

การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยแบคทีเรียโอสินแบบหยาบ  
ซึ่งผลิตจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์มะดันดอง

นางสาวณัฐธิดา จันทร์ประเสริฐ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร  
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี  
ปีการศึกษา 2553

**GROWTH INHIBITION OF FOODBORNE PATHOGENS  
BY CRUDE BACTERIOCIN PRODUCED FROM  
LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM PICKLED  
*Garcinia schomburgkiana* pierre PRODUCTS**

**Natthida Chanprasert**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for  
the Degree of Master of Science in Food Technology**

**Suranaree University of Technology**

**Academic Year 2010**

การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยแบคทีเรียโอสซินแบบหยาบซึ่งผลิต  
จากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์มะดันดอง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา  
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

(ผศ. ดร.สุนทร กาญจนทวี)

ประธานกรรมการ

(ผศ. ดร.ปิยะวรรณ กาสลัก)

กรรมการ (อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์)

(ผศ. ดร.ปริยาภรณ์ อิศรานุกวัฒน์)

กรรมการ

(อ. ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไฉย)

กรรมการ

(ศ. ดร.ชูกิจ ลิ้มปีจางค์)

รองอธิการบดีฝ่ายวิชาการ

(ผศ. ดร.สุเวทย์ นิงสานนท์)

คณบดีสำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร

ณัฐธิดา จันทร์ประเสริฐ : การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดย  
แบคทีเรียโอซินแบบหยาบซึ่งผลิตจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์  
มะดันดอง (GROWTH INHIBITION OF FOODBORNE PATHOGENS BY CRUDE  
BACTERIOCIN PRODUCED FROM LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM  
PICKLED *Garcinia schomburgkiana* pierre PRODUCTS) อาจารย์ที่ปรึกษา :  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก, 129 หน้า.

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากมะดันดอง จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารแข็ง MRS ผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่าคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ทั้งหมด 160 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างแท่งสั้น 141 ไอโซเลท (ร้อยละ 88) รูปร่างกลม 11 ไอโซเลท (ร้อยละ 7) และรูปไข่ 8 ไอโซเลท (ร้อยละ 5) เมื่อทดสอบด้วยวิธี spot agar test มีเพียง 18 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* TISTR 687 และ/หรือ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ได้ หลังจากนั้นทดสอบเพื่อยืนยันการผลิตแบคทีเรียโอซินแบบหยาบ (Crude bacteriocin) โดยวิธี agar well diffusion พบว่ามี 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญทั้ง *B. cereus* TISTR 687 และ *S. aureus* TISTR 118 ได้ และมี 6 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญ *B. cereus* TISTR 687 ได้เพียงสายพันธุ์เดียว ทุกไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* TISTR 780 ได้ เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 18 ไอโซเลทโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี สรีรวิทยา และความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ พบว่าจัดเป็น *Lactobacillus plantarum* 1 ทั้งหมด 13 สายพันธุ์ สำหรับ *Lactobacillus brevis* 1, *Lactobacillus pentosus* และ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 พบอย่างละ 1 สายพันธุ์ ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนกร้อยละ 91.1-99.9, 99.8, 99.9 และ 99.7 ตามลำดับ สำหรับ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* และ *Lactobacillus plantarum* 1 มีระดับความถูกต้องของการจัดจำแนกต่ำ ร้อยละ 47.4 และ 57.8 ตามลำดับ สายพันธุ์ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 สามารถผลิต crude bacteriocin ได้มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกมาตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต crude bacteriocin โดยใช้ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบ พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวเมื่อเจริญในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พร้อมทั้งเติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สามารถเจริญได้ดีและผลิต crude bacteriocin ได้มากที่สุด กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเมื่อผลิตในสภาวะที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 320 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Arbitrary unit, AU/ml) และเมื่อใช้วิธี simple parallel line model มีค่าเท่ากับ 1.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับไนซิน คุณสมบัติของ

crude bacteriocin เป็นโปรตีน ทนความร้อนได้ไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวดีในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5-7 ออกฤทธิ์แบบฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตก ผลจากการศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบรูที่เชื่อมเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 และสังเกตเห็นสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ผ่านรูที่เชื่อมเซลล์นี้

NATTHIDA CHANPRASERT : GROWTH INHIBITION OF FOODBORNE  
PATHOGENS BY CRUDE BACTERIOCIN PRODUCED FROM LACTIC  
ACID BACTERIA ISOLATED FROM PICKLED *Garcinia schomburgkiana*  
pierre PRODUCTS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PIYAWAN  
GASALUCK, Ph.D., 129 PP.

PICKLED *Garcinia schomburgkiana* pierre/*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1/  
CRUDE BACTERIOCIN/ TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY/  
FOODBORNE PATHOGENS

One hundred and sixty isolates of lactic acid bacteria (LAB) were isolated from 8 natural lactic acid fermentations of pickled *Garcinia schomburgkiana* pierre (Madan) on de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) medium supplemented with 1% calcium carbonate. Among these isolates, 141 were short rod-shaped (88%), 11 were coccoid-shaped (7%) and 8 were oval-shaped (5%). The eighteen out of one hundred and sixty isolates could inhibit *Bacillus cereus* TISTR 687 and/or *Staphylococcus aureus* TISTR 118 by using agar spot test. Afterwards, confirmed test by well diffusion method of 18 isolates showed that 2 isolates could inhibit both *B. cereus* TISTR 687 and *S. aureus* TISTR 118, 6 isolates could inhibit only *B. cereus* TISTR 687 but not against *Escherichia coli* TISTR 780. Morphological, biochemical, physiological characteristics and carbohydrate fermentation by API 50 CHL kits were preliminarily examined. Eighteen antimicrobial substances producing LAB were potentially identified as *Lactobacillus plantarum* 1, 3 isolates were *Lactobacillus brevis* 1, *Lactobacillus pentosus* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 with high

preciseness of identification at 91.1-99.9%, 99.8%, 99.9% and 99.7%, respectively. The remaining 2 isolates were identified as *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* and *Lactobacillus plantarum* 1 with low preciseness of identification at 47.4% and 57.8%, respectively. *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 provided the maximum crude bacteriocin, thus this strain was selected for optimization study of bacteriocin production and further investigation by using only *B. cereus* TISTR 687 as test microorganism. The growth of *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 in the initial pH 6.5 of MRS broth using glucose as carbon source containing 2% NaCl concentration (w/v) incubated at 35°C for 18 h could produce the highest crude bacteriocin. The bacteriocin activity of crude bacteriocin produced under the condition mentioned above was 320 AU/ml and was quantified as 1.97 mg/ml compared with nisin using a simple parallel line model. Characterizations of crude bacteriocin were heat resistant protein at not more than 100°C and stable at pH 5-7. The mode of action of crude bacteriocin was bactericidal with concomitant cell lysis. Cell morphological study results drawn from transmission electron microscopy showed disintegrated cells with loss of protoplasmic materials through cell membrane pores.

School of Food Technology

Academic Year 2010

Student's Signature\_\_\_\_\_

Advisor's Signature\_\_\_\_\_

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ ช่วยชี้แนะและให้คำปรึกษาในการศึกษางานวิจัยด้วยดีตลอดมา รวมถึงให้คำแนะนำในการเขียน และตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์ กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริยาภรณ์ อิศรานุกวัฒน์ และ อาจารย์ ดร.รัชฎาพร อุ่นศิริไฉย กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไข วิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น กราบขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านที่ไม่ได้กล่าวชื่อนาม าน ที่นี้ ที่ให้ความรู้ด้านวิชาการตลอดระยะเวลาที่ศึกษาอยู่ที่ มทส.

กราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนทร กาญจนทวี สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และอาจารย์ ดร. Pascal Loubière, Institut National des Sciences Appliquées, INSA เมืองตูลุส ประเทศฝรั่งเศส ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำแนะนำเทคนิคการทำวิจัย อำนวยความสะดวกทั้งสถานที่ เครื่องมือในการวิจัย เงินทุนการศึกษาตลอดการฝึกอบรม ภายใต้โครงการความร่วมมือไทย-ฝรั่งเศส (Franco-Thai Cooperation Program in Higher Education and Research)

ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารีที่ให้เงินทุนสนับสนุน อุปกรณ์และเครื่องมือในการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 และ 3 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่ตลอดเวลาให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกแก่ผู้วิจัยด้วยดีตลอดการดำเนินการวิจัย

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนและผู้ช่วยวิจัย สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหารที่ให้ความช่วยเหลือ เป็นให้กำลังใจพร้อมทั้งให้คำปรึกษาและคำแนะนำมาโดยตลอด

ท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดาและทุกคนในครอบครัวที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษา อบรมสั่งสอนและให้กำลังใจมาโดยตลอด จนทำให้ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในชีวิตตลอดมา

ณัฐธิดา จันทร์ประเสริฐ



# สารบัญ

## หน้า

บทคัดย่อ (ภาษาไทย).....	ก
บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ).....	ค
กิตติกรรมประกาศ.....	จ
สารบัญ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท

## บทที่

<b>1 บทนำ.....</b>	<b>1</b>
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
1.3 สมมุติฐานการวิจัย.....	3
1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น.....	3
1.5 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
<b>2 ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....</b>	<b>5</b>
2.1 ผักและผลไม้ดอง (Pickled fruits and vegetables).....	5
2.1.1 ประเภทของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง.....	6
2.1.2 มะดันดอง (Pickled <i>Garcinia schomburgkiana</i> pierre, Madan).....	7
2.2 แบคทีเรียกรดแล็กติก.....	8
2.2.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแล็กติก.....	9
2.2.2 กระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต.....	12
2.2.3 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก.....	16
2.3 แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocins) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก.....	19

## สารบัญ (ต่อ)

### หน้า

2.3.1	ความหมายของแบคทีเรียโอซิน.....	19
2.3.2	คุณสมบัติโดยทั่วไปของแบคทีเรียโอซิน.....	20
2.3.3	ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินกับสารปฏิชีวนะ (Antibiotics).....	20
2.3.4	การจำแนกแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก.....	21
2.3.5	ไนซิน (Nisin).....	26
2.3.6	ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยแบคทีเรียกรดแล็กติก.....	30
2.3.7	การใช้แบคทีเรียโอซินเพื่อปรับปรุงเรื่องความปลอดภัยของอาหาร.....	32
2.3.8	การใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับเทคโนโลยีเซลล์.....	32
<b>3</b>	<b>วัสดุและวิธีการ.....</b>	<b>34</b>
3.1	แบคทีเรีย.....	34
3.2	การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากผลิตภัณฑ์นมสด.....	34
3.3	การทดสอบ เพื่อพิสูจน์แบคทีเรียกรดแล็กติก.....	35
3.4	การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งยับยั้งการเจริญ แบคทีเรียทดสอบ.....	35
3.5	การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้.....	37
3.6	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin.....	38
3.7	การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin ในสภาวะที่เหมาะสม.....	40
3.8	การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของ crude bacteriocin.....	41
3.9	การศึกษาลักษณะการออกฤทธิ์ของ crude bacteriocin ต่อเชื้อก่อโรคในอาหาร <i>B. cereus</i> TISTR 687.....	42
3.10	การวิเคราะห์ทางสถิติ.....	44
3.11	สถานที่ทำการทดลอง และเก็บข้อมูล.....	44
<b>4</b>	<b>ผลการทดลองและการวิจารณ์.....</b>	<b>45</b>
4.1	การแยกแบคทีเรียกรดแล็กติก.....	45

## สารบัญ (ต่อ)

## หน้า

4.2	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินแบบหยาบ.....	46
4.3	การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ.....	51
4.4	การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินแบบหยาบ.....	67
4.5	การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1.....	85
4.6	การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคเทอริโอซินแบบหยาบที่ผลิตโดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1.....	87
4.7	การศึกษาลักษณะการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินต่อเชื้อก่อโรคในอาหาร <i>B. cereus</i> TISTR 687.....	93
5	สรุปและข้อเสนอแนะ.....	101
5.1	บทสรุป.....	101
5.2	ข้อเสนอแนะ.....	102
	รายการอ้างอิง.....	103
	ภาคผนวก.....	118
	ภาคผนวก ก.....	119
	ภาคผนวก ข.....	124
	ประวัติผู้เขียน.....	129

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ผักดองที่ผลิตในประเทศต่างๆ ทั่วโลก.....6
2.2	คุณค่าสารอาหารของผลและใบอ่อนมะดันในส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม.....8
2.3	ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ.....21
2.4	ลักษณะที่สำคัญบางประการของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก.....23
2.5	ปริมาณการใช้ไนซินและ Nisaplin ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ.....29
4.1	จำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมดซึ่งตรวจนับได้จากมะดันดองแหล่งต่างๆ.....45
4.2	จำนวนไอโซเลททั้งหมดและการทดสอบเพื่อบ่งชี้แบคทีเรียกรดแล็กติก.....47
4.3	ผลการคัดกรองแบคทีเรียกรดแล็กติกในเบื้องต้นซึ่งสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญ ของแบคทีเรียทดสอบโดยใช้วิธี agar spot test.....48
4.4	ผลการทดสอบยืนยันการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบจาก crude bacteriocin โดยใช้วิธี agar well diffusion assay.....50
4.5	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งคัดแยกจากมะดันดอง เจริญบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน.....52
4.6	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยก จากมะดันดอง และแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง.....55
4.7	ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติก ด้วยชุดจัดจำแนกสำเร็จรูป API 50 CHL เปรียบเทียบกับเชื้ออ้างอิงมาตรฐาน.....61
4.8	ค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1.....84
1ก	ปริมาณความขุ่นเซลล์ที่เบอร์ McFarland ต่างๆ.....121

## สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแล็กติกโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas pathway).....14
2.2	การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแล็กติกโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลสหรือ 6-ฟอสโฟกลูโคเนต (Phosphoketolase, 6-phosphogluconate pathway).....16
2.3	โครงสร้างพื้นฐานของไนซิน เอ.....26
2.4	กลไกการทำงานของไนซินโดยมีผลทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์.....27
4.1	รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เจริญบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน.....53
4.2	รูปร่างของเซลล์ <i>Lb. plantarum</i> TISTR 875 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เจริญบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน.....54
4.3	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5.0.....69
4.4	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5.5.....70
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.0.....70
4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5.....71
4.7	ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0.....71

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.8 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5.....	72
4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์.....	75
4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1.....	76
4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2.....	76
4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 3.....	77
4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 4.....	77
4.14 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5.....	78
4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส.....	80
4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส.....	80
4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส.....	81
4.18 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส.....	81
4.19 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อ และการผลิต crude bacteriocin ค่าความขุ่นของเซลล์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงไป เมื่อ <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 เจริญในสภาวะที่เหมาะสม.....	83

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.20	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อจำนวนเชื้อ ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไปและการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1.....86
4.21	ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1.....88
4.22	ผลของการให้ความร้อนต่อกิจกรรมของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1.....90
4.23	ความคงตัวของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่างต่างๆ.....92
4.24	ลักษณะการเจริญของ <i>B. cereus</i> TISTR 687 ในอาหารเหลว Nutrient ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....94
4.25	ผลของ crude bacteriocin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเชื้อ (log CFU/ml) ของ <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและไนซิน.....95
4.26	ผลของ crude bacteriocin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าการดูดกลืนแสง (OD <sub>600 nm</sub> ) ของ <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและไนซิน.....96
4.27	โครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ <i>B. cereus</i> TISTR 687 (เซลล์ปกติ) ที่ส่องด้วยวิธี TEM.....97
4.28	โครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ <i>B. cereus</i> TISTR 687 (เติมไนซินความเข้มข้นสุดท้าย 1000 IU/ml) ส่องด้วยวิธี TEM.....98
4.29	โครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ <i>B. cereus</i> TISTR 687 (เติม crude bacteriocin ความเข้มข้นสุดท้าย 120 AU/ml) ส่องด้วยวิธี TEM.....99
1ข	กราฟมาตรฐานการเจริญและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรของ <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....125
2ข	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว MRS ต่อการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1.....125

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3ข ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1.....	126
4ข ผลของอุณหภูมิในการบ่มต่อการผลิต crude bacteriocin โดย <i>Lc. lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1.....	126
5ข Dose-response plot ของไนซิน และ crude bacteriocin.....	127



## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ANOVA	=	Analysis of variance
AU	=	Arbitrary unit
°C	=	Degree Celsius
CFU	=	Colony forming unit
DMRT	=	Duncan's New Multiple Range Test
<i>e.g.</i>	=	For example
et al.	=	et alia (and others)
g	=	Gram
h	=	Hour
IU	=	International unit
kDa	=	Kilodalton
kg	=	Kilogram
l	=	Liter
mg	=	Milligram
mm	=	Millimeter
mm <sup>2</sup>	=	Square millimeter
nm	=	Nanometer
OD	=	Optical density
ml	=	Milliliter
w/v	=	Weight: volume
×g	=	Gravitational acceleration
μl	=	Microliter
μm	=	Micrometer
%	=	Percent

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ผักและผลไม้หลังจากเก็บเกี่ยวจะมีการสูญเสียเกิดขึ้น ซึ่งการทำนายการสูญเสียของผักและผลไม้ทำได้ยาก การสูญเสียส่วนใหญ่เป็นการสูญเสียลักษณะทางสรีรวิทยาร่วมกับจุลินทรีย์อีกหลายชนิด (Barbosa-Cánovas et al., 2003) Flores-Gutiérrez (2000) อ้างถึงใน Barbosa-Cánovas et al. (2003) ได้รายงานเกี่ยวกับสาเหตุการสูญเสียหลังการเก็บเกี่ยว เช่น ความเสียหายทางชีวภาพหรือจุลินทรีย์ และทางกล การเสื่อมเสียทางสรีรวิทยาของผักและผลไม้ในระหว่างการเก็บรักษาโดยปฏิกิริยาทางเคมีตามธรรมชาติยังเป็นสาเหตุของการสูญเสียคุณค่าทางอาหาร ส่วนการเสื่อมเสียทางชีววิทยาหรือทางจุลินทรีย์เกิดขึ้นเนื่องจากแมลง แบคทีเรีย รา ยีสต์ ไวรัส หนู และสัตว์อื่นๆ เมื่อผักและผลไม้ถูกเก็บไว้ในกล่อง ถัง ตะกร้า หรือขนส่งทางรถบรรทุกหลังจากการเก็บเกี่ยวอาจเกิดการปนเปื้อนข้ามจากภาชนะบรรจุหรือโดยจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียจากผักและผลไม้อื่นๆ การเก็บเกี่ยว การบรรจุและการขนส่งที่ไม่เหมาะสมทำให้เพิ่มโอกาสในการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของผักและผลไม้ได้เช่นเดียวกัน ซึ่งผักและผลไม้สดจะมีความชื้นและสารอาหารสูงจึงทำให้เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้ (Lee, 2004) ผักและผลไม้ต่างชนิดกันจะมีจำนวนและชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนแตกต่างกัน จำนวนของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนเริ่มต้นจะบ่งบอกถึงคุณภาพของผลิตภัณฑ์สุดท้าย โดยหากมีจุลินทรีย์เริ่มต้นปนเปื้อนในวัตถุดิบมาก จะทำให้ผักและผลไม้มีคุณภาพที่ด้อยลงและมีอายุการเก็บที่สั้นกว่าปกติ การหมัก (Fermentation) จึงเป็นการถนอมรักษาอาหารอีกวิธีหนึ่งที่มีประโยชน์มากสำหรับผักและผลไม้ ไม่ยุ่งยากซับซ้อนและไม่ต้องการความชำนาญในการใช้เครื่องมือ การดองผักและผลไม้มีหลายวิธี ได้แก่ การดองเค็ม การดองเปรี้ยว และการดองปรุงรส ตัวอย่างของผักที่นำมาทำการดอง เช่น แตงกวา มะเขือเทศ กะหล่ำดอก หัวหอม และกะหล่ำปลี เป็นต้น ในอุตสาหกรรมการทำผักและผลไม้ดองมักจะใช้กระบวนการให้ความร้อน หรือพาสเจอร์ไรซ์เข้มข้นเพื่อเพิ่มความมั่นใจและความปลอดภัยในอาหาร แต่อย่างไรก็ตามผักและผลไม้บางชนิดจะมีความไวต่อความร้อน คุณภาพของสีและเนื้อสัมผัสจะเกิดการเปลี่ยนแปลง และมีคุณลักษณะที่ไม่ดี ไม่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ดังนั้นผักและผลไม้บางชนิดจึงต้องทำการบรรจุใส่ภาชนะ โดยปราศจากการให้ความร้อน หรืออาจผ่านกระบวนการให้ความร้อนเพียงเล็กน้อย แต่ยังคงไม่เพียงพอสำหรับ

จุลินทรีย์ประจำถิ่น (Micro flora) ของผักและผลไม้ชนิดนั้นๆ โดยแบคทีเรียกรดแล็กติกจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติและกลิ่นรสที่เฉพาะตัวแตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสามารถผลิตสารได้หลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหาร เช่น กรดอินทรีย์ (Organic acids) คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) เอทานอล (Ethanol) ไดอะซีทิล (Diacetyl) สารยับยั้งโมเลกุลต่ำ และแบคทีริโอซิน (Bacteriocins) เป็นต้น รวมทั้งทำให้เกิดการแข่งขันในเรื่องการใช้สารอาหารและพื้นที่สำหรับการเจริญกับจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ซึ่งอาจมาวัดดูคิบหรือจากการปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิต ในปัจจุบันผู้บริโภคมีความใส่ใจ และห่วงใยเกี่ยวกับสุขภาพมากขึ้น จึงพยายามเลือกรับประทานอาหารที่ไม่มีสารเติมแต่งทางเคมี (Chemical additives) ดังนั้นการใช้สารถนอมอาหารที่มาจากธรรมชาติ เช่น แบคทีริโอซินจึงได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นและเพื่อเพิ่มทางเลือกของการถนอมอาหารด้วยวิธีทางชีวภาพ (Biopreservative) ในกระบวนการผลิตอาหาร ซึ่งเป็นการหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีและช่วยลดผลกระทบจากสารพิษตกค้างในอาหารได้

มะดัน (*Garcinia schomburgkiana* pierre, Madan) เป็นผลไม้ที่มีการปลูกกันมากตามบ้านเรือนหรือเพื่อทางการค้าในบางพื้นที่ มีการนำไปใช้ประโยชน์เป็นอาหารและยาสมุนไพร นอกจากนี้ยังนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น มะดันดองซึ่งเป็นวิธีหนึ่งช่วยถนอมรักษาอาหารให้เก็บไว้ได้นานมากขึ้น เนื่องจากมะดันเป็นผลไม้ที่มีองค์ประกอบที่เป็นน้ำอยู่ค่อนข้างมากจึงเกิดการเน่าเสียได้ง่าย ส่วนใหญ่มะดันดองเป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือนที่มีการผลิตในระดับท้องถิ่น ด้วยวิธีการหมักเองตามธรรมชาติซึ่งมีข้อเสียหลายประการ เช่น ควบคุมกระบวนการหมักค่อนข้างยาก จุลินทรีย์ที่มีบทบาทหลักในการหมักมีปริมาณไม่แน่นอน และเสี่ยงต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญต่อสุขภาพของผู้บริโภค ทำให้ส่งผลเสียต่อคุณภาพสุดท้ายของผลิตภัณฑ์ เช่น รสชาติและกลิ่นรสไม่สม่ำเสมอ การหมักยังใช้เวลานาน (Ballesteros, Palop, and Sánchez, 1999; Ozdemir, www, 1997) ปัจจุบันมีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับมะดันและการแปรรูปมะดันน้อยมาก เพื่อพัฒนาในเรื่องการหมักและความปลอดภัยของอาหาร จึงได้ศึกษาผลการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของแบคทีริโอซิน ซึ่งเป็นสารประกอบประเภท โพรตีนที่ผลิตจาก LAB ที่คัดแยกได้จากมะดันดอง เพื่อให้ทราบว่ามะดันดองมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากตัวอย่างมะดันดอง

1.2.2 เพื่อคัดเลือกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินแบบหยาบเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้

1.2.3 เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตแบคทีริโอซินแบบหยาบ

ของแบคทีเรียกรดแล็กติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้

1.2.4 เพื่อศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นและลักษณะการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินแบบหยาบ

### 1.3 สมมติฐานของงานวิจัย

1.3.1 แบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากมะดันคองจะสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่ทำการทดสอบได้

1.3.2 แบคทีเรียโอซินมีผลต่อโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและทำให้เซลล์ที่มีชีวิตของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารมีปริมาณลดลง

1.3.3 สภาพแวดล้อมที่ไซบ่ม ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมจะมีผลต่อการเจริญและการผลิตแบคทีเรียโอซินแบบหยาบโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้

### 1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น

1.4.1 จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่ใช้ในการศึกษาได้มาจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

1.4.2 แบคทีเรียโอซินที่ใช้ในการศึกษาดังกล่าวนี้ อยู่ในรูปแบคทีเรียโอซินแบบหยาบ (Crude bacteriocin) ซึ่งยังไม่ได้ทำให้บริสุทธิ์

1.4.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติก และการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซินแบบหยาบจะพิจารณาจากค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้ง (Diameter of inhibition zone) ซึ่งค่านี้จะแปรผันตรงกับปริมาณการผลิตแบคทีเรียโอซิน

### 1.5 ขอบเขตการวิจัย

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างมะดันคองจากตลาดในจังหวัดนครนายก และในจังหวัดนครราชสีมา เพื่อคัดแยก และบ่งชี้แบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารได้ ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นและลักษณะการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินแบบหยาบ ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินได้สูงที่สุด จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารที่ใช้ในการศึกษามี 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus cereus* TISTR 687, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Escherichia coli* TISTR 780 โดยทำการสกัดแบคทีเรียโอซินแบบหยาบ แล้วนำมาหาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Antimicrobial activity) ศึกษาปัจจัย (ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และอุณหภูมิที่ไซบ่ม) ซึ่งมีผลต่อการเจริญและการผลิตแบคทีเรียโอซินแบบหยาบ และศึกษาผลของแบคทีเรียโอซินแบบหยาบต่อ

ลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร โดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (Transmission electron microscopy, TEM)

## 1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.6.1 ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับการคัดแยก การคัดเลือกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน

1.6.2 ได้องค์ความรู้เกี่ยวกับสภาวะที่มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้ เพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์หมักดอง โดยกล้าเชื้อ ทำให้เกิดความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ได้

## บทที่ 2

### ปรีทัศน์วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 ผักและผลไม้ดอง

อาหารหมักดอง (Food fermentation) เป็นอาหารที่มีผู้นิยมบริโภคกันทั่วโลก ซึ่งในแต่ละภูมิภาคก็จะมีรูปแบบ ส่วนผสม และวิธีการผลิตที่แตกต่างกันตามแต่ละสถานที่ ทำให้ผลิตภัณฑ์เหล่านี้มีลักษณะเฉพาะตัว (ตารางที่ 2.1) ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง (Pickling) เป็นหนึ่งในผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักกรดแล็กติก (Lactic acid fermentation) ตัวอย่างเช่น กะหล่ำปลีดอง ผักกาดเขียวดอง แดงกวาดอง หน่อไม้ดอง ลูกแพร์ดอง และลูกฟิก เป็นต้น โดยจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้อง คือ แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria) ซึ่งอาจจะปนเปื้อนมากับวัตถุดิบที่ใช้ในการหมักดอง หรือจากสภาพแวดล้อม การหมักดองอาหารนอกจากจะสามารถนอมรักษาอาหาร ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาอาหารให้นานขึ้นและสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Spoilage bacteria) และที่ก่อโรคในอาหารได้แล้ว (Pathogenic bacteria) ยังช่วยจัดสารต้านโภชนาการ (Antinutrient) ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีน กรดอะมิโนและกรดไขมันที่จำเป็น วิตามินที่นำไปใช้ประโยชน์ได้ เช่น โทเคมิน ไรโบฟลาวิน ไนอะซิน เป็นต้น รวมทั้งในระหว่างหมักนั้นจุลินทรีย์จะสามารถผลิตเอนไซม์ที่สามารถย่อยธาตุอาหารหลัก (Macronutrient) ซึ่งจะช่วยให้การย่อย (Digestibility) (Karovičová and Kohajdová, 2003) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแล็กติกถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe, GRAS) และเป็นโปรไบโอติก (Probiotic) หมายถึงจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อบริโภคแล้วก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ ช่วยปรับสมดุลและส่งเสริมการทำงานของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติและในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ (Deegan, Cotter, Hill, and Ross, 2006) โดยสกุล *Lactobacilli*, *Bifidobacterium* และ *Lactococci* มักจะพบว่ามีความสามารถเป็นโปรไบโอติกได้ (Fuller, 1989; Soomro, Masud, and Anwaar, 2002) ถ้าโปรไบโอติกมีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินก็จะเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้ ในปัจจุบันมีความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อซึ่งมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเหล่านี้มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารของทั้งคนและสัตว์ รวมทั้งในอุตสาหกรรมยาด้วย (Narender, Ravi, Sunder, and Mallikarjun, 2010) สำหรับ *Lactobacilli* และ *Bifidobacterium* จะมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากเชื้อทั้งสองสายพันธุ์นี้ จะพบได้ในลำไส้ของมนุษย์มีการอยู่แบบพึ่งพาอาศัยกัน แต่สำหรับ *Lactococcus* จะมีความสนใจศึกษาเรื่องโปรไบโอติกน้อยกว่าเนื่องจากเชื้อมีชีวิตโดยธรรมชาติแล้วไม่ได้อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (gastrointestinal tract)

(Shitandi, Alfred, and Symon, 2007) ในปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสำคัญเกี่ยวกับอาหาร และสุขภาพมากขึ้น และอาหารที่มีโปรไบโอติกถือว่ามีความปลอดภัยและมาจากธรรมชาติ ดังนั้นอาหารที่มีโปรไบโอติกจึงได้รับความนิยมและความสนใจไปทั่วโลก (Abee, Krockel, and Hill, 1995; Lim and Im, 2009; Stanton et al., 2001)

## ตารางที่ 2.1 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ผักดองที่ผลิตในประเทศต่างๆ ทั่วโลก

Product name	Country	Major ingredients	Microorganisms
Sauerkraut	International	Cabbage, salt	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Latobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Kimchi	Korea	Korea cabbage, radish, various vegetables, salt	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Latobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Dhamuoi	Vietnam	Cabbage, various vegetables	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i>
Dakguadong	Thailand	Mustard leaf, salt	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Burong mustala	Philippines	Mustard	<i>Latobacillus brevis</i> , <i>Pediococcus cerevisiae</i>

ที่มา: Karovičová and Kohajdová (2003)

### 2.1.1 ประเภทของผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง

Subhadrabandhu (2001) ได้แบ่งประเภทผักและผลไม้ดองที่เกิดจากการหมักชนิดให้กรดแล็กติกออกเป็น 3 ประเภท คือ การดองด้วยเกลือแห้ง การดองด้วยน้ำเกลือ และการดองแบบไม่เติมเกลือ

#### 2.1.1.1 การดองด้วยเกลือแห้ง (Dry salted pickles)

เกลือที่ใช้ควรเป็นเกลือทะเลในรูปของเม็ดหรือผงก็ได้ เมื่อผักหรือผลไม้ซึ่งเป็นวัตถุดิบในการหมักจะถูกผสมกับเกลือแห้ง เกลือจะทำหน้าที่สกัดน้ำออกจากวัตถุดิบ นอกจากนี้ น้ำหนักของวัตถุดิบจะเป็นตัวกดทับชั้นของวัตถุดิบด้วยตัวเอง ทำให้เกิดเป็นน้ำเกลือ หลังจากนั้นกระบวนการหมักจะเริ่มเกิดขึ้นและพบฟองอากาศของคาร์บอนไดออกไซด์ โดยทั่วไปนิยมใช้เกลือประมาณร้อยละ 3-5 โดยโรยระหว่างชั้นของผักที่หนาประมาณ 1 นิ้ว ซ้อนทับกันหลายๆ ชั้น ด้านบนสุดจะปิดทับด้วยเกลือและใช้ของหนักๆ ปิดทับด้านบนสุดอีกชั้น เพื่อช่วยให้น้ำออกจากวัตถุดิบ

ได้ดีขึ้น ผักจะเกิดการอัดตัวกันแน่นทำให้มีอากาศแทรกตัวอยู่ได้น้อย ทำให้แบคทีเรียกรดแล็กติกเจริญเติบโตได้ดี การหมักจะใช้เวลาประมาณ 8-20 วัน ขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของผัก รวมถึงอุณหภูมิห้องที่ใช้หมักด้วย การหมักจะเสร็จสมบูรณ์เมื่อไม่พบฟองอากาศเกิดขึ้น หลังจากนั้นจะสามารถบรรจุผักคองร่วมกับส่วนผสมอื่นๆ ได้ เช่น น้ำส้มกับเครื่องเทศ หรือน้ำมันกับเครื่องเทศ ผักและผลไม้คองที่นิยมนำมาคองด้วยวิธีนี้ เช่น กะหล่ำปลีคอง (Sauerkraut) แตงกวา (Cucumber) ผักกาด (Mustard leaf) ทูเรียน (Durian) ไลม์ (Lime) บีตรูต (Beetroot) และเลมอน (Lemon) เป็นต้น

#### 2.1.1.2 การคองด้วยน้ำเกลือ (Brined fruit and vegetable pickles)

การหมักคองโดยใช้น้ำเกลือนิยมใช้กับผักหรือผลไม้ที่มีความชื้นน้อย โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำเกลือแตกต่างกันไปตามแต่ละผลิตภัณฑ์ เช่น แตงกวาคองใช้น้ำเกลือความเข้มข้นร้อยละ 5-8 (Mäki, 2004) สำหรับมะกอกเขียว มะเขือยาว กะหล่ำปลี ขิง กระเทียม และมะม่วงใช้ความเข้มข้นของน้ำเกลือร้อยละ 6 (Ballesteros et al., 1999; Kacem and Karam, 2006; Tanganurat, Quinquis, Leelawatcharamas, and Bolotin, 2009) ซึ่งโดยปกติแล้วผักและผลไม้คองที่คองแบบธรรมชาติเพื่อให้เกิดกรดแล็กติก (Lactic acid fermentation) มักจะใช้ความเข้มข้นของน้ำเกลือไม่เกินร้อยละ 8 (Ozdemir, www, 1997) เมื่อวัตถุดิบถูกจุ่มลงไปลงในน้ำเกลือ น้ำเกลือจะทำหน้าที่สกัดน้ำตาลออกจากผักและผลไม้โดยอาศัยหลักการออสโมติก การหมักจะเริ่มเกิดขึ้น แบคทีเรียกรดแล็กติกจะเริ่มเจริญใช้น้ำตาลที่ละลายอยู่ในน้ำเกลือ เพื่อผลิตกรดและสารชนิดต่างๆ มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลง และวัตถุดิบจะเริ่มอ่อนตัวลงภายใน 24 ชั่วโมง ผักและผลไม้คองที่นิยมนำมาคองด้วยวิธีนี้ เช่น มะม่วง (Mango) ไลม์ (Lime) มะกอกเขียว (Green olive) มะกอกดำ (Black olive) ขนุน (Jackfruit) หัวไชเท้า (Radish) แตงกวา (Cucumber) หน่อไม้ (Bamboo shoot) หอมแดง (Red onion) กะหล่ำปลี (Cabbage) เป็นต้น

#### 2.1.1.3 การคองแบบไม่เติมเกลือ (Non salted lactic acid bacteria products)

กระบวนการหมักจะเกิดขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งจะผลิตกรดแล็กติก ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลง สภาวะแวดล้อมจึงไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและที่ก่อโรคในอาหาร ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ที่หมักแบบไม่ใส่เกลือ เช่น Gundruk และ Sinki เป็นต้น

### 2.1.2 มะดันคอง (Pickled *Garcinia schomburgkiana* pierre, Madan)

มะดัน (*Garcinia schomburgkiana* pierre, Madan) จัดอยู่ในวงศ์ Guttiferae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับมังคุด ขนาดของต้นจะมีขนาดปานกลางจนถึงขนาดเล็ก สูงประมาณ 5-10 เมตร มีแหล่งปลูกมะดันในทุกพื้นที่ทุกภาคของประเทศไทย โดยเฉพาะที่ภาคตะวันออก จังหวัดนครนายก นิยมปลูกกันมากและมีการส่งขายผลมะดันสดหรือผลิตภัณฑ์ที่ทำจากมะดันไปยังพื้นที่ข้างเคียง (สำนักงานพัฒนาชุมชนจังหวัดนครนายก, 2553) ใบอ่อนมักจะถูกจัดให้เป็นผัก โดยส่วนใหญ่จะทานสด



หรือนำไปปรุงให้สุกก่อน ทั้งใบและผลมะดันมีคุณค่าทางอาหารสูงมาก ประกอบด้วยวิตามินเอและแคลเซียมสูง (ตารางที่ 2.2) ผลมะดันจะมีสรรพคุณบรรเทาอาการเจ็บคอ รวมทั้งใบ และรากยังมีสรรพคุณขับเสมหะ บรรเทาอาการไอ และช่วยเรื่องขับถ่าย ผลมะดันเมื่อทานสดจะมีรสชาติเปรี้ยวมากและสามารถใช้เป็นเครื่องเคียงในสลัดได้โดยการหั่นเป็นชิ้นบางๆ (Subhadrabandhu, 2001) นอกจากนี้ผลมะดันยังสามารถนำไปแปรรูปเป็นมะดันแช่อิ่ม มะดันคอง และมะดันตากแห้งได้อีกด้วย ซึ่งผลิตภัณฑ์มะดันคองจะเป็นการคองโดยใช้น้ำเกลือประมาณร้อยละ 7 น้ำเกลือจะสามารถช่วยลดความเปรี้ยวของมะดันซึ่งเป็นการถนอมรักษาอาหารวิธีหนึ่ง

ตารางที่ 2.2 คุณค่าสารอาหารของผลและใบอ่อนมะดันในส่วนที่รับประทานได้ 100 กรัม

Components	Fruit	Young leaves
Carbohydrates (g)	6.5	7.3
Protein (g)	0.3	0.3
Fat (g)	0.1	0.1
Fibres (g)	0.4	-
Calcium (mg)	17	103
Phosphorous (mg)	7.0	8.0
Iron (mg)	-	-
Vitamin A (IU) (Carotene)	431	225
Vitamin B (mg) (thiamine)	-	0.01
Vitamin B <sub>2</sub> (mg) (riboflavin)	0.04	0.04
Vitamin B <sub>5</sub> (mg) (niacin)	-	0.02
Vitamin C (mg)	5.0	16.0

ที่มา: Subhadrabandhu (2001)

## 2.2 แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria, LAB) จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเซลล์กลมหรือเป็นท่อน ไม่สร้างสปอร์ (Nonsporing) ไม่เคลื่อนที่ (Non-motile) ไม่สร้างเอนไซม์อะเลส แต่ในสภาวะการเจริญที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำ เชื้ออาจสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์อะเลส (Pseudocatalase) ได้ เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่เพาะเลี้ยงยากเนื่องจากต้องการสารอาหารที่เหมาะสม ครอบงำในการเติบโต (Fastidious microorganism) การจัดจำแนก

แบคทีเรียกรดแล็กติกในระดับสกุล สามารถพิจารณาจากข้อมูลลักษณะทางสัณฐานวิทยา รูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ โครงแบบ (Configuration) ของกรดแล็กติก การทดสอบความสามารถในการทนเกลือและต่อสภาวะกรดหรือด่าง นอกจากนี้ยังรวมถึงการศึกษาอนุกรมวิธานโดยอาศัยของค้ประกอบทางเคมี (Chemotaxonomic markers) เช่น การศึกษาของค้ประกอบของกรดไขมันและผนังเซลล์ รวมถึงการวิเคราะห์ลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rRNA gene sequencing) และ การสร้างลายพิมพ์ดีเอ็นเอ โดยวิธีที่มีการใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรส (Polymerase chain reaction-based fingerprinting techniques) และ soluble protein patterns ซึ่งในปัจจุบันถือว่าเป็นวิธีที่สามารถจำแนกและจัดหมวดหมู่สกุลของแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ถูกต้องแม่นยำมากที่สุด (Axelsson, 2004)

### 2.2.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแล็กติก

ในปัจจุบันแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ถูกจำแนกและจัดหมวดหมู่ได้ทั้งหมด 21 สกุล (Genus) แต่อย่างไรก็ตามสกุลของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่เกี่ยวข้องกับเทคโนโลยีอาหารจะมีอยู่ 12 สกุลดังนี้ *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* ดังนั้นในงานวิจัยฉบับนี้จะกล่าวถึงเพียง 12 สกุลซึ่งมีความเกี่ยวข้องกัอาหาร

#### 2.2.1.1 สกุล *Aerococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาด 1.0-2.0 ไมโครเมตร และเซลล์มีการเรียงตัวแบบ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (Tetrad) หรือเป็นคู่ มีลักษณะคล้าย *Pediococcus* แต่ทนกรดได้น้อยกว่า นำมาจัดจำแนกใหม่เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีสถานะเป็นเบสสูงและสามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีคาร์โบไฮเดรตประกอบด้วย *Aerococcus viridans* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากสายพันธุ์ *P. homari* และ *P. urinae-equi* ตามลำดับ มีปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 39.6-39.7 โมลเปอร์เซ็นต์ และมีเพียงสายพันธุ์เดียว คือ *A. viridans* ซึ่งก่อให้เกิดโรคในกึ่งลอบสเตอร์และเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน (Stiles and Holzappel, 1997)

#### 2.2.1.2 สกุล *Carnobacterium*

เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลาง หรือเป็นท่อนเรียว (Slender rod) ขนาดกว้าง 0.5-0.7 ไมโครเมตร และยาว 1.1-3.0 ไมโครเมตร เซลล์มีการจัดเรียงตัวแบบอยู่เป็นคู่หรือแบบเดี่ยว มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ ผลิตรกรดแล็กติกชนิด L(+) มีเพียงสายพันธุ์เดียว คือ *Carnobacterium pleistocenium* ที่ไม่สามารถผลิตแล็กเตท แต่ผลิตอะซีเตท เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ จากการหมักน้ำตาลเฮกโซสได้ (Hammes and Hertel, 2009a) ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ คือ *Carnobacterium divergens*, *C. piscicol*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C. alterfunditum* มีปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 31.6-37.2 โมลเปอร์เซ็นต์ (Schillinger and

