รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย สารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี (Novel antimicrobial agents from bacterial probiotics for controlling bacterial standard of dried and processed seafood products in Chon Buri Province)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2559A10802051
สัญญาเลขที่ 55/2559

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัย สารต้านจุลชีพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกเพื่อใช้ในการควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปในจังหวัดชลบุรี (Novel antimicrobial agents from bacterial probiotics for controlling bacterial standard of dried and processed seafood products in Chon Buri Province)

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์[1]
วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย[2]

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
[2]ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 55/2559

บทคัดย่อ

ในการศึกษาครั้งนี้มีการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* และการศึกษาถึงชนิดและสภาวะที่เหมาะสมของสูตรอาหารราคาถูกเพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก รวมถึงศึกษาแหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ผลการศึกษาพบว่าผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* สามารถคงทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50-96 องศาเซลเซียส และสภาวะความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3-10 และสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์โปรติโอไลติก คือ เปปซิน ทริปซิน และโปรติเนส เค โดยพบว่าชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสม ราคาถูก และหาง่าย จำนวน 2 ชนิด คือ รำข้าวและข้าวโพด พบว่ารำข้าวเป็นสับสเตรทที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในการศึกษาครั้งนี้สูงสุด และต่อมาทำจากการศึกษาถึงสับสเตรทและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* คือการเพาะเลี้ยงโดยใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท และเติม 1 % (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และอุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

คำสำคัญ : ผลิตภัณฑ์อาหารทะเล; สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ; โพรไบโอติก; บาซิลลัส

ABSTRACT

In this work, physical, chemical and biological characteristics of bioactive compounds from *Bacillus licheniformis* as probiotic bacteria were studied. The alternative low-cost culture medium in terms of type and optimal growth for probiotic cultivation was also investigated. The optimal concentrations of nitrogen source for the growth of probiotic bacteria were also studied. The results showed that antagonistic activity of bioactive compounds from *Bacillus licheniformis* was active at 50 – 96 °C. These compounds were tolerant to pH in the range of 3-10. Antagonistic activity was completely lost after treated with proteolytic enzymes which were pepsin, trypsin and proteinase K. Two types of suitable substrates for the growth of probiotic bacteria that were not expensive and easy to find which were rice bran and corn. Rice bran demonstrated the most appropriate the alternative substrate for probiotic cultivation. In the last step, the optimal growth of alternative substrate and growth conditions for *Bacillus licheniformis* production were studied. Obtained results showed that the most appropriate substrate and growth conditions were the culture medium supplemented with rice bran and 1% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ as inorganic nitrogen source, pH 7.0 and 35 °C.

Keywords : Seafood product; Bioactive compounds; Probiotics; *Bacillus*

สารบัญ

		หน้า
กิตติกรรมประกาศ		I
บทคัดย่อ		II
Abstract		III
สารบัญ		IV
สารบัญตาราง		V
สารบัญภาพ		VI
บทที่		
1	บทนำ	1
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
3	วิธีดำเนินงานวิจัย	18
4	ผลการทดลอง	27
5	สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	38
เอกสารอ้างอิง		42
ผลผลิต (Output)		50
ประวัติคณะผู้วิจัย		51

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก	13
2	ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*	28
3	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*	29
4	ผลของเอนไซม์ต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*	30
5	ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เจริญในสับสเตรทชนิดต่าง ๆ	32
6	ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เจริญ ณ อุณหภูมิต่าง ๆ	33
7	ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เจริญ ณ ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ	34
8	ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เจริญในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ	35

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	เครื่อง Jar test	20
2	กระบวนการทำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกให้อยู่ในรูปกึ่งบริสุทธิ์ โดยการเติมเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตและกวนในสภาวะเย็น 4-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนสารโปรตีน	20
3	การเตรียมเพื่อการกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกด้วยวิธีไดอะไลซิส (ใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 1,000 ดาลตัน) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.05 M, pH 7.0)	21
4	การทดสอบความคงทนต่อความร้อนของกิจกรรมการยับยั้งจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ	22
5	การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค Agar well diffusion test	22
6	ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*	28
7	การทดสอบความคงทนต่อความร้อนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้ง *B. cereus* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion test	29
8	ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*	30
9	ผลของเอนไซม์ต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*	31
10	การทดสอบความคงทนต่อเอนไซม์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้ง *B. cereus* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion test	32
11	การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิต่าง ๆ	33
12	การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ	35
13	การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ	36
14	กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส ที่เพาะเลี้ยงในสับสเตรทและสภาวะที่เหมาะสม	37

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันอาหารทะเลได้รับความนิยมมีผู้บริโภคมากขึ้นและยังเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญอีกแหล่งหนึ่ง ผู้บริโภคมักนิยมรับประทานอาหารทะเลทั้งแบบดิบและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป อาหารทะเลดิบที่พร้อมบริโภค เช่น กุ้ง หอยนางรม เป็นต้น ส่วนผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป เช่น กะปิ กุ้งแช่แข็ง กุ้งแห้ง ปลาเค็ม เป็นต้น ตามนโยบายของรัฐบาลที่กำหนดให้ปี พ.ศ. 2547 เป็นปีแห่งการสร้างระบบความปลอดภัยด้านอาหารเพื่อให้ประชาชนมีสุขภาพดีถ้วนหน้าและเพื่อให้อาหารที่ผลิตและบริโภคในประเทศมีความปลอดภัยได้มาตรฐานนำไปสู่การเป็น "ครัวโลก" ปัจจุบันสาธารณสุขจังหวัดชลบุรีได้ทำการตรวจสอบคุณภาพทั้งด้านเคมีและด้านจุลินทรีย์ พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียก่อโรคและสารเคมีสังเคราะห์เพิ่มขึ้นซึ่งส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2550) นอกจากนั้นจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมีการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงและสีสังเคราะห์ร้อยละ 0.00-39.02 และ 14.89 - 100.00 ตามลำดับ โดยผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนยาฆ่าแมลงมากที่สุดคือ หมึกแห้งและหมึกแปรรูป (ร้อยละ 39.02) และผลิตภัณฑ์ที่มีการปนเปื้อนของสีสังเคราะห์สูงที่สุดคือ ปูกรอบ (ร้อยละ 100) รวมทั้งปริมาณของแบคทีเรียกลุ่มเฮท-เทอโรโทรปในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูปมีค่าอยู่ระหว่าง $1.00 \pm 0.50 \times 10^{2} - 5.23 \pm 0.63 \times 10^{9}$ CFU/g โดยแบคทีเรียที่พบมากกว่าร้อยละ 50 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Pantoea* ส่วนปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีพบในช่วง $0.00 - 1.04 \pm 0.04 \times 10^{5}$ CFU/g โดยแบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. hemolyticus*, *Acinetobacter* spp., *Bordetella holomesii*, *Burkholderia cepacia* complex, *Kluyvera cryocrescens*, *Neisseria weaveri*, *Rahnella aquatilis*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia ficaria*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* และ *S. rubidaea* และแบคทีเรียกลุ่มทนเกลือมีปริมาณอยู่ในช่วง $1.00 \pm 0.00 \times 10^{2} - 3.12 \pm 0.18 \times 10^{9}$ CFU/g โดยแบคทีเรียสกุล *Bacillus*, *Staphylococcus* และ *Pantoea* เป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุด (สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ, 2553ก, 2553ข; 2553ค; Chotmongcol et al., 2010; Samutsan et al., 2010)

การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในอาหารและการเน่าเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคยังเป็นปัญหาสำคัญอย่างต่อเนื่องตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน (Fisher and Phillips, 2006) จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขชี้ให้เห็นถึงอันตรายจากการเจ็บป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรค สะท้อนจากตัวเลขของผู้ป่วยตลอด 15 ปีที่ผ่านมา โดยในปี พ.ศ. 2548 สำนักระบาดวิทยาได้รายงานว่าพบผู้ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทยรวมทั้งสิ้น 140,949 ราย คิดเป็นอัตราการป่วย 226.62 รายต่อประชากรแสนคน เพิ่มขึ้นจากปี พ.ศ. 2539 ที่มีอัตราการป่วยด้วยโรค

อาหารเป็นพิษเท่ากับ 136.87 รายต่อประชากรแสนคน (สำนักระบาดวิทยา, 2548) ซึ่งปัญหานี้กำลังเพิ่มสูงขึ้นตลอดช่วงระยะเวลาหลายปีที่ผ่านมา ในปี พ.ศ. 2552 พบว่ามีผู้ป่วยที่ป่วยด้วยโรคอาหารเป็นพิษมากกว่า 1.5 แสนรายต่อปี (ข้อมูลสถิติประจำปี พ.ศ. 2552 จากกระทรวงสาธารณสุข เรื่องผู้ป่วยโรคอาหารเป็นพิษ) จากรายงานการศึกษาข้อมูลของฝ่ายพัฒนา ระบบข้อมูลเฝ้าระวังโรค สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรคพบว่า แบคทีเรียเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษของคนไทย โดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Vibrio parahaernolyticus*, *Salmonella*, *Staphylococcus* และแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ที่พบบ้าง ได้แก่ *Clostridium butulinum*, *Clostridium perfringens* (สำนักระบาดวิทยา, 2545; 2548) จากปัญหาที่เพิ่มขึ้นนี้ทำให้มีการกำหนดมาตรฐานที่มุ่งเน้นการลดการปนเปื้อนโดยการออกกฎหมายและส่งเสริมแนวความคิดในการบริโภคอาหารที่ปราศจากสารกันเสีย มีความปลอดภัยและมีขั้นตอนการผลิตอาหารที่มีสุขอนามัย (Brul and Coote, 1999) ดังนั้นแนวทางหนึ่งที่ถูกนำมาใช้ในการควบคุมมาตรฐานของอาหารจากการปนเปื้อนของจุลินทรีย์คือการยับยั้งการเจริญหรือการทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารด้วยการปรับสภาวะไม่ให้เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ การใช้สารเคมีหรือสารต้านจุลชีพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ในปัจจุบันสารเคมีสังเคราะห์หลากหลายชนิดถูกนำมาใช้ในการควบคุมหรือทำลายจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหาร ได้แก่ กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดเบนโซอิก (Benzoic acid) กรดแล็คติก (Lactic acid) กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) กรดซอร์บิก (Sorbic acid) ไนไทรต์ (Nitrite) และซัลไฟท์ (Sulfites) เป็นต้น (Beuchat and Golden, 1989; Davidson, 1997; Sofos et al., 1998)

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงความปลอดภัยและต้องการอาหารที่ไม่เจือปนสารเคมีจึงส่งผลให้บริษัทผู้ผลิตผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ หันมาสนใจเทคนิคที่ใช้สารที่ได้จากธรรมชาติหรือสารที่ไม่มีความเป็นพิษในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร ดังนั้นทางเลือกจากธรรมชาติจึงเป็นวิธีหนึ่งที่สามารถใช้ในการควบคุมหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพคือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียจากการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าวสามารถประยุกต์ใช้โดยการเติมแบคทีเรีย (Addition of live bacteria; Ananou et al., 2007) ยกตัวอย่างเช่น Matamoros et al. (2009a) รายงานว่าการประยุกต์ใช้แบคทีเรียเดี่ยว คือ *Lactobacillus piscium* สายพันธุ์ EU2241 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* และยืดระยะเวลาการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์กุ้งแช่เย็นบรรจุแบบสุญญากาศ (Chillled vacuum-packaged shrimp) นอกจากนั้นการประยุกต์ใช้แบคทีเรียผสมยังเป็นวิธีการที่มีประสิทธิภาพในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารเช่นเดียวกัน เช่น การใช้แบคทีเรียผสมของ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Pediococcus pentosaceus* และ *Staphylococcus xylosus* สามารถควบคุมการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมถึงแบคทีเรียที่ผลิตสารก่อภูมิแพ้ซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ได้แก่ แบคทีเรียกลุ่มผลิตฮีสตามีน (Histaminogenic bacteria) และสารไบโอจีนิกเอมีนอื่น ๆ (Biogenic amines) ได้แก่ Tyramine, Cadaverine, Putrescine และ Tryptamine (Emborg and Dalgaard, 2006; Yongjin et al., 2007) และการประยุกต์ใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียในรูปของสารบริสุทธิ์ เช่น การใช้ไนซินและ

เพดิโอซินสามารถลดปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมด (Total viable count) ในปลาสดหั่นชิ้น (Fresh fish fillets) และควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นปลา (Yin et al., 2007) รวมทั้งการใช้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพกึ่งบริสุทธิ์ เช่น Mesenterocin Y ที่ผลิตจาก *Lactobacillus sakei* สามารถลดปริมาณของแบคทีเรียกลุ่ม Enterococci, Coagulase-negative cocci และยีสต์ รวมทั้งไม่มีผลต่อลักษณะทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ไส้กรอก (Zdolec et al., 2008)

ในปัจจุบันมีการนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียบางชนิด ได้แก่ ไนซิน มาใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหารในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก เนื่องจากสารกลุ่มแบคเทอริโอซินเป็นสารที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิดได้อย่างจำเพาะและเป็นสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่ถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe; GRAS) (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547; Delves-Broughton et al., 1996; Ogunbanwo et al., 2003) แต่อย่างไรก็ตามข้อจำกัดประการหนึ่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดนี้ คือ ไนซิน มีราคาจำหน่ายค่อนข้างสูง (ประมาณ 1,990 บาทต่อกิโลกรัม) ส่งผลให้ต้นทุนในการผลิตอาหารแปรรูปเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นทีมงานวิจัยของเราจึงมีความมุ่งมั่นในการศึกษาถึงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่ที่ผลิตจากแบคทีเรียที่ได้จากประเทศไทย ซึ่งสามารถพัฒนาไปสู่การผลิตในเชิงพาณิชย์และมีราคาที่ถูกเพื่อทดแทนไนซินและสารเคมีสังเคราะห์ชนิดอื่นที่ใช้ในปัจจุบัน โดยได้เริ่มการศึกษาตั้งแต่ปี พ.ศ. 2553 ภายใต้โครงการวิจัยเรื่อง "การพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์ และแบคทีเรียก่อโรค" ที่ได้รับการสนับสนุนจาก สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553-2555 และได้ค้นพบองค์ความรู้ในการจัดจำแนกและพัฒนาแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ที่แยกได้จากอาหารทะเลแห้ง ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในการก่อโรคทางอาหารมากที่สุดชนิดหนึ่ง รวมทั้งทราบถึงสถานการณ์การปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลากชนิดในอาหารทะเลแห้งและแปรรูป โดยพบว่าผลิตภัณฑ์อาหารเหล่านี้ปนเปื้อนด้วยแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus*, *Bacillus* และ *Pantoea* มากกว่าร้อยละ 50 ในขณะที่ *Acinetobacter calcoaceticus*, *A. hemolyticus*, *Acinetobacter* spp., *Bordetella holomesii*, *Burkholderia cepacia* complex, *Kluyvera cryocrescens*, *Neisseria weaveri*, *Rahnella aquatilis*, *Shigella dysenteriae*, *Serratia ficaria*, *S. odorifera*, *S. plymuthica* และ *S. rubidaea* เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลบางชนิด

โครงการวิจัยนี้คณะผู้วิจัยได้ตระหนักถึงการพัฒนาสารทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้ในการควบคุมหรือทำลายแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในปัจจุบัน เพื่อมุ่งยกระดับมาตรฐานอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตจากจังหวัดชลบุรีด้วยการศึกษาถึงสารทดแทนสารเคมีสังเคราะห์เพื่อส่งจำหน่ายทั้งในและต่างประเทศ และเพื่อให้มหาวิทยาลัยบูรพาซึ่งเป็นมหาวิทยาลัยในภาคตะวันออกสามารถช่วยเหลือทางด้านวิชาการให้แก่ชุมชนได้อย่างมีประสิทธิภาพ รวมทั้งเพื่อทำให้การศึกษาในเรื่องดังกล่าวได้ดำเนินการอย่างต่อเนื่อง คณะผู้วิจัยจึงได้ออกแบบการศึกษาถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ได้จากโครงการวิจัยก่อนหน้านี้ต่อแบคทีเรียก่อโรคชนิดอื่นที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปเพิ่มเติมจาก *S. aureus* และ

ทดสอบศักยภาพของแบคทีเรียกลุ่มดังกล่าวในการประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป โดยประเมินถึงประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี และคุณสมบัติทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูป หลังจากนั้นคณะผู้วิจัยยังได้วางแผนระเบียบการวิจัยในการพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยวัสดุที่มีราคาถูกเพื่อมุ่งพัฒนาในการนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป เนื่องจากในปัจจุบันการผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก (ไนซิน) ที่นิยมนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปนั้นมีราคาค่อนข้างสูงอันเนื่องมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปที่ใช้ในกระบวนการผลิตมีราคาสูง ดังนั้นเพื่อเป็นการลดต้นทุนในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องศึกษาหาแหล่งของสารอาหารที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิต แต่ทั้งนี้ยังคงต้องคำนึงถึงปริมาณของสารอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกว่ามีครบถ้วนหรือไม่ และองค์ประกอบในอาหารนั้นต้องไม่มีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเชื้อและการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป รวมทั้งจะต้องมีปริมาณมากพอ มีคุณสมบัติคงที่ จัดหาได้ง่ายและสามารถจัดการของเสียหรือน้ำเสียที่เกิดขึ้นได้โดยง่าย (กำเนิด สุภัณวงษ์, 2534) แหล่งของสารอาหารที่เหมาะสมและมีศักยภาพในการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก คือ ของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมและของเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งยังอุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้เป็นอย่างดี ยกตัวอย่างเช่น กากน้ำตาล (Molasses) (ไวรุจน์ เดชมหิทกุล และคณะ, 2550; Khodair et al., 2008) น้ำแช่ข้าวโพด (Corn-steep liquor) (Amarty and Leung, 2000) กากถั่วเหลือง (Soybean meal) (El Enshasy et al., 2008) และหางนม (Whey) (Rech and Ayub, 2007) เป็นต้น ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้นอกจากจะเป็นการยกระดับมาตรฐานอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลที่ผลิตจากจังหวัดชลบุรีด้วยการศึกษาถึงสารทดแทนสารเคมีสังเคราะห์แล้ว ยังมุ่งในการเพิ่มมูลค่าและลดปัญหาการกำจัดของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมและของเหลือใช้ทางการเกษตรอีกด้วย ซึ่งจะส่งผลให้ประเทศไทยมีความมั่นคงทางอาหารและมีศักยภาพในการแข่งขันทางด้านอุตสาหกรรมอาหารกับนานาประเทศได้อย่างเข้มแข็งและยั่งยืน อันเนื่องมาจากการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีที่สรรสร้างโดยคนไทยและเหมาะสมต่อประเทศไทย

