	UAL-9
ส้มฟัก	48	4.68	2.9	SN40	UAL-9
ส้มฟัก	48	4.56	2.9	SN41	L. sake
ส้มฟัก	48	4.56	2.9	SN42	L. sake
ส้มฟัก	48	4.56	2.9	SN43	M114-25
ส้มฟัก	48	4.56	2.9	SN44	S. aureus

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	pH	%NaCl	เชื้อที่คัดเลือกได้	เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ
ส้มฟัก	72	4.33	3	SN45	L. sake
ส้มฟัก	72	4.33	3	SN46	L. sake
ส้มฟัก	72	4.33	3	SN47	A1147-43
ส้มฟัก	72	4.33	3	SN48	A1147-43
กะหล่ำปลีดอง	36	4.06	ND	SN49	L. plantarum
กะหล่ำปลีดอง	36	4.06	ND	SN50	M114-25
กุ้งส้ม	-[a]	4.04	3.8	SN51	S. aureus
แหนม	-	4.85	3.2	SN52	UAL-9
แหนม	-	4.85	3.2	SN53	Micrococcus sp.
แหนม	-	4.85	3.2	SN54	A1147-43
แหนม	-	4.85	3.2	SN55	A1147-43
แหนม	-	4.83	3.2	SN56	A1147-43
แหนม	-	4.83	3.2	SN57	A1147-43
แหนม	-	4.83	3.2	SN58	A1147-43
แหนม	-	4.83	3.2	SN59	M114-25
แหนม	-	4.83	3.2	SN60	M114-25
ไส้กรอกหมัก	-	4.82	1.5	SN61	M114-25
ไส้กรอกหมัก	-	4.82	1.5	SN62	M114-25
ไส้กรอกหมัก	-	4.82	1.5	SN63	UAL-9
ไส้กรอกหมัก	-	4.5	1.65	SN64	Micrococcus sp.
ไส้กรอกหมัก	-	4.5	1.65	SN65	L. plantarum
ไส้กรอกหมัก	-	4.5	1.65	SN66	UAL-9

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	ระยะเวลาการหมัก (ชั่วโมง)	pH	%NaCl	เชื้อที่คัดเลือกได้	เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ
สะตอดอง	-	3.79	3.7	SN67	UAL-9
สะตอดอง	-	3.72	3.7	SN68	E. coli
สะตอดอง	-	3.72	3.7	SN69	E. coli
กุ้งส้ม	-	3.95	4.1	SN70	L. sake
กุ้งส้ม	-	3.95	4.1	SN71	S. aureus
แหนม	-	4.94	3.32	SN72	L. sake
แหนม	-	4.94	3.32	SN73	L. sake
แหนม	-	4.94	3.32	SN74	L. sake
แหนม	-	4.94	3.32	SN75	L. plantarum
แหนม	-	4.94	3.32	SN76	UAL-9
ผักเสี้ยนและถั่วงอกดอง	-	4.04	1.9	SN77	L. sake
ผักเสี้ยนและถั่วงอกดอง	-	4.04	1.9	SN78	V. parahaemolyticus
กุ้งส้ม	-	3.88	3.4	SN79	L. sake
ผักกาดอง	-	3.95	3.05	SN80	M114-25
ผักกาดดอง	-	3.9	2.9	SN81	M114-25
กะหล่ำปลีดอง	-	4.03	3.4	SN82	E. coli
กะหล่ำปลีดอง	-	4.03	3.4	SN83	E. coli
ถั่วงอกดอง	-	3.78	2.55	SN84	L. sake
ถั่วงอกดอง	-	3.78	2.55	SN85	L. sake
ผักเสี้ยนดอง	-	3.9	2.15	SN86	E. coli

หมายเหตุ : a = ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากตลาดสด ไม่สามารถประมาณระยะเวลาการหมักตัวอย่างได้

: ND ไม่ได้ทำการทดสอบ

แลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ระยะเวลาการหมักต่างๆ ในขั้นตอนต่อไป

สำหรับตัวอย่างผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยวบีทาเกน, โยเกิร์ตดาน่อน, โยเกิร์ตดัชชีชัญญาหาร และโยเกิร์ตดัชมิลล์รสส้ม ตรวจไม่พบเชื้อแบคทีเรียแลกติก อาจเป็นเพราะผลิตภัณฑ์ทางการค้ามีการทำให้เชื้อในผลิตภัณฑ์อ่อนแอลง จนไม่สามารถแยกเชื้อได้ และในภาพที่ 2 และ ภาพที่ 3 แสดงถึงการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ภาพที่ 2. การยับยั้งเชื้อ Lactobacillus plantarum โดยแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาหมัก (ส้มฟัก)

ภาพที่ 3. การยับยั้งเชื้อ Carnobacterium divergens UAL-9 โดยแบคทีเรียที่แยกได้จาก ไส้กรอกหมัก

2. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟัก

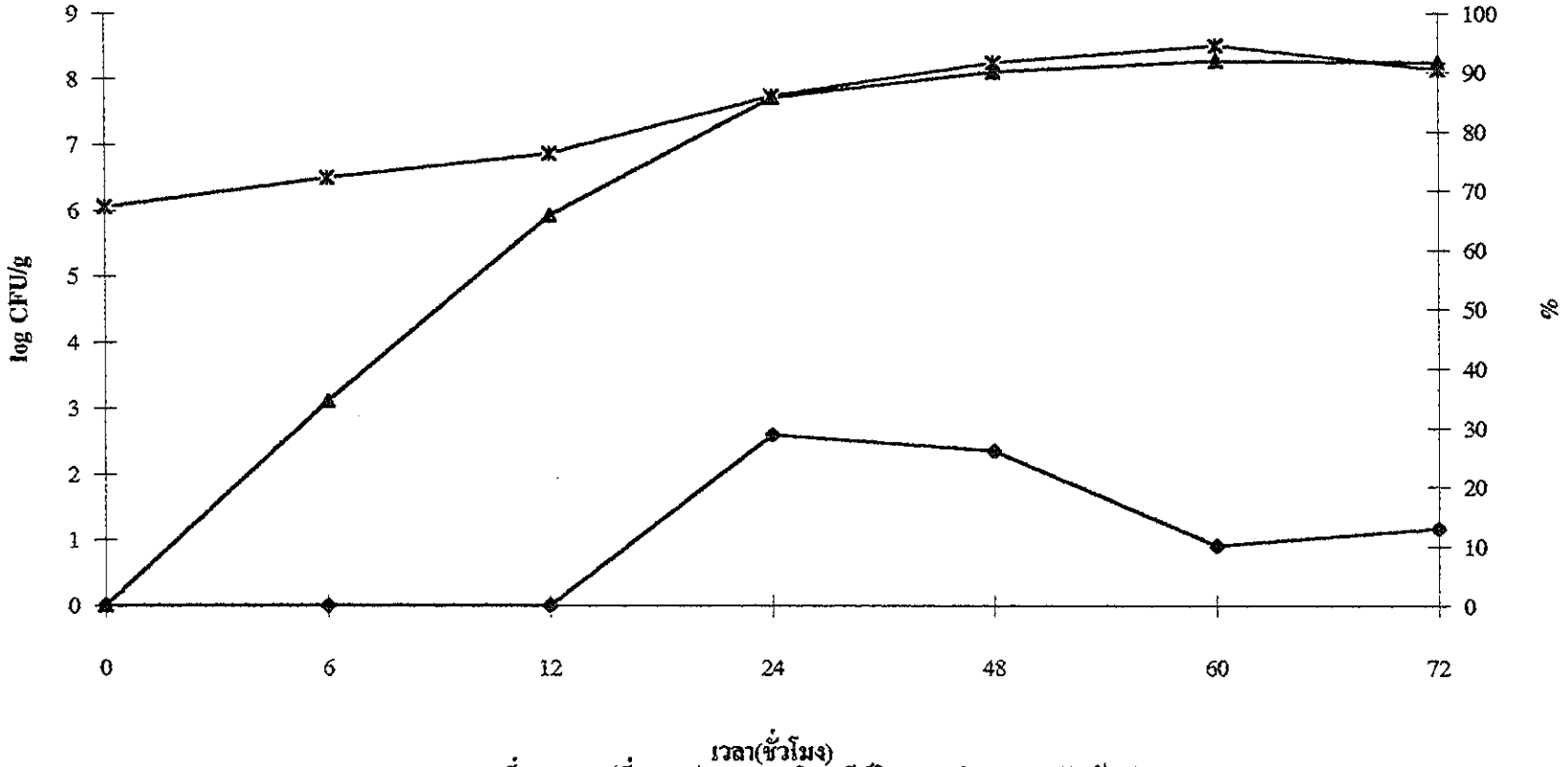
การทดลองหมักส้มฟัก 3 ชุดทดลองและศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมัก 72 ชั่วโมง ของตัวอย่างแต่ละชุดการทดลองโดยเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาการหมัก 0, 6, 12, 24, 48, 60 และ 72 ชั่วโมงพบการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียแลกติก และจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟัก

เวลา (ชั่วโมง)	จุลินทรีย์ทั้งหมด (log CFU/g)			แบคทีเรียแลกติก (log CFU/g)			แบคทีเรียแลกติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์(ร้อยละ)		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0	7.58	5.18	5.4	0	0	0	0	0	0
6	7.51	5.48	6.51	0	4.11	5.33	0	0	0
12	6.85	6.85	6.91	4.87	6.84	6.05	0	0	0
24	7.98	7.35	7.87	7.96	7.49	7.71	64.52	16.13	5.77
48	9.18	7.52	8.01	8.34	7.83	8.13	50.11	5.84	22.30
60	8.49	8.83	8.17	8.47	8.18	8.16	10.1	0	0
72	8.34	7.94	8.14	8.19	8.32	8.22	6.39	19.42	0

จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เริ่มพบเมื่อหมักส้มฟักได้ 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะการหมักที่พบปริมาณแบคทีเรียแลกติกสูงถึง 10^7 CFU/g และจะพบแบคทีเรียแลกติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ มากในระหว่างชั่วโมงที่ 24 และ 48 ของการหมัก ดังแสดงในภาพที่ 4

ซึ่งจากรายงานเรื่อง การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตส้มฟัก (ทองคำ ดิมหะมานนท์, 2538) พบว่า ส้มฟักมีคะแนนเฉลี่ยความชอบสูงสุดที่ชั่วโมงที่



ภาพที่ 4 การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟัก

60 ของการหมัก โดยส้มฟักจะมีเนื้อสัมผัสแน่นและเหนียว มีกลิ่นหอมเฉพาะของปลาหมัก มีรสเปรี้ยว และมีความปลอดภัยในการบริโภค เนื่องจากการเจริญของแบคทีเรียแลกติกจะทำให้ pH ลดต่ำลง และปริมาณจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ปลาหมักเน่าเสีย เช่น แบคทีเรียในสกุล Micrococcus, Pseudomonas, Proteus, Escherichia, Vibrio และ Clostridium จะลดลงอย่างมาก (Adams, *et al.*, 1987 อ้างโดย ทองคำ คิมหะมานนท์, 2538) ในระหว่างการหมัก นอกจากการสร้างกรดแลกติก และกรดระเหยทำให้ pH ลดลงแล้ว แบคทีเรียแลกติกยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้ปลาเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร เช่น hydrogenperoxide nisin diplococcin lactolin acidolin lactocidin acidophilin bulgarican และ lactobacilin ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อโรคกลุ่ม Staphylococcus aureus และ Salmonella spp. (นภา โล่ห์ทอง, 2535)

3. การเทียบเคียงและการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูง

จากการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 86 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้ ทางกายภาพ และทางชีวเคมีตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และใช้แผนภูมิการจำแนกซึ่งดัดแปลงจาก Schillinger และ Lucke (1989) พบว่าประกอบไปด้วย แบคทีเรียแลกติก Lactobacillus casei ssp. pseudoplantarum 2 สายพันธุ์ (SN1 และ SN37), Lactobacillus plantarum 28 สายพันธุ์ (SN2 SN3 SN4 SN5 SN7 SN9 SN10 SN15 SN17 SN18 SN19 SN20 SN21 SN27 SN28 SN36 SN38 SN39 SN40 SN41 SN42 SN46 SN70 SN75 SN77 SN78 SN79 และ SN80), Lactobacillus casei ssp. rhamnosus 4 สายพันธุ์ (SN6 SN8 SN11 และ SN12), Lactobacillus brevis 2 สายพันธุ์ (SN13 และ SN25), Lactobacillus viridescens 2 สายพันธุ์ (SN14 และ SN26), Lactobacillus agilis 2 สายพันธุ์ (SN16 และ SN29), Lactobacillus fermentum 2 สายพันธุ์ (SN22 และ SN67), Lactobacillus delbrueckii ssp. delbrueckii 1 สายพันธุ์ (SN23), Lactobacillus alimentarius 1 สายพันธุ์ (SN24), Lactobacillus confusus 2 สายพันธุ์ (SN50 และ SN74), Lactobacillus buchneri 1

สายพันธุ์ (SN45), Lactobacillus murinus 2 สายพันธุ์ (SN68 และ SN69), Lactobacillus casei ssp. casei 1 สายพันธุ์ (SN71), Lactobacillus homohiochii 1 สายพันธุ์ (SN73), Leuconostoc paramesenteroides 1 สายพันธุ์ (SN31), Pediococcus acidilactici 3 สายพันธุ์ (SN30 SN64 และ SN72), Pediococcus halophilus 1 สายพันธุ์ (SN49), Pediococcus parvulus 1 สายพันธุ์ (SN52), Pediococcus pentosaceus 1 สายพันธุ์ (SN76), Streptococcus uberis 5 สายพันธุ์ (SN54 SN55 SN56 SN57 และ SN58), Streptococcus lactis 19 สายพันธุ์ (SN32 SN33 SN34 SN35 SN43 SN48 SN53 SN59 SN60 SN62 SN63 SN65 SN66 SN81 SN82 SN83 SN84 SN85 และ SN86) และ Streptococcus sp. 1 สายพันธุ์ (SN61)

หลังจากนั้นนำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 86 ไอโซเลต ที่ทำการเทียบเคียงชนิดของเชื้อแล้ว มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูงสุด 5 ไอโซเลต ได้ผลดังตารางที่ 6 และ ภาพที่ 5 โดยพบว่าแบคทีเรียแลกติก 5 ไอโซเลต ที่คัดเลือกได้ คือ Lactobacillus casei ssp. rhamnosus SN11, Streptococcus lactis SN33, Streptococcus lactis SN48, Streptococcus sp. SN61 และ Streptococcus lactis SN62 (สมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี สำหรับการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้แสดงในภาคผนวก ข ในตารางที่ 7) มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด โดยเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 4 ชนิด และสามารถยับยั้ง S. aureus ได้ดีที่สุด เชื้อ S. lactis SN33 ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 5 ชนิด และสามารถยับยั้ง L. sake ได้ดีที่สุด เชื้อ S. lactis SN48 ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 6 ชนิด และสามารถยับยั้ง E. coli ได้ดีที่สุด เชื้อ Streptococcus sp. SN61 ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 5 ชนิด และสามารถยับยั้ง L. plantarum ได้ดีที่สุด และ เชื้อ S. lactis SN62 ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 5 ชนิด และสามารถยับยั้ง Carnobacterium sp. M114-25ได้ดีที่สุด เมื่อศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ E. coli 0157:H7 และ Listeria monocytogenes 018 พบว่าเชื้อที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ มีเฉพาะ S. lactis SN48 ที่ยับยั้ง E. coli 0157:H7 ได้ดีที่สุด และ Streptococcus sp. SN61 ยับยั้ง L. monocytogenes 018 ได้ดีที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 6 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

อินดิเคเตอร์ / เชื้อที่คัดเลือกได้	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)												
	L. plantarum	L. sake	UAL-9	A1147-43	M114-25	Leuconostoc sp.	V. parahae-molyticus	Micrococcus sp.	Proteus sp.	Salmonella sp.	S. aureus	E. coli	Botrytis sp.
SN1	-	10	15	-	6	-	-	-	-	-	10	-	-
SN2	-	9	10	-	7	-	-	-	-	-	10	-	-
SN3	-	9	15	-	8	-	-	-	-	-	8	-	-
SN4	-	10	10	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-
SN5	-	12	13	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-
SN6	-	12	20	-	-	15	-	-	-	-	20	-	-
SN7	-	10	20	-	-	17	-	-	-	-	20	-	-
SN8	-	11	20	-	-	18	-	-	-	-	24	-	-
SN9	-	8	18	-	-	18	-	-	-	-	19	-	-
SN10	-	10	16	-	-	16	-	-	-	-	19	-	-
SN11	-	12	19	-	8	-	-	-	-	-	25	-	-
SN12	-	10	19	-	8	-	-	-	-	-	20	-	-
SN13	-	-	15	-	-	-	-	-	-	-	13	20	-
SN14	-	-	10	-	-	10	-	-	-	-	15	-	-
SN15	-	10	-	-	7	10	-	-	-	-	20	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

อินดิเคเตอร์ / เชื้อที่คัดเลือกได้	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)												
	L. plantarum	L. sake	UAL-9	A1147-43	M114-25	Leuconostos sp.	V. parahaemolyticus	Micrococcus sp.	Proteus sp.	Salmonella sp.	S. aureus	E. coli	Botrytis sp.
SN16	-	-	15	-	7	-	-	-	-	-	15	-	-
SN17	7	13	18	-	10	-	-	-	-	-	18	-	-
SN18	7	13	-	-	10	-	-	-	-	-	15	-	-
SN19	7	13	-	-	10	-	-	-	-	-	15	-	-
SN20	7	13	10	-	10	-	-	-	-	-	18	-	-
SN21	8	14	-	-	12	-	-	-	-	-	14	-	-
SN22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	8	-
SN23	-	-	12	-	-	-	-	-	-	-	8	8	-
SN24	-	7	-	-	-	-	-	-	-	-	9	9	-
SN25	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	14	11	-
SN26	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-	19	-	-
SN27	7	13	-	11	-	8	-	-	-	-	17	-	-
SN28	-	11	-	8	-	8	-	-	-	-	21	-	-
SN29	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	16	-	-
SN30	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

อินดิเคเตอร์ / เชื้อที่คัดเลือกได้	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)												
	L. plantarum	L. sake	UAL-9	A1147-43	M114-25	Leuconostoc sp.	V. parahae-molyticus	Micrococcus sp.	Proteus sp.	Salmonella sp.	S. aureus	E. coli	Botrytis sp.
SN31	-	-	-	-	-	11	-	5	-	-	6	-	-
SN32	15	21	-	-	9	-	-	5	-	-	10	-	-
SN33	16	24	-	-	10	-	-	-	-	-	10	9	-
SN34	13	21	-	-	9	-	-	-	-	-	12	-	-
SN35	14	21	-	-	9	-	-	-	-	-	12	-	-
SN36	-	9	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	-
SN37	-	-	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-
SN38	-	8	8	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
SN39	-	10	9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN40	-	8	9	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
SN41	-	15	-	-	11	-	-	-	-	-	14	-	-
SN42	-	13	-	-	9	-	-	-	-	-	13	-	-
SN43	15	21	11	-	14	-	-	-	-	-	13	9	-
SN44	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	14	6	-
SN45	-	11	-	-	7	-	-	-	-	-	9	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