Holzapfel, 1995)

#### 2.1.1.3 สกุล *Enterococcus*

แต่เดิมถูกจัดอยู่ในสกุล *Streptococcus* เซลล์มีรูปไข่และมีการจัดเรียงตัวแบบเดี่ยว คู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นๆ (Short chains) ผลิตกรดแล็กติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมัก กลูโคส (Homofermentative lactic acid bacteria) สามารถเจริญได้ทั้งที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์เมื่อเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเลือดเป็นส่วนผสม (Blood-containing agar media) จะมีความสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม (Pseudocatalase) ได้ มีอัตราส่วนของเบสในดีเอ็นเอ (G+C content) ระหว่าง 37-40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Devriese and Pot, 1995; Švec and Devriese, 2009)

#### 2.1.1.4 สกุล *Lactobacillus*

เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งหรือทรงรี (coccobacilli) ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ ส่วนมากเป็นพวกต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อยในการเจริญ (Microaerophilic bacteria) แต่บางสายพันธุ์เป็นเจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobic bacteria) และไม่ต้องใช้ออกซิเจนในการเจริญ (Strictly anaerobes) เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่มใหญ่ที่สุด เนื่องจากมีความแตกต่างในอัตราส่วนของเบสในดีเอ็นเอ (G+C content) ภายในสกุลสูงถึง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ จึงทำให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความหลากหลายของลักษณะทางฟิโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยา (Axelsson, 2004; Hammes and Hertel, 2009b; Hammes and Vogel, 1995)

#### 2.1.1.5 สกุล *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดกว้าง 0.58-1.2 ไมโครเมตร และยาว 0.5-1.5 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ มีการหมักแบบผลิตกรดแล็กติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลัก (Homofermentative lactic acid bacteria) มักใช้เป็นก้ำเชื้อในผลิตภัณฑ์นมสามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส แต่บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่ 7 องศาเซลเซียส ใช้เวลาในการเจริญ 7-14 วัน (Sakala et al., 2002) ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus lactis*, *Lc. garvieae*, *Lc. plantarum*, *Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium* มี ปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 34-43 โมลเปอร์เซ็นต์ (Teuber, 1995)

#### 2.1.1.6 สกุล *Leuconostoc*

รูปร่างของเซลล์ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญ เมื่อเจริญอยู่ในอาหารที่มีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยึดออกคล้ายกลุ่ม lactobacilli มีการจัดเรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยวและเป็นสายโซ่สั้น แต่เมื่อเจริญในน้ำนม เซลล์จะมีลักษณะเป็นทรงกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ขนาดกว้าง 0.5-0.7 ไมโครเมตร และยาว 0.7-1.2 ไมโครเมตร สามารถหมักกลูโคสแล้วผลิตกรดแล็กติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซิติลและสารให้กลิ่นรสต่างๆ (Heterofermentation) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการ

สารอาหารสูง ประกอบด้วย 8 สปีชีส์ ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *L. pseudomesenteroides*, *L. argentinum*, *Lc. lactis*, *L. gelidum*, *L. carnosum*, *L. citreum* และ *L. fallax* มีปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 37-40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Dellaglio, Dicks, and Torriani, 1995)

#### 2.1.1.7 สกุล *Oenococcus*

ประกอบด้วยสายพันธุ์เดียวคือ *Oenococcus oeni* ได้ถูกแยกออกมาจากสกุล *Leuconostoc* ด้วยคุณสมบัติการทนทั้งกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอด้วยการศึกษาดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA hybridization) และลำดับเบสของ 16S rRNA ต่างจากสายพันธุ์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน มีปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 37-43 โมลเปอร์เซ็นต์ (Axelsson, 1994; Dicks and Holzapfel, 2009)

#### 2.1.1.8 สกุล *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมบางครั้งมีรูปร่างไข่ (Ovoid) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร สามารถแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวโดยแบ่งครั้งที่ 2 ในทิศทางด้านขวามือของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (Tetrad) บางครั้งพบเป็นคู่ ไม่ค่อยพบเซลล์เดี่ยวและสายโซ่ ในสภาวะไม่มีอากาศผลิตกรดแล็กติกชนิด DL และ L (+) จากการหมักกลูโคส เจริญที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์อะคาเลสเทียซึม (Pseudocatalase) พบการหมักแบบ homofermentative และบางสายพันธุ์เป็นสาเหตุของการเสื่อมสภาพในเบียร์และไวน์ มีปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 35-44 โมลเปอร์เซ็นต์ (Holzapfel, Franz, Ludwig, and Dicks, 2009; Simpson and Taguchi, 1995)

#### 2.1.1.9 สกุล *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ (Ovoid) เซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร เซลล์มักจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือกลุ่มเมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว เชื้อในสกุลนี้ส่วนมากเป็นสายพันธุ์เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultatively anaerobic) มีเพียงบางสายพันธุ์ที่ต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญ ผลิตกรดแล็กติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) เจริญได้ที่อุณหภูมิ 20-42 องศาเซลเซียส ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ มีหลายสปีชีส์ที่เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์และบางสปีชีส์ก่อให้เกิดโรครุนแรงได้ มีปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 33-46 โมลเปอร์เซ็นต์ (Hardie and Whiley, 1995; Whiley and Hardie, 2009)

#### 2.1.1.10 สกุล *Tetragenococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมบางครั้งมีรูปร่างไข่ (Ovoid) มีการเรียงตัวของเซลล์แบบ tetrad เป็นคู่หรืออยู่เป็นเซลล์เดี่ยว ซึ่งมีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เซลล์มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 0.5-1.0 ไมโครเมตร พบการหมักแบบ homofermentative เป็นสายพันธุ์เจริญได้

ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultatively anaerobic) สายพันธุ์ทั้งหมดในสกุลนี้เดิมเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ใน *P. halophilus* อย่างไรก็ตามได้นำมาจัดจำแนกใหม่เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 18 ซึ่งแตกต่างจากแบคทีเรียกรดแล็กติกชนิดอื่นๆ และมีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม มีปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 34-36 โมลเปอร์เซ็นต์ (Dicks, Holzapfel, Satomi, Kimura, and Fujii, 2009)

#### 2.1.1.11 สกุล *Vagococcus*

เซลล์มีรูปร่างไข่ (Ovoid) มีการเรียงตัวของเซลล์แบบเป็นแบบเดี่ยว คู่ หรือสายโซ่ เป็นสายพันธุ์เจริญได้ทั้งที่มีและไม่มีออกซิเจน (Facultatively anaerobic) แบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งเคลื่อนที่ได้แต่ไม่ทุกสปีชีส์ เจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถผลิตก๊าซได้เมื่อเจริญในอาหารเหลว MRS สามารถผลิตกรดได้จากกลูโคส (D-glucose) และน้ำตาลชนิดอื่นๆ มีปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 34-40 โมลเปอร์เซ็นต์ (Collins, 2009)

#### 2.1.1.12 สกุล *Weissella*

เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งสั้นปลายมน (Rounded tapered ends) หรือไม่มีรูปร่างไข่ (Ovoid) มีการเรียงตัวของเซลล์แบบเป็นคู่หรือสายสั้นๆ ลักษณะคล้ายกับ *Leuconostoc* (*Leuconostoc*-like bacteria) สกุลนี้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแล็กติกเนื่องจากกระบวนการเมแทบอลิซึมและตำแหน่งไฟโลเจเนติก (Phylogenetic position) โครงแบบ (Configuration) ของกรดแล็กติกจะเป็นแบบ DL- หรือ D(-) ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ สามารถหมักกลูโคสแล้วผลิตกรดแล็กติก เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และอะซิเตท (Heterofermentation) มีปริมาณของเบส G+C (mol%) ระหว่าง 37-47 โมลเปอร์เซ็นต์ (Björkroth, Dicks, and Holzapfel, 2009)

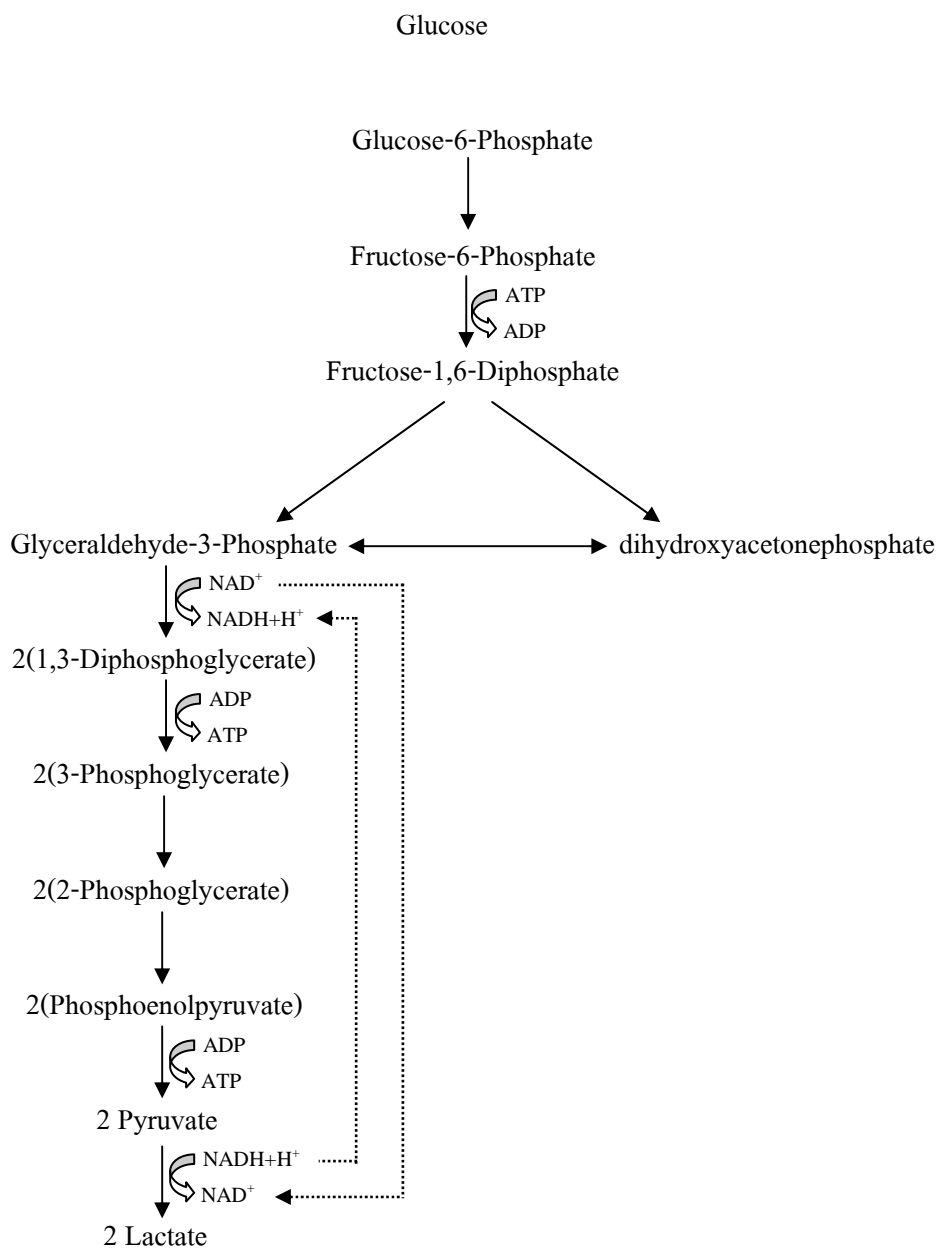
### 2.2.2 กระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต

การหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรียกรดแล็กติกจะทำให้เกิดพลังงานเพื่อนำไปใช้ในการเจริญได้ โดยความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตจะแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติก และเนื่องจากน้ำตาลเฮกโซส (Hexose) เช่น กลูโคสเป็นน้ำตาลที่ถูกนำไปใช้อย่างง่ายดาย ดังนั้นเชื้อทุกชนิดจึงสามารถนำกลูโคสไปใช้ในการเจริญได้ จึงสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแล็กติกออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ตามความสามารถในการหมักกลูโคสได้ดังนี้

#### 2.2.2.1 Homofermentative lactic acid bacteria

กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแล็กติกทุกสกุลยกเว้น *Leuconostoc*, *Obliogately heterofermentative lactobacilli*, *Oenococci* และ *Weissella*s เกิดขึ้นโดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas pathway) (Axelsson, 2004) ดังแสดงในรูปที่ 2.1 โดย

เปลี่ยนกลูโคสแล้วได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดแล็กติกแต่เพียงอย่างเดียว (Homolactic fermentation) ไม่มีผลผลิตพลอยได้ (By products) ตัวอื่นๆ เลย ดังนั้นแบคทีเรียกลุ่มนี้จึงมีความสำคัญในทางอุตสาหกรรมการผลิตกรดแล็กติกมาก ในขั้นตอนแรกของปฏิกิริยามีการใช้พลังงานจากอะดีโนซีน ไตรฟอสเฟต (Adenosine triphosphate, ATP) 2 โมเลกุลเพื่อเปลี่ยนกลูโคสไปเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต (Glucose-6-Phosphate) และเปลี่ยนฟรุกโตส-6-ฟอสเฟต (Fructose-6-Phosphate) ไปเป็นฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟต (Fructose-1,6-Diphosphate) โดยอาศัยเอนไซม์เฮกโซไคเนส และฟอสโฟฟรุกโตไคเนส ตามลำดับ จากนั้น ฟรุกโตส-1,6-ไดฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบคาร์บอน 3 อะตอม ได้แก่ กลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-Phosphate) และไดไฮดรอกซีอะซิโตนฟอสเฟต (Dihydroxyacetonephosphate) ต่อมากลีสเอร์ดีไฮด์-3-ฟอสเฟตเกิดปฏิกิริยาเอสเทอร์ฟิเคชันควบคู่กับการรีดิวซ์นิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide,  $NAD^+$ ) กลายเป็น 1,3-ไดฟอสโฟกลีเซอเรท (1,3-Diphosphoglycerate) จากนั้น 1,3-ไดฟอสโฟกลีเซอเรทจะถ่ายทอคอนมูลฟอสเฟตไปยัง ADP เพื่อสังเคราะห์ ATP และเกิดเป็น 3-ฟอสโฟกลีเซอเรท (3-Phosphoglycerate) ก่อนที่จะเปลี่ยนรูปไปเป็น 2-ฟอสโฟกลีเซอเรท (2-Phosphoglycerate) และฟอสโฟอินอลไพรูเวท (Phosphoenolpyruvate) ตามลำดับ จากนั้นฟอสโฟอินอลไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (pyruvate) พร้อมกับการถ่ายทอคอนมูลฟอสเฟตไปยัง ADP เพื่อสังเคราะห์ ATP ไพรูเวทที่เกิดขึ้นนั้นจะเข้าสู่กระบวนการหมักซึ่งจะมีบทบาทสำคัญในการรักษาสมดุลของสภาวะออกซิเดชันและรีดักชันในเซลล์ ภายใต้สภาวะปกติ เช่น การมีปริมาณน้ำตาลมากเกินไป ไพรูเวทจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแล็กเตทโดยเอนไซม์แล็กเตทดีไฮโดรจีเนส ( $NAD^+$ -dependent lactate dehydrogenase, nLDH) ในขณะที่  $NADH$  ที่เกิดขึ้นจะถูกออกซิไดซ์



**รูปที่ 2.1** การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแล็กติก โดยแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยผ่านวิถีไกลโคไลซิส (Glycolysis, Embden-Meyerhof-Parnas pathway)

ที่มา: Axelsson (2004)

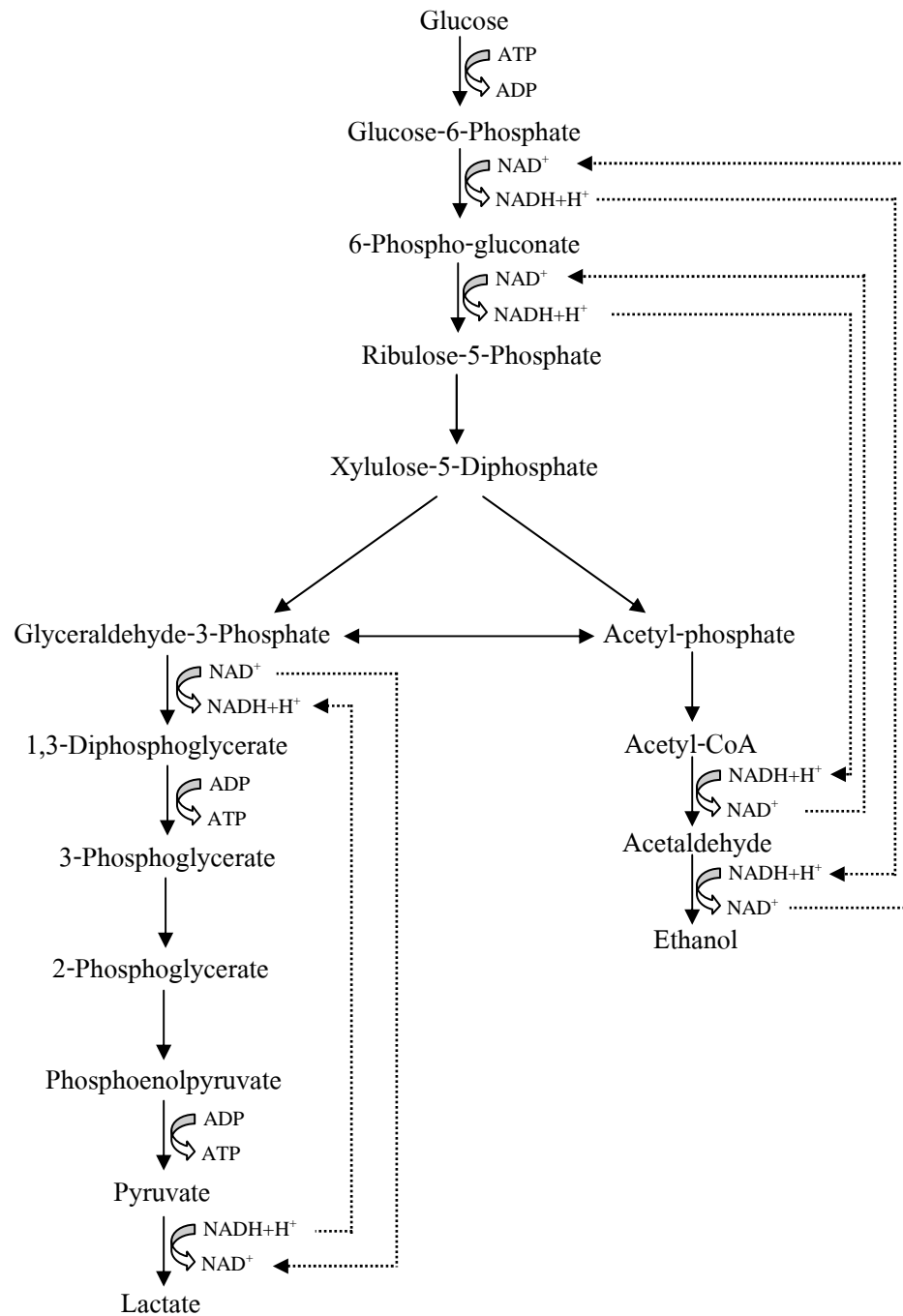
จากกระบวนการดังกล่าวจะได้พลังงานสุทธิ 2 โมเลกุลและกรดแล็กติก 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล การหมักของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแล็กติกซึ่งมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง มีค่าลดลงและยังช่วยยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารได้ นอกจากนี้ยังทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติเปรี้ยวและ

มีกลิ่นกรดด้วย (Battcock and Azam-Ali, 1998)

#### 2.2.2.2 Heterofermentative lactic acid bacteria

กระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่มนี้ดำเนินตามวิถีฟอสโฟลิกโตเลสหรือ 6-ฟอสโฟกลูโคเนต (Phosphoketolase, 6-phosphogluconate pathway) (Axelsson, 2004) แสดงในรูปที่ 2.2 ผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากกระบวนการหมักคือกรดแล็กติกประมาณร้อยละ 50 ส่วนที่เหลือเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอลหรือกรดอะซิติก ในสัดส่วน 1:1:1 กระบวนการหมักเริ่มต้นจากกลูโคสถูกเปลี่ยนไปเป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟต (Glucose-6-Phosphate) จากนั้นกลูโคส-6-ฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนไปเป็น 6-ฟอสโฟกลูโคเนต (6-Phospho-gluconate) และไรบูลอส-5-ฟอสเฟต (Ribulose-5-Phosphate) โดยการทำงานของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสและ 6-ฟอสโฟกลูโคเนตดีไฮโดรจีเนส ตามลำดับ ต่อมาไรบูลอส-5-ฟอสเฟตถูกเปลี่ยนเป็นไซลูลอส-5-ฟอสเฟต (Xylulose-5-Phosphate) โดยเอนไซม์เพนโตสฟอสเฟตไอโซเมอเรส จากนั้นไซลูลอส-5-ฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นอะซีทิลฟอสเฟต (Acetyl-Phosphate) และกลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (Glyceraldehyde-3-Phosphate) ต่อมากลีเซอรอลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวท (Pyruvate) และแลคเตท (Lactate) ตามลำดับ ส่วนอะซีทิลฟอสเฟตจะเปลี่ยนเป็นเอทานอล (Ethanol) หรือกรดอะซิติก (Acetic acid) ขึ้นอยู่กับความสมดุลของสภาวะออกซิเดชันและรีดักชัน สำหรับผลผลิตสุทธิจะได้พลังงาน ATP 1 โมเลกุลและกรดแล็กติก 1 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล การหมักของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะทำให้เกิดสารประกอบต่างๆ ซึ่งมีผลต่อรสชาติและกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์สุดท้าย ซึ่ง heterofermentative lactobacilli สามารถที่จะผลิตแมนนิทอลได้และบางสายพันธุ์ก็สามารถผลิตเดกซ์แทรน (Dextran) ได้ ตัวอย่างเช่น *Leuconostoc mesenteroides* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในกะหล่ำปลีดอง (Sauerkraut) และในผักดองทั่วไป เชื้อชนิดนี้จะมีความทนต่อความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาลได้สูง และมักจะเจริญในช่วงเริ่มต้นของการหมัก ผลิตคาร์บอนไดออกไซด์และกรดทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็ว มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารได้ นอกจากนี้คาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นยังเข้ามาแทนที่ออกซิเจน ทำให้สภาวะเป็นแบบไม่มีออกซิเจน (Anaerobe) ซึ่งเหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Lactobacillus* และออกซิเจนที่ถูกขจัดออกไปนั้นยังส่งผลดีต่อลักษณะทางกายภาพของผักดองด้วย เพราะจะช่วยรักษาสีของผักดองและทำให้กรดแอสคอร์บิกมีความคงตัว





**รูปที่ 2.2** การเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแล็กติกโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลสหรือ 6-ฟอสโฟกลูโคเนต (Phosphoketolase, 6-phosphogluconate pathway)  
ที่มา: Axelsson (2004)

### 2.2.3 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก

แบคทีเรียกรดแล็กติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัยและมีความสำคัญ

ในเรื่องการถนอมอาหารและการหมักอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีอยู่ในตัววัตถุดิบที่จะนำมาใช้หมักหรืออาจเติมในรูปของกล้าเชื้อ (Starter cultures) ภายใต้การควบคุมสภาวะการหมัก (Cintas, Herranz, Nes, and Hernandez, 2001) ในระหว่างกระบวนการหมักที่เกิดขึ้นนี้ แบคทีเรียกรดแล็กติกจะแย่งสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ให้โทษและผลิตสารหลายชนิดซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Food spoilage bacteria) และทำให้อาหารเป็นพิษ (Foodborne pathogen) ได้แก่ กรดแล็กติก กรดอะซิติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ โคอะซิติก สารยับยั้งโมเลกุลต่ำ และแบคทีริโอซิน สารเหล่านี้จะสะสมอยู่ในสภาพแวดล้อมของจุลินทรีย์ และทำให้เกิดผลการยับยั้งการเจริญ ดังนี้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990)

#### 2.2.3.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์เพียงอย่างเดียวของแบคทีเรียกรดแล็กติกชนิด homo-fermentative สังเคราะห์โดยวิถีไกลโคไลซิส ส่วนในกลุ่ม heterofermentative พบว่ามีการสังเคราะห์ทั้งกรดแล็กติก กรดอะซิติกและกรดฟอร์มิก โดยสังเคราะห์ผ่านวิถีฟอสโฟทีโตเลส การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ของกรดอินทรีย์เกิดขึ้นจากการลดลงของความเป็นกรด-ด่างของสภาพแวดล้อมและกรดที่ไม่แตกตัว การที่ความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงเป็นผลมาจากการสะสมของกรดซึ่งมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus* sp., *Vibrio parahaemolyticus* และ *Pseudomonas* sp. (Östling and Lindgren, 1993) โดยปกติแล้วเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์มีหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน กรดอินทรีย์ในรูปที่ไม่แตกตัวจะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้โดยวิธีแพร่ผ่าน เมื่อกรดอินทรีย์เข้าสู่ภายในเซลล์จะเกิดการแตกตัวและปลดปล่อยโปรตอนเข้าสู่ภายในไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดการสะสมของกรดภายในเซลล์ และทำลายสมดุลความต่างศักย์ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ส่งผลให้แรงขับเคลื่อนโปรตอนถูกทำลาย ซึ่งจะขัดขวางกระบวนการเมแทบอลิซึมที่สำคัญภายในเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการเข้าออกของสารซึ่งมีผลต่อการยับยั้งกลไกการขนส่งอาหารและกระบวนการสร้างพลังงาน ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตและอยู่รอดได้ กรดอะซิติกจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย มากกว่ากรดแล็กติก ซึ่งกรดแล็กติกจะเป็นผลิตภัณฑ์หลักของกระบวนการหมักโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก โดยจะอยู่ในรูปสมดุลระหว่างรูปที่แตกตัวและไม่แตกตัว และปริมาณของการแตกตัวของกรดจะขึ้นอยู่กับค่าความเป็นกรด-ด่างของสภาพแวดล้อม (Ammor, Tauveron, Dufour, and Chevallier, 2006; Caplice and Fitzgerald, 1999)

#### 2.2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)

แบคทีเรียกรดแล็กติกเมื่อเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจน จะสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ โดยเกี่ยวข้องกับกระบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอน (Electron transport) อาศัยเอนไซม์ฟลาโว

โปรตีน ออกซิเดส (Flavoprotein oxidases) และนิโคตินาไมด์อะดีนีนไดนิวคลีโอไทด์เพอออกซิเดส (Nicotinamide adenine dinucleotide, NADH peroxidase) ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันบนเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายที่หมู่ซัลไฟไฮดริล (Sulphydryl) มีผลทำให้เอนไซม์หลายชนิดถูกทำลาย และการเกิดปฏิกิริยาเพอออกซิเดชันของชั้นไขมันที่อยู่เยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane lipid) ส่งผลให้เพิ่มการซึมผ่านได้ (Permeability) ของชั้นเมมเบรนจนไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารได้ นอกจากนี้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อาจจะเป็นสารตัวกลางในการผลิตอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ในการฆ่าทำลายเซลล์ (Bactericidal) เช่น อนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ (Superoxide,  $O_2^-$ ) และอนุมูลอิสระไฮดรอกซิล (Hydroxyl,  $OH^\cdot$ ) ซึ่งมีผลทำให้ดีเอ็นเอเกิดความเสียหายได้ (Ammor et al., 2006) แต่อย่างไรก็ตามไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะไม่ส่งผลอันตรายต่อแบคทีเรียกรดแล็กติก เนื่องจากผลของการทำงานของเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ในระบบ เช่น เปอร์ออกซิเดส (Peroxidases) ฟลาโวโปรตีน (Flavoproteins) และ ซูโดคะตะเลส (Pseudocatalase) โดยจะรีดิวซ์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นน้ำ ทำให้ไม่พบการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณที่สูงมาก (Caplice and Fitzgerald, 1999)

#### 2.2.3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide)

ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลผลิตได้จากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ของแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่ม heterofermentative ส่วนแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative ก็สามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ได้เช่นเดียวกันโดยเปลี่ยนซิเตรทและมาเลต หรือจากกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) ของกรดอะมิโน เช่น ฮิสติดีน ไทโรซีน คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้ด้วยการเข้าแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ ซึ่งสภาวะนี้จะไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ต้องการใช้ออกซิเจน และยังส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่างทั้งภายในและภายนอกเซลล์ลดลง ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายถูกทำลาย และทำให้เซลล์ตายในที่สุด ซึ่งประสิทธิภาพการยับยั้งของคาร์บอนไดออกไซด์จะขึ้นอยู่กับเชื้อแบคทีเรียเป้าหมายด้วย (Ammor et al., 2006; Caplice and Fitzgerald, 1999)

#### 2.2.3.4 ไดอะซีทิล (Diacetyl)

ไดอะซีทิล หรือ 2, 3 บิวเทนไดโอน (2, 3-butanedione) เป็นสารที่ให้กลิ่น (Aroma) ซึ่งผลิตโดยการหมักของแบคทีเรียกรดแล็กติก ที่สามารถใช้ซิเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้ เช่น แบคทีเรียกรดแล็กติกบางสายพันธุ์ที่อยู่ในสกุล *Leuconostoc*, *Lactococcus*, *Pediococcus* และ *Lactobacillus* (Holzapfel, Geisen, and Schillinger, 1995) ในสภาวะที่มีซิเตรทและพลังงานจากกระบวนการเมแทบอลิซึมจะทำให้เกิดการสังเคราะห์ไพรูเวตเป็นจำนวนมาก ไพรูเวตส่วนเกินจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไดอะซีทิลและอะซีโตน ไดอะซีทิลสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารและที่เป็นสาเหตุในการเน่าเสียของอาหาร โดยเฉพาะที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รา และยีสต์ ได้มากกว่า

แบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากโคอะซิติลจะไปขัดขวางการใช้ประโยชน์จากอาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบ แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของโคอะซิติลที่พบในอาหารหมักมักจะมีปริมาณไม่มากพอที่จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย (Ammor et al., 2006; Caplice and Fitzgerald, 1999; Jay, 1982)

#### 2.2.3.5 สารยับยั้งโมเลกุลต่ำ

แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำได้หลายชนิด เช่น รอยเทอริน (Reuterin), Reutericyclin และ 2-Pyrrolidone-5-carboxylic acid โดยสารเหล่านี้มีลักษณะที่ต่างจากกรดอินทรีย์และไม่มีสมบัติเป็นโปรตีน เช่น Reuterin ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus reuteri* ที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนผสมของกลูโคสและกลีเซอรอล หรือกลีเซอรอลดีไฮด์ (Glyceraldehydes) ในสภาวะไม่มีอากาศ Reuterin สามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวก รา ไวรัส และ โปรโตซัวได้ (Ross, Morgan, and Hill, 2002) กลไกการยับยั้งของรอยเทอรินเกิดจากการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลุ่มซัลโฟไฮดริล เช่น เอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส (Ribonucleotide reductase) เอนไซม์จึงไม่สามารถเข้าจับกับสารตั้งต้นได้ ส่งผลให้ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ (Caplice and Fitzgerald, 1999; Ouweland and Vesterlund, 2004)

#### 2.2.3.6 แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocins)

แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้หลายชนิด แต่ละชนิดจะมีลักษณะที่แตกต่างกัน เช่น โครงสร้างทางเคมี และกลไกการออกฤทธิ์ เป็นต้น โดยกลไกการออกฤทธิ์พบได้ถึง 3 แบบ คือ การยับยั้งการเจริญของเซลล์ (Bacteriostatic effect) การฆ่าทำลายเซลล์ (Bactericidal effect) และการฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตกด้วย (Bacteriolytic effect) กลไกเหล่านี้นอกจากจะขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียโอซินแล้วยังขึ้นอยู่กับปัจจัยอย่างอื่นด้วย เช่น ระดับความบริสุทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน ชนิดของสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทดสอบ และสภาวะที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรม เป็นต้น

## 2.3 แบคทีเรียโอซิน (Bacteriocins) ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก

### 2.3.1 ความหมายของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินเป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม ซึ่งมีฤทธิ์ในการฆ่าแบคทีเรียเป้าหมายค่อนข้างแคบ และมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน (Tagg, 1976) คือ มีความสัมพันธ์ที่ใกล้เคียง หรือมีถิ่นที่อยู่บริเวณเดียวกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซินนั่นเอง โดยที่แบคทีเรียโอซินจะไม่ยับยั้งหรือมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน เนื่องจากแบคทีเรียจะมีกลไกเฉพาะสำหรับป้องกันตัวเอง (Caplice and Fitzgerald, 1999; Jack et al.,

1995) แบคทีเรียโอซินสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบหลายสายพันธุ์ ในงานวิจัยครั้งนี้จะขอกล่าวถึงแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งได้รับความนิยมมากที่สุด

### 2.3.2 คุณสมบัติโดยทั่วไปของแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียต่างชนิดกันย่อมมีลักษณะทางกายภาพและทางเคมี รวมถึงกลไกการออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมายที่แตกต่างกัน แต่สารที่จะถูกจัดว่าเป็นแบคทีเรียโอซินจะต้องมีคุณสมบัติหลักที่เหมือนกัน (Tagg, 1976) ดังนี้

2.3.2.1 แบคทีเรียโอซินเป็นสารประกอบเปปไทด์หรือโปรตีนดังนั้นจึงถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Proteolytic enzymes) ได้ นอกจากนี้ยังสามารถทดสอบโดยการใส่สารยับยั้งการสร้างโปรตีน (Protein synthesis inhibitor) เพื่อยับยั้งการผลิตสารแบคทีเรียโอซินซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย

2.3.2.2 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แบบฆ่าทำลายเซลล์ (Bactericidal) แบบหยุดการเจริญของเซลล์ (Bacteriostatic) หรือแบบฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตกด้วย (Bacteriolytic)

2.3.2.3 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ โดยแบคทีเรียโอซินจะจับกับตำแหน่งเฉพาะ (Specific binding site or specific receptor) ซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคทีเรียโอซิน

2.3.2.4 ถูกสังเคราะห์โดยประกอบด้วยกระบวนการทรานสคริปชัน (Transcription) และทรานสเลชัน (Translation) เพื่อที่จะถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคทีเรียโอซิน ซึ่งอาจเป็นยีนที่อยู่ในพลาสมิด หรือเป็นยีนที่อยู่ในโครโมโซมก็ได้ขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์

### 2.3.3 ความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียโอซินกับสารปฏิชีวนะ (Antibiotics)

แบคทีเรียโอซินจะถูกสังเคราะห์จากไรโบโซมโดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีน ในขณะที่สารปฏิชีวนะเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีได้หลายรูปแบบและมักมีการเปลี่ยนแปลงจากสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ (Primary metabolite) ไปเป็นสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ (Secondary metabolite) ก่อนจะถูกหลั่งออกมาภายนอกเซลล์ แบคทีเรียโอซินจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะและไวต่อจุลินทรีย์ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียโอซินนั้นๆ แต่สารปฏิชีวนะจะมีการยับยั้งทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ ซึ่งแบคทีเรียโอซินจึงมักถูกประยุกต์ใช้กับอาหารแต่สารปฏิชีวนะจะใช้ในทางการแพทย์ นอกจากนี้แบคทีเรียโอซินยังมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2-3 กิโลดาลตัน จนถึง 30 กิโลดาลตัน แต่สารปฏิชีวนะจะมีน้ำหนักโมเลกุลเพียง 2-3 กิโลดาลตัน เท่านั้น แสดงดังตารางที่ 2.3

### ตารางที่ 2.3 ความแตกต่างระหว่างแบคทีริโอซินและสารปฏิชีวนะ

Characteristic	Bacteriocins	Antibiotics
Application	Food	Clinical
Synthesis	Ribosomal	Secondary metabolite
Activity	Narrow spectrum	Varying spectrum
Host cell immunity	Yes	No
Mechanism of target cell resistance or tolerance	Usually adaptation affecting cell membrane composition	Usually a genetically transferable determinant affecting different sites depending the mode of action
Interaction requirements	Sometimes docking molecules	Specific target
Mode of action	Mostly pore formation, but in a few cases possibly cell wall	Cell membrane or intracellular targets
Toxicity/side effects	None known	Yes

ที่มา: Cleveland et al. (2001)

#### 2.3.4 การจำแนกแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก

การจำแนกแบคทีริโอซินสามารถจำแนกได้หลายแบบ ขึ้นอยู่กับเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนก เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีริโอซิน มวลโมเลกุล โครงสร้างทางเคมีและกลไกการทำงานของแบคทีริโอซิน (ตารางที่ 2.4) ในปัจจุบันนี้แบคทีริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม โดยจะจัดจำแนกตามวิธีการของ Klaenhammer (1993) ซึ่งใช้มวลโมเลกุล โครงสร้างพื้นฐานและพันธะต่างๆ ภายในโมเลกุล การทนต่อความร้อน ความไวต่อเอนไซม์ต่างๆ การมีกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส (Posttranslationally modified amino acid) และกลไกการออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์เป้าหมาย

##### 2.3.4.1 กลุ่มที่ 1 (Class I)

แบคทีริโอซินในกลุ่มนี้จะมีแลนไทปอิดิก (Lantibiotic) คือเปปไทด์ขนาดเล็ก มีจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19-38 โมเลกุลและมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน มีคุณสมบัติทนความร้อน ซึ่งเปปไทด์จะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัสทำให้สายเปปไทด์มีกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนที่พบเห็นได้โดยทั่วไป เช่น dehydrobutyrine และ dehydroalanine รวมถึงโครงสร้างที่มีลักษณะเป็นวงแหวนย่อยๆ เช่น

lanthionine และ methyl-lanthionine แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะถูกจัดจำแนกโดยอาศัยเกณฑ์ของโครงสร้างและประจุของแบคทีเรียโอซิน ดังนั้นจึงจำแนกแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ได้ออกเป็น 2 กลุ่มย่อย คือ Ia และ Ib

กลุ่ม Ia: แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้เป็นเปปไทด์ที่มีขนาดยาว ยืดหยุ่น โคลิเจน มีประจุสุทธิเป็นบวก มีกลไกการทำงานโดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย

กลุ่ม Ib: แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้เป็นเปปไทด์ที่มีรูปร่างกลม โครงสร้างไม่มีความยืดหยุ่น และมีประจุสุทธิเป็นลบหรือเป็นกลาง มีกลไกการทำงานโดยรบกวนการทำงานของเอนไซม์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย (Deegan et al., 2006)

#### 2.3.4.2 กลุ่มที่ 2 (Class II)

แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะป็นนอนแลนไทบิโอติก (Non-lantibiotic) คือไม่มีกรดอะมิโนที่ถูกตัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัส เปปไทด์ขนาดเล็ก มีจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 20-60 โมเลกุล น้ำหนักโมเลกุลมีความไม่แน่นอนแต่มีน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน และมีคุณสมบัติทนความร้อนได้ปานกลาง (80 องศาเซลเซียส) ถึงสูง (120 องศาเซลเซียส) สามารถจำแนกแบคทีเรียโอซินออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ IIa, IIb และ IIc

กลุ่ม IIa : แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria* sp. (Anti-listerial activity) ส่วนปลายด้าน N ของสายเปปไทด์จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะเหมือนกัน คือ Try-Gly-Asn-Gly-Val (YGNGV) และยังมีกรดอะมิโนซิสเทอีน 2 โมเลกุลซึ่งเชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ ที่อยู่ก่อนไปทางด้าน N ของสายเปปไทด์ มีกลไกการทำงานโดยทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย ไม่สามารถควบคุมการเข้าออกของสารหรือไอออนได้

กลุ่ม IIb : แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้ต้องอาศัยแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิดทำงานร่วมกัน โดยทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย

กลุ่ม IIc : แบคทีเรียโอซินในกลุ่มย่อยนี้จะสามารถจำแนกได้อีก 2 กลุ่ม คือแบคทีเรียโอซินที่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) และที่ไม่มีกรดอะมิโนซิสเทอีน

#### 2.3.4.3 กลุ่มที่ 3 (Class III)

แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้จะมีความใหญ่ มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน และไม่ทนความร้อน จึงไม่เหมาะสำหรับนำมาประยุกต์ใช้ในอาหาร ส่วนใหญ่ผลิตโดยแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*

#### 2.3.4.4 กลุ่มที่ 4 (Class IV)

แบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้มีโครงสร้างรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับโมเลกุลอื่น เช่น ไขมัน (Lipoprotein) และคาร์โบไฮเดรต (Glycoprotein) เช่น Plantaricin S

ตารางที่ 2.4 ลักษณะที่สำคัญบางประการของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก

Producing species	Bacteriocin	Spectrum of action	Characteristics
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisin	Gram-positive bacteria	Class I lantibiotic, 3.5 kDa, 34 amino acids, commercially available
	Lacticin 3147	<i>Clostridium</i> sp. <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Propionibacterium acne</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Class I two-component lantibiotic, 4.2 kDa, heatstable, active under acid and physiological pH
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Lactococcin B	<i>Lactobacillus</i>	Class II bacteriocin, 5 kDa, narrow spectrum of action
<i>Lactobacillus sake</i>	Lactocin S	<i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i>	Class I bacteriocin, 3.7 kDa, active between pH of 4.5 and 7.5
	Sakacin P	<i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 4.4 kDa, heat-stable
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticin J	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Class III bacteriocin, 37 kDa, narrow spectrum of action, sensitive to proteolytic enzymes, reduction of activity after 100°C for 30 min

ที่มา: Parada et al. (2007)



ตารางที่ 2.4 (ต่อ) ลักษณะที่สำคัญบางประการของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก

Producing species	Bacteriocin	Spectrum of action	Characteristics
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocin CH5	Gram-positive bacteria <i>Lactobacillus</i>	Class II bacteriocin, forms high molecular weight aggregates
	Lactacin F	<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	Class II bacteriocin, 6.3 kDa, 57 amino acids, heat-stable at 121°C for 15 minutes
	Lactacin B	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Class III bacteriocin, 6.3 kDa, heat-stable, detected only in cultures maintained between pH 5.0 to 6.0
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Lactobin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Class II bacteriocin, 4.8 kDa, 50 amino-acids, narrow spectrum of activity
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactocin 705	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Class II two-component bacteriocin (33 amino acids each component), 3.4 kDa
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvacin A	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Class II bacteriocin, 4.3 kDa