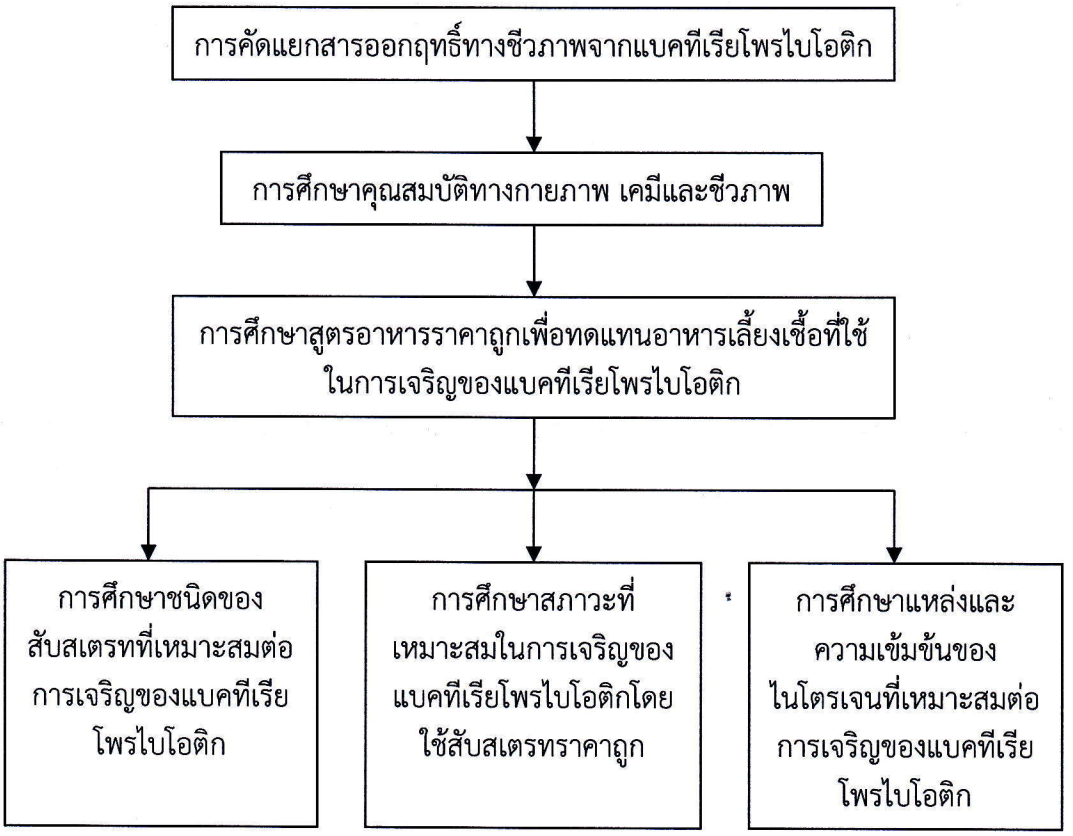
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาถึงปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารทะเลแห้งและแปรรูปที่ทนต่อฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก
2. เพื่อพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมและทำลายแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแปรรูป เพื่อทดแทนสารเคมีสังเคราะห์และพัฒนาให้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีตั้งแต่ในระดับห้องปฏิบัติการจนถึงระดับเชิงพาณิชย์

ขอบเขตของการวิจัย

คัดแยกสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกและศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว ได้แก่ การทำบริสุทธิ์และการวิเคราะห์น้ำหนักมวลโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พร้อมทั้งการศึกษาผลของอุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เอนไซม์โปรติเอสต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหาร นอกจากนั้นยังได้ศึกษาสูตรอาหารราคาถูกเพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เพื่อมุ่งเพิ่มศักยภาพในการนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัยโดยสรุปทฤษฎีและ/หรือแนวทางความคิดที่นำมาใช้ในงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

สามารถพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดใหม่จากแบคทีเรียทดแทนสารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมปริมาณและชนิดของจุลินทรีย์เพื่อควบคุมมาตรฐานทางแบคทีเรีย รวมทั้งลดความเสี่ยงของการเกิดโรคต่างๆ ที่เกิดจากสารเคมีสังเคราะห์ ทำให้คุณภาพชีวิตของประชากรไทยในท้องถิ่นและประเทศชาติดีขึ้นเทียบกับมาตรฐานโลกและทำให้ผู้ส่งออกต่างประเทศมีความมั่นใจและยอมรับในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งและแปรรูปซึ่งเป็นสินค้าส่งออกไปยังต่างประเทศต่อไป

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษา

เอกสารที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาจำแนกได้ดังนี้

1. แบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร
2. แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย
3. โพรไบโอติก
4. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

1. แบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร

ความปลอดภัยของอาหารเป็นปัจจัยสำคัญที่ต้องคำนึงถึงของทั้งผู้ผลิตและผู้บริโภค ซึ่งอาหารทะเลเป็นผลิตภัณฑ์หนึ่งที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจของประเทศไทย ในแต่ละปีประเทศไทยผลิตและส่งออกสินค้าประเภทนี้จำนวนมาก แต่อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เหล่านี้ยังคงมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่าง ๆ อันส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นจึงต้องมีการเฝ้าระวังการเกิดโรคจากการบริโภคอาหารทะเล แบคทีเรียก่อโรคที่มักพบปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลยกตัวอย่างเช่น

B. cereus จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนตรง ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้ สร้างสปอร์ภายในเซลล์ (Endospore) บริเวณกลางเซลล์ เซลล์ถูกทำลายได้ด้วยความร้อนระดับอุณหภูมิพาสเจอร์ไรซ์ คือ 72 องศาเซลเซียส แต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ได้จึงมักพบสปอร์เจริญอยู่ในอาหาร มักพบเซลล์และสปอร์ของ *B. cereus* ในดิน น้ำ ฝุ่นละออง ในอาหารสุกและอาหารดิบและธัญพืช *B. cereus* สามารถผลิตสารพิษออกมาอย่างน้อย 2 ชนิด และแต่ละชนิดจะทำให้เกิดอาการของโรคต่างกัน สารพิษจะสร้างออกมาในระหว่างการเจริญและยังคงอยู่ภายในเซลล์ เมื่อเซลล์แตกสารพิษจึงถูกปล่อยออกมา อาการของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจากเชื้อ *B. cereus* มี 2 แบบ คือ 1) อาการท้องร่วง (Diarrheal form) เกิดจากสารพิษที่เป็นโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน (Thermolabile) ผู้ป่วยมีอาการอุจจาระร่วง ปวดท้อง คลื่นไส้ แต่ไม่อาเจียน ไม่มีไข้ ผู้ป่วยจะหายเองได้ภายใน 24 ชั่วโมง โดยอาการจะคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *C. perfringens* 2) อาการอาเจียน (Emetic form) เกิดจากสารพิษที่เป็นโปรตีนซึ่งที่ทนความร้อนได้ ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย โดยอาการจะคล้ายกับโรคอาหารเป็นพิษที่เกิดจาก *S. aureus* (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

Clostridium perfringens จัดอยู่ในวงศ์ Bacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สร้างสปอร์รูปไข่ที่ปลายข้างใดข้างหนึ่งของเซลล์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญในที่ที่ไม่มีอากาศ เซลล์ปกติจะถูกทำลายได้โดยใช้ความร้อนต่ำแต่ไม่สามารถทำลายสปอร์ของเชื้อนี้ได้ พบเซลล์ปกติและสปอร์ได้ทั่วไปในดิน น้ำ อาหาร เครื่องเทศ ฝุ่นละออง ลำไส้มนุษย์และสัตว์ น้ำโสโครกและสิ่งปฏิกูล เป็นต้น *C. perfringens* สามารถสร้างสารพิษได้ 5 ชนิด คือ A B C D และ E แต่สารพิษชนิด A มักเป็นชนิดที่ทำให้เกิดโรคทางเดินอาหารเป็นพิษและสร้างก๊าซ อาการของโรคจะเกิดขึ้นหลังจากบริโภค

อาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนในปริมาณมาก แบคทีเรียชนิดนี้ทนต่อความเป็นกรดของกระเพาะอาหารจึงมีชีวิตรอดผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็ก เจริญและสร้างสปอร์พร้อมๆ กับขับสารพิษออกมามากทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการของโรคอาหารเป็นพิษ (สุมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545) อาการของโรคคือ ท้องเสีย ปวดท้อง เนื่องจากมีแก๊สในกระเพาะอาหารมาก คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ อัตราการตายต่ำ ถ้ามีการตายจะพบในเด็กทารก คนชราและคนป่วยด้วยโรคอื่นที่มีร่างกายอ่อนแอ อาการต่างๆ จะหายเองภายใน 24 ชั่วโมง (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545) *C. perfringens* มักพบในอาหารแห้งทั่วๆ ไป แต่จะไม่พบในอาหารแช่แข็งเพราะสปอร์ไม่สามารถทนอยู่ได้ที่อุณหภูมิต่ำ ผลิตภัณฑ์ประมงที่พบเชื้อนี้ เช่น กะปิ ปลาเค็ม ปลาร้า ปลาเจ่าและกุ้งแห้ง (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538)

Staphylococcus aureus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ พบได้ทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกายมนุษย์และสัตว์ เช่น จมูก มือ ผิวหนัง รวมทั้งอากาศและฝุ่นละออง การปนเปื้อนของเชื้อนี้ในอาหารมาจากการไอ จามลงในอาหารหรือจากผิวหนัง เมื่อ *S. aureus* ปนเปื้อนลงในอาหารและมีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญจะสร้างสารพิษ (Enterotoxin) ภายในเซลล์แล้วปล่อยออกนอกเซลล์ลงสู่อาหาร ชนิดของสารพิษที่สร้างมี 5 ชนิด คือ A B C D และ E ซึ่งมีคุณสมบัติในการทนความร้อน (Heat stable toxin) สารพิษชนิดนี้ไม่ทำให้รูปสัมผัสของอาหารมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ผู้บริโภคจึงไม่สามารถทราบได้ว่ามีสารพิษเกิดขึ้นในอาหาร เมื่อรับประทานอาหารที่มีสารพิษเข้าไปประมาณ 1-6 ชั่วโมง จะทำให้มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องอย่างรุนแรง ท้องเสีย เหงื่อแตก ปวดศีรษะ อ่อนเพลียและบางครั้งมีไข้ด้วย อาการป่วยจะดีขึ้นภายใน 8-24 ชั่วโมง (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

***Salmonella* sp.** จัดอยู่ในวงศ์ Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ที่มีอากาศและไม่มีอากาศ ไม่ทนความร้อนสามารถทำลายได้ในระยะเวลาอันสั้น พบได้ทั่วไปในระบบทางเดินอาหารของสัตว์เลี้ยง สัตว์ป่า สัตว์ปีก เต่า กบ รวมทั้งแมลงต่างๆ สามารถแยกเชื้อได้จากดิน น้ำและสิ่งโสโครกต่างๆ ที่ปนเปื้อนด้วยอุจจาระ อาการของโรคอาหารเป็นพิษเนื่องจาก *Salmonella* sp. ผู้ป่วยจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ปวดศีรษะ หนาวสั่นและอุจจาระร่วง อ่อนเพลีย มีไข้ปานกลาง โดยสามารถจำแนกอาการของโรคที่เกิดจาก *Salmonella* sp. ได้ 3 แบบคือ 1) โรคไข้เอนเทอริค (Enteric fever) ได้แก่ โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์ เชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคไทฟอยด์ คือ *S. typhi* และเชื้อที่เป็นสาเหตุของพาราไทฟอยด์คือ *S. paratyphi* A, *S. paratyphi* B และ *S. paratyphi* C โรคไข้ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์เกิดขึ้นเฉพาะในคนเท่านั้น โดยได้รับเชื้อที่ปนเปื้อนเข้าไปในอาหารและน้ำดื่ม แสดงอาการภายใน 12-24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการไข้สูง ปวดศีรษะ ปวดเมื่อยตามตัว ปอดอักเสบ เบื่ออาหาร ท้องอืด ม้ามโต อาจมีอาการอุจจาระร่วง ระยะของโรคประมาณ 3-4 สัปดาห์ 2) โลหิตเป็นพิษ (Septicemia) เชื้อเข้าสู่กระแสเลือดโดยตรง สามารถตรวจพบเชื้อในกระแสโลหิตโดยไม่มีอาการอุจจาระร่วง ผู้ป่วยมีไข้สูง ตับและม้ามโต น้ำหนักลด เซื่องซึม อาจมีอาการปอดบวม เยื่อหุ้มสมองอักเสบ 3) กระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ (Gastroenteritis) ส่วนใหญ่เชื้อนี้มักจะทำให้เกิดโรคในระบบทางเดินอาหาร เมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนเข้าไป ภายใน 8-24 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน อุจจาระร่วง มีไข้เล็กน้อย อาจพบการปนเปื้อนของ *Salmonella* sp. ในเนื้อสัตว์ เช่น ไก่ หมู ปลา และสัตว์มีเปลือก ในผลิตภัณฑ์ประมงประเภทสัตว์มี

เปลือกแช่แข็งพร้อมบริโภค (Precooked frozen crustaceans) ในระหว่างกระบวนการผลิตเพราะอาหารประเภทนี้จะสัมผัสกับคนงานโดยตรง ถ้าคนงานไม่ระมัดระวังเรื่องความสะอาด เชื้อจากคนงานจะปนเปื้อนเข้าไปในอาหาร เมื่อนำอาหารไปแช่แข็งแบคทีเรียชนิดนี้สามารถทนอยู่ได้ ดังนั้นเมื่อนำอาหารมาละลายแล้วนำไปรับประทานทันทีก็จะทำให้ผู้บริโภคได้รับเชื้อเข้าไปด้วย (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538)

Vibrio parahaemolyticus จัดอยู่ในวงศ์ Vibrionaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนตรงหรือท่อนโค้ง เคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ในที่มีอากาศและไม่มีอากาศ เจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลืออยู่ 3% พบได้ทั่วไปในน้ำทะเลหรือน้ำกร่อย สามารถทำลายได้ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที อาการของโรคเกิดขึ้นภายหลังได้รับเชื้อ 10-24 ชั่วโมง โดยจะมีอาการปวดท้องอย่างรุนแรงภายใน 2-48 ชั่วโมง มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียนและอุจจาระร่วง ถ้าพิษรุนแรงจะทำให้ถ่ายออกมามีมูกเลือด (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538) สามารถแยกเชื้อได้จากอาหารทะเลต่าง ๆ ในระหว่างฤดูร้อน การระบาดของโรคเกิดขึ้นเป็นครั้งคราวซึ่งเกิดจากผู้ป่วยรับประทานอาหารทะเลดิบ อาหารทะเลที่ปรุงไม่สุกหรือมีเชื้อปนเปื้อนภายหลังการปรุงอาหารสุกแล้ว ได้แก่ ปลา ปู เป็นต้น (บุษกร อุตรภิชาติ, 2545)

นอกจากนั้นยังพบงานวิจัยหลายชนิดที่ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่

Hatha and Lakshmanaperumalsamy (1997) รายงานการตรวจพบ *Salmonella* ในปลาและสัตว์มีเปลือก จำนวน 370 และ 276 ตัวอย่าง ตามลำดับ โดยซื้อตัวอย่างจากตลาดในเมือง Coimbatore ทางตอนใต้ของประเทศอินเดียตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน ปี ค.ศ. 1990 ถึงเดือนสิงหาคม ปี ค.ศ. 1992 ตรวจพบ *Salmonella* ในปลาและสัตว์มีเปลือกจำนวน 14.25% และ 17.39% ตามลำดับ สามารถจำแนก Serotype ได้ คือ *Salmonella weltevreden*, *S. typhi*, *S. paratyphi* B, *S. mgulani* และ *S. typhimurium* ซึ่งพบได้ทั้งในปลาและสัตว์มีเปลือก ส่วน *S. senftenberg* พบได้ในสัตว์มีเปลือกเท่านั้น

Hosseini et al. (2004) รายงานการตรวจพบ *Vibrio* spp. ในกุ้งที่จับได้จากชายฝั่ง Persian Gulf อยู่ทางตอนใต้ของประเทศอิหร่าน มีจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 770 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Vibrio* spp. ในตัวอย่าง 16 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้ คือ *V. alginolyticus*, *V. damsela*, *V. parahaemolyticus* และ *V. fluvialis* แต่จากการทดลองนี้ตรวจไม่พบ *V. cholerae*

Aycicek et al. (2005) รายงานการตรวจพบ *S. aureus* ในอาหารพร้อมบริโภคจากร้านขายอาหารในกองทัพบกที่เมือง Ankara ประเทศตุรกี จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 512 ตัวอย่าง ได้แก่ ตับ สลัดผัก สลัดรัสเซีย พิซซ่า แฮมเบอร์เกอร์ Meatballs, Turkish lahmacun, Turkish pide และ Turkish doner ตรวจพบ *S. aureus* ที่ให้ผลการทดสอบโคแอ็กกูเลสเป็นบวก ในตัวอย่าง 48 ตัวอย่าง คิดเป็น 9.4% มีปริมาณเชื้ออยู่ในช่วง 2.2 ถึง 4.3 log CFU/g ชนิดของอาหารพร้อมบริโภคได้แก่ สลัดผัก สลัดรัสเซียและ Meatballs มี *S. aureus* ปนเปื้อนในอาหารมากกว่าพิซซ่า แฮมเบอร์เกอร์ Turkish lahmacun, Turkish pide และ Turkish doner จากข้อมูลนี้แสดงให้เห็นว่า *S. aureus* อาจปนเปื้อนในอาหารได้จากการใช้มือสัมผัสกับอาหาร

