สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
แสนสุข เมือง จ ชลบุรี 20131

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักดองพื้นบ้าน จ. ชลบุรี

Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Chonburi traditional fermented foods

นางสาวเยาวภรณ์ แย้มประดิษฐ์

- 2 ก.ย. 45
05336

ปัญหาทางจุลชีววิทยานี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มีนาคม 2545

ลิขสิทธิ์เป็นของภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

คณะกรรมการที่ปรึกษาประจำตัวนิสิต และคณะกรรมการสอบได้พิจารณาปัญหาทางจุลชีววิทยาฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการที่ปรึกษา

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ปุญญิศา วิจิตรศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(-)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(อาจารย์ปุญญิศา วิจิตรศิริ)

.....กรรมการ
(อาจารย์กาญจนา หริ่มเพ็ง)

.....กรรมการ
(ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า)

ภาควิชาจุลชีววิทยา อนุมัติให้รับปัญหาทางจุลชีววิทยาฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยบูรพา

.....หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า)
วันที่ เดือน มีนาคม พ.ศ. 2545

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กิตติกรรมประกาศ

"ไม่มีความสำเร็จใดที่ไม่ใช้ความพยายาม" คำกล่าวข้างต้นบ่งบอกได้ดีถึงการทำปัญหาทางจุลชีววิทยาในครั้งนี้ ซึ่งปัญหาทางจุลชีววิทยาฉบับนี้สำเร็จลงด้วยดีโดยได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ปุญญิศา วิจิตรศิริ ประธานควบคุมปัญหาทางจุลชีววิทยา ที่สละเวลาคอยให้คำปรึกษา แนะแนวทางรวมทั้งตรวจแก้ไขปัญหาทางจุลชีววิทยา ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์กาญจนา หริ่มเพ็ง และ ดร.ศิริโฉม ทุ่งเก้า ที่ช่วยให้คำปรึกษา และตรวจสอบแก้ไขปรับปรุงปัญหาทางจุลชีววิทยาฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ดร.สุคารัตน์ สวนจิตร ที่ช่วยให้คำปรึกษา และคำแนะนำ ปัญหาทางจุลชีววิทยาฉบับนี้

ขอขอบคุณ คุณปกิจพงษ์ ชลันธร คุณหลิม ชะอุ่มใบ และคุณอภิลักษณ์ ลอยล่อง ที่คอยช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ และสารเคมี รวมทั้งคำปรึกษาด้านต่างๆ

ขอขอบคุณ คุณปริญญา นุกูลกิจ คุณภุมรี กัณฑ์ราย และเพื่อนๆ เอกจุลชีววิทยาทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือทั้งแรงกาย และแรงใจ

สำหรับคุณความดี และความสำเร็จทั้งปวงขอมอบให้แด่ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้อง ที่คอยให้กำลังใจ และสนับสนุนการศึกษาตลอดมา รวมทั้งคณาจารย์ทุกท่านที่ได้อบรมสั่งสอน แนะแนวทางชีวิตข้าพเจ้ามา

เยาวภรณ์ แย้มประดิษฐ์

มีนาคม 2545

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

หัวข้อวิจัย การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักดองพื้นบ้าน จ. ชลบุรี

ชื่อผู้วิจัย นางสาวเยาวภรณ์ แย้มประดิษฐ์

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา พ.ศ. 2544

บทคัดย่อ

การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักดองทั้งหมด 22 ตัวอย่าง บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส เพื่อกำจัดการสร้างกรดอินทรีย์ และบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อยับยั้งการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 19 ไอโซเลท (F1-F19) นำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 19 ไอโซเลท มาทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ได้แก่ *Escherichai coli* , *Leuconostoc mesenteroides* TSITR473 , *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. โดยวิธี swab paper disc พบว่ามีเพียงแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 เพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถยับยั้ง *L. mesenteroides* TSITR473 และ *S. aureus* ได้ แต่ไม่สามารถตรวจพบสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ในขั้นการทดสอบความไวต่อความร้อน และ proteolytic enzyme จึงไม่อาจสรุปได้ว่าความสามารถของแบคทีเรียแลกติก F19 ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบเป็นผลมาจากแบคเทอริโอซิน และจากการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 พบว่าเป็น *Streptococcus*

คำสำคัญ : แบคเทอริโอซิน, แบคทีเรียแลกติก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Title Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Chonburi traditional fermented foods

Name Miss Yaowaporn Yampradit

Department Microbiology

Academic Year 2001

Abstract

A total of 19 isolates (F1-F19) of lactic acid bacteria were obtained from 22 samples of Chonburi traditional fermented foods. They were tested for antibacterial activity by using swab paper disc method against indicator bacteria including *Escherichia coli*, *Leuconostoc mesensteroides* TISTR 473, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* spp., on MRS agar containing 0.2 % glucose and incubated under anaerobic condition to elimenate the effect of organic acids and hydrogen peroxide. The only one isolate (F19), which was tentatively, was shown to be able to inhibit the growth of *L. mesenteroides* TSITR 473 and *S. aureus*. However the properties of bacteriocin (heat sensitivity and proteolytic activity) could not be detected from this isolate. Therefore, the inhibition effect according to bacteriocin could not be taken into consideration. Lactic acid bacteria was identified as *Streptococcus*.

Key words: Bacteriocin, Lactic acid bacteria

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา	4
รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียแลกติก	4
รายละเอียดเกี่ยวกับสารกันเสียในอาหารจากแบคทีเรียแลกติก	8
รายละเอียดเกี่ยวกับองค์ประกอบ โครงสร้าง การผลิต และกลไกการทำงาน ของแบคเทอริโอซิน	12
รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	22
วัสดุอุปกรณ์	22
วิธีการทดลอง	24
การเก็บตัวอย่างและแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักดอง	24
การศึกษาลักษณะรูปร่าง และคุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้	24
การเตรียม culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติก	25
การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดย วิธี swab paper disc	25
การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความสามารถในการยับยั้ง	26
การศึกษาผลของความร้อนที่มีต่อความคงตัวของสารยับยั้ง	26
การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้	27
บทที่ 4 ผลการทดลอง	28
การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักดอง	28
การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดย วิธี swab paper disc	30
การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความสามารถในการยับยั้ง	34
การศึกษาผลของความร้อนที่มีต่อความคงตัวของสารยับยั้ง	34
การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้	34

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	36
สรุปผลการทดลอง	36
อภิปรายผลการทดลอง	37
ข้อเสนอแนะ	40
เอกสารอ้างอิง	41
ภาคผนวก	44
ภาคผนวก ก	45
ภาคผนวก ข	48
ภาคผนวก ค	50

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักดอง 28
2. แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 19 ไอโซเลทต่อการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ 30
3. แสดงลักษณะทางสรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 35

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.	กระบวนการฟอสฟอคีโตเลส หรือการหมักแบบเฮเทอโรแลกติก	6
2.	โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน	12
3.	การผลิตแบคเทอริโอซิน	14
4.	กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน	16
5.	การยับยั้งการสังเคราะห์ ribosomal RNA โดย colicin E_3 และ cloacin DF13	16
6.	แสดงรูปร่างของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19	29
7.	บริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ต่อการยับยั้ง *S. aureus*	32
8.	บริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ต่อการยับยั้ง *L. mesenteroides* TSITR473	33

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่1

บทนำ

ในปัจจุบันผู้บริโภคอาหารได้ให้ความสำคัญ และหันมาสนใจเกี่ยวกับความปลอดภัยในการบริโภคอาหารกันมากขึ้น ทั้งความปลอดภัยจากเชื้อก่อโรค และสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร (chemical preservation) (วิลาวัณย์, 2542) แบคทีเรียที่พบในอาหารส่วนใหญ่นั้นทำให้เกิดผลเสียโดยทำให้อาหารเน่าเสีย หรือก่อโรคกับผู้บริโภคได้แก่ *Vibrio parahaemolyticus* , *Staphylococcus aureus* , *Salmonella* spp. และ *Shigella* sp. เป็นต้น (Arith และคณะ, 1993) อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียบางชนิดที่เป็นประโยชน์ต่ออาหาร ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียที่มีบทบาทในการเกิดอาหารหมัก ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีความสนใจนำแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคมาใช้ในการผลิตอาหารบางชนิด จัดเป็นสารกันเสียธรรมชาติ (nature biopreservation) ซึ่งแนวทางที่ได้รับความสนใจและเริ่มศึกษากันคือ การใช้สารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ใช้ในการผลิตอาหารหมักซึ่งแบคทีเรียที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมการหมัก และแปรรูปอาหารประเภทผลิตภัณฑ์นม เนื้อสัตว์ ผัก และผลไม้ คือ แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacterial) เนื่องจากแบคทีเรียบางชนิดในกลุ่มนี้สามารถสร้างสารต้านแบคทีเรีย (antibacterial agent) ที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดที่ปนเปื้อน และเป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหาร (วิลาวัณย์, 2542) ทำให้ช่วยยืดอายุการเก็บอาหารได้นานขึ้น และพบว่ามีความปลอดภัยมากกว่าสารกันบูดซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์ แบคทีเรียแลกติกที่มีความสำคัญได้แก่ *Leuconostoc* , *Streptococcus* , *Pediococcus* และ *Lactobacillus* เป็นต้น (Wood, 1992) แบคทีเรียเหล่านี้สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์ และสารอื่นๆ มีผลในการปรับปรุงกลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของอาหารหมัก ความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งแบคทีเรียเกิดจากการหมักน้ำตาลให้เกิดกรดอินทรีย์ทำให้ระดับพีเอชของอาหารลดลง นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังสามารถสร้างสารยับยั้งอื่นๆ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งมีผลในการต้านแบคทีเรียอื่นได้เช่นกัน (วิลาวัณย์, 2542)

แบคเทอริโอซินเป็นสารต้านจุลชีพ (antimicrobial substance) ที่สร้างจากแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Leuconostoc mesenteroides* , *Lactobacillus sake* และ *Pediococcus* spp. เป็นสารประกอบประเภทโปรตีน และเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ ดังนั้นจึงมีกลุ่มนักวิจัยมากมายที่สนใจในการคัดเลือกแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินสำหรับนำมา

ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อใช้ยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดยใช้เป็นประเภทสารถนอมอาหารธรรมชาติ เพื่อเพิ่มความปลอดภัย ความคงตัวของอาหาร และไม่มีผลต่อเชื้อประจำถิ่น (normal flora) ที่มีประโยชน์ที่อาศัยอยู่ในร่างกายมนุษย์ (Pongsak and Parichat, 2000) แบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินถูกแยกได้จากอาหารหลายๆ ชนิด เช่น ไส้กรอก นม ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่ม และอาหารหมักดองต่างๆ เป็นต้น

ดังนั้นปัญหาทางจุลชีววิทยานี้จึงต้องการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักดองชนิดต่างๆ และความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารบางชนิด และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิดได้แก่ *Escherichia coli* , *Staphylococcus aureus* , *Salmonella* spp. และ *Leuconostoc mesenteroides* TSITR473

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ความมุ่งหมายของการศึกษา

1. เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักดอง
2. เพื่อทดสอบความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิด
3. เพื่อจำแนก และศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

ความสำคัญของการศึกษา

เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักดองที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียบางชนิด โดยแบคทีเรียแลกติกที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปศึกษาต่อเพื่อเป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ และในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

สมมติฐานของการศึกษา

แบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ *S. aureus* , *E. coli* , *Salmonella* spp. และ *L. mesenteroides* TSITR473

ขอบเขตการศึกษา

1. เก็บตัวอย่างอาหารหมักแล้วทำการเพาะแยกแบคทีเรียแลกติกโดยดูความสามารถในการเจริญบน MRS 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose agar ในสภาวะไม่มีออกซิเจน (anaerobic)
2. ตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc
3. ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้น
4. คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบและจำแนกเชื้อเบื้องต้น

สถานที่ทำการศึกษา

ห้องปฏิบัติการภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

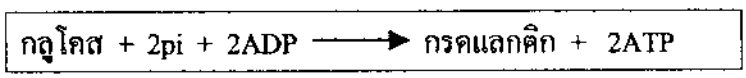
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาแบ่งออกเป็น 4 หัวข้อ ดังนี้

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacterial,LAB)
2. รายละเอียดเกี่ยวกับสารกันเสียในอาหารจากแบคทีเรียแลกติก
3. รายละเอียดเกี่ยวกับองค์ประกอบ โครงสร้าง การผลิต และกลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)
4. รายงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacterial,LAB)