ที่มา: Parada et al. (2007)

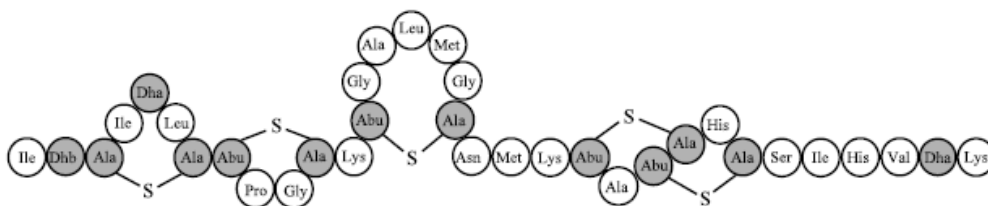
ตารางที่ 2.4 (ต่อ) ลักษณะที่สำคัญบางประการของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก

Producing species	Bacteriocin	Spectrum of action	Characteristics
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin F	Gram-positive bacteria	Class II bacteriocin, 4.5 kDa, sensitive to proteolytic enzymes, resistant to heat and organic solvents, active under a wide range of pH
	Pediocin PA-1	<i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 4.6 kDa, 44 amino-acids
	Pediocin AcH	Gram-positive and Gram-negative bacteria under stressing situations	Class II bacteriocin, 4.6 kDa, 44 amino-acids, broad spectrum of action
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocin A	<i>Lactobacillus, Lactococcus</i> <i>Leuconostoc, Pediococcus</i> <i>Staphylococcus, Enterococcus</i> <i>Listeria, Clostridium</i>	Class II bacteriocin, 2.7 kDa, sensitive to proteolytic enzymes and heat stable (10 min 100°C)
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocin A	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pediococcus</i>	Class II bacteriocin, 4.8 kDa, 47 amino-acid residues, heat-stable
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesentericin	<i>Enterococcus faecalis</i>	Class II bacteriocin, 3.8 kDa, 37 amino-acid residues, heat stable (60°C for 120 min at pH 4.5)
	Y105	<i>Listeria monocytogenes</i>	
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocin A	<i>Lactobacillus, Enterococcus</i> <i>faecalis, Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 3.9 kDa, 37 amino acids, stable at low pH values, even after heating (100°C for 20 min)

ที่มา: Parada et al. (2007)

### 2.3.5 ไนซิน (Nisin)

ไนซิน (Nisin) เป็นวัตถุกันเสียจากธรรมชาติชนิดหนึ่งซึ่งผลิตโดย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ถูกค้นพบเป็นครั้งแรกในประเทศอังกฤษ (Rogers and Whittier, 1928) โครงสร้างเป็นโพลีเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ตัว (รูปที่ 2.3) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3510 ดาลตัน โมเลกุลจะประกอบด้วยกรดอะมิโนที่ถูกดัดแปลงหลังจากกระบวนการถอดรหัสคือ lanthionine, methyl-lanthionine, dehydrobutyrine และ dehydroalanine มีการเชื่อมต่อกันด้วยไทออลอีเทอร์ (Thioether linkage) 5 ตำแหน่ง แต่ถ้าไนซินอยู่ในลักษณะไดเมอร์ (Dimer form) ซึ่งมีความเสถียรมากจะมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 7 กิโลดาลตัน และยังพบในรูปเตตระเมอร์ (Tetramer form) มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 14 กิโลดาลตัน ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินถูกจัดให้อยู่ในกลุ่มที่ 1 (Lantibiotic) มีคุณสมบัติทนความร้อนได้สูง ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด ทั้งในรูปเซลล์และสปอร์ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของรา ยีสต์ ไวรัส และแบคทีเรียแกรมลบได้ ละลายได้ดีและทนต่อการให้ความร้อนในสภาวะกรด (Jeevaratnam, Jamuna, and Bawa, 2005)



รูปที่ 2.3 โครงสร้างพื้นฐานของไนซิน เอ (Dha: didehydroalanine; Dhb: didehydrobutyrin;

Abu:  $\alpha$ -aminobutyric acid; Ala-S-Ala: lanthionine; Abu-S-Ala: 3-methylanthionine)

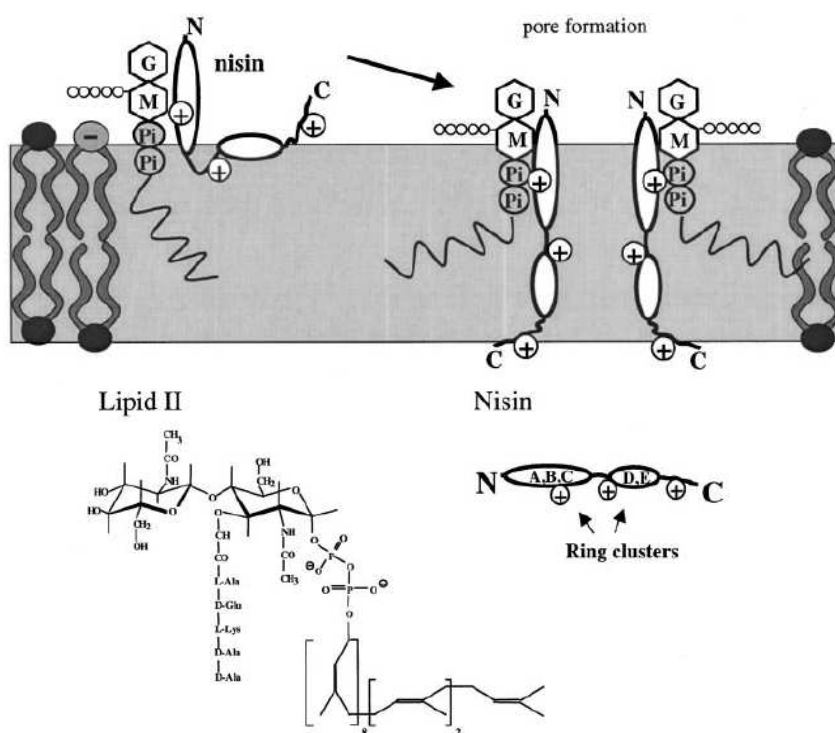
ที่มา: Hoffmann, Pag, Wiedemann, and Sahl (2001)

ในปัจจุบันแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียว คือ ไนซินที่ได้รับการรับรองจากองค์การทางอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (U.S. Food and Drug Administration, U.S. FDA) ให้เป็นสารที่ปลอดภัย (Generally recognized as safe, GRAS) เพราะได้มีการพิสูจน์แล้วว่าเมื่อนำมาใช้ในอาหาร จะไม่มีผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค (Mall et al., 2010; Rajarum et al., 2010) ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1953 ไนซินได้ถูกขายภายใต้ชื่อในทางการค้าว่า Nisaplin มีไนซินประมาณร้อยละ 2.5 ในปัจจุบัน ไนซินได้รับการยอมรับให้ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและมีการใช้ในสินค้ากันอย่างแพร่หลายมากกว่า 40 ประเทศ ซึ่งถูกใช้เป็นส่วนประกอบในนม ช่วยยืดอายุการเก็บรักษานมพาสเจอร์ไรซ์ ป้องกันการงอกของสปอร์ของเชื้อก่อโรคในอาหาร ในกระบวนการผลิต เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์นม อาหารกระป๋อง ผลิตภัณฑ์เนื้อสำเร็จรูป ช่วยในการควบคุมการเจริญของ *Clostridium botulinum* type E ใน

ผลิตภัณฑ์พลาสติกที่บรรจุแบบปรับเปลี่ยนบรรยากาศ และในอุตสาหกรรมอาหารหมักต่างๆ ช่วยควบคุมการเจริญของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ทำให้อาหารเน่าเสียในกระบวนการผลิตเบียร์ ไวน์ และในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์อื่นๆ (Jeevaratnam et al., 2005)

### 2.3.5.1 กลไกการออกฤทธิ์ของไนซิน

การที่ไนซินมีผลยับยั้งหรือฆ่าแบคทีเรียแกรมบวกเนื่องจากการจับตัวของไนซินกับ lipid II ซึ่งเป็นสารตั้งต้นในการเกิดผนังเซลล์ (Cell wall) ของแบคทีเรีย สารประกอบระหว่างไนซินกับ lipid II จะแทรกตัวเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ (Cytoplasmic membrane) ทำให้รบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้เกิดช่องหรือรู (Pores) ซึ่งทำให้แบคทีเรียถูกยับยั้งหรือตายเนื่องจากการสูญเสียสารที่สำคัญซึ่งอยู่ภายในเซลล์ ดังแสดงรูปที่ 2.4 (Delves-Broughton, 2005) นอกจากนี้ในบางสายพันธุ์อาจมีการแตกสลายของเซลล์



รูปที่ 2.4 กลไกการทำงานของไนซิน โดยมีผลทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก  
ที่มา: Wiedemann et al. (2001)

แบคทีเรียแกรมลบจะมีความสามารถต้านทานต่อไนซิน เนื่องจากผนังเซลล์มีความต้านทานต่อการซึมผ่านมากกว่าผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก (Delves-Broughton, 2005) โดยด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นของกลีเซอโรฟอสโฟ-

lipids) และลิโปพอลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) หุ้มอยู่ lipopolysaccharide ซึ่งอยู่ด้านนอกมีสมบัติชอบน้ำ (Hydrophilic property) ทำหน้าที่กั้นโมเลกุลที่มีสมบัติไม่ชอบน้ำและมีขนาดใหญ่ไม่ให้ผ่านเข้าไปได้ ไนซินซึ่งมีโมเลกุลใหญ่และมีสมบัติไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic property) จึงไม่สามารถแทรกผ่านชั้น lipopolysaccharide เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่อย่างไรก็ตามเมื่อใช้ร่วมกับกระบวนการอื่นๆ เช่น การแช่แข็ง การให้ความร้อน และการลดความเป็นกรดต่าง พบว่าไนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด เช่น *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas* sp., *Actinobacillus* sp., *Klesiella* sp., *Yersinia* sp. และ *Aeromonas* sp. (Stevens et al., 1991) ในปัจจุบันความสามารถของไนซินในการทำลายสปอร์ยังไม่เป็นที่ทราบมากนัก แต่กลไกการออกฤทธิ์น่าเป็นแบบยับยั้งการเติบโตของสปอร์ (Sporostatic) มากกว่าออกฤทธิ์แบบฆ่าสปอร์ (Sporocidal) ถ้ามีการให้ความร้อนร่วมด้วยจะยิ่งทำให้สปอร์มีความไวต่อไนซินมากขึ้น โดยไนซินจะจับกับหมู่ซัลไฟไฮดริล (Sulhydryl groups) บนพื้นผิวของสปอร์ (Delves-Broughton, 2005) การใช้ไนซินและ Nisaplin ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ ซึ่งมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมาย แสดงดังตารางที่ 2.5

ตารางที่ 2.5 ปริมาณการใช้ไนซินและ Nisaplin ในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ

Food Application	Typical target organisms	Level of nisin mg/kg or mg/l	Level of Nisaplin mg/l
Processed cheese	<i>Clostridium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.	5-15	200-600
Pasteurised milk and milk products	<i>Clostridium</i> spp. <i>Bacillus</i> spp.	0.25-10.0	10-400
Pasteurised chilled soups	<i>Bacillus cereus</i> <i>Clostridium pasteurianum</i>	2.5-6.25	100-200
Crumpets	<i>Bacillus cereus</i>	4-6.25	150-250
Canned foods (high acid)	<i>Clostridium botulinum</i> and <i>thermosaccharolyticum</i>	2.5-5.0	100-200
Ricotta cheese	<i>Listeria monocytogenes</i>	2.5-5.0	100-200
Continental type cooked sausage	Lactic acid bacteria <i>Brochothrix thermosphac-</i> <i>ta, Listeria monocytogenes</i>	5-25	200-1,000
Dipping sauces	Lactic acid bacteria	1.25-6.25	50-250
Salad dressings	Lactic acid bacteria	1.25-5	50-200
Beer pitching yeast wash post fermentation	Lactic acid bacteria <i>e.g.</i> <i>Lactobacillus</i> and <i>Pediococcus</i>	25.0-37.5  0.25-1.25	1,000-1,500  10-50

ที่มา: Delves-Broughton (2005)

### 2.3.6 ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินโดยแบคทีเรียกรดแล็กติก

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินมีได้หลายปัจจัย เช่น ชนิดของจุลินทรีย์ แหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน และสภาวะที่ใช้ในการหมัก (ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและการปั่นกวน) การผลิตแบคทีเรียโอซินในสภาวะที่เหมาะสมจะช่วยให้เพิ่มกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินซึ่งมีความสำคัญทางเศรษฐศาสตร์ (Parente and Ricciardi, 1994)

#### 2.3.6.1 ชนิดของจุลินทรีย์

แบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละสายพันธุ์ก็มีความสามารถ ในการผลิตแบคทีเรียโอซินได้แตกต่างกัน Yang and Ray (1994) พบว่าการผลิตโนซินและลิโวโนซิน แอลซีเอมหนึ่ง (Leuconocin Lcm1) สามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ ในขณะที่มีเพียงบางสายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิตเพดิโอซิน เอซีเอช (Pediocin AcH) ได้ นอกจากนี้ Devuyt (1994) ยังพบว่า *Lactobacillus lactis* ที่คัดแยกได้นั้น มี 21 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตโนซินได้และมี 6 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถผลิตได้ ปริมาณโนซินที่ผลิตได้อยู่ในช่วง 1-1,886 หน่วยต่อมิลลิลิตร (International unit, IU/ml) และการผลิตโนซินนี้จะไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณ nis ยีนในกระบวนการถอดรหัสหรือกระบวนการแปลรหัส สำหรับความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์จะเป็นผลมาจากการแสดงออกของยีน กิจกรรมของเอนไซม์และระบบภูมิคุ้มกันของโนซิน (Nisin immunity)

#### 2.3.6.2 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ชนิดและปริมาณของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน และฟอสเฟต รวมทั้งสารที่มีประจุบวก (Cations) สารยับยั้ง (Inhibitors) และสารลดแรงตึงผิว (Surfactants) ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินเป็นอย่างมาก แบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายชนิดเพื่อผลิตแบคทีเรียโอซิน *Lactococcus lactis* IO-1 สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส และไซโลส เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ผลิตโนซิน Z ได้ แต่ถ้าใช้น้ำตาลกลูโคสจะผลิตโนซิน Z ได้มากที่สุด คือ 4,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร (Arbitrary unit, AU/ml) เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำตาลไซโลส (3,000 AU/ml) (Matsusaki, Endo, Sonomoto, and Ishikazi, 1996) จากงานวิจัยของ Todorov and Dicks (2005b) พบว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคส ซูโครส มอลโทส และแมนโนสเป็นแหล่งคาร์บอน *Lactobacillus plantarum* ST26MS สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้เท่ากัน (6,400 AU/ml) แต่เมื่อใช้น้ำตาลแล็กโตสและฟรุคโตสมีค่ากิจกรรมเท่ากับ 3,200 และ 1,600 AU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้ Mataragas, Drosinos, Tsakalidou, and Metaxopoulos (2004) พบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเพียงอย่างเดียวจะไม่มีผลต่อจำนวนเซลล์หรือมวลชีวภาพ และการผลิตแบคทีเรียโอซินของ *Leuconostoc mesenteroides* L124 และการเพิ่มสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) จะมีผลต่อจำนวนเซลล์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น แต่การเพิ่มทั้งความเข้มข้นของเปปโทน กลูโคส และสารสกัดจากยีสต์เป็น 80, 45 และ 15 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ จะเพิ่มการผลิตแบคทีเรียโอซินได้ถึง 4 เท่า (10,240 AU/ml) เมื่อ

เปรียบเทียบกับการใช้อาหารเหลว MRS (2,560 AU/ml) สูตรพื้นฐาน เหตุผลที่กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินมีค่าเพิ่มขึ้นน่าจะเนื่องมาจากการเพิ่มกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Cell mass) และการผลิตแบคทีเรียโอซิน

ไอออนที่มีประจุลบ (สารประกอบฟอสเฟต) และไอออนที่มีประจุบวก เช่น แมกนีเซียม ( $Mg^{2+}$ ) และแคลเซียม ( $Ca^{2+}$ ) จะมีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ด้วย จากผลการทดลองของ Devuyt and Vandamme (1993) ได้รายงานว่าฟอสเฟตจะช่วยกระตุ้นการผลิตแบคทีเรียโอซินได้ โดยการเจริญของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.8 และเติมฟอสเฟต 50 กรัมต่อลิตร จะผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุด คือ 3500 IU/ml ในทางตรงกันข้ามฟอสเฟตจะไม่มีผลใดๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินของ *Lc. lactis* subsp. *lactis* IO-1 รวมทั้ง Todorov and dicks (2005a) ได้รายงานว่า การเจริญของเชื้อ *Lb. plantarum* ST194BZ ในอาหารเหลว MRS ที่เติมไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate,  $K_2HPO_4$ ) หรือโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium Dihydrogen Phosphate,  $KH_2PO_4$ ) ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร จะผลิตแบคทีเรียโอซินได้ไม่แตกต่างกัน (12,800 AU/ml) แต่ถ้าเพิ่มความเข้มข้นของโปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตเป็น 10, 20 และ 50 กรัมต่อลิตร จะได้ผลผลิตแบคทีเรียโอซินเพิ่มมากขึ้นเป็น 2 เท่า (25,600 AU/ml)

### 2.3.6.3 สภาพที่ใช้ในการหมัก

การเจริญของ *Pediococcus acidilactici* LAB 5 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จะสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุด รองลงมาคือ 28 และ 20 องศาเซลเซียส ตามลำดับ (Mandal Sen, and Mandal, 2008) และยังมีผลการทดลองของ Lim (2010) ที่พบว่า *Lb. plantarum* KC21 เมื่อเจริญอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะผลิตแบคทีเรียโอซินได้มากที่สุด (6,400 AU/ml) ส่วนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จะผลิตได้เพียง 3,200 AU/ml แต่ที่อุณหภูมิ 25 และ 45 องศาเซลเซียส ไม่พบการผลิตแบคทีเรียโอซินเลย สำหรับที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 เมื่อบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง จะผลิตแบคทีเรียโอซินได้มากที่สุด (6,400 AU/ml) รองลงมาคือ 7.0, 5.0 และ 8.0 ตามลำดับ แต่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 4.0 และ 9.0 ไม่พบการผลิตแบคทีเรียโอซิน สอดคล้องกับการทดลองของ Sarika, Lipton, and Aishwarya (2010) ที่รายงานว่า *Lactobacillus rhamnosus* GP1 จะผลิตแบคทีเรียโอซินได้สูงที่สุด 1,200 AU/ml เมื่อเจริญในอาหารเหลว MRS ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง สำหรับ Ogunbanwo, Sanni, and Onilude (2003) พบว่าอาหารเหลว MRS มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง *Lactobacillus brevis* OG1 จะผลิตแบคทีเรียโอซินได้มากที่สุดและ Mataragasa, Metaxopoulou, Galiotoub, and Drosinos (2003) ยังพบว่าอุณหภูมิและค่าความเป็นกรด-ด่างของ



อาหารเลี้ยงเชื้อมีผลเป็นอย่างมากต่อการผลิตแบคทีเรียโอสตินของ *Leuconostoc mesenteroides* L124 และ *Lactobacillus curvatus* L442 ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอสตินจะไม่ใช้สภาวะเดียวกับที่เหมาะสมต่อการเจริญ โดยที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ภายใต้การควบคุมความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าคงที่เท่ากับ 5.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต แบคทีเรียโอสตินของทั้ง 2 สายพันธุ์ แต่ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ภายใต้การควบคุมความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าคงที่เท่ากับ 6.0-6.5 จะเหมาะสำหรับการเจริญ

### 2.3.7 การใช้แบคทีเรียโอสตินเพื่อปรับปรุงเรื่องความปลอดภัยของอาหาร

แบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอสตินจะทำให้สภาวะ หรือสภาพแวดล้อมของผลิตภัณฑ์ไม่เหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร และจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ดังนั้นแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอสตินหรือแบคทีเรียโอสตินจึงสามารถใช้เป็นเครื่องมือทางชีวภาพ (Biological tools) เพื่อปรับปรุงเรื่องความปลอดภัยในอาหาร และลดความเจ็บป่วยเนื่องจากอาหารเป็นพิษได้ (Babalola, 2007; O' Sullivan, Ross, and Hill, 2002) แต่ไม่นิยมใช้แบคทีเรียโอสตินเป็นขั้นตอนแรกในการป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร แต่จะใช้เป็นตัวเสริมในภายหลังเพื่อป้องกันโรคอาหารเป็นพิษ แบคทีเรียโอสตินมีบทบาทอย่างน้อย 3 ทางในการควบคุมความปลอดภัยในอาหาร คือ การใช้แบคทีเรียโอสตินที่บริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในการเติมเป็นส่วนประกอบหนึ่งในอาหาร การใช้เชื้อที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอสตินผสมกับองค์ประกอบที่ใช้เตรียมอาหาร และการใช้เชื้อที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอสตินแทนเชื้อเดิมหรือใช้เป็นก้ำเชื้อร่วมกับสายพันธุ์อื่นในอาหารหมัก แต่การเติมแบคทีเรียโอสตินที่บริสุทธิ์จะต้องมีการติดฉลากว่ามีสารเติมแต่ง (Additive) และมีการรับรอง ดังนั้นในอุตสาหกรรมอาหารจึงนิยมใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียโอสติน โดยการเติมเชื้อที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอสตินในรูปของส่วนผสมหรือก้ำเชื้อมากกว่าเนื่องจากไม่ต้องการติดฉลาก (Deegan et al., 2006)

### 2.3.8 การใช้แบคทีเรียโอสตินร่วมกับเทคโนโลยีฮาร์ดเดิล (Hurdle Technology)

เทคโนโลยีฮาร์ดเดิล (Hurdle Technology) เป็นการนำปัจจัยรวมทั้งภายนอกและภายในหรือวิธีการต่างๆ มาใช้ร่วมกันเพื่อเพิ่มความคงตัว ความปลอดภัยและคุณภาพของอาหาร เป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพสูงในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร และยังสามารถคงคุณลักษณะที่ดีทางประสาทสัมผัสไว้ได้ เนื่องจากการใช้การถนอมอาหารหลายวิธีร่วมกันจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมากกว่าการใช้เพียงวิธีเดียว ดังนั้นการนำแบคทีเรียโอสตินมาประยุกต์ใช้ร่วมกับวิธีการถนอมอาหารอื่นๆ เช่น เทคโนโลยีฮาร์ดเดิล จะทำให้ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการถนอมรักษาอาหารและช่วยปรับปรุงเรื่องความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ให้มากยิ่งขึ้น (Hansen, 2002; Leistner, 2000; Settanni and Corsetti, 2008) ในแต่ละผลิตภัณฑ์จะใช้วิธีการถนอมอาหารหลายวิธีร่วมกันแตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยดังนี้ จำนวนจุลินทรีย์เริ่มต้นของวัตถุดิบที่จะนำมาถนอมอาหาร สภาวะที่เหมาะสม

ต่อการเจริญของจุลินทรีย์ภายในผลิตภัณฑ์นั้นๆ และเป้าหมายหรือระยะเวลาที่ต้องการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ เป็นต้น (Lee, 2004) ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียโอสินบางชนิด เช่น ไนซีน จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่เมื่อใช้ในจีนร่วมกับสารซึ่งมีคุณสมบัติจับกับโลหะ เช่น เอทิลีนไดอะมีนเตตระอะซีติก เอซิด (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) ที่อนุญาตให้ใช้ในอาหารได้ EDTA จะไปจับกับแมกนีเซียมไอออนในชั้นลิโปพอลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ทำให้ผนังเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียแกรมลบเกิดบาดแผลขึ้น ไนซีนจึงสามารถแทรกผ่านชั้น lipopolysaccharide เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์และรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังสามารถใช้แบคทีเรียโอสินร่วมกับกรดอินทรีย์และสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรีย เช่น ในเนื้อวัวที่เก็บแบบสุญญากาศจะทำให้เกิดการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes* ถึง  $10^7$  เซลล์ต่อกรัม (Colony-forming units per milliliter, CFU/g) แต่การใช้เพดดิโอสิน เอแอลทีเอ 2341 (Pediocin ALTA 2341) ความเข้มข้น 6,000 AU/ml สามารถลดจำนวนของ *L. monocytogenes* ลงได้น้อยกว่า 1 log CFU/g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจาก 14 และ 21 วัน และประสิทธิภาพจะยิ่งเพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ Pediocin ALTA 2341 ร่วมกับโซเดียมอะซิเตตและโซเดียมแล็กเตต สามารถลดจำนวนของ *L. monocytogenes* ลงได้ถึง 1.5 และ 2.5 log CFU/g หลังจาก 14 และ 21 วัน ตามลำดับ (Deegan et al., 2006)

## บทที่ 3

### วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

#### 3.1 แบคทีเรีย

แบคทีเรียทดสอบ (Test microorganisms) ที่ใช้ในงานวิจัยนี้มีทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *Bacillus cereus* TISTR 687, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 (คัดแยกจากรอยโรคของมนุษย์) และ *Escherichia coli* TISTR 780 (คัดแยกจากอุจจาระ) สำหรับ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 (คัดแยกจากกะหล่ำปลีดอง) ใช้เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดนี้ได้จาก ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, TISTR)

#### 3.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากมะดันดอง

เก็บตัวอย่างมะดันดอง (*Pickled Garcinia schomburgkiana pierre*, Madan) จากตลาดในเขต จังหวัดนครราชสีมาและนครนายก จำนวน 8 ตัวอย่าง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในภาชนะที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จนกระทั่งทำการวิเคราะห์

นำตัวอย่างมะดันดองปริมาณ 25 กรัม เจือจางด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ในถุงใส่ตัวอย่าง (Stomacher bag) ตีบดด้วยเครื่องเครื่องตีผสมตัวอย่าง (Stomacher) (Lab-Blender 400, Seward Medical, London, U.K.) โดยใช้ความเร็วรอบปานกลางเป็นเวลา 60 วินาที ได้ตัวอย่างมะดันดองที่มีความเจือจางในระดับ  $10^{-1}$  และทำการเจือจางเป็นลำดับให้ลดลงทีละสิบเท่า (10-fold dilution) จนได้ระดับความเจือจางประมาณ  $10^{-7}$  ปิเปตตัวอย่างจากแต่ละระดับความเจือจาง 0.1 มิลลิลิตร ลงบนจานอาหารแข็ง MRS ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate,  $\text{CaCO}_3$ ) ความเข้มข้นร้อยละ 1 เกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหารโดยใช้เทคนิค spread plate ทำการทดลอง 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน ในโถบ่มเชื้อ (Anaerobic jar) โดยใช้สารดูดออกซิเจน (GENbox anaer, Biomérieux, Marcy-I'Etoile, France) ตรวจสอบโคโลนีในระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี เลือกเก็บโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันและมีโซนใส (Clear zone) รอบโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS ตามวิธีของ Harrigan and McCance (1976) นำไปแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบนอาหารแข็ง MRS ด้วยเทคนิค streak plate เก็บสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติก

บริสุทธิ์ที่แยกได้ไว้ใน MRS agar slants ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับการใช้ทดลองการทดลอง และอีกส่วนหนึ่งเก็บรักษาไว้ในหางนมผง (Skim milk powder) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่ตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (SF-C697 GYN, Sanyo, Thailand)

### 3.3 การทดสอบเพื่อป้องกันแบคทีเรียกรดแล็กติก

#### 3.3.1 การตรวจสอบการติดสีแกรม

หยดน้ำเกลือปลอดเชื้อ (Sterile saline solution) ลงบนกระจกสไลด์ เชื้อซึ่งเป็นโคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ให้กระจายบนหยดน้ำเกลือเป็นฟิล์มบางๆ ปล่อยให้แห้ง หลังจากนั้นนำสไลด์มาผ่านเปลวไฟโดยหงายด้านที่มีเชื้อขึ้น ผ่านด้านล่างของสไลด์ไปมาเหนือเปลวไฟ 2-3 ครั้ง (Heat fix) แล้วย้อมด้วยสารละลายคริสตัล ไวโอเล็ต (Crystal violet) เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 ล้างให้สีของ crystal violet หลุดออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลายซาฟรานินโอ (Safranin-O) ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่นทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสีแกรม คุณลักษณะเซลล์และการจัดเรียงตัวด้วยกล้องจุลทรรศน์ (BX51TF, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) ถ่ายรูปเซลล์ด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัล (DP11-P, Olympus Corporation, Tokyo, Japan) (Bell, Neaves, and Williams, 2005)

#### 3.3.2 การทดสอบกิจกรรมเอนไซม์อะเลส

เชื้อซึ่งเป็นโคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์มาวางบนสไลด์ หลังจากนั้นหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนเชื้อ จากนั้นสังเกตการณ์เกิดฟองก๊าซภายในเวลา 1 นาที ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ถ้าเกิดฟองอากาศแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์อะเลสได้ แต่ถ้าไม่เกิดฟองอากาศแสดงว่าเชื้อไม่สามารถสร้างเอนไซม์อะเลสได้ (Bell et al., 2005)

#### 3.3.3 การทดสอบออกซิเดชันและเฟอร์เมนเตชันน้ำตาลกลูโคส

ใช้เข็ม (Needle) ปลอดเชื้อ และเชื้อซึ่งเป็นโคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ แล้วแทง (Stab) ลงในอาหาร Oxidation/fermentation (O/F) แบบตั้งตรง จำนวน 2 หลอด โดย 1 หลอดจะถูกปิดฝิดหน้าหลอดด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าทั้งหลอดที่ปิดและไม่ได้ปิดทับด้วยพาราฟินเหลวปลอดเชื้อเปลี่ยนเป็นสีเหลือง แสดงว่าเกิดการหมักน้ำตาลขึ้นให้ผลเป็นบวก (Bell et al., 2005)

### 3.4 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งยับยั้งการเจริญ แบคทีเรียทดสอบ

#### 3.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

เลี้ยงเชื้อ *B. cereus* TISTR 687, *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 780 ในอาหารเหลว Nutrient (Nutrient broth, Hi-media, Mumbai, India) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้ออีกครั้งที่สภาวะเดิม แยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากตัวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง (Sorvall, Legend Mach 1.6 R, Germany) ที่  $7,000 \times g$  เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำเซลล์มาละลายในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 แล้วปรับความขุ่นเซลล์ให้เท่ากับ McFarland เบอร์ 1 เทียบเท่ากับปริมาณเซลล์ประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Colony-forming units per milliliter, CFU/ml) เพื่อใช้สำหรับการศึกษาการผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคในอาหาร

#### 3.4.2 การทดสอบเบื้องต้นด้วยวิธี Spot agar test (Direct method)

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ใช้ในการทดสอบการผลิตแบคเทอริโอซิน ในอาหารเหลว MRS 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ในโถบ่มเชื้อ โดยใช้สารดูดออกซิเจน (GENbox anaer, Biomérieux, Marcy-I'Etoile, France) หลังจากนั้นทดสอบการผลิตสารยับยั้งการเจริญโดยนำเชื้อที่เลี้ยงไว้ปริมาตร 5 ไมโครลิตร มาปลูกเชื้อแบบจุด (Spot) ลงบนพื้นผิวของอาหารแข็ง Modified MRS และบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่สภาวะไร้ออกซิเจน เมื่อครบตามระยะเวลาการบ่มเททับผิวหน้าอาหารที่มีเชื้อเจริญด้วยอาหารกึ่งแข็ง Nutrient ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ซึ่งผสมกับแบคทีเรียทดสอบซึ่งเตรียมตามข้อ 3.4.1 ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ใช้อาหารเหลว MRS เป็นชุดควบคุม (Control) ตรวจสอบผลโดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญ (Diameter of inhibition zone) บริเวณใสการยับยั้งที่มีค่าเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับหรือมากกว่า 10 มิลลิเมตร จะอ่านผลเป็นบวก แบคทีเรียกรดแล็กติกที่แสดงผลบวกจะถูกนำไปทดสอบ เพื่อยืนยันการผลิตแบคเทอริโอซินโดยวิธี agar well diffusion ต่อไป (Kacem, Halima, and Nour-Eddine, 2004)

#### 3.4.3 การทดสอบเพื่อยืนยันผลด้วยวิธี Agar well diffusion

##### 3.4.3.1 การเตรียมแบคเทอริโอซินแบบหยาบ (Crude bacteriocin)

เลี้ยงแบคทีเรียกรดแล็กติกในอาหารเหลว MRS 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกตัวเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยง (Sorvall, Legend Mach 1.6 R, Germany) ที่  $10,000 \times g$  เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จะได้สารละลายที่เป็นส่วนใส (Cell-free supernatant, CFS) หลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของสารละลายส่วนใส

ให้มีค่าเท่ากับ 6.5 โดยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ปลอดเชื้อ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ และเติม เอมไซม์อะตาลเลส ความเข้มข้นสุดท้าย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (C-3515, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.S.A.) หลังจากนั้นกรองสารละลายส่วนใสผ่านตัวกรองเซลลูโลสอะซีเตท (Cellulose acetate) ที่มี ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Chrom Tech, Apple Valley, Minnesota, U.S.A.) สารละลายที่ได้หลังจาก การกรองนี้เรียกว่าแบคทีเรียไอซินแบบหยาบ (Crude bacteriocin) โดยใช้อาหารเหลว MRS เป็นชุด ควบคุมเชิงลบและไนซินเป็นชุดควบคุมเชิงบวก (N5764, Sigma-Aldrich, St. Louis, U.K.)

#### 3.4.3.2 การทดสอบเพื่อยืนยันโดยวิธี agar well diffusion

ใส่เชื้อแบคทีเรียทดสอบ (*B. cereus* TISTR 687, *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 780) ซึ่งเตรียมตามข้อ 3.4.1 ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ลงในอาหารแข็ง Nutrient ซึ่งหลอมละลาย เทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อขนาด 100×15 มิลลิเมตร ผสมให้เชื้อเข้ากับอาหารเลี้ยง เชื้อโดยใช้เทคนิค pour plate แล้วทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว หลังจากนั้นเจาะหลุมบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยที่เจาะหลุมวุ้น (Cork borer) โดยช่องมีขนาด เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยด crude bacteriocin ที่ได้จากข้อ 3.5.3.1 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลง ในหลุมที่เจาะ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อ่านผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทั้ง 3 ชนิด โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier caliper) (Mitutoyo, Japan) ในการวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ บริเวณใสการยับยั้งการเจริญ (Diameter of inhibition zone) (Xiraphi et al., 2005)

### 3.5 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียไอซินได้

#### 3.5.1 การจัดจำแนกเบื้องต้นในระดับสกุล (Genus)

ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Morphology) ของโคโลนี และทำการย้อมแกรม (Gram staining) (Lee, Kim, and Kunz, 2006; Sharpe, 1979) ทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์อะตาลเลส (Catalase test) ตรวจสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการใช้กลูโคสโดยใช้อาหารเหลว MRS ที่ไม่เติมซิเตรท ตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10, 25, 30, 35 และ 45 องศา เซลเซียส การเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.4 และ 9.6 การเจริญที่สภาวะมีโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้นร้อยละ 4, 6.5, 8, 10 และ 18 (Sharpe, 1979) จัดกลุ่มโดยอ้างอิงตามเกณฑ์ในคู่มือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (De Vos et al., 2009)

#### 3.5.2 การจัดจำแนกในระดับชนิด (Species)

ตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้งหมด 49 ชนิด โดยใช้ชุด ทดสอบ API 50 CHL medium และ API 50 CH strips (Biomérieux, Marcy-I'Etoile, France) โดย เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกบนอาหารแข็ง MRS ให้เป็นโคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (Loop)

ให้ได้เซลล์ปริมาณมากใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 2 มิลลิลิตร (หลอดที่ 1) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน แล้วจึงถ่ายสารละลายเซลล์จากหลอดนี้ด้วยปริมาตรที่แน่นอน (n) ใส่ลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 5 มิลลิลิตร (หลอดที่ 2) โดยจะต้องใส่สารแขวนลอยเซลล์ (หลอดที่ 1) จนน้ำกลั่นหลอดใหม่ (หลอดที่ 2) นี้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland เบอร์ 2 (ภาคผนวกตารางที่ 1ก) ผสมกันจนเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน หลังจากนั้นถ่ายเชื้อปริมาณ 2n ใส่ลงใน API 50 CHL medium แล้วผสมให้เข้ากัน เตรียมชุดทดสอบโดยการเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงในหลุมที่ถาดเพื่อให้ขณะบ่มเกิดความชื้น ใส่ API 50 CHL medium ที่มีเชื้อผสมอยู่ลงในแต่ละหลุม ปิดทับผิวหน้าของแต่ละหลุมด้วยน้ำมันมิเนอร์อล (Mineral oil) นำ API kits บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และดูการเกิดปฏิกิริยาหลังจาก 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม APILAB PLUS V.3.2.2 (Biomérieux, Marcy-l'Étoile, France) โดยถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองคือให้ผลเป็นบวก ถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ ยกเว้นช่องที่ 25 ที่จะให้ผลบวกเมื่อเปลี่ยนเป็นสีดำ ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียวหรืออ่านผลได้ไม่ชัดเจนให้ใส่เครื่องหมายปรัศนี (?)

