



รายงานฉบับสมบูรณ์

**“การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิต
ผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ”**

โดย

รศ. ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์

ผศ.ดร. คมแข พิลาสมบัติ

ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

(ส่วนที่ 2 เล่มที่ 1)

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “การนำเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิต
ผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ”

โดย

รศ.ดร.อดิศร	เสวตวิวัฒน์	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ผศ.ดร.คมแห	พิลาสมบัติ	สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

โครงการ ศูนย์เครือข่ายการวิจัยเทคโนโลยีเนื้อสัตว์

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

โครงการย่อยที่ 2 “การนำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกมาใช้ในการเป็นก๊อ
เชื้อสำหรับผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อเพื่อความปลอดภัยในอาหารและสุขภาพ”

ส่วนที่ 2 การคัดแยกและศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้าง
สารแบคเทอริโอซินและที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก

แผนการดำเนินการ ข้อที่ 2.1, 2.2, 3, 4.1 และ 4.2

(ส่วนที่ 2 เล่มที่ 1)

**ส่วนที่ 2 การคัดแยกและศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่
สร้างสารแบคเทอริโอซินและที่มีคุณสมบัติเป็น
โปรไบโอติก**

(ส่วนที่ 2 เล่มที่ 1)

สารบัญ

	หน้า
แผนการดำเนินงาน	4
สรุปแผนการดำเนินงาน	5
บทคัดย่อ	6
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
วิธีการดำเนินงาน	18
ผลการทดลองและวิจารณ์	
การทดลองที่ 1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอรีโอซิน จากแหล่งต่างๆ	38
การทดลองที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติก	71
การทดลองที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรีย ในอาหารหมักประเภทเนื้อ	86
สรุปผลการทดลอง	95
ข้อเสนอแนะ	96
บรรณานุกรม	97
ภาคผนวก	102

ส่วนที่ 2 การคัดแยกและศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินและที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากตัวอย่างต่างๆ

2.1. คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินจากแหล่งต่างๆ

2.1.1 ศึกษาคุณสมบัติทั่วไปของสารแบคทีเรียโอซิน

2.1.2 การจำแนกชนิดของสารแบคทีเรียโอซิน

2.1.3 แบคทีเรียโอซินศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินที่ใช้ร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* spp.

2.2 คุณสมบัติเบื้องต้นการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซิน

2.2.1 การมีชีวิตรอดและสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินในสภาวะที่เป็นกรด สภาวะที่มีน้ำดี

2.2.2 การมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง

2.3 ศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นกล่าเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อ

2.3.1 ศึกษาการมีชีวิตรอดของกล่าเชื้อแบคทีเรียในสภาวะที่มีไนไตรท์

2.3.2 ศึกษาผลการการใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกร่วมกับกระเทียมในการทำลายเชื้อ

Salmonella ในแบบจำลองการหมักเหนม

2.4 การใช้สารแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดในการลดเชื้อ *Salmonella* sp. ในเนื้อโค

2.5 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากลำไส้สุกร ลำไส้ไก่ กระทั่ง และลำไส้โค

สรุปขั้นตอนการดำเนินงาน

กิจกรรม	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ความสำเร็จ
2. คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากแหล่งต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทรีโอซิน 2.1 คัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก จากแหล่งต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทรีโอซินที่สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค 2.2 ใช้แบคเทรีโอซินลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรคที่พบมากในเนื้อสดก่อนการผลิตอาหารหมักประเภทเนื้อ	1. ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคเทรีโอซินที่มีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้ 2. ได้ทราบข้อมูลว่าเชื้อที่คัดเลือกได้ใหม่มีคุณสมบัติเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อได้ 3. สามารถลดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสัตว์โดยใช้สารแบคเทรีโอซินหรือใช้แบคเทรีโอซินร่วมกับกรดอินทรีย์ ซึ่งมีเนื้อสัตว์เป็นวัตถุดิบหลักในการผลิต ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยในการบริโภคมากขึ้น 4. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 1 เรื่อง	/ / /
3. คัดเลือกและศึกษาแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก	1. ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเพื่อนำไปศึกษาการนำไปใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียโปรไบโอติกในอาหารหมักประเภทเนื้อต่อไป 2. ได้ข้อมูลสำหรับเผยแพร่ตีพิมพ์ในวารสารภายในหรือต่างประเทศจำนวน 1 เรื่อง	/ /
4. นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 และ 3 มาใช้เป็นกล้ำเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อ 4.1 การศึกษาการนำกล้ำเชื้อแบคทีเรีย ที่เป็นสูตรสำเร็จ จากข้อ 1.3 มาทดสอบการใช้เป็นกล้ำเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เนื้อ (In vitro) 4.2 การศึกษาการนำกล้ำเชื้อแบคทีเรีย จากเชื้อที่คัดแยกใหม่ (จากข้อ 2 และ 3) มาทดสอบ	1. สามารถผลิตกล้ำเชื้อแบคทีเรียที่นำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อที่มีความปลอดภัยจากเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ได้กล้ำเชื้อที่มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่สามารถนำมาใช้ในอาหารหมักประเภทเนื้อ	/

กิจกรรม	ผลที่คาดว่าจะได้รับ	ความสำเร็จ
การใช้เป็นกล้ำเชื้อโปรไบโอติกใน ผลิตภัณฑ์เนื้อ (In vitro)		

แผนการดำเนินงานข้อที่ 2.1, 2.2, 3 และ 4.2

บทคัดย่อ

การทดลองนี้ทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคเทอรีโอซินและที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก โดยแยกเชื้อจากระบบทางเดินอาหารของปลากระพง ปลาช่อน ปลาดุก ปลาตะเพียน ปลานิล ปลาสวาย กระเพาะโค ลำไส้เล็กกระทา ลำไส้เปิดและลำไส้สุกร พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอรีโอซิน 7 ไอโซเลท ได้แก่ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2, P 1 และ P 2 จากลำไส้ปลากระพงและปลาสวายตามลำดับ สามารถสร้างสารแบคเทอรีโอซิน Nisin A และ Z ตามลำดับ และ *Lactobacillus salivarius* D 4, D 8, D 9 และ D 10 จากลำไส้เปิด สร้างสารแบคเทอรีโอซิน abp 118 α และ β ตามลำดับ เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติก และกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมัก โดยทดสอบคุณสมบัติการทนต่อค่าความเป็นกรดค่าความสามารถในการทนต่อน้ำดี การมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง ความสามารถในการมีชีวิตรอดต่อไนไตรท์และแบบจำลองการหมักแหนม ผลการทดลองพบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถทนและมีชีวิตรอดในสภาวะดังกล่าวข้างต้น จึงกล่าวได้ว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็น โปรไบโอติกและกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียกรดแลกติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียที่พบได้ทั่วไปตามธรรมชาตินอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ซึ่งปนเปื้อนมากับอาหารได้ สารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างออกมาส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อย แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ได้ เช่น แบคเทอริโอซิน ซึ่งจัดเป็นโมเลกุลของโปรตีน โดยสามารถสร้างจากแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ แบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติในการทำลายเฉพาะแบคทีเรียในสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน ปัจจุบันแบคเทอริโอซินได้รับความสนใจ และมีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง โดยสามารถนำมาใช้ประโยชน์ในด้านอุตสาหกรรมอาหาร เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิดที่ปนเปื้อนมากับอาหาร สำหรับในวงการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ แบคทีเรียกรดแลกติก ได้รับความสนใจมานานแล้ว ในต่างประเทศนั้นได้มีการศึกษาความหลากหลายและประโยชน์ของชนิดแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ต่าง ๆ มากมายและสามารถนำไปประยุกต์ใช้สำหรับเป็นโปรไบโอติกในสัตว์น้ำ เพื่อยับยั้งและทำลายสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรคต่างๆ ในระบบทางเดินอาหาร แต่สำหรับแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นสารที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ พบว่ายังมีการศึกษาไม่มากนัก ไม่ว่าจะเป็นในแง่ของสัตว์น้ำหรือผลิตภัณฑ์ของสัตว์น้ำ ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในเรื่องของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินในระบบทางเดินอาหารของปลาได้ เพื่อศึกษาลักษณะและคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สามารถคัดแยกได้

1. แบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะสำคัญคือ ไม่สร้างสปอร์ (nonsporing) ไม่เคลื่อนที่ รูปร่างเป็นแท่ง (rod) และกลม (cocci) จัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae ในการเจริญส่วนใหญ่ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการอากาศเลย (strictly anaerobe) เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหมักน้ำตาลโดยไม่ใช้ออกซิเจน จึงมีความต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อนและสมบูรณ์ ส่วนใหญ่ต้องการสารอนินทรีย์ในปริมาณค่อนข้างสูง เช่น แมงกานีส แมกนีเซียม และ ฟอสฟอรัส (Orla-Jensen. 1919 อ้างโดย ภักดี สุขพันธ์. 2548) ในปัจจุบันมีการศึกษาและคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากแหล่ง

ต่างๆมากมาย อาทิเช่น การศึกษาและคัดแยกจากอาหารหมักดองพื้นบ้าน (สุริยรัตน์. 2545) น้านมโคดิบ โยเกิร์ต หรือลำไยสดตัวชนิดต่างๆ (ภักดี สุขพันธ์. 2548)

2. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก

การศึกษานุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติกนั้นอาศัยลักษณะทางกายภาพ สมบัติทางชีวเคมี ลักษณะสัณฐาน องค์ประกอบของผนังเซลล์ กรดไขมันภายในเซลล์ ไอโซพรีนอยด์(isoprenoid) ควิโนน (quinone) รวมทั้งการศึกษาระดับโมเลกุล เช่น mol % G+C ของดีเอ็นเอ การเข้าคู่กันของดีเอ็นเอ และลำดับเบสบน rRNA ทำให้พบลักษณะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแต่ละสกุล (นงลักษณ์ สุวรรณพิณ และปรีชา สุวรรณพิณ, 2544) แบคทีเรียกรดแลกติก (Lactic acid bacteria) แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่ม homofermentative และกลุ่ม heterofermentative โดยกลุ่มแรกสามารถสร้างกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัวอื่นๆ ได้กรดแลกติกประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ ที่เหลือจะเปลี่ยนไปเป็นกรดอะซิติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอนไดออกไซด์อีกเล็กน้อย ส่วนแบคทีเรียกลุ่มหลังสามารถผลิตกรดแลกติกจากน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 ตัว ได้กรดแลกติกประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ได้กรดอะซิติกรวมทั้งเอทานอล 20-25 เปอร์เซ็นต์ และคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ ปัจจุบันสามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกออกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่ *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Carnobacterium*, *Weissella* และ *Lactobacillus* (Axelsson, 2004) ลักษณะความแตกต่างเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแลกติกแต่ละจีนัส ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะความแตกต่างของแบคทีเรียกรดแลกติก

ลักษณะ	รูปร่างแท่ง		รูปร่างกลม							
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lacto bacillus</i>	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus, Vagococcus,</i>	<i>Leuconostoc, Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus.</i>	<i>Tetragenococcus</i>	<i>Weissella</i>
เซลล์ต่อกันเป็น 4	-	-	+	-	-	-	+			
เซลล์	-	±	-	-	-	+	-			
ผลิต CO ₂ จาก	+	±	+	+	+	+	±			
กลูโคส ^b	-	±	-	+	-	-	±	-	+	-
เจริญที่อุณหภูมิ	ND ^d	±	+	+	-	±	±	-	-	+
10 องศาเซลเซียส	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
เจริญที่อุณหภูมิ	ND	±	-	+	±	±	+	±	-	-
45 องศาเซลเซียส	-	-	+	+	-	-	-	-	+	±
เจริญใน	L	D,L,DL ^f	L	L	L	D	L,	-	+	-
6.5%NaCl							DL ^f	-	-	±
เจริญใน 18%NaCl								-	+	-
เจริญที่ pH 4.4								L	L	D,
เจริญที่ pH 9.6										DL ^f
ชนิดของกรดแลกติก ^c										

หมายเหตุ +, ใช่; -, ไม่ใช่; ±, ผลขึ้นกับสปีชีส์; ND, ไม่ระบุ

^a*Weissella* บางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน

^b+, homofermentative; -, heterofermentative

^cอาจผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณเล็กน้อย ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ

^dไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 8 เปอร์เซ็นต์

^eชนิดของกรดแลกติกจากการหมักกลูโคส

ชนิดของกรดแลกติกแตกต่างกันตามสปีชีส์

D, ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกซึ่งบ่งบอกถึงการหมุน ระนาบแสงซ้าย

L, ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกซึ่งบ่งบอกถึงการหมุน ระนาบแสงขวา

DL, ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกซึ่งบ่งบอกถึงการหมุน 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน

ที่มา : คัดแปลงจาก Axelsson (2004)

3. สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติกนอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นเฉพาะตัวในอาหารหมักแล้ว ยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญ และทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเกิดการเน่าเสีย และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ซึ่งปนเปื้อนมากับอาหาร เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *C. perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* เป็นต้น ซึ่งสารที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างออกมา ส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้นในปริมาณน้อย แต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) แอมโมเนีย (ammonia) เอทานอล (ethanol) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ไดอะซีทิล (diacetyl) อะซีโตอิน (acetoin) อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) เบนโซเอต (benzoate) เอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (bacteriolytic enzyme) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (Franz *et al.* 1998)

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ได้ (Caplice *et al.* 1999) สารต่างๆ ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีการศึกษากันมาก ได้แก่

3.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กรดอินทรีย์ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซิติก สำหรับกรดอะซิติกสามารถยับยั้งได้ดีกว่ากรดแลกติก และมีช่วงการยับยั้งที่กว้าง สามารถยับยั้งได้ทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย การใช้กรดทั้งสองชนิดนี้ร่วมกันสามารถลดอัตราการเจริญของทั้ง *Salmonella Typhimurium* ได้มากกว่าการใช้กรดชนิดใดชนิดหนึ่งเพียงอย่างเดียว จึงกล่าวได้ว่ากรดทั้งสองมี synergistic activity เมื่อกรดอินทรีย์เข้าไปภายในเซลล์แล้วกรดจะแตกตัวปล่อยโปรตอนเข้าไปใน cytoplasm ทำให้เกิดภาวะที่เป็นกรดจึงทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Bojana and Irena, 1998)

3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมในระหว่างการเจริญของแบคทีเรียทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ สามารถพบได้ในแบคทีเรียกรดแลกติก เนื่องจากไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นพิษต่อจุลินทรีย์ ที่ไม่สามารถผลิตเอนไซม์ คะตะเลส ทำลายฤทธิ์ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นของการเกิด superoxide radicals ($O_2^{\cdot-}$) และ hydroxyl radicals (OH) ซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสมเป็นจำนวนมาก ก็จะมีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ของ จุลินทรีย์อื่นๆ ตลอดจนแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่มรูปร่างกลม และรูปท่อน (Caplice and Fitzgerald. 1999)

3.3 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

Eklund. (1984) อ้างโดย Caplice and Fitzgerald. (1999) รายงานว่า คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จะเกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสให้เป็นกรดแลกติกแบบ hetero fermentative นอกจากนี้วิธีเมแทบอลิซึมอื่น ๆ ก็สามารถสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ได้ในระหว่างกระบวนการหมัก คาร์บอนไดออกไซด์จะไปยับยั้งระบบเอนไซม์ของกระบวนการดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) และมีการสะสมของ คาร์บอนไดออกไซด์ในชั้นไขมัน จึงเป็นเหตุให้คุณสมบัติในการซึมผ่านของสารเสียไป คาร์บอน ไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงๆ สามารถป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดได้

3.4 ไดอะซีทิล (Diacetyl)

Caplice and Fitzgerald. (1999) กล่าวว่า ไดอะซีทิลชนิด 2,3-butanedione เป็นผลผลิตสุดท้ายที่ได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลกติก ซึ่งสังเคราะห์ขึ้นจากไพรูเวตที่เป็นสารตัวกลาง (intermediate) แบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* สามารถสังเคราะห์ไดอะซีทิลได้ ซึ่งเป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ด้วย โดยจะมีการสร้างสารไดอะซีทิลขึ้นในระหว่างการใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) และบางครั้งอาจเกิดขึ้นจากการใช้ซิเตรต (citrate) โดยซิเตรตจะถูกเปลี่ยนผ่านไพรูเวต ไปเป็นสาร ไดอะซีทิล และอาจอยู่ในรูปรีดิวซ์คือ อะซีโตอิน (acetoin) Krier *et al.* (1998) รายงานว่า ไดอะซีทิล (diacetyl) และ แบคเทอริโอซิน เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทโปรตีน หรือ โปรตีนเชิงซ้อน (protein complex) ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (food-borne pathogen) เช่น *L. monocytogenes*, *C. perfringens*, *B. cereus* และ *S. aureus* เพราะฉะนั้นจึงถือได้ว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารถนอมอาหารตามธรรมชาติ

3.5 รีวเทอร์ริน (Reuterin)

รีวเทอร์รินมีชื่อทางเคมีว่า 3-hydroxypropanol ละลายน้ำได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเป็นกลาง (Axelsson *et al.* 2004) รีวเทอร์รินถูกผลิตขึ้นในระยะ stationary phase ของ *Lactobacillus reuteri* ซึ่งมีการเจริญเติบโตแบบไม่อาศัยอากาศ (anaerobic) สร้างจากกลูโคสและกลีเซอรอล หรือกลีเซอรอลดีไฮด์ สามารถยับยั้งกิจกรรมไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเตส (ribonucleotide reductase) เป็นสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการต่อต้านไวรัส ฟังไจและโปรโตซัว (Caplice and Fitzgerald. 1999)

3.6 แบคทีริโอซิน (bacteriocin)

แบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและการถนอมอาหาร แบคทีริโอซินจะมีขนาดเล็ก ทนต่อความร้อน (Rodriguez *et al.* 2003) ในระยะเริ่มต้นได้มีการศึกษาตัวอย่างของแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ คือ *E. coli* ซึ่งสามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีน ออกมายับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้ และเรียกสารดังกล่าวว่า colicins ต่อมามีการค้นพบสารที่มีลักษณะคล้าย colicin ซึ่งสร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก จึงเรียกสารกลุ่มนี้ว่า แบคทีริโอซิน (bacteriocin) (Riley and Wertz. 2002)

Muyanja *et al.* (2002) กล่าวว่า แบคทีริโอซินเป็นสารโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร โมเลกุลของแบคทีริโอซินประกอบด้วย กรดอะมิโนหลายร้อยตัวต่อกันแบบ linear chain เนื่องจากไม่มีพันธะไฮโดรเจนและ disulphide bridges (-s-s-) สารแบคทีริโอซินที่สร้างจากเชื้อต่างชนิดกันจะมีโครงสร้างทางเคมีที่แตกต่างกัน และสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน De Vuyst and Vandamme. (1994) อ้างโดย พงษ์เทพ วิไลพันธ์. (2546) รายงานว่า แบคทีริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียโดยสังเคราะห์จากไรโบโซม ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนการลอกแบบ (transcription) และการแปลรหัส (translation) จากยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซิน โดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินบางชนิดอยู่บนโครโมโซม เช่น nisin, lactocin, helveticin J, lactacin B และ F หรืออยู่บนพลาสมิด เช่น diplococcin, lactacin 481, lactococcins, pediocins, sakacin A และ lactocin B คุณสมบัติของแบคทีริโอซิน จะพิจารณาจากขนาด ความคงตัว ตำแหน่งทางพันธุกรรมการดัดแปลง หลังผ่านกระบวนการแปลรหัสทางพันธุกรรม (Post-translation modification)

3.6.1 การจัดแบ่งประเภทของแบคทีเรียโอซิน

Klaenhammer (1993) สามารถแบ่งแบคทีเรียโอซินโดยพิจารณาจากชนิดของกรดอะมิโน มวลโมเลกุล (MW) โครงสร้างพื้นฐานและพันธะต่าง ๆ ภายในโมเลกุล รวมถึง คุณสมบัติด้านอื่น ๆ เช่น คุณสมบัติในการทนความร้อน ทำให้สามารถจัดแบ่งแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังแสดงในตารางที่ 2

กลุ่ม I : Lantibiotic เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีสายเพปไทด์ขนาดเล็ก ประกอบด้วยจำนวนกรดอะมิโน 19-38 โมเลกุล มวลโมเลกุลน้อยกว่า 5,000 ดาลตัน แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อน ซึ่งภายในสายเพปไทด์แต่ละสายจะมีโครงสร้างลักษณะเป็นวงแหวนย่อย ๆ ที่เกิดจากการสร้าง thioether bridge ระหว่าง sulphydryl group ของกรดอะมิโนซิสเทอีนกับกรดอะมิโน dihydroalanine ที่มีชื่อเรียกว่า lanthionine หรือกรดอะมิโนซิสเทอีนกับกรดอะมิโน dihydrobutyrine ที่มีชื่อเรียกว่า β -methyl lanthionine

กลุ่ม II : Non Lantibiotic เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีขนาดเล็ก โดยประกอบด้วยกรดอะมิโน 20-60 โมเลกุล เป็นแบคทีเรียโอซินชนิดที่ทนความร้อนได้ดี และสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายได้น้อยชนิด (narrow spectrum) เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotic โดยจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีปริมาณของเบส G+C ต่ำ เช่น *Listeria* และ *Clostridium* ได้ดี แบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่มย่อย ได้แก่

Ila. กลุ่มแบคทีเรียโอซินที่สามารถทำลาย *Listeria* sp. ได้ดี ซึ่งในบางครั้งถูกเรียกว่ากลุ่ม pediocin-like bacteriocins โดยพบว่าในขั้นตอนแรกแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้จะถูกสร้างขึ้นมาในลักษณะที่เป็นสายเพปไทด์ตั้งต้น (precursor peptide) ที่ยังไม่สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ แต่หลังจากนั้นจะถูกเปลี่ยนแปลง โดยการตัดสายเพปไทด์ในตำแหน่งที่มีกรดอะมิโนไกลซีน 2 โมเลกุลติดกัน ได้เป็นสายเพปไทด์ที่สมบูรณ์ และมีประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ที่ปลาย N ในสายเพปไทด์ของแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดในกลุ่มนี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะเหมือนกัน (conserved N-terminal sequence) ได้แก่ Try-Gly-Asn-Gly-Val และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน 2 โมเลกุลที่อยู่ก่อนมาทางปลาย N ของสายเพปไทด์ ซึ่ง Abee (1995) ได้ยกตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ เช่น *pediococcus acidilactici* ซึ่งเป็น pediocin PA-1

I Ib. กลุ่มแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วยสายเพปไทด์ 2 สายที่แตกต่างกัน (two-peptide bacteriocin) Klaenhammer (1993) กล่าวว่า สายเพปไทด์อาจแสดงกิจกรรมในการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมายเพียงเส้นใดเส้นหนึ่ง หรือทั้งสองเส้น แต่ในการยับยั้งเซลล์เป้าหมายจะมี

ประสิทธิภาพสูงสุดต้องอาศัยการทำงานร่วมกันของสายเปปไทด์ทั้งสองเส้น ซึ่ง Flynn *et al.* (2002) ได้ยกตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ เช่น Abp 118 α และ β ที่สร้างจาก *Lb. Salivarius* UCC 118

IIc. แบคทีเรียโอซินขนาดเล็กที่ไม่ถูกจัดอยู่ในกลุ่ม IIa และ IIb เป็นการทำงานระหว่างเปปไทด์สองสายขึ้นไป หรือเป็นวง (cyclic peptides) Klaenhammer (1993) ได้ยกตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้ เช่น Enterocin AS-48 และ Gassericin A แบคทีเรียโอซินในกลุ่ม IIc สามารถแบ่งเป็นสองกลุ่ม โดยกลุ่มแรกเป็นแบคทีเรียโอซินที่มีกรดอะมิโน cysteine หนึ่ง (thiolbiotics) หรือสองตัว (cystibiotics) เป็นองค์ประกอบ ส่วนกลุ่มที่สองไม่มี กรดอะมิโน cysteine เป็นองค์ประกอบ ได้แก่ lactococcin A และ acidocin B

กลุ่ม III : Non Lantibiotic เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีขนาดของโมเลกุลใหญ่กว่า 15,000 ดาลตัน และเป็นชนิดที่มีคุณสมบัติไม่ทนต่อความร้อน