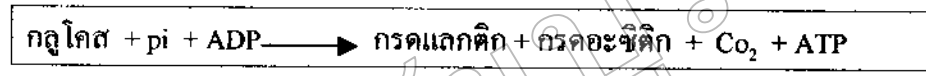
แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน Family Lactobacillacus มีรูปร่างกลม (cocci) และเป็นท่อน (rod) (Pongsak and Parichat, 2000) พบการเรียงตัวได้ทั้ง เดี่ยว เกาะกันเป็นคู่ เรียงต่อกันเป็นสาย หรืออาจพบเซลล์เกาะติดกัน 4 เซลล์ ย้อมติดสีน้ำเงิน (Gram positive) บางชนิดมีโคโลนีสีเหลือง ส้ม และแดง ไม่สร้างสปอร์ (non-sporeforming bacteria) ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase enzyme) ในการเจริญของแบคทีเรียเหล่านี้ส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดไม่ต้องการอากาศ (strictly anaerobe) สามารถทนต่อกรดได้ดี (ปรียา, 2524) สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตได้ดี โดยเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นกรดแลกติก สารกรดระเหย (volatile acid) แอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ (ไพโรจน์, 2534) แบคทีเรียกลุ่มนี้แบ่งออกเป็น 2 พวกคือ

1. Homofermentative เป็นกลุ่มที่หมักน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติกอย่างเดียวด้วยวิถีไกลโคลิติก (Glycolytic patway) จุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Pediococcus, Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *L. casei , L. pentosus*

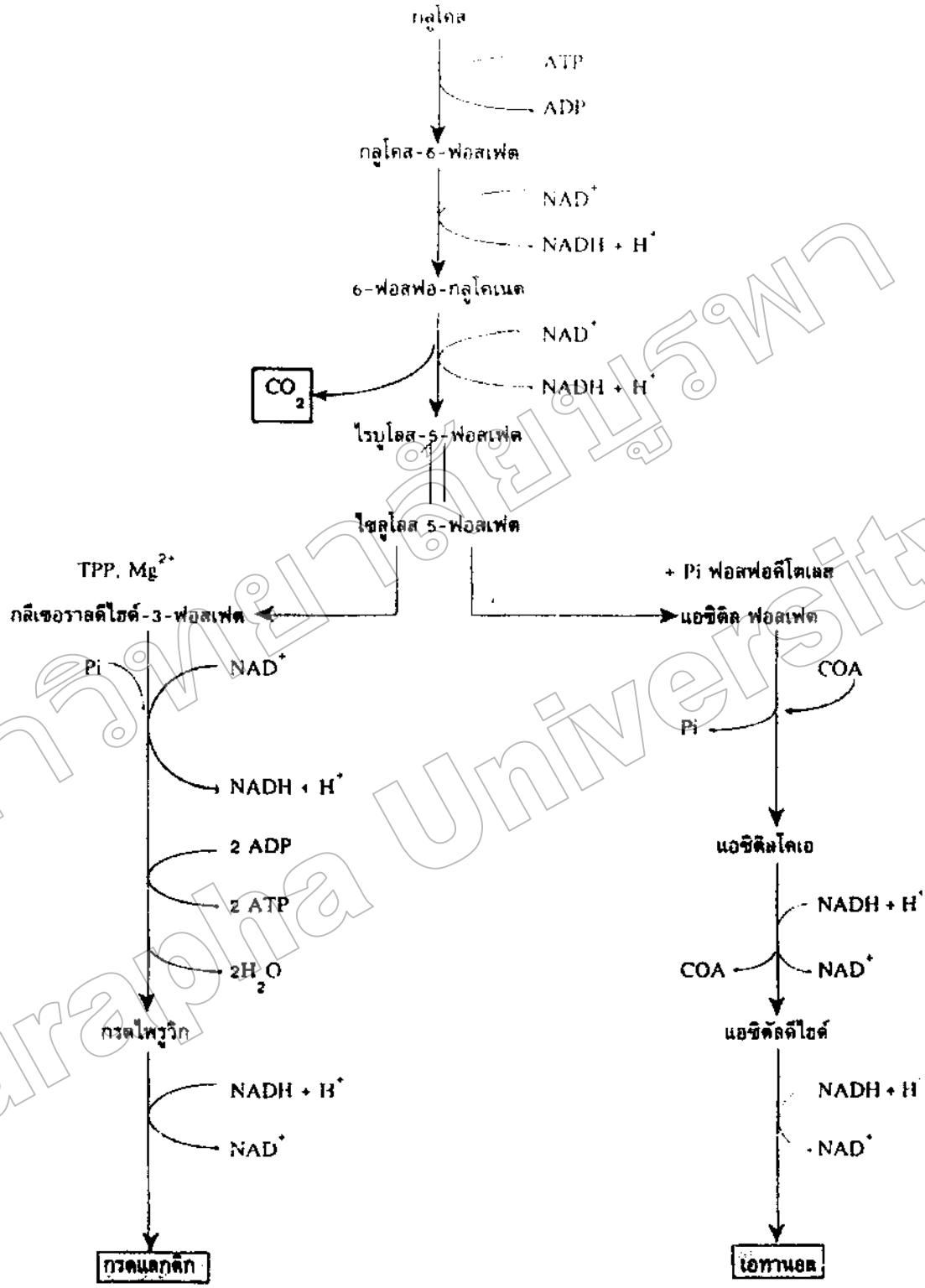


มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. Heterofermentative เป็นกลุ่มที่หมักน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลกติก และมีสารชนิดอื่นๆ เกิดขึ้นร่วมอยู่ด้วย เช่น เอทธานอล กรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยวิถีฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase patway) ดังแสดงในภาพที่ 1 จุลินทรีย์ที่อยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc* , *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *L. lycopersici* , *L. brevis* , *L. pantoaceticus* ซึ่งสามารถสรุปปฏิกิริยาทั้งหมดในการหมักแบบ heterofermentative ได้ดังนี้



มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาพที่ 1 กระบวนการฟอสโฟคีโตเลส หรือการหมักแบบเฮเทอโรแลกติก
(ที่มา: วิลาวัณย์, 2539)

แบคทีเรียแลกติกพบได้ในธรรมชาติทั่วไป เช่น ดิน พืช ผัก และอาหารดิบ มีความสำคัญในอาหารโดยมีบทบาทในการผลิตอาหารหมัก (fermented food) ชนิดต่างๆ เช่น ผักดอง นมเปรี้ยว ไส้กรอก แหนม และเนยแข็ง เป็นต้น การผลิตอาหารหมักบางชนิด เช่น ผักดอง และแหนม อาศัยกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติกธรรมชาติหลายๆ ชนิดที่ติดมากับวัตถุดิบ ในขณะที่อาหารหมักบางชนิด คือ นมเปรี้ยว และโยเกร์ตใช้หัวเชื้อแลกติกในรูปเชื้อบริสุทธิ์ (starter culter) (ศิริโฉม, 2543) บทบาทที่สำคัญในการหมักอาหารของแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ การผลิตกรดทำให้เกิดรสเปรี้ยว และมีกลิ่นหอมของสารต่างๆ และยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ ที่แตกต่างกันออกไปตามประเภทในผลิตภัณฑ์ (นภา, 2543) การตรวจสอบชนิด และจำนวนแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีความสำคัญเพื่อติดตามการดำเนินไปของกระบวนการหมัก เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกเป็นพวกที่ต้องการสารอาหารซับซ้อน ดังนั้นจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทั่วไปได้ (ศิริโฉม, 2543)

<u>ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติก</u> คือ

1. Lactic agar อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ใช้ตรวจ หรือตรวจนับ lactic Streptococci และ lactobacilli โดยหลังจากที่เชื้อเจริญเป็นโคโลนีแล้ว จะถูกนำไปย้อมสี และทดสอบปฏิกิริยคะตาเลส ถ้าผลออกมาว่า โคโลนีนั้นมีแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม หรือเป็นท่อน และผลคะตาเลสเป็นลบ จึงอาจกล่าวได้ว่าโคโลนีนั้นเป็นแบคทีเรียแลกติก
2. MRS agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของ lactobacilli ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่พบในนม อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้สามารถใช้แทน Lactic agar ได้
3. RMW agar เป็นอาหารที่เชื้อประเภท selective medium สำหรับตรวจหาแบคทีเรีย lactobacilli ที่มีแหล่งมาจากปาก หรืออุจจาระ
4. Eugon agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่เจริญบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ ทำให้สามารถตรวจนับได้สะดวก
5. ATP agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้รับการพัฒนาเพื่อใช้ในการเลี้ยง และตรวจนับพวก heterofermentative lactic acid bacteria ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (วราวุฒิ, 2538)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. สารกันเสียในอาหารจากแบคทีเรียแลกติก

2.1 สารกันเสียในอาหาร และกลไกการทำงานของสารกันเสีย

องค์การอาหารและยาของประเทศสหรัฐอเมริกาได้ให้ความหมายของสารกันเสียว่า สารเคมีใดๆ เมื่อเติมลงในอาหารแล้วจะสามารถป้องกัน หรือชะลอการเสื่อมเสียของอาหาร ซึ่งไม่รวมถึงเกลือทั่วไป น้ำตาล น้ำส้มสายชู เครื่องเทศ หรือน้ำมันที่เกิดจากเครื่องเทศ สารที่เติมลงในอาหารซึ่งได้จากการสัมผัสโดยตรงกับควันของไม้ หรือสารจำพวกที่มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าแมลง จากคำนิยามนี้ สารกันเสียจึงรวมถึงวัตถุกันหืน สารที่ช่วยรักษาสี และกลิ่นรสที่ช่วยทำให้อาหารมีความคงตัว และสารที่มีปฏิกิริยาด้านจุลินทรีย์เท่านั้น สารกันเสียจะต้องสามารถยับยั้งการเจริญของรา ยีสต์ และแบคทีเรีย จะต้องไม่เป็นพิษกับสัตว์ทดลอง และต่อมนุษย์ จะต้องไม่เป็นสารที่ทำให้เกิดการสะสมในเนื้อเยื่อไขมัน ควรจะต้องเป็นสารที่ละลายน้ำได้ มีความคงตัวในผลิตภัณฑ์อาหาร และไม่ไปทำปฏิกิริยากับสารอื่นที่เติมลงในอาหาร หรือส่วนประกอบตามธรรมชาติของอาหารเอง

กลไกการทำงานของสารกันเสียสามารถแบ่งได้เป็น

1. การยับยั้งและการทำลาย ความแตกต่างของสารยับยั้งพวกรา หรือแบคทีเรีย กับสารที่ทำลายรา หรือแบคทีเรียนั้น ขึ้นอยู่กับอัตราการตายของจุลินทรีย์ ผลการเติมสารกันเสียในอาหารระยะยาวถ้าไม่ทำลายจุลินทรีย์ก็ปล่อยให้จุลินทรีย์สามารถเจริญได้ ฉะนั้นปริมาณสารกันเสียที่ใช้จึงมีความสำคัญ ถ้าความเข้มข้นของสารกันเสียเพิ่มขึ้นการเจริญของเซลล์จะช้าลงในขณะเดียวกันอัตราการตายของจุลินทรีย์จะถูกเร่งให้เร็วขึ้น ถ้าใช้ความเข้มข้นในปริมาณมากจะทำให้เกิดการปลอดเชื้อจะพบว่าจุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะถูกทำลายตั้งแต่แรก แต่ถ้ามีจุลินทรีย์ที่สามารถรอดต่อการถูกทำลายได้จะขยายพันธุ์ในเวลาต่อมาฉะนั้นอาจกล่าวได้ว่า สารกันเสียจะทำหน้าที่ได้ดีที่สุดก็ต่อเมื่อปริมาณที่ใช้เพียงพอเท่านั้น แม้ว่าผลของสารกันเสียจะไม่ขึ้นอยู่กับจำนวนจุลินทรีย์โดยตรงก็ตาม แต่ในทางปฏิบัติพบว่าการใช้สารกันเสียควรจะกระทำต่อเมื่อมีจำนวนจุลินทรีย์ต่ำทั้งนี้เพื่อให้สารกันเสียสามารถไปยับยั้งจุลินทรีย์ในระยะเริ่มต้นของ log phase

