การยับยั้งแบคทีเรียของสารกันเสียชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำ

Bacterial Inhibition of Biopreservative Producing Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria

มูฮัมหมัดริฎวาน สมานุรัตน์

Muhammadridwan Samanurat

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

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

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การยับยั้งแบคทีเรียของสารกันเสียชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำ

ผู้เขียน นายมูฮัมหมัดริฎวาน สมานุรัตน์

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

..... (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

..... (รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

คณะกรรมการสอบ

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

.....กรรมการ
(ดร.อัจฉรา เพิ่ม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้เป็นผลมาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และขอแสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนเกี่ยวข้อง

ลงชื่อ…….....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

ลงชื่อ…….....
(นายมูฮัมหมัดริฎวาน สมานุรัตน์)
นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....
(นายมูฮัมหมัดริฎวาน สมานุรัตน์)
นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์ การยับยั้งแบคทีเรียของสารกันเสียชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำ
ผู้เขียน นายมูฮัมหมัดริฎวาน สมานุรัตน์
ปีการศึกษา 2556
สาขาวิชา จุลชีววิทยา

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการศึกษาในครั้งนี้เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็น และศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารทะเล โดยแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเลแช่เย็น 14 ตัวอย่าง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกบนอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 15 วัน ได้ 52 และ 22 ไอโซเลทตามลำดับ นำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 โดยวิธี Agar spot assay ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 10^6 CFU/mL พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก 9 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด และมี 17 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ATCC 15313 และ*V. parahaemolyticus* AAHRC 1 ได้ และจากการทดสอบแบคทีเรียแลคติกที่ได้รับความอนุเคราะห์ จำนวน 53 ไอโซเลท พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *V. parahaemolyticus* ได้ 52 ไอโซเลท และสามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ 31 ไอโซเลท และเมื่อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Agar well diffusion ของcell free supernatant (CFS) ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ มีทั้งหมด 22 ไอโซเลท และพบว่ามีเพียง 8 ไอโซเลทเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งได้ทั้ง *Vibrio parahaemolyticus* และ *Listeria monocytogenes* คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ยับยั้งได้ดี 6 ไอโซเลท มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารกันเสียชีวภาพที่มีการแปรผันอุณหภูมิที่ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทุกไอโซเลทมีการเจริญเร็วและ มีค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง เมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เชื้อทุกไอโซเลทจะเจริญได้สูงเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส และเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่าไอโซเลท HYL 25103, SQL 10104 และ SQL 10107 พบฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ตั้งแต่การเจริญชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงทุกอุณหภูมิ

สำหรับฤทธิ์การยับยั้ง *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 นั้น พบว่า ทุกไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ไม่ แสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ ชั่วโมงที่ 24 โดยให้วงใสกว้างมากกว่า 35 มิลลิเมตร และไม่พบวงใสในชั่วโมงที่ 36 และ 48

นำแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 ที่แยกได้จากหมึกกล้วย ซึ่งเจริญและสร้างฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุด เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ CFS มาศึกษาสมบัติของสารกันเสียชีวภาพที่คัดเลือกได้ด้วยการทดสอบกับอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ proteinase K, protease, trypsin และ alpha-chymotrypsin พบว่าเมื่อนำ CFS ไปผ่านอุณหภูมิสูงที่ 63, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีนั้น ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุม ยกเว้น CFS ที่ผ่านอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ลดลง และเมื่อนำ CFS ที่มีการปรับ pH เป็น 6.5 เทียบกับ CFS ที่ไม่มีการปรับ pH พบว่าไม่มีความแตกต่างของการยับยั้งแบคทีเรีย และCFS ที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ยกเว้น CFS ที่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์ trypsin เท่านั้น ที่สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้ แต่มีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ลดลง

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 ด้วยวิธี 16S rRNA sequence พบว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 มีความใกล้เคียงกับ *Carnobacterium divergens* DSM 20263^{T} ซึ่งมี % similarity เท่ากับ 100 % ซึ่งตรงกับ Accesstion number คือ AB 705304.1

จากนั้นนำแบคทีเรีย *Carnobacterium divergens* SQL 10104 มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่มักจะพบในอาหารทะเล (กุ้งขาว) โดยนำกุ้งขาวมาทำให้ปลอดเชื้อและเติมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 10^{6} CFU/mL เพื่อที่จะทดสอบฤทธิ์การยับยั้งโดยใช้ CFS ของแบคทีเรีย *Carnobacterium divergens* SQL 10104 และใช้อาหารเหลว MRS เป็นชุดควบคุม พบว่าเมื่อล้างกุ้งใน อาหารเหลวMRS และใน CFS เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที พบว่า เชื้อก่อโรคในกุ้งลดลง โดยกุ้งที่มีเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 เมื่อล้างใน MRS และใน CFS พบว่า เชื้อลดลงประมาณ 2 log CFU/mL สำหรับกุ้งที่มีเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 เมื่อล้างลงใน MRS เชื้อลดลง 1 log CFU/mL แต่เมื่อล้างลงใน CFS เชื้อลดลงถึง 3 log CFU/mL

Thesis Title Bacterial Inhibition of Biopreservative Producing Psychrotrophic Lactic Acid Bacteria

Author Mr. Muhammadridwan Samanurat

Major Program Microbiology

Academic Year 2013

Abstract

This study aims to select psychrotrophic lactic acid bacteria isolated from seafoods and study bacterial inhibition of biopreservative producing psychrotrophic lactic acid bacteria. 52 and 22 isolates from 14 samples of chilled seafoods cultered on MRS agar medium incubated for 2 and 15 days at 35 ^{o}C and 8^{o}C, respectively were lactic acid bacteria. All of them were investigated the inhibition of 4 strains bacteria indicators: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 incubated at 37 ^{o}C and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 incubated at 20 ^{o}C with last concentration 10^{6} CFU/mL determined by the agar spot method. It was found that 9 isolates were inhibited all of bacteria indicators and 17 isolates were inhibited *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus*. In addition, 53 isolates of lactic acid bacteria were courtesy. Found 52 isolates were inhibited *Vibrio parahaemolyticus* and 31 isolates were inhibited *L. monocytogenes*. Selected lactic acid bacteria were further investigated the inhibition of 2 strains bacteria indicator: *L. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus* by the agar well diffusion method. Lactic acid bacteria cultured on MRS broth medium incubated at 8 ^{o}C for 5 days. Then Centrifuge and sterilization with filtration method as crude filtrate supernatant (CFS), 22 isolates of selected lactic acid bacteria could inhibited at least 1 strain of bacteria indicators and 8 isolates of selected lactic acid bacteria could inhibited both of bacteria inhibitors. 6 isolates of selected lactic acid bacteria were studied about an optimal temperature for growth and biopreservative production at 15, 20, 25 and 30 ^{o}C. All of them could decrease pH in medium, incubated at 30 ^{o}C faster decrease than another temperature. However selected lactic acid bacteria could grew fast but also entered to stationary phase fast. An optimal temperature of selected lactic acid bacteria were 25 ^{o}C except SQL 10104 can growth at 20 ^{o}C. Moreover, investigated the inhibition of bacteria

indicators: HYL 25103, SQL 10104 and SQL 10107 could inhibited *Listeria monocytogenes* since incubated 12 hours of all temperatures. The inhibition of *Vibrio parahaemolyticus* found all of selected lactic acid bacteria could inhibited at 24 hours and could not inhibited after 24 hours.

The selected lactic acid bacteria (SQL 10104) were incubated on MRS at 25 ^{o}C 24 hours for studied characteristics of CFS: tested with temperature, pH and proteases (proteinase K, ptotease, trypsin and alpha-chymotrypsin). The antibacterial activity of CFS treated with 63, 80 and 100^{o}C for 30 minutes on *Listeria monocytogenes* were not changed when compared with the control, except CFS treated with 121^{o}C decrease antibacterial activity. A CFS treated with pH and without treated pH were not difference of antibacterial activity. In addition, CFS treated with proteinase K and alpha-chymotrypsin were not decreased antibacterial activity on *Listeria monocytogenes* when compared with the control, except the CFS treated with trypsin.

Identification of isolate SQL 10104 with 16SrRNA sequence analysis and processed in GenBank database with BLAST, SQL 10104 was *Carnobacterium divergens* DSM 20263^{T} with 100% similarity and matches accestion number of AB705304.1

In addidtion, *Carnobacterium divergens* SQL 10104 was tested for inhibited pathogenic bacteria in seafood (White wild shrimps). The sterile shrimps were added with bacteria inhibitors before washed in CFS of *Carnobacterium divergens* SQL 10104 and MRS broth were a control at 10, 20 and 30 minutes. The results showed that a sterile shrimps were washed with MRS broth and CFS could decreased *Vibrio parahaemolyticus* about 2 log CFU/mL. and MRS broth could decreased *Listeria monocytogenes* about 1 log CFU/mL Moreover, CFS could decreased *Listeria monocytogenes* about 3 log CFU/mL

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความกรุณาและความอนุเคราะห์อย่างดียิ่งจากบุคคลหลายท่าน ซึ่งไม่อาจนำมากล่าวได้ทั้งหมด โดยข้าพเจ้าขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักที่ได้กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการศึกษาค้นคว้าด้วยดีเสมอมา รวมทั้งให้กำลังใจด้วยความเมตตา ห่วงใยและเอาใจใส่ข้าพเจ้าตั้งแต่เริ่มทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนกระทั่งเสร็จสมบูรณ์ ขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ที่กรุณาให้คำปรึกษาในการทำวิจัย และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันธโชติ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ ดร.อัจฉรา เพิ่มกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิจากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ ให้คำแนะนำที่ดีที่เป็นประโยชน์ต่อการเรียนและการทำวิจัย อบรมจรรยามารยาท รวมทั้งให้ความเมตตาแก่ข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อกรี และคุณแม่ไลลา ที่ได้อยู่เบื้องหลังความสำเร็จที่ได้ให้ความช่วยเหลือสนับสนุน และให้กำลังใจตลอดมา

ขอขอบคุณพี่ๆ น้องๆ เพื่อนๆ นักศึกษา และเจ้าหน้าที่ภาคจุลชีววิทยาทุกท่าน ตลอดจนทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวนามมา ณ ที่นี้ด้วย ซึ่งได้สนับสนุน และมีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

มูฮัมหมัดริฎวาน สมานุรัตน์

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(16)
บทที่	
1 บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
การตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	26
2 วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ	
อาหารเลี้ยงเชื้อ และสารเคมี	27
อุปกรณ์และเครื่องมือ	28
แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ	29
วิธีการทดลอง	29
3 ผลการทดลอง	35
4 วิจารณ์ผลการทดลอง	61
5 สรุปผลการทดลอง	66
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	72
ประวัติผู้เขียน	88

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
3.1	จำนวนแบคทีเรียสร้างกรดและแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็นบนอาหาร MRS ที่เติม bromcresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ และ calcium carbonate 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 5-15 วัน ตามลำดับ	35
3.2	การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ด้วยวิธี Agar spot assay	37
3.3	การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติกจำนวน 53 ไอโซเลทที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาว นุชรี ตันติสุวรรณโณ ด้วยวิธี Agar spot assay	38
3.4	การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติก ด้วยวิธี Agar well diffusion assay	42

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
1	ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเล บนอาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0 % และ Bromcresol purple 0.004% บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-7 วัน	77
2	ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเล บนอาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0 % และ Bromcresol purple 0.004% บ่มที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7-15 วัน	81
3	ผลการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	85

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
3.1	แสดงวงใสของการยับยังเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ด้วยวิธี Agar spot ของไอโซเลท SHL 10101 และ FSJ 10105	38
3.2	วงใสการยับยั้งของ CFS ต่อเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (ซ้าย) และ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1(ขวา)	42
3.3	การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25103 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	44
3.4	การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25104 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	45
3.5	การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 25104 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	46
3.6	การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท HYL 25103 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	47
3.7	การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	48
3.8	การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10107ที่เลี้ยงในอาหาร MRS brothบ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	49
3.9	ลักษณะของวงใสของ CFS ที่ได้มาจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้	50

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.10	ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25103, SHL 25104, SQL 25104, HYL 25103, SQL 10104 และ SQL 10107 ที่เจริญในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง	51
3.11	ฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQ L10104 ที่แช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 63, 80, 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีและเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที	53
3.12	ฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 ที่แช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 63, 80, 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีและเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที	53
3.13	แสดงฤทธิ์การยับยั้ง แบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313เทียบกับ CFS ที่มีการปรับ และไม่ปรับ pH	54
3.14	แสดงฤทธิ์การยับยั้ง แบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313เทียบกับ CFS ที่มีการปรับ และไม่ปรับ pH	54
3.15	ฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 ที่ผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ proteinase K, protease, trypsin และ alpha-chymotrypsin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	55
3.16	ฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของCFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 ที่ผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ proteinase K, protease, trypsin และ alpha-chymotrypsin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง	55
3.17	รูปร่างและการจัดเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติก SQL 10104	56
3.18	การจัดลำดับอนุกรมวิธานของสายพันธุ์ SHL 10104	56

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.19	จำนวนเชื้อ Listeria monocytogenes ATCC 15313 ในกุ้งที่เหลือเมื่อผ่านการแช่ใน CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104(ขวา) และการแช่ใน MRS (ขวา) เป็นเวลา 10 นาที	59
3.20	จำนวนเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 ในกุ้งที่เหลือเมื่อผ่านการแช่ใน CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 (ขวา) และการแช่ใน MRS (ขวา) เป็นเวลา 10 นาที	59
3.21	การยับยั้ง*Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1โดยใช้ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 และการแช่ใน MRS เป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที	60
3.22	การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 โดยใช้ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 และการแช่ใน MRS เป็นเวลา 10 20 และ 30นาที	60

สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ

CFU	=	Colony forming unit
^{o}C	=	Degree Celsius
g	=	Gram (s)
pH	=	Hydrogen ion concentration
log	=	Logarithm
µg	=	Microgram (s)
µl	=	Microlitre (s)
mL	=	Mililitre (s)
%	=	Percent

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

ความปลอดภัยของอาหารเป็นเรื่องสำคัญอย่างยิ่งสำหรับผู้ผลิตอาหารและผู้ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการออกกฎหมายเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับประทานอาหารที่ปลอดภัยปราศจากเชื้อก่อโรคและสารเคมีที่เป็นพิษต่อร่างกาย ในปัจจุบันแม้ว่าความรู้ทางจุลชีววิทยาจะพัฒนาก้าวหน้าขึ้นไปมากแต่อัตราการเกิดโรคอาหารเป็นพิษทั่วโลกก็ยังคงเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากวัฒนธรรมในการบริโภคอาหารของมนุษย์ได้เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพเศรษฐกิจ กล่าวคือมนุษย์เริ่มใช้เวลาอย่างเร่งรีบในการใช้ชีวิตในแต่ละวัน กระทั่งอาหารที่ใช้บริโภคนั้นก็ต้องเร่งรีบเช่นกัน อาหารจึงต้องตอบสนองความเร่งรีบของมนุษย์ เช่นการทำอาหารสำเร็จรูป การยืดระยะอายุการเก็บของอาหารเพื่อที่จะได้ซื้ออาหารได้คราวละมากๆและลดเวลาการเดินทางในการซื้ออาหาร ซึ่งสามารถทำได้ทั้งวิธีทางชีวภาพ หรือการใช้สารเคมี ขณะเดียวกันผู้บริโภคก็มีความสนใจเกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพกันมากขึ้นผู้ผลิตอาหารจึงต้องลดปริมาณการใช้เกลือน้ำตาลและสารกันเสียและนำวิธีการอื่นเข้ามาช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารแทนเช่นการใช้ระบบทำความเย็นการใช้ภาชนะบรรจุที่ดัดแปลงสภาพบรรยากาศหรือทำให้เกิดสภาพสุญญากาศเพื่อลดปัญหาการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์รวมทั้งการใช้สารกันเสียชีวภาพเช่นแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) ทดแทนการใช้สารเคมีหรือสารปฏิชีวนะที่อาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค

การป้องกันการเน่าเสียของอาหารนั้นมีหลายวิธี เช่นการทำให้แห้งโดยใช้ความร้อนและความเย็น การเก็บที่อุณหภูมิเย็นซึ่งวิธีเหล่านี้เป็นวิธีทางกายภาพในการเก็บรักษา แต่ก็ยังมีรายงานถึงความไม่สมบูรณ์ในการป้องกันจุลินทรีย์ปนเปื้อน คือมีการพบจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียในการเก็บที่อุณหภูมิต่ำ เช่น *Aeromonas, Alcagines, Arthrobacter* และ *Corynebacterium* เป็นต้น (บุษกร ,2550) นอกจากนี้ยังมีการใช้สารเคมีเติมลงในอาหารเพื่อใช้เป็นสารกันเสีย เช่น benzoic acid และ sodium benzoate ซึ่งสารทั้งสองชนิดนี้เป็นสารกันเสียที่มีฤทธิ์กว้าง (broad spectrum) มักใช้เป็นสารต้านเชื้อ สำหรับยาปฏิชีวนะ เช่น natamycin ซึ่งได้จากเชื้อ *Streptomyces natalensis* ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์แต่ปัจจุบันนี้ก็พบว่ามีจุลินทรีย์หลายชนิดที่ดื้อต่อยา (Magnusson *et al,* 2003) นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นสารกันเสียชีวภาพตามธรรมชาติในอาหารมนุษย์และอาหารสัตว์มานานแล้วได้มีการศึกษา

ถึงสารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกพบว่ามีหลายชนิด เช่น organic acid, phenyllactic acid, proteinaceous compounds และ fatty acids (Magnusson *et al,* 2003)

สารกันเสียชีวภาพหมายถึงสารต้านจุลินทรีย์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิต โดยสารนั้นจะช่วยเพิ่ม shelf life ของอาหารให้นานขึ้น และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคสารกันเสียชีวภาพนั้นถือว่าเป็นนวัตกรรมใหม่ในการยืดอายุการเก็บของอาหาร สารกันเสียชีวภาพที่ผลิตได้นั้นจะนำมาใช้กับอาหารเพื่อยับยั้งแบคทีเรียไม่พึงประสงค์ โดยสารกันเสียชีวภาพนั้นจะประกอบไปด้วยสารหลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอออกไซด์ ไดอะซิทิล และแบคเทอริโอซิน ซึ่งแบคทีเรียที่ผลิตสารเหล่านี้ออกมามาก และน่าสนใจก็คือ กลุ่มของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีผลในการป้องกันการเน่าเสียและการก่อโรคได้ (สมใจ และคณะ, 2550)

สารกันเสียชีวภาพนั้นมักจะพบในอาหารหมักดอง แต่ก็มีรายงานเกี่ยวกับสารกันเสียชีวภาพที่สามารถพบได้ในอาหารที่ไม่หมักดองได้เช่นกัน แต่มีรายงานซึ่งเกี่ยวข้องกับเรื่องนี้น้อยมาก โดยเฉพาะสารกันเสียชีวภาพที่พบจากแบคทีเรียแลคติกในอาหารทะเล และผลการยับยั้งเชื้อ *Listeria* spp. โดยใช้แบคทีเรียแลคติกหลาย*สายพันธุ์*ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล (Nilsson *et al,* 1999) และมีผลการรายงานของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารกันเสียชีวภาพในอุณหภูมิต่ำได้ (Matamoros *et al,* 2009)

มีการรายงานอธิบายถึงแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตสารกันเสียชีวภาพเช่น แบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีนหรือ peptide ซึ่งสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียหลายชนิดแต่ที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหารได้แก่แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นจากแบคทีเรียแลคติกเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมักชนิดต่างๆซึ่งมนุษย์บริโภคมาเป็นเวลานานแล้ว (อรอนงค์, 2007) ดังนั้นผู้บริโภคส่วนใหญ่จึงยอมรับว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักเป็น food-grade organism ที่ปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) และเนื่องจากแบคเทอริโอซินมีโครงสร้างเป็นโปรตีนซึ่งถูกย่อยสลายได้ในระบบย่อยอาหารของมนุษย์จึงมีแนวโน้มที่ปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหารได้ แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับแบคทีเรียแลคติกชนิดที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้นอย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกบางชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* โดยเฉพาะ *Listeria monocytogenes* เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดปัญหาในอุตสาหกรรมอาหารแช่แข็งเป็นอย่างมาก (Guerrieri *et al,* 2009) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงได้ศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารกันเสียชีวภาพได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแช่เย็นเพื่อหาแนวทางในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียชีวภาพและเป็นแนวทางในการผลิตสารกันเสียชีวภาพสำหรับใช้ในการถนอมอาหารทะเลแช่เย็นเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาให้นานขึ้นต่อไป

การตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียแลคติก

เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ แบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และทนในสภาพที่มีอากาศ มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะให้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมักคาร์โบไฮเดรต (Sneath *et al*, 1986) ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียประเภทนี้คือ ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลมและท่อน แบคทีเรียแลคติกขาดสารไซโตโครม (cytochromes) และฟอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์คะทะเลส และออกซิเจน (อรอนงค์, 2551)

แบคทีเรียแลคติกจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae ต้องการอากาศในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) สามารถเจริญได้ในที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และสามารถทนต่อสภาวะที่มีอากาศ (aerotolerant) และทนกรดได้ (Wood and Hopzapfel, 1995) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ต้องใช้ออกซิเจน โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและแลกโทส แบคทีเรียแลคติกเป็นพวกที่มีความต้องการอาหารค่อนข้างซับซ้อน (complex and enrichment media) เชื้อจะเจริญในอาหารที่มี growth factor เช่น ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน นอกจากนี้ยังต้องการวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิด เช่น ไบโอติน (Biotin) และไรโบฟลาวิน (Riboflavin) เป็นต้น ส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณที่ค่อนข้างสูงเช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และฟอสฟอรัส เป็นต้น แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่เป็นพวกที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อประจำถิ่น พบได้ในร่างกาย เช่น บริเวณเยื่อบุภายในท่อทางเดินอาหาร ช่องฟัน และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนั้นยังพบทั่วไปตามธรรมชาติโดยเฉพาะในอาหาร เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์หมักจากธัญพืช ผลิตภัณฑ์เนื้อและปลาหมัก เครื่องในสัตว์ และเครื่องดื่มต่างๆ เป็นต้น(อัจฉรา, 2549)

แบคทีเรียแลคติกจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally Regognized as Safe, GRAS) ซึ่งมนุษย์ได้นำมาใช้ประโยชน์มาเป็นระยะเวลายาวนาน โดยนำมาใช้ในการถนอมอาหาร และใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารหลายประเภท เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่น แบคเทอริโอซิน และกรดอินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น (ภวัต, 2544)

ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียแลคติก คือ ความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ทำให้เกิดรสชาติเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น ผักดอง เนยแข็ง เป็นต้น แบคทีเรียแลคติกโดยเฉพาะในกลุ่ม *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* มีบทบาทในการหมักอาหารและ เครื่องดื่มหลายชนิดเช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่างๆ ผักผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่างๆ และผลิตภัณฑ์หมักที่ได้จากธัญพืช เช่น ขนมจีน ลูกแป้งข้าวหมาก เป็นต้น (สุพรรณิการ์, 2548)

แบคทีเรียแลคติกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการหมักน้ำตาล คือ

1. Homofermentative lactic acid bacteria สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมผ่านวิถีไกลโคไลซีส(glycolysis หรือ Embden-Mayerhof-parnas pathway, EMP pathway) โดยมีกระบวนการหมักเป็นแบบ Homofermentation ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ กลไกการเกิดกรดแลคติก คือ ในขั้นตอนแรกจะเกิดการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นglucose-6-phosphate และ fructose-6-phosphate จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็น dihydroxy-acetone-phosphate และglyceral-3-phosphate ซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน 3 อะตอม ด้วยเอนไซม์ lactatedehydrogenase จากนั้นจะเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิก (pyruvic acid) ด้วยวิถี glycolysisแล้วจึงเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแลคติก85-95เปอร์เซ็นต์ จากกระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกจะได้พลังงาน ATP 2โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 15 $^{\circ}$C เรียกว่า streptobacterium และพวกที่ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 15 $^{\circ}$Cเรียกว่า thermobacterium และแบคทีเรียแลคติกกลุ่มที่มีเมแทบอไลท์แบบ homofermentative ได้แก่ *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Tetranococcus* และบางกลุ่มของ *Lactobacillus* ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* เป็นต้น (สุพรรณิการ์, 2548)

2. Heterofermentative lactic acid bacteria สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลชนิดอื่นผ่านวิถี phosphoketolase (PK pathway หรือ 6-phosphogluconatepathway,6-PG pathway) ซึ่งจะมีกระบวนการหมักเป็นแบบ Heterofermentation โดยเป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแลคติกได้เพียง 50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่น กรดแลคติกกรดอะซีติก กรดฟอร์มิก เอทานอลอะซีเทตกลีเซอรอล และคาร์บอนไดออกไซด์ เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถี EMP ดังนั้นจึงเกิดการหมักผ่านวิถี phosphogluconate โดย glucose-6-phosphate จะถูกออกซิไดซ์เป็น 6-phospho-gluconate จากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชั่น ได้ pentose-phosphateกับก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แล้ว pentose-phosphate จะแตกตัวโดยเอนไซม์phosphoketolase เป็น trihose-phosphate ซึ่งจะเปลี่ยนเป็นแลกเตตและอะซิติลจะเปลี่ยนเป็นเอธานอล แบคทีเรียแลคติกกลุ่มที่มีเมแทบอลิซึมแบบ heterofermentative เช่น *Leuconostoc*, *Oenococcus*,

Weissella และบางกลุ่มของ *Lactobacillus* ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus* และ *Lactobacillus casei*เป็นต้น(สุพรรณิการ์, 2548)

นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกอาจใช้กระบวนการอื่นๆ ในการสร้างผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น กรดฟอร์มิก และกลีเซอรอล เป็นต้น

นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม homofermentative บางชนิดสามารถแสดงผลิตภัณฑ์สุดท้ายเหมือนแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม heterofermentative เช่น กรดฟอร์มิกกรดอะซิติก และเอธานอล (Cogan *et al*., 1989) ผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะผลิตขึ้นเมื่อมีระดับของ fructose-1,6-diphosphate ภายในเซลล์ต่ำ โดยเฉพาะเมื่อเจริญอยู่ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสปริมาณจำกัด (Thomas *et al*, 1979) ดังนั้นเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า facultative homofermentation (De Vuyst and Vandamme, 1994)

1.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก

การนิยามและการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกมีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะช่วง 10–20 ปีที่ผ่านมาในอดีตนั้นหมายถึงกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยวจากการผลิตกรดซึ่งรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วยปัจจุบันแม้ไม่มีนิยามที่ชัดเจนและเป็นเอกฉันท์แต่ลักษณะพื้นฐานซึ่งยอมรับทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งไม่สร้างสปอร์ ขาดเอนไซม์คะตะเลส ขาดไซโตโครมทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรดต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ และผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาล (ปิ่นมณี, 2543)

