SUT 3-305-45-24-18

รายงานการวิจัย

การผลิตและการใช้แบคทีริโอซินและแลคติกแอซิดแบคทีเรีย สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

Production and Utilization of Bacteriocins and Lactic Acid Bacteria for Meat Products

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

รองศาสตราจารย์ ดร.กนกอร อินทราพิเชฐ

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร

สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผู้ร่วมงานวิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพิชญา จันทะชุม

ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร

คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2545 – 2546

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มีนาคม 2553

บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาการผลิตแบคทีริโอซินที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร การทำบริสุทธิ์ และการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินเพื่อยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ผลิตในท้องถิ่น การทดลองประกอบด้วย

1) การผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวแทนน้ำตาลซูโครส และน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบกับอาหารสำเร็จ MRS และสูตรอาหารดัดแปลง

2) การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีริโอซินผลิตได้จากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

3) การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ประสิทธิภาพสูง และชนิดที่ทนความร้อนได้สูง โดยคัดเลือกจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4) การประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินที่ไม่บริสุทธิ์กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ได้แก่ ลูกชิ้นหมูและลูกชิ้นไก่ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา

5) การประยุกต์ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่ทนความร้อนได้สูง สำหรับการใช้เป็นแนวทางการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนสูงสำหรับเร่งการผลิตไส้กรอกอีสาน

การผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ด้วยน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ

วัตถุประสงค์การทดลองนี้เพื่อการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรซ์ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 เพื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ M 1 (ควบคุม) ที่ปราศจาก beef extract และ dextrose เพาะกล้าเชื้อ *Lc. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ปริมาณ 5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด บ่มที่ 37 °C เก็บตัวอย่างหมัก ณ เวลา 0, 12, 18, 36 และ 48 ชั่วโมง ปรับ pH เป็น 6.5 เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของ แบคทีริโอซิน ด้วยวิธี agar well diffusion ใช้ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อทดสอบ แสดงกิจกรรมการยับยั้งเป็นค่า arbitrary unit per ml (AU/ml)

การใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS โดยให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น 20 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ถึง 24 ซึ่งเป็นช่วง late log phase ถึงระยะ early stationary phase ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลงที่มีการใช้ปริมาณน้ำมะพร้าวเพิ่มขึ้นเป็น 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 10 AU/ml เชื้อเริ่มผลิตแบคทีริโอซินตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง และในสูตรอาหารที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเพิ่มขึ้น 2 และ 3 เท่า ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml โดยตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญ และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 16 ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในสูตรอาหารที่ไม่มีน้ำนึ่งทูน่า และสูตรที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่าเพิ่มขึ้น 4 เท่า

ดังนั้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวให้มากขึ้นมีผลทำให้การเจริญของเชื้อและการผลิตแบคทีริโอซินลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณสารอาหารที่มากเกินพอ เข้าไปมีผลในการยับยั้งการเจริญและการสร้างแบคทีริโอซิน

การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต gel filtration chromatography, cation exchange chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography and HPLC and Amberlite XAD-4 polymeric Resins followed by fast protein liquid chromatography

ตกตะกอนแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่มีกิจกรรมการยับยั้ง 20 AU/ml ด้วย ammonium sulfate เข้มข้น 40 และ 80% ต่อเนื่องกัน ที่อุณหภูมิ 4 °C เวลา 2 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ ละลายเกลือที่ได้ใน 0.2 M acetate buffer, pH 3.0 แล้วแยกเกลือด้วยการทำ dialysis ใน acetate buffer เช่นกัน ใช้ถุงไนลอน ที่มี molecular weight cut off 3.5 KDa ผสมสารละลายที่ได้ในถุงไนลอนด้วย carboxymethylcellulose เพื่อทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้น และวิเคราะห์กิจกรรมของแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินที่ได้มีค่ากิจกรรมการยับยั้ง 100 AU/ml มีผลผลิต 0.05%

ทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินด้วยวิธี gel filtration chromatography ใช้ Sephadex G-50 column, ชะด้วย 0.2 M acetate buffer, pH 3.0 เก็บรวม fractions ที่มีกิจกรรมของแบคทีริโอซิน และวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้ง พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าการยบยั้ง 800 AU/ml และมีผลผลิต 0.87%.

ทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินด้วยวิธี cation exchange chromatography ใช้ Hitrap CM FF column ชะ column ด้วย 0.2 M acetate buffer, pH 3.0 แล้วแยกตัวอย่างโดยใช้ NaCl ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น

จาก 0.05-0.2 M เก็บ fractions วิเคราะห์กิจกรรมของแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าการยบยั้ง 400 AU/ml และมีผลผลิต 0.40%.

ทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินด้วยวิธี reversed-phase HPLC ใช้ Lichrosorb RP18 column ชะด้วย 1% trifluoroacetic acid (TFA) ในน้ำ และ 0.1% TFA ใน acetonitrile ได้พีคเดี่ยว และเก็บสารที่พีคนั้นวิเคราะห์กิจกรรมแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าการยบยั้ง 100 AU/ml และมีผลผลิต 0.05%.

การใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถลดการสูญเสียและลดขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ได้ โดยดูดซับด้วย Amberlite XAD-4 สกัดแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้โดยใช้ methanol:H_2O (1:1) และ 0.1 M HCl:methanol (1:9) ละลายสารสกัดใน 0.2 M phosphate buffer, pH 6.5 ทำบริสุทธิ์ต่อด้วย fast protein liquid chromatography เก็บ fractions วิเคราะห์กิจกรรมของแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าการยบยั้ง 80 AU/ml และมีผลผลิต 30%.

แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,975.71 Da เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,454 Da เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค electrospray mass spectroscopy พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ลงได้ 2 log cfu/ml และลด *Escherichia coli* และ *Streptococcus lactis* ได้ 1 log cycle แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้

แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาทีได้ โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* เท่ากับ 320, 20 และ 160 AU/ml ตามลำดับ และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 และ 100 °C เป็นเวลา 15 นาทีได้ โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* ลดลงเป็น 160, 20 และ 80 AU/ml ตามลำดับ

แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN11 ทน pH ได้ในช่วงกว้าง โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* ที่ pH 2 ถึง 8 และพบว่าแบคทีริโอซินถูกย่อยสลายโดย trypsin, α-chrymotrypsin และ Proteinase K แต่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ catalase

การคัดเลือกและการผลิตแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดลองเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ โดยใช้เชื้อ *Lb. plantarum* TISTR 050, *Pd. acidilactici* TISTR 051, *Leu. mesenteriodes* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb.*

sake TISTR 911, *Lc. lactis* TISTR 1401 และ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ทดสอบแบคทีริโอซินด้วยแบคทีเรียทดสอบประกอบด้วย *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B. subtilis* TISTR 008 และ *S. aureus* TISTR 118 พบว่าแบคทีริโอซินจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 มีความสามารถยับยั้งสูงที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ 8 จาก 13 สายพันธุ์ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแกรมลบได้

ภาวะการผลิตแบคทีริโอซินที่เหมาะสมของ *Lc. lactis* TISTR 1401 คือ การควบคุมระดับ pH ที่ 6.5 ณ อุณหภูมิ 37 °C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติม 2% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) glucose และ 2% (w/v) meat extract แบคทีริโอซินที่ได้ยังมีความสามารถในการทดความร้อนได้สูงถึง 80 °C และคงตัวที่ pH ต่ำจนถึงระดับ pH ที่เป็นกลาง (pH 2-7)

การใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นหมู

สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocin supernatant, CBS) ที่ผลิตได้จาก LAB สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ใช้แบคทีริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง เมื่อใช้กับผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูโดยจุ่มเคลือบผิวด้วย CBS ความเข้มข้นเต็มที่ (F-CBS) และเจือจางให้เจือจางลงครึ่งหนึ่ง (F-CBS) บรรจุลูกชิ้นเคลือบแล้วในถุงพลาสติกแบบปกติและแบบสุญญากาศ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าการบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ ตัวอย่างลูกชิ้นเคลือบด้วย F-CBS เก็บได้นานกว่า 12 วัน ขณะที่ ใช้ H-CBS และตัวอย่างควบคุมเก็บได้นานประมาณ 9 วัน ทำนองเดียวกันสำหรับการบรรจุแบบสุญญากาศ ลูกชิ้นเคลือบด้วย F-CBS เก็บได้นานกว่า 12 วัน ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบด้วย H-CBS และลูกชิ้นตัวอย่างเก็บได้นานเพียง 6 วัน (จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 1 x 10^5 cfu/g sample ตามมาตรฐาน มอก. 2533) ค่า pH และปริมาณกรดของตัวอย่างทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บ ค่าสีของตัวอย่างใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ลูกชิ้นที่เคลือบด้วย CBS มีสีเหลืองกว่าตัวอย่างควบคุม คุณภาพทางประสาทสัมผัสของลูกชิ้นทั้งหมดใกล้เคียงกัน แต่การยอมรับโดยรวม กลิ่นผิดปกติ และสีของลูกชิ้นเคลือบด้วย CBS ต่ำกว่าของลูกชิ้นควบคุม เนื่องจากสีและกลิ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต CBS

การคัดและจำแนกแบคทีเรียทดสอบและการใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่

เชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนลูกชิ้นไก่ปริมาณมากที่จำแนกได้และใช้เป็นเชื้อทดสอบ 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Staphylococcus lentus* PN-1, 3%, *Stap. Saprophyticus* PN-2, 12% และ *Bacillus spp.*

PN-3, 85% และแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ โดยยับยั้ง *Bacillus spp.* PN-3 ได้สูงที่สุด

เตรียมแบคทีริโอซินสำหรับการใช้ 4 ชนิด คือ filtered crude bacteriocin supernatant (FCBS), heated crude bacteriocins supernatant (HCBS), concentrated crude bacteriocin (CCB) and freeze dried crude bacteriocins (FDCB) สารละลาย 2 ชนิดแรกใช้โดยเคลือบผิวลูกชิ้น ส่วน 2 ชนิดหลังใช้ผสมในส่วนสับผสมของลูกชิ้น บรรจุลูกชิ้นในถุงพลาสติกแบบปกติและแบบสุญญากาศ และเก็บที่ 4 °C

แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ทุกชนิดสามารถยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในสภาวะการบรรจุแบบปกติ และแบบสุญญากาศได้นานกว่าเมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุม ทั้งนี้การใช้แบบเคลือบผิวลูกชิ้นสามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 15-18 วัน และการใช้แบบผสมในสูตรลูกชิ้นสามารถเก็บได้นานประมาณ 21 วัน ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมทั้ง 2 สภาวะเก็บได้นานเพียง 9 และ 12 วัน ตามลำดับ และพบว่าแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่ดีใกล้เคียงกับสาร nisin ทางการค้าที่ผลิตจากเชื้อ LAB สายพันธุ์ *Lc. lactis* เช่นกัน แต่ต่าง strain กัน

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกทนความร้อน สำหรับผลิตไส้กรอกอีสาน

การทดลองคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ที่สามารถทนความร้อนได้ไม่ต่ำกว่า 70 °C จาก 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 และ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 หลังจากให้ความร้อนที่ 60, 70 และ 80 °C นาน 3 ชั่วโมง พบว่า *Lb. acidophilus* TISTR 450 ทนความร้อนได้สูงที่สุด ที่ 80 °C ยังมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตประมาณครึ่งหนึ่งของจำนวนเซลล์เริ่มต้น เมื่อใช้ *Lb. acidophilus* TISTR 450 เป็นกล้าเชื้อผลิตไส้กรอกอีสานที่มีการผลิตโดยอบให้ความร้อนประมาณ 70 °C เพื่อให้ผิวไส้กรอกแห้งหมาดก่อนการหมัก พบว่าการใช้กล้าเชื้อ LAB ที่ทนความร้อนสำหรับผลิตไส้กรอกอีสานสามารถเร่งการผลิตไส้กรอกได้เร็วขึ้นกว่าการผลิตที่ไม่มีการใช้กล้าเชื้อ ไส้กรอกผสมกล้าเชื้อมี pH ลดต่ำกว่า 5 ในเวลา 1-2 วัน ขณะที่ไส้กรอกผลิตแบบปกติต้องใช้เวลานานประมาณ 3-4 วัน แต่พบว่าไส้กรอกผสมกล้าเชื้อมีสีสว่าง (ค่า L*) สูงกว่าและมีสีแดง (ค่า a*) อ่อนกว่าไส้กรอกปกติ

Abstract

The objectives of this research experiment were to investigate the production, purification and use of bacteriocins for extension of shelf life of local meat products. The main experiments were performed as followed:

1) production of bacteriocins from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 by using modified microbial media with substitution coconut juice for sucrose and tuna condensate for nitrogen source. The different modified media formulas were compared with MRS media.
2) Purification and study of some propertied of purified bacteriocins produced from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11.
3) Selection of lactic acid bacteria capable of producing high activity bacteriocins and having high heat tolerance. The lactic acid bacteria used in this part were obtained from Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) and Prince of Songkla University.
4) The uses of crude bacteriocins for extension shelf life of meat products, i.e., pork meatballs and chicken meatballs.
5) Selection and use of high heat tolerant lactic acid bacteria as starter culture for fermentation acceleration of Isan sausages.

Production of bacteriocins from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 using coconut juice and tuna condensate in culture media

The objective of this experiment was to use tuna condensate and coconut juice in culture media as carbon and nitrogen sources for bacteriocin production from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11. The culture media were prepared using pasteurized tuna condensate and coconut juice in the ratio of 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 in comparison with MRS and M 1 (control) media without which beef extract and dextrose. The starter culture of 5% *Lc. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 was grown in each media, incubated at 37 °C. The fermentate was sampled at 0, 6, 12, 18, 24, 36 and 48 h, pH adjusted to 6.5 for determination of inhibition activity of bacteriocins by agar well diffusion method against *Staphylococcus aureus*. Inhibition activity of bacteriocins was expressed in term of arbitrary unit per ml (AU/ml).

The uses of coconut juice and tuna condensate in the culture media as carbon and nitrogen source in the bacteriocins produced from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 could provide good bacterial growth in all modified media formulas. However, the highest bacterial growth observed in the MRS media with an inhibiting activity on *Staphylococcus aureus* was 20 AU/ml starting from 16 to 24 h during which was in the late log phase to early stationary phase. The media added tuna condensate and coconut juice in the ratios of 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 had the activity of 10 AU/ml, bacteriocin production was found from 16 h through the end of culturing at 48 h. In the media added 2 and 3 fold tuna condensate had the inhibiting activity of 10 AU/ml at the initial growth but not found the activity after 16 h. The inhibiting activity was not found in the media without and with 4 fold of tuna condensate added.

Therefore, increasing amount of tuna condensate and coconut juice decreased microbial growth and bacteriocin production. This could be due to other constituents in the media that could suppress microbial growth and bacteriocin production.

Purification of bacteriocins produced from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

Purification of bacteriocins produced from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 by precipitation of proteins with ammonium sulfate, gel filtration chromatography, cation exchange chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography and HPLC and Amberlite XAD-4 polymeric Resins followed by fast protein liquid chromatography.

Crude bacteriocins supernatant having inhibition activity of 20 AU/ml was precipitated with consecutively 40 and 80 % ammonium sulfate at 4 °C for 2 and 3 h, respectively, salt was dissolved with 0.2 M acetate buffer, pH 3.0 and then, dialyzed to separate salt in the same acetate buffer using nylon dialysis bag with molecular weight cut off 3.5 KDa. The retentate was mixed with carboxymethylcellulose for concentration and determined for bacteriocin activity. It was found that the bacteriocins obtained had an inhibition activity of 100 AU/ml with production yield of 0.05%.

Crude bacteriocin supernatant was purified by gel filtration chromatography using Sephadex G-50 column, eluted with 0.2 M acetate buffer, pH 3.0. Fractions containing bacteriocin activity were collected and determined for bacteriocin activities. The purified bacteriocins obtained had an inhibition activity of 800 AU/ml, with production yield of 0.87%.

Crude bacteriocin supernatant was purified by cation exchange chromatography using Hitrap CM FF column, eluted with 0.2 M acetate buffer, pH 3.0, followed by stepwise gradient elution by 0.05-0.2 M NaCl, fractions were determined for bacteriocin activities. It was found that purified bacteriocins had an inhibition activity of 400 AU/ml with production yield of 0.40%.

Crude bacteriocin supernatant was purified by reversed-phase HPLC using Lichrosorb RP18 column, eluted with 1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and 0.1% TFA in acetonitrile. Single peak was obtained and collected for bacteriocin activity. Purified bacteriocins had an inhibition activity of 100 AU/ml with production yield of 0.05%.

The use of Amberlite XAD-4 as an adsorbance in combination with chromatographic technique could decrease the yield loss and reduced steps for purification. Purified bacteriocins obtained from adsorption with Amberlite XAD-4 then, extracted by methanol:H_2O (1:1) and 0.1 M HCl:methanol (1:9), dissolved the extract in 0.2 M phosphate buffer, pH 6.5 and determined bacteriocin activity. Bacteriocin extract was further purified using FPLC and fractions were determined for bacteriocin activity. It was found that purified bacteriocins had an inhibition activity of 80 AU/ml with the production yield of 30%.

Molecular weight of purified bacteriocins produced from *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 was 3,975.71 Da determined by SDS-PAGE and 3,454 Da determined by electrospray mass spectroscopy technique. It was found that purified bacteriocins with the concentration of 0.8 mg/ml and 1 mg/ml could decrease *Staphylococcus aureus* by 2 log cycles and decrease *Escherichia coli* and *Streptococcus lactis* by 1 log cycle but could not inhibit growth of *Listeria monocytogenes*.

Purified bacteriocins produced from *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 could tolerate the heat at 60 °C for 30 min with the inhibition activity of 320, 20, and 160 AU/ml against *S. aureus*, *E. coli* and *Strep. lactis*, respectively. Purified bacteriocins could tolerate the heat at 100 °C for 30 and 60 min, and at 121 and 100 °C for 15 min and had an inhibition activity of 160, 20 and 80 AU/ml against *S. aureus*, *E. coli* and *Strep. lactis*, respectively.

Purified bacteriocins produced from *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 could give an inhibition activity in a wide pH range of 2-8 against *S. aureus*, *E. coli* and *Strep. lactis*. Purified bacteriocins were hydrolyzed by trypsin, α-chrymotrypson and Proteinase K but not by catalase enzyme.

Screening and production of bacteriocins from lactic acid bacteria

The experiment was conducted to screen bacteriocin producing lactic acid bacteria using the following culture strains: *Lb. plantarum* TISTR 050, *Pd. acidilactici* TISTR 051, *Leu. mesenteriodes* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911, *Lc. lactis* TISTR 1401 and *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11. The indicator bacteria for testing an inhibition activity of bacteriocins were *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B. subtilis* TISTR 008 and *S. aureus* TISTR 118. It was found that bacteriocins obtained from *Lc. lactis* TISTR 1401 had the highest inhibition activity. The bacteriocins obtained had ability to inhibit growth of 8 Gram-positive out of 13 strains but could not inhibit Gram-negative bacterial tested.

The optimal conditions for bacteriocin production were controlled pH at 6.5 and temperature at 37 °C. The MRS broth media was modified by adding 2% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) glucose and 2% (w/v) meat extract. In addition, bacteriocins obtained could withstand high temperature up to 80 °C and stable in a wide pH range of 2-7.

The use of crude bacteriocins produced from Lactobacillus lactis TISTR 1401 for extension shelf life of pork meatballs.

Crude bacteriocins produced from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 were used to extend the shelf life of pork meatballs by surface coating with full strength (F-CBS) and half strength concentration (H-CBS). The meatballs were aerobically and vacuum packed in plastic bags and kept at 4 °C. It was found that the meatballs coated with F-CBS and aerobically packed could be kept longer than 12 days while those coated with H-CBS and control meatballs could be kept around 9 days. Similarly for the vacuum package, the meatballs coated with F-CBS could be kept longer than 12 days as well while those coated with H-CBS and control meatballs could be kept only 6 days (according to the total plate count of 1×10^5 cfu/g sample of TIS standard, 2533). Acidity and pH of all meatball samples did not change during storage. Similar color values of all samples were observed. However, slightly more yellow in color of CBS treated meatballs than control samples was also observed. All the meatballs of each treatment had similar sensory quality except for the CBS coated meatballs received lower scores in total acceptance, off-flavor and color due to the color and flavor of the culture media for CBS production.

Selection and identification of indicator bacteria and use of crude bacteriocins from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 to extend shelf life of chicken meatballs

Contaminant bacteria were collected from chicken meatball and 3 dominant flora were identified consisting of *Staphylococcus lentus* PN-1, 3%; *Stap. Saprophyticus* PN-2, 12% and *Bacillus spp.* PN-3, 85%. These microbial flora were used as indicator bacteria to test the inhibition activity of bacteriocins produced from *Lactococcus lactis* TISTR 1401. It was found that all three bacterial strains were inhibited by crude bacteriocins produced from *Lactococcus lactis* TISTR 1401. The highest inhibition activity was observed on *Bacillus spp.* PN-3.

Four forms of crude bacteriocins were prepared, i.e., filtered crude bacteriocin supernatant (FCBS), heated crude bacteriocins supernatant (HCBS), concentrated crude bacteriocin (CCB) and freeze dried crude bacteriocins (FDCB). The first 2 forms were used by coating on chicken meatballs surface and the other 2 forms were used by mixing in the meatball batter. The treated meatballs were aerobically and vacuum packed in plastic bags and kept at 4 °C.

Crude bacteriocins from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 in all 4 forms could extend longer shelf life of chicken meatballs aerobically and vacuum packed and kept at 4 °C compared with control samples. However, the meatballs coated with bacteriocin supernatant could be kept 15-18 days while those mixed in the batter with concentrated bacteriocins could be kept longer for 21 days while control samples for both conditions could be kept only 9 and 12 days, respectively. It was also observed that crude bacteriocins produced from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 had good inhibition against microbial contaminant on chicken meatballs similar commercial nisin produced from lactic acid bacteria, *Lc. lactis* as well but different strains.

Screening for thermo-tolerant lactic acid bacteria for Isan sausage production

The experiment was conducted to screen lactic acid bacteria (LAB) that could be able to withstand heat not less than 70 °C from 8 culture strains consisting of *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 and *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN11. After being heated at 60, 70 and 80 °C, it was found that *Lb. acidophilus* TISTR 450 could withstand the heat the most with viable cells about an a half of original cells. The starter culture of *Lb. acidophilus* TISTR 450 was

used for Isan sausage production which initial heating at about 70 °C was applied to dry off the surface before fermentation taking off. It was found that the use of thermo-tolerant LAB could accelerate sausage production faster compared with control sample. The sausages mixed with starter culture had pH lower than pH 5 in about 1-2 days while it took about 3-4 days for control sausages. However, lighter color in terms of L* and a* was observed for the sausages with starter culture.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย)..... ก

บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)..... ฉ

สารบัญ..... ฎ

สารบัญตาราง..... ต

สารบัญภาพ..... ท

บทที่

1. บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย 2

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย 3

1.4 วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ 3

1.5 ประโยชน์ของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ 4

เอกสารอ้างอิง 5

2. ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 7

2.1 คำนำ 7

2.2 ประเภทของแบคทีริโอซิน 7

2.3 การทำงานของแบคทีริโอซิน 9

2.4 แบคทีเรียที่ผลิตแบคทีริโอซิน (Bacteriocin-producing bacteria) 11

2.4.1 สายพันธุ์ของ *Lactococcus lactis* 12

2.5 กระบวนการผลิตแบคทีริโอซิน 12

2.6 การใช้แบคทีริโอซินกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ 14

เอกสารอ้างอิง..... 16

3. การผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 19
ด้วยน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 คำนำ..... 19

3.2 วัตถุประสงค์..... 20

3.3 อุปกรณ์และวิธีการ..... 20

3.3.1 จุลินทรีย์และวิธีการเก็บรักษา..... 20

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ วัสดุเศษเหลือ และสารเคมี 21
3.3.3 วิธีทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน 21
3.3.4 การเตรียมน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าว 22
3.3.5 การผลิตแบคทีริโอซิน 22
3.4 ผลการทดลองและวิจารณ์..... 24
3.4.1 การเจริญของเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11) ในอาหาร MRS 24
3.4.2 การผลิตแบคทีริโอซินด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าว..... 25
3.5 สรุปผลการทดลอง..... 35
เอกสารอ้างอิง..... 36
4. การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 39
4.1 คำนำ 39
4.2 วัตถุประสงค์ 40
4.3 อุปกรณ์และวิธีการ 40
4.3.1 จุลินทรีย์ 40
4.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ 40
4.3.3 การศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ 41
Lb. casei ssp. *rhamnosus* (SN 11)
4.3.4 การศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซิน 41
4.3.4.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 41
4.3.4.2 แยกส่วนด้วย Gel Filtration Chromatography 42
4.3.4.3 Cation Exchange Chromatography 42
4.3.4.4 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography 43
(RP-HPLC)
4.3.4.5 การศึกษาการทำบริสุทธิ์ด้วย Amberlite XAD-4 43
ควบคู่กับการใช้โครมาโทกราฟี
4.3.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ 45
4.3.5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินโดยวิธี 45
SDS-Polyacylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.5.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินโดยวิธี 45
Electrospray Mass Spectrometry (EMS)

4.3.6 การวิเคราะห์หาลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของแบคทีริโอซิน 45

4.3.7 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตได้ 46
จากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN 11)

4.3.7.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีริโอซิน 46

4.3.7.2 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อความคงตัวของแบคทีริโอซิน 46

4.3.7.3 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแบคทีริโอซิน 46

4.3.7.4 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของแบคทีริโอซิน 47

4.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 47

4.4.1. การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ 47
Lactobacillus casei ssp. *rhamnosus* (SN11)

4.4.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 47

4.4.3 Gel-filtration Chromatography 48

4.4.4 Cation-Exchange Chromatography 49

4.4.5 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP- HPLC) 50

4.4.6 การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) 52
โดยใช้ Amberlite XAD-4 ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟี

4.4.7 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินจาก 53
เชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)

4.4.8 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตได้จาก 56
เชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)

4.5 สรุปผลการทดลอง 59

เอกสารอ้างอิง 61

5. การคัดเลือกและการผลิตแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก 63

5.1 คำนำ 63

5.2 วัตถุประสงค์ 64

5.3 อุปกรณ์และวิธีการ 65

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

5.3.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย 65
5.3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีริโอซิน 65
5.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ในการ 66
ผลิตแบคทีริโอซิน
5.3.4 ผลของการควบคุม pH คงที่ต่อปริมาณแบคทีริโอซิน 66
5.3.5 การเตรียม Crude bacteriocin supernatant (CBS) 66
5.3.6 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน 67
5.3.7 Inhibitory spectrum ของแบคทีริโอซิน 67
5.3.8 ผลของความร้อนต่อแบคทีริโอซิน 67
5.3.9 ผลของ pH และเอนไซม์ต่อแบคทีริโอซิน 68
5.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 68
5.4.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีริโอซิน 68
5.4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีริโอซิน 70
5.4.3 ผลของการควบคุม pH คงที่ต่อปริมาณสารแบคทีริโอซิน 71
5.4.4 Inhibitory spectrum ของแบคทีริโอซิน 74
5.4.5 ผลของความร้อนต่อแบคทีริโอซิน 75
5.4.6 ผลของ pH และเอนไซม์ ต่อแบคทีริโอซิน 77
5.5 สรุปผลการทดลอง 77
เอกสารอ้างอิง 79
6. การใช้แบคทีริโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 81
เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นหมู
6.1 คำนำ 81
6.2 วัตถุประสงค์ 83
6.3 อุปกรณ์และวิธีการ 83
6.3.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ 83
6.3.2 การผลิตแบคทีริโอซินจาก Lactococcus lactis TISTR 1401 83
6.3.3 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน 84
6.3.4 การผลิตลูกชิ้นหมู 84

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

6.3.5 การวางแผนการทดลอง 85
6.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ตัวอย่างลูกชิ้น 85
6.3.7 การวิเคราะห์ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมด 86
6.3.8 การวัดค่าสีของตัวอย่างลูกชิ้น 86
6.3.9 การประเมินทางประสาทสัมผัส 86
6.3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ 86
6.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 87
6.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์ 87
6.4.1.1 ปริมาณจุลินทรีย์ของลูกชิ้นหมูที่บรรจุแบบปกติ 87
6.4.1.2 ปริมาณจุลินทรีย์ของลูกชิ้นหมูบรรจุแบบสุญญากาศ 89
6.4.2 ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดของลูกชิ้น 90
6.4.3 การเปลี่ยนแปลงสีของลูกชิ้นหมู 91
6.4.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของลูกชิ้นหมู 92
6.5 สรุปผลการทดลอง 96
เอกสารอ้างอิง 97
7. การคัดและจำแนกแบคที่เรียทดสอบและการใช้แบคทีริโอซิน 99
จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่
7.1 คำนำ 99
7.2 วัตถุประสงค์ 100
7.3 อุปกรณ์และวิธีการ 101
7.3.1 การคัดและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกชิ้นไก่เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ 101
7.3.2 การผลิตแบคทีริโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 101
7.3.3 การใช้แบคทีริโอซินกับผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ 102
7.3.4 การวิเคราะห์คุณภาพของลูกชิ้นไก่ 103
7.3.4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ 103
7.3.4.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ 103
7.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 104
7.4.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากลูกชิ้นไก่ 104

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

7.4.2 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบคัดแยกจากลูกชิ้นไก่ของแบคทีริโอซิน ผลิตจาก *lactococcus lactis* TISTR 1401 109
7.4.3 ผลการใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์เคลือบลูกชิ้นไก่ 111
7.4.4 ผลการใช้แบคทีริโอซินผสมในส่วนผสมลูกชิ้นไก่ 115
7.5 สรุปผลการทดลอง 117
เอกสารอ้างอิง 119
8. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกทนความร้อนสำหรับผลิตไส้กรอกอีสาน 121
8.1 คำนำ 121
8.2 วัตถุประสงค์ 123
8.3 อุปกรณ์และวิธีการ 123
8.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนความร้อนสูง 123
8.3.2 การผลิตไส้กรอกหมักอีสานด้วย thermotolerant lactic acid bacteria 124
8.3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 124
8.3.2.2 การผลิตไส้กรอกอีสาน 125
8.3.2.3 การวิเคราะห์คุณภาพไส้กรอกหมักอีสาน 125
8.3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ 126
8.4 ผลการทดลองและวิจารณ์ 126
8.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนความร้อนสูง 126
8.4.2 คุณภาพไส้กรอกอีสานผลิตด้วยกล้าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 128
8.4.2.1 คุณภาพความเป็นกรด-ด่างของไส้กรอกอีสาน 128
8.4.2.2 คุณลักษณะสีของไส้กรอกเติมกล้าเชื้อ 129
8.5 สรุปผลการทดลอง 132
เอกสารอ้างอิง 133
9. สรุปผลการทดลอง 135
9.1 ผลผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (SN11) 135

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

9.2 ผลการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. 135
rhamnosus SN 11

9.3 การคัดเลือกและการผลิตแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก 136

9.4 การใช้แบคทีริโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 137
เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นหมู

9.5 การคัดและจำแนกแบคที่เรียทดสอบและการใช้แบคทีริโอซิน 137
จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่

9.6 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกทนความร้อน 138
สำหรับผลิตไส้กรอกอีสาน

ประวัติผู้วิจัย..... 139

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	ประเภทของแบคทีริโอซินชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก	8
3.1	สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ..... ทั้ง 9 สูตร โดยดัดแปลงจากสูตรอาหาร M 1 ให้มีปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำมะพร้าวในสัดส่วนที่แตกต่างกัน	23
3.2	ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่า	26
4.1	แสดงอัตราส่วนของบัฟเฟอร์ A และบัฟเฟอร์ B สำหรับการชะ ..... แบคทีริโอซิน ที่เวลาต่างๆ	43
4.2	แสดงอัตราส่วนของบัฟเฟอร์ A และบัฟเฟอร์ Bใช้ชะแบคทีริโอซิน ..... ออกจากคอลัมน์ Resource RPC ที่เวลาต่างๆ	44
4.3	แสดงขั้นตอนการทำบริสุทธิ์บางส่วนและกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ ..... *S. aureus* ของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)	49
4.4	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ..... ของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)	51
4.5	ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับ ..... และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคเทอริโอซินจาก เชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)	54
4.6	แสดงผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน อุณหภูมิ และพีเอช ต่อความคงตัว ..... ของแบคทีริโอซิน จากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* (SN 11)	58
5.1	ค่ากิจกรรมการยับยั้งของ cell-free supernatant ของสารแบคทีริโอซิน ..... ที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ	69
5.2	Inhibitory spectrum of bacteriocins produced by ..... *Lactococcus lactis* TISTR 1401	75
5.3	Effect of heat treatment on bacteriocin activity of CBS ..... produced by *Lactococcus lactis* TISTR 1401	76
5.4	Effect of pH and enzyme treatment to bacteriocin activity ..... of CBS produced by *Lactococcus lactis* TISTR 1401	78
6.1	Microbial population (log cfu/g) of pork meatballs during storage ..... at 4 °C in aerobically packed condition	88

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
6.2	Microbial population (log cfu/g) of pork meatballs during storage ..... at 4°C in vacuum packed condition	90
6.3	pH and titratable acidity (%, as lactic acid) of pork meatballs during ..... storage at 4 °C in aerobically packed condition	91
6.4	pH and titratable acidity (%, as lactic acid) of pork meatballs ..... during storage at 4°C in vacuum packed condition	91
6.5	Color values (Hunter L, a, b color system) of pork meatballs ..... during storage at 4 °C in aerobically packed condition	92
6.6	Color values (Hunter L, a, b color system) of pork meatballs ..... during storage at 4°C in vacuum packed condition	93
7.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ..... ของแบคทีเรียทดสอบ	104
7.2	ความสามารถยับยั้งของแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก LAB ..... ต่อแบคทีเรียทดสอบ โดยวัดขนาดวงใส หน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm.)	110
7.3	ค่า pH ของลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C	114

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	Schematic presentation of the cell envelop of Gram-positive ..... and Gram-negative bacteris. LPS, lipopolysaccharide.	9
3.1	กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ L. casei ssp. rhamnosus (SN 11) ในอาหาร MRS	25
3.2	การเจริญของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรม ..... การยับยั้งของเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ในอาหารสูตรต่าง ๆ	28
3.3	การผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ..... ในอาหารสูตรต่าง ๆ	32
4.1	กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแต่ละส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์	50
4.2	โครมาโทแกรมที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18)	52
4.3	ลักษณะพีคที่ได้จากการทำรีโครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ ..... RP-18 (Lichrosorb RP18)	52
4.4	โครมาโทแกรมที่ได้จากการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินโดยใช้คอลัมน์ชนิด ..... Resource RPC Reverse phases FPLC	55
4.5	น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซิน จากเชื้อ *Lb. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)	55
4.6	โครมาโทแกรมที่ได้จาการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของ ..... แบคทีริโอซินโดยวิธี EMS	56
4.7	ผลการทดสอบหาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ..... ของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)	57
5.1	Growth of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 in MRS broth at 30, 35, 37 and 40 °C	70
5.2	Growth of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 (log cfu/ml) in MRS broth ..... at 37°C, pH controlled and uncontrolled condition	71
5.3	Growth of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 (absorbance) in MRS broth ..... at 37 °C, pH controlled and uncontrolled condition	72
5.4	Bacteriocin activity from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 at 37 °C, ... pH controlled and uncontrolled condition.	73
5.5	The inhibition activity of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 in MRS broth ..... determined by agar well diffusion assay	73
6.1	Pork meatball manufacturing in Food processing laboratory, SUT	85

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
6.2	Sensory characteristics of pork meatballs during storage at 4°C ..... in aerobically packed condition	94
6.3	Sensory characteristics of pork meatballs during storage at 4°C ..... in vacuum packed condition	95
7.1	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกชิ้นไก่	108
7.2	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) ของลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซิน ..... เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C	112
7.3	ปริมาณ LAB (log cfu/g) ของลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซิน ..... เก็บที่อุณหภูมิ 4°C	113
7.4	ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) ของลูกชิ้นไก่ผสมแบคทีริโอซิน ..... เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C	116
7.5	ปริมาณ LAB (log cfu/g) ของลูกชิ้นไก่ผสมแบคทีริโอซิน ..... เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C	117
8.1	การเกิดกรดแลคติกในกระบวนการหมัก (Erickson et al., 2004)	122
8.2	Survival of selected lactic acid bacteria ที่ 60, 70 และ 80 °C, ใน MRS broth; ..... *Lc. Plantarum* TISTR 050, *Pd. Acidilactici* TISTR 051, *Leu. Mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. brevis TISTR 860, *Lb. delbrueckii* subsp. bulgaricus TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 และ *Lb. casei* subsp. rhamnosus SN11	127
8.3	Total acidity และ pH ของไส้กรอกหมักอีสาน ที่ 25 °C, ... Control = ไส้กรอกหมักควบคุม Starter = ไส้กรอกหมักด้วยกล้าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 (n= 6)	130
8.4	คุณลักษณะสี (L* a* b*) ของไส้กรอกหมักอีสาน ที่ 25 °C, ... Control = ไส้กรอกหมักควบคุม, Starter = ไส้กรอกหมักด้วยกล้าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 (n = 12)	131

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) มีความสามารถในการผลิตสารต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial) ได้หลายชนิด เช่น กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และแบคทีริโอซิน (bacteriocins) เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แตกต่างกันไป แบคทีริโอซินเป็นสารชีวเคมีประเภทเปปไทด์และโปรตีน มีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียได้หลายประเภท โดยเฉพาะอย่างยิ่งเชื้อแบคทีเรียชนิดแกรมบวก ซึ่งรวมถึงเชื้อ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และLAB ด้วย (Mataragas et al., 2003; Deegan et al,, 2006) ได้มีการศึกษาแบคทีริโอซินมาเป็นระยะเวลานานแล้ว และได้รับการรับรองให้ใช้ในอาหารได้อย่างปลอดภัย (GRAS status) อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีริโอซินในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้นยังไม่แพร่หลายมากนัก ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจถึงความเป็นไปได้ในการนำประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

การผลิตแบคทีริโอซินมีปัจจัยหลายประการที่เกี่ยวข้อง และมีผลต่อการสร้างแบคทีริโอซิน โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่สำคัญได้แก่ อุณหภูมิ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และระดับ pH ระหว่างการเจริญเติบโตเป็นต้น มีรายงานว่าการควบคุมระดับ pH ระหว่างการเจริญให้คงที่สามารถทำให้ปริมาณของเซลล์และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินได้ (Yang and Ray, 1994; Morgan et al., 1999; Morgan et al, 2001) โดยทั่วไปแบคทีริโอซินจะมีปริมาณสูงสุดเมื่อการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วง log-phase และมักจะมีค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary-phase ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจากการจับรวมตัวของของโปรตีน การยึดเกาะติดอยู่กับเซลล์เอง และ protein degradation เป็นต้น ดังนั้นการเก็บเกี่ยวแบคทีริโอซินจึงทำ ณ เวลาที่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ถึงจุดสูงสุด (Morgan et al., 1999; Onda et al., 2003) สำหรับการเตรียมแบคทีริโอซินเพื่อใช้งานในผลิตภัณฑ์อาหารนั้นสามารถทำได้หลายแบบ ตัวอย่างเช่น การทำแห้งด้วยการพ่นฝอย (spray-dried) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แต่แบคทีริโอซินที่ได้จะมีความบริสุทธิ์ต่ำ (Morgan et al., 2001; Silva et al., 2002) เมื่อเปรียบเทียบกับการทำ partial purification ซึ่งจะได้สารแบคทีริโอซินที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า แต่ก็มีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่ามาก โดยเฉพาะหากต้องการใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร

การใช้วัตถุดิบในท้องถิ่นให้เป็นประโยชน์เพื่อการผลิตแบคทีริโอซิน อาทิการใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษา

เพื่อเป็นการลดต้นทุนทั้งในด้านการผลิตและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์ และการทำให้แบคทีริโอซินมีความบริสุทธิ์จะทำให้ทราบถึงขนาดโมเลกุลของสารและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน เพื่อใช้ในการจัดจำแนกประเภทของสารและใช้เป็นข้อมูลสำหรับการนำแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ไปประยุกต์ใช้ หรือเพื่อการพัฒนาและขยายผลด้านต่างๆ เช่น การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม เพื่อให้ได้ปริมาณแบคทีริโอซินที่สูงขึ้น

ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้น เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่มีปริมาณการผลิตสูงมากในแต่ละวันเนื่องจากเป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่สะดวกสำรับการรับประทานและใช้สำหรับปรุงเป็นอาหารอื่น ๆ ได้อีกหลายชนิดมาก ลูกชิ้นหมูและลูกชิ้นไก่ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหลักในตลาดอาหารมีการใช้สารเคมีเติมแต่ง (food additives) เพื่อถนอมในการเก็บรักษาและยืดอายุค่อนข้างมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารกันบูดกลุ่ม sodium benzoate แต่ด้วยความกังวลด้านสุขภาพของผู้บริโภคที่เพิ่มสูงขึ้น การศึกษาแนวทางเพื่อลดการใช้สารเคมีปรุงแต่งในผลิตภัณฑ์อาหารจึงไดรับความสนใจเป็นอย่างยิ่งโดยเฉพาะการใช้ประเภท biopreservative แบคทีริโอซิน (bacteriocins) เป็น สาร peptides และ proteins เป็นหนึ่งในสารที่สามารถช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสียและก่อโรคที่สำคัญได้ และมีความเป็นไปได้ที่จะใช้ในป้องกันการเน่าเสียในกระบวนการผลิตลูกชิ้น เพื่อยืดอายุการเก็บและช่วยลดการใช้สารกันบูดได้

เพื่อศึกษาการผลิตและการใช้แบคทีริซินที่ไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสารถผลิตแบคทีริซินที่มีประสิทธิภาพสูง ทั้งนี้เพื่อให้ได้แนวทางการใช้ประโยชน์จากแบคทีริซินไม่บริสุทธิ์โดยตรงกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยสามารถลดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ที่ซับซ้อนและมีค่าใช้จ่ายสูงได้ ทั้งนี้การทดลองในส่วนนี้ของโครงการได้ใช้เชื้อ LAB บริสุทธิ์ที่คาดว่ามีประสิทธิภาพผลิตสารกลุ่มแบคทีริโอซินได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Ped. acidilactici* TISTR 424, *Ped. acidilactici* TISTR 425, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. acidophilus* TISTR 1338, Lb. brevis supsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* supsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 และ *Lc. lactis* TISTR 1401 ร่วมกับเชื้อ *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus* SN11 ที่ได้รับจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สำหรับการศึกษา

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1.2.1 เพื่อผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวแทนน้ำตาลซูโครส และน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน

เปรียบเทียบกับอาหารสำเร็จ MRS และสูตรอาหารดัดแปลง และการทำทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินผลิตได้จากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

1.2.2 เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ประสิทธิภาพสูง และประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินที่ไม่บริสุทธิ์กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ คือลูกชิ้นหมูและลูกชิ้นไก่ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา

1.2.3 เพื่อคัดเลือกและประยุกต์ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่ทนความร้อนได้สูง สำหรับการใช้เป็นแนวทางการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนสูงสำหรับเร่งการผลิตไส้กรอกอีสาน

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

1.3.1 การผลิตแบคทีริโอซิน ด้วย Lactic acid bacteria และการทำแบคทีริโอซินให้บริสุทธิ์ ซึ่งงานวิจัยส่วนนี้บางส่วนจะทำการวิจัย ณ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ และบางส่วนจะทำ ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.3.2 การใช้แบคทีริโอซิน ทั้งชนิดที่ผลิตได้ และ commercial bacteriocins และ Thermophilic lactic acid bacteria บางสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์ดังกล่าว ส่วนนี้จะทำการวิจัย ณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

1.4. วิธีดำเนินการวิจัยโดยย่อ

1.4.1 ทดลองผลการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) สายพันธุ์ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยการใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำกลั่น และน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ และตรวจสอบการเจริญเชื้อ LAB และประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

1.4.2 ทดลองวิธีการทำแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ให้บริสุทธิ์ และตรวจสอบคุณสมบัติของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์

1.4.3 คัดเลือกเชื้อ LAB ที่ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ให้ได้เชื้อที่มีความสารถผลิตแบคทีริโอซินที่มีประสิทธิภาพสูงสำหรับการใช้แบคทีริโอซินที่ผลิตได้โดยไม่ทำให้บริสุทธิ์และทดลองใช้เพื่อยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ คือลูกชิ้นหมูและลูกชิ้นไก่ ทั้งนี้ได้เก็บและจำแนกเชื้อที่คัดเลือกได้จากการปนเปื้อนกับลูกชิ้นไก่เป็นเชื้อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีริซินที่ผลิตได้จากเชื้อ LAB ที่คัดเลือกได้

1.4.4 คัดเลือกเชื้อ LAB ที่สามรถทนความร้อนได้สูงอย่างต่ำ 70 °C เพื่อทดลองใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับเร่งการผลิตไส้กรอกอีสานหมัก และตรวจสอบคุณภาพไส้กรอกเบื้องต้นบางประการ

1.5 ประโยชน์ของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ได้ทราบข้อมูลความเป็นไปได้ในการใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าสำหรับผลิตสารแบคทีริโอซิน และการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินด้วยวิธีการที่แตกต่างกัน

1.5.2 ได้ชนิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้สูงและสามารถประยุกต์ใช้แบคทีริซินที่ไม่บริสุทธิ์เพื่อยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นที่เป็นอาหารพร้อมรับประทานได้ และเป็นแนวทางการใช้แบคทีริซินที่ไม่บริสุทธิ์กับเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ในอนาคตต่อไป

1.5.3 ได้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดทนความร้อน และสามารถใช้เร่งกระบวนการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้

1.5.4 ได้ผลิตนักศึกษาระดับบัณฑิตจากโครงการวิจัยนี้ 3 คน

1.5.5 ได้เผยแพร่ผลการวิจัยในที่ประชุมวิชาการที่ในประเทศ 3 เรื่องและในต่างประเทศ 2 เรื่อง

เอกสารอ้างอิง

Deegan, L.H., Cotter. P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocin: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16:1058-1071.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. and Drosinos, E.H. 2003. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and Lactobacillus curvatus L442. Meat Sci. 64:265-271.

Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P. and Hill, C. 1999. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. J. Food Prot. 62:1011-1016.

Morgan, S.M., Galvin, M., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. Evaluation of a spray-dried Lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. Lett. Appl. Microbiol. 33:387-391.

Onda, T., Yanagisa, F., Tsuji, M., Shinohara, T. and Yokotsuka, K. 2003. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. strain GM005, isolated from miso-paste. Int. J. Food. Microbiol. 87:153-159.

Silva, J., Carvalho, A.S., Teixeira, P. and Gibbs, P.A. 2002. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 34:77-81.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11:281-291.

บทที่ 2

ปริทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 คำนำ

แบคทีริโอซิน คือ สารชีวเคมีประเภทไรโบโซมเปบไทด์ และโปรตีน (ribosomal proteins) ที่ถูกสังเคราะห์จากส่วนของไรโบโซมโดยแบคทีเรียบางชนิด และถูกขับออกมาจากเซลล์ มีผลในการยับยั้งหรือทำลายเซลล์ของแบคทีเรียชนิดอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียที่อยู่ในสปีชีย์ใกล้เคียงกัน โดยทั่วไปแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อตัวแบคทีริโอซินที่ผลิตขึ้นมา การคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินได้ สามารถทำได้โดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบ (indicator strain) โดยการให้แบคทีเรียที่อาจผลิตสารแบคทีริโอซินเจริญอยู่บนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ซึ่งมีแบคทีเรียทดสอบผสมอยู่ในเนื้ออาหารด้วย หลังจากการบ่มในอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมแล้ว หากแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้จะเกิดวงใส (clear zone) เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนี คำว่า "แบคทีริโอซิน" ถูกเรียกขึ้นครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1953 โดยใช้เพื่ออธิบายถึงสารปฏิชีวนะที่เป็นโปรตีนที่ได้จากจุลินทรีย์ *Escherichia coli* แต่ปัจจุบันนี้คำว่าแบคทีริโอซินได้รับการยอมรับให้ใช้เรียกสารกลุ่มดังกล่าวได้ทั้งหมด ไม่ว่าจะถูกผลิตด้วยแบคทีเรียสายพันธุ์ใดก็ตาม กลไกที่ทำให้แบคทีริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ เนื่องจากการเข้าไปจับยึดกับบริเวณ cytoplasmic membrane ของแบคทีเรียเป้าหมาย จากนั้นจะทำให้เกิดรูรั่วของเซลล์ ซึ่งจะไปรบกวนระบบ proton motive force ของเซลล์และในที่สุด ทำให้เซลล์แตกออก (Daw and Falkiner, 1996; Deegen et al., 2006)

2.2 ประเภทของแบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซิน แบ่งได้เป็นหลายประเภทด้วยกัน มีการจัดเป็น 3 กลุ่ม (class) (Chen and Hoover, 2003; O'Sullivan et al., 2002) ตารางที่ 2.1 แสดงกลุ่มของแบคทีริโอซินเป็น 3 กลุ่ม หรืออาจแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม (Cleveland et al., 2001; Franz et al., 2007) ดังนี้

- Class I เป็นแบคทีริโอซิน ชนิด lantibiotics โมเลกุลขนาดเล็ก 1 หรือ 2 linear peptides และมี lanthionine residues มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียค่อนข้างหลากหลายสายพันธุ์ (board spectrum) ทนความร้อนได้สูง อาทิเช่น nisin

- Class II เป็นแบคทีริโอซินขนาดเล็ก เป็น pediocin-like bacteriocins ทนความร้อนได้สูง โครงสร้างประกอบด้วยส่วน hydrophilic cationic region และ cysteine residues 2 หมู่
- Class III เป็นแบคทีริโอซินซึ่งมีขนาดโมเลกุลที่ใหญ่ขึ้น ไม่ทนความร้อน อาทิ helveticin
- Class IV เป็นแบคทีริโอซินที่เป็นโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่และซับซ้อนที่ไม่ทนความร้อน ที่สำคัญ อาทิ enterolysin A ผลิตจากเชื้อ *Enterococcus faecalis* และ zoocin A ผลิตจากเชื้อ *Staphylococcus simulans* biovar. *staphylolyticus*

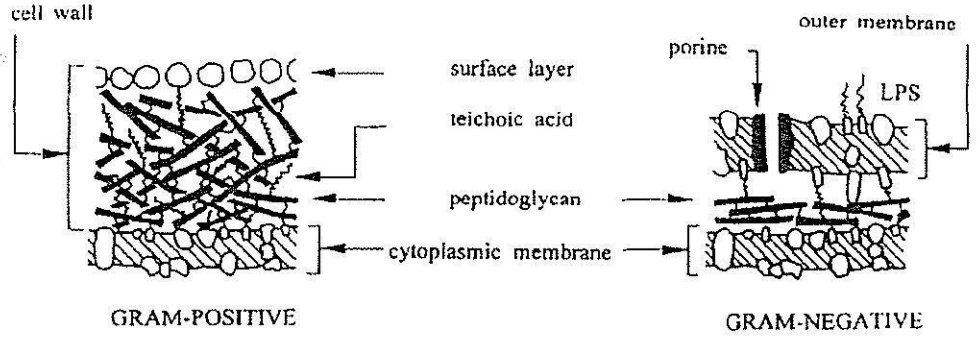
ตารางที่ 2.1 ประเภทของแบคทีริโอซินชนิดต่าง ๆ ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก

Bacteriocin	Producer	Inhibitory spectrum[a]	Size (aa)
Class I: Lantibiotics			
Nisin (A and Z)	*Lactococcus lactis*	Broad	34
Lacticin 481	*Lactococcus lactis*	Broad	27
Lactocin S	*Lactococcus sake*	Broad	37
Class II: Non-lantibiotic, small, heat-stable			
Lactococcin A	*Lactococcus lactis*	Narrow	54
Lactocin F	*Lactobacillus johnsonii*	Narrow	57, 48
Mesenterocin 52B	*Leuconostoc mesenteroides*	Narrow	32
Pediocin-like bacteriocin:			
Sakacin A	*Lactobacillus sake*	Medium	41
Pediocin AcH/PA-1	*Pediococcus acidilactici*	Medium	44
Leucocin A-UAL-187	*Leuconostoc gelidum*	Medium	37
Enterocin 1146/A	*Enterococcus faecium*	Medium	47
Class III: Large, heat-labile			
Helveticin J	*Lactobacillus helveticus*	Narrow	333

[a]Narrow spectrum indicates bacteriocins that only affect the producer genus; medium spectrum indicates bacteriocin that affect the producer genus and members of one or two other genera, aa = number of amino acid (O'Keeffe and Hill, 1999).