### 3.6 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin

#### 3.6.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ (สายพันธุ์ที่สามารถผลิต crude bacteriocin ได้ดีที่สุดจากข้อ 3.4.3.2) ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ให้เซลล์เจริญอยู่ในช่วงต้นของระยะการเจริญ แล้วนำอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งครบตามเวลาบ่มแล้วมาวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องตรวจวัดสารด้วยการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) (GENESYS 10 UV, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปรับค่าความขุ่นของเซลล์โดยการเจือจางเพื่อให้เซลล์เริ่มต้นมีค่าเท่ากับ  $10^8$  CFU/ml โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน ดังภาคผนวกรูปที่ 1ข

#### 3.6.2 การศึกษาปัจจัยค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีค่าเท่ากับ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 3 โมลาร์ หรือ สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 3 โมลาร์ หลังจากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ (สายพันธุ์ที่สามารถผลิต crude bacteriocin ได้มากที่สุด) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจผลตามเวลาที่กำหนด โดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (MP220, Mettler-Toledo GmbH, CH8603 Schwerzenbach, Switzerland) ค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Thermo Scientific,

Madison, Wisconsin, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญ โดยใช้วิธี agar well diffusion (ทำตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3)

### 3.6.3 การศึกษาปัจจัยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์

เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารให้เท่ากับผลที่ได้จากการทดลองข้อ 3.6.2 ซึ่งมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต crude bacteriocin หลังจากนั้นใส่เชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ (สายพันธุ์ที่สามารถผลิต crude bacteriocin ได้ดีที่สุด) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจผลตามเวลาที่กำหนด โดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไป ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (MP220, Mettler-Toledo GmbH, CH8603 Schwerzenbach, Switzerland) ค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญ โดยใช้วิธี agar well diffusion (ทำตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3)

### 3.6.4 การศึกษาปัจจัยอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม

เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ (สายพันธุ์ที่สามารถผลิต crude bacteriocin ได้ดีที่สุด) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อและเติมโซเดียมคลอไรด์ตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.6.2 และ 3.6.3 ตามลำดับ ซึ่งมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต crude bacteriocin หลังจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจผลตามเวลาที่กำหนด โดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไป ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (MP220, Mettler-Toledo GmbH, CH8603 Schwerzenbach, Switzerland) ค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญ โดยใช้วิธี agar well diffusion (ทำตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3)

### 3.6.5 การศึกษาการผลิตแบคทีเรียโอซินในสภาวะที่เหมาะสม

เติมเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ (สายพันธุ์ที่สามารถผลิต crude bacteriocin ได้ดีที่สุด) ความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ เติมโซเดียมคลอไรด์ และบ่มที่อุณหภูมิตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.6.2, 3.6.3 และ 3.6.4 ตามลำดับ บ่มเป็นเวลาตามข้อ 3.6.4 ซึ่งมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต crude bacteriocin หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างออกมาตรวจผลตามเวลาที่กำหนด โดยวัด



ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (MP220, Mettler-Toledo GmbH, CH8603 Schwerzenbach, Switzerland) ค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง MRS และค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญ โดยวิธี agar well diffusion (ทำตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3)

### 3.6.6 การวิเคราะห์หากิจกรรมของ crude bacteriocin

#### 3.6.6.1 การวิเคราะห์ด้วยวิธี critical dilution

เจือจาง crude bacteriocin เป็นลำดับให้ลดลงทีละสองเท่า (2-fold dilution) ด้วยน้ำปราศจากไอออน (Deionized water) หาค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin ที่แต่ละความเจือจางโดยวิธี agar well diffusion (ทำตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3.2) หลังจากนั้นนำมาคำนวณหาค่า bacteriocin unit แสดงด้วยหน่วย arbitrary ต่อมิลลิลิตร (AU/ml) (ภาคผนวก ข สมการที่ 1) (Yousef and Carlstrom, 2003)

#### 3.6.6.2 การวิเคราะห์ด้วย Simple parallel line model

วิธีนี้จะอาศัยหลักการของวิธี Agar well diffusion เช่นเดียวกับวิธี critical dilution โดยเจือจาง crude bacteriocin แบบ 2-fold dilution ด้วยน้ำ deionized หาค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin ที่แต่ละความเจือจางโดยวิธี agar well diffusion (ทำตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3.2) หลังจากนั้นนำค่าบริเวณใสการยับยั้งมาคำนวณ แล้วเขียนกราฟหาค่ากิจกรรมของ crude bacteriocin โดยเขียนกราฟระหว่างพื้นที่บริเวณใสการยับยั้ง (Inhibition zone area) และ  $\ln$  ของ แฟกเตอร์การเจือจาง (Dilution factor, DF) และใช้ในจีนเป็นสารมาตรฐาน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเขียนกราฟระหว่าง พื้นที่บริเวณใสการยับยั้ง (Inhibition zone area) และ  $\ln$  ของความเข้มข้นของในจีน นำค่าที่ได้จากการเขียนกราฟมาคำนวณหากิจกรรมของ crude bacteriocin แสดงด้วยหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Delgado et al., 2005) (ภาคผนวก ข สมการที่ 2)

### 3.7 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin ในสถานะที่เหมาะสม

เดิมเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดเลือกได้ (สายพันธุ์ที่สามารถผลิต crude bacteriocin ได้ดีที่สุด) เข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ลงในอาหารพื้นฐาน ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีกลูโคส ฟรุคโตส ซูโครส หรือแมนนิทอล ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้อาหารเหลว MRS ที่ไม่มีแหล่งคาร์บอนเป็นชุดควบคุม ซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร

เติมโซเดียมคลอไรด์ และบ่มตามอุณหภูมิที่ได้ตามผลการทดลองที่ได้จากข้อ 3.6.2, 3.6.3 และ 3.6.4 ตามลำดับ โดยใช้ระยะเวลาในการบ่มตามที่ได้จากข้อ 3.6.4 ซึ่งมีความเหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต crude bacteriocin สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจผลตามเวลาที่กำหนด โดยวัดค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) (MP220, Mettler-Toledo GmbH, CH8603 Schwerzenbach, Switzerland) ค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยใช้เทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง MRS และค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญ โดยใช้วิธี agar well diffusion (ทำตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3)

### 3.8 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของ crude bacteriocin

#### 3.8.1 การทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

เติม crude bacteriocin ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) หลังจากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์อัลคาเลส (Alcalase) ปาเปน (Papain) หรือทริปซิน (Trypsin) (Sigma Chemical, St. Louis, MO, U.S.A.) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียโอสินซึ่งผสมเอนไซม์แต่ละชนิด จะถูกนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายเอนไซม์แต่ละชนิด สารละลายบัฟเฟอร์ และ crude bacteriocin ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์เป็นชุดควบคุม หลังจากนั้นนำทั้งตัวอย่างควบคุมและตัวอย่างที่เติมเอนไซม์ไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้เอนไซม์หยุดกิจกรรม นำสารละลายมากรองผ่านตัวกรองเซลลูโลสอะซีเตท (Cellulose acetate) ที่มีขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Chrom Tech, Apple Valley, Minnesota, U.S.A.) ตรวจสอบค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin โดยวิธี agar well diffusion ตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3

#### 3.8.2 การทนต่อความร้อน

เติม crude bacteriocin ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวก์ (Microcentrifuge tube) ปริมาตร 500 ไมโครลิตร หลังจากนั้นนำไปให้ความร้อนโดยอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า (JULABO SW22, Germany) ที่อุณหภูมิ 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส ทั้งที่เวลา 15 และ 30 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อระบบความดัน (MLS-3020, Sanyo, Japan) โดยใช้ crude bacteriocin ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนเป็นชุดควบคุม ตรวจสอบค่าบริเวณใสการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin โดยวิธี agar well diffusion ตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 แล้วนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมการยับยั้งที่คงเหลืออยู่ (ภาคผนวก ข สมการที่ 3)

### 3.8.3 ความคงตัวของค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของ crude bacteriocin แต่ละหลอดให้มีค่าเท่ากับ 1-14 (มีค่าห่างกันทีละ 1 หน่วย) โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำสารละลายมากรองผ่านตัวกรองเซลลูโลสอะซีเตท (Cellulose acetate) ที่มีขนาด 0.2 ไมโครเมตร (Chrom Tech, Apple Valley, Minnesota, U.S.A.) โดยใช้ crude bacteriocin ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 เป็นชุดควบคุม ตรวจสอบค่าบริเวณใสการยับยั้งการเจริญโดยวิธี agar well diffusion ตามวิธีการทดลองข้อ 3.4.3 แล้วนำมาคำนวณหาค่ากิจกรรมการยับยั้งที่คงเหลืออยู่ (ภาคผนวก ข สมการที่ 3)

## 3.9 การศึกษาลักษณะการออกฤทธิ์ของ crude bacteriocin ต่อเชื้อก่อโรคในอาหาร *B. cereus* TISTR 687

### 3.9.1 การศึกษาการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687

เลี้ยงเชื้อ *B. cereus* TISTR 687 ในอาหารเหลว Nutrient (Nutrient broth, Hi-media, Mumbai, India) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้ออีกครั้งที่สถานะเดิม เติมเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 1 โดยปริมาตร ลงในอาหารเหลว Nutrient ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นสุ่มตัวอย่างออกมาตรวจผลตามเวลาที่กำหนด ค่าการดูดกลืนแสงด้วย Spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตโดยเทคนิค spread plate บนอาหารแข็ง Nutrient

### 3.9.2 การศึกษาการสูญเสียความสามารถในการมีชีวิตอยู่ของเซลล์

ทำการทดสอบความไวของเชื้อแบคทีเรียทดสอบต่อ crude bacteriocin โดยเติม crude bacteriocin ความเข้มข้น 40, 80 และ 120 AU/ml ลงในอาหารเหลว Nutrient ซึ่งมีแบคทีเรียทดสอบเจริญอยู่ในช่วงกลางของระยะเจริญ บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6, 10, 16, 22 และ 28 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมจะทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ไม่มีการเติม crude bacteriocin และใช้ในชั้นความเข้มข้นสุดท้าย 1,000 หน่วยต่อมิลลิลิตร (International unit, IU/ml) สุ่มตัวอย่างออกมาตรวจผลตามเวลาที่กำหนด ทำการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงโดยใช้อาหารแข็ง Nutrient การลดลงของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (CFU/ml) จะเป็นเครื่องบ่งชี้ (Indication) การสูญเสียความสามารถในการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ (Viability loss) และตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง

Spectrophotometer (GENESYS 10 UV, Thermo Scientific, Madison, Wisconsin, U.S.A.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จะเป็นเครื่องบ่งชี้การแตกของเซลล์ (Ösmanagaoglu, Kiran, and Gül, 2005)

### 3.9.3 การศึกษาผลของ crude bacteriocin ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

#### 3.9.3.1 การเตรียมตัวอย่างจุลินทรีย์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบในอาหารเหลว nutrient ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จนกระทั่งเชื้อเข้าสู่ช่วงกลางของระยะเจริญ (Mid-log phase) แล้วเติม crude bacteriocin ความเข้มข้น 120 AU/ml บ่มเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเข้าสู่ช่วงเวลาที่ 16 ชั่วโมง คูดสารแขวนลอยเซลล์ (Cell suspension) 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ (Microcentrifuge tube) ปั่นเหวี่ยงที่  $7,000 \times g$  ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (Sorvall, Legend Mach 1.6 R, Germany) แยกสารละลายส่วนใสออกไปจะได้เซลล์ของแบคทีเรียทดสอบอัดแน่นเป็นก้อน (Pellet) เพื่อใช้สำหรับการวิเคราะห์โครงสร้างของเซลล์ภายใต้เครื่อง TEM ส่วนชุดควบคุมจะประกอบด้วยแบคทีเรียทดสอบที่เจริญในอาหารเหลว nutrient ทำการทดลองเช่นเดียวกันแต่ไม่มีการเติม crude bacteriocin เป็นชุดควบคุมเชิงลบ (Negative control) และใช้ในจีน ความเข้มข้นสุดท้าย 1,000 IU/ml เป็นชุดควบคุมเชิงบวก (Positive control)

#### 3.9.2.2 การติดตามโครงสร้างของเซลล์ภายใต้เครื่อง TEM

pellet จะถูกตรึงครั้งแรก (Pre-fix) ในกลูตาอัลดีไฮด์ (Gluteraldehyde) (ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2) ความเข้มข้นร้อยละ 3 โดยปริมาตร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาข้ามคืน หลังจากนั้นล้าง pellet ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2 จำนวน 3 ครั้ง ใช้เวลาในการล้างครั้งละ 30 นาที หลังจากนั้น pellet จะถูกตรึงครั้งที่สอง (Post-fix) ในออสเมียม เตโตรไซด์ (Osmium tetroxide) (ละลายในฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้าง pellet ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์เข้มข้น 0.1 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.2 จำนวน 3 ครั้ง ใช้เวลาในการล้างครั้งละ 30 นาที จากนั้นทำการขจัดน้ำออกด้วยเอทานอลตามลำดับความเข้มข้นร้อยละ 30, 50, 70, 90, 95 และ 100 โดยน้ำหนัก โดยแช่ตัวอย่างในเอทานอลที่แต่ละความเข้มข้นเป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง และแช่ในเอทานอลเข้มข้นร้อยละ 100 โดยน้ำหนัก จำนวน 2 ครั้ง แช่นานครั้งละ 15 นาที จากนั้นจึงทำการขจัดน้ำออกโดยสมบูรณ์โดยแช่ pellet ในโพรพิลีน ออกไซด์ (Propylene oxide) ความเข้มข้นร้อยละ 100 โดยน้ำหนัก จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที แล้วจึงนำ pellet ไปใส่ในสารละลายผสมระหว่างโพรพิลีน ออกไซด์และ Spurr's resin โดยจะค่อยๆ เพิ่มอัตราส่วนของ Spurr's resin ขึ้นเรื่อยๆ ในอัตราส่วน 2:1, 1:1, 1:3 และ 1:4

ใช้เวลาในการแช่ที่อัตราส่วนละ 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ซึ่ง Spurr's resin ประกอบด้วย Vinylcyclohexane dioxide (VCD) ร้อยละ 23.585 โดยน้ำหนัก Diglycidyl ether of polypropyleneglycol (DER 736) ร้อยละ 14.151 โดยน้ำหนัก Nonenyl succinic anhydride (NSA) ร้อยละ 61.321 โดยน้ำหนักและ Dimethylaminoethanol (DMAE) ร้อยละ 0.943 โดยน้ำหนัก หลังจากนั้นแช่ใน Spurr's resin ความเข้มข้นร้อยละ 100 โดยน้ำหนัก เป็นเวลา 1 คืน นำตัวอย่างที่ผ่านการตรึงแล้วไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปล่อยให้ตัวอย่างเย็นจนถึงอุณหภูมิห้อง เลือกบริเวณของตัวอย่างแล้วเริ่มเลี่ยนและตัดตัวอย่างหยาบก่อน (Trimming) หลังจากนั้นนำตัวอย่างมาตัดให้มีความหนา 80 ถึง 100 นาโนเมตร ด้วยเครื่องตัดตัวอย่างแบบบางพิเศษ (Ultramicrotome Model MTX 75500, RMC, U.S.A.) วางตัวอย่างลงบนกริดทองแดง (Copper grids) แล้วทำการย้อมตัวอย่างด้วยยูรานิล อะซิเตท (Uranyl acetate) และเลดซิเตรท (Lead citrate) ตามลำดับ นำตัวอย่างไปวิเคราะห์โครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (TEM รุ่น EM 10 CR, ZEISS, West Germany) กำหนดให้ค่าความต่างศักย์ของกระแสไฟฟ้าเท่ากับ 80 กิโลโวลต์ ทำการถ่ายและบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล (Nikon digital sight DS-Fi1, Nikon Corp., Japan) โดยถ่ายภาพอย่างน้อย 20 ภาพของแต่ละตัวอย่าง (Ösmanagaoglu et al., 2005)

### 3.10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้ ANOVA และหาความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) โดยใช้โปรแกรม SPSS version 13 (SPSS Inc., Illinois, U.S.A.)

### 3.11 สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการแปรรูปอาหาร ห้องปฏิบัติการเคมีอาหาร ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 3 ฝ่ายวิเคราะห์ด้วยเครื่องมือ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และฝ่ายปฏิบัติการวิจัยและเรือนปลูกพืชทดลอง สถาบันวิจัยและพัฒนากำแพงแสน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 4.1 การแยกแบคทีเรียกรดแล็กติก

ทำการสุ่มเลือกตัวอย่างมะดันดองจากแหล่งต่างๆ ในจังหวัดนครนายกและนครราชสีมา จำนวน 8 ตัวอย่าง นำมาใช้ในการศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินที่แยกได้จากมะดันดอง โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะ (Selective media) คือ อาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตเข้มข้นร้อยละ 1 (ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5) แบคทีเรียกรดแล็กติกจะสร้างกรดอินทรีย์ทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนต ทำให้ปรากฏบริเวณใสรอบโคโลนี (Clear zone) จากการทดลองพบว่ามะดันดองทั้ง 8 ตัวอย่างมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติกอยู่ระหว่าง 5.40 ถึง 7.01 log CFU/g (ตารางที่ 4.1)

ตารางที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมดซึ่งตรวจนับได้จากมะดันดองแหล่งต่างๆ

Pickled Madan sampling places	Bacterial isolate codes	Number of LAB counts (log CFU/g)
Nakhonnayok	NN-MD1-1 to 20	7.01
	NN-MD2-1 to 20	6.30
Nakhon Ratchasima	NR-MD3-1 to 20	6.26
	NR-MD4-1 to 20	6.38
	NR-MD5-1 to 20	6.01
	NR-MD6-1 to 20	6.40
	NR-MD7-1 to 20	5.40
	NR-MD8-1 to 20	6.27

จากการทดลองสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากมะดันดอง โดยสุ่มเลือกโคโลนีที่มีโซนไฮสโอบโคโลนี สุ่มเลือกโคโลนีตัวอย่างละ 20 ไอโซเลท ได้แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมด 160 ไอโซเลท แบ่งเป็นแบคทีเรียที่มีเซลล์รูปร่างแท่งสั้น 141 ไอโซเลท (ร้อยละ 88) รูปร่างกลม 11 ไอโซเลท (ร้อยละ 7) และรูปไข่ 8 ไอโซเลท (ร้อยละ 5) เมื่อนำแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้งหมดไปทดสอบเพื่อบ่งชี้แบคทีเรียกรดแล็กติก พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เกิดปฏิกิริยากับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงว่าไม่ผลิตคะตะเลสหรือเรียกว่าคะตะเลสลบ และทุกไอโซเลททำให้อาหารทดสอบเปลี่ยนเป็นสีเหลืองทั้งหลอดที่เต็ม และไม่เติมน้ำมันพาราฟิน แสดงว่าผลทดสอบให้ผลเป็นผลบวกทั้งหมดหรือสามารถหมัก (Fermentation) น้ำตาลได้ ซึ่งเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียกรดแล็กติก ดังแสดงในตารางที่ 4.2

## 4.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินแบบหยาบ

### 4.2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

จากการคัดกรองแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งสามารถผลิตสาร ที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร *B. cereus* TISTR 687, *S. aureus* TISTR 118 และ *E. coli* TISTR 780 โดยวิธีการเพาะเชื้อแบบจุด (Spot agar test) ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MRS ซึ่งลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสและเพิ่มสารอาหารซึ่งมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ เพื่อกำจัดผลของกรดอินทรีย์บ่มในสภาพไร้ออกซิเจนเพื่อป้องกันการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แสดงบริเวณการยับยั้งการเจริญ (Inhibition zone) ของแบคทีเรียทดสอบมี 18 ไอโซเลท จากทั้งหมด 160 ไอโซเลท (ร้อยละ 11.25) ดังแสดงในตารางที่ 4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อไฮปราศจากเซลล์ (Cell-free supernatant, CFS) ของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-7 และ NR-MD1-4 สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญได้ทั้ง *B. cereus* TISTR 687 และ *S. aureus* TISTR 118 ส่วนแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-13, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NN-MD2-8, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD4-7, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18, NR-MD6-19 และ NR-MD8-5 (16 ไอโซเลท) สามารถแสดงยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 ได้เพียงสายพันธุ์เดียว แต่ไม่มีไอโซเลทใดที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 780 ได้

ตารางที่ 4.2 จำนวนไอโซเลททั้งหมดและการทดสอบเพื่อบ่งชี้แบคทีเรียกรดแล็กติก

Sampling places	Number of isolates	Gram stain	Cell shape	Catalase test	Oxidation/fermentation test
Nakhonnayok	17	positive	rod	-	+
	3		ovoid		
Nakhonnayok	15	positive	rod	-	+
	3		cocci		
	2		ovoid		
Nakhon Ratchasima	16	positive	rod	-	+
	4		cocci		
Nakhon Ratchasima	20	positive	rod	-	+
Nakhon Ratchasima	16	positive	rod	-	+
	4		cocci		
Nakhon Ratchasima	19	positive	rod	-	+
	1		ovoid		
Nakhon Ratchasima	20	positive	rod	-	+
Nakhon Ratchasima	18	positive	rod	-	+
	2		ovoid		

หมายเหตุ - หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ ไม่เกิดฟองแก๊ส ไม่มีการสร้างเอนไซม์อะมิเลส

+ หมายถึง เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคส (Fermentation)



ตารางที่ 4.3 ผลการคัดกรองแบคทีเรียกรดแล็กติกในเบื้องต้นซึ่งสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยใช้วิธี agar spot test

LAB isolates	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>(1)</sup>		
	<i>B. cereus</i> TISTR 687	<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>E. coli</i> TISTR 780
NN-MD1-5	15.3±0.29 <sup>a</sup>	-	-
NN-MD1-7	17.5±0.50 <sup>b</sup>	12.2±0.29 <sup>a</sup>	-
NN-MD1-9	13.3±0.58 <sup>c</sup>	-	-
NN-MD1-12	12.3±0.58 <sup>cde</sup>	-	-
NN-MD1-13	12.2±0.29 <sup>de</sup>	-	-
NN-MD1-14	11.3±0.29 <sup>c</sup>	-	-
NN-MD2-7	11.2±0.29 <sup>c</sup>	-	-
NN-MD2-8	11.3±0.58 <sup>c</sup>	-	-
NR-MD3-4	12.5±0.50 <sup>cd</sup>	11.2±0.29 <sup>a</sup>	-
NR-MD3-5	12.7±0.58 <sup>cd</sup>	-	-
NR-MD3-19	13.0±0.50 <sup>cd</sup>	-	-
NR-MD4-7	11.2±0.29 <sup>c</sup>	-	-
NR-MD6-2	12.3±0.29 <sup>cde</sup>	-	-
NR-MD6-9	12.2±0.76 <sup>de</sup>	-	-
NR-MD6-13	12.0±0.50 <sup>de</sup>	-	-
NR-MD6-18	12.3±0.29 <sup>cde</sup>	-	-
NR-MD6-19	12.2±0.29 <sup>de</sup>	-	-
NR-MD8-5	12.5±0.50 <sup>de</sup>	-	-
MRS broth	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

<sup>(1)</sup> ขนาดของโคโลนี (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 8 มิลลิเมตร) ที่เจริญบนผิวหน้าอาหารของทุกไอโซเลทมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )

ตัวอักษร a, b, c, d และ e ในแนวตั้งของแต่ละไอโซเลทแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

จากผลการทดสอบเบื้องต้นโดยวิธีนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบเกิดจากแบคทีเรียโอซิน ดังนั้นแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 18 ไอโซเลท จึงต้องทำการทดลองยืนยันความสามารถในการผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป็นผลจากแบคทีเรียโอซิน ในการทดลองขั้นต่อไป

#### 4.2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน

เพื่อตรวจสอบว่าผลการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเพียงอย่างเดียว ไม่ได้เกิดจากสารยับยั้งอื่นๆ ที่การเจริญของแบคทีเรียทดสอบชนิดอื่น โดยการนำส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อไฮปราศจากเซลล์ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ เพื่อกำจัดผลการยับยั้งของกรดอินทรีย์และเติมเอนไซม์อะไมเลสเพื่อสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่อาจเกิดขึ้นได้ เมื่อแบคทีเรียกรดแล็กติกเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนให้กลายเป็นน้ำและออกซิเจน กรองอาหารเลี้ยงเชื้อไฮปราศจากเซลล์ผ่านเซลลูโลสอะซีเตทเมมเบรน ขนาด 0.2 ไมโครเมตร สารละลายที่ได้นี้เรียกว่า แบคทีเรียโอซินแบบหยาบ (Crude bacteriocin) หลังจากนั้นทดสอบความสามารถของ crude bacteriocin ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า แบคทีเรียกรดแล็กติก 8 ไอโซเลทจากทั้งหมด 18 ไอโซเลท ยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยแบคทีเรียกรดแล็กติก 2 ไอโซเลทสามารถผลิต crude bacteriocin ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งทั้ง *B. cereus* TISTR 687 และ *S. aureus* TISTR 118 และมี 6 ไอโซเลทที่สามารถผลิต crude bacteriocin ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้ง *B. cereus* TISTR 687 ได้เพียงสายพันธุ์เดียวแต่ crude bacteriocin ของแบคทีเรียกรดแล็กติกทุกไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 780 (ตารางที่ 4.4) ได้ จากการทดลองนี้ พบว่าไอโซเลท NN-MD1-7 สามารถผลิต crude bacteriocin ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบสูงที่สุดโดยยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 สูงกว่า *S. aureus* TISTR 118 มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสเท่ากับ  $14.2 \pm 0.58$  มิลลิเมตร และ  $9.3 \pm 0.58$  มิลลิเมตร ตามลำดับ

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบยืนยันการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบจาก crude bacteriocin โดยใช้วิธี agar well diffusion assay

LAB isolates	Diameter of inhibition zone (mm) <sup>(1)</sup>		
	<i>B. cereus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>
	TISTR 687	TISTR 118	TISTR 780
NN-MD1-5	10.2±0.29 <sup>b</sup>	-	-
NN-MD1-7	14.2±0.58 <sup>c</sup>	9.3±0.58 <sup>b</sup>	-
NN-MD1-9	11.0±1.00 <sup>b</sup>	-	-
NN-MD1-12	11.0±1.00 <sup>b</sup>	-	-
NN-MD1-13	10.3±0.58 <sup>b</sup>	-	-
NN-MD1-14	-	-	-
NN-MD2-7	-	-	-
NN-MD2-8	-	-	-
NR-MD3-4	10.8±0.76 <sup>b</sup>	9.2±0.29 <sup>b</sup>	-
NR-MD3-5	-	-	-
NR-MD3-19	-	-	-
NR-MD4-7	-	-	-
NR-MD6-2	10.2±0.76 <sup>b</sup>	-	-
NR-MD6-9	-	-	-
NR-MD6-13	-	-	-
NR-MD6-18	-	-	-
NR-MD6-19	-	-	-
NR-MD8-5	10.2±0.76 <sup>b</sup>	-	-
Nisin (2,500 IU)	17.5 <sup>a</sup>	16.5 <sup>a</sup>	-
MRS broth	-	-	-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่พบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

<sup>(1)</sup> ขนาดของช่อง (Well) (ค่าเฉลี่ยเท่ากับ 6 มิลลิเมตร) ในอาหารของทุกไอโซเลทมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ )  
ตัวอักษร a, b และ c ในแนวตั้งของแต่ละไอโซเลท และในซันแสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

### 4.3 การระบุสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

#### 4.3.1 การจัดจำแนกในระดับสกุล (Genus)

ทำการจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 18 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในระดับสกุล โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยา นำข้อมูลที่ได้มาพิจารณาเทียบกับข้อมูลของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (De Vos et al., 2009) และข้อมูลการจัดจำแนกตามวิธีของ Axelsson (2004) พบว่าสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 18 ไอโซเลท ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ *Lactobacillus* (ร้อยละ 94) และ *Lactococcus* (ร้อยละ 6)

##### 4.3.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแล็กติก พบว่าการเจริญของไอโซเลทกลุ่มที่ 1 (NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NN-MD2-8, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD4-7, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5) บนอาหารแข็ง MRS โคโลนีมีรูปร่างกลม (Circular) ผิวเรียบ (Smooth) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.5-2.0 มิลลิเมตร กลมมน โคนสูงจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย (Convex) สีขาว สะท้อนแสงเป็นเงา (Glistening) ขอบเรียบไม่มีรอยเว้า (Entire) (ตารางที่ 4.5) ซึ่งคล้ายลักษณะโคโลนีของ *Lb. plantarum* TISTR 875 สำหรับไอโซเลท NN-MD1-7 และ NN-MD1-13 จะมีลักษณะโคโลนีคล้ายกับกลุ่มที่ 1 แต่มีลักษณะแตกต่างบางประการ โคโลนีของไอโซเลท NN-MD1-7 มีรูปร่างกลม โคนสูงจากผิวหน้าอาหารเล็กน้อย ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1-1.5 มิลลิเมตร สีครีม ทึบแสง (Opaque) และโคโลนีของ NN-MD1-13 มีรูปร่างกลมแบนราบไปตามผิวหน้าของอาหาร (Flat) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 1.5-2 มิลลิเมตร สีขาว ทึบแสง ส่วนไอโซเลท NR-MD6-19 มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างจากไอโซเลทอื่นๆ อย่างชัดเจน คือ โคโลนีมีสีขาว สะท้อนแสงเป็นเงา รูปร่างไม่แน่นอน (Irregular) ผิวหน้าขรุขระ (Rough) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 3-4 มิลลิเมตร

ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกทุกไอโซเลทติดสีแกรมบวก มีลักษณะเซลล์รูปแท่ง พบการจัดเรียงตัวทั้งแบบเดี่ยวและแบบเป็นคู่ (รูปที่ 4.1) คล้ายกับเซลล์ของ *Lb. plantarum* TISTR 875 (รูปที่ 4.2) ยกเว้นเพียงไอโซเลทเดียวคือ NN-MD1-7 ที่ติดสีแกรมบวก เซลล์มีรูปไข่ มีการเรียงตัวแบบเดี่ยวและเป็นคู่ (รูปที่ 4.1)

ตารางที่ 4.5 ลักษณะ โคโลนีของแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งคัดแยกจากมะคั้นดอง เจริญบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน

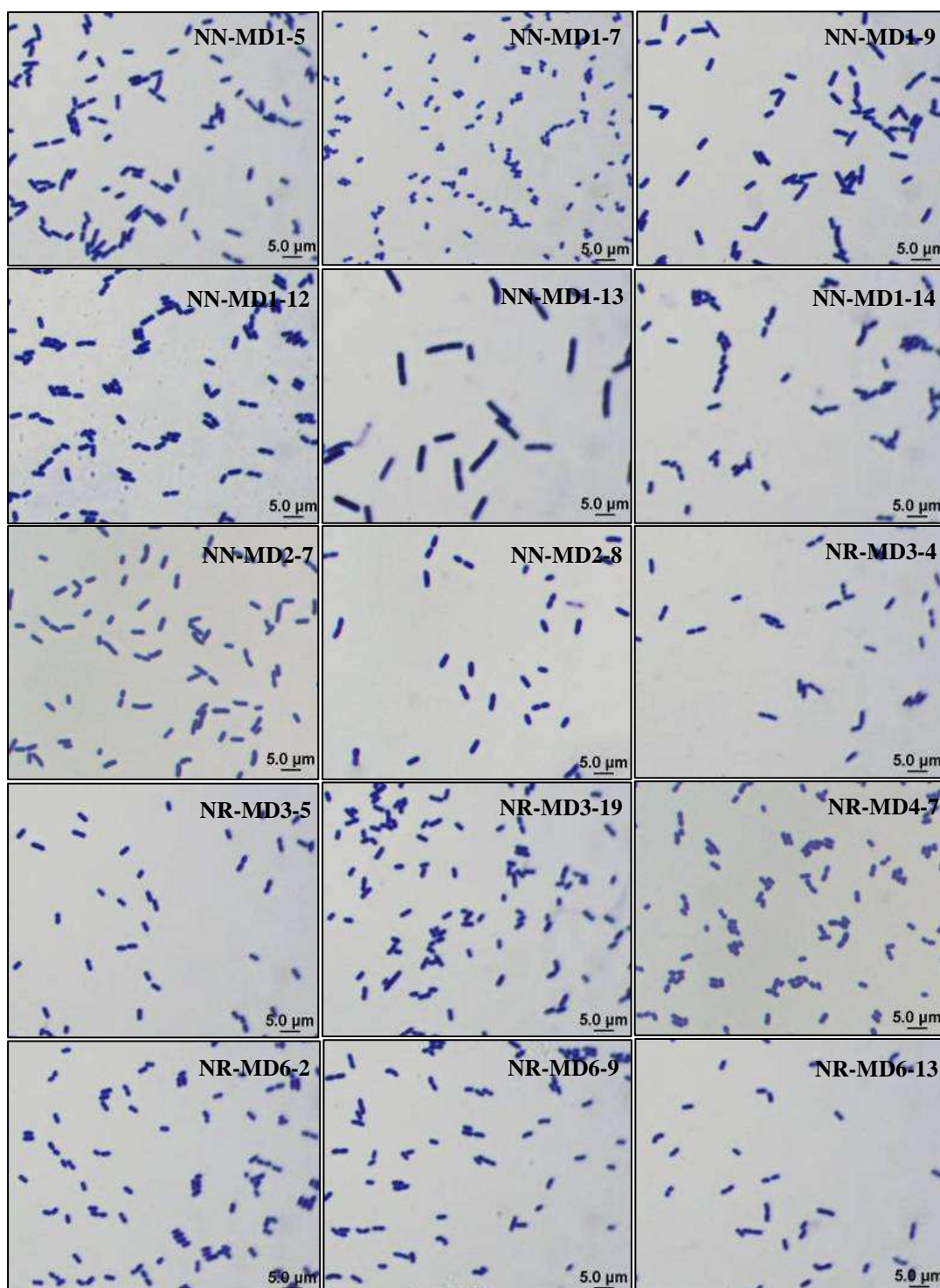
Characteristics	Reference strain	Groups			
	<i>Lb. plantarum</i> TISTR 875	I	II	III	IV
Colony morphology					
Diameter (mm)	1.5-2.2	1.5-2	3-4	1-1.5	1.5-2
Form	Circular, convex	Circular, convex	Irregular	Circular, convex	Circular, flat
Surface	Smooth	Smooth	Rough, raised centre	Smooth	Smooth
Pigment	White	White	White	Cream	White
Optical character	Glistening	Glistening	Glistening	Opaque	Opaque
Number of isolates		15 <sup>a</sup>	1 <sup>b</sup>	1 <sup>c</sup>	1 <sup>d</sup>

หมายเหตุ <sup>a</sup> หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NN-MD2-8, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD4-7, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5

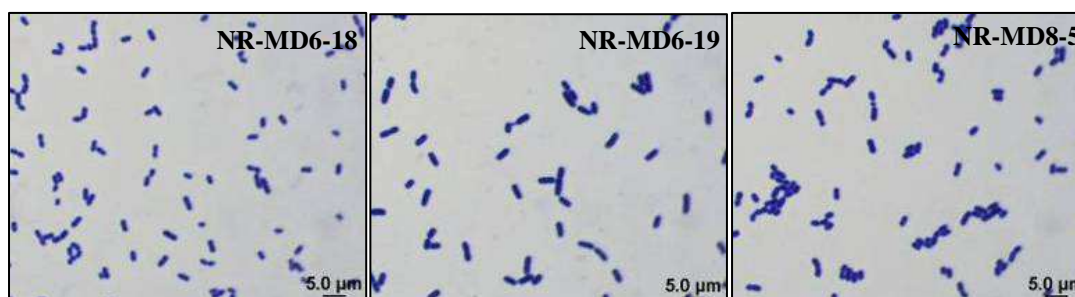
<sup>b</sup> หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NR-MD6-19

<sup>c</sup> หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-7

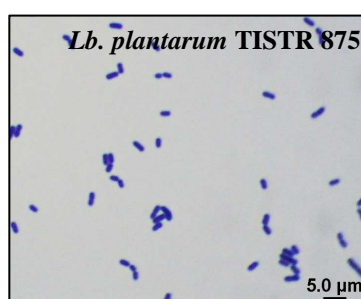
<sup>d</sup> หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-13



**รูปที่ 4.1** รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติก ภายใต้วัดกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เจริญบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน



รูปที่ 4.1 (ต่อ) รูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแล็กติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เจริญบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน



รูปที่ 4.2 รูปร่างของเซลล์ *Lb. plantarum* TISTR 875 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่กำลังขยาย 1,000 เท่า เจริญบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ในสภาวะไม่มีออกซิเจน

#### 4.3.1.2 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยา

การจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกในระดับสกุลนอกจากข้อมูลทางสัณฐานวิทยาแล้วยังต้องพิจารณาข้อมูลทางชีวเคมีและสรีรวิทยาประกอบด้วย เช่น การผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส ปฏิกิริยาของเอนไซม์อะเลส ความสามารถในการเคลื่อนที่ การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิและระดับความเป็นกรดต่างๆ และความสามารถในการทนเกลือ ผลการศึกษาลักษณะทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 18 ไอโซเลท แสดงในตารางที่ 4.6 พบว่า แบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 18 ไอโซเลท ไม่เคลื่อนที่ ไม่ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส จึงจัดแบคทีเรียกรดแล็กติกทุกไอโซเลทเป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกประเภทสร้างกรดแล็กติกเพียงอย่างเดียว (Homofermentative LAB)

ตารางที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกจากมะดันคองและแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง

Characteristics	Reference strain	Group I					
	<i>Lb. plantarum</i> TISTR 875	NN-MD1-5	NN-MD1-9	NN-MD1-12	NN-MD1-14	NN-MD2-7	NN-MD2-8
Cell size (µm)	0.83-0.89×1.25-1.33	0.83-0.9×1.5-1.88	1-1.25×2.5-2.7	1-1.15×1.4-1.67	0.75-0.8×1-1.25	1-1.2×1.4-1.55	1-1.2×1.40-1.51
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 10 °C	+	+	+	+	+	+	+
25 °C	+	+	+	+	+	+	+
30 °C	+	+	+	+	+	+	+
35 °C	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.4	+	+	+	+	+	+	+
9.6	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
6.5%	+	+	+	+	+	+	+
8.0%	+	+	+	+	+	+	+
10.0%	-	+	-	-	-	-	+
18.0%	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

- หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ



ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกจากมะดันดองและแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง

Characteristics	Reference strain	Group I (cont.)					
	<i>Lb. plantarum</i> TISTR 875	NR-MD3-4	NR-MD3-5	NR-MD3-19	NR-MD4-7	NR-MD6-2	NR-MD6-9
Cell size (µm)	0.83-0.89×1.25-1.33	0.75-0.8×1.45-1.5	0.9-1×1.4-1.67	0.90-1×1.45-1.6	0.9-1.2×1.5-2	0.89-1×1.25-1.3	0.8-1×1.45-1.65
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 10 °C	+	+	+	+	-	+	+
25 °C	+	+	+	+	+	+	+
30 °C	+	+	+	+	+	+	+
35 °C	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.4	+	+	+	+	+	+	+
9.6	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
6.5%	+	+	+	+	+	+	+
8.0%	+	+	+	+	+	+	+
10.0%	-	-	-	-	-	-	+
18.0%	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

- หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

ตารางที่ 4.6 (ต่อ) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกจากมะดันดองและแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง

Characteristics	Reference strain	Group I (cont.)			Group II	Group III	Group IV
	<i>Lb. plantarum</i> TISTR 875	NR-MD6-13	NR-MD6-18	NR-MD8-5	NR-MD6-19	NN-MD1-7	NN-MD1-13
Cell size (µm)	0.83-0.89×1.25-1.33	0.9-1×1.5-1.67	0.8-1×1.2-1.35	0.8-0.9×1.1-1.4	0.9-1×2.22-2.5	0.63×1.25	1.5-1.67×3.5-3.9
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 10 °C	+	+	+	+	+	+	+
25 °C	+	+	+	+	+	+	+
30 °C	+	+	+	+	+	+	+
35 °C	+	+	+	+	+	+	+
45 °C	+	+	+	+	+	-	+
Growth at pH 4.4	+	+	+	+	+	-	+
9.6	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+
6.5%	+	+	+	+	+	+	+
8.0%	+	+	+	+	+	-	+
10.0%	-	+	-	-	+	-	-
18.0%	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

- หมายถึง ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

พิจารณาจากลักษณะพื้นฐานทางสัณฐานวิทยา (ตารางที่ 4.5) ชิวเคมี และสรีรวิทยา (ตารางที่ 4.6) ของแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 18 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกในกลุ่มที่ 1 (NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NN-MD2-8, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD4-7, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5) กลุ่มที่ 2 (ไอโซเลท NR-MD6-19) และกลุ่มที่ 4 (ไอโซเลท NN-MD1-13) สามารถจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* เนื่องจากเซลล์มีรูปร่างแท่ง ไม่ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักกลูโคส เจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส และเจริญได้ด้วยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร จากคุณลักษณะที่กล่าวมาแล้วสามารถแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกในกลุ่ม 1, 2 และ 4 ออกจากสกุล *Carnobacterium* ได้ เพราะสกุลนี้จะไม่เจริญทั้งที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร อย่างไรก็ตามความสามารถของ *Lactobacillus* ในการเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสขึ้นอยู่กับเชื้อแต่ละสายพันธุ์ และการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมของกระบวนการหมักในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง (Sánchez, Palop, and Ballesteros, 2000)

สำหรับไอโซเลท NN-MD1-7 เซลล์มีรูปร่างไข่ (Ovoid) มีการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นแบบเซลล์เดี่ยวและเป็นคู่ ไม่ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส ดังนั้นไอโซเลทนี้จึงไม่น่าจะเป็น *Leuconostoc* เนื่องจากเชื้อนี้จะสามารถผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักกลูโคสได้ ไอโซเลทนี้เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส จึงทำให้ไม่สามารถจัดอยู่ในสกุล *Streptococcus* และ *Enterococcus* ได้ *Lactococcus* ค่อนข้างจะมีลักษณะทางสรีรวิทยาที่คล้ายกับ *Vagococcus* แต่ต่างกันที่การเคลื่อนที่ *Vagococcus* สามารถเคลื่อนที่ได้ (Axelsson, 2004) ดังนั้นไอโซเลท NN-MD1-7 สามารถจัดอยู่ในสกุล *Lactococcus* อย่างไรก็ตามไอโซเลท NN-MD1-7 สามารถเจริญได้ที่มีความเป็นกรดต่ำกว่ากับ 9.6 และที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งโดยส่วนมากแล้ว *Lactococcus* จะไม่สามารถเจริญได้ที่สองสภาวะนี้ แต่จากการศึกษาของ Kimoto, Nomura, Kobayashi, Okamoto, and Sadahiro (2004) พบว่า *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ซึ่งคัดแยกมาจากผักดองและหญ้าเนเปียร์ (Napier grass) สามารถเจริญได้ที่มีความเป็นกรดต่ำกว่ากับ 9.6 ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งคัดแยกมาจากวัตถุดิบที่เป็นพืช อาจจะมีคุณลักษณะบางอย่างที่แตกต่างจากแบคทีเรียกรดแล็กติกซึ่งคัดแยกมาจากนมหรือผลิตภัณฑ์นม นอกจากนี้จากผลการทดลองของ Kacem et al. (2004) พบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* ที่คัดแยกได้จากมะกอกเขียวดอง (Fermented green olives) มีความสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงถึงร้อยละ 8 และจากการทดลองของ Dewan and Tamang (2007) พบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* ที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์นมหมักมีความสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5

### 4.3.2 การจัดจำแนกในระดับชนิด (Species)

ทำการจัดจำแนกในระดับชนิดแบคทีเรียกรดแล็กติกในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Lactococcus* โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.7 จากข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยา สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม แต่เมื่อพิจารณาผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิดในชุดจำแนกสำเร็จรูปของแบคทีเรียกรดแล็กติกแต่ละไอโซเลท มาประมวลผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป APILAB V.3.3.3 ที่ใช้สำหรับชุดจำแนก API 50 CHL สามารถจัดจำแนกได้เพิ่มเป็น 6 กลุ่ม แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลทกลุ่มที่ 1 มีทั้งหมด 13 สายพันธุ์ (NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5) จำแนกเป็น *Lactobacillus plantarum* 1 ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนก (% of identification, ID) ร้อยละ 91.1-99.9 สำหรับไอโซเลท NR-MD6-19 (กลุ่มที่ 2), NR-MD4-7 (กลุ่มที่ 3) และ NN-MD1-7 (กลุ่มที่ 4) จัดจำแนกเป็น *Lactobacillus brevis* 1, *Lactobacillus pentosus* และ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนกสูงถึงร้อยละ 99.8, 99.9 และ 99.7 ตามลำดับ โดยส่วนมากแล้ว *Lb. brevis* 1 สามารถหมักน้ำตาลราฟฟิโนส (Raffinose) และแซคคาไรส (Saccharose) ได้ และ *Lb. brevis* 1 มีลักษณะคล้ายคลึงทางสปีชีส์กับสายพันธุ์ *Lb. buchneri* ทำให้ยากต่อการจำแนกเชื้อตามคุณสมบัติการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ แต่เนื่องจากไอโซเลท NR-MD6-19 ไม่สามารถหมักน้ำตาลเมลิไซโตส (Melizitose) ได้ จึงสามารถแยกทั้ง *Lb. brevis* 1 และ *Lb. plantarum* 1 ซึ่งสามารถหมักน้ำตาล Melizitose ออกจาก *Lb. buchneri* ได้ (Hammes and Hertel, 2009) อย่างไรก็ตาม *Lb. brevis* 1 ที่คัดแยกจากมะดันคองสามารถหมักน้ำตาลเซลโลไบโอส (Cellobiose) และเทรฮาโลส (Trehalose) ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว *Lb. brevis* จะไม่สามารถหมักน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้ได้ แต่ Tamang et al. (2008) รายงานว่า *Lb. brevis* ที่คัดแยกได้จากหน่อไม้คอง (Fermented bamboo tender shoots) สามารถหมักน้ำตาล Cellobiose และ Trehalose ได้ ดังนั้นความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ นั้นอาจขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ สำหรับ *Lb. pentosus* มีความสามารถในการหมักน้ำตาลคล้ายกับ *Lb. plantarum* แต่ *Lb. pentosus* จะสามารถหมักกลีเซอรอล (Glycerol) และน้ำตาลดีไซโลส (D-xylose) ได้ ซึ่ง *Lb. plantarum* จะไม่สามารถหมักน้ำตาลทั้งสองชนิดนี้ได้ (Hammes and Hertel, 2009) เมื่อเปรียบเทียบกับ *Lb. plantarum* TISTR 875 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง พบว่ามีระดับความถูกต้องของการจัดจำแนกเท่ากับร้อยละ 99.9 ส่วนไอโซเลท NN-MD1-13 และ NN-MD2-8 ถูกจัดจำแนกเป็น *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* (กลุ่มที่ 5) และ *Lb. plantarum* 1 (กลุ่มที่ 6) พบว่ามีระดับความถูกต้องของการจัดจำแนกร้อยละ 47.4 และ 57.8 ตามลำดับ ซึ่งเป็นค่าความถูกต้องของการจัดจำแนกที่อยู่ในระดับน้อยมาก ดังนั้นต้องมีการจัดจำแนกโดยใช้การยืนยันด้วยวิธี