ส่วนการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ของแบคทีเรียแลคติก อาศัยลักษณะทางสรีรวิทยา และ ชีวเคมี การทนต่อน้ำดี ความสามารถในการสลายเม็ดเลือดแดง ลักษณะของการเจริญในน้ำนม และชนิดของเซรุ่มเป็นต้น นอกจากนี้มีการนำวิธีการตรวจสอบถึงระดับสารที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ต่างๆ ภายในเซลล์เพื่อพิเคราะห์ถึงความสัมพันธ์และลักษณะทางพันธุกรรมโดยเฉพาะกรดนิวคลีอิก โดยใช้เทคนิคทางพันธุศาสตร์ร่วมด้วย เช่น อัตราส่วนเบสในดีเอ็นเอองค์ประกอบของกรดไขมันและการเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าของเอนไซม์แลกเทตดีไฮโดรจีเนส (Axelsson, 1998) เป็นต้น

1.2 ลักษณะที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก

1.2.1 ลักษณะทางสันฐานวิทยา (Morphology)

เป็นการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยพิจารณาจากรูปร่างเซลล์ การจัดเรียงตัว การเคลื่อนที่ การย้อมติดสีแกรม การสร้างแคปซูล การสร้างสปอร์ หรือ แฟลกเจลลา เป็นต้น พบว่า จีนัส *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* และ *Enterococcus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกันสามารถแยกออกจากจีนัสอื่นได้ในขณะที่จีนัส *Lactobacillus*แและ *Carnobacterium* ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ จีนัส *Lactobacillus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างออกไปจากกลุ่ม *Bifidobacteriu*m และแบคทีเรียแลคติกจีนัส *Streptococci*ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 จีนัส คือ *Lactococcus*, *Enterococcus* และ *Streptococcus*อย่างไรก็ตามสภาวะการเจริญและระยะเวลาในการเจริญของเซลล์ อาจมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (De Vuystand and Vandamme, 1994) เช่น *Leuconostoc* เมื่ออยู่ในอาหารที่มีกลูโคส ขนาดของเซลล์จะยืดยาวออกและมีรูปร่างเป็นท่อนใกล้เคียงกับลักษณะทางสัณฐานของ *Lactobacillus* แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลมอยู่เป็นเซลล์เดี่ยว หรือคู่ หรือเรียงต่อกันเป็นสายสั้น ในขณะที่เจริญบนอาหารแข็งเซลล์มีลักษณะเป็นท่อนยาว นอกจากนี้ยังพบบางสายพันธุ์อาจผลิตเมือก (slime) เช่น *Leuconostoc mesenteroides* (Dellagilo *et al*., 1995)

1.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยา (Physiology)

โดยศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ในสภาวะความเป็นกรด-ด่าง ในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของอิออน ความสามารถในการทนเกลือ และ Hydrostatic pressure เช่นใช้ความต้องการออกซิเจน อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอิออน pH และ Hydrostatic pressure ในการแยกความแตกต่างระหว่าง *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* พบว่า *Carnobacterium* ไม่สามารถเจริญได้ที่ pH 4.5 และบนอาหารเพาะเชื้อแข็งอะซีเทต แต่สามารถเจริญได้ที่ pH 9.0 (Hammes *et al*., 1991) นอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ขณะที่ *Carnobacterium* ไม่สามารถเจริญได้ (Kandler and Weiss, 1986) สำหรับการแยกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่มใหญ่ โดยวิธีการทดสอบทางสรีรวิทยาอาจไม่เพียงพอ อาจจะต้องใช้วิธีการทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติมด้วย (De Vuyst and Vandamme, 1994)

1.2.3 การหมักแหล่งคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate fermentation)

ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิด ในการใช้สารอาหารและการสร้างผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมโดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นและรูปแบบการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต จากการเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ ในอาหารเพาะเชื้อที่ใส่สารอาหารชนิดต่างๆลงไปแล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากกรด การเกิดกรด การเกิดแก๊ส และการเกิด

สารบางชนิด เป็นต้น รวมทั้งการศึกษารูปแบบของการหมักสารประเภทคาร์โบไฮเดรต (De Vuyst and Vandamme, 1994)

1.2.4 ส่วนประกอบของผนังเซลล์ (cell wall composition)

องค์ประกอบทางเคมีของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก จะประกอบด้วยเพปติโดไกลแคน ไลโพพอลีแซกคาร์ไรด์ไลโพโปรตีน กรดไทโคอิก และกรดอะมิโนหลายชนิด เป็นต้น ซึ่งความแตกต่างด้านโครงสร้างของเพปติโดไกลแคน ปริมาณและชนิดของกรดอะมิโนที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ มีความแตกต่างกันตามชนิดของแบคทีเรีย (Schleifer and Kandler, 1972)

1.2.5การเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าของเอนไซม์แลกแตทดีไฮโดรจีเนส (Electrophoretic mobility of lactate dehydrogenase)

ในกระบวนการหมักแบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติกได้เป็นชนิด D, L หรือทั้ง 2 ชนิดทั้งนี้ขึ้นกับการมีเอนไซม์ NAD^+-dependent lactate dehydrogenase (nLDH) ชนิด D-nLDHหรือ L-nLDHซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีรูปแบบของเอนไซม์แต่ละชนิดต่างกัน (Axelsson, 1998) ดังนั้นจึงสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ โดยอาศัยหลักของวิธี gel electrophoresis เพื่อจำแนกเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) บน starch gel หรือ polyacrylamide gel ใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันมาก เช่น *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus gallinarum*, *Lactobacillus gasseri*และ *Lactobacillus johnsonii* (Pot *et al*., 1994)

1.2.6 SDS-PAGE ของโปรตีนทั้งเซลล์

อาศัยหลักการเชื้อที่มีสายพันธุ์ต่างกันจะให้รูปแบบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกัน โดยการเปรียบเทียบลักษณะของโปรตีนทั้งหมดภายในเซลล์ซึ่งใช้ sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) สามารถทำได้ง่ายรวดเร็วให้ผลถูกต้องแม่นยำในระดับสปีชีส์และสับสปีชีส์สามารถช่วยในการจำแนกเชื้อที่มีปัญหาในการแบ่งหมวดหมู่ได้ (Pot *et al*., 1994)

1.2.7 การศึกษาเบสองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (DNA base composition/DNA-DNA hybridization)

เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบเบสองค์ประกอบของดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงในรูปของ mol% G+C พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกัน

มีค่า mol% G+C ใกล้เคียงกัน (Pot *et al*., 1994) แต่บางครั้งแบคทีเรียที่ไม่สัมพันธ์กันอาจมีค่า mol% G+C ใกล้เคียงกันได้ ดังนั้นวิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ถูกต้องและแม่นยำกว่า คือ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการศึกษาดีเอ็นเอที่สามารถเข้าคู่กันได้ อาศัยหลักการ คือ ดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความเหมือนกัน และสามารถเข้าคู่กันได้วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะใช้เป็น probe มาติดฉลาก ซึ่งอาจติดโดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive label) หรือสามารถใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive label) จากนั้นนำ probe ที่ได้ไปทำ hybridization กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบถ้าสามารถเข้าคู่กันได้จะปรากฏสัญญาณ (signal) ขึ้นมาและวัดเปอร์เซ็นต์ความเหมือนหรือคล้ายกัน (Stiles and Holzapfel, 1997)

1.2.8 การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสของ rRNA (rRNA sequence)

วิธีนี้ใช้จำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการวิเคราะห์ลำดับของ rRNA (rRNA sequence) มีการนำมาใช้หลายรูปแบบ เช่น การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนส์ 16S rRNAและ 23S rRNA นอกจากนี้ Schillinger *et al*., (1996) ได้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง *Leuconostoc* sp. และ *Lactobacillus* sp. บางสายพันธุ์โดยวิธีนี้เช่นกัน

1.2.9 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

วิธีนี้นิยมใช้กันในปัจจุบันโดยอาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีอยู่ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้นรวมทั้งสารพันธุกรรมชนิดอื่นๆด้วย ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการ PCR ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น การใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เพื่อเปลี่ยน RNA ให้เป็น DNA ก่อนการเข้าสู่ขั้นตอน PCR นอกจากนี้วิธี RandomLy Amplified Polymorphic DNA (RADP) เป็นอีกรูปแบบหนึ่งที่มีการใช้ไพรเมอร์เดี่ยวแบบอิสระเพื่อจับกับสาย DNA template ที่ตำแหน่งใดก็ได้ที่สามารถเข้าคู่กันได้ และเพิ่มจำนวน DNA ได้ทันที ทำให้เกิดแบบแผนของ DNA ที่เกิดขึ้น (Welsh and McClelland, 1990)

1.2.10 เซรุ่มวิทยา (serology)

เป็นวิธีการสำคัญในการแยกและจำแนกเชื้อในจีนัส *Streptococcus* ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์โดยอาศัยคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนที่จำเพาะของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้จัดแบ่งเป็นกลุ่ม ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนขององค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย เช่น การมีแอนติเจนที่เป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์จัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม A และ G หรือการมีกรดไทโคอิกระหว่างชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ และผนังเซลล์ชั้นใน จัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม D เช่น *Streptococcus pyrogenes* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการเจ็บคอจัดอยู่ในกลุ่ม A ส่วน *S. faecalis* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะจัดอยู่ใน

กลุ่ม D ส่วน *Lactobacillus* เมื่อใช้ลักษณะทางเซรุ่มวิทยาสามารถแบ่งกลุ่มได้ 7 กลุ่ม ตั้งแต่A-G ตามชนิดของแอนติเจน (Kandler and Weiss, 1986)

1.2.11 การศึกษารูปแบบพลาสมิด (plasmid profile)

แบคทีเรียแลคติกบางชนิดจะมีพลาสมิดอยู่ในเซลล์ ซึ่งจะควบคุมสมบัติพิเศษบางอย่างของเชื้อ เช่น การผลิตเมือก การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น โดยพลาสมิดของเชื้อ ชนิดเดียวกันจะมีจำนวน ขนาด และลำดับเบสที่เหมือนกัน เมื่อแยกพลาสมิดออกจากเซลล์นำมาตัดโดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบการตัดตำแหน่งที่แน่นอนจึงนำมาทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (gel electrophoresis) โดยถ้าเป็นเชื้อชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบการเคลื่อนที่ที่เหมือนกัน ความหลากหลายของจำนวนและขนาดของพลาสมิดของแบคทีเรียแลคติกในชนิดเดียวกันใช้เป็นลักษณะสำคัญสำหรับการกำหนดลักษณะและใช้จำแนกแบคทีเรียแลคติกออกจากกัน (Josephson and Nielson, 1988)

1.2.12 hemotaxonomic markers

การจัดจำแนกด้วยวิธีนี้พิจารณาจากการสร้างสารประกอบทางเคมีที่จำเพาะเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ ได้แก่ สาร quinine เช่น menaquinones และ ubiquinones แบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม *streptococci* ส่วนใหญ่จะขาด menaquinones ซึ่งจะตรวจสอบปริมาณของสารชนิดนี้ โดยวิธี High Pressure Liquid-Chromatography (HPLC) (Pot *et al*., 1994) และการวิเคราะห์ Fatty Acid Methyl Ester (FAME) โดยวิธี Gas-liquid Chromatography (GC) สามารถใช้ในการจำแนกแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (Moss *et al*., 1974)

1.3 จีนัสของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถจำแนกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่

1. *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8–1.2 ไมครอนจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญมีหลายสายพันธุ์ก่อโรคในคนหรือสัตว์ และบางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิดโรคได้เจริญที่อุณหภูมิ 20-41 องศาเซลเซียสปัจจุบันประกอบด้วย 39 สายพันธุ์มี mol % G+C ระหว่าง 34-46 % (Hardie and Whiley, 1995)

Streptococcus ที่มีความสำคัญทางด้านอาหาร (วิลาวัณย์, 2539) ดังนี้

1. กลุ่มไพโอจินิก (Pyogenic) เป็นพวกที่ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10 หรือ 45 องศาเซลเซียส ประกอบด้วยพวกที่ทำให้เกิดโรค เช่น *S. agalactis* และ *S. pyognes* สามารถสร้างสารพิษได้ ซึ่งเชื้อ *S. pyoganes* มีระยะพักตัว 1-3 วัน อาการที่พบหลังจากได้รับเชื้อ คือ เจ็บคอ คอแดง ปวดศีรษะ มีไข้สูง คลื่นไส้อาเจียน วิงเวียน อาหารที่พบแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ นม ไอศครีม ไข่ กุ้ง สลัด อาหารที่มีไข่ และนม

2. กลุ่มวิริแดน (Viridan) ได้แก่เชื้อ *S. thermophiles* มีความสำคัญในการผลิตเนยแข็งและผลิตภัณฑ์นมพวกโยเกิร์ต แบคทีเรียกลุ่มนี้ทนต่อความร้อน และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

3. กลุ่มเอนเทอโรคอคคัส (Enterococcus) เป็นพวกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 48-50 องศาเซลเซียส บางชนิดสามารถเจริญได้ที่ 5-8 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นพวกทนความร้อน สามารถอยู่รอดได้ในนมที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์ สามารถทนเกลือได้ 6.5 เปอร์เซ็นต์ หรือมากกว่า สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นด่าง pH 9.6 แบคทีเรียกลุ่มนี้ได้แก่ *S. feacalis* และ *S. faecium* ทางอุตสาหกรรมอาหารเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า ฟิคัลสเตรปโตคอคไค (Fecal streptococci) ซึ่งใช้เป็นดัชนีบ่งชี้คุณภาพของอาหาร

2.*Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกรูปกลม ไข่ หรือท่อนสั้น มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.2 x 0.5-2.0 ไมโครเมตร มีการเรียงตัวแบบเดี่ยวๆ หรือเป็นคู่ หรือสายสั้นๆ ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe มีการผลิตกรดในการหมักคาร์โบไฮเดรต แต่ไม่เกิดแก๊ส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 25-35 องศาเซลเซียส แยกได้จากน้ำหรือจากปลาแซลมอนที่เป็นโรค เป็นแบคทีเรียซึ่งเคลื่อนที่ได้(ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์คือ *Vagococcusfluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน *Streptococci* กลุ่ม N และ *V. Salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles and Holzapfel, 1997)

3. *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1ไมครอนจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคสมักใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter) ในผลิตภัณฑ์นมสามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียสพบในแหล่งต่างๆเช่นผักกาดถั่วหญ้ามันฝรั่งน้ำนมดิบประกอบด้วย 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. Lactis* ssp*. lactic, L.lactis* ssp*. cremoris, L. lactis* ssp.*hordniae, L. garvieae, L. plantarum, L. raffinolactis* และ*L. piscium*มีmol % G + C ระหว่าง 34 – 43% (Teuber, 1995)

4. *Enterococcus*

เซลล์มีรูปไข่จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือสายโซ่สั้น ๆผลิตกรดแลคติก ชนิดL (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคสต้องการสารอาหารสูงในการเจริญเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา (Flageella) ไม่มีแคปซูล ต้องการอากาศแบบ Facultative anaerobe และสารอาหารที่สมบูรณ์ในการเจริญ สามารถเจริญได้ในช่วง pH 4.2-4.6 และสามารถเจริญได้ที่ pH 9.6 ส่วนใหญ่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ยังสามารถหมักน้ำตาลแลกโตสได้ บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้และบางสายพันธุ์ทำให้เกิดโรค ปัจจุบันประกอบด้วย 5 กลุ่มสายพันธุ์ ได้แก่กลุ่ม *Enterococcus faecalis,* กลุ่ม *E. avium,* กลุ่ม *E. gallinarum* ,*E. solitaries* และกลุ่ม *E. cecorum* มี mol % G + C ระหว่าง 37–40 (Devriese and Pot, 1995)

5. *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36–1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกันโดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไม่มีอากาศ ผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+)จากการหมักกลูโคสบางสายพันธุ์ทำให้เบียร์และไวน์เสียประกอบด้วย6สายพันธุ์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici, P. damonosus, P. dextrinicus, P.inopinatus, P. parvulus, P. pentosaceus*มี mol % G + C ระหว่าง 34–44 %

6. *Tetragenococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิมคือ สายพันธุ์ *P. Halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18% และมีลำดับเบสบน 16SrRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม

7. *Aerococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สายพันธุ์คือ *Aerococcus viridians* และ *A. Urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinaeequi* ตามลำดับ โดย *A. viridians* ทำให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน (Stiles and Holzapfel, 1997)

8. *Leuconostoc*

เซลล์มีสัณฐานขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารซึ่งมีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลมการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวอยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลางผลิตกรดแลคติกชนิด D (-) เอทานอลคาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดองการเจริญต้องการสารอาหารสูงปัจจุบันประกอบด้วย8สายพันธุ์ *Leuconostoc mesenteroides, Leuc. lactis, Leuc.gelidum, Leuc. carnosum, Leuc. pseudomesenteroides, Leuc. citreum,* และ *Leuc. fallax, Leuc. argentinum* มีmol % G + C ระหว่าง 37-40 % (Dellaglio *et al,* 1995)

แบคทีเรียในจีนัสนี้มีความสัมพันธ์กับจีนัส *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ในแง่สรีรวิทยา ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นกับอาหารเพาะเชื้อ ในอาหารที่มีกลูโคสเซลล์จะยืดออกคล้าย Lactobacilli แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การหมักกลูโคสสามารถผลิตกรดแลคติกชนิด D(-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหย จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์ ได้แก่ *L. mesenteroid*, *L.lactis*, *L. pseudomesenteroids*, *L. citreum*, *L. argentinum* และ *L. fallax* (สุพรรณิการ์, 2548)

คุณสมบัติที่สำคัญบางอย่างที่ทำให้ *Leuconostoc* มีความสำคัญทางด้านอาหาร (บุษกร, 2547) ได้แก่

1. การผลิตไดอะซิติล และผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นอื่นๆ เช่น *L. cremoris* เปลี่ยนไพรูเวตเป็นไดอะซิโตอิน และไดอะซิติล นำไปใช้ในการทำให้เกิดกลิ่นในเนย

2. ความสามารถในการทนเกลือ เช่น *L. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียที่พบในอาหารหมักประเภทผักดอง เช่น กะหล่ำปลีดอง มีการสร้างกรดออกมาจนมีความเข้มข้น 0.7-1.0 เปอร์เซ็นต์ (อยู่ในรูปของกรดแลคติก)

3. ความสามารถในการทนต่อน้ำตาล โดยสามารถเจริญได้ในที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงเช่น *L. mesenteroides* สามารถทนน้ำตาลใน sugar syrup ที่มีความเข้มข้นสูงถึง 55–60 เปอร์เซ็นต์

4. การผลิตสารเมือก เช่น *L. mesenteroides* จะผลิตสารเมือกพวกเดกซ์แทรน (dextran) จากน้ำตาลซูโครสได้ อุณหภูมิที่เหมาะในการสร้างเมือก คือ 20-25 องศาเซลเซียส เชื้อ *L. dextranicum* สามารถสร้างเดกซ์แทรนจากน้ำตาลซูโครสได้เช่นกัน แต่น้อยกว่า ดังนั้นการผลิตเดกซ์แทรนในระดับการค้าจะใช้ *L. Mesenteroides* โดยใช้กากน้ำตาลเป็นวัตถุดิบ แต่ในขณะเดียวกันการสร้างสารเมือกเหล่านี้ ทำให้เป็นผลเสียต่ออาหาร เช่น ทำให้น้ำอ้อยเกิดเมือก ทำให้ตกผลึกไม่ได้ ความหวานของน้ำอ้อยลดลง และสารเมือกเหล่านี้ไปทำให้ท่อต่างๆ อุดตัน เชื้อนี้ยังทำให้ไวน์ไส้กรอก และแฮมเกิดเมือกเป็นต้น

5. ความสามารถในการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาล ทำให้อาหารต่าง ๆ เกิดเน่าเสีย เช่น การเกิดก๊าซในแตงกวาดอง และ การทำให้ไส้กรอกบวม เป็นต้น

6. ความสามารถในการเริ่มต้นหมักได้เร็วกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ เช่น ในการหมักกะหล่ำปลีดองพบว่า *L. mesenteroides* เป็นแบคทีเรียแลคติกพวกแรกที่เจริญ และมีบทบาทในการหมัก โดยสามารถผลิตกรดแลคติกออกมาในปริมาณ 0.7-1.0 เปอร์เซ็นต์ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ เจริญไม่ได้

9. *Oenococcus*

ประกอบด้วยสายพันธุ์เดียวคือ *Oenococcusoeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leucoenos* ด้วยสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูงรวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ :ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นและลำดับเบสของ 16SrRNA ต่างจากสายพันธุ์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio *et al,* 1995)

10. *Weissella*

ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สายพันธุ์ซึ่งลักษณะคล้าย *Leuconostoc* (Leuconosdoc–like bacteria) รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลมมีสายพันธุ์ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล*Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Leuc. paramesenteroides (Weissella paramesenteroides), Lactobacillus confusus (W. confusus), Lb.halotolerans (W. halotoleran), Lb. kandleri (W.kandleri), Lb. minor (W. minor), Lb. viridescens (W. viridescen)*และสายพันธุ์ใหม่ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมักคือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1997)

11. *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุดมีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์สมบัติทางชีวเคมีและสรีระวิทยาเนื่องจากความแตกต่างของ mol % G + C ภายในสกุลสูงคือระหว่าง 32- 53 % พบในแหล่งต่างๆเช่นเยื่อเมือกของมนุษย์และสัตว์พืชและน้ำทิ้ง เป็นต้นบางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี (coccobacilli) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญประกอบด้วย 55 สายพันธุ์ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มคือ

1.กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแลกโทส (มากกว่า85 %) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden–Meyerhof–Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6biphosphate–aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนทไม่ได้ประกอบด้วย 18 สายพันธุ์

2. กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้

3. กลุ่ม Obilgately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทเป็นแลคเตท, เอทานอลและคาร์โบไฮเดรต

คุณสมบัติที่ทำให้ *Lactobacillus* มีความสำคัญทางด้านอาหาร (วิลาวัณย์, 2539) ดังนี้

1. ความสามารถในการหมักน้ำตาลให้กรดแลคติกสามารถนำไปใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์นม เช่น ยาคูลย์ใช้ *L. casei* โยเกิร์ตใช้ *L. bulgaricus* (และ *Streptococcus thermophilus*) นมแอซิโดฟิลัสใช้ *L. bulgaricus* นมบัลคาเรียนใช้ *L. delbrueckii* นอกจากนี้ในการหมักผักดองใช้ผลิตกรดแลคติกในระดับอุตสาหกรรม เช่น ใช้ผลิตกรดแลคติกจากหางนม *L. pentosus* (*L. plantarum*) ผลิตกรดแลคติกจากโรงงานกระดาษ แต่ในขณะเดียวกันจะทำให้อาหารมีรสเปรี้ยว จากการผลิตกรดแลคติกออกมา นอกจากนี้ยังทำให้ไวน์ ไซเดอร์ เบียร์ มีรสเปรี้ยว เป็นต้น

2. การผลิตก๊าซ และผลิตสารระเหยอื่นๆ ในพวก heterofermentative บางครั้งทำให้เกิดความเสียหายต่อคุณภาพอาหาร เช่น การเจริญของ *L fermentum* ในเนยแข็งสวิส *L. hilgardii* หรือ *L. trichodes*ในไวน์

3. ความสามารถในการสร้างเมือก เช่น *L. plantarum* ทำให้น้ำแอปเปิ้ล น้ำองุ่น ผักดอง เกิดเมือกได้ *L. brevis* ทำให้น้ำแอปเปิ้ลเกิดเมือกได้ *L. cucumeria* ทำให้ผักดองเกิดเมือกได้

4. ความสามารถในการทนความร้อน (Thermoduric) ทำให้เชื้อรอดชีวิตจากการให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรส์ เช่น จะยังคงพบ *L. bulgaricus*, *L. brevis* รอดชีวิตจากการพาสเจอร์ไรส์น้ำนม จากนั้นเชื้อนี้จะหมักน้ำตาลแลกโตสให้กรดแลคติกออกมา ทำให้นมมีรสเปรี้ยว นอกจากนี้อาจพบเชื้อนี้ในอาหารกระป๋องที่ให้ความร้อนไม่เพียงพอ เช่น ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศ ถั่ว และผลไม้อื่นๆ

5. ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่ำเป็นสาเหตุให้เนื้อ และผลิตภัณฑ์เนื้อ เช่น แฮม ไส้กรอก เกิดการเน่าเสียโดยมีกลิ่นเปรี้ยว

6. แบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีความสามารถในการสังเคราะห์วิตามินที่ตัวมันเองต้องการได้ ทำให้เชื้อไม่สามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีวิตามินต่ำ ดังนั้นจึงใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามินในอาหาร เช่น ใช้ *L. leichmannii* ในการตรวจวิเคราะห์ปริมาณวิตามิน B12

12. *Carnobacterium*

Carnobacterium เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมหรือแท่ง มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 x 1.0-2.0 ไมโครเมตรเซลล์มีการจัดเรียงตัวคู่ หรืออยู่เดี่ยวๆ บางครั้งมีการเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ มี %mol G+C อยู่ระหว่าง 31.6-37.2 เปอร์เซ็นต์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียสแต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 37 องศาเซลเซียส พบในผลิตภัณฑ์เนื้อ และปลา และพบว่า *C. piscicola* เป็นเชื้อที่ก่อโรคในปลาเซลม่อน (Holt *et al*., 1994)

จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) กรดอะซีติกเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส ประกอบด้วย 6สปีชีส์ คือ*C. divergens*, *C .pisicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C.alterfunditum* มี mol % G+C ระหว่าง 31.6-37.2 %(สุพรรณิการ์, 2548)

2 สารกันเสียชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก

สมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติกผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดที่ได้จากการหมักกรดแลคติกเช่นนมเปรี้ยว ผัก ผลไม้ดองผลิตภัณฑ์เนื้อและอาหารทะเลหมักสามารถเก็บไว้ได้นานและปลอดภัยเมื่อนำไปบริโภคทั้งนี้เป็นเพราะ LAB มีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ดังนี้ทำให้ pH ของอาหารลดลง เกิดกรดอินทรีย์ เกิดแบคเทอริโอซิน เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดเอทานอลโดยแบคทีเรียแลคติกจะมีการสร้างสารกันเสียชีวภาพมากมายเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาอาหารให้ยาวนานขึ้น (Schnurer *et al,* 2005) เช่น

2.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

ในกระบวนการหมักของ LAB นั้นจะมี 2 แบบคือ homofermentative และ heterofermentative โดย lactic acid เป็นสารหลักที่ได้จากกระบวนการหมักแบบ homofermentative โดย lactic acid นั้นจะมีผลทำให้ pH ของอาหารลดลงซึ่งก็มีผลให้เชื้อจุลินทรีย์อื่นไม่สามารถเจริญเติบโตได้ เพราะ ไฮโดรเจนอิออนจะซึมผ่าน cell membrane เข้าสู่ภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ทำให้ cytoplasm มีสภาพเป็นกรดสูง ซึ่งส่งผลให้ electrochemical proton gradient ภายในเซลล์จุลินทรีย์เสียไปด้วย