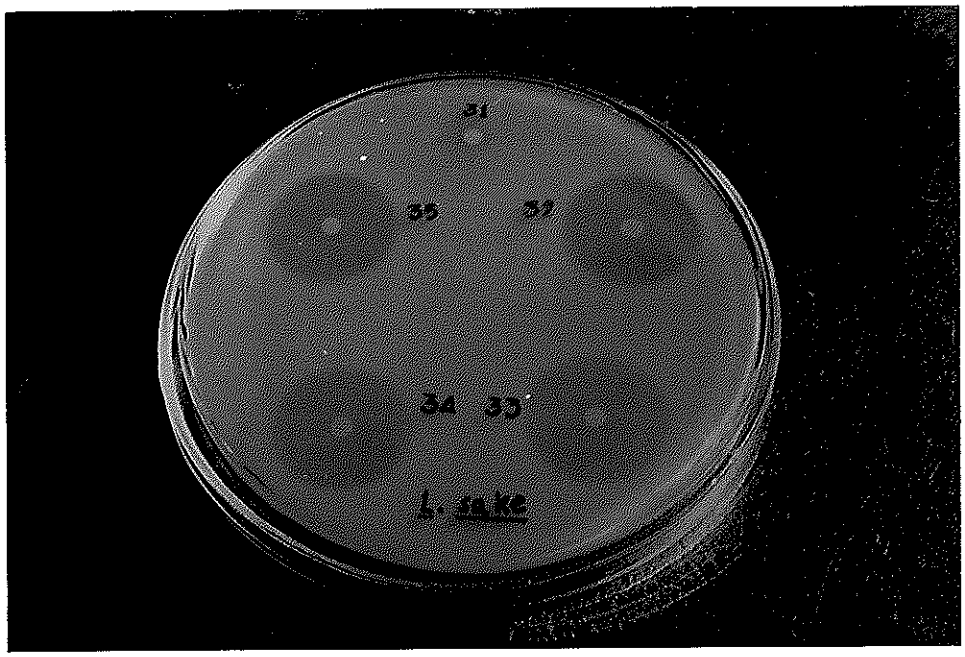
อินดิเคเตอร์ / เชื้อที่คัดเลือกได้	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)												
	L. plantarum	L. sake	UAL-9	A1147-43	M114-25	Leuconostoc sp.	V. parahae-molyticus	Micrococcus sp.	Proteus sp.	Salmonella sp.	S. aureus	E. coli	Botrytis sp.
SN46	-	11	-	-	7	-	-	-	-	-	11	-	-
SN47	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	8	-	-
SN48	11	18	-	7	8	-	-	-	-	-	7	19	-
SN49	16	21	-	-	11	-	-	-	-	-	9	9	-
SN50	-	10	7	-	6	-	-	-	-	-	-	-	-
SN51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	9	-	-
SN52	-	-	8	-	-	-	-	-	-	-	18	-	-
SN53	16	19	8	-	13	-	-	-	-	-	14	-	-
SN54	-	-	9	8	-	-	-	-	-	-	19	-	-
SN55	-	-	8	9	-	-	-	7	-	-	15	-	-
SN56	-	-	8	8	-	-	-	-	-	-	16	-	-
SN57	-	-	7	7	-	-	-	-	-	-	19	10	-
SN58	-	-	7	7	-	-	-	-	-	-	14	9	-
SN59	15	22	6	-	14	-	-	-	-	-	12	9	-
SN60	15	23	6	-	19	-	-	-	-	-	12	9	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

อินดิเคเตอร์ / เชื้อที่คัดเลือกได้	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)												
	L. plantarum	L. sake	UAL-9	A1147-43	M114-25	Leuconostoc sp.	V. parahaemolyticus	Micrococcus sp.	Proteus sp.	Salmonella sp.	S. aureus	E. coli	Botrytis sp.
SN61	20	22	6	-	14	-	-	-	-	-	12	8	-
SN62	18	23	-	-	20	-	-	-	-	-	15	14	-
SN63	11	23	9	-	15	-	-	-	-	-	12	14	-
SN64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7	11	-
SN65	15	22	-	-	13	-	-	-	-	-	12	12	-
SN66	14	22	10	-	11	-	-	-	-	-	13	11	-
SN67	-	12	10	-	12	-	-	-	-	-	-	15	-
SN68	-	14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-
SN69	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-
SN70	-	15	-	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-
SN71	-	11	-	-	-	-	-	-	-	-	13	-	-
SN72	18	22	8	-	-	-	-	-	-	-	14	-	-
SN73	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN74	-	12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SN75	7	16	13	-	12	-	-	-	-	-	19	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

อินดิเคเตอร์ / เชื้อที่คัดเลือกได้	เส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)												
	L. plantarum	L. sake	UAL-9	A1147-43	M114-25	Leuconostoc sp.	V. parahaemolyticus	Micrococcus sp.	Proteus sp.	Salmonella sp.	S. aureus	E. coli	Botrytis sp.
SN76	-	11	9	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-
SN77	-	16	8	-	13	-	-	-	-	-	21	14	-
SN78	-	14	9	-	-	-	-	-	-	-	19	12	-
SN79	-	13	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-	-
SN80	-	14	10	-	14	-	-	-	-	-	16	11	-
SN81	-	16	-	-	16	-	-	-	-	-	17	14	-
SN82	9	14	-	-	-	-	-	-	-	-	15	15	-
SN83	9	15	-	-	-	-	-	-	-	-	12	16	-
SN84	-	13	11	-	-	-	-	-	-	-	-	14	-
SN85	-	15	-	-	-	-	-	-	-	-	14	17	-
SN86	11	13	-	-	-	-	-	-	-	-	15	17	-



ภาพที่ 5 วงใสของการยับยั้งเชื้อ Lactobacillus sake โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ตารางที่7 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ E. coli 0157:H7 และ L. monocytogenes 018

แบคทีเรียแลกติก \ อินดิเคเตอร์	เส้นผ่านศูนย์กลางวงใสของการยับยั้ง(มิลลิเมตร)	
	E. coli 0157:H7	L. monocytogenes 018
L. casei ssp. rhamnosus SN11	14	17
S. lactis SN33	16	15
S. lactis SN48	17	14
Streptococcus sp. SN61	14	19
S. lactis SN62	14	18

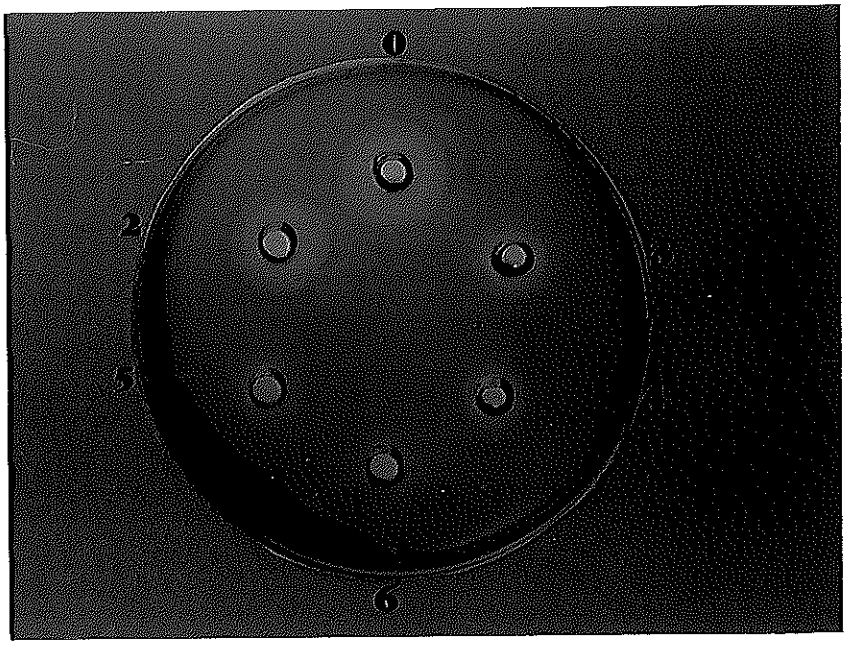
จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 6 และ 7 พบว่าแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินเคเตอร์ที่เป็นแบคทีเรียแลกติก และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แกรมบวก ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ(S. aureus) และทำให้อาหารเน่าเสีย(Micrococcus sp.) ได้บ้าง แต่จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แกรมลบ(Vibrio parahaemolyticus, Proteus sp., และ Botrytis sp.) ยกเว้น E. coli และ Salmonella sp. ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบที่ถูกยับยั้งการเจริญได้ แต่ก็มีประสิทธิภาพในการยับยั้งต่ำ ซึ่ง Hanlin และคณะ (1993) ได้รายงานถึงข้อจำกัดของการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยแบคเทอริโอซินไว้ว่าแบคเทอริโอซินจะไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ Stevens และคณะ (1994) และ Cutter และ Siragusa (1995) พบว่า การใช้ nisin ร่วมกับสาร chelating agent จะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ไปวัดประสิทธิภาพการยับยั้งต่อมิลลิลิตรของส่วนใสเป็นหน่วย Arbitary Unit ต่อมิลลิลิตร (AU/ml) ได้ผลดังตารางที่ 8 และ ภาพที่ 6

ตารางที่ 8 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ต่อมิลลิลิตรของส่วนใส (AU/ml.)ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียแลกติก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	ประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml.)
L. casei ssp. rhamnosus SN11	S. aureus	20
S. lactis SN33	L. sake	300
S . lactis SN48	E. coli	10
	E. coli 0157:H7	10
Streptococcus sp. SN61	L. plantarum	200
	L. monocytogenes 018	200
S. lactis SN62	Carnobacterium sp.M114-25	200

จากผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (AU/ml) โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้แตกต่างกัน อาจเนื่องมาจากการเพิ่มจำนวนจากเดิมเป็นสองเท่า (generation time) ของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยเชื้อ E. coli จะใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนจากเดิมเป็นสองเท่าน้อยที่สุด รองลงไปคือเชื้อ S. aureus ส่วนแบคทีเรียแลกติกอินดิเคเตอร์ใช้ระยะเวลาในการเพิ่มจำนวนจากเดิมเป็นสองเท่านานที่สุด (วิลาวัฒย์ เจริญจิระตระกูล, 2533) ซึ่งจากการทดลองของ Scott และ Taylor (1981 อ้างโดย Hurst and Hoover, 1993) พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ไวต่อ nisin จะขึ้นอยู่กับจำนวนเชื้อของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วย กล่าวคือ ถ้าจำนวนของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เพิ่มขึ้นประสิทธิภาพการยับยั้งโดย nisin ก็จะลดลง ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าการที่แบคทีเรีย



ภาพที่ 6. ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus ต่อมิลลิลิตรของส่วนใส (AU/ml) โดยเชื้อ Lactobacillus casei ssp. rhamnosus SN11 โดยที่ 0, 2, 3, 4, 5 และ 6 คือ ระดับการเจือจางส่วนใส (AU/ml = $\frac{4 \times 1000}{200}$ = 20)

อินดิเคเตอร์ S. aureus และ E. coli มีช่วงเวลาในแต่ละชั่วรุ่นสั้นกว่าแบคทีเรียแลกติกทำให้สามารถเพิ่มจำนวนได้มากกว่าแบคทีเรียแลกติก มีผลให้ประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำด้วย

4. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

4.1 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT และ MRS มีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีแหล่งไนโตรเจนแตกต่างกันและในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT จะมีสารอาหารพวก วิตามิน เหล็ก โซเดียม สูงกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT จะไม่มี Tween 80 ซึ่งTween 80 จะช่วยในการผ่านเข้าออกสารของเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้การกระจายของแบคเทอริโอซินเร็วขึ้น (Daba, *et al.*, 1993) จากองค์ประกอบของอาหารที่แตกต่างกันอาจมีผลต่อการเจริญของเชื้อ โดยจากการทดลองของ Daba และคณะ(1993) รายงานว่า ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Tween 80 (ร้อยละ0.1) เป็นองค์ประกอบทำให้การสร้างสารแบคเทอริโอซิน mesenterocin 5 จาก Leuconostoc mesenteroides เพิ่มขึ้น ส่วน $MnSO_4$ ร้อยละ 0.005 และ $MgSO_4$ ร้อยละ0.01 ในองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เพียงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามพบว่า เชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ชนิด

ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI และ M17 พบว่าเชื้อมีการเจริญ และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ต่ำ ดังนั้นจึงทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์น้อยด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Spelhug และ Harlander (1987 อ้างโดย Hoover, 1993) ที่พบว่า βglycerophosphate ที่เติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 จะรวมตัวกับโปรตีน ทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารโปรตีนลดลง และจากการศึกษาของ Yang และ Ray (1994) พบว่า การผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ

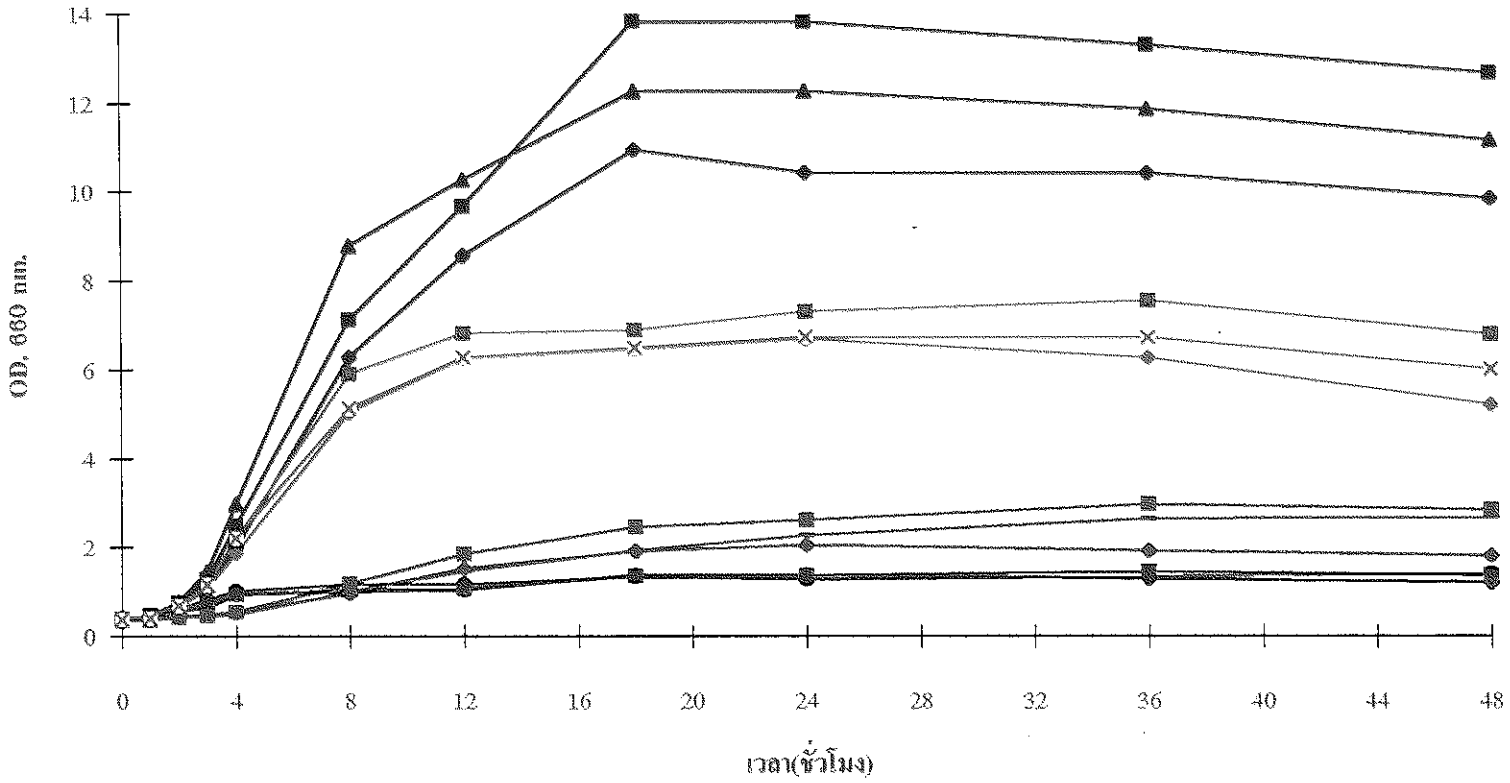
ตารางที่ 9 เปรียบเทียบองค์ประกอบของ APT และ MRS broth

สารอาหาร	แหล่งอาหาร	องค์ประกอบ (ร้อยละ)	
		APT	MRS
ไนโตรเจน	peptone	-	1.0
	beef extract	-	1.0
	yeast extract	0.75	0.5
	tryptone	1.25	-
	ammonium citrate	-	0.2
คาร์บอน	glucose, dextrose	1.0	2.0
วิตามิน	thaimine hydrochloride	0.0001	-
เหล็ก	ferrous sulfate	0.004	-
โซเดียม	sodium chloride	0.5	-
	sodium citrate	0.5	-
	sodium acetate	-	0.5
แมกนีเซียม	magnesium sulfate	0.08	0.01
แมงกานีส	manganese sulfate	-	0.005
	manganese chloride	0.014	-
อื่นๆ	Tween 80	-	0.1
	sorbitan monoleate complex	0.02	-
pH		6.7	6.5