2.3 การทำงานของแบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซินมีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแคทีเรียชนิด Gram positive เป็นส่วนมาก ไม่มีรายงานว่ามีการยับยั้งชนิด Gram negative bacteria ทั้งนี้เนื่องจากองค์ประกอบของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน (ภาพที่ 2.1) ผิวนอกสุดของเซลล์ประกอบด้วยชั้นของ peptiglycan ชนิด Gram-negative มีชั้นของสารนี้บางกว่า แต่มีองค์ประกอบของผนังเซลล์ชั้นนอกอีกชั้นที่ประกอบด้วย phospholipids, proteins และ lipopolysaccharides ซึ่งทำให้มีคุณสมบัติ impermeable ต่อโมเลกุลของสารต่าง ๆ และสารหมู่ porins ในชั้นนี้ ให้สารประกอบที่มี โมเลกุลต่ำกว่า 600 Da ผ่านได้เท่านั้น แต่แบคทีริโอซินส่วนมากมีขนาดโมเลกุลที่เล็กที่สุดเพียง 3 kDa เท่านั้น ซึ่งเป็นขนาดที่โตเกินกว่าจะผ่านผนังเซลล์ของ Gram-negative bacteria ได้ (Abee et al., 1995) การทำลาย Gram-negative bacteria เกิดขึ้นได้หลังจากที่แบคทีเรียถูกทำให้บาดเจ็บด้วยวิธีการอื่นก่อน เช่น ความร้อนเป็นต้น



ภาพที่ 2.1 Schematic presentation of the cell envelop of Gram-positive and Gram-negative bacteria, LPS, lipopolysaccharide (Abee et al., 1995)

แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติต่างกันความสามารถในการยับยั้งหรือการทำลายจะแตกต่างกันด้วย สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีริโอซินชนิดต่างๆ สรุปได้ดังนี้ (Jack et al., 1995; Chen and Hoover, 2003; Deegan et al., 2006, Daw and Falkiner, 1996)

1) ยับยั้งการสร้างผนังเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่อยู่นอกสุดของเซลล์ มีความแข็งแรงทำหน้าที่ป้องกันสิ่งที่อยู่ในเซลล์ สำหรับแบคทีเรียผนังเซลล์เป็นส่วนสำคัญที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียเป็นแกรมบวกและแกรมลบ โดยแบคทีเรียแกรมบวกจะมี peptidoglycan, tricoic acid, polysaccharides และ proteins เป็นองค์ประกอบในขณะที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบจะประกอบด้วย peptidoglycan, olysaccharides, proteins, lipids, lipopolysaccharides และ lipoproteins

โครงสร้างพื้นฐานของแบคทีเรียทั้ง 2 พวก ที่ต่างกัน คือ peptidoglycan (อาจเรียกว่า glycopeptide หรือ mucopeptide หรือ murein) พวกแกรมบวกมีส่วนนี้หนามาก ในแกรมลบจะบางกว่า และแกรมลบจะมีส่วนของ lipopolysaccharides หุ้มอีกชั้นหนึ่ง peptidoglycan ของแบคทีเรียทั้งหลายจะมีโครงสร้างหลักเป็น polysaccharides ซึ่งสลับกันระหว่าง N-acetylglucosamine (GlcNAC) และ N-acetylmuramate (MurNAC) แต่มี side chain แตกต่างกันไปบ้าง

แบคทีริโอซินจะไปยับยั้งการสร้าง peptidoglycan ซึ่งส่งผลให้หยุดการสร้างผนังเซลล์ เนื่องจากผนังเซลล์มีความสำคัญมากหากถูกทำลายหรือสร้างไม่สมบูรณ์แบคทีเรียจะตายได้ แบคทีริโอซินพวกนี้จึงจัดเป็น bacteriocidal

2) รบกวนหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเป็นส่วนที่ถัดจากผนังเซลล์เข้ามา หน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ทั่วไป คือ osmotic barrier ที่ช่วยป้องกันไม่ให้สารต่างๆ เข้าหรือออกจากเซลล์ง่ายเกินไป อีกหน้าที่หนึ่งเกี่ยวข้องกับระบบขนส่งเพื่อนำสารเข้า-ออกเซลล์ โดยมีผลต่อ proton motive force ของเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ความสมดุลของ K^+ ของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป โดยมีการผ่านเข้าไปในเซลล์มากขึ้นและเกิดการสะสมทำให้แรงดันในเซลล์ไม่สมดุล เซลล์จะแตกและตายในที่สุด

3) ยับยั้งการสร้าง nucleic acids ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ deoxyribonucleic acid (DNA) และ ribonucleic acid (RNA) ในการเจริญและแบ่งตัวของเซลล์ขึ้นกับการสังเคราะห์ DNA ซึ่งเป็นสารพันธุกรรม แต่ RNA มีความจำเป็นสำหรับเซลล์ เพราะเป็นแม่พิมพ์ในการสังเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์

4) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน กระบวนการสังเคราะห์โปรตีนได้จากการแปรรหัสบน mRNA หรือเรียกว่า ขั้นตอน translation กระบวนการนี้เกิดขึ้นใน ribosome สำหรับ ribosome ของแบคทีเรียจะเป็นชนิด 70S (ประกอบด้วย 2 หน่วยย่อย คือ 30S และ 50S) การยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน จะเกิดจากแบคทีริโอซินที่มีโครงสร้างแบบ aminoglycoside คือมี amino sugar ในโมเลกุลทำให้เกิดพันธะ glycocidic ซึ่งมีความสามารถจับกับ 30S ribosomal subunit ทำให้ไปยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและลดความสามารถในการขนส่งรหัสทางพันธุกรรม นอกจากนี้ยังทำให้การอ่านรหัสในการสร้าง mRNA ผิดพลาด เพราะบางตำแหน่งถูกบดบัง ส่งผลให้ความสามารถในการสร้างโปรตีนที่เป็นเอนไซม์ผิดพลาด เมื่อไม่มีเอนไซม์การทำงานของเซลล์จะผิดปกติไป ในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีนหลายขั้นตอนที่แบคทีริโอซินยับยั้งได้นั้น สามารถกลับสู่สภาพเดิมได้เมื่อลดความเข้มข้นลง ด้วยเหตุนี้แบคทีริโอซินที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนส่วนใหญ่เป็น bacteriostatic

5) รบกวนกระบวนการเมตาบอลิซึม กระบวนการเมตาบอลิซึมสามารถกลับเข้า สู่สภาพเดิมได้เมื่อปริมาณแบคทีริโอซินลดลง ดังนั้น แบคทีริโอซินพวกนี้จึงจัดเป็น bacteriostatic

สารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จาก LAB นั้น มีกลไกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้หลายวิธีด้วยกัน โดยส่วนใหญ่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป็นตำแหน่งหลักของการเกิดกระบวนการ

การยับยั้งการเจริญ ไนซินเป็นแบคทีริโอซินที่ได้รับการศึกษามาอย่างยาวนาน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้กว้าง (broad spectrum) โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวก รวมถึง *Bacillus* sp. และ *Clostridium* spp. ในกรณีของสารแบคทีริโอซิน lactococcin A ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้เฉพาะกลุ่ม (narrow spectrum) เช่น สามารถยับยั้งได้เฉพาะกลุ่มของ Lactococcus เท่านั้น แบคทีริโอซินจะทำให้เกิดรูขึ้นบนผนังเซลล์และมีผลต่อสมดุลของโปรตอนและค่า pH ระหว่างผนังทั้งทางด้านในและด้านนอกของเซลล์ เกิดการรั่วซึมของไอออนและ ATP ออกจากผนังเซลล์ ทำให้เซลล์ตายในที่สุด แบคทีริโอซินชนิดอื่นที่มีกลไกเช่นเดียวกันนี้ ได้แก่ lacticin 3147, Pep5, subtilin และ epidermin เป็นต้น (McAuliffe et al., 2001) โดยทั่วไปแบคทีริโอซินมีผลในการรบกวนกระบวนการสังเคราะห์ต่าง ๆ ที่ผนังเซลล์ ซึ่งจะส่งผลทำให้เซลล์ตายด้วย ซึ่งปัจจุบันนี้กลไกดังกล่าวค่อนข้างเป็นที่ยอมรับกันว่าเป็นผลเนื่องมาจากที่โมเลกุลของไนซินไปเกาะเข้ากับตำแหน่งของ lipid II บนผนังเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งมีผลทำให้กระบวนการสังเคราะห์ทางชีวโมเลกุลสูญเสียไป (Deegan et al., 2006)

2.4 แบคทีเรียที่ผลิตแบคทีริโอซิน (Bacteriocin-producing bacteria)

แบคทีริโอซินสามารถถูกสร้างจากแบคทีเรียได้หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LAB ซึ่งสามารถผลิตแบคทีริโอซินได้หลายชนิด รวมทั้งยังมีความปลอดภัยในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร ด้วยได้แก่ *Lactococcus spp.*, *Lactobacillus spp.*, *Pediococcus spp.* เป็นต้น แบคทีเรีย *Lb. pentosus* B96 เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากการหมักน้ำมะกอก แบคทีริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียชนิดนี้ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Weissella paramesenteroides* ได้ (Delgado et al., 2005) แบคทีริโอซินที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งคือ lacticin 3147 ซึ่งมีบทบาทในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เนื่องจากสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ เช่น *Listeria monocytogenes* (Morgan et al., 1999; Guinane et al., 2005) แบคทีริโอซิน lacticin 3147 ผลิตได้จาก *Lc. lactis* 3147 และได้มีการทดลองประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้แก่ ซุปกระป๋อง และนมผง เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีริโอซินที่ได้จากแบคทีเรีย *Lb. sake* ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ สามารถแสดงค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวกได้หลากหลายชนิดด้วย (Schillinger and Lücke, 1989)

ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้จากการรวบรวมของ Chen and Hoover (2003) เพิ่มเติมจากตารางที่ 2.1 ประกอบด้วยดังนี้

แบคทีเรียผลิต Class I bacteriocins ประกอบด้วย *Lactococcus lactis, Lactobacillus sake, Staphylococcus epedemidis, S. gallinarum, Bacillus subtilis, Streptomyces cinnamoneus* และ *Acinoplanes* spp.

แบคทีเรียผลิต Class II bacteriocins ประกอบด้วย *Pediococcus acidilactici, Lc. sake, Leuconostoc glidum, Leu. mesnteroides, Enterococcus faecium, Carnobacterium divergens, Lc lactis, Lb. johnsomii, Lb. plantarum, Lb. acidophilus* และ *Car. Piscicola*

แบคทีเรียผลิต Class III bacteriocins ประกอบด้วย *Lb. heleveticus*

2.4.1 สายพันธุ์ของ *Lactococcus lactis*

แบคทีเรีย *Lactococcus lactis* เป็นจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมนมเช่น การผลิตโยเกิร์ต ครีม เนย ชีส และนมเปรี้ยว เป็นต้น ลักษณะโดยทั่วไปของจุลินทรีย์สายพันธุ์นี้คือ ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ มีขนาดยาว 0.5-1.5 ไมโครเมตร มีลักษณะการหมักแบบ homofermentative เจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจนถึงมีออกซิเจนต่ำ โดยทั่วไปเจริญที่อุณหภูมิตั้งแต่ 10 °C ขึ้นไป แต่จะไม่เจริญที่ 45 °C สามารถผลิต กรดแลคติก L(+) ได้จากกลูโคส มีลักษณะเซลล์ที่เป็นทรงกลม (cocci) และเรียงต่อกันเป็นสายโซ่ ซึ่งบางครั้งอาจทำให้สามารถแยกออกได้ยาก เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรีย Lactobacillus โดยทั่วไป Lactococcus สามารถผลิตสาร antimicrobial ได้หลายชนิด เช่น กรดแลคติก Hydogen peroxide และแบคทีริโอซิน เป็นต้น (Wijtzes et al., 1997)

Lactococcus lactis TISTR 1401 ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ แบคทีเรียสายพันธุ์นี้ สามารถเทียบเคียงได้กับสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* IO-1 และ *Lactoccus lactis* JCM 7638 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตคือ 37 °C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งสภาวะดังกล่าวได้สอดคล้องกับสภาวะการเจริญที่ศูนย์จุลินทรีย์ได้แนะนำไว้ จุลินทรีย์ *Lc. lactis* TISTR 1401 มีความสามารถในการผลิต L-lactate จาก xylose หรือ glucose ได้ดี ซึ่งสภาวะดังกล่าวจุลินทรีย์สามารถผลิตแบคทีริโอซิน nisin z ได้ด้วย (Matsusaki et al., 1998; Sonomoto et al., 2000; Park et al., 2003)

2.5 กระบวนการผลิตแบคทีริโอซิน

การผลิตแบคทีริโอซินส่วนมากใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในการผลิต และอาจมีการเติมสารอาหารเพิ่มเติมบางชนิด เพื่อเพิ่มค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ เช่นการศึกษาของ Nieto-Lozano (2006) ได้ทำการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งแบคทีริโอซินที่ผลิตได้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium perfingen* ได้ แต่เมื่อพิจารณาถึงต้นทุนในการผลิตพบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ทำให้ต้นทุนในการผลิตแบคทีริโอซินสูงมาก หากต้องนำไปใช้ในอุตสาหกรรม ดังนั้นหากใช้อาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ในการผลิตแบคทีริโอซินจึงถูกจำกัดเฉพาะการผลิตในปริมาณน้อย ๆ เท่านั้น ใน

กระบวนการผลิตแบคทีริโอซินพบว่า ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินสูงในช่วง log phase ของการเจริญ และบางครั้งค่ากิจกรรมการยับยั้งอาจจะลดลงเล็กน้อยในช่วงปลายของ log phase ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะแบคทีริโอซินที่ผลิตออกมาอาจมีการจับตัวรวมกัน เกิด protein degradation และเกิดการยึดเกาะที่เซลล์ของแบคทีเรียผู้ผลิตเอง ซึ่งทั้งหมดนั้นส่งผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งทั้งสิ้น (Paynter et al., 1997; O'Keeffe and Hill, 1999) ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินสามารถถูกกระตุ้นให้สูงขึ้นได้ (Parente and Ricciardi, 1999; O'Keeffe and Hill, 1999; Mataragas et al., 2003) วิธีที่ทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินสูงขึ้นเช่น การเพิ่มความเครียดในการเจริญให้กับจุลินทรีย์ (stress) ไม่ว่าจะเป็น อุณหภูมิ หรือการเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้จุลินทรีย์มีสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ซึ่งส่งผลให้กระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์เปลี่ยนไปในด้านการผลิตสาร metabolite ออกมาแทน นอกจากนี้การใช้เทคโนโลยีด้านพันธุวิศวกรรมมาใช้ในการตัดต่อยีนส์ของจุลินทรีย์ เพื่อให้สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้มากขึ้น ซึ่งในที่สุดแล้วสามารถนำไปใช้ในการผลิตแบคทีริโอซินในปริมาณมาก ๆ ได้ โดยมีต้นทุนการผลิตที่ไม่สูง มีความบริสุทธิ์ของแบคทีริโอซินมากกว่า 90% และสามารถได้ % recovery มากกว่า 50 ขึ้นไป (O'Keeffe and Hill, 1999)

ปัจจัยการผลิตที่ส่งผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินนั้นมีหลายปัจจัย แต่ปัจจัยที่สำคัญและมีผลกระทบมากได้แก่ อุณหภูมิ ค่า pH และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น (Yang and Ray, 1994; Mataragas et al., 2003) การควบคุมค่า pH ระหว่างการเจริญให้คงที่นั้นสามารถเพิ่มค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินได้ โดยการศึกษาของ Onda et al. (2003) รายงานว่า การควบคุมระดับ pH ให้คงที่ตลอดระยะเวลาการเจริญของแบคทีเรีย สามารถทำให้ปริมาณของแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้นได้ ซึ่งมีรายงานเกี่ยวกับเทคนิคการควบคุมระดับ pH คงที่ตลอดการเจริญสามารถเพิ่มค่ากิจกรรมการยับยั้งได้อย่างสอดคล้องกัน ทั้งนี้อาจเป็นสาเหตุมาจาก การควบคุม pH ให้คงที่นั้นสามารถส่งเสริมให้ปริมาณของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงมากขึ้นและส่งผลโดยตรงต่อปริมาณของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

นอกจากนี้ปริมาณของแบคทีริโอซินอาจมีค่าเพิ่มขึ้นหากควบคุมสภาวะการเจริญของ จุลินทรีย์ให้ต่ำกว่าสภาวะการเจริญที่เหมาะสม โดยการศึกษาของ Mataragas et al. (2003) รายงานว่า แบคทีริโอซินที่ผลิตโดย Leuconostoc ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งสภาวะการเจริญของเชื้อที่เหมาะสมคือ ที่ระดับ pH 6.0-6.5 และอุณหภูมิ 30 °C แต่พบว่าสภาวะที่เหมาะสมของการผลิตแบคทีริโอซินอยู่ที่ pH 5.5 และอุณหภูมิ 25 °C

เมื่อต้องคำนึงถึงความคุ้มค่าในการผลิต การพัฒนากระบวนการผลิตแบคทีริโอซินให้มีต้นทุนในการผลิตที่สามารถยอมรับได้ในการนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรม การเลือกสรรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตแบคทีริโอซิน แต่มีราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ ซึ่งเป็นสิ่งที่ผู้ที่ศึกษาทางด้านแบคทีริโอซินให้ความสนใจมาโดยตลอด เพราะหากสามารถทำให้

ต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อต่ำลง ย่อมจะส่งผลดีอย่างยิ่งต่อการพัฒนาให้สามารถแบคทีริโอซินประยุกต์ใช้ได้อย่างสมบูรณ์ Morgan et al. (1999) รายงานว่า การผลิตแบคทีริโอซิน lacticin 3147 ในปริมาณมากโดยใช้ whey power เป็นเป็นวัตถุดิบหลักที่ใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อในการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตแบคทีริโอซิน จากการศึกษาดังกล่าวพบว่า แบคทีริโอซินที่ได้ สามารถแสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสียได้หลายชนิด รวมทั้งการควบคุมระดับ pH ระหว่างการเจริญ ที่ 6.5 ณ อุณหภูมิ 30 °C สามารถทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีเพิ่มขึ้นอย่างยิ่งและทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินสูงขึ้นได้ด้วย

หลังจากผ่านกระบวนการการผลิตแบคทีริโอซินแล้ว สารแบคทีริโอซินจะถูกแยกออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลายวิธีเช่น การปั่นเหวี่ยง หรือการใช้วัสดุยึดจับกับแบคทีริโอซิน (adsorbants) เพื่อแยกแบคทีริโอซิน ซึ่งมีค่าความสามารถในการยึดจับแตกต่างจากโปรตีนที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินสามารถทำได้หลายวิธี โดยอาศัยธรรมชาติของแบคทีริโอซิน ซึ่งมีความเป็น cationic และ hydrophobic ออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีปริมาณของ peptide อยู่ระหว่าง 10-30 g/L ในขณะที่ปริมาณของแบคทีริโอซินนั้นอยู่ที่ระดับ 10-100 mg/L (Parente and Ricciardi, 1999) โดยทั่วไปการทำบริสุทธิ์ในห้องปฏิบัติการอาจใช้วิธีการตกตะกอน ammonium sulphate เป็นขั้นตอนแรก จากนั้นใช้การแยกด้วยวิธี reversed phase-high performance liquid chromatography (RP- HPLC)

2.6 การใช้แบคทีริโอซินกับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

Lactic acid bacteria (LAB) ที่เจริญได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หลายชนิดที่สามารถรบกวนการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งชนิดก่อโรคและชนิดทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเชื้อ LAB สามารถแข่งขันการใช้อาหารและออกซิเจน และสร้างสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ อาทิ lactic acid, acetic acid, acetoin, diacetyl, hydrogen peroxide, reuterin และ bacteriocins ทั้งนี้มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียที่พบในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ Class I และ Class II โดย Hugas (1998) ได้รวบรวมข้อมูลของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่พบว่าสร้างแบคทีริโอซินในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ได้ ซึ่งประกอบด้วยเชื้อต่าง ๆ ดังนี้

Meat-borne bacteriocinogenic strains producing Class I bacteriocins ได้แก่ *Lactococcus lactis* และ *Lactobacillus sakei* ส่วนมากพบในไส้กรอกหมัก ส่วน meat-borne bacteriocinogenic strains producing Class II bacteriocins ได้แก่ *Pediococcus acidilactici, Pd. pentosaceus, Lb. sakei, Lb. curvatus, Lb. bavaricus, Enterococcus faecium, Leuconostoc gelidum, Leu. mensteroides, Leu. curvatus, Carnobacterium piscicola, C. divergens* และ *Pd. acidilactici,*

โดยทั่วไปการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินในผลิตภัณฑ์อาหารนั้น มักจำกัดอยู่ในกลุ่ม ผลิตภัณฑ์นมแปรรูป อาหารกระป๋อง และไวน์ แต่สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้นในระยะแรกยังไม่ได้รับความสนใจ ภายหลังเมื่อผู้บริโภคเริ่มมีความกังวลต่อการใช้ไนไตรท์ในผลิตเนื้อสัตว์กันมากขึ้น ทำให้แบคทีริโอซินมีบทบาทมากขึ้นในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เนื่องจากสามารถลดปริมาณการใช้ไนไตรท์ที่ต้องเติมลงในผลิตภัณฑ์ลงได้ แบคทีริโอซินที่ผลิตได้จาก LAB หลายชนิดมีศักยภาพเพียงพอที่จะประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น Pediococcus, Leuconostoc, Carnobacterium และ Lactobacillus เป็นต้น (Abee et al., 1995)

มีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ ในการใช้แบคทีริโอซินเพื่อการถนอมและเพื่อยืดอายุการเก็บรักษา กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หลายชนิด เช่น

- ได้มีการใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์ไส้กรอกปลา ที่ระดับความเข้มข้น 50 ppm พบว่าสามารถคงคุณภาพของไส้กรอกปลาได้ดีเป็นที่ยอมรับได้นาน 20-22 วัน เปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุมซึ่งสามารถเก็บไว้ได้เพียง 2 วันเท่านั้น (Raju et al., 2003)
- แบคทีริโอซิน entercin AS-48 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ได้ดีในผลิตไส้กรอก (Model sausage) (Ananou et al., 2005)
- การยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ Salmonella ในไก่แช่เย็น โดยใช้การผสมวิธีการร่วมระหว่างการเติมไนซินและโยเกิร์ต สามารถลดจำนวนของ mesophilic aerobic bacteria และ Salmonella ได้ถึง 2.1 และ 1.97 log ตามลำดับ (Göğüş et al., 2004)
- การใช้ไนซิน ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดในผลิตภัณฑ์แฮมและโบโลน่า (Alexander and Richard, 2000)

อย่างไรก็ตามในงานวิจัยบางชนิดแสดงให้เห็นว่า ปริมาณของแบคทีริโอซินที่จะใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบางชนิดนั้นต้องมีปริมาณที่มากพอด้วย เช่นกรณีของ lacticin 3147 ที่ได้มีการประยุกต์ใช้ในอาหารหลายชนิด Morgan et al. (2001) รายงานต่อประเด็นดังกล่าวว่าอาจต้องใช้ปริมาณของ lacticin 3147 ถึง 10% เพื่อจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายให้ได้เป็นที่น่าพอใจ ซึ่งปริมาณการใช้งานดังกล่าวนั้น แทบจะเป็นไปไม่ได้เลยในทางเศรษฐกิจ ดังนั้นการเพิ่มความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียให้สูงขึ้น โดยเพิ่มค่ากิจกรรมการยับยั้ง จึงจำเป็นต้องพัฒนาต่อไป อย่างไรก็ดี วิธีการเติมแบคทีริโอซินลงไปโดยตรงนั้นอาจทำให้ประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินลดลง เนื่องจากการรบกวนของ food matrix ที่มีอยู่

เอกสารอ้างอิง

Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. Int. J. Food Microbiol. 28:169-185.

Alexander, O.G. and Richard, A.H. 2000. Inhibition of bacterial growth on ham and bologna by lysozyme, nisin and EDTA. Food Res. Int. 33:83-90.

Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A. and Valdivia, E. 2005. Control of *Listeria monocytogenes* in model sausages by enterocin AS-48. Int. J. Food Microbiol. 103:179-190.

Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their food applications. Compre. Rev. Food Sci. Food Safety. 2:82-100.

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

Daw, M.A. and Falkiner, F.R. 1996. Bacteriocins: Nature, function and structure. Micron. 27:467-479.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16:1058-1071.

Delgado, A., Brito, D., Peres, C., Noé-Arroyo, F. and Garrido-Fernández, A. 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. Food Microbiol. 22:521-528.

Franz, C.M.A.P., van Belkum, M.J., Holzapfel, W.H., Abriouel, J. and Gálvez, A. 2007. Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. FEMS Microbiol. Rev. 31:293-310.

Göğüş, U., Bozoglu, F. and Yurdugul, S. 2004. The effects of nisin, oil-wax coating and yogurt on the quality of refrigerated chicken meat. Food Control. 5:537-542

Guinane, C.M., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, R.P. 2005. Microbial solutions to microbial problems; lactococcal bacteriocins for the control of undesirable biota in food. J. Appl. Microbiol. 98:1316-1325.

Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Sci. 49:S139-S150.

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

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. and Drosinos, E.H. 2003. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Sci. 64:265-271.

Matsusaki H., Chinachoti, N., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1998. Purification, identification, and effective production of a peptide antibiotic produced by *Lactococcus lactic* OI-1 (JCM 7638). Annals of the New York Academy of Sciences. 864:422–427.

McAuliffe, O., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. FEMS Microbiol. Rev. 25: 285-308.

Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P. and Hill, C. 1999. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. J. Food Prot. 62:1011-1016.

Morgan, S.M., Galvin, M., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. Evaluation of a spray-dried Lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. Lett. Appl. Microbiol. 33:387-391.

Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Peláez-Martínez, M.C. and Torre, A.H. 2006. Effect of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* against *Listeria monocytogenes* and *Clostridium perfringens* on Spanish raw meat. Meat Sci. 72:57-61.

O'Keeffe, T. and Hill, C. 1999. Bacteriocins/Potential in food preservation. Encyclopedia of food Microbiology (vol.1) (pp 183-191). New york: Academic press.

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

Onda, T., Yanagisa, F., Tsuji, M., Shinohara, T. and Yokotsuka, K. 2003. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. Strain GM005, isolated from *Miso*-paste. Int. J. Food. Microbiol. 87:153-159.

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

Park, S., Itoh, K., Kikuchi, E., Niwa, H. and Fujisawa, T. 2003. Identification and characteristics of nisin Z-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* isolated from Kimchi. Current microbiol. 46:385-388.

Paynter, M.J.B., Brown, K.A. and Hayasaka, S.S. 1997. Factors affecting the production of an antimicrobial agent, plantaricin F, by *Lactobacillus lantarum* BF001. Lett. Appl. Microbiol. 24:159-165.

Raju, C.V., Shamasundar, B.A. and Udupa, S.K. 2003. The use of nisin as preservative in fish sausage stored at ambient (28±2°C) and refrigerated (6±2°C). Int. J. Food Sci. Tech. 38:171-185.

Schillinger, U. and Lücke F. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Envi. Microbiol. 55:1901-1906.

Sonomoto, K., Chinachoti, N., Endo, N. and Ishizaki, A. 2000. Biosynthetic production of nisin Z by immobilized *Lactococcus lactis* IO-1. J. Mol. Catal. B: Enzymatic. 10:325-334.

Wijtzes, T., Bruggeman, M.R., Nout, M.J.R. and Zwietering, M.H. 1997. A computerised system for the identification of lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 38:65–70.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11:281-291.

บทที่ 3

การผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ด้วยน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 คำนำ

แบคทีริโอซิน (bacteriocins) เป็นสารประกอบโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียต่างๆ ได้ สามารถผลิตได้จาก lactic acid bacteria (LAB) หลายสายพันธุ์ จากศักยภาพต่างๆ ของแบคทีริโอซิน จึงมีผู้สนใจใช้แบคทีริโอซินเป็นสารป้องกันการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหารมากมาย โดยแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ส่วนใหญ่เป็นสารปฐมภูมิ (primary metabolite) (De Vuyst and Vandamme, 1992; Kaiser and Montville, 1993) และพบกิจกรรมของแบคทีริโอซิน เมื่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในช่วงปลายของ log phase

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* SN 11 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเซลล์เป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก homofermentative แยกได้จากอาหารประเภทส้มฟัก สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ (indicator bacteria) ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ pH เริ่มต้นของอาหารที่ระดับ 5.5 สามารถเจริญและผลิตแบคทีริโอซินได้ทั้งที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °C แบคทีริโอซินที่เชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 สร้างขึ้นสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 90 °C เป็นเวลา 45 นาที และสามารถทนต่อสภาวะเป็นกรดได้ โดยยังคงมีกิจกรรมที่ pH 5 bacteriocins ที่ผลิตขึ้นจะถูกทำลายกิจกรรมการยับยั้งได้ด้วยเอนไซม์ Pronase-E, Proteinase-K, trypsin และ α-chymotrypsin แต่ทนต่อเอนไซม์ catalase และจากการทดลองเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sake*, *Escherichia coli*, *E. coli* O157:H7, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogen* O18 และ *Carnobacterium* sp. M 114-25 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH 5.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูงถึงร้อยละ 89-99 (ศิรินาถ หนูเอก, 2540)

การผลิตแบคเทอริโอซินมีปัจจัยมากมายที่สำคัญต่อการผลิต เช่น องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และ pH เป็นต้น โดยการผลิตแบคทีริโอซิน จะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อ (Yang and Ray, 1994) ดังนั้นเพื่อเพิ่มปริมาณแบคทีริโอซิน จึงนิยมใช้อาหารที่มีสารอาหารครบถ้วนเพื่อให้เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อเช่นกัน ซึ่งมีผลต่อราคาต้นทุนการผลิตที่เพิ่มมากขึ้น จึงมีการศึกษาหาวิธีการลดต้นทุนการผลิตโดยการใช้วัสดุเศษเหลือจากการเกษตรเป็นวัตถุดิบในการผลิต โดยวัสดุเศษเหลือที่มีการใช้ในการผลิต bacteriocins ได้แก่ cotton seed meal (De Vuyst et al., 1990)

หางนม (Chii-Cherng et al., 1993) beet molasses และ corn steep liquor (Hsieh et al., 1996) และภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ใช้กากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าในการเลี้ยงเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 เพื่อลดต้นทุนการผลิตแบคทีริโอซินเช่นกัน

จากการศึกษาของภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) พบว่าการใช้กากน้ำตาลแทนแหล่งคาร์บอนในอาหารไม่สามารถเพิ่มการผลิตแบคทีริโอซินได้ จึงทำการทดลองแทนที่กลูโคสและไนโตรเจนในอาหารเหลว MRS ด้วยซูโครสร้อยละ 1 และน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ผ่านการแยกไขมันและตกตะกอนโปรตีนเจือจางในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 โดยยังมีการเติมสารประกอบ บัฟเฟอร์ และ tween 80 แต่ไม่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต (Medium I) พบว่าเชื้อมีการเจริญและผลิต แบคทีริโอซินได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.08 กรัมต่อลิตร และมีกิจกรรมการยับยั้ง 30 AU/ml ในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับในอาหาร MRS สูตรปกติ

จากข้อมูลการศึกษาการผลิตแบคทีริโอซินข้างต้น พบว่า การใช้ซูโครสยังอยู่ในปริมาณสูงซึ่งยังคงส่งผลต่อราคาต้นทุนการผลิต และจากรายงานของ Child (1974) พบว่าในส่วนที่เป็นน้ำมะพร้าวแก่มีองค์ประกอบที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์และน้ำตาลซูโครสในปริมาณสูง จึงก่อให้เกิดแนวคิดในการศึกษาการใช้น้ำตาลในน้ำมะพร้าวแทนที่ซูโครสในอาหาร Medium I เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว

ดังนั้นการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีริโอซิน โดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจในการศึกษา เพื่อเป็นการลดต้นทุนทั้งในด้านการผลิตและการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์

3.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวแทนน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบกับอาหารสำเร็จ MRS และสูตรอาหารดัดแปลง Medium I

3.3 อุปกรณ์และวิธีการ

3.3.1 จุลินทรีย์และวิธีการเก็บรักษา

จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตแบคเทอริโอซิน คือ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักประเภทส้มฟัก (ศิรินาถ หนูเอก, 2540) จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง คือ *Staphylococcus aureus* จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ผลิตผลเกษตร ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ใช้ให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 – 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติม 70% กลีเซอรอล ผสมให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอย เก็บในตู้เก็บเชื้อที่อุณหภูมิ -80 °C

3.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ วัสดุเศษเหลือ และสารเคมี

อาหาร De Man Rogusa Sharpe (MRS, Difco) และ Medium I สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 อาหาร trypticase soy broth (TSB, Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus* อาหาร nutrient agar (NA, Difco) สำหรับเทรองพื้นจานเพาะเชื้อในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน โดยวิธี agar well diffusion

น้ำนึ่งปลาทูน่าจากบริษัทโชติวัฒน์อุตสาหกรรมการผลิต อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา น้ำมะพร้าว จากตลาดสด อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณเกลือ

3.3.3 วิธีทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน

ทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินโดยวิธี agar well diffusion ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Parente and Hill (1992) โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินในส่วนใสของอาหารสูตรต่างๆ ในขั้นตอนการผลิตและในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ และใช้เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 3 ชนิด ได้แก่ *S. aureus*, *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* O157:H7 สำหรับทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อของแบคทีริโอซิน โดยมีวิธีการดังนี้

ปรับพีเอชของน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ให้ได้เป็น 6.5 ด้วย 6 N NaOH หรือ 6 N HCl นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (5145C, Eppendorf, Ltd) ที่ความเร็ว 4,500 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 °C นาน 10 นาที แล้ววัดค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อมิลลิลิตรของส่วนใส ในหน่วยของ arbitrary unit (AU/ml) โดยเทอาหาร TSA ที่มีวุ้นร้อยละ 0.75 ซึ่งมีปริมาณเชื้อ *S. aureus* ประมาณ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ทับบนอาหารแข็ง NA พักให้แห้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมงในตู้ปลอดเชื้อ แล้วทำการเจาะหลุมเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.6 มิลลิเมตร หลังจากนั้นหยดส่วนใสที่ไม่เจือจางและที่ผ่านการเจือจางครั้งละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (serial twofold dilution) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง สังเกตแต่ละความเจือจางที่ทำให้เกิดวงใสแล้วคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน ดังสูตร

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)} = \frac{1000\ \mu l \times A}{B\ \mu l}$$

A = ค่าเฉลี่ยระหว่างการเจือจางสุดท้ายที่ทำให้เกิดวงใสกับการเจือจางถัดไป

B = ปริมาตรส่วนใสที่หยดลงในหลุม หรือที่หยดบนอาหาร

3.3.4 การเตรียมน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าว

นำน้ำนึ่งปลาทูน่ามากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกรองแยกตะกอนขนาดใหญ่ออก ให้ความร้อนน้ำนึ่งปลาทูน่าที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ไขมันลอยขึ้นมาบนผิวหน้าแล้วตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 คืน ทำการตักไขมันที่ผิวหน้าทิ้งไป ปรับพีเอชของน้ำนึ่งปลาทูน่าให้เท่ากับ 6.5 หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนโปรตีนโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที แล้วกรองแยกตะกอนออก บรรจุขวด เก็บที่อุณหภูมิ -20 °C (ดัดแปลงจาก ชูตินุช สุจริต, 2541; ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543)

นำน้ำมะพร้าวมากรองด้วยผ้าขาวบาง เพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่ออก ปรับพีเอชของน้ำมะพร้าวให้เท่ากับ 6.5 และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 °C เป็นเวลา 15 นาที บรรจุขวด และเก็บที่อุณหภูมิ -20 °C

การศึกษาการใช้โปรตีนในน้ำนึ่งปลาแทนแหล่งไนโตรเจนและการใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำตาลซูโครสและน้ำในสูตรอาหาร Medium I สำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 สูตรอาหาร Medium I ประกอบด้วย Sucrose 10 กรัม Tween 80 1.0 มิลลิลิตร ammonium citrate 2.0 กรัม sodium acetate 5.0 กรัม dipotassium phosphate 2.0 กรัม distilled water 500 มิลลิลิตร และน้ำนึ่งปลาทูน่า 500 มิลลิลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.5 ด้วยสารละลาย 6 N NaOH หรือ 6 N HCl

วิเคราะห์องค์ประกอบเริ่มต้นของน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่า โดยทำการวิเคราะห์ ค่าพีเอช (Cyber Scan pH 2500, Entech Instruments, Ltd.) ปริมาณโปรตีนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของน้ำนึ่งปลาทูน่า ตามวิธี Kjeldahl method (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000) ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำมะพร้าวโดยใช้วิธี Lane and Eynon volumetric method (ดัดแปลงจาก AOAC, 2000) ปริมาณเกลือในน้ำนึ่งปลาทูน่า (AOAC, 2000)

3.3.5 การผลิตแบคทีริโอซิน

ถ่ายเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 จากหลอดเก็บเชื้อลงในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารเหลวแต่ละชนิดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีพีเอช 6.5 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่า (VS-8480 SR-L, S.V. Medico Co., Ltd.) ที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

ศึกษาปริมาณแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่เหมาะสมโดยใช้น้ำตาลในน้ำมะพร้าว และโปรตีนในน้ำนึ่งปลาทูน่าเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ถ่ายหัวเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ที่เตรียมได้ปริมาตรร้อยละ 5 ลงในอาหารทั้ง 9 สูตร ดังนี้ คือ MRS Medium I (M 1) และสูตรอาหารที่ดัดแปลงจากสูตรอาหาร M 1 ทั้ง 7 สูตร ที่มีการใช้น้ำมะพร้าวทดแทนน้ำกลั่น และใช้โปรตีนในน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน โดยมีสัดส่วนของน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวเพิ่มขึ้นและลดลง ดังแสดงในตารางที่ 3.1

ตารางที่ 3.1 สูตรอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Lb. casei* susp. *rhamnosus* SN 11 ทั้ง 9 สูตร โดยดัดแปลงจากสูตรอาหาร M 1 ให้มีปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวในสัดส่วนที่แตกต่างกัน

The composition in media	The different media								
	MRS	M 1	Coco4	Coco3	Coco2	Coco1	Tuna2	Tuna3	Tuna4
Proteose peptone, Beef extract, Yeast extract (g)	25	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose (g)	20	-	-	-	-	-	-	-	-
Tween 80 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Ammonium citrate (g)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Sodium acetate (g)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Dipotassiumphosphate (g)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Magnesium sulfate (g)	0.1	-	-	-	-	-	-	-	-
Manganses sulfate (g)	0.05	-	-	-	-	-	-	-	-
Distilled water (ml)	1,000	500	-	-	-	-	-	-	-
Tuna condensate (ml)	-	500	200	250	300	500	600	750	800
Coconut juice (ml)	-	-	800	750	600	500	300	250	200
C/N ratio	0.8	0.81	2.59	2.01	1.41	0.81	0.55	0.42	0.37

ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำเร็จ MRS ควบคู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ใช้ความเร็ว 100 รอบต่อนาที เก็บตัวอย่างวัดการเจริญของเชื้อที่ค่าดูดกลืนแสง 660 นาโนเมตร ค่าพีเอช และ กิจกรรมการยับยั้งที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

ทำการปรับพีเอชของน้ำหมักให้อยู่ที่ระดับ 6.5 ก่อนการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินทุกชุดการทดลองทำการทดลอง 2 ครั้ง ๆ ละ 3 ซ้ำ และคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินในสูตรอาหารที่ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด

3.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

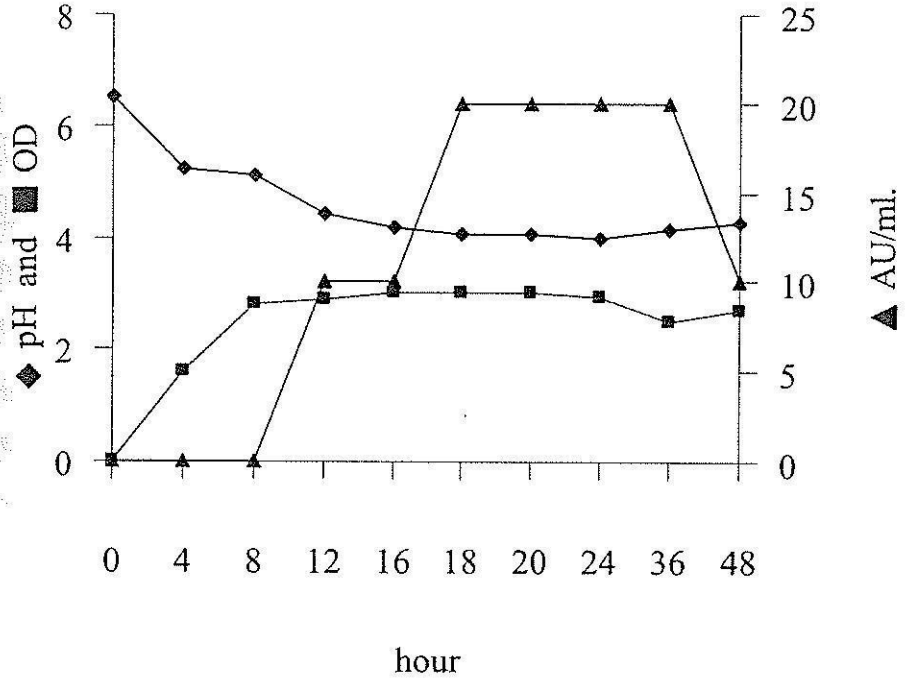
3.4.1 การเจริญของเชื้อ *Lbacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหาร MRS

จากการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหาร MRS โดยติดตามการเจริญเติบโตของเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร พร้อมกับการติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า pH และกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ ให้ผลดังภาพที่ 3.1

การผลิตแบคเทอริโอซินจากแลกติกแอสิดแบคทีเรียโดยส่วนใหญ่จะมีความสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ โดยการผลิตแบคทีริโอซินจะสูงสุดในระยะ mid หรือ late log phase ไปจนถึงระยะ early stationary phase จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหารสำเร็จ MRS พบว่าเชื้อจะเจริญอย่างรวดเร็วใน 8 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลง และเข้าสู่ระยะคงที่ โดยวัดการเจริญสูงสุดของเชื้อได้ในชั่วโมง 18 มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เท่ากับ 20 AU/ml และมีค่าพีเอชลดลงเป็น 4.3 ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของพีเอชจะผกผันกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 ของการเจริญ พบว่าการเจริญของเชื้อและกิจกรรมการยับยั้งลดลงเป็น 10 AU/ml และมีค่าพีเอชลดลงเป็น 4.10 จากการทดลองของภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ในการศึกษาการเจริญของเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* (SN 11) ในอาหาร MRS พบว่าการเจริญของเชื้อจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลง โดยมีการเจริญสูงสุดอยู่ที่ 24 ชั่วโมง และมีการผลิตแบคทีริโอซินเกิดขึ้นสูงสุดในชั่วโมงที่ 16 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 30 AU/ml โดยกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นจะลดลงหลังจากเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมงเช่นกัน

การลดลงของกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินหลังเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะคงที่แล้วเกิดเนื่องมาจากการย่อยสลายแบคทีริโอซิน โดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic degradation) Avonts et al. (2004) กล่าวว่าในระหว่างที่เชื้อเกิดการไลซิส (lysis) จะปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่ไม่มีความจำเพาะออกมา ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนเพิ่มขึ้น โดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนเหล่านี้จะเข้าไปย่อยสลายแบคทีริโอซิน ทำให้ปริมาณแบคทีริโอซินลดลงในช่วงปลายของการหมัก เช่นเดียวกับการทดลองของ Robert et al. (1996) พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสจะเพิ่มขึ้นพร้อมกับการลดลงของปริมาณ leuconosin ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Leuconostoc paramesenteroides* ปัญหาการลดลงของปริมาณแบคทีริโอซินนอกจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนแล้ว การลดลงของแบคทีริโอซิน อาจเกิดจากการดูดซับของแบคทีริโอซินกับตัวเซลล์ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยรวมถึงการดูดซับอยู่กับโปรตีนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย (Parente et al., 1994)



ภาพที่ 3.1 กราฟแสดงการเจริญของเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหาร MRS

◆ pH, ■ OD 660 nm, ▲ Bacteriocin activity (AU/ml)

สำหรับการเปลี่ยนแปลงของพีเอชที่เกิดขึ้นในระหว่างการเจริญของเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 เกิดเนื่องจากการที่เชื้อเป็นแลกติกแอสิดแบคทีเรียกลุ่ม homofermentative ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอนหกตัวแล้วให้กรดแลกติกประมาณร้อยละ 85 - 95 ซึ่งกรดที่ผลิตขึ้นมีผลทำให้ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง จากการทดลองของ Ruiz-Barba et al. (1994) พบว่า การลดลงของค่าพีเอชในระหว่างการหมักจะมีผลต่อปริมาณแบคทีริโอซินที่ได้ คือ เมื่อพีเอชลดลงถึงจุดๆ หนึ่งที่ให้ค่าความแรงของประจุ (ionic strength) ที่เหมาะสมจะทำให้ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์สามารถขับแบคทีริโอซินออกสู่นอกเซลล์ได้ดีขึ้น

3.4.2 การผลิตแบคทีริโอซินด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าว

การเจริญเติบโตและการผลิตแบคทีริโอซินจากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นตัวสำคัญที่ใช้ควบคุมการเจริญและการผลิตแบคทีริโอซิน น้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวเป็นวัสดุเศษเหลือจาก

อุตสาหกรรมและจากการเกษตร ที่ยังมีโปรตีนและน้ำตาลในปริมาณสูง อีกทั้งยังมีแร่ธาตุต่างๆ เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และเหล็ก ที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก ซึ่งเมื่อวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวที่นำมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ได้องค์ประกอบเบื้องต้นดังแสดงในตารางที่ 3.2

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นในน้ำนึ่งปลาทูน่าพบว่ามีปริมาณไนโตรเจนอยู่ร้อยละ 5.1 และหลังจากการเตรียมวัตถุดิบพบว่าปริมาณไนโตรเจนลดลงเหลือร้อยละ 4.5 ในขณะที่ปริมาณเกลือในน้ำนึ่งปลาทูน่ามีประมาณร้อยละ 0.2 จากการวิเคราะห์องค์ประกอบดังกล่าว พบว่า สอดคล้องกับการทดลองของ ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ซึ่งทำการศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนไนโตรเจนทั้งหมดในอาหาร MRS จากการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของน้ำนึ่งปลาทูน่า พบว่ามีปริมาณไนโตรเจนร้อยละ 7.0 และเมื่อแยกโปรตีนและไขมันออกพบว่ายังมีปริมาณไนโตรเจนเหลืออีกร้อยละ 4.0 (ไม่แสดงข้อมูล) ซึ่งใกล้เคียงกับอาหาร MRS ที่มีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดร้อยละ 4.8

ตารางที่ 3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นของน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่า

Composition	Tuna condensate		Coconut water	
	Untreat	Treat	Untreat	Treat
pH	6.2	6.5	5.50	6.52
Nitrogen (%)	5.12	4.54	0.11	0.10
Salt (%)	0.23	0.19	NA	NA
Reducing sugar (%)	NA	NA	0.56	0.53
Total sugar (%)	NA	NA	1.71	1.69

A = Not Available

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบเบื้องต้นในน้ำมะพร้าวพบว่ามีปริมาณ น้ำตาลทั้งหมดร้อยละ 1.7 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ร้อยละ 0.5 และมีปริมาณไนโตรเจนเพียงร้อยละ 0.1 จากการทดลองของ Child (1974) พบว่าในน้ำมะพร้าวอ่อนจะมีน้ำตาลเฉลี่ยร้อยละ 5.77 เมื่อเจริญเต็มที่จะมีน้ำตาลเฉลี่ยลดลงเป็นร้อยละ 4.58 และเมื่อเป็นมะพร้าวห้าวจะมีน้ำตาลเฉลี่ยลดลงเป็นร้อยละ 1.6 น้ำตาลที่พบส่วนใหญ่จะเป็นน้ำตาล glucose และ fructoseในปริมาณที่เท่าๆ กัน โดยมีปริมาณไขมันและโปรตีนประมาณร้อยละ 0.1

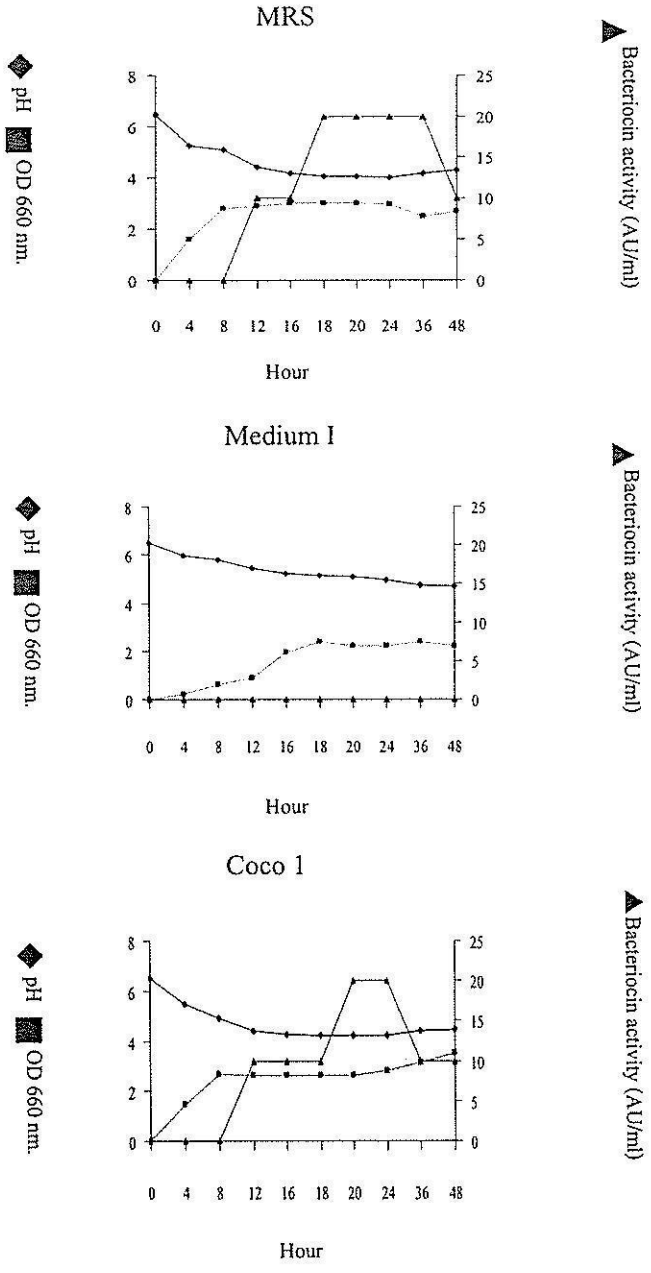
จากการทดลองเมื่อทราบองค์ประกอบของน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวแล้วจึงนำมาปรับสัดส่วนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตรต่างๆ โดยแปลงสัดส่วนจากสูตรอาหาร