สำหรับกระบวนการหมักแบบ heterofermentative ของ LAB จะได้ acetic acid เป็นสารหลัก และผลิต propionic acid ในปริมาณเล็กน้อย แต่กรดทั้งสองชนิดจะมีค่า pKaที่สูงมากกว่า lactic acid โดยกลไกการออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก็จะเหมือนกับของ lactic acid คือจะมีผลต่อ electrochemical proton gradient

กรดแลคติก (Lactic acid)

เป็นกรดที่เกิดจากแบคทีเรียแลคติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลในอาหาร ทำให้ pH ของอาหารลดลง มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ทำให้อาหารเน่าเสีย นอกจากนี้ยังใช้ในทางเภสัชกรรม และอุตสาหกรรมเคมีอื่นๆอีกด้วย กรดแลคติกที่เกิดจากกระบวนการหมักอาจอยู่ในรูป L หรือ D เป็นกรดที่นิยมนำมาใช้ในอาหารโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองประเภทต่างๆ เพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส ควบคุม pH ของอาหาร และช่วยในการถนอมอาหาร(อรวินท์, 2532)

กรดอะซิติก (Acetic acid)

เป็นกรดที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียพวก heterofermentative Lactobacilli ซึ่งกรดอะซิติกนี้จะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์

แบคทีเรียแลคติกที่มีรายงานว่าสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคส่วนใหญ่จะเป็น *Lactobacillus* sp. ซึ่งได้แก่ *L. sake* ที่แยกจากเนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ สามารถสร้างกรดอินทรีย์มายับยั้งการเจริญของ*Salmonella Typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* ได้ นอกจากนี้ Bearso *et al*., (1997) มีข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับกลไกการยับยั้ง คือ กรดอินทรีย์แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ เพราะสามารถละลายได้ในไขมัน การสะสมของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญส่งผลให้ค่า pH ในช่วงแรกของการเจริญลดลงและมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด นอกจากนี้ยังมีข้อเสนอแนะจากผู้ทำการศึกษากลุ่มอื่นๆว่าการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นเกิดจากการสะสมประจุลบ ซึ่งจะไปลดอัตราการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ และมีผลกระทบต่อการเคลื่อนย้ายสารบริเวณเหนือเยื่อหุ้มเซลล์

ดังนั้นจึงมีการประยุกต์ใช้แบคทีเรียแลคติกซึ่งสามารถผลิตกรดอินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหารหมักเพื่อวัตถุประสงค์ในการถนอมอาหาร นอกจากนี้การควบคุมสภาวะการผลิตกรดอินทรีย์ในกระบวนการหมักมีความสำคัญอย่างมากจำเป็นต้องอาศัยปัจจัยหลายอย่าง เช่น การควบคุมพีเอชเริ่มต้นในการหมัก สภาพบัฟเฟอร์และองค์ประกอบของสารอาหาร ชนิดของจุลินทรีย์ อัตราการเจริญของแบคทีเรียแลคติก และจุลินทรีย์เป้าหมาย เป็นต้น (Montville and Winkonwski, 1997)

2.2 Reuterin

Reuterin เป็นสารต้านจุลชีพที่มีฤทธิ์กว้าง (broad-spectrum) พบครั้งแรกจากเชื้อ *Lactobacillus reuteri* โดย reuterinเป็นสารที่ได้จากการ oxidize glycerol โดย LAB ในสภาพ anaerobic โดยทั่วไป LAB จะไม่มี oxidative pathway สำหรับ glycerol หรือ glycerol ไม่สามารถถูกใช้เป็น C-source เดี่ยวได้ดังนั้นวิธีการเดียวที่จะใช้ glycerol ของ LAB ได้ คือ การทำให้ LAB เข้าสู่ intermediate state ของ 3-hydroxypropionaldehyde (reuterin, 3-HPD)

พบว่า reuterin มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบยีสต์ รา โดยเชื่อว่า รูทีรีนมีฤทธิ์ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่นribonucleotidereductase จึงทำให้การสังเคราะห์ DNA เสียไป

2.3 Fatty acids

จากการแยกสารที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 ในอาหารเหลว พบว่ามี fatty acid เช่น 3-hydroxylated fatty acid ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้โดยฤทธิ์ต้านเชื้อราจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของ chain ที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่า caprylic (C8) acid และสายที่ยาวกว่านี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้สูงสุด

2.4 Acetaldehyde

เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการแมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตโดย Heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งในที่สุดก็จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกขาดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase หรือเอนไซม์นี้ถูกกดการสร้างจะทำให้มีอะเซทาลดีไฮด์หลั่งออกมานอกเซลล์ อะเซทาลดีไฮด์เป็นสารที่ให้กลิ่นโดยเฉพาะของโยเกิร์ต

2.5 Diacetyl

เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมทาบอลิซึมของแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรด แลคติกไดอะซิทิลเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก (อรวินท์, 2532)

ไดอะซิทิลเป็น aroma component ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับกลิ่นของเนยผลิตโดยการใช้ซิเตรตของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีผลยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียแกรมลบโดยมีผลต่อ arginine utilizationพบว่าแบคทีเรียแกรมลบไวต่อไดอะซิทิลมากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยใช้เพียง200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และไดอะซิทิลความเข้มข้น 344 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้ง *Listeria, Salmonella, Yersinia, Escherichia coli* และ *Aeromonas*

2.6 Carbondioxide (CO_2)

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักของ heterofermentative lactic acid bacteria กลไกการยับยั้งเชื้อของคาร์บอนไดออกไซด์ ปัจจุบันยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตาม CO_2 อาจมีบทบาทในการเพิ่มสภาวะไร้ออกซิเจน ซึ่งส่งผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ enzymatic decarboxylation และทำให้เกิดการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณ membrane lipid bilayer

2.7 Hydrogenperoxide

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียแลคติกที่ไปเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำ ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างนั้นถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น แบคทีเรียแลคติกสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน โดยการทำงานของฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) ของเอนไซม์เอ็นเอดีเฮชออกซิเดส (NADH oxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) ในสภาวะที่ไม่มีเหล็ก แบคทีเรียแลคติกจะไม่มีเอนไซม์ catalase ซึ่งทำหน้าที่ในการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำและออกซิเจน แต่จะมีระบบอื่นที่ใช้ในการจำกัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Condon, 1987) นอกจากนี้ ถ้าไม่มีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ เนื่องจากถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase), ฟลาโวโปรตีน และซูโดคะตะเลส (pseudocatalase)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นตัวออกซิไดส์ที่รุนแรงและสามารถทำลายเซลล์แบคทีเรียได้ โดยหมู่ซัลไฮดริล (sulfhydryl) ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์ และในชั้นไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ถูกออกซิไดส์ได้ ทำให้โครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ และในปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขนส่งออกซิเจน ทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจน ส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังสามารถรวมตัวกับสารประกอบอื่นเกิดเป็นสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ เช่น ในน้ำนมดิบ มีทั้งเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) ไทโอไซยาเนต (thiocyanate, SCN-) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส จะเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโอไซยาเนตให้เปลี่ยนเป็นไฮโปไทโอไซยาไนต์ (hypocyanite, OSCN-) และหากมีไฮโดรเจนเจนเปอร์ออกไซด์สูงจะเปลี่ยนเป็น O_2SCN- และ O_3SCN- ตามลำดับ ซึ่งไฮโปไทโอไซยาไนต์จะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ปฏิกิริยา อย่างไรก็ตามกลไกหลักในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น คือ ขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิส โดยจะไปขัดขวางการขนถ่ายกลูโคสรวมทั้งกิจกรรมของเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (G-3-P dehydrogenase) เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้มีหมู่ซัลไฮดริลเป็นองค์ประกอบซึ่งถูกออกซิไดซ์ได้ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติก สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นได้ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังมีผลในการทำลายแบคทีเรียแกรมลบอย่างรวดเร็ว

ในอาหารหมักจะมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณน้อย เนื่องจากมีการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่มีข้อดีตรงที่จะไม่เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไป ซึ่งอาจจะไปยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่เป็นตัวการของการหมักได้ (สุมณฑา, 2545)

จากการทดลองของ Edward (1980) พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ใช้ในการถนอมอาหาร มีการเติมลงในน้ำนมดิบโดยใส่ที่ความเข้มข้น 0.02-0.05% จะฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ไซด์ความเข้มข้น 0.04-0.08% ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 53 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีในนมพาสเจอไรซ์ ปรากฏว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด และโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่พบได้

2.8 Proteinaceous compounds

Ribosome ของ LAB สามารถสังเคราะห์ peptide หรือ protein ได้ ซึ่งจากการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของ LAB จะสูญเสียไปเมื่อมีการย่อยด้วย proteolytic enzyme ซึ่งต่อมาพบว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เป็นพวก proteinaceous compounds โดยสารที่มีฤทธิ์นี้เป็นสารกลุ่ม peptide มีฤทธิ์ต้านเชื้อได้กว้างทนความร้อน และออกฤทธิ์ได้ดีที่ pH 3-6 แต่จะถูกทำลายได้ด้วย proteinase ซึ่งใน proteinaceous compounds นั้นจะประกอบด้วย โปรตีนหลายชนิดที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ เช่น

2.9 Bacteriocin

แบคเทอริโอซินหมายถึงเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (antibiotics) คือ แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบและแกรมบวกหลายสายพันธุ์ แต่แบคเทอริโอซินที่สร้างจากกลุ่มแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria)ได้รับความสนใจมากที่สุด

กลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้มักแยกมาจากอาหารดังนั้นจึงเหมาะที่จะนำมาใช้ในการประยุกต์ทางด้านอาหารการสร้างแบคเทอริโอซินนี้มีข้อดีแก่แบคทีเรียแลคติกเองคือแบคเทอริโอซินสามารถฆ่าหรือยับยั้งแบคทีเรียอื่นที่อยู่ในแหล่งอาหารนั้นๆ แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งค่อนข้างกว้างการนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้สารกันเสียที่เป็นสารเคมีรวมทั้งลดการใช้ความร้อนทำให้อาหารยังคงอุดมไปด้วยคุณค่าของสารอาหารซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคต้องการเนื่องจากมีความปลอดภัยมีรสชาติสดใหม่และพร้อมรับประทาน(สุมณฑา, 2545)

โครงสร้างในสายพอลิเพปไทด์ของแบคเทอริโอซิน สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ซึ่งแต่ละส่วนทำหน้าที่ต่างกัน ดังนี้

2.6.1 binding peptide ทำหน้าที่ช่วยให้โมเลกุลของแบคเทอริโอซินจับกับ receptor บนผิวเซลล์ของแบคทีเรีย

2.6.2 active protein ทำหน้าที่ทำลายแบคทีเรียโดย active protein จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและสังเคราะห์โมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ของแบคทีเรีย

2.6.3 immunity protein ทำหน้าที่จับกับ active peptide อย่างจำเพาะซึ่งจะป้องกันไม่ให้เกิดการทำลายแบคทีเรียที่มี immunity protein เหมือนกัน

2.6.4 translocation peptide ช่วยให้มีการเคลื่อนย้ายสารเชิงซ้อนของแบคเทอริโอซินผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

กลไกในการทำลายเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย เกิดจากการที่แบคเทอริโอซินเข้าจับกับเซลล์แบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวนทำให้เกิดรูหรือช่องว่างที่มีลักษณะคล้ายชิ้นไม้ที่นำมาประกอบกันเป็นถังมีรูตรงกลาง (barrel-stave) ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟตซึ่งเป็นสารให้พลังงานของเซลล์ และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ในกรณีสปอร์พบว่าเยื่อหุ้มเซลล์จะถูกทำลายอย่างรวดเร็ว ในระหว่างที่สปอร์งอกขึ้นมา และแบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นสูงๆ สามารถยับยั้งการสร้างเพปติโดไกลแคน (peptidoglycan) ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของผนังเซลล์ของ *Bacillus stearothermophillus* และ *Eshcherichia coli* ได้(De Vuyst and Vandamme, 1994)

3.สารกันเสีย (Preservative) และอันตรายจากการใช้สารกันเสีย

สารกันเสียคือสารเคมีหรือของผสมของสารเคมีที่ใช้ในการถนอมอาหาร โดยอาจจะใส่ลงในอาหาร พ่นหรือฉาบรอบๆผิวของอาหารหรือภาชนะบรรจุสารดังกล่าวจะทำหน้าที่ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียโดยอาจจะไปออกฤทธิ์ต่อผนังเซลล์รบกวนการทำงานของเอนไซม์หรือกลไกทางพันธุกรรม (genetic mechanism) ในเซลล์ เป็นผลทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนได้หรือตายในที่สุด(ศิวาพร, 2535)

สารกันเสียที่ดีควรจะออกฤทธิ์ทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียมากกว่าที่จะออกฤทธิ์ยับยั้ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งพวกที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเกิดสายพันธุ์ต้านทาน (resistant strain) นอกจากนี้สารกันเสียไม่ควรจะเสื่อมคุณภาพเมื่อใส่ลงในอาหาร ยกเว้นสารกันเสียประเภทที่ฆ่าเชื้อได้ ควรจะถูกเปลี่ยนสภาพให้เป็นสารไม่มีพิษหรือถูกทำลายได้ด้วยการหุงต้ม

การใช้วัตถุเจือปนอาหารซึ่งรวมถึงวัตถุกันเสียด้วย จะต้องใช้ในปริมาณเหมาะสมที่ทำให้เกิดผลตามต้องการ คือไม่ใส่เกินขนาด เพราะผู้บริโภคจะได้สารเหล่านั้นมากเกินความจำเป็น ดังนั้นจึงมีประกาศกระทรวงสาธารณสุข ห้ามใช้วัตถุกันเสียในอาหารที่ไม่

จำเป็นที่ต้องใช้สารกันเสียคืออาหารกระป๋องที่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์เรียบร้อยแล้ว สำหรับอาหารอื่นผู้บริโภคจะอ่านได้จากฉลากอาหารว่ามีการใช้วัตถุกันเสียหรือไม่ มีส่วนประกอบอย่างไร (บุษกร, 2550)

1. กรดและเกลือของกรดบางชนิดเช่น กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก กรดโปรปิโอนิก ฯลฯ และเกลือของกรดเหล่านี้ส่วนใหญ่นิยมใช้ในรูปเกลือของกรด เพราะละลายน้ำได้ง่าย เมื่อใส่ในอาหารเกลือเหล่านี้จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปของกรด หากอาหารนั้นมีความเป็นกรดสูง กรดจะคงอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว ซึ่งเป็นรูปที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ (วิลาวัณย์, 2537) ดังนั้นอาหารที่จะใช้สารกันเสียชนิดนี้ควรจะเป็นอาหารที่มีความเป็นกรด ประมาณ 4-6 ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของกรด เช่น น้ำผลไม้ เครื่องดื่ม แยม ผักดองชนิดต่างๆ ขนมปัง ฯลฯ สารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่จะให้ผลยับยั้งราและ ยีสต์มากกว่าแบคทีเรีย ข้อดีของสารกลุ่มนี้คือมีความเป็นพิษต่ำ เพราะร่างกายคนสามารถเปลี่ยนแปลงเป็นสารอื่นที่ไม่มีพิษและขับถ่ายออกจากร่างกายได้

2. พาราเบนส์ (parabens)เป็นสารกันเสียที่มีประสิทธิภาพยับยั้ง หรือทำลายราและยีสต์ได้ดีกว่าแบคทีเรีย และจะมีประสิทธิภาพสูงในช่วงความเป็นกรดด่างกว้างกว่าสารกลุ่มแรกคือประมาณ 2-9 อาหารที่นิยมใส่พาราเบนส์ ได้แก่ น้ำหวานผลไม้ น้ำผลไม้ แยม ขนมหวานต่างๆ สารปรุงแต่งกลิ่นรส ฯลฯ ร่างกายคนจะมีกระบวนการขจัดพิษของพาราเบนส์ ได้โดยปฏิกิริยาไฮโดรลีซิส

3. ซัลเฟอร์ไดออกไซด์และซัลไฟต์กลไกในการทำลายเชื้อของสารกันเสียชนิดนี้จะคล้ายคลึงกับสารกันเสียกลุ่มแรกและจะมีประสิทธิภาพสูง ในอาหารที่มีความเป็นกรดด่างปริมาณน้อยกว่า 4 ลงมา จึงนิยมใส่ในไวน์ น้ำผลไม้ต่างๆ ผักและผลไม้แห้ง ฯลฯ สำหรับความปลอดภัยต่อผู้บริโภคนั้น พบว่าแม้สารนี้จะถูกขับออกมาจากร่างกายได้ แต่หากร่างกายได้รับสารนี้ มากเกินไป สารดังกล่าวจะไปลดการใช้โปรตีนและไขมันในร่างกายได้ นอกจากนี้สารกันเสียกลุ่มนี้ยังทำลายไธอามีน (thiamine) หรือวิตามิน B1 ในอาหารด้วย

4. สารปฏิชีวนะข้อดีของสารปฏิชีวนะคือ ความเป็นกรดด่างของ อาหาร ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของสาร ซึ่งอาหารที่นิยมใส่สารปฏิชีวนะ ส่วนใหญ่จะเป็นพวกเนื้อสัตว์ต่างๆ อาจจะพบว่าใช้กับผักและผลไม้สดด้วย สารปฏิชีวนะจะทำลายหรือยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดขึ้นกับชนิดที่ใช้ ข้อเสียของสารกันเสียชนิดนี้คือมักจะก่อให้เกิดสายพันธุ์ต้านทานขึ้น

สำหรับปริมาณของสารกันเสียที่ใช้นั้นจะแตกต่างกันออกไป ขึ้นกับชนิดของอาหาร ซึ่งกระทรวงสาธารณสุขจะเป็นผู้กำหนดปริมาณที่อนุญาตให้ใส่ในอาหารได้ โดยทั่วไปปริมาณที่อนุญาตให้ใช้จะมีฤทธิ์แค่เพียงยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเท่านั้น ดังนั้นในระหว่างกรรมวิธีผลิต จะต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สู่อาหารให้น้อยที่สุด

4. การเน่าเสีย และเกิดพิษของอาหารทะเลแช่เย็น และแบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง

การเน่าเสียของสัตว์น้ำจะเกิดทันทีหลังจากสัตว์น้ำตาย และเกี่ยวข้องกับปัจจัยต่าง ๆ เช่น วิธีการจับ แหล่งจับ การเน่าเสียจะมีสาเหตุที่สำคัญ 3 ประการคือ

1.จากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ในตัวเอง

2.จากปฏิกิริยาของเอ็นไซม์ในแบคทีเรียที่ติดในตัวสัตว์

3.จากปฏิกิริยาทางเคมีของสารประกอบต่าง ๆ ที่มีในตัวสัตว์เช่นปฏิกิริยาจากออกซิเจนกับไขมันทำให้สัตว์น้ำมีกลิ่นหืนและรสชาติไม่ดี

4.1 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย

โดยทั่วไปแบคทีเรียมักจะมีการเจริญในสัตว์น้ำได้ดีเนื่องจากสัตว์น้ำส่วนใหญ่มีค่าพีเอชที่เป็นกลาง มีค่า aw สูง ทำให้จุลินทรีย์จำนวนมาก สามารถเจริญได้ดีในสัตว์น้ำ และสัตว์น้ำแต่ละชนิดนั้นมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างกัน ดังนั้นสัตว์น้ำแต่ละชนิดจึงมีแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียแตกต่างกันดังนี้ (Matamoros *et al,* 2009)

4.1.1ปลา

แบคทีเรียที่ทำให้ปลาเน่าเสียมักจะอยู่บริเวณผิวและทางเดินอาหารของปลา แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญที่สุดคือ *Pseudomonas* พวกที่สำคัญรองลงมา *Acenitobactor* และ *Flavobacterium* โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะเจริญบริเวณผิวและเข้าสู่เนื้อปลา ทำให้เกิดสารพวก ไตรเมทิลามีน แอมโมเนีย เอมีน กรดไขมัน เป็นต้น ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น

4.1.2 ปู

จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในปูมีแหล่งเช่นเดียวกับปลา โดยส่วนใหญ่เป็น *Bacillus,Micrococcus, Pseudomonas, Morexella* และ *Flavobacterium*โดยปูจะมีกลิ่นเนื่องจากแอมโมเนียที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น

4.1.3 หอย

มักจะเกิดการเน่าเสียทันทีหลังจากการตาย โดยแหล่งที่มาของแบคทีเรียมักมาจากโคลน โดยเกิดกลิ่นเนื่องจากการสลายของโปรตีน และเกิดกรดจากการหมักน้ำตาลโดยมักมีแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องคือ *Pseudomonas*, *Acenitobactor* และ *Flavobacterium*

4.1.4 กุ้ง

แหล่งจุลินทรีย์ของกุ้งมีที่มาเช่นเดียวกับปลา ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในกุ้ง ได้แก่*Acenitobactor*, *Bacillus, Micrococcus, Pseudomonas, Morexella*และ *Flavobacterium* กุ้งมักจะเน่าเสียเร็วเนื่องจากมีกรดอะมิโนอิสระจำนวนมาก โดยแบคทีเรียจะเข้าไปสลายอะมิโน ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น (วิลาวัณย์, 2537)

4.2 แบคทีเรียที่ก่อโรคที่พบในอาหารทะเล

4.2.1 *Listeria monocytogenes*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะรูปท่อนสั้นมักเรียงตัวเป็นสายต่อกัน 3-5 เซลล์หรือมากกว่านั้นเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์หรือแคปซูลอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียสแต่สามารถเจริญได้ทุกอุณหภูมิแม้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 2.5 องศาเซลเซียสสามารถอยู่รอดในที่มีโซเดียมคลอไรด์ 20% ที่ 4 องศาเซลเซียสนานถึง 8 สัปดาห์และสามารถทนความร้อนได้ดี

แหล่งที่มาของเชื้อ*Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes พบได้ทั่วไปในน้ำ น้ำเสีย อุจจาระคนและสัตว์จึงสามารถปนเปื้อนลงไปในอาหารได้ง่ายในระหว่างขั้นตอนการบรรจุการขนส่งและการวางจำหน่าย

การเข้าสู่ร่างกาย

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคและสามารถถ่ายทอดเข้าสู่ร่างกายได้โดยการรับประทานอาหารที่มีเชื้อนี้ปนเปื้อนอาหารที่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อได้แก่นมเนื้อไก่อาหารทะเลส่วนในผักไม่พบหรือพบน้อยมาก นอกจากนี้เชื้อ *Listeria monocytogenes* ยังสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตู้เย็นและทนความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ชนิดอื่นจึงสามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆเช่น นมเนื้อสัตว์ผักและไส้กรอก

อันตรายของเชื้อ *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งมีอาการโลหิตเป็นพิษและเยื่อหุ้มสมองอักเสบมักพบในผู้ป่วยที่มีระบบภูมิคุ้มกันอ่อนแอหรือทารกที่เกิดจากมารดาที่ได้รับเชื้อขณะตั้งครรภ์และยังมีรายงานว่ามีผู้เสียชีวิตเนื่องจากบริโภคอาหารที่มีเชื้อปะปนอยู่ *Listeria monocytogenes* จึงเป็นดัชนีตัวหนึ่งที่แสดงถึงความปลอดภัยของอาหารด้วย (สุมณฑา, 2545)

4.2.2 *Vibrio parahaemolyticus*

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่ง มี flagella อยู่ที่ปลายข้างหลัง บางสายพันธุ์มีอยู่รอบเซลล์ ไม่สร้างแคปซูลและสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้ เจริญได้ตั้งแต่อุณหภูมิ 15-42 องศาเซลเซียส สามารถเจริญในที่มีเกลือได้ตั้งแต่ 0.5 - 8.0 เปอร์เซ็นต์ก่อโรคอาหารเป็นพิษหรือ กระเพาะและลำไส้อักเสบพบระบาดครั้งแรกในประเทศญี่ปุ่นเดิมเรียกเชื้อนี้ว่า *Pasteurella parahaemolyticus* ประเทศญี่ปุ่น จีน ไต้หวัน อินเดีย และหลายๆประเทศทางเอเชียรวมทั้งอเมริกามีรายงานว่า มากกว่า 50% ของอาหารเป็นพิษมีสาเหตุจากเชื้อ *V. parahaemolyticus*

ความทนทานของเชื้อ

1.ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 60 °C ในเวลา 15 นาที

2. ถูกทำลายโดยกรด มีผู้ศึกษาพบว่าเชื้อนี้ถูกทำลายด้วยกรดมะนาว (Citric acid) พีเอช 4.4 ในเวลา 30 นาที

3. ในฤดูหนาวเชื้อสามารถอาศัยในตะกอนใต้พื้นน้ำ

4. สามารถมีชีวิตอยู่ในอาหารหรือน้ำที่มี NaCl ตั้งแต่ 1-8% ถ้ามากกว่า 10% เชื้อจะตาย

การเจริญ

เจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 9.5-45 °C, ช่วงพีเอชเท่ากับ 5 -11 และสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือ NaCl ความเข้มข้น 0.5–8 เปอร์เซ็นต์

การทำให้เกิดโรค

เกิดจากการกินอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไปโดยเฉพาะอาหารทะเลพวกกุ้ง ปู ปลา หอย จำนวนเชื้อต้องมีมากพอที่ตั้งแต่ 10^6-10^9โคโลนีต่อกรัม จึงสามารถทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ อาการมักปรากฏหลังจากกินเชื้อเข้าไป 10 ถึง 12 ชั่วโมง บางรายแสดงอาการภายใน 4 ถึง 96 ชั่วโมงขึ้นอยู่กับความเป็นกรดหรือด่าง ภายในระบบทางเดินอาหารเชื้อนี้จะเพิ่มจำนวนเป็นเท่าตัวทุกๆ 10 ถึง 15 นาที ที่อุณหภูมิ 37 °C เมื่อเข้าสู่ร่างกายเชื้อจะทวีจำนวนขึ้นในลำไส้ มีอาการปวดท้อง อาจปวดเกร็งท้องเดิน อุจจาระเป็นน้ำมีกลิ่นเหม็นเหมือนกุ้งเน่า บางรายคล้ายเป็นบิดอุจจาระมีมูกเลือด มีไข้ต่ำ ปวดศีรษะ คลื่นไส้ อาเจียน อาการที่เป็นอาจหายเองภายใน 2 ถึง 5 วัน อัตราตายต่ำ โรคนี้มักพบในฤดูร้อน ไม่ค่อยพบในฤดูหนาว (บุศกร, 2550)

5. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

วิลาวัณย์ (2543) ได้ศึกษาแบคทีเรียแลตคิกที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ ทดสอบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Bacillus cereus, S. aureus, E. coli* และ *Salmonella*

typhimurium ซึ่งพบแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบนี้ได้ โดยสามารถผลิตสารยับยั้งที่เป็นกลุ่มโปรตีน ทนอุณหภูมิสูง ซึ่งแบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งได้ดีในอาหาร MRS

สมใจ (2550) มีการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* โดยการใช้วิธี agar spot assay และวิธี agar well diffusion ในการทดสอบฤทธิ์ยับยั้ง ซึ่งสามารถยับยั้งได้ดี และมีสมบัติที่น่าสนใจเช่น ทนความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียสได้นาน 10 นาที มีความคงตัวดีในช่วงพีเอช 4-7 มี antibacterial spectrum ค่อนข้างกว้าง และได้มีการศึกษาเปรียบเทียบกับไนซิน ที่ใช้ในทางการค้า ซึ่งให้ผลการยับยั้งที่ใกล้เคียง จึงมีความเหมาะสมจะใช้เชื้อที่คัดแยกได้เป็นหัวเชื้อในการหมักอาหาร หรือนำไปใช้ในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้

Anastasiadou *et al*, (2008) คัดแยกแบคทีเรีย *Pedicoccus pentosaceus* จากตัวอย่างไส้กรอก ซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินชนิด pediocin ได้

Gao *et al,* (2009) คัดแยกแบคทีเรีย *Lactobacillus sake* C2 จากตัวอย่างกะหล่ำปลีดอง ซึ่งได้มีการจำแนกชนิดโดยการใช้ 16 S rRNA ซึ่งสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์กว้างออกมายับยั้ง*S. aureus* และ *E. coli* ได้ และสามารถทนความร้อนถึง 121 องศาเซลเซียส 15 นาที

Guerrieri *et al,* (2008) พัฒนาไบโอฟิล์มที่ใช้ควบคุม *Listeria monocytogenes* โดยได้ใช้แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินสองสายพันธุ์คือ *Lactobacillus plantarum* 35d และ *Enterococcus casseliflavus* และแบคทีเรียแลคติกที่ไม่ผลิตแบคเทอริโอซินคือ *L. plantarum* 396/1 และ *Enterococcus faecalis* JH2-2 ซึ่งได้แสดงผลไว้ว่า *Lactobacillus plantarum* 35d มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*ได้สูงถึง 5.4 log

Einarsson and Lauzon (1994) ทดลองผลของการใช้สารกันเสียชีวภาพในกุ้งทะเล โดยได้ใช้แบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียแลคติก ไนซิน และ สารละลายเบนโซเอต-ซอเบต เทียบกับตัวควบคุมที่ไม่มีสารใดๆ พบกุ้งที่ไม่มีสารกันเสียสามารถคงสภาพได้ 10 วัน กุ้งที่ใช้แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกสามารถคงสภาพได้ 16 วัน กุ้งที่ใช้ไนซินคงสภาพได้ 31 วัน และกุ้งที่ใช้สารละลายเบนโซเอต-ซอเบตคงสภาพได้ถึง 59 วัน

Matamoros *et al,* (2009) ได้มีการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหารทะเล เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำ เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคและเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ได้เชื้อกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่มีฤทธิ์การยับยั้งดีทั้งหมด 7 กลุ่ม และมีกลุ่มที่ทางผู้วิจัยสนใจมากคือ *Lactobacillus piscium* ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้กว้าง คือ *C. sporogenes, L monocytogenes, L. farciminis, B. thermosphacta, S. aureus, Psychrobacter*sp.,*S. putrefaciens, Pseudomonas* sp.,*S. liquefaciens, P. phosphorium*และ *S. enteric*แต่ผู้ทำการทดลองยังไม่ทราบแน่ชัดถึงกลไกการยับยั้งเชื้อทดสอบ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็น
2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และแบคทีเรียก่อโรค โดยวิธี agar spot assay และ agar well diffusion
3. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่มีต่อการผลิตสารกันเสียชีวภาพของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้
4. ศึกษาสมบัติของสารกันเสียชีวภาพจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้
5. จำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้
6. ศึกษาแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อ

ชื่ออาหารเลี้ยงเชื้อ	บริษัทผู้ผลิต
1. Agar	Merck
2. Brain Heart Infusion broth (BHI)	Difco
3. De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)	Difco
4. De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS broth)	Difco
5. Tryptone	Difco
6.Tryptic Soy agar (TSA)	Bacto
7. Tryptic Soy broth (TSB)	Bacto

1.2 สารเคมี

ชื่อสารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
1. Acetic acid	Merck
2. Bromocresol Purple	LabChem
3. Calcium Carbonate	Merck
4. Ethanol	Reagent
5. Glycerol	Sigma
6. Iodine	Merck
7. Hydrochloric acid	Merck
8. Sodium chloride	Merck
9. Sodium hydroxide	Merck

1.3 เอนไซม์

ชื่อเอนไซม์	บริษัทผู้ผลิต
1. โปรติเนสเค (Proteinase K)	Sigma
2. แอลฟา – ไคโมทริปซิน (alpha-chymotrypsin)	Sigma
3. ทริปซิน (Trypsin)	Sigma
4. โปรติเอส (Protease)	Sigma

2.อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์	ยี่ห้อ/บริษัทผู้ผลิต
1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง รุ่น UV-1800	Shimadzu, Japan
2. เครื่องชั่งสาร 3 ตำแหน่ง	Denver Instrument, Germany
3. อ่างควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath) รุ่น TW 20	Shel-Lab, USA
4. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo seven easy
5. เครื่อง Hot Plate and Stirrer รุ่น PC-420D	Fisher scientific, USA
6. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)	Heraeus, Germany
7. เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave)	Tomy, Japan
8. ตู้อบลมร้อน (Hot Air Oven)	Venticell
9.ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar airflow cabinet)	ASTEC microflow, UK
10. เครื่อง Vortex Mixer	Genie II
11. ไมโครปิเปต ขนาด 2-20, 20-200 และ 1000µl	Eppendorf Research
12. ตู้เย็น 4 °C	Sanden intercool, Japan
13. เครื่องกรองสุญญากาศ (vacum filter)	Gelman Sciences, Germany
14. กล้องจุลทรรศน์	Olympus
15. กระดาษกรอง (Cellulose Acetate Filter)	Sartorius
16. กระดาษกรองเบอร์ 1	Whatman
17. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge)	Sorvall RC 5C Plus
18. ไมโครเวฟ	Sanyo
19. ตู้เย็นแช่แข็ง -80 °C	Sanyo, Japan
20. เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernia caliper)	

3. แบคทีเรียอินดิเคเตอร์

3.1 *Staphylococcus aureus* ATCC 25923

3.2 *Escherichia coli* ATCC 25922

3.3*Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1

3.4 *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

แบคทีเรียทุกสายพันธุ์ที่ใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบได้รับมาจากภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4 วิธีการทดลอง

1.การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเล

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็น จากเขตเทศบาลนครหาดใหญ่และเทศบาลเมืองนราธิวาส ตัวอย่างทั้งหมดเก็บไว้ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ บรรจุลงในถังน้ำแข็งและเก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรักษาสภาพตัวอย่างก่อนนำไปวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองคือ ปลาใช้บริเวณเนื้อ และผิวของตัวอย่าง กุ้งใช้ตัวอย่างทั้งตัว หอยใช้เนื้อหอยตัวอย่าง และหมึกใช้บริเวณลำตัวเป็นตัวอย่าง

1.2 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารแช่เย็น

นำตัวอย่างอาหารมาเจือจางให้เหมาะสมด้วย tryptone broth 1% แล้วนำไป pour ลงบนอาหาร MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) agar ที่เติม $CaCO_3$ 0.5 % บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส ดูผลและคัดเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส ทุกๆ 5 วัน เป็นเวลา 15 วัน และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วันเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบโคโลนีนำไป restreakบนอาหารแข็ง MRS agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จำแนกเชื้อแบคทีเรียแลคติกโดยการตรวจสอบการติดสีแกรม และทดสอบคะตะเลส ถ้าพบโคโลนีเกิดฟองอากาศแสดงว่าแบคทีเรียนั้นให้ผลบวกส่วนโคโลนีที่ไม่เปลี่ยนแปลงจะให้ผลลบบันทึกผลพร้อมจดรหัสไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ โดยเก็บเชื้อแบคทีเรียในอาหารหลอด MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0 % ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารกันเสียชีวภาพต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

2.1 การเตรียมแบคทีเรียแลคติก

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ เลี้ยงใน MRS btoth บ่มเป็นเวลา 2 วันที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เพื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่บ่มใน MRS broth ใช้ในการทดลองต่อไป

2.2 การเตรียม inoculum ของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อตัวทดสอบต่อไปนี้ คือ *(Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Escherichia coli* ATCC 25922 เลี้ยงในอาหาร BHI อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 เลี้ยงในอาหาร TCBS อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 เลี้ยงในอาหาร BHI อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียสมา streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับเชื้อชนิดนั้นๆ เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง แล้วใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวๆมา 4-5 โคโลนีลงในtryptic soy broth (TSB) จากนั้นนำไปเขย่าในเครื่องเขย่าโดยใช้ความเร็ว 150 รอบต่อนาที อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 3-6 ชั่วโมง แล้วนำมาปรับความขุ่นโดยใช้ sterile normal saline solution (NSS) ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard

2.3 การทดสอบด้วยวิธี agar spot assay

ทำโดย spot เชื้อ LAB ที่เตรียมได้จากข้อ 2.1 ลงบนอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วันที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส (บ่มตามอุณหภูมิที่แยกได้) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วย soft agar ที่เหมาะสมต่อเชื้อนั้น (วุ้น 0.7%) ที่ผสมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 7 มล.ที่มีความเข้มข้นสุดท้าย 10^6 CFU/mL บ่มต่อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมงตรวจผลโดยดูการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของ LAB วัดความกว้างของวงใสโดยใช้เวอเนียร์คาลิปเปอร์ และคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ให้ความกว้างของวงใสมาก เพื่อเก็บไว้ศึกษาต่อไป

2.4 การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

นำ LAB ที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา5 วันปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกกรองให้ปราศจากเชื้อโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรได้เป็น cell free supernatant (CFS) นำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ผสมลงในอาหารกึ่ง

แข็งแล้วเททับบนผิวหน้าอาหาร MRS ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง ทำการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร จากนั้นปิเปต CFS ปริมาตร 70 ไมโครลิตรหยด CFS ที่ต้องการทดสอบลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดขอบวงใสของการยับยั้ง เพื่อดูความสามารถในการยับยั้ง

3. การศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารกันเสียชีวภาพของแบคทีเรียแลคติก

3.1 อุณหภูมิที่เหมาะสม

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิที่แปรผันที่ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมาทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาทีเป็นเวลา15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารที่ปั่นได้กรองผ่านแผ่นเยื่อขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ

3.1.1 วัดการเจริญของเชื้อด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm

โดยปิเปตตัวอย่างจากอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 และ 48 ชั่วโมงแล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

3.1.2 วัดค่า pH

โดยปิเปตตัวอย่างจากอาหารเหลวที่มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 และ 48 ชั่วโมงแล้วบันทึกค่า pH โดยใช้ pH meter

3.1.3 วัดการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี agar well diffusion assay

โดยปิเปตตัวอย่างจากอาหารเหลวที่มีเชื่อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารที่ปั่นได้กรองผ่านแผ่นเยื่อขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ นำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ผสมลงในอาหารกึ่งแข็งแล้วเททับบนผิวหน้าอาหาร MRS ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง ทำการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4มิลลิเมตร จากนั้นปิเปต CFS ปริมาตร 70ไมโครลิตรหยด CFS ที่ต้องการทดสอบลงไป แล้ว

นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา24 ชั่วโมง วัดขนาดขอบวงใสของการยับยั้งเพื่อดูความสามารถในการยับยั้ง

4. การศึกษาสมบัติของสารกันเสียชีวภาพที่คัดเลือกได้

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม มาทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านแผ่นเยื่อขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสไปทดสอบสมบัติได้แก่

4.1 ผลของอุณหภูมิต่อสารกันเสียชีวภาพ

นำ CFS ผ่านอุณหภูมิ 63, 80, 100 องศาเซลเซียสใน water bath เป็นเวลา 30 นาทีและ autoclave 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนโดยการวัดวงใสที่เกิดขึ้น

4.2 ผลของ pH ต่อสารกันเสียชีวภาพ

นำ CFS ที่ไม่ได้ปรับ pH และ CFS ที่นำมาปรับ pH โดยใช้โซเดียมไฮดรอกไซด์เป็น 6.5 แล้วจึงนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay

4.3 ผลของเอนไซม์โปรติเอสต่อสารกันเสียชีวภาพ

นำ CFS ที่เตรียมได้ ผสมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ protease, proteinase K, trypsin และ alpha-chymotrypsin โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มก/มล. โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์เป็นตัวทำละลาย นำ CFS ที่ผสมกับเอนไซม์ protease, protenase K, trypsin และ alpha-chymotrypsin วางไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง นำ CFS ดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบผลกับวงใสที่ไม่ได้ผ่านการทดสอบเอนไซม์

5. การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารกันเสียชีวภาพได้

ตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ทำการสกัดดีเอนเอ เพิ่มปริมาณ 16 SrRNA gene ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และหาลำดับเบสของ 16S rRNA ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ ตามวิธีของ Arahal *et al,*(1996) โดยทำการส่งตรวจที่บริษัท MacroGen ประเทศเกาหลีใต้ นำข้อมูลลำดับเบสของแบคทีเรียที่

แยกได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลที่มีอยู่ในฐานข้อมูล GeneBank EMBL และ DDBJ โดยใช้โปรแกรมเปรียบเทียบที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov

6. การนำไปใช้การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ

6.1 การเตรียมตัวอย่างอาหารทะเล (หัสยาณีย์, 2556)

ในการทดลองนี้ได้ใช้กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยคัดเลือกกุ้ง ที่มีขนาดประมาณ 30-50 กรัมต่อตัว โดยจะใช้กุ้งที่ปอกเปลือกผ่าหลังในการทดลอง โดยนำกุ้งไปแช่ใน 3 เปอร์เซ็นต์ฟอมัลดีไฮด์นาน 3 นาที และ นำกุ้งไปล้างฟอมัลดีไฮด์ด้วยการแช่ใน NSS อีก 10 ครั้ง(เป็นอย่างน้อย) จึงจะได้กุ้งปลอดเชื้อเพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

6.2 การเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ใช้เชื้อก่อโรคที่มักพบในอาหารทะเล คือ *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นตัวอย่างการศึกษา โดยนำไปเลี้ยงใน 5 มล. TSB บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 6 ชั่วโมง และนำไปถ่ายลงในฟลาสก์ที่มี 45 มล. TSB 37 องศาเซลเซียส 1 ชั่วโมง ให้มีเชื้อสุทธิประมาณ 10^7–10^8 cfu/mL

6.3 การเติมเชื้อลงในกุ้ง

นำกุ้งจากข้อ 6.1 ปริมาตร 500 กรัม นำมาบ่มกับเชื้อตัวทดสอบที่เตรียมจากข้อ 6.2 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มีเชื้อสุทธิประมาณ 10^6 cfu/g และมีการนับเชื้อทั้งก่อนและหลังล้างกุ้ง เพื่อเทียบว่าเชื้อเจริญไปเท่าใดและมีผลต่อประสิทธิภาพการยับยั้งหรือไม่

6.4 การทดสอบการล้างกุ้งโดยใช้ CFS และ MRS

นำกุ้งที่เตรียมได้ไปแช่ใน MRS broth (ควบคุม) และ CFS ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ในอาหารเลี้ยงที่บ่มที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมซึ่งได้จากการทดลองที่ 3(ซึ่งวิธีการแยกจะทำด้วยทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์มีความเร็ว 8000 รอบต่อนาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กรองผ่านแผ่นเยื่อขนาด 0.2 ไมโครเมตร) เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที

6.5การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

นำกุ้งที่ผ่านการล้างด้วย CFS และล้างด้วย MRS broth ในอัตราส่วน 1:1 และนำไปเข้าใน stomarcher และเจือจางในน้ำเกลือ NSS และนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่จำเพาะต่อ *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* เทียบกับตัวควบคุม เพื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพ ของการยับยั้งเชื้อโดยการนับเชื้อที่เหลือรอดอยู่ สำหรับเชื้อ *Listeria monocytogenes* จะนับในอาหาร TSA บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง และ *Vibrio parahaemolyticus* ทำการนับเชื้อที่เหลือรอดอยู่ในอาหาร TSA ที่เติม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1.การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเลแช่เย็น

จากการเก็บตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นได้แก่ ปลา กุ้ง หอย และหมึก จำนวน 14 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดซึ่งสังเกตได้จากการเห็นวงใสรอบโคโลนี และมีโคโลนีสีเหลืองบนอาหาร MRS ที่เติม bromcresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ และ calcium carbonate 0.5 เปอร์เซ็นต์ 195 ไอโซเลท และนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตกรดได้ไปทดสอบด้วยการย้อมแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญที่อุณหภูมิ 8 และ 35 องศาเซลเซียสได้ 22 และ 52 ไอโซเลท ตามลำดับรวมแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้งหมดได้ 74 ไอโซเลท โดยตัวอย่างที่สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้มากที่สุด คือ ปลา (ตารางที่ 3.1) จากตารางจะเห็นได้ว่า เชื้อที่แยกได้แม้จะแยกได้มาจากอาหารทะเลแช่เย็น แต่เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่ เป็นเชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

ตารางที่ 3.1จำนวนแบคทีเรียสร้างกรดและแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็นบนอาหาร MRS ที่เติม bromcresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ และ calcium carbonate 0.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 และ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 และ 15 วัน ตามลำดับ

ตัวอย่างอาหารทะเล	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียที่ผลิตกรดจากการบ่มที่อุณหภูมิ 8 และ 35 ºC (ไอโซเลท)		แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากการบ่มที่อุณหภูมิ 8 และ 35 ºC (ไอโซเลท)	
		8	35	8	35
ปลา	9	55	63	15	32
กุ้ง	2	17	13	2	3
หอย	1	4	11	3	11
หมึก	2	11	11	2	6
ทั้งหมด	14	87	108	22	52

2.การทดสอบความสามารถในการผลิตสารกันเสียชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี Agar spot assay

นำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *(Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1และ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313)มาปรับความขุ่นโดยใช้ sterile normal saline solution (NSS) ให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland standard และนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้งหมด 74 ไอโซเลทมา spot ลงบนอาหาร MRS แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส และ 35 องศาเซลเซียส (บ่มตามอุณหภูมิที่แยกได้) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วย soft agar ที่เหมาะสมต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์นั้น (วุ้น 0.7%) ที่ผสมเชื้อทดสอบ 7 มิลลิลิตรบ่มต่อที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแลคติก9 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด (ตารางที่ 3.2) และพบว่ามี 17 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ได้ นอกจากนี้พบว่า แบคทีเรียแลคติก C 103 ซึ่งแยกได้จากปลาสีกุน จากการบ่มที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส มีผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทุกสายพันธุ์ และให้วงใสที่แสดงถึงการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ATCC 15313 ได้สูงที่สุดถึง 17.05 มิลลิเมตร และจากการศึกษาครั้งนี้ได้มีการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ให้ความกว้างของวงใสสูง เพื่อเก็บไว้ศึกษาต่อไป

ตารางที่ 3.2 การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ด้วยวิธี Agar spot assay

ตัวอย่างอาหารทะเล	รหัสเชื้อ	บ่มที่อุณหภูมิ (ºC)	ขนาดวงใสการยับยั้งของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)*			
			E. coli ATCC 25922	*S. aureus* ATCC 25923	*V. parahaemolyticus* AAHRC 1	*L. monocytogenes* ATCC 15313
ปลาสีกุน	C 205	35	18.05	12.05	8.60	10.20
ปลาอินทรีย์	E 208	35	12.20	15.20	12.25	13.10
ปลากะพงแดง	F 202	35	13.05	-	14.00	15.80
ปลาทราย	G 230	35	-	10.50	11.25	10.10
ปลาทราย	G 204	35	12.10	-	11.50	11.10
หอยหวาน	H 201	35	15.05	-	11.10	12.45
หมึกกล้วย	I 203	35	12.20	12.25	12.25	13.10
ปลาไข่	J 201	35	13.10	15.25	13.25	12.25
ปลาไข่	J 203	35	11.80	-	11.20	12.10
ปลาทู	K 201	35	14.10	12.25	12.40	11.40
ปลาทู	K 204	35	12.10	13.35	11.55	10.15
ปลาโอ	L 210	35	-	14.80	13.20	12.30
หมึกหอม	M 204	35	11.10	15.50	13.15	11.10
หมึกหอม	M 207	35	-	13.15	12.15	11.20
ปลาสีกุน	C 103	8	19.00	16.20	12.05	17.05
ปลาไข่	J 103	8	11.00	-	12.40	14.30
ปลาโอ	L 102	8	18.50	12.50	17.20	11.20

หมายเหตุ: (-) คือ ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

(*) ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ซ้ำ

นอกจากนี้ ยังได้รับความอนุเคราะห์แบคทีเรียแลคติกจาก นางสาว นุชรี ตันติสุวรรณโณ จำนวน 53 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.3) เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอน Agar spot assay ทำการทดสอบการยับยั้งโดยการ ปรับลดชนิดของเชื้อแบคทีเรียตัวทดสอบ ให้เป็นแบคทีเรียก่อโรคคือ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ*Listeria monocytogenes* ATCC 15313และทดลองโดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส จากตารางพบว่า แบคทีเรียแลคติกที่ได้รับความอนุเคราะห์ค่อนข้างมีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 ซึ่งส่วนใหญ่มักแสดงวงใสที่ไม่สามารถวัดค่าได้ นอกจากนี้ยัง พบว่าแบคทีเรียแลคติกรหัส SQL 10104 และ SQL 25108 ซึ่งแยกได้จากหมึกกล้วย แสดงวงใสในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 สูงที่สุดและจากการศึกษาครั้งนี้ได้มีการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียตัวทดสอบทั้งสองสายพันธุ์ เพื่อเก็บไว้ศึกษาในขั้นตอน Agar well diffusion ต่อไป

รูปที่ 3.1 แสดงวงใสของการยับยังเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ด้วยวิธี Agar spot ของไอโซเลทSHL 10101 และ FSJ 10105

ตารางที่ 3.3 การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติกจำนวน 53 ไอโซเลทที่ได้รับความอนุเคราะห์จาก นางสาว นุชรี ตันติสุวรรณโณ ด้วยวิธี Agar spot assay

ตัวอย่างอาหารทะเล	รหัสเชื้อ	ขนาดวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)	
		L. monocytogenes ATCC 15313	*V. parahaemolyticus* AAHRC 1
ปลากะพงขาว	FSK L 25103	-	N
กุ้งขาว	SHL 25103	1.50	N
กุ้งขาว	SHL 25104	1.25	N

ตารางที่ 3.3(ต่อ)

ตัวอย่างอาหารทะเล	รหัสเชื้อ	ขนาดวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)	
		L. monocytogenes ATCC 15313	*V. parahaemolyticus* AAHRC 1
หมึกกล้วย	SQL 25103	0.75	N
หมึกกล้วย	SQL 25104	1.10	N
หมึกกล้วย	SQL 25108	8.05	N
ปูม้า	POL 25101	0.50	N
ปูม้า	POL 25102	1.00	N
ปูม้า	POL 25104	-	N
ปูม้า	POL 25107	1.75	N
ปูม้า	POL 251010	4.50	N
หอยหวาน	HYL 25101	1.25	N
หอยหวาน	HYL 25102	0.50	N
หอยหวาน	HYL 25103	4.50	N
หอยหวาน	HYL 25104	-	N
หอยหวาน	HYL 25105	3.50	N
หอยหวาน	HYL 25106	0.55	N
หอยหวาน	HYL 25108	-	N
หมึกกล้วย	SQL 30107	-	N
หมึกกล้วย	SQL 30109	-	2.70
ปลาโอ	FSOL 31103	0.50	N
กุ้งขาว	SHL 31107	-	N
กุ้งขาว	SHL 311010	1.60	N
ปลาจะละเม็ด	FSJ 10101	-	N
ปลาจะละเม็ด	FSJ 10102	-	N
ปลาจะละเม็ด	FSJ 10105	3.50	N
ปลาจะละเม็ด	FSJ 10109	1.00	1.25

ตารางที่ 3.3(ต่อ)

ตัวอย่างอาหารทะเล	รหัสเชื้อ	ขนาดวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)	
		L. monocytogenes ATCC 15313	*V. parahaemolyticus* AAHRC 1
หมึกกล้วย	SQL 10104	8.55	0.50
หมึกกล้วย	SQL 10107	4.65	3.60
หมึกกล้วย	SQL 10108	-	N
กุ้งก้ามกราม	SHK 10101	5.50	N
กุ้งก้ามกราม	SHK 10102	-	N
กุ้งก้ามกราม	SHK 10103	-	N
กุ้งก้ามกราม	SHK 10104	-	N
กุ้งก้ามกราม	SHK 10105	1.85	N
กุ้งก้ามกราม	SHK 10107	5.90	N
กุ้งก้ามกราม	SHK 10108	1.05	-
กุ้งก้ามกราม	SHK 10109	-	N
หอยลาย	HYL 10101	-	N
หอยลาย	HYL 10102	-	N
หอยลาย	HYL 10103	-	N
หอยลาย	HYL 10105	-	5.05
หอยลาย	HYL 10106	-	N
หอยลาย	HYL 10107	-	N
หอยลาย	HYL 10108	5.50	N
หอยลาย	HYL 10109	3.60	N
หอยลาย	HYL 101010	-	N
ปลาเก๋า	FSK 10102	4.55	8.80
ปลาเก๋า	FSK 10103	1.25	N
ปลาเก๋า	FSK 10106	2.50	N
ปลาเก๋า	FSK 10107	6.10	4.50

ตารางที่ 3.3 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหารทะเล	รหัสเชื้อ	ขนาดวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)	
		L. monocytogenes ATCC 15313	*V. parahaemolyticus* AAHRC 1
ปลาเก๋า	FSK 10108	4.65	N
ปลาเก๋า	FSK 10109	-	N