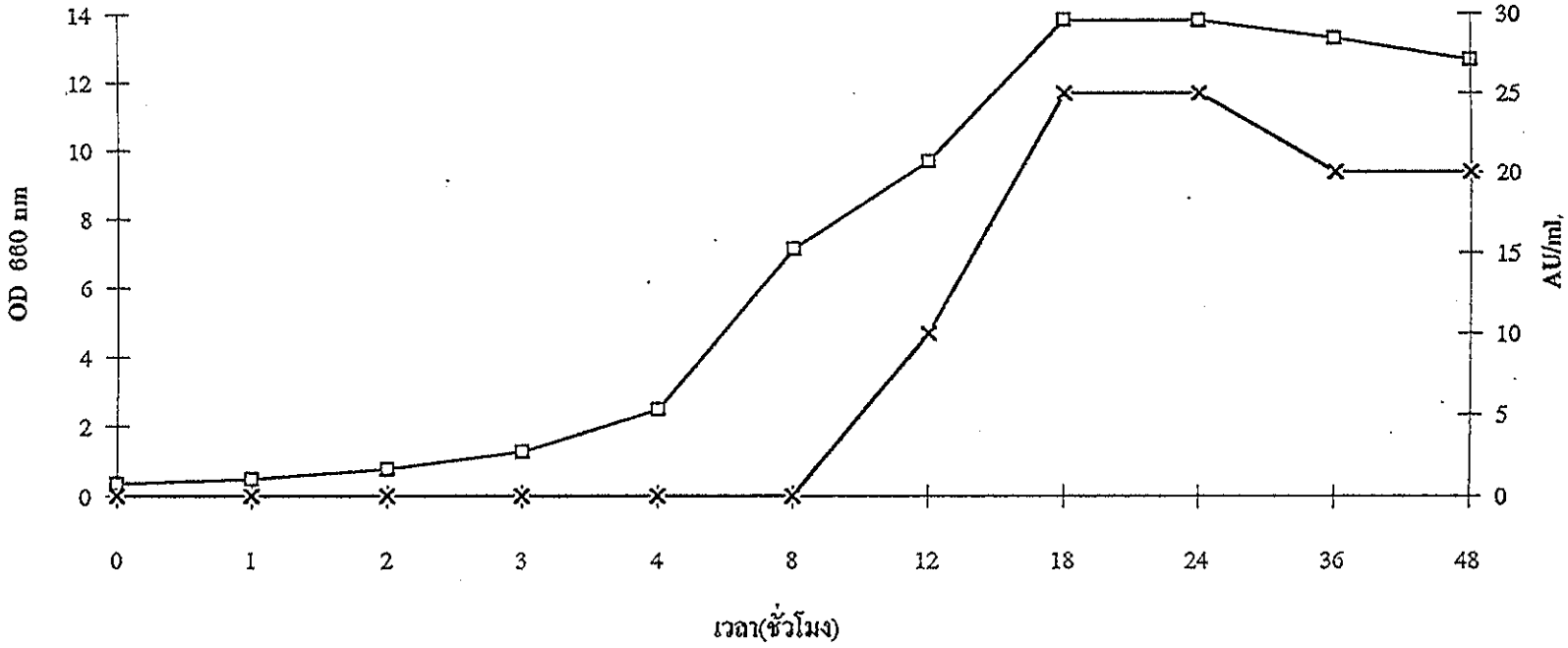
ที่มา : บริษัท Difco

(Simple medium) เพิ่มขึ้นได้เมื่อเชื้อมีการเจริญที่ pH ที่เหมาะสม และมีการเพิ่มสารอาหารที่จำเป็นสำหรับแต่ละสกุลหรือสายพันธุ์ นอกจากนี้ Yang และ Ray (1994) ยังมีผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่เซลล์มีการเจริญเพิ่มขึ้น จะทำให้การสร้างสารแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นด้วย

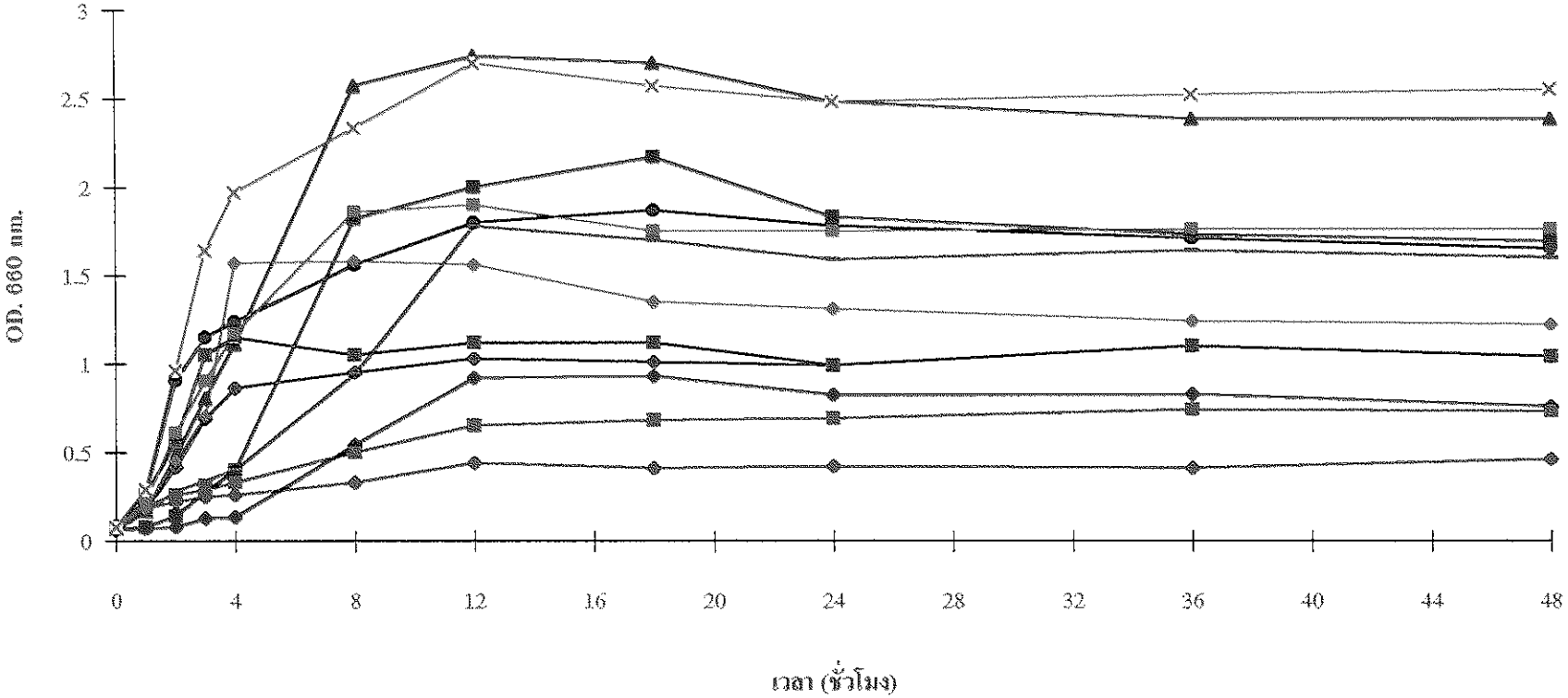
การผลิตสารแบคเทอริโอซิน ยังขึ้นอยู่กับระยะการเจริญของเชื้อด้วย โดยพบว่าเชื้อจะมีการผลิตแบคเทอริโอซินได้มาก ในระยะ mid หรือ late log phase (Jeorge and Klaenhammer, 1986 ; Samelis, *et al.*, 1994 ; Jimenez-Diaz, *et al.*, 1993) ไปจนถึงระยะ early stationary phase (Barefoot and Klaenhammer, 1983 ; Kawai, *et al.*, 1994) และจากการทดลองพบว่า เชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 มีการเจริญและยับยั้งเชื้อ S. aureus ได้ดีที่สุดในอาหาร MRS pH เริ่มต้น 5.5 ที่เวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ late log phase ดังแสดงในรูปที่ 7-8 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Mcgroarty และ Reid (1985 อ้างโดย Hoover and Harlander, 1993) ที่ได้รายงานว่า การเลี้ยงเชื้อLactobacillus casei ssp. rhamnosus GR-1 ในอาหารเหลว MRS ให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ และ จากการทดลองของ Jeorge และ Klaenhammer (1986) ก็พบว่าเชื้อ Lactobacillus helveticus ผลิต helveticin J ได้มากที่สุดในอาหาร MRS ที่ pH 5.5 สำหรับเชื้อ S. lactis SN48 มีการเจริญและยับยั้งเชื้อ E. coli และ E. coli 0157: H7 ได้ดีที่สุดในอาหาร MRS pH เริ่มต้น 6.5 ที่เวลา 12 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะ early stationary phase ดังแสดงในรูปที่ 9-10 ซึ่งก็ให้ผลสอดคล้องกับการทดลองของ Muriana และ Klaenhammer (1987) ที่พบว่า Lactobacillus acidophilus ผลิต lactacin F ได้มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ pH 7.0 อย่างไรก็ตามพบว่าทั้งเชื้อ S. lactis SN33 (ยับยั้งเชื้อ L. sake) เชื้อ Streptococcus sp. SN61 (ยับยั้งเชื้อ L. plantarum และ L. monocytogenes 018) และเชื้อ S. lactis SN62 (ยับยั้งเชื้อ Carnobacterium sp. M114-25) มีการเจริญและยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH เริ่มต้น 6.7 ที่เวลา 12, 18 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งระยะเวลาดังกล่าวอยู่ในช่วง late log phase ถึง early stationary phase ดังแสดงในรูปที่ 11-12, 13-14 และ 15-16 โดยจากผลการศึกษาของ Ahn และ Stiles (1990 อ้างโดย Stiles, 1993) ได้รายงานไว้ว่า



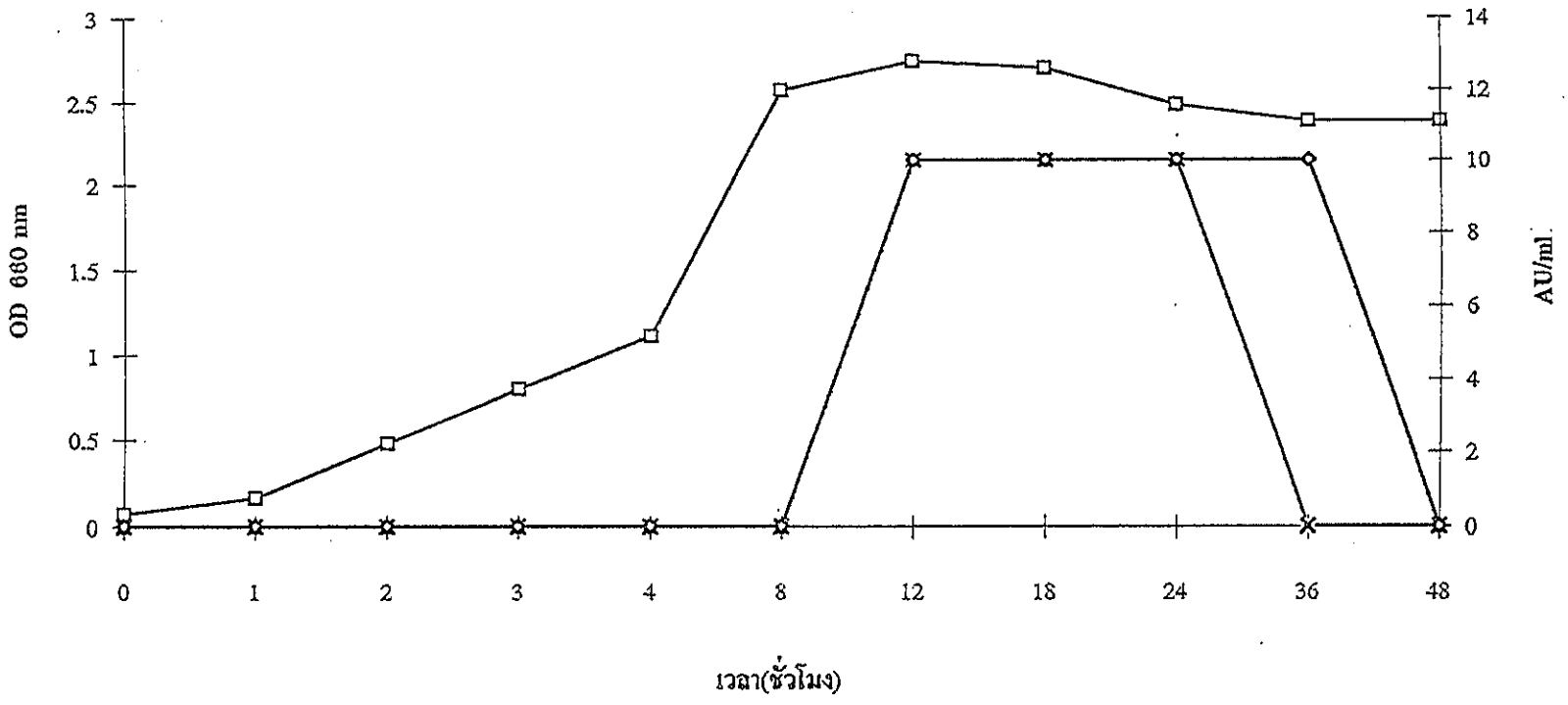
ภาพที่ 7 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน



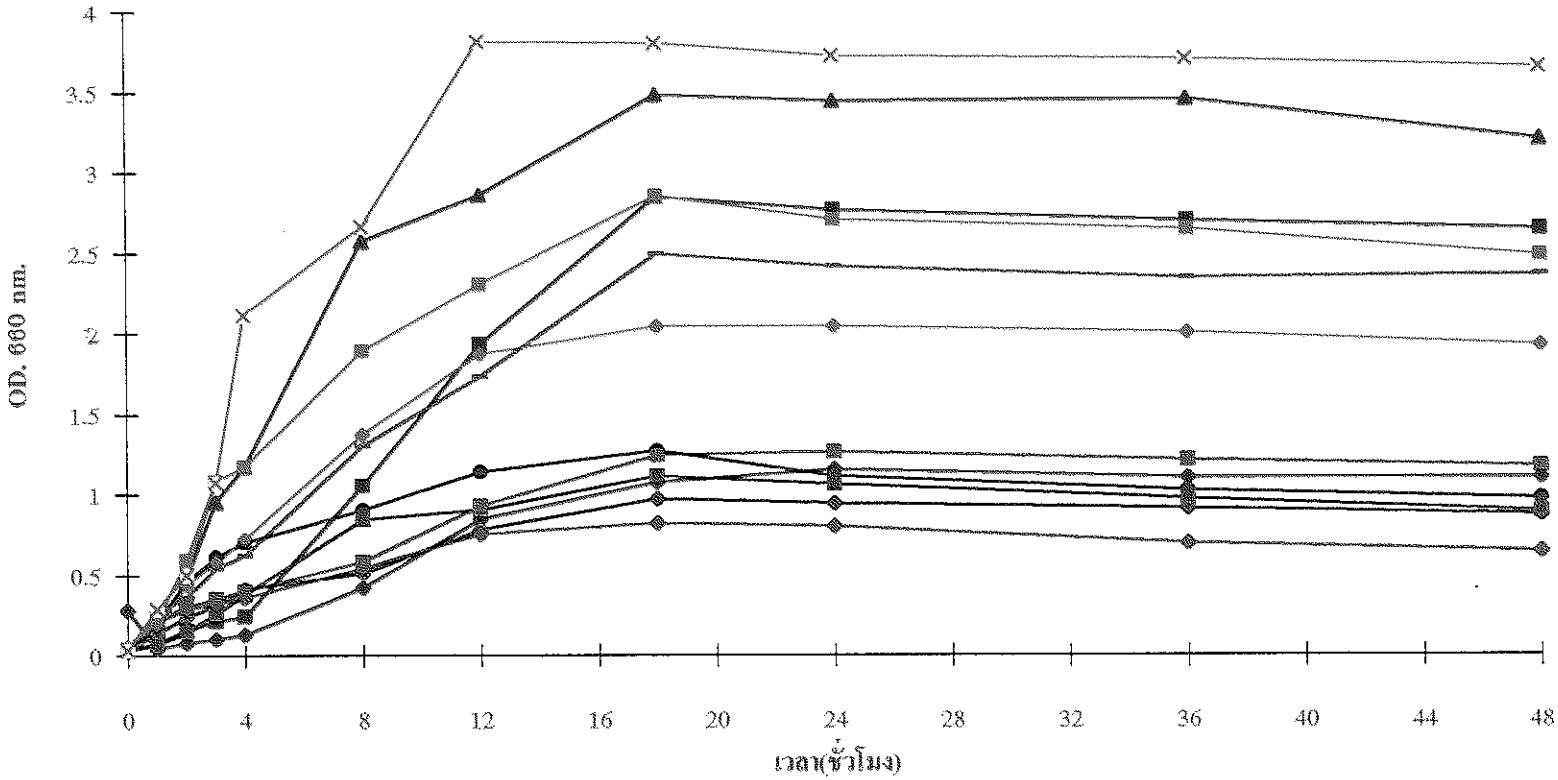
ภาพที่ 8 การเจริญของเชื้อL. casei ssp. rhamnosus(SN11) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS pH 5.5 และประสิทธิภาพการยับยั้ง (AU/ml.)เชื้อ S. aureus ที่เวลาต่างๆ



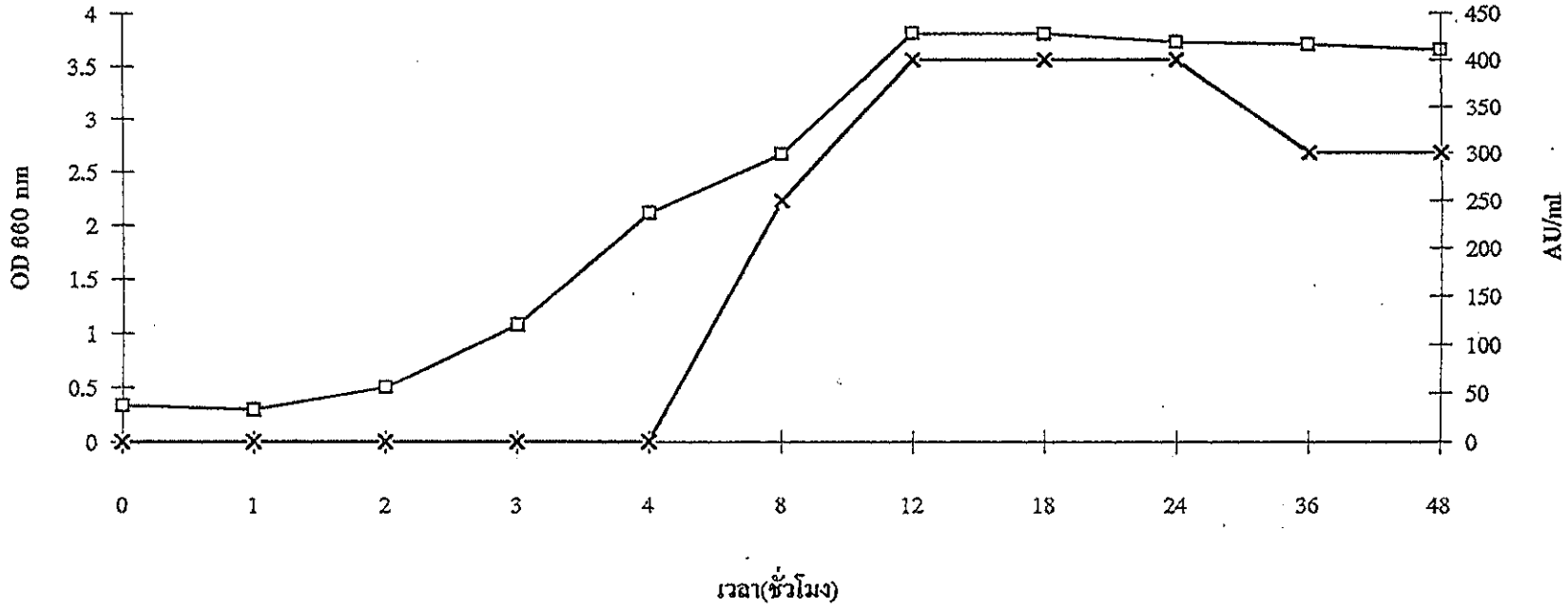
ภาพที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ S. lactis SN48 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน



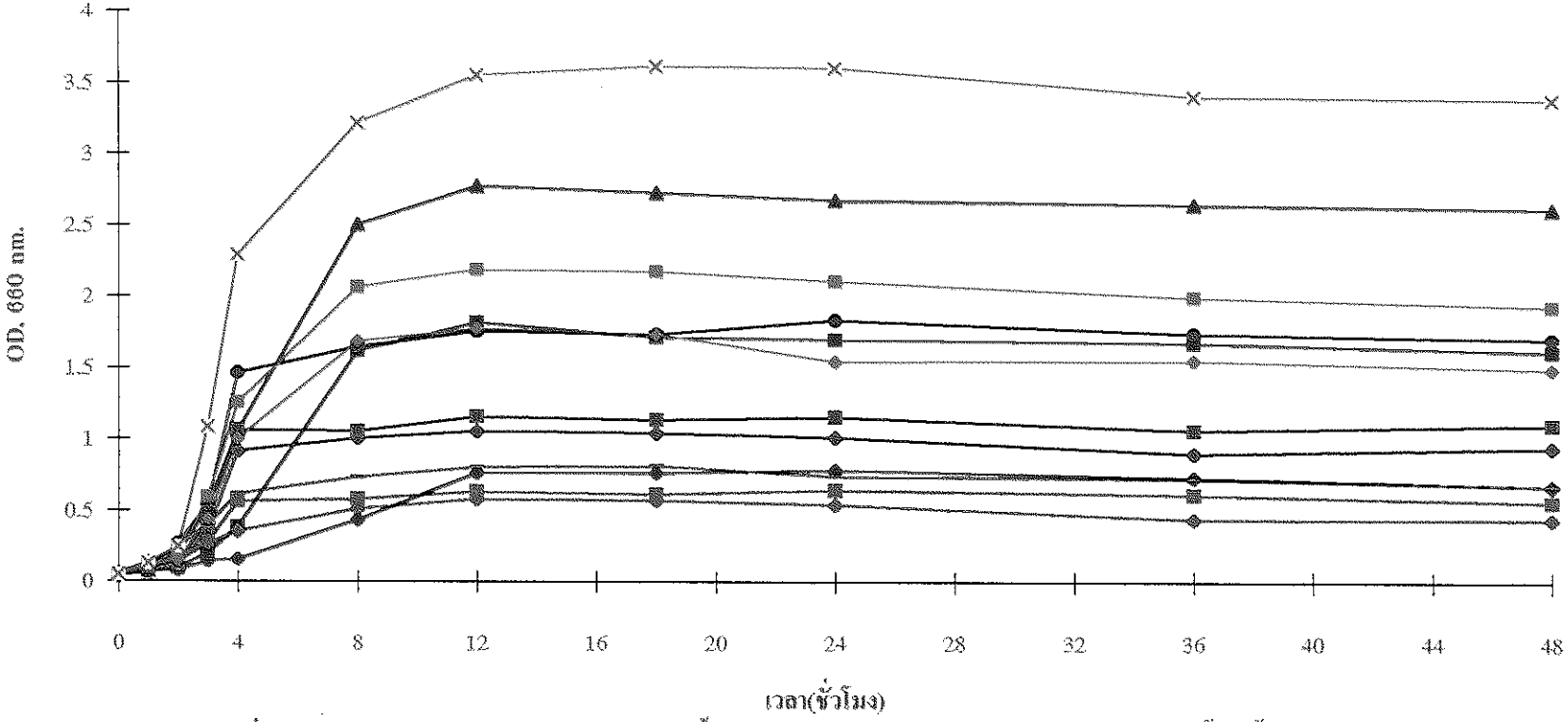
ภาพที่ 10 การเจริญของเชื้อ S. lactis SN48 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS pH 6.5 และประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml) เชื้อ E. coli และ E. coli 0157:H7 ที่เวลาต่างๆ



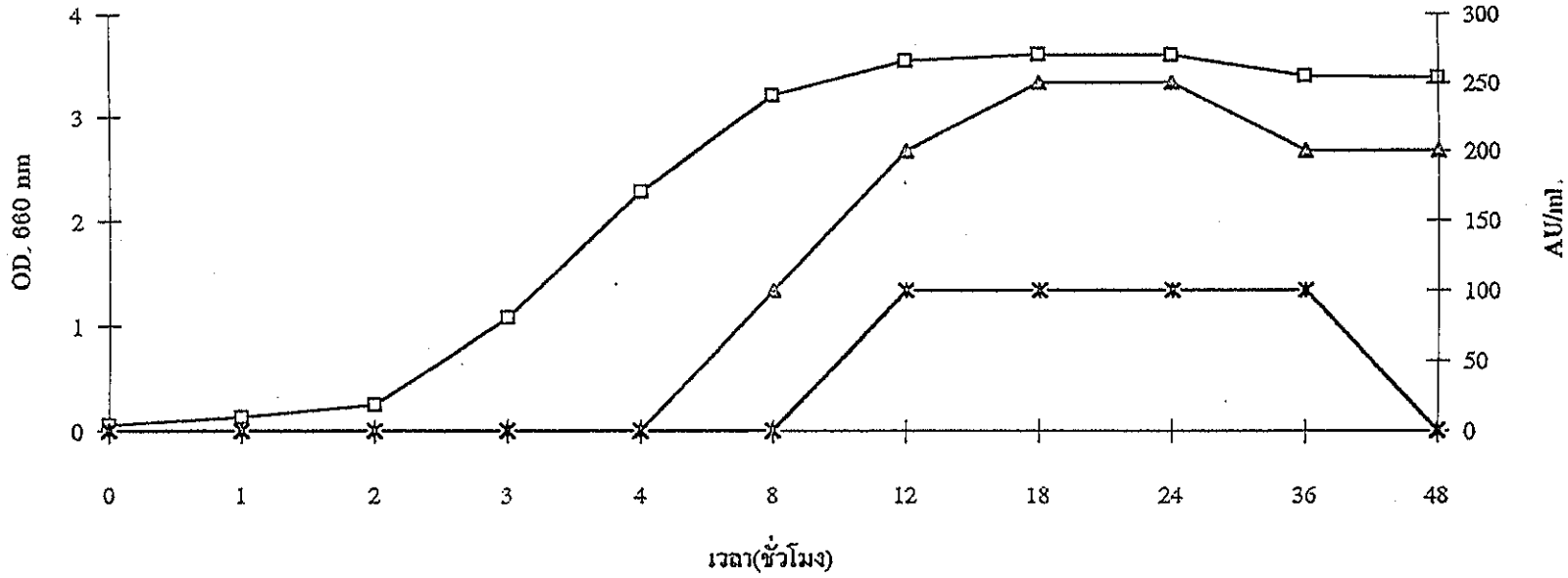
ภาพที่ 11 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ S. lactis SN 33 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน



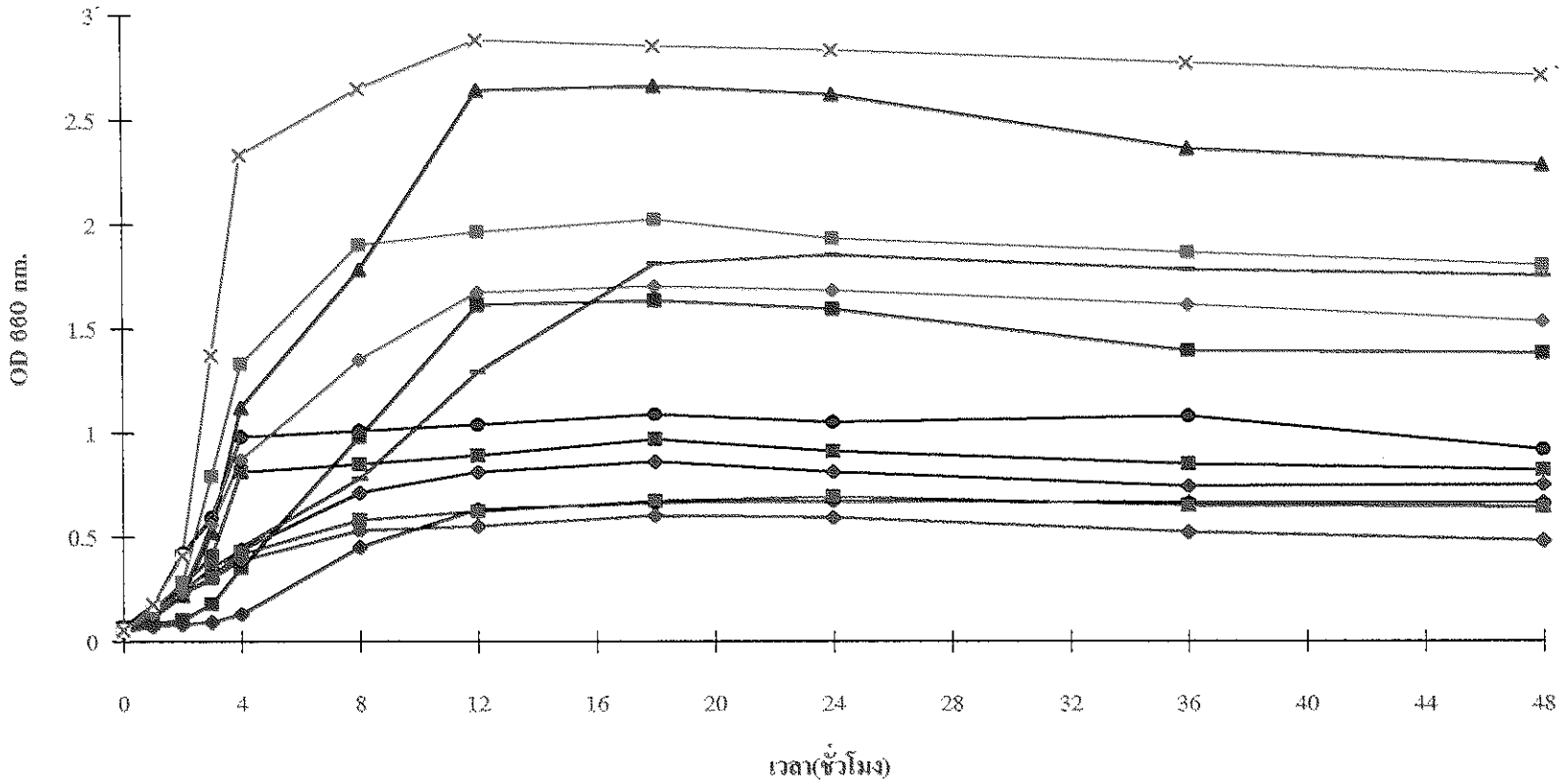
ภาพที่ 12 การเจริญของเชื้อ S. lactis SN33 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH 6.7 และประสิทธิภาพการยับยั้ง (AU/ml) เชื้อ L. sake ที่เวลาต่างๆ



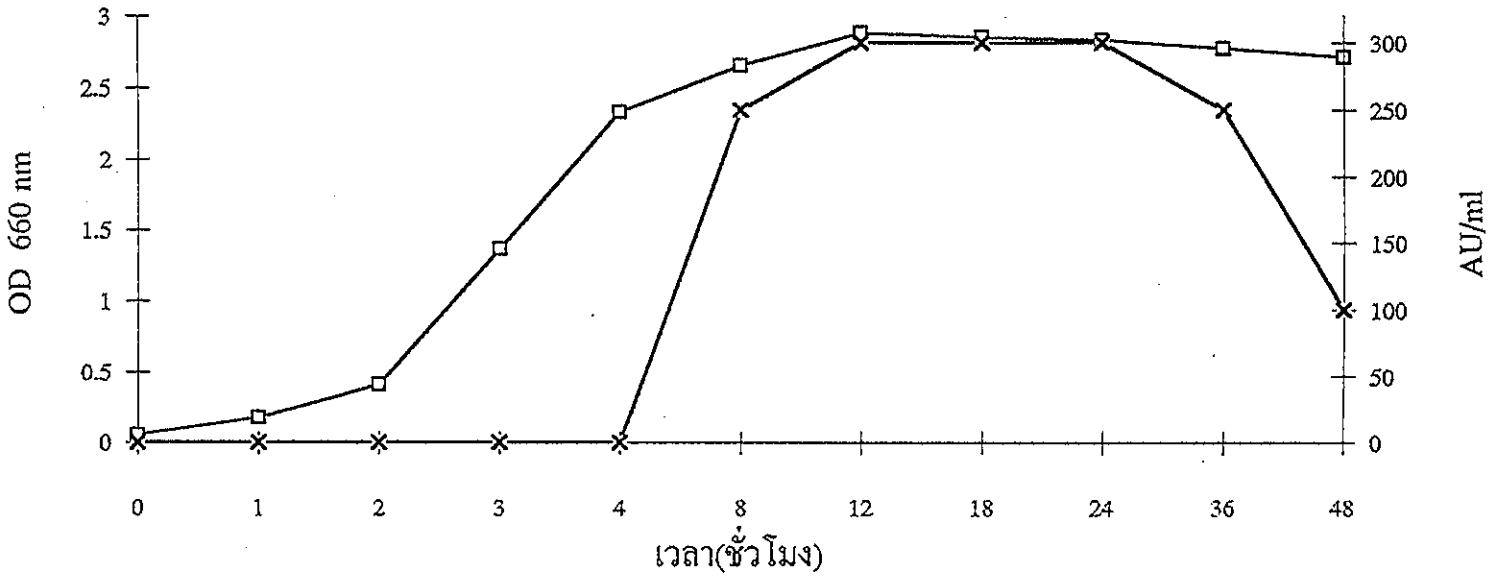
ภาพที่ 13 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ Streptococcus sp. SN61 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน



ภาพที่ 14 การเจริญของเชื้อ Streptococcus sp. SN61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH 6.7 และประสิทธิภาพการยับยั้ง (AU/ml.)เชื้อ L. plantarum และ L. monocytogenes ที่เวลาต่างๆ



ภาพที่ 15 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อ S. lactis SN 62 กับเวลาในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH แตกต่างกัน



ภาพที่ 16 การเจริญของเชื้อ S. lactis SN 62 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH 6.7 และประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml) เชื้อ Carnobacterium sp. M114-25 ที่เวลาต่างๆ

Carnobacterium piscicola LV17 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ในอาหารเหลว APT และจะไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินถ้า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 5.5

ดังนั้นจึงทำการคัดเลือกอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้น และระยะเวลา ที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกมีการเจริญ และมีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สูงสุด ในการทดลองหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญในขั้นต่อไป

4.2 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ในการศึกษาถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างสารสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียแลกติกที่ทำการทดลองมีการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้น S. lactis SN48 มีการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับค่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ(AU/ml.)ของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส มีค่าไม่แตกต่างกัน ยกเว้น S. lactis SN62 ที่มีค่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (300 AU/ml) สูงกว่าที่ 35 องศาเซลเซียส (250 AU/ml) ดังแสดงในตารางที่ 10 ดังนั้นจึงเลือกอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เชื้อมีการเจริญ และประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สูง ในการทดลองขั้นต่อไป

5. ศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

5.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

จากการศึกษาถึงความคงตัว ต่ออุณหภูมิและเวลาต่างๆ เมื่อเก็บส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออก แล้วทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่า สารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 45 นาที แต่สำหรับสารยับยั้งจาก L. casei ssp. rhamnosus SN11 และ S. lactis SN33 ยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เวลานาน 15 นาที และ 100 องศาเซลเซียส เวลานาน 60 นาที ตามลำดับ ดัง

ตารางที่10 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญ และสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

แบคทีเรียแลกติก/	อุณหภูมิ			
แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	30 ^{0}ซ		35 ^{0}ซ	
	OD_{660}	AU/ml.	OD_{660}	AU/ml.
L. casei ssp. rhamnosus/	*13.78[a]	-	13.86[a]	-
S. aureus	-	25	-	25
S. lactis SN33/	3.15[b]	-	3.08[b]	-
L. sake	-	300	-	300
S. lactis SN48/	2.61[c]	-	2.39[d]	-
E. coli	-	10	-	10
E. coli 0157:H7	-	10	-	10
Streptococcus sp. SN61/	3.64[e]	-	3.56[e]	-
L. plantarum	-	250	-	250
L. monocytogenes 018	-	100	-	100
S. lactis SN62/	2.83[f]	-	2.69[f]	-
Carnobacterium sp.	-	300	-	250

* ค่าเฉลี่ยจากการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ

-อักษรเหมือนกันในแถวเดียวกัน แสดงว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ($P<0.05$)

แสดงในตารางที่ 11 สำหรับสมบัติด้านความคงตัวต่ออุณหภูมิ ณ เวลาต่างๆของสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ จะใกล้เคียงกับคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ได้มีผู้ทำการศึกษามาแล้ว โดยพบว่าแบคเทอริโอซินสามารถทนความร้อนตั้งแต่อุณหภูมิพาสเจอร์ไรเซชันไปจนถึงอุณหภูมิสเตอริไลซ์เซชัน เช่น Brink และ คณะ (1994) พบว่า acidocin B ซึ่งเป็น แบคเทอริโอซินจาก Lactobacillus acidophilus M46 ยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที แต่จะสูญเสียกิจกรรมไปบางส่วนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที จะสูญเสียกิจกรรมทั้งหมด ในขณะที่ Lyon และคณะ (1995) พบว่า enterocin EL2 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินจาก Enterococcus faecium ยังคงมีกิจกรรมที่ 85 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และจะสูญเสียกิจกรรมไปบางส่วนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 และ 30 นาที การที่แบคเทอริโอซินทนความร้อนสูง จะมีประโยชน์ในการนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องฆ่าเชื้อด้วยความร้อน โดยจากการทดลองของ Hurst (1981 อ้างโดย Hurst and Hoover, 1993)พบว่าการใช้ nisin ร่วมกับการฆ่าเชื้ออาหารกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำด้วยความร้อน สามารถลดเวลาในการฆ่าเชื้อลงได้ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณค่าทางอาหาร ลักษณะปรากฏ และเนื้อสัมผัสที่ดี

อย่างไรก็ตามการที่แบคเทอริโอซินถูกทำลายด้วยความร้อนยังขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์และปัจจัยอื่น เช่น pH, ionic strength และการมี protective molecules (Schillinger, 1990) จากการทดลองของ Mathieu และคณะ(1993)พบว่า mesenterocin 52 จะมีความเสถียรที่ pH 4.5 มากกว่าที่ pH 7.0 หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

5.2 ผลของ pH ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

การศึกษาความคงตัวเมื่อปรับ pH ส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แยกเซลล์ออกเป็น 5.0, 5.5, 6.0 และ7.0 แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง พบว่าสารยับยั้งที่สร้างจาก S. lactis SN33 และ Streptococcus sp. SN61 มีความคงตัวที่ pH 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0 โดยกิจกรรมจะไม่ลดลงเลย ดังแสดงในตารางที่ 12 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Samelis และคณะ(1994) ที่พบว่าแบคเทอริโอซิน sakacin B ซึ่งผลิตได้