กลุ่ม IV : เป็นกลุ่มที่รวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนขนาดใหญ่กับสารอื่น ๆ เช่น ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต (Klaenhammer, 1993)

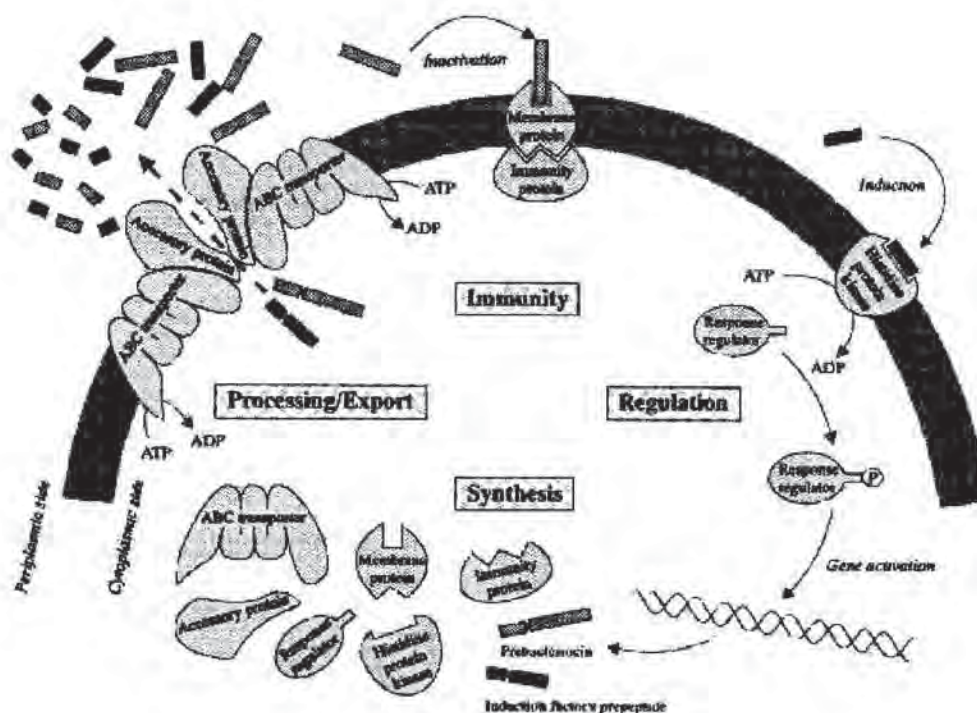
ตารางที่ 2 กลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก

class	Subclass	ลักษณะ
I		จัดเป็น Lantibiotic-มีขนาดเล็ก, ทนความร้อน, มีกรดอะมิโนชนิดผิดปกติรวมอยู่
II		มีขนาดเล็ก (มีกรดอะมิโน 30-100 ตัว) ทนความร้อน จัดเป็น non-Lantibiotic
	IIa	เหมือนแบคทีเรียโอซินชนิด pediocin มีผลยับยั้งต่อ listeria
	IIb	เป็นแบคทีเรียโอซินสองเปปไทด์
	IIc	ขึ้นอยู่กับ การจับออกของแบคทีเรียโอซิน
III		มีขนาดใหญ่ (>30kDa) เป็นโปรตีนที่ทนต่อความร้อนที่เปลี่ยนแปลงได้เสมอ
IV		เป็นแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วย glycol- และ/หรือ lipidmoieties

ที่มา : ดัดแปลงจาก Caplice and Fitzgerald (1999)

3.6.2 กระบวนการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน

กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซินจะถูกควบคุมโดยยีนที่อยู่บนโครโมโซมหรือบนพลาสมิด ซึ่งยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินนี้มีทั้งยีนโครงสร้าง (structural gene) และยีนภูมิคุ้มกัน (immunity gene) โดยส่วนใหญ่จะอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม (cluster) และยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตการขนส่งแบคทีเรียโอซินออกนอกเซลล์ประกอบด้วยยีนสำหรับผลิตเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน ยีนสำหรับโปรตีนภูมิคุ้มกัน ยีนสำหรับขนส่งโปรตีน และยีนสำหรับโปรตีนที่ช่วยในการจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ (Ennahar *et al.* 2000) กระบวนการผลิตแบคทีเรียโอซินเกิดจากการทำงานร่วมกันของ Histidine protein kinase (HPK), Response regulator (RR) และ Induction factor's prepeptide (IF) แบคทีเรียโอซินถูกสังเคราะห์บนไรโบโซมในรูปของเปปไทด์ที่ยังไม่พร้อมทำงาน และจะถูกแยกส่วน N-terminal leader ออกโดยผ่านการตัดแปลงหลังกระบวนการแปลรหัส (post-translational modification) ซึ่งทำให้เปปไทด์อยู่ในสภาพพร้อมทำงาน ส่วน N-terminal leader ของแบคทีเรียโอซินอาจมีลักษณะเป็น double glycine leader peptide หรือ signal peptide (Worobo *et al.* 1995) แบคทีเรียโอซินจะถูกสังเคราะห์จากไรโบโซม (ribosome) ต่อจากนั้นก็จะรวมตัวกับ immunity protein ในอัตราส่วน 1 : 1 เกิดเป็นโมเลกุลของสารประกอบเชิงซ้อน ซึ่งจะผ่านเนื้อเยื่อชั้นใน (innermembrane) และสะสมอยู่ในบริเวณช่องว่าง periplasmic ของไซโตพลาสซึม และแผ่ขยายไปถึงบริเวณผิวหน้าของแบคทีเรีย ซึ่งที่บริเวณผิวหน้าของแบคทีเรียนี้ สารประกอบเชิงซ้อนจะจับกับ polysaccharides หรือ O-antigen ของเยื่อหุ้มชั้นนอกและจะทำให้เกิดแบคทีเรียโอซินหยาบ (crude bacteriocin) และถูกขับออกสู่ภายนอกเซลล์ (Vincent *et al.* 2002) ดังภาพที่ 1

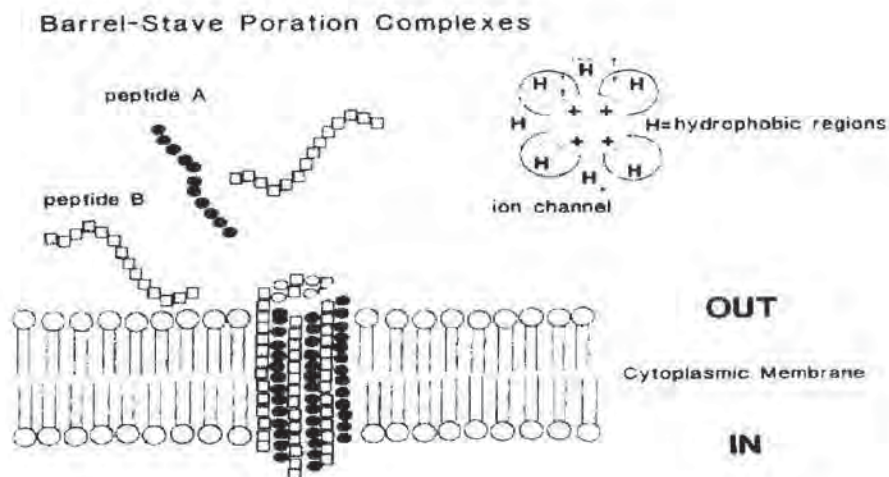


ภาพที่ 1 การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน class II

ที่มา : Ennahar *et al.* (2000)

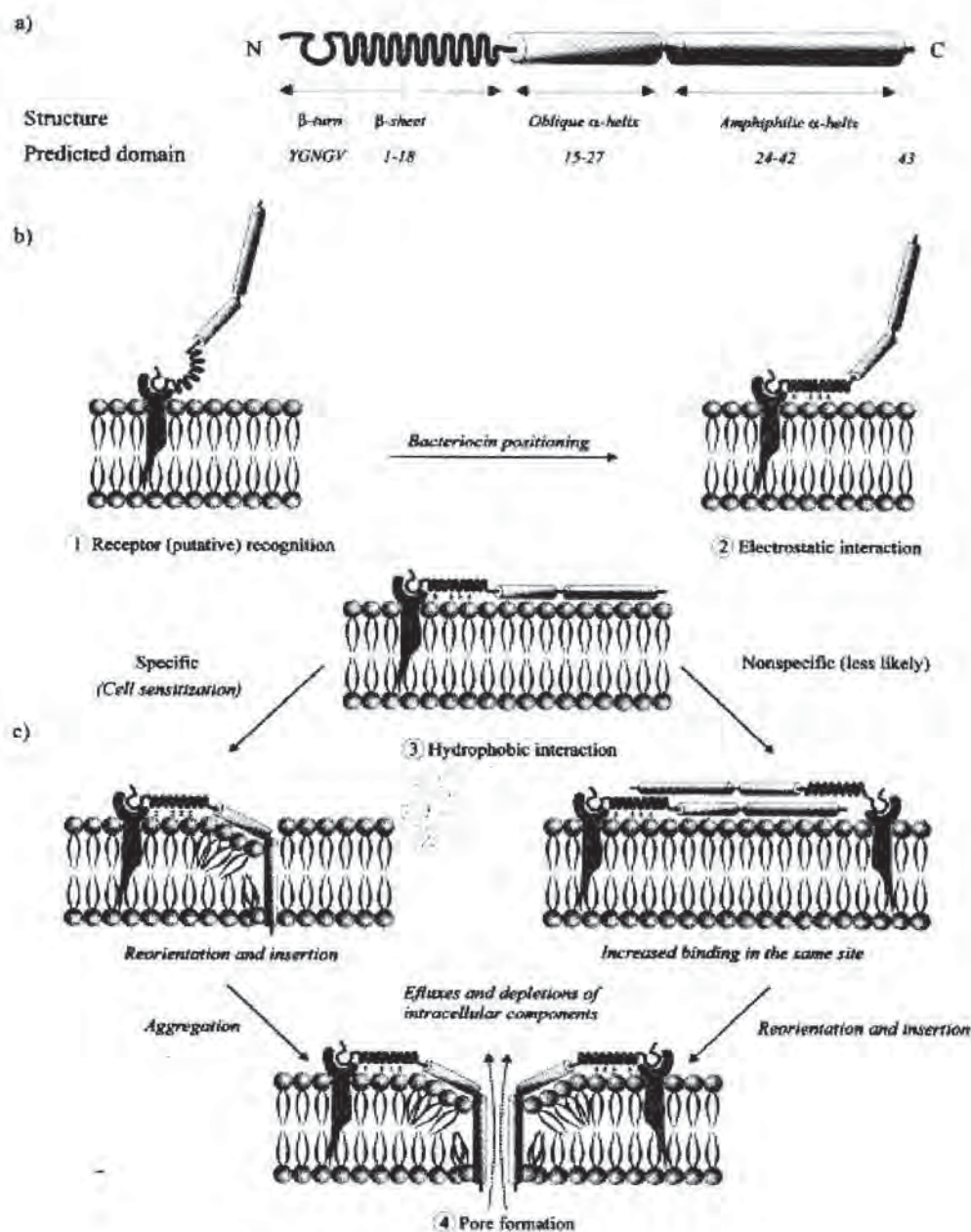
3.6.3 กลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน

การทำลายเซลล์เป้าหมายของแบคทีเรียโอซิน เกิดจากการที่แบคทีเรียโอซินแต่ละโมเลกุลมาอยู่ร่วมกันทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เชื่อมเซลล์เป้าหมายเป้าหมาย ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายชั้นไม้ที่มาประกอบกันเป็นผนังด้านข้างของถังไม้ (barrel-stave) แสดงดังภาพที่ 2 ช่องว่างดังกล่าวทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออน สูญเสียกรดอะมิโน และสารประกอบอินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานของเซลล์ ดังนั้นกลไกการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอซินจึงสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ขั้นตอน คือ ขั้นแรก แบคทีเรียโอซินจะยึดจับกับผิวของเซลล์เป้าหมาย และขั้นต่อไป คือ แบคทีเรียโอซินจะสร้างช่องว่างในชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (Ennahar *et al.* 1999) ซึ่งขั้นตอนและกลไกในการทำลายเซลล์เป้าหมายจะแตกต่างกันไปตามชนิดของ แบคทีเรียโอซิน เช่น ในจีนซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินในกลุ่ม lantibiotic ที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* พบว่าเป็นสายเพปไทด์ที่มีประจุสุทธิเป็นบวกและมีขั้นตอนในการเข้าทำลายเซลล์เป้าหมาย คือ