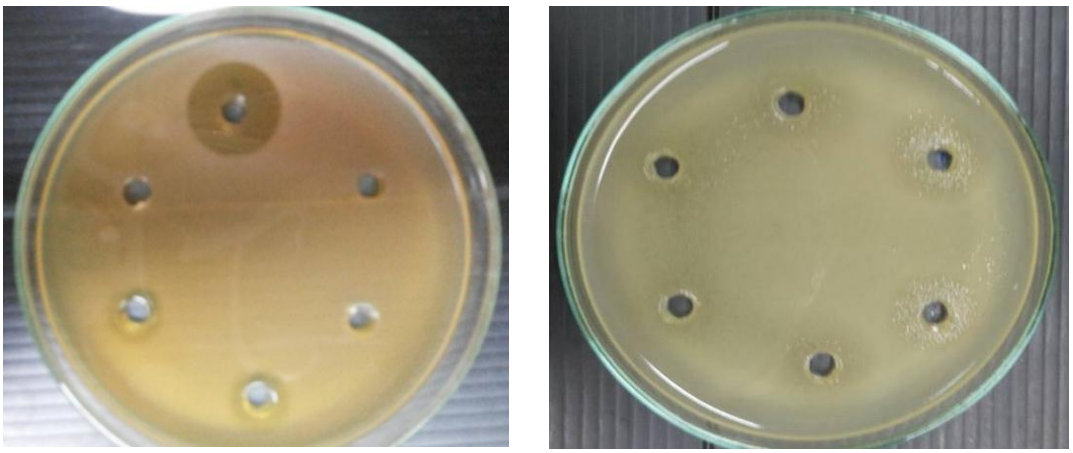
หมายเหตุ: N = ขนาดของวงใสกว้างเกิน 25 มิลลิเมตร

3.การทดสอบความสามารถในการผลิตสารกันเสียชีวภาพต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออกกรองให้ปราศจากเชื้อโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตรได้เป็น cell free supernatant (CFS) นำเชื้อทดสอบคือ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313ผสมลงในอาหารกึ่งแข็งแล้วเททับบนผิวหน้าอาหาร MRS ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง ทำการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 4มิลลิเมตร จากนั้นปิเปต CFS ปริมาตร 70ไมโครลิตรหยด CFS ที่ต้องการทดสอบลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 24ชั่วโมง วัดขนาดขอบวงใสของการยับยั้ง เพื่อดูความสามารถในการยับยั้ง

จากแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ มีทั้งหมด 22 ไอโซเลท และพบว่ามีเพียง 8 ไอโซเลทเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งได้ทั้ง *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ*Listeria monocytogenes* ATCC 15313ซึ่งไอโซเลทที่ให้ขนาดของวงใสกว้างที่สุด คือ SQL10104 แยกได้จากหมึกกล้วย ซึ่งเป็นไอโซเลทเดียวกันกับที่ให้ผลการยับยั้งด้วยวิธีการ Agar spot assay สูงที่สุดเช่นกัน (ตารางที่ 3.4 และ รูปที่ 3.2)

คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีฤทธิ์การยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้สูงที่สุด ได้แก่ SHL 25103, SHL 25104, SQL 25104, HYL 25103, SQL 10104 และ SQL 10107 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3.2 วงใสการยับยั้งของ CFS ต่อเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (ซ้าย) และ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 (ขวา)

ตารางที่ 3.4 การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลคติก ด้วยวิธี Agar well diffusion assay

ตัวอย่างอาหารทะเล	รหัสเชื้อ	ขนาดวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)	
		L. monocytogenes ATCC 15313	*V. parahaemolyticus* AAHRC 1
กุ้งขาว	SH 25103	15.50	10.25
กุ้งขาว	SH 25104	13.75	12.75
หมึกกล้วย	SQ 25103	-	10.50
หมึกกล้วย	SQ 25104	11.00	16.60
หมึกกล้วย	SQ 25108	-	12.25
หอยหวาน	HY 25102	-	14.00
ปูม้า	PO 25101	-	14.50
หอยหวาน	HY 25102	-	10.25
หอยหวาน	HY 25103	17.25	14.15
หอยหวาน	HY 25105	-	12.00
หอยหวาน	HY 25106	-	12.75
ปลาโอ	FSO 31103	-	11.50

ตารางที่ 3.4 (ต่อ)

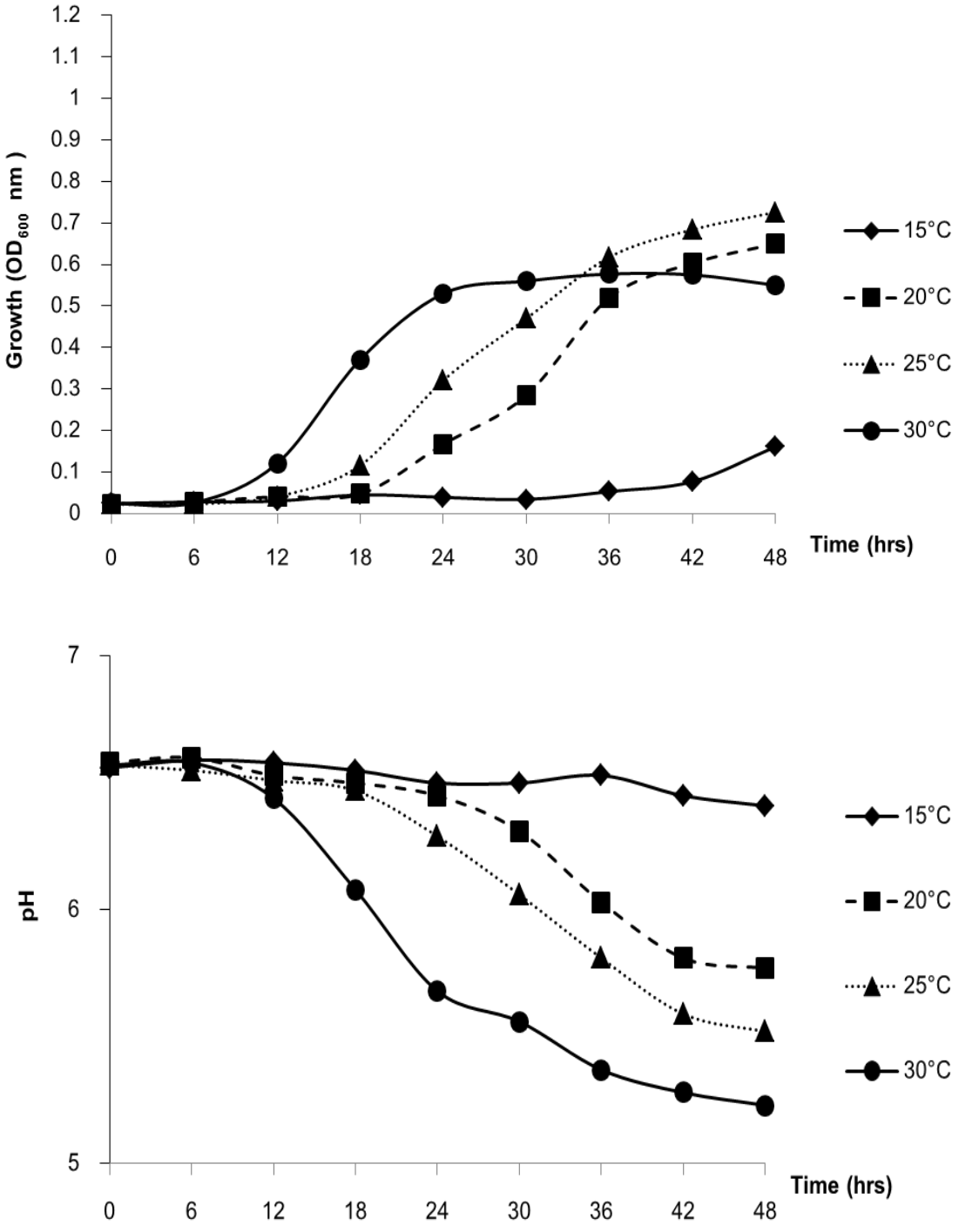
ตัวอย่างอาหารทะเล	รหัสเชื้อ	ขนาดวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (มิลลิเมตร)	
		L. monocytogenes ATCC 15313	*V. parahaemolyticus* AAHRC 1
ปลาจะละเม็ด	FSJ 10109	-	12.75
หมึกกล้วย	SQ 10104	17.55	14.00
หมึกกล้วย	SQ 10107	18.55	14.00
กุ้งก้ามกราม	SHK 10104	-	16.10
กุ้งก้ามกราม	SHK 10105	-	10.05
หอยลาย	HYL 10108	10.00	10.25
หอยลาย	HYL 10109	8.75	11.20
ปลาเก๋า	FSK 10102	-	11.20
ปลาเก๋า	FSK 10107	11.45	18.25
ปลาเก๋า	FSK 10109	7.50	-

หมายเหตุ: (-) คือ ไม่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง

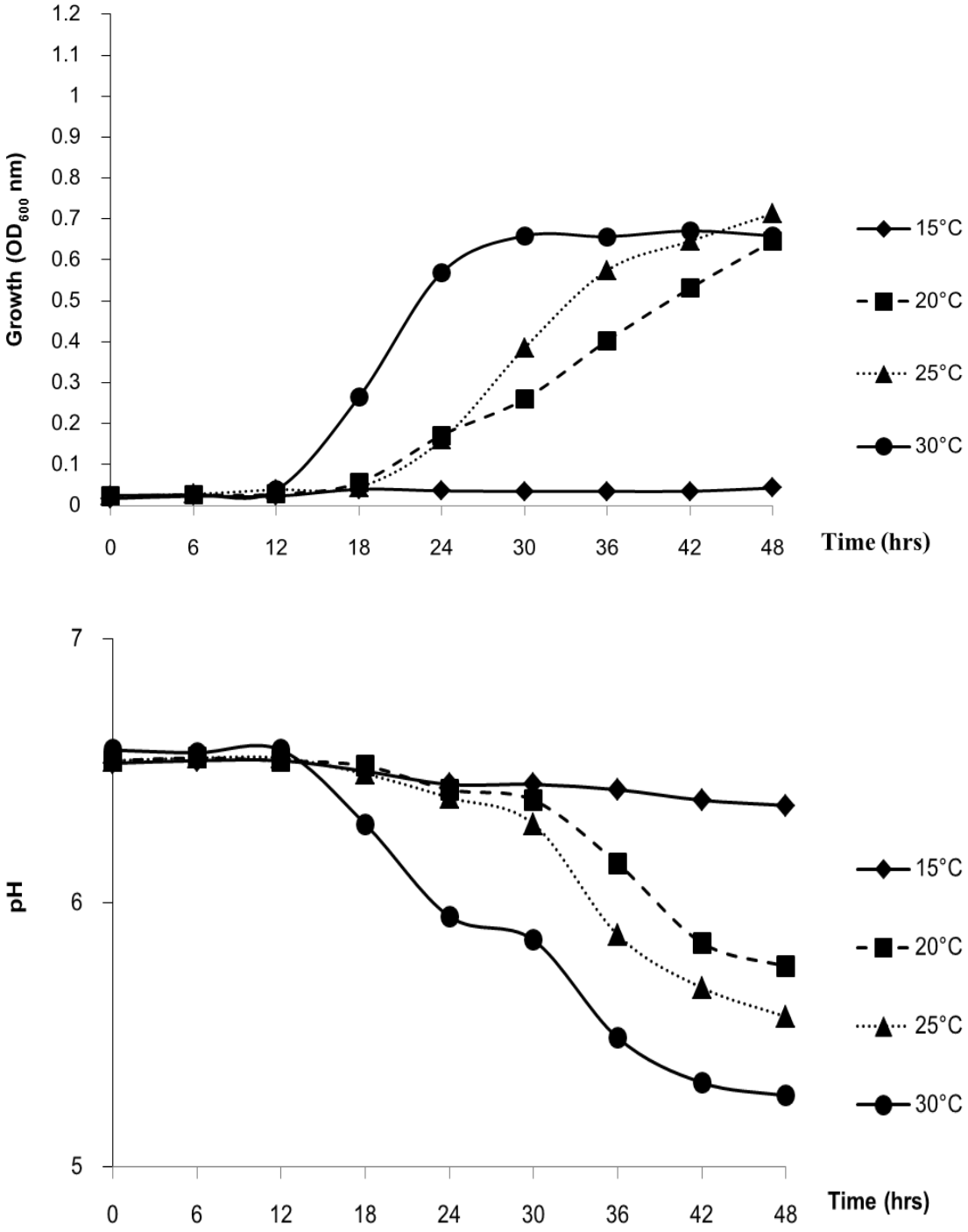
4. การศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตสารกันเสียชีวภาพของแบคทีเรียแลคติก

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ SHL 25103, SHL 25104, SQL 25104, HYL 25103, SQL 10104 และ SQL 10107 มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารกันเสียชีวภาพที่มีการแปรผันอุณหภูมิที่ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส โดยตรวจสอบทุก 6 ชั่วโมง จนถึง 48 ชั่วโมง

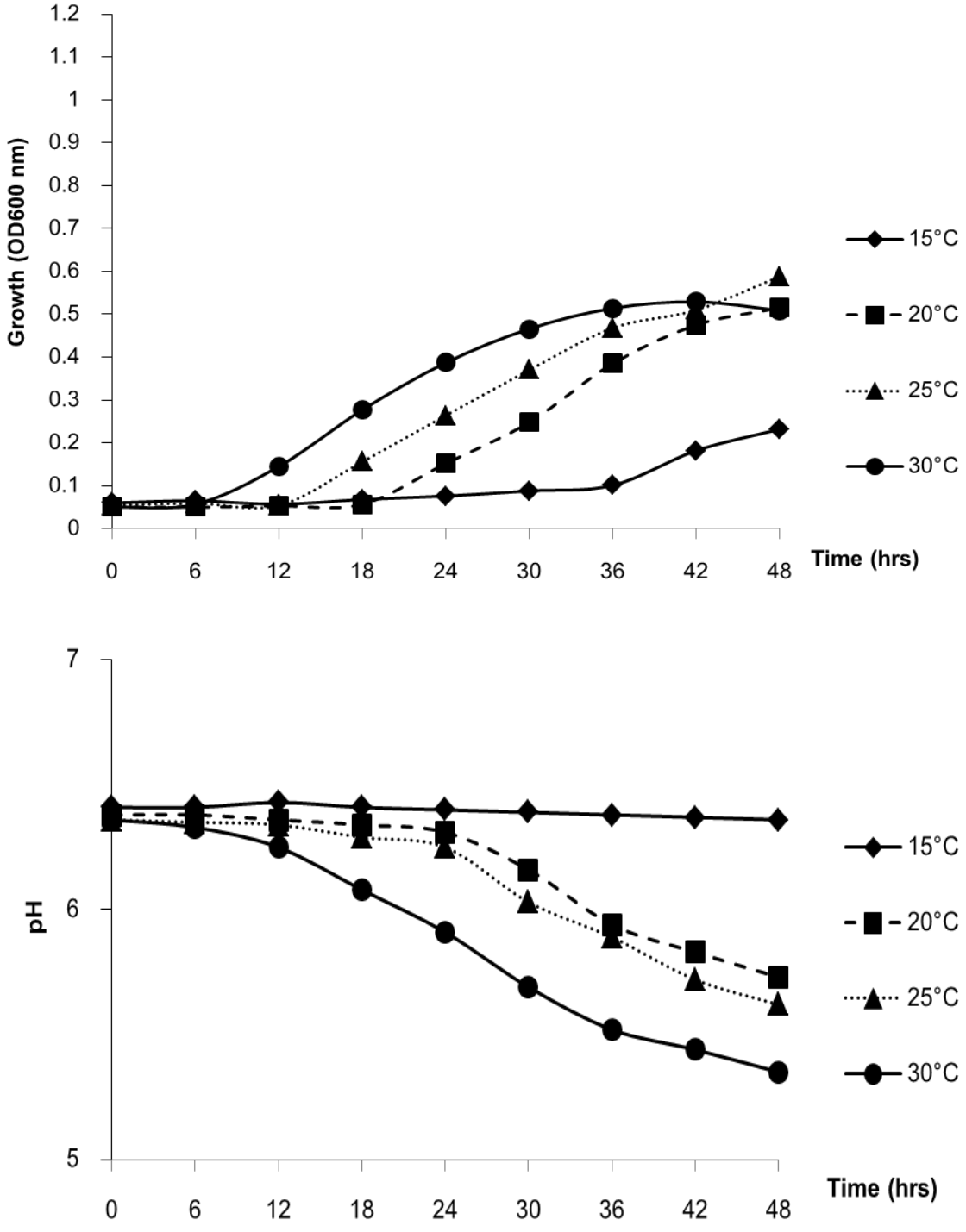
พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทุกสายพันธุ์ มีค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ซึ่งเชื้อที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสทุกสายพันธุ์นั้น มีค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเร็ว และมากที่สุด แต่ในขณะเดียวกัน เมื่อมีการวัดค่าการเจริญด้วยการวัดดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร พบว่าเชื้อที่คัดเลือกทุกสายพันธุ์ เจริญได้เร็วเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเข้าสู่ระยะ stationary phase เร็วเช่นกัน และเชื้อทุกสายพันธุ์เจริญได้สูงที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.3-3.8) ยกเว้นสายพันธุ์ SQL 10104 ที่สามารถเจริญได้ดีทั้งที่ 20 และ 25 องศาเซลเซียส (รูปที่ 3.7)



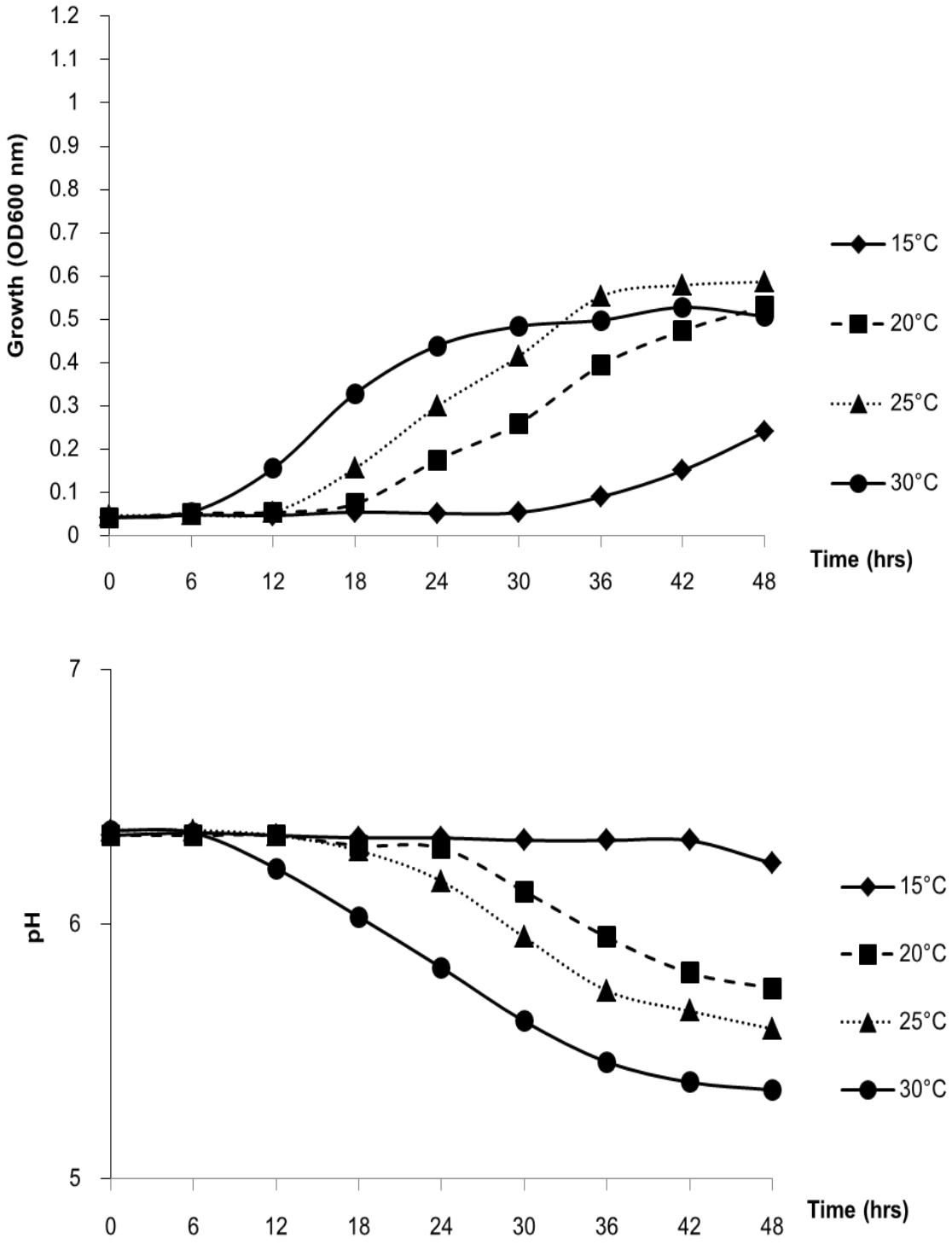
รูปที่ 3.3 การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25103 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



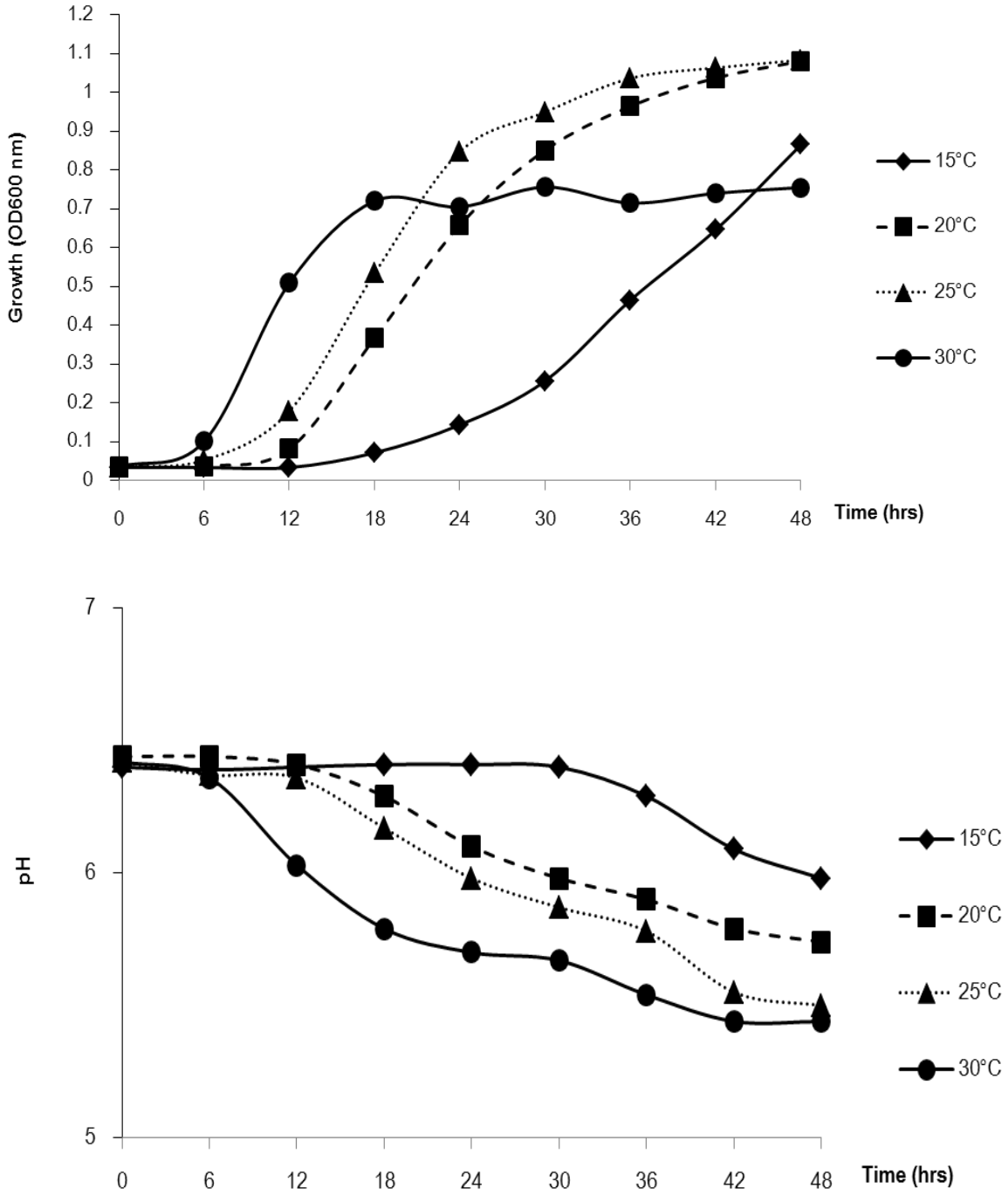
รูปที่ 3.4 การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25104 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



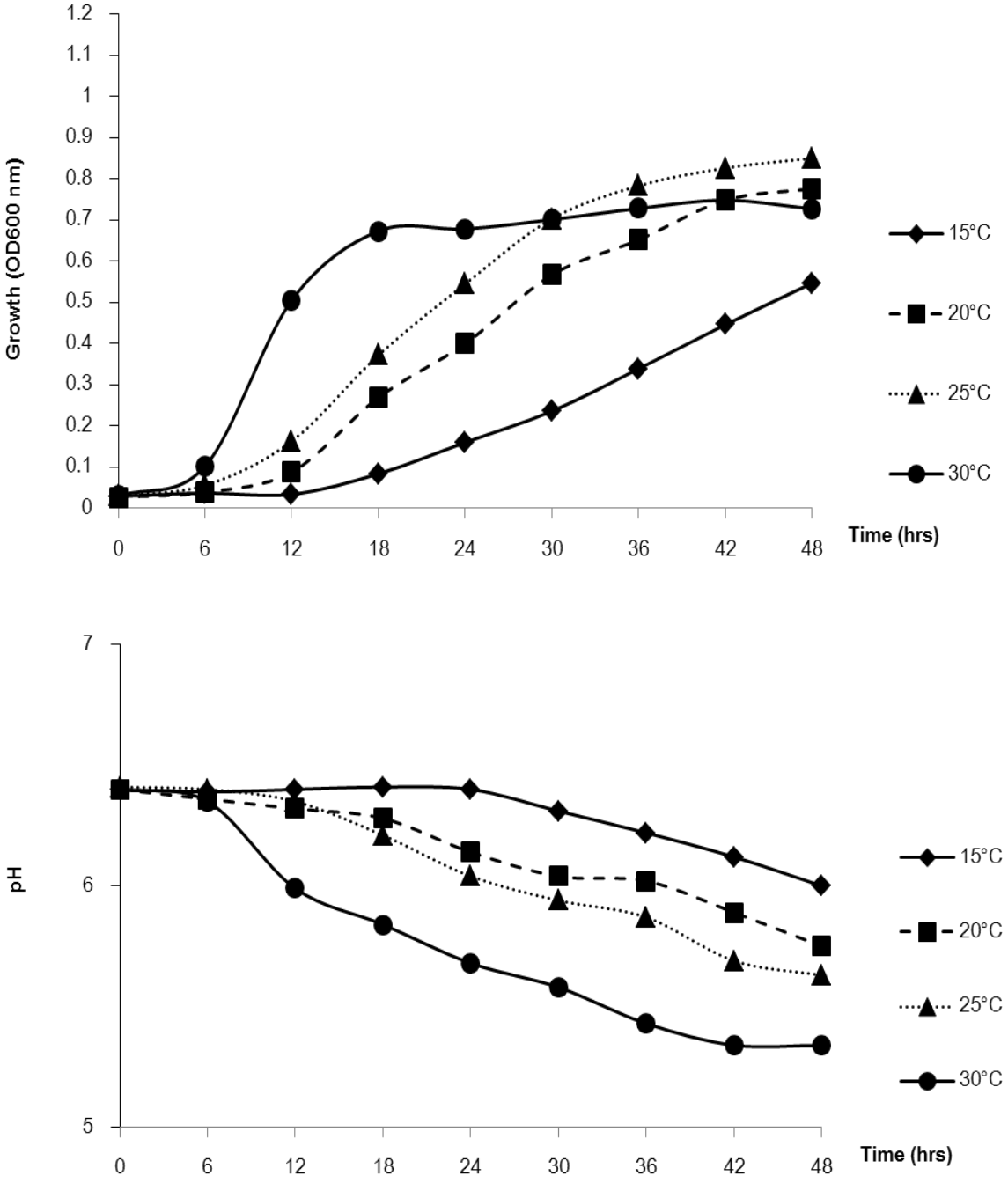
รูปที่ 3.5 การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 25104 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.6 การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท HYL 25103 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