2. ผลต่อเซลล์จุลินทรีย์ สารที่มีคุณสมบัติทำลายจุลินทรีย์จะเกิดกิริยาการทำลายก็ต่อเมื่อเซลล์จุลินทรีย์ได้สัมผัสกับสารนั้นๆ ในปริมาณที่เพียงพอ กิริยาการทำลายจะมีลักษณะจำเพาะกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด ซึ่งกิริยาดังกล่าวจะรวมถึงกลไกทางฟิสิกส์ เคมี กายภาพ และชีวเคมี ผลของสารกันเสียที่มีต่อเซลล์จุลินทรีย์ อาจสรุปได้ดังนี้

2.1 ไปกระทบกระเทือนต่อระบบผนังเซลล์และ/หรือเนื้อเยื่อเซลล์ ปกติผนังเซลล์จะทำหน้าที่เป็นตัวป้องกันสารต่างๆ แต่สารกันเสียจะไปทำหน้าที่ทำให้ผนังเซลล์นี้หายไปหรือชั้น lipopolysaccharide ที่ห่อหุ้มเซลล์หายไป

2.2 ไปกระทบกระเทือนต่อกิจกรรมของเอนไซม์ หรือโครงสร้างของยีนใน

ไซโตพลาสซึม สารกันเสียจะไปหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์บางตัว หรือสารสังเคราะห์เอนไซม์ในเซลล์จุลินทรีย์ ซึ่งมีผลทำให้เอนไซม์ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับเมตาบอลิซึมหลักของเซลล์ หรือการสังเคราะห์ส่วนประกอบสำคัญของเซลล์หยุดทำงาน เช่น การสังเคราะห์โปรตีน หรือการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก (ไพบูลย์, 2532)

ซึ่งสารกันเสียที่ใช้เติมลงในอาหารเป็นสารเคมีที่สังเคราะห์ขึ้นอาจสะสมอยู่ภายในร่างกายและทำลายจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ทำให้เกิดผลเสียกับผู้บริโภคอาหาร ดังนั้นจึงได้หันมาสนใจหาสารกันเสียธรรมชาติ (nature preservative) มาใช้ทดแทน โดยแบคทีเรียแลกติกเป็นจุลชีพชนิดหนึ่งที่มีความสามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในการผลิตสารกันเสียธรรมชาติ

2.2 สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติก

2.2.1 กรดอินทรีย์ (organic acid)

โดยทั่วไปกรดอินทรีย์ต่างๆ ที่ได้จากขบวนการหมัก เช่น กรดแลกติก กรดอะซิติก กรดโพรพิโอนิก และกรดบิวทาริก (บัญญัติ, 2543) โดยกรดอินทรีย์เหล่านี้จะทำให้ค่าพีเอชของอาหารลดลง จึงสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ แต่จุลินทรีย์บางชนิดก็สามารถทนต่อกรดอินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียแลกติก (ปาริชาติ และพงศ์ศักดิ์, 2543)

โดยทั่วไปจุลินทรีย์จะมีระบบในการรักษาระดับความแตกต่างของพีเอชภายในเซลล์ต่อพีเอชภายนอกเซลล์ ดังนั้นเมื่อสภาวะที่เป็นกรดค่อนข้างสูงจุลินทรีย์ไม่สามารถรักษาระดับความแตกต่างของพีเอชได้ กรดจะทำลายสารอินทรีย์ต่างๆ ภายในเซลล์ ซึ่งส่งผลต่อการทำลายผนังเซลล์ และเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์ ทำให้คุณสมบัติในการผ่านเข้า-ออกของเซลล์สูญเสียไป ส่งผลให้ไอออนต่างๆ สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้ เมื่อรวมกับกรดนิวคลีอิค หรือโปรตีนทำให้ไม่สามารถทำงานได้ตามปกติ นอกจากนี้เมื่อคุณสมบัติในการผ่านเข้า-ออกของเซลล์เมมเบรนสูญเสียไป กรดสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ลดต่ำลง ส่งผลให้เอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์ถูกทำลายไป การดำรงชีวิตของจุลินทรีย์จะหยุดชะงัก

2.2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

แบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ในสภาวะที่มีออกซิเจน การที่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้นั้น เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความสามารถในการรับอิเลคตรอน และโปรตรอนภายในเซลล์แบคทีเรียได้สูง เมื่อทำปฏิกิริยากับอิเลคตรอน และโปรตรอนทำให้เกิด hydroxy radicle ($OH^{\bullet}$) ในเซลล์ ซึ่งสารนี้มี

ความเป็นพิษสูง ทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการผ่านเข้า-ออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่างๆ เสียไป เซลล์จึงถูกทำลาย นอกจากนี้อาจทำให้เกิด hydroxy ion (OH^-) สามารถทำปฏิกิริยารุนแรงกับไฮโดรเจนไอออน (H^+) ของโปรตีน มีผลทำให้เกิดการทำลายชีวโมเลกุลต่างๆ ภายในเซลล์เช่น โปรตีน และกรดนิวคลีอิก (บัญญัติ, 2543)

2.2.3 ไดอะซิติล (diacetyl)

ไดอะซิติล หรือ 2,3 – butanedione เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของไพรูเวท (pyruvate) ทั้งแบบใช้ออกซิเจน และไม่ใช้ออกซิเจน แบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างไดอะซิติลได้จะต้องสามารถหมักซิเตรท (citrate) ได้ ไดอะซิติลเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค และเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียโดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

ไดอะซิติลเป็นสารที่ให้กลิ่นหอม ซึ่งเป็นกลิ่นที่มีอยู่ในอาหารหมักหลายชนิด เช่น เนย ไวน์แดง ไวน์ขาว บรั่นดี และกาแฟ ความเข้มข้นของไดอะซิติลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในอาหารได้โดยทั่วไปจะมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ความเข้มข้นของไดอะซิติลในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป ถึงแม้ว่าไดอะซิติลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นได้ แต่ก็ต้องใช้ในปริมาณที่ค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารระเหยที่ให้กลิ่นหอม ดังนั้นจึงไม่นิยมนำไปใช้ถนอมอาหาร (food preservation) แต่นิยมใช้เป็นสารกีดกั้นเชื้อ (aseptic agent) ในการทำความสะอาดภาชนะ หรือเครื่องมือเครื่องใช้ต่างๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร

2.2.4 อะเซทาลดีไฮด์ (acetaldehyde)

อะเซทาลดีไฮด์ เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตโดยจุลินทรีย์ในกลุ่ม heterofermentative lactic acid bacteria ซึ่งในที่สุดก็จะถูกเปลี่ยนไปเป็นเอทานอลโดยเอนไซม์ alcohol dehydrogenase ถ้าแบคทีเรียแลกติกขาดเอนไซม์ alcohol dehydrogenase หรือเอนไซม์นี้ถูกกดการสร้างจะทำให้มีอะเซทาลดีไฮด์หลั่งออกมานอกเซลล์

อะเซทาลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1-100 ppm สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในอาหารได้ เช่น *E. coli* , *Salmonella typhinurium* และ *S. aureus* เนื่องจากในอาหารที่เติมแบคทีเรียแลกติกจะมีปริมาณอะเซทาลดีไฮด์ค่อนข้างน้อย เช่น ในโยเกิร์ตพบประมาณ 25 ppm เท่านั้น ดังนั้นบทบาทในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของอะเซทาลดีไฮด์จึงน้อยมาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2.5 รูเทอริน (reuterin)

รูเทอริน เป็นสารที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลีเซอรอล (glycerol) ซึ่งสร้างจากแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus reuteri* มีคุณสมบัติที่สำคัญคือ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำได้ แต่ไม่ใช่โปรตีนเพราะไม่ถูกทำลายโดย proteolytic enzyme

ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยรูเทอรินมีค่อนข้างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ยีสต์ รา และโปรโตซัว แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยรูเทอรินได้แก่ *Salmonella* , *Shigella* , *Clostridium* , *Staphylococcus* และ *Listeria* โดยรูเทอรินจะไปมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิดเช่น ribonucletide reductase จึงทำให้การสังเคราะห์ DNA เสียไป ดังนั้นรูเทอรินจึงน่าจะนำไปประยุกต์ใช้ในกระบวนการถนอมอาหาร (ปาริชาติ และพงศ์ศักดิ์, 2543)

2.2.6 แบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน เป็นสารต้านแบคทีเรียชนิดหนึ่ง เป็นโปรตีน หรือสารประกอบของโปรตีน เช่น lypocarbohydrate protein หรือ glycoprotein มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย จึงเป็นอีกแนวทางในการเลือกใช้เป็นสารกันเสียธรรมชาติ (biopreservation) (Hanlin, 1993) ทำให้เก็บรักษาอาหารไว้ได้ในระยะเวลายาวนานขึ้น แบคเทอริโอซินแต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียได้ต่างกัน โดยส่วนใหญ่มักยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล หรือสปีชีส์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้น

การตั้งชื่อแบคเทอริโอซินจะแตกต่างกันโดยจะใช้ชื่อสปีชีส์ (species) ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินเป็นส่วนแรกและตามด้วยคำว่า "ซิน" (cin) ต่อท้ายชื่อสปีชีส์ของแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้น เช่น *Escherichai coli* ผลิต โคลิซิน (colicin) , *Klebsiella pneumoniae* ผลิต นิวโมซิน (pneumocins) และ *Enterobacter aerogenes* ผลิต แอร์โรซิน (aerocins) เป็นต้น (Hamom, 1988)

ไนซิน (Nisin) เป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่งที่สร้างจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเป็นที่ยอมรับของ Food and Drug Administration (FAD) และ World Health Organization (WHO) นับตั้งแต่ปีค.ศ. 1969 เป็นต้นมาจนถึงปัจจุบันมีมากกว่า 50 ประเทศทั่วโลกใช้ไนซินเป็นสารถนอมอาหาร ไนซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา อาหารที่นิยมเติมไนซิน เช่น เนย นม โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ อาหารประเภทปลา และผักบรรจุกระป๋อง (ปาริชาติ และพงศ์ศักดิ์, 2543)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. องค์ประกอบ โครงสร้าง การผลิต และกลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

3.1 องค์ประกอบ และโครงสร้างของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่มีโครงสร้างซับซ้อนและแสดงออกอย่างจำเพาะเจาะจง มีมวลโมเลกุลประมาณ 40,000-90,000 โมเลกุลของแบคเทอริโอซินประกอบไปด้วยกรดอะมิโนหลายร้อยตัวมาต่อกันแบบ linear chain ไม่มีพันธะไฮโดรเจนและ disulphide bridge (-s-s) (Hamon, 1988)

โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน

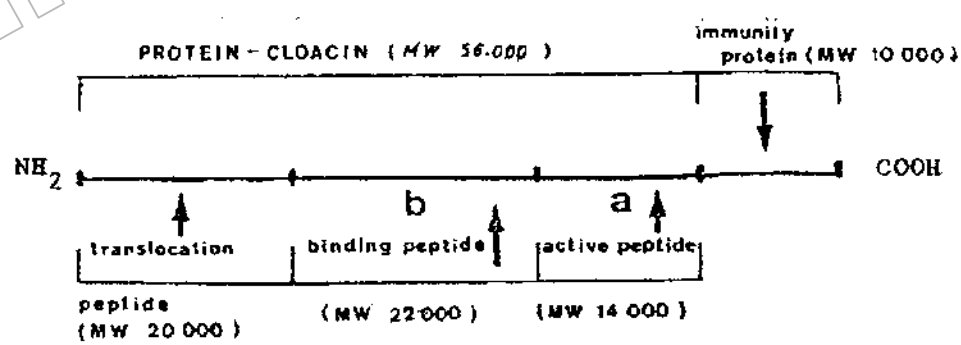
ประกอบด้วย linear chain ของกรดอะมิโน 4 ตำแหน่ง ซึ่งแต่ละตำแหน่งมีหน้าที่ แตกต่างกัน ดังแสดงในภาพที่ 2 ดังนี้

1. binding peptide (b) ทำหน้าที่ช่วยให้โมเลกุลของแบคเทอริโอซิน (colicin A, E_1, E_2 ,E_3 K และ cloacin DF13) ดูดซับที่ receptor บนผิวของแบคทีเรีย มีมวลโมเลกุลประมาณ 22,000-39,000