ตารางที่11 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ณ เวลาต่างๆ

แบคทีเรียแลกติก/ แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	ประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/mL.)												
	ส่วนใส	70 °ซ			80 °ซ			90 °ซ			100 °ซ		121 °ซ
	ชุดควบคุม	30 นาที	45 นาที	60 นาที	30 นาที	45 นาที	60 นาที	30 นาที	45 นาที	60 นาที	30 นาที	60 นาที	15 นาที
L. casei ssp. rhamnosus SN11/													
S. aureus	25	25	25	25	25	25	25	25	25	25	20	20	20
S. lactis SN33/													
L. sake	300	300	300	300	300	300	300	300	300	250	250	150	0
S. lactis SN48/													
E. coli	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0
E. coli 0157:H7	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	0	0	0
Streptococcus sp. SN61/													
L. plantarum	250	250	250	250	200	200	200	100	100	100	0	0	0
L. monocytogenes 018	100	100	100	100	100	100	100	100	100	0	0	0	0
S. lactis SN62/													
Carnobacterium sp.	300	300	300	300	300	300	300	150	150	0	0	0	0

ตารางที่12 ผลของ pH ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่บ่มที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

แบคทีเรียแลกติก / แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	ประสิทธิภาพการยับยั้ง (AU/ml.)								
	ชุดควบคุม					ชุดทดสอบ			
	ส่วนใส	บัฟเฟอร์ปรับ pH				ส่วนใสปรับ pH			
	pH เริ่มต้น	5.0	5.5	6.0	7.0	5.0	5.5	6.0	7.0
	AU/ml.								
L. casei ssp. rhamnosus SN11/	4.0								
S. aureus	25	0	0	0	0	15	15	10	10
S. lactis SN33/	4.2								
L. sake	300	0	0	0	0	300	300	300	300
S. lactis SN48/	4.4								
E. coli	10	0	0	0	0	0	0	0	0
E. coli 0157:H7	10	0	0	0	0	10	0	0	0
Streptococcus sp. SN61/	4.2								
L. plantarum	250	0	0	0	0	250	250	250	200
L. monocytogenes 018	150	0	0	0	0	150	150	150	150
S. lactis SN62/	4.1								
Carnobacterium sp. M114-25	250	0	0	0	0	250	250	200	150

จาก Lactobacillus sake ยังคงมีกิจกรรมที่ pH 2-9 เช่นเดียวกันกับ acidocin B (Brink, *et al.*, 1994) จาก Lactobacillus acidophilus M46 ซึ่งยังคงมีกิจกรรมที่ pH 2-10 ในขณะที่สารยับยั้งจาก L. casei ssp. rhamnosus SN11 กิจกรรมจะลดลงเหลือร้อยละ 60 ที่ pH 5.0 และ 5.5 และเหลือร้อยละ 40 ที่ pH 6.0 และ 7.0 (ตารางที่ 12)

กิจกรรมของสารยับยั้งจาก S. lactis SN62 จะไม่ลดลงที่ pH 5.0 และ 5.5 แต่ที่ pH 6.0 และ7.0 จะมีกิจกรรมเหลืออยู่ร้อยละ 80 และร้อยละ 60 ตามลำดับ ส่วนสารยับยั้งจาก S. lactis SN48 ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ E. coli จะสูญเสียกิจกรรมที่ pH 5.0, 5.5, 6.0 และ 7.0 แต่สำหรับการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ E. coli 0157:H7 สารยับยั้งจากเชื้อดังกล่าวยังคงมีกิจกรรมที่ pH 5.0 และจะสูญเสียกิจกรรมที่ pH 5.5, 6.0 และ7.0 (ตารางที่ 12) ซึ่งจากการทดลองของ Parente และ Hill (1992) พบว่าระยะเวลาในการบ่ม และ pH มีผลต่อความคงตัวของ enterocin 1146 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินจาก Enterococcus faecium กล่าวคือ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส pH 5.0 เวลา 4 ชั่วโมง แบคเทอริโอซินมีกิจกรรม 1,200 AU/ml ซึ่งสูงกว่าที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส pH 5.0 เวลา 24 ชั่วโมง ที่จะมีกิจกรรมเหลืออยู่ 800 AU/ml ส่วนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ที่ pH 7.0 แบคเทอริโอซินมีกิจกรรม 400 AU/ml และที่ pH 9.0 แบคเทอริโอซินมีกิจกรรม 200 AU/ml

ดังนั้น จึงอาจเป็นไปได้ว่าการที่สารยับยั้งจาก S. lactis SN48 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ E. coli และ E. coli 0157:H7 เป็นเพราะสารยับยั้งจาก S. lactis SN48 ที่มีการปรับ pH ให้เพิ่มขึ้นกว่าเดิม และ ถูกบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะสูญเสียความคงตัวทำให้กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ลดลง หรือสูญเสียไป นอกจากนี้ยังพบว่าแบคเทอริโอซินอื่นๆ เช่น nisin (Hurst, A., 1981 อ้างโดย Fricourt, *et al.*, 1994) lactostrepcin (Kozack, *et al.*, 1978 อ้างโดย Fricourt, *et al.*, 1994) และ caseicin 80 (Kammelsberg, *et al.*, 1990 อ้างโดย Fricourt, *et al.*, 1994) จะมีความคงตัวที่ pH เป็นกรดตั้งแต่ 2.0-4.6 เท่านั้น และได้มีการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าความสามารถในการละลาย และความคงตัวของ nisin ลดลงเมื่อ pH เพิ่มขึ้น ทำให้ประสิทธิภาพของ nisin ลดลงด้วย (Rayman, *et al.*, 1981 and Scott and Taylor, 1981 อ้างโดย Hurst and Hoover, 1993)

5.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเอนไซม์ catalase ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินเคเตอร์

การศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่าสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ trypsin และ α-chymotrypsin ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนเอนไซม์ pronase-E proteinase-K และ pepsin ยับยั้งกิจกรรมของสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกได้อย่างสมบูรณ์บางสายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 13 ซึ่งได้ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมา โดยพบว่าแบคเทอริโอซินแต่ละชนิดก็จะถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเอนไซม์ และ สับสเตรท(แบคเทอริโอซิน) ไม่มีความจำเพาะเจาะจงกัน เช่น การทดลองของ Pilet และคณะ (1994) พบว่า piscicocin V1 และ divercin V41 ถูกยับยั้งกิจรรมได้ด้วยเอนไซม์ pronase E, proteinase K และ trypsin แต่ไม่ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ α-chymotrypsin ในขณะที่ enterocin EL1 ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ pronase E, proteinase K, trypsin และ α-chymotrypsin (Lyon, *et al.*, 1994) enterocin 1146 (Parente and Hill , 1991) และ mesenterocin 52 (Mathieu, *et al.*, 1993) ถูกยับยั้งกิจกรรมได้ด้วยเอนไซม์ pronase E, proteinase K, trypsin, α-chymotrypsin และ pepsin ในขณะที่จากการทดลองของ Jarvis และ Mahoney (1969) พบว่า nisin ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ α-chymotrypsin แต่ไม่ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ pepsin trypsin และ pronase ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ เป็นสารโปรตีนหรือสารเปปไทด์ และเป็นแบคเทอริโอซิน แต่ไม่ใช่ nisin

การศึกษาผลของเอนไซม์ catalase ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์พบว่า เอนไซม์ catalase มีผลทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งลดลงบ้างเล็กน้อย ยกเว้นสารยับยั้งจาก L. casei ssp. rhamnosus SN11 และ S. lactis SN48 ที่ยังคงมีกิจกรรมอยู่เท่าเดิม (ตารางที่ 13) ซึ่งเป็นไปได้ว่าการที่แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ถูกยับยั้งการเจริญเป็นผลร่วมมาจาก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดที่ผลิตขึ้นด้วย แต่ก็เป็นส่วนน้อย และพบว่าชุดควบคุมที่เป็นบัฟเฟอร์ และ เอนไซม์ในบัฟเฟอร์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ยกเว้นซิเตรตบัฟเฟอร์(pH3.0) และเอนไซม์

ตารางที่ 13 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเอนไซม์ catalase ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

แบคทีเรียแลกติก/ แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	ประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml.)																	
	ส่วนใส	pronase-E			proteinase-K			trypsin			α - chymotrypsin			pepsin			catalase		
	ชุดควบคุม	บัฟเฟอร์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ + ส่วนใส	บัฟเฟอร์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ + ส่วนใส	บัฟเฟอร์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ + ส่วนใส	บัฟเฟอร์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ + ส่วนใส	บัฟเฟอร์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ + ส่วนใส	บัฟเฟอร์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ (ชุดควบคุม)	เอนไซม์ + ส่วนใส
L. casei ssp. rhamnosus SN11/																		
S. aureus	25	0	0	10	0	0	10	0	0	0	0	0	0	25	25	15	0	0	25
S. lactis SN33/																		
L. sake	300	0	0	200	0	0	150	0	0	0	0	0	0	0	0	200	0	0	250
S. lactis SN48/																		
E. coli	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	0	0	10
E. coli 0157:H7	10	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	10	10	0	0	10
Streptococcus sp. SN61/																		
L. plantarum	200	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	150
L. monocytogenes 018	150	0	0	0	0	0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	100	0	0	100
S. lactis SN62/																		
Carnobacterium sp. M114-25	150	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	100

pepsin ในซิเตรตบัฟเฟอร์ ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ S. aureus, E. coli, และ E. coli 0157:H7 โดยมีวงใสของการยับยั้งกว้างกว่าชุดควบคุมที่เป็นส่วนใสของสารยับยั้ง ซึ่งเป็นไปได้ว่ามีการยับยั้งเนื่องมาจาก pH ที่ต่ำ (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

6. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซินสูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมี pH เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการเจริญและและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ และ เวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญ และสร้างแบคเทอริโอซิน พบว่าเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 ซึ่งเลี้ยงร่วมกับ S. aureus ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS pH เริ่มต้น 5.5 เวลา 18 ชั่วโมง, เชื้อ S. lactis SN33 ซึ่งเลี้ยงร่วมกับ L. sake ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH เริ่มต้น 6.7 เวลา 12 ชั่วโมง, เชื้อ Streptococcus sp. SN61 ซึ่งเลี้ยงร่วมกับ L. plantarum หรือ L. monocytogenes 018 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH เริ่มต้น 6.7 เวลา 18 ชั่วโมง และ เชื้อ S. lactis SN62 ซึ่งเลี้ยงร่วมกับ Carnobacterium sp. M114-25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT pH เริ่มต้น 6.7 เวลา 12 ชั่วโมง สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ร้อยละ 97-99 ยกเว้นเชื้อ S. lactis SN48 ซึ่งเลี้ยงร่วมกับ E. coli หรือ E. coli 0157 : H7 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS pH เริ่มต้น 6.5 เวลา 12 ชั่วโมง ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้เพียงร้อยละ 93.85 และร้อยละ 89.82 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 14 ซึ่งใกล้เคียงกับรายงานการทดลองของ Gilliland และ Spect (1977) ที่พบว่าประสิทธิภาพการยับยั้ง S. aureus B92 และ E. coli 0222 : B4 โดยเชื้อ Lactobacillus acidophilus 4962 เป็นร้อยละ 98.2 และ 87.0 ตามลำดับ และได้รายงานว่า L. acidophilus 4962 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก (S. aureus และ Clostridium perfringens) ได้สูงกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (S. typhimurium และ E. coli) นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยร่วมกัน คือ ปริมาณกรด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารยับยั้งอื่นๆ รวมทั้ง antibiotic like substances ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น (Gilliland and Spect, 1977 ; Gonzalez, *et al.*, 1993)

ตารางที่ 14 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน

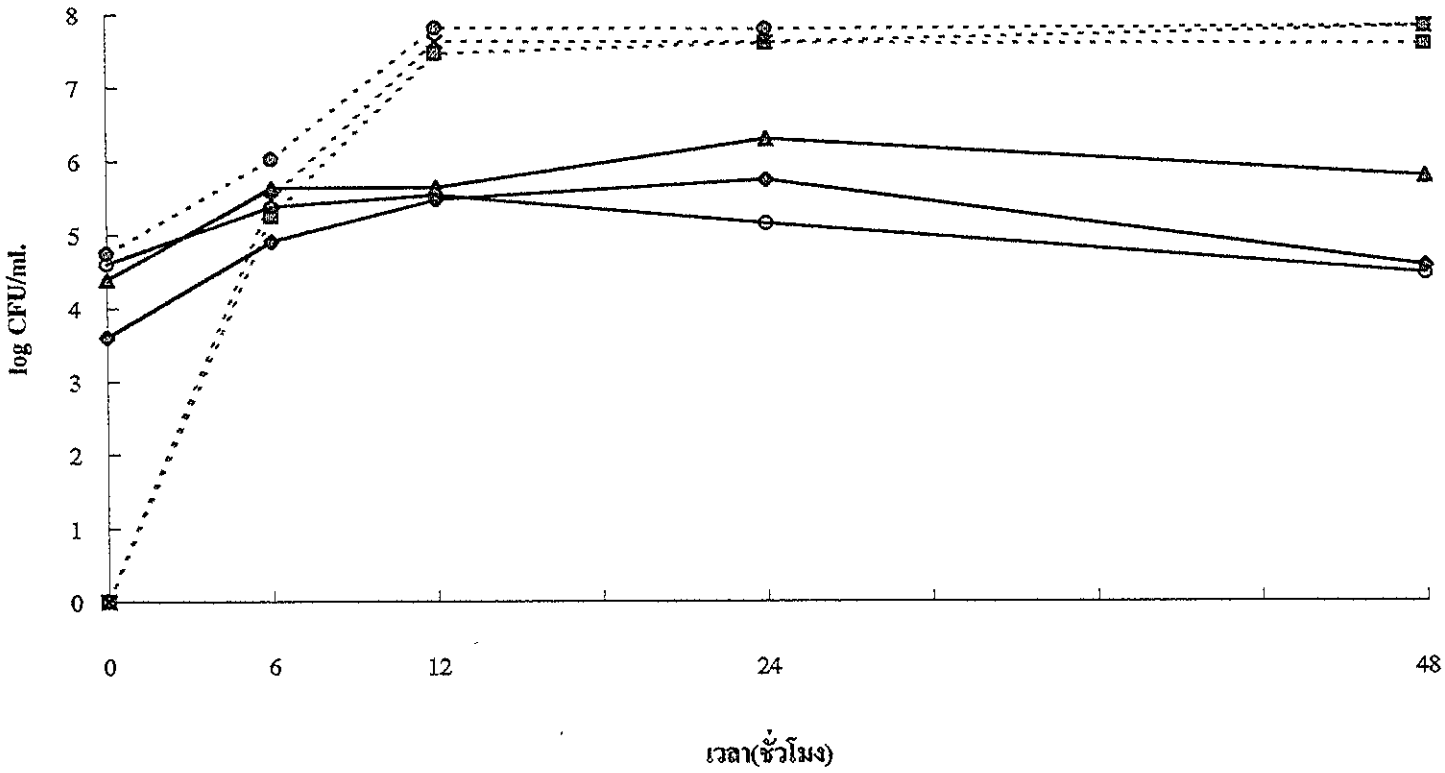
แบคทีเรียแลกติก/ แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	จำนวนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์		ร้อยละการยับยั้ง
	ชุดควบคุม	ชุดเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลกติก	
L. casei ssp. rhamnosus SN11/			
S. aureus	1.52×10^8	1.8×10^6	98.28
S. lactis SN33/ L. sake	2.21×10^8	3.0×10^6	98.64
S. lactis SN48/			
E. coli	1.22×10^8	7.5×10^6	93.85
E. coli 0157:H7	1.09×10^8	1.11×10^7	89.82
Streptococcus sp. SN61/			
L. plantarum	1.93×10^8	2.0×10^6	99.32
L. monocytogenes 018	2.46×10^8	3.0×10^6	93.78
S. lactis SN62/			
Carnobacterium sp. M114-25	2.42×10^8	7.0×10^6	97.10

7. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ S. aureus โดยแบคทีเรียแลกติก L. casei ssp. rhamnosus SN11 ในส้มฟัก

การทดลองหมักส้มฟักใน 3 ชุดทดลอง คือ ส้มฟักหมักตามธรรมชาติ(ชุดควบคุม) ส้มฟักที่เติมเชื้อ S. aureus และ ส้มฟักที่เติมเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 ร่วมกับ S. aureus แล้วเก็บตัวอย่างเพื่อนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก และจำนวนเชื้อ S. aureus ที่ระยะเวลาต่างๆ พบว่า จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกในส้มฟักทั้ง 3 ชุดทดลอง จะเริ่มใกล้เคียงกันในชั่วโมงที่ 12 และ ในส้มฟักที่มีการเติมเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 ร่วมกับ S. aureus ตรวจพบจำนวนเชื้อ S. aureus น้อยกว่าในส้มฟักที่มีการเติมเชื้อ S. aureus อย่างเดียว และส้มฟักที่เป็นชุดควบคุม ที่ระยะการหมัก 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งคิดเป็นค่าร้อยละการยับยั้งในส้มฟักที่เติมเชื้อผสม เทียบกับส้มฟักที่เติมเชื้อ S. aureus ได้เท่ากับร้อยละ 92.66 และ 95.17 ตามลำดับ ดังผลการทดลองในตารางที่15 และ ภาพที่ 17 แสดงว่าในการหมักส้มฟักที่มีการเติมเชื้อL. casei ssp. rhamnosus SN11 สามารถชลอการเพิ่มปริมาณของเชื้อ S. aureus ได้ และค่าร้อยละการยับยั้งเชื้อ S. aureus มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น

ตารางที่ 15 การเปลี่ยนแปลงจำนวนของเชื้อ S. aureus และ L. casei ssp. rhamnosus SN11 ในระหว่างการหมักส้มฟัก

เวลา (ชั่วโมง)	ส้มฟักหมักตามธรรมชาติ			ส้มฟักเติมเชื้อ S. aureus			ส้มฟักเติมเชื้อ S. aureus + SN11			ร้อยละการยับยั้ง
	log CFU/g			log CFU/g			log CFU/g			
	S. aureus	Lactic acid bacteria	pH	S. aureus	Lactic acid bacteria	pH	S. aureus	Lactic acid bacteria	pH	(%)
0	3.60	0	6.24	4.39	0	6.21	4.60	4.74	6.08	0
6	4.96	5.25	6.15	5.63	5.49	6.12	5.38	6.02	5.88	44.19
12	5.48	7.46	5.42	5.63	7.63	5.39	5.54	7.81	5.40	18.60
24	5.74	7.60	5.07	6.29	7.61	5.00	5.15	7.79	4.84	92.66
48	4.57	7.58	4.58	5.78	7.83	4.63	4.46	7.83	4.50	95.17