ภาพที่ 2 ช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งเกิดจากโมเลกุลแบคทีเรียโอซินรวมตัวกัน
ที่มา : Klaenhammer. (1993)

การเข้าจับกับเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการรั่วขององค์ประกอบภายในเซลล์ เช่น กรดอะมิโน สารให้พลังงาน และไอออนของสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ออกมาสู่ภายนอกเซลล์ (Davidson and Hoover. 1993 อ้างโดย ภักดี สุขพันธ์. 2548) นอกจากนี้ในแบคทีเรียโอซิน class II ที่มีขนาดเล็ก และทนความร้อน พบว่า ในขั้นตอนแรกปลายด้าน N ของโมเลกุลแบคทีเรียโอซิน ซึ่งมีประจุบวกจะเข้าจับส่วนหัวของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มของแบคทีเรียเป้าหมาย ซึ่งมีประจุลบโดยจับเข้าคู่กัน (Abee. 1995) หลังจากนั้นปลายด้าน C ในโมเลกุลแบคทีเรียโอซินซึ่งมีคุณสมบัติไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) จะทำปฏิกิริยากับหมู่เอซิล (acyl group) ของไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดเป็นช่องว่างที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เกิดการสูญเสียความสมดุลของไอออนและสารประกอบฟอสเฟตภายในเซลล์ (Ennahar *et al.* 2000) แสดงดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 โครงสร้างของแบคทีริโอซิน class II และการเข้าจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย

(a) โครงสร้างของแบคทีริโอซิน

(b) การเข้าจับกันของแบคทีริโอซินกับผิวของเซลล์เป้าหมาย

(c) การแทรกตัวของแบคทีริโอซิน ทำให้เกิดช่องว่างและเกิดการผ่านเข้าออกของน้ำ

ที่มา : Ennahar *et al.* (2000)

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. อุปกรณ์

1.1 ตัวอย่างระบบทางเดินอาหารของสัตว์

ตัวอย่างระบบทางเดินอาหารของสัตว์ที่นำมาใช้ในการทดลองได้แก่ ระบบทางเดินอาหารปลา กะพง ระบบทางเดินอาหารปลาช่อน ระบบทางเดินอาหารปลาดุก ระบบทางเดินอาหารปลาตะเพียน ระบบทางเดินอาหารปลานิล ระบบทางเดินอาหารปลาสวาย กระเพาะ โค ลำไส้เล็กกระเทาะ ลำไส้เปิดและ ลำไส้สุกร

1.2 เชื้อทดสอบที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติของสารแบคทีเรียโอซิน

ตารางที่ 3 เชื้อจุลินทรีย์ทดสอบที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติของสารแบคทีเรีย โอซิน

Indicator strains	Media	Temperature	Condition
Lactic acid bacteria			
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC14917 ^T	MRS	30°C	Anaerobic
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM1157 ^T	MRS	30°C	Anaerobic
<i>Lactobacillus sakei</i> TISTR890	MRS	37°C	Anaerobic
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TISTR1344	MRS	30°C	Anaerobic
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM6124 ^T	MRS	30°C	Anaerobic
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> TISTR 942	MRS	30°C	Anaerobic
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM5803 ^T	MRS	37°C	Anaerobic
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888	MRS	37°C	Anaerobic
Other bacteria			
<i>Bacillus coagulans</i> JCM2257 ^T	TSB-YE	37°C*	Aerobic
<i>Bacillus coagulans</i> TISTR1447	TSB-YE	37°C*	Aerobic
<i>Listeria innocua</i> ATCC33090 ^T	TSB-YE	37°C*	Aerobic
<i>Brochothrix campestris</i> NBRC11547 ^T	TSB-YE	25°C	Aerobic
<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM5963 ^T	TSB-YE	25°C	Aerobic

ตารางที่ 3 (ต่อ)

Indicator strains	Media	Temperature	Condition
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TISTR358	TSB-YE	25°C*	Aerobic
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR118	TSB-YE	37°C	Aerobic
<i>Streptococcus</i> sp. TISTR1030	MRS	30°C	Aerobic
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR1321	NB	30°C	Aerobic

ATCC = American Type Culture Collection , Rockville, Md

JCM = Japanese culture of Microorganism , Wako, Japan

NBRC = National Institute of Tecnology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

TISTR = Thailand Institute of Scientific and Technological Research

2. สารเคมีที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบที่ใช้ในการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์

1. MRS broth (Merck, Germany)
2. Agar (Criterion, U.S.A.)
- 3 Tryptic soy broth (Merck, Germany)
4. yeast extract (BIO BASIC INC, Canada)
5. Peptone (Merck, Germany)

2.2 สารเคมี

1. CaCO₃ (Scharlau Chemie S.A., Spain)
2. โซเดียมคลอไรด์ (Ajax Finechem, Australia)
3. กลีเซอรอล (APS Finechem, Australia)
4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Ajax Finechem, Australia)
5. กรดไฮโดรคลอริก (Merck, Germany)
6. แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์
7. Alphachymotrypsin (Sigma, U.S.A)
8. Trypsin (Sigma, U.S.A)
9. Proteinase K (Usbiological, U.S,A)

10. 1X Taq Buffer (Fermentas, U.S.A)
11. 10 มิลลิโมลาร์ dNTP (Fermentas, U.S.A)
12. 400 ไมโครโมลาร์ dNTP mix (Fermentas, U.S.A)
13. 2 มิลลิโมลาร์ $MgCl_2$ (Fermentas, U.S.A)
14. 5 ยูนิตต่อไมโครลิตร *Taq* DNA Polymerase (Fermentas, U.S.A)
15. QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, U.S.A)
16. QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, U.S.A)
17. InsTAcloneTM PCR Cloning Kit

3. อุปกรณ์และเครื่องมือ

1. ตู้เป่าเชื้อ (Laminar Flow Clean)
2. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)
3. เครื่องเขย่า (Shaking Incubator)
4. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge CR 3i)
5. เครื่องวัดค่าพีเอช (pH meter)
6. เครื่องซังไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง
7. เครื่องผสมสารละลายในหลอดทดลอง (Vortex Mixer KMC-1300V)
8. ไมโครเวฟ
9. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (High-Pressure Steam Sterilizer ES-315)
10. ตู้อบเครื่องแก้ว (Hot air oven)
11. เครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น

4. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาเนื้อสัตว์ ภาควิชา เทคโนโลยีการผลิตสัตว์ คณะ
เทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

5. วิธีการทดลอง

การทดลองที่ 1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคทีริโอซินจากแหล่งต่าง ๆ

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซิน

นำตัวอย่างระบบทางเดินอาหารสัตว์ชนิดต่าง ๆ ทั้งหมดมาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก โดยการนำเอาส่วนที่บรรจุภายในระบบทางเดินอาหาร 25 กรัม มาทำการเจือจางด้วยสารละลายเปปโตน 0.1% ให้ได้ระดับความเจือจาง 1: 10, 1:100, 1:1000, 1:10000, 1:100000 และ 1:1000000 จากนั้นนำไป spread plate บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม 0.5% CaCO_3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ภายใต้สภาวะที่ไม่มีอากาศ จากนั้นสุ่มเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เพื่อทำเป็น stock culture โดยใส่ glycerol ความเข้มข้น 30% จากนั้นจึงนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้สำหรับในการทำการศึกษาค้างต่อไป

2. ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีริโอซิน

2.1 การวิเคราะห์และคำนวณค่ากิจกรรมของแบคทีริโอซิน

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นให้น้ำเฉพาะส่วนใส ปรับ pH เท่ากับ 6-7 และนำน้ำส่วนใสไปทำการฆ่าเชื้อโดยต้มในน้ำเดือดอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที จากนั้นจึงทำให้เจือจางลงครึ่งละ 2 เท่าอย่างต่อเนื่องกันด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ นำน้ำส่วนใสในแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เททับหน้าด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีส่วนผสมของเชื้อเป้าหมาย (indicator organism) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร (0.8-1% agar) รอจนกระทั่งหยดน้ำส่วนใสที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง หลังจากนั้นนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ตามความเหมาะสมของเชื้อเป้าหมายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณส่วนใสที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในแต่ละความเจือจางลงไป ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมของแบคทีริโอซินที่อยู่ในน้ำส่วนใสต่อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดเป็นยูนิตต่อมิลลิลิตร (Arbitrary Unit; AU/ml) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในน้ำเลี้ยงเชื้อ = ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของน้ำส่วนใสซึ่ง
ยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้ง
การเจริญของแบคทีเรียทดสอบ $\times 100$

2.2. การทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

นำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 14-18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบ/นาที นาน 20 นาที เทเอาเฉพาะส่วนใสมาปรับค่า pH ให้เหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ α -chymotrypsin และ Trypsin ค่าความเป็นกรด-เบส 7.0 จากนั้นนำส่วนใสดังกล่าวมาย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่าง ๆ ที่ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากครบเวลาที่กำหนดให้กรองโดยใช้ sterile filter แล้วนำไปต้มในน้ำเดือดที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที นำสารละลายส่วนใสที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไปวัดค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่เหลืออยู่

2.3. การทดสอบความสามารถของสารแบคทีเรียโอซินในการทนต่ออุณหภูมิสูง

นำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้ปลา) และอาหารเหลว MRS (สำหรับแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้เป็ด) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทเอาเฉพาะส่วนใสมาปรับค่า pH เท่ากับ 6 โดยส่วนหนึ่งนำไปต้มในน้ำที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 30 และ 60 นาที และอีกส่วนหนึ่งนำไปผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที วัดค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน

2.4 การทดสอบความคงทนของสารแบคทีเรียโอซินต่ออุณหภูมิต่ำ

นำเชื้อตัวอย่างเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (สำหรับแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้ปลา) และอาหารเหลว MRS (สำหรับแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้เป็ด) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 4,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เทเอาเฉพาะส่วนใสมาปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 6 กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน โดยวัดค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินทุกวัน

2.5 การวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่สร้างสารแบคทีเรียโอซิน

นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสของยีนที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินโดยมีขั้นตอนดังนี้

1) การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่หรือเทคนิคพีซีอาร์ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอประมาณ 200 base pair (bp) ของยีนที่สร้างสารแบคทีเรียโอซิน Nisin A ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้ปลา และ ประมาณ 400 bp ของยีนที่สร้างสารแบคทีเรียโอซิน abp 118 β ของแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้เป็ดตามลำดับ โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ ใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่สร้างสาร Nisin A จากแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้ปลา โดยใช้ไพรเมอร์ Nisin A Forward (5'-CCGGAATTCATAAGGAGGCACTCAAAATG-3') และ Nisin A Reverse (5'-CGGGGTACCTACTATCCTTTGATTTGGTT-3') (Swetwathana. 2005) และใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่สร้างสารแบคทีเรียโอซิน abp 118 β โดยใช้ 118b_F (5'TAGGTGGAGCAAACCTTAGGA-3') และ K4_R (5'-CTTACACTTGACACTACTTGA-3') (Pilasombut. 2006) โดยส่วนประกอบของสารละลายสำหรับทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ แสดงดังตารางที่ 4 การทำปฏิกิริยาพีซีอาร์จะใช้เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเออัตโนมัติ (MyCycler™ thermal cycler) ก่อนการทำงานของปฏิกิริยาพีซีอาร์ กำหนดอุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ เพื่อเตรียมดีเอ็นเอต้นแบบให้แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยวอย่างสมบูรณ์ จากนั้นเริ่มปฏิกิริยาพีซีอาร์จำนวน 30 รอบ ตามวงรอบที่อุณหภูมิต่างๆ กัน ในส่วนของแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้ปลา ใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที (ดีเอ็นเอเสียสภาพแยกเป็นสายเดี่ยว) จากนั้นลดอุณหภูมิลงในช่วง 53 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เพื่อให้สายดีเอ็นเอต้นแบบจับกับไพรเมอร์อย่างเหมาะสม และเพิ่มอุณหภูมิขึ้นที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นตอนนี้เพื่อเพิ่มจำนวนลำดับนิวคลีโอไทด์จากการจับตัวกันอย่างเหมาะสมของไพรเมอร์และดีเอ็นเอต้นแบบ ส่วนของแบคทีเรียที่คัดแยกจากลำไส้เป็ด จะใช้อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 วินาที และ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที เมื่อปฏิกิริยาพีซีอาร์ทำงานครบ 30 รอบ ก่อนสิ้นสุดปฏิกิริยา ให้คงอุณหภูมิที่ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 นาที จำนวน 1 รอบ ซึ่งถือได้ว่าขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเสร็จสิ้นอย่างสมบูรณ์ หลังจากเสร็จสิ้นปฏิกิริยา เก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (PCR product) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบผลผลิตพีซีอาร์โดยอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้ 100 bp DNA Ladder เป็น marker