2. active peptide (a) ทำหน้าที่ทำลายแบคทีเรียโดยจะตอบสนองการทำงานของ colicin A, E_1, E_2 ,E_3 , K และ cloacin DF13 peptide ของ colicin E_2 ที่ความเข้มข้นต่ำๆ จะยับยั้งการสังเคราะห์ DNA และชักนำให้ DNA แตกสลาย peptide ของ colicin E_3 และ cloacin DF13 จะยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน peptide ของ colicin A, E_1,K จะไปกระตุ้นการยับยั้งการสังเคราะห์ macromolecules พวก DNA , RNA , Protein และ glycogen มีมวลโมเลกุลประมาณ 11,500-14,000

3. immunity protein (i) ทำหน้าที่จับกับ active peptide (a) อย่างจำเพาะเจาะจง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการทำลาย immunity protein (i) เหมือนกัน มวลโมเลกุลประมาณ 10,000

4. translocation (t) ช่วยให้มีการโยกย้ายสารเชิงซ้อนของ colicin E_2 และ cloacin DF13 ผ่านเข้าไปใน outer membrane ของแบคทีเรีย (Hamom, 1988)



ภาพที่ 2 โครงสร้างของแบคเทอริโอซิน

(ที่มา: Hamom, 1988)

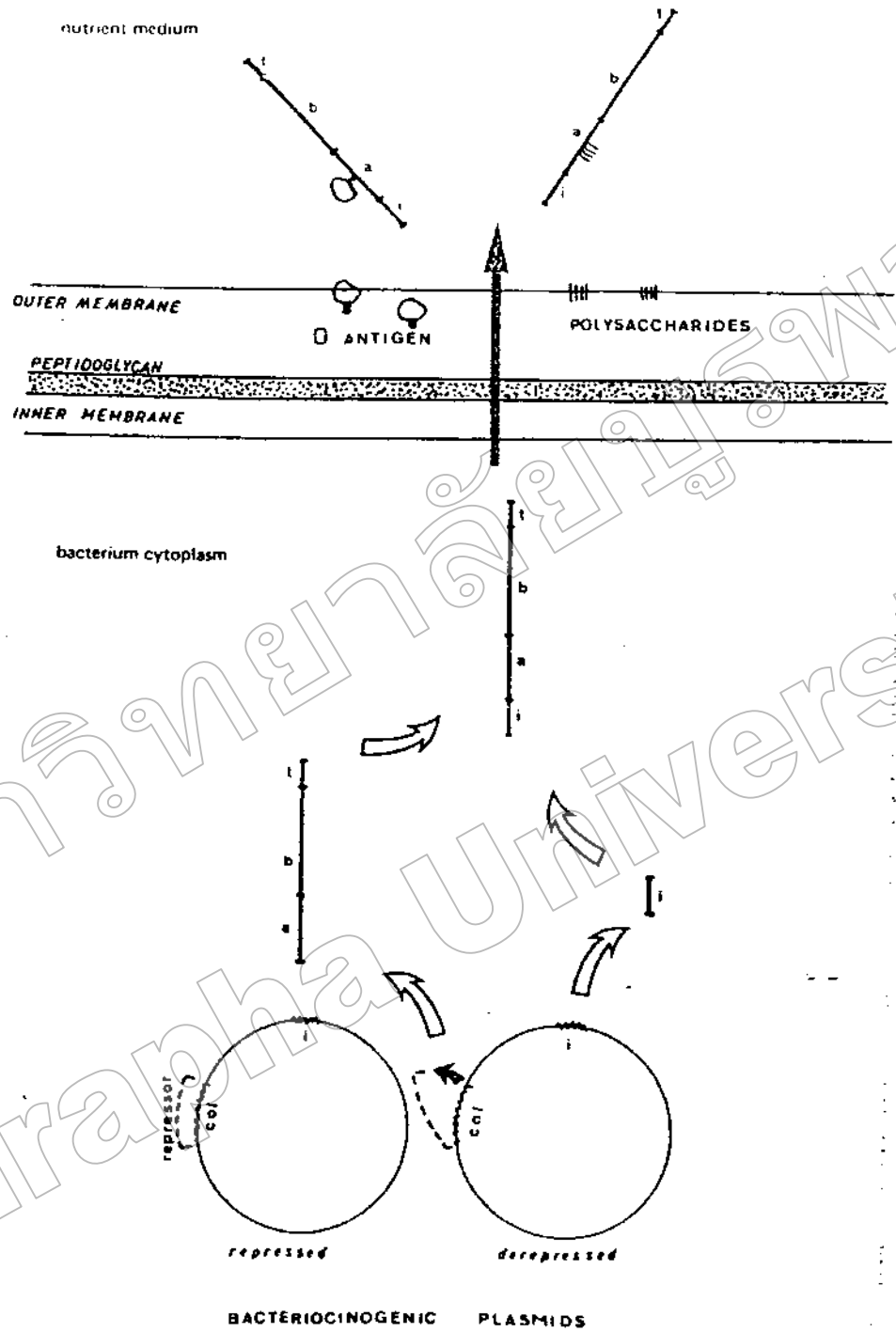
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.2 การผลิตแบคเทอริโอซิน

การสร้างแบคเทอริโอซินถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด (plasmid) โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินมี 2 ส่วน คือ structure gene และ repressor gene ดังแสดงในภาพที่ 3 โดย repressor gene จะกระตุ้นให้ structure gene ผลิตแบคเทอริโอซิน การสังเคราะห์แบคเทอริโอซินเป็นผลมาจากสภาพระงับ ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติของ structure gene หรือ ชักนำให้มีสภาพระงับโดยการใช้ metagenic หรือ carcinogenic agent เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ รังสียูวี รังสีเอ็กซ์ (Hamom, 1988)

ในแบคทีเรียที่ไม่ได้ถูกระงับการสร้างแบคเทอริโอซิน ยีนที่ทำหน้าที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin gene) และ immunity gene จะทำหน้าที่ผลิตโปรตีน โดยปกติแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นจะถูกปล่อยในไซโตพลาสซึมต่อจากนั้นจะรวมกับ immunity gene ในอัตราส่วน 1 โมเลกุลของโปรตีนแบคเทอริโอซิน (t-b-a) ต่อ 1 โมเลกุลของ immunity protein (i) ได้เป็นโมเลกุลเชิงซ้อน (t-b-a-i) ผ่าน inner menbrane เข้าไปสะสมใน periplasmic space และแพร่ไปถึงบริเวณผิวหน้าแบคทีเรียโดยรวมกับ o-antigen หรือ polysaccharide ของ outer membrane ได้ crude bacteriocin และถูกขับออกสู่ภายนอกเซลล์ดังแสดงในภาพที่ 3 (Hamom, 1988) อย่างไรก็ตามกระบวนการผลิตแบคเทอริโอซินอาจขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆ อย่าง เช่น ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสปริมาณต่ำ พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนในการเจริญ (Hanlin, 1993)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



<u>ภาพที่ 3</u> การผลิตแบคเทอริโอซิน

(ที่มา: Hamorn, 1988)

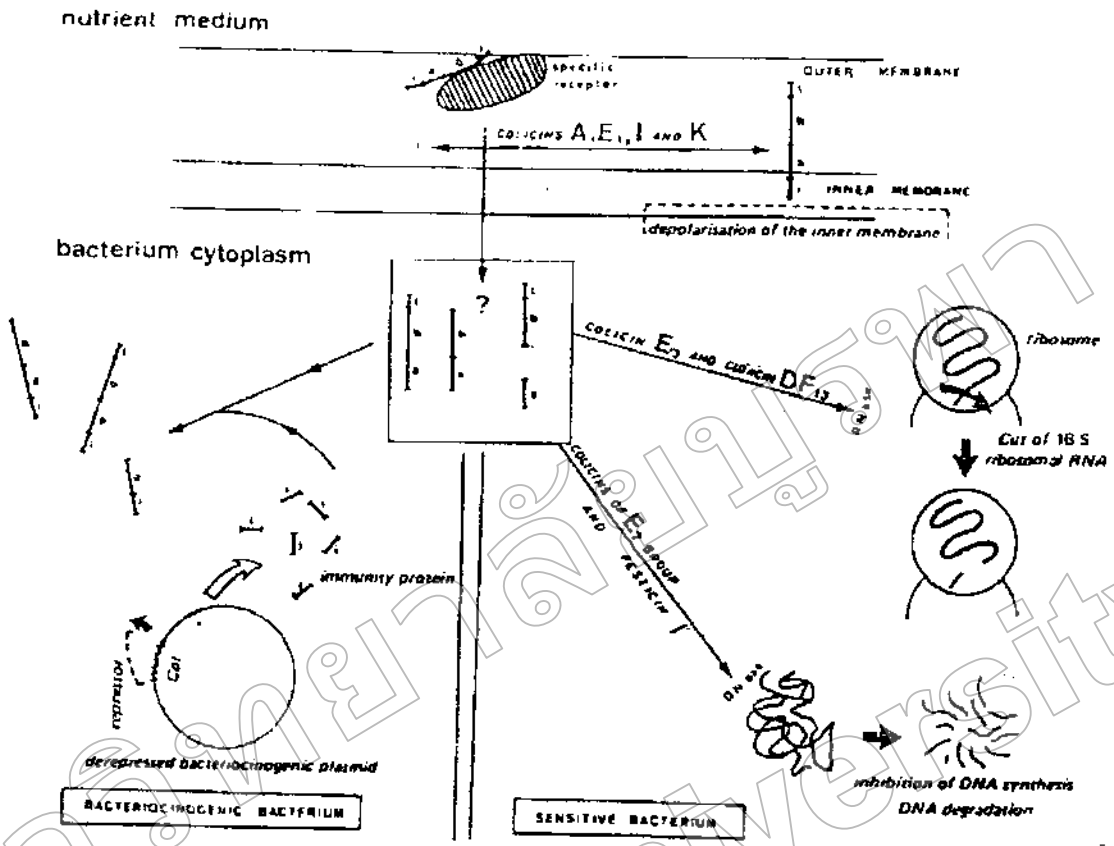
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3.3 กลไกการออกฤทธิ์

โมเลกุลของแบคเทอริโอซินถูกควบคุมด้วยระบบการทำงานมากมาย ซึ่งแต่ละส่วนของโมเลกุลจะทำงานแตกต่างกัน การที่แบคเทอริโอซินจะทำลายแบคทีเรียนั้นขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ที่ถูกกระตุ้นได้ง่ายภายหลังจากที่ homologous immunity protein ของแบคเทอริโอซินดูดซับที่ receptor ที่จำเพาะบนเซลล์แบคทีเรีย (Hamom, 1988) ซึ่งแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่มักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล หรือสปีชีส์ใกล้เคียงกันกับเชื้อจุลินทรีย์ที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้น (ปาริชาติ และพงศ์ศักดิ์, 2543) กระบวนการทำลายแบคทีเรียแบ่งเป็น 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรก แบคเทอริโอซินจะดูดซับกับ receptor อย่างจำเพาะเจาะจงกับ outer membrane ของแบคทีเรียที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซินนั้น ขั้นที่ 2 แบคเทอริโอซินจะเกิดการ translocated ผ่าน inner membrane ไปสัมผัสกับโครงสร้างที่เฉพาะเจาะจงภายในเซลล์ เช่น โครโมโซม (chromosome) หรือไรโบโซม (ribosome) ด้วยเอนไซม์ DNase และ RNase ทำให้เซลล์แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์โปรตีนได้ ดังแสดงในภาพที่ 4 (Hamom, 1988) การออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินในการทำลายแบคทีเรียมีปัจจัยที่จำเป็นหลายอย่าง เช่น receptor ที่มีความจำเพาะลักษณะทั่วไปทางเคมีของ receptor และสภาวะในการดูดซับที่ receptor (Schillinger, 1990)