ภาพที่ 17 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกและ S. aureus ในส้มฟักที่ระยะการหมักต่างๆ

S. aureus ในส้มฟักหมักตามธรรมชาติ

S. aureus ในส้มฟักที่เติม S. aureus

S. aureus ในส้มฟักที่เติม S.aureus+SN11

LAB.ในส้มฟักหมักตามธรรมชาติ

LAB.ในส้มฟักที่เติม S. aureus

LAB. ในส้มฟักที่เติม S.aureus+SN11

บทที่ 4

สรุป

ในการแยกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 14 ชนิด สามารถแยกแบคทีเรียแลกติก ที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้ทั้งหมด 86 ไอโซเลต โดยแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืชจำนวน 14 ไอโซเลต และเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์จำนวน 72 ไอโซเลต

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ซึ่งแยกได้ทั้ง 86 ไอโซเลต มาทำการเทียบเคียงและคัดเลือกไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สูงจำนวน 5 ไอโซเลต พบว่า คือ Lactobacillus casei ssp. rhamnosus SN11, Streptococcus lactis SN33, Streptococcus lactis SN48, Streptococcus sp. SN61 และ Streptococcus lactis SN62 โดย Lactobacillus casei ssp. rhamnosus SN11 สามารถยับยั้ง S. aureus ได้ดีที่สุด Streptococcus lactis SN33 สามารถยับยั้ง L. sake ได้ดีที่สุด Streptococcus lactis SN48 สามารถยับยั้ง E. coli และ E. coli 0157:H7 ได้ดีที่สุด Streptococcus sp. SN61 สามารถยับยั้ง L. plantarum และ L. monocytogenes 018 ได้ดีที่สุด และ Streptococcus lactis SN62 สามารถยับยั้ง Carnobacterium sp. M114-25 ได้ดีที่สุด

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ และ การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกทั้ง 5 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11, S. lactis SN33, S. lactis SN48, Streptococcus sp. SN61 และ S. lactis SN62 มีการเจริญและสร้างสารยับยั้งได้ดี เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS pH เริ่มต้น 5.5 เวลา 18 ชั่วโมง, APT pH เริ่มต้น 6.7 เวลา 12ชั่วโมง, MRS pH เริ่มต้น 6.5 เวลา 12 ชั่วโมง, APT pH เริ่มต้น 6.7 เวลา 18 ชั่วโมง และ APT pH เริ่มต้น 6.7 เวลา 12 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยพบว่าที่เวลาที่เชื้อแบคทีเรียแลกติก มีการเจริญสูงสุด การสร้างสารยับยั้งก็จะสูงสุดด้วย เมื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่ทำการทดลอง มีการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ที่

อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส ยกเว้น S. lactis SN48 มีการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับค่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ(AU/ml) ของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส มีค่าไม่แตกต่างกัน ยกเว้น S. lactis SN62 ที่มีค่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส สูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

การศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ พบว่าสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน โดยสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ยังคงมีกิจกรรมที่ อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส 45 นาที แต่สำหรับสารยับยั้งจาก L. casei ssp. rhamnosus SN11 และ S. lactis SN33 ยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที และ 100 องศาเซลเซียส เวลา 60 นาที ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของ pH ต่อความคงตัวของสารยับยั้ง พบว่า สารยับยั้งที่สร้างจาก L. casei ssp. rhamnosus SN11, S. lactis SN33, Streptococcus sp. SN61 และ S. lactis SN62 ยังคงมีกิจกรรมที่ pH 5.0 5.5 6.0 และ 7.0 ส่วนสารยับยั้งจาก S. lactis SN48 ซึ่งยับยั้งการเจริญของ E. coli จะสูญเสียกิจกรรมที่ pH ทั้ง 4 ระดับ แต่ยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ E. coli 0157:H7 เฉพาะที่ pH 5.0

เมื่อทำการศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ catalase ต่อความคงตัวของสารยับยั้ง พบว่า เอนไซม์ trypsin และα-chymotrypsin สามารถยับยั้งกิจกรรมของสารยับยั้ง จากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกทั้ง 5 สายพันธุ์ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วนเอนไซม์ pronase E proteinase K และ pepsin ยับยั้งกิจกรรมของสารยับยั้ง จากแบคทีเรียแลกติกได้อย่างสมบูรณ์บางสายพันธุ์ ซึ่งแสดงว่าสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกทั้ง 5 สายพันธุ์ เป็นสารโปรตีนหรือสารเปปไทด์ และเป็นแบคเทอริโอซิน และพบว่าเอนไซม์ catalase ทำให้กิจกรรมของสารยับยั้งลดลงบ้างเล็กน้อย ยกเว้นสารยับยั้งจาก L. casei ssp. rhamnosus SN11 และ S. lactis SN48 ที่ยังคงมีกิจกรรมอยู่เท่าเดิม ซึ่งเป็นไปได้ว่าการที่แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ถูกยับยั้งการเจริญ เป็นผลร่วมจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วย

แบคทีเรียแลกติกที่สร้างแบคเทอริโอซินสายพันธุ์ที่คัดเลือก มีประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ S. aureus, L. sake, E. coli, E. coli 0157:H7, L. plantarum, L. monoytogenes 018 และ Carnobacterium sp. M114-25 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน ได้ร้อยละ 98.28, 98.64, 93.85, 89.82, 99.32, 93.78 และ 97.10 ตามลำดับ

การหมักส้มฟักที่มีการเติมเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus SN11 สายพันธุ์ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินร่วมกับเชื้อ S. aureus พบว่า L. casei ssp. rhamnosus SN11 สามารถชลอการเพิ่มปริมาณของเชื้อ S. aureus ได้ในระยะเวลาการหมักส้มฟัก 24-48 ชั่วโมง และค่าร้อยละการยับยั้งเชื้อ S. aureus มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น

ข้อเสนอแนะ

แม้ว่าการศึกษาครั้งนี้ทำให้สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติก ที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ จึงเป็นการประกันความปลอดภัยของอาหารหมักได้ระดับหนึ่ง แต่ควรมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมดังนี้

1. ศึกษาการเติมชนิดและปริมาณสารอาหารต่างๆ จากธรรมชาติที่มีราคาถูก เช่น หางนม ยีสต์สกัด ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน และเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

2. ศึกษาการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารตลอดจน ศึกษาการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับกรรมวิธีอื่นๆ เช่น การดัดแปรสภาพบรรยากาศ การใช้ความร้อน และควรมีการศึกษาถึงสภาวะ และชนิดของผลิตภัณฑ์ที่จะนำไปใช้ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการใช้แบคเทอริโอซินเป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหาร

เอกสารอ้างอิง

ดุษณี ธนะบริพัฒน์. 2537. อาหารหมัก. ใน จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. หน้า 6-1 - 6-71. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ทองคำ คิมหะมานนท์. 2538. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตปลาหมัก(ส้มฟัก). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นภา โล่ห์ทอง. 2531. ซีอิ๊ว. ว. วิทยาศาสตร์. 42(4) : 217 - 224.

นภา โล่ห์ทอง. 2535. กล้าแบคทีเรีย. ใน กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. หน้า 122-145. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นัยทัศน์ ภู่ศรัณย์. 2529. การถนอมอาหารโดยการหมักดอง. ใน จุลชีววิทยาทางอาหาร. หน้า 280-287. สงขลา : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ไปรมา ยงมานิตชัย. 2531. ไนซิน-สารกันบูดธรรมชาติ. ว. อาหาร. 18(1) : 37-40.

ประสิทธิ์ อติวีระกุล. 2527. ผลิตภัณฑ์ผลไม้และผักดอง. ใน เทคโนโลยีของผลไม้และผัก. หน้า 232-250. สงขลา : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พูนสุข ประเสริฐสรรพ์. 2536. การผลิตซีอิ๊ว. ใน อุตสาหกรรมหมักดอง. หน้า 136-146. สงขลา : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะทรัพยากรธรรมชาติ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์. 2538. การคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. 2521. เต้าเจี้ยวและซีอิ๊ว และ อาหารหมักดอง. ในอุตสาหกรรมหมักดอง. หน้า 115-125. กรุงเทพ. : ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. 2536. อาหารหมักประเภทนมและผลิตภัณฑ์นม. ใน จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม จุลินทรีย์กับอุตสาหกรรม. หน้า 59-142. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา.

วิชาญ อัณประยูร. 2537. วิธีการผลิตแหนมแบบดั้งเดิม และปัญหาของการผลิต. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการเรื่องทิศทางการผลิตแหนมยุคใหม่ ณ. โรงแรมปางสวนแก้ว จ. เชียงใหม่. 10 พฤศจิกายน 2537. หน้า 1-4.

วิเชียร วรพุทธพร. 2526. การถนอมและแปรรูปอาหารโดยใช้จุลินทรีย์. ว. แก่นเกษตร. 11(3) : 97-99.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2522. จุลินทรีย์ในซีอิ๊ว. ใน ซีอิ๊ว. หน้า 38-40. กรุงเทพฯ : ภาควิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. โปรซีดดิงส์แลกติกแอสิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2530. อาหารหมักดอง. ใน จุลชีววิทยาทางอาหาร. หน้า 98- 111. สงขลา : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2533. การสืบพันธุ์และการเติบโต. ใน ชีววิทยาของแบคทีเรีย. หน้า 64-87. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมัก. ใน ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. หน้า 3-33. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อรพิน ภูมิภมร. 2526. น้ำปลาและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก และ ซีอิ๊วและผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก. ใน จุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอาหารหมักพื้นเมือง. หน้า 71-140. กรุงเทพ ฯ : ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรวินท์ เลาหรัชตนันท์. 2532. สารกันเสียในอาหารจากแบคทีเรียกลุ่มสร้างกรดแลกติก. ว.อาหาร. 99(3): 202-206.

Axelsson, L. T. 1993. Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology. *In* Lactic Acid Bacteria (ed. S. Salminen and A. von Wright) pp. 1-64 . New york : Marcel Dekker.

Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. 1983. Detection and Activity of Lactacin B, a Bacteriocin Produced by Lactobacillus acidophilus. Appl. Environ. Microbiol. 45 : 1808-1815.

Barefoot, S. F. and Klaenhammer, T. R. 1984. Purification and Characterization of the Lactobacillus acidophilus Bacteriocin Lactacin B. Antimicr. Agents Chemoth. 26 : 328.

Berry, E. D. , Hutkin, R. W. and Mandigo, R. W. 1991. The Use of Bacteriocin - Producing Pediococcus acidilactici to Control Postprocessing Listeria monocytogenes Contamination of Frankfurters. J. Food Prot. 54 : 681-686.

Brink, B. T. , Minekus, M. , Vossen, J. M. B. M. V. D. , Leer, R. J. and Veld, J. H. J. H. I. 1994. Antimicrobial Activity of Lactobacilli : Preliminary Characterization and Otimization of Acidocin B, a Novel Bacteriocin Produced by Lactobacillus acidophilus M46. J. Appl. Bacteriol. 77 : 140-148.

Cutter, C. N. and Siragusa, G. R. 1995. Population Reductions of Gram-Negative Pathogens Following Treatments with Nisin and Chelators Under Various Conditions. J. Food Prot. 58 : 977-983.

Daba, H. , Lacroix, G. , Huang, J. and Simard. R. E. 1993. Influence of Growth Conditions on Production and Activity of Mesenterocin 5 by a Strain of Leuconostoc mesenteroides. Appl Microbiol Biotechnol. 39 : 166-173.

Davey, G.P. and Richardson, B.C. 1981. Purification and Some Properties of Diplococcin from Streptococcus cremoris 346. Appl Environ Microbiol. 84-89.

Dean, J.P. and Zottola, E.A. 1996. Use of Nisin in Ice Cream And Effect on the Survival of Listeria monocytogenes. J. Food Prot. 59 : 476-480.

El-Khateib, T. , Yousef, A. E. and Ockerman, H. W. 1993. Inactivation and Attachment of Listeria monocytogenes on Beef Muscle Treated with Lactic Acid and Selected Bacteriocin. J. Food Prot. 56 : 29-33.

Farias, M.E. , Holgada, A.P. D. R. and Sesma, F. 1994. Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria Isolated from Regional Cheeses : Inhibition of Foodborne Pathogens. J. Food Prot. 57 : 1013-1015.

Fricourt, B. V. , Barefoot, S. F. , Testin, R.F. and Hayasaka, S. S. 1994. Detection and Activity of Plantaricin F an Antibacterial Substance from Lactobacillus plantarum BF101 Isolated from Processed Channel Catfish. J. Food Prot. 57 : 698-702.

Geis, A. , Singh, J. and Teuber, M. 1983. Potential of Lactic Streptococci to Produce Bacteriocin. Appl. Environ. Microbial. 45 : 205-211.

Gilliland, S. E. and Spect, M. L. 1977. Antagonistic Action of Lactobacillus acidophilus Toward Intestinal and Foodborn Pathogens in Associated Cultures. J. Food Prot. 40 : 820-823.

Giraffa, G. , Neviani, E. and Veneroni, A. 1990. Use of Conductance to Detect Bacteriocin Activity. J. Food Prot. 53 : 772-776.

Giraffa, G. , Carminati, D. , and Tarelli, G.T. 1994. Inhibition of Listeria innocua in Milk by Bacteriocin-Producing Enterococcus faecium 7C5. J. Food Prot. 58 : 621-623.

Gonzalez, S. N. , Apella, M. C. , Romero, N. C. , Nader, M. C. and Olive, G. 1993. Inhibition of Enteropathogen by Lactobacilli Strains Used in Fermented Milk. J. Food Prot. 56 : 773-775.

Hanlin, M. B. , Kalchayand, N. and Ray, B. 1993. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria in Combination Have Greater Antibacterial Activity. J. Food Prot. 56 : 252-255.

Hoover, D.G. 1993. Bacteriocins with Potential for Use in Foods. *In* Antimicrobial in Foods. (ed. P. M. Davidson and A.L. Branen) pp. 409-440. Newyork : Dekker.

Hoover, D.G. and Harlander, S.K. 1993. Screening Methods for Detection Bacteriocin Activity. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. (ed. D.G. Hoover and L.R. Steenson) pp. 23-39. California : Academic Press.

Hsieh, H. Y. , Paik, H. D. and Glatz, B. A. 1996. Improvement of Detection and Production of Propionicin PLG-1, a Bacteriocin Produced by Propionibac terium thoenii. J. Food Prot. 59 : 734-738.

Hurst, A. and Hoover, D.G. 1993. Nisin. *In* Antimicrobials in Foods. (ed. P.M. Davidson and A.L. Branen) pp. 369-394. Newyork : Dekker.

Jarvis, B. and Mahoney, R. R. 1969. Inactivation of Nisin by Alphachymotrypsin. J. Diary Sci. 52 : 1448.

Jimenez-Diaz, R. , Rios-Sanchez, R. M. , Desmazeaud, M. , Ruiz-Barba, J.L. and Paird, J. C. 1993. Plantaricin S and T , Two New Bacteriocins Produced by Lactobacillus plantarum LPCO10 Isolated from a Green Olive Fermentation. Appl. Environ. Microbial. 59 : 1416-1424.

Joerger, M. C. and Klaenhammer, T. R. 1986. Charactrization and Purification of Helveticin J and Evidence for a Chromosomally Determined Bacteriocin Produced by Lactobacillus helveticus 481. J. Bacteriol. 167 : 439-446.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, Nonsporing Gram - Positive Rod. *In* Bergey'S Mannual of Systematic Bacteriology(ed. P.H.A. Sneath)Vol. II. pp.1208-1234. Baltimore : William & Wilkins.

Kawai, Y. , Saito, T. , Samant, S.K. and Itoh, T. 1994. Isolation and Characterization of a Highly Hydrophobic New Bacteriocin (Gassericin A) from Lactobacillus gasseri LA39. J. Biosci. Biotech Biochem. 58 : 1218-1211.

Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. J. Biochimie. 70 : 337-349.

Larsen, A. G. , Vogensen, F.K. and Josephen, J. 1993. Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Sour Doughs : Purification and Characterization of Bavaricin A , a Bacteriocin Produced by Lactobacillus bavaricus MI401. J. Appl. Bacteriol. 75 : 113-122.

Lyon, W. J. , Olson, D.G. and Murano, E. A. 1995. Isolation and Purification of Enteriocin EL1, a Bacteriocin Produced by a Strain of Enterococcus faecium. J. Food Prot. 58 : 890-898.

Mathieu, F. , Suwandhi, I. S. , Rekhif, N. , Milliere, J. B. and Lefebvre, G. 1993. Mesenterocin 52 , a Bacteriocin Produced by Leuconostoc mesenteroides ssp. mesenteroid FR52. J. Appl. Bacteriol. 74 : 372-379.

McMullen, L.M. and Stiles, M.E. 1996. Potential for Use of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria in the Preservative of Meats. J. Food Prot. 64-71.

Muriana, P. M. 1996. Bacteriocins for Control of Listeria spp. in Food. J. Food Prot. 54-63.

Muriana, P. M. and Klaenhammer, T. R. 1987. Conjugal Transfer of Plasmid-Encoded Determinants for Bacteriocin Production and Immunity in Lactobacillus acidophilus 88. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 553-560.

Nettles, C. G. and Barefoot, S. F. 1993. Biochemical and Genetic Characteristic of Bacteriocin of Food Associated Lactic Acid Bacteria. J. Food Prot. 56 : 338-356.

NG. M.C. 1987. Determination of salt. *In* Laboratory Manual on Analytical Methods and Procedure for Fish Products (ed. H. Hiroshi) pp. 5.1-5.2. Singapore : SEAFDEC.

Nielsen, J. W. , Dickson, J. S. and Crouse, J. D. 1990. Use of a Bacteriocin Produced by Pediococcus acidilactici to Inhibit Listeria monocytogenes Associated with Fresh Meat. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 2142-2145.

Okereke, A. and Montville, T. J. 1991. Bacteriocin Inhibition of Clostridium botulinum Spores by Lactic Acid Bacteria. J. Food Prot. 54 : 349-353.

Parente, E. and Hill, C. 1992. Characterization of Enterocin 1146 , a Bacteriocin from Enterococcus faecium Inhibitory to Listeria monocytogenes. J. Food Prot. 55 : 197-502.

Pilet, M. F. , Dousset, X. , Marre, R. , Novel, G. , Desmazeaud, M. and Paird, J. R. 1994. 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.

Pucci, M. J. , Vedamuthu, E. R. , Kunka, B. S. and Vandenbergh, P. A. 1988. Inhibition of Listeria monocytogenes by Using Bacteriocin PA-1 Produced by Pediococcus acidilactici PAC 1.0. Appl. Environ. Microbiol. 54 : 2349-2353.

Samelis, J. , Roller, S. and Metaxopoulos, J. 1994. Sakacin B , a Bacteriocin Produced by Lactobacillus sake Isolated from Greek Dry Fermented Sausages. J. Appl. Bacteriol. 76 : 475- 486.