รูปที่ 3.7 การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



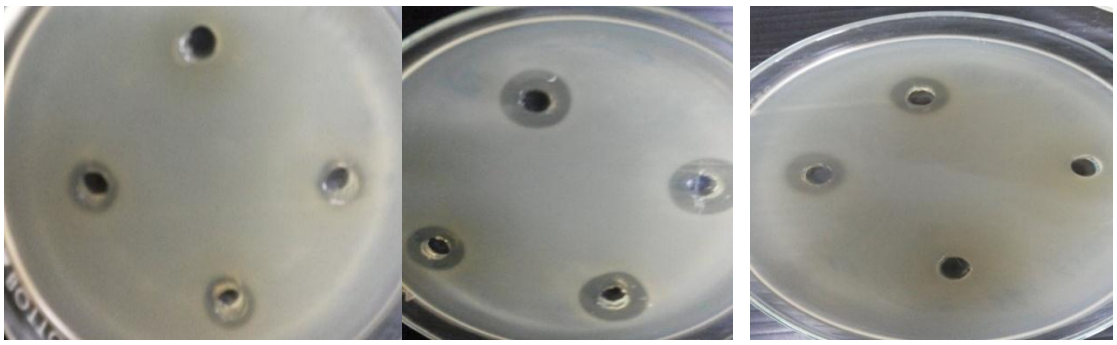
รูปที่ 3.8 การเจริญและค่าพีเอชของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10107 ที่เลี้ยงในอาหาร MRS brothบ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

จากรูปที่ 3.3-3.8 พบว่าการเจริญของเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์นั้นจะเจริญได้ดีที่อุณหภูมิเดียวกัน แต่ ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 นั้นมีความแตกต่างกัน แม้แต่ในไอโซเลทเดียวกัน ถ้าเลี้ยงที่อุณหภูมิที่แตกต่างกัน ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อก็แตกต่างกันด้วย (รูปที่ 3.9)

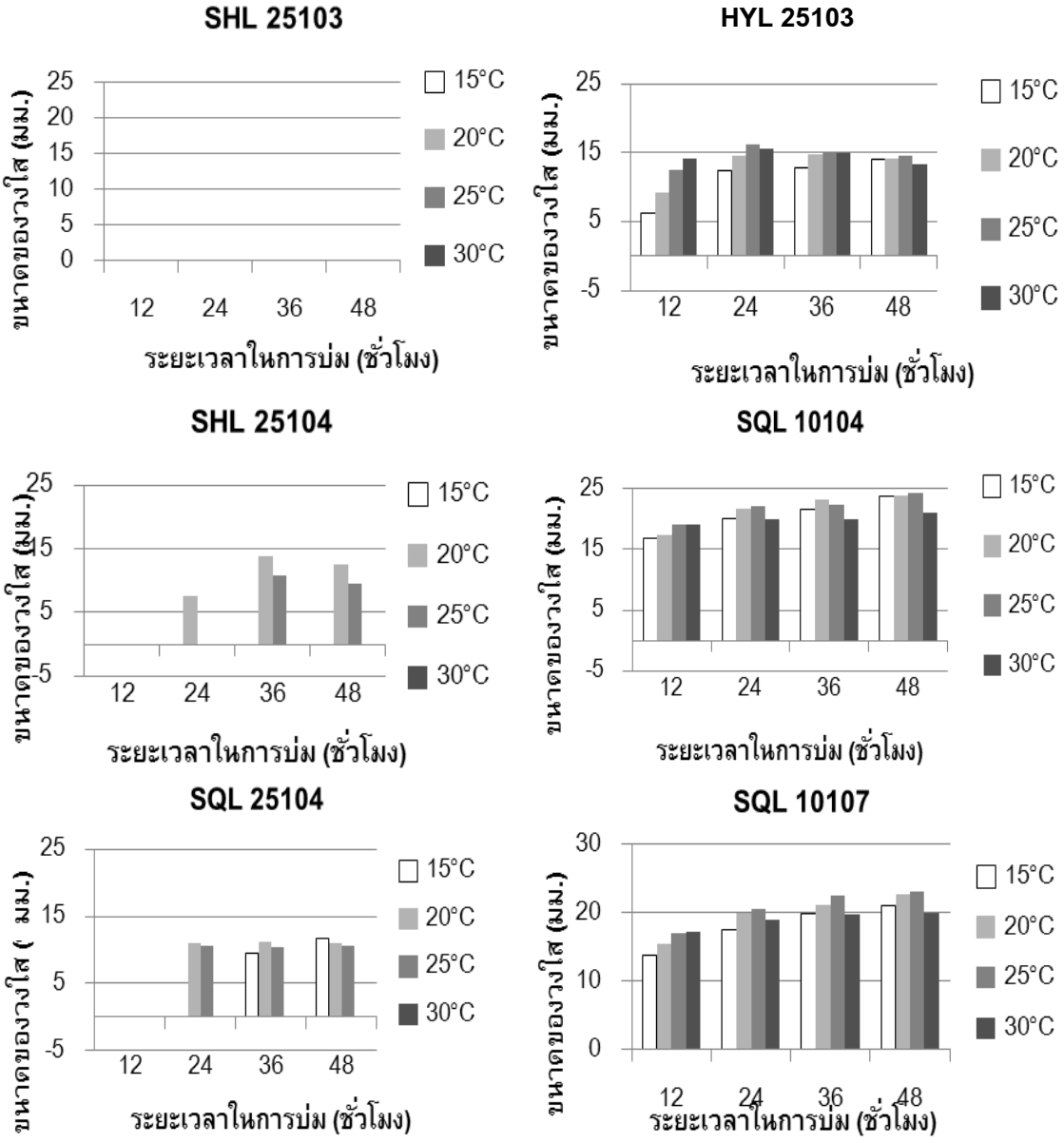
นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25103 ที่เจริญที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (รูปที่ 3.10 A) แต่แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25104 และ SQL 25104 ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 เมื่อเจริญเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทุกอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง แต่จะพบฤทธิ์การยับยั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ยกเว้นเชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (รูป 3.8 B, C)

รูป 3.10 (D, E และ F) ไอโซเลท HYL 25103, SQL 10104 และ SQL 10107 พบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ตั้งแต่การเจริญชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงทุกอุณหภูมิ และผลของการยับยั้งเชื้อพบว่า เชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส แสดงผลการยับยั้งที่ไม่แตกต่างกัน

สำหรับฤทธิ์การยับยั้ง *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 นั้น พบว่าทุกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ แสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ชั่วโมงที่ 24 วงใสที่เกิดขึ้นกว้างกว่า 35 มิลลิเมตร และไม่พบฤทธิ์การยับยั้งเมื่อบ่มต่อชั่วโมงที่ 36 และ 48



รูปที่ 3.9 ลักษณะของวงใสของ CFS ที่ได้มาจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของไอโซเลท SQL 25104 (ซ้าย) ไอโซเลท SQL 10104 (กลาง) และไอโซเลท SHL 25104 (ขวา)



รูปที่ 3.10 ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25103, SHL 25104, SQL 25104, HYL 25103, SQL 10104 และ SQL 10107 ที่เจริญในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยวิธี Agar well diffusion assay

5. การศึกษาสมบัติของสารกันเสียชีวภาพที่คัดเลือกได้

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ไอโซเลท SQL10104 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่

ความเร็ว 8000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านแผ่นเยื่อขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบสมบัติดังนี้

5.1 ผลของอุณหภูมิต่อสารกันเสียชีวภาพ

นำ CFS แช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 63, 80, 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อนโดยการวัดวงใสที่เกิดขึ้น

พบว่าเมื่อนำ CFS ไปทำให้มีอุณหภูมิสูงขึ้นนั้น ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุม ยกเว้น CFS ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ที่ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ลดลง ตามขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น กล่าวคือเมื่อนำ CFS ไปทำให้มีอุณหภูมิ 63, 80, 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาที และ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที มีขนาดของวงใส ดังนี้ 20.75, 20.73, 20.47 และ 16.88 (มิลลิเมตร) ตามลำดับ (รูปที่ 3.11 และรูปที่ 3.12)

5.2 ผลของ pH ต่อสารกันเสียชีวภาพ

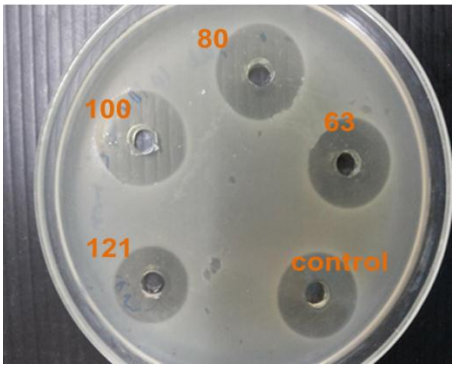
นำ CFS ที่ไม่ได้ปรับ pH และ CFS ที่นำมาปรับ pH เป็น 6.5 แล้วจึงนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียโดยวิธี agar well diffusion assay

เมื่อนำ CFS ที่มีการปรับ pH เป็น 6.5 เทียบกับ CFS ที่ไม่มีการปรับ pH (ค่า pH เท่ากับ 5.9) พบว่าไม่มีความแตกต่างของการยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งขนาดของวงใสที่เกิดขึ้นจาก CFS ที่มีการปรับ และไม่มีการปรับ pH มีขนาดเท่ากับ 20.67 และ 20.55 (มิลลิเมตร) ตามลำดับ (รูปที่ 3.13 และรูปที่ 3.14)

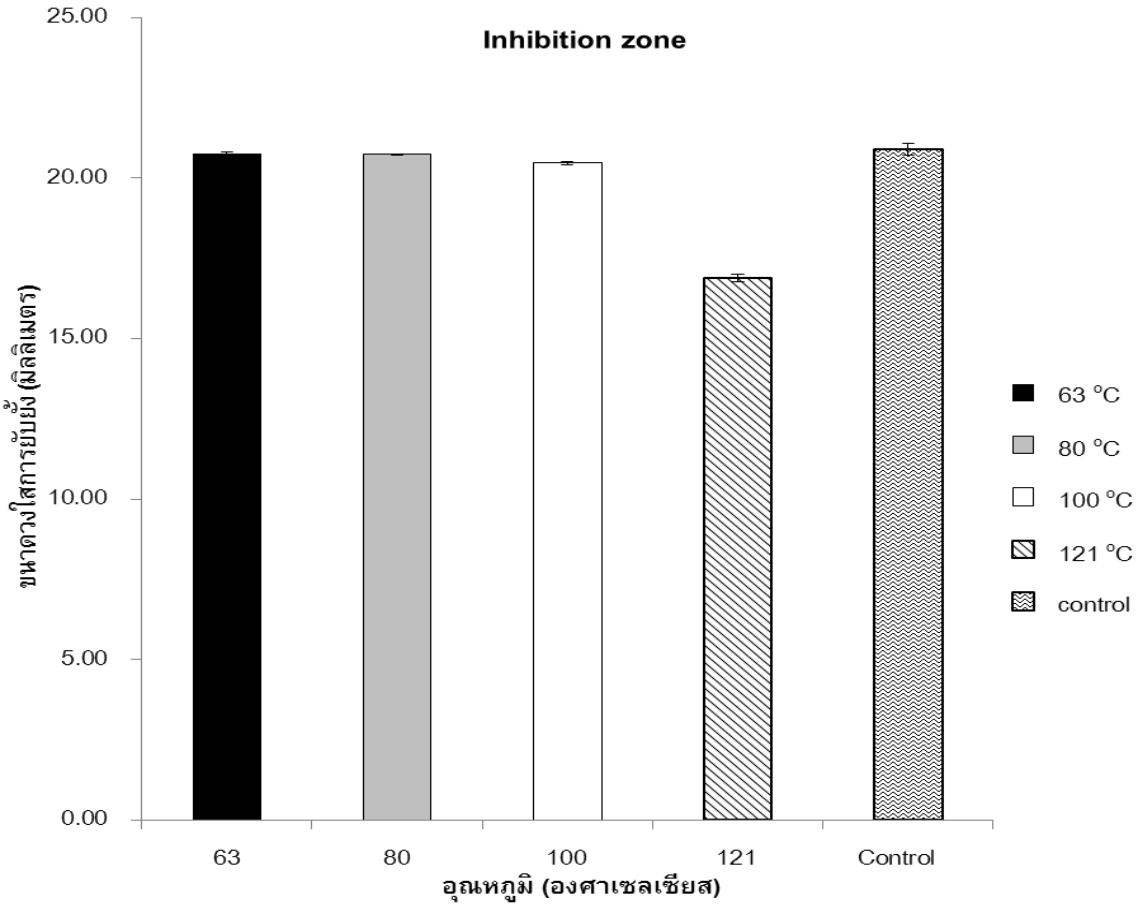
5.3 ผลของเอนไซม์โปรติเอสต่อสารกันเสียชีวภาพ

นำ CFS ที่เตรียมได้ ผสมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ proteinase K, trypsin, protease และ alpha-chymotrypsin โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มก/มล. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำส่วนใสดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบผลกับส่วนใสที่ไม่ได้ผ่านการทดสอบเอนไซม์ทั้งสี่ชนิด

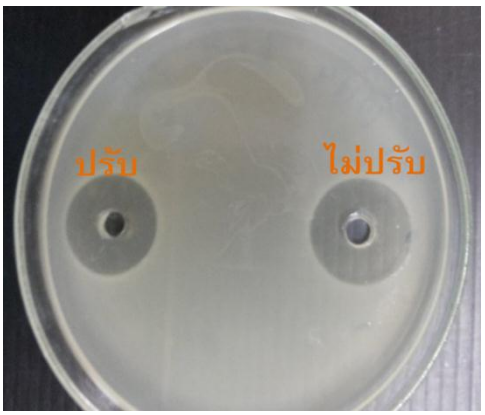
CFS ที่ผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ชนิดต่างๆ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ยกเว้น CFS ที่ผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ trypsin เท่านั้น ที่สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้ แม้ว่าจะมีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ลดลงมากก็ตามเมื่อเทียบกับชุดควบคุม (รูปที่ 3.15 และรูปที่ 3.16)



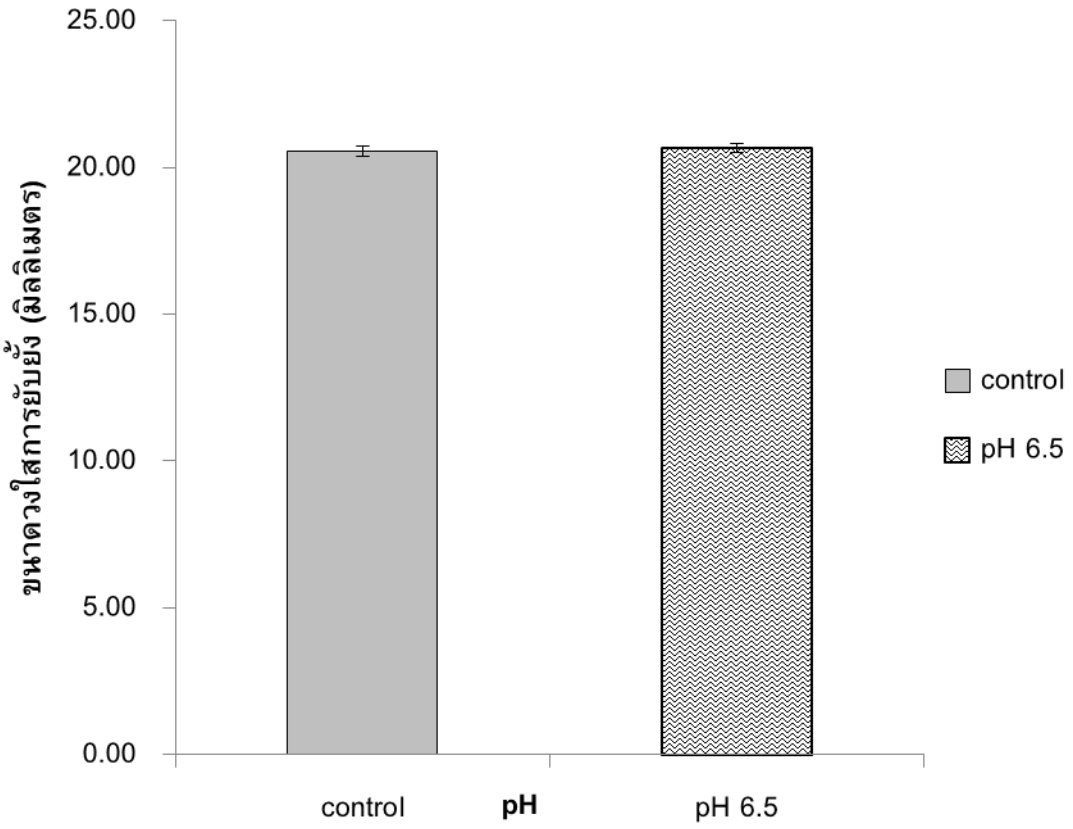
รูปที่ 3.11 ฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104ที่แช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 63, 80, 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีและเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที



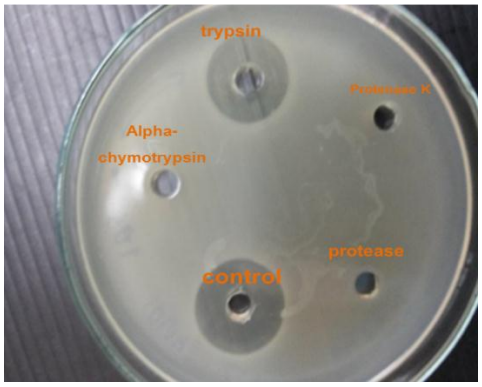
รูปที่ 3.12 ฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 ที่แช่ในอ่างน้ำอุณหภูมิ 63, 80, 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 นาทีและเข้าเครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที



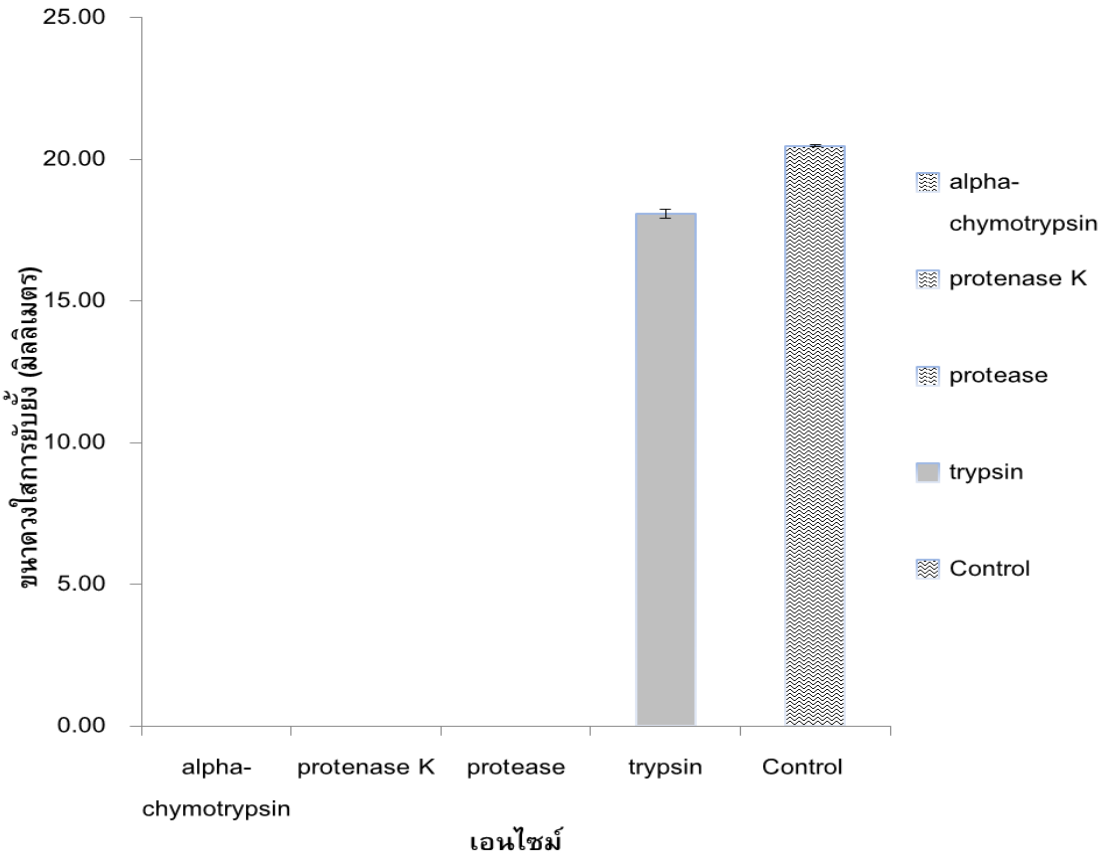
รูปที่ 3.13 แสดงฤทธิ์การยับยั้ง แบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 เทียบกับ CFS ที่มีการปรับเป็น 6.5 และไม่ปรับ pH



รูปที่ 3.14 ฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 ที่มีการปรับเป็น 6.5 และไม่ปรับ pH



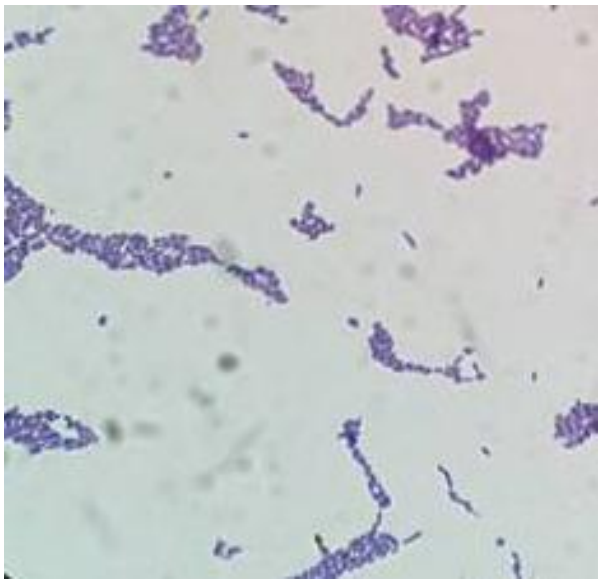
รูปที่ 3.15 ฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของCFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 ที่ผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ proteinase K, trypsin, protease และ alpha-chymotrypsin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง



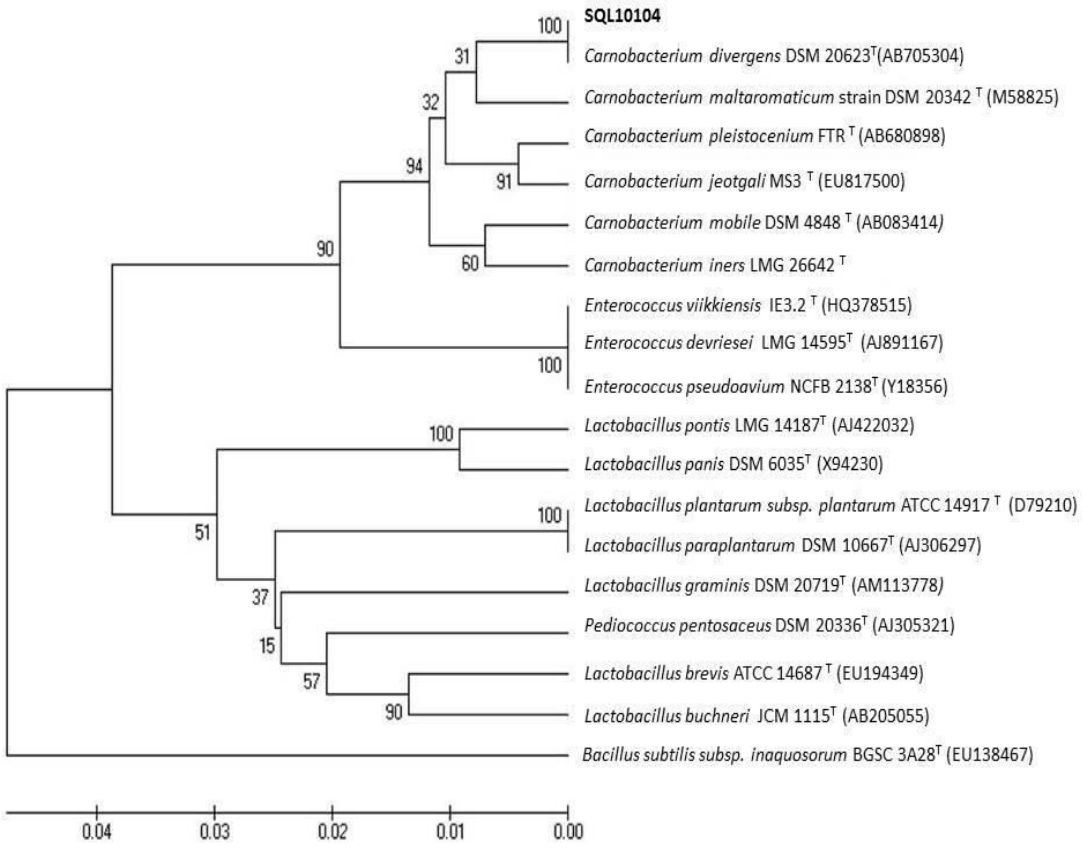
รูปที่ 3.16 ฤทธิ์การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ของCFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 ที่ผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ proteinase K, trypsin, protease และ alpha-chymotrypsinที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

6. การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ได้คัดเลือก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง (รูปที่ 3.17) ยังมีการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอโดยวิธี 16S rRNA sequence analysis แล้วทำการประมวลผลด้วยข้อมูลใน GenBank database โดยใช้ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 แสดงดังรูป ดังนั้น ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกพบว่า แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 มีความใกล้เคียงกับ Carnobacterium divergens DSM20623^{T} ซึ่งมี %similarity เท่ากับ 100 % ซึ่งตรงกับ Accesstion number คือ AB705304.1 (รูปที่ 3.18)



รูปที่ 3.17 รูปร่างและการจัดเรียงตัวของแบคทีเรียแลคติก SQL 10104 ที่กำลังขยาย 100x เท่า