Colakoglu et al. (2006) รายงานการตรวจพบ *Aeromonas* spp. และ *Vibrio* spp. ในหอยและกุ้งที่ซื้อจากตลาดและห้องครัวของโรงแรมในเมือง Dardanelles ประเทศตุรกี จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 127 ตัวอย่าง แบ่งเป็นหอย 97 ตัวอย่าง และกุ้ง 30 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Aeromonas* spp. และ *Vibrio* spp. ในตัวอย่าง 84 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้ คือ *Vibrio alginolyticus* จำนวน 26.7%, *V. vulnificus* จำนวน 9.7%, *V. parahaemolyticus* จำนวน 0.8% และ *A. hydrophila* จำนวน 29.1%

Normanno et al. (2006) รายงานการตรวจพบ *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *Salmonella* spp., *E. coli* และแบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์ม (Fecal coliform) ในหอยแมลงภู่เมดิเตอร์เรเนียน (*Mytilus galloprovincialis*) จำนวน 600 ตัวอย่าง ซึ่งจำหน่ายที่ตลาดในเมือง Puglia ประเทศอิตาลี ตรวจพบ *V. parahaemolyticus* และ *V. vulnificus* ในตัวอย่างจำนวน 47 และ 17 ตัวอย่าง ตามลำดับ คิดเป็น 7.83% และ 2.83% ตามลำดับ พบ *E. coli* ในตัวอย่างจำนวน 21 ตัวอย่าง คิดเป็น 3.5% แบคทีเรียกลุ่มฟีคัลโคลิฟอร์มในตัวอย่างจำนวน 28 ตัวอย่าง คิดเป็น 4.66% และ *Salmonella* ในตัวอย่างจำนวน 1 ตัวอย่าง คิดเป็น 0.16%

Parihar et al. (2008) รายงานการตรวจพบ *Listeria* spp. ในอาหารทะเลที่จำหน่ายในตลาดในเมือง Goa ประเทศอินเดีย จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 115 ตัวอย่าง ตรวจพบ *Listeria* spp. ในตัวอย่าง 28 ตัวอย่าง สามารถจำแนกชนิดได้คือ *L. monocytogenes* พบใน 10 ตัวอย่าง และ *L. innocua* พบใน 18 ตัวอย่าง โดย *L. monocytogenes* อาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ถ้าปนเปื้อนในอาหารทะเลดิบแบบพร้อมบริโภค

2. แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

ตามปกติแล้วการเน่าเสียของอาหารจะทำให้ลักษณะทางด้านเคมีและทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป ส่งผลต่อเนื่องถึงคุณลักษณะของอาหาร เช่น ลักษณะเนื้อสัมผัส กลิ่น รสชาติ สีและคุณค่าทางอาหาร ซึ่งการเน่าเสียของอาหารนี้สาเหตุหลักเกิดจากแบคทีเรีย (รังสินี โสธรวิทย์, 2550) โดยอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์อาหารทะเลเป็นอาหารที่นอกจากจะพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารแล้วยังพบแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ซึ่งไม่จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรค แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้อาหารเน่าเสีย เกิดกลิ่น รสชาติและลักษณะทางประสาทสัมผัสที่ไม่พึงประสงค์ ส่งผลให้ไม่สามารถเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารไว้บริโภคในระยะเวลานานได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้ยกตัวอย่างเช่น *Acinetobacter*, *Alcaligenes*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Moraxella* และ *Pseudomonas* นอกจากนี้ยังพบว่า อาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 1-3 องศาเซลเซียส จะพบแบคทีเรียกลุ่มชอบความเย็นอีกหลายชนิดที่เป็นสาเหตุทำให้เนื้อเน่าเสีย ได้แก่ *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Alcaligenes*, *Chromobacterium*, *Escherichia*, *Flavobacterium* และ *Pseudomonas* เป็นต้น ซึ่งจัดได้ว่าเป็นแบคทีเรียที่ชอบและทนอุณหภูมิต่ำได้เป็นอย่างดี จึงสามารถเจริญได้ในอาหารที่เก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิระดับตู้เย็นและก่อให้เกิดการเสื่อมเสียของอาหารติดตามมา แบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียที่สำคัญอีกกลุ่มหนึ่งคือ แบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารหลากหลายชนิดเน่าเสีย ได้แก่ นม ผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ผัก ผลไม้ ขนมหวาน เครื่องดื่มแอลกอฮอล์และอาหารหมักดอง แบคทีเรียกลุ่มนี้ทำให้เกิดเมือก กลิ่นและ

ผลิตภัณฑ์อาหาร ทั้งนี้ลักษณะการเน่าเสียของผลิตภัณฑ์อาหารจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียแลคติก สภาพความเป็นกรดด่างของอาหาร ตลอดจนคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์และการบรรจุหีบห่อ (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547) นอกจากนั้นแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่สำคัญที่สามารถทำให้อาหารเสียได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่มผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ แบคทีเรียที่สำคัญในกลุ่มนี้ที่มักพบปนเปื้อนในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหาร คือ *Shewanella putrefaciens* หรือ *Pseudomonas putrefaciens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปท่อนและเป็นแบคทีเรียกลุ่ม Non-fermentative bacilli คือ กลุ่มที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (Khashe and Janda, 1998) อยู่ในวงศ์ Shewanellaceae เป็นแบคทีเรียทางทะเลที่สามารถผลิตไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้ (Holt et al., 2005)

งานวิจัยหลายฉบับได้ทำการศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล ดังนี้

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์ และคณะ (2532) ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาและเคมีของกุ้งแห้งที่จำหน่ายทั่วไป พบว่ากุ้งแห้งมีจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนค่อนข้างสูง มีกลิ่นแอมโมเนียและมีปริมาณรงควัตถุแอสตาแซนทีนต่ำ กุ้งแห้งส่วนใหญ่มีความชื้นค่อนข้างสูงถึง 30% – 50% มีกลิ่นแอมโมเนียจึงทำให้ค่าความเป็นกรดด่างสูง มีค่าประมาณ 8.0 – 8.4 มีค่าปริมาณน้ำที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ในช่วง 0.72 – 0.78 และมีปริมาณเกลือสูงถึง 9% – 13% และจากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยา พบว่าจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด *S. aureus* และเชื้อรามีค่าเท่ากับ 5.00×10^{5}, 1.00×10^{2} และ 5.00×10 CFU/g ตามลำดับ แต่ไม่พบ *E. coli และ Salmonella* sp. ในตัวอย่างกุ้งแห้ง

สินหทัย สมบูรณ์ยิ่ง (2545) ได้ศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ปลาหมึกหวานปรุงรสที่จำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี จำนวน 40 ตัวอย่าง ในเดือนตุลาคม - ธันวาคม พ.ศ. 2544 โดยเก็บตัวอย่างจาก 4 ร้าน ร้านละ 10 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จำนวนเชื้อรา *E. coli* และแบคทีเรียก่อโรค คือ *S. aureus, Salmonella* sp. และ *Clostridium perfringens* พบว่าผลิตภัณฑ์ปลาหมึกหวานปรุงรสไม่ได้มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมเลขที่ มอก.972-2533 เนื่องจากมีเชื้อราเกินกำหนด และพบ *E. coli* เกินกำหนด 1 ตัวอย่าง แต่ไม่พบแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 ชนิด ดังกล่าวในตัวอย่าง

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ก) ศึกษาถึงการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรีจำนวน 21 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มทุกตัวอย่างที่นำมาศึกษา (คิดเป็น 100%) โดยอาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มมากที่สุดคือ หมึกกะตอย มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.97\pm0.16\times10^{9}$ CFU/g และพบการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีจำนวน 3 ตัวอย่าง (คิดเป็น 12.5%) โดยอาหารทะเลแห้งที่มีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีมากที่สุดคือ หมึกไข่ มีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ $1.70\pm0.21\times10^{4}$ CFU/g เมื่อนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรียกลุ่มทนเค็มในผลิตภัณฑ์หมึกแห้ง พบแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* มากที่สุด รองลงมาคือ *Micrococcus* และ *Bacillus* ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอีที่จำแนกได้คือ *Proteus, Enterobacter* และ *Klebsiella* ดังนั้นควรมีการติดตามตรวจสอบและตระหนักถึง

ความปลอดภัยของอาหารเป็นระยะ โดยเฉพาะการปนเปื้อนของแบคทีเรียในอาหารที่บริโภคในแต่ละวันและผลิตภัณฑ์ที่มีการส่งออก

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์ และคณะ (2553ข) ศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในอาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี จำนวน 29 ตัวอย่าง พบว่าอาหารทะเลแห้งมีปริมาณแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปอยู่ในช่วง $6.00\pm2.00\times10^{2}$ ถึง $4.40\pm1.22\times10^{9}$ CFU/g โดยพบมากที่สุดในตัวอย่างหมึกกะตอยแห้ง และพบน้อยที่สุดในตัวอย่างหนวดหมึกชุบน้ำเชื่อม เมื่อนำมาจำแนกชนิดของแบคทีเรีย พบแบคทีเรียกลุ่ม *Staphylococcus* มากที่สุด รองลงมาคือ *Bacillus* และ *Micrococcus* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Corynebacterium* spp., *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *K. ozaenae*, *Listeria* spp. และ *Proteus mirabilis* ดังนั้นจึงควรมีการเฝ้าระวังและตรวจติดตามการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เพื่อให้ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่วางจำหน่ายในจังหวัดชลบุรีมีคุณภาพทางจุลินทรีย์มากยิ่งขึ้น

Ayulo et al. (1994) ทำการศึกษาคุณภาพทางจุลชีววิทยาของปลาและความปลอดภัยของอาหารทะเลที่จับได้จากบริเวณชายฝั่งของรัฐซานตา คาทารินาและจำหน่ายในเมืองฟลอเรียโนโปลิส ประเทศบราซิล จากการตรวจคุณภาพปลา Acoupa blanc (*Cynoscion leiarchus*) ทั้งที่อยู่ในรูปของปลาสดและแปรรูป กุ้งขาว (*Peneaus paulensis*) หอย (*Anomalocardia brasiliensis*) หอย Blue mussel (*Mytilus edulis*) และปูม้า (*Callinectes sapidus*) จากตลาดจำนวน 175 ตัวอย่าง จากการศึกษาพบว่า ในตัวอย่าง 175 ตัวอย่าง ตรวจพบ *S. aureus* จำนวน 35 ตัวอย่าง คิดเป็น 20% และจากตัวอย่างเนื้อหอยคิดเป็น 60% และพบว่า *S. aureus* จำนวน 109 สายพันธุ์ ซึ่งมีจำนวน 9 สายพันธุ์ ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน ได้แก่ เอนเทอโรทอกซินเอ จำนวน 4 สายพันธุ์ เอนเทอโรทอกซินดี จำนวน 1 สายพันธุ์ และเอนเทอโรทอกซินเอบี จำนวน 4 สายพันธุ์ จากการศึกษาดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าควรมีการจัดการเอาใจใส่ในระหว่างการจับสัตว์น้ำและหลังการจับสัตว์น้ำที่ได้ เพื่อลดการปนเปื้อนแบคทีเรียของปลาและอาหารทะเล

Jeyasekaran et al. (2004) ศึกษาการเก็บรักษาปลาจบรีม (*Lethrinus miniatus*) โดยใช้น้ำแข็งแห้ง 20% ร่วมกับน้ำแข็ง 50% พบว่าเป็นสภาวะที่ดีในการเก็บรักษาได้ถึง 24 ชั่วโมง โดยไม่ต้องเติมน้ำแข็งเพิ่ม โดยปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง 10^{4}-10^{7} CFU/g ในขณะที่แบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำมีปริมาณ 10^{2}-10^{4} CFU/g ปริมาณแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วง 10^{1}-10^{2} CFU/g แบคทีเรียที่ผลิตก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟล์ตรวจพบที่เวลา 6 ชั่วโมง โดยมีปริมาณ 10^{2} CFU/g แบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มทั้งหมดและแบคทีเรียที่ไม่ใช้ออกซิเจนในการเจริญและรีดิวซ์ซัลไฟท์ไม่แสดงแนวโน้มที่สอดคล้องกัน

3. โพรไบโอติก

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่มีประโยชน์ต่อร่างกายของมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์กลุ่มนี้ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ให้มากขึ้นและลดปริมาณจุลินทรีย์ที่เป็นโทษ จุลินทรีย์โพรไบโอติกได้แก่ เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก โดยเฉพาะเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* และ *Bifidobacterium* sp. มีการนำจุลินทรีย์กลุ่มนี้มาผลิตอาหารหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผักดอง และเนื้อหมัก และมีการผลิตในรูป

ของแคปซูลและเมล็ดออกมาจำหน่ายตามท้องตลาด นอกจากนี้มีการนำมาใช้ในอาหารสัตว์เร่งการเจริญเติบโตและป้องกันการเกิดโรค (อุษามาส จริยวรานุกุล, 2548)

ซึ่งโพรไบโอติก แปลว่า For life คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่คัดเลือกจากสายพันธุ์ที่มีอยู่แล้วในลำไส้ของมนุษย์ที่แข็งแรงดี โดยจะให้เสริมเข้าไปจากภายนอกร่างกายในปริมาณที่เพียงพอ เพื่อไปสู่ระบบทางเดินอาหาร และเข้าไปเจริญตั้งรกรากในลำไส้ ทำหน้าที่เหมือนกับเป็นสมาชิกของจุลินทรีย์ในลำไส้ และก่อให้เกิดกิจกรรมของจุลินทรีย์ อันจะเป็นผลดีต่อร่างกายหลายประการ ซึ่งโดยส่วนใหญ่มักจะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่ม Lactobacilli หรือ Bifidobacteria ในปัจจุบันมีหลักฐานการศึกษาในมนุษย์หรือสัตว์ทดลองพบว่า โพรไบโอติกมีบทบาทก่อให้เกิดผลดีต่อร่างกายหลายประการ (พีร์ เหมะรัชตะ, 2551)

การเจริญของโพรไบโอติกจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคได้นั้น เป็นไปตามกระบวนการธรรมชาติของจุลินทรีย์ที่มีจำนวนมากกว่าจะสามารถแย่งชิงอาหารได้ดีกว่า อีกทั้งยังปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีมากกว่านั้น ทำให้เชื้อโรคไม่สามารถอยู่รอดได้ และความสามารถในการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียจำพวกนี้ในระหว่างการเจริญจะทำให้ระดับความเป็นกรดด่างในสภาพแวดล้อมรอบ ๆ นั้นลดลง เป็นเหตุหนึ่งที่ทำให้เชื้ออื่น ๆ รวมทั้งเชื้อโรคด้วยนั้นไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้พบว่าโพรไบโอติกบางชนิดสามารถยับยั้งการยึดเกาะ (Adhesion) ของเชื้อโรคกับผนังเซลล์ภายในทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ได้ และบางชนิดยังสามารถช่วยกระตุ้นการสร้างภูมิต้านทานชนิด Immunoglobulin A ซึ่งจะช่วยกำจัดเชื้อโรคได้ โพรไบโอติกใช้ได้ดีในการควบคุมโรคเกี่ยวกับทางเดินอาหาร ช่วยป้องกันโรคอุจจาระร่วง ซึ่งเกิดจากการที่มีเชื้อโรคปนเปื้อนไปกับอาหาร เมื่อเข้าสู่ระบบการย่อยอาหารจะเกิดการแบ่งตัวอย่างมาก ทำให้เกิดสภาวะผิดปกติในทางเดินอาหาร เป็นเหตุให้เกิดอาการอุจจาระร่วงได้ ดังนั้นการที่มีแบคทีเรียโพรไบโอติกอยู่ในทางเดินอาหารในปริมาณเพียงพอ จะทำให้สภาวะที่ไม่เหมาะสมกับการแบ่งตัวของเชื้อโรค เป็นเหตุให้เชื้อโรคไม่สามารถก่อให้เกิดอาการของโรคนั้น ๆ ได้ (เสาวนีย์ ธรรมสถิต, 2547)

โพรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียที่เคยมีในลำไส้ใหญ่ในสมัยเป็นทารก ซึ่งมีมากมายหลายชนิด ดังแสดงในตางรางที่ 1

ตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก

Lactobacillus species	*Bifidobacterium* species	อื่น ๆ
L. acidophilus	*B. bifidum*	*Bacillus cereus*
L. casei (rhamnosus) - LGG	*B. longum*	*Escherichia coli*
L. reuteri	*B. breve*	*Saccharomyces cerevisiae*
L. bulgaricus	*B. infantis*	*Saccharomyces boulardii*
L. plantarum	*B. lactis*	*Enterococcus faecalis*
L. johnsonii	*B. adolescentis*	*Streptococcus thermophilus*
L. lactis	-	-