Medium I ซึ่งมีการใช้น้ำตาล sucrose 10 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนและใช้น้ำนึ่งปลาเจือจางร้อยละ 50 เป็นแหล่งไนโตรเจน

จากการทดลองของ ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) พบว่า ในการดัดแปลงสูตรอาหาร MRS มาเป็นอาหารดัดแปลง Medium I สามารถใช้น้ำตาล sucrose ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ1-2 เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ โดยไม่พบความแตกต่างใดๆ เกิดขึ้นในช่วงความเข้มข้นของน้ำตาลระดับนี้ ดังนั้นในการปรับสัดส่วนอาหารดัดแปลงจึงปรับสัดส่วนให้มีปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าต่อน้ำมะพร้าวที่เพิ่มขึ้นเป็น 1:1 (Coco1), 1:2 (Coco2), 1:3 (Coco3) และ 1:4 (Coco4) และปรับสัดส่วนให้มีน้ำมะพร้าวต่อน้ำนึ่งปลาทูน่าที่เพิ่มขึ้นเป็น 1:2 (Tuna2), 1:3 (Tuna3) และ 1:4 (Tuna4) โดยยังคงมีการใช้น้ำตาล sucrose 10 กรัมต่อลิตร ในอาหารทุกสูตร

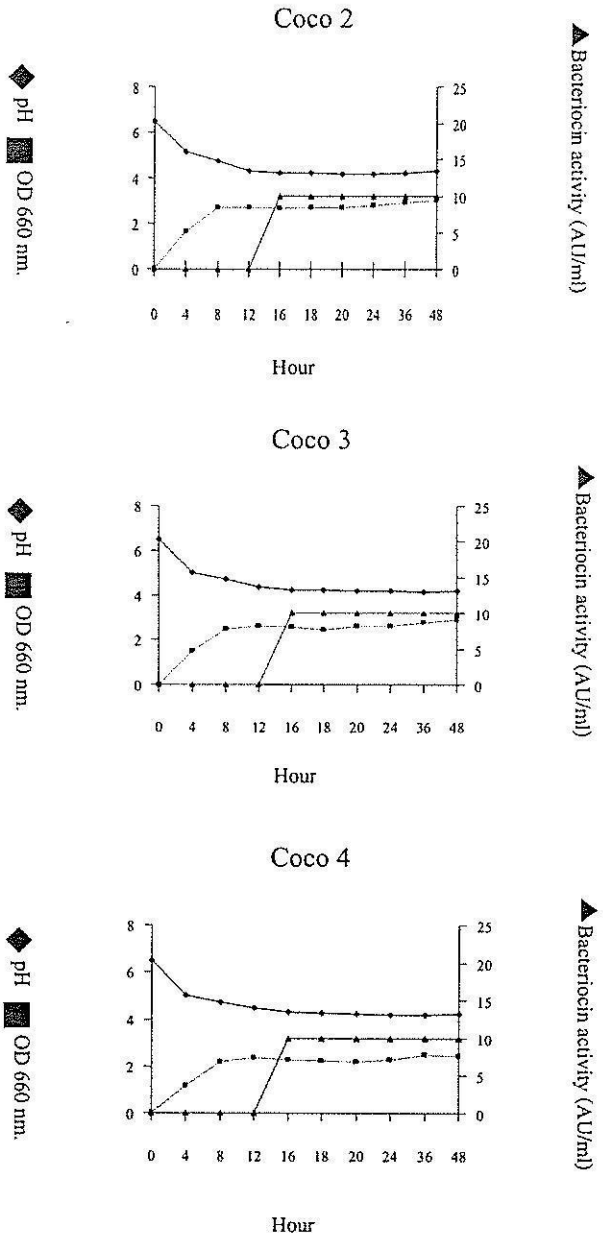
ผลการเจริญของเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 การผลิตแบคทีริโอซินและการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารที่ดัดแปลงที่ใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำกลั่นและใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน การผลิตแบคทีริโอซิน และการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ดัดแปลงจากสูตรอาหาร Medium I ทั้ง 7 สูตร คือ Coco1, Coco2, Coco3, Coco4, Tuna2, Tuna3 และ Tuna4 เปรียบเทียบกับการเจริญและการผลิตแบคทีริโอซินในอาหารสำเร็จ MRS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลการทดลองดังภาพที่ 3.2

เมื่อพิจารณาการเจริญเติบโตของเชื้อในอาหารสูตรต่างๆ ซึ่งวัดจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร จะพบว่าเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS ในขณะที่การเจริญของเชื้อในอาหารดัดแปลงสูตรต่างๆ ที่ใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นองค์ประกอบนั้นมีการเจริญแตกต่างกัน โดยเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกๆ สูตรและเจริญได้ดีในสูตรอาหารที่มีปริมาณน้ำมะพร้าว (Coco1, Coco2 และ Coco3) และน้ำนึ่งปลาทูน่าสูงขึ้น (Tuna2 และ Tuna4) แต่อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มปริมาณน้ำมะพร้าวในสูตรอาหาร Coco4 และเพิ่มปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าในสูตรอาหาร Tuna4 เป็น 4 เท่า จะทำให้การเจริญของเชื้อลดลง โดยรูปแบบการเจริญของเชื้อในอาหารทุกสูตรยังเป็นไปในรูปแบบเดียวกัน คือ เจริญอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 8 หลังจากนั้นการเจริญจะเริ่มช้าลงและเข้าสู่ระยะคงที่



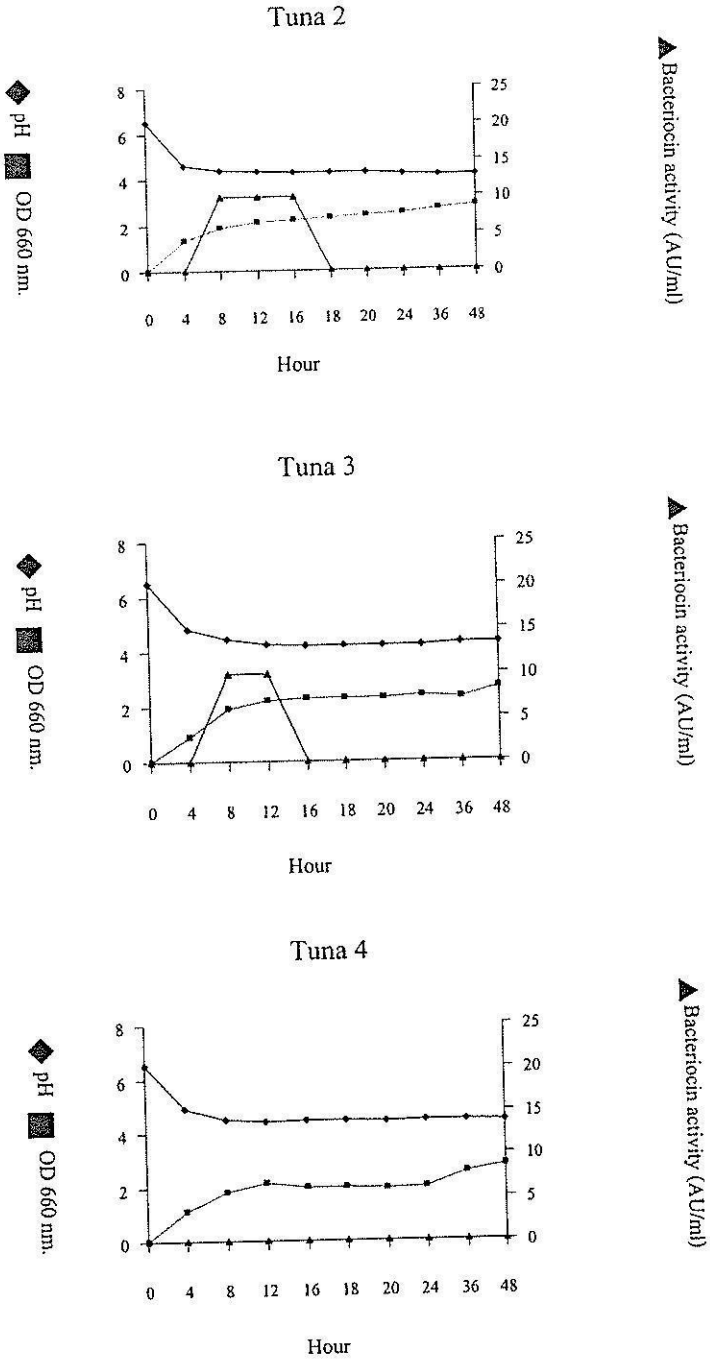
ภาพที่ 3.2 การเจริญของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

◆ pH, ■ OD 600 nm, ▲ Bacteriocin activity (AU/ml)



ภาพที่ 3.2 (ต่อ) การเจริญของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

◆ pH, ■ OD 600 nm, ▲ Bacteriocin activity (AU/ml)



ภาพที่ 3.2 (ต่อ) การเจริญของเชื้อ การเปลี่ยนแปลงพีเอช และกิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหารสูตรต่าง ๆ ◆ pH, ■ OD 600 nm, ▲ Bacteriocin activity (AU/ml)

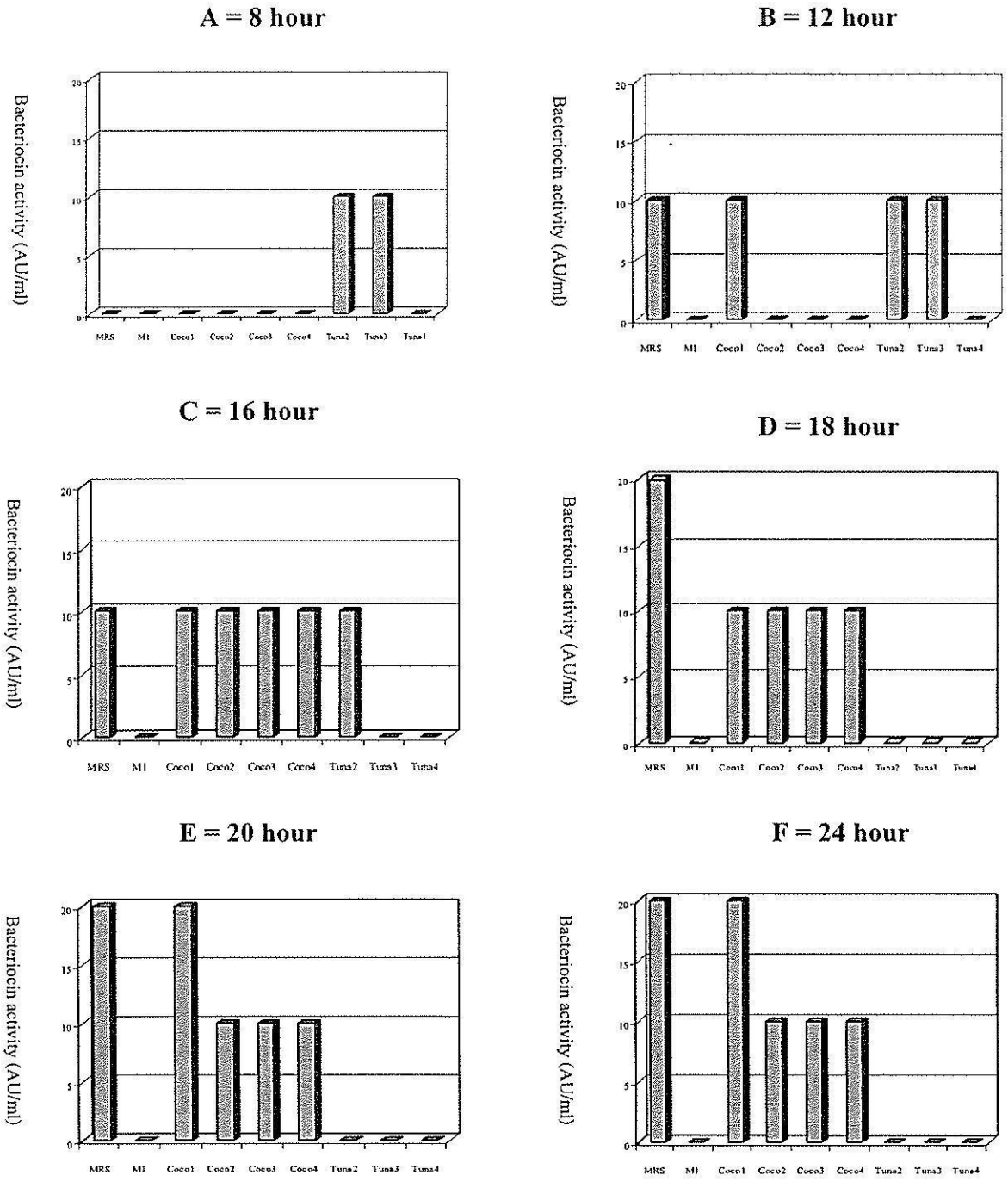
การผลิตแบคทีริโอซินในอาหารแต่ละสูตรจะแตกต่างกัน ขึ้นกับองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เมื่อพิจารณาสัดส่วนของน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวในสูตรอาหารดัดแปลงจากอาหาร Medium I ทั้ง 7 สูตร พบว่า ในสูตรอาหาร Coco1, Coco2, Coco3 และ Coco4 มีปริมาณน้ำมะพร้าว

ที่นำมาใช้แทนน้ำกลั่นเพิ่มขึ้นเป็น 500, 667, 750 และ 800 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยมีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเติมเพื่อปรับปริมาตรให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1 ลิตร ในขณะที่ในสูตรอาหาร Tuna2, Tuna3 และ Tuna4 จะเพิ่มปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็น 667, 750 และ 800 มิลลิลิตร ตามลำดับ โดยใช้น้ำมะพร้าวปรับปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ซึ่งเมื่อนำน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวมาผสมเข้าด้วยกันทำให้ปริมาณน้ำตาลในสูตรอาหาร Coco1, Coco2, Coco3 และ Coco4 เพิ่มขึ้น แต่มีปริมาณโปรตีนในสูตรอาหารลดลง ขณะที่ปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลในสูตรอาหาร Tuna2, Tuna3 และ Tuna4 จะมีปริมาณสูงมาก เนื่องจากในน้ำนึ่งปลาทูน่าจะมีปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลทั้งหมด เป็นองค์ประกอบในปริมาณสูงอยู่แล้ว (ภัทรพล จันทราภรณ์, 2543)

ความแตกต่างขององค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ มีผลทำให้การผลิตแบคทีริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรมีความแตกต่างกันไป ผลการผลิตแบคทีริโอซินในอาหารทั้ง 9 สูตร ณ เวลาต่างๆ ที่เริ่มตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน แสดงในภาพที่ 3.3 การผลิตแบคทีริโอซินในสูตรอาหาร Coco1 เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 12 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 20 AU/ml ในชั่วโมงที่ 20 และกิจกรรมของแบคทีริโอซินจะลดลงเป็น 10 AU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นในสูตรอาหาร Coco1 ใกล้เคียงกับกิจกรรมการยับยั้งในสูตรอาหารสำเร็จ MRS เพียงแต่ระยะเวลาในการคงตัวของแบคทีริโอซินในสูตรอาหาร Coco1 จะน้อยกว่าในสูตรอาหาร MRS (กิจกรรมการยับยั้งลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 36 ชั่วโมง) ดังนั้นการลดลงของปริมาณแบคทีริโอซินในสูตรอาหาร Coco1 จึงอาจเกิดจากการย่อยสลายโดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน และเกิดจากการดูดซับของแบคทีริโอซินกับตัวเซลล์ และโปรตีนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกันกับสูตรอาหาร MRS (สัญจกร จันทร์อุดม, 2549)

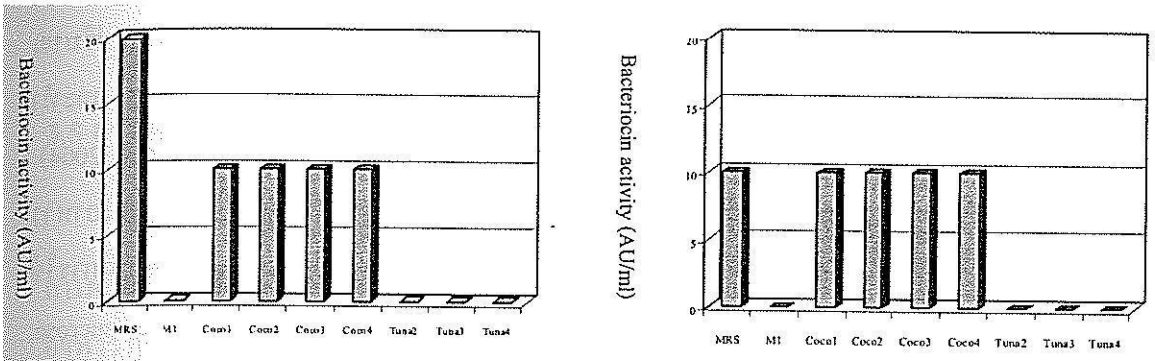
สำหรับในสูตรอาหาร Coco2, Coco3 และ Coco4 เชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 จะผลิตแบคทีริโอซินเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 16 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml และยังคงมีกิจกรรมของแบคทีริโอซินเกิดขึ้นจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก การผลิตแบคทีริโอซินในสูตรอาหารดัดแปลงทั้ง 3 สูตรนี้ จะเกิดช้าและมีกิจกรรมการยับยั้งต่ำกว่าในสูตรอาหาร MRS เนื่องมาจากในสูตรอาหารมีการใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำกลั่นในปริมาณมาก ทำให้ปริมาณโปรตีนในน้ำนึ่งปลาทูน่าถูกเจือจางลง และทำให้เกิดความไม่สมดุลของอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจน (Vazques et al., 2004) นอกจากนี้ในน้ำมะพร้าวยังมีปริมาณแร่ธาตุ เช่น เหล็ก แคลเซียม ฟอสฟอรัส แมกนีเซียม และโปแตสเซียม (ปริมาณสูงถึง 290 มิลลิกรัม) (ไม่แสดงข้อมูล) เป็นองค์ประกอบ ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้อาจเข้าไปมีผลในการยับยั้งหรือขัดขวางการทำงานของเชื้อ ยิ่งเพิ่มปริมาณน้ำมะพร้าวทำให้มีแหล่งคาร์บอนมากขึ้นเซลล์จุลินทรีย์จะสร้างกรดและเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น ทำให้การผลิตแบคทีริโอซินของเชื้อเกิดได้น้อยลง อีกทั้งน้ำมะพร้าวที่นำมาใช้ในการทดลองเป็นน้ำมะพร้าวแก่ ซึ่งมีปริมาณกรดซิตริกสูง

(Campos et al., 1996) มีผลต่อการเกิดออโตไลซีสของเชื้อ โดยการเกิดออโตไลซีสของเชื้อจะทำให้แบคทีริโอซินซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีนเกิดการเสียสภาพ (Kang et al., 1998)



ภาพที่ 3.3 การผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

G = 36 hour **H = 48 hour**



ภาพที่ 3.3 (ต่อ) การผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SNb11 ในอาหารสูตรต่าง ๆ

นอกจากนี้ในการทดลองเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหาร Tuna2, Tuna3 และ Tuna4 ยังให้ผลการผลิตแบคทีริโอซินแตกต่างจากสูตรอาหารข้างต้น เนื่องจากในสูตรอาหารเหล่านี้มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณ 2, 3 และ 4 เท่า ตามลำดับ โดยในการนำน้ำนึ่งปลาทูน่ามาใช้จะคำนึงถึงปริมาณโปรตีนเป็นหลัก แต่อย่างไรก็ตามจากการทดลองของ ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) พบว่าในน้ำนึ่งปลาทูน่ามีปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอยู่สูงเช่นกัน ดังนั้นในการปรับสัดส่วนให้มีน้ำนึ่งปลาทูน่าในปริมาณสูงจึงเป็นการเพิ่มปริมาณโปรตีนและปริมาณน้ำตาลในสูตรอาหารเช่นกัน

จากการทดลอง พบว่าการผลิตแบคเทอริโอซินในสูตรอาหาร Tuna2 และ Tuna3 จะเกิดขึ้นตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญของเชื้อ โดยสามารถตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 โดยในสูตรอาหาร Tuna2 จะมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml จนถึงชั่วโมงที่ 16 ในขณะที่การผลิตแบคทีริโอซินในสูตรอาหาร Tuna3 สิ้นสุดที่ชั่วโมงที่ 12 และไม่มีการผลิตแบคทีริโอซินเกิดขึ้นในสูตรอาหาร Tuna4 และ Medium I การลดลงของแบคทีริโอซินอาจเป็นผลมาจากปริมาณโปรตีนเหลืออยู่ เนื่องจากปริมาณโปรตีนที่เหลือหลังจากการเจริญของเชื้อเข้าสู่ระยะ stationary อาจเป็นพิษต่อเซลล์ และเร่งการเกิดการไลซีสของเชื้อ ซึ่งจะมีผลต่อความคงตัวของแบคทีริโอซิน (Jung et al., 1992) สอดคล้องกับการทดลองของ Chii-Cherng et al. (1993) ที่ศึกษาผลของปริมาณยีสต์สกัดร้อยละ 0.5, 1, 2, 3 และ 4 ในอาหารน้ำเวย์ พบว่าที่ปริมาณยีสต์สกัดร้อยละ 2 จะให้การผลิตแบคทีริโอซินสูงสุด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดปริมาณการผลิตแบคทีริโอซินจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเพิ่มถึงจุดสูงสุด นอกจากปริมาณโปรตีนแล้ว ปริมาณน้ำตาลในสูตรอาหารก็มีผลต่อการผลิตแบคทีริโอซินเช่นเดียวกัน จากการทดลองของ Ogunbanwo et al. (2003) พบว่าการใช้น้ำตาล glucose ในปริมาณมากไม่ได้ช่วยให้การผลิตแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้นแต่กลับทำให้กิจกรรมของแบคทีริ

โอซินลดลงหรือไม่พบกิจกรรมของแบคทีริโอซินเลย สอดคล้องกับการทดลองของ Parente et al. (1997) พบว่าเมื่อใช้ glucose ที่ความเข้มข้นสูงๆ (30 กรัมต่อลิตร) จะทำให้การผลิตแบคทีริโอซินลดลงเช่นกัน ดังนั้นในการผลิตแบคทีริโอซินควรควบคุมปริมาณสารอาหารให้สมดุล เพราะปริมาณสารอาหารที่มากเกินพอและเหลืออยู่จะไปยับยั้งการเจริญของเชื้อทำให้การเจริญของเชื้อลดลง และทำให้ผลิตแบคทีริโอซินได้น้อยจนถึงไม่ผลิตแบคทีริโอซินเลย (Dave et al., 1997; Vazques et al., 2004)

นอกจากปริมาณน้ำตาลที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดของน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในอาหารสูตรต่างๆ ก็อาจมีผลต่อการผลิตแบคทีริโอซิน จากการทดลองของ Dave et al. (1997) พบว่าการใช้อาหารสำเร็จ MRS ที่มีการเปลี่ยนชนิดของน้ำตาล (glucose, fructose, mannose, lactose, sucrose, maltose, raffinose และ cellobiose) เชื้อ *Lb. acidophilus* (LA-1) สามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่จะเจริญช้าในอาหารที่ใช้น้ำตาล mannose และ raffinose แต่จากการทดลองถึงแม้ว่าในอาหารสำเร็จ MRS จะใช้น้ำตาล dextrose เป็นองค์ประกอบ ในขณะที่สูตรอาหารที่เหลือใช้น้ำตาล sucrose และน้ำตาลจากน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นองค์ประกอบ จึงไม่น่าจะมีผลต่อการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 เพราะน้ำตาลจากน้ำมะพร้าวโดยส่วนใหญ่เป็นน้ำตาล fructose และ glucose ซึ่งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเช่นเดียวกับน้ำตาล dextrose ดังนั้นผลของแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในอาหารจึงน่าจะมาจากการเพิ่มหรือลดลงของปริมาณน้ำตาลมากกว่าจะเป็นผลมาจากชนิดของน้ำตาลที่ใช้ และการที่เพิ่มปริมาณน้ำ

การเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารแต่ละสูตร เมื่อพิจารณาที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเป็นช่วง late stationary phase พบว่าในอาหาร MRS, Medium I, Coco1, Coco2, Coco3, Coco4, Tuna2, Tuna3 และ Tuna4 มีค่าพีเอชเป็น 3.98, 4.94, 4.23, 4.15, 4.17, 4.20, 4.20, 4.20 และ 4.40 ตามลำดับ จากการทดลองของภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) พบว่าเมื่อควบคุมพีเอชในการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ให้มีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 4.5 จะให้ปริมาณการผลิตแบคทีริโอซินสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 16 และยังให้กิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 60 AU/ml แสดงให้เห็นว่าการควบคุมพีเอชในระหว่างการหมักให้เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีริโอซินของเชื้อแต่ละชนิดเป็นปัจจัยหนึ่งที่จำเป็นต่อการผลิตแบคทีริโอซิน เพราะในการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมของมันต่อการเปลี่ยนรูปของแบคทีริโอซินจากรูป inactive เป็น active ในขั้นตอนการ prostranslation และจากการทดลองของ Tom et al. (1998) พบว่ากิจกรรมสูงสุดของ plantaricin ที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. plantarum* 423 จะเกิดขึ้นเมื่อพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงเป็น 4 ซึ่งการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของแบคทีริโอซินเกิดขึ้นจากการปลดปล่อยเปปไทด์ที่ยึดเกาะอยู่กับผนังเซลล์ของเชื้อซึ่งเหมือนกับการทดลองของ Hurst and Dring (1968) ที่ พบว่าไนซินจะถูกดูดซับอยู่กับผนังเซลล์ของเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* เมื่อพีเอชเท่ากับ 6.8 และกิจกรรมของไนซินจะเพิ่มขึ้นร้อยละ 80

เมื่อปรับ พีเอชให้ต่ำกว่า 6 ในขณะที่การผลิต pediocin AcH จะถูกดูดซับอยู่กับผนังเซลล์ที่พีเอช 6.0-5.5 และจะมีการปลดปล่อยอย่างสมบูรณ์ที่พีเอชเป็น 1.5 (Yang et al., 1992)

3.5 สรุปผลการทดลอง

การใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 เชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS โดยให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น 20 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ถึง 24 ซึ่งเป็นช่วง late log phase ถึงระยะ early stationary phase ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลงที่มีการใช้ปริมาณน้ำมะพร้าวเพิ่มขึ้นเป็น 1:1 (Coco1), 1:2 (Coco2), 1:3 (Coco3) และ 1:4 (Coco4) มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 10 AU/ml โดยที่เชื้อเริ่มผลิตแบคทีริโอซินตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง และในสูตรอาหาร Tuna2 และ Tuna3 ที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเพิ่มขึ้น 2 และ 3 เท่า ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml โดยตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญ และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 16 และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในสูตรอาหาร Medium I และ Tuna 4

ปัจจัยที่สำคัญในการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 คือปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ของสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ปริมาณน้ำตาล ปริมาณโปรตีน และปริมาณแร่ธาตุที่มีอยู่ในวัตถุดิบ จะมีผลต่อการผลิตแบคทีริโอซินมากกว่าชนิดของสารที่เป็นส่วนประกอบ เช่น ชนิดของน้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แตกต่างกันถึงแม้ว่าเชื้อจะสามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ดีในอาหาร MRS ซึ่งมีน้ำตาล dextrose เป็นองค์ประกอบมากกว่าในสูตรอาหารดัดแปลงที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวเป็นองค์ประกอบก็ตาม เมื่อเพิ่มอัตราส่วนปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวให้มากขึ้นมีผลทำให้การเจริญของเชื้อและการผลิตแบคทีริโอซินลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณสารอาหารที่มากเกินพอ เข้าไปมีผลในการยับยั้งการเจริญและการสร้างแบคทีริโอซิน

เอกสารอ้างอิง

ชุตินุช สุจริต. 2540. การเลี้ยงยีสต์ในน้ำนึ่งปลาทูน่าหลังการแยกโปรตีนและไขมัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ภัทรพล จันทราภรณ์. 2543. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดย *Lactobacillus casei* ssp. Rhamnosus ที่ถูกตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ลัญจกร จันทร์อุดม. 2549. การพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. Rhamnosus(SN11). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

A.O.A.C. 2000. Official Method of Analysis. 16th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington DC, USA.

Avonts, L., Uytven, V. E. and De Vuyst, L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic Lactobacillus strains in different media. Int. Dairy J. 14:947-955.

Campos, C.F., Souza, P.E.A., Coelho, J.V. and Gloria, M.B.A. 1996. Chemical composition, enzyme activity and affect of enzyme inactivation on flavor quality of green coconut water. J. Food Process. 20:487-500.

Chii-Cherng, L., Ahmed, E.Y., Edward, R.R. and Grady, W.C. 1993. Pediococcus acidilactici PO2 bacteriocin production in whey permeate and inhibition of Listeria monocytogenes in foods. J. Food Sci. 58:430-434.

Child, R. 1974. Coconuts. 2nd. ed. Longman, London (UK), 335 pp.

Dave, R.I. and Shah, N.P. 1997. Characteristics of bacteriocin produced by*Lactobacillus acidophilus* LA-1. Int. Dairy J. 7:707-715.

De Vuyst, L., De Poorter, G. and Vandamme, E. 1990. Metabolic control of nisin biosynthesis in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. In Fermentation Technologies: Industrial Applications, pp. 166-172. Edited by Yu PL: Elsevier Applied Science.

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

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. lactis NIZO 22186 in the synthetic medium. J. Appl. Bacteriol. 78:28-33

Hsieh, H.Y., Paik, H.D. and Glatz, B.A. 1996. Improvement of detection and production of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by Propionibacterium thoenii. J. Food Prot. 59:734-738.

Hurst, A. and Dring, G.J. 1968. Observations on the action of Benzylpenicillin on a strain of *Streptococcus lactis*. J. Ben. Microbiol. 55:185-194

Jung, D.S., Bodyfelt, F.W. and Daeschel, M.A. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficacy of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. J. Dairy Sci. 75:387-393.

Kaiser, A.L. and Montville, T.J. 1993.The influence of pH and growth rate on production of the bacteriocin, bavaricin M N, in batch and continuous fermentations. J. Appl. Bacteriol. 75:536-540.

Kang, O.J., Vezina, L.P., Laberge, S. and Simard, R.E. 1998. Some factors influencing the autolysis of *Lactobacillus bulgaricus* and *Lactobacillus casei*. J. Dairy Sci. 81:639–646.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by Lactobacillus brevis OG1. African. J. Biot. 2:179-184.

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

Parente, E., Brienza, C., Ricciardi, A. and Addario, G. 1997. Growth and bacteriocin production by *Enterococcus faecium* DPC1146 in batch and continuous culture. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 18:62–67.

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

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

Roberts, C.B., Winkowski, K. and Montville, T.J. 1996. pH-controlled fermentors to increased production of Leuconocin S by *Leuconostoc paramesenteroides*. Proc. Biochem. 31:225-228.

Rodriguez, J. M., Martínez, M. I., Kok, J. 2002. Pediocin PA-1, a wide-spectrum bacteriocin from lactic acid bacteria. Crit. Rev. Food Sci. Tech. 42:91–121.

Ruiz-Barba, J.L., Cathcart, D.P., Warner, P.J. and Jimenez-Dıaz, R. 1994. Use of Lactobacillus plantarum LPCO10, a bacteriocin producer, as a starter culture in Spanish-style green olive fermentations. Appl. Environ. Microbiol. 60:2059–2064.

Tom, L.J.V., Greey, B., Carol, A.V.R., Leon, M.T.D. and Vandamme, E.I. 1998. Fermentation optimization of plataricin 423, a bacteriocin prodoced by *Lactobacillus plantarum* 423. J. Ferment. Bioeng. 2:174-179.

Vazquez, J.A., Cabo, M. ., Gonzalez, M. . and Murado, M.A. 2004. The role of amino acids in nisin and pediocin production by two lactic acid bacteria a factorial study. Enzyme Microbial Technol. 34:319-325.

Yang, R., Johnson, M.C. and Ray, B. 1992. Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 58:3355-3359.

Yang, R. and B. Ray. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11:281-291.

บทที่ 4

การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus* SN 11

4.1 คำนำ

จากคุณสมบัติและความสามารถของแบคทีริโอซินการเป็นสารธรรมชาติที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคต่างๆ ซึ่งปลอดภัยกว่าการใช้สารป้องกันการเสื่อมเสียสังเคราะห์ในการยับยั้ง ทำให้แบคทีริโอซินถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมมากยิ่งขึ้นและทำให้มีผู้สนใจศึกษาคุณสมบัติในด้านต่างๆ ของแบคทีริโอซินมากขึ้นด้วย

กระบวนการผลิตแบคทีริโอซินของแลกติกแอสิดแบคทีเรีย นอกจากเชื้อจะผลิตแบคทีริโอซินแล้ว ยังมีสารอื่นๆ เช่น กรดอินทรีย์ (กรดแลกติก และกรดอะซิติก) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Daeschel, 1989) ออกมาด้วย ดังนั้นในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สารแบคทีริโอซินจึงต้องคำนึงถึงสารที่เชื้อผลิตออกมา รวมทั้งคำนึงถึงสารประกอบอื่นๆ เช่น โปรตีน สารอินทรีย์ และสารอนินทรีย์ต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย

การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินซึ่งเป็นสารประกอบโปรตีน อาศัยเทคนิคการทำบริสุทธิ์โปรตีนโดยทั่วไป ซึ่งแบคทีริโอซินจากเชื้อแต่ละชนิดจะมีวิธีการทำบริสุทธิ์แตกต่างกันไป โดยวิธีการที่นิยมใช้ ได้แก่ การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ion-exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography และ reversed phase HPLC (Mϕrtvedt et al., 1991; Larsen et al., 1993; Benoit et al., 1997; Verellen et al., 1998) ซึ่งเป็นวิธีการที่ใช้ในการทำบริสุทธิ์ curvarin A, sakacin P, lactocin A, brevicin 27, bavaricin A และ plantaricin 423

การศึกษาผลของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 จะนำแบคทีริโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วน โดยการใช้ ultrafiltration membrane ขนาด 100 กิโลดาลตัน เพื่อแยกสารโมเลกุลใหญ่ออก และใช้เทคนิคการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อให้ได้ปริมาณโปรตีนที่ต้องการ แล้วนำเอาตะกอนที่ได้ไปกำจัดเกลือออกโดยการไดอะไลซีส และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการทำแห้งแบบแช่แข็ง (freeze dry) (น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว, 2544) แล้วจึงนำเอา แบคทีริโอซินมาใช้ในการทดสอบ ซึ่งทำให้ผลการทดลองที่ได้ไม่เป็นผลมาจากแบคทีริโอซินเพียงอย่างเดียว

ดังนั้นในการศึกษาในครั้งนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อหาวิธีการทำบริสุทธิ์สาร เพื่อให้ได้สารที่บริสุทธิ์ ตลอดจนให้ทราบถึงขนาดโมเลกุลของสารและการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโน เพื่อใช้ในการจัดจำแนกประเภทของสารและใช้เป็นข้อมูลสำหรับการนำแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ไปประยุกต์ใช้ หรือ

เพื่อการพัฒนาด้านต่างๆ เช่น การพัฒนาปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้เทคนิคทางด้านพันธุวิศวกรรม เพื่อให้ได้ปริมาณแบคทีริโอซินที่สูงขึ้น

4.2 วัตถุประสงค์

4.1 เพื่อศึกษาขั้นตอนการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

4.2 เพื่อการจัดจำแนกประเภทของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้จากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

4.3 เพื่อให้ทราบถึงคุณสมบัติบางประการของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้จากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

4.3 อุปกรณ์และวิธีการ

4.3.1 จุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตแบคทีริโอซิน คือ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ซึ่งแยกได้จากอาหารหมักประเภทส้มฟัก (ศิรินาถ หนูเอก, 2540) จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีริโอซิน ได้แก่ *Staphylococcus aureus, Escherichia coli, Listeria monocytogenes* และ *Streptococcus lactis* จากห้องปฏิบัติการจุลินทรีย์ผลิตผลเกษตร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4.3.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหาร De Man Rogusa Sharpe (MRS) (Merck) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN.11 และ *Strep.lactis* อาหาร trypticase soy broth (TSB) (Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *S. aureus, E. coli, Salmonella* และ *L. monocytogenes* อาหาร nutrient agar (NA) (Difco) สำหรับเทรองพื้นจานเพาะเชื้อในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน โดยวิธี agar well diffusion

4.3.3 การศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

ถ่ายเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 จากหลอดเก็บเชื้อลงในอาหารเหลวปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อร้อยละ 5 ลงในอาหารเหลวแต่ละชนิดปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่มีพีเอช 6.5 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 °C (VS-8480 SR-L, S.V. Medico Co., Ltd.) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

นำหัวเชื้อที่ได้ร้อยละ 5 ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ปริมาตร 4 ลิตร ที่มีพีเอช 6.5 บ่มในตู้บ่มแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 100 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับพีเอช (Cyber Scan pH 2500, Entech Instruments, Ltd.) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 3 ด้วย 6 N NaOH หรือ 6 N HCl (Blom et al., 2001) นำไปหมุนเหวี่ยง เพื่อแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C (Himac SCR 20B, Hitachi Koki Co., Ltd.) นำส่วนใสที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อกำจัดเอนไซม์โปรตีเอส (protease enzyme)

4.3.4 การศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซิน

นำส่วนที่ได้จากการเตรียมแบคทีริโอซินไปกรองผ่าน ultrafiltration (Pellicon XL, Millipore) ขนาด 100 กิโลดาลตัน เพื่อกำจัดโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า 100 กิโลดาลตันออก นำส่วนที่ผ่านเมมเบรนไปตกตะกอนโปรตีนโดยใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว, 2544)

4.3.4.1 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต 2 ระดับ (น้อมจิตต์ อ่อนแก้ว, 2544) โดยตกตะกอนที่ความเข้มข้นของเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 40 ทำการกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสที่ได้ไปตกตะกอนต่อที่ระดับเกลืออิ่มตัวร้อยละ 80 โดยทำการกวนผสม (magnetic stirrer, IKA) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ละลายตะกอนที่ได้ด้วยสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 ทำการแยกเกลือออกโดยการไดอะไลซิส นำสารละลายแบคทีริโอซินบรรจุในถุงไดอะไลซิสขนาด 3.5 กิโลดาลตัน ผูกถุงให้แน่นและแช่ในสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 โดยมีสัดส่วนสารละลายในถุง 1 ส่วนต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 50 ส่วน ทิ้งค้างคืนที่อุณหภูมิ 4 °C โดยกวนสารละลายบัฟเฟอร์ตลอดเวลาด้วยเครื่องกวนผสม และ

เปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง (Bogovic-Matijasic et al., 1998) จากนั้นนำสารละลายที่ในถุงไปทำให้เข้มข้นขึ้น ด้วยสารคาร์บอกซีเมทธิลเซลลูโลส (carboxymethylcellulose: CMC)

นำเอาสารละลายที่แยกได้มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินโดยการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method และคำนวณปริมาณแบคทีริโอซินที่แยกได้ โดยกำหนดให้กิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสหลังแยกเซลล์ออกไปเป็นร้อยเปอร์เซ็นต์

4.3.4.2 แยกส่วนด้วย Gel Filtration Chromatography

ทำการปรับสมดุลคอลัมน์ (Sephadex G-50 column ขนาด 1.5 X 20 cm) ด้วยสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 นำเอาสารละลายแบคทีริโอซินที่ได้ปริมาณ 5 มิลลิลิตร เติมลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะด้วยสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ เข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 โดยมีอัตราการไหลของตัวชะ 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บสารละลายแบคทีริโอซินแต่ละส่วนที่แยกได้ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนอัตโนมัติ (fraction collector) หลอดละ 3 มิลลิลิตร นำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method เก็บรวบรวมส่วนที่มีกิจกรรมของแบคทีริโอซินและนำไปทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้ระบบสูญญากาศที่อุณหภูมิ 50 °C ให้ปริมาตรของสารละลายลดลงครึ่งหนึ่ง (ดัดแปลงวิธีของ Muriana and Klaenhammer, 1990)

4.3.4.3 Cation Exchange Chromatography

ทำการปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ (Hitrap CM FF ขนาด 1 X 5 cm.) โดยใช้สารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 (starting buffer) ปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรคอลัมน์ โดยมีอัตราการไหลของตัวชะ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยสารละลายนำเอาสารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 ที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นำแบคทีริโอซินที่ได้จากข้อ 4.5.4.2 เติมลงในคอลัมน์ หลังจากนั้นชะด้วยใช้สารละลายอะซิเตดบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ พีเอช 3 ที่มีการทำ stepwise gradient ของโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.05-0.2 โมลาร์ อัตราการไหลของตัวชะ 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที (ดัดแปลงวิธีของ Benoit et al., 1997)

เก็บสารละลายแบคทีริโอซินแต่ละส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนสารละลายอัตโนมัติ (fraction collector) หลอดละ 1 มิลลิลิตร นำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method เก็บรวบรวมส่วนที่มีกิจกรรมของแบคทีริโอซินและนำไปกำจัดเกลือออกโดยวิธีไดอะไลซีสข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส ทำให้เข้มข้นโดยการระเหยภายใต้ระบบสูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ให้ปริมาตรของสารละลายลดลงครึ่งหนึ่ง

4.3.4.4 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP-HPLC)

แยกแบคทีริโอซินด้วย HPLC (Agilent 1100) เตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่จะใช้เป็นตัวชะ 2 ชนิด คือ บัฟเฟอร์ A ประกอบด้วย trifluoroacetic acid (TFA) ร้อยละ 1 ในน้ำกลั่น บัฟเฟอร์ B ประกอบด้วย TFA ร้อยละ 0.1 ใน acetonitrile ร้อยละ 99.8 ปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ (Lichrosorb RP18) โดยใช้สารละลายบัฟเฟอร์ A ร้อยละ 50 นำเอาสารละลายที่เก็บรวบรวมได้จากข้อ 4.3.4.3 มาเติมในคอลัมน์แล้วชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A และบัฟเฟอร์ B ในอัตราส่วนต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 4.1 โดยปรับอัตราการไหลของตัวชะเป็น 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที (ดัดแปลงวิธีของ Benoit et al., 1997)

ตารางที่ 4.1 แสดงอัตราส่วนของบัฟเฟอร์ A และบัฟเฟอร์ B สำหรับการชะแบคทีริโอซิน ที่เวลาต่างๆ

Time (min)	Buffer A	Buffer B
0 – 2	50	50
2 – 3	20	80
3 – 10	20	80

Buffer A: 0.1% trifluoroacetic acid in water

Buffer B: 0.1% trifluoroacetic acid in 99.8% acetonitrile

เก็บสารละลายแบคทีริโอซินแต่ละส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ด้วยเครื่องเก็บแยกส่วนสารละลายอัตโนมัติ (fraction collector) หลอดละ 0.5 มิลลิลิตร และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method

4.3.4.5 การศึกษาการทำบริสุทธิ์ด้วย Amberlite XAD-4 ควบคู่กับการใช้โครมาโทกราฟี (ดัดแปลงวิธีของ Green et al., 1997)

นำสารละลายแบคทีริโอซินที่ไม่ผ่านกระบวนการทำบริสุทธิ์ มากวนผสมกับ Amberlite XAD-4 (Amberlite XAD-4 3 กรัมต่อสารละลาย 100 มิลลิลิตร) ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมากรองผ่านกระดาษกรอง แล้วนำเอา Amberlite ที่ได้จากการกรองไปบรรจุลงในคอลัมน์ ล้างด้วยน้ำกลั่นปริมาตร 5 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ หลังจากนั้นชะด้วยสารละลายเมทธานอลต่อ

น้ำกลั่น ในอัตราส่วน 1:1 โดยใช้สารละลายปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ จากนั้นชะคอลัมน์ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอลิก ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ในสารละลายเมทธานอล อัตราส่วน 1:9 ปริมาตร 3 เท่าของปริมาตรของคอลัมน์ นำเอาสารละลายที่แยกได้ในแต่ละส่วนไประเหยเมทธานอลออกที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.5 นำสารละลายที่ได้ไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method

นำเอาสารละลายแบคทีริโอซินที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบ fast protein liquid chromatography (FPLC system, Pharmacia Biotech)โดยเตรียมสารละลายบัฟเฟอร์ที่ใช้เป็นตัวชะ 2 ชนิด คือ บัฟเฟอร์ A ประกอบด้วย trifluoroacetic acid (TFA) ร้อยละ 1 ในน้ำกลั่น บัฟเฟอร์ B ประกอบด้วย TFA ร้อยละ 0.1 ใน acetonitrile ร้อยละ 99.8 ทำการปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ (Resource RPC column) ด้วยบัฟเฟอร์ A ร้อยละ 50 เติมสารละลายแบคทีริโอซินที่ได้ลงในคอลัมน์ และเริ่มชะคอลัมน์ด้วยบัฟเฟอร์ A ร้อยละ 50 (บัฟเฟอร์ B ร้อยละ 50) โดยเพิ่มปริมาณบัฟเฟอร์ ให้เป็นบัฟเฟอร์ B อย่างเดียว ในนาทีที่ 10 ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 แสดงอัตราส่วนของบัฟเฟอร์ A และบัฟเฟอร์ B ใช้ชะแบคทีริโอซินออกจากคอลัมน์ Resource RPC ที่เวลาต่างๆ

Time (min)	Buffer A	Buffer B
0	50	50
10	0	100

Buffer A: 0.1% trifluoroacetic acid in water

Buffer B: 0.1% trifluoroacetic acid in 99.8% acetonitrile

เก็บสารละลายแบคทีริโอซินแต่ละส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์ และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีริโอซิน และวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry method

4.3.5 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์

4.3.5.1 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินโดยวิธี SDS-Polyacylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

นำเอาแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้จากข้อ 4.3.4.5 มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้วิธี SDS-polyacylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Laemmli (1970) เปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน (rainbow colored protein molecular weight marker) ซึ่งมีช่วงน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน คือ 2.5 ถึง 45 กิโลดาลตัน ประกอบด้วยโปรตีน 7 ชนิด คือ ovalbumin, carbonic anhydrase, trypsin inhibitor, lysozyme, aprotinin, insulin (b) chain และ insulin (a) chain มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 45, 30, 20.1, 14.3, 6.5, 3.5 และ 2.5 กิโลดาลตัน ตามลำดับ

แบ่งแผ่นเจลที่ได้เป็น 2 ส่วน ส่วนแรกนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินโดยนำแผ่นเจลที่ได้แช่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ แล้วนำไปวางบนอาหารแข็ง NA หลังจากนั้นเททับด้วยอาหารกึ่งแข็ง TSA ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณเชื้อ *S. aureus* 10^5 cfu/ml ลงบนแผ่นเจลที่อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตวงใสที่เกิดขึ้นซึ่งแสดงถึงผลการยับยั้งของแบคทีริโอซิน

นำแผ่นเจลส่วนที่สองมาทำการย้อมแถบโปรตีนโดยแช่ในสารละลายสี Coomassie brilliant blue R250 ไว้ข้ามคืน และล้างแผ่นเจลด้วยสารละลายผสม (เมทธานอลร้อยละ 40 และกรดอะซิติกเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตรต่อปริมาตร) คำนวณ หาน้ำหนักโมเลกุลของสารโดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน

4.3.5.2 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินโดยวิธี Electrospray Mass Spectrometry (EMS)

นำตัวอย่างสารละลายแบคทีริโอซินที่ได้จากข้อ 4.3.5.1 มาวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลโดยใช้เทคนิค Electrospray Ionisation Mass Spectrometry (LC-MS, LCT)

4.3.6 การวิเคราะห์หาลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของแบคทีริโอซิน

นำแถบโปรตีนของแบคทีริโอซินที่ได้จากวิธี SDS-PAGE มาถ่ายลงบนแผ่น polyvinylidene difluoride (PDVF) และทำการวิเคราะห์หาลำดับการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนของแบคทีริโอซินด้วยเครื่อง amino acid sequencer (Procise 492 HT, Appiled Biosystems) โดยใช้เทคนิค Edman

degradation ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผันกลับ (reversed phase chromatography) โดยใช้คอลัมน์ PTH-C18

4.3.7 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

นำแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้จากการทำบริสุทธิ์ (ข้อ 4.3.4.5) มาศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

4.3.7.1 การทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคของแบคทีริโอซิน

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Streptococcus lactis* และ *Escherichia coli* O157:H7 ในอาหารเหลว TSB ให้มีปริมาณเชื้อ 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เติมแบคทีริโอซินที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ (1.0 มิลลิกรัม เท่ากับ 320 AU/ml) ที่ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำการ pour plate เชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดบนอาหารแข็ง TSA บ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในตัวอย่างควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคทีริโอซิน (ดัดแปลงวิธีจากนิติเนตร ขำทวี, 2544)

4.3.7.2 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อความคงตัวของแบคทีริโอซิน

ศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อความคงตัวของแบคทีริโอซินโดยดัดแปลงวิธีจาก Pilet et al., 1995 (อ้างโดย ศิรินาถ หนูเอก, 2540) โดยนำแบคทีริโอซิน บริสุทธิ์ในปริมาณที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ (จากข้อ 4.5.7.1) มาผสมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ Proteinase K, trypsin, α-chymotrypsin และ catalase โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นำส่วนใสหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด โดยใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ไม่มีสารแบคทีริโอซิน เป็นชุดควบคุม

4.3.7.3 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของแบคทีริโอซิน

ทำการทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินต่ออุณหภูมิ (ดัดแปลงจาก Mathieu et al., 1993) โดยนำแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ทราบความเข้มข้นจากข้อ 4.3.7.1 ละลายในสารละลายฟอตเฟสบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.5 โมลาร์ พีเอช 6.5 แล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที 100 °C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที และที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำให้เย็นโดย

ทันที และนำไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินที่เหลืออยู่กับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด

4.3.7.4 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของแบคทีริโอซิน

ทำการทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินต่อพีเอช (ดัดแปลงจาก Oh et al., 2000) โดยนำแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ทราบความเข้มข้นจากข้อ 4.3.7.1 มาปรับพีเอชเป็น 1.0 ถึง 14 ด้วยสารละลาย 6 N NaOH หรือ HCl บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นปรับ พีเอชให้เป็นกลาง (พีเอช 6.5) แล้วนำส่วนใสที่ได้หลังจากการปรับพีเอชมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด

4.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.4.1. การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN11

จากการศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง (ช่วง late log phase) พบว่า มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 20 AU/ml. ปรับพีเอชของสารละลายเป็น 3 เพื่อลดและป้องกันการดูดซับของแบคทีริโอซินกับผนังเซลล์ (Blom et al., 2001) จากนั้นนำเอาสารละลายที่ได้ไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกที่ความเร็ว 6,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้หลังจากการกำจัดตัวเซลล์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75 °C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส พบว่ากิจกรรมการยับยั้งยังคงเท่ากับส่วนใสหลังแยกเซลล์ออก (20 AU/ml) จากนั้นทำการแยกโปรตีนโมเลกุลใหญ่ออกจากน้ำหมัก โดยนำสารละลายที่ได้มากรองผ่าน ultrafiltration ซึ่งมีขนาดแผ่นกรอง 100 กิโลดาลตัน พบว่าช่วยให้สีของน้ำหมักจางลงและไม่พบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินในส่วนที่ไม่ผ่านแผ่นกรอง แต่ในส่วนที่ผ่านแผ่นกรองกิจกรรมการยับยั้งยังคงเดิม แสดงว่าแบคทีริโอซินที่ได้มีขนาดโมเลกุลต่ำกว่า 100 กิโลดาลตัน

4.4.2 การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

ทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือที่ระดับเกลืออิ่มตัวร้อยละ 40 และร้อยละ 80 โดยทำการกวนผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องกวนผสมที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเหวี่ยงแยกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากการทดลองพบกิจกรรมการยับยั้ง

หลังจากตกตะกอนที่ระดับเกลืออิ่มตัวร้อยละ 40 ในส่วนตะกอนเท่ากับ 10 AU/ml และในส่วนใสมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 20 AU/ml โดยมีปริมาณโปรตีนเป็น 9.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 11.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการตกตะกอนต่อที่ระดับเกลืออิ่มตัวร้อยละ 80 โดยกวนผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 30 นาที จะพบตะกอนเกิดขึ้น 2 ส่วน คือ ลอยอยู่บนผิวและตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด การเกิดตะกอนแบบนี้มักพบมากในการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย เช่น lactacin F จากเชื้อ *Lb. acidophilus* 11088 (Muriana et al., 1991) Brevicin 27 จากเชื้อ *Lb. brevis* SB27 (Benoit et al., 1997) และการทำบริสุทธิ์ Lactocin S จากเชื้อ *Lb. sake* L45 (Mϕrtvedt et al., 1991) ทำการเก็บรวบรวมตะกอนทั้งสองส่วนเข้าด้วยกัน ละลายตะกอนโดยใช้สารละลาย 0.2 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 3 จากผลการทดลองไม่พบกิจกรรมการยับยั้งในส่วนใสแต่พบกิจกรรมการยับยั้งในส่วนตะกอนเท่ากับ 80 AU/ml และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 19.02 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

หลังจากการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นร้อยละ 80 แล้วนำมากำจัดเกลือโดยการใช้วิธีไดอะไลซิส นำสารละลายแบคทีริโอซินที่ได้บรรจุในถุงไดอะไลซิสซึ่งมีขนาดโมเลกุลผ่าน 3,500 ดาลตัน แช่ในสารละลาย 0.2 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 3 ทิ้งค้างคืนไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C โดยทำการเปลี่ยนบัฟเฟอร์ 2 ครั้ง ทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารละลายภายในถุงไดอะไลซิสพบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 80 AU/ml และมีปริมาณโปรตีนเท่ากับ 17.52 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้สาร CMC เป็นตัวดูดซับโดยทำการดูดซับน้ำออกให้ปริมาตรของสารละลายลดลง 4 เท่า จากการทดลองพบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 160 AU/ml และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้น 7 เท่า (แสดงในตารางที่ 4.3)

4.4.3 Gel-filtration Chromatography

ทำการปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ (Sephadex G-50 ขนาด 1.5 X 20 cm.) โดยใช้สารละลาย 0.2 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 3 เติมสารละลายแบคเทอริโอซินลงในคอลัมน์ ชะด้วยสารละลาย 0.2 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 3 ที่อัตราเร็ว 1 มิลลิลิตรต่อนาที เก็บแยกส่วนที่ได้ครั้งละ 3 มิลลิลิตร จากการทดลองให้ผลดังภาพที่ 4.1

จากภาพที่ 4.1 ทำการเก็บรวบรวมส่วนที่มีกิจกรรมการยับยั้ง (fraction no. 9 - 22) แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นโดยการระเหยภายใต้สูญญากาศ ที่อุณหภูมิ 50 °C พบว่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 800 AU/ml (ตารางที่ 4.4) และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 40 เท่า แต่ปริมาณผลิตผลลดลงเหลือเพียงร้อยละ 0.87 ทั้งนี้เนื่องมาจากเทคนิคโครมาโทกราฟีแบบเจลฟิวเตชั่นเป็นเทคนิคที่ใช้ใน

การแยกสารตามขนาดโมเลกุล ดังนั้นสารที่มีขนาดโมเลกุลแตกต่างไปจากสารที่เราต้องการจึงถูกกำจัดออกไปทำให้ปริมาณผลิตผลลดลง แต่ช่วยให้ความบริสุทธิ์ของสารที่ต้องการเพิ่มขึ้น

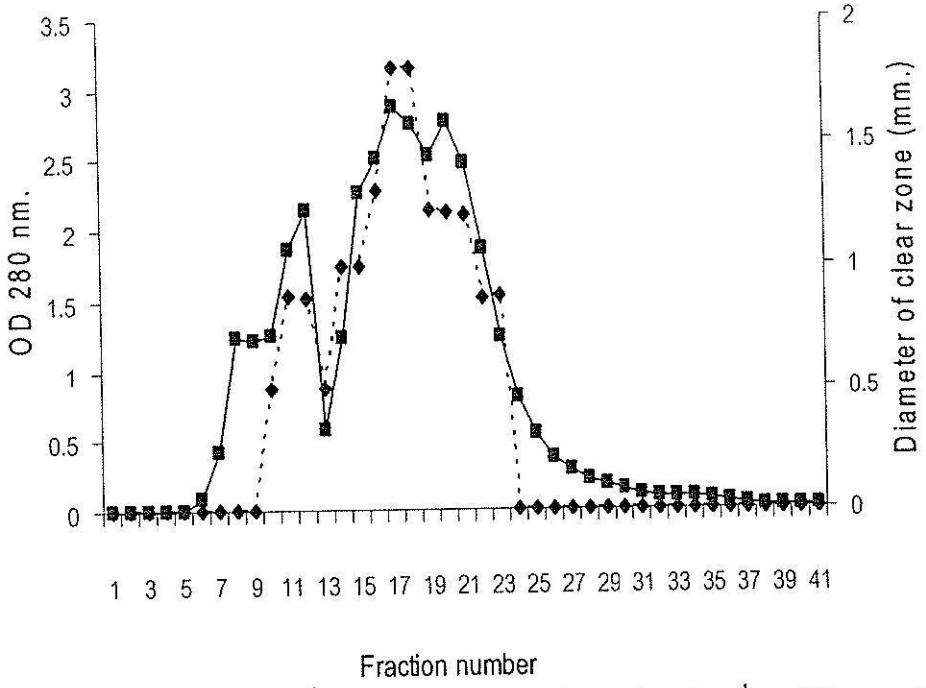
ตารางที่ 4.3 แสดงขั้นตอนการทำบริสุทธิ์บางส่วนและกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

Partial purifying steps	Volume (ml.)	Activity (AU/ml)	Total activity (AU)	Protein (mg/ml)	Specific activity (AU/mg)	Increasing in specific activity	Yield (%)
- Cell-free supernatant	4,000	20	80,000	18.02	1.11	1	100
- Heated supernatant	4,000	20	80,000	18.02	1.11	1	100
- Retaintate (Ultrafiltration 100 Kda.)	3,000	20	60,000	18.52	1.08	0.97	75
- Permeate (Ultrafiltration 100 Kda.)	1,000	0	0	17.52	0	0	0
- Crude from Ammonium sulfate precipitation (40%)	100	10	1,000	9.52	1.05	0.94	2.5
- Supernate from Ammonium sulfate precipitation (40%)	3,540	20	70,800	11.52	1.73	1.56	88.5
- Crude from Ammonium sulfate precipitation (80%)	160	80	12,800	19.02	4.21	3.79	4
- Supernatant from Ammonium sulfate precipitation (80%)	3,800	0	0	7.52	0	0	0
- Dialysis	160	80	80	17.52	4.57	4.12	4
- After concentrated by CMC	40	160	160	22.07	7.26	6.55	1

4.4.4 Cation-Exchange Chromatography

สารที่แยกได้จากข้อ 4.4.3 มาเติมลงในคอลัมน์ Hitrap CM FF ขนาด 1 X 5 มิลลิลิตร ที่ผ่านการปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์โดยสารละลาย 0.2 โมลาร์ อะซิเตดบัฟเฟอร์ พีเอช 3 หลังจากนั้นใช้บัฟเฟอร์ชนิดเดียวกันที่มีความเข้มข้นของ sodium chloride เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 0.05 โมลาร์ 0.1 โมลาร์ 0.15 โมลาร์ และ 0.2 โมลาร์ เก็บแต่ละส่วนที่แยกได้ส่วนละ 1 มิลลิลิตร ที่อัตราเร็ว 0.5 มิลลิลิตรต่อนาที ไดอะไลซิสแยกเกลือออกและนำแต่ละส่วนไปทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง พบว่า มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 400 AU/ml (ตารางที่ 4.4) และให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 100 เท่า

แต่ปริมาณผลิตผลที่ได้ลดลงเหลือเพียงร้อยละ 0.4 จากการทดลองของ Benoit et al. (1997) หลังจากการทำบริสุทธิ์ Brevicin 27 จากเชื้อ *Lactobacillus brevis* SB27 โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบแลกเปลี่ยนประจุ พบว่า ปริมาณผลิตผลลดลงเหลือเพียงร้อยละ 0.34 ทั้งนี้เนื่องมาจากการสูญเสียแบคทีริโอซินระหว่างขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากการดูดซับระหว่างสารที่ต้องการกับตัวเจล แต่ถึงอย่างไรก็ตามในขั้นตอนการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจะเก็บรวบรวมเฉพาะส่วนที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูง ทำให้บางส่วนที่มีกิจกรรมการยับยั้งเพียงเล็กน้อยสูญเสียไปเช่นกัน



ภาพที่ 4.1 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแต่ละส่วนที่แยกได้จากคอลัมน์

---- OD 280 nm. —— Diameter of clear zone

4.4.5 Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography (RP- HPLC)

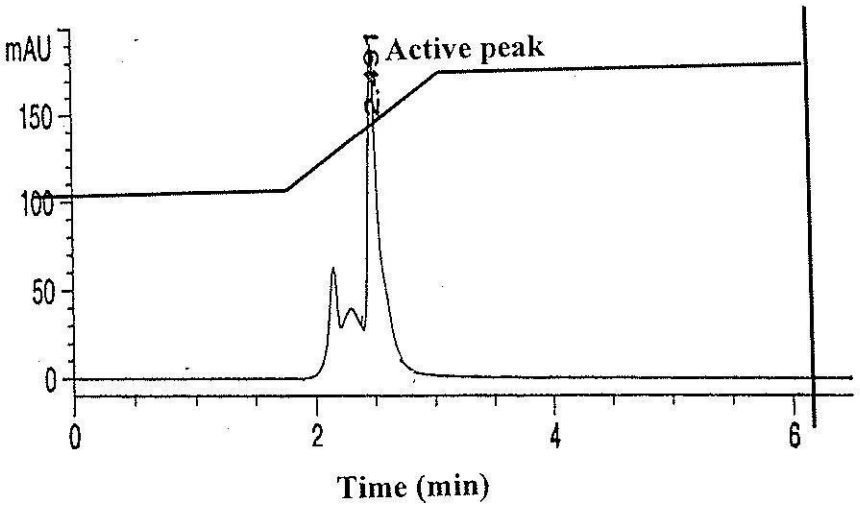
RP-HPLC เป็นขั้นตอนสุดท้ายในการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 จากการทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18) โดยมีบัฟเฟอร์ A (สารละลาย TFA ร้อยละ 0.1 ใน สารละลาย acetonitrile ร้อยละ 99.8) และบัฟเฟอร์ B (สารละลาย TFA ร้อยละ 0.1 ในน้ำกลั่น) เป็นตัวชะ โดยปรับให้มีอัตราการไหลเท่ากับ 0.9 มิลลิลิตรต่อนาที จากการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน พบว่าพีคที่ออกมาณ นาทีที่ 2.49 เป็นพีคของแบคเทอริโอซิน และสารแบคเทอริโอซินที่ต้องการ จะออกมาพร้อมกับสารละลาย acetonitrile ร้อยละ 70 (ภาพที่ 4.2)

ตารางที่ 4.4 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

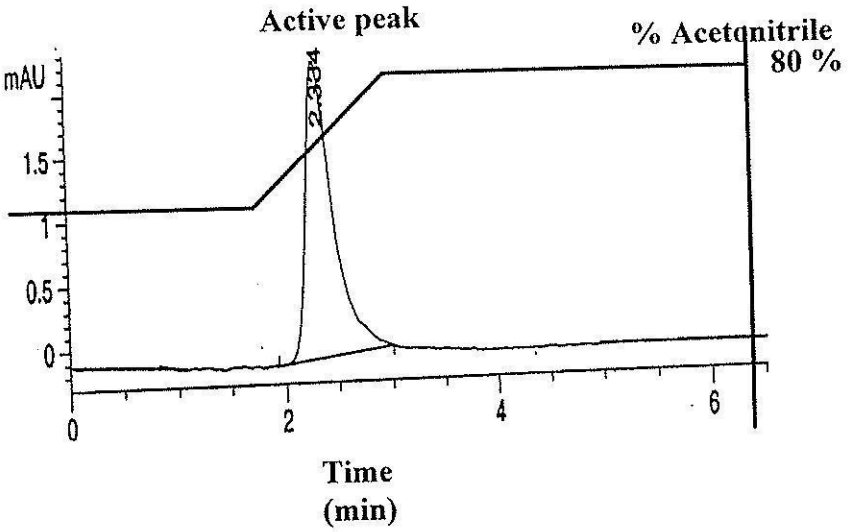
Purification steps	Volume (ml)	Bacterioc in activity (AU/ml)	Total activity (AU)	Protein (mg/ml)	Specific activity (AU/mg)	Increacing in specific activity	Yield (%)
- Cell-free	4,000	20	80,000	18.02	1.11	1	100
supernatant	3,000	20	60,000	18.52	1.08	0.97	75
- Ultrafiltration							
100 Kda.	160	80	12,800	19.02	4.21	3.79	4
- Crude from							
ammoniumsulfate							
precipitate 40-80%	160	80	12,800	17.52	4.57	4.12	4
- Dialysis	40	160	6,400	22.07	7.26	6.55	1
- After concentrated							
by CMC	35	800	28,000	18.77	42.62	38.39	0.87
- Gel-filtration							
Chromatography	16	400	6,400	3.42	116.96	105.36	0.4
- Cation-exchange							
Chromatography	2	100	200	0.27	370.37	333.67	0.05
- RP-HPLC							

จากลักษณะของพีคดังกล่าวทำให้เราทราบถึงคุณสมบัติการเป็น Hydrophobic ของสารซึ่งพบว่ามีแบคทีริโอซินหลายชนิดที่ผลิตจากแลกติกแอสิดแบคทีเรีย เช่น Lactocin S จากเชื้อ *Lb. sake* L45 (Mϕrtvedt et al.,1991) และ Bozacin 14 จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 (Ivanova et al., 2000) แสดงคุณสมบัติการเป็น Hydrophobic สูง

จากพีคของแบคเทอริโอซินที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18) พบว่าลักษณะของพีคที่ได้ยังไม่แยกออกจากกัน จึงทำการเก็บแยกแต่ละส่วนและนำไปผ่านคอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18) อีกครั้ง โดยใช้บัฟเฟอร์ A และ B ซึ่งมีปริมาตรของบัฟเฟอร์และอัตราการไหลของตัวชะเท่ากับการทดลองในครั้งแรก จากการทดลองพบว่าพีคที่ได้มีลักษณะเป็นพีคเดี่ยว (ภาพที่ 4.3) เมื่อเก็บส่วนที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนและทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นจากเดิมเป็น 300 เท่า (ตารางที่ 4.4)



ภาพที่ 4.2 โครมาโทแกรมที่ได้จากการทำบริสุทธิ์โดยใช้คอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18)



ภาพที่ 4.3 ลักษณะพีคที่ได้จากการทำรีโครมาโทกราฟีโดยใช้คอลัมน์ RP-18 (Lichrosorb RP18)

4.4.6 การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยใช้ Amberlite XAD-4 ร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟี

จากการศึกษาการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยวิธีการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในข้อที่ 1 พบว่าปริมาณผลิตผลที่ได้ส่วนใหญ่สูญเสียไปในช่วงของการตกตะกอน โดยพบว่าหลังจากผ่านขั้นตอนอัลตร้าฟิวเตชั่นขนาด 100 กิโลดาลตัน จะมีปริมาณผลิตผลร้อยละ 75 และเมื่อตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตที่ระดับเกลืออิ่มตัว ร้อยละ 40-80 พบว่า ปริมาณผลิตผลลดลงเหลือเพียงร้อยละ 4 และเมื่อสิ้นสุดขั้นตอน

การทำบริสุทธิ์โดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟี พบว่าแบคทีริโอซินที่ได้มีลักษณะความเป็น hydrophobicity สูง

การนำ Amberlite XAD-4 ซึ่งมีโครงสร้างเป็นอะโรมาติกโพลีเมอร์ ไม่ละลายน้ำ มีพื้นที่ในการดูดซับสูง และสามารถดูดซับพวก hydrophobic โมเลกุลจากสารละลายที่มีขั้ว มาใช้สำหรับดูดซับแบคทีริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะช่วยลดการสูญเสีย เพิ่มปริมาณผลิตผลและลดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ได้ การเติม Amberlite XAD-4 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อและกวนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °C แล้วกรองเอา Amberlite XAD-4 ที่ดูดซับโปรตีนมาบรรจุในคอลัมน์ ล้างด้วยน้ำกลั่นแล้วชะตัวสารละลายผสมระหว่าง methanol: น้ำกลั่น พบว่า การชะด้วยสารละลายผสมในอัตราส่วน 1:1 ไม่สามารถชะแบคเทอริโอซิน ออกมาจากตัวดูดซับได้ แต่หลังจากการชะด้วย methanol: 0.1 HCl ในอัตราส่วน 9:1 พบว่า สามารถชะเอาแบคเทอริโอซิน ออกมาจาก Amberlite ได้ดี โดยให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เป็น 80 AU/ml โดยมีกิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเป็น 3.35 และมีปริมาณผลิตผลเป็นร้อยละ 30 (ตารางที่ 4.5) จากการทดลองของ Tolonen et al. (2004) ในการทดสอบประสิทธิภาพการดูดซับไนซิน ของสารดูดซับหลายชนิด ได้แก่ Streamline DEAE, Streamline SP, Streamline phenyl, Amberlite XAD-4 และ Kieselguhr พบว่า ปริมาณไนซินที่เหลืออยู่ในบัฟเฟอร์ที่ใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับมีน้อยกว่า 100 IU/ml ในขณะที่สารดูดซับตัวอื่นๆ มีปริมาณไนซินเหลืออยู่สูงถึง 900-1,000 IU/ml (ปริมาณไนซินเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 IU/ml) จากการทดลองแสดงว่า Amberlite XAD-4 มีความสามารถในการดูดซับไนซินได้ดีกว่าสารดูดซับตัวอื่นๆ

แบคทีริโอซินที่ถูกชะออกจาก Amberlite XAD-4 แล้วจะถูกนำมาทำบริสุทธิ์ต่อโดยใช้เทคนิคโครมาโทกราฟีแบบผันกลับ หลังจากการปรับสภาพสมดุลของคอลัมน์ (Resource RPC) ด้วยสารละลาย acetonitrile ร้อยละ 50 พบว่าแบคทีริโอซินถูกชะออกมาพร้อมกับสารละลาย acetonitrile ร้อยละ 60 ในนาทีที่ 3.25 (ภาพที่ 4.4) และให้กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เป็น 320 AU/ml. โดยมีกิจกรรมการยับยั้งทั้งหมดเท่ากับ 1,600 AU และมีกิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นประมาณ 60 เท่า โดยมีปริมาณผลิตผลเท่ากับร้อยละ 0.5 ดังแสดงในตารางที่ 4.5

4.4.7 การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

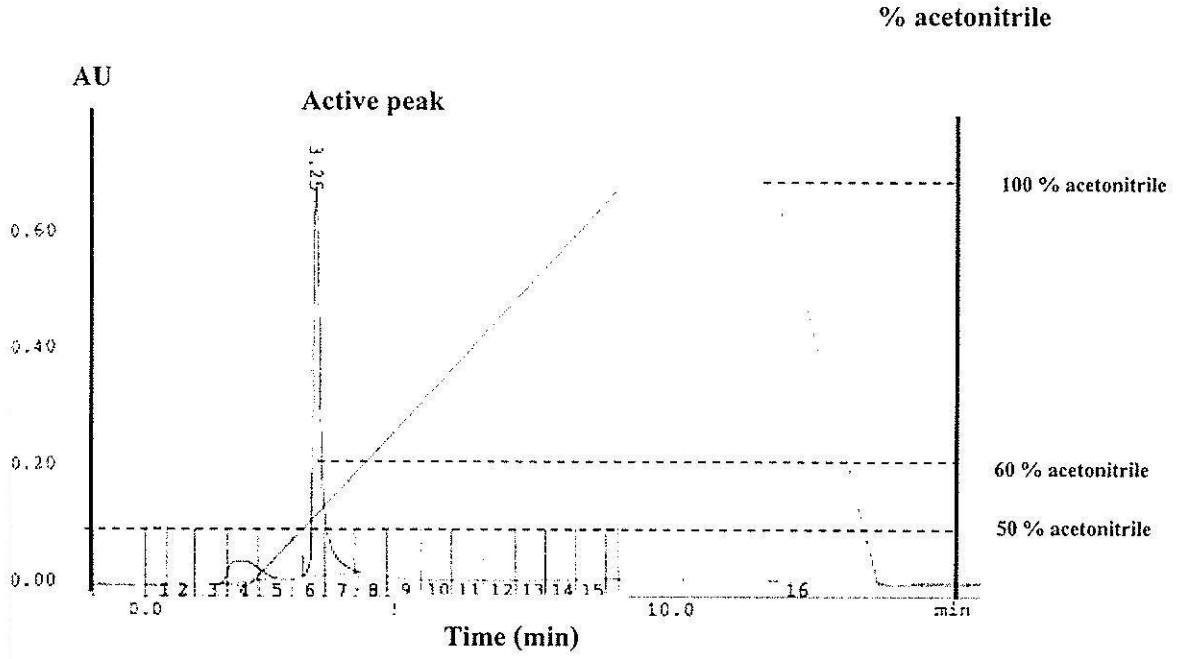
การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินโดยวิธี SDS-PAGE ซึ่งทำการเตรียมเจล 2 ชนิด คือ stacking gel ร้อยละ 4 และ separating gel ร้อยละ 17 โดยมีโปรตีนมาตรฐานขนาด 2.5-45 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนเปรียบเทียบน้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซิน ได้ผลดังภาพที่ 4.5

ตารางที่ 4.5 ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์โดยใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับ และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

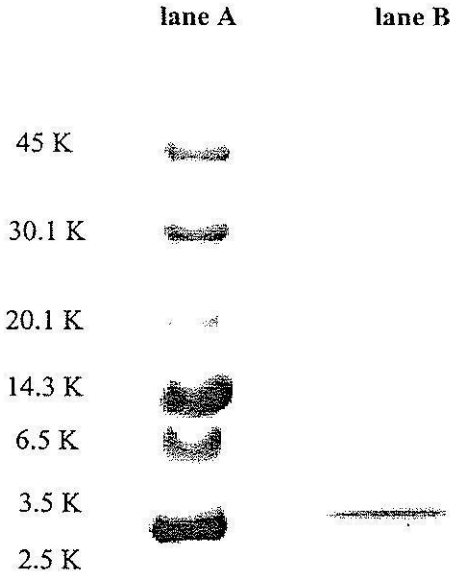
Purification steps	Volume (ml)	Activity (AU/ml)	Total activity (AU)	Protein (mg/ml)	Specific activity (AU/mg)	Increasing in specific activity	Yield (%)
- Cell-free	1,000	20	80,000	18.52	1.11	1	100
supernatant	3,000	0	0	3.77	0	0	0
- Washed amberlite							
with distill water	500	0	0	16.02	0	0	0
- Eluted amberlite							
with	300	80	24,000	21.52	3.72	3.35	30
methanol:water							
(1:1)	30	320	9,600	29.02	11.03	9.94	3
- Eluted amberlite	5	320	1,600	4.92	65.04	58.59	0.5
with							
methanol:0.1 HCl							
(9:1)							
- Evaporation							
- Reversed phase							
FPLC							
(Resource RPC)							

จากการทดลองเมื่อเปรียบเทียบแถบโปรตีนของแบคทีริโอซินที่ได้จากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 กับแถบน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน พบว่า แบคทีริโอซินที่ได้มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,975.71 ดาลตัน

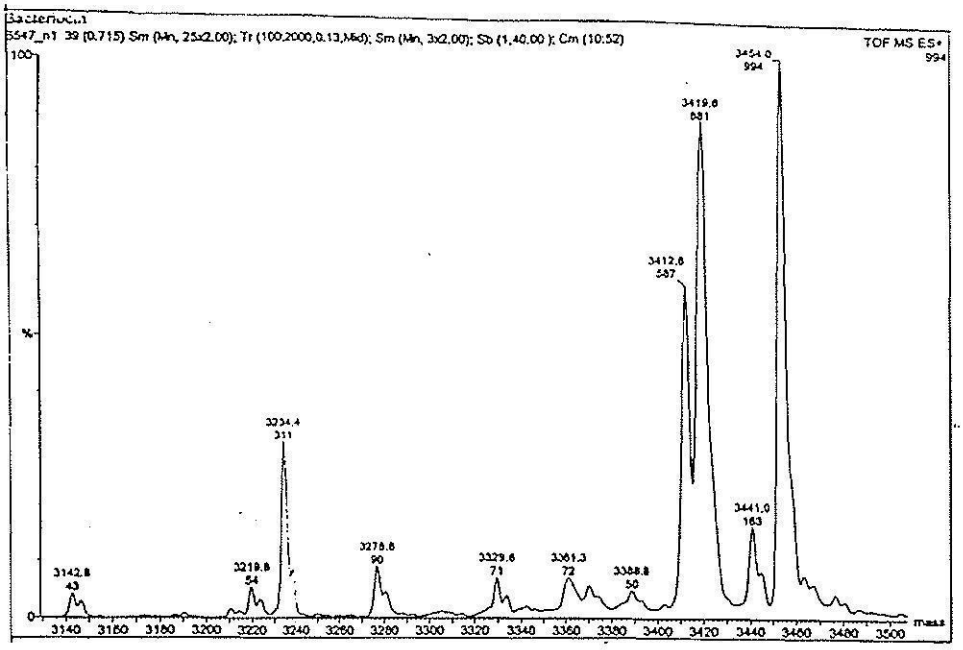
การวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคเทอริโอซินโดยวิธี electrospray positive ionization (ESI^+) โดยใช้เครื่อง LC- MS พบว่า แบคทีริโอซินมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,454 ดาลตัน ดังแสดงในภาพที่ 4.6



ภาพที่ 4.4 โครมาโทแกรมที่ได้จากการทำบริสุทธิ์แบคเทอริโอซินโดยใช้คอลัมน์ชนิด Resource RPC Reverse phases FPLC



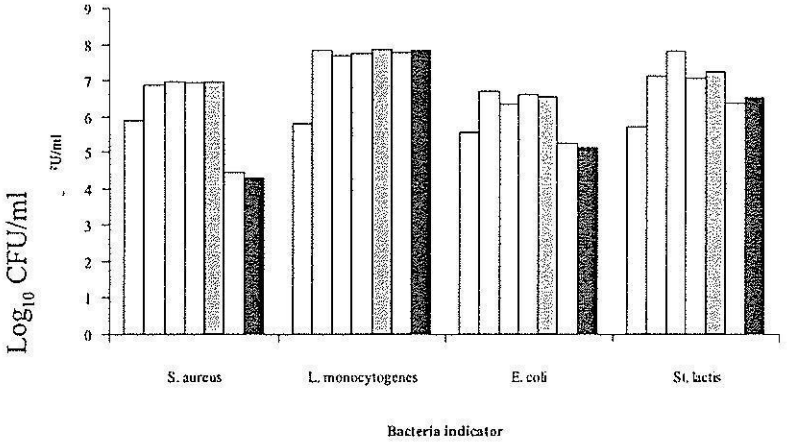
ภาพที่ 4.5 น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN11,
lane A = standard protein, lane B = bacteriocin sample



ภาพที่ 4.6 โครมาโทแกรมที่ได้จากการวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของแบคทีริโอซินโดยวิธี EMS

4.4.8 การศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

ประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วนำไป pour plate นับจำนวนโคโลนี พบว่าในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคทีริโอซินที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (256 AU/ml) และ 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (320 AU/ml) สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ 2 log cfu/ml ในขณะที่เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งกับเชื้อ *E. coli* และ *Strep. lactis* แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN11 สามารถลดปริมาณแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 2 ชนิดได้ 1 log CFU/ml และไม่พบการเปลี่ยนแปลงใดๆ กับการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งกับเชื้อ *L. monocytogenes* (ภาพที่ 4.7) จากการทดลองของ นิดิเนตร ขำทวี (2544) พบว่าแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ที่ผ่านการทำบริสุทธิ์บางส่วนสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่า *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีลักษณะคล้ายกับแบคทีริโอซินหลายชนิด เช่น แบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus acid*ophilus LF221 (Bogovic-Matijasic et al., 1998) แบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus damnosus* NCRB1832 (Green et al., 1997) และแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* KW30 (Kelly et al., 2000) เป็นต้น



ภาพที่ 4.7 ผลการทดสอบหาประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

Bacteria indicator (log CFU/ml)
Bacteria indicator after 12 hour
Bacteriocin conc. 0.2 mg/ml
Bacteriocin conc. 0.4 mg/ml
Bacteriocin conc. 0.6 mg/ml
Bacteriocin conc. 0.8 mg/ml
Bacteriocin conc. 1.0 mg/ml

ความคงตัวของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน อุณหภูมิ และพีเอช พบว่าแบคทีริโอซินจะสูญเสียกิจกรรมโดยเอนไซม์ trypsin, α-chrymotrypsin และ Proteinase K แต่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ catalase โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* เป็น 320 AU/ml, 20 AU/ml และ 80 AU/ml และไม่มีผลใดๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* (ตารางที่ 4.6)

ความคงตัวของแบคทีริโอซินต่ออุณหภูมิในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด โดยการนำแบคทีริโอซิน 1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (320 AU/ml) ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ดังนี้ คือที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 และ60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่า แบคทีริโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาที ได้โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* เป็น 320 AU/ml ในขณะที่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 100 และ 121 °C กิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินจะลดลงเป็น 160 AU/ml นอกจากนี้เมื่อนำแบคทีริโอซินไปทดสอบกับเชื้อ *E. coli* และ *Strep. lactis* พบว่าแบคทีริโอซินยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 20 AU/ml และ 160 AU/ml ตามลำดับ โดยแบคทีริโอซินไม่มีผลใด ๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes*

ตารางที่ 4.6 แสดงผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน อุณหภูมิ และพีเอช ต่อความคงตัวของแบคทีริโอซิน จากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

Charecterization	Residue activity (AU/ml)			
	S. aureus	*L. monocytogenes*	*E. coli*	*Strep. lactis*
Enzyme				
Control	0	0	0	0
Catalase	320	0	20	80
Trypsin	40	0	0	0
α-Chrymotrypsin	0	0	0	0
Proteinase K	0	0	0	0
Temperature				
Untreat	320	0	20	160
60 °C 30 min	320	0	20	160
100 °C 30 min	160	0	20	80
100 °C 60 min	160	0	0	80
121 °C 30 min	160	0	0	80
pH				
pH 1	0	0	0	0
pH 2-5	320	0	20	160
pH 6-8	40	0	20	40
pH 9-14	0	0	0	0

Control = Treated with individual enzyme.

ผลของพีเอชต่อความคงตัวของแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยการปรับสภาวะของแบคทีริโอซินให้มีพีเอชตั้งแต่ 1 ถึง 14 แล้วปรับพีเอชให้เป็นกลางก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่าแบคทีริโอซินยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* ได้หลังจากที่ถูกปรับสภาวะให้มีพีเอชตั้งแต่ 2 ถึง 8 แต่ความสามารถของแบคทีริโอซินจะสูญหายไปหลังจากที่ปรับพีเอชให้สูงขึ้นเป็น 9 ถึง 14

การที่แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 สามารถถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและสามารถทนต่อความร้อนได้ แสดงว่าแบคทีริโอซินดังกล่าวเป็นโปรตีนที่ทนความร้อน และมีความแข็งแรงของพันธะสูง ซึ่งขึ้นอยู่กับการยึดเกาะกันของโมเลกุลของกรดอะมิโนและปริมาณไกลซีนที่มีอยู่ในโมเลกุล (Lee et al., 1999) นอกจากนี้แบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ยังมีคุณสมบัติในการคงสภาพได้ดีในช่วงพีเอชที่ค่อนข้างกว้าง ซึ่งสอดคล้องกับแบคทีริโอซินที่ผลิตจากแลกติกแอสิดแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* 30 SC (Oh et al., 2000) และ Bozacin 14 จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 (Ivanova et al., 2000) จะคงตัวที่พีเอชตั้งแต่ 3 ถึง 10

ความคงตัวของแบคทีริโอซินต่อเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน อุณหภูมิ และพีเอช เป็นคุณสมบัติที่ดีของแบคทีริโอซิน เพราะสามารถนำไปใช้เป็นสารป้องกันการเสื่อมเสียในอุตสาหกรรมอาหารที่ใช้ความร้อนและสภาวะที่เป็นกรดต่ำในการแปรรูปได้

4.5 สรุปผลการทดลอง

การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 สามารถทำได้โดยใช้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ 4 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต gel-filtration chromatography, cation-exchange chromatography และ RP-HPLC โดยแบคทีริโอซินที่ได้มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 100 AU/ml และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 300 เท่า แต่ผลิตผลส่วนใหญ่จะสูญเสียไปในขั้นตอนของการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์มีปริมาณผลิตผลที่ได้เหลือเพียงร้อยละ 0.05

การใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถลดการสูญเสียและลดขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ได้ โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ ดูดซับด้วย Amberlite XAD-4 สกัดโดยใช้ methanol และแยกด้วย RP-FPLC จากการทดลองทำให้ได้แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 320 AU/ml มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 60 เท่า และมีปริมาณผลิตผลร้อยละ 0.5 เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ โดยมีปริมาตรแบคทีริโอซินเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร

แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,975.71 ดาลตัน จากการวิเคราะห์โดยใช้วิธี SDS-PAGE และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,454 ดาลต้น เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารโดยใช้เทคนิค EMS

การศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ พบว่าการเตรียมแบคทีริโอซินที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (256 AU/ml) และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (320 AU/ml) สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* ลงได้ 2 log CFU/ml และเมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งกับ

เชื้อ *E. coli* และ *Strep. lactis* พบว่า สามารถลดปริมาณเชื้อทั้งสองชนิดลงได้ 1 log CFU/ml และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ได้

การทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซิน (1.0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่ออุณหภูมิโดยใช้เชื้อ *S. aureus, E. coli, Strep. lactis* และ *L. monocytogenes* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง จากการทดลอง พบว่า แบคทีริโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาทีได้ โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* เท่ากับ 320 AU/ml, 20 AU/ml และ 160 AU/ml ตามลำดับ และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาทีได้ โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* ลดลงเป็น 160 AU/ml, 20 AU/ml และ 80 AU/ml ตามลำดับ โดยแบคทีริโอซินที่ทดสอบไม่มีผลใด ๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes*

การทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินต่อพีเอช โดยทำการปรับสภาวะให้มี พีเอชเป็น 1 ถึง 14 พบว่าแบคทีริโอซินสามารถทนพีเอชได้ในช่วงกว้าง โดยแบคทีริโอซินยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* ที่พีเอช 2 ถึง 8 และเมื่อทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่าแบคทีริโอซินถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน trypsin, α-chrymotrypsin และ Proteinase K แต่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ catalase

การศึกษาสมบัติบางประการของแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ ทำให้ทราบว่าแบคทีริโอซินที่ผลิตได้โดยเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 เป็นโปรตีนทนร้อนและทนพีเอชได้ในช่วงกว้าง แต่สามารถถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน จากความสามารถเหล่านี้ถือเป็นข้อดีของแบคทีริโอซิน เพราะสามารถนำแบคทีริโอซินที่ได้ไปใช้เป็นสารป้องกันการเสื่อมเสียในอุตสาหกรรมที่ใช้ความร้อนและใช้สภาวะที่เป็นกรดในการแปรรูปได้

เอกสารอ้างอิง

นิติเนตร ขำทวี. 2544. การทำลายแบคทีเรียโดยแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

น้อมจิต อ่อนแก้ว. 2544. ผลของแบคเทอริโอซินและระบบแลคโตเปอร์ออกซิเดสในการผลิตนมพาสเจอร์ไรส์. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Benoit, V., Lebrihi, A., Milliere, J.B. and Lefebvre, G. 1997. Purification and partial amino acid sequence of brevicin 27, a bacteriocin produced by *Lactobacillus brevis* SB 27. Curr. Microbiol. 34:173-179.

Blom, H., Katla, T., Nissen. H. and Holo, H. 2001. Characterization, production, and purification of carnocin H, a bacteriocin produced by *Carnobacterium* 377. Curr. Microbiol. 43:227-231.

Bogovic-Matijasic, B., Rogelj, I., Nes, F.I. and Holo, H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49: 606-612.

Dasechel, M.A. and Klaenhammer, T.R. 1989. Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Environ. Microbiol. 50:1538-1541.

Green, G., Dicks, L.M.T., Bruggeman, G., Vandamme, E.J. and Chikindas, M.L. 1997. Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. J. Appl. Microbiol. 83:127-132.

Ivanova, I., Kabadjova, P., Pantev, A., Danova, S. and Dousset, X. 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* B14 isolated from boza-bulgarian traditional cereal beverage, Biocatalysis. 41:47-53.

Kelly, A.N., Reuben, G.B., Rhoades, J. and Roller, S. 2000. Solvent extraction of bacteriocins from model solutions and fermentation broths. J. Chem. Technol. Biotechnol. 75:777-784.

Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, August. 227:680-685.

Larsen, N., Olsen, G.J.O., Maidak, B.L., McCaughey, M.J., Overbeek, R., Macke, T. J., Marsh, T.L. and Woese, C.R. 1993. The ribosomal database project. Nucl. Acids Res. 21:3021-302.

Lee, H.J., Joo, J.Y., Park, S.C. Kim, H.S., Hwang, K.I., Ahn, S.J. and Mheen, I.T. 1999. Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from kimchi. J. Biosci. Bioeng. 88:153-159.

Mathieu, M., Suwandhi, S., Rekhif, N., Milliere, J. B. and Lefebvre, G. 1993. Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* ssp. mesenteroid FR 52. J. Appl. Bacteriol. 74:372-379.

Muriana, F.J., Alvarez-Ossorio, M.C. and Relimpio, A.M. 1991. Purification and characterization of aspartate aminotransferase from halophile archaebacterium *Haloferax mediterranei*. Biochem. J. 278:149-154.

Muriana, P.M. and Klaenhammer, T.R. 1991. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lacrobucillus* spp. J. of Bacteriol. 173, 1779-1788.

Muriana, P.M. 1996. Bacteriocin for control of *Listeria* spp. in food. J. Food Prot. (Suppl.) 5:54-63.

Mϕrtvedt, C.I., Nissen-Meyer, J., Sletten, K. and Nes, I.F.1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol. 57:1829-1834.

Oh, S., Kim, H.S. and Worobo, W.R. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. J. Dairy Sci. 83:2747-2752.

Tolonen, M., Saris, P.E.J. and Siika-aho, M. 2004. Production of nisin with continuous adsorption to amberlite XAD-4 resin using *Lactococcus lactis* N8 and *L. lactis* LAC 48. Appl. Microbiol. Biotechnol. 63:659-665.

Verellen, T.L.J., Bruggemen, G., Van Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. and Vandamme, E.J. 1998. Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. J. Ferment. Bioeng. 86:174-179.

บทที่ 5

การคัดเลือกและการผลิตแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

5.1 คำนำ

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) มีความสามารถในการผลิตสาร Antimicrobial ได้หลายชนิด เช่น lactic acid, acetic acid, acetoin, diacetyl, hydrogen peroxide, reuterin และ bacteriocins ซึ่งสารเหล่านี้ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกันไป Hugas (1998) แบคทีริโอซินเป็นสารชีวิเคมีประเภทโปรตีน มีความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้หลายประเภท โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งรวมไปถึง *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* และ LAB ด้วย (Mataragas et al., 2003; Deegan et al., 2006) มีการศึกษาแบคทีริโอซินมาเป็นระยะเวลานานแล้ว โดยได้รับการรับรองให้ใช้ในอาหารได้อย่างปลอดภัย (GRAS status) อย่างไรก็ตามงานวิจัยเกี่ยวกับแบคทีริโอซินในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้นยังไม่แพร่หลายมากนัก ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะคัดเลือกสายพันธุ์ LAB ที่ผลิตแบคทีริโอซินได้ดีและมีประสิทธิภาพสูง ทั้งนี้เพื่อการประยุกต์ใช้สารแบคทีริโอซินที่ไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ซึ่งจะทำให้สามารถลดต้นทุนการใช้สารบริสุทธิ์ และให้ความสะดวกในการใช้ได้ระดับการผลิตขนาดเล็กจนถึงระดับปานกลาง ทั้งนี้ ได้รับ LAB จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังได้รับ LAB สายพันธุ์ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 จากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อใช้ในการคัดเลือกและศึกษาความสามารถในการผลิตแบคทีริโอซิน เพื่อทำการประยุกต์กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ประเภทผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นในลำดับต่อไป

มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการผลิตแบคทีริโอซิน ที่สำคัญได้แก่ อุณหภูมิ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และ pH ระหว่างการเจริญเติบโต มีรายงานว่า การควบคุม pH ระหว่างการเจริญให้คงที่สามารถทำให้ปริมาณของเซลล์และค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินได้ (Yang and Ray, 1994; Morgan et al., 1999; Morgan et al., 2001) โดยทั่วไปแล้วแบคทีริโอซินจะมีปริมาณสูงสุดเมื่อการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วง log phase และมักจะมีค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลงเล็กน้อยเมื่อเข้าสู่ช่วง stationary phase ทั้งนี้เป็นผลเนื่องมาจาก การจับรวมตัวของของโปรตีน, การยึดเกาะติดอยู่กับเซลล์เองและ protein degradation ดังนั้นการเก็บเกี่ยวแบคทีริโอซินมาใช้จึงทำ ณ เวลาที่การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ถึงจุดสูงสุด (Morgan et al., 1999; Onda et al,, 2003) สำหรับการเตรียมแบคทีริโอซินเพื่อใช้งานกับผลิตภัณฑ์อาหารนั้นสามารถทำได้หลายแบบ ตัวอย่างเช่น การทำแห้งด้วยการพ่นฟอย

(spray-dried) ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก รวดเร็ว แต่แบคทีริโอซินที่ได้จะมีความบริสุทธิ์ต่ำ (Morgan et al., 2001; Silva et al., 2002) เมื่อเปรียบเทียบกับการทำ partial purification ซึ่งจะได้แบคทีริโอซินที่มีความบริสุทธิ์สูงกว่า แต่มีค่าใช้จ่ายที่สูงกว่ามาก โดยเฉพาะหากต้องการนำไปใช้ผลิตภัณฑ์อาหาร

แนวทางการวิจัยสำหรับด้านอาหารนั้น มักจะมุ่งเน้นไปในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อโรคเป็นส่วนใหญ่ ในระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา แนวโน้มของผู้บริโภคที่มีความต้องการผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความสดใหม่และลดกระบวนการแปรรูปลงให้มากที่สุด มีการใช้สารเคมีปรุงแต่งให้น้อยที่สุด ดังนั้นแนวโน้มของเทคโนโลยีในการแปรรูปอาหารจึงมุ่งเน้นไปที่การใช้สารปรุงแต่งอื่น ๆ ที่มาจากธรรมชาติ และมีความปลอดภัยสูง สารแบคทีริโอซิน ผลิตได้จาก LAB ซึ่งได้รับการยืนยันและรับรองมาเป็นเวลานานแล้วว่ามีความปลอดภัยต่อการปริโภคสูงที่สุดชนิดหนึ่ง เนื่องจากมนุษย์มีการบริโภคผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของ LAB นานมาแล้ว ดังนั้นผลผลิตที่ได้จาก LAB ย่อมได้รับความเชื่อถืออย่างสูงในเรื่องของความปลอดภัย

สารแบคทีริโอซินเป็นเป็บไทด์ (peptide) ที่สังเคราะห์ออกมาจากส่วนของ ribosome ของแบคทีเรียหลายชนิดโดยเฉพาะอย่างยิ่ง LAB ในกรณีของ nisin ซึ่งเป็น สารแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก *Lc. lactis* ซึ่งไม่เพียงแต่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มที่ใกล้เคียงกันแล้ว ในบางกรณีอาจยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่มอื่น ๆได้ด้วย โดยเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร nisin มีความปลอดภัยในการนำมาใช้ในอาหารสูง (GRAS: Generally recognized as safe) โดย US FDA ด้วยเหตุผลนี้ สารแบคทีริโอซินจึงได้รับความสนใจในการใช้เป็นสารธรรมชาติที่สามารถป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารได้ในช่วงหลายปีที่ผ่านมา

เป้าหมายของการวิจัยส่วนนี้ คือเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของ LAB ที่มีความเหมาะสมและสามารถผลิตสารแบคทีริโอซินที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบ (indicator bacteria) และตรวจสอบคุณภาพของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้ในคุณลักษณะบางประการที่จำเป็นต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร รวมทั้งการหาสภาวะที่เหมาะสมที่จะใช้ในการผลิตสารแบคทีริโอซินด้วย

5.2 วัตถุประสงค์

1) เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมและใช้ในการผลิตแบคทีริโอซิน โดยคัดเลือกจากแบคทีเรียที่ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
2) เพื่อผลิตแบคทีริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งที่สูงเพียงพอ เพื่อการใช้กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ รวมทั้งศึกษาคุณลักษณะบางประการที่สำคัญของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

5.3 อุปกรณ์และวิธีการ

5.3.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาประกอบไปด้วยแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ต่าง ๆ ดังนี้ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Pd. acidilactici* TISTR 424, *Pd. acidilactici* TISTR 425, *Leuconostoc mesenteriodes* TISTR 053, *Lb .acidophilus* TISTR 450, *Lb. acidophilus* TISTR 1338, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911, *Lactococcus lactis* TISTR 1401, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Bacillus subtilis* TISTR 008, *B. cereus* TISTR 687, *Bacillus* sp. TISTR 908 และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Escherichia coli* TISTR 780 จุลินทรีย์ข้างต้นได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย นอกจากนี้ยังได้ใช้จุลินทรีย์ *Pseudomonas aerogenosa* และ *Enterococcus aerogenosa* ซึ่งได้รับจากศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี รวมทั้งยังได้รับจุลินทรีย์ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 จากคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จุลินทรีย์ทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาจะถูกเก็บรักษาใน 10% skim milk ที่อุณหภูมิ -40 °C และก่อนใช้จะทำการ re-activated ก่อน โดยการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิดก่อน เพื่อให้จุลินทรีย์มีความแข็งแรงสมบูรณ์ก่อนการใช้งานทุกครั้ง

5.3.2 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีริโอซิน

จุลินทรีย์ที่ใช้คัดเลือกจำนวน 9 สายพันธุ์ได้แก่ *Lb. plantarum* TISTR 050, *Pd. acidilactici* TISTR 051, *Leu. mesenteriodes* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911, *Lc. lactis* TISTR 1401 และ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 25 ml ในอุณหภูมิที่เหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ ในตู้บ่มอุณหภูมิ ทำการเขย่าตลอดระยะเวลาการเจริญที่ 100 rpm เป็นเวลา 12-16 ชั่วโมง เพื่อให้การเจริญเข้าสู่สภาวะ stationary phase (Schillinger and Lücke, 1989) เมื่อจุลินทรีย์เจริญตามเวลาที่กำหนดแล้วปั่นเหวี่ยงที่ 12,000 x g เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C (Sorvall® RC SC-plus centrifuge, Thermo Sciencetific, Waltham, USA) จากนั้นใช้ส่วนใส่ของแบคทีริโอซินที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ วิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ 4 ชนิดคือ *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. subtilis* TISTR 008, *B. cereus* TISTR 687

และ *S. aureus* TISTR 118 ด้วยวิธี agar well diffusion รายงานค่ากิจกรรมการยับยั้งที่วัดได้ในรูปแบบของความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของ clear zone

5.3.3 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตสารแบคทีริโอซิน

หลังจากได้จุลินทรีย์ที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงที่สุด เพื่อใช้ในการผลิตสารแบคทีริโอซินแล้ว ได้ศึกษาอุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมในการเจริญเพื่อให้ได้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงที่สุด โดยทำการเลี้ยงจุลินทรีย์ที่ได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 100 ml เขย่า 100 rpm ในอุณหภูมิต่าง ๆ กันคือ 30, 35, 37 และ 40 °C ทำการเก็บตัวอย่างทุกชั่วโมงใน 12 ชั่วโมงแรกของการเจริญ และเก็บที่ 14, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง เพื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-36 ชั่วโมง (Cai et al., 1997)

5.3.4 ผลของการควบคุม pH คงที่ต่อปริมาณสารแบคทีริโอซิน

ทำการศึกษาผลของการควบคุม pH ระหว่างการเจริญของแบคทีเรียที่มีสามารถผลิตสารแบคทีริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงที่สุด โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติม 2% (w/v) yeast extract (Hi-media, Mumbai, India), 0.2% (w/v) glucose (Ajax Finechem, Australia) and 0.2% (w/v) meat extract (Merck, Darmstadt, Germany) ที่อุณหภูมิ 37 °C, micro-aerobically ใน bio-reactor (100 rpm agitation) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กำหนดสภาวะการควบคุม pH ที่ระดับต่าง ๆ กัน คือ 6.0, 6.5 และ 7.0 การควบคุม pH ทำโดยการเติม 1 M NaOH อัตโนมัติด้วยเครื่อง Auto titration (718 STAT Titrino, Metrohm, Ireland) รวมทั้งศึกษาตัวอย่างที่ไม่มีการควบคุม pH ด้วย ทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 1 ชั่วโมงในเวลา 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นเก็บตัวอย่างที่ 14, 16, 20 และ 24 ชั่วโมง ทำการวิเคราะห์ตัวอย่างที่เก็บได้ เพื่อให้ทราบปริมาณของจุลินทรีย์ที่เจริญ การทดลองทั้งหมดดำเนินการ 2 ซ้ำ