ตารางที่ 4 ส่วนประกอบของสารละลายในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคพีซีอาร์

สาร	ปริมาตร (ไมโครลิตร)	ความเข้มข้นสุดท้าย
10x PCR buffer with $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2.5	1x
25 mM MgCl_2	2.0	2 mM
10 mM dNTP	1	400 μM
10 μM Primer BSF8/20	1	0.4 μM
10 μM Primer REVB	1	0.4 μM
5U/ μl Taq DNA polymerase	0.25	0.05 μM
100 ng/ μl DNA template	1	
น้ำกลั่น	16.25	
รวม	25	

2) การสกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ สกัดแยกดีเอ็นเอออกจากเจลและทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit

3) การเชื่อมต่อผลผลิตพีซีอาร์เข้ากับพลาสมิดเวกเตอร์ (Ligation) นำผลผลิตพีซีอาร์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

4) การทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ Competent cell *E.coli* DH5 α ด้วยวิธี Heat shock ทำการทรานส์ฟอร์มดีเอ็นเอสายผสมเข้าสู่ Competent cell *E.coli* DH5 α

5) การคัดเลือกโคโลนีที่ได้รับการทรานส์ฟอร์มคัดเลือกโคโลนีสีขาว

6) การสกัดพลาสมิด โดยใช้ชุดแยกพลาสมิดสำเร็จรูป QIAprep Spin Miniprep Kit

7) การตรวจสอบความถูกต้องของพลาสมิดเวกเตอร์ที่ถูกแทรกด้วยยีน nisin A และ abp 118 β ทำการตรวจสอบยืนยัน nisin A และ abp 118 β

8) วิเคราะห์ลำดับทำการวิเคราะห์ลำดับเบส

3. ศึกษาพื้นฐานวิทยาและลักษณะทางกายภาพ

3.1 การศึกษาลักษณะทางกายภาพ

เลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS บ่มเป็นเวลา 18- 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นำเชื้อที่ได้โคโลนีเดี่ยวๆ นำมาทดสอบดังนี้

3.1.1 การตรวจการติดสีแกรม

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนกระจกสไลด์ เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ให้กระจายบนหยดน้ำกลั่นทิ้งให้แห้ง นำมาผ่านความร้อน (heat fixed) ย้อมด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด 95 เปอร์เซ็นต์ แอลกอฮอล์พอทำให้สีของ crystal violet หลุดออก แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นหยดสารละลาย safranin O ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสี แกรม ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวให้กล้องจุลทรรศน์

3.1.2 ทดสอบกะตะเลส

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนกระดาษกรองปลอดเชื้อ จากนั้นเชื้อบริสุทธิ์ลงบนกระดาษกรอง ถ้าเกิดฟองอากาศ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์กะตะเลสได้ ส่วนโคโลนีที่ไม่เกิดฟองจะให้ผลลบ

3.1.3 การตรวจสอบการสร้างก๊าซ

เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีหลอดดักก๊าซ (durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-72 ชั่วโมง หากพบก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative หากไม่พบก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่าเป็นแบคทีเรียในกลุ่ม homofermentative

3.1.4 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ

เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 10, 37, 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.5 ทดสอบความทนเกลือ

เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1.6 ทดสอบความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรดต่างๆ

เชื้อเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหาร MRS ที่ปรับพีเอช เป็น 4.5 และ 9.6 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยการวัดค่าการดูความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3.2 การศึกษาทางชีวเคมี

ศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux, France) โดยเลี้ยงเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารแข็ง MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง จากนั้นใช้ loop ที่เผาจนแดงทำการเขี่ยโคโลนีจำนวน 3-5 โคโลนีลงในหลอดอาหารของ API 50 CHL medium จากนั้นจึงถ่ายเชื้อใส่ลงใน API 50 CHL medium เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน เตรียมชุดทดสอบ โดยเรียงชุดทดสอบลงบนถาด ถ่าย API 50 CHL medium ที่มีเชื้ออยู่ลงไปทุกช่อง ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศและอย่าให้ปลายทิวสัมผัสกับขอบช่อง ส่วนในหลุมแรกซึ่งเป็นช่อง control ให้ดูดน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เมื่อดูดอาหารใส่ในช่องทุกช่องแล้ว ให้เททับด้วย parafin oil จากนั้นนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส อ่านผลหลังจากบ่ม 24 และ 48 ชั่วโมง นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม *apiweb*TM stand alone V 1.2.1 (BioMerieux, France) โดยอ่านผลบวกจากการเปลี่ยนสีจากม่วงน้ำเงินเป็นเหลือง ยกเว้นช่องที่ 25 ซึ่งเปลี่ยนสีจากม่วงน้ำเงินเป็นสีดำ แสดงว่าเป็นผลบวก หากอาหารเปลี่ยนเป็นสีเขียว หรืออ่านผลไม่ชัดเจน ให้ใส่เครื่องหมาย ?

3.3 การวิเคราะห์ลำดับเบสของ 16S rDNA มีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 การสกัดดีเอ็นเอ

สกัดดีเอ็นเอทั้งหมดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้ โดยใช้วิธีของ Duffner *et al.* 1994

3.3.2 การสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมายด้วยเทคนิคเพิ่มขยายจำนวนดีเอ็นเอแบบปฏิกิริยาลูกโซ่ (Polymerase Chain Reaction, PCR)

สังเคราะห์ดีเอ็นเอ 1500 base pair (bp) ของยีน 16S rRNA โดยใช้ดีเอ็นเอที่สกัดได้เป็นดีเอ็นเอต้นแบบ แล้วใช้ไพรเมอร์ที่จำเพาะกับแบคทีเรีย BSF8/20 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') และ -REVB เป็น (5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') (Kanokratana *et al.* 2004) โดยตั้งโปรแกรมในการสังเคราะห์ดีเอ็นเอเป้าหมาย 3 ขั้นตอน ขั้นแรกประกอบด้วยช่วง denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 1 รอบ ขั้นที่ 2 ประกอบด้วยช่วง denaturation 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาที ช่วง annealing 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 นาทีและ ช่วง extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1.45 นาที ทั้งหมดจำนวน 35 รอบ ขั้นสุดท้ายประกอบด้วยช่วง extension 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 1 รอบ หลังจากเสร็จสิ้น ปฏิบัติการเก็บดีเอ็นเอที่สังเคราะห์ได้ (PCR product) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick Gel Extraction Kit

3.3.3 การโคลนจีนดิเอ็นเอเป้าหมายเข้าสู่ดิเอ็นเอพาหะ

โดยการ โคลนจีนดิเอ็นเอบริสุทธิ์ที่ได้เข้าสู่เวกเตอร์ pTZ57R/T จากนั้นจึงย้ายดิเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์เจ้าบ้าน (host cell) โดยนำดิเอ็นเอพาหะที่ได้ เคลื่อนย้ายเข้าสู่เซลล์ของ *E. coli* DH5 α โดยใช้วิธี heat shock นำเซลล์ของ *E. coli* DH5 α ที่ผ่านขั้นตอนการเคลื่อนย้ายดิเอ็นเอลูกผสมเข้าสู่เซลล์มาเลี้ยงใน LB broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้วนำไปเกลี่ยบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ LB agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12-18 ชั่วโมง คัดเลือกเฉพาะโคโลนีของ *E. coli* DH5 α ที่ได้รับดิเอ็นเอพาหะเข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะไม่สามารถสร้างเอนไซม์ β -galactosidase ทำให้มีลักษณะโคโลนีบน LB agar เป็นสีขาว

3.3.4 การแยกดิเอ็นเอลูกผสมออกจากเซลล์เจ้าบ้าน

โดยทำการแยกดิเอ็นเอลูกผสมออกจากเซลล์ของ *E. coli* DH5 α โดยใช้ชุดแยกพลาสมิดสำเร็จ รูป QIAprep Spin Miniprep Kit

3.3.5 วิเคราะห์ลำดับเบส

ตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์จากโคลนที่ได้ว่ามีความเหมือนหรือคล้ายคลึงกับดิเอ็นเอของแบคทีเรียชนิดใดในฐานข้อมูล โดยใช้โปรแกรม BLASTN (Basic Local Alignment Search Tools) จากฐานข้อมูล NCBI ในอินเทอร์เน็ตที่ (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) เพื่อใช้ในการหาค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงหรือความเหมือน (% Identity) และรายละเอียดต่างๆของแบคทีเรียที่ปรากฏในผลของการ BLASTN

4. การศึกษาผลของการใช้สารแบคทีเรียโอสินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* D 4, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 และ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ร่วมกับกรดแลกติก ต่อจำนวนเชื้อ *Salmonella* sp.

4.1 การเตรียมแบคทีเรียโอสิน

4.1.1 นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 จาก stock culture ที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS (Merck, Germany) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น ถ่ายเชื้อจากหลอดอาหารที่เลี้ยง ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่ม 16-18 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำเชื้อในอาหารเหลว MRS 10 มิลลิลิตร ไป centrifuge 4,000 รอบต่อนาที

นาน 15 นาที 4 องศาเซลเซียส นำส่วนที่เป็น ส่วนใสที่เป็นแบคทีเรียไอชินจากที่ได้จากเชื้อมาใช้ แบ่งเป็น 2 หลอด หลอดละ 4 มิลลิลิตร แล้วกรองด้วย กระดาษกรองจุลินทรีย์ (0.2 ไมโครเมตร) จะได้ ส่วนที่เป็น แบคทีเรียไอชินออกมา

4.1.2 การเตรียมเชื้อ *Salmonella* Anatum หรือ *S. Typhimurium* โดยนำเชื้อจาก stock culture ที่ -20 องศาเซลเซียส ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB-YE broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 16-18 ชั่วโมง จากนั้น ถ่าย เชื้อจากหลอดอาหารที่เลี้ยงปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหาร TSB-YE broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่ม 16-18 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อ *S. Anatum* หรือ *S. Typhimurium* ปริมาตร 100 ไมโครลิตรลงในอาหารเหลว TSB-YE 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

4.2 วิธีการทดลอง

ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Veerawatanayotin *et al.* (2010) โดยนำเชื้อ *S. Anatum* 1% ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ที่เติมเอาไว้ใส่ในอาหาร TSB-YE ขวดละ 50 ml ที่เตรียมไว้โดยปรับค่า pH ให้ เป็น pH 4.5, 5, 5.5 และ 6 ใส่เข้าไปทุกขวดจำนวน 8 ขวด เติมแบคทีเรียไอชิน 2 % ในอาหารปริมาตร 50 มิลลิลิตร (1 มิลลิลิตร) มาขวดอาหารจำนวน 4 ขวด ส่วนอีก 4 ขวดคือกลุ่มควบคุมไม่ได้เติมแบคทีเรียไอชิน วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลาชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ด้วยวิธี Standard plate count โดยการดูอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ถ่ายลงในหลอดอาหารเจือจาง 9 มิลลิลิตร ปิดฝาแล้วเขย่า หลอดหรือขวดด้วยเครื่องเขย่าไฟฟ้า (mixer) หรือใช้มือเขย่าขึ้นลงอย่างแรง 25 ครั้ง ให้เข้ากันดี จะได้ ตัวอย่างอาหารที่มีความเจือจางเท่ากับ 10^{-1} (1:10) ถ้าต้องการเตรียมตัวอย่างให้เจือจางในระดับต่อไปนี้ คือ 10^{-2} (1:100) และ 10^{-3} (1:1,000) ตามลำดับ ถ่ายตัวอย่างแต่ละความเจือจางลงบนอาหารโดยวิธี Pour plate ลงบนอาหาร TSA เมื่ออาหารแข็งตัวนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยใส่เชื้อลงใน อาหารแข็งมา 1 และ 0.1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วไปรายงาน ผลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดเป็นค่า log cfu/ml

5. ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินสายพันธุ์ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis subsp. lactis* P 1, P 2 และ Sb 2

5.1 ศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อกิจกรรมการสร้างสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis subsp. lactis* P 1, P 2 และ Sb 2

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 5 มิลลิตร ที่มีการปรับค่า pH เป็น 3-10 นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้เทใส่หลอดพลาสติกและนำไปตกตะกอน 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปปรับ pH ประมาณ 5.5-6 ดูดส่วนใสลงใน eppendorf 0.5 มิลลิตร แล้วนำไปปั่นในน้ำเค็ม 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำส่วนใสมาทำให้เจือจางที่ละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วหยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบเททับบนผิวหน้าแล้วในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ร่อนกระดาษที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตามความเหมาะสมของเชื้อเป้าหมายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณส่วนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดเป็นหน่วยต่อมิลลิเมตร (Arbitrary Unit; AU/ml) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ค่ากิจกรรมของการยับยั้ง} &= \frac{\text{ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของน้ำส่วนใสซึ่ง} \\ &\quad \text{ยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้ง} \\ &\quad \text{การเจริญของแบคทีเรียทดสอบ} \times 100}{\text{การเจริญของแบคทีเรียทดสอบ}} \end{aligned}$$

5.2 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการสร้างสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis subsp. lactis* P 1, P 2 และ Sb 2

นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 5 มิลลิตร ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้เทใส่หลอดพลาสติกและนำไปตกตะกอน 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปปรับ pH ประมาณ 5.5-6 ดูดส่วนใสลงใน eppendorf 0.5 มิลลิตร แล้วนำไปปั่นในน้ำเค็ม 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำส่วนใสมาทำให้เจือจางที่ละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วหยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบเททับบนผิวหน้าแล้วในปริมาตร 10 ไมโครลิตร ร่อนกระดาษที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตามความเหมาะสมของเชื้อเป้าหมายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณส่วนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียอินทรีย์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัม (Arbitrary Unit; AU/ml) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ค่ากิจกรรมของการยับยั้ง} &= \frac{\text{ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของน้ำส่วนใสซึ่ง} \\ &\quad \text{ยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้ง} \\ &\quad \text{การเจริญของแบคทีเรียทดสอบ}}{\text{การเจริญของแบคทีเรียทดสอบ}} \times 100 \end{aligned}$$

5.3 การศึกษาความเข้มข้นของ Bile salts ที่มีต่อการสร้างสารแบคทีเรียอินทรีย์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2

Bile salts ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ นำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบ 100 ไมโครลิตร มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth 5 มิลลิกรัม ที่มี Bile salts ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่เลี้ยงได้เทใส่หลอดพลาสติกและนำไปตกตะกอน 4000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสไปปรับ pH ประมาณ 5.5-6 ดูดส่วนใสลงใน eppendorf 0.5 มิลลิกรัม แล้วนำไปปั่นในน้ำเดือด 5 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น นำส่วนใสมาทำให้เจือจางที่ละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วหยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบที่ทับบนผิวหน้าแล้วในปริมาตร 10 ไมโครลิตร รอจนกระทั่งสารที่หยดลงบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อแห้ง กลับจานเพาะเชื้อแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ ตามความเหมาะสมของเชื้อเป้าหมายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง การอ่านผลให้ดูจากบริเวณส่วนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นจากผลการถูกยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ซึ่งสามารถคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียอินทรีย์ต่อเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิดเป็นหน่วยต่อมิลลิกรัม (Arbitrary Unit; AU/ml) ซึ่งมีสูตรการคำนวณดังนี้

$$\begin{aligned} \text{ค่ากิจกรรมของการยับยั้ง} &= \frac{\text{ส่วนกลับของค่าความเจือจางสูงสุดของน้ำส่วนใสซึ่ง} \\ &\quad \text{ยังสามารถสังเกตเห็นบริเวณใสที่เกิดจากการถูกยับยั้ง} \\ &\quad \text{การเจริญของแบคทีเรียทดสอบ}}{\text{การเจริญของแบคทีเรียทดสอบ}} \times 100 \end{aligned}$$

5.4 การทดสอบความสามารถในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อตัวอย่าง 2 เปอร์เซ็นต์จาก stock culture ถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมี โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 5 มิลลิกรัม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เปรียบเทียบความขุ่นของเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ 0.5 McFarland มาตรฐาน โดยใช้น้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วทำการเจือจางเชื้อ จากนั้นนำสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อไป swab บนอาหารแข็ง MRS ซึ่งมี โซเดียม

คลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ ให้ทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ ปล่อยให้แห้ง แล้ววางแผ่นยาปฏิชีวนะไว้ด้านบนอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสถานะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตบริเวณใส วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส เปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน แล้วแสดงผลเป็น susceptible (S), intermediate (I) หรือ resistant (R) (ดัดแปลงจาก NCCLS. 1998)

5.5 การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง

การทดสอบความสามารถในการมีชีวิตรอดในกระเพาะและลำไส้จำลอง ดัดแปลงจาก Zárate *et al.* (2000) โดยถ่ายเชื้อ 100 ไมโครลิตรจาก stock culture ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิตร นำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 2 มิลลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิตร นำเชื้อในอาหารเหลว MRS 100 มิลลิตร ปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วยโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 0.9 เปอร์เซ็นต์ 5 มิลลิตร แล้วใส่สารละลายเซลล์ลงในน้ำย่อยสังเคราะห์ที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 ปริมาตร 100 มิลลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count นำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แล้วนำที่เวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที ไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดโดยวิธี standard plate count หลังจากผ่านไป 180 นาที ในกระเพาะอาหารจำลอง นำเชื้อที่อยู่ในน้ำย่อยสังเคราะห์ 50 มิลลิตร ไปปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบต่อนาที 10 นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เติมน้ำย่อยสังเคราะห์ทิ้ง นำเซลล์ของแบคทีเรียที่ได้ไปละลายลงในของเหลวในลำไส้จำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 8 ปริมาตร 50 มิลลิตร วิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่เวลา 0 นาที โดยวิธี standard plate count จากนั้นนำไปบ่มในเครื่องเขย่า 200 รอบต่อนาที 37 องศาเซลเซียส แล้วนำที่เวลา 30, 60, 90 และ 180 นาที ไปวิเคราะห์หาปริมาณเชื้อที่มีชีวิตรอดโดยวิธี standard plate count รายงานผลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดเป็นค่า log cfu/ml แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ซึ่งสามารถคำนวณได้โดย

$$\text{เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณเชื้อรอดชีวิตในแต่ละช่วงเวลาของการทดสอบ 0, 30, 60, 90 และ 180 นาที (log cfu/ml)} \times 100}{\text{ปริมาณเชื้อเริ่มต้น (log cfu/ml)}}$$

5.6 การทดสอบการมีชีวิตรอดระหว่างสายพันธุ์ (compatibility between strains)

กล้าเชื้อที่ตีหมักมีเชื้อหลายสายพันธุ์มีชีวิตอยู่ร่วมกันเนื่องจากเชื้อแต่ละชนิดมักมีคุณสมบัติที่โดดเด่นแตกต่างกัน การนำคุณสมบัติที่โดดเด่นแต่ละลักษณะมารวมกันจะทำให้ได้กล้าเชื้อที่มีคุณสมบัติตามต้องการ ดังนั้นการทดสอบการมีชีวิตรอดและความสามารถในการอยู่ร่วมกันของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่จะนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อจึงเป็นสิ่งที่คำนึงถึงในการศึกษาครั้งนี้เชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Lb. salivarius* D 4, D 8, D 9, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, Sb 2 และ *pediococcus pentosaceus* 536 ทดสอบโดยใช้วิธี spot-on-lawn ทำการศึกษาเชื้อแต่ละชนิดถูกทำลายโดยเชื้อตัวใดบ้าง ทำการศึกษา 2 วิธีคือ Spot-on-lawn และ Direct method

5.6.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Spot-on-lawn method

ทำการทดสอบการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธี spot-on-lawn (ดัดแปลงจาก Ennahar *et al.*, 1999) โดยเทอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1.5 % ปริมาตร 15 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเชื้อแล้วทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัว ถ้วยเชื้อทดสอบที่เลี้ยงในอาหารเหลวปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีวุ้น 1 % ซึ่งหลอมตัวและมีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานเพาะเชื้อเป้าหมายที่เตรียมไว้ ปลดทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที เพื่อให้อาหารแข็งตัว จากนั้นหยดสารละลายไฮปราจากเซลล์ที่ไม่ปรับ pH (pH 4) และผ่านการกรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อแล้ว ปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงบนผิวอาหาร รอจนสารละลายซึมผ่านวุ้น นำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบแต่ละชนิด (ตารางที่ 3) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยสังเกตบริเวณใส (clear zone)

5.6.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Direct Method

1) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ต้องการทดสอบ คูณมาปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 2 มิลลิลิตร บ่มในตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

2) นำเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 100 ไมโครลิตร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเชื้อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดจะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อและบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน โดยใช้ระยะเวลาบ่มประมาณ 24 ชั่วโมง (overnight)

3) ใช้ปลายเหล็กแหลมจุ่มเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกไว้ ทิ่มลงในอาหารวุ้นแข็ง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง

4) คูดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคซึ่งใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบปริมาตร 20 ไมโครลิตร และคูดเชื้อธรรมชาติปริมาตร 10 ไมโครลิตร ลงในอาหารวุ้นที่ต้มให้ละลาย แล้วผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex เททับลงบนอาหารวุ้นแข็ง (MRS agar) โดยอาหารวุ้นที่ใช้เททับจะเป็นอาหารชนิดเดียวกับที่ใช้ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด จากนั้นเททับบนจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียกรดแลกติกที่เจริญบนอาหาร นำไปบ่มในอุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อทดสอบแต่ละชนิด

5) ตรวจสอบผลโดยการสังเกตวงใส (Clear zone) และบันทึกผลดังนี้

- ไม่เกิดวงใส

+ เกิดวงใส

การทดลองที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อ

1. การทดสอบผลของการใช้ไนไตรท์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. Lactis* sbusp. *lactis* P 1, P 2, และ Sb 2 ในแบบจำลองการหมักแก๊ส (Nham model broth, NMB) (Swetwivathana et al. 1999)

1.1 วิธีเตรียมแบบจำลองการหมักแก๊ส (Nham Model Broth)

ส่วนประกอบ

1.1.1 meats extract	10 กรัม
1.1.2 tryptone	10 กรัม
1.1.3 sodium ascorbate	0.5 กรัม
1.1.4 sodium tri-polyphosphate	3 กรัม
1.1.5 glucose	10 กรัม
1.1.6 Sodium Nitrite	25 กรัม
1.1.7 น้ำกลั่น	900 มิลลิลิตร

นำผสมส่วนจากข้อที่ 1.1.1 ถึง 1.1.7 ตามปริมาณที่ระบุไว้ ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 900 มิลลิลิตร คนให้ส่วนผสมละลายจนหมดและปรับพีเอชประมาณ 6.8 แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบปริมาตร 1000 มิลลิลิตร เสร็จแล้วบรรจุลงขวดที่มีฝาปิด ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 การเตรียมโซเดียมไนไตรท์

เตรียมโซเดียมไนไตรท์ 0.1 กรัม ละลายน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำไปผ่านแผ่นกรองจุลินทรีย์ขนาด 0.2 ไมโครลิตร กรองใส่หลอดไมโครเซนตริฟิวจ์ ในการนำไปใช้ดูมา 10 ไมโครลิตร เติมลงในขวดแบบจำลองແໜ່ນ ปริมาตรขวดละ 100 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จะได้ແໜ່ນจำลองที่มีโซเดียมไนไตรท์ที่มีความเข้มข้น 100 ppm