(ที่มา: อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

บทบาทของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกออกฤทธิ์ได้หลายรูปแบบในการช่วยเสริมสร้างสุขภาพและป้องกันหรือรักษาโรคต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น กลุ่ม Lactobacilli จะสร้างน้ำย่อยเบต้า-กาแลกโตซิเดส ช่วยลดปริมาณน้ำตาลแล็คโตสในอาหารซึ่งเป็นสาเหตุของอุจจาระร่วงได้ นอกจากนี้สามารถสร้างสารหลายชนิดที่ช่วยทำหน้าที่เป็นยาปฏิชีวนะ เช่น กรดอินทรีย์ กรดไขมันอิสระ แอมโมเนีย ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ช่วยกำจัดแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหาร น้ำย่อยบางชนิดจากโพรไบโอติกจะช่วยยับยั้งสารพิษจากแบคทีเรีย โดยไปปิดกั้นส่วนที่พิษเข้าเซลล์และสามารถแย่งจับตำแหน่งต่าง ๆ ของเนื้อเยื่อในลำไส้ เพื่อไม่ให้แบคทีเรียเข้าเกาะได้ ป้องกันไม่ให้แบคทีเรียเพิ่มจำนวนในลำไส้ นอกจากนี้สามารถกระตุ้นภูมิต้านทานทั้งในลำไส้และในกระแสเลือด หรือกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่น ๆ ไว้ต่อสู้กับเชื้อโรค และกระตุ้นการสร้างสารป้องกันโรคในร่างกาย เช่น Gamma-interferon, Interleukin-12 และ Interleukin-18 เป็นต้น (อุทัย เก้าเอี้ยน, 2549)

4. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (Bioactive compounds) เป็นสารจากสิ่งมีชีวิตตามธรรมชาติที่มีผลต่อสิ่งมีชีวิตทั้งคน สัตว์และพืช สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ดีต้องเป็นสารที่มีผลจำเพาะเจาะจงและสารนั้นจะต้องไม่มีผลกระทบเชิงลบต่อร่างกายหรือมีผลข้างเคียงน้อยมาก แต่ถ้าหากสารใดก็ตามเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วมีผลข้างเคียงที่ไม่ต้องการ เราจะจัดสารนั้นเป็นพวกสารพิษ (Toxic substances) ในปัจจุบันนักวิทยาศาสตร์ได้มุ่งศึกษาและพัฒนาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีอยู่ในธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ทดแทนสารต้านจุลชีพหรือสารเคมีสังเคราะห์ที่นิยมนำมาใช้ในทางการแพทย์ เภสัชวิทยาและอุตสาหกรรมอาหาร เป็นต้น ซึ่งในปัจจุบันกำลังประสบกับปัญหาการดื้อต่อสารต้านจุลชีพของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค เนื่องมาจากมีการนำสารต้านจุลชีพมาใช้กันอย่างแพร่หลายและมีการใช้ไม่ถูกวิธีส่งผลทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีการพัฒนาตนเองให้ทนต่อสารต้านจุลชีพ ทำให้ต้องใช้ยาในปริมาณที่เพิ่มสูงขึ้นหรือสารต้านจุลชีพตัวเดิมใช้ไม่ได้ผล อีกทั้งในผู้ป่วยบางรายอาจเกิดอาการแพ้สารต้านจุลชีพ นอกจากนั้นการใช้สารเคมีสังเคราะห์เพื่อใช้เป็นสารกันเสียในอุตสาหกรรมอาหารได้สร้างความกังวลเกี่ยวกับผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภค ดังนั้นในปัจจุบันจึงมีการรณรงค์และส่งเสริมการบริโภคอาหารที่มีความปลอดภัยและไม่เจือปนสารเคมีสังเคราะห์

ด้วยสาเหตุดังกล่าวนี้จึงทำให้นักวิทยาศาสตร์พยายามคิดค้นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีคุณสมบัติที่เหมือนหรือให้มีประสิทธิภาพในการใช้งานใกล้เคียงกันกับการสารต้านจุลชีพหรือสารเคมีสังเคราะห์ โดยสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่น่าสนใจ คือ สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย ซึ่งสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียมีหลากหลายชนิด ยกตัวอย่างเช่น

แบคเทอริโอซิน คือ สารเปปไทด์หรือสารประกอบโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน รวมทั้งสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน (ten Brink et al., 1994) สารชนิดนี้ได้รับความสนใจอย่างมากในทางการแพทย์และอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นสารที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิดได้อย่างจำเพาะและผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่ถือว่ามีความปลอดภัย (Generally Recognized as Safe; GRAS) สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดนี้

ถือว่าเป็นสารป้องกันการเน่าเสียตามธรรมชาติ โดยยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Delves-Broughton et al., 1996; Ogunbanwo et al., 2003) มนุษย์ได้นำสารชนิดนี้มาใช้ประโยชน์มานานนับศตวรรษ โดยมีการนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อช่วยควบคุมคุณภาพอาหารและการป้องกันระบาดวิทยาของอาหารเป็นพิษที่เกิดจากแบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร (Papagianni et al., 2006) แบคเทอริโอซินชนิดแรกที่ถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหารและได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย คือ ไนซิน ซึ่งได้มาจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ในปัจจุบันไนซินได้ถูกนำมาใช้ในอาหารและผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายเชิงพาณิชย์ในประเทศต่าง ๆ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก ซึ่งช่วยแก้ปัญหาของการห้ามใช้สารต้านจุลชีพในผลิตภัณฑ์อาหารบางประเภทได้เป็นอย่างดี (Li and O'Sullivan, 2002) ในประเทศสหรัฐอเมริกาไนซินได้รับการยอมรับว่าปลอดภัยสามารถใช้ได้ในไข่เหลว ไส้กรอกและน้ำสลัด ในประเทศออสเตรเลียก็อนุญาตให้ใช้ไนซินได้ในผลิตภัณฑ์ขนมอบที่มีองค์ประกอบของความชื้นสูง เพื่อป้องกันการเจริญของ *B. cereus* และยังมีรายงานอื่น ๆ อีกมากมายที่ได้ระบุว่าสามารถใช้ไนซินในการควบคุมการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *Clostridium* spp. ได้ในผลิตภัณฑ์นมและสัตว์ (สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล, 2547)

ไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่ถูกนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลายในหลายประเทศทั่วโลกเพื่อช่วยรักษาคุณสมบัติของอาหารและยืดระยะเวลาในการเก็บรักษา ผลิตภัณฑ์อาหารที่นิยมใช้ไนซิน เช่น เนยแข็งต่าง ๆ นมพาสเจอร์ไรซ์ นมสเตอริไรซ์ อาหารกระป๋อง เครื่องดื่ม แอลกอฮอล์ และผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เป็นต้น โดยปริมาณที่อนุญาตให้ใช้จะแตกต่างกันไปตามกฎหมายอาหารของแต่ละประเทศ ตัวอย่างเช่น ในประเทศไทยมีการอนุญาตให้ใช้ได้ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 84 ไนซินในความเข้มข้นไม่เกิน 4,000 IU ต่อกรัมของผลิตภัณฑ์อาหาร และอนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนยแข็งแปรรูป ส่วนคณะกรรมการผู้เชี่ยวชาญของอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติองค์การอนามัยโลกที่เกี่ยวกับสารเจือปนในอาหาร (Joint FAO/WHO Expert Committees on Food Additives) ได้มีการประเมินความเป็นพิษของสารนี้ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1969 และได้กำหนดค่า Acceptable Daily Intake เป็น 0-33,000 หน่วยต่อกิโลกรัมของน้ำร่างกาย (ศิวาพร ศิวเวชช, 2546)

จากการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียเป็นแหล่งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีศักยภาพในการนำมาใช้ในการควบคุมและทำลายแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมทั้งมีความเหมาะสมในการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารเพื่อรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อาหารและยืดระยะเวลาการเก็บรักษา ดังรายงานการวิจัยต่อไปนี้

กรรณิการ์ เสนทอง และคณะ (2551) ได้คัดเลือกและแยก *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนและ *Lactobacillus* จากน้ำนมดิบและฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งสามารถคัดแยก *Bacillus* และ *Lactobacillus* ด้วยวิธีกระจาย ได้เชื้อจำนวน 41 และ 40 ไอโซเลท ตามลำดับ โดยในการศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง Luria Bertani (LB) ที่มีส่วนประกอบของนมซึ่งสกัดเอาไขมันออกความเข้มข้น 2% และบ่มที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรีย *Bacillus* ได้จำนวน 10 ไอโซเลท ที่สามารถสร้างวงใสรอบโคโลนีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางมากกว่า 10 มิลลิเมตร โดยไอโซเลท BA26 และ BA27 สามารถ

ผลิตเอนไซม์โปรติเอสสูงสุดเท่ากับ 12.278 และ 12.058 ยูนิตต่อมิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ เมื่อทดสอบด้วยสารตั้งต้นเคซีนความเข้มข้น 1.5% และเอนไซม์มีความจำเพาะต่อเคซีนมากกว่าเจลลาติน ผลจากการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสแบบหลั่งออกนอกเซลล์ได้ดีที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จากการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อดัชนีด้วยวิธี Agar well diffusion ของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตัวอย่างน้ำนมดิบทั้งหมดจำนวน 81 ไอโซเลท พบว่าแบคทีเรียจำนวน 9 ไอโซเลท คือ BA08, BA16, LA09, LA10, LA13, LA16, LA18, LA19 และ LA20 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* TISTR 517 และ *Escherichia coli* TISTR 887 โดยมีวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร ซึ่งเมื่อจำแนกสายพันธุ์ โดยสังเกตลักษณะการติดสีย้อม สมบัติทางชีวเคมีและการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ สามารถจัดจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* ที่สามารถผลิตเอนไซม์สูงสุดคือ BA26 และ BA27 เป็น *Brevibacillus* Non reactive และจัดจำแนกสายพันธุ์ *Bacillus* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* TISTR 517 และ *E. coli* TISTR 887 โดยมีขนาดวงใสการยับยั้งได้สูงสุดคือ BA08 เป็น *Brevibacillus laterosporus* และ BA16 เป็น *Geobacillus thermoglucosidasius* ส่วน *Lactobacillus* ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อดัชนีทั้ง 2 ชนิด โดยมีขนาดวงใสการยับยั้งสูงสุด คือ LA10 และ LA16 เป็น *Lactobacillus plantarum* 1 และ *Lactobacillus plantarum* 2 ผลจากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำเชื้อ *Bacillus* ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสทนร้อนและ *Bacillus* และ *Lactobacillus* ที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมฟอกหนังสัตว์และอุตสาหกรรมเภสัชต่อไป

Anthony et al. (2009) ได้ศึกษาสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย ซึ่งการศึกษานี้ได้รับความสนใจมากขึ้นในการที่จะนำมาเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรค การถนอมอาหาร เพื่อป้องกันการเน่าเสียและการเสื่อมสภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียคือ *Bacillus licheniformis* ที่แยกได้จากดินตะกอนจากน้ำทิ้งในโรงฆ่าสัตว์ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายชนิด การผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *B. licheniformis* โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม Lactose, NH_4NO_3, Yeast extract, NaCl และศึกษาผลของสภาวะต่าง ๆ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ และระยะเวลาในการบ่มต่อประสิทธิภาพการผลิตสารเปปไทด์ จากการศึกษาพบว่าเมื่อมี Yeast extract และ NaCl ที่ความเข้มข้นสูงจะมีผลทำให้ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียและกิจกรรมจำเพาะได้ดีตามลำดับ ซึ่งความเป็นด่างและอุณหภูมิสูงจะส่งเสริมให้ *B. licheniformis* AnBa9 ผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้ดี ถ้าในสภาวะที่เหมาะสม *B. licheniformis* AnBa9 สามารถผลิตสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้สูงกว่าสภาวะที่ไม่เหมาะสมถึง 25 เท่า ซึ่งคุณสมบัติทางชีวเคมีของสารเปปไทด์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตได้จาก *B. licheniformis* มีคุณสมบัติเป็นสารแบคเทอริโอซิน

Matamoros et al. (2009b) ได้ทำการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งโดยแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นและแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นมาศึกษาต่อเนื่องในการใช้เป็นสารกันเสียทางชีวภาพในผลิตภัณฑ์อาหารทะเล โดยการคัดเลือกแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่ชอบความเย็นทั้งหมด 5,575 ไอโซเลทที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเล พบว่า 132 ไอโซเลท มีคุณสมบัติใน

การยับยั้งแบคทีเรีย และมีจำนวน 52 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายได้ 14 ไอโซเลท (สามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ) ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่มแลคติกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารทะเลเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรค จากนั้นจำแนกด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียแลคติก 7 ไอโซเลทที่น่าสนใจประกอบด้วย *Leuconostoc gelidum* 3 ไอโซเลท *Lactococcus piscium* 2 ไอโซเลท *Lactobacillus fuchuensis* 1 ไอโซเลท และ *Carnobacterium alterfunditum* 1 ไอโซเลท แบคทีเรียสายพันธุ์เหล่านี้ไม่ผลิตฮิสตามีนและไทรามีน และพบว่าไม่มีการดื้อยาปฏิชีวนะ นอกจากนั้นยังได้ศึกษาถึงอัตราการเจริญที่อุณหภูมิต่างกันของ *L. piscium* 1 ไอโซเลท และ *L. gelidum* 1 ไอโซเลท เพื่อยืนยันคุณสมบัติความชอบเจริญที่อุณหภูมิต่ำ หนึ่งในเจ็ดเชื้อที่แยกได้สามารถผลิตสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรีย ส่วนกลไกในการยับยั้งของเชื้ออื่นที่แยกได้นั้นยังไม่ทราบแน่ชัดแต่อาจเกิดเนื่องจากการแข่งขันในการจับกับสารตั้งต้น

Hemalatha and Shanthi (2010) ได้ทำการแยก *Bacillus subtilis* จากตัวอย่างนม โดยศึกษาการดื้อยาปฏิชีวนะและประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ของ *B. subtilis* จากการศึกษาพบว่า *B. subtilis* ทั้ง 4 ไอโซเลท ไวต่อยาปฏิชีวนะ ได้แก่ Streptomycin (25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Ampicillin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Penicillin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) Erythromycin (15 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) และ Amoxycillin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) แต่ *B. subtilis* ทั้งหมดนี้ดื้อต่อ Bacitracin (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) *B. subtilis* มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ ได้แก่ *Salmonella* spp., *Streptococcus* spp., *Klebsiella* spp. และ *E. coli* ซึ่งสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจาก *B. subtilis* ที่สกัดด้วยสารอินทรีย์ คือ เอทิลอะซิเตท พบว่าสารที่ได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ ซึ่งสารนี้เป็นโปรตีนที่ผลิตจาก *B. subtilis* มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยโปรตีนมีปริมาณระหว่าง 0.05-0.55 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้เทคนิค SDS-PAGE ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน พบว่าสารที่ผลิตจาก *B. subtilis* เป็นสารเปปไทด์มีน้ำหนักน้อยกว่า 62 กิโลดาลตัน

บทที่ 3
วัสดุอุปกรณ์และวิธีดำเนินการทดลอง

วัสดุอุปกรณ์

1. วัตถุดิบ

1.1 รำข้าว

1.2 ข้าวโพด

2. วัสดุอุปกรณ์

2.1 จานเพาะเชื้อ (Petri Dish)

2.2 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)

2.3 กรรไกรปลอดเชื้อ

2.4 หลอดทดลอง (Test Tube) 16 x 150 มิลลิเมตร และ 13 x 100 มิลลิเมตร

2.5 ออโตปิเปต P100 (Gilson, pipetman P100, กรุงปารีส, สาธารณรัฐฝรั่งเศส)

2.6 ออโตปิเปต P1000 (Gilson, pipetman P1000, กรุงปารีส, สาธารณรัฐฝรั่งเศส)

2.7 ตู้อบลมร้อน (Memmert, UFB 500, เมือง Schwabach, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

2.8 ตู้บ่มเชื้อ (Memmert, BE 400, เมือง Schwabach, สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี)

2.9 หม้อนึ่งความดันไอ (Daihan, Wacs-1450, เมืองโซล, สาธารณรัฐเกาหลี)

2.10 กล้องจุลทรรศน์ (Olympus, CH30RF200, ประเทศญี่ปุ่น)

2.11 ตู้ปลอดเชื้อ (Super Clean, Super Clean150 VC, จังหวัดกรุงเทพฯ, ประเทศไทย)

2.12 ถุงไดอะไลซิส

2.13 เครื่อง Jar test

2.14 กระดาษกรอง Whatman No. 5

3. สารเคมี

3.1 โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

3.2 Gram's crystal violet solution

3.3 Gram's safranin O solution

3.4 Gram's iodine solution

3.5 Gram's alcohol solution

3.6 Alcohol 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์

3.7 Catalase reagent

3.8 Oxidase reagent

3.9 Nitrate reagent

3.10 Kovac' s reagent

3.11 Methyl red reagent

3.12 แอมโมเนียมซัลเฟต

3.13 โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

3.14 โซเดียมไฮดรอกไซด์

3.15 กรดไฮโดรคลอกริก

3.16 โซเดียมไนเทรต

3.17 แอมโมเนียมคลอไรด์

3.18 แคลเซียมคาร์บอเนต

3.19 น้ำแป้งความเข้มข้น 1% (w/v)

3.20 สารละลาย Dinitrosalicylic acid

3.21 Tris-HCl 0.5 โมลาร์

3.22 Casein 10% (w/v)

3.23 สารละลาย Trichloacetic acid ที่มี 0.22 โมลาร์ Sodium acetate และ 0.33 โมลาร์ Acetic acid

3.24 สารละลาย Olive oil

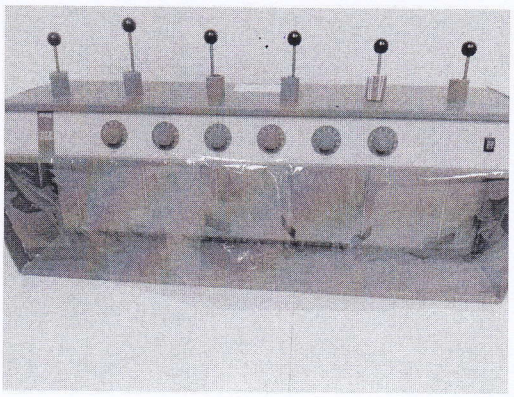
3.25 สารละลายอะซิโตน : แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:1