ทางอนุชีวโมเลกุลอื่นๆ เช่น การศึกษาลำดับเบสบางส่วนของ 16S rDNA

จากผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในอาหารจากมะคั้นดอง สามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ *Lb. plantarum* 1, *Lb. brevis* 1, *Lb. pentosus* และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เชื้อส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้เป็น *Lactobacillus* sp. รูปร่างเป็นแท่ง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าเชื้อนี้สามารถทนต่อสภาวะเป็นกรดได้ดีกว่าเชื้อชนิดอื่น จากการรายงานผลการวิจัยพบว่าสามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ โดยเฉพาะ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ซึ่งสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้หลายชนิด แต่งานวิจัยที่ผ่านมาพบ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ในนมและผลิตภัณฑ์นม แต่ปัจจุบันพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้ในผักและผลไม้รวมถึงในอาหารหมักดองชนิดอื่นอีกด้วย เช่น ถั่วงอก (Cai, Ng, and Farber, 1997; Franz, Du Toir, Holy, Schillinger, and Holzappel, 1997) ผักขมและมันเทศ (Franz et al., 1997) ผลไม้เบอร์รี่ (Chen, Wu, and Yanagida, 2010) มะกอกเขียวดอง (Kacem, Halima, and Karam 2004; 2005) กิมจิ (Chin, Breidt, Fleming, Shin, and Yoon, 2006; Lee et al., 1999, 2002; Park, Itoh, Kikuchi, Niwa, and Fujisawa, 2003) กะหล่ำปลีดอง (Sauerkraut) (Harris, Fleming, and Klaenhammer, 1992) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Kacem and Karem (2006) ที่รายงานไว้ในช่วงต้น (First stage) ของการหมักมะกอกเขียวดองแบบธรรมชาติ (Fermented Algerial olives) เป็นระยะเวลา 15 วัน พบการเจริญของเชื้อ *E. faecium* มากที่สุด (ร้อยละ 15.5) รองลงมาคือ *Lb. plantarum* (ร้อยละ 12.2) และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* (ร้อยละ 4.4) เมื่อเข้าสู่ช่วงที่ 2 (Second stage) ของการหมักเป็นเวลา 60 วัน พบเชื้อ *E. faecium* ร้อยละ 7 ซึ่งมีปริมาณลดลงจากตอนช่วงต้น แต่พบ *Lb. plantarum* มากที่สุด (ร้อยละ 19.2) และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* (ร้อยละ 13.8) ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากตอนเริ่มต้นการหมัก หลังจากครบ 90 วัน ซึ่งเป็นช่วงสุดท้ายของการหมักยังคงพบ *Lb. plantarum* มากที่สุด (ร้อยละ 31.7) รองลงมาคือ *E. faecium* (ร้อยละ 13.8) *Lb. casei* (ร้อยละ 12.2) *Lb. paracasei* (ร้อยละ 10.5) *E. faecalis* (ร้อยละ 6.5) *E. durans* (ร้อยละ 4.8) และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* (ร้อยละ 4) นอกจากนี้ยังมี lactococci และ lactobacilli ที่ไม่ได้ระบุสายพันธุ์ถึงระดับสกุลอีกร้อยละ 6.5 และ 9.7 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 ผลการจดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดจดจำแนกสำเร็จรูป API 50 CHL เปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง

Carbohydrates	Reference strain		LAB isolates				
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Group I <sup>a</sup>	Group II <sup>b</sup>	Group III <sup>c</sup>	Group IV <sup>d</sup>	Group V <sup>e</sup>	Group VI <sup>f</sup>
	TISTR 875	(13 isolates)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)
Control	-	-	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	+	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	-
L-Arabinose	+	+	+	+	-	-	-
D-Ribose	+	+	+	+	+	?	+
D-Xylose	-	+/-	-	+	+	-	-
L-Xylose	-	+	-	-	-	-	-
D-Adonitol	-	+/-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้

- หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้

? หมายถึง ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

a หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5

b, c, d, e และ f หมายถึง ไอโซเลท NR-MD6-19, NR-MD4-7, NN-MD1-7, NN-MD1-13 และ NN-MD2-8 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดจัดจำแนกสำเร็จรูป API 50 CHL เปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง

Carbohydrates	Reference strain	LAB isolates					
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Group I <sup>a</sup>	Group II <sup>b</sup>	Group III <sup>c</sup>	Group IV <sup>d</sup>	Group V <sup>e</sup>	Group VI <sup>f</sup>
	TISTR 875	(13 isolates)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)
β-Methyl-D-Xyloside	-	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	+	+	+	+	+	-	-
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-
L-Rhamnose	-	+/-	-	+	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	+	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้

- หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้

? หมายถึง ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

a หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5

b, c, d, e และ f หมายถึง ไอโซเลท NR-MD6-19, NR-MD4-7, NN-MD1-7, NN-MD1-13 และ NN-MD2-8 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดจัดจำแนกสำเร็จรูป API 50 CHL เปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง

Carbohydrates	Reference strain		LAB isolates				
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Group I <sup>a</sup>	Group II <sup>b</sup>	Group III <sup>c</sup>	Group IV <sup>d</sup>	Group V <sup>e</sup>	Group VI <sup>f</sup>
	TISTR 875	(13 isolates)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)
D-Mannitol	+	+	+	+	+	-	+
D-Sorbitol	+	+	+	+	-	-	+
α-Methyl-D-Mannoside	+	+/-	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-Glucoside	-	+/-	-	+	-	-	-
N-Acetyl-glucosamine	+	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	-	+
Arbutin	+	+	+	+	+	+	+
Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้

- หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้

? หมายถึง ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

a หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5

b, c, d, e และ f หมายถึง ไอโซเลท NR-MD6-19, NR-MD4-7, NN-MD1-7, NN-MD1-13 และ NN-MD2-8 ตามลำดับ



ตารางที่ 4.7 (ต่อ) ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดจัดจำแนกสำเร็จรูป API 50 CHL เปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง

Carbohydrates	Reference strain	LAB isolates					
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Group I <sup>a</sup>	Group II <sup>b</sup>	Group III <sup>c</sup>	Group IV <sup>d</sup>	Group V <sup>e</sup>	Group VI <sup>f</sup>
	TISTR 875	(13 isolates)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	-	+
D-Maltose	+	+	+	+	+	+	+
D-Lactose (bovine origin)	+	+	+	+	-	-	+
D-Melibiose	+	+/-	+	+	-	-	+
D-Saccharose (sucrose)	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+
Inulin	-	+/-	+	+	-	-	+
D-Melezitose	+	+	-	+	-	-	+
D-Raffinose	+	+/-	+	+	-	-	+

หมายเหตุ + หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้

- หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้

? หมายถึง ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

a หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5

b, c, d, e และ f หมายถึง ไอโซเลท NR-MD6-19, NR-MD4-7, NN-MD1-7, NN-MD1-13 และ NN-MD2-8 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดจัดจำแนกสำเร็จรูป API 50 CHL เปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง

Carbohydrates	Reference strain		LAB isolates				
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Group I <sup>a</sup>	Group II <sup>b</sup>	Group III <sup>c</sup>	Group IV <sup>d</sup>	Group V <sup>e</sup>	Group VI <sup>f</sup>
	TISTR 875	(13 isolates)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)
Amidon (starch)	-	+/-	-	-	+	-	-
Glycogen	-	+/-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+	+	+	-	+
D-Turanose	+	+/-	+	-	-	-	-
D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-
D-Tagatose	-	-	-	-	-	-	-
D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-
L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้

- หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้

? หมายถึง ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

a หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5

b, c, d, e และ f หมายถึง ไอโซเลท NR-MD6-19, NR-MD4-7, NN-MD1-7, NN-MD1-13 และ NN-MD2-8 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.7 (ต่อ) ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกด้วยชุดจัดจำแนกสำเร็จรูป API 50 CHL เปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแล็กติกอ้างอิง

Carbohydrates	Reference strain	LAB isolates					
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Group I <sup>a</sup>	Group II <sup>b</sup>	Group III <sup>c</sup>	Group IV <sup>d</sup>	Group V <sup>e</sup>	Group VI <sup>f</sup>
	TISTR 875	(13 isolates)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)	(1 isolate)
D-Arabitol	-	+/-	+	-	-	-	+
L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-
Potassium Gluconate	+	+/-	+	+	+	-	+
Potassium 2-Keto-gluconate	-	-	-	-	-	-	-
Potassium 5-Keto-gluconate	-	+/-	+	-	-	-	-
Identified as	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	<i>Lactobacillus brevis</i> 1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>delbrueckii</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1
Identification (%)	99.9	91.1-99.9	99.8	99.9	99.7	47.4	57.8

หมายเหตุ + หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้

- หมายถึง ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนไม่ได้

? หมายถึง ผลการทดสอบไม่ชัดเจน

a หมายถึง แบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท NN-MD1-5, NN-MD1-9, NN-MD1-12, NN-MD1-14, NN-MD2-7, NR-MD3-4, NR-MD3-5, NR-MD3-19, NR-MD6-2, NR-MD6-9, NR-MD6-13, NR-MD6-18 และ NR-MD8-5

b, c, d, e และ f หมายถึง ไอโซเลท NR-MD6-19, NR-MD4-7, NN-MD1-7, NN-MD1-13 และ NN-MD2-8 ตามลำดับ

จากการทดลองในข้อ 4.2.2 (ตารางที่ 4.4) พบว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 (NN-MD1-7) สามารถผลิต crude bacteriocin ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบสูงที่สุดโดยยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 ได้มากกว่า *S. aureus* TISTR 118 ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติก *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 และ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบ เพื่อใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป คือ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต crude bacteriocin คุณสมบัติเบื้องต้นและกลไกการทำงานของ crude bacteriocin

#### 4.4 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตแบคทีเรียโอซินแบบหยาบ

##### 4.4.1 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต crude bacteriocin

จากผลการทดลองในข้อ 4.2.2 พบว่าสายพันธุ์ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 (NN-MD1-7) สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 ได้ดีที่สุด สำหรับ *S. aureus* TISTR 118 ก่อนข้างมีปัญหาในเรื่องการต้านทานต่อแบคทีเรียโอซิน และให้ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญไม่คงที่ตลอดการทดลอง (Parada et al., 2007) ดังนั้นจึงเลือกใช้ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิตแบคทีเรียโอซินและใช้ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบเพียงสายพันธุ์เดียว

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 พบความสัมพันธ์ระหว่างขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส (Diameter of inhibition zone) โดยใช้ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบ ค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ดังแสดงในรูปที่ 4.3-4.8 ตามลำดับ อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 5.0 พบว่า ภายในระยะเวลา 48 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างและค่าการดูดกลืนแสงน้อยมาก แสดงว่าที่สภาวะนี้ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 มีการเจริญน้อยมาก ชั่วโมงที่ 12 crude bacteriocin จะเริ่มผลิตมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสเท่ากับ  $12.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร และมีค่าลดลงเป็น  $12 \pm 0.71$  และ  $11 \pm 1.41$  มิลลิเมตร ในชั่วโมงที่ 18 และ 24 ตามลำดับ เมื่อเพิ่มค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 5.5 พบว่า มีการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างและค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้น แต่ยังคงเริ่มผลิต crude bacteriocin ในชั่วโมงที่ 12 จนกระทั่งชั่วโมงที่ 48 โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งอยู่ในช่วง 12.0-12.5 มิลลิเมตร ซึ่งสังเกตได้ว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสก่อนข้างจะมีค่าคงที่ตลอดช่วงการทดลอง

ส่วนที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.0 พบว่าแตกต่างจาก 2 สภาวะแรกที่กล่าวไปแล้ว เนื่องจากค่าความเป็นกรด-ด่าง และค่าการดูดกลืนแสงมีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบ

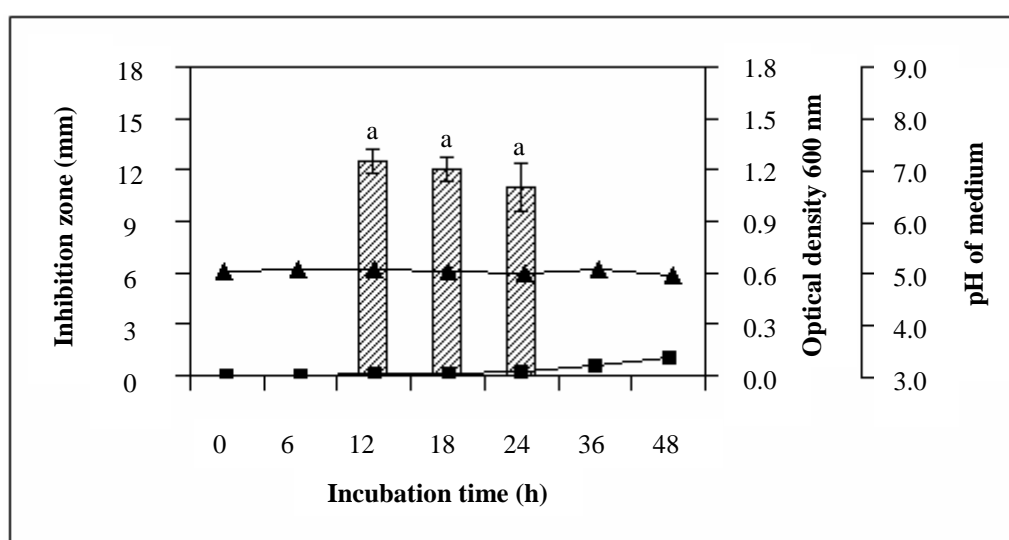
เทียบจากตอนเริ่มต้นการเจริญ แสดงว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 มีการเจริญได้มากขึ้นและเริ่มมีผลิต crude bacteriocin ในชั่วโมงที่ 6 ไปจนถึงชั่วโมงที่ 48 โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสอยู่ในช่วง 11.0-13.0 มิลลิเมตร ที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พบว่าในชั่วโมงที่ 6 จะเริ่มมีการผลิต crude bacteriocin ถึงชั่วโมงที่ 24 โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสอยู่ในช่วง 12.5-15.0 มิลลิเมตร เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 การผลิต crude bacteriocin จะมากที่สุด และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $16.0 \pm 1.41$  มิลลิเมตร และจะลดลงที่ชั่วโมงที่ 48 มีค่าเท่ากับ  $13.0 \pm 0.0$  มิลลิเมตร

สำหรับที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0 จะเริ่มมีการผลิต crude bacteriocin ในชั่วโมงที่ 6 และผลิตอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 18 โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสอยู่ในช่วง 11.5-12.5 มิลลิเมตร เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 24 พบการผลิต crude bacteriocin มากที่สุด (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $14.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร) และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในชั่วโมงที่ 48 ที่สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.0 และ 7.5 พบว่ามีรูปแบบการผลิต crude bacteriocin คล้ายกัน คือ crude bacteriocin เริ่มมีการผลิตในช่วงชั่วโมงที่ 6-12 โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสอยู่ในช่วง 11.0-13.0 มิลลิเมตร มีการผลิต crude bacteriocin มากที่สุดในชั่วโมงที่ 18 และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $14.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในชั่วโมงที่ 48

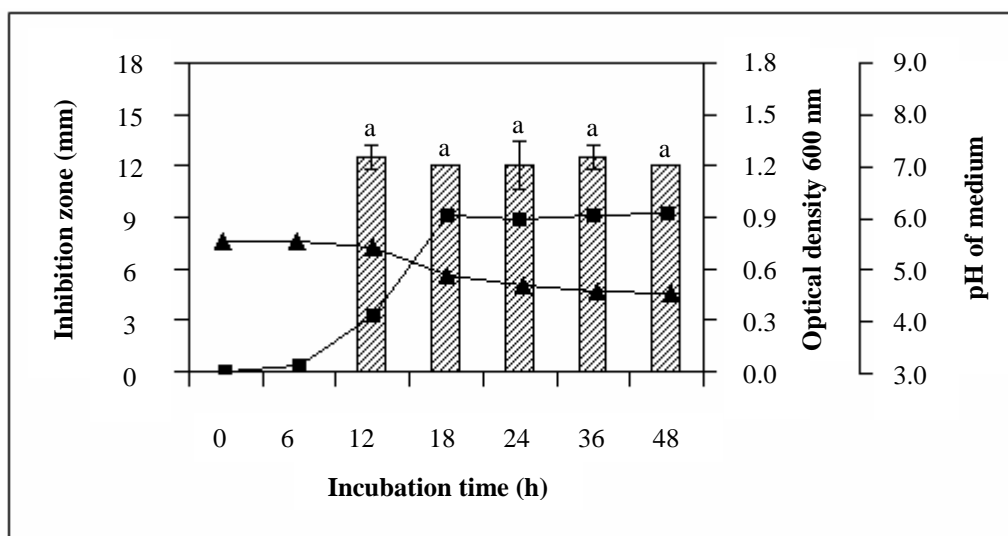
เมื่อพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.0, 6.5 และ 7.0 พบว่ามีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่คล้ายกัน ค่าการดูดกลืนแสงมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วในชั่วโมงที่ 6-12 ซึ่งเป็นช่วงระยะเจริญ (Log phase) ของเชื้อ จากนั้นในชั่วโมงที่ 18 จนถึงชั่วโมงที่ 48 ค่าการดูดกลืนแสงจะมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนเกือบคงที่ แสดงว่าการเจริญของเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ (Stationary phase) ดังนั้นการเจริญของเชื้อในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.0, 6.5 และ 7.0 จะมีรูปแบบการเจริญที่ไม่แตกต่างกัน

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่สภาวะการเจริญ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่ำจะพบการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อน้อยมาก แต่ถึงแม้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นจะแตกต่างกันแต่ค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายกลับมีค่าใกล้เคียงกันซึ่งมีค่าอยู่ในช่วง 4.5-4.6 ยกเว้นที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5.0 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายเท่ากับ 4.9 การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างในแต่ละสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นต่างๆ นั้น จะพบการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในชั่วโมงที่ 6-18 คล้ายกับการเปลี่ยนแปลงของค่าการดูดกลืนแสงที่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนในเวลาดังกล่าวเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับการเจริญในช่วงระยะการเจริญของเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 แสดงว่าในช่วงระยะเวลานี้เชื้อมีการมีการเจริญอย่างรวดเร็ว และมีการใช้

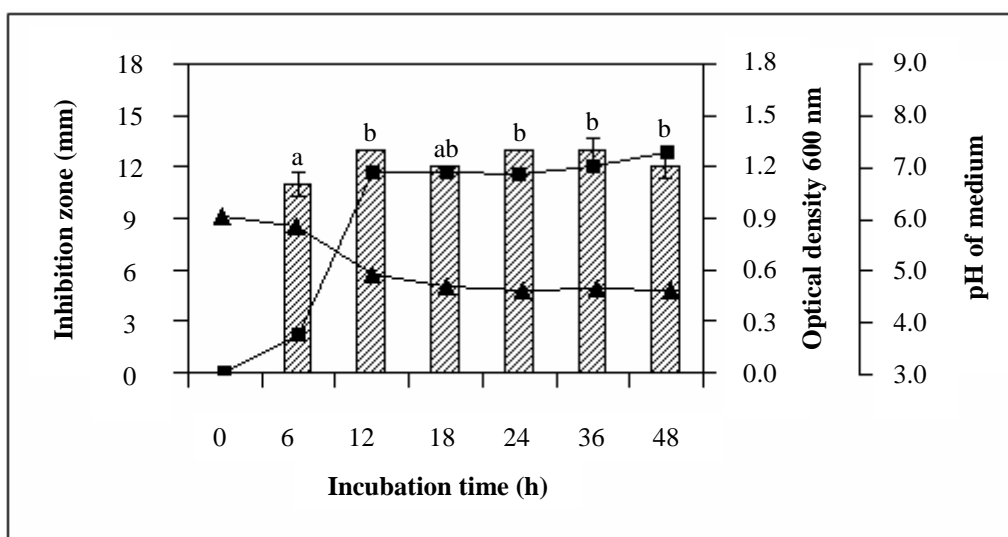
น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนส่งผลให้มีการสร้างกรดแล็กติก ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลง นอกจากนี้ส่วนมากจะพบกิจกรรมของ crude bacteriocin ในช่วงเวลานี้ด้วย ดังนั้นค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว MRS จึงมีผลต่อทั้งการเจริญและการผลิต crude bacteriocin ของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 (Mitra, Chakrabarty, and Biswas, 2005) จากการทดลองนี้พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว MRS ในชั่วโมงที่ 36 พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเหลว MRS ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ศึกษาผลของปัจจัยความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ในขั้นตอนต่อไป



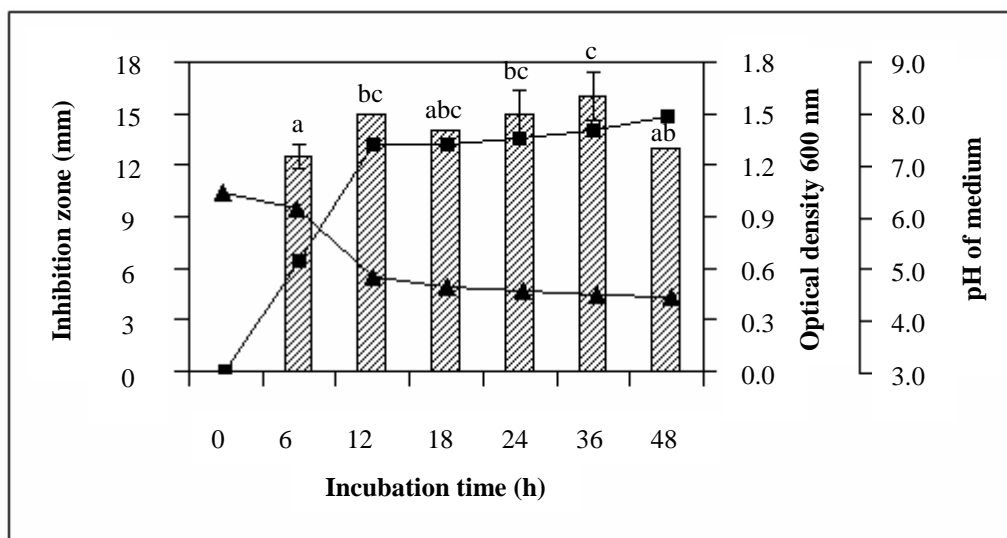
รูปที่ 4.3 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5.0  
หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณใสการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



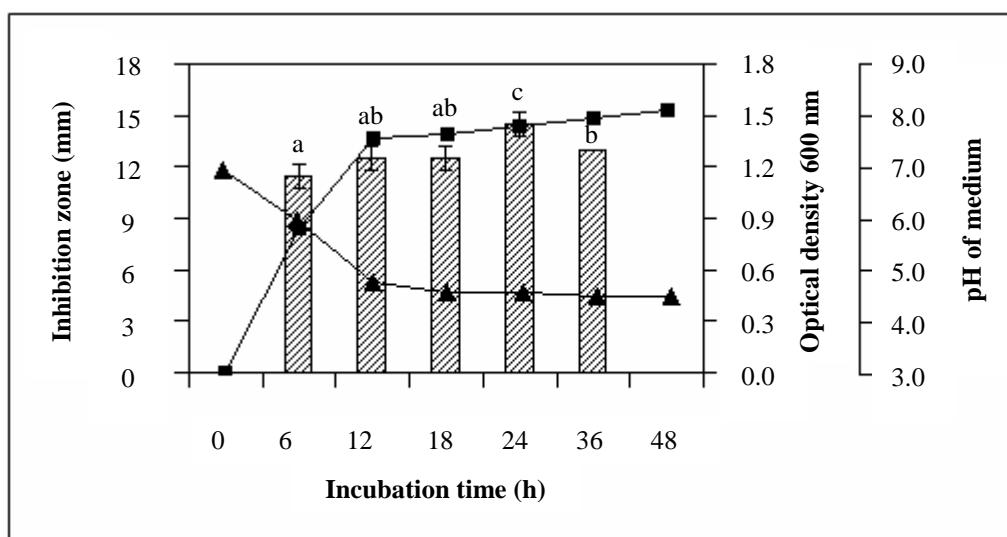
รูปที่ 4.4 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5.5  
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6  
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

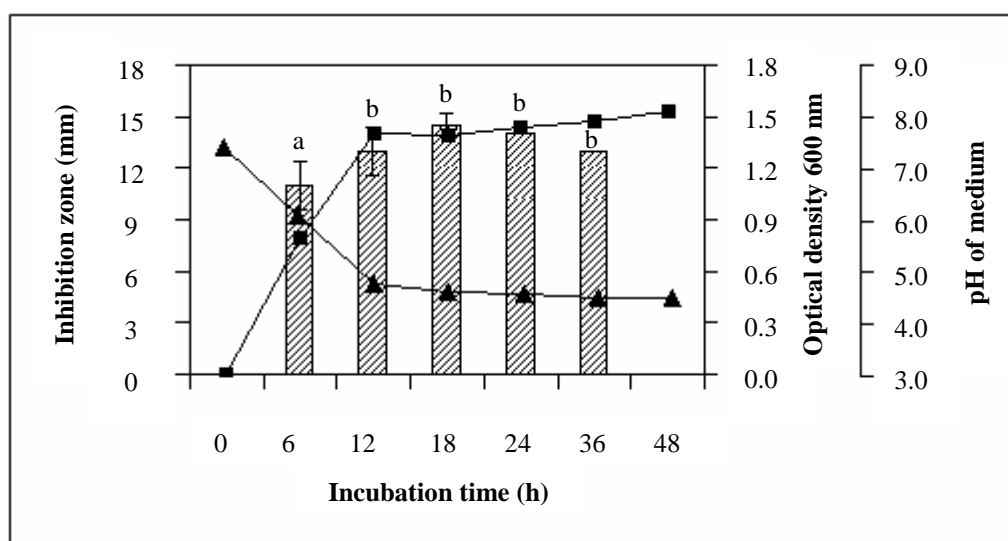


รูปที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 6.5  
หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4.7 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7  
หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )





**รูปที่ 4.8** ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 7.5 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

จากการเจริญ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 ที่ชั่วโมงที่ 36 พบว่าเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกสภาวะการเลี้ยงที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin จากผลการทดลองในรูปที่ 4.6 สอดคล้องกับผลการทดลองของ Todorov and Dicks (2005b) ที่พบว่า การเจริญของ *Lb. plantarum* ST28MS ในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับเริ่มต้น 6.0-6.5 จะทำให้สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้มากที่สุด เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Todorov and Dicks (2007) ที่พบว่า *Lb. pentosus* ST712BZ สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้มากที่สุด ในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น 5.5, 6.0 และ 6.5 เช่นเดียวกับ Todorov and Dicks (2006a) ที่พบว่า *Lb. plantarum* ST23LD ผลิตแบคทีริโอซินได้มากที่สุดเมื่อเจริญในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 โดยมีทริปโตน (Tryptone) และสารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) เป็นแหล่งไนโตรเจน แต่บางกรณีพบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการผลิต crude bacteriocin ต่างกันเช่นงานวิจัยของ Mataragas et al. (2003) ที่พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมสำหรับการเจริญคือ 6.0-6.5 แต่ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตแบคทีริโอซินคือ 5.5

#### 4.4.2 การศึกษาความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิต crude bacteriocin

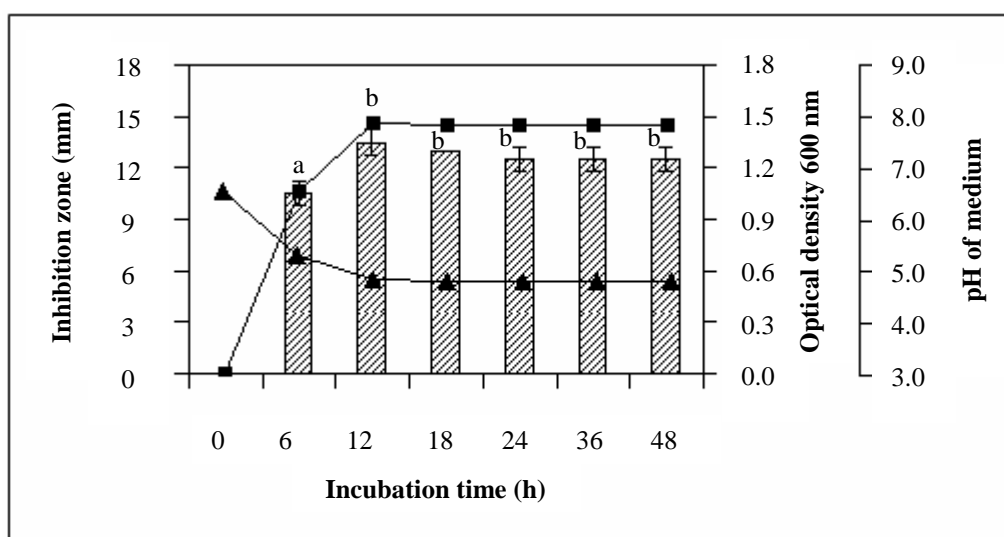
จากการทดลองในข้อ 4.4.1 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 6.5 ดังนั้นจึงใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างนี้ในการศึกษาผลของความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสโดยใช้ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบ ในสภาวะการเลี้ยงที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ตามลำดับ (รูปที่ 4.9-4.14) จากการทดลองพบว่าในสภาวะการเลี้ยงที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ เชื้อไม่มีระยะปรับตัว (lag phase) สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6 จะมีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจากตอนเริ่มต้นจาก 0.001 เป็น 1.061 แสดงว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วและเริ่มพบกิจกรรมของ crude bacteriocin วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $10.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้มากที่สุด  $12.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร หลังจากนั้นกิจกรรมของ crude bacteriocin จะเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 18 จนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็นร้อยละ 1 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสภาวะการเลี้ยงที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ในชั่วโมงที่ 6 การเจริญของเชื้อจะช้าลงเล็กน้อย อย่างไรก็ตามลักษณะการเจริญและการผลิต crude bacteriocin ยังคงเหมือนกัน คือในชั่วโมงที่ 12 จะพบกิจกรรมของ crude bacteriocin มากที่สุด โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $13.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร และค่าคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 36 แต่ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในชั่วโมงที่ 48 ส่วนที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 พบว่ารูปแบบของการเจริญและกิจกรรมของ crude bacteriocin ยังคงมีรูปแบบที่คล้ายกับสองสภาวะแรกที่ได้กล่าวไปแล้ว ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจาก 0.598 เป็น 1.246 ในชั่วโมงที่ 6 และชั่วโมงที่ 12 ตามลำดับ แสดงว่าเป็นช่วงระยะการเจริญของเชื้อ และในชั่วโมงที่ 12 ยังพบกิจกรรมของ crude bacteriocin มากที่สุด วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $14.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร เมื่อเข้าสู่ระยะคงที่ในชั่วโมงที่ 18 ของการเจริญ ค่าการดูดกลืนแสงเริ่มมีค่าคงที่และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสเริ่มมีค่าลดลงจนถึงสิ้นสุดระยะเวลาการบ่มที่ 48 ชั่วโมง สามารถวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $12.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็นร้อยละ 3 พบว่าเชื้อมีการเจริญช้าลง มีระยะปรับตัวในช่วงแรก โดยในชั่วโมงที่ 6 มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจากตอนเริ่มต้นเพียงเล็กน้อยจาก 0.001 เป็น 0.117 แต่อย่างไรก็ตามยังสามารถพบกิจกรรมของ crude bacteriocin โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $11.8 \pm 0.35$  มิลลิเมตร เมื่อเพิ่มระยะเวลาในการเจริญจนถึงชั่วโมงที่ 18 พบว่าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสมีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ นอกจากนี้ในชั่วโมงที่ 6-18 พบว่าค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นอย่าง

รวดเร็วจากตอนเริ่มต้นแสดงว่าการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วงระยะการเจริญ จนกระทั่งชั่วโมงที่ 24 เริ่มเข้าสู่ระยะคงที่เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงเริ่มมีค่าคงที่และพบกิจกรรมของ crude bacteriocin มากที่สุด โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $13.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตรและมีค่าคงที่จนถึงชั่วโมงที่ 36 หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 48 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสเริ่มมีค่าลดลงเท่ากับ  $10.3 \pm 0.35$  มิลลิเมตร ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4 พบว่าเชื้อมีระยะปรับตัวในช่วง 6 ชั่วโมงแรกของการเจริญ เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 12 ซึ่งเป็นช่วงระยะการเจริญมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.129 และเพิ่มเป็น 0.324 ในชั่วโมงที่ 18 โดยในชั่วโมงที่ 12-48 สามารถวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ 10 มิลลิเมตร เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็นร้อยละ 5 พบว่าเชื้อมีระยะปรับตัวในช่วงแรก ในชั่วโมงที่ 12-24 พบกิจกรรมของ crude bacteriocin โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ 10 มิลลิเมตร และเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 36 มีค่าลดลงเท่ากับ 8 มิลลิเมตร แต่ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในชั่วโมงที่ 48

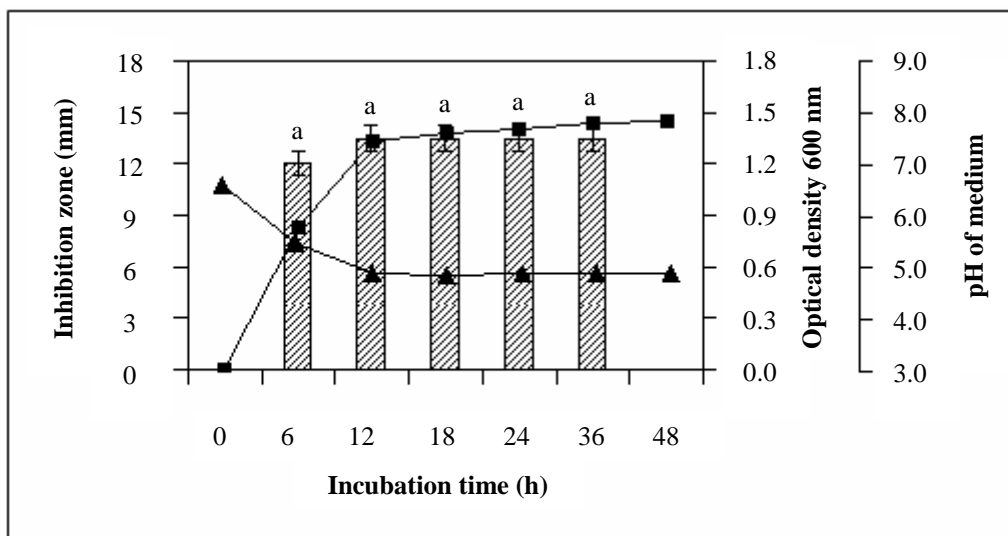
เมื่อพิจารณาที่ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่างๆ พบว่าเมื่อเชื้อเริ่มมีการเจริญมากขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างค่อยๆ ลดลงโดยเฉพาะในระยะการเจริญจะเห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน และเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงน้อยลงเมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่ โดยแนวโน้มการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง จะขึ้นอยู่กับระยะเวลาการเจริญของเชื้อในแต่ละสภาวะ ในสภาวะที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1 และ 2 พบว่าในระยะเวลาการบ่ม 48 ชั่วโมง ความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลงประมาณ 1.55-1.71 หน่วย คือลดลงจาก 6.5 เป็น 4.8-5.0 ซึ่งสอดคล้องกับค่าการดูดกลืนแสงที่ลดลงในแต่ละสภาวะ แสดงว่าเชื้อมีการเจริญได้ดีในสภาวะดังกล่าว แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็นร้อยละ 3, 4 และ 5 พบว่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลงประมาณ 1.19, 1.04 และ 0.82 หน่วย ตามลำดับ ความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายมีค่าอยู่ในช่วง 5.3-5.7 เชื้อมีการเจริญช้าลงเพราะมีช่วงระยะปรับตัวก่อนถึงระยะการเจริญ ดังนั้น ความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายที่วัดได้จึงมีค่าลดลงจากตอนเริ่มต้นของการเจริญไม่มากนัก

จากงานวิจัยนี้พบว่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 0-3) ในระดับที่เหมาะสมสามารถกระตุ้นการผลิต crude bacteriocin ได้ แต่ถ้าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 4-5) มากเกินไปก็จะมีผลในการยับยั้งการผลิต crude bacteriocin นอกจากนี้ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่มากเกินไปยังมีผลทำให้ทำให้ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 มีระยะปรับตัวเพิ่มมากขึ้น ผลการทดลองที่ผ่านมา Delgado et al. (2007) ได้รายงานไว้ว่า *Lb. plantarum* 17.2b ที่คัดแยกได้จากมะกอกดอง จะสามารถผลิตแบคทีริโอซินได้มากที่สุดในสภาวะที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Leal-Sánchez, Jiménez-Díaz, Maldonado-Barragán, Garrido-Fernández and Ruiz-Barba (2002) ที่พบว่าค่าความเข้มข้นโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2.5 จะสามารถกระตุ้นการผลิต

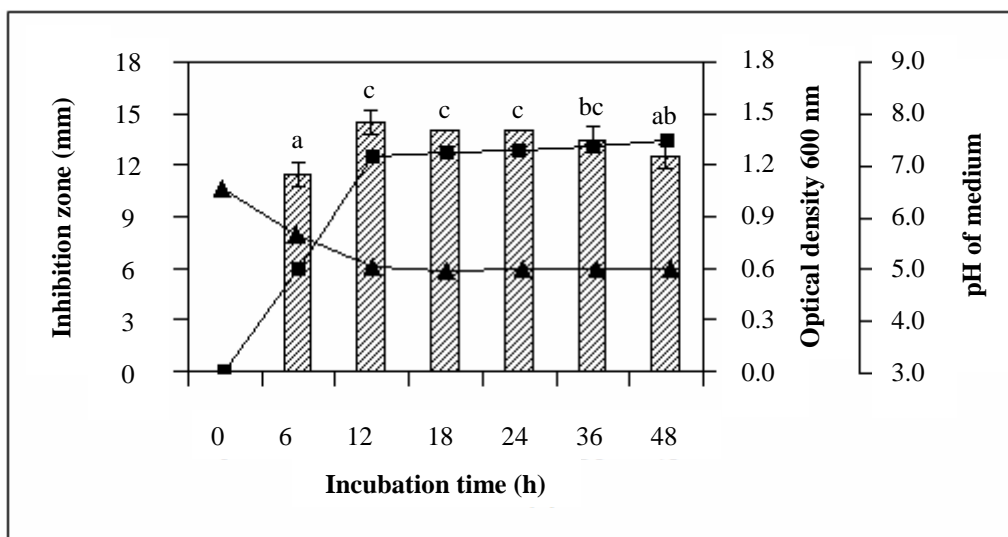
แบคทีเรียโอสินของเชื้อ *Lb. plantarum* 128/2 ที่คัดแยกมาจากมะกอกเขียวคองได้ แต่ถ้าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์มากกว่าร้อยละ 2.5 การผลิตแบคทีเรียโอสินจะลดลง จากการทดลองนี้พบว่าสถานะความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 ในช่วงเวลาที่ 12 จะพบขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสได้มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกใช้อาหารเหลว MRS ซึ่งมีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 และโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 ศึกษาผลของปัจจัยอุณหภูมิในการบ่มในขั้นตอนต่อไป ผลที่ได้จากการทดลองนี้ พบว่าเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ก่อนข้างจะมีความไวต่อความเป็นกรด (ข้อ 4.4.1) และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูง (ข้อ 4.4.2) แสดงว่าเชื้อชนิดนี้น่าจะมีบทบาทรอง (Minor role) ในกระบวนการหมักมะคั้น ดังนั้น *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 จึงน่าจะใช้เป็นกล้าเชื้อ (Co-protective culture) ร่วมกับแบคทีเรียกรดแล็กติกชนิดอื่นที่ทนต่อสภาวะที่ใช้ในการหมัก หรือทนต่อ crude bacteriocin ที่ผลิตจาก *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ได้



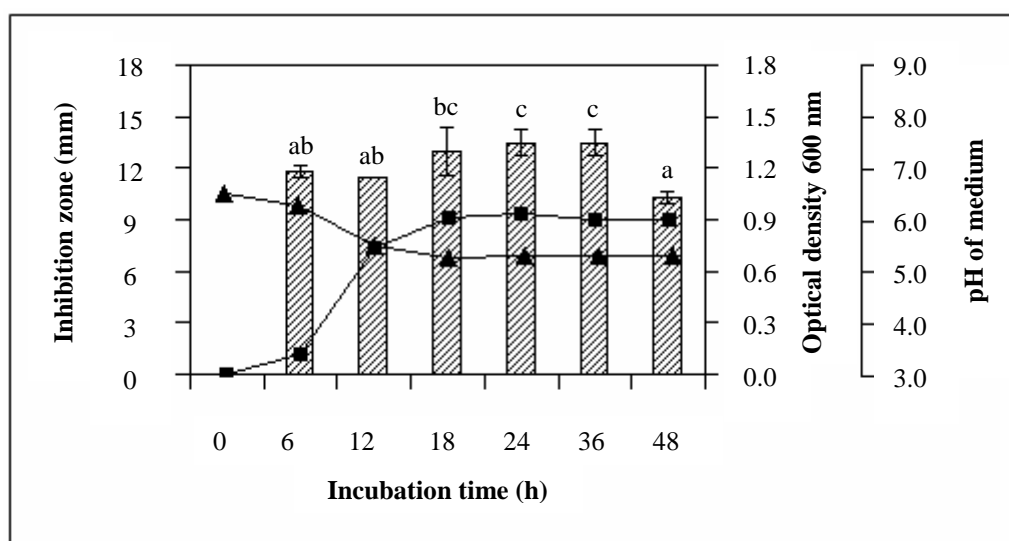
รูปที่ 4.9 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (OD<sub>600 nm</sub>, —■—) ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไป (—▲—) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ในอาหารเหลว MRS ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์