5.3.5 การเตรียม Crude bacteriocin supernatant (CBS)

ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีริโอซินที่มีประสิทธิภาพยับยั้งดี และได้สภาวะการผลิตแบคทีริโอซินที่เหมาะสมแล้ว จึงใช้เชื้อนั้นเตรียมแบคทีริโอซินและวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินต่อแบคทีเรียทดสอบต่อไป โดยปั่นเหวี่ยงน้ำหมักที่ได้ที่ 12,000 x g เป็นเวลา 20 นาที ที่ 4 °C (Sorvall® RC SC-plus centrifuge, Thermo Sciencetific, Waltham, USA) ส่วนใสที่ได้ (supernatant) ปรับ pH ที่ 6.5 ด้วย 1 M NaOH เพื่อกำจัดการรบกวนจากค่าความเป็นกรดในตัวอย่าง จากนั้นกำจัดสิ่งรบกวนคือ hydrogen peroxide ที่อาจเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยการเติม catalase ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mg/ml บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

ส่วนใสที่ผ่านกระบวนการดังกล่าว กรองผ่าน 0.22-μm pore-size cellulose acetate syringe filter (PALL, New York, USA) และเก็บส่วนใสของแบคทีริโอซิน (CBS) ที่ 4 °C เพื่อรอการทำไปทดสอบต่อไป

5.3.6 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซิน

ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินด้วยวิธี agar well diffusion โดยดัดแปลงจาก Schillinger and Lücke (1989) ดังต่อไปนี้คือ เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus* sp. TISTR 908 ข้ามคืน ณ อุณหภูมิที่เหมาะสม ทำการย้ายเชื้อ 1% (v/v) ไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (0.75% TSB agar) ปริมาตร 15 ml เทบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar อย่างสม่ำเสมอ เมื่ออาหารด้านแข็งตัวดีแล้วจึงทำการเจาะเป็นหลุมขนาด 6 mm ให้เท่ากันด้วย cork borer เติมส่วนใสของแบคทีริโอซิน (CBS) ลงในหลุม 40 uL โดยทำการเจือจาง CBS ลงเป็น 2 เท่า (two-fold serial dilution) ตั้งแต่ 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 เท่า ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ปล่อยให้ CBS ซึมผ่านเข้าในเนื้อวุ้นจนสมบูรณ์ (pre-diffusion)โดยบ่มไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนทำการบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจหาหลุมที่เกิดวงใสรอบ ๆ หลุมที่เกิดจากการยับยั้งการเจริญของแบคทีริโอซิน ทำการคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml) ที่ได้จาก 1/ความเจือจาง x 25

5.3.7 Inhibitory spectrum ของสารแบคทีริโอซิน

ทำการศึกษา inhibitory spectrum ของการยับยั้ง สารแบคทีริโอซินที่ได้ ใช้สารแบคทีริโอซินที่ผลิตในสภาวะที่เหมาะสมทั้งที่ อุณหภูมิ สภาวะการควบคุม pH และระยะเวลาการเก็บตัวอย่างที่เหมาะสม โดยใช้แบคทีเรียประกอบด้วย LAB ที่ใช้ในการศึกษานี้ทั้งหมด รวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่ได้จากศูนย์จุลินทรีย์และจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นแบคทีเรียทดสอบสารแบคทีริโอซินที่ได้ เตรียมในรูป CBS ตามขั้นตอนที่ระบุไว้ข้างต้น วิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion

5.3.8 ผลของความร้อนต่อสารแบคทีริโอซิน

ทดสอบการทนความร้อนของ CBS ที่ผลิตได้ ใส สารละลาย CBS ปริมาณเท่า ๆ กันในหลอดทดลอง หลอดละ 5 ml ปิดฝาให้สนิท ให้ความร้อนในอ่างน้ำร้อน ที่อุณหภูมิ 70, 80, 90 และ 100 °C เวลา 10, 15 และ 20 นาที และให้ความร้อนที่ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที ตัวอย่างที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของสารละลาย CBS ด้วยแบคทีเรียทดสอบ *Bacillus* sp. TISTR 908

5.3.9 ผลของ pH และเอนไซม์ ต่อสารแบคทีริโอซิน

CBS ที่ได้จากการผลิต แบ่งเป็นปริมาณเท่า ๆ กัน ปริมาตร 50 ml ทำการปรับ pH ของแต่ละส่วนให้เป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 และ 12 โดยใช้ 0.1 M HCl หรือ 0.1 M NaOH บ่มแต่ละส่วนไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้รับการปรับ pH

สำหรับการศึกษาผลของเอนไซม์ต่อสารแบคทีริโอซินที่ได้ ทำการทดสอบกับเอนไซม์ 2 ชนิด คือ catalase (Sigma, St. Louis, USA) และ proteinase (Sigma, St. Louis, USA) โดยเติมเอนไซม์ลงในสารละลายสารแบคทีริโอซินที่ได้ทำการปรับ pH เท่ากับ 7.0 จนได้ระดับความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mg/ml จากนั้นบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง วิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบต่อไป

5.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

5.4.1 การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีริโอซิน

การเปรียบเทียบค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่ได้จากการผลิตของแบคทีเรียทั้ง 9 สายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบนั้น พบว่า สารแบคทีริโอซินที่ได้จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถแสดงผลการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 4 ชนิดคือ *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. subtilis* TISTR 008, *B. cereus* TISTR 687 and *S. aureus* TISTR 118 ได้สูงที่สุด โดยวัดค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้นได้เท่ากับ 22.0, 17.5, 16.4 และ 11.3 mm ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่น ๆ ที่ใช้ทดสอบด้วย พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่น ๆ ไม่สามารถให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งได้สูงเท่ากับสายพันธุ์ *Lc. lactis* TISTR 1401 ดังผลการวัดวงใสการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบในตารางที่ 5.1

จากตารางที่ 5.1 นอกเหนือจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* TISTR 1401 แล้ว จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้เช่นกัน ได้แก่ ส่วนใสปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) ที่ได้จากการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และสายพันธุ์ *Lb. acidophilus* TISTR 450 สามารถแสดงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้เช่นกัน แต่อย่างไรก็ตามจากการทดสอบดังกล่าวพบว่าสารแบคทีริโอซินที่ได้จาก *Lc. lactis* TISTR 1401 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดีที่สุดเมื่อเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่น ๆ โดยมีวงใสการยับยั้ง

กว้างมากที่สุด ระหว่าง 11-22 mm ขณะที่ cell-free supernatant ของเชื้อ *Lb. plantarum* TISTR 050 และ *Lb. acidophilus* TISTR 450 ให้วงใสประมาณ 7-9 mm เท่านั้น

ตารางที่ 5.1 ค่ากิจกรรมการยับยั้งของ cell-free supernatant ของสารแบคทีริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ

Strain of LAB	Strains	Inhibition zone (mm) of indicator bacteria			
		Bacillus sp. TISTR 908	*B. cereus* TISTR 687	*B. subtilis* TISTR 008	*S. aureus* TISTR 118
Lactobacillu plantarum	TISTR 050	7.1 (+)	6.9 (+)	6.6 (+)	-
Pediococcus acidilactici	TISTR 051	-	-	-	-
Leuconostoc mesenteriodes	TISTR 053	-	-	-	-
Lactobacillus acidophilus	TISTR 450	7.9 (+)	7.1 (+)	-	-
Lactobacillus brevis supsp.*brevis*	TISTR 860	-	-	-	-
Lactobacillus delbruckii subsp. *bulgaricus*	TISTR 892	-	-	-	-
Lactobacillus sake	TISTR 911	-	-	-	-
Lactobacillus casei spp. *rhamnosus*	SN 11	-	-	-	-
Lactococcus lactis	TISTR1401	22.0 (+++)	16.4 (++)	17.5 (++)	11.3 (++)

Symbol: -, No inhibition zone: +, small inhibition zone (<10 mm): ++, intermediate inhibition zone (11-20 mm): +++, large inhibition zone (>21 mm).

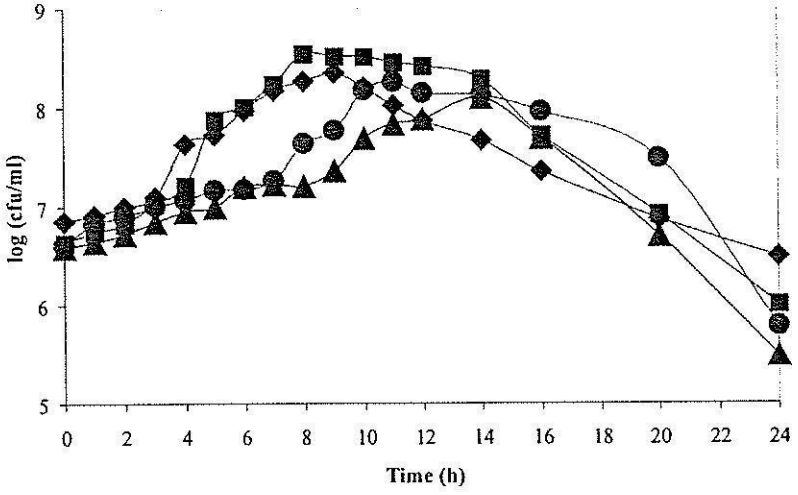
อย่างไรก็ตาม การตรวจวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินต่อแบคทีเรียทดสอบนั้น จำเป็นจะต้องเลือกใช้แบคทีเรียทดสอบให้เหมาะสม เพราะสารแบคทีริโอซินบางชนิดก็จะมีความจำเพาะเจาะจงต่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียทดสอบที่จะใช้ โดยทั่วไปแล้วการเลือกใช้แบคทีเรีย

ทดสอบอาจเลือกจากสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ถูกระบุไว้ว่าเป็นแบคทีเรียสำหรับใช้ในการทำ bioassay หรือเลือกใช้กลุ่มของแบคทีเรียที่ต้องการใช้แบคที่ริโอซินผลิตจากแต่ละเชื้อยับยั้งเป็นการเฉพาะเจาะจง ในการทดลองนี้เลือกใช้แบคทีเรียทดสอบเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีความเป็นไปได้สูงที่จะปนเปื้อนอยู่ในกระบวนการแปรรูปเนื้อสัตว์ และแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวก็ยังเป็นแบคทีเรียพื้นฐานที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินด้วย

โดยสรุปแล้วจากการทดลองนี้ สามารถเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lc. lactis* TISTR 1401 ใช้เป็นแบคทีเรียสำหรับผลิตสารแบคทีริโอซินต่อไปได้ และได้เลือกใช้แบคทีเรียทดสอบ *Bacillus* sp. TISTR 908 เป็นแบคทีเรียทดสอบหลักสำหรับการทดลองขั้นต่อ ๆ ไป

5.4.2 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตสารแบคทีริโอซิน

การศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ได้ผลดังภาพที่ 5.1 การศึกษาดังกล่าวทำการเปรียบเทียบที่ 4 ระดับอุณหภูมิคือ 30, 35, 37 และ 40 °C พบว่าปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย *Lc. lactis* TISTR 1401 มีปริมาณสูงสุด 8.54 log cfu/ml ที่ 37 °C เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับปริมาณของจุลินทรีย์ที่เจริญ 30 °C 11 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อ 8.26 log cfu/ml ที่ 35 °C 9 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อ8.35 log cfu/ml และ ที่ 40 °C 14 ชั่วโมง มีจำนวนเชื้อ 8.10 log cfu/ml จึงสรุปได้ว่า ที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะต่อการผลิตสารแบคทีริโอซินของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ เพราะใช้เวลาการผลิตเซลล์น้อยที่สุดคือ 8 ชั่วโมงเท่านั้น และเป็นการสนับสนุนแนวคิดที่ว่าสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีริโอซินด้วย

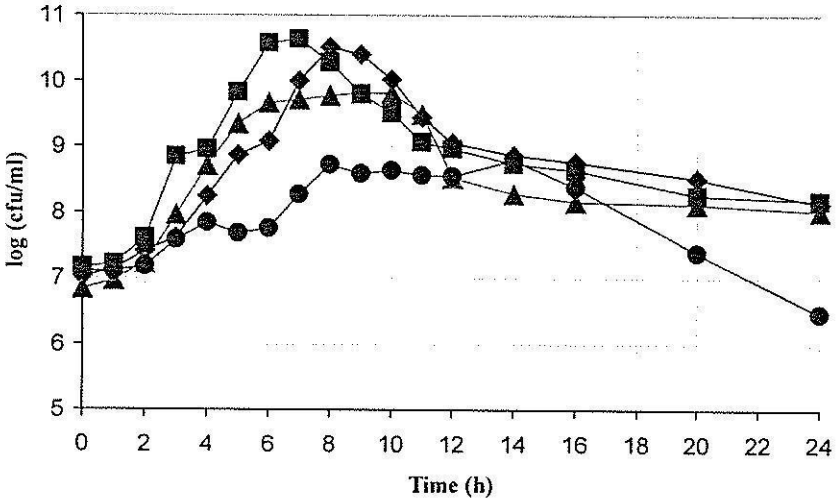


ภาพที่ 5.1 Growth of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 in MRS broth at 30, 35, 37 and 40 °C. ●, at 30°C; ◆, at 35°C; ■, at 37°C ; ▲, 40°C.

5.4.3 ผลของการควบคุม pH คงที่ต่อปริมาณแบคทีริโอซิน

การศึกษาผลของการควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ตลอดระยะเวลาการเจริญของแบคทีเรียต่อการผลิตและประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินที่ได้ โดยทำการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เพียงอุณหภูมิเดียว (ภาพที่ 5.2) พบว่า เมื่อควบคุม pH คงที่ที่ระดับ 6.0 และ 7.0 ได้ปริมาณจุลินทรีย์สูงสุดที่ 9.08 log cfu/ml และ 9.66 log cfu/ml ตามลำดับ ในเวลา 8-10 ชั่วโมง ในขณะที่เมื่อควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ที่ 6.5 ได้ปริมาณแบคทีเรียสูงสุดที่ 10.58 log cfu/ml ในเวลา 6-7 ชั่วโมง ซึ่งเป็น pH คงที่ที่สามารถทำให้ปริมาณแบคทีเรียที่เจริญมีสูงขึ้นอย่างชัดเจนและใช้เวลาในการเจริญที่น้อยกว่าอีกด้วย และเมื่อไม่มีการควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเลย ได้ปริมาณแบคทีเรียสูงสุดที่เพียง 7.75 log cfu/ml เท่านั้น และยังต้องใช้เวลาในการเจริญถึง 14 ชั่วโมง ดังแสดงในภาพ 5.2

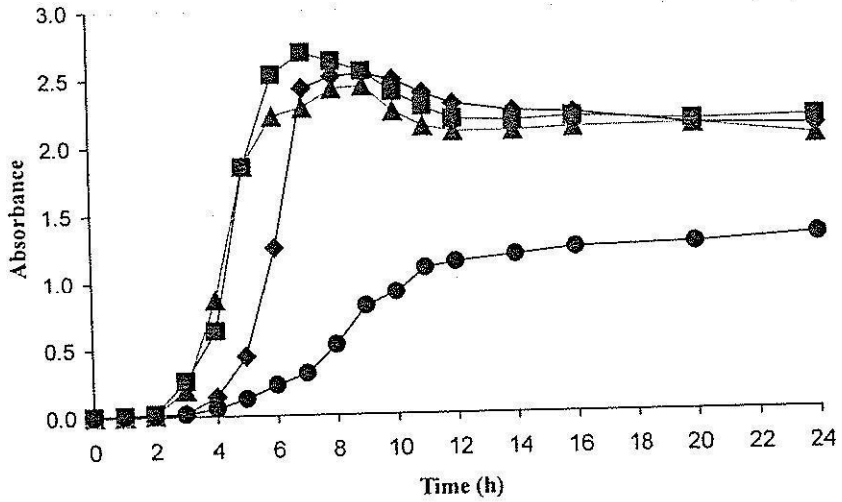
นอกจากความแตกต่างทางด้านปริมาณของแบคทีเรียแล้ว ค่าความดูดกลืนแสง (absorbance ที่ 600 nm) เป็นอีกข้อมูลหนึ่งที่สามารถบ่งชี้ถึงปริมาณแบคทีเรียที่มีอยู่ได้ จากการทดลองพบว่า การควบคุม pH คงที่ที่ 6.0, 6.5, 7.0 และ ไม่ควบคุม pH จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 600 nm เท่ากับ 2.526, 2.684, 2.434 และ 1.297 ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 5.3



ภาพที่ 5.2 Growth of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 (log cfu/ml) in MRS broth at 37°C, pH controlled and uncontrolled condition. ●, with no pH control imposed; ◆, constant pH of 6.0; ■, constant pH of 6.5; ▲, constant pH of 7.0.

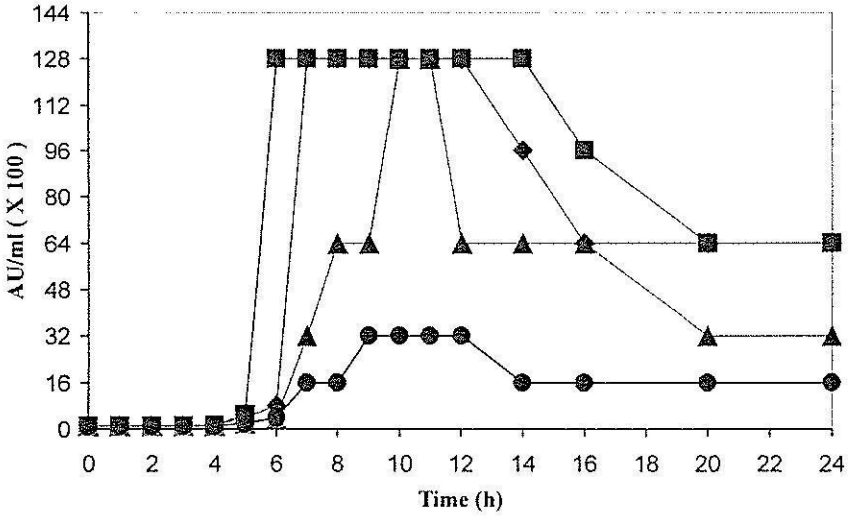
จากผลการทดลองจะเห็นว่าการควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่างการเจริญให้คงที่ที่ 6.5 สามารถทำให้ปริมาณของแบคทีเรียและค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินสูงขึ้นอย่างชัดเจน ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินที่ได้จาก *Lc. lactis* TISTR 1401 สูงถึง 12,800 AU/ml เมื่อ

ควบคุม pH ให้คงที่ที่ 6.5 และระยะเวลาเวลาในการเจริญเท่ากับ 6 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตแบคทีริโอซินโดยไม่มีการควบคุม pH จะได้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 3,200 AU/ml เท่านั้น (ภาพที่ 5.4) อย่างไรก็ดีการควบคุม pH ให้คงที่ที่ 6.0 และ 7.0 ก็สามารถทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินที่ได้สูงมากขึ้นเช่นกัน โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 12,800 AU/ml ได้เช่นกัน แต่ต้องใช้ระยะเวลาในการเจริญของเชื้อเท่ากับ 10 และ 7 ชั่วโมง ตามลำดับ เห็นได้ว่าการควบคุม pH ที่ 6.5 เป็นสภาวะที่ทำให้แบคทีเรีย *Lc. lactis* TISTR 1401 เจริญได้เป็นอย่างดีและผลิตแบคทีริโอซินที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุดด้วยเช่นกัน จึงได้ใช้สภาวะการเจริญของ *Lc. lactis* TISTR 1401 ผลิตแบคทีริโอซินเพื่อไปใช้งานวิจัยต่อไป

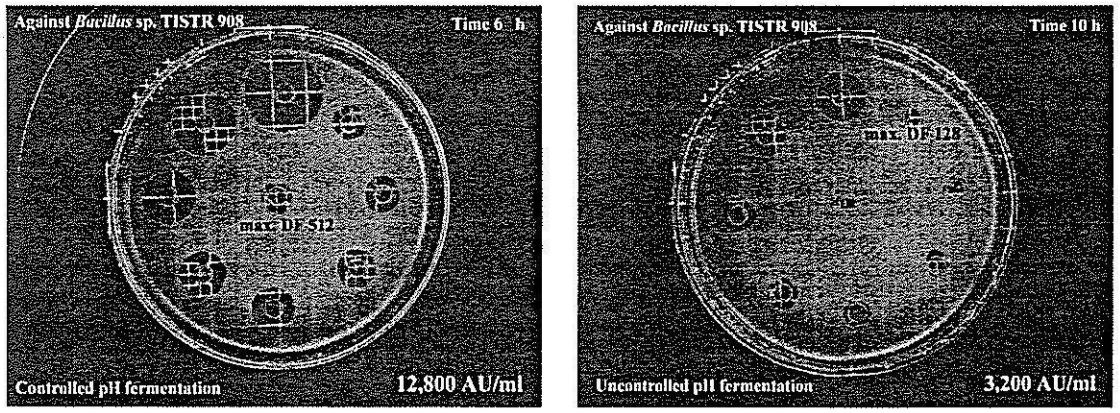


ภาพที่ 5.3 Growth of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 (absorbance) in MRS broth at 37 °C, pH controlled and uncontrolled condition. ●, no pH control imposed; ◆, constant pH of 6.0; ■, constant pH of 6.5; ▲, constant pH of 7.0: Absorbance measured at 600 nm.

ผลการควบคุม pH ต่อการผลิตแบคทีริโอซินของเชื้อแบคทีเรีย ได้มีการรายงานมาแล้วจากงานวิจัยหลายชิ้น เช่น Morgan (1999) ได้ทำการผลิตแบคทีริโอซิน ชื่อ Lacticin 3147 จากแบคทีเรีย *Lc. lactis* 3147 โดยควบคุม pH ระหว่างการเจริญไว้ที่ระดับต่างๆกันตั้งแต่ 5.5 ถึง 7.0 พบว่า การควบคุม pH ที่ 6.5 สามารถได้แบคทีริโอซินที่มีปริมาณสูงที่สุด ซึ่งการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลที่ได้จากงานวิจัยนี้ด้วยเช่นกัน ดังภาพที่ 5.5 แสดงค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินบน agar well diffusion



ภาพที่ 5.4 Bacteriocin activity from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 at 37 °C, pH controlled and uncontrolled condition. ●, AU/ml with no pH control imposed; ◆, constant pH of 6.0; ■, constant pH of 6.5; ▲, constant pH of 7.0.



(A) (B)

ภาพที่ 5.5 The inhibition activity of *Lactococcus lactis* TISTR 1401 in MRS broth determined by agar well diffusion assay: (A), inhibition activity at 6 h, controlled pH at 6.5; (B), inhibition activity at 10 h, uncontrolled pH.

จากข้อมูลข้างต้น การผลิตแบคทีริโอซินเพื่อการใช้งานในกิจกรรมต่อไปในงานวิจัยนี้ จึงทำการผลิตที่สภาวะการควบคุม pH ให้คงที่ที่ 6.5 อุณหภูมิ 37 °C ใช้ผลิตเวลา 6-8 ชั่วโมง โดยหยุดกระบวนการผลิตเมื่อปริมาณของเชื้อแบคทีเรียเพิ่มจำนวนจนถึงจุดสูงสุด อย่างไรก็ ตามปริมาณของแบคทีริโอซินและค่ากิจกรรมการยับยั้งอาจลดลงบ้างเล็กน้อยหลังจากการเก็บตัวอย่างไว้ระยะเวลาหนึ่ง ซึ่งอาจเป็นผลจากการตกตะกอนของโปรตีน รวมทั้งการเข้ายึดเกาะเข้ากับเซลล์ของแบคทีเรีย

ดังนั้นหลังจากทำการเก็บตัวอย่างแบคทีริโอซินที่ต้องการแล้ว ควรทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกจากน้ำหมักทันที และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C หรือในกรณีต้องการเก็บเป็นระยะเวลานานๆ ควรทำการเก็บโดยการแช่แข็ง

5.4.4 Inhibitory spectrum ของสารแบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซินที่ผลิตได้จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้หลายชนิด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ 8 จาก 13 สายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีริโอซินที่ได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 3 สายพันธุ์ที่เป็นแกรมลบได้ ซึ่งลักษณะดังกล่าวก็สอดคล้องกับลักษณะของแบคทีริโอซินโดยทั่วไปความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 16 สายพันธุ์ ของ CBS ที่ผลิตได้จาก *Lc. lactis* TISTR 1401 แสดงอยู่ในตารางที่ 5.2

แบคทีเรียทดสอบที่ถูกยับยั้งโดยแบคทีริโอซินได้มากที่สุดคือ *Bacillus* sp. TISTR 908 โดยจากการทดสอบบน agar well diffusion พบว่าสามารถทำให้เกิด clear zone ขนาด 23.6 mm ทั้งนี้แบคทีริโอซินที่ผลิตได้ในการวิจัยนี้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียต่าง ๆ สอดคล้องกับผลที่เคยมีการรายงานการผลิจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lc. lactis* JCM 7638 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus lactis* และ *Clostridium* spp. อย่างไรก็ตามบางรายงานที่กล่าวว่า สารแบคทีริโอซินจาก *Lc. lactis* JCM 7638 สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ แต่ปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเป็นเรื่องของสภาพของผนังเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ อาจไม่แข็งแรงนัก (weak cell) ซึ่งอาจทำให้การจับยึดของแบคทีริโอซินบนผนังเซลล์และให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปจากปกติ สำหรับการทดลองนี้ พบว่า แบคทีริโอซินที่ได้ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบสายพันธุ์ *E. coli*, *Pseudomonas aerogenosa* และ *Enterococcus aerogenosa* ได้ (Matsusaki et al., 2003; Moreno et al., 2000; O'ullivan et al., 2002; Rossland et al., 2005; Tarelli et al., 1994; Zendo et al., 2006)

การคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ของแบคทีเรียทดสอบเพื่อตรวจวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน ขึ้นอยู่กับลักษณะและความต้องการใช้แบคทีริโอซิน ในกิจกรรมใด และจุลินทรีย์ที่ต้องการใช้แบคทีริโอซินไปยับยั้ง นับว่าเป็นปัจจัยใช้เป็นตัวเลือกที่ดีในการเลือกใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ ดังนั้นงานวิจัยต่าง ๆ ย่อมเลือกใช้แบคทีเรียทดสอบแตกต่างกันออกไป แต่อย่างไรแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวก เช่น *Bacillus* sp. และ *Staphylococcus aureus* มักจะถูกใช้เป็นหลักเสมอ สำหรับในการศึกษานี้ แบคทีริโอซินที่ได้จะถูกประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูหรือลูกชิ้นไก่ ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการใช้แป้งมันสำปะหลังหรือแป้งโมดิฟายด์เป็นส่วนผสมค่อนข้างมาก ซึ่งในแป้งมักมี

สปอร์ของ *Bacillus* sp. อยู่ในปริมาณที่สูงมาก ดังนั้น จึงจำเป็นต้องใช้ แบคทีเรียกลุ่ม *Bacillus* sp เพื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินเป็นหลักด้วย

ตารางที่ 5.2 Inhibitory spectrum of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* TISTR 1401

Indicator bacteria	Strain	Origin	Average zone (mm)	Inhibition activity
Gram-positive bacteria				
Lactobacillus plantarum	050	TISTR	12.3	++
Pediococcus acidilactici	051	TISTR	8.3	+
Leuconostoc mesenteriodes	053	TISTR	19.9	++
Lactobacillus acidophilus	450	TISTR	-	-
Lactobacillus brevis supsp. *brevis*	860	TISTR	-	-
Lactobacillus delbruckii subsp. *bulgaricus*	892	TISTR	-	-
Lactobacillus sake	911	TISTR	13.4	++
Lactobacillus casei spp. *rhamnosus*	SN11	PSU	-	-
Lactococcus lactis	1401	TISTR	-	-
Staphylococcus aureus	118	TISTR	10.0	+
Bacillus subtilis	008	TISTR	10.5	++
Bacillus cereus	687	TISTR	16.0	++
Bacillus sp.	908	TISTR	23.6	+++
Gram-negative bacteria				
Escherichia coli	780	TISTR	-	-
Pseudomonas aerogenosa	-	SUT	-	-
Enterococcus aerogenosa	-	SUT	-	-

Symbol: -, No inhibition zone: +, small inhibition zone (7-10 mm): ++, intermediate inhibition zone (10-20 mm): +++, large inhibition zone (20-30 mm).

5.4.5 ผลของความร้อนต่อแบคทีริโอซิน

การให้ความร้อนแก่ CBS ที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 70, 80, 90, 100 และ 121 °C ณ เวลาต่าง ๆ กัน พบว่า สารแบคทีริโอซินที่ผลิตได้มีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูง โดยที่ CBS ควบคุม (ไม่

มีการให้ความร้อนใด ๆ) มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 3,200 AU/ml โดยที่การให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 70-80 °C เป็นเวลา 20 นาที ค่าประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีริโอซินไม่แตกต่างกันคือมีค่า 3,200 AU/ml การให้ความร้อนที่ 90 °C จะทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง 50% และสำหรับการให้ความร้อนในระดับ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที นั้น ทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินลดลงอย่างมาก เหลือเพียง 100 AU/ml เท่านั้น แต่อย่างไรก็ดี CBS ที่ผ่านความร้อนสูงถึง 121 °C ยังคงมีค่ากิจกรรมการยับยั้งได้อยู่บ้าง ดังข้อมูลแสดงในตารางที่ 5.3

จะเห็นได้ว่าแบคทีริโอซินจาก *Lactococcus lactic* TISTR 1401 มีความสามารถทนความร้อนในระดับสูงเป็นที่น่าพอใจ ทำให้มีความเป็นไปได้ที่สามารถใช้แบคทีริโอซินที่ไม่ต้องผ่านการทำบริสุทธิ์ได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่จำเป็นต้องใช้ความร้อนสูงที่ไม่มากกว่า 80 °C ในกระบวนการผลิต ทั้งนี้เนื่องจากโดยทั่วไปแล้วกระบวนการแปรรูปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นมีการใช้ความร้อนในระดับที่ไม่สูงมากนัก โดยทั่วไปจะใช้ความร้อนในการขึ้นรูปลูกชิ้นต่ำกว่า 90 °C ซึ่งทำให้ความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้มีมากขึ้น

ตารางที่ 5.3 Effect of heat treatment on bacteriocin activity of CBS produced by *Lactococcus lactis* TISTR

Temperature (°C)	Time (min)	Inhibition activity (AU/ml)
70	10	3,200
	15	3,200
	20	3,200
80	10	3,200
	15	3,200
	20	3,200
90	10	1,600
	15	1,600
	20	1,600
100	10	1,200
	15	1,200
	20	800
121	20	100
Control	-	3,200

5.4.6 ผลของ pH และเอนไซม์ ต่อแบคทีริโอซิน

เนื่องจากแบคทีริโอซินเป็นสายของเป็บไทด์เรียงต่อกัน จึงมีคุณลักษณะที่ตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH และเอนไซม์ แบคทีริโอซินส่วนมากมีความคงตัวที่สภาวะที่เป็นกรดจนถึงสภาวะที่เป็นกลาง ตัวอย่างเช่น nisin และมักสูญเสียสภาพในสภาวะที่เป็นด่าง ความสามารถในการละลายของ nisin จะสูงขึ้นในสภาวะที่เป็นกรด ซึ่งสภาวะดังกล่าวจะเป็นสภาวะที่ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินสูงสุด มีแบคทีริโอซินที่ได้รับการพัฒนาออกสู่ท้องตลาด เช่น nisaplin ซึ่งผลิตจาก nisin 2.5 % (Delves-Broughton et al., 1996) มีความสามารถในการทนความร้อนสูง 121°C นาน 15 นาที ที่ pH 3.0-3.5 โดยสูญเสียประสิทธิภาพน้อยกว่า 10% จากผลการทดลองในตารางที่ 5.3 แสดงให้เห็นว่า แบคทีริโอซินที่ผลิตได้จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 มีความคงตัวในสภาวะตั้งแต่ pH 2-8 โดยที่ตัวอย่างควบคุมมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 6,400 AU/ml เมื่อทำการปรับ pH ของตัวอย่างในระดับต่าง ๆ กัน พบว่า ไม่มีการลดลงของค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ pH ระหว่าง 2-7 และเมื่อ pH เท่ากับ 8 พบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งลดลง 50% และเมื่อค่า pH เพิ่มขึ้นตั้งแต่ 9 ขึ้นไป พบว่าแบคทีริโอซินสูญเสียประสิทธิภาพทั้งหมด

โดยทั่วไปความสามารถยับยั้งของแบคทีริโอซิน จะสูญเสียทั้งหมดโดยเอนไซม์ proteinase ด้วยหลักการนี้สามารถใช้ในการแยกแบคทีริโอซินออกจากสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ สำหรับกรณีของ catalase นั้นจะไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน จากการทดลองที่แสดงในตารางที่ 5.4 พบว่าแบคทีริโอซินที่ได้จาก *Lc. lactis* TISTR 1401 สูญเสียสภาพทั้งหมดโดย proteinase และสำหรับ catalase ไม่มีผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้ง ซึ่งสอดคล้องกับคุณลักษณะของแบคทีริโอซินทั่วไป

5.5 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษา พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ที่ใช้ทดสอบมีความสามารถผลิตแบคทีริโอซินได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีริโอซินที่มีประสิทธิ์ภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบสายพันธุ์ต่าง ๆ ได้ประกอบด้วย *Lb. plantarum* TISTR 050, *Pd. acidilactici* TISTR 051, *Leu. mesenteriodes* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911, *Lc. lactis* TISTR 1401 และ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 พบว่าแบคที่เรียสายพันธุ์ที่ให้แบคทีริโอซินที่มีความสามารถยับยั้งสูงสุด และเหมาะสมสำหรับการผลิตแบคทีริโอซินเพื่อใช้ทดลองยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เนื้สัตว์โดยเฉพาะลูกชิ้นในการทดลองส่วนต่อไปคือสายพันธุ์ *Lc. lactis* TISTR 1401 ทั้งนี้แบคทีริโอซินที่ผลิตได้จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถ

ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้หลายชนิด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ 8 จาก 13 สายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามแบคทีริโอซินที่ได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 3 สายพันธุ์ที่เป็นแกรมลบได้

ตารางที่ 5.4 Effect of pH and enzyme treatment to bacteriocin activity of CBS produced by *Lactococcus lactis* TISTR 1401

pH / Enzyme Treatment	Inhibition activity (AU/ml)
Control	6,400
2	6,400
3	6,400
4	6,400
5	6,400
6	6,400
7	6,400
8	3,200
9	0
10	0
11	0
12	0
Catalase	6,400
Proteinase	0

สำหรับสภาวะในการผลิตแบคทีริโอซินที่เหมาะสมของ *Lc. lactis* TISTR 1401 คือ การควบคุมระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ที่ 6.5 ณ อุณหภูมิ 37 °C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (เติม 2% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) glucose และ 2% (w/v) meat extract) ซึ่งสภาวะดังกล่าวทำให้ได้แบคทีริโอซินมีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบการผลิตแบคทีริโอซินโดยไม่มีการควบคุม pH อย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้แบคทีริโอซินที่ได้ยังมีความสามารถในการทดความร้อนได้สูง และคงตัวที่ pH ต่ำจนถึงระดับ pH ที่เป็นกลาง (pH 2-7)

เอกสารอ้างอิง

Cai, Y., Ng, L.K. and Farber, J.M. 1997. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. J. Appl. Microbiol. 83:499-507.

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

Deegan, L.H., Cotter. P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocin: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16:1058-1071.

Hugas, M. 1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Sci. 49:S139-S150.

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. and Drosinos, E.H. 2003. Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. Meat Sci. 64:265-271.

Matsusaki H., Chinachoti, N., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1998. Purification, identification, and effective production of a peptide antibiotic produced by *Lactococcus lactic* OI-1 (JCM 7638). Annals of the New York Academy of Sciences. 864:422–427.

Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P. and Hill, C. 1999. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. J. Food Prot. 62:1011-1016.

Morgan, S.M., Galvin, M., Ross, R.P. and Hill, C. 2001. Evaluation of a spray-dried Lacticin 3147 powder for the control of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in a range of food systems. Lett. Appl. Microbiol. 33:387-391.

Moreno, I., Lerayer, A.L.S., Baldini, V.L.S. and Leitão, M.F. de F. 2000. Characterization of bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* strains. Brazilian J. Microbiol. 31:182-192.

Onda, T., Yanagisa, F., Tsuji, M., Shinohara, T. and Yokotsuka, K. 2003. Production and purification of a bacteriocin peptide produced by *Lactococcus* sp. Strain GM005, isolated from Miso-paste. Int. J. Food. Microbiol. 87:153-159.

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

Rossland, E., Langsrud, T., Granum, P.E. and Sorhaug, T. 2005. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. Int. J. Food Microbiol. 98:193-200.

Schillinger, U. and Lücke F. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Envi. Microbiol. 55: 1901-1906.

Silva, J., Carvalho, A.S., Teixeira, P. and Gibbs, P.A. 2002. Bacteriocin production by spray-dried lactic acid bacteria. Lett. Appl. Microbiol. 34:77-81.

Tarelli, G.T., Carminati, D. and Giraffa, G. 1994. Production of bacteriocins active against *Listeria monocytogenes* and *Listeria* innocua from dairy *enterococci*. Food Microbiol. 11: 243-252.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 11:281-291.

Zendo, T., Koga, S., Shigeri, Y., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. Appl. Environ. Microbiol. 72:3383-3389.

บทที่ 6

การใช้แบคทีริโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นหมู

6.1 คำนำ

แบคทีริโอซิทางการค้าที่ได้รับการรับรองให้ใช้ได้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่สำคัญคือ nisin ซึ่งผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) *Lactococcus lactis* ได้การรับรองให้ใช้ได้อย่างถูกต้องในหลายประเทศ และถูกรับรองสถานะ คือ GRAS (Generally Recognized as Safe) ปัจจุบันนี้มีแบคทีริโอซินอีกหลายชนิดที่ได้รับการพัฒนาเพื่อประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ nisin สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหารได้หลายชนิด รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคที่สำคัญอีกด้วย (Deegan et al., 2006) ปัจจุบันนี้แนวโน้มในการใช้สารเคมีเติมแต่งในอาหารลดลง กอร์ปกับผู้บริโภคให้ความสนใจในผลิตภัณฑ์อาหารที่ไม่มีการปรุงแต่งด้วยสารเคมีมากขึ้น ทำให้สารแบคทีริโอซินหลายชนิดได้รับความสนใจเพื่อใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมากขึ้น เนื่องจากสามารถลดปริมาณการใช้สารกันบูดชนิดต่าง ๆ ในอาหารได้

มีการศึกษาวิจัยนานมาแล้ว และพบว่าแบคทีเรียกลุ่ม LAB หลายสายพันธุ์สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้หลายชนิด และแบคทีริโอซินส่วนมากสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสำคัญ ๆ ได้ เช่น *Listeria monocytogenes* ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Holzapfel et al., 1995; Hugas, 1998) อย่างไรก็ตามการใช้ nisin กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้นมักประสบปัญหาอันเนื่องมาจากการละลายของ nisin จะต่ำที่สภาวะที่ pH เป็นกลางหรือสูงกว่า 7.0 ขึ้นไป และหากเติม nisin ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์โดยตรงแล้วให้ความร้อนระหว่างการแปรรูป จะมีผลทำให้ nisin นั้นเกิดการยึดเกาะเข้ากับโปรตีนเนื้อสัตว์ทำให้ประสิทธิภาพของ nisin สูญเสียไปเกือบทั้งหมด (O'Keeffe and Hill,1999) ทำให้การประยุกต์ใช้ nisin ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์นั้นไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาถึงผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์บางประเภทเช่น ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้น ซึ่งหลังจากกระบวนการขึ้นรูปเป็นลูกชิ้นด้วยน้ำร้อนแล้ว ลูกชิ้นจถูกแช่ในน้ำเย็นระยะเวลาหนึ่ง ขั้นตอนดังกล่าวมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจากแบคทีเรียที่เป็นอันตรายได้อีก ดังนั้นหากสามารถใช้แบคทีริโอซินในขั้นตอนดังกล่าว และก่อนการบรรลูกชิ้นในบรรจุภัณฑ์ จึงมีความเป็นไปได้ที่จะสามารถยืดอายุการเก็บและการวางจำหน่ายในตลาดออกไปได้อีกระยะหนึ่งโดยไม่ต้องใช้สารกันบูดที่อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

ผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นในประเทศไทย โดยเฉพาะลูกชิ้นหมูนั้นมีปริมาณการบริโภคสูงมาก ทั่วไปมีจำหน่ายโดยบรรจุแบบในถุงพลาสติกที่ไม่เป็นสุญญากาศ และมีแบบบรรจุในสุญญากาศบ้างที่

จำหน่ายในตลาดระดับสูง เช่น ซูปเปอร์มาร์ค โดยทั่วไปลูกชิ้นมีอายุการเก็บปนะมาณ 15 วัน ที่อุณหภูมิ 0-5 °C ตามที่มีการระบุไว้ที่บรรจุภัณฑ์ แต่ในความเป็นจริงแล้วจากการสุ่มและตรวจเชื้อจุลินทรีย์ตัวอย่างลูกชิ้นจากตลาดในท้องถิ่นแล้ว พบว่าตัวอย่างลูกชิ้นที่ผลิตจากโรงงานหลายแห่งมีอายุการเก็บเพียง 1-2 วันเท่านั้นก็มีปริมาณจุลินทรีย์ (แบคทีเรีย) ทั้งหมดสูงเกินกว่ามาตรฐานแล้ว (1 x 10^5 cfu/g food) (มอก. 1009-2533ม 2536) ปัจจัยที่ทำให้คุณภาพของลูกชิ้นในประเทศไทยต่ำกว่าที่ควรจะเป็นนั้น อาจเนื่องจากกระบวนการผลิตภายหลังการให้ความร้อนลูกชิ้น (80-90 °C) มีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์กลับอีกครั้ง เนื่องจากลูกชิ้นที่ผ่านการให้ความร้อนแล้ว มีการลดอุณหภูมิลงก่อนการบรรจุ โดยใช้พัดลมเป่า หรือการแช่ลูกชิ้นลงในน้ำเย็น ซึ่งทั้ง 2 กระบวนการนั้นส่งเสริมให้เกิดการปนเปื้อนเป็นอย่างยิ่ง โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หลังจากการให้ความร้อนแล้ว อาจมีการปนเปื้อนกลับเของแบคทีเรียได้พียงประมาณที่ระดับ 0.5-2 log cfu/g ซึ่งส่วนมากเป็นกลุ่มของ LAB (Samelis et al., 2000)

โดยทั่วไปการควบคุมปริมาณของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหาร กระทำโดยการแปรรูปด้วยวิธีการต่าง ๆ เช่น การให้ความร้อน การใช้ความเย็น การใช้ส่วนผสมเครื่องปรุงต่าง ๆ รวมทั้งการใช้สารกันบูดร่วมด้วย สำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นเป็นผลิตที่มีการให้ความร้อนระดับการพาสเจอไรซ์เท่านั้นโดยไม่อยู่ในบรรจุภัณฑ์ที่มิชิด จึงมีโอกาสที่จะมีจุลินทรีย์หลายชนิดยังคงเหลือรอดจากกระบวนการแปรรูปได้มาก อาทิเช่น เชื้อจุลินทรีย์จากแป้งมันสำปะหลังหรือแป้งสาลีที่นิยมใช้เติมในลูกชิ้นเพื่อช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสและลดต้นทุน วัตถุดิบแป้งต่าง ๆ มักมีการปนเปื้อนของ Bacillus sp. (Berghofer et al., 2003) ในปริมาณที่สูงมาก สปอร์ของแบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวยังมีความสามารถทนความร้อนได้สูงมาก นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียอีกหลายชนิดที่มีผลต่ออายุการเก็บของผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (Viana et al., 2005) โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ลูกชิ้น เช่น LAB, Pseudomonas, Enterobacteriaceae และ *Brochothrix thermosphacta* (Samelis et al., 2000) ดังนั้นการทดลองใช้แบคทีริโอซินที่ไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์จาก LAB ที่พบว่าสามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ดีเพื่อยืดอายุการเก็บและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนบนผิวลูกชิ้นที่บรรจุถุงพลาสติกแบบบรรยากาสปกติ และแบบสุญญากาศ จึงเป็นที่น่าสนใจมากว่ามีความเป็นไปได้สำหรับการขยายผลการทดลองที่ได้สำหรับผู้ผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ต่อไปได้ เชื้อ LAB ที่คัดเลือกได้จากการที่ทดลอง (บทที่ 5) คือ *Lactococcus lactis* TISTR 1401

6.2 วัตถุประสงค์

การศึกษานี้เป็นการทดลองการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินที่ไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์เพื่อยืดอายุการเก็บและป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนบนผิวลูกชิ้นที่บรรจุถุงพลาสติกแบบบรรยากาสปกติ

และแบบสุญญากาศ เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 °C และตรวจการบนเปื้อนของเชื้อแบคที่เรีย คือ ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมด Enterobacteriaceae, Pseudomonas, แบคทีเรียกรดแลคติก และ *Brochothrix thermosphacta* ระหว่างการเก็บ 12 วัน

6.3 อุปกรณ์และวิธีการ

6.3.1 สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

แบคทีเรียกรดแลคติก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และแบคทีเรียทดสอบ Bacillus sp. TISTR 908 ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย เก็บแบคทีเรียไว้ใน 10% (w/v) skim milk ที่อุณหภูมิ - 40 °C ทำการกระตุ้นให้เชื้อเจริญเติบโตเต็มที่ก่อนการใช้ ถ่าย stock culture ปริมาณ 1 ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (Hi-media, Mumbai, India) broth 5 ml บ่มเพาะบนเครื่องเขย่า (Unimax 100, Heidolph, Schwabach, Germany) 50 rpm ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายลงใน MRS broth 25 ml บ่มใน shaking incubator (Orbital Incubator S-150, Stuart Sciencetific, UK) อุณหภูมิ 37 °C สำหรับกรณีของ Bacillus sp. TISTR 908 ใช้ TSB (tryptic soy broth) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

6.3.2 การผลิตแบคทีริโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401

ทำการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เสริมด้วย 2% yeast extract (Hi-media, Mumbai, India), 0.2% glucose (Ajax Finechem, Australia) และ 0.2% meat extract (Merck, Darmstadt, Germany) ตามวิธีของ Nieto-Lozano et al. (2005) ปริมาตร 2 ลิตร ควบคุม pH ให้คงที่ ที่ 6.5 ตลอดเวลาด้วย 1 N NaOH ด้วย เครื่อง auto-titration (718 STAT Titrino (Metrohm, Ireland) เพาะเชื้อภายใต้สภาวะ micro-aerobic ใน stainless steal bioreactor ที่อุณหภูมิ 37 °C กวนด้วยความเร็ว 100 rpm เก็บเกี่ยวแบคทีริโอซินเมื่อการเจริญของแบคทีเรียถึงจุดที่มีจำนวนแบคทีเรียสูงที่สุด (initial stationary phase) โดยวัดค่า absorbance ที่ 600 nm ปั่นเหวี่ยงน้ำหมัก (fermentate) ที่ 12,000 x g ที่ 4 °C เป็นเวลา 20 นาที (Sorvall® RC SC-plus centrifuge, Thermo Sciencetific, Waltham, USA) ปรับ pH ส่วนใส (supernatant) ที่ได้อีกครั้งให้ได้ pH 6.5 ด้วย 1 M NaOH (Morgan et al., 1999) แล้วเติม catalase (จาก bovine liver, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mg/ml เพื่อกำจัด hydrogen peroxide ที่อาจมีอยู่ใน supernatant จากนั้นกำจัดแบคทีเรียที่อาจหลงเหลืออยู่ในส่วนใสโดยให้ความร้อนที่ 80 °C 20 นาที ใน autoclave (LABO Autoclave, Sanyo, NB Scientific, Edison, N.J.) ทำให้เย็นอย่างรวดเร็ว

ในน้ำแข็ง แล้วเก็บ crude bacteriocin supernatant (CBS) เก็บไว้ 4 °C ในระหว่างรอการใช้ทดลองต่อไป

6.3.3 การวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซิน

ทำการวิเคราะห์ค่ากิจกรรมการยับยั้งของ CBS ด้วยวิธี agar well diffusion ซึ่งดัดแปลงจาก Schillinger and Lücke (1989) ดังต่อไปนี้ ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบ Bacillus sp. TISTR 908 ข้ามคืน ที่อุณหภูมิ 37 °C จากนั้นย้ายเชื้อ 1% (v/v) ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อกึ่งแข็ง (0.75% TSB agar) ปริมาตร 15 ml แล้วเทลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar อย่างสม่ำเสมอ เมื่ออาหารแข็งตัวดีแล้วจึงทำการเจาะหลุม (well) ขนาด 6 mm ให้เท่ากันด้วย cock borer หยดส่วนใส CBS ปริมาตร 40 µl ลง ใน well ทั้งนี้ทำการเจือจาง CBS ที่ใส่ใน well เป็น 2 เท่า ตั้งแต่ 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 และ 512 เท่า ทำการทดลอง 2 ซ้ำ ปล่อยให้ CBS ซึมผ่านเข้าในเนื้อวุ้นของถาดอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจนสมบูรณ์ (pre-diffusion) โดยบ่มไว้ที่ 4 °C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ก่อนบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Buncic et al., 2001; Suma et al., 1998) ตรวจ well ที่เกิดวงใสรอบ ๆ well ทำการคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้งปืนค่า AU/ml คำนวณจากความเข้มข้นต่ำสุด (A)ที่ทำให้เกิดวงใสของการยับยั้ง คูณกับ 1,000 ไมโครลิตร หารด้วยปริมาตร CBS ที่ใช้ (B) ดังสมการ

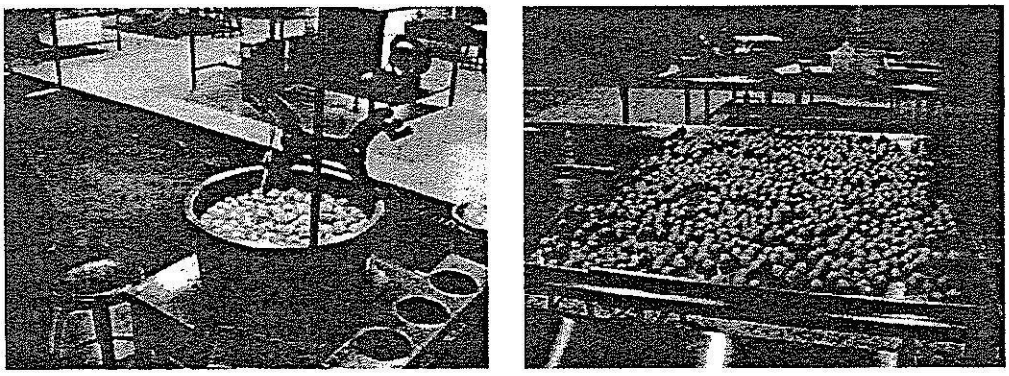
$$\text{Arbitary Unit} = \frac{1000\mu\text{l} \times A}{B\mu\text{l}}$$

6.3.4 การผลิตลูกชิ้นหมู

ซื้อหมูเนื้อแดงจากร้านค้าเนื้อสัตว์ในจังหวัดนครราชสีมา เนื้อหมูเป็นเนื้อที่ตัดแต่งหลังจากการฆ่าไม่เกิน 2-3 ชั่วโมง ส่วนผสมที่ใช้ในการผลิตลูกชิ้นประกอบด้วย เนื้อหมูส่วนขาหลัง 10 กก เกลือ 2%, sodium phosphate 0.4%, น้ำแข็ง 15%, แป้งมันสำปะหลัง 4% ส่วนผสมโดยสับผสมในเครื่องสับผสม ควบคุมคุมอุณหภูมิระหว่างการสับผสมไม่เกิน 14 °C ขึ้นรูปส่วนผสมให้เป็นลูกชิ้นด้วยเครื่องปั้นลูกชิ้นลงในน้ำอุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 5 นาที แล้วเพิ่มอุณหภูมิเป็น 80 °C และต้มลูกชิ้นต่อ 20 นาที ตักขึ้นจากน้ำ กระจายบนถาด ผึ่งที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที สำหรับตัวอย่างลูกชิ้นที่ต้องเคลือบด้วย CBS ทำการจุ่มลูกชิ้นในสารละลาย CBS ผลิตจากข้อ 6.3.2 ก่อนแล้วจึงผึ่งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง (ภาพที่ 6.1) เก็บลูกชิ้นทั้งหมดในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที ก่อนการบรรจุ

6.3.5 การวางแผนการทดลอง

เพื่อศึกษาผลของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เคลือบผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมู จึงวางแผนการทดลองดังต่อไปนี้คือ ตัวอย่างที่จุ่มในสาละลาย CBS ไม่ทำเจือจาง (full strength, F-CBS) ตัวอย่างที่จุ่มในสาละลาย CBS ที่เจือจาง ½ เท่า (half strength, H-CBS เจือจาง CBS 1:1 ใน sterile phosphate buffer pH 6.5) และตัวอย่างควบคุมที่ไม่จุ่มในสาละลาย CBS บรรจุแยกในถุงพลาสติก polyethylene ในแบบสุญญากาศและไม่สุญญากาศ บรรจุถุงละประมาณ 30 g เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 12 วัน เก็บตัวอย่างวิเคราะห์ทุก 3 วัน



(A) (B)

ภาพที่ 6.1 Pork meatball manufacturing in Food processing laboratory, SUT:
(A), heating of pork meatballs; (B), drying of pork meatballs at room temperature.