รูปที่ 3.18 การจัดลำดับอนุกรมวิธานของสายพันธุ์ SHL 10104

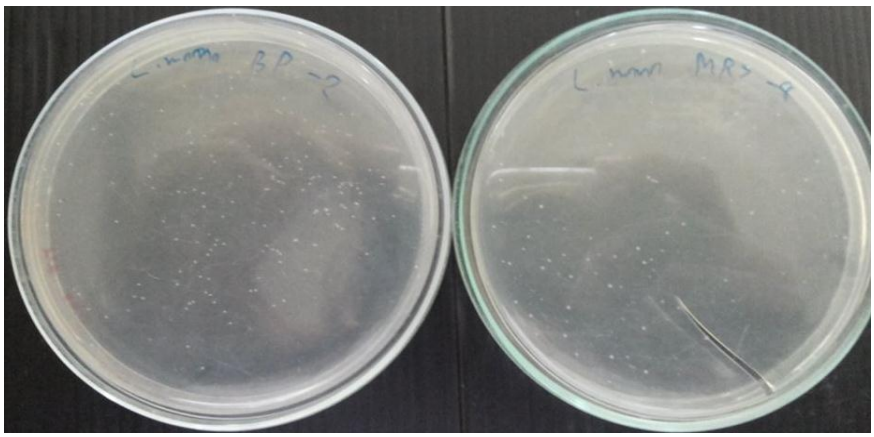
7. การนำสารกันเสียไปใช้ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ

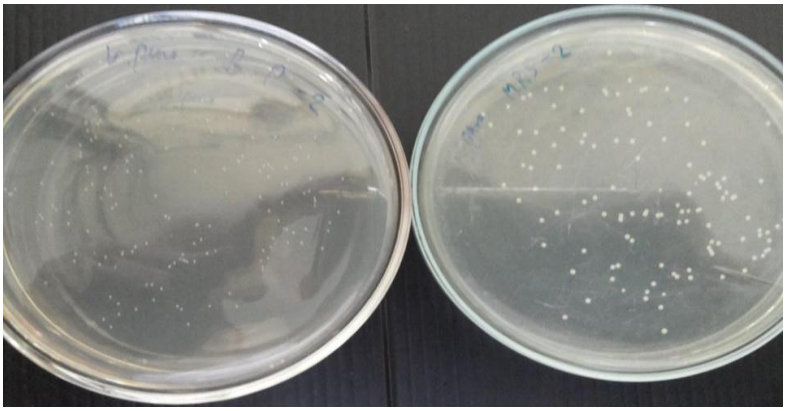
นำกุ้งที่ผ่านการล้างด้วย CFS และล้างด้วย MRS broth ไปเข้าใน stomacher และเจือจางในน้ำเกลือ 0.85% NSS และนำ *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA เทียบกับตัวควบคุม (รูปที่ 3.19 และ 3.20) เพื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพ ของการยับยั้งเชื้อโดยการนับเชื้อที่เหลือรอดอยู่

ได้มีการผันแปรเวลาที่ใช้ในการล้างกุ้งเป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที เพื่อศึกษาปัจจัยทางเวลาว่ามีผลในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์หรือไม่ โดยสำหรับเชื้อ *Listeria monocytogenes* จะนับในอาหาร TSA บ่มที่ 20 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง และ *Vibrio parahaemolyticus* ทำการนับเชื้อที่เหลือรอดอยู่ในอาหาร TSA ที่เติม NaCl 1 เปอร์เซ็นต์บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

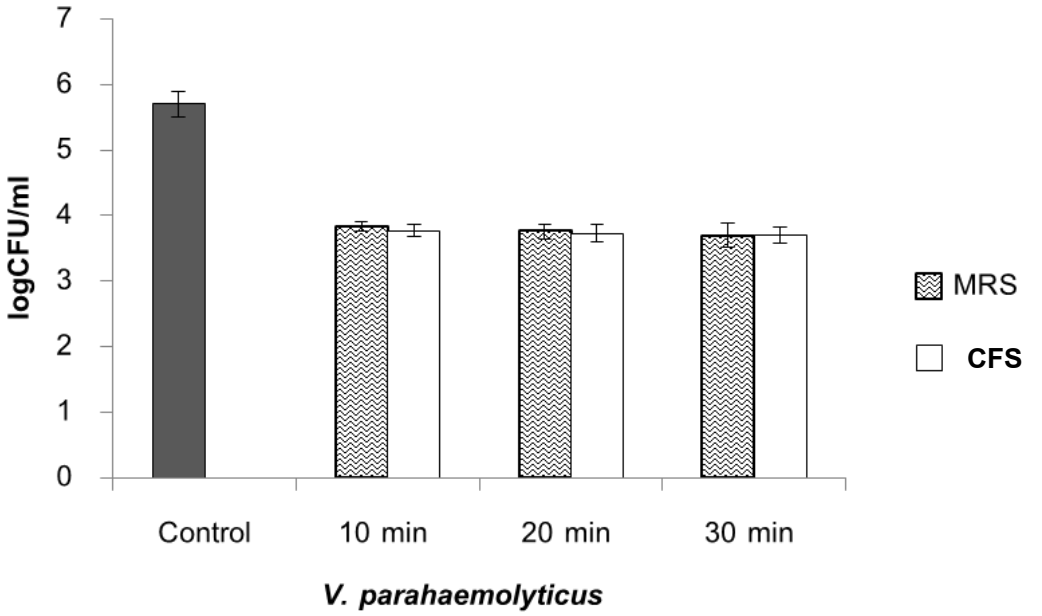
เมื่อล้างกุ้งใน MRS และใน CFS พบว่า เชื้อก่อโรคในกุ้งลดลง โดยกุ้งที่มีเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 เมื่อล้างใน MRS และใน CFS พบว่า เชื้อลดลงประมาณ 2 log CFU/mL สำหรับกุ้งที่มีเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 เมื่อล้างลงใน MRS เชื้อลดลง 1 log CFU/mL แต่เมื่อล้างลงใน CFS เชื้อลดลงถึง 3 log CFU/mL :ซึ่งจากการผันแปรเวลาที่ใช้ในการล้างกุ้งพบว่า เวลาที่ใช้ในการล้างกุ้งในเวลาต่างๆให้ผลการยับยั้งที่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (p-value>0.05)ดั่งแสดงในรูปที่ 3.21 และ 3.22



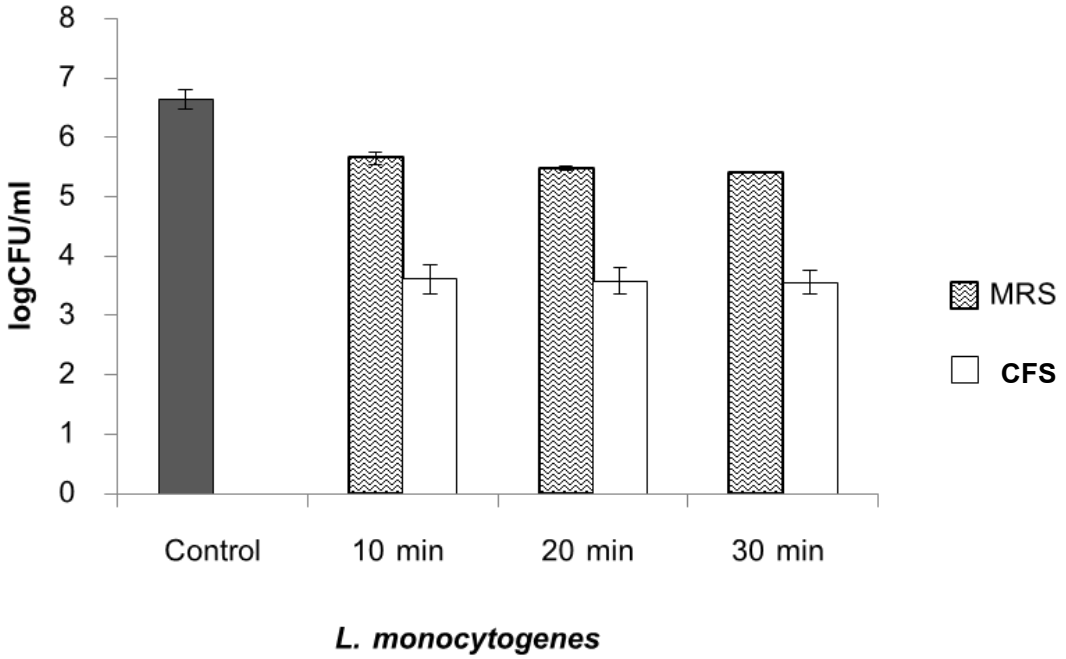
รูปที่ 3.19 จำนวนเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ในกุ้งที่เหลือเมื่อผ่านการล้างใน CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 (ซ้าย) และการล้างใน MRS (ขวา) เป็นเวลา 10 นาที



รูปที่ 3.20 จำนวนเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 ในกุ้งที่เหลือเมื่อผ่านการล้างใน CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 (ซ้าย) และการล้างใน MRS (ขวา) เป็นเวลา 10 นาที



รูปที่ 3.21 การยับยั้ง*Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1โดยใช้ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 และการล้างใน MRS เป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที



รูปที่ 3.22 การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 โดยใช้ CFS ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 และการล้างใน MRS เป็นเวลา 10 20 และ 30นาที

บทที่ 4
วิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ แบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และทนในสภาพที่มีอากาศ และมีรายงานการพบแบคทีเรียแลคติกในอาหารทะเลเช่นกัน (Huss, 1995) การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลแช่เย็นเพื่อใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ในขั้นตอนแรก ทำการเก็บตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นชนิดต่างๆจากสถานที่ต่างๆเพื่อนำมาแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเลแช่เย็น จากการศึกษาตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นทั้ง 14 ตัวอย่าง และแยกที่การบ่ม 2 อุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ ที่ 8 องศาเซลเซียสและ 35 องศาเซลเซียส โดยคัดเลือกไอโซเลทที่เป็นแบคทีเรียแลคติกด้วยการการตรวจสอบการติดสีแกรม เป็นแกรมบวก และทดสอบคะตะเลสที่ให้ผลลบ พบว่าแม้แยกมาจากอาหารทะเลแช่เย็น แต่เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่มักแยกได้จากอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส (52 ไอโซเลทจาก 74 ไอโซเลท) ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้ที่อุณหภูมิต่ำพบน้อยกว่า และจากการทดลองของ Matamoros *et al*, 2009 ได้มีการทดลองแยกแบคทีเรีย psychrotrophic lactic acid จากตัวอย่างอาหารทะเลเช่น ปลาแซลมอนรมควันแช่เย็น แซลมอนบรรจุแบบดัดแปรบรรยากาศ เป็นต้น พบเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ในขั้นต้น 5,575 ไอโซเลท แต่เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อและทดสอบสมบัติของแบคทีเรียแลคติกพบว่า มีเพียง 52 ไอโซเลทเท่านั้น

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย ด้วยวิธี Agar spot assay โดยใช้แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ดังนี้ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 พบว่ามีแบคทีเรียแลคติก 17 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *V. parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ได้ ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส 14 ไอโซเลท และแยกได้จากอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส 3 ไอโซเลท

นอกจากนี้ยังได้รับความอนุเคราะห์แบคทีเรียแลคติกจาก นางสาว นุชรี ตันติสุวรรณโณ จำนวน 53 ไอโซเลท เพื่อใช้ในการทดลองขั้นตอน Agar spot assay และได้ปรับวิธีการทดลองโดยการปรับลดชนิดของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ให้เป็นแบคทีเรียก่อโรค คือ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 และทดลองโดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้จากอุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียแลคติก 52 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้สามารถยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และมีแบคทีเรียแลคติก 31 ไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 และการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกอาจมาจาก กรดอินทรีย์ ไดอาซิทิล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และ แบคเทอริโอซิน (Lindgren and Dobrogosz 1989)

นำแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้ง *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารกันเสียชีวภาพด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ มีทั้งหมด 22 ไอโซเลท และพบว่ามีเพียง 8 ไอโซเลทเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งได้ทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งไอโซเลทที่ให้ขนาดของวงใสกว้างที่สุด คือ SQL 10104 ซึ่งเป็นไอโซเลทเดียวกันกับที่ให้ผลการยับยั้งด้วยวิธีการ Agar spot assay สูงที่สุดเช่นกัน แบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์ในขั้นตอน Agar spot assay มี 32 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้มาทดสอบในขั้นตอน Agar well diffusion ปรากฏว่า มีเพียง 8 ไอโซเลทเท่านั้นที่ยังยับยั้งได้ ทั้งสองสายพันธุ์ เนื่องจากขั้นตอน Agar spot assay เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อยังคงมีชีวิตสามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งต่างๆได้ ในขณะที่วิธี Agar well diffusion assay ไม่มีเซลล์มีชีวิตของแบคทีเรียแลคติก มีเพียง supernatant ที่เชื้อผลิตออกมาเท่านั้นโดยไม่ได้ใช้ตัวเซลล์ของแบคทีเรียในการยับยั้ง ซึ่งเชื้อแต่ละไอโซเลท อาจผลิตสารกันเสียชีวภาพออกมามากน้อยแตกต่างกัน ทำให้ไอโซเลทที่ยับยั้งในขั้นตอน Agar spot assay อาจไม่อาจยับยั้งในขั้นตอน Agar well diffusion ได้ อย่างไรก็ตามในบางไอโซเลทที่ยับยั้งในขั้นตอน Agar spot assay สามารถยับยั้งในขั้นตอน Agar well diffusion ได้สูงเช่น ไอโซเลท SQL 10104

หลังจากคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ SHL 25103, SHL 25104, SQL 25104, HYL 25103, SQL 10104 และ SQL 10107 เพื่อมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารกันเสียชีวภาพ โดยบ่มที่อุณหภูมิที่แปรผันที่ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยมีการวัดค่าการเจริญของเชื้อ ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600นาโนเมตร ที่ เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกค่าการดูดกลืนแสง วัดค่า pH ที่เวลาดังกล่าว แล้วบันทึกค่า pH และวัดการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง โดยทำการปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็ว 8000 รอบ/นาทีเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารที่ปั่นได้กรองผ่านแผ่นเยื่อขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำไปทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ นำเชื้อทดสอบผสมลงในอาหารกึ่งแข็ง แล้วเททับบนผิวหน้าอาหาร MRS ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็ง ทำการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิเมตร จากนั้นปิเปต CFS ปริมาตร 70 ไมโครลิตร หยด CFS ที่ต้องการทดสอบลงไป แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้ง เพื่อดูความสามารถในการยับยั้ง พบว่าเชื้อที่คัดเลือกได้นั้นทั้งหมดแยกได้จากที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อทุกไอโซเลทเจริญได้เร็วที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่แสดงการเจริญได้สูงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และค่า pH ที่วัดได้มีความสัมพันธ์กับค่าการเจริญของเชื้อ คือ เมื่อการเจริญของเชื้อมากขึ้น ค่าpH ก็ลดลงอย่างสัมพันธ์กัน เมื่อเทียบผลการทดลองของ Min Jung Kim *et al,* 2012 พบว่าเมื่อมีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียแลคติกผลิตกรดเป็น primary metabolite ทำให้ระยะแรกของ growth phase ซึ่งจำนวนเชื้อเพิ่มสูง ค่า pH ก็ลดต่ำลงโดยสัมพันธ์กัน

นอกจากนี้ ฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 พบว่า การเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ที่อณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส สามารถให้ CFS ที่มีความกว้างวงใสสูงที่สุด และประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลงเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิสูงกว่า หรือต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสม แม้ว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสทำให้ค่า pH ใน CFS ต่ำกว่าการเลี้ยงที่อุณหภูมิอื่นๆ แต่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียไม่ได้มีประสิทธิภาพที่ดีขึ้น ซึ่งแสดงว่า ฤทธิ์การยับยั้งของสารกันเสียชีวภาพที่ผลิตได้หลักๆ ไม่ได้มาจากกรดเพียงอย่างเดียว ซึ่งสารกันเสียที่ผลิตออกมาอาจเป็น diacetyl, hydrogen peroxide, CO_2 หรือ แบคเทอริโอซิน (Daeschel 1989) และพบว่าสารกันเสียที่ผลิตได้ มีฤทธิ์สูงตั้งแต่ ชั่วโมงที่ 24 สำหรับชั่วโมงที่ 36 และ 48 มีฤทธิ์เพิ่มกว่าเดิมเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

สำหรับการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 นั้นพบว่าทุกไอโซเลทที่คัดเลือกมานั้น พบการยับยั้งเชื้อที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งขนาดวงใสกว้างจนไม่สามารถวัดค่าได้ และ ไม่เห็นวงใสอีกครั้งในชั่วโมงที่ 36 และ 48 และจากข้อมูลการคัดเลือกสภาวะของแบคทีเรียแลคติก อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม จึงคัดเลือกไอโซเลท SQL 10104 เลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการศึกษาสมบัติของสารกันเสียชีวภาพต่อไป

สมบัติการทนอุณหภูมิสูง ทำโดยนำ CFS แช่ที่อุณหภูมิ 63, 80, 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และ เข้าเครื่อง autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาทีก่อนนำไปทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion กับเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 พบว่า CFS ที่แช่ที่อุณหภูมิ 63, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อเมื่อเทียบกับตัวควบคุม (ที่ไม่ผ่านการแช่ที่อุณหภูมิใดๆ) ไม่ลดลง แต่ CFS ที่ผ่านความร้อน 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลงไป 20 เปอร์เซ็นต์ (เมื่อเทียบขนาดวงใสของ CFS ที่ผ่านอุณหภูมิ กับ CFS ของตัวควบคุม) ซึ่งแสดงว่าสารกันเสียชีวภาพที่ผลิตได้ค่อนข้างทนอุณหภูมิสูง

ผลของพีเอชต่อการยับยั้ง ทำโดย นำ CFS ชุดที่ 2 ที่ไม่ได้ปรับ pH (pH 5.98) และ CFS ที่นำมาปรับ pH เป็น 6.5 แล้วจึงนำไปทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion กับเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 พบว่า CFS ทั้งที่ผ่านการปรับ และไม่ปรับ pH ให้ผลที่ไม่แตกต่าง (ขนาดของวงใส 20.55 และ 20.67 ตามลำดับ) แสดงว่าการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียที่ผลิตได้ ไม่ได้มาจากกรดเป็นสารหลักเพียงอย่างเดียว

และเมื่อนำ CFS ผสมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ protease, protenase K, trypsin และ alpha-chymotrypsin โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มก/มล บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำ CFS ดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรีย โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบผลกับ CFS ที่ไม่ได้ผ่านการผสมด้วยเอนไซม์มาทดสอบ Agar well diffusion กับเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 พบว่า ประสิทธิภาพของ CFS ถูกยับยั้ง เมื่อนำไปทรีทด้วย protease, protenase K และ alpha-chymotrypsin ยกเว้น CFS ที่ผ่านการผสมด้วย trypsin ที่ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคอยู่ แต่ขนาดของวงใสเล็ก เมื่อเทียบกับ CFS ที่ไม่ได้ผ่านการผสม

ด้วยเอนไซม์ (ขนาดของวงใส 18.08 และ 20.48 มิลลิเมตร ตามลำดับ) แสดงว่าการยับยั้งเชื้อที่เกิดขึ้นน่ามาจากสารออกฤทธิ์กลุ่มโปรตีน ซึ่งอาจเป็นแบคเทอริโอซิน (Pilar *et al,* 2007)

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ยังมีการจัดจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอซึ่งได้รับการเพิ่มขยายโดยวิธี 16S rRNA sequence analysis ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสด้วยวิธี 16S rRNA สามารถใช้ในการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ได้ถูกต้องมากที่สุด เนื่องจากเป็นการจัดจำแนกในระดับโมเลกุล และกรดนิวคลีอิกที่เป็นองค์ประกอบในไรโบโซมชนิด 16S ของเซลล์โปรคาริโอตเป็นหน่วยอนุรักษ์สายพันธุ์และมีความคงตัวสูงมาก ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์มีการเปลี่ยนแปลงไปน้อยมากแม้มีการวิวัฒนาการมานาน (Axelsson, 1998) แล้วทำการประมวลผลด้วยข้อมูลใน GenBank database โดยใช้ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA 4 ดังนั้น ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกพบว่า แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 9 ตรงกับ *Carnobacterium divergens* DSM 20623^{T} ซึ่งมี %similarity เท่ากับ 100 % ซึ่งตรงกับ Accesstion number คือ AB705304.1

จากนั้น นำ CFS ไปใช้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ โดยอาหารทะเลที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้คือ กุ้งขาว (*Litopenaeus vannamei*) โดยคัดเลือกกุ้ง ที่มีขนาดประมาณ30-50 กรัมต่อตัว โดยใช้กุ้งที่ปอกเปลือกผ่าหลังในการทดลอง ซึ่งก่อนที่นำกุ้งไปใช้ในการทดลอง ต้องทำให้ปลอดเชื้อจากสิ่งแวดล้อมก่อนที่นำไปใช้กับเชื้อก่อโรค ด้วยการนำกุ้งไปแช่ในสารละลายฟอมัลดีไฮด์ 3 เปอร์เซ็นต์เป็นเวลา 3 นาที และนำกุ้งไปล้างฟอมัลดีไฮด์ด้วยการแช่ใน NSS อีก 10 ครั้ง (เป็นอย่างน้อย) (หัสยานีย์, 2556) และนำกุ้งปลอดเชื้อไปทดลองเพาะในจานเลี้ยงเชื้อเพื่อทดสอบว่ากุ้ง sterile จริง และเตรียมเชื้อก่อโรคคือ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 โดยนำไปเลี้ยงในอาหาร TSB 5 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และนำไปถ่ายลงในฟลาสก์ที่มีอาหาร TSB 45 มล. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้มีเชื้อสุทธิประมาณ 10^{7}–10^{8} CFU/mL จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้ไปบรรจุในกุ้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มีเชื้อสุทธิประมาณ 10^{-6} CFU/mL และมีการนับเชื้อทั้งก่อนและหลังล้างกุ้ง เพื่อศึกษาปริมาณของเชื้อที่ติดกับกุ้ง และที่ล้างไปแล้ว

นำกุ้งที่ได้ไปล้างใน MRS broth (ชุดควบคุม) และ CFS ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที นำกุ้งที่ผ่านการล้าง ไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อด้วยการ นำกุ้งไปเข้าใน stomacher และเจือจางในน้ำเกลือ NSS และนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อศึกษาจำนวนเชื้อก่อโรคที่ยังเหลือรอด เทียบกับกุ้งที่ยังไม่ได้ผ่านการล้างและกุ้งที่ล้างด้วย MRS (ชุดควบคุม) พบว่ากุ้งที่เติมเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 ก่อนล้างมีเชื้อประมาณ 5 log CFU/mL หลังจากผ่านการล้างด้วย MRS broth (ชุดควบคุม) และ CFS จำนวนเชื้อลดลงไปเหลือ 3 log CFU/mL ไม่แตกต่างกัน แม้ระยะเวลาในการล้างกุ้ง แตกต่างกัน แต่จำนวนเชื้อที่เหลือใกล้เคียงกัน ซึ่งแสดงว่า CFS ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อเมื่อเทียบกับตัวควบคุม แต่จำนวนเชื้อที่

ลดลงมาจากการที่นำกุ้งไปล้างใน MRS broth (ควบคุม) และ CFS ซึ่งเชื้อที่เกาะกุ้งก็หลุดออกมาอยู่ในสารละลาย

แต่ในทางตรงกันข้ามกุ้งที่เติมเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ก่อนล้างกุ้งมีเชื้อประมาณ 6 log CFU/mL เมื่อนำกุ้งไปล้างใน MRS broth (ควบคุม) พบว่าเชื้อลดลงเหลือ 5 log CFU/mL แต่เมื่อเทียบกับการนำกุ้งไปล้างใน CFS พบว่า เชื้อลดลงเหลือ 3 log CFU/mL ลดลงมากกว่าการล้างใน MRS ถึง 2 log CFU/mL แสดงว่า CFS มีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ในกุ้ง แม้ว่าล้างกุ้งเป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที ผลการยับยั้งเชื้อแตกต่างกันไม่มาก (3.61, 3.58 และ 3.56 log CFU/mL)

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

การศึกษาในครั้งนี้ เพื่อหาสารกันเสียชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทนอุณภูมิต่ำ เพื่อใช้ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารทะเลในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทำการเก็บตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นจากสถานที่ต่าง ๆเพื่อนำมาแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเลแช่เย็น จากการศึกษาตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นทั้ง 14 ตัวอย่าง และนำมาแยกที่การบ่ม 2 อุณหภูมิที่แตกต่างกันคือ ที่ 8 องศาเซลเซียสและ 35 องศาเซลเซียส โดยคัดเลือกไอโซเลทที่เป็นแบคทีเรียแลคติก สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 74 ไอโซเลท (52 ไอโซเลทแยกจากการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส และ 22 ไอโซเลทแยกจากการบ่มที่ 8 องศาเซลเซียส) เพื่อทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) ด้วยวิธี Agar spot assay พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแลคติก 9 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้ทั้งหมด และพบว่ามี 17 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *V. parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *L. monocytogenes* ATCC 15313 ได้ และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียแลคติกจากนางสาว นุชรี ตันติสุวรรณโณ จำนวน 53 ไอโซเลท พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *V. parahaemolyticus* AAHRC 1 ได้ 52 ไอโซเลท และ สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ATCC 15313 ได้ 31 ไอโซเลท

ทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยการนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 วัน ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ออก กรองให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ได้เป็น crude filtrate supernatant (CFS) พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อย่างน้อย 1 สายพันธุ์ มีทั้งหมด 22 ไอโซเลท และพบว่ามีเพียง 8 ไอโซเลทเท่านั้น ที่สามารถยับยั้งได้ทั้ง *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 และ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลท ได้แก่ SHL 25103, SHL 25104, SQL 25104, HYL 25103, SQL 10104 และ SQL 10107 มาศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตสารกันเสียชีวภาพที่มีการแปรผันอุณหภูมิที่ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทุกไอโซเลท มีค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง ซึ่งเชื้อที่เลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสทุกไอโซเลทนั้น มีค่า pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเร็วมากที่สุด แต่ในขณะเดียวกัน พบว่าเชื้อที่คัดเลือกทุกไอโซเลทจะเจริญได้เร็วเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่จะเข้าสู่ระยะ stationary phase เร็วเช่นกัน และเชื้อทุกไอโซเลทจะเจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ยกเว้นไอโซเลท SQL 10104 ที่สามารถเจริญได้ดีที่ 20 และ 25 องศาเซลเซียส