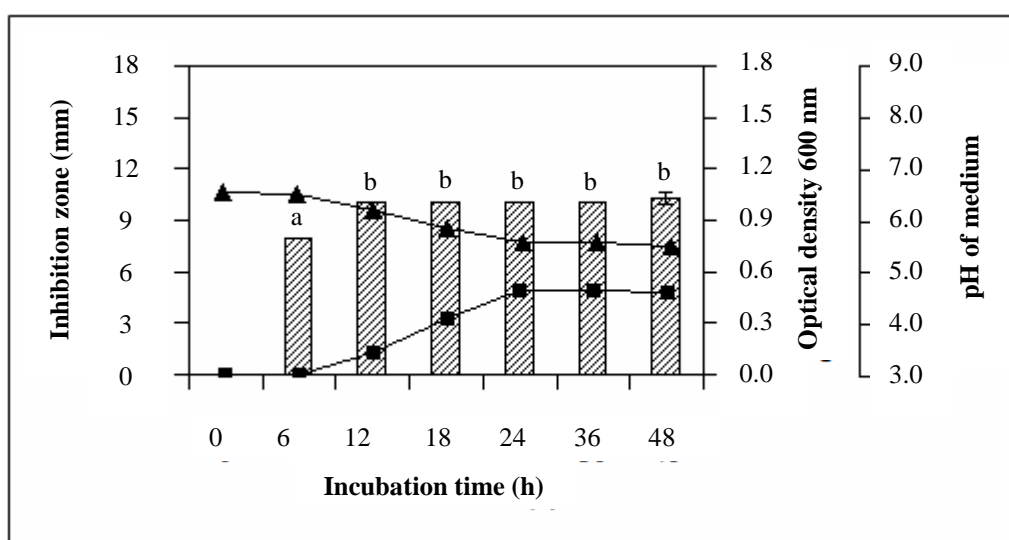
รูปที่ 4.10 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เดิมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 1 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



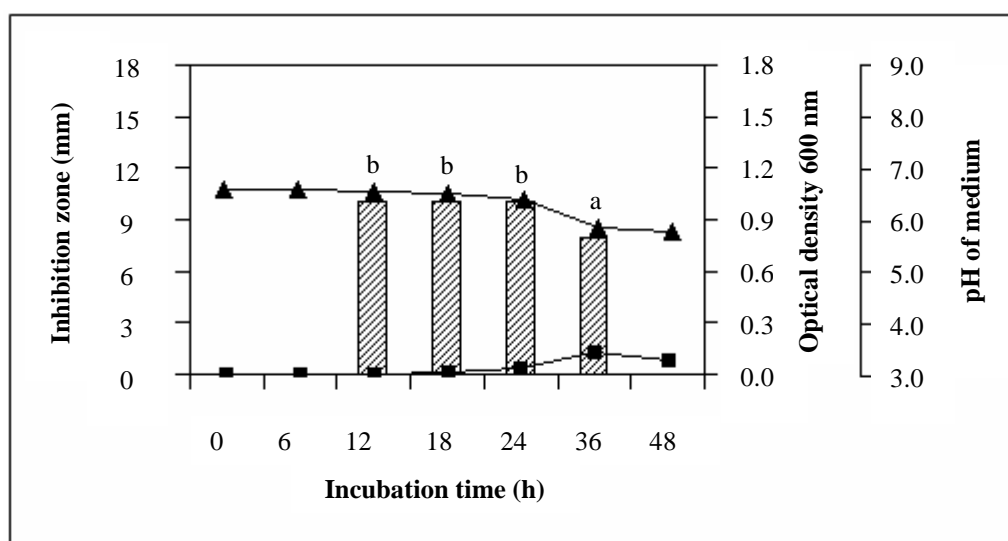
รูปที่ 4.11 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เดิมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4.12 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เต็มไซเคียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 3 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4.13 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เต็มไซเคียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 4 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



**รูปที่ 4.14** ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เดิม โขเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 5 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

#### 4.4.3 การศึกษาอุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิต crude bacteriocin

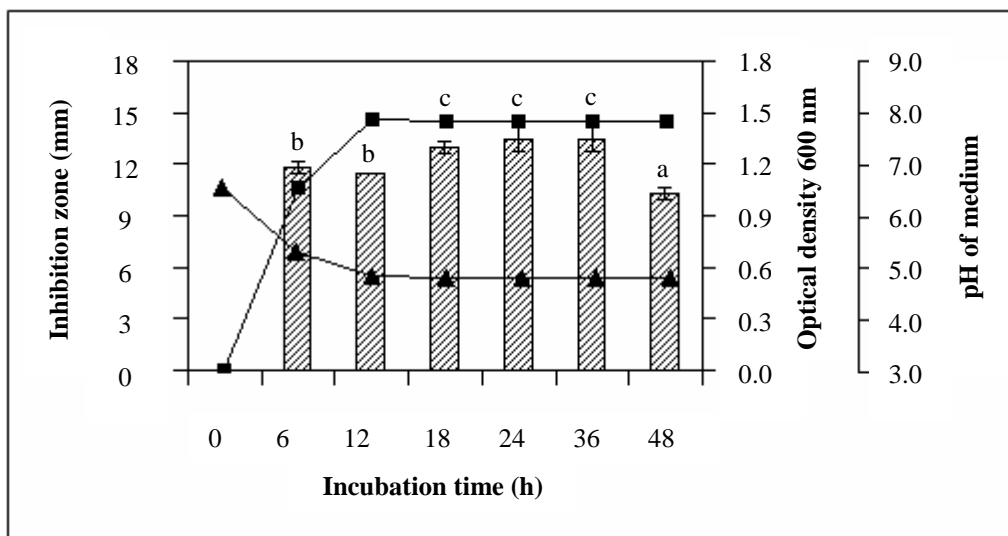
จากการทดลองในข้อ 4.4.1 และ 4.4.2 พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin มากที่สุดมีค่าเท่ากับ 6.5 และร้อยละ 2 ตามลำดับ ดังนั้นจึงใช้ค่าความเป็นกรด-ด่างและความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์นี้ในการศึกษาผลของอุณหภูมิ ความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ค่าความเป็นกรด-ด่าง และขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณไฮโดยใช้ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบ ในสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส แสดงในรูปที่ 4.15-4.18 ตามลำดับ พบว่าเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 สามารถเจริญได้ดีในทุกสภาวะอุณหภูมิ เนื่องจาก *Lactococci* เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (Mesophilic bacteria) สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส (Teuber, 2009) ที่สภาวะการเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส จะจะมีการเจริญอย่างรวดเร็ว ในช่วงเวลาที่ 6 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.061 และเริ่มพบกิจกรรมของ crude bacteriocin วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณไฮได้เท่ากับ  $11.8 \pm 0.35$  มิลลิเมตร หลังจากนั้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณไฮจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จนกระทั่งช่วงเวลาที่ 24 จะพบกิจกรรมของ crude bacteriocin มากที่สุด วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณไฮได้เท่ากับ  $13.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตรและมีค่าคงที่จนถึงช่วงเวลาที่ 36 แต่จะเริ่มมีค่าลดลงเมื่อ

เข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $10.3 \pm 0.35$  มิลลิเมตร

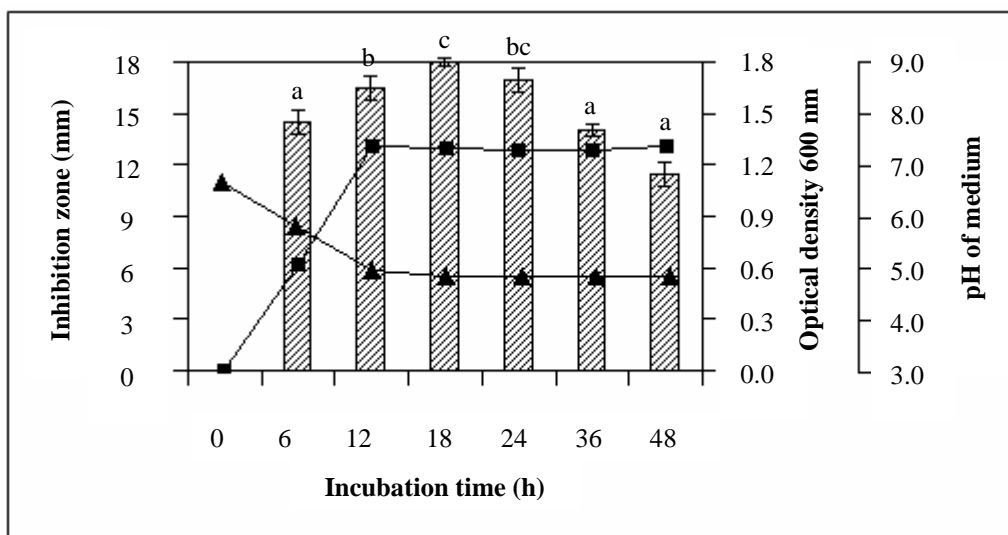
เมื่อบ่มที่อุณหภูมิเป็น 35 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อจะมีการเจริญอย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ในชั่วโมงที่ 6 มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.622 และเริ่มพบกิจกรรมของ crude bacteriocin วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $14.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร ซึ่งค่านี้จะมีค่าเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการบ่มที่เพิ่มมากขึ้น เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 18 จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสมากที่สุดเท่ากับ  $18.3 \pm 0.35$  มิลลิเมตร และเริ่มมีค่าลดลงในชั่วโมงที่ 24, 36 และ 48 มีค่าเท่ากับ  $17.0 \pm 0.71$ ,  $14.3 \pm 0.35$  และ  $13.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าในชั่วโมงที่ 6 เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็ว แต่น้อยกว่าการเจริญที่สภาวะ 30 และ 35 องศาเซลเซียส วัดค่าการดูดกลืนแสงได้เท่ากับ 0.488 และเริ่มพบกิจกรรมของ crude bacteriocin วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $11.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตรและค่านี้จะมีค่าเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการบ่ม จนถึงชั่วโมงที่ 36 จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสมากที่สุดคือ  $15.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตรและเริ่มมีค่าลดลงเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 48 เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 40 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วเหมือนกับที่สภาวะการเจริญที่ 30 องศาเซลเซียส แต่ที่สภาวะนี้จะพบกิจกรรมของ crude bacteriocin ในชั่วโมงที่ 6 เพียงแค่ครั้งเดียว วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ 8 มิลลิเมตร แม้ว่าค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายจะลดลงจาก 6.56 เป็น 4.77 ลดลงถึง 1.8 หน่วย สันนิษฐานว่าที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส อาจมีการยับยั้งกลไกในการผลิต crude bacteriocin หรืออาจมีการผลิตสารยับยั้งแต่ถูกขัดขวางในขั้นตอนการขนส่งออกนอกเซลล์ (Guerra and Pastrana, 2002) แสดงว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเป็นปัจจัยที่สำคัญมากและมีความสัมพันธ์กับการผลิตแบคทีริโอซิน (Todorov and Dicks, 2006a)

เมื่อพิจารณารูปแบบการเจริญของเชื้อ และการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส ที่แต่ละอุณหภูมิจะพบว่ามีรูปแบบการเจริญและการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่างเหมือนกัน คือ ไม่มีระยะการปรับตัวแต่จะเข้าสู่ระยะการเจริญตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึงชั่วโมงที่ 12 เห็นได้จากค่าการดูดกลืนแสงที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ดังนั้นในช่วงเวลาดังกล่าวนี้ค่าความเป็นกรด-ด่างในแต่ละอุณหภูมิจึงมีค่าลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยในชั่วโมงที่ 6 ค่าความเป็นกรด-ด่างที่อุณหภูมิ 30, 35, 37 และ 40 องศาเซลเซียส มีค่าเท่ากับ 5.32, 5.81, 5.80 และ 4.79 ตามลำดับ เมื่อเริ่มเข้าสู่ชั่วโมงที่ 18 พบว่าเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะคงที่เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจนเกือบคงที่ และค่าความเป็นกรด-ด่างมีค่าลดลงเพียงเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรูปแบบการเจริญของเชื้อ

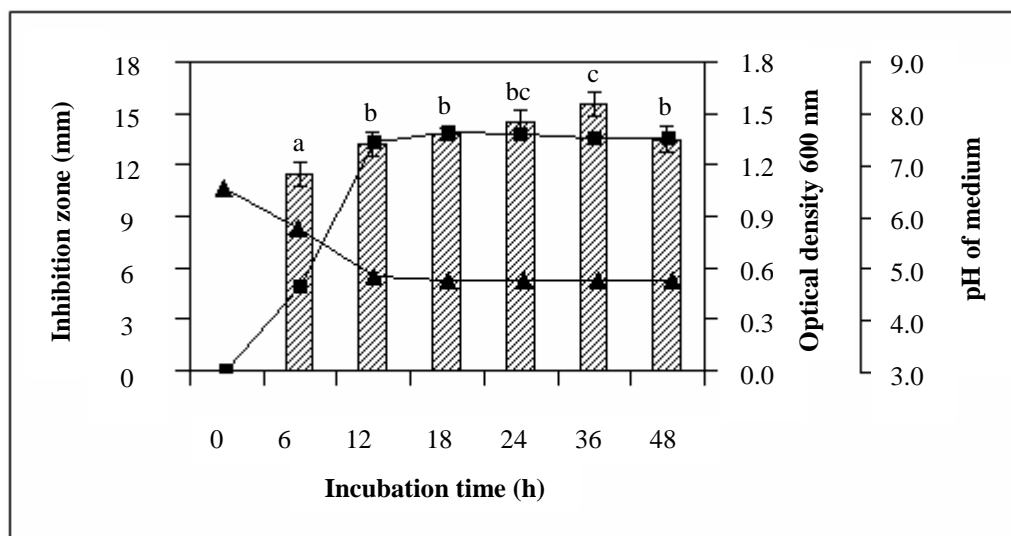




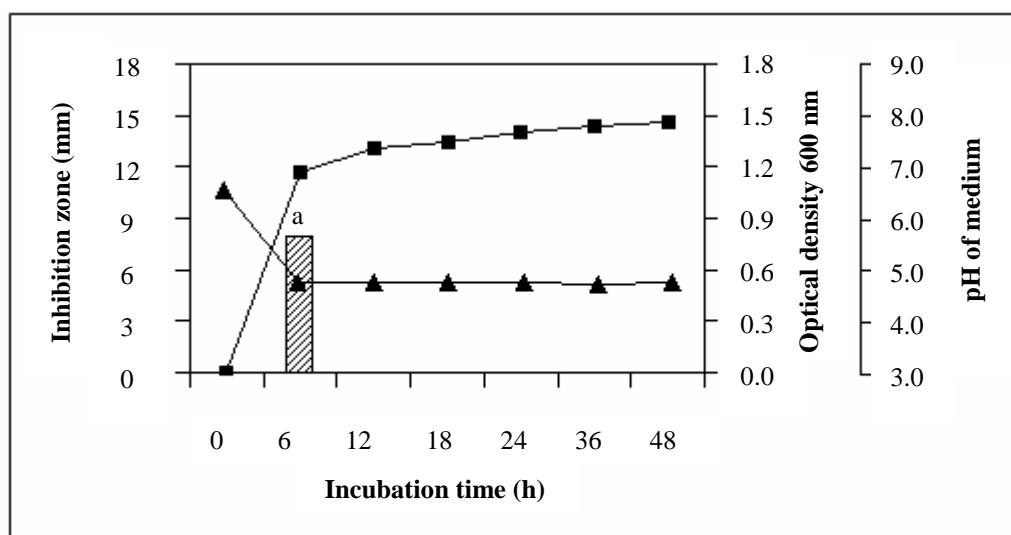
รูปที่ 4.15 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส  
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณใสการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4.16 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส  
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณใสการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4.17 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส  
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณใสการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

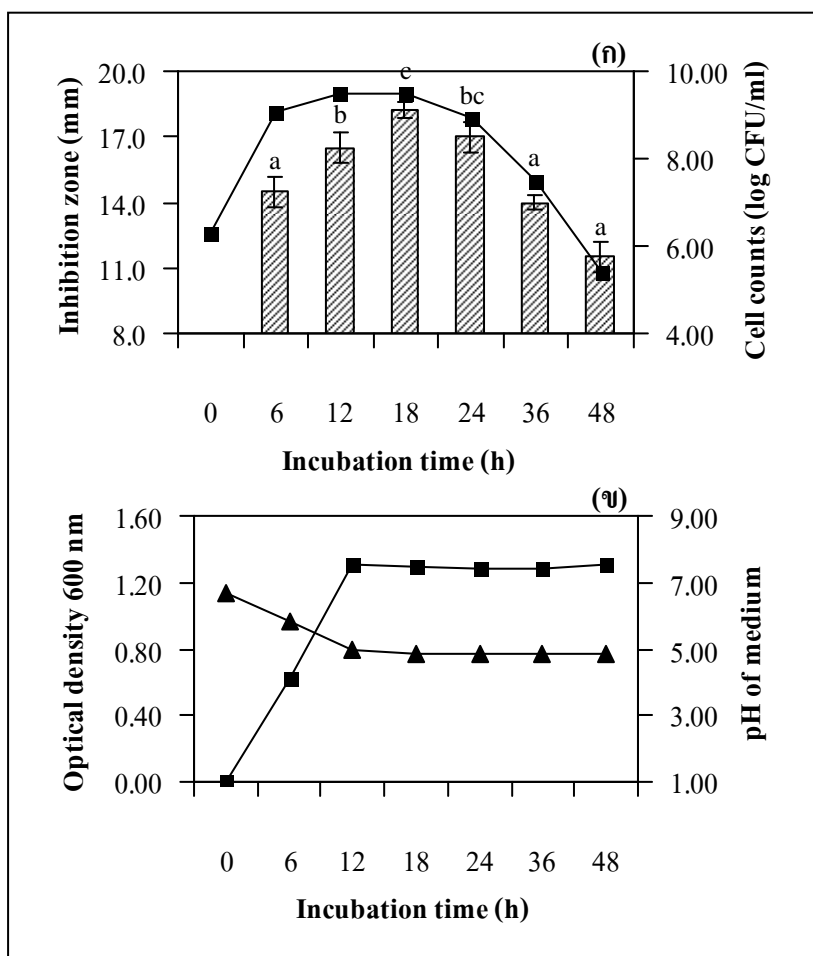


รูปที่ 4.18 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญ (-■-) ค่าความเป็นกรด-ด่าง (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส  
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณใสการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

จากการทดลองนี้พบว่าอาหารเหลว MRS ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เดิมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้มากที่สุด (รูปที่ 4.17) ดังนั้นจึงเลือกใช้สภาวะดังที่กล่าวมานี้สำหรับผลิต crude bacteriocin เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

#### 4.4.4 การศึกษาการเจริญและการผลิต crude bacteriocin ในสภาวะที่เหมาะสมโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1

จากการศึกษาการเจริญและการผลิต crude bacteriocin ของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ในอาหารเหลว MRS มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 และเดิมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยใช้ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบ ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.19 พบว่าในช่วงเวลาที่ 0-6 ชั่วโมง *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว โดยมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.26 log CFU/ml เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 6 จำนวนเชื้อเพิ่มเป็น 9.08 log CFU/ml ค่าการดูดกลืนแสงมีค่าเท่ากับ 0.622 เชื้อมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วแสดงว่าอยู่ในช่วงระยะการเจริญและค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 6.56 เป็น 5.81 พบกิจกรรมของ crude bacteriocin วัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $14.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 18 มีจำนวนเชื้อและค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยจากชั่วโมงที่ 6 เป็น 9.51 log CFU/ml และ 1.297 ตามลำดับ แสดงว่าการเจริญของเชื้ออยู่ในช่วงระยะคงที่ พบกิจกรรมของ crude bacteriocin มากที่สุด โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสได้เท่ากับ  $18.3 \pm 0.35$  มิลลิเมตร (Jamuna and Jeevaratnam, 2004) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสจะเพิ่มขึ้นตามการเจริญของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่เพิ่มมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าการสร้าง crude bacteriocin ของสายพันธุ์ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เป็นแบบที่มีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ (Growth-associated production) ซึ่งคล้ายกับกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากสายพันธุ์อื่น (Cheigh et al., 2002; Huang et al., 2009; Millette, Dupont, Archambault, and Lacroix 2007; Zamfir et al., 2000) เมื่อตรวจพบการผลิตแบคทีเรียโอซินมากที่สุด หลังจากนั้นขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสจะมีค่าลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาของการบ่ม โดยในช่วงเวลาที่ 24, 36 และ 48 จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสเท่ากับ  $17.0 \pm 0.71$ ,  $14.0 \pm 0.35$  และ  $11.5 \pm 0.71$  มิลลิเมตร ตามลำดับ สำหรับจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 18 เพียงเล็กน้อย ค่าความเป็นกรด-ด่างก็มีค่าลดลงเพียงเล็กน้อยเช่นเดียวกัน แสดงว่าเชื้อเริ่มผลิตกรดได้น้อยลง สอดคล้องกับการเจริญของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ซึ่งอยู่ในช่วงระยะคงที่



รูปที่ 4.19 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเชื้อ (log CFU/ml, -■-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) (ก); ค่าความขุ่นของเซลล์ (OD<sub>600 nm</sub>, -■-) ค่าความเป็นกรด-ด่างเปลี่ยนแปลงไป (-▲-) (ข) เมื่อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เจริญในสภาวะที่เหมาะสม  
 หมายเหตุ ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณใสการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

การที่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสมีค่าลดลงแสดงถึงการผลิต crude bacteriocin ที่น้อยลงด้วย อาจมีสาเหตุมาจากเกิดการยับยั้งจากผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End-product inhibition) เช่น ผลของกรดแล็กติกที่สะสมมีผลต่อการเจริญ เมื่อไม่มีการเจริญของเซลล์จึงมีผลต่อการหยุดการสร้าง crude bacteriocin ไปด้วย (Mataragas et al., 2003; Onda, Yanagidab, Tsuji, Shinohara, and Yokotsuka, 2003; Zamfir et al., 2000) ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ถูกปล่อยออกมาในระหว่างการไลซิสของเซลล์ (Lysis) (Cheigh et al., 2002), การตกตะกอน และการถูกดูดซับอยู่บนพื้นผิวของเชื้อซึ่งผลิตแบคทีริโอซิน (Mataragas et al., 2003) จากผลการทดลองนี้แสดงว่าการเจริญ

ของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง คือสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin มากที่สุด ส่วนใหญ่แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกมักจะเป็น primary metabolites ซึ่งผลิตมากที่สุดในช่วงต้นหรือกลางของระยะการเจริญสอดคล้องกับหลายๆการทดลองที่ผ่านมา การศึกษาในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาโดยใช้อาหารเหลว MRS ไม่ได้ศึกษาในอาหารเหลวซึ่งทำจากมะดัน (Madan juice) เพื่อให้เข้าใจถึงอิทธิพลของปัจจัยทางด้านสภาวะแวดล้อมต่อพฤติกรรมเบื้องต้นของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 และความสามารถในการผลิต crude bacteriocin ซึ่งการใช้ Madan juice จะทำให้ศึกษาผลของปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิต crude bacteriocin ได้ยากขึ้น เนื่องจากมีตัวแปรอย่างอื่น เช่น สารอาหารหรือองค์ประกอบอื่นๆ จากมะดันเข้ามาเกี่ยวข้อง (Mataragas et al., 2003)

#### 4.4.5 การวิเคราะห์หากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินด้วย Critical dilution method และ Simple parallel line model

ค่ากิจกรรมการยับยั้งของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เจริญในสภาวะที่ใช้เพื่อยืนยันผลข้อ 3.4.3.1 และในสภาวะที่เหมาะสม (อาหารเหลว MRS ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 เติมโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 2 และบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง) โดยใช้ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบ แสดงดังตารางที่ 4.8 พบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin ที่ผลิตในสภาวะที่เหมาะสม เมื่อคำนวณตามสูตรในภาคผนวก ข สมการที่ 1 มีค่าเท่ากับ 320 AU/ml ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นถึง 8 เท่าเปรียบเทียบกับการผลิตในสภาวะที่ใช้เพื่อยืนยันผล

ตารางที่ 4.8 ค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1

Samples	Dilution factor							Bacteriocin activity (AU/ml)
	2 <sup>0</sup>	2 <sup>1</sup>	2 <sup>2</sup>	2 <sup>3</sup>	2 <sup>4</sup>	2 <sup>5</sup>	2 <sup>6</sup>	
Crude bacteriocin <sup>a</sup>	+	-	-	-	-	-	-	40
Crude bacteriocin (Optimal condition)	+	+	+	+	+	-	-	320

หมายเหตุ + หมายถึง พบบริเวณใสของการยับยั้งการเจริญ

- หมายถึง ไม่พบบริเวณใสของการยับยั้งการเจริญ

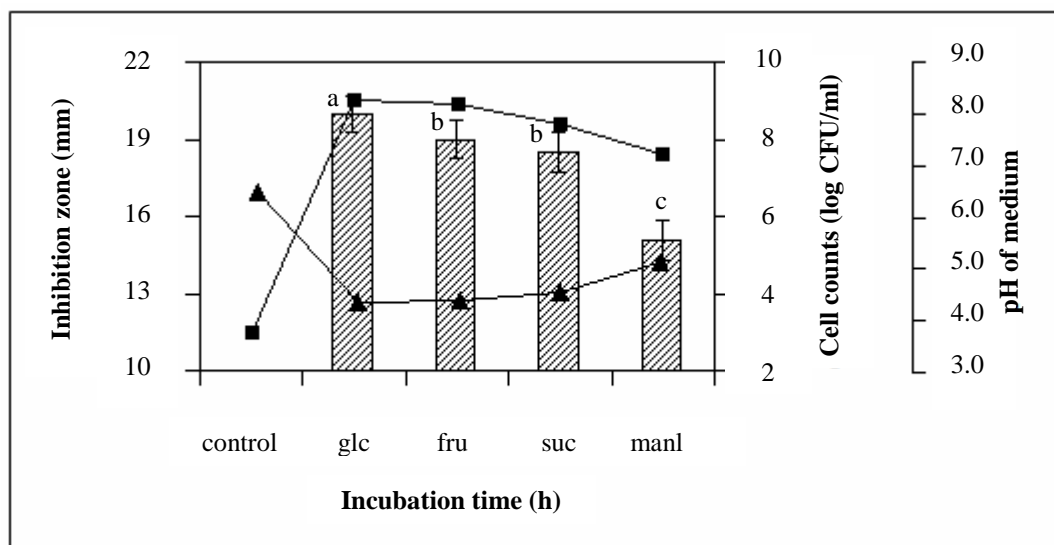
<sup>a</sup> หมายถึง ผลิต crude bacteriocin ในอาหารเหลว MRS โดยใช้สภาวะตามข้อ 3.4.3.1

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าปัจจัยทางกายภาพมีความสำคัญมาก (ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้น ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ และอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม) ต่อการผลิต crude bacteriocin ของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 แต่อย่างไรก็ตามค่ากิจกรรมการยับยั้งของ crude bacteriocin ในการทดลองครั้งนี้ อาจจะมีค่าไม่สูงมากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยที่ผ่านมาที่พบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 สามารถผลิตแบคทีริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งอยู่ในช่วง 1,200-10,240 AU/ml ซึ่งมีค่ากิจกรรมค่อนข้างสูง (Cheigh et al., 2002; Ivanova et al., 2000; Moreno, Lerayer, Baldini, and Leitão, 2000; Sharma, Garg, and Singh, 2010; Tuncer and Ozden, 2010) ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งการยับยั้งการเจริญ เช่น แหล่งที่มาของแบคทีเรียกรดแล็กติก ความไวและวิธีที่ใช้ในการทดสอบ ระดับความบริสุทธิ์ของแบคทีริโอซิน สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ สภาพการหมักและอาหารที่ใช้ในการเจริญ เป็นต้น (Sezer and Güven, 2009)

การหากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin เป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร (Arbitrary units, AU/ml) ด้วยวิธี Critical dilution ซึ่งเป็นการศึกษาเชิงกึ่งปริมาณ (Semi-quantitative) ข้อดีของวิธีนี้คือ รวดเร็วและมีค่าใช้จ่ายน้อย ช่วยลดปัญหาในเรื่องเซลล์ตกตะกอนและการรบกวนเมื่อตัวอย่างที่วิเคราะห์มีสี แต่การอ่านผลของแต่ละคนอาจจะเกิดความคลาดเคลื่อน ซึ่งเกิดขึ้นได้ตลอดการทดลอง จากข้อเสียในเรื่องนี้ Delgado et al. (2005) จึงมีการพัฒนาวิธี simple parallel line model โดยอาศัยหลักการของวิธี agar diffusion หากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin เปรียบเทียบกับไนซิน แล้วคำนวณตามสูตรในภาคผนวก ข สมการที่ 2 crude bacteriocin จะมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเท่ากับ 1.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร การวิเคราะห์การถดถอยเชิงเส้น (Linear regression) ในการทดลองครั้งนี้ พบว่าสัมประสิทธิ์การอธิบาย (Coefficient of determination,  $r^2$ ) มีค่าเท่ากับ 0.9976 ซึ่งค่านี้จะบ่งบอกถึงความแม่นยำและความสามารถในการอธิบายความแปรปรวนของพื้นที่บริเวณใสการยับยั้งการเจริญ แสดงว่าร้อยละ 99.76 ของความแปรปรวนของพื้นที่บริเวณใสการยับยั้งการเจริญสามารถอธิบายหรือทำนายได้ด้วยความเข้มข้นของ crude bacteriocin

#### 4.5 การศึกษาแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมสำหรับการผลิต crude bacteriocin โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1

เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ในอาหารพื้นฐานของ MRS ที่ปราศจากน้ำตาลเพื่อใช้เป็นชุดควบคุม ศึกษาการใช้กลูโคส ฟรุกโตส ซูโครส และแมนนิทอล ความเข้มข้นร้อยละ 2 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เป็นแหล่งคาร์บอน ดังแสดงในรูปที่ 4.20



รูปที่ 4.20 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อจำนวนเชื้อ (log CFU/ml, -■-) ค่าความเป็นกรด-ด่างที่เปลี่ยนแปลงไป (-▲-) และการผลิต crude bacteriocin (กราฟแท่ง) โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 หมายถึง ตัวอักษรที่แตกต่างกันของค่าบริเวณไฮการยับยั้ง แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

จะเห็นว่าการผลิต crude bacteriocin ยังคงมีความสัมพันธ์กับการเจริญแม้ว่าจะมีการเปลี่ยนแปลงแหล่งคาร์บอน เมื่อเชื้อมีการเจริญได้ดีก็จะสามารถผลิต crude bacteriocin ได้ดีเช่นเดียวกัน เมื่อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เจริญในอาหารเหลวพื้นฐาน MRS ที่ปราศจากแหล่งคาร์บอน พบว่าไม่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ แต่สามารถพบการเจริญของเชื้อได้ อาจเนื่องมาจากเชื้อสามารถใช้สารอาหารชนิดอื่น เช่น ยีสต์สกัด (Yeast extract) และเปปโตน (Peptone) เป็นต้น ในการเจริญได้ (Audisio, Oliver, and Apella, 2001) เมื่อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนจะสามารถเจริญได้ดีที่สุด รองลงมาคือ ฟรุกโตส ซูโครส และแมนนิทอล มีจำนวนเซลล์เท่ากับ 9.01, 8.91, 8.37 และ 7.61 log CFU/ml ตามลำดับ สาเหตุที่ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีที่สุด เนื่องจากกลูโคสมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่าน้ำตาลชนิดอื่น สามารถถูกดูดซึมนำไปใช้ประโยชน์เปลี่ยนแปลงเป็นพลังงานได้อย่างรวดเร็ว (Audisio et al., 2001) เมื่อเชื้อสามารถใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อใช้ในการเจริญได้ดีก็จะสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้มากยิ่งขึ้น มีผลทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่าลดลง ดังนั้น ค่าความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสจึงมีค่าน้อยที่สุด รองลงมา คือ ฟรุกโตส ซูโครส และแมนนิทอล จึงมีค่าเท่ากับ 4.336, 4.396, 4.569 และ 5.113 ตามลำดับ อาหารพื้นฐานที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนให้ผลการเจริญและการผลิต crude bacteriocin ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

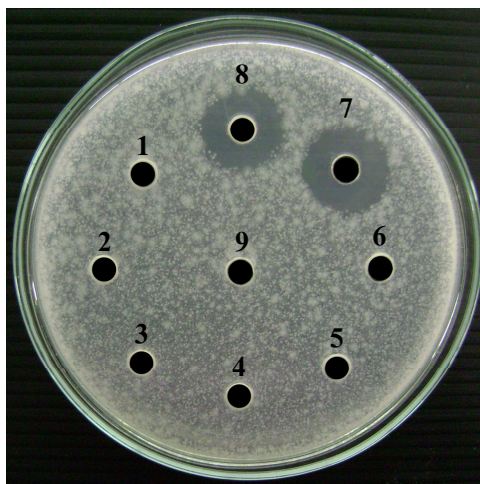
ได้มากที่สุด รองลงมาคือ ฟลูโคส ซูโครส และแมนนิทอล มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใส เท่ากับ  $20.33 \pm 2.56$ ,  $19.61 \pm 2.34$ ,  $18.50 \pm 2.92$  และ  $15.06 \pm 2.01$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p \leq 0.05$ ) เช่นเดียวกับ Todorov and Dicks (2005c) ที่พบว่าเมื่อ *Lb. pentosus* ST712BZ ใช้กลูโคสหรือแมนโนสเป็นแหล่งคาร์บอน จะสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้มากที่สุด

#### 4.6 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคเทอริโอซินแบบหยาบที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1

##### 4.6.1 การทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

จากการทดลองนำ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 มาทดสอบการทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนทั้ง 3 ชนิด คือ อัลคาเลส ปาเปน และทริปซิน มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 4.21 เมื่อทดสอบผลของสารละลายเอนไซม์ อัลคาเลส ปาเปน ทริปซิน และสารละลายบัฟเฟอร์เพียงอย่างเดียว พบว่าสารละลายทั้งหมดนี้ไม่มี ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (รูปที่ 4.21 ตำแหน่งที่ 1, 2, 3 และ 9 ตามลำดับ) สำหรับสารละลาย crude bacteriocin ที่ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์ พบว่าสามารถตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ (รูปที่ 4.21 ตำแหน่งที่ 7 และ 8) แสดงว่า สารละลายบัฟเฟอร์ไม่มีผลต่อกิจกรรมของ crude bacteriocin แต่เมื่อย่อย crude bacteriocin ด้วย เอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ละชนิด พบว่าเอนไซม์อัลคาเลส ปาเปน และทริปซิน สามารถลดค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบลงได้อย่างสมบูรณ์ (ร้อยละ 100) (รูปที่ 4.21 ตำแหน่งที่ 4, 5 และ 6 ตามลำดับ) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองของ Mitra et al. (2005), Park et al. (2003), Simova, Beshkova, and Dimitrov (2009) และ Todorov, Vaz-Velho, and Dicks (2003) ที่พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* จะสูญเสียกิจกรรมการยับยั้งการเจริญโดยสมบูรณ์เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และปาเปน เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Gong, Meng, and Wang (2010) ได้รายงานไว้ว่า plantaricin MG ซึ่งผลิตโดย *Lb. plantarum* เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลสจะมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญลดลง นอกจากนี้งานวิจัยของ Kamoun et al. (2005) ได้รายงานไว้ว่าเมื่อย่อย bacthuricin F4 ที่ผลิตโดย *Bacillus thuringiensis* ด้วยเอนไซม์อัลคาเลส bacthuricin F4 มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญลดลงอย่างสมบูรณ์ แต่มีงานวิจัยบางฉบับกล่าวว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* มีความทนต่อการย่อยด้วยทริปซิน และ/หรือปาเปน (Ivanova et al., 2000; Moreno et al., 2000; Olasupo, Schillinger, Narbad, Dodd, and Holzapfel, 1999; Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn, 2008)





รูปที่ 4.21 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1

หมายเหตุ 1, 2 และ 3 หมายถึง สารละลายเอนไซม์อัลคาเลส ปาเปน และทริปซิน ตามลำดับ

4, 5 และ 6 หมายถึง crude bacteriocin ที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์อัลคาเลส ปาเปน และทริปซิน ตามลำดับ

7 และ 8 หมายถึง สารละลาย crude bacteriocin ที่ผสมกับสารละลายบัฟเฟอร์

9 หมายถึง สารละลายบัฟเฟอร์

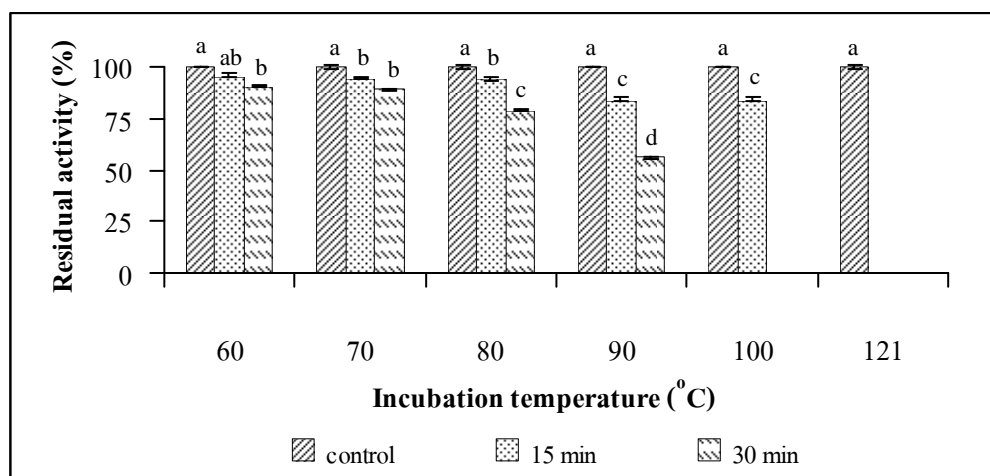
อย่างไรก็ตามมีหลายปัจจัยซึ่งมีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin เช่น การเกิดอันตรกิริยาระหว่าง crude bacteriocin กับองค์ประกอบของเซลล์หรืออาหารเลี้ยงเชื้อ ความบริสุทธิ์และความเข้มข้นของเอนไซม์ และเทคนิคที่ใช้ในการทดสอบ รวมทั้งจุลินทรีย์ที่นำมาใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ ก็มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโอซินด้วยเช่นกัน ดังที่ Ponce, Moreira, Del Valle, and Roura (2008) กล่าวว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน จะไม่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* GHA30 และ *Listeria monocytogenes* ได้ แต่กลับสามารถมีกิจกรรมยับยั้งการเจริญของ *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus* ATCC 10791 และ *E. coli* ได้ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *Lc. lactis* แต่ละสายพันธุ์จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่แตกต่างชนิดกัน (Campos, Rodríguez, Calo-Mata, Prado, and Barros-Velázquez, 2006; Lee et al., 1999; Tuncer and Ozcen, 2010; Rodríguez, González, Gaya, Nuñez, and Medina, 2000) แสดงว่าแบคทีเรียโอซินเหล่านี้จะมีลำดับของกรดอะมิโน และโครงสร้างที่แตกต่างกัน เนื่องจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ละชนิด จะมีบริเวณจำเพาะในการสลายพันธะเปปไทด์ระหว่างกรด

กรดอะมิโนแต่ละชนิดที่แตกต่างกันจากการทดลองที่ได้นี้สามารถยืนยันได้ว่าสาร crude bacteriocin ซึ่งผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 คือสารที่มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนเนื่องจากกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบของ crude bacteriocin ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้จัดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียโอซิน และการที่แบคทีเรียโอซินมีความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่พบได้ในระบบการย่อยของร่างกาย ซึ่งแสดงว่าเมื่อผสมแบคทีเรียโอซินในอาหาร จะสามารถรับประทานได้โดยไม่มีผลต่อนิเวศวิทยาของทางเดินอาหาร (Digestive tract ecology) (Harris et al., 1992) และแบคทีเรียโอซินสามารถถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ที่อยู่ในร่างกายซึ่งจะมีความปลอดภัยต่อร่างกาย ไม่ทำให้เกิดอันตรายเหมือนกับการใช้สารปฏิชีวนะ (Bromberg, Moreno, Zaganini, Delboni, and De Oliveira, 2004; Caplice and Fitzgerald 1999) เอนไซม์ทริปซินที่ใช้ในการทดลองนี้เป็นเอนไซม์ที่พบได้ในตับอ่อน แต่อย่างไรก็ตามเอนไซม์ชนิดอื่นๆ ซึ่งพบได้ในร่างกาย เช่น เอนไซม์เปปซิน โปรติเนส และไลโมทริปซิน ควรมีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการย่อย crude bacteriocin ด้วย

#### 4.6.2 การทนต่อความร้อน

ทำการศึกษาคุณสมบัติการทนความร้อนของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 นำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลาทั้ง 15 และ 30 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที กิจกรรมการยับยั้งการเจริญที่เหลืออยู่โดยใช้ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบ แสดงดังรูปที่ 4.22 พบว่าเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 70, 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และ 60, 70, 80 และ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที crude bacteriocin ยังสามารถพบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญได้ ถึงแม้ว่า crude bacteriocin ที่ผ่านการให้ความร้อนที่ระดับอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพียงระดับเดียวเท่านั้น จะยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเหลืออยู่โดยไม่มี ความแตกต่างทางสถิติจาก crude bacteriocin ซึ่งไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน ( $p>0.05$ )

อย่างไรก็ตาม crude bacteriocin ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 70 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) และยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเหลืออยู่ก่อนข้างสูงร้อยละ 95.58, 94.40 และ 93.80 ตามลำดับ ส่วน crude bacteriocin ที่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่ายังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเหลืออยู่ถึงร้อยละ 83-89 แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 15 นาที ตามลำดับ มีผลทำให้ crude bacteriocin สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งอย่างสมบูรณ์ แสดงว่า crude bacteriocin น่าจะมีคุณสมบัติในการทนความร้อนได้เพียงระดับพาสเจอร์ไรซ์เท่านั้น ไม่สามารถทนความร้อนได้ถึงระดับสเตอริไลเซชัน



รูปที่ 4.22 ผลของการให้ความร้อนต่อกิจกรรมของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1