6.3.6 การวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ตัวอย่างลูกชิ้น

การวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์ตัวอย่างลูกชิ้น ชั่งตัวอย่างลูกชิ้น 25 g เจือจาง 10 เท่าด้วย 0.85% NaCl ปลอดเชื้อ ตีป่นด้วยเครื่อง Stomacher (Stomacher Lab-blender model 400, Seward, London, England) 2 นาที เจือจางต่อตามความเหมาะสม เพาะเชื้อแบบ spread plate ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดต่าง ๆ ดังนี้

- ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total aerobic plate count) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA (plate count agar) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (Nel et al., 2004)
- ปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติก บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มแบบ anaerobically ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (Viana et al, 2005)

- ปริมาณของแบคทีเรีย Enterobacteriaceae บนอาหารเลี้ยงเชื้อ VRBG (Violet red bile agar with glucose) บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
- ปริมาณของแบคทีเรีย *Brochothrix thermosphacta* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ STAA (streptomycin sulphate thallous acetate actidione) บ่มที่อุณหภูมิ 25 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

6.3.7 การวิเคราะห์ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมด

การวัดค่า pH ของตัวอย่างทำโดยใช้เครื่องวัด pH (718 STAT Titrino) ใช้ตัวอย่างลูกชิ้น 10 g ปั่นละเอียดให้เข้ากันในน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml สำหรับการวัดปริมาณกรดทั้งหมด ใช้ตัวอย่างลูกชิ้น 10 g ปั่นละเอียดในน้ำกลั่น 50 ml (Benkerroum et al., 2003) จากนั้นทำการไทเทรตด้วยเครื่อง auto-titration (718 STAT Titrino) ด้วย 0.1 M NaOH ในการไทเทรต โดยจุดยุติอยู่ที่ 7.0 (Castano et al., 2002)

6.3.8 การวัดค่าสีของตัวอย่างลูกชิ้น

ทำการวัดค่าสีที่ผิวของตัวอย่างลูกชิ้นด้วยเครื่องวัดสี Minolta (CR-300, Minota Chroma Meter, Minolta, Japan) ในระบบ Hunter L, a, b color system วัดสี 3 ซ้ำต่อตัวอย่าง

6.3.9 การประเมินทางประสาทสัมผัส

ทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสด้วยวิธี QDA (Quantitative description analysis) (Stone and Sidel, 1985) ใช้ผู้ประเมินที่คุนเคยกับการรับประทานลูกชิ้นและผ่านการฝึกที่งหมด 6 คน วิเคราะห์ประเมินคุณลักษณะต่าง ๆ ดังนี้คือ ลักษณะปรากฏ สี ปริมาณน้ำที่ออกมาจากลกชิ้น (water purge) เมือก กลิ่นที่ผิดปกติ กลิ่นหืน กลิ่นเน่าเสีย และการยอมรับโดยรวม

6.3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลองทางสถิติด้วย SAS (1993) program ทำการวิเคราะห์ Variance, t-test และ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($P < 0.05$) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ วิเคราะห์ทางจุลินทรีย์ 2 ซ้ำ วิเคราะห์ทางเคมี 3 ซ้ำ

6.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

6.4.1 การวิเคราะห์ปริมาณของจุลินทรีย์

6.4.1.1 ปริมาณจุลินทรีย์ของลูกชิ้นหมูที่บรรจุแบบปกติ

ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นของส่วนผสมของลูกชิ้นหมูหลังจากการสับผสมเสร็จแล้ว มีปริมาณของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ดังนี้ ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) เท่ากับ 6.18 log cfu/g ปริมาณ Enterobacteriaceae เท่ากับ 4.98 log cfu/g ปริมาณ Pseudomonas เท่ากับ 4.73 log cfu/g ปริมาณแบคทีเรียแลคติก ท่ากับ 5.52 log cfu/g และ ปริมาณ *Brochothrix thermosphacta* เท่ากับ 3.59 log cfu/g

ปริมาณของจุลินทรีย์ในส่วนผสมเริ่มต้น มีความแตกต่างมาได้จากหลายปัจจัย ไม่ว่าจะเป็นเรื่องของคุณภาพของวัตถุดิบ ความสดใหม่ ระยะเวลาในการตัดแต่ง ระยะเวลาในการแปรรูป การปนเปื้อนของส่วนผสมต่าง ๆ (Davies and Board, 1998) อย่างไรก็ตามปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นดังกล่าวจะลดลงไปมากหลังจากผ่านกระบวนการให้ความร้อนแล้ว ตารางที่ 6.1 แสดงปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดสำหรับลูกชิ้นหมูบรรจุแบบปกติที่ 4 °C

ในวันที่ 0 ของการทดลองพบว่า ไม่พบการเจริญของของจุลินทรีย์ในตัวอย่างควบคุม และตัวอย่างที่ใช้ F-CBS แต่สำหรับตัวอย่างที่ใช้ H-CBS นั้นพบว่า มีจุลินทรีย์ทั้งหมดเจริญเท่ากับ 4.09 log cfu/g ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของแบคทีริโอซินที่ไม่สูงมาก ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในตัวอย่างลูกชิ้นได้มากเพียงพอ ทำให้จุลินทรีย์ที่หลงเหลือในตัวอย่างสามารถเจริญเติบโตได้ แต่เนื่องจากตัวอย่างควบคุมไม่พบการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้น อาจเป็นผลมาจากตัวอย่างควบคุมมีความชื้นบนผิวด้านนอกของลูกชิ้นน้อยกว่าตัวอย่างที่มีการจุ่มสารแบคทีริโอซิน จึงทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้น้อยกว่า อย่างไรก็ตาม ในการเก็บวันที่ 3 ถึงวันที่ 12 พบว่า ตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่จุ่ม H-CBS ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ มีปริมาณของจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 3.41 ถึง 6.25 log cfu/g ในขณะที่พบว่าตัวอย่างที่จุ่ม F-CBS ตั้งแต่วันที่ 0 ถึง วันที่ 6 ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์ และพบการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดในวันที่ 9 เพียง 3.51 log cfu/g เท่านั้น และในวันที่ 12 มีปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมด เท่ากับ 4.30 log cfu/g ขณะที่ตัวอย่างควบคุมมี 6.00 log cfu/g และตัวอย่างที่ใช้ H-CBS มี 6.01 log cfu/g ทั้งนี้ลูกชิ้นที่จุ่มเคลือบด้วย F-CBS มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำกว่าตัวอย่างอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ประมาณ 2 log cfu/g

การวิเคราะห์ Enterobacteriaceae สามารถใช้ในการบ่งบอกถึงสุขอนามัยของกระบวนการผลิตได้ เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่มักพบในระบบขับถ่ายของมนุษย์ ผลการทดลองนี้ไม่พบการเจริญของกลุ่มนี้ในตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ใช้ F-CBS แต่พบการเจริญในตัวอย่างที่มีการใช้ H-CBS

ปรากฏการณ์ดังกล่าวอาจเป็นผลมาจากความเข้มข้นของแบคทีริโอซินไม่เพียงพอ จุลินทรีย์กลุ่มดังกล่าวจึงไม่ตอบสนองต่อการยับยั้งของแบคทีริโอซิน และการจุ่มลูกชิ้นในแบคทีริโอซิน ทำให้มีความชื้นบนผิวของลูกชิ้นสูงขึ้น จนเป็นการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียชนิดดังกล่าวได้ แต่เมื่อเก็บลูกชิ้นทั้งหมดจนถึงวันที่ 12 พบว่าปริมาณของ Enterobacteriaceae ไม่แตกต่างกัน คือ เท่ากับ 5.28, 5.06 และ 4.22 log cfu/g สำหรับตัวอย่างควบคุม ตัวอย่างที่ใช้ H-CBS และตัวอย่าง F-CBS

ตารางที่ 6.1 Microbial population (log cfu/g) of pork meatballs during storage at 4 °C in aerobically packed condition

Storage Time (days)	Aerobic count			Enterobacteriaceae			Lactic acid bacteria			Brochothrix thermosphacta		
	C	H	F	C	H	F	C	H	F	C	H	F
0	-	4.09	-	-	3.53	-	-	-	-	-	-	-
3	3.41	3.51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	4.21	4.78	-	-	4.62	-	-	-	-	-	-	-
9	4.80	4.49	3.57	4.87	4.90	-	-	-	-	-	-	-
12	6.26a	6.01a	4.30b	5.28	5.06	4.22	4.72	4.43	4.25	-	-	-

[a] Mean within a row for each treatment (C, H and F) lacking a common letter (a through c) differ significantly ($P < 0.05$), C: control treatment, H: half strength treatment, F: full strength treatment, - : ND, not detected or less than minimum level of sensitivity of enumeration method.

แบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) เป็นแบคทีเรียที่มีส่วนที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์เช่นกัน โดยที่จุลินทรีย์ดังกล่าวจะสร้างเมือก (slime) ขึ้นที่ผิวหน้าของผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสายพันธุ์ Leuconostoc sp. ผลการทดลองพบว่า ตั้งแต่วันที่ 0 จนถึง 9 ของระยะเวลาในการเก็บ ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกในทุก ๆ ตัวอย่างที่ทำการทดลอง ในวันที่ 12 ของการเก็บพบการเจริญของ LAB ในทุกตัวอย่างแต่อยู่ในปริมาณที่ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) ซึ่งอาจพิจารณาได้ว่าการที่ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในช่วงระยะเวลาในตอนต้นของการเก็บนั้น อาจเนื่องจากการเจือจางตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์นั้นอาจสูง

เกินไปกว่าที่จะตรวจนับได้ อย่างไรก็ตามอาจคาดคะเนได้ว่าปริมาณของ LAB อยู่ที่ระดับที่ต่ำกว่า 10^3 cfu/g

แบคทีเรีย *Brochothrix thermosphacta* เป็นแบคทีเรียมีที่พบในเนื้อสัตว์แช่เย็น จากการเจริญทำให้เกิดการเน่าเสียของเนื้อสัตว์ได้ ผลการทดลองนี้ ไม่พบการเจริญของ *Br. thermosphacta* เลยตลอดระยะเวลาการเก็บตัวอย่างลูกชิ้นหมูทั้งหมด ทั้งนี้อาจเป็นผลเนื่องจาก แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวถูกทำลายได้ง่ายที่อุณหภูมิ 70 °C เป็นเวลา 5 นาที ซึ่งกระบวนการผลิตลูกชิ้นมีการใช้ความร้อนสูงถึงอุณหภูมิ 70 °C จึงไม่พบการอยู่รอดของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ อย่างไรก็ดีมีรายงานแน่ชัดว่า *Br. thermosphacta* ถูกยับยั้งได้ด้วยสารแบคทีริโอซิน nisin (Cutter and Siraguasa, 1998)

6.4.1.2 ปริมาณจุลินทรีย์ของลูกชิ้นหมูบรรจุแบบสุญญากาศ

ผลการวิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ของตัวอย่างลูกชิ้นหมูบรรจุแบบสุญญากาศแสดงในตารางที่ 6.2 ในวันแรกของการผลิต (วันที่ 0) ปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่พบในตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ใช้ F-CBS แต่สำหรับตัวอย่างที่ใช้ H-CBS พบว่ามีปริมาณของจุลินทรีย์ 4.88 log cfu/g ทั้งนี้อาจเป็นเหตุผลเดียวกับที่อธิบายไว้ในหัวข้อที่ 6.4.1.1 อย่างไรก็ตามอาจมีเหตุผลจากการปนเปื้อนระหว่างการเจือจาง CBS ได้ และ sensitivity ของการตรวจนับจุลินทรีย์ต่ำกว่าที่ทำได้ หากพิจารณาเฉพาะในวันที่ 12 ของการเก็บพบว่า ตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่ใช้ H-CBS มีปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) โดยปริมาณจุลินทรีย์ เท่ากับ 6.16, 6.04 และ 4.74 log cfu/g ตามลำดับ

แบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae นั้นไม่สามารถตรวจพบได้ในตัวอย่างลูกชิ้นที่มีการใช้ F-CBS ตลอดระยะเวลาการเก็บ 12 วัน แต่สามารถตรวจพบในตัวอย่างที่ใช้ H-CBS ในวันแรกของการผลิตและมีปริมาณค่อนคงที่ไปจนวันที่ 12 โดยอยู่ในปริมาณตั้งแต่ 4 – 5 log cfu/g ซึ่งเกิดขึ้นเช่นเดียวกับตัวอย่างควบคุม

สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ไม่พบการเจริญในตัวอย่างที่มีการใช้แบคทีริโอซินจนกระทั่งวันที่ 12 ซึ่งจะพบปริมาณ LAB เท่ากับ 3.66 และ 3.74 log cfu/g สำหรับตัวอย่าง H-CBS และ F-CBS ตามลำดับ ในกรณีของตัวอย่างควบคุมพบ LAB ในวัน 9 -12 โดยมีปริมาณเท่ากับ 5.50 และ 4.32 log cfu/g ตามลำดับ และไม่พบแบคทีเรีย *Brochothrix thermosphacta* เจริญกับตัวอย่างลูกชิ้นหมูทุกชนิดตลอดระยะเวลาการเก็บ

จากผลการทดลองทั้งหมด จะเห็นได้ว่า การใช้แบคทีริโอซินที่ไม่ผ่านการทำบริสุทธิ์ด้วยความเข้มข้นเต็มที่ (F-CBS) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดี โดยเฉพาะมีผลต่อปริมาณจุลิน ทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างทั้งที่บรรจุแบบสุญญากาศและแบบปกติ และจากข้อมูลนี้อาจคาดคะเนได้ว่าการใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่มีความเข้มข้นเต็มที่ที่ผลิตได้จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถ

การเก็บของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูได้ประมาณ 9 วัน ตามมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม (2533) เมื่อเทียบกับตัวอย่างที่ไม่มีการใช้แบคทีริโอซินซึ่งเก็บได้เพียง 3 วันเท่านั้น คือยืดอายุตัวอย่างออกไปได้อีกอย่างน้อย 6 วันเมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม

ตารางที่ 6.2 Microbial population (log cfu/g) of pork meatballs during storage at 4 °C in vacuum packed condition

Storage Time (days)	Aerobic count			Enterobacteriaceae			Lactic acid bacteria			Brochothrix thermosphacta		
	C	H	F	C	H	F	C	H	F	C	H	F
0	-	4.88	-	-	3.43	-	-	-	-	-	-	-
3	4.35	4.15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	5.59	4.25	3.55	4.03	3.87	-	-	-	-	-	-	-
9	6.72	6.03	3.71	5.76	4.70	-	5.50	-	-	-	-	-
12	6.16a	6.04a	4.74b	5.45	5.34	-	4.32	3.66	3.74	-	-	-

[a] Mean within a row for each treatment (C, H and F) lacking a common letter (a through c) differ significantly ($P < 0.05$), C: control treatment, H: half strength treatment, F: full strength treatment, -: ND, not detected or less than minimum level of sensitivity of enumeration method.

6.4.2 ค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดของลูกชิ้น

ผลการทดลองแสดงค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างลูกชิ้นที่บรรจุในสภาวะปกติและสุญญากาศ แสดงอยู่ในตารางที่ 6.3 และ 6.4 ตามลำดับ พบว่า ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) และค่าปริมาณกรดทั้งหมดตลอดระยะเวลาการเก็บในทุกตัวอย่าง โดยค่า pH มีค่าอยู่ระหว่าง 6.52 ถึง 6.55 และค่าปริมาณกรดทั้งหมดมีค่าอยู่ในระหว่าง 0.33 ถึง 0.39% (คิดเป็นปริมาณกรดแลคติก) การที่ค่า pH ค่อนข้างคงที่นั้น สอดคล้องกับปริมาณของ LAB ที่วิเคราะห์ได้ จากการวิเคราะห์ทางด้านจุลินทรีย์ ไม่พบ LAB เลยในระยะแรกของการเก็บ ทำให้ปริมาณกรดที่สร้างโดยเชื้อ LAB (Dykes et al.,1991; Borch et al., 1996) น้อย อย่างไรก็ตาม เมื่อเก็บตัวอย่างนานขึ้นพบความแตกต่างทางค่า pH และปริมาณกรดทั้งหมดได้

ตารางที่ 6.3 pH and titratable acidity (%, as lactic acid) of pork meatballs during storage at 4 °C in aerobically packed condition

Storage time (day)	pH			Titratable acidity (%)		
	C	H	F	C	H	F
0	6.54	6.55	6.53	0.39	0.33	0.37
3	6.54	6.53	6.54	0.36	0.35	0.36
6	6.54	6.53	6.54	0.35	0.38	0.37
9	6.52	6.52	6.54	0.35	0.36	0.35
12	6.54	6.53	6.53	0.36	0.35	0.37

C: control treatment, H: half strength treatment, F: full strength treatment.

ตารางที่ 6.4 pH and titratable acidity (%, as lactic acid) of pork meatballs during storage at 4 °C in vacuum packed condition

Storage time (day)	pH			Titratable acidity (%)		
	C	H	F	C	H	F
0	6.54	6.55	6.53	0.35	0.34	0.37
3	6.54	6.53	6.54	0.37	0.36	0.35
6	6.54	6.53	6.54	0.34	0.36	0.37
9	6.52	6.52	6.54	0.35	0.37	0.35
12	6.54	6.53	6.53	0.37	0.37	0.35

C: control treatment, H: half strength treatment, F: full strength treatment.

6.4.3 การเปลี่ยนแปลงสีของลูกชิ้นหมู

เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของสีในตัวอย่างลูกชิ้นหมู ทำการวัดสีในระบบ Hunter L, a, b color system (ตารางที่ 6.5) พบว่า ตัวอย่างลูกชิ้นที่บรรจุแบบปกตินั้นไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของค่า L (ความสว่าง) และ a (ความเป็นสีแดง) ตลอดระยะเวลาการเก็บ โดยที่ค่า L และ a มี

ค่าอยู่ในช่วง 75.75 – 77.59 และ 1.86 – 2.88 ตามลำดับ สำหรับในกรณีของค่า b (ความเป็นสีเหลือง) มีความแตกต่างกันในวันที่ 3 โดยตัวอย่างที่มีการใช้สารแบคทีริโอซินจะมีค่าสีเหลืองที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 6.5 Color values (Hunter L, a, b color system) of pork meatballs during storage at 4 °C in aerobically packed condition

Storage Time (days)	L-value			a-value			b-value		
	C	H	F	C	H	F	C	H	F
0	76.30	75.87	75.75	2.77	3.07	3.05	7.77	8.42	9.34
3	76.77	75.98	75.79	2.82	2.88	2.88	6.93b	8.27ab	8.72a
6	77.35	76.16	76.69	2.57	2.57	2.71	7.25	8.24	8.98
9	77.25	76.01	75.95	1.98	2.53	2.60	7.48	8.39	8.60
12	77.59	76.68	76.75	1.86	2.73	2.58	7.51	8.42	8.74

[a] Mean within a row for each treatment (C, H and F) lacking a common letter (a through c) differ significantly ($P < 0.05$). C: control treatment, H: half strength treatment, F: full strength treatment.

คุณภาพสีของตัวอย่างลูกชิ้นที่เก็บแบบสุญญากาศมีลักษณะเช่นเดียวกันกับตัวอย่างเป็บแบบปกติ คือ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่า L และ a เช่นเดียวกัน โดยค่า L และ a มีค่าอยู่ในช่วง 75.03-75.97 และ 3.05-4.12 ตามลำดับ และมีค่า b ามแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ตัวอย่างที่มีการใช้สารแบคทีริโอซินจะมีค่า b สูงกว่าตัวอย่างควบคุม (ตารางที่ 6.6)

6.4.4 คุณภาพทางประสาทสัมผัสของลูกชิ้นหมู

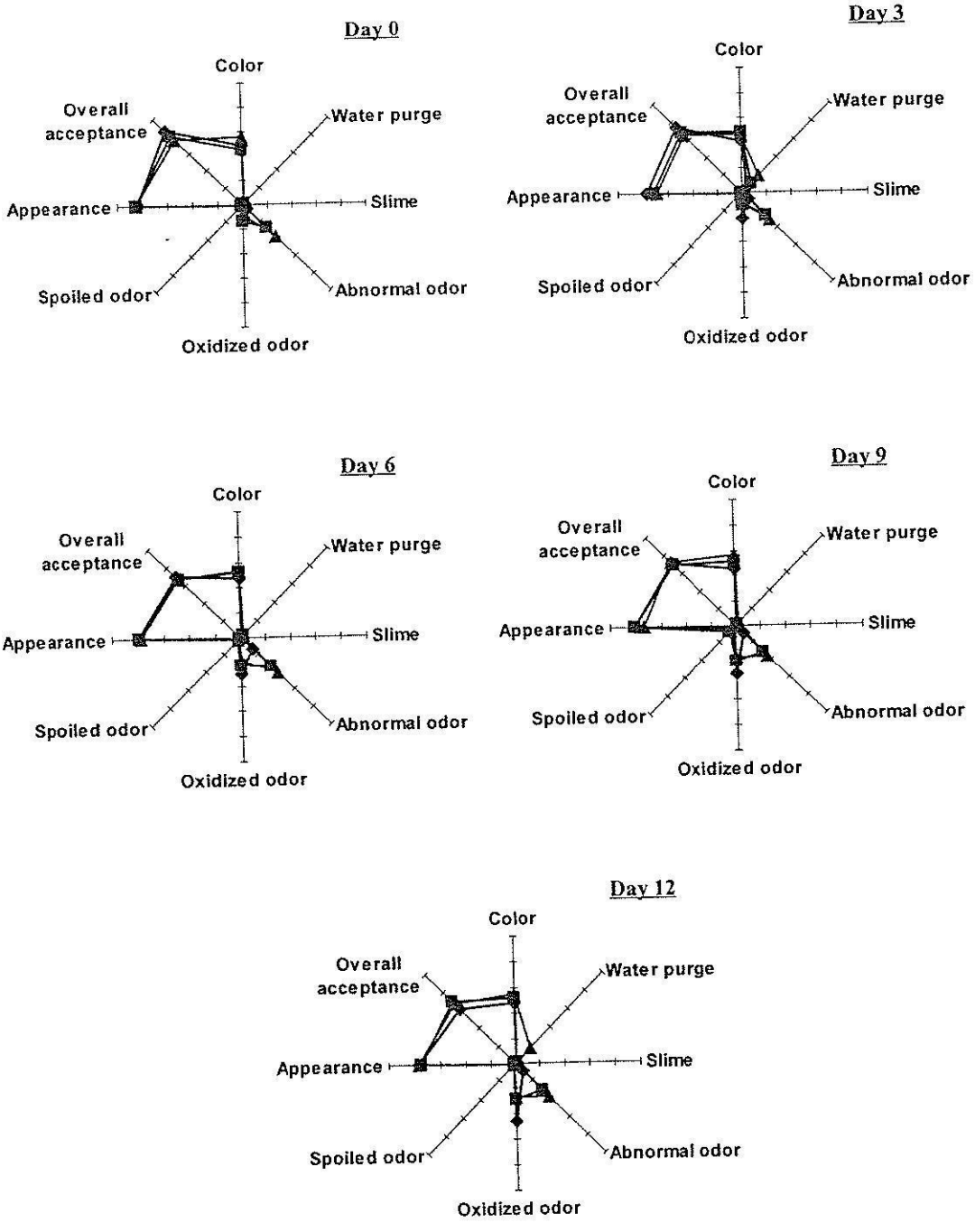
ผู้บริโภคโดยทั่วไปตัดสินใจซื้อผลิตภัณฑ์อาหารโดยพิจารณาจากลักษณะภายนอก และบรรจุภัณฑ์ ดังนั้นลักษณะภายนอกของลูกชิ้นหมูจึงเป็นสิ่งสำคัญในการตัดสินใจซื้อของผู้บริโภค อาทิ สี ปริมาณของเหลวที่ซึมออกในบรรจุภัณฑ์ (purge) และอื่น ๆ สีของผลิตภัณฑ์เป็นปัจจัยอันดับต้น ๆ ที่ผู้บริโภคจะให้ความสนใจในการเลือกซื้อผลิตภัณฑ์ชนิดนั้น ๆ ในการทดลองนี้ ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูบรรจุแบบปกติแสดงดังภาพที่ 6.2

ตารางที่ 6.6 Color values (Hunter L, a, b color system) of pork meatballs during storage at 4°C in vacuum packed condition

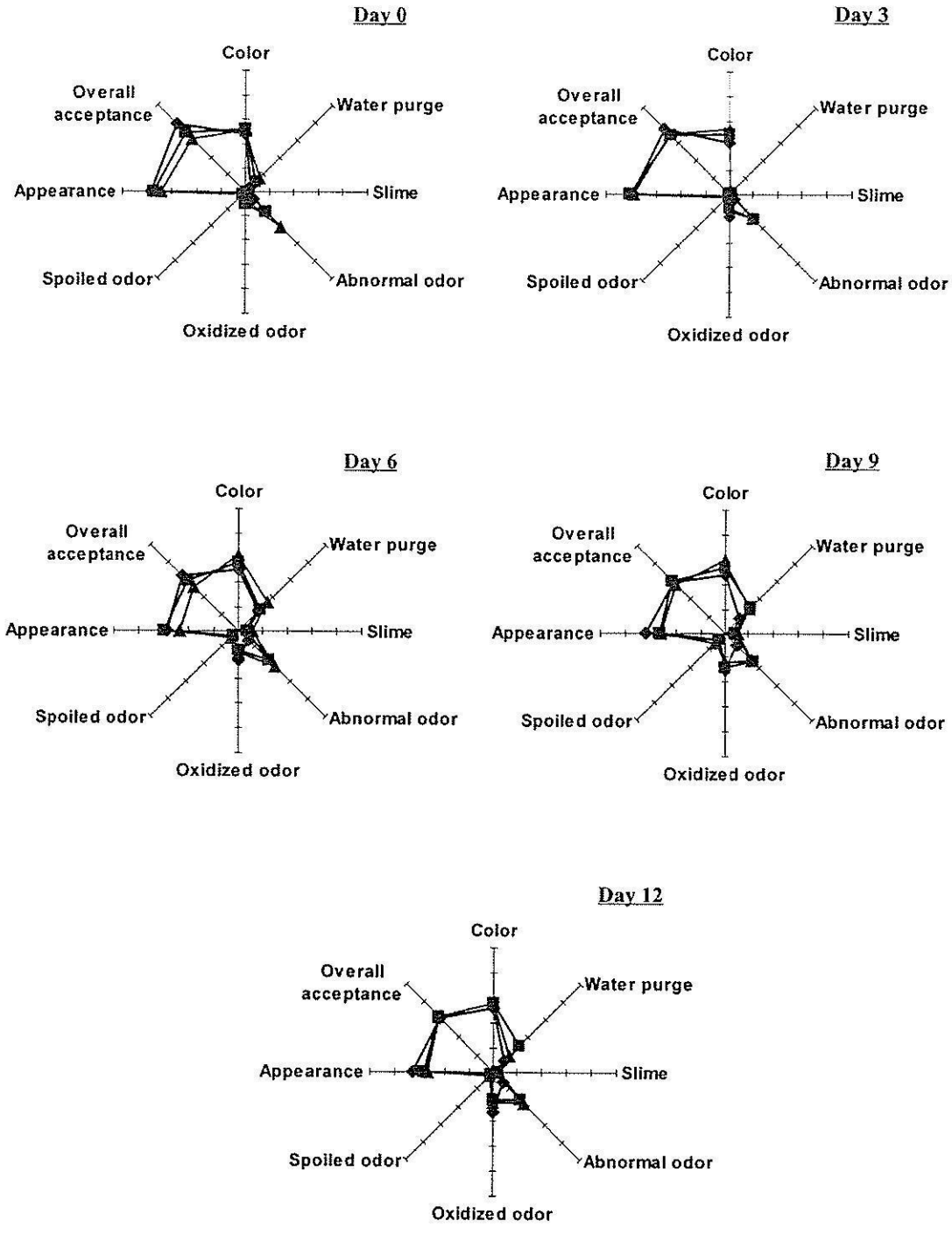
Storage Time (days)	L-value			a-value			b-value		
	C	H	F	C	H	F	C	H	F
0	76.40	75.25	74.22	3.05	3.28	3.49	7.53	8.53	9.24
3	75.97	75.90	74.78	3.68	3.40	3.56	7.09b	8.40ab	8.92a
6	76.29	75.34	75.03	3.59	3.66	3.44	7.15	8.32	9.03
9	75.78	75.13	74.86	3.74	3.96	3.64	7.42	8.37	8.86
12	76.49	75.19	75.11	3.76	4.12	3.66	7.54b	7.91b	9.03a

[a] Mean within a row for each treatment (C, H and F) lacking a common letter (a through c) differ significantly ($P < 0.05$). C: control treatment, H: half strength treatment, F: full strength treatment.

ลูกชิ้นที่บรรจุแบบปกติมีลักษณะปรากฏ (overall appearance) ของเหลวในถุงบรรจุ (purge) เมือก กลิ่นเน่า และกลิ่นหืน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$) ตลอดระยะเวลาการเก็บ อย่างไรก็ตามตัวอย่างที่มีการใช้แบคทีริโอซินส่งผลให้ค่าของกลิ่นที่ผิดปกติสูงกว่าตัวอย่างควบคุม ทั้งนี้เนื่องจากกลิ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ (MRS broth) ใน CBS ยังคงมีอยู่มาก เป็นวาเหตุให้การยอมรับโดยรวมของตัวอย่างควบคุมจึงสูงกว่าตัวอย่างที่ใช้แบคทีริโอซิน อย่างมีนัยสำคัญ ในช่วงท้าย ๆ ของการเก็บ สำหรับลูกชิ้นที่บรรจุแบบสุญญากาศ (ภาพที่ 6.3) พบว่าตัวอย่างที่มีการใช้แบคทีริโอซิน มีค่า purge ที่สูงกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างชัดเจน ทั้งนี้การทำสุญญากาศเป็นการบีบรัดให้ของเหลวซึมออกจากตัวอย่าง นอกจากนี้หากแบคทีริโอซินไม่สูงเพียงพอแล้ว ยิ่งทำให้ส่งเสริมการเจริญของ จุลินทรีย์ให้สูงมากขึ้นได้ (Hugas, 1998) ทั้งนี้อาจสังเกตได้ว่า ตัวอย่างที่ใช้แบคทีริโอซินแบบ half strength จะมีปริมาณของจุลินทรีย์สูงกว่าในตัวอย่างควบคุมอีกด้วย อาจเนื่องจากปริมาณ purge นั่นเอง สำหรับปริมาณเมือก กลิ่นการหืน และกลิ่นเน่าเสีย ไม่พบความแตกต่างในทุก ๆ ตัวอย่างตลอดระยะเวลาการเก็บ แต่พบว่า ค่าสี และกลิ่นผิดปกติของตัวอย่างที่มีการใช้แบคทีริโอซินได้รับการยอมรับน้อยกว่าตัวอย่างควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) เนื่องจากสีและกลิ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งควรมีการทดลองต่อไปเพื่อกำจัดออกจาก CBS ก่อนการใช้กับผลิตภัณฑ์อาหาร



ภาพที่ 6.2 Sensory characteristics of pork meatballs during storage at 4 °C in aerobically packed condition: Control treatment (◆), Half strength treatment (■), Full strength treatment (▲).



ภาพที่ 6.3 Sensory characteristics of pork meatballs during storage at 4 °C in vacuum packed condition: Control treatment (◆), Half strength treatment (■), Full strength treatment (▲).

6.5 สรุปผลการทดลอง

แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocin supernatant, CBS) ที่ผลิตได้จาก LAB สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 โดยควบคุม pH ให้คงที่ที่ 6.5 ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อ เพื่อให้ได้แบคทีริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง เมื่อใช้กับผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูโดยจุ่มเคลือบผิวด้วย CBS ความเข้มข้นเต็มที่ (F-CBS) และเจือจางให้เจือจางลงครึ่งหนึ่ง (F-CBS) บรรจุลูกชิ้นเคลือบแล้วในถุงพลาสติกแบบปกติและแบบสุญญากาศ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าการบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ ตัวอย่างลูกชิ้นเคลือบด้วย F-CBS เก็บได้นานกว่า 12 วัน ขณะที่ ใช้ H-CBS และตัวอย่างควบคุมเก็บได้นานประมาณ 9 วัน ทำนองเดียวกันสำหรับการบรรจุแบบสุญญากาศ ลูกชิ้นเคลือบด้วย F-CBS เก็บได้นานกว่า 12 วัน ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบด้วย H-CBS และลูกชิ้นตัวอย่างเก็บได้นานเพียง 6 วัน (จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 1 x 10^5 cfu/g sample ตามมาตรฐาน มอก. 2533) ค่า pH และปริมาณกรดของตัวอย่างทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บ ค่าสีของตัวอย่างใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ลูกชิ้นที่เคลือบด้วย CBS มีสีเหลืองกว่าตัวอย่างควบคุม คุณภาพทางประสาทสัมผัสของลูกชิ้นทั้งหมดใกล้เคียงกัน แต่การยอมรับโดยรวม กลิ่นผิดปกติ และสีของลูกชิ้นเคลือบด้วย CBS ต่ำกว่าของลูกชิ้นควบคุม เนื่องจากสีและกลิ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต CBS ซึ่งควรมีการทดลองกำจัดสีและกลิ่นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

มอก.1009-2533. 2533. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นเนื้อวัว ลูกชิ้นหมู และลูกชิ้นไก่. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.

Benkerroum, N., Daoudi, A. and Kamal, M. 2003. Behaviour of Listeria monocytogenes in raw sausages (merguez) in presence of a bacteriocin-producing lactococcal strain as a protective culture. Meat Sci. 63:479-484.

Berghofer, L.K., Hocking, A.D., Miskelly, D. and Jansson, E. 2003. Microbiology of wheat and flour milling in Australia. Int. J. Food Microbiol. 85:137-149.

Borch, E., Kant-Muermans, M. and Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. Food Microbiol. 33:103-120.

Buncic, S., Avery, S.M., Rocourt, J. and Dimitrijevic, M. 2001. Can food-related environmental factors induce different behaviour in two key serovars, 4b and 1/2a, of Listeria monocytogenes. Int. J. Food Microbiol. 65:201-212.

Castano, A., García Fontán, M.C., Fresno, J.M., Tornadijo, M.E. and Carballo, J. 2002. Survival of Enterobacteriaceae during processing of Chorizo de cebolla, a Spanish fermented sausage. Food Control. 13:107-115.

Cutter, C.N. and Siragusa, G.R. 1998. Incorporation of nisin into a meat binding system to inhibit bacteria on beef surfaces. Lett. Appl. Microbiol. 27:19-23.

Davies, A. and Board, R. 1998. The microbiology of meat and poultry. London. Academic Press.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocin: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. Int. Dairy J. 16:1058-1071.

Dykes, G.A.,Cloete, T.E. and von Holly, A. 1991. Quantification of microbial populations associated with the manufacture of vacuum-packaged, smoked Vienna sausages. Int. J. Food. Microbiol. 13:239-248.

Holzapfel, W.H., Geisen, R.and Schillinger, U. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. J. Food Microbiol. 24:343-362.

Hugas, M. 1998. Bacteriogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Sci. 98:139-150.

Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P. and Hill, C. 1999. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. J. Food Prot. 62:1011-1016.

Nel, S., Lues, J.F.R., Buys, E.M. and Venter, P. 2004. Bacterial populations associated with meat from the deboning room of a high throughput red meat abattoir. Meat Sci. 66:667-674.

Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Peláez-Martínez, M.C. and Torre, A.H. 2006. Effect of a bacteriocin produced by Pediococcus acidilactici against Listeria monocytogenes and Clostridium perfringens on Spanish raw meat. Meat Sci. 72:57-61.

O'keeffe, T. and Hill, C. 1999. Bacteriocins/potential in food preservation. Encyclopedia of food Microbiology (vol.1) (pp 183-191). New York: Academic press.

Samelis L.K., Kakouri, A. and Ramentzis, J. 2000. Selective effect of the product type and the packaging conditions on the species of lactic acid bacteria dominating the spoilage microbial association of cooked meats at 4°C. Food Microbiol. 17:329-340.

SAS. 1993. SAS 6.08.04 WIN. Carry, NC: SAS Institute Inc.

Schillinger, U. and Lücke F. 1989. Antibacterial activity of Lactobacillus sake isolated from meat. Appl. Envi. Microbiol. 55:1901-1906.

Stone, H. and Sidel, J.L. 1985. Sensory evaluation practices. London. Academic Press.

Suma, K., Misra, M.C. and Varadaraj, M.C. 1998. Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of Lactobacillus plantarum NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. Int. J. Food Microbiol. 40:17-25.

Viana, E.S., Gomide, L.A.M. and Vanetti, M.C.D. 2005. Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. Meat Sci. 71:696-705.

บทที่ 7

การคัดและจำแนกแบคที่เรียทดสอบและการใช้แบคทีริโอซิน จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่

7.1 คำนำ

แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) สามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมบวกได้หลายชนิดรวมทั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเช่น *Staphylococcus aureus* (Ananou et al., 2005), *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* และ *Clostridium botulinum* (Ennahar et al., 1999; Cleveland et al., 2001) เป็นต้น และอาจจะมีผลยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้บ้างบางชนิด แต่ต้องมีการใช้ร่วมกับสารยับยั้งอื่น ๆ ด้วย เช่น disodium ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) เป็นต้น ได้แก่ *Pseudomonas fluorescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, Salmonella spp. (Sankuntaw et al., 2008; Stevens et al., 1991) นอกจากนี้สารแบคทีริโอซินบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราและยีสต์ได้อีกด้วย (Lavermicocca et al., 2000)

แบคทีริโอซินส่วนใหญ่มีคุณสมบัติทนต่ออุณหภูมิสูงได้ จึงเหมาะสมต่อการใช้กับอาหารเนื่องจากอาหารทั่วไปส่วนมากต้องผ่านกระบวนการแปรรูปโดยใช้ความร้อน ตัวอย่างเช่น แบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Pediococcus acidilactici* strain *hansen* มีความเสถียรต่ออุณหภูมิสูงที่ 115 °C นาน 15 นาที โดยมีค่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย *Pediococcus pentosaceus* Fbb 61 เท่ากับ 4000 BU/ml (Nieto-Lozano et al., 2002) การศึกษาของ Khalid et al. (1999) พบว่า แบคทีริโอซินที่สร้างจาก Lactobacillus strain LC-09 สามารถทนความร้อนได้สูงที่ 100 °C เป็นเวลานานถึง 4 ชั่วโมง และยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ระดับ pH ต่ำได้อีกด้วย นอกจากนี้ ไนซิน (nisin) ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินทางการค้ายังมีความสามารถในการทนความร้อนได้สูงที่ 121 °C นาน 15 นาที (Noonpakdee et al., 2003) แบคทีริโอซินอีกชนิดหนึ่งที่มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายได้คือ Pediocin ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารที่แช่ในตู้เย็นเน่าเสียได้แก่ *Brochothrix thermosphacta* พบได้ในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ต่าง ๆ ที่บรรจุในระบบสุญญากาศและเนื้อหมัก เป็นต้น (Ennahar et al., 1999) นอกจากนี้ Hugas (1998) ได้รายงานเกี่ยวกับการใช้ไนซินในผลิตภัณฑ์เนื้อต่าง ๆ ว่า มีประสิทธิภาพในการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ได้ดีน้อยกว่าการใช้ในผลิตภัณฑ์นม เนื่องจากไนซินมี ความสามารถในการละลายต่ำ (low solubility) การกระจายตัวไม่สม่ำเสมอ และขาดความเสถียร

การเสื่อมเสียของอาหารโดยทั่วไปมีสาเหตุมาจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบของอาหารเองด้วย โดยอาหารแต่ละชนิดมีระดับการเสื่อมเสียยากง่ายแตกต่างกันขึ้นอยู่กับ องค์ประกอบของอาหารได้แก่ ไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรท และแร่ธาตุเป็นต้น ปริมาณน้ำที่จุลินทรีย์ใช้ได้ (a_w) ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และสภาพบรรยากาศในสถานที่เก็บรักษา ปัจจัยต่าง ๆ เหล่านี้มีอิทธิพลอย่างยิ่งที่เป็นตัวกำหนดกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์เนื้อในแถบภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มักมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์เช่น Staphylococcus spp. และ Bacillus spp. เป็นต้น ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง (thermal tolerance pathogenic bacteria) และสามารถสร้างสปอร์ที่ทนต่อความร้อนสูงได้อีกด้วย โดยเฉพาะสปอร์ของเชื้อ *Bacillus cereus* ที่ยังสามารถเจริญได้ แม้ผ่านกระบวนการให้ความร้อนสูง (Anonymous, 2007)

จากผลการทดลองที่ทราบว่าแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ LAB สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 มีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และทำให้สามารถยืดอายุลูกชิ้นหมูได้ (บทที่ 6) โดยสามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 9 วันตามมาตรฐานจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 1 x 10^5 cfu/g sample (มอก. 1009-2533, 2536) ขณะที่ลูกชิ้นปกติเก็บได้นานเพียง 3 วันเท่านั้น เพื่อให้ทราบผลการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินว่ามีประสิทธิภาพที่เจาะจงต่อเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนลูกชิ้นที่ผลิตจากเฉพาะประเภทของเนื้อสัตว์ได้ดีเพียงใด การทดลองนี้จึงได้เก็บและคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มที่ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่มากที่สุด (dominant flora) พร้อมจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรีย และใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ (indicator bacteria) ที่เฉพาะสำหรับการตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ LAB สายพันธุ์ *Lc. lactis* TISTR 1401 ที่มีต่อการประยุกต์ใช้เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่ ทั้งนี้ได้ใช้แบคทีริโอซินที่ไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตได้เคลือบลูกชิ้น และใช้แบคทีริโอซินที่ไม่บริสุทธิ์แบบเข้มข้น (concentrate) และผงระเหิดแห้ง (freez dried powder) ผสมในสูตรผลิตลูกชิ้นไก่

7.2 วัตถุประสงค์

การศึกษานี้เพื่อได้ทราบข้อมูลประสิทธิภาพการยับยั้งจุลินทรีย์กลุ่มหลักที่ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่ของแบคทีริโอซินผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 และเพื่อศึกษาการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตได้กับลูกชิ้นไก่ ในรูปของเหลวเคลือบลูกชิ้น ของเหลวข้น และผงระเหิดแห้งผสมในสูตรผลิตลูกชิ้น พร้อมกับศึกษาการยืดอายุการเก็บและคุณภาพเปรียบเทียบกับผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นปกติ

7.3 อุปกรณ์และวิธีการ

7.3.1 การคัดและจำแนกเชื้อจุลินทรีย์จากลูกชิ้นไก่เพื่อใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ

ทำการผลิตลูกชิ้นไก่มีส่วนผสมประกอบด้วย เนื้ออกไก่ 80% น้ำแข็ง 15% แป้งมันสำปะหลัง 5% และจากมวลหลัก 100% เติมเกลือ 1.5% น้ำตาล 0.75% และ เกลือฟอสเฟส 0.3% มีกระบวนการผลิตตามบทที่ 6 เก็บตัวอย่างลูกชิ้นไก่อายุ 24 ชั่วโมง จำนวน 25 กรัม ใส่ถุงพลาสติก เติมน้ำเกลือปลอดเชื้อ (0.85% NaCl) 225 มิลลิลิตร ตีป่นในเครื่องตีป่น (Stomacher Lab-blender model 400, Seward, London, England) นาน 2 นาที และเจือจางต่อจนมีความเจือจาง 10^{-7} เท่า เพาะเชื้อบน plate count agar (PCA agar: Hi-media, Mumbai, India) แบบ spread plate บ่มเชื้อที่ 37 และ 45 °C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และที่ 10 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตและนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียโดยขีดลากบนวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA: Merck, Darmstadt, Germany) บ่มเชื้อที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เก็บแยกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียไว้ในหลอดอาหารวุ้น slant agar ที่ 4°C และเก็บเป็น stock culture (ในอาหารเหลวที่มี 10% skim milk) ที่ -40 °C

จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ประกอบด้วย ลักษณะทางสัณฐานของเซลล์และสปอร์ การติดสีย้อมเกรม การเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์ oxidase, catalase, oxidation-fermentation และระบุชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบสมบัติทางชีวเคมีของระบบ API (bioMérieux) และ/หรือ ส่งวิเคราะห์ที่ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

7.3.2 การผลิตแบคทีริโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401

ทำการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ตามวิธีการผลิตบทที่ 5 เตรียมแบคทีริโอซินจาก crude bacteriocin supernatant (CBS) ที่ได้ให้อยู่ในรูปแบบต่าง ๆ เพื่อใช้กับผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่ดังนี้

1) สาร CBS ปลอดเชื้อโดยกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ cellulose acetate membrane filter ขนาด 0.22 µm ได้สารละลายแบคทีริโอซินชนิด filtered crude bacteriocin supernatant (FCBS)

2) สาร CBS ผ่านการฆ่าเชื้อที่ 80 °C นาน 20 นาที ใน autoclave (LABO Autoclave, Sanyo, NB Scientific, Edison, NJ, USA) ได้สารละลาย heated crude bacteriocins supernatant (HCBS) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

3) สารละลาย CBS เข้มข้น โดยการระเหยแบบสุญญากาศ (rota evaporator) ที่อุณหภูมิ 40-60 °C ให้ความเข้มข้นขึ้น 10 เท่า ได้แบคทีริโอซินชนิด concentrated crude bacteriocin (CCB) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

4) แบคทีริโอซินผงแห้ง โดยการทำ CBS ให้แห้งแบบระเหิดแห้ง ได้แบคทีริโอซินชนิด freeze dried crude bacteriocins (FDCB) เก็บในตู้ดูดความชื้น (desiccator cabinet) อุณหภูมิ 4 °C

ตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีริโอซินที่เตรียมได้ในรูปต่าง ๆ ด้วยวิธี agar well diffusion ดัดแปลงจาก Mogan et al. (1999) และ Nieto-Lozano et al. (2006) วิธีในข้อ 5.3.6 บทที่ 5

7.3.3 การใช้แบคทีริโอซินกับผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นไก่

ทำการผลิตลูกชิ้นไก่เพื่อทดลองการใช้และประสิทธิภาพการยืดอายุของสารแบคทีริโอซินชนิดต่าง ๆ ใช้เนื้ออกไก่จาก หจก.สหฟาร์ม จังหวัดนครราชสีมา บดผ่านตะแกรงรูขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วสับผสมกับส่วนผสมต่างๆ ตามข้อ 7.3.1 บรรจุมวลสับผสมในไส้ cellophane ขนานเส้นผ่านศูนย์กลาง 22 มิลลิเมตร ไล่อากาศ แล้วมัดเป็นท่อน ๆ ยาวประมาณ 6 นิ้ว ต้มให้ความร้อน อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 20 นาที แล้วเพิ่มเป็น 80 °C เป็นเวลา 30 นาที แช่ในน้ำเย็น อุณหภูมิ 10 °C ลอกไส้ cellophane ที่หุ้มออก แล้วตัดเป็นชิ้นขนาด 20 ± 2 มิลลิเมตร เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

ทำการทดลองการยับยั้งและยืดอายุลูกชิ้นไก่ด้วยแบคทีริโอซินชนิดต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ดังต่อไปนี้

1) ใช้แบคทีริโอซินของเหลวเคลือบผิวลูกชิ้นไก่ ชนิดปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง FCBS มีประสิทธิภาพยับยั้ง 5,333.3 AU/ml และชนิดปลอดเชื้อด้วยความร้อน HCBS มีประสิทธิภาพยับยั้ง 5,333.3 AU/ml และใช้ nisin (Fluka; 72535 nisin from Streptococcus lactic, UK) ความเข้มข้น 0.2% มีประสิทธิภาพยับยั้ง 6,400 AU/ml เป็น negative control และตัวอย่างลูกชิ้นควบคุม (positive control) ทำการคลุกเคล้าให้แบคทีริโอซินเคลือบบนผิวของลูกชิ้นไก่ให้สม่ำเสมอเป็นเวลา 5 นาที แล้วผึ่งให้แห้งที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 10 นาที แบ่งบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ (aerobically packaged) และแบบสุญญากาศ (vacuum packaged) เก็บลูกชิ้นไก่ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพการเก็บรักษาเป็นเวลา 12-21 วัน และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ เคมีและกายภาพทุก 3 วัน

2) ใช้แบคทีริโอซินชนิดของเหลวข้นและชนิดผงแห้งผสมในส่วนผสมลูกชิ้นไก่ ชนิดของเหลวข้น CCB มีประสิทธิภาพยับยั้ง 3,200 AU/ml และชนิดผงแห้ง (freeze dried crude bacteriocins: FDCB) มีประสิทธิภาพยับยั้ง 6,400 AU/ml ใช้ในสูตรส่วนผสมลูกชิ้นปริมาณ 0.2% และใช้ nisin มีประสิทธิภาพยับยั้ง 6,400 AU/ml ปริมาณ 0.2% และตัวอย่างลูกชิ้นควบคุม ทำการแบ่งบรรจุลูกชิ้น

แบบปกติ และแบบสุญญากาศ เก็บลูกชิ้นไก่ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อทำการวิเคราะห์คุณภาพการเก็บรักษาเป็นเวลา 12-21 วัน และเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์เคมีและกายภาพทุก 3 วัน