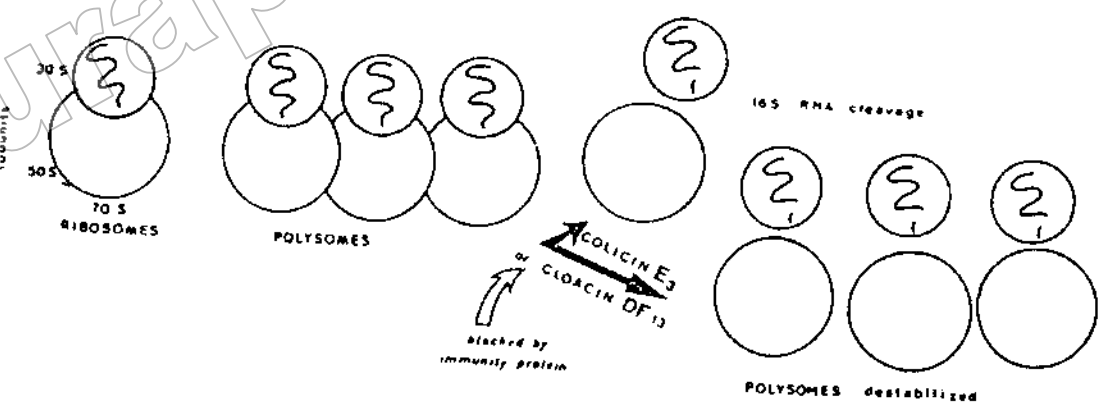
กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินมี 4 domain คือ t-a-b-i ซึ่งการแสดงออกของแบคเทอริโอซินจะแตกต่างกัน 3 แบบ ตามลักษณะของ peptide คือ (1). peptide ของ colicin A, E, I, และ K จะทำลายแบคทีเรียเมื่อจับกับ inner membrane (2). peptide ของ colicin E_3 และ cloacin DF13 จะทำลายแบคทีเรียโดยทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ตัดที่ 16 s ribosomal RNA (3). peptide ของ colicin กลุ่ม E_2 และ pesticin จะทำลายแบคทีเรียโดยทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ย่อยสลาย DNA ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินนั้น สรุปรวมได้ดังแสดงในภาพที่ 5 (Hamom, 1988)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



<u>ภาพที่ 4</u> กลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซิน

(ที่มา: Hamom, 1988)



<u>ภาพที่ 5</u> การยับยั้งการสังเคราะห์ ribosomal RNA โดย colicin E_3 และ cloacin DF13

(ที่มา: Hamom, 1988)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. รายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ยุภารัตน์ และคณะ (2541) ได้ทำการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียแลกติก จำนวน 102 ไอโซเลท ที่แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยว และหม่ำ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบซึ่งได้แก่ *Bacillus subtilis* ATCC 6633 , *Escherichia coli* ATCC 25922 , *Staphyloccus aureus* ATCC 29523 , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27583 และ *Proteus vulgaris* ATCC 13315 โดยวิธี swab paper disc พบแบคทีเรียแลกติก 96 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบได้ และเมื่อนำ supernatant ของแบคทีเรียทั้ง 96 ไอโซเลท มาทำการ neutralize ด้วย 1 N NaOH พบว่าทั้ง 96 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยแบคทีเรียแลกติกนั้นเป็นผลเนื่องมาจากการสร้างกรดอินทรีย์

ปาริชาติ และพงศ์ศักดิ์ (2543) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบคือ *Leuconostoc mesenteroides* TSITR 473 โดยพบแบคทีเรียแลกติก 3 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ เมื่อนำ supernatant ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 3 ไอโซเลท มาเติมเอนไซม์ proteinase K พบว่าทั้ง 3 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ซึ่งแสดงว่าสารต่อต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นสารประเภทโปรตีนโดยทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถเทียบเคียงได้เป็น *Pediococcus* 1 ไอโซเลท และ *Lactobacillus* 2 ไอโซเลท

ธิดาทิพย์ และคณะ (2544) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* ATCC 26523 โดยพบแบคทีเรียแลกติก 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้ง *L. mesenteroides* และ 7 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 9 ไอโซเลท ไปยืนยันความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* และ *S. aureus* โดยวิธี spot-on-lawn และวิธี swab paper disc พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลท เท่านั้นที่สามารถยับยั้ง *L. mesenteroides* ได้ทั้งวิธี spot-on-lawn และวิธี swab paper disc ในขณะที่อีก 7 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้เฉพาะวิธี spot-on-lawn เท่านั้น และพบว่า supernatant ของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้ง *L. mesenteroides* จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ pepsin และ proteinase K เมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ดังกล่าวไปเทียบเคียง พบว่าเป็น *Streptococcus* ทั้ง 2 ไอโซเลท

Schillinger และ Karllucke (1989) ได้ทำการศึกษาหาสารต้านจุลินทรีย์จากแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อ และผลิตภัณฑ์เนื้อ พบ *Lactabacillus* 221 สายพันธุ์ ซึ่งจำแนกได้เป็น *L. sake* 142 สายพันธุ์ , *L. plantarum* 4 สายพันธุ์ และ *L. curvatus* 75 สายพันธุ์ เมื่อศึกษาความสามารถใน

การยับยั้งการเจริญของ lactobacilli ที่นำมาเป็นแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี agar spot พบ *L. sake* 19 สายพันธุ์ , *L. plantarum* 3 สายพันธุ์ และ *L. curvatus* 1 สายพันธุ์ ที่ยับยั้ง lactobacilli ได้ และเมื่อนำ supernatant ของ *L. sake* 19 สายพันธุ์ ไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ พบว่าสารประกอบที่ผลิตจาก *L. sake* Lb 706 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และแบคทีเรียแลกติกหลายชนิด เมื่อศึกษาสารประกอบดังกล่าว พบว่าเป็นสารประกอบโปรตีนที่ทนความร้อนสูง ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวเป็นคุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน จึงได้ตั้งชื่อสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *L. sake* Lb 706 นี้ว่า sakacin A

Daba และคณะ (1991) พบว่า *L. mesenteroides* ที่แยกได้จากเนยแข็งสามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า mesenterocin 5 โดยสารดังกล่าวสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลกติกชนิดอื่นที่นำมาทดสอบได้ ซึ่งสารต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวนี้เป็นสารประกอบประเภทโปรตีนโดยถูกทำลายด้วยเอนไซม์ pronase และมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที แต่ถูกทำให้เสียสภาพโดย chloroform เมื่อนำ *L. mesenteroides* ไปกระตุ้นให้เกิดการกลายพันธุ์ด้วย acriflavine พบว่าสายพันธุ์ที่กลายพันธุ์ไปจะสูญเสียความสามารถในการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยไม่สามารถสร้างวงใสการยับยั้ง (inhibition zone) ต่อ *L. monocytogenes* ได้เมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่ได้ถูกกลายพันธุ์

Lewus และคณะ (1991) พบแบคทีเรียแลกติก 10 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากเนื้อชนิดตัดขายปลีกซึ่งทั้ง 10 สายพันธุ์ รวมกับแบคทีเรียแลกติกอื่นอีก 11 สายพันธุ์ ถูกนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำซึ่งได้แก่ *L. monocytogenes* 4 สายพันธุ์ , *Aeromonas hydrophila* 2 สายพันธุ์ และ *S. aureus* 2 สายพันธุ์ โดยในการทดสอบจะจำกัดผลของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ bacteriophage จากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 10 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากเนื้อชนิดตัดขายปลีกมี 8 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ทั้ง 4 สายพันธุ์ และเมื่อนำสารยับยั้งดังกล่าวมาทดสอบความไวต่อ proteolytic enzyme พบว่าถูกทำลายด้วย proteolytic enzyme ซึ่งคุณสมบัติดังกล่าวนี้เป็นคุณสมบัติของแบคเทอริโอซิน

Conzatez และคณะ (1994) ได้ทำการคัดเลือก lactobacilli ที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก *Lactobacillus* 75 สายพันธุ์ โดยวิธี agar spot พบ *Lactobacillus* 10 สายพันธุ์ (*L. plantarum* 9 สายพันธุ์ และ *L. sake* 1 สายพันธุ์) ที่สามารถยับยั้ง lactobacilli ที่นำมาทดสอบ โดยศึกษาในสภาวะที่จำกัดผลของกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อนำ supernatant ของ *Lactobacillus* ทั้ง 10 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี agar well diffusion พบว่ามีเพียง 3 สายพันธุ์ ของ *L. plantarum* (NCDO 1193 , C3.8 และ LL 441)

เท่านั้นที่สามารถสร้าง inhibition zone ได้ โดยสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *L. plantarum* ทั้ง 3 สายพันธุ์ จะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ protease

Farias และคณะ (1994) พบว่า Enterococci 4 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากเนยแข็งในอาร์เจนตินาสามารถผลิตแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลกติกหลายสายพันธุ์ ซึ่ง enterocin CRL 35 ที่ผลิตโดย *E. faecium* CRL 35 สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหาร เช่น *L. monocytogenes* และ *S. aureus* เมื่อศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งดังกล่าวพบว่าเป็นสารที่ไวต่อเอนไซม์ protease ทนความร้อนสูง และมีความเสถียรหลัง 4 ชั่วโมง เมื่อถูกปรับให้มีพีเอชเป็น 2 7 และ 10 ที่อุณหภูมิห้อง

Mary และคณะ (1994) ได้ศึกษาถึงประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียแลกติก 2 ชนิด คือ pediocin AcH จาก *Pediocin acidilactici* H และ nisin จาก *L. lactis* subsp. lactis (ATCC 11454) โดยศึกษาประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว และนำ 2 ชนิดมารวมกันในการต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวกหลายสายพันธุ์รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และเชื้อที่ก่อโรคในอาหาร พบว่าเมื่อนำ pediocin AcH และ nisin มาร่วมกันในการต่อต้านแบคทีเรียทดสอบจะสามารถต่อต้านแบคทีเรียทดสอบได้หลายสายพันธุ์กว่าการใช้ pediocin AcH หรือ nisin ชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงชนิดเดียว โดยสามารถต่อต้านได้ทั้งเซลล์ และสปอร์ของแบคทีเรีย

Stauber และ Scherer (1994) พบว่า *Brevibacterium linens* M18 ที่แยกได้จากชีส สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Listeria* sp. , *Coryneform* และแบคทีเรียแกรมบวกต่างๆ ที่นำมาทดสอบ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาทดสอบได้ เมื่อนำสารยับยั้งดังกล่าวไปทดสอบคุณสมบัติพบว่าจะถูกทำลายด้วย proteolytic enzyme แต่ไม่ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ nuclease, lipase, catalase , α-amylase และ papain โดยยังคงมีความเสถียรที่พีเอช 3-12 และพบว่า activity ของสารยับยั้งดังกล่าวจะเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิ โดยยังคงมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 40-50 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นาน 1 ปี ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 4 วัน แต่ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จะสูญเสีย activity และที่อุณหภูมิห้อง activity จะลดลงอย่างรวดเร็ว หลัง 1-2 วัน โดยได้ตั้งชื่อสารยับยั้งดังกล่าว ที่ผลิตจาก *B. linens* M18 ว่า linocin M18

Pilet และคณะ (1995) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากผลิตภัณฑ์ปลา พบแบคทีเรียแลกติก 22 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ โดยพบว่าสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *Carnobacteria divergens* V41 และ *Carnobacteria piscicola* V1 สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *L. innocua* ทุกสายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ แต่สารต่อต้าน

จุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *C. divergens* V41 สามารถต่อต้านแบคทีเรียแลกติกได้มากกว่าที่ผลิตจาก *C. piscicola* V1 โดยสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *Carnobacteria* ทั้ง 2 สายพันธุ์ จะถูกทำลายด้วย proteolytic enzyme และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที โดยได้ตั้งชื่อสารต่อต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *C. piscicola* V1 และ *C. divergens* V41 ว่า piscicocin V1 และ divercin V41 ตามลำดับ

Mulet และคณะ (1998) ได้ศึกษาถึง activity ของการนำแบคเทอริโอซิน (nisin , pediocin AcH , lacticin 481 , lactacin F และ lactacin B) แต่ละชนิดมาจับคู่ร่วมกันในการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ 10 สายพันธุ์ ซึ่งทำการศึกษาทั้งในอาหารแข็ง และอาหารเหลว ผลการทดลองที่ได้มีทั้งการเสริมฤทธิ์กัน ไม่มีผลต่อกัน และต่อต้านกันของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ โดยพบว่า lacticin 481 ให้ผลการต่อต้านเมื่อนำไปรวมกับแบคเทอริโอซินชนิดอื่นเป็นส่วนใหญ่ ในขณะที่ pediocin AcH ให้ผลการเสริมฤทธิ์กันเมื่อนำไปรวมกับแบคเทอริโอซินชนิดอื่นเป็นส่วนใหญ่ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้เป็นแนวทางในการนำแบคเทอริโอซินมากกว่า 1 ชนิดมารวมกัน และนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียธรรมชาติต่อไป