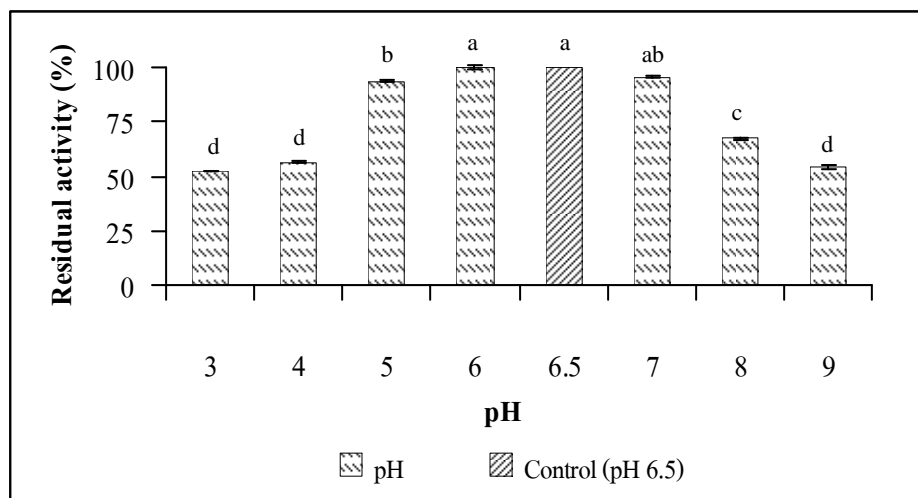
หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นสัญลักษณ์ที่แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกันที่ระดับอนุกรมต่างๆ ภายในระยะเวลาที่ให้ความร้อนเท่ากัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

คุณสมบัติในการทนความร้อนของ crude bacteriocin ถือว่ามีประโยชน์มากสำหรับผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองบางชนิด เนื่องจากในอุตสาหกรรมการทำผักและผลไม้ดองจะมีกระบวนการฆ่าเชื้อด้วยการให้ความร้อน โดยมักใช้อุณหภูมิในการฆ่าเชื้อเท่ากับ 74 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Lee, 2004) จากการศึกษาของ Jamuna and Jeevaratnam (2004) พบว่า *Lactobacillus casei* ที่คัดแยกได้จากผักดองสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่สามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และ 60 นาที โดยมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเหลืออยู่ร้อยละ 86-92 เช่นเดียวกับ Ponce et al. (2008) ที่พบว่า *Lc. lactis* ssp. *lactis* ที่คัดแยกมาจากผักขม (Spinach) สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 และ 20 นาที โดยมีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญเหลืออยู่ร้อยละ 60-80 ซึ่งแตกต่างจากการทดลองของ Noonpakdee, Santivarangkna, Jumriangrit, Sonomoto, and Panyim (2003) ที่พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lc. lactis* WNC 20 ซึ่งคัดแยกได้จากแฮม สามารถทนความร้อนได้สูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จะเห็นว่าแบคทีเรียโอซินซึ่งผลิตจากแบคทีเรียกรดแล็กติกต่างสายพันธุ์นั้นจะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแต่ละสายพันธุ์เป็นคนละชนิดกันซึ่งเป็นไปได้ว่าเชื้อต้องมีการปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมนั้นๆ จึงส่งผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินที่ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันด้วย รวมทั้งแบคทีเรียโอซิน

ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ต่างสายพันธุ์หรือคัดแยกมาจากวัตถุดิบหรือผลิตภัณฑ์ที่ต่างชนิดกัน จะมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนได้แตกต่างกันด้วย และเป็นสิ่งที่สังเกตได้ว่าแบคทีเรียโอซินที่อยู่ในสถานะที่เป็นกรด จะมีความสามารถในการทนความร้อนได้ดีกว่าอยู่ในสถานะที่เป็นกลางและที่เป็นด่าง จากงานวิจัยของ Moreno et al. (2000) พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ITAL 104 ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 2, 4 และ 6 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แต่เมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 7, 8, 10 และ 12 มีผลทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินลดลงโดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนงานวิจัยของ Noonpakdee et al. (2003) พบว่า *Lc. lactis* WNC 20 ที่คัดแยกได้จากเหวมสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่ทนต่อความร้อน ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 3.0 แต่เมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของแบคทีเรียโอซินเป็น 7.0 จะตรวจไม่พบกิจกรรมใดๆ ของแบคทีเรียโอซิน ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้ศึกษาโดยใช้ crude bacteriocin ที่ถูกปรับให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5 ไม่ได้ทำการหาความสัมพันธ์ของการทนความร้อนที่สถานะความเป็นกรด-ด่างต่างๆ อย่างไรก็ตามมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถการทนความร้อนของแบคทีเรียโอซิน พบว่าทั้งปริมาณและโครงสร้างของโมเลกุลของกรดอะมิโนมีผลต่อการทนความร้อนได้ในระดับที่แตกต่างกัน เช่น ที่พบในไดโพลคอกซิน (Diplococcin) แลคทาซินเอฟ (Lactacin F) และแลคโตซิน 27 (Lactocin 27) ที่มีปริมาณกรดอะมิโนไกลซีนเป็นจำนวนมาก และการมีโครงสร้างที่เป็นวงกลมและการมีพันธะที่แข็งแรงระหว่างกรดอะมิโนที่คุณสมบัติไม่ชอบน้ำภายในโมเลกุลดังที่พบในไนซินและแลคโตคอกซินเอ (Lactococcin A) รวมถึงการมีพันธะไดซัลไฟด์ที่เกิดจากกรดอะมิโนที่มีซัลเฟอร์ เป็นองค์ประกอบภายในโมเลกุลดังที่พบในไนซินและแลคโตซินเอส (Lactocin S) มีผลทำให้แบคทีเรียโอซินมีความสามารถในการทนต่อความร้อนได้มากขึ้น นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับปัจจัยภายนอกอีกหลายประการ เช่น ค่าความเป็นกรด-ด่างและองค์ประกอบของสารละลาย เช่น ไนซิน เป็นต้น (Liu and Hansen, 1990)

#### 4.6.3 ความคงตัวของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* สภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

ความคงตัวของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่างต่างๆ ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.23 พบว่าความเป็นกรด-ด่างมีผลต่อกิจกรรมของ crude bacteriocin ในการยับยั้งการเจริญ *B. cereus* TISTR 687 ซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (crude bacteriocin มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.5) crude bacteriocin จะมีความคงตัวสูงที่สุดในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6 และความคงตัวจะเริ่มมีค่าลดลงที่ความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำกว่า 6.0



**รูปที่ 4.23** ความคงตัวของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ภายใต้สภาวะความเป็นกรด-ด่างต่างๆ

หมายเหตุ a, b, c และ d เป็นสัญลักษณ์ที่แสดงการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย ตัวอักษรที่ต่างกัน แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )

แต่อย่างไรก็ตามกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ crude bacteriocin ภายใต้ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.0, 6.0 และ 7.0 ยังคงมีค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) นอกจากนี้ crude bacteriocin ที่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 3, 4, 8 และ 9 ยังคงสามารถพบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญได้ แต่เมื่อปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 1, 2, 10, 11, 12, 13 และ 14 ไม่สามารถตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญได้เลย ผลการทดลองที่ได้นี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Abdelbasset and Djamilia (2008) ที่พบว่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* มีความคงตัวในช่วงค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5-7 แต่พบว่ามี *Lc. lactis* บางสายพันธุ์ สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีคุณสมบัติคงตัวในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างซึ่งแตกต่างจากผลการทดลองนี้ ดังเช่นการศึกษาของ Moreno et al. (2000) ที่พบว่า *Lc. lactis* ITAL 104 และ 185 สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งมีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2-12 โดยที่ไม่มีผลต่อกิจกรรมการยับยั้งการเจริญ แต่สำหรับสายพันธุ์ ITAL 187, 403, 404 และ 438 จะทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2-8 เท่านั้น ส่วนสายพันธุ์ ITAL 383 และ 435 จะทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 2-6 เช่นเดียวกับ Millette et al. (2007) พบว่า *Lc. lactis* MM19 สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินซึ่งมีคุณสมบัติในการทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างที่ 2-10 ความสามารถในการคงตัวของ crude bacteriocin ในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่างที่แตกต่างกันนั้น แสดงว่าแบค

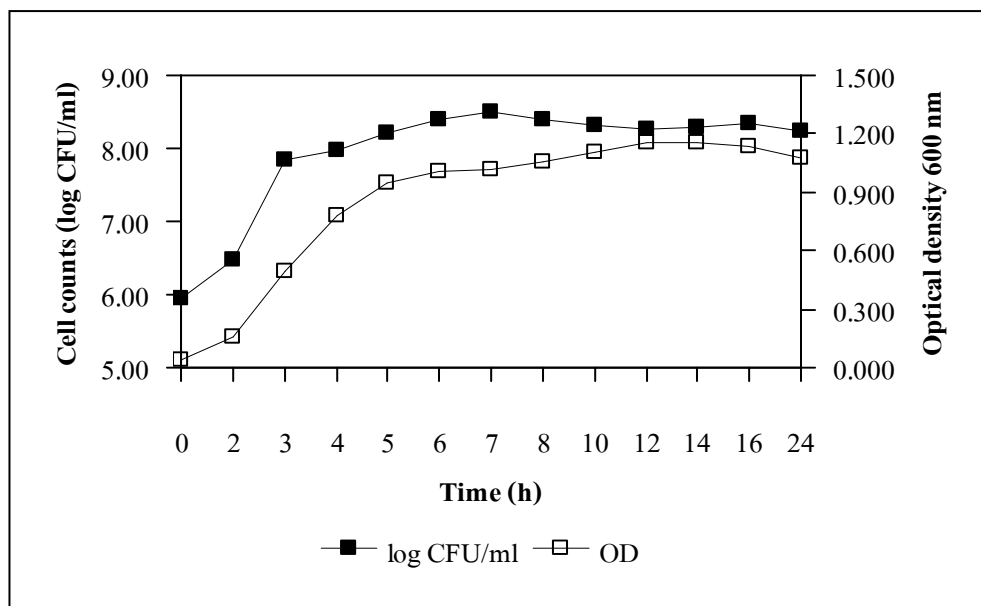
เทอริโอซินเหล่านี้ อาจมีจำนวนและชนิดของกรดอะมิโน รวมทั้งโครงสร้างของโมเลกุลที่ต่าง กัน นอกจากนี้เมื่อ crude bacteriocin อยู่ในสภาวะความเป็นกรดหรือความเป็นด่างสูงๆ อาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโมเลกุลแบบไม่สามารถกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ของ crude bacteriocin ทำให้ไม่สามารถพบกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่สภาวะดังกล่าวได้ (Liu and Hansen, 1990) การที่แบคทีเรียโอซินซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียกรดแล็กติกมักจะมี ความคงตัวที่สภาวะความเป็นกรดหรือที่สภาวะเป็นกลาง แสดงว่าสารแบคทีเรียโอซินน่าจะ สามารถทนอยู่ในสภาวะ แวดล้อมที่แบคทีเรียกรดแล็กติกได้สร้างขึ้น ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีความสำคัญมากในการที่จะใช้สารแบคทีเรียโอซินในอาหารหมักดองเพื่อการถนอมอาหาร (Ponce et al., 2008; Rodríguez et al., 2000) รวมทั้งแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน คือ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่คัดแยกจากมะดันดอง น่าจะสามารถใช้เป็นแบคทีเรียที่ใช้ผลิตสารถนอมอาหารทางชีวภาพ (Biopreservative cultures) ได้โดยตรง

#### 4.7 การศึกษาลักษณะการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินต่อเชื้อก่อโรคในอาหารที่มีต่อเชื้อ

##### *B. cereus* TISTR 687

###### 4.7.1 การศึกษาการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687

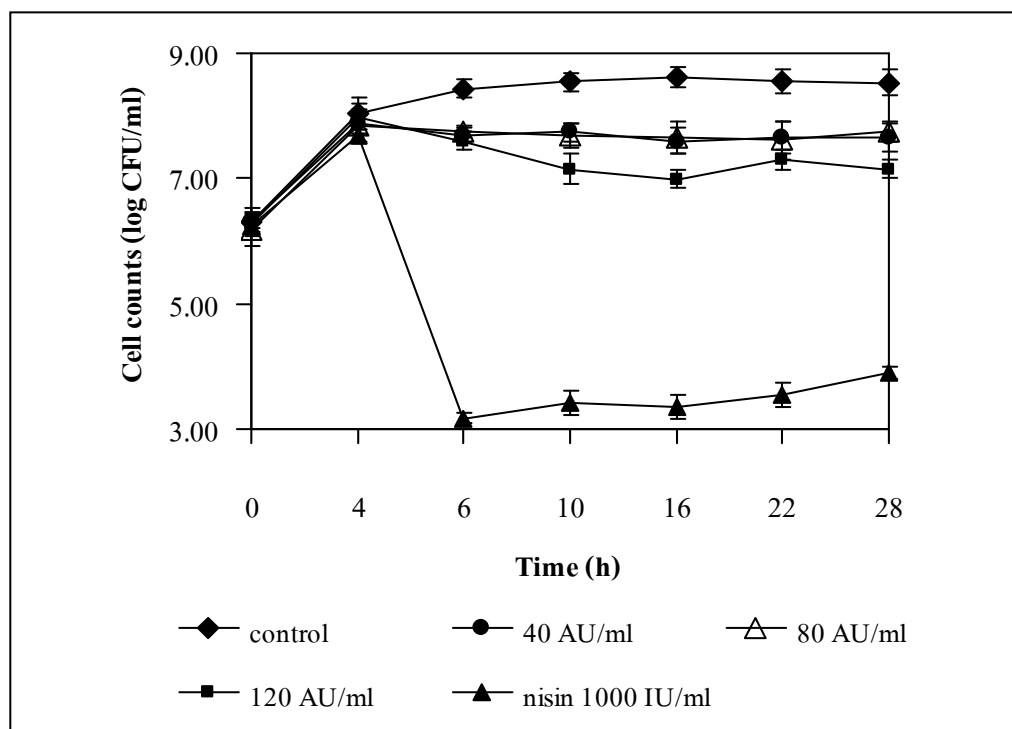
การศึกษาที่ผ่านมามีพบว่าระยะการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ มีความสำคัญสำหรับการศึกษาลักษณะการออกฤทธิ์ จากการศึกษานี้ของ Todorov and Dicks (2006b) พบว่าระยะการเจริญของแบคทีเรียทดสอบจะมีผลต่อลักษณะการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน โดยถ้าใช้เต็มแบคทีเรียโอซินลงในช่วงต้นของระยะเจริญของแบคทีเรียทดสอบ แบคทีเรียโอซินจะแสดงผลแบบการทำลายเซลล์ (Bactericidal effect) ในทางตรงกันข้ามเมื่อเติมแบคทีเรียโอซินลงในช่วงระยะคงที่แบคทีเรียโอซินจะไม่สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบได้ อาจเนื่องจากเซลล์ที่แก่กว่าจะมีความทนต่อแบคทีเรียโอซินมากกว่า ดังนั้นในการทดลองจึงศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ คือ *B. cereus* TISTR 687 ในอาหารเหลว Nutrient ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลดังแสดงในรูปที่ 4.24 *B. cereus* TISTR 687 จะมีช่วงระยะปรับตัวใน 2 ชั่วโมงแรกของการเจริญ หลังจากนั้น *B. cereus* TISTR 687 จะเข้าสู่ระยะการเจริญในชั่วโมงที่ 3 มีการเจริญอย่างรวดเร็ว และเริ่มเจริญช้าลงเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 14 ซึ่งเป็นระยะคงที่ของการเจริญ ดังนั้นจึงเลือกใช้ *B. cereus* TISTR 687 ซึ่งเจริญในชั่วโมงที่ 4 เป็นช่วงกลางของระยะการเจริญ เพื่อศึกษาลักษณะการออกฤทธิ์ของ crude bacteriocin ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1



รูปที่ 4.24 ลักษณะการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 ในอาหารเหลว Nutrient ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

#### 4.7.2 การหาการสูญเสียความสามารถในการมีชีวิตอยู่ของเซลล์

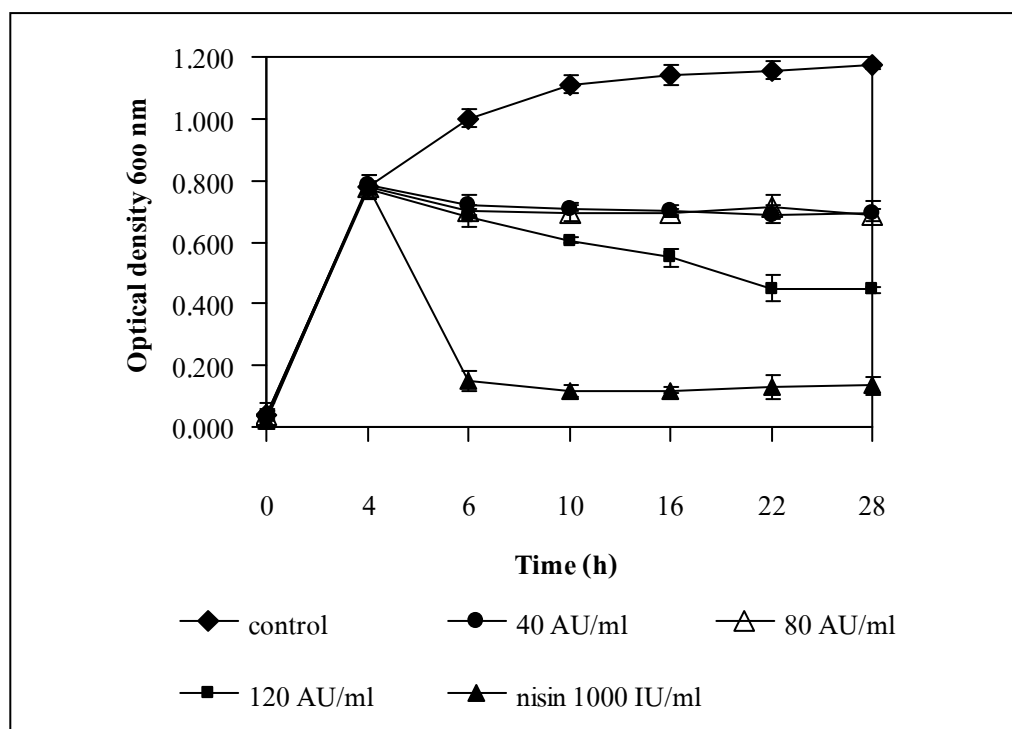
เมื่อศึกษาลักษณะการออกฤทธิ์ของ crude bacteriocin ซึ่งผลิตโดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่มีต่อเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งเติมอาหารเหลว MRS แทน crude bacteriocin ได้ผลดังรูปที่ 4.25 เมื่อเติม crude bacteriocin ความเข้มข้น 40, 80 และ 120 AU/ml ลงในช่วงกลางของระยะการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 พบว่าหลังจากเติม crude bacteriocin ความเข้มข้นสุดท้าย 40, 80 และ 120 AU/ml เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จำนวนเชื้อของ *B. cereus* TISTR 687 มีค่าเท่ากับ 7.70, 7.74 และ 7.60 log CFU/ml ตามลำดับ *B. cereus* TISTR 687 มีการเจริญได้ช้าลง เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีจำนวนเซลล์เท่ากับ 8.43 log CFU/ml อย่างไรก็ตามเมื่อเพิ่มระยะเวลาการบ่มให้นานขึ้น เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 22 พบว่าจำนวนเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 มีปริมาณเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ซึ่งอาจเป็นเพราะว่าความเข้มข้นของ crude bacteriocin อาจไม่เหมาะสมหรือเกิดการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Huang et al., 2009) จากรูปที่ 4.25 จะเห็นว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งผสมกับ crude bacteriocin ที่ความเข้มข้นต่างๆ จำนวนเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 มีปริมาณลดลงไม่มากนัก เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยเฉพาะที่ความเข้มข้นสุดท้าย 40 และ 80 AU/ml แต่ที่สภาวะความเข้มข้นสุดท้าย 120 AU/ml จำนวนเชื้อของ *B. cereus* TISTR 687 จำนวนเชื้อก่อนข้างลดลงมากกว่า 2 ความเข้มข้นแรก และในชั่วโมงที่ 16 จำนวนเชื้อจะมีค่าลดลงมากที่สุดมีค่าเท่ากับ 6.99 log CFU/ml



รูปที่ 4.25 ผลของ crude bacteriocin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อจำนวนเชื้อ (log CFU/ml) ของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและนินซิน

เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีการเติมนินซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 1,000 IU/ml พบว่าจำนวนเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 ในช่วงเวลาที่ 6 มีค่าลดลงอย่างรวดเร็วเหลือเพียง 3.17 log CFU/ml หลังจากนั้นจำนวนเซลล์จะมีค่าเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อย จากผลการทดลองดังกล่าวเปรียบเทียบกับชุดควบคุมทำให้ทราบว่า crude bacteriocin ความเข้มข้นสุดท้าย 40 และ 80 AU/ml น่าจะออกฤทธิ์แบบหยุดการเจริญของเซลล์ (Bacteriostatic effect) ซึ่งไม่พบการลดลงของจำนวนเซลล์ (รูปที่ 4.25) และค่าการดูดกลืนแสง (รูปที่ 4.26) แต่ที่ความเข้มข้นสุดท้าย 120 AU/ml น่าจะออกฤทธิ์แบบฆ่าทำลายเซลล์ (Bactericidal effect) รวมทั้งมีผลทำให้เซลล์แตก (lysis) ด้วย เนื่องจากจำนวนเซลล์ (รูปที่ 4.25) และค่าการดูดกลืนแสงมีค่าลดลง (รูปที่ 4.26) ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา Ghrairi, Frère, Berjeaud, and Manai (2005) พบว่า lactococcin MMT24 ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* จะออกฤทธิ์แบบฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตก และจากการศึกษาของ Deraz, Karlsson, Khalil, and Mattiasson (2007) พบว่า acidocin D20079 ความเข้มข้น 2,078, 128 และ 11.3 AU/ml ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20076 แบบฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตก นอกจากนี้ Lee et al. (2002) พบว่าเชื้อ *Lc. lactis* ซึ่งคัดแยกได้จากกิมจิ สามารถผลิตนินซินยับยั้งการเจริญของเชื้อ



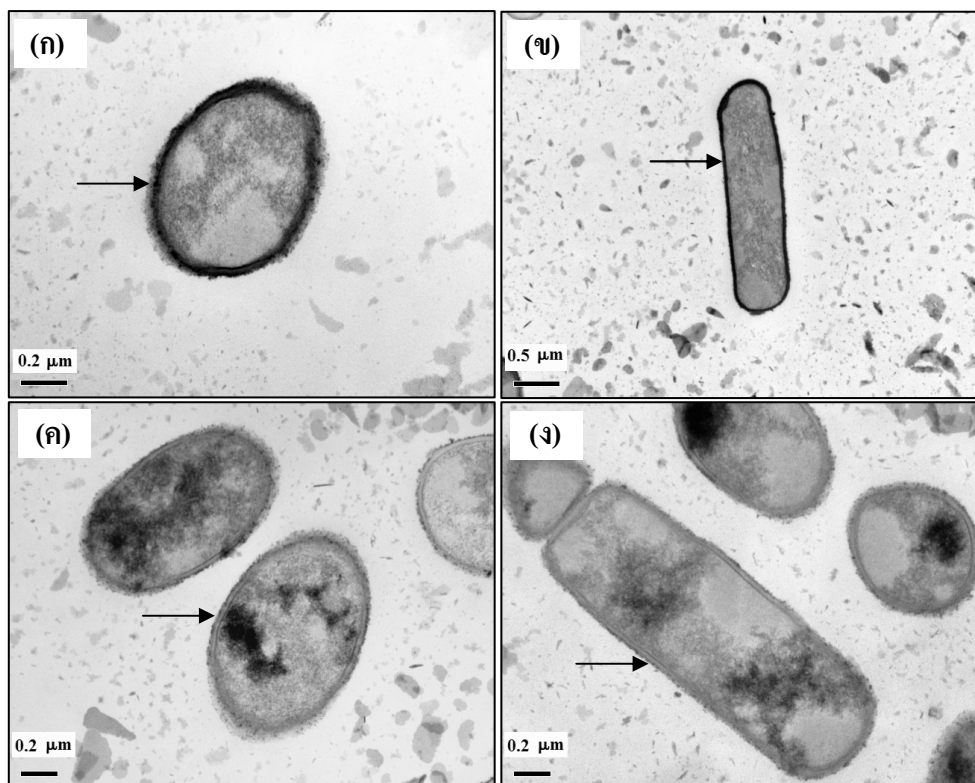


รูปที่ 4.26 ผลของ crude bacteriocin ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อค่าการดูดกลืนแสง ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) ของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและไนซิน

ผลที่ได้จากการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา Ghrairi, Frère, Berjeaud, and Manai (2005) พบว่า lactococcin MMT24 ที่ผลิตโดย *Lc. lactis* จะออกฤทธิ์แบบฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตก และจากการศึกษาของ Deraz, Karlsson, Khalil, and Mattiasson (2007) พบว่า acidocin D20079 ความเข้มข้น 2,078, 128 และ 11.3 AU/ml ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* DSM 20076 แบบฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตก นอกจากนี้ Lee et al. (2002) พบว่า *Lc. lactis* ซึ่งคัดแยกได้จากกิมจิ สามารถผลิตไนซินยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Lb. plantarum* แบบฆ่าทำลายเซลล์

#### 4.7.3 การศึกษาผลของแบคทีริโอซินต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายในเซลล์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

เมื่อศึกษาผลของ crude bacteriocin ที่มีต่อเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมและสารไนซิน พบว่าอาหารเหลว MRS ไม่มีผลต่อผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 เซลล์มีรูปร่างปกติ ผนังเซลล์หรือเยื่อหุ้มเซลล์ไม่มีการฉีกขาด (รูปที่ 4.27)

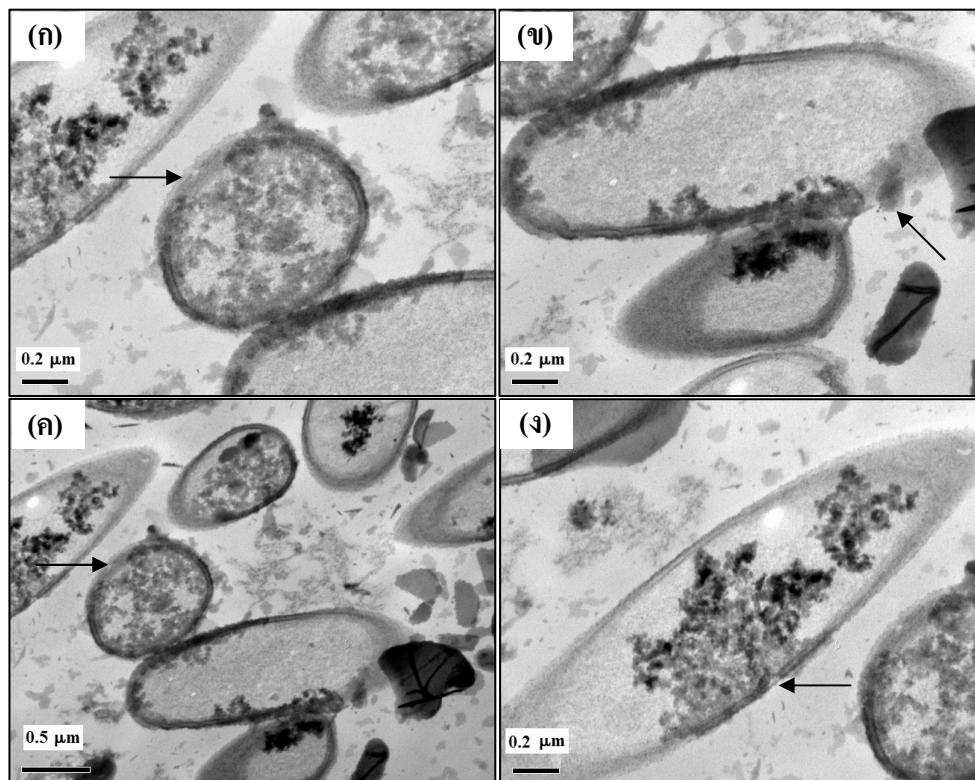


รูปที่ 4.27 โครงสร้างระดับจุลภาคที่ส่องด้วยวิธี TEM ของเซลล์ปกติ *B. cereus* TISTR 687 ซึ่งถูกตัดตามขวาง (Cross section) (ก และ ค) และที่ถูกตัดตามยาว (Longitudinal section) (ข และ ง)

หมายเหตุ ลูกศรในภาพแสดงถึงผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ปกติ

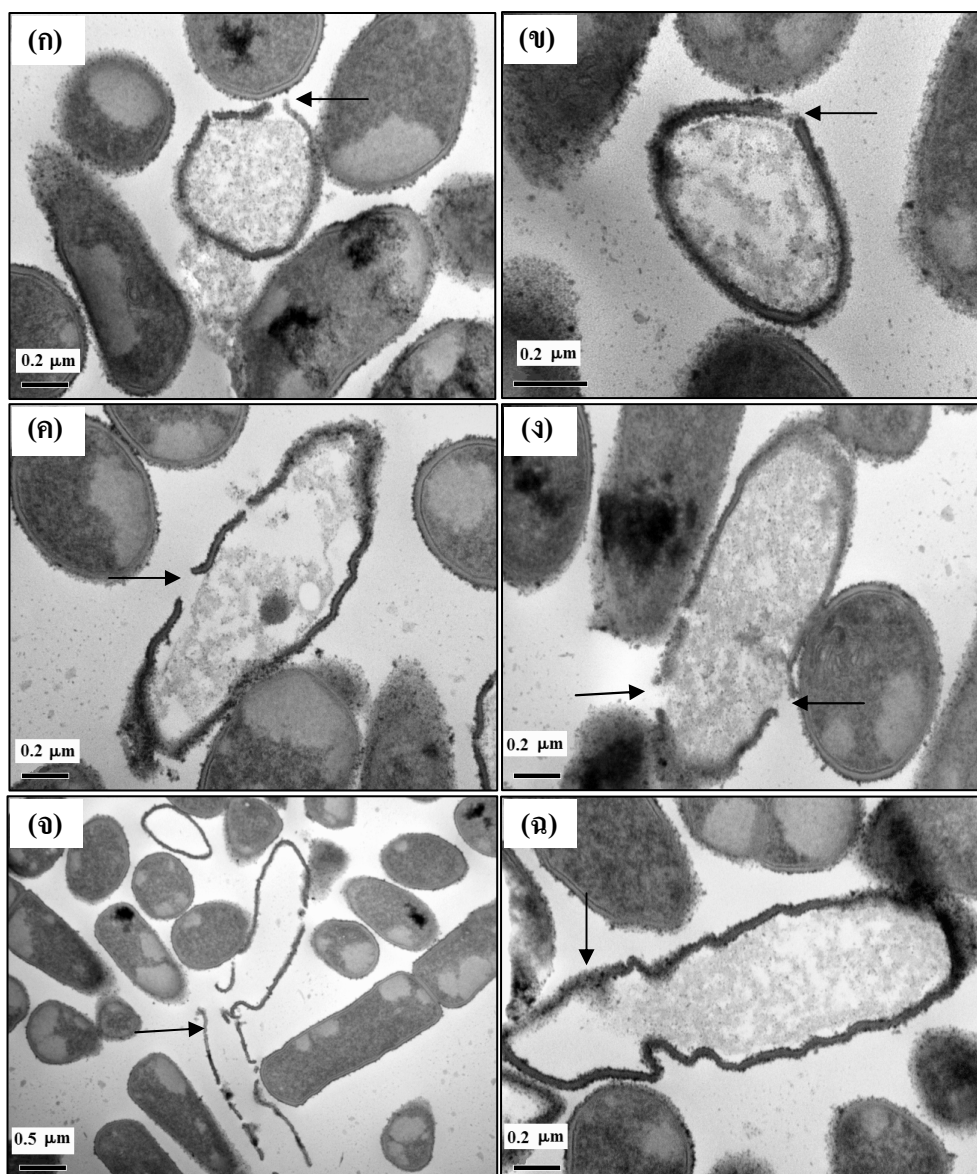
เมื่อเปรียบเทียบกับผลของการเติมไนซินและ crude bacteriocin ไนซินจะมีผลทำให้ผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 มีลักษณะผิดปกติ เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์มีผลทำให้เซลล์ตาย (รูปที่ 4.28) (Asaduzzaman et al., 2009) และเมื่อเติม crude bacteriocin เซลล์จะมีลักษณะผิดปกติ เกิดรูหรือช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ ทำให้เซลล์สูญเสียสารที่อยู่ภายในเซลล์ผ่านทางช่องที่เกิดขึ้นนี้ เซลล์ยังเกิดการแตกแยกเป็นส่วนๆ (Ocaña, de Ruiz Holgado, and Nader-Macias, 1999) ดังแสดงในรูปที่ 4.29 จากผลการทดลองนี้ช่วยสนับสนุนผลการทดลองในข้อ 4.7.1 ที่พบว่า crude bacteriocin มีลักษณะการออกฤทธิ์แบบฆ่าทำลายเซลล์และยังมีผลทำให้เซลล์แตกด้วยสอดคล้องกับงานวิจัยของ Öamanagaoglu et al. (2005) ที่รายงานว่า pediocin DT10 ที่ผลิตโดย *Pediococcus pentosaceus* DT10 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* OZ-N3 โดยมีผลทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียความสามารถ permeabilization ตามด้วยการสูญเสียสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น ไอออน การสลายตัวของศักย์ไฟฟ้าของเยื่อหุ้มเซลล์

(Membrane potential) และการหยุดการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ (Macromolecule)



รูปที่ 4.28 โครงสร้างระดับจุลภาคที่ส่องด้วยวิธี TEM ของเซลล์ *B. cereus* TISTR 687 (เติมไนซิน ความเข้มข้นสุดท้าย 1,000 IU/ml) ซึ่งถูกตัดตามขวาง (Cross section) (ก และ ค) และที่ถูกตัดตามยาว (Longitudinal section) (ข และ ง)

หมายเหตุ ลูกศรในภาพแสดงถึงผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ที่ถูกทำลาย



รูปที่ 4.29 โครงสร้างระดับจุลภาคที่ส่องด้วยวิธี TEM ของเซลล์ *B. cereus* TISTR 687 (เติม crude bacteriocin ความเข้มข้นสุดท้าย 120 AU/ml) ซึ่งถูกตัดตามขวาง (Cross section) (ก และ ค) และที่ถูกตัดตามยาว (Longitudinal section) (ข และ ง)

หมายเหตุ ลูกศรในภาพแสดงถึงผนังเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์ที่ถูกทำลาย

รวมทั้งการศึกษาของ Simmonds, Pearson, Kennedy, and Tagg (1996) ที่พบว่า *Streptococcus zooepidemicus* 4881 จะผลิต lysostaphin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *S. pyogenes* FF22 และ *S. mutans* 10449 ผนังเซลล์เกิดการฉีกขาดที่บริเวณผนังกั้นเซลล์ (Septum formation) แบคทีเรียทดสอบจะสูญเสียสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ ในทำนองเดียวกับงานวิจัยของ Andersson,

Daeschel, and Hassan (1988) พบว่า *Lb. plantarum* SIK 83 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ในจีส *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* ได้ ซึ่งผลจากภาพที่ถ่ายด้วย TEM พบว่าเกิดความเสียหายที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบ *Lb. plantarum* พร้อมทั้งสูญเสียสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยอื่นๆ ที่พบว่ามีหลายปัจจัยที่ส่งผลต่อกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน ดังเช่นการศึกษาของ Albano et al. (2007) ที่รายงานว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบมีผลต่อกลไกการออกฤทธิ์ของ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *P. acidilactici* โดยจะแสดงผลแบบการทำลายเซลล์ต่อ *Enterococcus faecium* HKLHS แต่จะแสดงผลแบบที่หยุดการเจริญของเซลล์ (Bacteriostatic effect) ต่อ *Listeria innocua* N27 สำหรับ Bendali, Gaillard-Martinie, Hebraud, and Sadoun (2008) พบว่าความเข้มข้นของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lb. paracasei* subsp. *paracasei* จะส่งผลต่อกลไกการออกฤทธิ์ ถ้าแบคทีเรียโอซินมีความเข้มข้น 20-40 AU/ml จะแสดงผลแบบที่หยุดการเจริญของเซลล์ แต่ถ้ามีความเข้มข้นมากกว่า 160 AU/ml จะแสดงผลแบบการทำลายเซลล์

## บทที่ 5

### บทสรุปและข้อเสนอแนะ

#### 5.1 บทสรุป

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากมะดันคองซึ่งเก็บตัวอย่างมาจากจังหวัดนครนายกและ นครราชสีมา จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารแข็ง MRS ผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนต ความเข้มข้น ร้อยละ 1 พบว่าคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ทั้งหมด 160 ไอโซเลท มีเพียง 18 ไอโซเลทที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 และ/หรือ *S. aureus* TISTR 118 ซึ่งเป็นแบคทีเรียทดสอบได้ แต่ทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* TISTR 780 ได้ เมื่อนำแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 18 ไอโซเลท มาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี สรีรวิทยา และความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ สามารถจัดจำแนกได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ *Lb. plantarum* 1 มีทั้งหมด 13 สายพันธุ์ สำหรับ *Lb. brevis* 1, *Lb. pentosus* และ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 พบอย่างละ 1 สายพันธุ์ และมี 2 สายพันธุ์ที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญและการผลิต crude bacteriocin โดยใช้ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีค่าเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* TISTR 687 ที่เป็นแบคทีเรียทดสอบมากที่สุด พบว่าเมื่อเจริญในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พร้อมทั้งเติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีและผลิต crude bacteriocin ได้มากที่สุด โดยการผลิต crude bacteriocin จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญของเซลล์ ค่ากิจกรรมของ crude bacteriocin ซึ่งผลิตจากสภาวะที่ใช้ในการคัดเลือกตอนเริ่มต้นและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต หาด้วยวิธี critical dilution มีค่าเท่ากับ 40 และ 320 AU/ml ตามลำดับ เมื่อใช้วิธี simple parallel line model อาศัยหลักการของ agar well diffusion และใช้สารไนซินเป็นสารมาตรฐาน เพื่อหาค่ากิจกรรมของ crude bacteriocin มีค่าเท่ากับ 1.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่มีต่อการเจริญและการผลิต crude bacteriocin โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิต พบว่าน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีที่สุดสำหรับทั้งการเจริญและการผลิต crude bacteriocin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาคือ ฟลักโตส ซูโครส และแมนนิทอล ตามลำดับ ( $p \leq 0.05$ )

*Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 สามารถผลิต crude bacteriocin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น โปรตีน ทนความร้อนได้ในระดับปานกลาง (ไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส) และมีความคงตัวดีในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5-7 กลไกการออกฤทธิ์ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ crude bacteriocin ที่ความเข้มข้น 120 AU/ml จะออกฤทธิ์แบบฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตก และผลจากการศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ด้วยกล้อง TEM พบว่า crude bacteriocin ทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 ดังนั้น *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 น่าจะสามารถนำไปประยุกต์เป็นหัวเชื้อบริสุทธ์ร่วม (Co-protective culture) ในกระบวนการทำอาหารหมักที่ปลอดภัยและช่วยลดความเสี่ยงจากจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร เช่น *B. cereus* TISTR 687 และ *S. aureus* TISTR 118 ที่อาจปนเปื้อนมากับวัตถุดิบหรือในระหว่างกระบวนการผลิต

## 5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ควรมีการศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มอื่น (Broad spectrum) ของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียให้มากกว่านี้ เพื่อให้ทราบถึงประสิทธิภาพและชนิดของจุลินทรีย์ที่ไวต่อ crude bacteriocin

5.2.2 ควรมีการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 ที่มีผลต่อคุณภาพของมะดันดอง และควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความสามารถในการหมักผลไม้ชนิดอื่นซึ่งมีปริมาณสารอาหารที่ใกล้เคียงกัน เนื่องจากในระบบการหมักอาจมีตัวแปรอื่นๆ ที่อาจส่งผลต่อการเจริญและการผลิตแบคทีเรียโอซินได้

## รายการอ้างอิง

- สำนักงานพัฒนาชุมชนจังหวัดนครนายก. (2553). รายงานการประเมินสถานการณ์พัฒนาหมู่บ้าน [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://cddweb.cdd.go.th/nakhonnayok/VDR\\_53.html](http://cddweb.cdd.go.th/nakhonnayok/VDR_53.html)
- Abdelbasset, M. and Djamila, K. (2008). Antimicrobial activity of autochthonous lactic acid bacteria isolated from Algerian traditional fermented milk “Raïb” **African Journal of Biotechnology** 7 (16): 2908-2914.
- Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology** 28: 169-185.
- Albano, H., Todorov, S. T., Van Reenen, C. A., Hogg, T., Dicks, L. M. T. and Teixeira, P. (2007). Characterization of two bacteriocins produced by *Pediococcus acidilactici* isolated from “Alheira”, a fermented sausage traditionally produced in Portugal. **International Journal of Food Microbiology** 116: 239-247.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control** 17: 454-461.
- Andersson, R. E., Daeschel, M. A. and Hassan, H. M. (1988). Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **Biochimie** 70: 381-390.
- Asaduzzaman, S. M., Nagao, J-I., Iida, H., Zendo, T., Nakayama, J. and Sonomoto, K. (2009). Nukacin ISK-1, a bacteriostatic lantibiotic. **Antimicrobial Agent and Chemotherapy**. 53 (8): 3595-3598.
- Audisio, M. C., Oliver, G. and Apella, M. C. (2001). Effect of different complex carbon sources on growth and bacteriocin synthesis of *Enterococcus faecium*. **International Journal of Food Microbiology** 63: 235-241.



- Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. In S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand (eds.). **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects** (3rd ed., pp. 1-66). New York: Marcel Dekker.
- Babalola O. O. (2007). Characterization of two isolated lactococcal strains with respect to bacteriocin concentrations. **African Journal of Food Science** 1: 5-10.
- Ballesteros, C., Palop, L. and Sánchez, I. (1999). Influence of sodium chloride concentration on the controlled lactic acid fermentation of Almagro eggplants. **International Journal of Food Microbiology** 53: 13-20.
- Barbosa-Cánovas, G. V., Fernández-Molina, J. J., Alzamora, S. M., Tapia, M. S., López-Malo, A. and Chanes, J. W. (2003). **Handling and preservation of fruits and vegetables by combined methods for rural areas**. FAO Agricultural Services Bulletin, Vol. 149. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations.
- Battcock, M. and Azam-Ali, S. (1998). **Fermented Fruits and Vegetables-A Global Perspective**. FAO Agricultural Services Bulletin, vol. 134. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations.
- Bell, C., Neaves, P. and Williams, A. P. (2005). **Food Microbiology and laboratory practice**. U.S.A.: Wiley-Blackwell.
- Bendali, F., Gaillard-Martinie, B., Hebraud, M. and Sadoun, D. (2008). Kinetic of production and mode of action of the *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* anti-listerial bacteriocin, an Algerian isolate. **Food Science and Technology** 41: 1784-1792.
- Björkroth, J., Dicks, L. M. T. and Holzapfel, W. H. (2009). Genus III. *Weissella*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed., pp. 643-654). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C. L., Delboni, R. R. and De Oliveira, J. (2004). Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. **Brazilian Journal of Microbiology** 35: 137-144.
- Cai, Y., Ng, L-K. and Farber, J. M. (1997). Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. **Journal of Applied Microbiology** 83: 499-507.