7.3.4 การวิเคราะห์คุณภาพของลูกชิ้นไก่

7.3.4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์

วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (total plate count) และปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก โดยวิธีตาม AOAC (1997), Ananou et al. (2005) และ Viana et al. (2005) ชั่งตัวอย่างลูกชิ้นไก่ 10 กรัม เติม 0.1% peptone water (Hi-media, Mumbai, India) ปลอดเชื้อจำนวน 90 มิลลิลิตร ตีป่นด้วยเครื่องตีป่น (Stomacher Lab-blender model 400, Seward, London, England) ที่ระดับความเร็วปานกลาง เป็นเวลา 1 นาที และที่ระดับความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 1 นาที เตรียมความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ด้วย 0.1% peptone water เพาะเชื้อแบบ spread plate บนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA agar (Hi-media, Mumbai, India) สำหรับการหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Hi-media, Mumbai, India) สำหรับการหาปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติก บ่มที่อุณหภูมิ 30 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ในสภาวะไร้อากาศ ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้ออยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี คำนวณค่าเฉลี่ยและรายงานผลเป็นหน่วย log cfu/g

การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของลูกชิ้นไก่ โดยสุ่มตัวอย่างลูกชิ้น วัด pH ด้วยเครื่อง meat pH meter แบบ probe แทง (Hanna; HI99163 pH/temperature meter, Italy)

7.3.4.2 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ ทางเคมี และทางกายภาพ โดยวิเคราะห์ 3 ซ้ำในทุกชุดการทดลอง วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) วางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's Multiple Range Test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$) ด้วยโปรแกรม Statistical Analysis System (SAS institute, Inc., 1993)

7.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

7.4.1 การแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียทดสอบจากลูกชิ้นไก่

เชื้อแบคทีเรียชนิดที่ปนเปื้อนมาก (dominant flora) ในตัวอย่างลูกชิ้นไก่ประกอบด้วยเชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมด 3 isolates คือ PN-1, PN-2 และ PN-3 ซึ่งปริมาณเชื้อที่ปนเปื้อนคิดเป็น 3%, 12% และ 85% ตามลำดับ ดังผลการทดสอบคุณสมบัติในตารางที่ 7.1 โดยทั้ง 3 isolates สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิบ่ม 37 และ 45 °C ภายในเวลา 18-24 ชั่วโมง เมื่อเทียบเปรียบกับอุณหภูมิ 10 °C ที่มีเฉพาะ PN-2 และ PN-3 ที่สามารถเจริญได้ แต่ต้องใช้เวลานานถึง 48 ชั่วโมง แสดงว่ากลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนและเป็นสาเหตุของการเน่าเสียในลูกชิ้นไก่ ส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม mesophile

แบคทีเรียกลุ่ม mesophile เป็นกลุ่มที่สร้างความเสื่อมเสียแก่อาหารได้มากที่สุดกลุ่มหนึ่ง สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 25-45 °C โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีบทบาทตั้งแต่กระบวนการผลิต ขนส่ง และการจัดเก็บ (Borch et al., 1996; เชื้อแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนได้บ่อยได้แก่ Salmonella และ Staphylococcus เป็นต้น

ตารางที่ 7.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียทดสอบ

Tests	Bacteria strain		
	PN-1	PN-2	PN-3
Viable cell population	3%	12%	85%
Growth at temperature:			
10 °C	-	+	+
37 °C	+	+	+
45 °C	+	+	+
Colony:			
Color	Yellow	White	White- yellow
Form	Circular	Circular	Spindle
Size(mm.)	1-2	1-2	2-3
Margin	Entire	Entire	Undulate
Surface	Smooth	Smooth	Smooth
Elevation	Convex	Convex	Raised

ตารางที่ 7.1 (ต่อ)

Tests	Bacteria strain		
	PN-1	**PN-2**	**PN-3**
Shape	Cocci	Cocci	Rod
Size (μm)	0.79	0.68	2.66/0.69
Gram stain	+	+	+ ve
Arrangement	Pairs/Tetrads	Tetrads	Pairs
Endospore	-	-	+
Motility	-	-	-
Oxidase	-	-	-
Catalase	-	+	+
O-F test	+,+	+,+	-,-
Aerobic growth	+	+	+
Anaerobic growth	+	+	+
Fermentative production of acid from:			
Glycerol	ND	ND	-
Erythritol	ND	ND	-
D-arabinose	ND	ND	-
L-arabinose	ND	ND	-
D-ribose	ND	ND	-
D-xylose	+	-	-
L-xylose	ND	ND	-
D-adonitol	ND	ND	-
Methy-βD-xylopyranoside	ND	ND	-
D-galactose	ND	ND	-
D-glucose	+	+	-
D-fructose	+	-	-
D-mannose	+	-	-
L-sorbose	ND	ND	-
L-rhamnose	ND	ND	-

ตารางที่ 7.1 (ต่อ)

Tests	Bacteria strain		
	PN-1	PN-2	PN-3
Inositol	ND	ND	-
D-mannitol	+	+	-
D-sorbitol	ND	ND	-
Methyl-αD-mannopyranoside	ND	ND	-
Methyl-αD-glucopyranoside	ND	ND	-
N-acetylglucosamine	+	+	+
Amygdaline	ND	ND	-
Arbutine	ND	ND	-
Esculine ferric citrate	ND	ND	-
Fermentative production of acid from:			
Salicine	ND	ND	-
D-cellobiose	ND	ND	-
D-maltose	ND	ND	-
D-lactose (bovine origin)	ND	ND	-
D-melibiose	+	-	-
D-saccharose (sucrose)	+	+	-
D-trehalose	+	+	-
Inuline	ND	ND	-
D-melezitose	ND	ND	-
D-raffinose	ND	ND	-
Amidon (starch)	ND	ND	-
Glycogen	ND	ND	-
Xylitol	+	-	-
Gentiobiose	ND	ND	-
D-turanose	ND	ND	-
D-lyxose	ND	ND	-
D-tagatose	ND	ND	-
D-fucose	ND	ND	-

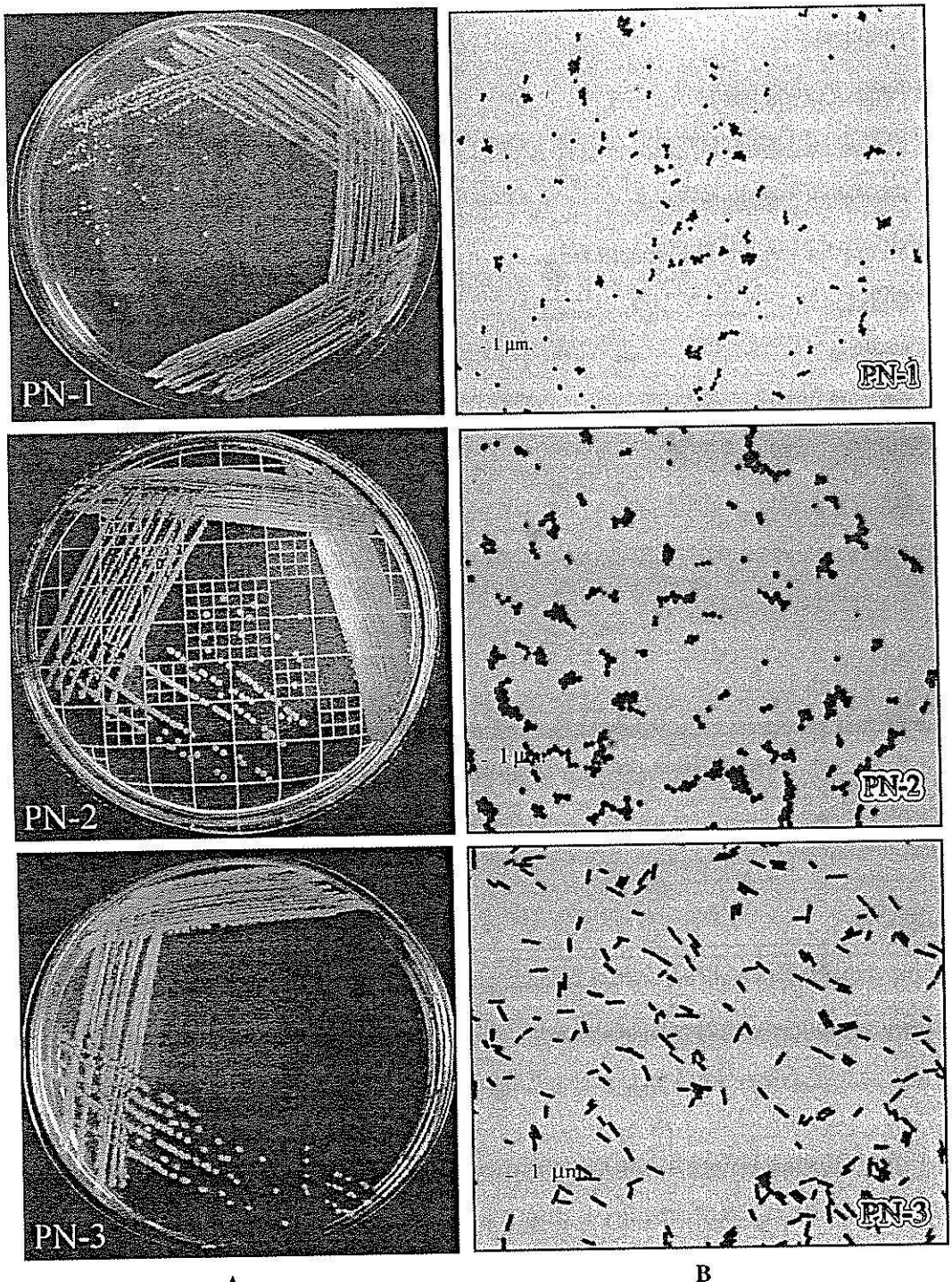
ตารางที่ 7.1 (ต่อ)

Tests	Bacteria strain		
	PN-1	**PN-2**	**PN-3**
D-arabitol	ND	ND	-
L- arabitol	ND	ND	-
Potassium gluconate	ND	ND	-
Potassium 2-ketogluconate	ND	ND	-
Potassium 5-ketogluconate	ND	ND	-
Fermentative production of acid from:			
Maltose	+	+	ND
Lactose	+	+	ND
Potassium nitrate	+	-	ND
β-naphthyl-acid phosphate	+	-	ND
Sodium pyruvate	+	-	ND
Raffinose	+	-	ND
α-methyl-D-glucoside	+	-	ND
Arginine	+	-	ND
Urea	-	+	ND
Identification result according to biochemical characteristics			
Closest relative	*Staphylococcus lentus*	*Staphylococcus saprophyticus*	*Bacillus* spp.
Identity (%)	90.8	87.9	ND

[a] = API system (API STAPH for cocci belonging to genera *Staphylococcus* and *Micrococcus*; API 50 CH/B for bacilli having spores; bioMérieux (ผลวิเคราะห์จาก วว.), + = Positive test, - = Negative test, ND = Not detect, + ve = Gram positive bacteria, - ve = Gram negative bacteria

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรีย และสมบัติทางชีวเคมีบางประการของเชื้อทั้ง 3 isolates พบว่า ลักษณะโคโลนีของ PN-1 และ PN-2 คล้ายคลึงกันในด้านขนาด รูปร่าง ระดับความนูน และขอบริมของโคโลนีคือ มีขนาดเล็ก (1-2 mm.) รูปร่างกลม โค้งนูน และมีขอบริมเรียบ แต่แตกต่างกันในด้านสีคือ สีเหลือง และสีขาว ตามลำดับ ส่วน PN-3 มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างจาก PN-1 และ PN-2 คือ มีขนาดใหญ่กว่า (2-3 mm.) รูปร่างกลมรี มีความโค้งนูนน้อยกว่า สีขาวแกม

เหลือง และมีขอบริมหยักเล็กน้อย ลักษณะเซลล์ของ PN-1 และ PN-2 มีรูปร่างเซลล์กลม มีการเรียงตัวเป็น tetrads ส่วน PN-3 มีรูปร่างเซลล์แท่ง มีการเรียงตัวเป็น pairs ตัวอย่างของลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโคโลนีและเซลล์แสดงในภาพที่ 7.1A และ 7.1B ตามลำดับ



A B

ภาพที่ 7.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกชิ้นไก่ (A) ลักษณะโคโลนี และ (B) ลักษณะเซลล์

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแต่ละ isolate มีความแตกต่างกันในรายละเอียดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 7.1 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของทั้ง 3 isolates ในการเคลื่อนที่ และการสร้างเอนไซม์บางชนิดพบว่า เชื้อแบคทีเรียแต่ละ isolate มีความสามารถแตกต่างกัน เชื้อแบคทีเรียทุก isolates ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase PN-1 และ PN-2 สามารถเจริญได้ดีในทั้งสภาวะอากาศที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน ส่วน PN-3 สามารถเจริญได้ดีในสภาวะอากาศที่มีออกซิเจน และมีการเจริญได้บ้างเล็กน้อยในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase พบว่า มีเพียง PN-1 ที่สามารถสร้างได้

การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น และด้วยชุดทดสอบระบบ API ของกลุ่มเชื้อแบคทีเรีย PN-1 และ PN-2 ที่มีลักษณะเซลล์เป็น cocci, Gram positive OF เป็นบวก (O+F+) และทดสอบด้วยชุดทดสอบ API STAPH จัดจำแนกกลุ่มนี้เป็น Staphylococcus สำหรับ PN-3 มี ลักษณะเซลล์เป็น rod ติดสีแกรมบวก มีการสร้าง endospore ไม่สร้างเอนไซม์ oxidase และเมื่อทดสอบด้วย OF mediumให้ผลเป็นลบ (O-F-) การทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CH/B จัดจำแนกกลุ่มนี้เป็น Bacillus พบว่า ชุดทดสอบ API STAPH สามารถระบุสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียเป็นที่น่ายอมรับได้ โดยเชื้อ PN-1 มีความใกล้เคียงกับ *Stap. lentus* มีเปอร์เซนต์ความถูกต้อง (% ID) เท่ากับ 90.8% และเชื้อ PN-2 มีความใกล้เคียงกับ *Stap. saprophyticus* มีเปอร์เซนต์ความถูกต้อง (% ID) เท่ากับ 87.9% แตกต่างกับเชื้อ PN-3 ที่วิเคราะห์ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH/B (อ้างอิงผลวิเคราะห์จาก วว.) ที่ไม่สามารถระบุชื่อและสกุลของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ได้ เนื่องจากให้ผลไม่ชัดเจนในกลุ่มของ Bacillus

จากผลการศึกษาการแยกและจำแนกแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในลูกชิ้นไก่ จึงได้ใช้เชื้อทั้ง 3 strains คือ *Staphylococcus lentus* (PN-1), *Stap. saprophyticus* (PN-2) และ *Bacillus spp.* (PN-3) เป็นแบคทีเรียทดสอบทั้งหมด เพื่อเป็นดัชนีบ่งชี้การยับยั้งของสารแบคทีริโอซินที่ได้จาก *lactococcus lactis* TISTR 1401 เปรียบเทียบกับสารแบคทีริโอซินผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์อื่นอีก 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 7.2) และเป็นการสนับสนุนการใช้แบคทีริโอซินจาก *lactococcus lactis* TISTR 1401 สำหรับยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่

7.4.2 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบคัดแยกจากลูกชิ้นไก่ของแบคทีริโอซินผลิตจาก *lactococcus lactis* TISTR 1401

ประสิทธิภาพของ CBS ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้งหมด 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 7.2) พบว่า สาร CBS ที่สร้างจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบมากที่สุด เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อได้มากถึง 6 สายพันธุ์ได้แก่ *Stap. saprophyticus*, *Bacillus* spp. strain PN-3, *Stap. aureus* TISTR 118, *B. subtilis* TISTR 008, *B. cereus*

TISTR 687 และ *Bacillus* sp. TISTR 908 รองลงมาคือ สาร CBS ที่สร้างจากเชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 1338 โดยให้ผลยับยั้งต่อเชื้อเพียง 3 สายพันธุ์

ตารางที่ 7.2 ความสามารถยับยั้งของแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก LAB ต่อแบคทีเรียทดสอบ โดยวัดขนาดวงใส หน่วยเป็นมิลลิเมตร (mm.)

Indicator bacteria	**Average diameter of inhibition zone (mm.) of indicator bacteria**				
	Ped. acidilactici TISTR 051	*Ped. acidilactici* TISTR 424	*Ped. acidilactici* TISTR 425	*Lb. acidophilus* TISTR 1338	*Lc. lactis* TISTR 1401
Stap. lentus	-	-	-	-	-
Stap. Saprophyticus	-	-	-	7.8	9.6
Bacillus spp.	19.3	18.9	19.5	21.0	22.5
Stap. aureus TISTR 118	-	-	-	6.1	10.5
Bac. subtilis TISTR 008	-	-	-	-	15.3
Bac. cereus TISTR 687	-	-	-	-	15.0
Bacillus sp. TISTR 908	-	-	-	-	17.0
E. coli TISTR 780	-	-	-	-	-

- = ไม่เกิดวงใส

ดังนั้นเชื้อ *Lc. lactis* TISTR1401 จึงเป็นเชื้อ LAB ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคทีริโอซิน เพื่อใช้ต้านแบคทีเรีย แกรมบวก (Stecchini et al., 1992) ส่วนมากที่เป็นสาเหตุทำให้อาหารเน่าเสียได้ ซึ่ง

สอดคล้องกับผลการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียทดสอบทั่วไปที่มีแกรมบวกของ nisin ที่สร้างโดยเชื้อ *Lc. lactis* strain จากไส้กรอกหมักแห้ง (Rodriguez et al., 1995) และงานวิจัยของ Gosaarak (2006) พบว่า เชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 สามารถสร้างแบคทีริโอซิน ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกหลายสายพันธุ์ได้แก่ *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B. subtilis* TISTR 008, *Lb. sake* TISTR 911, *Leuconostoc mesenteriodes* TISTR 053, *Ped. acidilactici* TISTR 051, *Lb. plantarum* และ *Stap. aureus* TISTR 118 เป็นต้น

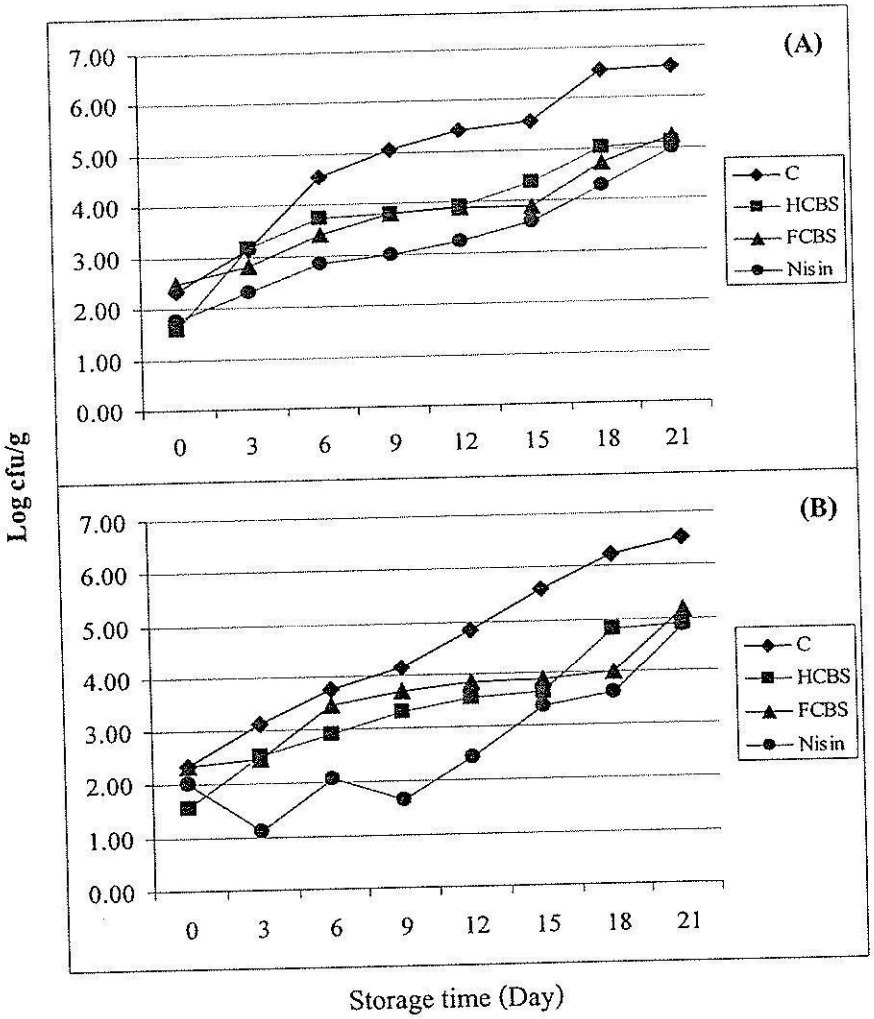
7.4.3 ผลการใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์เคลือบลูกชิ้นไก่

ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ ผลิตได้จาก *Latococcus lactis* TISTR 1401 ชนิดปลอดเชื้อด้วยการกรองผ่านเยื่อกรอง (FCBS) และผ่านความร้อนที่ 80 °C (HCBS) และ nisin บรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ และเก็บรักษาที่ 4 °C เวลา 21 วัน ปรากฏดังภาพที่ 7.2 พบว่า ลูกชิ้นบรรจุแบบปกติ ตัวอย่างควบคุมมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงถึง 5.05 log cfu/g ภายในวันที่ 9 ขณะที่ตัวอย่างทั้งหมดที่มากกว่าลูกชิ้นเคลือบด้วยแบคทีริโอซินสมารถเก็บต่อไปได้อีกจนถึงประมาณวันที่ 18 ของการเก็บรักษา (ภาพที่ 7.2 A) ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าการใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 เคลือบผิวลูกชิ้นไก่สามารถทำให้เก็บลูกชิ้นบรรจุแบบปกติ ที่ 4 °C ได้นานออกไปอีกประมาณ 9 วัน เมื่อพิจารณาจากจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดของตัวอย่าง และตามมาตรฐาน มอก.1009-2533 (2536) ทั้งนี้ประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ใช้ทั้ง 2 รูปแบบคือ FCBS และ HCBS มีผลใกล้เคียงกับสารทางการค้า คือ nisin มาก

สำหรับลูกชิ้นไก่บรรจุแบบสุญญากาศ (ภาพที่ 7.2 B) ลูกชิ้นไก่ทุกชนิดของการทดลองมีการเจริญของเชื้อแบคที่เรียในเวลาที่นานออกไปอีก แต่อย่างไรก็ตาม ตัวอย่างลูกชิ้นควบคุมก็ยังคงมีอายุการเก็บที่สั้นกว่าลูกชิ้นที่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินทางการค้า nisin และแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 ทั้ง 2 ชนิดด้วยเช่นกัน ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของลูกชิ้นควบคุมสูงถึง 10^5 cfu/g หรือ 5 log cfu/g ในวันที่ 12 (วันที่ 9 สำหรับการบรรจุปกติ) ขณะที่ตัวอย่างลูกชิ้นที่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ทั้งแบบ FCBS และ HCBS มีปริมาณ 5 log cfu/g ประมาณวันที่ 21 เช่นเดียวกับตัวอย่างลูกชิ้นที่เคลือบด้วย nisin

เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) เป็นเชื้อแบคทีเรียอีกกลุ่มหนึ่งที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของลูกชิ้นเก็บรักษาในตู้เย็นหรือที่อุณหภูมิต่ำ ทำให้ผิวของลูกชิ้นมีลักษณะเป็นเมือก (slime surface) เกิดก๊าซ (gassing) และกลิ่นรสเปรี้ยว (souring) เป็นต้น กลุ่มเชื้อ LAB ที่ทำให้อาหารเน่าเสียชนิดที่พบและเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Leuconostoc* sp. (Samelis

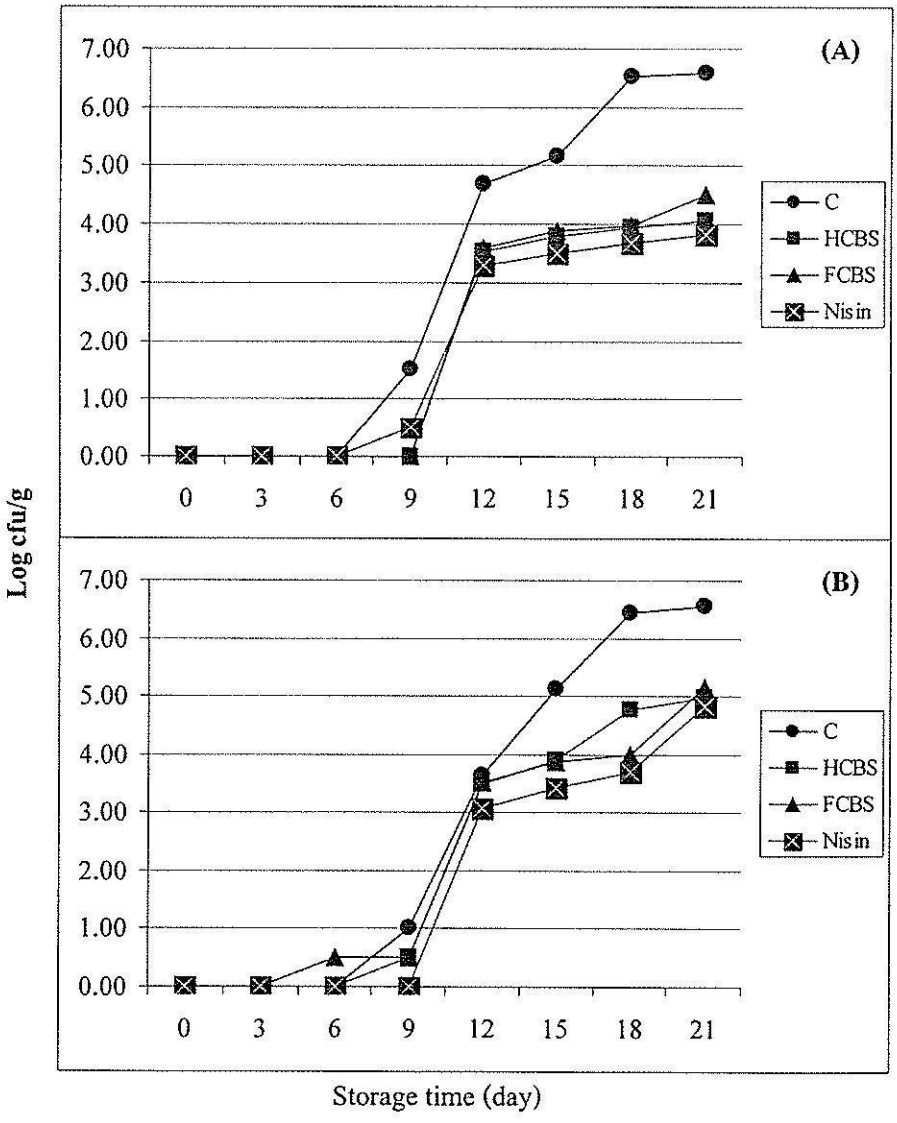
et al., 2006), *Streptococcus faecium*, *Strep. faecalis* และ *Microbacterium thermosphactum* (ชื่อปัจจุบันคือ *Brochothrix thermosphacta*) (Holy et al., 1992) เป็นต้น



ภาพที่ 7.2 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) ของลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C, A = aerobic packaging, B = vacuum packaging, C = control, HCBS = heated crude bacteriocin supernatant และ FCBA = filtered crude bacteriocin supernatant

สำหรับการทดลองนี้ พบว่าตัวอย่างลูกชิ้นไก่บรรจุทั้ง 2 สภาวะเริ่มมีปริมาณ LAB เจริญขึ้นในวันที่ 9 ของการเก็บรักษา และหลังจากนั้นตัวอย่างลูกชิ้นควบคุมมีปริมาณ LAB สูงกว่าตัวอย่างลูกชิ้นที่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินทั้งชนิด FCBS และ HCBS ตลอดระยะการเก็บช่วงสุดท้ายของการเก็บ ดังแสดงในภาพที่ 7.3 ทั้งนี้การบรรจุแบบปกติลูกชิ้นควบคุมมีเชื้อ LAB สูงถึง 5.17 log cfu/g ในวันที่ 15 ขณะที่ตัวอย่างลูกชิ้นเคลือบด้วย HCBS, FCBS และ nisin มีเชื้อ LAB เพียง 3.79, 3.88 และ 3.51 log

cfu/g ตามลำดับ และการบรรจุแบบสุญญากาศมีเชื้อ LAB สูงถึง 5.11 log cfu/g ในวันที่ 15 ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบด้วย HCBS, FCBS และ nisin มี LAB เพียง 3.89, 3.87 และ 3.43 log cfu/g ตามลำดับเท่านั้น และตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 21 วัน ลูกชิ้นไก่ไม่มีลักษณะเป็นเมือกเยิ้มหรือมีกลิ่นเหม็นเปรี้ยว เนื่องจากผลของปริมาณ LAB ทั้งหมดที่พบในลูกชิ้นทุกชนิดนั้นต่ำกว่า 10^7-10^8 cfu/g ซึ่งเป็นปริมาณที่ไม่มากพอ สำหรับการสร้างกรดและปล่อยออกมาในสิ่งแวดล้อมของเชื้อ LAB (Kun et al., 2008)



ภาพที่ 7.3 ปริมาณ LAB (log cfu/g) ของลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4°C, A = aerobic packaging, B = vacuum packaging, C = control, HCBS = heated crude bacteriocin supernatant และ FCBA = filtered crude bacteriocin supernatant

จากผลของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้หมด และตามมาตรฐาน มอก. 1009-2533. (2536) อาจสรุปได้ว่าแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตได้จากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 สามารถใช้เคลือบผิวลูกชิ้นไก่ได้และทำให้สามารถยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่ที่บรรจุทั้งแบบปกติและแบบสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น หรือ 4 °C ได้นานกว่าลูกชิ้นปกติเก็บ ณ สภาวะเดียวกันประมาณ 9 วัน นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ของ FCBS, HCBS และไนซิน ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงได้เลือกใช้แบคทีริโอซินชนิด HCBS สำหรับการทดลองต่อไป เพราะเตรียมได้ง่ายและสะดวกกว่าแบบ FCBS

ลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินทุกชนิดมีค่า pH แสดงดังตารางที่ 7.3 ลูกชิ้นทุกชนิดมีค่า pH แตกต่างกันเล็กน้อย ($p < 0.05$) เมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้นทั้งในสภาวะการบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ โดยมีช่วง pH เท่ากับ 6.17-6.30 และมีค่าไม่แตกต่างกับค่า pH ของมวลสับผสม (batter) ของลูกชิ้น คือ 6.30 (ไม่ได้แสดงผล) ค่า pH ของอาหารเป็นตัวกำหนดชนิด และปริมาณของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารได้ โดยทั่วไปแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญได้ดีในช่วง pH ที่เป็นกลางและค่อนข้างไปทางด่างอ่อน (pH 7-9) ดังนั้นเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ที่มี pH สูง จึงเกิดการเน่าเสียได้ง่ายกว่าเนื้อสัตว์ที่มี pH ต่ำ ($pH < 6$) (Borch et al., 1996)

ตารางที่ 7.3 ค่า pH ของลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C

Storage time (days)	pH							
	Aerobic Packaging				Vacuum Packaging			
	C	HCBS	FCBS	Nisin	C	HCBS	FCBS	Nisin
0	6.27a[(1)]	6.28a	6.22b	6.20c	6.28a	6.24b	6.20b	6.22b
3	6.28a	6.27a	6.20b	6.20b	6.30a	6.26b	6.21c	6.23bc
6	6.27a	6.23ab	6.18b	6.19b	6.28a	6.24b	6.20b	6.23b
9	6.26a	6.22ab	6.18bc	6.17c	6.28a	6.23b	6.19b	6.23b
12	6.27a	6.22bc	6.23ab	6.18c	6.27a	6.23b	6.20b	6.22b
15	6.26a	6.23a	6.18b	6.17b	6.28a	6.24ab	6.21b	6.20b
18	6.27a	6.22b	6.18c	6.18c	6.23a	6.25a	6.22a	6.22a
21	6.27a	6.22b	6.18c	6.18c	6.22a	6.25a	6.20a	6.20a

[(1)] ตัวอักษรที่แตกต่างกันในแนวนอน= มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$), n= 6.

7.4.4 ผลการใช้แบคทีริโอซินผสมในส่วนผสมลูกชิ้นไก่

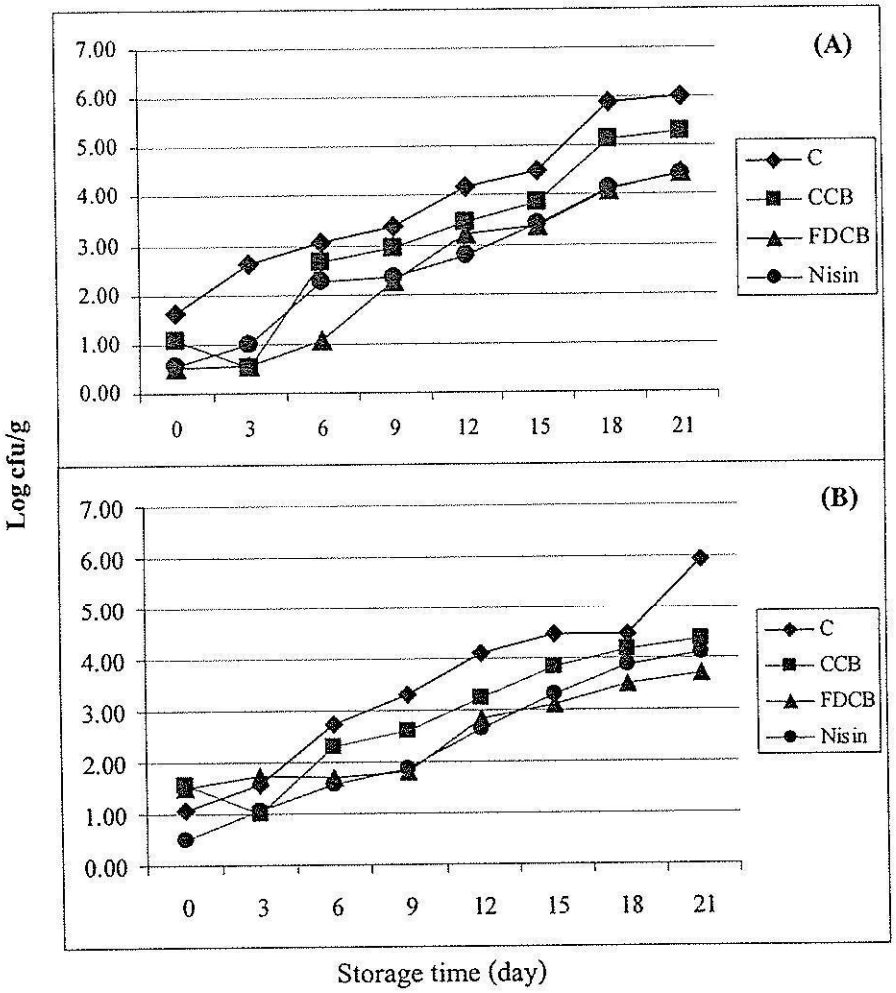
การผสมแบคทีริโอซินเข้มข้น 2 ชนิดคือ concentrated crude bactericin (CCB) และ freeze dried crude bacteriocin (FDCB) และ nisin ในมวลสับผสม (batter) ของลูกชิ้นไก่ และลูกชิ้นที่ไม่มีการเติมสารแบคทีริโอซิน มีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดดังแสดงในภาพที่ 7.4 พบว่า ในสภาวะบรรจุแบบปกติ (ภาพที่ 7.4 A) ปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดของลูกชิ้นผสมสารแบคทีริโอซินทั้ง 2 ชนิด และไนซินมีปริมาณต่ำกว่าลูกชิ้นควบคุมตลอดระยะเวลาการเก็บ ลูกชิ้นควบคุมมีอายุการเก็บประมาณ 15 วัน มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 4.46 log cfu/g ขณะที่ลูกชิ้นผสมแบคทีริโอซินแบบ CCB มีจำนวน 5.14 log cfu/g ในวันที่ 18 วัน ลูกชิ้นผสม FDCB กับลูกชิ้นผสม nisin เก็บได้นานขึ้นถึง 21 วัน มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 4.09 และ 4.12 log cfu/g ตามลำดับ ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของ FDCB และ nisin ใกล้เคียงกันมาก

การเก็บตัวลูกชิ้นแบบสุญญากาศ และที่ 4 °C ลูกชิ้นควบคุมมีอายุการเก็บได้ประมาณ 18 วัน จำนวนจุลินทรีย์เท่ากับ 4.47 log cfu/g ขณะที่ลูกชิ้นผสมแบคทีริโอซินทุกชนิด รวมทั้งไนซินสามารถเก็บได้นานกว่า 21วัน ผลการวิเคราะห์ ณ วันที่ 21 ลูกชิ้นผสม CCB มีจำนวนนับเท่ากับ 4.36 log cfu/g ลูกชิ้นผสม FDCB มีจำนวนนับเท่ากับ 3.71 log cfu/g และลูกชิ้นผสม nisinมีจำนวนนับเท่ากับ 4.09 log cfu/g ลูกชิ้นผสม ทั้งนี้ตลอดเวลาการเก็บ ตัวอย่างลูกชิ้นควบคุมมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงกว่าตัวอย่างที่เติมแบคทีริโอซิน และ nisin ในสูตรมวลสับผสมของลูกชิ้น แต่อย่างไรก็ตามปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดของตัวอย่างบรรจุแบบปกติมีจำนวนจุลินทรีย์สูงกว่าตัวอย่างที่บบรรจุแบบสุญญากาศ (ภาพที่ 7.4 A และ 7.4 B)

ปริมาณ LAB ทั้งหมดในลูกชิ้นไก่ดังแสดงในภาพที่ 7.5 เริ่มตรวจพบเชื้อ LAB ในตัวอย่างได้ในวันที่ 9 ของการเก็บรักษา ลูกชิ้นผสมแบคทีริโอซินทั้ง 2 ชนิด และไนซินมีปริมาณ LAB ทั้งหมดต่ำกว่าเมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุม ที่สภาวะการบรรจุแบบปกติ (ภาพที่ 7.5 A) ในวันที่ 18 ลูกชิ้นควบคุมมี 5.87 log cfu/g ขณะที่ลูกชิ้นผสมแบคทีริโอซินชนิด CCB และ FDCB และ nisin มี 5.29, 4.22 และ 4.16 log cfu/g ตามลำดับ และในสภาวะการบรรจุแบบสุญญากาศ (ภาพที่ 7.5B) ลูกชิ้นควบคุมมี 4.47 log cfu/g ขณะที่ลูกชิ้นผสมแบคทีริโอซินชนิด CCB และ FDCB และ nisis มี 4.18, 4.22 และ 4.12 log cfu/g ตามลำดับ ทั้งนี้เห็นได้ว่าการใช้แบคทีริโอวินผสมในมวลสับผสมของลูกชิ้นและบรรจุแบบสุญญากาศมีปริมาณเชื้อ LAB ต่ำกว่าเมื่อบรรจุแบบปกติ เก็บ ณ อุหภูมิเดียวกัน

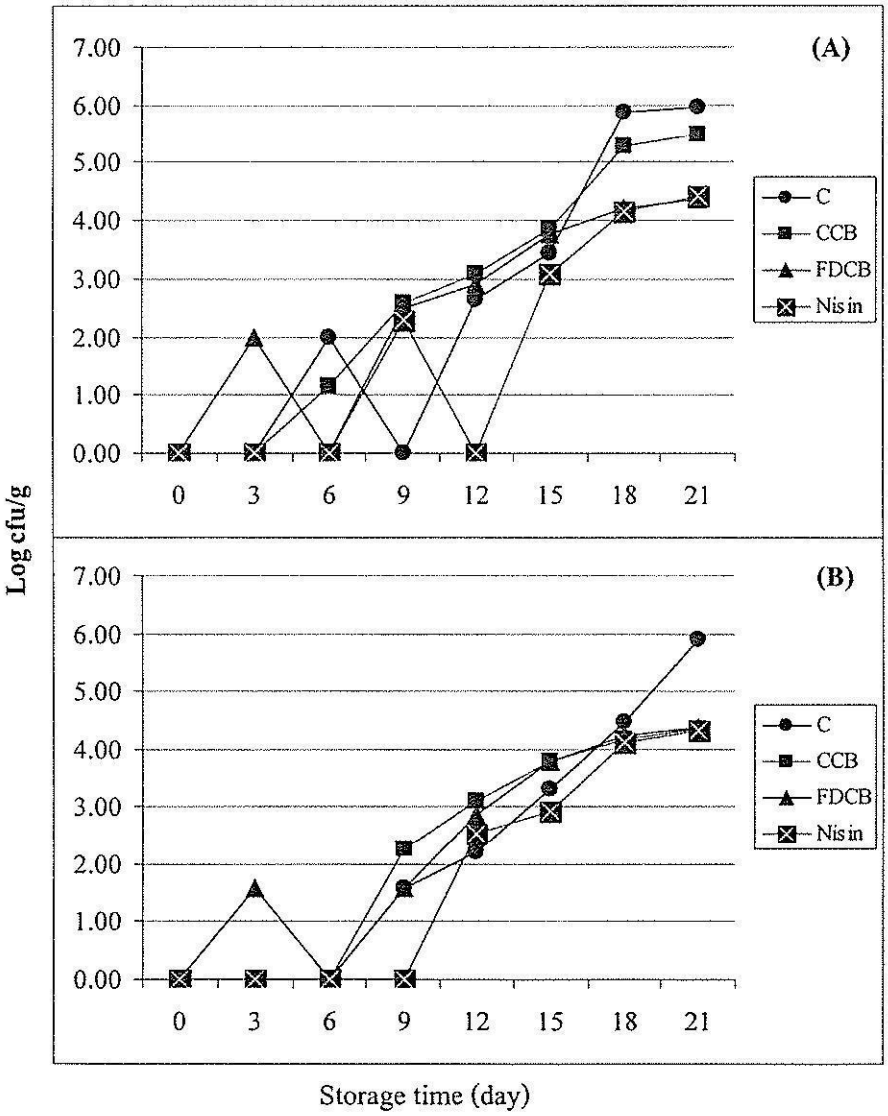
จากผลของปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ทั้หมด และตามมาตรฐาน มอก. 1009-2533. (2536) อาจสรุปได้ว่าเมื่อใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตได้จากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 ในรูปแบบเข้มข้นและผงแห้งผสมในสูตรการผลิตลูกชิ้น ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่ที่บรรจุทั้งแบบปกติและแบบสุญญากาศ เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น หรือ 4 °C ได้นานกว่าลูกชิ้นปกติเก็บ ณ สภาวะเดียวกัน โดยพบว่าการบรรจุแบบปกติเก็บตัวอย่างลูกชิ้นควบคุมได้นานประมาณ 15 วัน ขณะที่แบบสุญญากาศเก็บได้นาน

ประมาณ 18 วัน แต่การใช้แบคทีริโอซินผสมในลูกชิ้นทำให้สามารถเก็บลูกชิ้นได้นานกว่า 21 วันใน การบรรจุทั้ง 2 สภาวะ นอกจากนี้ยังพบว่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญเชื้อจุลินทรีย์ของ FDCB มี ประสิทธิภาพใกล้เคียงกับ nisin และดีกว่า CCB ($p > 0.05$) เล็กน้อยเท่านั้น



ภาพที่ 7.4 ปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด (log cfu/g) ของลูกชิ้นไก่ผสมแบคทีริโอซิน เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C, A = aerobic packaging, B = vacuum packaging, C = control, CCB = concentrated crude bacteriocin, FDCB = freeze dried crude bacteriocin

ค่า pH ของลูกชิ้นไก่ผสมแบคทีริโอซินในสภาวะการบรรจุแบบปกติและแบบสุญญากาศ (ตารางที่ 7.3) ค่า pH ของลูกชิ้นทุกชนิดมีค่าไม่แตกต่างกันตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ทั้ง 2 สภาวะ การบรรจุ โดยมีช่วง pH ระหว่าง 5.99-6.30 แสดงว่าระยะเวลาการเก็บรักษา ของลูกชิ้นที่อุณหภูมิ 4 °C ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในตัวอย่างลูกชิ้น



ภาพที่ 7.5 ปริมาณ LAB (log cfu/g) ของลูกชิ้นไก่ผสมแบคทีริโอซินเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C, A = aerobic packaging, B = vacuum packaging, C = control, CCB = concentrated crude bacteriocin, FDCB = freeze dried crude bacteriocin.

7.5 สรุปผลการทดลอง

ผลการคัดและจำแนกแบคทีเรียปริมาณมากที่ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่ พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีปริมาณมาก 3 สายพันธุ์ประกอบด้วย *Staphylococcus lentus* PN-1, 3%, *Stap. Saprophyticus* PN-2, 12% และ *Bacillus spp.* PN-3, 85% และแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ โดยยับยั้ง *Bacillus spp.* PN-3 ได้สูงที่สุด

แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในสภาวะการบรรจุแบบปกติ และแบบสุญญากาศได้นานกว่าเมื่อเทียบกับ

ลูกชิ้นควบคุม เมื่อพิจารณามาตรฐานการปนเปื้อนของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารคือ 5.0 log cfu/g พบว่า ลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ และลูกชิ้นที่ผสมแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่เตรียมได้แบบเข้มข้นและแบบผงแห้งมีอายุการเก็บรักษาได้นานกว่าลูกชิ้นที่ไม่มีการใช้สารแบคทีริโอซิน ทั้งนี้การใช้แบบเคลือบผิวลูกชิ้นสามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 15-18 วัน และการใช้แบบผสมในสูตรลูกชิ้นสามารถเก็บได้นานประมาณ 21 วัน และพบว่าแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่ดีใกล้เคียงกับสาร nisin ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินทางการค้าที่ผลิตจากเชื้อ LAB สายพันธุ์ *Lc. Lactis* เช่นกัน แต่ต่าง strain กัน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจและควรมีการศึกษาการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์จาก *Lc. lactis* TISTR 1401 กับผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ชนิดอื่น ๆ อีกต่อไป

เอกสารอ้างอิง

มอก.1009-2533. 2536. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นเนื้อวัว ลูกชิ้นหมู และลูกชิ้นไก่. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.

Ananou, S., Maqueda, M., Martinez-Bueno, M., Galvez, A. and Valdivia, E. 2005. Control of Staphylococcus aureus in sausages by enterocin AS-48. Meat Sci. 71:549-556.

Anonymous. 2007. Bacillus cereus. Food safety: Ireland [On-line]. Available: www.fsai.ie/publications/factsheet/factsheet_bacillus_cereus.pdf.

A.O.A.C. 1997. Official Methods of Analysis. 16th ed. The Association of Official Analytical Chemists,Inc., Washington D.C.

Borch, E., Kant-Muermans, M. and Blixt, Y. 1996. Bacterial spoilage of meat and cured meat products. Food Microbiol. 33:103-120.

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

Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. Class IIa bacteriocin from Lactic acid bacteria: antibacterial activity and food preservation. J. Biosci. Bioen. 87:705-716.

Holy, A.V., Holzapfel, W.H. and Dykes, G.A. 1992. Bacterial populations associated with Vienna sausage packaging. Food Microbiol. 9:45-53.

Hugas, M.(1998. Bacteriocinogenic lactic acid bacteria for the biopreservation of meat and meat products. Meat Sci. 49:139-150.

Khalid F., Siddiqi R. and Mojgani N. 1999. Detection and characterization of a heat stable bacteriocin (lactocin LC-09) produced by a clinical isolate of Lactobacilli. Med. J. Islamic Acad. Sci. 12:67-71.

Kun, S., Rezessy-Szabó, J.M., Nguyen, Q.D. and Hoschke, A. 2008. Changes of microbial population and some components in carrot juice during fermentation with selected Bifidobacterium strains. Process Biochem. 43:816-821.

Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. and Gobbetti, M. 2000. Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough Lactobacillus plantarum strain 21B. Appl. Environ. Microbiol. 66:4084-4090.

Morgan, S.M., Galvin, M., Kelly, J., Ross, R.P. and Hill, C. 1999. Development of a lacticin 3147-enriched whey powder with inhibitory activity against foodborne pathogens. J. Food Prot. 62:1011-1016.

Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.C. and Hardisson de la Torre, A. 2002. Bacteriocinogenic activity from starter cultures used in Spanish meat industry. Meat Sci. 62:237-243.

Nieto-Lozano, J.C., Reguera-Useros, J.I., Pelaez-Martinez, M.del.C. and de la Torre, A.H. 2006. Effect of a bacteriocins produced by Pediococcus acidilactici against Listeria monocytogenes and Clostridium perfringens on Spanish raw meat. Meat Sci. 72:57-61.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing Lactococcus lactis WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. Int. J. Food Microbiol. 81:137-145.

Samelis, J., Bjorkroth, J., Kakouri, A. and Rementzis, J. 2006. Leuconostoc carnosum associated with spoilage of refrigerated whole cooked hams in Greece. J. Food Protec. 69:2268-2273.

Sankuntaw, N., Suranarakun, W., Phumkhachorn, P. and Rattanachaikunsopon, P.(2008. Partial characterization of bacteriocin produced by Streptococcus SK 5.1: antimicrobial spectrum and optimal incubation time for bacteriocin production [On-line]. Available: http://www.scisoc.or.th/stt/30/sec_b/paper/ stt30_B0024.pdf.

SAS. 1993. SAS 6.08.04 WIN. Carry, NC: SAS Institute Inc.

Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A. and Klaenhammer, T.R. 1991. Nisin treatment for inactivation of Salmonella species and other Gram negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 57:3613-3615.

Viana, E.S., Gomide, L.A.M. and Vanetti, M.C.D. 2005. Effect of modified atmospheres on microbiological, color and sensory properties of refrigerated pork. Meat Sci. 71:696-705.