Schillinger, U. 1990. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. *In* Biotechnology and Food safety. (ed. D. D. Bills, S. Kung, D. Westhoff, B. Quebedeaux, E.

Raleigh, J. Goss, A. Kotula, A. Watada) pp. 55-63. USA : Butterworth-Heinemann.

Schillinger, U. and Lucke, F. K. 1989. Antibacterial Activity of Lactobacillus sake Isolated from Meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1901-1906.

Stevens, K. A. , Sheldon, B. W. , Klapes, N. A. and Klaenhammer, T. R. 1992. Effect of Treatment Conditions on Nisin Inactivation of Gram Negative Bacteria. J. Food Prot. 55 : 763-766.

Stiles, M.E. 1993. Bacteriocins from Carnobacterium and Leuconostoc. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. (ed. D.G. Hoover and L.R. Steenson) pp. 211-218. California : Academic Press.

Voughan, E. E. , Caplice, E. , Looney, R. , O' Rourke, N. , Coveney, H. , Daly, C. and Fitzgerald, G. F. 1994. Isolation from Food Sources of Lactic Acid Bacteria that Produced Antimicrobial. J. Appl. Bateriol. 76 : 118-123.

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

ตารางภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 การเจริญ($OD._{660}$)และประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml.)เชื้อ S. aureus ของ L. casei ssp. rhamnosus SN11 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และ pH ต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	OD.660 nm. และ AU/ml. /แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	อาหารเลี้ยงเชื้อและ pH											
		MRS			BHI			M17			APT		
		5.0	5.5	6.5	5.0	5.5	7.2	5.0	5.5	7.15	5.0	5.5	6.7
0	$OD._{660}$	0.38	0.35	0.37	0.38	0.38	0.38	0.35	0.36	0.38	0.41	0.39	0.37
	AU/ml. / S. aureus	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	$OD._{660}$	0.43	0.47	0.43	0.41	0.43	0.43	0.36	0.36	0.41	0.44	0.43	0.4
	AU/ml. / S. aureus	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	$OD._{660}$	0.67	0.75	0.77	0.55	0.6	0.61	0.45	0.42	0.43	0.68	0.71	0.68
	AU/ml. / S. aureus	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	$OD._{660}$	1.06	1.27	1.44	0.65	0.74	0.82	0.48	0.46	0.45	1.06	1.13	1.16
	AU/ml. / S. aureus	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	$OD._{660}$	1.99	2.47	2.97	0.94	0.94	1.01	0.53	0.55	0.49	1.86	2.16	2.21
	AU/ml. / S. aureus	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
8	$OD._{660}$	6.27	7.11	8.78	1	1.05	1.16	0.97	1.18	1	5.03	5.9	6.12
	AU/ml. / S. aureus	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
12	$OD._{660}$	8.56	9.66	10.27	1.05	1.07	1.16	1.52	1.84	1.46	6.26	6.81	6.27
	AU/ml. / S. aureus	10	10	15	0	0	0	0	0	0	0	0	0
18	$OD._{660}$	10.94	13.82	12.25	1.38	1.34	1.33	1.9	2.45	1.92	6.46	6.88	6.49
	AU/ml. / S. aureus	20	25	25	0	0	0	0	0	0	10	10	10
24	$OD._{660}$	10.42	13.8	12.26	1.37	1.36	1.28	2.05	2.61	2.26	6.67	7.31	6.73
	AU/ml. / S. aureus	20	25	25	0	0	0	0	0	0	10	15	10
36	$OD._{660}$	10.4	13.28	11.85	1.29	1.45	1.33	1.92	2.96	2.64	6.26	7.55	6.71
	AU/ml. / S. aureus	20	20	20	0	0	0	0	0	0	10	10	10
48	$OD._{660}$	9.83	12.65	11.15	1.2	1.36	1.41	1.8	2.84	2.66	5.20	6.78	6.0
	AU/ml. / S. aureus	15	20	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0

ตารางที่ 2 การเจริญ ($OD._{660}$)และประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml.)เชื้อ L. sake ของ S. lactis SN33 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและ pH ต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	OD. 660 nm. และ AU/ml./แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	อาหารเลี้ยงเชื้อ และ pH											
		MRS			BHI			M17			APT		
		5.0	5.5	6.5	5.0	5.5	7.2	5.0	5.5	7.15	5.0	5.5	6.7
0	$OD._{660}$	0.28	0.033	0.041	0.028	0.03	0.036	0.045	0.038	0.04	0.051	0.041	0.033
	AU/ml. / L. sake	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0
1	$OD._{660}$	0.045	0.07	0.155	0.135	0.065	0.205	0.215	0.235	0.265	0.19	0.225	0.29
	AU/ml. / L. sake	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0
2	$OD._{660}$	0.075	0.155	0.48	0.24	0.145	0.46	0.29	0.3	0.36	0.44	0.59	0.5
	AU/ml. / L. sake	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0
3	$OD._{660}$	0.1	0.21	0.95	0.31	0.26	0.61	0.32	0.35	0.54	0.58	1.08	1.07
	AU/ml. / L. sake	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0
4	$OD._{660}$	0.125	0.24	1.17	0.41	0.38	0.7	0.36	0.4	0.62	0.72	1.17	2.11
	AU/ml. / L. sake	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0
8	$OD._{660}$	0.42	1.05	2.57	0.51	0.84	0.9	0.54	0.68	1.3	1.37	1.89	2.66
	AU/ml. / L. sake	0	250	150	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	150	250
12	$OD._{660}$	0.84	1.93	2.853	0.78	0.9	1.14	0.75	0.926	1.73	1.87	2.3	3.81
	AU/ml. / L. sake	0	250	250	ND	ND	ND	ND	ND	0	150	250	400
18	$OD._{660}$	1.07	2.84	3.48	0.97	1.11	1.27	0.82	1.24	2.49	2.04	2.85	3.8
	AU/ml. / L. sake	0	300	300	ND	ND	ND	ND	ND	250	150	400	400
24	$OD._{660}$	1.15	2.76	3.44	0.94	1.06	1.11	0.8	1.26	2.41	2.04	2.7	3.72
	AU/ml. / L. sake	0	300	300	ND	ND	ND	ND	ND	250	150	400	400
36	$OD._{660}$	1.1	2.69	3.45	0.91	0.97	1.02	0.69	1.21	2.34	2	2.64	3.7
	AU/ml. / L. sake	0	250	300	ND	ND	ND	ND	ND	250	150	250	300
48	$OD._{660}$	1.1	2.64	3.2	0.87	0.89	0.97	0.64	1.17	2.36	1.92	2.48	3.65
	AU/ml. / L. sake	0	250	250	ND	ND	ND	ND	ND	250	150	250	300

ตารางที่ 3 การเจริญ ($OD._{660}$) และประสิทธิภาพการยับยั้ง (AU/ml.)เชื้อ E. coli และ E. coli 0157:H7 ของ S. lactis SN48 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและ pH ต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	OD. 660 nm. และ AU/ml./แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	อาหารเลี้ยงเชื้อ และ pH											
		MRS			BHI			M17			APT		
		5.0	5.5	6.5	5.0	5.5	7.2	5.0	5.5	7.15	5.0	5.5	6.7
0	$OD._{660}$	0.056	0.065	0.068	0.086	0.073	0.071	0.065	0.066	0.06	0.071	0.065	0.076
	AU/ml. / E. coli	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	/ E. coli 0157:H7	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
1	$OD._{660}$	0.065	0.075	0.165	0.18	0.26	0.26	0.185	0.2	0.165	0.18	0.225	0.29
	AU/ml. / E. coli	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	/ E. coli 0157:H7	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
2	$OD._{660}$	0.075	0.14	0.48	0.415	0.56	0.905	0.22	0.26	0.28	0.45	0.605	0.96
	AU/ml. / E. coli	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	/ E. coli 0157:H7	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
3	$OD._{660}$	0.125	0.275	0.8	0.69	1.05	1.15	0.25	0.29	0.34	0.7	0.9	1.64
	AU/ml. / E. coli	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
	/ E. coli 0157:H7	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
4	$OD._{660}$	0.133	0.395	1.11	0.86	1.15	1.24	0.26	0.33	0.4	1.57	1.17	1.97
	AU/ml. / E. coli	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ E. coli 0157:H7	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
8	$OD._{660}$	0.54	1.82	2.57	0.95	1.05	1.56	0.33	0.5	0.94	1.58	1.86	2.33
	AU/ml. / E. coli	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ E. coli 0157:H7	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
12	$OD._{660}$	0.917	2	2.74	1.03	1.12	1.8	0.44	0.65	1.78	1.56	1.9	2.7
	AU/ml. / E. coli	0	0	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ E. coli 0157:H7	0	0	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
18	$OD._{660}$	0.927	2.17	2.7	1.01	1.12	1.87	0.41	0.68	1.7	1.35	1.75	2.57
	AU/ml. / E. coli	0	10	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ E. coli 0157:H7	0	10	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
24	$OD._{660}$	0.822	1.83	2.48	0.99	0.99	1.78	0.42	0.69	1.59	1.31	1.75	2.48
	AU/ml. / E. coli	0	0	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ E. coli 0157:H7	0	0	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
36	$OD._{660}$	0.826	1.73	2.38	1.1	1.1	1.71	0.41	0.74	1.64	1.24	1.76	2.52
	AU/ml. / E. coli	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ E. coli 0157:H7	0	0	10	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
48	$OD._{660}$	0.756	1.69	2.38	1.04	1.04	1.65	0.46	0.73	1.6	1.22	1.76	2.55
	AU/ml. / E. coli	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ E. coli 0157:H7	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0

ตารางที่ 4 การเจริญ(OD_{660})และประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml.) เชื้อ L. plantarum และ L. monocytogenes 018 ของ Streptococcus sp. SN61 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและ pH ต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	OD.660 nm. และ AU/ml./แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	อาหารเลี้ยงเชื้อ และ pH											
		MRS			BHI			M17			APT		
		5.0	5.5	6.5	5.0	5.5	7.2	5.0	5.5	7.15	5.0	5.5	6.7
	OD_{660}	0.04	0.048	0.05	0.048	0.043	0.046	0.043	0.045	0.05	0.046	0.045	0.048
0	AU/ml./ L. plantarum	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ L. monocytogenes	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	OD_{660}	0.07	0.072	0.13	0.085	0.06	0.06	0.09	0.09	0.125	0.095	0.11	0.125
1	AU/ml./ L. plantarum	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ L. monocytogenes	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	OD_{660}	0.08	0.09	0.19	0.13	0.115	0.26	0.145	0.175	0.235	0.14	0.17	0.245
2	AU/ml./ L. plantarum	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ L. monocytogenes	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	OD_{660}	0.14	0.2	0.52	0.35	0.41	0.535	0.26	0.275	0.4	0.435	0.585	1.08
3	AU/ml./ L. plantarum	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ L. monocytogenes	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	OD_{660}	0.15	0.38	1.05	0.91	1.06	1.46	0.35	0.56	0.611	0.997	1.25	2.285
4	AU/ml./ L. plantarum	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	/ L. monocytogenes	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	OD_{660}	0.42	1.61	2.5	1	1.05	1.64	0.51	0.58	0.73	1.68	2.06	3.21
8	AU/ml./ L. plantarum	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	100
	/ L. monocytogenes	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
	OD_{660}	0.76	1.81	2.77	1.05	1.15	1.75	0.58	0.63	0.8	1.77	2.18	3.55
12	AU/ml./ L. plantarum	0	100	200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	200
	/ L. monocytogenes	0	0	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	100
	OD_{660}	0.76	1.71	2.72	1.04	1.13	1.73	0.57	0.61	0.81	1.73	2.17	3.61
18	AU/ml./ L. plantarum	0	100	200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	100	250
	/ L. monocytogenes	0	100	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	100
	OD_{660}	0.78	1.69	2.67	1.01	1.15	1.83	0.54	0.64	0.74	1.54	2.1	3.6
24	AU/ml./ L. plantarum	0	100	200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	100	250
	/ L. monocytogenes	0	100	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	100
	OD_{660}	0.73	1.67	2.64	0.9	1.06	1.74	0.44	0.61	0.72	1.55	1.99	3.4
36	AU/ml./ L. plantarum	0	100	200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	100	200
	/ L. monocytogenes	0	100	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	100
	OD_{660}	0.67	1.61	2.61	0.94	1.1	1.7	0.44	0.56	0.67	1.49	1.93	3.38
48	AU/ml./ L. plantarum	0	100	200	ND	ND	ND	ND	ND	ND	100	100	200
	/ L. monocytogenes	0	0	100	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0

ตารางที่ 5 การเจริญ($OD._{660}$)และประสิทธิภาพการยับยั้ง(AU/ml.) เชื้อ Carnobacterium sp. M114 -25 ของ S. Lactis SN62 ในอาหารเลี้ยงเชื้อและ pH ต่างๆ

เวลา (ชั่วโมง)	OD. 660 nm. AU/ml./ แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	อาหารเลี้ยงเชื้อและ pH											
		MRS			BHI			M17			APT		
		5.0	5.5	6.5	5.0	5.5	7.2	5.0	5.5	7.15	5.0	5.5	6.7
0	$OD._{660}$	0.045	0.055	0.057	0.065	0.063	0.063	0.07	0.06	0.055	0.047	0.048	0.053
	AU/ml./Carnobacterium sp.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
1	$OD._{660}$	0.07	0.085	0.11	0.135	0.13	0.175	0.135	0.13	0.15	0.125	0.15	0.18
	AU/ml./Carnobacterium sp.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
2	$OD._{660}$	0.08	0.1	0.22	0.24	0.27	0.42	0.225	0.23	0.235	0.235	0.28	0.41
	AU/ml./Carnobacterium sp.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
3	$OD._{660}$	0.09	0.18	0.52	0.35	0.41	0.59	0.305	0.305	0.295	0.56	0.79	1.37
	AU/ml./Carnobacterium sp.	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0
4	$OD._{660}$	0.13	0.35	1.12	0.44	0.81	0.98	0.39	0.42	0.45	0.87	1.33	2.33
	AU/ml./Carnobacterium sp.	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	0
8	$OD._{660}$	0.45	0.98	1.78	0.71	0.85	1.01	0.53	0.58	0.78	1.35	1.9	2.65
	AU/ml./Carnobacterium sp.	0	0	150	ND	ND	ND	ND	ND	0	150	150	250
12	$OD._{660}$	0.63	1.61	2.64	0.81	0.89	1.04	0.55	0.62	1.29	1.67	1.96	2.88
	AU/ml./Carnobacterium sp.	0	150	250	ND	ND	ND	ND	ND	150	250	250	300
18	$OD._{660}$	0.66	1.63	2.66	0.86	0.97	1.09	0.6	0.67	1.81	1.7	2.02	2.85
	AU/ml./Carnobacterium sp.	0	150	250	ND	ND	ND	ND	ND	150	150	250	300
24	$OD._{660}$	0.67	1.59	2.62	0.81	0.91	1.05	0.59	0.69	1.85	1.68	1.93	2.83
	AU/ml./Carnobacterium sp.	0	150	250	ND	ND	ND	ND	ND	150	150	150	300
36	$OD._{660}$	0.66	1.39	2.36	0.74	0.85	1.08	0.52	0.65	1.78	1.61	1.86	2.77
	AU/ml./Carnobacterium sp.	0	0	100	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	100	250
48	$OD._{660}$	0.66	1.38	2.28	0.75	0.82	0.92	0.48	0.64	1.75	1.53	1.8	2.71
	AU/ml./Carnobacterium sp.	0	0	0	ND	ND	ND	ND	ND	0	0	0	100

ภาคผนวก ข

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบเชื้อ และวิธีการทดสอบ

1. MRS (Man Rogosa and Sharpe)

Proteose peptone No.3	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Disstilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH 6.5

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน เติม Brom cresol purple ร้อยละ 1.6 จำนวน 1 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

2. PCA (Plate Count Agar)

Peptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

3. APT (All Purpose Tween)

Yeast extract	7.5 กรัม
Tryptone	12.5 กรัม
Dextrose	10.0 กรัม
Sodium citrate	5.0 กรัม
Thiamine hydrochloride	0.001 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	5.0 กรัม
Manganese chloride	0.14 กรัม
Magnesium sulphate	0.8 กรัม
Ferrous sulfate	0.04 กรัม
Sorbitan monoleate complex	0.2 กรัม
Agar	15.0 กรัม
Distilled water	1000.0 มิลลิลิตร

pH 6.7

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

4. BHI (Brain Heart Infusion)

Calf brains, Infusion from	200.0 กรัม
Beef heart, Infusion from	250.0 กรัม
Proteose peptone	10.0 กรัม
Dextrose	2.0 กรัม

Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.2

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

5. M17 broth

Proteose peptone No.3	5.0	กรัม
Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Beef extract	5.0	กรัม
Ascorbic acid	0.5	กรัม
(Beta-disodium) glycerophosphate	19.0	กรัม
Magnesium sulfate 1.0 M	1.0	มิลลิลิตร
Lactose	5.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.15

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

6. Macconkey Agar

Peptone	17.0	กรัม
Proteose peptone No.3	3.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile salts	1.5	กรัม

Sodium chloride	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

7. MSA (Mannitol Salt Agar)

Proteose peptone No.3	10.0	กรัม
Beef extract	1.0	กรัม
Mannitol	10.0	กรัม
Sodium chloride	75.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

pH 7.2

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

8. LPM Agar Base

Tryptose	10.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Lithium chloride	5.0	กรัม
Glycine anhydride	10.0	กรัม

Phenylethanol	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.3

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ทำให้เย็นที่อุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส

ในการเตรียม complete medium เติมสารละลาย moxalactam ที่ฆ่าเชื้อโดยการกรอง 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ลงในอาหาร agar base ที่ฆ่าเชื้อแล้ว

9. TSB (Triptic Soy Broth)

Trypyone	5.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.3

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

10. Carbohydrate fermentation medium

ใช้อาหาร MRS ที่ไม่มีกลูโคส และเติมคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการลงไปร้อยละ 1 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที และเมื่อเอาออกจากหม้อนึ่งความดัน แช่น้ำเย็นทันที เพื่อให้อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็ว

11. Arginine broth

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
K_2HPO_4	2.0	กรัม

Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
$MnSO_4.4H_2O$	0.04	กรัม
Arginine	3.0	กรัม
Glucose	0.5	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH 7.0

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียว 5 มิลลิลิตรแล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

สารเคมีทดสอบ

สารละลายเนสเลอร์ (Nessler 's reagent) เตรียมได้โดย ละลายโพแทสเซียมไอโอไดด์ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 5 มิลลิลิตร เติมสารละลายเมอคิวริคคลอไรด์อิ่มตัว จนพบว่ามีตะกอนที่เขย่าแล้วไม่ละลายอีก แล้วเติม 9 N โซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น เก็บในขวดสีชา ตั้งทิ้งไว้ให้ตกตะกอนก่อนนำไปใช้

12. MRS broth without Ammonium citrate (ใช้ทดสอบการสร้างก๊าซจากกลูโคส)

Proteose peptone No.3	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Sodium acetate $3H_2O$	5.0	กรัม
ID-salt solution	1.0	มิลลิลิตร
Na_2HPO_4	2.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Distilled water	1000.0	มิลลิลิตร

pH 6.5

ID-salt solution เตรียม 1 มิลลิลิตร

Magnesium sulfate	0.1 กรัม
Manganese sulfate	0.05 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน ใส่ในหลอดทดลองที่มีหลอดดักก๊าซ(durham tube) 5 มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

ภาคผนวก ค

วิธีการวิเคราะห์ปริมาณเกลือ (NaCl)

1. การเตรียมตัวอย่าง

ใช้ตัวอย่างประมาณ 100 กรัม บดผสมให้เข้ากัน

2. รีเอเจนต์

รีเอเจนต์ทั้งหมดใช้ GR grade หรือ AR grade

2.1 การเตรียม 0.1 N Silver nitrate ($AgNO_3$) solution

ละลาย $AgNO_3$ 17 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร ในขวดวัดปริมาตร เก็บในขวดสีชา

2.2 การเตรียม Potassium chromate indicator, K_2CrO_4

ละลาย K_2CrO_4 5 กรัม ในน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร

3. วิธีการวิเคราะห์

3.1 ชั่งตัวอย่าง 25 กรัม ในบีกเกอร์ขนาด 400 มิลลิลิตร

3.2 เติมน้ำร้อนปริมาตร 200 มิลลิลิตร คนเป็นเวลา 60 นาที

3.3 กรองผ่านใยแก้ว ปรับปริมาตรของส่วนใสที่ได้จากการกรองให้เป็น 250 มิลลิลิตร ในขวดวัดปริมาตร เขย่าให้เข้ากัน

3.4 นำส่วนใสจากข้อ 3.3 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ในฟลาสก์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร และเติม K_2CrO_4 indicator 1 มิลลิลิตร

3.5 ไตเตรตด้วย 0.1 N $AgNO_3$ (S มิลลิลิตร) จุดยุติจะเปลี่ยนสีจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาลแดง

3.6 ทำ blank โดยใช้น้ำกลั่น 60 มิลลิลิตร และเติม K_2CrO_4 1 มิลลิลิตร (B ml.)