- Campos, C. A., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barros-Velázquez, J. (2006). Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). **Food Research International** 39: 356-364.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology** 50: 131-149.
- Cheigh, C-I., Choi, H-J., Park, H., Kim, S-B., Kook, M-C., Kim, T-S., Hwang, J-K. and Pyun, Y-R. (2002). Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from kimchi. **Journal of Biotechnology** 95: 225-235.
- Chen, Y-S., Wu, H-C. and Yanagida, F. (2010). Isolation and characteristics of lactic acid bacteria isolated from ripe mulberries in Taiwan. **Brazilian Journal of Microbiology** 41: 916-921.
- Chin, H-S., Breidt, F., Fleming, H. P., Shin, W-C. and Yoon, S-S. (2006). Identifications of predominant bacterial isolates from the fermenting kimchi using ITS-PCR and partial 16S rDNA sequence analyses. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 16: 68-76.
- Choi, H-J., Cheigh, C-I., Kim, S-B. and Pyun, Y-R. (2000). Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. **Journal of Applied Microbiology** 88: 563-571.
- Cintas, L. M., Casaus, M. P., Herranz, C., Nes, I. F. and Hernandez, P. E. (2001). Review: bacteriocins of lactic acid bacteria. **Food Science and Technology International** 7 (4): 281-305.
- Collins, M. D. (2009). Genus IV. *Vagococcus*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed., pp. 616-623). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Deegan, L. H., Cotter, P. D., Hill, C. and Ross, P. (2004). Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal** 16: 1058-1071.
- Delgado, A., Brito, B., Fevereiro, P., Tenreiro, R. and Peres, C. (2005). Bioactivity quantification of crude bacteriocin solutions. **Journal of Microbiological Methods** 62: 121-124.

- Delgado, A., López, F. N. A., Brito, D., Peres, C., Fevereiro, P. and Garrido-Fernández, A. (2007). Optimum bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* 17.2b requires absence of NaCl and apparently follows a mixed metabolite kinetics. **Journal of Biotechnology** 130: 193-201.
- Dellagio, F. L., Dicks, M. T. and Torriani, S. (1995). The genus *Leuconostoc*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria** (2nd ed., pp. 235-278). U.K.: Chapman & Hall.
- Delves-Broughton, J. (2005). Nisin as a food preservative. **Food Australia** 57 (12): 525-527.
- Deraz, S. F., Karlsson, E. N., Khalil, A. A. and Mattiasson, B. (2007). Mode of action of acidocin D20079, a bacteriocin produced by the potential probiotic strain, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 34:373-379.
- De Vos, P., Garrity, G. M., Jones, D., Krieg, N. R., Ludwig, W., Rainey, F. A. , Schleifer, K-H. and Whitman W. B. (2009). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed.) New York: Springer.
- Devriese, L. S. and Pot, B. (1995). The genus *Enterococcus*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria** (2nd ed., pp. 327-367). U.K.: Chapman & Hall.
- De Vuyst, L. (1994) Nisin production variability between natural *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains. **Biotechnology Letters** 16: 287-292.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. (1993). Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations using a complex medium. **Applied Microbiology and Biotechnology** 40: 17-22.
- Dewan, S. and Tamang, J. P. (2007). Dominant lactic acid bacteria and their technological properties isolated from the Himalayan ethnic fermented milk products. **Antonie van Leeuwenhoek** 92: 343-352.
- Dicks, L. M. T. and Holzapfel, W. H. (2009). Genus II. *Oenococcus*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed., pp. 635-642). Baltimore: Williams & Wilkins.

- Dicks, L. M. T., Holzapfel, W. H., Satomi, M., Kimura, B. and Fujii, T. (2009). Genus III. *Tetragenococcus*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed., pp. 611-615). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Diop, M. B., Dubois-Dauphin, R., Tine, E., Ngom, A., Destain, J. and Thonart, P. (2007). Bacteriocin producers from traditional food products. **Biotechnology Agronomy Society and Environment** 11 (4): 275-281.
- Flores-Gutiérrez, A. A. (2000). **Manejo Postcosecha de Frutasy Hortalizasen Venezuela. Experienciasy Recomendaciones**. (2nd ed., pp. 86-102). Venezuela: UNELLEZ, San Carlos, Cojedes. Quoted in G. V. Barbosa-Cánovas, J. J. Fernández-Molina, S. M. Alzamora, M. S. Tapia, A. López-Maloand and J. W. Chanes (2003). **Handling and preservation of fruits and vegetables by combined methods for rural areas**. FAO Agricultural Services Bulletin, vol. 149. Rome: Food and Agriculture Organization of United Nations.
- Franz, C. M. A. P., Du Toit, M., Holy, A. von., Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. (1997). Production of nisin-like bacteriocins by *Lactococcus lactis* strains isolated from vegetables. **Journal of Basic Microbiology** 37 (3): 187-196.
- Fuller, R. (1989). Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology** 66: 365-378.
- Ghraiiri, T., Frère, J., Berjeaud, J. M. and Manai, M. (2005). Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from *rigouta* cheese. **International Journal of Food Microbiology** 105 (3): 389-398.
- Gong, H. S., Meng, X. C. and Wang, H. (2010). Plantaricin MG active against Gram-negative bacteria produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 isolated from “Jiaoke”, a traditional fermented cream from China. **Food Control** 21: 89-96.
- Guerra, N. P. and Pastrana, L. (2002). Modelling the influence of pH on the kinetics of both nisin and pediocin production and characterization of their functional properties. **Process Biochemistry** 37: 1005-1015.
- Hammes, W. P. and Hertel, C. (2009a). Genus I. *Carnobacterium*. In P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K-H. Schleifer and W. B. Whitman (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2**. New York: Springer

- Hammes, W. P. and Hertel, C. (2009b). Genus I. *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212AL. In P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K-H. Schleifer and W. B. Whitman (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed., pp. 464-511). New York: Springer.
- Hammes, W. P. and Vogel, R. F. (1995). The genus *Lactobacillus*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria** (2nd ed., pp. 19-54). U.K.: Chapman & Hall.
- Hansen, E. B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. **International Journal of Food Microbiology** 78: 119-131.
- Hardie, J. M. and Whiley, R. A. (1995). The genus *Streptococcus*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria** (2nd ed., pp. 55-124). U.K.: Chapman & Hall.
- Harrigan, W. F. and McCance, M. E. (1976). **Laboratory Methods in Food and Dairy Microbiology**. New York: Academic Press
- Harris, L. J., Fleming, H. Y. and Klaenhammer, T. R. (1992). Characterization of two nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* strains isolated from a commercial sauerkraut fermentation. **Applied and Environmental Microbiology** 58 (5): 1477-1483.
- Heo, S., Lee, S-K., Lee, C-H., Min S-G., Park, J-S. and Kim, H-Y. (2007). Morphological changes induced in *Listeria monocytogenes* V7 by a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici*. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 17 (4): 663-667.
- Hoffmann, A., Pag, U., Wiedemann, I. and Sahl, H-G. (2001). Combination of antibiotic mechanisms in lantibiotics. **Il Farmaco** 57: 685-691.
- Holzapfel, W. H., Franz, C. M. A. P., Ludwig, W. and Dicks, L. M. T. (2009). Genus III. *Pediococcus* Claussen 1903, 68<sup>AL</sup>. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed., pp. 513-532). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Huang, Y., Luo, Y., Zhai, Z., Zhang, H., Yang, C., Tian, H., Li, Z., Feng, J., Liu, H. and Hao, Y. (2009). Characterization and application of an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* 05-10 isolated from Sichuan pickle, a traditionally fermented vegetable product from China. **Food Control** 20: 1030-1035.

- 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: Fundamentals and Applications** 41 (6): 47-53.
- Jack, R. W., Tagg, J. R. and Ray, B. (1995). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews** 59 (2): 171-200.
- Jamuna, M. and Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. **Journal of General and Applied Microbiology** 50: 79-90.
- Jay, J. M. (1982). Antimicrobial properties of diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology** 44 (3): 525-532.
- Jeevaratnam, K. Jamuna, M. and Bawa, A. S. (2005). Biological preservation of foods- Bacteriocins of lactic acid bacteria. **Indian Journal of Biotechnology** 4: 446-454.
- Kacem, M., Halima, Z-K. and Karam, N-E. (2004). Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermentation of green Algerian olives. **Grasas y Aceites** 55 (4): 385-393.
- Kacem, M., Halima, Z-K. and Karam, N-E. (2005). Isolation of lactic acid bacteria from naturally fermented Algerian olives. **Journal of King Saud University** 18 (2): 89-98.
- Kacem, M. and Karem, N-E. (2006). Microbiological study of naturally fermented Algerian green olives: isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts along with the effects of brine solutions obtained at the end of olive fermentation on *Lactobacillus plantarum* growth. **Grasas y Aceites** 57 (3): 292-300
- Kamoun, F., Mejdoub, H., Aouissaoui, H., Reinbolt, J., Hammami, A. and Jaoua, S. (2005). Purification, amino acid sequence and characterization of bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. **Journal of Applied Microbiology** 98: 881-888.
- Karovičová and Kohajdová. (2003). Lactic acid fermented vegetable juices. **Horticultural Science** 30 (4): 152-158.
- Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, M., Okamoto, T. and Ohmomo, S. (2004). Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. **Japan Agricultural Research Quarterly** 38 (2): 111-117.

- Klaenhammer, T. R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews** 12: 39-86.
- Leal-Sánchez, M V., Jiménez-Díaz, R., Maldonado-Barragán, A., Garrido-Fernández, A. and Ruiz-Barba, J. L. (2002). Optimization of bacteriocin production by batch fermentation of *Lactobacillus plantarum* LPCO10. **Applied and Environmental Microbiology** 68 (9): 4465-4471.
- Lee, H-J., Joo, Y-J., Park, C-S., Kim, S-H., Hwang, I-K., Ahn, J-S. and Mheen, T-I. (1999). Purification and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 isolated from Kimchi. **Journal of Bioscience and Bioengineering** 88 (2): 153-159.
- Lee, J-Y., Kim, C-J. and Kunz, B. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolated from Kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. **Meat Science** 72: 437-445.
- Lee, K-H., Moon, G-S., An J-Y., Lee, H-J., Chang, H. C., Chung, D. K., Lee, J-H. and Kim, J. H. (2002). Isolation of a nisin-producing *Lactococcus lactis* strain from Kimchi and characterization of its *nisZ* gene. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 12 (3): 389-397.
- Lee, S-Y. (2004). Microbial safety of pickled fruits and vegetables and hurdle technology. **Internet Journal of Food Safety** 4: 21-32.
- Leistner, L. (2000). Basic aspects of food preservation by hurdle technology. **International Journal of Food Microbiology** 55: 181-186.
- Lim, S. M. (2010). Cultural conditions and nutritional components affecting the growth and bacteriocin production of *Lactobacillus plantarum* KC21. **Food Science and Biotechnology** 19 (3): 793-802.
- Lim, S-M. and Im, D-S. (2009). Screening and characterization of probiotic lactic acid bacteria isolated from Korean fermented foods. **Journal of Microbiology and Biotechnology** 19 (2): 178-186.
- Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Reviews** 87: 149-164.

- Liu, W. and Hansen, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology** 56: 2551-2558.
- Mäki, M. (2004). Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. In S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand (eds.). **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects** (3rd ed., pp. 419-430). New York: Marcel Dekker.
- Mall, P., Mohanty, B. K., Patankar, D. B., Mody, R. and Tunga, R. (2010). Physicochemical parameters optimization for enhanced nisin production by *Lactococcus lactis* (MTCC 440). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 53: 203-209.
- Mandal, V., Sen, S. K. and Mandal, N. C. (2008). Optimized culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactili* LAB 5 and its characterization. **Indian Journal Biochemistry Biophysics** 45: 106-110.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., Tsakalidou, E. T and Metaxopoulos, J. (2004). Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Antonie van Leeuwenhoek** 85: 191-198.
- Mataragasa, M., Metaxopoulou, J., Galiotoub, M. and Drosinos, E. H. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science** 64: 265-271.
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K. and Ishikazi, A. (1996). Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. **Applied Microbiology and Biotechnology** 45: 36-40.
- Millette, M., Dupont, C., Archambault, D. and Lacroix, M. (2006). Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. **Journal of Applied Microbiology** 102: 274-282.
- Mitra, S., Chakrabarty, P. K. and Biswas, S. R. (2010). Potential production and preservation of dahi by *Lactococcus lactis* W8, a nisin-producing strain. **Food Science and Technology** 43: 337-342.
- Moreno, I., Lerayer, A. L. S., Baldini, V. L. S. and Leitão, M. F. F. (2000). Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology** 31:184-192.



- Liu, W. and Hansen, J. N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. **Applied and Environmental Microbiology** 56: 2551-2558.
- Mäki, M. (2004). Lactic acid bacteria in vegetable fermentations. In S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand (eds.). **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects** (3rd ed., pp. 419-430). New York: Marcel Dekker.
- Mall, P., Mohanty, B. K., Patankar, D. B., Mody, R. and Tunga, R. (2010). Physiochemical parameters optimization for enhanced nisin production by *Lactococcus lactis* (MTCC 440). **Brazilian Archives of Biology and Technology** 53: 203-209.
- Mandal, V., Sen, S. K. and Mandal, N. C. (2008). Optimized culture conditions for bacteriocin production by *Pediococcus acidilactili* LAB 5 and its characterization. **Indian Journal Biochemistry Biophysics** 45: 106-110.
- Mataragas, M., Drosinos, E. H., Tsakalidou, E. T and Metaxopoulos, J. (2004). Influence of nutrients on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Antonie van Leeuwenhoek** 85: 191-198.
- Mataragasa, M., Metaxopouloa, J., Galiotoub, M. and Drosinosa, E. H. (2003). Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* L124 and *Lactobacillus curvatus* L442. **Meat Science** 64: 265-271.
- Matsusaki, H., Endo, N., Sonomoto, K. and Ishikazi, A. (1996). Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. **Applied Microbiology and Biotechnology** 45: 36-40.
- Millette, M., Dupont, C., Archambault, D. and Lacroix, M. (2006). Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococcus acidilactici* isolates. **Journal of Applied Microbiology** 102: 274-282.
- Mitra, S., Chakrabartty, P. K. and Biswas, S. R. (2010). Potential production and preservation of dahi by *Lactococcus lactis* W8, a nisin-producing strain. **Food Science and Technology** 43: 337-342.
- Moreno, I., Lerayer, A. L. S., Baldini, V. L. S. and Leitão, M. F. F. (2000). Characterization of bacteriocins produced by *Lactococcus lactis* strains. **Brazilian Journal of Microbiology** 31:184-192.

- Narender, R. B., Ravi, P., Sunder, A. S. and Mallikarjun, V. (2010). Isolation and characterization of bacteriocins from fermented foods and probiotics. **International Journal of Pharma and Bio Sciences** 1 (3): 1-6.
- 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. **International Journal of Food Microbiology** 81: 137-145.
- Öamanagaoglu, O., Kiran, F. and Gül, N. (2005). Effect of pediocin DT10 on *Leuconostoc mesenteroides* Z-N3 cells. **Journal of Food Safety** 25: 303-317.
- Ocaña, V. S., de Ruiz Holgado A. A. P. and Nader-Macías, M. E. (1999). Characterization of a bacteriocin-like substance produced by a vaginal *Lactobacillus salivarius* strain. **Applied and Environmental Microbiology** 65 (12): 5631-5635.
- Ogunbanwo, S. T., Sanni, A. I. and Onilude, A. A. (2003). Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin *Lactobacillus brevis* OG1. **African Journal of Biotechnology** 2 (7): 179-184.
- Olasupo, N. A., Schillinger, U., Narbad, A., Dodd, H. and Holzappel, W. H. (1999). Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from *wara*, a traditional Nigerian cheese product. **International Journal of Food Microbiology** 53: 141-152.
- Onda, T., Yanagida, 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. **International Journal of Food Microbiology** 87: 153-159.
- Östling, C. E., Lindgren, S. E. (1993). Inhibition of enterobacteria and listeria growth by lactic, acetic and formic acids. **Journal of Applied Bacteriology** 75: 18-24.
- O'Sullivan, L., Ross, R. P. and Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. **Biochimie**. 84: 593-604.
- Ouwehand, A. C. and Vesterlund, S. (2004). Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand (eds.). **Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects** (3rd ed., pp. 375-396). New York: Marcel Dekker.
- Ozdemir, M. (1997). **Table olive fermentation** [On-line]. Available: [http://www.okyanusbilgiambari.com /Bilimsel.Makale/Okyanus-OliveFermentation](http://www.okyanusbilgiambari.com/Bilimsel.Makale/Okyanus-OliveFermentation)

- Parada, J. L., Caron, C. R., Medeiros, A. B. P. and Soccol, C. R. (2007). Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50 (3): 521-542.
- Parente, E. and Ricciardi, A. (1991). Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology** 52: 628-638.
- Park, S-H., 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 Microbiology** 46: 385-388.
- Ponce, A. G., Moreira, M. R., Del Valle, C. E. and Roura, S. I. (2008). Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. **Food Science and Technology** 41: 432-441.
- Sakala, R. M., Hayashidani, H., Kato, Y., Hirata, T., Makino, Y. Fukushima, A., Yamada, T., Kaneuchi, C. and Ogawa, M. (2002). Change in the composition of the microflora on vacuum-packaged beef during chiller storage. **International Journal of Food Microbiology** 74: 87-99.
- Sánchez, I., Palop, L. and Ballesteros, C. (2000). Biochemical characterization of lactic acid bacteria isolated from spontaneous fermentation of 'Almagro' eggplants. **International Journal of Food Microbiology** 59: 9-17.
- Sarika, A. R., Lipton A. P. and Aishwarya, M. S. (2010). Bacteriocin production by a new isolate of *Lactobacillus rhamnosus* GP1 under different culture conditions. **Advance Journal of Food Science and Technology** 2 (5): 291-297.
- Schillinger, U. and Holzapfel, W. H. (1995). The genus *Carnobacterium*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria** (2nd ed., pp. 307-326). U.K.: Chapman & Hall.
- Settanni, L. and Corsetti, A. (2008). Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **International Journal of Food Microbiology** 121: 123-138.
- Sezer, Ç. and Güven, A. (2009). Investigation of bacteriocin production capability of lactic acid bacteria isolated from foods. **Kafkas Üniversitesi Veteriner Fakültesi Dergisi** 15: 45-50.

- Sharma, S., Gang, A. P. and Singh, G. (2010). Optimization of fermentation conditions for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* CCSULAC1 on modified MRS medium. **International Journal of Dairy Science** 5: 1-9.
- Sharpe, M. E. (1979). Identification of lactic acid bacteria. In F. A. Skinner and D. W. Lovelock (eds). **Identification method for microbiologists** (pp. 233-235). New York: Academic press.
- Shitandi, A., Alfred, M. and Symon, M. (2007). Probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from local fermented *Amaranthus hybridus* and *Solanum nigrum*. **African Crop Science Conference Proceedings** 8: 1890-1812.
- Simmonds, R. S., Pearson, L., Kennedy, R. C. and Tagg, J. R. (1996). Mode of action of a lysostaphin-like bacteriolytic agent produced by *Streptococcus zooepidemicus* 4881. **Applied and Environmental Microbiology** 62 (12): 4536-4541.
- Simova, E. D., Beshkova, D. B. and Dimitrov, Zh. P. (2009). Characterization and antimicrobial spectrum of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from traditional Bulgarian dairy products. **Journal of Applied Microbiology** 106: 692-701.
- Simpson, W. J. and Taguchi, H. (1995). The genus *Pediococcus* with notes on the genera *Tetratogenococcus* and *Aerococcus*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria** (2nd ed., pp. 125-172). U.K.: Chapman & Hall.
- Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K. (2002). Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health. **Pakistan Journal of Nutrition** 1: 20-24.
- Stanton, C., Gardiner, G., Meehan, H., Collins, K., Fitzgerald, G., Lynch, P. B. and Ross, R. P. (2001). Market potential for probiotics. **American Journal of Clinical Nutrition** 73: 476-483.
- 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. **Applied and Environmental Microbiology** 57: 3613-3615.
- Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy: a review. **International Journal of Food Microbiology** 36: 1-29.

- Subhadrabandhu S. (2001). **Under-utilized tropical fruits of Thailand**. Bangkok: Regional Office for Asia and the Pacific Publication.
- Švec, P. and Devriese, L. A. (2009). Genus I. *Enterococcus* (ex Thiercelin and Jouhaud 1903). In P. De Vos, G. M. Garrity, D. Jones, N. R. Krieg, W. Ludwig, F. A. Rainey, K-H. Schleifer and W. B. Whitman (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed., pp. 594-607). New York: Springer.
- Tagg, J. R., Dajani A. S. and Wannamaker, L. W. (1976). Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriological Reviews** 40: 722-756.
- Tamang, B., Tamang, J. P., Schillinger, U., Franz, C. M. A. P., Gores, M. and Holzapfel, W. H. (2008). Phenotypic and genotypic identification of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented bamboo tender shoots of North East India. **International Journal of Food Microbiology** 121: 35-40.
- Tanganurat, W., Quinquis, B., Leelawatcharamas, V. and Bolotin, A. (2009). Genotypic and phenotypic characterization of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Thai fermented fruits and vegetables. **Journal of Basic Microbiology** 49: 377-385.
- Teuber, M. (1995). The genus *Lactococcus*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Lactic Acid Bacteria: The Genera of Lactic Acid Bacteria** (2nd ed., pp. 173-234). U.K.: Chapman & Hall.
- Teuber, M. (2009). Genus II. *Lactococcus*. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed., pp. 711-722). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. (2005a). Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. **Food Technology and Biotechnology** 43 (2): 165-173.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. (2005b). *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. **Enzyme and Microbial Technology** 36: 318-326.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. (2005c). Optimization of Bacteriocin ST311LD Production by *Enterococcus faecium* ST311LD, Isolated from Spoiled Black Olives. **The Journal of Microbiology** 43 (4): 370-374.

- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. (2006a). Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. **Microbiological Research** 161: 102-108.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. (2006b). Screening for bacteriocin-producing lactic acid bacteria from boza, a traditional cereal beverage from Bulgaria comparison of the bacteriocins. **Process Biochemistry** 41: 11-19.
- Todorov, S. D. and Dicks, L. M. T. (2007). Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST712BZ isolated from boza. **Brazilian Journal of Microbiology** 38:166-172.
- Todorov S. D., Vaz-Velho M. and Dicks L. M. T. (2003). Isolation and partial characterization of bacteriocins produced by four lactic acid bacteria isolated from traditional South African beer. **Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry** 2 (4): 525-530.
- Tuncer, Y. and Ozden, B. (2010). Partial biochemical characterization of nisin-like bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* YBD11 isolated from boza, a traditional fermented Turkish beverage. **Romanian Biotechnological Letters** 15: 4940-4948.
- Rajaram G., Manivasagan, P., Thilagavathi, B. and Saravanakumar, A. (2010). Purification and Characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* isolated from marine environment. **Advance Journal of Food Science and Technology** 2 (2): 138-144.
- Rogers, L. A. and Whittier, E. D. (1928). Limiting factors in lactic fermentation. **Journal of Bacteriology** 16: 211-229.
- Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2008). Characterization of nisin produced by *Lactococcus lactis* RP359 isolated from Kem-Buk-Nud, a traditional Thai fermented food. **The Internet Journal of Microbiology** 5(1).
- Rodríguez, E., González, B., Gaya, P., Nuñez, M. and Medina, M. (2000). Diversity of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from raw milk. **International Dairy Journal** 10: 7-15.
- Ross, R. P., Morgan, S. and Hill, C. (2002). Preservation and fermentation: past, present and future. **International Journal of Food Microbiology** 79: 3-16.

- Whiley, R. A. and Hardie J. M. (2009). Genus I. *Streptococcus* Rosenbach 1884, 22<sup>AL</sup>. In P. H. A. Sneath, N. S. Mair, M. E. Sharpe & J. G. Holt (eds.). **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol. 2** (2nd ed., pp. 655-710). Baltimore: Williams & Wilkins.
- Wiedemann, I., Breukink, E., van Kraaij, C., Kuipers, O. P., Bierbaum, G., de Kruijff B. and Sahl, H-G. (2001). Specific binding of nisin to the peptidoglycan precursor lipid II combines pore formation and inhibition of cell wall biosynthesis for potent antibiotic Activity. **The Journal of Biological Chemistry** 276: 1772-1779.
- Xiraphi, N., Georgalaki, M., Van Driessche, G., Devreese, B., Van Beeumen, J., Tsakalidou, E., Metaxopoulos, J. and Drosinos, E. H. (2005). Purification and characterization of curvaticin L442, a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* L442. **Antonie van Leeuwenhoek** 89: 19-26.
- Yang R. and Ray, B. (1994). Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Food Microbiology** 11: 281-291.
- Yousef, A. E. and Carlstrom, C. (2003). Lactic acid fermentation and bacteriocin production: batch fermentation, growth kinetics and bacteriocin bioassay. In **Food Microbiology: A Laboratory Manual** (pp. 231-238). New Jersey: John Wiley & Sons.
- Zamfir, M., Callewaert, R., Cornea, P. C. and De Vuyst, L. (2000). Production kinetics of acidophilin 801, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* IBB 801. **FEMS Microbiology Letters** 190: 305-308.

ภาคผนวก



ภาคผนวก ก

สารเคมีที่ใช้ทดสอบและอาหารเลี้ยงเชื้อ

## 1. สารเคมีที่ใช้ทดสอบ

### 1.1 Crystal violet (Gram stain)

Crystal violet	2	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20	มิลลิลิตร
Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย ตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมากรองก่อนใช้

### 1.2 Safranin (Gram stain)

Safranin O	2	กรัม
(สารละลายร้อยละ 2.5 ใน ethyl alcohol ร้อยละ 95)		
น้ำกลั่น	90	มิลลิลิตร

### 1.3 Acetone alcohol

Alcohol (ร้อยละ 95)	700	มิลลิลิตร
Acetone	300	มิลลิลิตร

### 1.4 Iodine solution (Gram's iodine)

Iodine	1	กรัม
Potassium iodide	2	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนปริมาตรครบ	300	มิลลิลิตร

### 1.5 Hydrogen peroxide (ร้อยละ 3)

Hydrogen peroxide	3	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	97	มิลลิลิตร

### 1.6 การเตรียมสารละลาย McFarland

เตรียมสารละลาย A

Barium chloride	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

เตรียมสารละลาย B

Sulfuric acid	1	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	100	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายทั้งสองชนิดตามตารางที่ 1ก ดังนี้

ตารางที่ 1ก ปริมาณความขุ่นเซลล์ที่เบอร์ McFarland ต่างๆ

McFarland No.	0.5	1	2	3	4	5	6	7	8
1% Barium chloride (ml)	0.05	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5	0.6	0.7	0.8
1% Sulfuric acid (ml)	9.95	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5	9.4	9.3	9.2
Approx. cell density ( $\times 10^8$ /ml)	1.5	3	6	9	12	15	18	21	24

## 2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

### 2.1 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Proteose peptone	10	กรัม
Meat extract	8	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Di-ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.04	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

ละลายสารอาหารสำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 2.2 De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

ส่วนผสมจะเหมือนกับ De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth แต่จะเติมวุ้นผงลงไป 15 กรัมต่อ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 2.3 Modified-De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Tryptone	10	กรัม
Meat extract	2	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Dextrose	2	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	8.7	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	8	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Di-ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

ละลายอาหารสำเร็จรูปด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 2.4 Modified-De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar

ส่วนผสมจะเหมือนกับ Modified-De Man Rogosa and Sharpe (MRS) broth แต่จะเติมน้ำผงลงไป 15 กรัมต่อ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 2.5 Nutrient broth

Beef extract	3	กรัม
Peptone	5	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ینگฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 2.6 Nutrient agar

ส่วนผสมจะเหมือนกับอาหารเหลว Nutrient แต่จะเติมน้ำผงลงไป 15 กรัมต่อ 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือ

กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

### 2.7 Motility test medium

Peptone	10	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Meat extract	3	กรัม
Agar	4	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.0 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

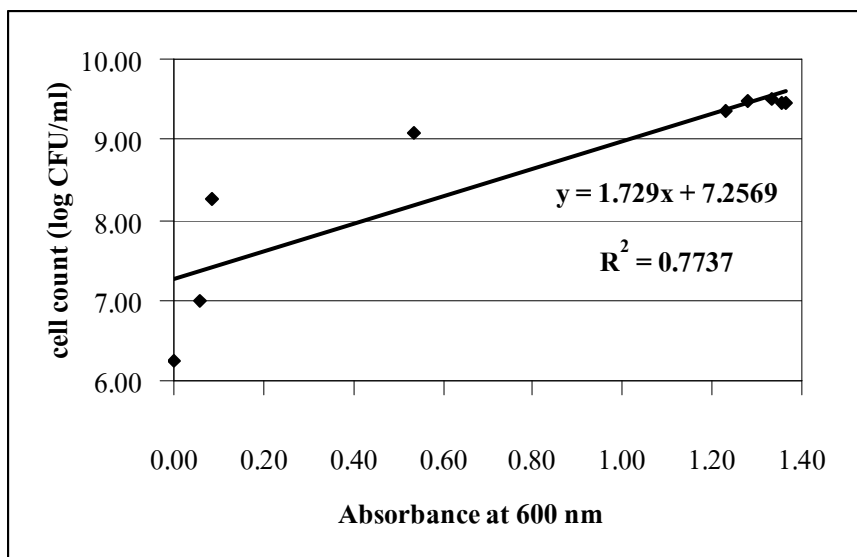
### 2.8 Oxidation/Fermentation medium for lactic acid bacteria

Peptone	2	กรัม
Meat extract	8	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	0.3	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Chlorophenol red	0.04	กรัม
Agar	3	กรัม
เติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร	1,000	มิลลิลิตร

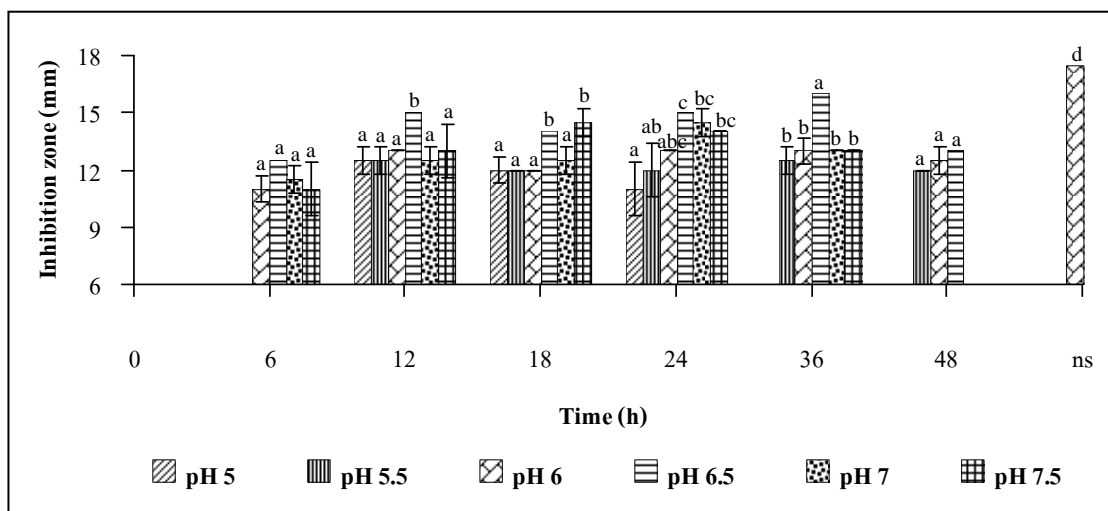
ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 6.5 โดยใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์หรือกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 โมลาร์ นิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**ภาคผนวก ข**

**ผลการทดลอง**



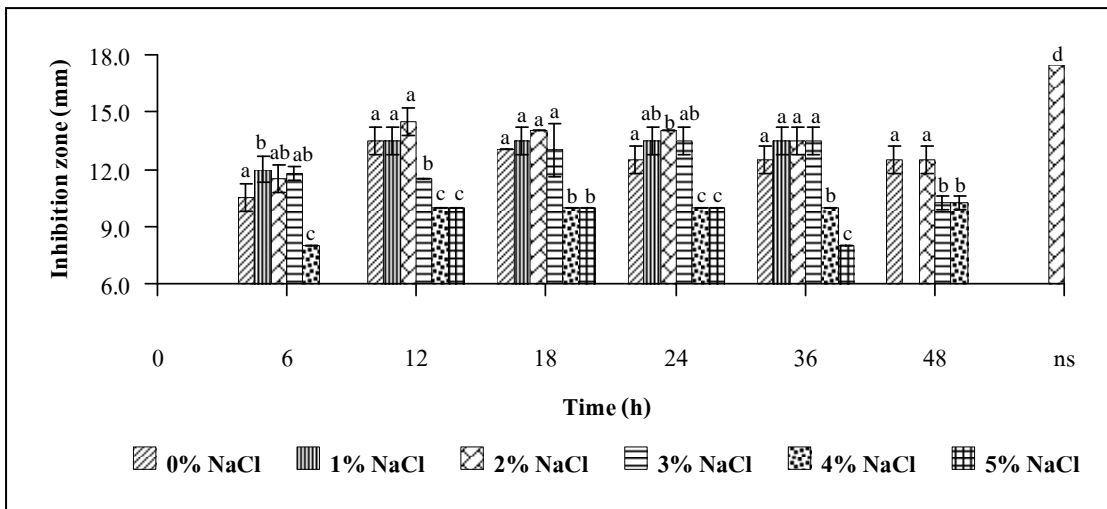
รูปที่ 1 ข กราฟมาตรฐานการเจริญและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 เลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูปที่ 2 ข ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเหลว MRS ต่อการผลิต crude bacteriocin โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1

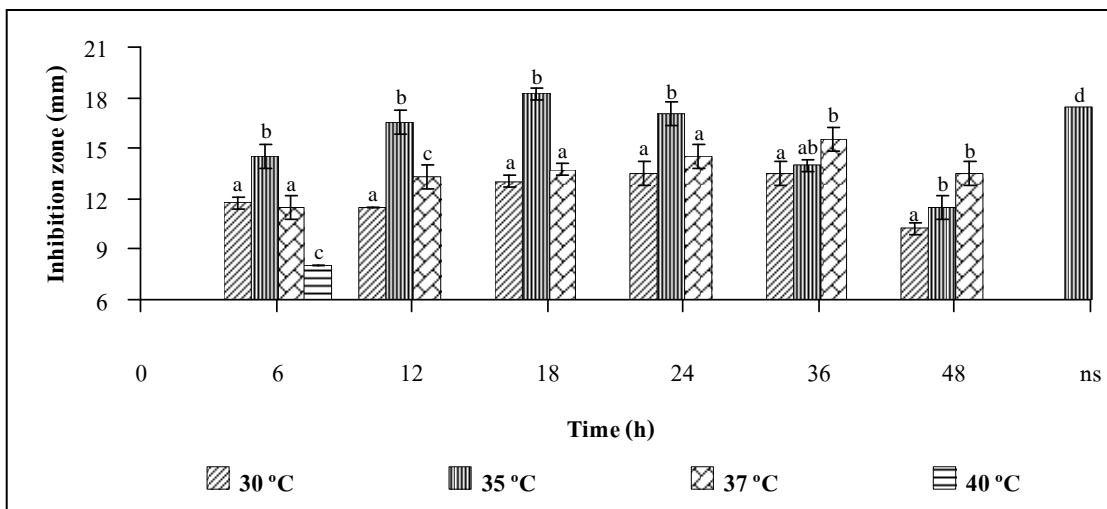
หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่นิชน

ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในระยะเวลาที่เท่ากัน แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 3ข ผลของปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่อการผลิต crude bacteriocin โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1  
 หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่นับ

ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในระยะเวลาที่เท่ากัน แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



รูปที่ 4ข ผลของอุณหภูมิในการบ่มต่อการผลิต crude bacteriocin โดย *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1  
 หมายเหตุ ns หมายถึง ไม่นับ

ตัวอักษรที่แตกต่างกันภายในระยะเวลาที่เท่ากัน แสดงถึงค่าวิเคราะห์ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p \leq 0.05$ )



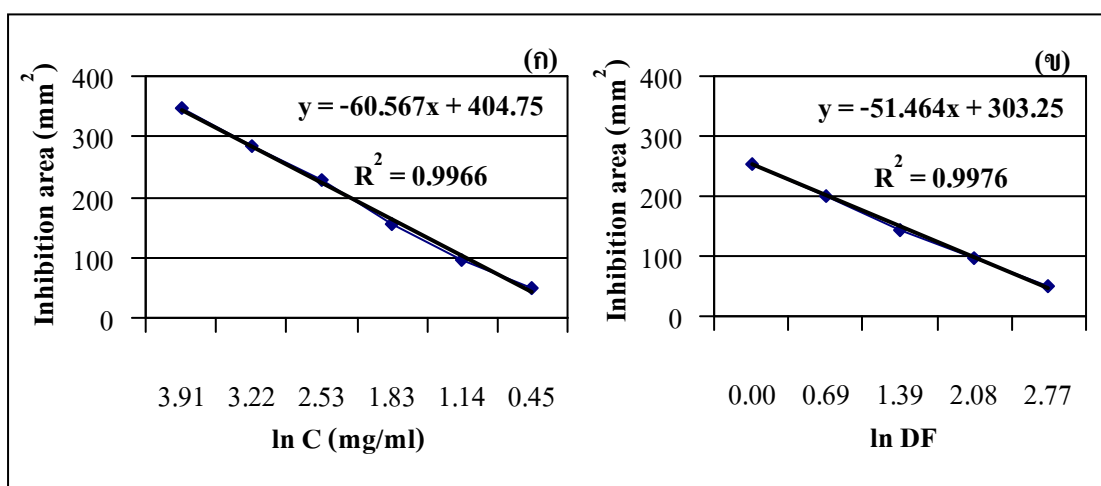
## 1. การคำนวณค่ากิจกรรมของ crude bacteriocin (Bacteriocin activity)

1.1 วิธี critical dilution แสดงด้วยหน่วย arbitrary unit (AU/ml) (Yousef and Carlstrom, 2003)

$$\text{กิจกรรมของแบคทีริโอซิน (AU/ml)} = \frac{1}{DF_i} \times \frac{1000}{\text{ปริมาตรของสารที่ใช้ทดสอบ (\mu\text{l})}} \quad \text{-----(1)}$$

โดยที่  $DF_i$  คือสัดส่วนของ dilution factor ที่มีค่าสูงที่สุดซึ่งสร้างเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณใสการยับยั้งที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางอย่างน้อยที่สุด 8 มิลลิเมตร ดังนั้น

1.2 วิธี simple parallel line model แสดงด้วยหน่วยมิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



รูปที่ 5x Dose-response plot ของไนซิน (ก) และ crude bacteriocin (ข)

หมายเหตุ C คือ ความเข้มข้นของไนซิน

DF คือ ค่าแฟกเตอร์การเจือจาง (Dilution factor) ของ crude bacteriocin

ความเข้มข้นของ

$$\text{Crude bacteriocin (มก./ลิตร)} = \frac{\text{จุดตัดแกน Y (ตัวอย่าง) (ตร.มม.)} - \text{จุดตัดแกน Y (ไนซิน) (ตร.มม.)}}{\text{ค่าความชัน (ตัวอย่าง) (ตร.มม.·ลิตร/มก.)}} \quad \text{-----(2)}$$

**2. สูตรคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้งที่เหลืออยู่ (% Residual activity)**

$$\text{กิจกรรมการยับยั้งที่เหลืออยู่} = \frac{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางกลางของบริเวณใสการยับยั้ง (มม.)}}{\text{เส้นผ่าศูนย์กลางกลางของบริเวณใสการยับยั้ง (มม.)}} \times 100 \quad \text{-----}(3)$$

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวณัฐธิดา จันทร์ประเสริฐ เกิดเมื่อวันที่ 19 ธันวาคม พ.ศ. 2527 ที่จังหวัดสมุทรสงคราม จบการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลายจากโรงเรียนอัมพวันวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2548 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ในปีการศึกษา 2549

### ประสบการณ์ทำงาน/ฝึกอบรม

- ปฏิบัติงานภายใต้โครงการสหกิจศึกษาในแผนกวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ (Research and Development : RD) ณ บริษัท สหพัฒนพิบูล จำกัด (มหาชน) จังหวัดราชบุรี (สิงหาคม-ธันวาคม 2548)

- ประสบการณ์การฝึกอบรมในหัวข้อ “Metabolic comparative analysis of *Lactococcus lactis* strains producing diacetyl” ณ สถาบัน Institut National des Sciences Appliquées (INSA) เมืองตูลูส ประเทศฝรั่งเศส (มกราคม-พฤษภาคม 2551)

### ผลงานทางวิชาการ

- Bacteriocin production and its crude characterization of lactic acid bacteria isolates from pickled *Garcinia schomburgkiana* pierre ณัฐธิดา จันทร์ประเสริฐ และ ปิยะวรรณ กาสลัก การนำเสนอแบบโปสเตอร์ (Poster presentation) การประชุมนานาชาติ เรื่อง Food Innovation Asia Conference 2010 : Indigenous Food Research and Development to Global Market" ในวันที่ 17-18 มิถุนายน 2553 จัดโดยมหาวิทยาลัยอุบลราชธานี ร่วมกับ สมาคมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหารแห่งประเทศไทย (FoSTAT) และสมาคมสภาวิชาการอุตสาหกรรมเกษตร (AIAC) ณ ศูนย์นิทรรศการและการประชุมกรุงเทพ (ไบเทค) บางนา กรุงเทพมหานคร

- Morphological changes of *Bacillus cereus* TISTR 687 cells induced by crude bacteriocin producing *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 ณัฐธิดา จันทร์ประเสริฐ และ ปิยะวรรณ กาสลัก การนำเสนอแบบโปสเตอร์ (Poster presentation) การประชุมนานาชาติ เรื่อง Biotechnology for Healthy Living ครั้งที่ 22 ในวันที่ 20-22 ตุลาคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตตรัง จังหวัดตรัง