Yildirim และ Johnson (1998) ได้ทดสอบความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Bifidobacterium bifidum* 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. bifidum* ATCC 11863 , *B. bifidum* ATCC 29521 , *B. bifidum* NCF 1453 , *B. bifidum* NCFB 1454 และ *B. bifidum* NCFB 1455 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มี cysteine 0.05 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีเพียง *B. bifidum* NCFB 1454 สายพันธุ์เดียวที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารเหลวออกมายับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Bacillus, Enterococcus, Leuconostoc Lactobacillus, Pediococcus* และ *Listeria* แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆที่นำมาทดสอบได้ และพบว่าสารต่อต้านจุลินทรีย์ดังกล่าวจะถูกทำลายด้วย proteolytic enzyme และยังมีความเสถียรที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 , 30 และ 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที พร้อมกันนั้นได้ตั้งชื่อแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *B. bifidum* NCFB 1454 นี้ว่า bifidocin B

Jane และ Johnson (1999) พบแบคเทอริโอซิน 2 ชนิดจากแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากจากกระเทียมและขิง โดยพบ leucocin BC2 จาก *L. mesenteroides* ที่แยกได้จากกระเทียม และพบ lactocin G13 จาก *L. lactis* ที่แยกได้จากขิง เมื่อนำแบคเทอริโอซินทั้ง 2 ชนิด ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี spot-on-lawn พบว่า leucocin BC2 สามารถยับยั้ง *Bacillus* , *Enterococcus* , และ *Listeria* เท่านั้น ในขณะที่ lactocin G13 สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้มากกว่า leucocin BC2 โดยสามารถยับยั้ง *Bacillus* , *Enterococcus* ,*Clostridium*

Leuconostoc, *S. aureus* และ *Listeria* ซึ่งแบคเทอริโอซินทั้ง 2 ชนิดมีคุณสมบัติเป็นสารประเภทโปรตีน โดยจะถูกทำลายด้วย proteolytic enzyme และพบว่าแบคเทอริโอซินทั้ง 2 ชนิด มีความเสถียรที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หรือที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

Pongsak และ Parichat (2000) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักดองภายใต้สภาวะที่จำกัดการผลิตกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 11 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 11 ไอโซเลทมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบพบว่ามีเพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถยับยั้ง *L. mesenteroides* TSITR 473 ได้ ไอโซเลทดังกล่าวเมื่อนำไปจัดจำแนกพบว่าเป็น *Lactobacillus lactis* subsp. lactis ซึ่งสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *L. lactis* subsp. lactis มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนที่ทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ *L. lactis* subsp. lactis และ activity ของแบคเทอริโอซิน พบว่า แบคเทอริโอซินจะถูกผลิตขึ้นในช่วง log phase และมี activity สูงสุดในช่วง stationary phase

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้แยกแบคทีเรียแลกติก

   อาหารหมักที่ใช้ ได้แก่

   1.1 ไส้กรอกเปรี้ยว

   1.2 แหนม

   1.3 อาหารทะเลหมักดองชนิดต่างๆ เช่น ปูดอง หอยแมลงภู่ดอง หอยนางรมดอง หอยแครงดอง และกั้งดอง

   1.4 ผักดองชนิดต่างๆ เช่น ผักกาดดอง ขิงดอง กระเทียมดอง หน่อไม้ดอง ผักกาดเขียวดอง ผักเสี้ยนดอง และมะกอกดำดอง

   1.5 ผลไม้ดองชนิดต่างๆ เช่น องุ่นดอง มะม่วงดอง มะยมดอง มะดันดอง มะกอกดอง กระท้อนดอง พุทซาดอง และระกำดอง

   สุ่มเก็บตัวอย่างจากบริเวณตลาดหนองมน อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จำนวนรวม 22 ตัวอย่าง

2. แบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ (indicator organism)

   แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ หรือแบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ ได้แก่

   2.1 *E. coli*

   2.2 *S. aureus*

   2.3 *Salmonella* spp.

   2.4 *L. mesenteroides* TSITR 473

   แบคทีเรียทดสอบเหล่านี้ได้รับจาก ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สำนักวิทยบริการ มหาวิทยาลัยบูรพา
๑ ตุลาคม ๒๕๔๕

3. สารเคมี

3.1 ชุดย้อมสีแกรม

3.1.1 crystal violet

3.1.2 gram iodine

3.1.3 decolorizer agent

3.1.4 safranin

3.2 3 เปอร์เซ็นต์ Hydrogenperoxide

3.3 Motility test

3.4 protease

3.5 pronase E

3.6 0.5 Mc Farland

3.7 0.85 เปอร์เซ็นต์ sodium chloride (NaCl)

3.8 6.5 เปอร์เซ็นต์ sodium chloride (NaCl)

3.9 40 เปอร์เซ็นต์ Bile

4. อาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 อาหารแข็ง MRS 0.2 เปอร์เซ็นต์กลูโคส (MRS 0.2% glucose agar)

4.2 อาหารเหลว MRS 0.2 เปอร์เซ็นต์กลูโคส (MRS 0.2% glucose broth)

4.3 อาหาร Nutrient broth

4.4 อาหาร Nutrient agar

5. อุปกรณ์

5.1 เครื่องปั่นเหวี่ยง (รุ่น HERMLE Z 323 K)

5.2 เครื่องตีปั่น (รุ่น AES 01021059)

5.3 anaerobic jar

5.4 micropipette พร้อม tip

5.5 หัวกรองสำเร็จรูปขนาด 0.45 ไมโครเมตร

0536
ป
ว๕๙๑
๒๕๔๕

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่าง และแยกแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria,LAB) จากอาหารหมักดอง
   1.1 เก็บตัวอย่างอาหารหมัก ได้แก่ ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม อาหารทะเลหมักดอง ผักดอง และผลไม้ดอง
   1.2 นำตัวอย่างอาหาร 25 กรัม ใส่ถุงปราศจากเชื้อ เติม 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water ปริมาตร 225 มิลลิลิตร
   1.3 นำตัวอย่างมาบดให้ละเอียดด้วยเครื่องตีปั่นได้ตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-1}
   1.4 ปิเปตตัวอย่างจากข้อ1.3 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอด 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ได้ตัวอย่างที่เจือจาง 10^{-2}
   1.5 เจือจางครั้งละ 10 เท่า เช่นเดียวกันในข้อ 1.4 จนได้ความเจือจางที่ต้องการ
   1.6 นำตัวอย่างที่ 10^{-4} 10^{-5} และ 10^{-6} มา spread plate โดย
      1.6.1 นำตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหาร MRS ที่มีกลูโคสเพียง 0.2 เปอร์เซ็นต์ (MRS 0.2% glucose) ใช้แท่งแก้วงอที่ฆ่าเชื้อแล้ว เกลี่ยตัวอย่างอาหารให้ทั่วผิวหน้าอาหาร
      1.6.2 รอจนผิวหน้าอาหารแห้งนำไปบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยทำการบ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง
   1.7 เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วนำมาทำการย้อมแกรม คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก และให้ผลการทดสอบเอนไซม์คะตาเลสเป็นลบ
   1.8 เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ที่ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลสใน MRS 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส ถ่ายเชื้อทุกๆ 15 วัน
2. การศึกษาลักษณะรูปร่าง และคุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้
   2.1 การย้อมสีแกรม (Gram strain)
      2.1.1 ใช้ลูปปราศจากเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ เกลี่ย (smear) ลงบนแผ่นสไลด์ ทิ้งให้แห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 2-3 ครั้ง
      2.1.2 หยด crystal violet ลงบนเชื้อที่เกลี่ยนาน 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง
      2.1.3 หยดสารละลาย iodine บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 1 นาที แล้วเททิ้ง
      2.1.4 ล้างสีออกด้วย alcohol 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 30 วินาที แล้วจึงล้างออกด้วยน้ำสะอาด
      2.1.5 หยด safranin บนเชื้อที่เกลี่ยนาน 30 วินาที แล้วล้างออกด้วยน้ำสะอาด

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.6 เช็ดแผ่นสไลด์ให้แห้ง โดยใช้กระดาษซับเบาๆ แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า

2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase test)

2.2.1 ใช้ลูปปราศจากเชื้อเขี่ยโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ป้ายลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด

2.2.2 หยด 3 เปอร์เซ็นต์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้

2.2.3 อ่านผลการทดสอบ

ผลบวก มีฟองก๊าซผุดขึ้นทันที

ผลลบ ไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น

3. การเตรียม culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติก

3.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกจากข้อ 1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ (0.2% glucose) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.3 นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำส่วนใสไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc

4. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc

4.1 เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบใน Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง

4.2 ปรับปริมาณแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ให้มีจำนวนประมาณ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร โดยใช้ 0.5 Mc Farland

4.3 นำ sterile swab ป้ายเป็นระนาบให้ทั่วจานเพาะเลี้ยง ทิ้งไว้ 2-3 นาที

4.3 นำ sterile paper disc ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร วางบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.4 หยดส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกที่เตรียมไว้ในข้อ 3 ปริมาตร 30 ไมโครลิตร บน paper disc

4.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4.6 ตรวจสอบโดยดูจากการวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) รอบๆ paper disc

4.7 การอ่านผล

ผลบวก มี inhibition zone ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางมากกว่าหรือเท่ากับ 7 มิลลิเมตร

ผลลบ มี inhibition zone ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 7 มิลลิเมตร

5. การศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติที่สร้าง inhibition zone ในข้อ 4 ในอาหารเหลว MRS ที่มีกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ (MRS 0.2% glucose) ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้กรองผ่านหัวกรองสำเร็จรูปขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร

5.1 การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความสามารถในการยับยั้ง

5.1.1 นำ culture supernatant ของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง inhibition zone ต่อแบคทีเรียทดสอบมาเติมเอนไซม์ proteinase และ pronase E โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.1.2 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

5.1.3 นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc เปรียบเทียบผลการยับยั้งกับชุดควบคุม

หมายเหตุ : ชุดควบคุม (control) คือ ส่วนใสที่ไม่ได้เติมเอนไซม์

5.2 การศึกษาผลของความร้อนที่มีต่อความคงตัวของสารยับยั้ง

5.2.1 นำส่วนใสของแบคทีเรียที่สามารถสร้าง inhibition zone ต่อแบคทีเรียทดสอบไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 , 20 และ 30 นาที

5.2.2 นำส่วนใสหลังให้ความร้อนไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc เปรียบเทียบผลการยับยั้งกับชุดควบคุม

หมายเหตุ : ชุดควบคุม (control) คือ ส่วนใสที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในข้อ 4 มาทำการศึกษาลักษณะต่างๆ เพื่อจัดจำแนกชนิด ดังนี้

6.1 ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาขั้นพื้นฐานโดยการย้อมสีแกรม

6.2 ทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมี ตามหลัก Bergey's manual of determinative bacteriology-9, (Holt, 1994)

- การจัดเรียงตัว
- Motility test
- Catalase test
- 6.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl
- 40 เปอร์เซ็นต์ Bile
- การสร้างแก๊สจากการหมักกลูโคส

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักดอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักดอง ได้แก่ ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเลหมักดอง ผลิตภัณฑ์จากผลไม้ดอง และผลิตภัณฑ์จากผลไม้ดอง จำนวนรวม 22 ตัวอย่าง โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสต่ำ คือ MRS 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose medium เพื่อจำกัดการผลิตกรดอินทรีย์ และบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 19 ไอโซเลท ให้สัญลักษณ์เป็น F1-F19 เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่แยกได้ไปย้อมแกรมพบว่า แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งมีรูปร่างหลายลักษณะดังนี้ คือ รูปร่างกลม (cocci) 14 ไอโซเลท รูปร่างท่อน (rod) 3 ไอโซเลท รูปร่างเป็นวงรี (ovoid) 1 ไอโซเลท และรูปร่างเป็นท่อนยาว (bacilli) 1 ไอโซเลท ดังแสดงในตารางที่ 1 เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ไปทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 19 ไอโซเลท ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส

<u>ตารางที่ 1</u> แสดงรูปร่างเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลทต่างๆ ที่แยกได้จากอาหารหมักดอง

สัญลักษณ์แบคทีเรียแลกติก	ตัวอย่างอาหาร	รูปร่าง	คะตาเลส
F1	มะยมดอง	cocci	-
F2	มะยมดอง	cocci	-
F3	มะดันดอง	cocci	-
F4	มะดันดอง	cocci	-
F5	มะม่วงดอง	cocci	-
F6	องุ่นดอง	cocci	-
F7	กระท้อนดอง	cocci	-

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 1 (ต่อ)