วิธีดำเนินการทดลอง

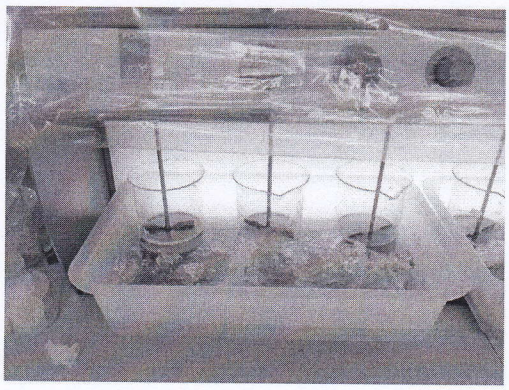
1. การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกและการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพ

1.1 การเตรียมสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก (Ahern et al., 2003)

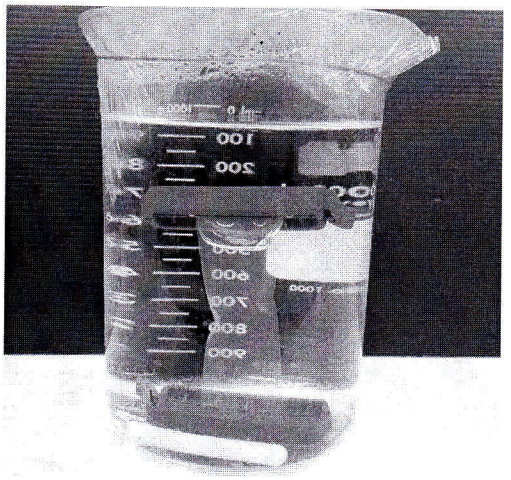
นำแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* มาขีด (Streak) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวมาเลี้ยงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy Broth (TSB) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์แขวนลอยไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต (ที่ความอิ่มตัวของแอมโมเนียมซัลเฟต 80%) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 9,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนตะกอนที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงมาละลายในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.05 M, pH 7.0) และกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกด้วยวิธีไดอะไลซิส (ใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 1,000 ดาลตัน) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.05 M, pH 7.0) ในอัตราส่วนสารละลายในถุงไดอะไลซิส 1 ส่วน ต่อสารละลายบัฟเฟอร์ 100 ส่วน ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยเปลี่ยนบัฟเฟอร์ทุก 1, 2 และ 4 ชั่วโมง นำสารละลายที่เตรียมได้มาเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป



ภาพที่ 1 เครื่อง Jar test



ภาพที่ 2 กระบวนการทำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกให้อยู่ในรูปกึ่งบริสุทธิ์ โดยการเติมเกลือแอมโมเนียมซัตเฟตและกวนในสภาวะเย็น 4-10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เพื่อตกตะกอนสารโปรตีน



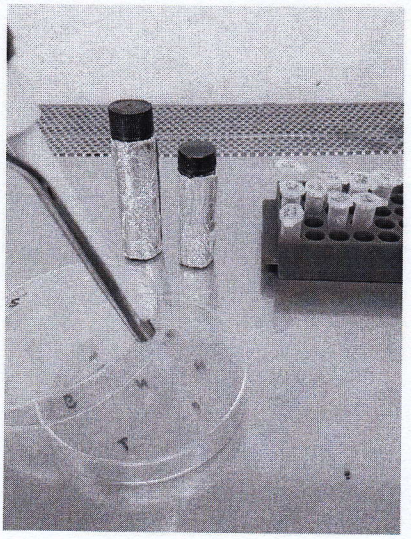
ภาพที่ 3 การเตรียมเพื่อการกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตออกด้วยวิธีไดอะไลซิส (ใช้ถุงไดอะไลซิสที่มีขนาดรูพรุนเท่ากับ 1,000 ดาลตัน) ในสารละลายโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (0.05 M, pH 7.0)

1.2 การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก

1.2.1 การศึกษาความคงทนต่อความร้อนของกิจกรรมการยับยั้งจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ ดังต่อไปนี้ 50, 60, 70, 80, 90, 92, 94, 96, 98 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Cherif et al., 2003; Cherif et al., 2001) จากนั้นนำสารที่ผ่านการให้ความร้อนมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion test บนอาหาร Mueller Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดของ Inhibitory zone บันทึกผลการทดลอง

ภาพที่ 4 การทดสอบความคงทนต่อความร้อนของกิจกรรมการยับยั้งจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ



ภาพที่ 5 การทดสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเทคนิค Agar well diffusion test

1.2.2 การศึกษาความคงทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่างของกิจกรรมการยับยั้งจากสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร มาปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้อยู่ในช่วง pH 3-11 ด้วย 1 N NaOH หรือ HCl ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้เป็นกลาง โดยการปรับค่า pH 7.0 (Cladera-Olivera et al., 2004; Compaoré et al., 2013) และทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion test บนอาหาร Mueller Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และวัดขนาดของ Inhibitory zone บันทึกผลการทดลอง

1.2.3 การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยับยั้งของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ในรูปของสารกึ่งบริสุทธิ์ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เติมเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนี้ pepsin, papain, trypsin, chymotrypsin, proteinase K, lysozyme, catalase, DNase และ RNase บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ซึ่งหลังจากการบ่มเอนไซม์จะถูกทำให้เสียสภาพโดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (Cherif et al., 2003; Cherif et al., 2001) ก่อนที่จะนำสารที่ผ่านการเติมเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion test บนอาหาร Mueller Hinton agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยชุดควบคุมประกอบด้วย ชุดที่เติมเพียงเอนไซม์ และชุดที่เติมเพียงสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* ในรูปสารกึ่งบริสุทธิ์ และวัดขนาดของ Inhibitory zone บันทึกผลการทดลอง

2. การศึกษาสูตรอาหารราคาถูกเพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียโพร-ไบโอติก

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการมุ่งพัฒนาการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติกด้วยวัสดุที่มีราคาถูกเพื่อมุ่งเพิ่มศักยภาพในการนำไปผลิตในระดับอุตสาหกรรมต่อไป ส่งผลให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ผลิตจากแบคทีเรียโพรไบโอติกมีราคาถูกกว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพชนิดอื่นและสารเคมีสังเคราะห์ที่นิยมใช้ในปัจจุบัน ซึ่งการลดต้นทุนในการผลิตในระดับอุตสาหกรรมจำเป็นต้องศึกษาหาแหล่งของสารอาหารที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิต แต่ทั้งนี้ยังคงต้องคำนึงถึงปริมาณของสารอาหารต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติกว่ามีครบถ้วนหรือไม่ และองค์ประกอบในอาหารนั้นต้องไม่มีสารพิษที่เป็นอันตรายต่อเชื้อและการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูป รวมทั้งจะต้องมีปริมาณมากพอ มีคุณสมบัติคงที่ จัดหาได้ง่ายและสามารถจัดการของเสียหรือน้ำเสียที่เกิดขึ้นได้โดยง่าย (กำเนิด สุภัณวงษ์, 2534) แหล่งของสารอาหารที่เหมาะสมและมีศักยภาพในการนำมาใช้ในกระบวนการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก คือ ของเหลือใช้จากอุตสาหกรรมและของเหลือใช้ทางการเกษตรซึ่งยังอุดมไปด้วยสารอาหารต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์สามารถนำมาใช้ในการเจริญและการผลิตสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ โดยรายละเอียดของระเบียบวิจัยมีดังต่อไปนี้

2.1 การศึกษาชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก (Naidu and Devi, 2005; Gangadharan et al., 2006)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้สับสเตรทที่เป็นของเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม ได้แก่ รำข้าวและข้าวโพด (ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของราคาและความคุ้มทุน) ปริมาณ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกล้าเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงในเครื่องเขย่าที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Dilution plate count คำนวนในหน่วย CFU/ml เพื่อคัดเลือกวัสดุที่เหมาะสมและนำไปศึกษาต่อไป

2.2 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยใช้สับสเตรทราคาถูก

การศึกษาในขั้นตอนนี้เป็นการศึกษาถึงปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีอิทธิพลต่อการเจริญและกิจกรรมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ได้แก่ ค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิ ดังนี้

2.2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก (Gangadharan et al., 2006)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมปริมาณ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร นำมานึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เลี้ยงเชื้อในสับสเตรทที่เหมาะสมที่อุณหภูมิ 30, 35, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Dilution plate count คำนวนในหน่วย CFU/ml เพื่อคัดเลือกอุณหภูมิที่เหมาะสมและนำไปศึกษาต่อไป

2.2.2 การศึกษาค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพร-ไบโอติก (Sen and Babu, 2005; Gangadharan et al., 2006; Sudharsan et al., 2007)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมปริมาณ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกล้าเชื้อลงในอาหารเลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร เลี้ยงเชื้อโดยเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 2.2.1 และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Dilution plate count คำนวนในหน่วย CFU/ml เพื่อคัดเลือกค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมและนำไปศึกษาต่อไป

2.3 การศึกษาแหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ตามวิธีการของ Gangadharan et al. (2006); Nilegaonkar et al. (2007)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากสับสเตรทราคาถูกที่เหมาะสมต่อการเจริญและกิจกรรมของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยใช้แหล่งของไนโตรเจนที่มีราคาถูก แบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ง่าย และนิยมนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียในเชิงอุตสาหกรรม ยกตัวอย่างเช่น $NaNO_3$, NH_4Cl และ $(NH_4)_2SO_4$ ดังนี้

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมปริมาณ 5 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เติมแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์แต่ชนิด คือ $NaNO_3$, NH_4Cl และ $(NH_4)_2SO_4$ ความเข้มข้นเท่ากับ 1% (w/v) ในแต่ละชุดการทดลอง เติม $CaCO_3$ 0.5% (w/v) ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะต่อการเจริญจากการศึกษาในข้อ 2.2.2 จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เติมกล้าเชื้อลงในอาหารเลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพาะเลี้ยงโดยเลือกใช้อุณหภูมิที่เหมาะสมจากการทดลองในข้อ 2.2.1 และเขย่าที่ความเร็วรอบ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียโดยวิธี Dilution plate count คำนวนในหน่วย CFU/ml และนำไปศึกษาต่อไป

2.4 การวัดการเจริญของแบคทีเรีย (ดัดแปลงมาจาก Jeyasekaran et al., 2004)

นำตัวอย่างจากการทดลองมาเจือจางแบบ 10 เท่า ใน 0.85% Normal saline ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตตัวอย่างของแต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate Count Agar ใช้แท่งแก้วสามเหลี่ยมปราศจากเชื้อเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิค Spread plate นำจานเพาะเชื้อบ่มที่อุณหภูมิ 35±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ บันทึกผล

2.5 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

2.5.1 การวัดกิจกรรมเอนไซม์อะไมเลส (Amylase; ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และสมใจ ศิริโภค, 2541; Anto et al., 2006)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสม เก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 10 นาที นำส่วนใสที่ได้เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เติมน้ำแป้งความเข้มข้น 1% (w/v) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เติมสารละลาย Dinitrosalicylic acid ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปแช่ในน้ำเดือดเป็นเวลา 5 นาที ทำให้เย็น เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณหาปริมาณน้ำตาลรีดิวส์เทียบกับกราฟมาตรฐานสารละลายกลูโคสและคำนวณหาแอคติวิตีเอนไซม์

2.5.2 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอส (Protease; ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ, 2541; Prakasham et al., 2006)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสม เก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Tris-HCl 0.5 โมลาร์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติม Casein 10% (w/v) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลาย Trichloacetic acid ที่มี 0.22 โมลาร์ Sodium acetate และ 0.33 โมลาร์ Acetic acid และเขย่าอย่างแรง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที กรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 5 นำสารละลายที่ได้มาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสารละลายไทโรซีนและคำนวณหาแอคติวิตีเอนไซม์

2.5.3 การวัดกิจกรรมเอนไซม์ไลเปส (Lipase; ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และคณะ, 2541)

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อและสภาวะที่เหมาะสม เก็บตัวอย่างที่ 24 ชั่วโมง และนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่เจือจางให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วย Tris-HCl 0.1 โมลาร์ ที่ค่า

ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5 ปริมาตร 4 มิลลิลิตร เติมสารละลาย Olive oil 2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปเขย่าบนเครื่องเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วยสารละลายอะซิโตน : แอลกอฮอล์ ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร นำมาไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน NaOH 0.05 นอร์มอล โดยใช้ Phenolphthalein เป็น Indicator นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐาน คำนวณหาปริมาณ Oleic acid และแอคติวิตีเอนไซม์

บทที่ 4
ผลการทดลอง

จากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* และการศึกษาถึงสูตรอาหารราคาถูกเพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยการศึกษาเกี่ยวกับชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก และสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยใช้สับสเตรทราคาถูก รวมถึงแหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ผลการทดลองแสดงดังต่อไปนี้

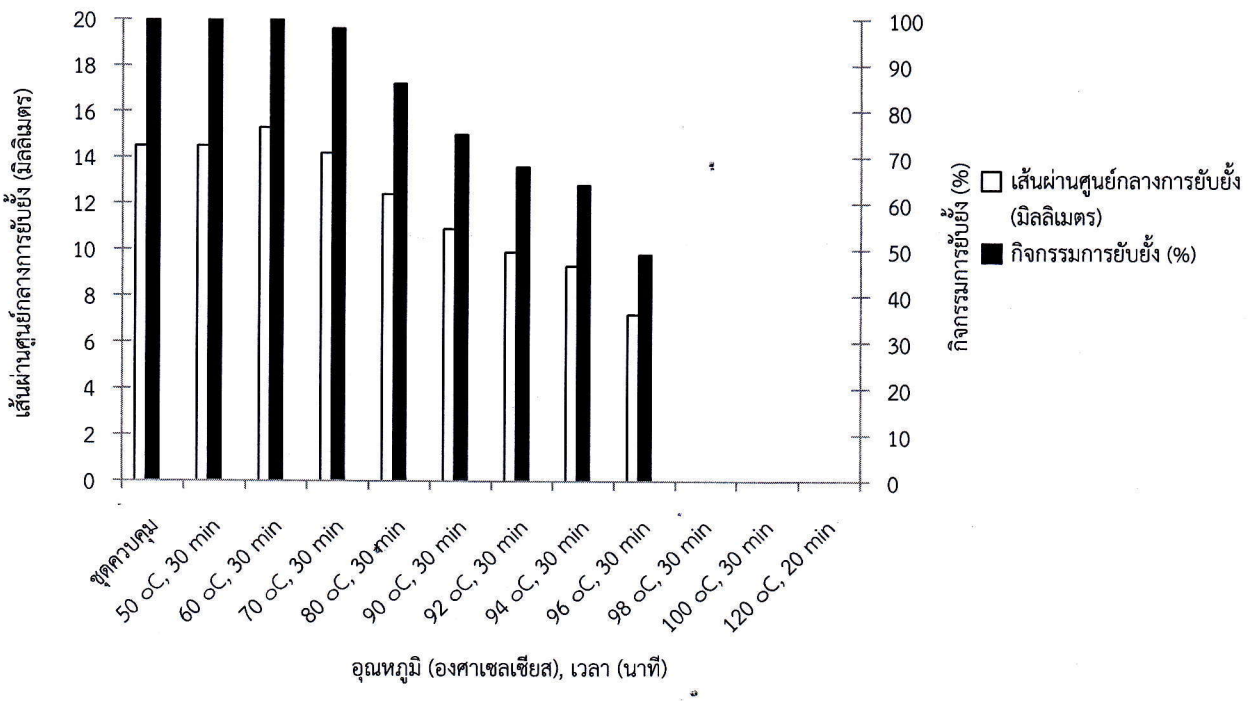
1. การศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียโพรไบโอติก

จากการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพ เคมีและชีวภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* โดยศึกษาความคงทนต่อความร้อน ความคงทนต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง รวมทั้งทดสอบผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบคือ *B. cereus* จากผลการทดลองพบว่ากิจกรรมการยับยั้ง (Antagonistic activity) ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* สามารถคงทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50-96 องศาเซลเซียส เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิดังกล่าวเป็นระยะเวลา 30 นาที โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การคงเหลือของกิจกรรมยับยั้ง (% Residual activity) อยู่ในช่วง 49-100% (ตารางที่ 2 และภาพที่ 6-7) และการทดสอบด้วยกรดและด่าง (pH) ในช่วง 3-10 พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพไม่สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* โดยมีค่าเปอร์เซ็นต์การคงเหลือของกิจกรรมยับยั้ง (% Residual activity) อยู่ในช่วง 63-100% ยกเว้นค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 11 ที่ทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพสูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้อย่างสมบูรณ์ (ตารางที่ 3 และภาพที่ 8)

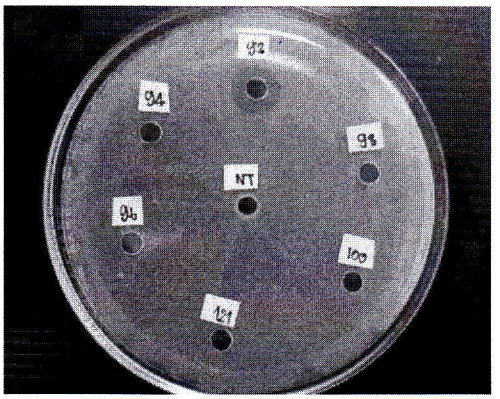
นอกจากนี้เมื่อนำสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมาทดสอบด้วยเอนไซม์จำนวน 6 ชนิด ได้แก่ Pepsin, Papain, Trypsin, Chymotrypsin, Proteinase K และ Catalase โดยเอนไซม์ดังกล่าวมีความเข้มข้นเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีค่าเปอร์เซ็นต์การคงเหลือของกิจกรรมยับยั้ง (% Residual activity) อยู่ในช่วง 67-100% ยกเว้นเมื่อนำมาทดสอบกับเอนไซม์ Pepsin, Trypsin และ Proteinase K เอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำให้สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis* สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ได้อย่างสมบูรณ์ (ตารางที่ 4 และภาพที่ 9-10)