และเมื่อทดสอบฤทธิ์การยับยั้งต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25103 ที่เจริญที่อุณหภูมิ 15, 20, 25 และ 30 องศาเซลเซียส ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 แต่แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SHL 25104 และ SQL 25104 ไม่พบฤทธิ์ยับยั้ง แบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 เมื่อเจริญเป็นเวลา 12 ชั่วโมงทุกอุณหภูมิที่เพาะเลี้ยง แต่จะพบฤทธิ์การยับยั้งตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 เป็นต้นไป ยกเว้นเชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ในขณะที่ไอโซเลท HYL25103, SQL10104 และ SQL10107 พบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ตั้งแต่การเจริญชั่วโมงที่ 12 ของการเพาะเลี้ยงทุกอุณหภูมิ และผลของการยับยั้งเชื้อพบว่า เชื้อที่เจริญที่อุณหภูมิ 20 และ 25 องศาเซลเซียส แสดงผลการยับยั้งที่ไม่แตกต่างกัน

สำหรับฤทธิ์การยับยั้ง *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 นั้น พบว่าทุกไอโซเลทของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ แสดงฤทธิ์การยับยั้งที่ ชั่วโมงที่ 24 แต่ไม่สามารถวัดค่าได้เนื่องจากมีความกว้างของวงใสเกิน 35 มิลลิเมตร แต่ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 ไม่พบฤทธิ์การยับยั้ง

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ไอโซเลท SQL 10104 เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำ CFS มาศึกษาสมบัติของสารกันเสียชีวภาพที่คัดเลือกได้โดยการทดสอบกับอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์พบว่า เมื่อนำ CFS ไปทำให้มีอุณหภูมิสูงขึ้นที่ 63, 80 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีนั้น ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับตัวควบคุม แต่ CFS ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสเวลา 15 นาที มีฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ลดลง ตามขนาดของวงใสที่เกิดขึ้น และเมื่อนำ CFS ที่มีการปรับ pH เป็น 6.5 เทียบกับ CFS ที่ไม่มีการปรับ pH พบว่าไม่มีความแตกต่างของการยับยั้งแบคทีเรีย และCFS ที่ผ่านการ บ่มด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ proteinase K, trypsin protease และ alpha-chymotrypsin ชนิดต่างๆ ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 ยกเว้น CFS ที่ผ่านการ บ่มด้วยเอนไซม์ trypsin เท่านั้นที่สามารถแสดงฤทธิ์การยับยั้งได้ แต่มีประสิทธิภาพการยับยั้งที่ลดลง

ทำการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL10104 ด้วยวิธีวิธี 16S rRNA sequence analysis แล้วทำการประมวลผลด้วยข้อมูลใน GenBank database โดยใช้ BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) พบว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท SQL 10104 ตรงกับ *Carnobacterium divergens* DSM 20263^{T} ซึ่งมี %similarity เท่ากับ 100 % ซึ่งตรงกับ Accesstion number คือ AB 705304.1

จากนั้นนำ CFS ของแบคทีเรีย *Carnobacterium divergens* SQL10104 ที่คัดเลือกได้มาศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในอาหารทะเล ได้แก่กุ้งขาว เหตุผลที่เลือกใช้กุ้งขาวเป็นตัวแทนอาหารทะเลเพราะ มีสัตว์เศรษฐกิจที่มีการส่งออกไปต่างประเทศ และมีรายงานกล่าวถึงเชื้อที่มักปนเปื้อนในกุ้ง โดยนำกุ้งขาวมาทำให้ปลอดเชื้อจากสิ่งแวดล้อม และเติมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เพื่อที่จะทดสอบฤทธิ์การยับยั้งโดยใช้ CFS ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ และใช้ MRS เป็นชุด

ควบคุม พบว่าเมื่อแช่กุ้งใน CFS พบว่า เชื้อก่อโรคในกุ้งลดลง โดยกุ้งที่มีเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* AAHRC 1 เมื่อแช่ใน MRS และใน CFS พบว่า เชื้อลดลงประมาณ 2 log CFU/mL สำหรับกุ้งที่มีเชื้อ *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 เมื่อแช่ลงใน MRS เชื้อลดลง 1 log CFU/mL แต่เมื่อแช่ลงใน CFS เชื้อลดลงถึง 3 log CFU/mL

ข้อเสนอแนะ เมื่อทำการทดลองต่อไปในอนาคต ควรเพิ่มการทดลองเพื่อทดสอบความปลอดภัยของ CFS ที่จะนำไปใช้ และหาวิธีเพิ่มขีดความสามารถในการยับยั้งการแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

เอกสารอ้างอิง

บุษกร อุตรภิชาติ. 2550. จุลชีววิทยาทางอาหาร. โครงการการส่งเสริมการผลิตเอกสารวิชาการ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยทักษิณ. 451 น.

ปิ่นมณีขวัญเมือง. 2546.การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก.มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ณรงค์ นิยมวิทย์ และ อัญชนีย์ อุทัยพัฒนาชีพ. 2538. วิทยาศาสตร์การประกอบอาหาร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพมหานคร

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. กรุงเทพมหานคร:โอเดียนสโตร์. 257 น.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล.2537. การเน่าเสียของอาหารเนื่องจากจุลินทรีย์. โครงการสนับสนุนของคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิวาพร ศิวเวชช.2535 วัตถุเจือปนอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 328 น.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 470 น.

สมใจ ศิริโภค, ประวัติ อังประภาพรชัย, ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้จากอาหารหมักและการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้. วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 23 (2):92–114.

หัสยานี บินมะแอ. 2556. ผลของอุณหภูมิและคลอรีนของการอยู่รอดของเชื้อ *Vibrio vulnificus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อัจฉรา เพิ่ม. 2549. แบคทีเรียแลคติก. โครงการตำราวิชาการราชภัฏเฉลิมพระเกียรติเนื่องในวโรกาสพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวครองสิริราชสมบัตรครบ 60 ปี. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.179 น.

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

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. 23(2) :145–160.

Anastasiadou, S., Papagianni, M., Filiousis.,Ambrosiadis, I. and Koidis, p. 2008. Growth and Metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus*in submerged Fermentation purification, characterization and properties of the produced pediocin SM-1.Enzyme and Microbial Technology.43 : 448-454.

Andrighetto, C., Angiolella L., Massimiliano F., Angelo G., Chiara C. and Giuseppe A. 2009. Lactic acid bacteria biodiversity in Italian marinated seafood salad and their interactions on the growth of *Listeria monocytogenes.* Food Control. 20 (5): 462-468.

Audenaert, K., Klaas D., Kathy M. T. R., Peter V. and Geert H. 2010. Diversity of lactic acid bacteria from modified atmosphere packaged sliced cooked meat products at sell-by date assessed by PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis. Food Microbiology. 27 (1): 8-12.

Axelsson, L. 1993. Lactic Acid Bacteria : Classification and physiology. In Lactic Acid Bacteria (Salminen, S. and Von Wright, A., eds.) p. 1-64. Marcel Dekker. New York.

Casla, D, T. Requena and R. Gomez. 1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria from goat's milk and artisanelcheeses : characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105.Journal of Applied Bacteriology.81 : 35-41.

Charernjiratrakul, W. 2000. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from southern of Thailand traditional fermented food. Songklanakarin.Journal of Science and Technology, 22(2) : 177–189.

Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substance from lactic acid bacteria for use as food preservatives.Food Science Nutrition. 42(2), 164-167

Dellaglio, F., L. M. T. Dicks, and S. Torriani. 1995. The genus *Leuconostoc*, p. 235-278. In B. J. B. W. a. W. H. Holzapfel (ed.), The Genera of Lactic Acid Bacteria, vol. 2. Blackie Academic & Professional, London.

Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and Its Use as Food Preservative. International Journal of Dairy Technology. 43(3) : 73-76.

Devriese, L. A. And B. Pot. 1995. The genus *Enterococcus*, pp. 327-367. In B.J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.).The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman and Hall, Glasgow.Eijsink, V. G. H., Skeie, M., Middelhoven, P. H., Bruberg, M. B. And Nes, I. F.

1998. Comparative studies of class IIabacteriocins of lactic acid bacteria. Applied and Enviromenthal Microbiology. 64: 3275-3281.

Einarsson, H. and Lauzon, H. 1994. Biopreservation of Brined Shrimp (*Pandalus borealis*) by Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. Applied and Enviromental Microbiology. 61 (2): 669-676.

Ercolini, D, F. Russo, A. Nasi, P. Ferranti, and F. Villani. 2009. Mesophilic and Psychrotrophic Bacteria from Meat and Their Spoilage Potential In Vitro and in Beef. Applied and Environmental Microbiology. 75 (7):1990-2001.

Gao, Y, Jia, S, Gao, Q. and Tan, Z. 2010. A novel bacteriocin with a broad inhibitory Spectrum produced by *Lactobacillus sake* C2, isolated from traditional Chinese fermented cabbage. Food Control. 21: 76-81.

Garneau, Sylvie, Nathaniel I. Martin, and John C. Vederas.Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria.Biochimie 84 (5-6):577-592.

Guerrieri, E., Simona N., Patrizia M., Carla S., Ramona I., Immacolata A., and Moreno B. 2009. Use of lactic acid bacteria (LAB) biofilms for the control of *Listeria monocytogenes* in a small-scale model. Food Control 20 (9):861-865.

Hardie, J. M. And R. A. Whiley. 1995. The genus Streptococcus, pp. 75-124. In B.J. B. Wood and W. H. Holzapfel(eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman and Hall, Glasgow.Huss, H.H. 1995. Quality and quality changes in fresh fish. In Huss, H.H. (Ed.), FAO fishing technical paper 348 (pp. 51). Rome, Italy: FAO

Izquierdo, E., Eric Marchioni, Dalal A., Claude H., and Saad E. 2009.Smearing of soft cheese with *Enterococcus faecium* WHE 81, a multi-bacteriocin producer, against *Listeria monocytogenes.* Food Microbiology 26 (1):16-20.

Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of Bacteriocins produced by lactic acid bacteria.FEMS Microbiology Reviews. 12: 39-68.

Lindgren, S. E., and Dobrogosz, W. J. 1990.Antagonistic activities of lactic bacteria in food and feed fermentation. FEMS Microbiology Reviews, 87, 149-164.

Magnusson J, Strom K, Roos S, Sjogren J. and Schnurer J. 2003. Broad and complex Antifungal activity amoung environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Letters. 219: 129-135.

Matamoros, S, F. Leroi, M. Cardinal, F. Gigout, F. K. Chadli, J. Cornet, H. Prvost, and M. F. Pilet. 2009. Psychrotrophic lactic acid bacteria used to improve the safety and quality of vacuum-packaged cooked and peeled tropical shrimp and cold-smoked salmon. Journal of Food Protection. 72 (2):365-374.

Matamoros, S, M. F. Pilet, F. Gigout, H. Prvost, and F. Leroi. 2009. Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors of pathogenic and spoilage bacteria. Food Microbiology. 26 (6):638-644.

Nilsson L, Gram L. and Huss H.H. 1999. Growth control of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon using a competitive lactic acid bacteria flora. Journal of Food Protection.62pp. 336–342.

Pilar, C. M. Samuel, A., and Karola, B. 2007. Current Applications and Future Trends of Lactic Acid Bacteria and their Bacteriocins for the Biopreservation of Aquatic Food Produtcs. Food Bioprocess Technol. 1: 43-63

Raghunath P, Iddya K, and Indrani K. 2009.Improved isolation and detection of pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* from seafood using a new enrichment broth.International Journal of Food Microbiology. 129 (2):200-203.

Schnurer J. and Magnusson J. 2005.Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives.Trends in Food Science & Technology. 16 (1-3): 70-78.

Stiles, M. E. And W. H. Holzapfel.1997.Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy.International Journal of Food Microbiology.36 : 1-29.

Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcuss,* pp. 134-173. In B.J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman and Hall, Glasgow.

Vihavainen, E, and J. Bjorkroth. 2009. *Leuconostoc gasicomitatum,* an ubiquitous spoilage lactic acid bacterium. Archives of Food Hygiene. 60 (2):52-55.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS agar)

Proteose Peptone	10	กรัม
Beat extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.10	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง MRS 70 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. De Man, Rogosa and Sharpe broth (MRS broth)

Proteose Peptone	10	กรัม
Beat extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.10	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลวMRS 55 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Brain Heart Infusion broth (BHI)

Calf brain infusion solid	12.5	กรัม
Beef heart infusion solid	5	กรัม
Proteose peptone	10	กรัม
Glucose	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Di-sodium phosphate	2.5	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว BHI 37 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเซลเซียส

4. Trypticase Soy agar (TSA)

Casein peptone	15	กรัม
Soymeal peptone	5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Agar	15	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อแข็ง TSA 30.0 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. Trypticase Soy broth (TSB)

Casein peptone	17	กรัม
Soymeal peptone	3	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
di-Potassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม

เตรียมโดยละลายอาหารเพาะเชื้อเหลว TSB 30 กรัม ในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Tryptone broth

tryptone	10.0	กรัม
Sodium chloride	8.75	กรัม

ละลายสารในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 9 มิลลิลิตร หรือขวดสารละลายเจือจาง 225 มิลลิลิตร มิลลิลิตร แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยเครื่องนึ่งฆ่าเชื้อความดันไอน้ำที่ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

ตารางและข้อมูลผลการทดลอง

เก็บตัวอย่างอาหารทะเลแช่เย็นจากเขตเทศบาลนครหาดใหญ่มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยใช้ตัวอย่างในการแยกครั้งล่าสุด 14 ตัวอย่าง โดยให้รหัสตัวอย่างทั้งหมดเป็นพยัญชนะภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ ดังนี้

A= ปลาลิ้นหมา ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่ เก็บตัวอย่างโดยการตัดชิ้นเนื้อปลา
B= ปลาแซลมอน ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่ เก็บตัวอย่างโดยการตัดชิ้นเนื้อปลา
C= ปลาสีกุน ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่ เก็บตัวอย่างโดยการตัดชิ้นเนื้อปลา
D= กุ้งก้ามกราม ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่ เก็บตัวอย่างบริเวณหัว เปลือก และเนื้อกุ้ง
E= ปลาอินทรีย์ ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่ เก็บตัวอย่างโดยการตัดชิ้นเนื้อปลา
F= ปลากะพงแดง ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่ เก็บตัวอย่างโดยการตัดชิ้นเนื้อปลา
G= ปลาทราย ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่ เก็บตัวอย่างโดยการตัดชิ้นเนื้อปลา
H= หอยหวาน ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่ เก็บตัวอย่างเฉพาะเนื้อหอย
I= หมึกกล้วย ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่เก็บตัวอย่างบริเวณหนวด เนื้อ และครีบ
J= ปลาไข่ ซื้อที่ห้างเทสโก้โลตัส สาขาหาดใหญ่ ใช้ปลาทั้งตัวเป็นตัวอย่าง
K= ปลาทู ซื้อที่ตลาดนัดเทศบาลเมืองนราธิวาส ใช้ปลาทั้งตัวเป็นตัวอย่าง
L= ปลาโอ ซื้อที่ตลาดนัดเทศบาลเมืองนราธิวาส ใช้ปลาทั้งตัวเป็นตัวอย่าง
M= หมึกหอม ซื้อที่ตลาดนัดเทศบาลเมืองนราธิวาส ใช้ปลาทั้งตัวเป็นตัวอย่าง
N= กุ้งขาว ซื้อที่ตลาดนัดเทศบาลเมืองนราธิวาส ใช้ปลาทั้งตัวเป็นตัวอย่าง

การลงรหัสเชื้อ

มีการแบ่งออกเป็น 3 ตอน คือ
พยัญชนะภาษาอังกฤษ หมายถึง เชื้อได้มาจากตัวอย่างอาหารทะเลใด
ตัวเลขตัวแรก หมายถึง เชื้อที่ได้มา บ่มที่อุณหภูมิใด (1= 8 องศาเซลเซียส, 2= 35 องศาเซลเซียส)
ตัวเลขสองตัวสุดท้าย หมายถึง เชื้อนั้นเป็นเชื้อลำดับที่เท่าใดจากตัวอย่างนั้น
ตัวอย่าง B 201
หมายถึง เชื้อตัวนี้แยกได้เป็นลำดับที่ 1 จากการบ่มที่ 35 องศาเซลเซียส จากตัวอย่างปลาแซลมอน

ตารางที่ 1 ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเล บนอาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0 % และ Bromcresol purple 0.004% บ่มที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

ไอโซเลท	คะตะเลส	แกรม	รูปร่าง	หมายเหตุ
A 201	+			Discard
A 202	+			Discard
A 203	-	+	กลมรี กระจัดกระจาย	
A 204	+			Discard
A 205	+			Discard
A 206	+			Discard
A 207	+			Discard
A 208	+			Discard
A 209	+			Discard
A 210	+			Discard
B 201	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
B 202	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
B 203	+			Discard
B 204	+			Discard
B 205	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
B 206	+			Discard
B 207	+			Discard
B 208	+			Discard

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท	คะตะเลส	แกรม	รูปร่าง	หมายเหตุ
B 209	+			Discard
B 210	+			Discard
C 201	+			Discard
C 202	+			Discard
C 203	-		แท่ง กระจัดกระจาย	
C 204	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
C 205	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
C 206	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
E 201	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
E 202	+	+		Discard
E 203	+			Discard
E 204	+			Discard
E 205	+			Discard
E 206	+			Discard
E 207	+			Discard
E 208	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
F 201	+			Discard
F 202	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
F 203	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
F 204	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
G 201	-	+	กลมรี กระจัดกระจาย	
G 202	-	+	กลมรี กระจัดกระจาย	
G 203	-	+	กลมรี กระจัดกระจาย	
G 204	-	+	กลมรี เป็นสาย	
G 205	-	+	กลมรี เป็นสาย	
H 201	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
H 202	-	+	กลมรี เส้นสาย	
H 203	-	+	กลมรี เส้นสาย	
H 204	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท	คะตะเลส	แกรม	รูปร่าง	หมายเหตุ
H 205	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
H 206	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
H 207	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
H 208	-	+	แท่ง เส้นสาย	
H 209	-	+	แท่ง เส้นสาย	
H 210	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
H 211	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
I 201	-	+	กลม เส้นสาย	
I 202	-	+	กลมรี เส้นสาย	
I 203	-	+	แท่ง เส้นสาย	
J 201	-	+	แท่ง เส้นสาย	
J 202	-	+	กลม เส้นสาย	
J 203	-	+	กลม เส้นสาย	
J 204	-	+	กลม เส้นสาย	
J 205	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
J 206	-	+	แท่ง เส้นสาย	
J 207	-	+	แท่ง เส้นสาย	
J 208	-	+	แท่ง เส้นสาย	
K 201	+			Discard
K 202	+			Discard
K 203	-	+	แท่ง เส้นสาย	
K 204	-	+	แท่ง เส้นสาย	
L 201	+			Discard
L 201	+			Discard
L 203	+			Discard
L 204	-	+	แท่ง เส้นสาย	
L 205	+			Discard
L 206	+			Discard
L 207	+			Discard

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไอโซเลท	คะตะเลส	แกรม	รูปร่าง	หมายเหตุ
L 208	+			Discard
L 209	+			Discard
L 210	-	+	แท่ง เส้นสาย	
L 211	-	+	กลม กระจัดกระจาย	
L 212	+			Discard
L 213	+			Discard
L 214	+			Discard
L 215	+			Discard
L 216	-	+	กลม กระจัดกระจาย	
M 201	+			Discard
M 201	+			Discard
M 203	+			Discard
M 204	-	+	แท่ง เส้นสาย	
M 205	-	+	แท่ง เส้นสาย	
M 206	+			Discard
M 207	-	+	กลม กระจัดกระจาย	
M 208	+			Discard
N 201	-	+	แท่ง เส้นสาย	
N 202	+			Discard
N 203	+			Discard
N 204	+			Discard
N 205	+			Discard
N 206	+			Discard

หมายเหตุ ไอโซเลทใดที่ให้ผลคะตะเลสเป็นบวก คัดเชื้อทิ้งทันที ไม่ทดสอบการย้อมสีแกรมต่อ

ตารางที่ 2 ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเล บนอาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0 % และ Bromcresol purple 0.004% บ่มที่ 8 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 วัน

ไอโซเลท	คะตะเลส	แกรม	รูปร่าง	หมายเหตุ
A 101	+			Discard
A 102	+			Discard
A 103	-	+	กลม กระจัดกระจาย	
A 104	+			Discard
A 105	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
A 106	+			Discard
A 107	+			Discard
A 108	+			Discard
A 109	+			Discard
A 110	-	+	กลมรี กระจัดกระจาย	
B 101	+			Discard
B 102	+			Discard
B 103	+			Discard
B 104	+			Discard
B 105	+			Discard
B 106	+			Discard
B 107	+			Discard
C 101	+			Discard
C102	+			Discard
C 103	-	+	กลม กระจัดกระจาย	
C 104	+			Discard
C 105	+			Discard
C 106	+			Discard
C 107	+			Discard
C108	+			Discard
D 101	+			Discard
D 102	+			Discard
D 103	+			Discard

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	คะตะเลส	แกรม	รูปร่าง	หมายเหตุ
D 104	+			Discard
D 105	+			Discard
D 106	+			Discard
D 107	+			Discard
D 108	+			Discard
D 109	+			Discard
D 110	+			Discard
E 101	+			Discard
E 102	+			Discard
E 103	+			Discard
E 104	+			Discard
E 105	+			Discard
F 101	+			Discard
F 102	+			Discard
F 103	-	+	แท่ง เส้นสาย	
F 104	+			Discard
F 105	-	+	กลมรี กระจัดกระจาย	
G 101	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
G 102	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
H 101	+	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
H 102	-			Discard
H 103	+	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
H 104	+	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
I 101	+			Discard
I 102	+			Discard
I 103	+			Discard
I 104	+			Discard
J 101	+			Discard
J 102	+			Discard

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	คะตะเลส	แกรม	รูปร่าง	หมายเหตุ
J 103	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
J 104	+			Discard
K 101	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
K 102	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
L 101	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
L 102	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
L 103	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
L 104	+			Discard
L 105	+			Discard
L 106	+			Discard
L 107	+			Discard
L 108	+			Discard
L 109	+			Discard
L 110	-	+	กลมรี เส้นสาย	
L 111	+			Discard
L 112	+			Discard
M 101	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	
M 102	-	+	แท่งกระจัดกระจาย	
M 103	+			Discard
M 104	+			Discard
M 105	+			Discard
M 106	+			Discard
M 107	+			Discard
N 101	+			Discard
N 102	+			Discard
N 103	+			Discard
N 104	-	+	กลมรี เส้นสาย	
N 105	+			Discard

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ไอโซเลท	คะตะเลส	แกรม	รูปร่าง	หมายเหตุ
N 106	+			Discard
N 107	-	+	แท่ง กระจัดกระจาย	

หมายเหตุ ไอโซเลทใดที่ให้ผลคะตะเลสเป็นบวก คัดเชื้อทิ้งทันที ไม่ทดสอบการย้อมสีแกรมต่อ

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

รหัสเชื้อ	ผลการยับยั้งต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (mm)			
	S. aureus	*E. coli*	*V. parahaemolyticus*	*L. monocytogenes*
A 203	12.20	14.10	N	N
B 201	12.85	N	N	10.00
B 202	14.25	12.15	10.20	N
B 205	13.00	11.50	N	11.25
C 203	15.25	13.35	N	N
C 204	10.10	12.25	8.50	N
C 205	12.05	18.05	8.60	10.20
C 206	9.40	N	N	8.70
D 205	13.70	11.05	N	10.25
D 207	12.65	12.90	11.00	N
E 201	11.15	N	10.05	N
E 208	15.50	12.20	12.25	13.10
F 202	N	13.05	14.00	15.80
F 203	11.90	N	N	10.10
F 204	12.00	N	11.15	N
G 201	13.00	12.50	9.90	N
G 202	12.85	12.75	N	11.20
G 203	10.50	N	11.25	10.10
G 204	N	12.10	11.50	11.10
G 205	N	N	N	N
H 201	N	15.05	11.10	12.45
H 202	14.60	N	N	11.50
H 203	9.25	13.05	N	8.65
H 204	11.50	N	N	N
H 205	14.25	N	N	12.25

ตารางที่ 3 (ต่อ)

code	ผลการยับยั้งต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (mm)			
	S. aureus	*E. coli*	*V. parahaemolyticus*	*L. monocytogenes*
H 206	13.05	14.05	N	9.05
H 207	N	10.10	N	7.75
H 208	N	16.10	13.10	N
H 209	13.50	12.90	12.00	N
H 210	N	N	6.55	N
H 211	12.50	13.20	N	10.35
I 201	N	11.05	N	11.00
I 202	11.50	11.10	N	10.20
I 203	12.45	12.20	12.15	13.10
J 201	15.25	13.10	13.35	12.25
J 202	8.50	N	N	7.25
J 203	N	11.80	11.20	12.10
J 204	N	12.20	N	10.20
J 205	11.90	12.30	N	11.20
J 206	11.25	N	N	N
J 207	N	13.10	N	10.05
J 208	N	13.40	9.45	N
K 201	12.50	14.10	12.40	11.40
K 204	13.35	12.10	11.55	10.25
L 204	11.25	14.45	N	9.30
L 210	14.80	N	13.10	12.30
L 211	13.10	15.55	N	12.00
L 216	N	12.35	N	11.10
M 204	15.50	11.10	13.15	11.10
M 205	N	11.20	N	10.00

ตารางที่ 3 (ต่อ)

code	ผลการยับยั้งต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (mm)			
	S. aureus	*E. coli*	*V. parahaemolyticus*	*L. monocytogenes*
M 207	13.13	N	12.15	11.20
N 201	12.25	11.25	12.15	N
A 103	N	12.10	11.35	N
A 105	12.35	N	N	11.00
A 110	11.25	12.55	N	13.05
C 103	16.20	19.00	12.05	17.05
F 103	13.45	12.45	13.15	N
F 105	12.80	14.50	N	13.10
G 101	N	N	N	5.25
G 102	N	14.80	12.10	N
H 101	11.50	N	8.70	N
H 103	10.20	N	9.15	N
H 104	11.80	12.90	N	10.15
J 103	N	11.00	19.40	14.30
K 101	13.00	14.25	N	12.90
K 102	12.45	12.25	N	10.55
L 101	14.25	N	13.10	N
L 102	18.50	12.50	17.20	11.20
L 103	13.15	11.35	N	11.25
L 110	11.15	12.25	9.05	N
M 101	14.80	11.25	N	11.45
M 102	N	13.45	N	11.55
N 104	14.20	14.80	13.15	N
N 107	12.10	N	N	N

N = ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล นายมูฮัมหมัดริฎวาน สมานุรัตน์

รหัสประจำตัวนักศึกษา 5210220066

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์	2552

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับในระหว่างการศึกษา)

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประจำปีงบประมาณ 2552

ทุนผู้ช่วยสอน (ประจำปีการศึกษา 2553) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทุนอุดหนุนการวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ประเภททั่วไป ประจำปี 2553 สัญญาเลขที่ SCI530142S

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

มูฮัมหมัดริฎวาน สมานุรัตน์,วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, และปรียานุช บวรเรืองโรจน์. 2557. การยับยั้งแบคทีเรียของสารกันเสียชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทนอุณหภูมิต่ำ. การประชุมวิชาการระดับชาติ มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต “บูรณาการสหวิทยาการงานวิจัยสู่มาตรฐานสากล” 8 พฤษภาคม-9 พฤษภาคม 2557.