สัญลักษณ์แบคทีเรียแลกติก	ตัวอย่างอาหาร	รูปร่าง	คะตาเลส
F8	กระท้อนดอง	cocci	-
F9	แหนม	cocci	-
F10	ไส้กรอกเปรี้ยว	cocci	-
F11	หน่อไม้ดอง	cocci	-
F12	หอยแมลงภู่ดอง	rod	-
F13	ระกำดอง	rod	-
F14	ระกำดอง	cocci	-
F15	ผักเสี้ยนดอง	cocci	-
F16	ผักเสี้ยนดอง	rod	-
F17	ผักกาดเขียวดอง	cocci	-
F18	ผักกาดเขียวดอง	bacilli	-
F19	ผักกาดเขียวดอง	ovoid	-

หมายเหตุ : - หมายถึง ให้ผลการทดสอบเอนไซม์คะตาเลสเป็นลบ

ภาพที่ 6 แสดงรูปร่างของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab paper disc

จากการนำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองทั้ง 19 ไอโซเลท (F1-F19) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งได้แก่ *E. coli* , *Salmonella* spp. , *S. aureus* และ *L. mesenteroides* TSITR 473 โดยวิธี swab paper disc พบว่ามีเพียง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ที่แยกได้จากผักกาดเขียวดองเพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* ได้ สังเกตได้จากการเกิดวงใสการยับยั้ง (inhibition zone) รอบๆ paper disc โดย inhibition zone ที่สร้างจาก culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ต่อการยับยั้ง *L. mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* คือ 15 มิลลิเมตร และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 6-7 ตามลำดับ เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ถูกทดสอบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* ได้ ดังนั้นจึงเลือกไอโซเลทนี้ไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของบริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกทั้ง 19 ไอโซเลท ต่อการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ

สัญลักษณ์แบคทีเรียแลกติก	ตัวอย่างอาหาร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร)			
		L. mesenteroides TSITR473	*S. aureus*	*E. coli*	*Salmonella* spp.
F1	มะยมดอง	-	-	-	-
F2	มะยมดอง	-	-	-	-
F3	มะดันดอง	-	-	-	-
F4	มะดันดอง	-	-	-	-
F5	มะม่วงดอง	-	-	-	-
F6	องุ่นดอง	-	-	-	-
F7	กระท้อนดอง	-	-	-	-
F8	กระท้อนดอง	-	-	-	-

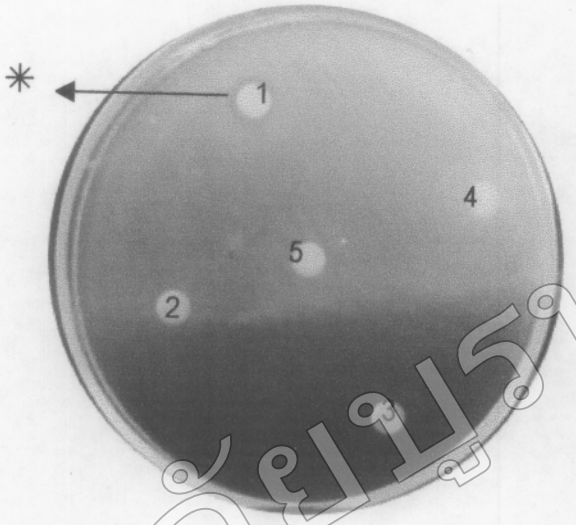
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2 (ต่อ)

สัญลักษณ์แบคทีเรียแลกติก	ตัวอย่างอาหาร	ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ inhibition zone (มิลลิเมตร)			
		L. mesenteroides TSITR473	*S. aureus*	*E. coli*	*Salmonella spp.*
F9	แหนม	-	-	-	-
F10	ไส้กรอกเปรี้ยว	-	-	-	-
F11	หน่อไม้ดอง	-	-	-	-
F12	หอยแมลงภู่ดอง	-	-	-	-
F13	ระกำดอง	-	-	-	-
F14	ระกำดอง	-	-	-	-
F15	ผักเสี้ยนดอง	-	-	-	-
F16	ผักเสี้ยนดอง	-	-	-	-
F17	ผักกาดเขียวดอง	-	-	-	-
F18	ผักกาดเขียวดอง	-	-	-	-
F19	ผักกาดเขียวดอง	15	10	-	-
				-	-

หมายเหตุ : - หมายถึง ไม่เกิด inhibition zone

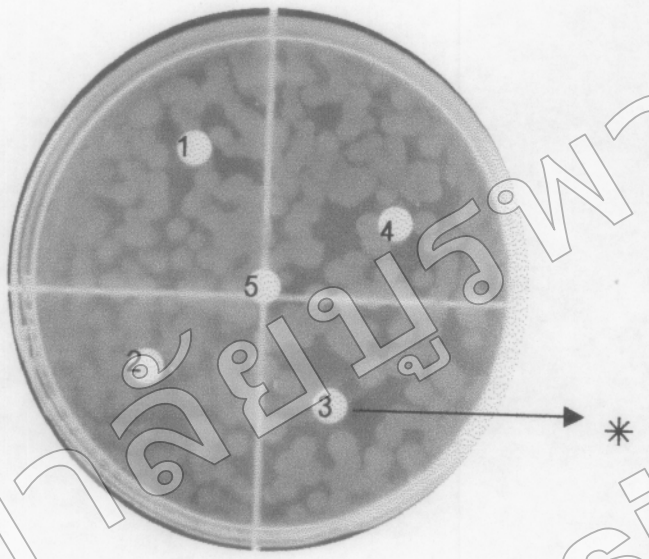
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



ภาพที่ 6 บริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ต่อการยับยั้ง *S. aureus* (✳)

หมายเหตุ : 1 หมายถึง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F 19
2 หมายถึง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F 18
3 หมายถึง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F 17
4 หมายถึง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F 16
5 หมายถึง control (MRS 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาพที่ 7 บริเวณยับยั้งการเจริญ (inhibition zone) ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ต่อการยับยั้ง *L. mesenteroides* TSITR473 (✳)

หมายเหตุ : 1 หมายถึง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F 17

2 หมายถึง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F 18

3 หมายถึง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F 19

4 หมายถึง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F 16

5 หมายถึง control (MRS 0.2 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส)

3. การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความสามารถในการยับยั้ง

เมื่อนำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR473 และ *S. aureus* มาเติมเอนไซม์ protease และ pronase E แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR473 และ *S. aureus* โดยวิธี swab paper disc พบว่า culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 หลังจากเติมเอนไซม์ protease และ pronase E และชุดควบคุม (culture supernatant ที่ไม่ได้เติมเอนไซม์ protease และ pronase E) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR473 และ *S. aureus* ได้โดยสังเกตจากไม่มี inhibition zone เกิดขึ้นรอบๆ paper disc

4. การศึกษาผลของความร้อนที่มีต่อความคงตัวของสารยับยั้ง

เมื่อนำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 มาศึกษาถึงการทนความร้อนของสารยับยั้งโดยนำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 , 20 และ 30 นาที แล้วนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR473 และ *S. aureus* โดยวิธี swab paper disc พบว่า culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 หลังจากให้ความร้อนและชุดควบคุม (culture supernatant ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR473 และ *S. aureus* ได้โดยสังเกตจากไม่มี inhibition zone เกิดขึ้นรอบๆ paper disc

5. การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

จากผลการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ดังแสดงในตารางที่ 3 แล้วนำผลดังกล่าวมาจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียสามารถจัดจำแนกได้เป็น *Streptococcus*

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 เพื่อทำการจัดจำแนกสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ได้เป็น *Streptococcus*

อภิปรายผลการทดลอง

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่พบได้มากในอาหารเช่น อาหารหมัก ผักสด ผลไม้ เครื่องดื่ม และ ผลิตภัณฑ์นม นอกจากนี้ยังพบได้ในร่างกายคน และสัตว์ด้วย เช่น ทางเดินอาหาร และทางเดินหายใจ แบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่มีบทบาทสำคัญในอุตสาหกรรมอาหารโดยนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเติมลงในอาหาร เพื่อช่วยปรับปรุงแต่งกลิ่น และรสชาติที่ดีให้เป็นที่นิยมของผู้บริโภค และยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์ และสารอื่นๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (ปาริชาติ และพงศ์ศักดิ์, 2542) จากการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจาก ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ผลิตภัณฑ์จากอาหารทะเลดอง ผลิตภัณฑ์จากผักดอง และผลิตภัณฑ์จากผลไม้ดองโดยในการคัดแยกจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสต่ำ คือ MRS 0.2 เปอร์เซ็นต์ glucose medium ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ช่วยลดการสร้างกรดอินทรีย์ ซึ่งยุภารัตน์และคณะ (2541) ได้รายงานไว้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียแลกติกสามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอน (carbon source) เพื่อสร้างกรดอินทรีย์ได้ในปริมาณมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และยังบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อยับยั้งการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 19 ไอโซเลท (F1-F19) เมื่อนำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 19 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ คือ *E. coli* , *Salmonella* spp. , *S. aureus* และ *L. mesenteroides* TSITR 473 โดยวิธี swab paper disc พบว่ามีเพียง culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ที่แยกได้จากผักกาดเขียวดองเพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* โดย inhibition zone ที่สร้างจาก culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ต่อการยับยั้ง *L mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* คือ 15 มิลลิเมตร และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ ซึ่งพงศ์ศักดิ์และปาริชาติ (2541) ได้รายงานไว้ว่า วิธี swab paper disc เป็นวิธีการอย่างง่ายในการตรวจหาแบคทีเรียที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน โดยเป็นวิธีที่ง่าย อุปกรณ์ที่ใช้มีราคาถูก และหาง่าย ซึ่งได้แก่ ไม้พันสำลี และแผ่นกระดาษกรอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของธิดาทิพย์ และคณะ (2541) ที่พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักสามารถยับยั้งการเจริญของ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