บทที่ 8

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกทนความร้อน สำหรับผลิตไส้กรอกอีสาน

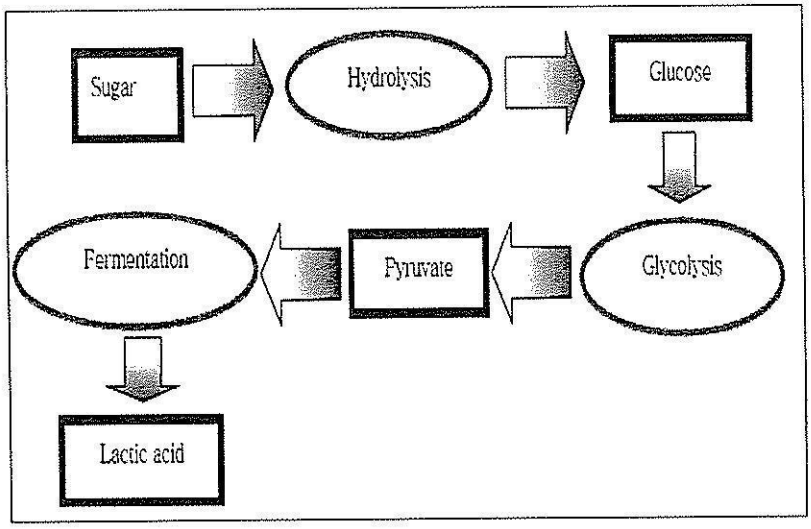
8.1 คำนำ

การผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์โดยการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ (fermentation) เป็นกระบวนการผลิตที่ไม่ซับซ้อนและต้นทุนการผลิตไม่แพง ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักโดยทั่วไปมีกลิ่นและรสชาติดีเป็นที่นิยมของผู้บริโภค (Tjener et al., 2003; Leroy and De Vuyst, 2004) ความเปรี้ยวของผลิตภัณฑ์เกิดจากกรดที่ผลิตโดยเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม lactic acid bacteria (LAB) แบคทีเรียกลุ่มนี้ผลิตกรดแลคติก (lactic acid) ให้รสเปรี้ยวและกลิ่นรสกับผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้ LAB บางสายพันธุ์ยังมีประสิทธิภาพที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย (food poisoning and spoilage bacteria) ในเนื้อสัตว์ได้ สารประกอบที่สร้างโดย LAB และยับยั้งจุลินทรีย์อื่นในอาหารได้ ที่สำคัญได้แก่ แบคทีริโอซิน (bacteriocins) (Leroy and De Vuyst, 2004; Holzapfel et al., 1995)

LAB เป็นแบคทีเรียกลุ่ม Gram-positive anaerobic bacteria ที่ผลิตและปล่อย lactic acid เป็นผลิตผลหลักจากการหมัก LAB เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีการใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักหลากหลายชนิด อาทิ ผลิตภัณฑ์นม ผักและผลไม้ เนื้อสัตว์ และผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆ เช่น ไวน์ การหมักอาหารด้วยเชื้อ LAB อาจทำโดยใช้เชื้อธรรมชาติที่มีในตัววัตถุดิบ หรือโดยการเติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์ การผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักโดยเฉพาะไส้กรอกหมัก (fermented sausages) เชื้อ LAB ใช้แหล่งอาหาร carbohydrate ผลิตเป็น lactic acid ทำให้ pH ของผลิตภัณฑ์ไส้กรอกลดลง (pH ประมาณ 5.9-4.6) (ภาพที่ 8.1) lactic acid จะทำให้ protein ของกล้ามเนื้อเกาะกันแน่น (coagulation) และเอื้อต่อการหั่นไส้กรอกได้ดี (Hugar and Monfort, 1997)

เทคนิคการหมักเนื้อสัตว์เป็นการถนอมอาหารที่สำคัญเทคนิคหนึ่ง เนื่องจากการใช้สารเคมีเพื่อการถนอมเนื้อสัตว์มีข้อกำหนดที่เข้มงวดมาก การถนอมเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์ด้วยวิธีการหมักจึงเป็นที่นิยมมากโดยเฉพาะเหมาะสมสำหรับประเทศในเขตอากาศร้อนและอุปกรณ์หรือเครื่องทำความเย็น (refrigeration) ไม่มีเพียงพอ ปัจจุบันการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์โดยกระบวนการหมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ในระดับอุตสาหกรรมตั้งแต่ขนาดเล็กขึ้นไปนิยมใช้จุลินทรีย์กล้าเชื้อ (starter cultures) สำหรับการผลิตโดยเฉพาะการผลิตไส้กรอกหมัก ทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลิตที่มีคุณภาพสูง ลดความผันแปรของคุณภาพของ

ผลิตภัณฑ์ และเพื่อให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสดีขึ้นเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค นอกจากนี้ การใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์สามารถลดเวลาการหมักและสามารถลดปริมาณการใช้ nitrate และ nitrite ในผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพสม่ำเสมอ (Leroy et al., 2006) กล้าเชื้อจุลินทรีย์สำหรับผลิตไส้กรอกหมักทางการค้าประกอบด้วย แบคทีเรียกลุ่มสายพันธุ์ LAB สายพันธุ์ staphylococci และ/หรือ สายพันธุ์ kocuriae (เดิม micrococci) (Hugas and Monfort, 1997; Talon et al., 2007) ทั้งนี้กลุ่ม LAB ผลิตกรดให้รสเปรี้ยวและเนื้อสัมผัส ขณะที่ staphylococcus และเชื้อแบคทีเรียอื่นๆ ผลิต amino acids และสารระเหยให้กลิ่น รสชาติ สี และยับยั้ง oxidation ของกรดไขมันไม่อิ่มตัวอิสระ (Hammes and Herter, 1998; Leroy et al., 2006)



ภาพที่ 8.1 การเกิดกรดแลคติกในกระบวนการหมัก (Erickson et al., 2004)

ดั้งเดิมการผลิตไส้กรอกหมักในอุตสาหกรรมขนาดเล็กมีการใช้ประโยชน์จากเชื้อ LAB อยู่ 2 แนวทาง คือใช้เชื้อปนเปื้อนในบรรยากาศของบริเวณการผลิตอยู่ประจำโดยไม่มีการเติมกล้าเชื้อจุลินทรีย์แต่อย่างใด ซึ่งเรียกว่า "house flora" และอีกแบบคือการใช้ผลิตภัณฑ์จากการผลิตก่อนหน้าผสมกับการผลิตในแต่ละครั้งเพื่อการควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้คงที่สม่ำเสมอ เรียกวิธีการใช้เชื้อจุลินทรีย์แบบนี้ว่า "back-slopping" ต่อมาจึงได้มีการพัฒนาการใช้กล้าเชื้อ (starter cultures) โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์บริสุทธิ์ที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีการใช้กล้าเชื้อเดี่ยว หรือกล้าเชื้อผสมหลายเชื้อ (Holzapfel, 2002; Holzapfel, 1997) โดยเฉพาะการผลิตระดับอุตสาหกรรมขนาดใหญ่ การพัฒนากล้าเชื้อที่สามารถทำให้ผลิตภัณฑ์มีคุณภาพ

ของคุณลักษณะต่าง ๆ ที่ได้ดีขึ้น อาทิ ความสม่ำเสมอของรสชาติ เนื้อสัมผัส และสี เป็นต้น นอกจากนี้กล้าเชื้อบางชนิดยังสามารถผลิตสารชีวภาพที่ป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่อาจทำให้อาหารเน่าเสียหรือก่อโรคในอาหารได้ สารชีวภาพที่สำคัญได้แก่แบคทีริโอซิน (bacteriocins) เป็นต้น ดังนั้นกล้าเชื้อที่ใช้เพื่อให้ทำหน้าที่ตามที่ผู้ผลิตต้องการเช่นนี้ เรียกว่า "functional starter cultures" (De Vuyst, 2000; Leroy et al., 2006) นอกจากคุณลักษณะต่างๆ ที่กล้าเชื้อมีต่อผลิตภัณฑ์อาหารหมักแล้ว การใช้กล้าเชื้อที่คัดเลือกได้จากเชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องยังทำให้ลดเวลาการผลิตหรือการบ่ม (reduction of ripening time) ลดต้นทุนและการใช้พลังงาน (reduction of cost and energy) ลดการเสี่ยงความปลอดภัยและสุขาภิบาลของอาหารได้ดีอีกด้วย (Holzapfel, 2002) ในการผลิตไส้กรอกหมักกึ่งแห้ง (semi-dry fermented sausage) เมื่อไส้กรอกมี pH ในระดับที่ต้องการ (pH 5.3-4.7) แล้ว ปกติจะมีการหยุดปฏิกิริยาของกล้าเชื้อด้วยความร้อน (อุณหภูมิ 60-74 °C) เพื่อไม่ให้ไส้กรอกมีกลิ่นรสเปรี้ยวมากเกินความต้องการ อย่างไรก็ตามกล้าเชื้อที่รอดชีวิตหรือทนความร้อนสูงได้จะเจริญต่อได้ดีที่อุณหภูมิต่ำ และสามารถลด pH ของไส้กรอกให้ต่ำลงมากยิ่งขึ้น (Raccach and Tilley, 2006) ดังนั้นการใช้กล้าเชื้อ LAB ที่ทนความร้อน (thermotolerant LAB) สำหรับผลิตไส้กรอกหมักที่ต้องใช้ความร้อนในกระบวนการผลิตจึงเป็นแนวทางที่สามารถลดระยะเวลาการผลิตไส้กรอกให้สั้นลง ลดระยะเวลาการเก็บไส้กรอกไว้ในโรงงานและสามารถนำออกจำหน่ายได้เร็วขึ้น ทำให้ช่วยลดต้นทุนการผลิตบางส่วนได้

8.2 วัตถุประสงค์

8.1 เพื่อคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์กรดแลคติก (LAB) ที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิไม่ต่ำกว่า 70 °C เพื่อให้ได้กล้าเชื้อที่สามารถอยู่รอดจากกระบวนการให้ความร้อนสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักได้

8.2 เพื่อผลิตไส้กรอกอีสานหมักด้วยกล้าเชื้อ LAB ที่ทนความร้อน และศึกษาคุณภาพเบื้องต้นของไส้กรอกที่สามารถใช้บ่งชี้ผลของการใช้กล้าเชื้อ LAB ที่มีต่อการหมักไส้กรอก

8.3 อุปกรณ์และวิธีการ

8.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนความร้อนสูง

เชื้อจุลินทรีย์ lactic acid bacteria (LAB) ที่ใช้ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus*

acidilactici TISTR 051, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. brevis TISTR 860, *Lb. delbrueckii* subsp. bulgaricus TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 และเชื้อ LAB ที่แยกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักส้มฟัก คือเชื้อ *Lb. casei* subsp. rhamnosus SN11 ได้รับความอนุเคราะห์จาก ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

จากเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man Rogusa Sharpe (MRS) agar (Hi-Media, Mumbai, India) เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ช่วง stationary phase) วัด absorbance ที่ 600 nm และปรับค่า absorbance ให้อยู่ที่ประมาณ 1.0-1.2 ซึ่งจะมีปริมาณเชื้อประมาณ 10^9 cells/ml

เตรียมเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (ปริมาตร 5 ml) ปริมาณของเชื้อเริ่มต้นปรมาณ 10^7 cells/ml บ่มหลอดเชื้อทดลอง ใน water bath (GP-400, Neslab Instruments, Newington, USA) อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 °C ทำการเก็บสารละลายตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากหลอดทดลองทุก 30 นาที เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจากความร้อน (log cfu/ml) โดยเพาะเชื้อบน MRS agar และบ่มเชื้อที่ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง (จัดชุดทดลอง 3 ชุด)

ทำการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนความร้อนได้สูงที่สุดสำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตไส้กรอกอีสาน และวิเคราะห์คุณลักษณะหลักเบื้องต้นสำหรับผลิตภัณฑ์ไส้กรอกหมักต่อไป

8.3.2 การผลิตไส้กรอกหมักอีสานด้วย thermotolerant lactic acid bacteria

8.3.2.1 การเตรียมกล้าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450

เชื้อ lactic acid bacteria ทนความร้อนได้สูงที่สุดที่คัดเลือกได้จากข้อ 7.3.1 คือเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 ทำการเพาะเชื้อใน MRS both จาก colony เดี่ยวของเชื้อ บ่มเชื้อใน incubator อุณหภูมิ 37 °C นาน 24-48 ชั่วโมง วัดค่า absorbance ของ MRS broth ที่ 600 nm แล้วทำการเพาะเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 450 จาก MRS broth บน MRS agar ใน incubator อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมงเพื่อหาจำนวน cell/ml ณ ค่า absorbance ที่วัดได้ของเชื้อที่เจริญใน MRS broth

ทำการเพาะเชื้อ *L. acidophilus* TISTR 450 ใน MRS broth อีกครั้ง วัดค่า absorbance ของ broth ที่ 600 nm คำนวณจำนวน cell/ml ของเชื้อใน MRS broth แล้วปรับความเข้มข้นของ broth ให้มีจำนวน cell เมื่อเติมในไส้กรอกแล้วมีปริมาณ cell ประมาณ 10^5-10^6 cfu/g ของมวลผสมไส้กรอก เก็บเกี่ยว cell จาก

MRS broth โดย centrifuge (Sorvall, RC SC-Plus Centrifuge, Thermo Scientific, Waltham, USA) ความเร็ว 12000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C ถ่ายส่วนของเหลวออก แล้วเติม 0.1% NaCl 10 ml ในหลอด centrifuge เขย่าผสม และใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับใช้ผสมในมวลผสมไส้กรอก (sausage batter)

8.3.2.2 การผลิตไส้กรอกอีสาน

ซื้อหมูเนื้อแดงส่วนสะโพกและมันหมูแข็งจากตลาดในจังหวัดนครราชสีมา เลาะพังผืดออก หั่นให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก แยกบดเนื้อแดง มันหมู ข้าวสุก และกระเทียม เตรียมสัดส่วนมวลผสมไส้กรอก (sausage batter) ให้มีน้ำหนัก 2 เท่า ประกอบด้วย หมูเนื้อแดง 62.50% มันแข็ง 15.00% ข้าวสุก 14.70% กระเทียม 7.35% พริกไทย 0.73% เกลือ 0.48% เกลือไนไตรท์ 0.12% ผงชูรส 0.37% และน้ำตาล 2.76% คลุกส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกัน แล้วแบ่ง sausage batter ออกเป็น 2 ส่วน เติมกล้าเชื้อ lactic acid bacteria ที่ทนความร้อนได้สูงที่สุดที่คัดเลือกได้ คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 ปริมาณ 10^5-10^6 cfu/g ของมวลรวม อีกส่วนที่เหลือไม่เติมกล้าเชื้อ ใช้เป็นตัวอย่างควบคุม นวดส่วนผสมจนได้มวลไส้กรอก (sausage batter) ที่มีลักษณะเหนียว บรรจุ sausage batter ในไส้หมู มัดเป็นข้อ ๆ ละประมาณ 1 นิ้ว แขวนไส้กรอกบนท่อนเหล็กในตู้อบรมควัน แต่ไม่มีการผลิตควัน ปรับอุณหภูมิในตู้ที่ 70 °C ให้ความร้อนนาน 1.5-2 ชั่วโมง จนผิวไส้กรอกหมาดแห้ง นำไส้กรอกออกจากตู้รมควัน แขวนในอากาศจนเย็น แบ่งบรรจุไส้กรอกใส่ถุงพลาสติกประมาณ 15 ลูกต่อถุง มัดปากถุง เก็บไส้กรอกในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 °C ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อทำการวิเคราะห์ ณ วันที่ 0, 2, 4 และ 6 ทำการทดลองผลิตไส้กรอก 2 ซ้ำ ลวกอุปกรณ์สำหรับการผลิตทุกชิ้นด้วยน้ำร้อนจัดก่อนใช้ทุกครั้ง

8.3.2.3 การวิเคราะห์คุณภาพไส้กรอกหมักอีสาน

การวัด pH

การวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) สุ่มตัวอย่างไส้กรอก วัด pH ด้วยเครื่อง pH meter แบบ probe แทง (Hanna; HI99163 pH/temperature meter, Italy)

การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด (total acidity)

ชั่งตัวอย่างไส้กรอก 10 กรัม ใส่ในโถปั่น เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 50 ml ตีปั่น 2 นาที กรองส่วนของเหลวที่ได้ผ่านผ้าขาวบาง ตีปั่นกากส่วนที่เหลือในโถปั่นอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น 50 ml นาน 2 นาที กรองส่วนของเหลวที่ได้รวมกับครั้งแรก เติม 1% phenolphthalein แล้วไตเตรทด้วย 0.1 N NaOH จนถึงจุดยุติ คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดในค่าของกรดแลคติกตามสูตร

$$(\%\ \text{acidity}) = \frac{\text{ml NaOH x normality x 90.09 x 100}}{\text{weight of sample (g) x 1000}}$$

การวัดสีค่า L*, a* และ b*

สุ่มไส้กรอก 3 ลูกต่อการทดลอง วัดสีที่ผิวของไส้กรอกในระบบ CIE L*, a* และ b* ด้วยเครื่องวัดสี Minolta (CR-300 Minolta) ทำการวัด 2 ครั้งต่อลูก

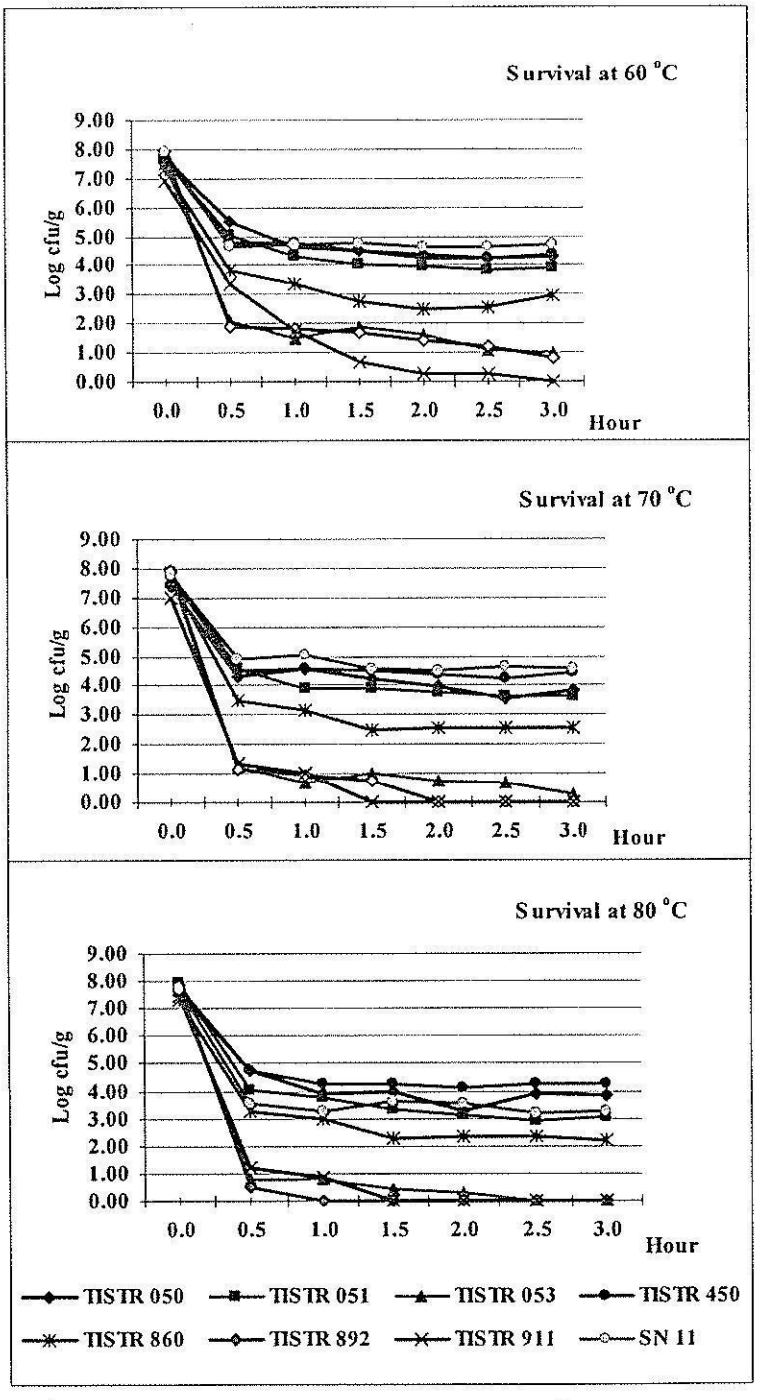
8.3.3 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ โดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) วางแผนการทดลองแบบ CRD (completely randomized design) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT (Duncan's multiple range test) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ด้วยโปรแกรม Statistical Analysis System (SAS institute, Inc., 1993) สำหรับทุกการวิเคราะห์

8.4 ผลการทดลองและวิจารณ์

8.4.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนความร้อนสูง

ด้วยปริมาณเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) เริ่มต้นทั้งหมดที่ใกล้เคียงกันประมาณ 7-8 log cfu/ml (ภาพที่ 8.2) หลังจากให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เวลา 0.5 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียทุกชนิดลดลงแตกต่างกันมาก เชื้อ *Leuconostoc mensenteroides* TISTR 053, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 และ *Lb. sake* TISTR 911 เป็นกลุ่มที่ทนความร้อนได้ต่ำที่สุด มีปริมาณเซลล์รอดชีวิตระหว่าง 2-3 log cfu/ml และเชื้อ *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860 มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตปานกลางประมาณ 3-4 log cfu/ml ขณะที่พบว่าเชื้อกลุ่มที่ทนความร้อนได้สูงที่สุดได้แก่ *Lactococcus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidactici* TISTR 051, *Lb. acidophilus* TISTR 450 และ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN11 ซึ่งมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตประมาณ 4.66-5.49 log cfu/ml เมื่อให้ความร้อนนานขึ้นจนถึง 3 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกลุ่มนี้ค่อนข้างจะคงที่ จำนวนเซลล์ระหว่างประมาณ 4-4.7 log cfu/ml ขณะที่แบคทีเรียอีก 2 กลุ่มที่ทนความร้อนได้ต่ำกว่ามีจำนวนเซลล์รอดชีวิตเพียงประมาณ 1-3 log cfu/g ขณะที่เชื้อ *Lactobacillus sake* TISTR 911 ตายทั้งหมดเมื่อให้ความร้อนนานถึง 3 ชั่วโมง



ภาพที่ 8.2 Survival of selected lactic acid bacteria ที่ 60, 70 และ 80 °C, ใน MRS broth; *Lc. plantarum* TISTR 050, *Pd. acidilactici* TISTR 051, *Leu. mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. brevis TISTR 860, *Lb. delbrueckii* subsp. bulgaricus TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 และ *Lb. casei* subsp. rhamnosus SN11

ทำนองเดียวกันเมื่อทำการทดลองให้ความร้อนต่อเชื้อแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 70 และ 80 °C พบว่า ที่เวลา 0.5 ชั่งโมง เชื้อ *Leu. mesenteriodes* TISTR 053, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892 และ *Lb. sake* TISTR 911 มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตเพียงประมาณ 1 log cfu/ml และเมื่อให้ความร้อนนานขึ้นจนถึง 3 ชั่วโมง เซลล์เชื้อทั้ง 3 strains ไม่เหลือรอดชีวิต ขณะที่เชื้อ *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860 ที่ทนความร้อนได้ปานกลางเหลือเซลล์รอดชีวิตเมื่อรับความร้อน 0.5 ชั่วโมง ประมาณ 3 log cfu/ml และเหลือเซลล์รอดชีวิตประมาณ 2-2.5 log cfu/ml เมื่อให้ความร้อนนานถึง 3 ชั่วโมง สำหรับแบคทีเรียกลุ่มที่ทนความร้อนได้สูงที่สุด 4 สายพันธุ์ เมื่อให้ความร้อน 70 °C พบว่า เชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 และ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตใกล้เคียงกันคือ เมื่อให้ความร้อนนานถึง 3 ชั่วโมง มีเซลล์รอดชีวิตประมาณ 4.4-4.5 log cfu/ml แต่เมื่อให้ความร้อนสูงถึง 80 °C ปรากฏว่า เชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตสูงกว่า *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ทั้งนี้เชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตสูงที่สุดคือ มีจำนวนเซลล์ประมาณ 4.42 log cfu/ml แต่เชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 มีเซลล์เหลือรอดชีวิตเพียง 3.25 log cfu/ml เท่านั้น

จากผลการทดลองให้ความร้อนกับเชื้อ LAB ทั้ง 8 สายพันธุ์ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ *Lb. acidophilus* TISTR 450 ทนความร้อนได้สูงที่สุด และเมื่อให้ความร้อนสูงถึง 80 °C ยังมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตประมาณครึ่งหนึ่งของจำนวนเซลล์เริ่มต้น แบคทีเรีย LAB ที่รอดชีวิตจากความร้อนสูง จะมีความสามารถเจริญได้ดีและเร็วยิ่งขึ้นเมื่อใช้สำหรับหมักอาหาร จะทำให้ลดเวลาการหมักและลด pH ได้ต่ำถึงระดับที่ต้องการได้เร็วขึ้น (Raccach and Tillery, 2006) ดังนั้นจึงได้เลือกใช้เชื้อ LAB สายพันธุ์ *Lb. acidophilus* TISTR 450 เป็นกล้าเชื้อสำหรับการผลิตไส้กรอกอีสานหมัก โดยทำการผลิตตามแนวทางการผลิตไส้กรอกอีสานในโรงงานผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ขนาดปานกลางในจังหวัดนครราชสีมา เพื่อศึกษาผลของกล้าเชื้อ LAB ที่ทนความร้อนได้สูงอย่างน้อย 70 °C ที่มีผลต่อการหมักไส้กรอกอีสานและคุณภาพเบื้องต้นที่เป็นตัวบ่งชี้การหมักของไส้กรอก ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลสำหรับการศึกษาการใช้กล้าเชื้อ LAB ชนิดทนความร้อนสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดอื่น ๆ ได้

8.4.2 คุณภาพไส้กรอกอีสานผลิตด้วยกล้าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450

8.4.2.1 คุณภาพความเป็นกรด-ด่างของไส้กรอกอีสาน

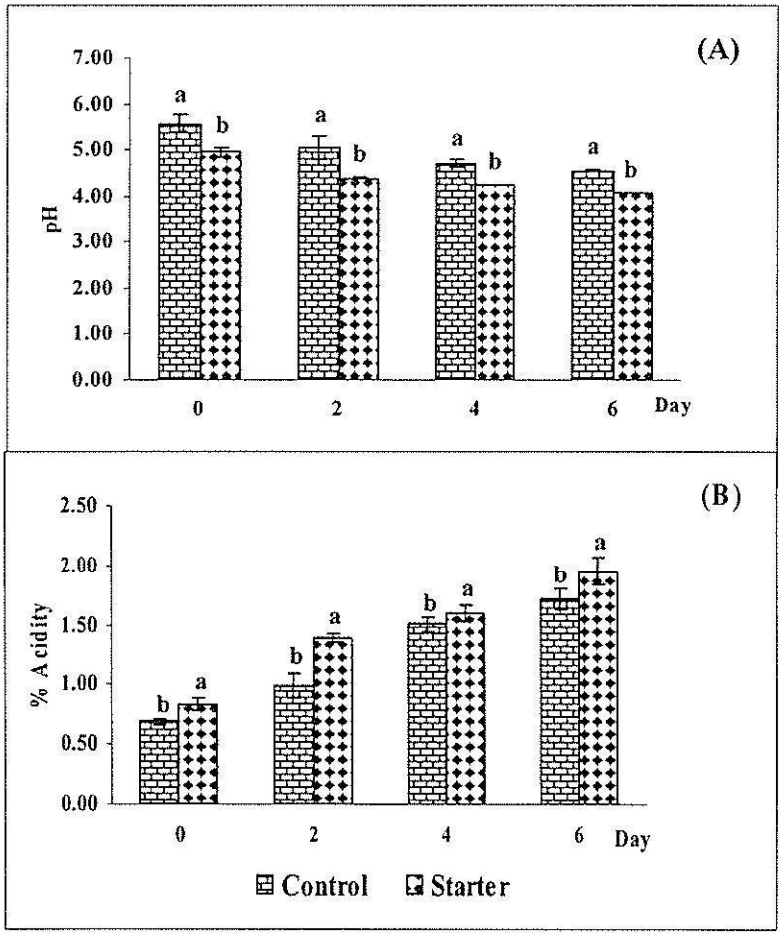
การใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์เติมในมวลผสมไส้กรอก (batter) สำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก เป็นการเร่งการเกิดกรดในเนื้อไส้กรอก (acidification of meat batter) ให้เร็ว ทำให้สามารถลดหรือป้องกันการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและสร้างสารพิษในผลิตภัณฑ์ได้ (Holzaptel, 1997)

นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ร่วมกับการหมักเนื้อที่อุณหภูมิสูง ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่มี pH ต่ำถึง 4.0-4.2 ได้ภายในเวลา 24-36 ชั่วโมง ที่ 37 °C และภายในเวลา 30-42 ชั่งโมง ที่อุณหภูมิ 30 °C (Sakhare and Rao, 2003) ทำนองเดียวกันสำหรับการทดลองนี้ ซึ่งได้ใช้กล้าเชื้อ LAB บริสุทธิ์ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 ที่ทนความร้อนได้สูงกว่า 70 °C (ภาพที่ 8.2) เติมใน batter ของไส้กรอกอีสาน ซึ่งในกระบวนการผลิตมีการอบไส้กรอกสดในตู้อบด้วยความร้อนประมาณ 70 °C ให้ผิวไส้กรอกแห้งพอหมาด เพื่อป้องกันการเกิดเมือก หรือเชื้อรา หรือยีสต์เจริญบนผิวไส้กรอกก่อนการบรรจุและปล่อยให้เกิดการหมักโดยเก็บไส้กรอกไว้ในตู้ควบคุมอุณหภูมิสูง 25 °C พบว่า pH ของไส้กรอกที่ผสมกล้าเชื้อลดลงเร็วกว่าไส้กรอกที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อหรือไส้กรอกควบคุม ($p < 0.05$) pH ของไส้กรอกผสม *Lb. acidophilus* TISTR 450 ลดลงต่ำกว่า pH 5 ภายในเวลา 1-2 วัน ขณะที่ไส้กรอกควบคุมต้องใช้เวลานานกว่า คือ 3-4 วัน เพื่อให้ pH ลดลงต่ำกว่า 5 (ภาพที่ 8.3 A) และปริมาณกรดทั้งหมดของไส้กรอกเติมกล้าเชื้อสูงกว่า 1% ภายในเวลา 1-2 วัน ขณะที่ไส้กรอกควบคุมต้องใช้เวลา 3-4 วัน ปริมาณกรดทั้งหมดจึงสูงกว่า 1% (ภาพที่ 8.3 B) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ทนความร้อนสูงใส่ใน batter ซึ่งเมื่อบรรจุเป็นไส้กรอกแล้วผ่านการอบให้ความร้อนสูงถึง 70°C นานประมาณ 1.5 - 2 ชั่วโมง เพื่อให้ผิวไส้กรอกแห้งหมาดก่อนการเก็บในถุงพลาสติก ทำให้มีเซลล์กล้าเชื้อที่รอดชีวิตจำนวนมากและสามารถเจริญได้ดีมากที่อุณหภูมิต่ำกว่า คือที่ 25 °C ได้ปริมาณกรดในไส้กรอกเร็วขึ้น จึงกล่าวได้ว่าการใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์ทนความร้อนสูงสามารถเร่งการผลิตไส้กรอกอีสานได้ผลดีมาก ลดเวลาการเก็บผลิตภัณฑ์ไส้กรอกไว้ในห้องเก็บผลิตภัณฑ์ นำออกจำหน่ายได้เร็วขึ้น ซึ่งจะช่วยให้ผู้ประกอบการสามารถลดต้นทุนการผลิตในส่วนนี้ได้

8.4.2.2 คุณลักษณะสีของไส้กรอกเติมกล้าเชื้อ

ภาพที่ 8.4 A แสดงค่า L* ซึ่งเป็นความสว่างของไส้กรอก เมื่อเปรียบเทียบความสว่างของไส้กรอก พบว่ามีความแตกต่างกัน ($p < 0.05$) โดยไส้กรอกที่เติมกล้าเชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 มีความสว่างมากกว่าไส้กรอกควบคุมตลอดระยะเวลาการหมัก ทำนองเดียวกัน ค่า a* (ความเป็นสีแดง) ของไส้กรอกเติมเชื้อมีค่าน้อยกว่า ($p < 0.05$) ไส้กรอกควบคุมตั้งแต่เริ่มต้นจนถึงวันที่ 4 ของการหมัก การที่สีของไส้กรอกที่เติมเชื้อ LAB อ่อนจางลง และมีความสว่างมากขึ้น อาจเนื่องจากปริมาณกรดแลคติกที่สะสมในไส้กรอกมากขึ้น ทำให้โปรตีนเกิด coagulation มากขึ้น และมีปริมาณน้ำถูกขับออกจากโครงสร้างโปรตีนมากขึ้น และอาจเนื่องจากเชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 เป็นเชื้อ LAB ที่สามารถสร้าง hydrogen peroxide ที่สามารถฟอกสีของเนื้อ (myoglobin) ทำให้ไส้กรอกมีสีซีดจางลงได้มากกว่าไส้กรอกควบคุม ทั้งนี้ Ammor and Mayo (2007) และ Hugas and Monfort (1990) ได้กล่าวว่าเชื้อ LAB บางสายพันธุ์ผลิต

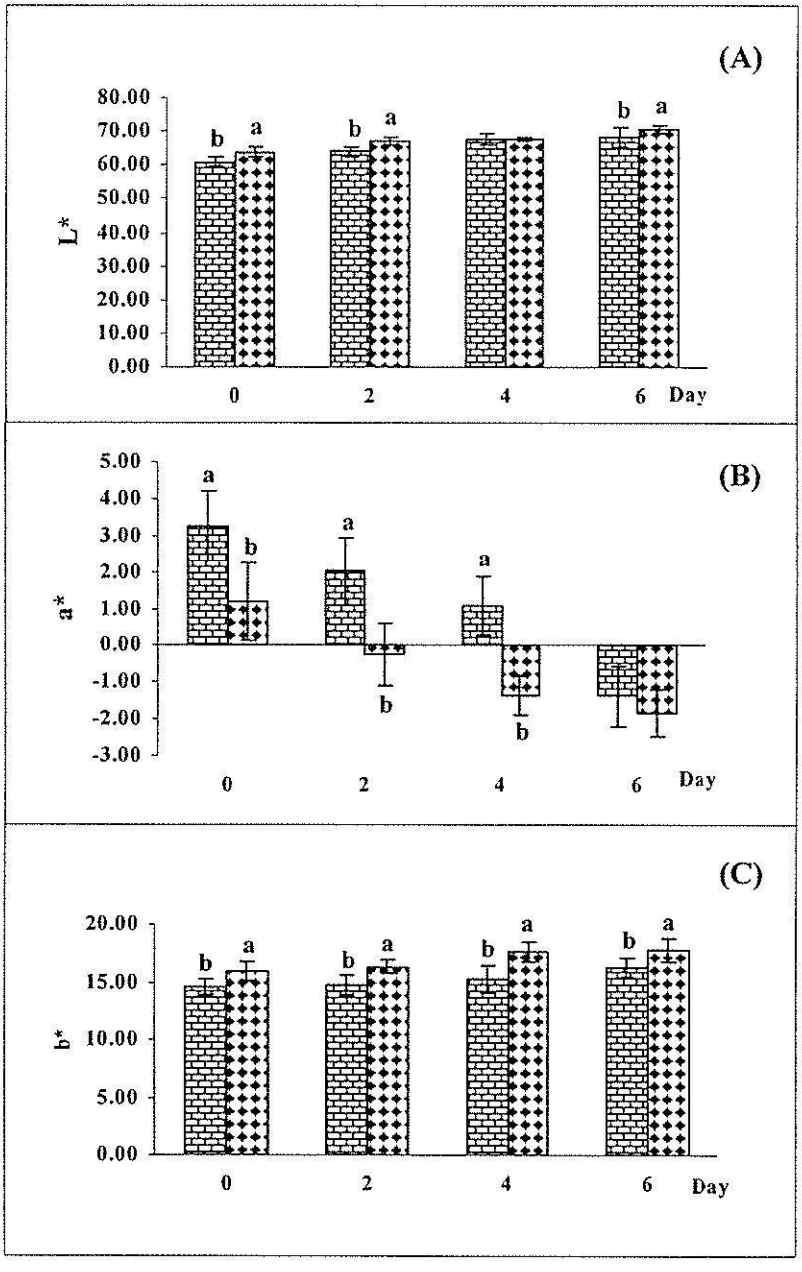
hydrogen peroxide ที่อาจทำให้ผลิตภัณฑ์เกิด rancidity และ discoloration และปริมาณที่เกิดขึ้นมากอย่างรวดเร็วทำให้เกิดการยับยั้งแบคทีเรียพวก coagulase negative cocci ด้วย



ภาพที่ 8.3 Total acidity และ pH ของไส้กรอกหมักอีสาน ที่ 25 °C,
Control = ไส้กรอกหมักควบคุม Starter = ไส้กรอกหมักด้วยกล้าเชื้อ
Lactobacillus acidophilus TISTR 450 (n= 6)

ภาพที่ 8.4 C แสดง ค่า b* หรือความเป็นสีเหลืองของไส้กรอก เมื่อใช้กล้าเชื้อ LAB, *Lb. acidophilus* TISTR 450 ในการผลิตไส้กรอกอีสาน ทำให้ไส้กรอกมีความเป็นสีเหลืองมากกว่าไส้กรอกควบคุม ($p < 0.05$) ซึ่งสอดคล้องกับค่า a* ของไส้กรอก ที่เมื่อเติมกล้าเชื้อจะได้สีไส้กรอกที่มีสีแดงลดลง

คือมีสีซีดกว่าไส้กรอกควบคุม และค่า b* ที่มากกว่าหมายความว่าไส้กรอกเติมเชื้อมีสีเหลืองและซีดจางกว่าไส้กรอกควบคุม



ภาพที่ 8.4 คุณลักษณะสี (L* a* b*) ของไส้กรอกหมักอีสาน ที่ 25 °C, Control = ไส้กรอกหมักควบคุม, Starter = ไส้กรอกหมักด้วยกล้าเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 (n = 12)

8.5 สรุปผลการทดลอง

ผลการทดลองให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 °C กับเชื้อ lactic acid bacteria ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. brevis TISTR 860, *Lb. delbrueckii* subsp. bulgaricus TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 และ *Lb. casei* subsp. rhamnosus SN11 พบว่า เชื้อสายพันธุ์ *Lb. acidophilus* TISTR 450 ทนความร้อนได้สูงที่สุด และเมื่อให้ความร้อนสูงถึง 80 °C ยังมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตประมาณครึ่งหนึ่งของจำนวนเซลล์เริ่มต้น เมื่อใช้เชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 เป็นกล้าเชื้อในมวลผสมไส้กรอกอีสาน และให้ความร้อนประมาณ 70 °C ก่อนการหมัก ทำให้การหมักของไส้กรอกเกิดขึ้นได้เร็วกว่าไส้กรอกผลิตด้วยเชื้อในธรรมชาติที่ไม่ได้ผสมกล้าเชื้อ โดย pH ของไส้กรอกผลิตด้วยกล้าเชื้อทนความร้อนสูงลดลงต่ำกว่า pH 5 ภายในเวลา 1-2 วัน ขณะที่ไส้กรอกผลิตแบบปกติต้องใช้เวลานานประมาณ 3-4 วัน และพบว่าไส้กรอกอีสานผลิตด้วยเชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 มีสีที่สว่างและอ่อนกว่าไส้กรอกปกติ

สำหรับการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าการใช้กล้าเชื้อ thermotolerant lactic acid bacteria สามารถทำให้ลด pH และลดระยะเวลาการผลิตไส้กรอกอีสานที่ผลิตโดยให้ความร้อนก่อนการหมักได้เร็วขึ้น ทั้งนี้ควรมีการศึกษาทดลองการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์อื่น ๆ ผสมกับกล้าเชื้อ LAB ที่คัดเลือกได้ เพื่อศึกษาคุณลักษณะอื่น ๆ รวมทั้งคุณภาพทางประสาทสัมผัสอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

Ammor, M.S. and Mayo, B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. Meat Sci. 76: 138-146.

Erickson, L.E., Fayet, E. Kakumanu, B.K. and Davis, L.C. 2004. Lactic Acid Fermentation. National Agricultural Biosecurity Center, Kansas State University.

Raccach, M. and Tilley, H.R. 2006. Thermal inactivation of the frozen thawed traditional meat starter culture, *Pediococcus pentosaceus*, in a meat model system. Meat Sci. 72:751-756.

Leroy, F., Verluyten, J. and De Vuyst, L. 2006. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. Int. J. Food Microbiol. 106:270-285.

Santos, E.M., González-Fernández, C., Jaime, I. and Rovira, J. 1998. Comparative study of lactic acid bacteria house flora isolated in different varieties of 'chorizo'. Int. J. Food Microbiol. 39:123-128.

Hammes, W.P. and Hertel, C. 1998. New developments in meat starter cultures. Meat Sci. 49:S125-S138.

Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. Trends Food Sci. Tech. 15:67-78.

Tjener, K., Stahnke, L.H., Andersen, L. and Martinussen, J. 2003. A fermented meat model system for studies of microbial aroma formation. Meat Sci. 66:211-218.

Holzapfel, W.H., Geisen, R. and Schillinger, U. 1995. Bilogical preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. Int. J. Food Microbiol. 24:343-362.

Holzapfel, W.H. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. Int. J. Food Microbiol. 75:197-212.

Talon, R., Leroy, S. and Lebert, I. 2007. Microbial ecosystems of traditional fermented meat products: The importance of indigenous starters. Meat Sci. 77:55-62.

Hugas, M. and Monfort, J.M. 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. Food Chem. 59:547-554.

Holzapfel, W.H. 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. Food Contr. 8:241-258.

Sakhare, P.Z. and Roa, D.N. 2003. Microbial profiles during lactic fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures. Food contr. 14: 1-5.

SAS. 1993. SAS 6.08.04 WIN. Carry, NC: SAS Institute Inc.

บทที่ 9

สรุปผลการทดลอง

9.1 ผลผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

การใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 เชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS โดยให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น 20 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ถึง 24 ซึ่งเป็นช่วง late log phase ถึงระยะ early stationary phase ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลงที่มีการใช้ปริมาณน้ำมะพร้าวเพิ่มขึ้นเป็น 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 10 AU/ml โดยที่เชื้อเริ่มผลิตแบคทีริโอซินตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง และในสูตรอาหารที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเพิ่มขึ้น 2 และ 3 เท่า ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml โดยตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญ และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 16 และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในสูตรอาหารที่ไม่มีน้ำนึ่งทูน่า และสูตรที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่าเพิ่มขึ้น 4 เท่า ดังนั้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวให้มากขึ้นมีผลทำให้การเจริญของเชื้อและการผลิตแบคทีริโอซินลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณสารอาหารที่มากเกินพอ เข้าไปมีผลในการยับยั้งการเจริญและการสร้างแบคทีริโอซิน

9.2 ผลการทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 สามารถทำได้โดยใช้ขั้นตอนการทำบริสุทธิ์ 4 ขั้นตอน คือ การตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต gel-filtration chromatography, cation-exchange chromatography และ RP-HPLC โดยแบคทีริโอซินที่ได้มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 100 AU/ml และมีค่ากิจกรรมการยับยั้งจำเพาะเพิ่มขึ้นเป็น 300 เท่า แต่ผลิตผลส่วนใหญ่จะสูญเสียไปในขั้นตอนของการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตทำให้เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์มีปริมาณผลิตผลที่ได้เหลือเพียงร้อยละ 0.05

การใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถลดการสูญเสียและลดขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ได้ โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ ดูดซับด้วย Amberlite XAD-4 สกัดโดยใช้ methanol และแยกด้วย RP-FPLC จากการทดลองทำให้ได้แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่มีค่ากิจกรรม

การยับยั้งเป็น 320 AU/ml มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 60 เท่า และมีปริมาณผลิตผลร้อยละ 0.5 เมื่อสิ้นสุดขั้นตอนการทำบริสุทธิ์

แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN11 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,975.71 ดาลตัน จากการวิเคราะห์โดยใช้วิธี SDS-PAGE และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,454 ดาลตัน เมื่อวิเคราะห์น้ำหนักโมเลกุลของสารโดยใช้เทคนิค EMS และพบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ลงได้ 2 log cfu/ml และลด *Escherichia coli* และ *Streptococcus lactis* ได้ 1 log cfu/ml และไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้

การทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินต่ออุณหภูมิ พบว่า แบคทีริโอซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาทีได้ โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* เท่ากับ 320 AU/ml, 20 AU/ml และ 160 AU/ml ตามลำดับ และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาทีได้ โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* ลดลงเป็น 160 AU/ml, 20 AU/ml และ 80 AU/ml ตามลำดับ โดยแบคทีริโอซินที่ทดสอบไม่มีผลใด ๆ ต่อการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes*

การทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินต่อ pH พบว่าแบคทีริโอซินสามารถทน pH ได้ในช่วงกว้าง โดยแบคทีริโอซินยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* ที่ pH 2 ถึง 8 และเมื่อทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่าแบคทีริโอซินถูกย่อยสลายโดย trypsin, α-chrymotrypsin และ Proteinase K แต่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ catalase

9.3 การคัดเลือกและการผลิตสารแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดลองเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) ที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ โดยใช้เชื้อ LAB รับจากศูนย์จุลินทรีย์และคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สายพันธุ์ต่าง ๆ ประกอบด้วย *Lb. plantarum* TISTR 050, *Pd. acidilactici* TISTR 051, *Leu. mesenteriodes* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911, *Lc. lactis* TISTR 1401 และ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ทดสอบแบคทีริโอซินด้วยแบคทีเรียทดสอบประกอบด้วย *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B. subtilis* TISTR 008 และ *S. aureus* TISTR 118 พบว่าแบคที่เรียสายพันธุ์ที่ให้แบคทีริโอซินที่มีความสามารถยับยั้งสูงสุด และเหมาะสมสำหรับการผลิตแบคทีริโอซินคือสายพันธุ์ *Lc. lactis* TISTR 1401 ทั้งนี้แบคทีริโอซินที่ผลิตได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้หลายชนิด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก

ได้ 8 จาก 13 สายพันธุ์ แต่อย่างไรก็ตามสารแบคทีริโอซินที่ได้ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 3 สายพันธุ์ที่เป็นแกรมลบได้

สำหรับสภาวะในการผลิตแบคทีริโอซินที่เหมาะสมของ *Lc. lactis* TISTR 1401 คือ การควบคุมระดับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้คงที่ที่ 6.5 ณ อุณหภูมิ 37 °C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (เติม 2% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) glucose และ 2% (w/v) meat extract) ซึ่งสภาวะดังกล่าวทำให้ได้แบคทีริโอซินมีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้สูงกว่า เมื่อเปรียบเทียบการผลิตแบคทีริโอซินโดยไม่มีการควบคุม pH อย่างเห็นได้ชัด นอกจากนี้แบคทีริโอซินที่ได้ยังมีความสามารถในการทดความร้อนได้สูง และคงตัวที่ pH ต่ำจนถึงระดับ pH ที่เป็นกลาง (pH 2-7)

9.4 การใช้แบคทีริโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นหมู

แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocin supernatant, CBS) ผลิตได้จาก LAB สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 โดยควบคุม pH ให้คงที่ที่ 6.5 ระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อเพื่อให้ได้แบคทีริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง เมื่อใช้กับผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูโดยจุ่มเคลือบผิวด้วย CBS ความเข้มข้นเต็มที่ (F-CBS) และเจือจางให้เจือจางลงครึ่งหนึ่ง (F-CBS) บรรจุลูกชิ้นเคลือบแล้วในถุงพลาสติกแบบปกติและแบบสุญญากาศ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าการใช้ F-CBS ทำให้สามารถยืดอายุออกไปอีกประมาณ 6 วัน คือเก็บผลิตภัณฑ์ได้นานถึงประมาณ 9 วัน (จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 1 x 10^5 cfu/g sample ตามมาตรฐาน มอก. 2533) ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมเก็บได้เพียง 3 วันท่านั้น ค่า pH และปริมาณกรดของตัวอย่างทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บ และสีของตัวอย่างไกล้เคียงกัน ยกเว้นลูกชิ้นที่เคลือบด้วย CBS มีสีเหลืองกว่าตัวอย่างควบคุม คุณภาพทางประสาทสัมผัสของลูกชิ้นทั้งหมดไกล้เคียงกัน แต่การยอมรับโดยรวม กลิ่นผิดปกติ และสีของลูกชิ้นเคลือบด้วย CBS ต่ำกว่าของลูกชิ้นควบคุม เนื่องจากสีและกลิ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต CBS ซึ่งควรมีการทดลองกำจัดสีและกลิ่นต่อไป

9.5 การคัดและจำแนกแบคที่เรียทดสอบและการใช้แบคทีริโอซินจาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่

แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในสภาวะการบรรจุแบบปกติ และแบบสุญญากาศได้นานกว่าเมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุม เมื่อพิจารณามาตรฐานการปนเปื้อนของปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารคือ

5.0 log cfu/g พบว่า ลูกชิ้นไก่เคลือบด้วยแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ และลูกชิ้นที่ผสมแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่เตรียมได้แบบเข้มข้นและแบบผงแห้งมีอายุการเก็บรักษาได้นานกว่าลูกชิ้นที่ไม่มีการใช้สารแบคทีริโอซินเลย ทั้งนี้การใช้แบบเคลือบผิวลูกชิ้นสามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 15-18 วัน และการใช้แบบผสมในสูตรลูกชิ้นสามารถเก็บได้นานประมาณ 21 วัน และพบว่าแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่ดีใกล้เคียงกับสาร nisin ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินทางการค้าที่ผลิตจากเชื้อ LAB สายพันธุ์ *Lc. Lactis* เช่นกัน แต่ต่าง strain กัน ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจและควรมีการศึกษาการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่สร้างจากเชื้อ *Lc. lactis* TISTR 1401 กับผลิตภัณฑ์อาหารจากเนื้อสัตว์ชนิดอื่น ๆ อีกต่อไป

9.6 การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกทนความร้อนสำหรับผลิตไส้กรอกอีสาน

การทดลองให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 °C กับเชื้อ lactic acid bacteria ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. brevis TISTR 860, *Lb. delbrueckii* subsp. bulgaricus TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 และ *Lb. casei* subsp. rhamnosus SN11 พบว่า เชื้อสายพันธุ์ *Lb. acidophilus* TISTR 450 ทนความร้อนได้สูงที่สุด และเมื่อให้ความร้อนสูงถึง 80 °C ยังมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตประมาณครึ่งหนึ่งของจำนวนเซลล์เริ่มต้น เมื่อใช้เชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 เป็นกล้าเชื้อผลิตไส้กรอกอีสานที่มีการผลิตโดยอบให้ความร้อนประมาณ 70 °C เพื่อให้ผิวไส้กรอกแห้งหมาดก่อนการหมัก พบว่าทำให้ได้ไส้กรอกที่มี pH ลดต่ำกว่า 5 ได้เร็วกว่าไส้กรอกผลิตด้วยเชื้อในธรรมชาติที่ไม่ได้ผสมกล้าเชื้อ โดย pH ของไส้กรอกผลิตด้วยกล้าเชื้อทนความร้อนสูงลดลงต่ำกว่า pH 5 ภายในเวลา 1-2 วัน ขณะที่ไส้กรอกผลิตแบบปกติต้องใช้เวลานานประมาณ 3-4 วัน และพบว่าไส้กรอกอีสานผลิตด้วยเชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 มีสีที่สว่างและอ่อนกว่าไส้กรอกปกติ ดังนั้นการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนความร้อนสำหรับผลิตไส้กรอกอีสานจึงสามารถเร่งการผลิตไส้กรอกได้เร็วขึ้นกว่าการผลิตที่ไม่มีการใช้กล้าเชื้อ ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนความร้อนได้มีจำนวนเซลล์รอดชีวิตจำนวนหนึ่งหลังผ่านการให้ความร้อนระหว่างการผลิต และสามารถหมักไส้กรอกได้ดีที่อุณหภูมิต่ำกว่าระหว่างการหมักไส้กรอก แต่ไส้กรอกอีสานผลิตด้วยเชื้อ *Lb. acidophilus* TISTR 450 มีสีที่สว่างและอ่อนกว่าไส้กรอกผลิตโดยไม่เติมกล้าเชื้อ

ประวัติหัวหน้าโครงการวิจัย

1. ชื่อ ดร. กนกอร นามสกุล อินทราพิเชฐ
2. ตำแหน่งปัจจุบัน รองศาสตราจารย์
3. หน่วยงานที่อยู่ที่ติดต่อได้

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
อ. เมือง จ. นครราชสีมา 30000
โทรศัพท์ 044 22 4265
โทรสาร 044 22 4387

4. ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2515 ปริญญาตรี วทบ. (วิทยาศาสตร์การอาหาร) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
พ.ศ. 2518 ปริญญาโท MS (Food Science) California State University, Fresno, USA
พ.ศ. 2533 ปริญญาเอก Ph.D. (Food Science) University of Missouri, Columbia, USA

5. สาขาวิชาที่มีความชำนาญการ

Food Chemistry (Food Flavors), Meat Science and Technology