1.3 วิธีการทดลอง

1. นำเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 1 เปอร์เซ็นต์ ในส่วน *Lb. salivarius* D 4 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ เชื้อทั้งหมดนี้เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่กำหนดไว้ด้วยปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 16 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2 และ 18 ชั่วโมงสำหรับเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 จากนั้นเมื่อครบระยะเวลาแล้วให้ถ่ายเชื้อจากหลอดเลี้ยงเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากหลอดเลี้ยงเชื้อแต่ละหลอดลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่กำหนดไว้สำหรับเชื้อแต่ละชนิดอีกครั้งหนึ่ง ด้วยปริมาตร 100 ไมโครลิตร และปิเปตเชื้อแต่ละชนิดปริมาตร 1000 ไมโครลิตร นำไปปั่นเหวี่ยง 4,000 รอบ ต่อนาที นาน 10 นาที 4 องศาเซลเซียส

2. เมื่อปั่นเหวี่ยงเสร็จแล้ว จะสังเกตได้ว่าเชื้อที่แยกชั้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ เทส่วนใสด้านบนออกให้หมดจนเหลือแต่ตะกอนเชื้อ จากนั้นเติมอาหารแบบจำลองແໜ່ນ ปริมาตร 700 ไมโครลิตร เติมในตะกอนของเชื้อผสมให้เข้ากัน แล้วปิเปตลงในขวดแบบจำลองແໜ່ນ ที่เตรียมไว้ หลังจากนั้นเทน้ำมันพาราฟินที่เตรียมไว้ลงไป หนาประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อให้อยู่ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ

3. ขั้นตอนการตรวจนับเชื้อที่มีชีวิตรอดในอาหารแบบจำลองແໜ່ນ โดยวิธีการ spread plate ลงในอาหารแข็งตัว แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง รายงานผลจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตรอดเป็นค่า log cfu/ml

2. การทดสอบผลของการใช้กระเทียมและ *Lb. salivarius* D 4 หรือ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2 ที่มีต่อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักແໜ່ນ (Swetwivathana *et al.* 1999)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักແໜ່ນ ขวดละ 100 มิลลิลิตรจำนวน 6 ขวด นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที และดูผลการละลายโซเดียมไนไตรท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 10 ไมโครลิตร เพื่อให้

มีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ppm/ml โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแฮม มีองค์ประกอบดังนี้

ขวดที่ 1 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 หรือ (*Lc. lactis* subsp. *Lactis* P 1, P 2 และ Sb 2)

ขวดที่ 2 เลี้ยงเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

ขวดที่ 3 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 หรือ (*Lc. lactis* subsp. *Lactis* P 1, P 2 และ Sb 2) ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292

ขวดที่ 4 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 หรือ (*Lc. lactis* subsp. *Lactis* P 1, P 2 และ Sb 2) ร่วมกับ กระเทียมสดปลอดเชื้อ (แช่กระเทียมสดในแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) 5 เปอร์เซ็นต์

ขวดที่ 5 เลี้ยงเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ร่วมกับ กระเทียมสดปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

ขวดที่ 6 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 หรือ (*Lc. lactis* subsp. *Lactis* P 1, P 2 และ Sb 2) ร่วมกับ *S. Typhimurium* TISTR 292 และกระเทียมสดปลอดเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์

เขย่าให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันในอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปิดทับหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำมันพาราฟินทุกขวด นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งหมดไปไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 องศาเซลเซียส) ทำการสุ่มตัวอย่างทุก 24 ชั่วโมง เพื่อวัดค่า pH และตรวจหาปริมาณของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE Agar และ *Lb. salivarius* D 4 หรือ (*Lc. lactis* subsp. *Lactis* P 1, P 2 และ Sb 2) ด้วย MRS agar และทำการยืนยันเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 โดยการสุ่มโคโลนีไปวางบนอาหาร XLD agar ถ้าเป็นเชื้อ *Salmonella* จะให้โคโลนีเป็นสีชมพูใส มีจุดดำตรงกลาง จากนั้นยืนยันเชื้อ *Salmonella* โดยการทดสอบทางด้านชีวเคมี

การทดลองที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อ

1. การทดสอบผลของการใช้ไนไตรท์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* D4, *Lc. Lactis* subsp. *lactis* P1, P2 และ Sb2 ในแบบจำลองการหมักแฮม (Nham model broth, NMB) (Swetwivathana et al. 1999)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแฮม ขวดละ 100 มิลลิลิตร นำอาหารเลี้ยงเชื้อที่ได้ไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แบ่งแบบจำลองการหมักแฮมออกเป็น ไม่เค็มและเค็มโซเดียมไนไตรท์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการกรองแล้วลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ขวดละ 10 ไมโครลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 100 ppm โดยอาหารเลี้ยงเชื้อแบบจำลองการหมักแฮม มีองค์ประกอบดังนี้

ขวดที่ 1 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* D4 หรือ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P1, P2, Sb2

ขวดที่ 2 เลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* D4 หรือ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P1, P2, Sb2

รวมกับการเติมโซเดียมไนไตรท์ 100 ppm/ml

ทำการทดลองทั้งหมด 4 ซ้ำ

**การทดลองที่ 1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสาร
แบคเทอริโอซินจากแหล่งต่างๆ**

การทดลองที่ 1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากแหล่งต่างๆ

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากแหล่งต่างๆ ที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคเทอริโอซินจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ระบบทางเดินอาหารของปลากระพง ปลาดุก ปลานิล ปลาสวาย ลำไส้เปิด ลำไส้สุกร ลำไส้ นกกระทา และกระเพาะโค ผลการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน 7 ไอโซเลท โดยแยกได้จากระบบทางเดินอาหารปลากระพง 1 ไอโซเลท จากระบบทางเดินอาหารปลาสวาย 2 ไอโซเลท และจากลำไส้เปิด 4 ไอโซเลท การทดลองครั้งนี้ไม่พบเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินจากระบบทางเดินอาหารปลาดุก ปลานิล นกกระทา และกระเพาะโค เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารปลากระพง ตั้งชื่อว่า Seabass2 (Sb 2) ไอโซเลทที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารปลาสวาย ตั้งชื่อว่า Pangasius 1 และ 2 (P 1 และ P 2) ส่วนไอโซเลทที่แยกได้จากลำไส้เปิดตั้งชื่อว่า D 4, D 8, D 9 และ D 10 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แหล่งของตัวอย่างที่คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน

Sources	No. of samples	No. of isolates	No. of Bacteriocin-producing LAB	Name
สัตว์น้ำ				
ระบบทางเดินอาหารปลากระพง	6	108	1	Sb 2
ระบบทางเดินอาหารปลาช่อน	4	56	0	-
ระบบทางเดินอาหารปลาดุก	20	94	0	-
ระบบทางเดินอาหารปลาตะเพียน	3	70	0	-
ระบบทางเดินอาหารปลานิล	19	89	0	-
ระบบทางเดินอาหารปลาสวาย	10	124	2	P 1, P 2
สัตว์บก				
กระเพาะโค	3	170	0	-
ลำไส้ นกกระทา	15	120	0	-
ลำไส้เปิด	15	130	4	D 4, D 8, D 9, D 10
ลำไส้สุกร	5	150	0	-

2. ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซิน

2.1 ผลของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ

จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกไอโซเลต D 4, D 8, D 9 และ D 10 มีคุณสมบัติคล้ายกันจึงคาดว่าน่าจะเป็นเชื้อตัวเดียวกัน ดังนั้นจึงเลือกมาทำการศึกษาเพียง 1 ไอโซเลต คือ D 4 ผลของสารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ D 4, P 1, P 2 และ Sb 2 ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ แสดงในตารางที่ 7 สารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ P 1, Sb 2 และ P 2 สามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC14917, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Lactobacillus sakei* TISTR890, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR1344, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^T, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR942, *Bacillus coagulans* JCM 2257^T, *Listeria innocua* ATCC33090, *Brochothrix campestris* NBRC11547 และ *Pseudomonas fluorescens* JCM5693^T นอกจากนี้ แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากไอโซเลต Sb 2 ยังสามารถยับยั้งและทำลายเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* TISTR358, *Staphylococcus aureus* TISTR118 และ *Streptococcus* sp. TISTR1030 ในขณะที่แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากไอโซเลต P 1 และ P 2 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อดังกล่าวได้ อีกทั้งยังไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Enterococcus faecalis* JCM5803^T และ *Enterococcus faecalis* TISTR888 ได้ตามลำดับ สารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากไอโซเลต P 1, P 2 และ Sb 2 สามารถยับยั้ง *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T ได้มากที่สุดคือ 6400, 12,800 และ 12,800 AU/ml ได้ตามลำดับ

สำหรับแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากไอโซเลต D 4 พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ATCC14917, *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T, *Lactobacillus sakei* TISTR890, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* TISTR1344, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM6124^T, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR942, *Enterococcus faecalis* JCM5803^T, *Bacillus coagulans* JCM2257^T, *Listeria innocua* ATCC33090, *Brochothrix campestris* NBRC11547, *Pseudomonas fluorescens* JCM5693^T และ *Enterococcus faecalis* TISTR888 สารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากไอโซเลต D 4 สามารถยับยั้ง *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JCM1157^T ได้มากที่สุดคือ 51,200 AU/ml

ในปัจจุบันการศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่แยกได้จากปลาอ่อนข้างน้อยส่วนมากในการศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกมักเกี่ยวข้องกับการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติกมากกว่าการนำสารแบคทีเรียโอซินไปใช้ (Gatesoup. 1999) การศึกษาแบคทีเรียโอซิน

มักจะมุ่งเน้นในผลิตภัณฑ์ของปลามากกว่า เนื่องจากอาจสามารถนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ (ภักดี สุขพันธ์. 2548) ดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งแยกได้จากปลาและผลิตภัณฑ์จากปลา

แบคทีเรียโอซิน	สายพันธุ์แบคทีเรียที่สร้าง	ผลิตภัณฑ์ที่พบ
Carnocin UI49	<i>Carnobacterium piscicola</i>	เนื้อปลาสด
Divercin V41	<i>Carnobacterium divergens</i> V41	ปลาหมักแช่เย็น
Piscicocin V1	<i>C. piscicola</i> V1	ปลาหมักแช่เย็น
Plantaricin F	<i>Lactobacillus plantarum</i> BF001	ปลาตากแห้งแช่เย็น

ที่มา : ดัดแปลงจากพงษ์เทพ วิไลพันธุ์. (2546)

มีรายงานการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินจากกล้ามเนื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซิน 3 สายพันธุ์ได้แก่ *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* และ *En. mundtii* โดยแบคทีเรียโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* (Campos et al. 2006)

ในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินจากระบบทางเดินอาหารของปลากะพง และปลาสวายทั้งในประเทศไทยและต่างประเทศ การศึกษาครั้งนี้ นับว่าเป็นการรายงานครั้งแรก

สำหรับสัตว์ปีกมีรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่ได้จากลำไส้ไก่กระทอง โดย Komkhae et al. (2005a); Komkhae (2005) และ Komkhae et al. (2006) สามารถแยกเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 และ *Lb. salivarius* K7 โดย *Lb. salivarius* K4 มีคุณสมบัติในการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน 2 ชนิดได้แก่ Salivaricin B และ Salvicin K ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T, *B. coagulans* JCM 2257^T, *E. faecalis* JCM 5803^T, *L. innocua* ATCC 33090^T and *Br. campestris* NBRC 11547^T ส่วน *Lb. salivarius* K7 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน abP 118 beta ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T, *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* JCM 6124^T and *B. coagulans* JCM 2257^T อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินจากลำไส้เป็ด การศึกษาครั้งนี้ นับว่าเป็นรายงานครั้งแรก

ตารางที่ 7 การยับยั้งเชื้อทดสอบโดยสารแบคทีริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

Indicator strains	Media	Temp. (°C)	Antibacterial activity (AU/ml)			
			D 4	P 1	P 2	Sb 2
Lactic acid bacteria						
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917 ^T	MRS	30°C	200	800	400	800
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i> JCM 1157 ^T	MRS	30°C	51200	6400	12800	12800
<i>Lactobacillus sakei</i> TISTR 890	MRS	37°C	100	800	400	1600
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TISTR1344	MRS	30°C	800	200	400	200
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> JCM 6124 ^T	MRS	30°C	400	800	800	800
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> TISTR 942	MRS	30°C	800	1600	400	1600
<i>Enterococcus faecalis</i> JCM 5803 ^T	MRS	37°C	400	-	400	800
<i>Enterococcus faecalis</i> TISTR 888	MRS	37°C	400	1600	-	1600
Other bacteria						
<i>Bacillus coagulans</i> JCM 2257 ^T	TEB-YE	37°C	100	800	400	800
<i>Bacillus coagulans</i> TISTR 1447	TEB-YE	37°C	-	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090 ^T	TEB-YE	37°C	6400	1600	400	1600
<i>Brochothrix campestris</i> NBRC 11547 ^T	TEB-YE	25°C	800	3200	400	1600
<i>Pseudomonas fluorescens</i> JCM 5963 ^T	TEB-YE	25°C	800	200	400	200
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TISTR 358	TEB-YE	25°C	-	-	-	200