L. mesenteroides และ *S. aureus* โดยวิธี swab paper disc นอกจากนี้รายงานวิจัยของ Jane และ Johnson (1989) ยังกล่าวว่า *L. mesenteroides* ที่แยกได้จากกระเทียม สามารถยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc* , *Listeria* , *Enterococcus* , *Clostridium* , *Pediococcus* และ *S. aureus* โดยแบคเทอริโอซินส่วนใหญ่มักจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล หรือสปีชีส์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้น (ปาริชาติ และพงศ์ศักดิ์, 2543) ซึ่ง *S. aureus* จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และ *L. mesenteroides* TSITR 473 ก็เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติกเช่นกัน และเมื่อนำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 19 ไอโซเลท ซึ่งเป็นไอโซเลทที่สร้าง inhibition zone ต่อการยับยั้ง *L. mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* มาทดสอบความไวต่อ proteolytic enzyme โดยนำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 มาเติมเอนไซม์ proteinase และ pronase E ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่า culture supernatant หลังจากเติม proteolytic enzyme และชุดควบคุม (culture supernatant ที่ไม่ได้เติม proteolytic enzyme ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* โดยสังเกตจากไม่มี inhibition zone เกิดขึ้นรอบๆ paper disc และเมื่อนำ culture supernatant ของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 , 20 และ 30 นาที พบว่า culture supernatant หลังจากนำไปผ่านความร้อน และชุดควบคุม (culture supernatant ที่ไม่ได้ผ่านความร้อน) ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* ได้เช่นกัน จากผลการทดลองดังกล่าวนี้แสดงว่าในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจพบสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ในขั้นการทดสอบความไวต่อความร้อน และ proteolytic enzyme อาจเนื่องมาจากมีการสูญเสียความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ดังกล่าวไปในระหว่างการถ่ายเชื้อ ซึ่ง Hoover และ Streenson (1993) รายงานว่า การสร้างแบคเทอริโอซินจะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนพลาสมิด ถ้ามีการถ่ายเชื้ออย่างไม่สม่ำเสมอ อาจทำให้มีการสูญหายของพลาสมิดไปในรุ่นลูกหลาน ทำให้แบคทีเรียสูญเสียคุณสมบัติในการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินไป อีกทั้งในรายงานวิจัยของ Davey และ Pearce (1982) ที่กล่าวไว้ว่า อาจมีการสูญหายของพลาสมิด ที่ใช้ในการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินของ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ไปในระหว่างการถ่ายเชื้อ และเมื่อไม่มีการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ออกมา ทำให้ไม่สามารถทราบคุณสมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 จึงไม่อาจสรุปได้ว่า ความสามารถของแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ในการยับยั้ง *L. mesenteroides* TSITR 473 และ *S. aureus* มาจากผลของแบคเทอริโอซินเพราะคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่แตกต่างไปจากสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ คือมีคุณสมบัติเป็นสารพวกโปรตีนที่ทนความร้อนสูง (วิลาวัณย์, 2542) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ของ Yildirim และ Johnson (1998) ได้ศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโซซินที่ผลิตจาก *B. bifidum* NCFB 1454 พบว่าจะถูกทำลายด้วย proteolytic enzyme และสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส นาน 15 , 30 และ 60 นาที หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และยังสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Daba และคณะ (1989) ที่ได้ศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* พบว่าจะถูกทำลายด้วยเอนไซม์ pronase E และสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที และอีกสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ไม่สามารถพบสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 อาจเนื่องมาจาก แบคเทอริโอซินเป็นสาร secondary metabolite ที่เริ่มสร้างขึ้นในช่วงท้ายของ log phase จนถึงช่วง stationary phase (Pongsak and Parichat, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Faris และคณะ (1994) ที่กล่าวไว้ว่า *E. facelium* CRL 35 จะเริ่มสร้างแบคเทอริโอซินขึ้นในช่วง log phase และมี activity สูงสุดในช่วง stationary phase ส่วนรายงานวิจัยของ Daba และคณะ (1989) กล่าวไว้ว่า activity ของแบคเทอริโอซินจะลดลงอย่างรวดเร็วประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ หลังจากช่วง stationary phase เนื่องมาจากเกิดการแตกสลายของเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานวิจัยของ Yildirim และ Johnson (1998) ที่กล่าวว่า activity ของแบคเทอริโอซินจะลดลงประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ หลังจากช่วง stationary phase เพราะเชื้อแบคทีเรียอาจมีการผลิตเอนไซม์ endogenous extracellular protease ออกมามีผลในการทำลายแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน ซึ่งจากที่กล่าวมาทั้งหมดอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ไม่พบความสามารถของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 ในขั้นการทดสอบความไวต่อความร้อน และ proteolytic enzyme จากการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 โดยการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี สามารถจัดจำแนกได้เป็น *Streptococcus* เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท F19 มีรูปร่างเป็น ovoid ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่สามารถเจริญใน 6.5 เปอร์เซ็นต์ NaCl , 40 เปอร์เซ็นต์ Bile และมีคุณสมบัติเป็นพวก homofermentative คือไม่สร้างแก๊สจากการหมักกลูโคส โดยคุณสมบัติดังกล่าวนี้ทำให้แตกต่างจาก *Leuconostoc* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นพวก heterofermentative คือ สามารถสร้างแก๊สจากการหมักกลูโคส (Holt, 1994)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการเก็บตัวอย่างอาหารหมักดองให้มากกว่านี้
2. ควรมีการศึกษาถึงความสามารถของสารนี้ในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจากที่ใช้ในการทดลองนี้
3. ควรมีการถ่ายเชื้ออย่างสม่ำเสมอเพื่อรักษาคุณสมบัติในการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรีย
4. ควรมีการเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส เพื่อคงสภาพ และรักษาคุณสมบัติในการสร้างแบคเทอริโอซิน
5. ควรมีการศึกษาความสัมพันธุ์ระหว่างการเจริญของจุลินทรีย์ และ activity ของแบคเทอริโอซิน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เอกสารอ้างอิง

ธิดาทิพย์ วงศ์สุรวัฒน์, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ, ปาริชาติ พุ่มขจร และยุภารัตน์ เครือวงษา. 2544. ความสามารถของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักในการยับยั้งการเจริญของ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Staphylococcus aureus*. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 13(1): 48-56.

นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: พินนี่ พับลิชชิ่ง.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์. 2524. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์อาหาร. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. 2541. วิธีอย่างง่ายในการทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซิน. วารสารวิทยาศาสตร์ มข. 26(4): 281-288.

ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. 2542. การคัดเลือกเชื้อแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 11(2): 65-71.

ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. 2543. แลคติคแอสิดแบคทีเรีย: สารยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 12(3): 101-107.

ไพบูลย์ ธรรมรัตน์วาสิก. 2532. กรรมวิธีการแปรรูปอาหาร. กรุงทพฯ: โอเดียนสโตร์.

ไพโรจน์ วิริยจารี. 2534. วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการหมัก. ภาควิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

ยุภารัตน์ เครือวงษา, พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ และปาริชาติ พุ่มขจร. 2541. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 10(2): 88-95.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. กรุงทพฯ: โอเดียนสโตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2542. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. วารสารสงขลานครินทร์ ฉบับวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 22(2): 177-189.

ศิริโฉม ทุ่งเก้า. 2543. ปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

สุมาลี เหลืองสกุล. 2535. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

Atrih, A., Rekhif N., and Milliere, J.B. 1993. Detection and characterization of bacteriocin produced by Lactobacillus plantarum C19. Can Journal Microbial 39: 1173 – 1179.

Daba, H., Pandain, S., Gosselin, J.F., Simard, R.E., Huang J., and Lacroix, C. 1991. Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. Applied and Environmental Microbiology 57: 3450-3455.

Davey, G.P. and Pearce, L.E. 1982. Production of diplococcin by Streptococcus cremoris and is transfer to nonproduction group N streptococci. American Society for Microbiology: Washington, D.C.

Gonzalez, B., Arca, P., Baltasar, M. and Suarez, E. 1994. Detection, purification, and partial characterization of Plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. Applied and Environmental Microbiology 60: 2158-2163.

Hamon, Y. 1988. Bacteriocin: Handbook of natural toxin volume 4 : Bacterial toxins. New york: Marel Dekker.

Hanlin, M.B., Kalchayanand, N., Ray, P. and Ray, B. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacterial in combination have greater antibacterial activity. Journal of Food Protection 56: 252-255.

Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.A. and Stanley, JT. 1994. Bergey's manaul of determinative Bacteriology-9. Baltimore: Williams & Wilkins.

Hoover, G.D., and Steenson, R.L. 1993. Bacteriocin of lactic acid bacteria. London: Acedemic Press, Inc.

Janes, M.E., Nannapaneni, R. and Johnson M.G., 1999. Journal of Food Protection 62: 899-904.

Lewus, B. C., Kaiser, A. and Montville, J. T. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocin from lactic acid bacterial isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology 57: 1683-1688.

Maria, E. F., Aida, A.P., Ruiz, H. and Fernando, S. 1994. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheeses: inhibition of food brone pathogens. Journal of Food Protection 57: 1013-1015.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Pongsak, R. and Parichat, P. 2000. A bacteriocin by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from Thai fermented foods. Science Asia 26: 195-200.

Schillinger, U. and Lucke, F.K. 1989. Antibacterial of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Applied and Environmental Microbiology 55: 1901-1906.

Stauber, V. N. and Scherer, S. 1994. Isolation and characterization of Linocin M18, a bacteriocin produced by *Brevibacterim linens*. Applied and Environmental Microbiology 60: 3809-3814.

Wood, BJB. 1992. The lactic acid bacteria. London: Elsvier applied science.

Yildirim, Z. and Johnson, G.M. 1998. Characterization and antimicrobial spectrum of Bididocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. Journal of Food Protection 61: 47-51.

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยบูรพา
Burapha University

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

1. MRS (0.2% glucose) agar มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Tween – 80	1.0	มิลลิลิตร
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Manganese sulfate	0.1	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2. MRS (0.2% glucose) broth มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Tween – 80	1.0	มิลลิลิตร
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Manganese sulfate	0.1	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

3. Nutrient agar (NA) มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

4. Nutrient broth (NB) มีส่วนประกอบดังนี้

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

5. Sucrose Tryptone agar มีส่วนประกอบดังนี้

Sucrose	100.0	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

6. Sucrose Tryptone broth มีส่วนประกอบดังนี้

Sucrose	100.0	กรัม
Glucose	0.2	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. Motility test agar มีส่วนประกอบดังนี้

Peptone	9.0	กรัม
Agar	5.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ต้มจนละลายเป็นเนื้อเดียวกัน ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียสนาน 15 นาที

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ข

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. Gram's crystal violet มีสูตรดังนี้

สารละลาย A

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethyl alcohol	20	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
Distilled water	80	มิลลิลิตร

นำสารละลาย A และสารละลาย B ผสมเข้าด้วยกัน

2. Gram's iodine มีสูตรดังนี้

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
Distilled water	300	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน โดยเติมไอโอดีนหลังจากโปแตสเซียมไอโอไดด์ละลายหมดแล้ว

3. Gram's alcohol มีสูตรดังนี้

Ethyl alcohol	98	มิลลิลิตร
Acetone	2.0	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน

4. Gram's safranin O มีสูตรดังนี้

Safranin O (2.5% solution in 95% ethyl alcohol)	10.0	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมดผสมเข้าด้วยกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. Kovac's solution

Para-dimethyl-amino benzaldehyde	5.0	กรัม
Amyl or butyl alcohol	75.0	มิลลิลิตร
HCl, concentrate	25.0	มิลลิลิตร

ผสม para-dimethyl amino benzaldehyde กับ alcohol ใน water bath อุณหภูมิ 30-60 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที ขณะปล่อยให้เย็นริน HCl ลงไป เขย่าให้เข้ากันเก็บในขวดสีชาใส่ไว้ในตู้เย็น

6. 0.85% NaCl

NaCl	0.85	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

7. 6.5% NaCl

NaCl	6.5	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ละลาย NaCl ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

8. 0.5 McFarland มีส่วนประกอบดังนี้

1% sulfuric acid	0.05	มิลลิลิตร
1.175% barium chloride	9.95	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย 1% sulfuric acid และสารละลาย 1.175% barium chloride เข้าด้วยกัน ในหลอดฝาเกลียวขนาด 16×100 มิลลิลิตร แล้วเก็บในที่มืดระวังอย่าให้ถูกแสง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ภาคผนวก ค

Characteristics of genera of regular, nonsporing Gram-positive rods

Characteristics	*Brochothrix*	*Carnobacterium*	*Erysipelothrix*	*Lactobacillus*	*Listeria*
Cell morphology	Slender rods, often filaments	Slender straight rods	Slender rods, often filaments	Rods, usually straight sometime cocco-bacilli	Short rods often short chain and filaments
Diameter of rods (trichomes)	0.6-0.8	0.5-0.7	0.2-0.5	0.5-1.6	0.4-0.5
Motility (if motile, peritrichate flagella)	-	D	-	-	-
Strictly aerobe	-	-	-	-	-
Facultative anaerobe or microaerophillic	+	+	+	+	+
Catalase raction	+	-	-	-	+
Habitat	Meat products, nonpathogenic	Food products: one species is a pathogen of fish	Widespread, may be pathogenic in vertebrates	Widespread in fermentable materials, rarely pathogenic	Widespread in decaying matter, may be vertebrate pathogen

+ : 90% more strains are positive

- : 90% more strains are negative

D : substantial proportion of species differ

(ที่มา : Holt, 1994)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Gram positive cocci

Characteristics	*Aeromonas*	*Enterococcus*	*Lactococcus*	*Leuconostoc*	*Pediococcus*
Predominantarraangement of cell (other than single cell), most common appearance first	Tetrad, pair	Pair, chain	Pair, short chain	Pair, chain	Tetrad, some pair
Motility	-	d	-	-	-
Growth at:					
PH 9.6	+	+	-	ND	D
Growth with :					
6.5 % NaCl	+	+	-	d	D
40 % Bile	+	+	D	ND	D
Catalase reaction	-	-	-	-	-

+ : 90% more strains are positive

- : 90% more strains are negative

d : 11-89 % of strain are positive

V : strain instability (not equivalent to "d")

D : Different reaction in different taxa (species of genus or genera of family)

ND : not determined

(ที่มา : Holt, 1994)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Gram positive cocci

Characteristics	*Staphylococcus*	*Stomatococcus*	*Streptococcus*	*Trichococcus*	*Vagococcus*
Predominantarraangement of cell (other than single cell), most common appearance first	clusters	clusters, Pair	Pair, chain	Very long chain of coccoid or oval	Pair, short rods, short chains
Motility	-	-	-	-	d
Growth at:					
PH 9.6	ND	ND	D	ND	-
Growth with :					
6.5 % NaCl	+	-	D	ND	-
40 % Bile	D	-	D	ND	ND
Catalase reaction	+	+ weak	-	-	-

\+ : 90% more strains are positive

\- : 90% more strains are negative

d : 11-89 % of strain are positive

V : strain instability (not equivalent to "d")

D : Different reaction in different taxa (species of genus or genera of family)

ND : not determined

(ที่มา : Holt, 1994)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University