ตารางที่ 2 ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*

Temperature	Diameter of inhibition zone ± SD (mm)	Residual activity (%)
None (control)	14.5±0.28	100
50 °C, 30 min	14.5±0.07	100
60 °C, 30 min	15.3±0.35	100
70 °C, 30 min	14.2±0.21	98
80 °C, 30 min	12.4±0.14	86
90 °C, 30 min	10.9±0.14	75
92 °C, 30 min	9.9±0.49	68
94 °C, 30 min	9.3±0.07	64
96 °C, 30 min	7.2±0.21	49
98 °C, 30 min	0.0±0.00	0
100 °C, 30 min	0.0±0.00	0
121 °C, 20 min	0.0±0.00	0



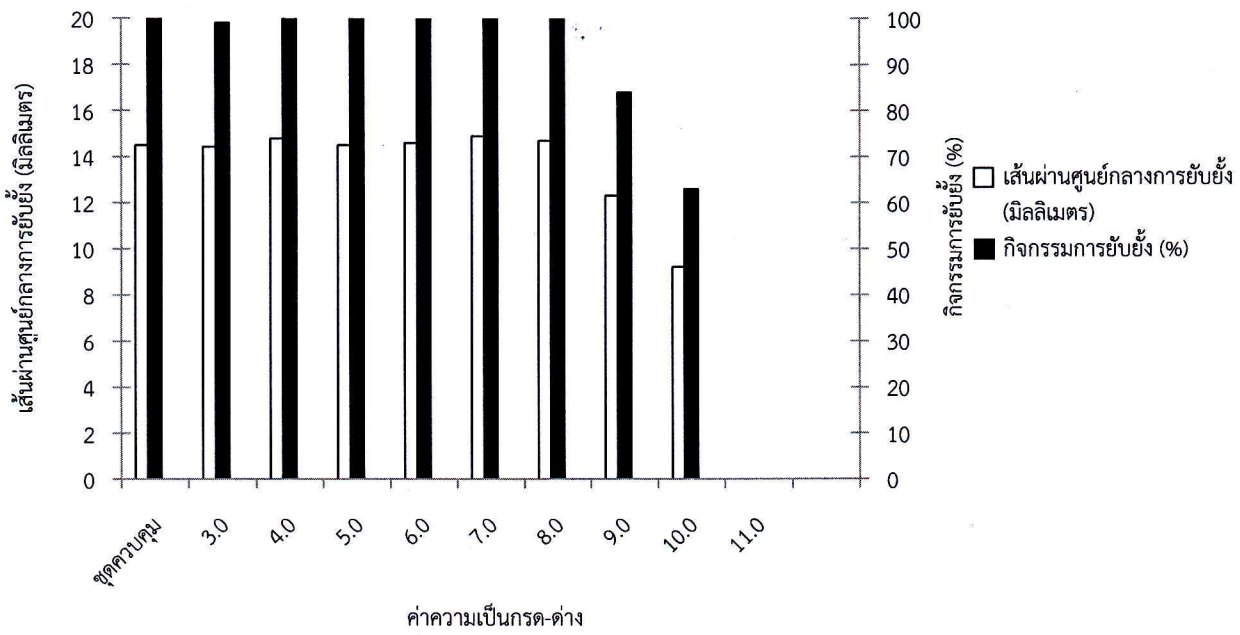
ภาพที่ 6 ผลของอุณหภูมิต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*



ภาพที่ 7 การทดสอบความคงทนต่อความร้อนของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้ง *B. cereus* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion test

ตารางที่ 3 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*

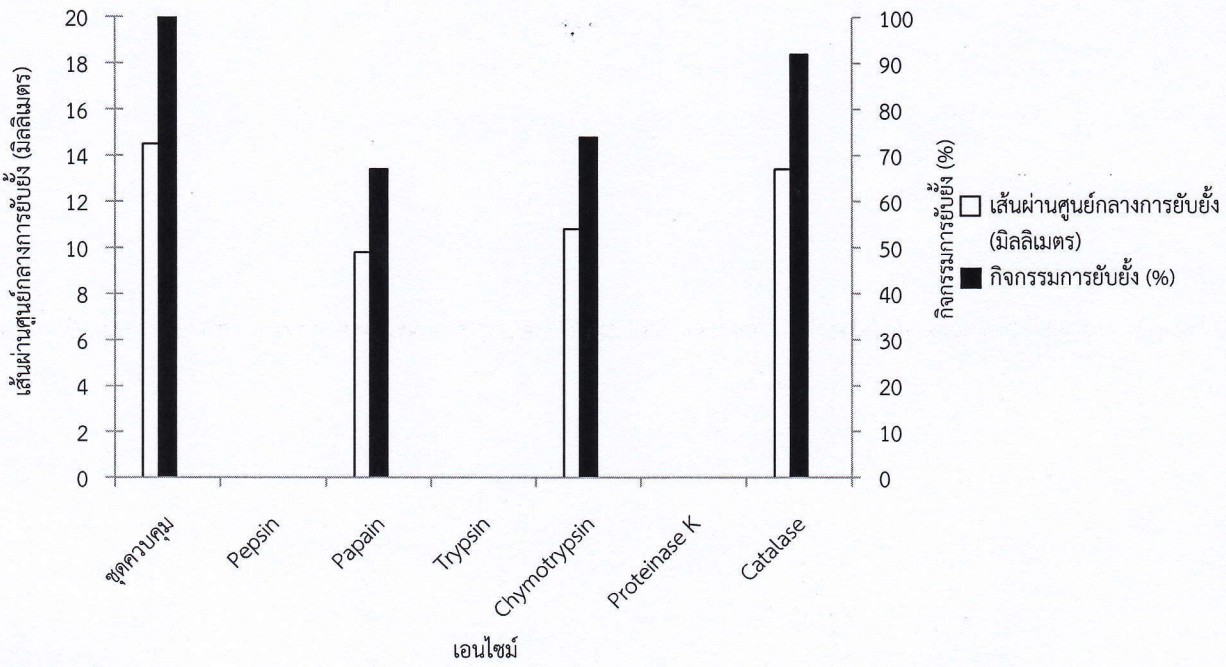
pH	Diameter of inhibition zone ± SD (mm)	Residual activity (%)
None (control)	14.5±0.28	100
3.0	14.4±0.07	99
4.0	14.8±0.35	100
5.0	14.5±0.42	100
6.0	14.6±0.14	100
7.0	14.9±0.21	100
8.0	14.7±0.92	100
9.0	12.3±0.35	84
10.0	9.2±0.28	63
11.0	0.0±0.00	0



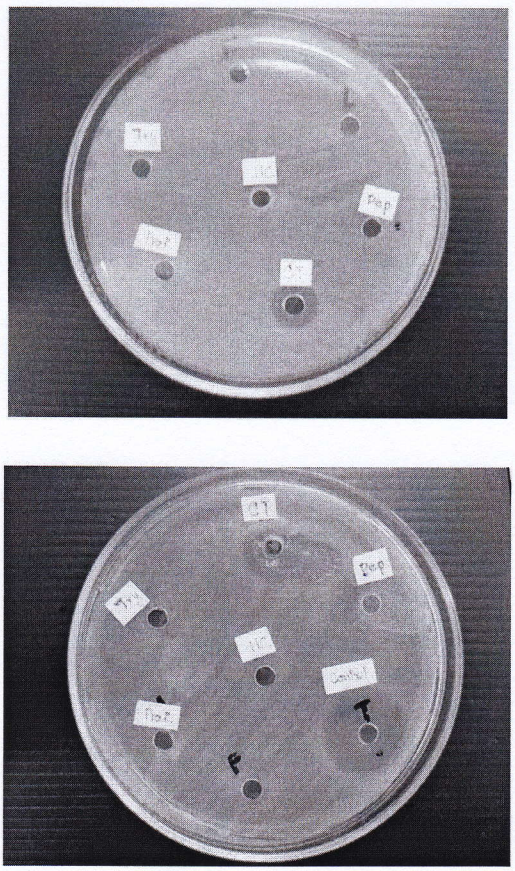
ภาพที่ 8 ผลของค่าความเป็นกรด-ด่างต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*

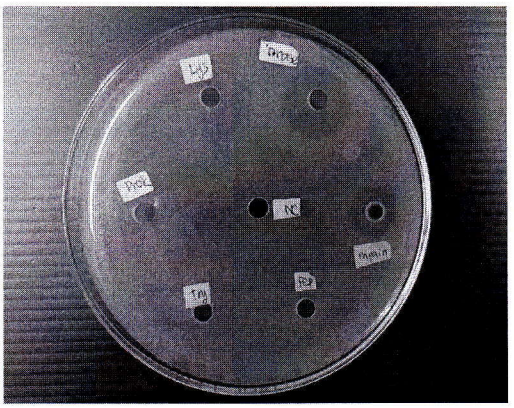
ตารางที่ 4 ผลของเอนไซม์ต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*

Enzyme	Diameter of inhibition zone ± SD (mm)	Residual activity (%)
None (control)	14.5±0.28	100
Pepsin	0.0±0.00	0
Papain	9.8±1.06	67
Trypsin	0.0±0.00	0
Chymotrypsin	10.8±0.35	74
Proteinase K	0.0±0.00	0
Catalase	13.4±0.21	92



ภาพที่ 9 ผลของเอนไซม์ต่อฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย *B. cereus* ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*





ภาพที่ 10 การทดสอบความคงทนต่อเอนไซม์ของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้ง *B. cereus* ด้วยเทคนิค Agar well diffusion test

2. การศึกษาสูตรอาหารราคาถูกเพื่อทดแทนอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเจริญของแบคทีเรียโพร-ไบโอติก

2.1 ชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก

จากการศึกษาชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* (BL) ในสับสเตรทราคาถูกจากการเกษตร ได้แก่ รำข้าวและข้าวโพด ปริมาณ 5% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แบคทีเรียโพรไบโอติกมีการเจริญดังแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 11

จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus licheniformis* สามารถเจริญโดยให้จำนวนเซลล์มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $9.33\pm0.58 \times 10^{9}$ CFU/g รองลงมาคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ข้าวโพดเป็นสับสเตรท ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $5.93\pm1.15 \times 10^{9}$ CFU/g

ตารางที่ 5 ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เจริญในสับสเตรทชนิดต่าง ๆ

สับสเตรท	ราคา/สถานที่ขาย	ความสะดวกในการหาซื้อ	ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก (CFU/g)
แบคทีเรียโพรไบโอติกเริ่มต้น	-	-	$2.33\pm0.58 \times 10^{8}$
รำข้าว	20 บาทต่อกิโลกรัม / ตลาดหนองมน	ง่าย	$9.33\pm0.58 \times 10^{9}$
ข้าวโพด	20 บาทต่อกิโลกรัม / ตลาดหนองมน	ง่าย	$5.93\pm1.15 \times 10^{9}$
Nutrient broth (Positive control)	-	-	$4.73\pm1.15 \times 10^{8}$
น้ำกลั่น (Negative control)	-	-	$2.60\pm0.27 \times 10^{7}$

2.2 สภาวะที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยใช้สับสเตรทราคาถูก

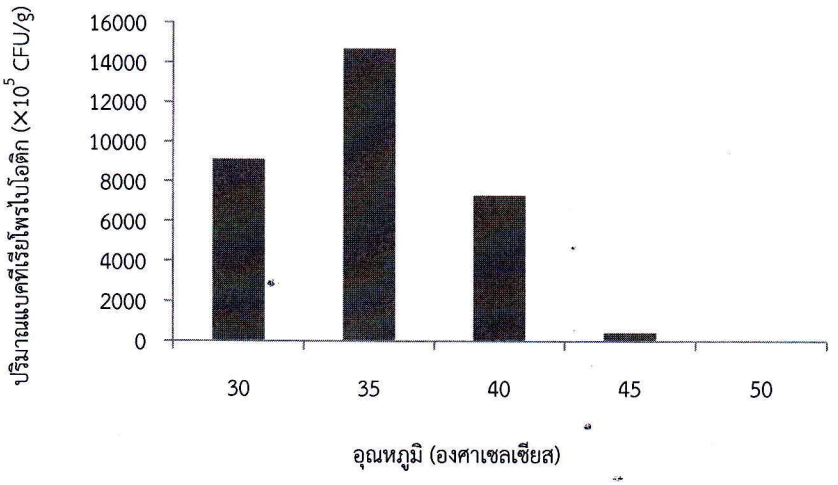
2.2.1 การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยใช้สับสเตรทราคาถูก

จากการศึกษาชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* (BL) ในสับสเตรทราคาถูกจากการเกษตร ได้แก่ รำข้าวและข้าวโพด ปริมาณ 5% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ารำข้าวมีคุณสมบัติในการใช้เป็นสับสเตรทในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อไป โดยนำมาศึกษาถึงผลของอุณหภูมิในการเจริญคือ 30, 35, 45, และ 50 องศาเซลเซียส

จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทมีการเจริญที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ได้สูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.47\pm0.25 \times10^{9}$ CFU/g รองลงมาคือ 30, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $9.13\pm0.32 \times10^{8}$, $7.33\pm1.53 \times10^{8}$, $4.33\pm0.58 \times10^{7}$ และ $6.70\pm0.58 \times10^{5}$ CFU/g ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เจริญ ณ อุณหภูมิต่าง ๆ

อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก (CFU/g)
30	$9.13\pm0.32 \times10^{8}$
35	$1.47\pm0.25 \times10^{9}$
40	$7.33\pm1.53 \times10^{8}$
45	$4.33\pm0.58 \times10^{7}$
50	$6.70\pm0.58 \times10^{5}$



ภาพที่ 11 การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ อุณหภูมิต่าง ๆ

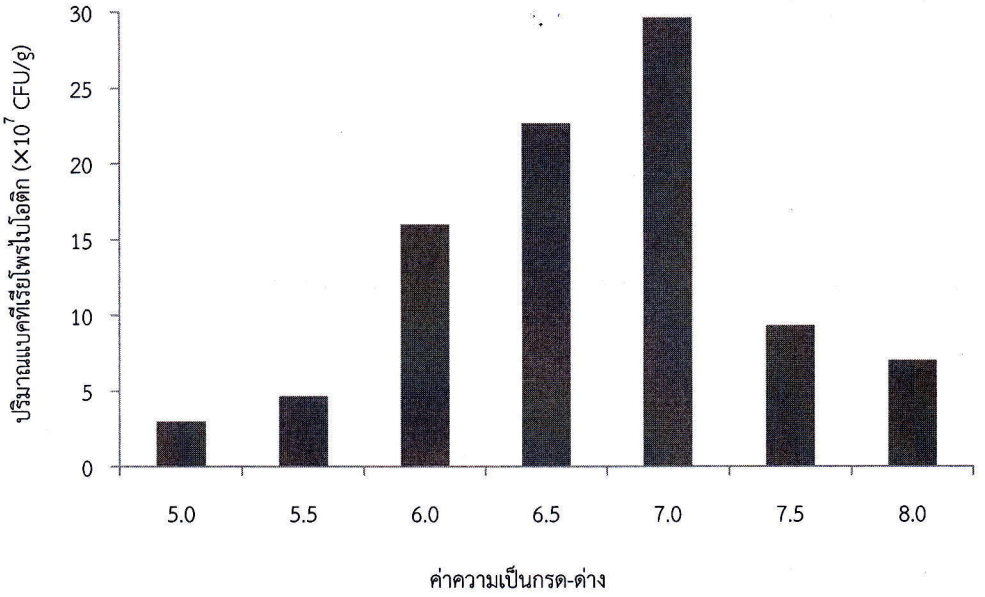
2.2.2 การศึกษาค่าเป็นความกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยใช้สับสเตรทราคาถูก

จากการศึกษาชนิดของสับสเตรทและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus lichenifomis* (BL) ในสับสเตรทราคาถูกจากการเกษตร พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทและเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อไป โดยนำมาศึกษาถึงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างในการเจริญคือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0

จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus lichenifomis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทและเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีการเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ได้สูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $2.97\pm0.06 \times10^{8}$ CFU/g รองลงมาคือ 6.5, 6.0, 7.5, 8.0, 5.5 และ 5.0 ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $2.27\pm0.46 \times10^{8}$, $1.60\pm0.44 \times10^{8}$, $9.33\pm1.15 \times10^{7}$, $7.00\pm2.65 \times10^{7}$, $4.67\pm0.58 \times10^{7}$ และ $3.00\pm1.00 \times10^{7}$ CFU/g ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 7 และภาพที่ 12

ตารางที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เจริญ ณ ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ

ค่าความเป็นกรด-ด่าง	ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก (CFU/g)
5.0	$3.00\pm1.00 \times10^{7}$
5.5	$4.67\pm0.58 \times10^{7}$
6.0	$1.60\pm0.44 \times10^{8}$
6.5	$2.27\pm0.46 \times10^{8}$
7.0	$2.97\pm0.06 \times10^{8}$
7.5	$9.33\pm1.15 \times10^{7}$
8.0	$7.00\pm2.65 \times10^{7}$



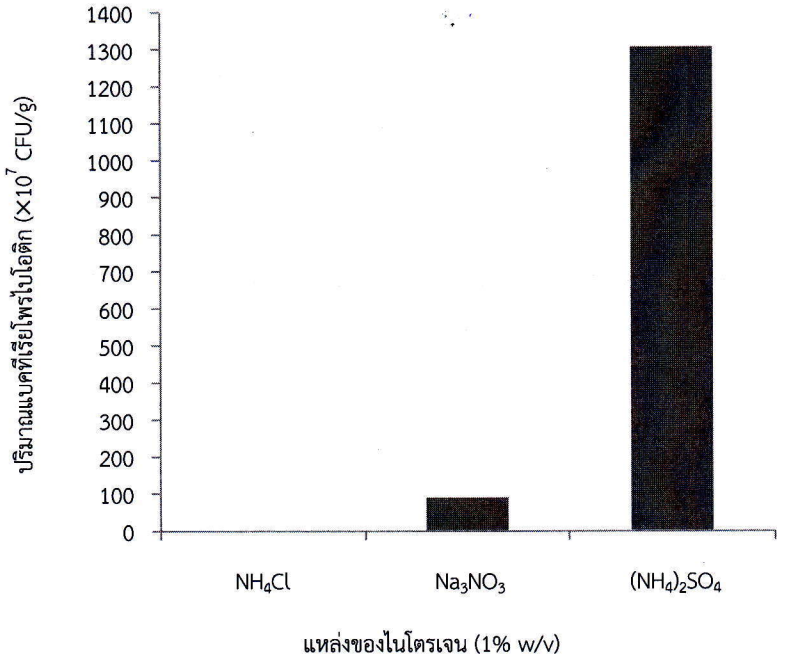
ภาพที่ 12 การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ ความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ

2.3 แหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก

จากเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากสับสเตรทราคาถูกที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยใช้แหล่งของไนโตรเจนที่มีราคาถูก แบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ง่าย และนิยมนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียในเชิงอุตสาหกรรม คือ $NaNO_3$, NH_4Cl และ $(NH_4)_2SO_4$ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสามารถในการเจริญสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสับสเตรทราคาถูกที่เหมาะสมที่เติมแหล่งของไนโตรเจน 1% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.31\pm0.06 \times 10^{10}$ CFU/g รองลงมาคือ 1% (w/v) $NaNO_3$ และ 1% (w/v) NH_4Cl ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $9.00\pm2.00 \times 10^{8}$ และ $1.33\pm0.58 \times 10^{7}$ CFU/g ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 8 และภาพที่ 13

ตารางที่ 8 ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติกที่เจริญในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

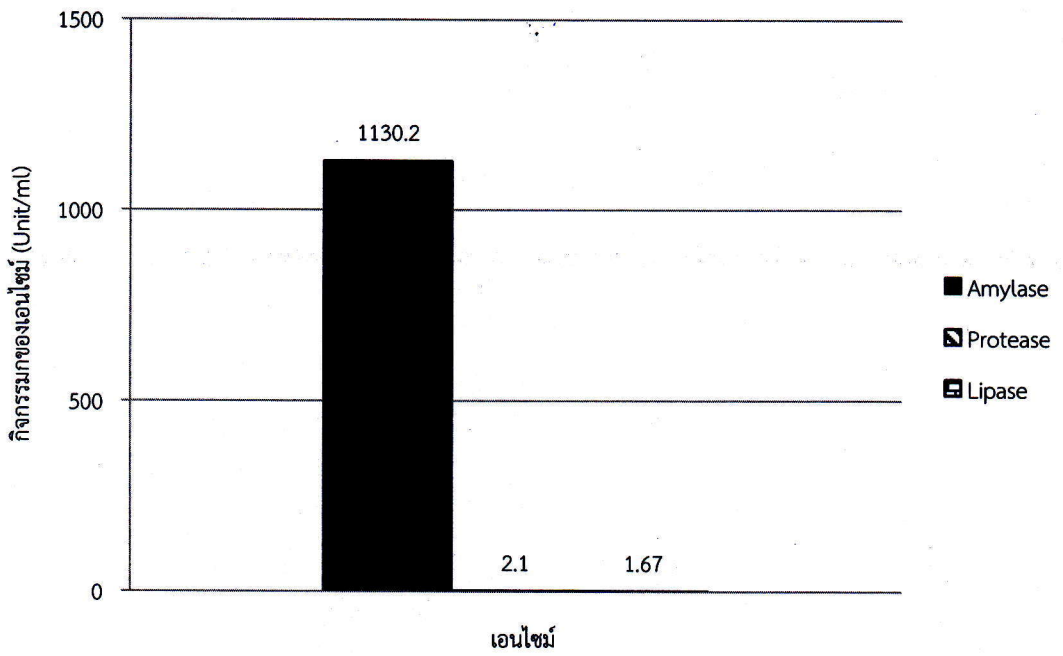
แหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจน	ปริมาณแบคทีเรียโพรไบโอติก (CFU/g)
1% $NaNO_3$	$9.00\pm2.00 \times 10^{8}$
1% NH_4Cl	$1.33\pm0.58 \times 10^{7}$
1% $(NH_4)_2SO_4$	$1.31\pm0.06 \times 10^{10}$



ภาพที่ 13 การเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ

2.4 การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส โดยศึกษาจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในสับสเตรท คือ รำข้าว และ 1% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ รวมทั้งปรับสภาวะที่เหมาะสม คือ เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าการใช้สับสเตรทและสภาวะดังกล่าวนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด คือ 1130.2 Unit/ml รองลงมาคือกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 2.10 และ 1.67 Unit/ml ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 14



ภาพที่ 14 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปส ที่เพาะเลี้ยงในสับสเตรทและสภาวะที่เหมาะสม

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

สรุปผลการทดลอง

1. การศึกษาความคงทนต่อความร้อนและค่าความเป็นกรดด่าง รวมทั้งทดสอบผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* สามารถคงทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50-96 องศาเซลเซียส และสภาวะความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3-10

2. สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์โปรติโอไลติก (Proteolytic enzyme) คือ Pepsin, Trypsin และ Proteinase K

3. จากการศึกษาชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมโดยเลือกใช้สับสเตรท 2 ชนิด พบว่ารำข้าวเป็นสับสเตรทที่มีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกในการศึกษาครั้งนี้

4. จากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกคืออุณหภูมิที่ 35 องศาเซลเซียส และจากการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก ณ ค่าความเป็นกรด-ด่างต่าง ๆ พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 มีความเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก

5. จากการศึกษาแหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกภายใต้สภาวะที่เหมาะสมพบว่าแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกคือ 1% (w/v) แอมโมเนียมซัลเฟต ($(NH_4)_2SO_4$)

6. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกโดยใช้สับสเตรทที่เหมาะสม สภาวะที่เหมาะสม แหล่งและความเข้มข้นของไนโตรเจนที่เหมาะสมพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงสุด

7. ดังนั้นจากผลการศึกษาในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าสับสเตรทและสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* คือการเพาะเลี้ยงโดยใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท และเติม 1 % (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ เป็นแหล่งไนโตรเจน โดยปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้มีค่าเท่ากับ 7.0 และเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส

อภิปรายผลการทดลอง

การศึกษาความคงทนต่อความร้อนและค่าความเป็นกรด-ด่าง รวมทั้งทดสอบผลของเอนไซม์ต่อกิจกรรมการยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* ทำให้ทราบถึงคุณสมบัติทางกายภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ซึ่งการศึกษาความสามารถในการคงทนต่อความร้อนและค่าความเป็นกรด-ด่าง ถูกนำมาใช้ในการบ่งบอกลักษณะของสารแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติเป็นสารถนอมอาหาร เนื่องจากอาหารแปรรูปหลายชนิดมักต้องผ่านกระบวนการใช้ความร้อนและการเติมสารเคมีซึ่งมีสภาวะเป็นกรดและด่างในกระบวนการแปรรูป (Lee et al., 1999) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจาก *Bacillus licheniformis* สามารถคงทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 50-96 องศาเซลเซียส และสภาวะความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3-10

ตลอดจนมีคุณสมบัติเป็นสารโปรตีนเนื่องจากถูกทำให้สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อทรีตด้วยโปรติโอไลติกเอนไซม์ (Proteolytic enzyme) คือ Pepsin, Trypsin และ Proteinase K ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ที่พบว่าสารเสมือนแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin like inhibitory substance, BLIS) ที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* P40 มีความคงทนต่อค่า pH ในช่วง 3-11 และอุณหภูมิสูงถึง 100 องศาเซลเซียส และสูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อทรีตด้วยเอนไซม์ Pronase E (Cladera-Olivera et al., 2004) และสารแบคเทอริโอซิน Bacillocin 490 ซึ่งผลิตจาก *Bacillus licheniformis* 490/5 ที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์นมสามารถคงทนต่ออุณหภูมิในช่วง 4-100 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วงกว้าง ซึ่งสูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเชื้อเมื่อทรีตด้วยเอนไซม์ Pronase E และ Proteinase K (Martirani et al., 2002) อีกทั้งจากการศึกษาของ Kayalvizhi and Gunasekaran (2008) พบว่าสารเสมือนแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Bacillus licheniformis* MKU3 มีความคงทนต่ออุณหภูมิสูง (100 องศาเซลเซียส 60 นาที) และค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 3-10 ซึ่งถูกทำให้หมดฤทธิ์ในการยังยั้งเชื้อทดสอบ (indicator strain) โดยเอนไซม์ Proteinase K, Trypsin และ Pronase E

จากการศึกษาชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ในสับสเตรทราคาถูกจากการเกษตร ได้แก่ รำข้าว (Rice bran) และข้าวโพด (Corn) ปริมาณ 5% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลองพบว่า *Bacillus licheniformis* สามารถเจริญโดยให้จำนวนเซลล์มากที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเตรท ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $9.33\pm0.58 \times 10^{9}$ CFU/g รองลงมาคือ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ข้าวโพดเป็นสับสเตรท ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $5.93\pm1.15 \times 10^{9}$ CFU/g โดยพบว่าการใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทสามารถให้จำนวนเซลล์ในปริมาณสูงนั้นเนื่องจากรำข้าวประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตปริมาณสูง สอดคล้องกับ Naidu and Devi (2005) ที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (Alkaline protease) โดยเชื้อ *Bacillus* sp. และจากการศึกษาของ Sandhia and Jijesh (2009) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* MTCC1790 โดยใช้รำข้าจเป็นสับสเตรท สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้มากที่สุด

จากการศึกษาชนิดของสับสเตรทที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ในสับสเตรทราคาถูกจากการเกษตร ได้แก่ รำข้าว (Rice bran) และข้าวโพด (Corn) ปริมาณ 5% (w/v) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ารำข้าวมีคุณสมบัติในการใช้เป็นสับสเตรทในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อไป โดยนำมาศึกษาถึงผลของอุณหภูมิในการเจริญคือ 30, 35, 45, และ 50 องศาเซลเซียส พบว่า *Bacillus licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทมีการเจริญที่อุณหภูมิเท่ากับ 35 องศาเซลเซียส ได้สูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.47\pm0.25 \times 10^{9}$ CFU/g รองลงมาคือ 30, 40, 45 และ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $9.13\pm0.32 \times 10^{8}$, $7.33\pm1.53 \times 10^{8}$, $4.33\pm0.58 \times 10^{7}$ และ $6.70\pm0.58 \times 10^{5}$ CFU/g ตามลำดับ สอดคล้องกับการศึกษาของ Korsten and Cook (1996) ที่รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเลี้ยงเชื้อ *Bacillus subtilis* คือ 30-37 องศาเซลเซียส และ Joo and Chang (2005) กล่าวว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *Bacillus* sp. I-312 คือ 32 และ 37 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ Genckal and Tari (2006) รายงานว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ

การเจริญและการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอส (Alkaline protease) โดยเชื้อ *Bacillus* sp. คือ 30 และ 37 องศาเซลเซียส

จากการศึกษาชนิดของสับสเตรทและอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติก *Bacillus licheniformis* ในสับสเตรทราคาถูกจากการเกษตร พบว่าการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทและเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นสภาวะที่มีความเหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกต่อไป โดยนำมาศึกษาถึงผลของค่าความเป็นกรด-ด่างในการเจริญคือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5 และ 8.0 พบว่า *Bacillus licheniformis* ที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทและเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส มีการเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 ได้สูงที่สุด ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $2.97\pm0.06 \times10^{8}$ CFU/g รองลงมาคือ 6.5, 6.0, 7.5, 8.0, 5.5 และ 5.0 ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $2.27\pm0.46 \times10^{8}$, $1.60\pm0.44 \times10^{8}$, $9.33\pm1.15 \times10^{7}$, $7.00\pm2.65 \times10^{7}$, $4.67\pm0.58 \times10^{7}$ และ $3.00\pm1.00 \times10^{7}$ CFU/g ตามลำดับ ซึ่งจากการรายงานของ Sen and Babu (2005) รายงานว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตมวลเซลล์แบคทีเรียโพรไบโอติกโดยเชื้อ *Bacillus coagulans* RK-02 คือค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.65 และจากรายงานของ Muis (2006) ที่รายงานว่าค่าความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการผลิตมวลเซลล์โดยเชื้อ *Bacillus subtilis* คือค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 6.0 นอกจากนี้จากรายงานของ Sudharsan et al. (2007) รายงานว่าจากการศึกษาผลของสารอาหารและลักษณะทางกายภาพในการผลิตเอนไซม์อะไมเลสโดย *Bacillus* sp. พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 มีการผลิตเอนไซม์มากที่สุด

จากการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจากสับสเตรทราคาถูกที่เหมาะสมต่อการเจริญโดยใช้แหล่งของไนโตรเจนที่มีราคาถูก แบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถนำไปใช้ในการเจริญได้ง่าย และนิยมนำมาใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียในเชิงอุตสาหกรรม คือ $NaNO_3$, NH_4Cl และ $(NH_4)_2SO_4$ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกมีความสามารถในการเจริญสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อจากสับสเตรทราคาถูกที่เหมาะสมที่เติมแหล่งของไนโตรเจน 1% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $1.31\pm0.06 \times10^{10}$ CFU/g รองลงมาคือ 1% (w/v) $NaNO_3$ และ 1% (w/v) NH_4Cl ซึ่งมีปริมาณเท่ากับ $9.00\pm2.00 \times10^{8}$ และ $1.33\pm0.58 \times10^{7}$ CFU/g ตามลำดับ โดยที่ Mabrouk et al. (1999) รายงานว่าการใช้น้ำสกัดกากถั่วเหลืองผสมกับแอมโมเนียมฟอสเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ อัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Bacillus licheniformis* ATCC21415 และ Tari et al. (2006) รายงานว่ากากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Bacillus* sp. L21 ในขณะที่ de Souza et al. (2006) รายงานว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส (Transglutaminase) โดย *Bacillus circulans* BL32 คือ เปปโตน (Peptone) โดยที่ทริปโตน (Tryptone) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตมวลเซลล์ สอดคล้องกับ Nilegaonkar et al. (2007) กล่าวว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์โปรติเอสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* MCM B-326 คือกากถั่วเหลือง $NaNO_3$ และ NH_4Cl ขณะที่รายงานของ Rao et al. (2007) กล่าวว่าแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสปอร์โดย *Bacillus amyloliquefaciens* B128 คือแอมโมเนียมซัลเฟตและเปปโตน นอกจากนี้รายงานของ

Zhao et al. (2008) รายงานว่าการใช้ Yeast extract และเปปโตนเป็นแหล่งไนโตรเจนในการผลิตสปอร์โดย *Bacillus licheniformis* ให้ปริมาณสปอร์สูงสุด

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอสและไลเปส โดยศึกษาจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในสับสเตรท คือ รำข้าว และ 1% (w/v) $(NH_4)_2SO_4$ รวมทั้งปรับสภาวะที่เหมาะสม คือ เขย่าที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7.0 และวัดกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด พบว่าการใช้สับสเตรทและสภาวะดังกล่าวนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกมีกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูงที่สุด คือ 1130.2 Unit/ml รองลงมาคือกิจกรรมของเอนไซม์โปรติเอสและไลเปส ซึ่งมีกิจกรรมของเอนไซม์เป็น 2.10 และ 1.67 Unit/ml ตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องจากสับสเตรทที่ใช้ในการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโพรไบโอติกประกอบด้วยรำข้าวเป็นส่วนใหญ่ (75%) ซึ่งในรำข้าวประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต 45-65% (Hasheminya and Dehghannya, 2013) โดยมีรายงายการใช้รำข้าวเป็นสับสเตรทในการผลิตเอนไซม์อัลคาไลน์โปรติเอสโดย *Bacillus* (Naidu and Devi, 2005) ในขณะที่จากรายงานของ Tanyildizi et al. (2005) รายงานว่าแป้งมีความเหมาะสมในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส (α- amylase) โดย *Bacillus* sp. และรายงานของ Anto et al. (2006) รายงานว่าการใช้รำข้าวสาลีในการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะไมเลสโดยเชื้อ *Bacillus cereus* MTCC 1305 ให้ปริมาณเอนไซม์สูงสุด นอกจากนี้ Mitsunaga et al. (2007) รายงานการใช้เมล็ดข้าวในการศึกษาการผลิตเอนไซม์อัลฟาอะไมเลส

ผลผลิต (Output)

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการทั้งในระดับชาติและนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่ม เลขที่ และหน้า)

1) สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, น้ำผึ้ง บุตรโคตร, พรพิมล สุดแสวง และวีรงพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2559). การศึกษาคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพในรูปสารกึ่งบริสุทธิ์จากแบคทีเรีย *Bacillus licheniformis*. การประชุมวิชาการระดับชาติ "วิทยาศาสตร์วิจัย" ครั้งที่ 8. มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา วันที่ 30-31 พฤษภาคม พ.ศ. 2559

2) Butkhot, N., Soodsawaeng, P., Vuthiphandchai, V. and Nimrat, S. (2016). Effect of antibacterial compounds on the growth of total heterotrophic bacteria in dried squid samples. The 5th Burapha University International conference 2016. Dusit Thani Hotel, Pattaya, Chonburi, 28-29 July 2016.

2. การจดสิทธิบัตร

-

3. ผลงานเชิงพาณิชย์ (มีการนำเสนอไปผลิต/ขาย/ก่อให้เกิดรายได้ หรือมีการนำไปประยุกต์ใช้โดยภาคธุรกิจ หรือบุคคลทั่วไป)

-

4. ผลงานเชิงสาธารณะ (เน้นประโยชน์ต่อสังคม ชุมชน ท้องถิ่น)

ผลิตบัณฑิตในระดับปริญญาเอก สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อมคือ นางสาวน้ำผึ้ง บุตรโคตร ซึ่งเป็นนิสิตที่ได้รับทุนของโครงการปริญญาเอกกาญจนาภิเษก ที่กำลังศึกษาอยู่ในปัจจุบัน

เอกสารอ้างอิง

กำเนิด สุภัณวงษ์. (2534). *จุลชีวอุตสาหกรรม*. กรุงเทพฯ: โอ. เอส. พริ้นติ้ง เฮ้าส์.

กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. (2550). *เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาสำหรับอาหารทั่วไปที่มิใช่อาหารควบคุมเฉพาะกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์*. วันที่ค้นข้อมูล 5 พฤศจิกายน 2550, เข้าถึงได้จาก http://www.dmsc.moph.go.th/webroot/BQSF/File/varity/cheme/confict22.htm

กรรณิการ์ เสนทอง, สุเมธ เนาว์รุ่งโรจน์, มณฑล เลิศคณาวนิชกุล, ภูวดล บางรักษ์ และวรางคณา จุ้งลก. (2551). *การคัดเลือกและการวิเคราะห์แยกชนิด Bacillus ที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสที่ทนร้อนและ Lactobacillus จากน้ำนมดิบ และฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์.

ขจีนาฏ โพธิเวชกุล, สุมาลี เหลืองสกุล และสมใจ ศิริโภค. (2541). *การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เพื่อผลิตเอนไซม์อะไมเลส โปรติเอส และไลเปส*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ.

บุษกร อุตรภิชาติ. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยทักษิณ.

ปรียา วิบูลย์เศรษฐ์, เนื้อทอง วนานุวัธ, สายสนม ประดิษฐดวง และวราภา วรพงษ์. (2532). *คุณภาพกุ้งแห้ง*. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร, คณะอุตสาหกรรมเกษตร, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พีร์ เหมะรัชตะ. (2551). ความสำคัญของ Probiotics ต่อการแพทย์. *Chula Med. Journal*, 52(3), 193-204.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. (2538). *จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง*. กรุงเทพฯ: รั้วเขียว.

รังสินี โสธรวิทย์. (2550). *เคมีและจุลชีววิทยาเบื้องต้นของอาหาร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไวรุจน์ เดชมหิทกุล, จันทร์จีรา อยู่คง, กนกวรรณ พุ่มพุทรา, แสงชัย เอกประทุมชัย และเพ็ญจันทร์ เมฆวิจิตรแสง. (2550). การศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตสปอร์ *Bacillus subtilis* เพื่อเป็นโปรไบโอติกในสัตว์. *วารสารวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยพระจอมเกล้าธนบุรี*, 30(2), 251-260.

ศิวาพร ศิวเวชช. (2546). *วัตถุเจือปนอาหาร*. นครปฐม: ศูนย์ส่งเสริมและฝึกอบรมการเกษตรแห่งชาติ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. (2547). *เทคโนโลยีชีวภาพอาหารการหมักและสิ่งแวดล้อม*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์หาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สินหทัย สมบูรณ์ยิ่ง. (2545). *การสำรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ปลาหมึกหวานปรุงรสที่จำหน่ายในตลาดหนองมน จังหวัดชลบุรี*. ปัญหาพิเศษทางจุลชีววิทยา ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต, สาขาวิชาจุลชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, ปรียาพร ทองเนียม และวีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย. (2553ก). แบคทีเรียกลุ่มทนเค็มและแบคทีเรียกลุ่มเอนเทอโรแบคทีเรียซีอี ในผลิตภัณฑ์หมึกแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี ประเทศไทย. *วารสารวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น*, 38(4), 509-519.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และปรียาพร ทองเนียม. (2553ข). การปนเปื้อนของแบคทีเรียกลุ่มเฮทเทอโรโทรปในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลแห้งที่จำหน่ายในจังหวัดชลบุรี. *วารสารปัญญาภิวัฒน์*, 2(1), 70-83.

สุบัณฑิต นิ่มรัตน์, วีรพงศ์ วุฒิพันธุ์ชัย และสวามินี ธีระวุฒิ. (2553ค). รายงานวิจัยเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหารทะเลในจังหวัดชลบุรีให้ปราศจากยาฆ่าแมลง สีสังเคราะห์และแบคทีเรียก่อโรค. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2553.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. (2545). *จุลชีววิทยาทางอาหาร*. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. (2545). *รายงานการเฝ้าระวังโรค ประจำเดือนมีนาคม 2545*. เอกสารอัดสำเนา.

สำนักระบาดวิทยา กรมควบคุมโรค. (2548). *รายงานการสอบสวนโรคอาหารเป็นพิษ ประจำปี พ.ศ. 2548: สรุปผลการเฝ้าระวังโรคอาหารเป็นพิษในประเทศไทย ปี พ.ศ. 2548*. วันที่ค้นข้อมูล 5 พฤศจิกายน 2550, เข้าถึงได้จาก http://203.157.15.4/publish/outbreak/FPOI49/sur48.htm

เสาวนีย์ ธรรมสถิติ. (2547). *แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพ เซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์*. กรุงเทพฯ: สถาบันพัฒนาสาธารณสุขอาเซี่ยน.

อุทัย เก้าเอี้ยน. (2549). โปรไบโอติคส์. *สงขลานครินทร์เวชสาร*, 24(4), 315-323.

อุษามาส จริยวรานุกูล. (2548). การรอดชีวิตของโปรไบโอติคและการนำไปใช้ประโยชน์. *วารสารวิชาการมหาวิทยาลัยหอการค้าไทย*, 25, 84-94.

Ahern, M., Verschueren, S. and van Sinderen, D. (2003). Isolation and characterisation of a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* strain B439. *FEMS Microbiology Letters*, 220, 127-131.

Amarty, S. A. and Leung, J. P. C. (2000). Corn steep liquor as a source of nutrients for ethanologic fermentation by *Bacillus stearothermophilus* T-13. *Bulletin of the Chemists and Technologists of Macedinia*, 9, 65-71.

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. and Valdivia, E. (2007). Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods. In: A. Mendez-Vilas (Ed.). *Communicating current research and educational topics and trends in applied microbiology*, Vol. 1, pp. 475-486.

Anthony, T., Rajesh, T., Kayalvizhi, N. and Gunasekaran, P. (2009). Influence of medium components and fermentation conditions on the production of bacteriocin(s) by *Bacillus licheniformis* AnBa9. *Bioresource Technology*, 100, 872-877.

Anto, H., Trivedi, U. and Patel, K. (2006). Alpha amylase production by *Bacillus cereus* MTCC 1305 using solid-state fermentation. *Food Technology Biotechnology*, 44 (2), 241-245.

Aycicek, H., Cakiroglu, S. and Stevenson, T. H. (2005). Incidence of *Staphylococcus aureus* in ready-to-eat meals from military cafeterias in Ankara, Turkey. *Food Control*, 16, 531-534.

Ayulo, A. M. R., Machado, R. A., and Scussel, V. M. (1994). Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus* in fish and seafood from the southern region of Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 24, 171-178.

Beuchat, L. R. and Golden, D. A. (1989). Antimicrobials occurring naturally in foods. *Food Technology*, 43, 134–142.

Brul, S., and Coote, P. (1999). Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*, 50, 1–17.

Cherif, A., Chehimi, S., Limem, F., Hansen, B. M., Hendriksen, N. B., Daffonchio, D., and Boudabous, A. (2003). Detection and characterization of the novel bacteriocin entomocin 9, and safety evaluation of its producer, *Bacillus thuringiensis* ssp. entomocidus HD9. *Journal of Applied Microbiology*, 95(5), 990-1000.

Cherif, A., Ouzari, H., Daffonchio, D., Cherif, H., Ben Slama, K., Hassen, A. and Boudabous, A. (2001). Thuricin 7: a novel bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* BMG1.7, a new strain isolated from soil. *Letters in Applied Microbiology*, 32(4), 243-247.

Chotmongcol, K,, Vuthiphandchai, V., Theeravut, S. and Nimrat, S. (2010) Contamination of formalin, salicylic acid and synthetic dyes of foods distributed in the Eastern Thailand. The 9th National Environmental Conference, March 24-27, 2010, Sunee Grand Hotel and Convention Center.

Cladera-Olivera, F., Caron, G. and Brandelli, A. (2004). Bacteriocin-like substance production by *Bacillus licheniformis* strain P40. *Letters in Applied Microbiology,* 38(4), 251-256.

Compaoré, C. S., Nielsen, D. S., Sawadogo-Lingani, H., Berner, T. S., Nielsen, K. F., Adimpong, D. B. and Thorsen, L. (2013). *Bacillus amyloliquefaciens* ssp. plantarum strains as potential protective starter cultures for the production of Bikalga, an alkaline fermented food. *Journal of Applied Microbiology,* 115(1), 133-146.

Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R. J. and Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *International Journal Antonie Van Leeuwenhoek,* 69, 193-202.

El Enshasy, H., Abuoul-Enein, A., Helmy, S. and El Azaly, Y. (2008). Opimization of the industrial production of alkaline protease by *Bacillus licheniformis* in different production scale. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 2(3), 583-593.

Emborg, J. and Dalgaard, P. (2006), Formation of histamine and biogenic amines in cold smoked tuna: An investigation of psychrotolerant bacteria from samples implicated in cases of histamine fish poisoning. *Journal of Food Protection*, 69, 897-906.

Fisher, K. and Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101, 1232-1240.

Gangadharan, D., Sivarrmakrishnan, S., Nampoothiri, K. M. and Pandey, A. (2006). Solid culturing of *Bacillus amyloliquefaciens* for alpha amylase production. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), 269-274.

Genckal, H., and Tari, C. (2006). Alkaline protease production from alkalophilic *Bacillus* sp. isolated from natural habitats. *Enzyme and Microbial Technology, 39*, 703-710.

Hatha, A. A. M. and Lakshmanaperumalsamy, P. (1997). Prevalence of *Salmonella* in fish and crustaceans from markets in Coimbatore, South India. *Food Microbiology*, 14, 111–116.

Hasheminya, S. –M. and Dehghannya, J. (2013). Processing industries: valuable strategy for reducing rice losses. *International Journal of Farming and Allied Sciences*, 2(15), 498-500.

Hemalatha, S. and Shanthi, S. (2010). In vitro characterization of bacteriocin producing *Bacillus subtilis* from milk samples. *African Journal of Microbiology Research*, 4, 2004-2010.

Holt, H. M., Gahrn-Hansen, B. and Bruun, B. (2005). *Shewanella algae* and *Shewanella putrefaciens*: clinical and microbiological characteristics. *Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, 11, 347–352.

Hosseini, H., Cheraghali, A. M., Yalfani, R. and Razavilar, V. (2004). Incidence of *Vibrio* spp. in shrimp caught off the south coast of Iran. *Food Control*, 15, 187–190.

Jeyasekaran, G., Ganesan, P., Shakila R. J., Maheswari, K. and Sukumar, D. (2004). Dry ice as a novel chilling medium along with water ice for short-term preservation of fish Emperor breams, lethrinus (*Lethrinus miniatus*). *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 5, 485– 493.

Kayalvizhi, N. and Gunasekaran, P. (2008). Production and characterization of a low-molecular-weight bacteriocin from *Bacillus licheniformis* MKU3. *Letters in Applied Microbiology,* 47(6), 600-607.

Khashe, S. and Jandaj, M. (1998). Biochemical and pathogenic properties of *Shewanella alga* and *Shewanella putrefaciens*. *Journal of Clinical Microbiology*, 36(3), 783-787.

Khodair, T. A., Abdelhafez, A. A. M., Sakr, H. M. and Ibrahim, M. M. M. (2008). Improvement of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticide production by fed-batch culture on low cost effective medium. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4 (6), 923-935.

Korsten, L. and Cook, N. (1996). Optimizing culturing condition for *Bacillus subtilis*. *South African Avocado Growers' Association Yearbook, 19*, 54-58

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.

Li, H. and O'Sullivan, D. J. (2002). Heterologous expression of the *Lactococcus lactis* bacteriocin, nisin, in a dairy *Enterococcus* strain. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(7), 3392–3400.

Mabrouk, S. S., Hashem, A. M., El-Shayeb, N. M. A., Ismail, A. M. S. and Abdel-fattah, A. F. (1999). Optimization of alkaline protease productivity by *Bacillus licheniformis* ATCC 21415. *Bioresource Technology*, 69, 155-159.

Martirani, L., Varcamonti, M., Naclerio, G. and De Felice, M. (2002). Purification and partial characterization of bacillocin 490, a novel bacteriocin produced by a thermophilic strain of *Bacillus licheniformis*. *Microbial cell factories,* 1(1), 1.

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

Matamoros, S., Pilet, M. F., Gigout, F., Pre´vost, H. and Leroi, F. (2009b). Selection and evaluation of seafood-borne psychrotrophic lactic acid bacteria as inhibitors

of pathogenic and spoilage bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, 26, 638–644.

Mitsunaga, S., Kobayashi, M., Fukui, S., Fukuoka, K., Kawakami, O., Yamaguchi, J., Ohshima, M. and Mitsui, T. (2007). α-Amylase production is induced by sulfuric acid in rice aleurone cells. *Plant Physiology and Biochemistry, 45*, 922-925.

Muis, A. (2006). Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control. *Indonesian Journal of Agricutural Science, 7* (2), 51-56.

Naidu, K. S. B. and Devi, K. L. (2005). Optomization of thermostable alkaline protease production from species of *Bacillus* using rice bran. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 724-726.

Nilegaonkar, S. S., Zambare, V. P., Kanekar, P. P., Dhakephalkar, P. K. and Sarnaik, S. S. (2007). Production and partial characterization of dehairing protease from *Bacillus cereus* MCM B-326. *Bioresource Technology*, 98, 1238-1245.

Normanno, G., Parisi, A., Addante, N., Quaglia, N. and Dambrosio, A. (2006). *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio vulnificus* and microorganisms of fecal origin in mussels (*Mytilus galloprovincialis*) sold in the Puglia region (Italy). *International Journal of Food Microbiology*, 106, 219 – 222.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A. I. and Onilude A. A. (2003). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. *African Journal of Biotechnology*, 2(8), 219-227.

Papagianni, M., Avramidis, N., Filioussis, G., Dasiou, D. and Ambrosiadis, I. (2006). Determination of bacteriocin activity with bioassays carried out on solid and liquid substrates: Assessing the factor "indicator microorganism". *Microbial Cell Factories*,5(30), 1-14.

Parihar, V. S., Barbuddhe, S. B., Danielsson-Tham, M. L. and Tham, W. (2008). Isolation and characterization of *Listeria* species from tropical seafoods. *Food Control*, 19, 566–569.

Prabakaran, G. and Balaraman, K. (2006). Development of cost-effective medium forthe large scale production of *Bacillus. thuringiensis* var *israelensis*. *Biological Control, 36*, 288-292.

Rao, Y. K., Tsay, K. J., Wu, W. S. and Tzeng, Y. M. (2007). Medium optimization of carbon and nitrogen source for the production of spores from *Bacillus amyloliquefaciens* B128 using response surface methodology. *Process Biochemistry,* 42, 535-541.

Rech, R. and Ayub, M. A. Z. (2007). Simplified feeding strategies for fed-batch cultivation of *Kluyveromyces marxianus* in cheese whey. *Process Biochemistry*, 42, 873-877.

Samutsan, S., Vuthiphandchai, V., Theeravut, S. and Nimrat, S. (2010) Distribution of borax, sodium hydrosulfite and pesticide residues in food product from Eastern Thailand. The 9th National Environmental Conference, March 24-27, 2010, Sunee Grand Hotel and Convention Center.

Sandhia, G. S. and Jijesh, M. (2009). *Studies on the production of proteinase by Bacillus subtilis MTCC 1790 in different low cost*. Retrieved January 9, 2009, from http;//www.sngscollege.info/Articles/Sandhia_GVC.pdf.

Sen, R. and Babu, K. S. (2005). Modeling and optimization of the process conditions for biomass Production and sporulation of probiotic culture. *Process Biochemistry,* 40, 2531-2538.

Sofos, J. N., Beuchat, L. R., Davidson, P. M. and Johnson, E. A. (1998). *Naturally occurring antimicrobials in food*: *Task force report no*. 132. Ames: Council for Agricultural Science and Technology.

Sudharhsan, S., Senthilkumar, S. and Ranjith, K. (2007). Physical and nutritional factors affecting the production of amylase from species of *Bacillus* isolated from spoiled food waste. *African Journal of Biotechnology*, 6(4), 430-435.

Tanyildizi, M. S., Ozer, D. and Elibol, M. (2005). Optimization of α-amylase production by *Bacillus* sp. using response surface methodology. *Process Biochemistry*, 40, 2291-2296.

Tari, C., Genckal, H. and Tokatli, F. (2006). Optimization of a growth medium using a statistical approach for the production of an alkaline protease from a newly isolated *Bacillus* sp. L21. *Process Biochemistry*, 41, 659-665.

ten Brink, B., Minekns, M., Vander Vossen, J. M. B. M., Leer, R. J. and Huis in't Veld, J. H. J. (1994). Antimcrobial activity of lactobacilli. *Journal of Applied Bacteriology*, 77, 140-148.

Volken de Souza, C. F., Flores, S. H. and Ayub, M. A. Z. (2006). Optimization of medium composition for the production of transglutaminase by *Bacillus circulans* BL32 using statistical experimental method. *Process Biochemistry*, 41, 1186-1192.

Yin, L. J., Wu, C. W. and Jiang, S. T. (2007). Biopreservative effect of pediocin ACCEL on refrigerated seafood. *Fisheries Science*, 73, 907-912.

Yongjin, H., Wenshui, X. and Xiaoyong, L. (2007). Changes in biogenic amines in fermented silver carp sausages inoculated with mixed starter cultures. *Food Chemistry*, 104, 188-195.

Zdolec, N., Hadziosmanovic, M., Kozacinski, L., Cvrtila, Z., Filipovic, I., Skrivanko, S. and Leskovar, K. (2008). Microbial and physicochemical succession in fermented sausages produced with bacteriocinogenic culture of *Lactobacillus sakei* and semi-purified bacteriocin mesenterocin Y. *Meat Science*, 80, 480–487.

Zhao, S., Hu, N., Huang, J., Liang, Y. and Zhao, B. (2008). High-yield spore production from *Bacillus licheniformis* by solid state fermentation. *Biotechnology Letter*, 30, 295-297.