4. วิธีการคำนวณ

$$\text{เกลือ (\%)} = \frac{250 \text{ ml.}}{10 \text{ ml.} \times 25 \text{ g.}} \times (S - B) \times F \times 100$$

โดยที่ S = ปริมาตรของสารละลาย $AgNO_3$ 0.1 N ที่ใช้ในการไตเตรตตัวอย่าง เป็นมิลลิลิตร

B = ปริมาตรของสารละลาย $AgNO_3$ 0.1 N ที่ใช้ในการไตเตรต blank เป็นมิลลิลิตร

F = Conversion factor ของ $AgNO_3$ 0.1 N 1 มิลลิลิตร เป็น 0.005844 กรัม NaCl

ภาคผนวก ง

การเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติก

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

โดยการย้อมสีแบคทีเรียเพื่อดูการติดสีแกรม พร้อมทั้งศึกษารูปร่าง และการจัดเรียงตัวของแบคทีเรียแลกติก มีวิธีการดังนี้

หยดน้ำกลั่นลงบนสไลด์ที่สะอาด เขี่ยเชื้ออายุ 18-24 ชั่วโมง ลงบนน้ำ เกลี่ยให้เชื้อกระจายทิ้งไว้ให้แห้ง นำสไลด์ผ่านเปลวไฟอ่อนๆ เพื่อให้เชื้อติดแน่นกับสไลด์ แล้วหยดทับด้วยcrystal violet ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ หยด gram iodine ทับ ทิ้งไว้อีก 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำจากนั้นหยด 95 % Alcohol แล้วล้างออกทันที สุดท้ายหยดทับด้วย safranin ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างออกด้วยน้ำ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

2.1 การสร้างเอนไซม์คะตาเลส หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วใช้ loop ลนไฟจนร้อนแดง ปล่อยให้เย็น เขี่ยเอาโคโลนีแบคทีเรียแลกติก อายุ 24-36 ชั่วโมง ซึ่งเจริญใน MRS agar นำไปวางบนหยดไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ และเกลี่ยให้เชื้อแพร่กระจาย สังเกตถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าการทดสอบเอนไซม์คะตาเลสเป็นบวก ถ้าไม่มีฟองก๊าซแสดงว่าให้ผลการทดสอบเป็นลบ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกให้ผลการทดสอบเป็นลบ

2.2 การทดสอบการสร้างก๊าซจากกลูโคส เขี่ยเชื้อลงในอาหาร MRS broth without Ammonium citrate ที่มีหลอดดักก๊าซ ผลบวกแสดงโดยมีอากาศในหลอดดักก๊าซ

2.3 การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เขี่ยเชื้อลงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ตรวจผลทุกวันจนครบ 7 วัน สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหาร จากสีม่วงแดงเป็นสีเหลือง

2.4 การทดสอบการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีน เขี่ยเชื้อลงในอาหาร Arginine

broth บ่มที่อุณหภูมิห้อง 3-4 วัน หยดสารละลายเนสเลอร์ (Nessler 's reagent) ลงบนเชื้อปริมาตร 10 ไมโครลิตร ผลบวกแสดงโดยมีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำตาลแดง แสดงว่ามีการสร้างแอมโมเนียเกิดขึ้น

2.5 ความสามารถในการใช้สารคาร์โบไฮเดรตบางชนิด แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่ทดสอบ คือ Arabinose Cellobiose Fructose Galactose Glucose Inulin Lactose Maltose Mannitol Mannose Melibiose Melizitose Rhamnose Ribose Sorbitol Sucrose Trehalose และ Xylose โดยใช้ปริมาณร้อยละ 1 ในอาหาร MRS broth (ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส) เขี่ยเชื้อที่จะทดสอบลงในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิห้อง ผลบวกแสดงโดยเชื้อมีการเจริญ และเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

ภาคผนวก จ

การเทียบเคียงสกุล และชนิดของแบคทีเรียแลกติกตาม Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology

ตารางที่ 1. ตารางการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกสกุล Streptococcus spp.

Characteristics	S. lactis	S. raffinolactis
Growth at 40°C	+	-
Growth in broth at pH 9.2	+	-
Growth in broth with 4% NaCl	+	-
Growth in 0.3% Methylene blue in milk	+	-
Growth on 40% bile agar	+	-
Hydrolysis of arginine	+	-
Isoprenoid Quinones	+	-
Acid from		
Dextrin	-	+
Raffinose	-	+
Rhamnose	-	+
Ribose	+	-
Sorbitol	-	+

ตารางที่ 2. ตารางการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกสกุล Pediococcus spp.

Characteristics	1. *P. damnosus*	2. *P. parvulus*	3. *P. inopinatus*	4. *P. dextrinicus*	5. *P. pentosaceus*	6. *P. acidilactici*	7. *P. halophilus*	8. *P. urinaeequi*
Growth at 45°C	−	−	−	−	d	+	−	−
Growth at pH 7.0	−	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.5	+	+	ND	−	+	ND	−	−
Growth in 10% NaCl	−	−	−	−	d	−	+	−
Production of "catalase"	−	−	ND	−	+	+	−	−
Hydrolysis of arginine	−	−	−	−	+	+	−	−
Acid produced from								
Arabinose	−	−	−	−	+	d	+	d
Ribose	−	−	−	−	+	+	+	ND
Xylose	−	−	−	−	d	+	−	d
Rhamnose	−	−	−	−	d	d	−	ND
Lactose	−	−	+	d	d	d	−	d
Maltose	d	+	+	+	+	−	+	+
Melezitose	d	−	−	−	−	−	+	−
Sucrose	d	−	d	d	−	−	+	+
Trehalose	+	d	+	−	+	d	+	+
Maltotriose	d	d	d	+	−	−	+	ND
Dextrin	−	−	d	+	−	−	−	+
Starch	−	−	−	+	−	−	−	−
Glycerol	−	−	−	−	−	−	+	−
Mannitol	−	−	−	−	−	−	−	d
Sorbitol	−	−	−	−	−	−	−	−
Arbutin	d	ND	ND	ND	+	ND	ND	ND
α-Methylglucoside	d	d	d	+	−	−	+	ND
Lactate formed	DL	DL	DL	L-(+)	DL	DL	L-(+) D-(−)	L-(+)

ตารางที่ 3. ตารางการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกสกุล Leuconostoc spp.

Characteristics	1. *L. mesenteroides*, subsp.			2. *L. paramesenteroides*	3. *L. lactis*
	1a. *mesenteroides*	1b. *dextranicum*	1c. *cremoris*		
Acid from					
Amygdalin	d	d	–	(d)	–
Arabinose	+	–	–	d	–
Arbutin	d	–	–	–	–
Cellobiose	d	d	–	(d)	–
Fructose	+	+	–	+	+
Galactose	+	d	d	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Lactose	(d)	+	+	(d)	+
Maltose	+	+	d	+	+
Mannitol	d	d	–	(d)	–
Mannose	+	d	–	+	d
Melibiose	d	d	–	+	d
Raffinose	d	d	–	d	d
Ribose	+	ND	ND	ND	ND
Salicin	d	d	–	–	d
Sucrose	+	+	–	+	+
Trehalose	+	+	–	+	–
Xylose	d	d	–	d	–
Hydrolysis of esculin	d	d	–	d	–
Required for growth					
Uracil	–	–	+	–	–
Guanine + adenine + xanthine + uracil	–	d	+	d	–
Riboflavin	d	d	+	+	+
Pyridoxal	d	d	+	+	–
Folic acid	d	d	+	+	–
Tomato juice factor	–	–	–	–	–
Destruction of tomato juice factor	–	–	–	–	–
Dextran formation	+	+	–	–	–
Dissimilate citrate (carbohydrate present)	d	d	+	d	d
Dissimilate malate					
No carbohydrate present	d	–	–	d	–
Carbohydrate	d	–	–	d	–
Yeast glucose litmus milk	+	+	+	+	+
Acid clot	d	d	d	d	d
Reduction	d	d	–	d	(d)
Gas	d	d	–	–	–
Growth in					
3.0% NaCl	+	d	–	d	d
6.5% NaCl	d	–	–	d	–
Growth at pH					
4.8 (initial)	–	–	–	d	–
6.5 (initial)	+	+	+	+	+
Growth at 37°C	d	+	–	d	+
Final pH in glucose broth	4.5	4.5	5.0	4.4	4.7

ตารางที่ 4. ตารางการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกสกุล Lactobacillus spp. กลุ่ม obligately homofermentative (group 1)

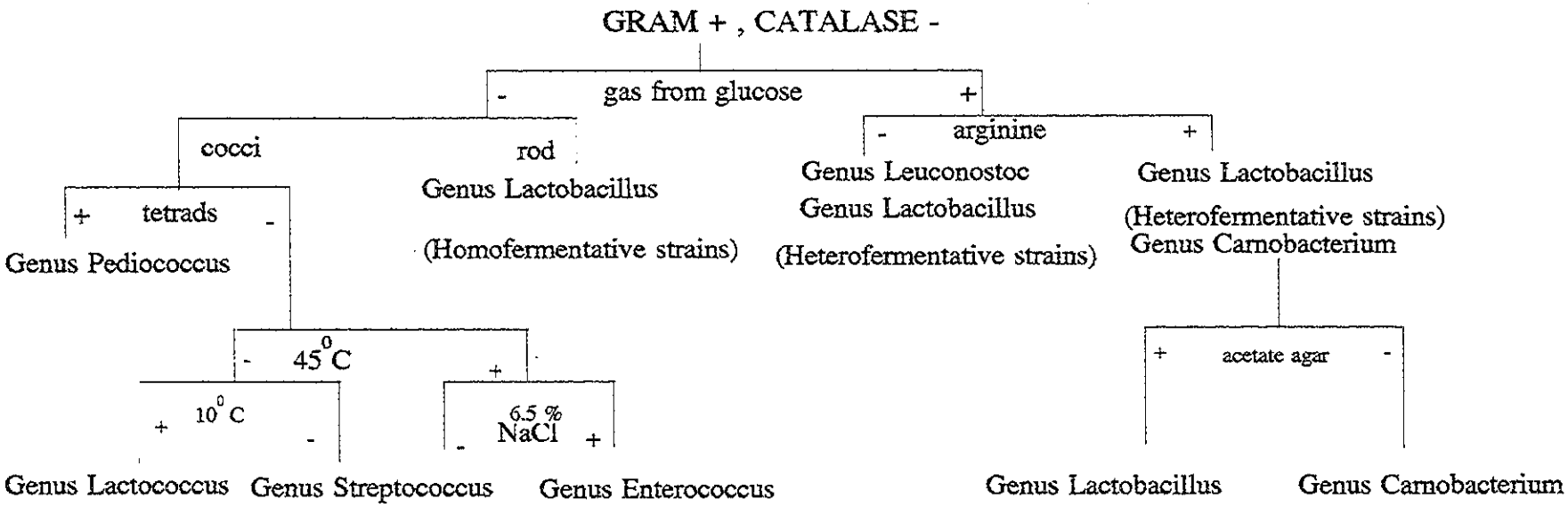
Species	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
1a. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*	−	−	d	−	+	−	+	−	−	d	−	+	−	−	−	−	−	−	+	+	d	−
1b. *L. delbrueckii* subsp. *lactis*	+	−	d	+	+	d	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−
1c. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	−	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
2. *L. acidophilus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	d	d	−	−	+	+	+	d	−
3. *L. amylophilus*	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
4. *L. amylovorus*	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−
5. *L. animalis*	d	d	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	+	+	−	−
6. *L. crispatus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−
7. *L. farciminis*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−
8. *L. gasseri*	+	−	+	+	+	+	+	−	d	d	−	+	−	d	d	−	−	+	+	+	d	−
9. *L. helveticus*	−	−	−	−	d	+	+	−	+	d	−	d	−	−	−	−	−	−	+	−	d	−
10. *L. jensenii*	+	−	+	+	+	+	+	−	−	d	d	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−
11. *L. ruminis*	+	−	+	+	+	+	+	−	d	+	−	+	−	+	+	−	−	+	+	+	−	−
12. *L. salivarius*	−	−	−	d[b]	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	d[b]	−	d[b]	+	+	+	−
13. *L. sharpeae*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−
14. *L. vitulinus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	d	+	d	−
15. *L. yamanashiensis*	+	−	d	+	+	d	+	−	−	−	−	+	−	−	−	d	−	+	+	+	+	−

ตารางที่ 5. ตารางการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกสกุล Lactobacillus spp. กลุ่ม facultatively heterofermentative (group 2)

Species	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
16. *L. agilis*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	d	+	+	−
17. *L. alimentarius*	o	d	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+	−
18. *L. bavaricus*	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+	−	−
19a. *L. casei* subsp. *casei*	+	−	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
19b. *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
19c. *L. casei* subsp. *rhamnosus*	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−
19d. *L. casei* subsp. *tolerans*	−	−	−	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
20a. *L. coryniformis* subsp. *coryniformis*	−	−	−	d	+	+	+	+	d	+	+	+	−	d	d	+	−	d	d	+	−	−
20b. *L. coryniformis* subsp. *torquens*	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	d	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
21. *L. curvatus*	−	−	+	+	+	+	+	+	d	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
22. *L. homohiochii*	−	−	d	o	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	+	d	−	−	d	−
23. *L. maltaromicus*	+	−	+	o	+	+	+	o	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−
24. *L. murinus*	d	+	+	+	+	+	+	−	+	+	d	+	−	+	+	−	+	d	−	+	d	−
25. *L. plantarum*	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	−	+	+	+	+	+	d[b]
26. *L. sake*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+	−

ตารางที่ 6. ตารางการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกสกุล Lactobacillus spp. กลุ่ม obligately heterofermentative (group 3)

Species	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
27. *L. bifermentans*	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−
28. *L. brevis*	−	+	−	d	+	d	+	+	d	+	−	−	−	+	d	−	+	−	−	d	−	d
29. *L. buchneri*	−	+	−	d	+	d	+	+	d	+	−	−	−	+	d	−	+	−	−	d	−	d
30. *L. collinoides*	−	+	−	+	+	+	+	+	d	+	−	−	−	+	−	−	+	d	−	−	−	+
31. *L. confusus*	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	−	+
32. *L. divergens*	+	−	+	o	+	d	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+	−
33. *L. fermentum*	−	d	d	−	+	+	+	+	+	+	−	+w	−	+	+	−	+	−	−	+	d	d
34. *L. fructivorans*	−	−	−	−	+	−	+	d	−	d	−	−	−	−	−	−	+w	−	−	d	−	−
35. *L. fructosus*	o	−	−	o	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
36. *L. halotolerans*	−	−	−	−	+	−	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	−
37. *L. hilgardii*	−	−	−	−	+	d	+	+	d	+	−	−	d	−	−	−	+	−	−	d	−	+
38. *L. kandleri*	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	o	+	−	−	−	−	−
39. *L. kefir*	−	d	−	−	+	−	+	+	+	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−
40. *L. minor*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	−	+	+	−
41. *L. reuteri*	o	+	−	o	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+	−	−	+	−	−
42. *L. sanfrancisco*	o	−	−	o	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
43. *L. vaccinostercus*	−	+	+w	−	−	+w	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+
44. *L. viridescens*	−	−	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	d	d	−



แผนภูมิการจำแนกแบคทีเรียแลกติกที่พบในอาหารหมัก

ที่มา : ดัดแปลงจาก Schillinger และ Lucke (1989)

ตารางที่ 7 สมบัติทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี สำหรับการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ ที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สูง

คุณสมบัติ	แบคทีเรีย				
	SN11	SN33	SN48	SN61	SN62
รูปร่างเซลล์	ท่อนสั้น	กลม	กลม	กลม	กลม
การติดสีแกรม	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์คะตาเลส	-	-	-	-	-
การสร้างแอมโมเนียจากอาร์จีนีน	-	+	+	+	+
การสร้างก๊าซจากกลูโคส	-	-	-	-	-
การเจริญบนอาหาร acetate agar	+	+	+	+	+
การเจริญที่ 10 ^{0}ซ	+	-	-	-	-
การเจริญที่ 45 ^{0}ซ	+	-	-	-	-
การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต					
Arabinose	+	+	+	-	+
Cellobiose	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+
Inulin	-	-	-	-	-
Lactose	+	+	+		+
Maltose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+
Melibiose	-	-	-	-	-
Melizitose	+	+	+	-	+
Rhamnose	+	+	+	-	+
Ribose	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+
Xylose	-	+	+	+	+

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาวศิรินาถ หนูเอก

วัน เดือน ปีเกิด 9 มกราคม 2515

วุฒิ	**ชื่อสถาบัน**	**ปีการศึกษา**
วิทยาศาสตรบัณฑิต(จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2537

เกียรตินิยมอันดับสอง

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนการศึกษาสำหรับนักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา ที่มีผลการเรียนดีเด่น