ตารางที่ 7 การยับยั้งเชื้อทดสอบโดยสารแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ

Indicator strains	Media	Temp. (°C)	Antibacterial activity (AU/ml)			
			D 4	P 1	P 2	Sb 2
<i>Staphylococcus aureus</i> TISTR118	TEB-YE	37°C	-	-	-	200
<i>Streptococcus</i> sp. TISTR1030	MRS	30°C	-	-	-	1600
<i>Aeromonas hydrophila</i> TISTR1321	NB	30°C	-	-	-	-

ATCC = American Type Culture Collection , Rockville, Md

JCM = Japanese culture of Microorganism ,Wako,Japan

NBRC = National Institute of Tecnology and Evaluation (NITE) Biological Resource Center

2.2 การทนต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

ทำการศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ D 4, P 1, P 2 และ Sb 2 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T โดยใช้เอนไซม์ทริปซินและ แอลฟาไคโมทริปซิน พบว่าสายพันธุ์ D 4, P 1 และ Sb 2 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ทริปซิน และ แอลฟาไคโมทริปซิน ในขณะที่สายพันธุ์ P 2 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ทริปซินเท่านั้น การศึกษานี้เป็นการยืนยันผลว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้นนั้นคือสารแบคทีเรียโอซินเนื่องจากสารแบคทีเรียโอซินมีคุณสมบัติเป็น โปรตีน ดังนั้นจึงถูกทำลายด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (Klaenhammer, 1998; Vaughan *et al.*, 2001) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลกติก

ไอโซ เลท D 4, P 1, P 2 และ Sb 2 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T

Treatments	Antibacterial activity (Au/ml)			
	D 4	P 1	P 2	Sb 2
Proteolytic enzyme stability				
Control	6400	3200	3200	3200
Trypsin	-	1600	3200	800
Alpha-chymotrypsin	-	-	200	200

2.3 ผลของความร้อนต่อกิจกรรมแบคทีเรียโอซิน

จากการศึกษาผลของความร้อนต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียที่เรียกรดแลกติกสายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ D 4 และ P 1, P 2 และ Sb 2 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T ลดลงเมื่อแบคทีเรียโอซินสัมผัสกับความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลานานขึ้น กล่าวคือ ที่เวลา 10 30 และ 60 นาที กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินมีค่าเท่ากับ 51200, 12800 และ 12800 Au/ml ตามลำดับ และประสิทธิภาพในการยับยั้งของแบคทีเรียโอซิน มีค่าต่ำสุดเมื่อแบคทีเรียโอซินสัมผัสกับความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 3200 Au/ml เท่านั้น ในทำนองเดียวกันเชื้อ ไอโซเลท P 1, P 2 และ Sb 2 ก็มีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินต่ำสุด เมื่อแบคทีเรียโอซินสัมผัสกับความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 15 นาที โดยมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 800, 800 และ 3200 Au/ml ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 9

จากผลดังกล่าวข้างต้นจะสังเกตเห็นว่า แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวสามารถทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °C ได้นาน 15 นาที แต่จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T ได้ลดลง โดยเชื้อ ไอโซเลท D 4 และ ไอโซเลท Sb 2 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินเท่ากันคือ 3200 Au/ml และเชื้อ ไอโซเลท P 1 และ P 2 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินเท่ากันคือ 800 Au/ml ซึ่งจะเห็นได้ว่า แบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยเชื้อ ไอโซเลท D 4 และ ไอโซเลท Sb 2 มีความสามารถในการทนต่อความร้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ ไอโซเลท P 1 และ P 2 (ตารางที่ 9)

ตารางที่ 9 ผลของความร้อนต่อแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย ไอโซเลท D 4 และ ไอโซเลท P 1, P 2 และ Sb 2 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T

Treatments	Antibacterial activity (Au/ml)			
	D 4	P 1	P 2	Sb 2
Heat Stability				
Control (100 °C 5 min)	51200	6400	51200	12800
100 °C 10 min	51200	3200	51200	12800
100 °C 30 min	12800	3200	51200	12800
100 °C 60 min	12800	1600	51200	6400
121 °C 15 min	3200	800	800	3200

2.4 ผลของความเย็นต่อกิจกรรมแบคทีเรียโอซิน

จากการทดสอบความสามารถในการทนต่อความเย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ ไอโซเลท D 4 และ ไอโซเลท P 1, P 2 และ Sb 2 ต่อการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T โดยทำการทดสอบวันที่ 0, 1, 3, 5, 7 และ 10 พบว่า แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง เชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T ลดลงจาก 51200 Au/ml ในวันที่ 3 แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T จะมีค่าคงที่ในวันที่ 3-10 คือมีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 25600 Au/ml ส่วนแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Le. lactis* subsp. *lactis* P 1 จะมีค่ากิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T คงที่ในวันที่ 0-5 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 6400 Au/ml หลังจากนั้นในวันที่ 7 และ 10 ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินจะมีค่าลดลงเท่ากับ 3200 และ 1600 Au/ml ตามลำดับ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ ไอโซเลท P 2 มีค่ากิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T คงที่อยู่ที่ 25600 ในวันที่ 0, 1 และ 3 ส่วนในวันที่ 5, 7 และ 10 ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินมีค่าลดลงเท่ากับ 12800, 6400 และ 3200 ตามลำดับ และแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ ไอโซเลท Sb 2 มีค่ากิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เท่ากับ 12800 ในวันที่ 0, 1, 3 และ 5 หลังจากนั้น ในวันที่ 7 และ 10 ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินมีค่าลดลงเท่ากับ 6400 และ 3200 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 ผลของกิจกรรมแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย ไอโซเลท D 4 และ ไอโซเลท P 1, P 2 และ Sb 2 ในการยับยั้งเชื้อ *Lb. sakei* subsp. *sakei* JCM 1157^T เมื่อเก็บที่ 4 องศาเซลเซียส

วันที่ทดลอง	Antibacterial activity (Au/ml)			
	D 4	P 1	P 2	Sb 2
0	51200	6400	25600	12800
1	51200	6400	25600	12800
3	25600	6400	25600	12800
5	25600	6400	12800	12800
7	25600	3200	6400	6400
10	25600	1600	3200	3200

2.5 จำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซิน

จากการศึกษาเบื้องต้นถึงสายพันธุ์และลักษณะของเชื้อที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน ทำให้สามารถคาดคะเนจากฐานข้อมูลว่าสารแบคทีเรียโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นคือสารแบคทีเรียโอซินชนิดใดจากฐานข้อมูลทราบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน abp 118 β ในขณะที่ *Lc. lactis* subsp. *lactis* สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินโนซิน ดังนั้นจึงได้ทำการออกแบบ primer ของสารแบคทีเรียโอซินทั้ง 2 ชนิด และทำการเพิ่มปริมาณชิ้น DNA จากนั้นทำการวิเคราะห์หาลำดับเบสนิวคลีโอไทด์ ผลการทดลองพบว่า ลำดับเบสของยีนแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากเชื้อ ไอโซเลท D 4 มีความเหมือนกับแบคทีเรียโอซิน abp 118 β โดยมีความเหมือนเท่ากับ 89 เปอร์เซ็นต์ ส่วนลำดับของยีนแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1 และ P 2 มีความเหมือนกับแบคทีเรียโอซิน nisin Z โดยมีความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ลำดับเบสของยีนแบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก ไอโซเลท Sb 2 มีความเหมือนกับ nisin A โดยมีเปอร์เซ็นต์ ความเหมือน 100 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในภาพที่ 4, 5, 6 และ 7

2.6. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคทีริโอซิน

2.6.1 การจำแนกในระดับโมเลกุล (Genus)

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 4 ไอโซเลทมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาแล้วนำมาเปรียบเทียบกับ Bergey's Manual พบว่า ไอโซเลท P 1, P 2 และ Sb 2 จัดอยู่ในสกุล *Lactococcus* subsp. ส่วนไอโซเลท D 4 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* subsp. ซึ่งผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 11

2.6.2 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกในระดับชนิด (Species) โดยวิธีทางชีวเคมี

ทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 4 สายพันธุ์โดยศึกษากระบวนการหมักน้ำตาล ซึ่งใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียสำเร็จรูปแบบ API 50 CHL kit (bioMerieux) เมื่ออ่านผลที่เกิดจากการหมักน้ำตาล 49 ชนิดและนำผลที่ได้ (ดังตารางที่ 15) ไปผ่านการประมวลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูปพบว่าไอโซเลท P 1 และ Sb 2 จำแนกเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ที่ระดับความถูกต้องของการจำแนก (% of identification) 99.8 และ 93.1% ตามลำดับ ในขณะที่ไอโซเลท P 1 ถูกจำแนกเป็น *Lactococcus raffinolactis* ที่ระดับความถูกต้องของการจำแนก 86.1% ส่วน D 4 ถูกจำแนกเป็น *Lactobacillus salivarius* ที่ระดับความถูกต้องของการจำแนก 99.8% ผลการทดสอบแสดงในตารางที่ 12

2.6.3 การยืนยันผลการจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ โดยวิธี 16 S rDNA

ยืนยันผลโดยการศึกษาลำดับเบสของ 16S rDNA จำนวน 1,500 เบส โดยใช้ Universal primer แล้วนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล 16S rDNA ของแบคทีเรียโดยใช้ฐานข้อมูลของ National Center of Health ประเทศสหรัฐอเมริกา ผลการทดลองพบว่าไอโซเลท P 1, P 2 และ Sb 2 ลำดับเบสมีความเหมือนกับสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*1 ถึง 99% (Accession No AE006456.1, AE006456.1 และ AE006456.1 Date 14/01/52 ตามลำดับ) และไอโซเลท D 4 มีความเหมือนกับ *Lactobacillus salivarius* 99% (Accession No. CP000233.1 Date 14/01/52) ดังแสดงในภาพที่ 4, 5, 6 และ 7 ตามลำดับ ดังนั้นจึงกำหนดชื่อสายพันธุ์ของแบคทีเรียดังกล่าวว่า *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2 และ *Lactobacillus salivarius* D 4 ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 12 ผลสรุปการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคทีริโอซินแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 11 ลักษณะทั่วไปของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอรีโอซิน

Test	Results			
	D 4	P 1	P 2	Sb 2
Gram's strains	positive	positive	positive	positive
Catalase	Negative	Negative	Negative	Negative
Morphology	Short rod	Cocci	Cocci	Cocci
Growth at 10 องศาเซลเซียส	-	-	-	-
30 องศาเซลเซียส	+	+	+	+
37 องศาเซลเซียส	+	+	+	+
42 องศาเซลเซียส	+	+	+	+
45 องศาเซลเซียส	+	-	-	-
50 องศาเซลเซียส	+	-	-	-
NaCl 1%	+	+	+	+
2%	+	+	+	+
3%	+	+	+	+
4%	+	+	+	+
5%	+	+	+	+
6%	+	+	-	+
7%	+	+	-	+
8%	+	+	-	+
18%	-	-	-	-
pH 4.5	+	+	+	+
9.6	+	+	+	+

ตารางที่ 12 ผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอรีโอซิน

Identification	Isolates			
	D 4	P 1	P 2	Sb 2
Morphology	Short Rod	Cocci	Cocci	Cocci
Biochemical test	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactococcus Raffinolactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1
ระดับความถูกต้อง (%)	99.8%	86.1%	99.8%	93.1%
16s rDNA	<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>
ระดับความถูกต้อง (%)	99%	99%	99%	99%

จากการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอรีโอซิน โดยวิธี 16S rDNA พบว่า ไอโซเลท D 4, D8, D9 คือเชื้อ *Lactobacillus salivarius* ตั้งชื่อว่า *Lactobacillus salivarius* D 4, D 8, D 9 และ ไอโซเลท P 1, P 2 และ Sb 2 คือเชื้อ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ตั้งชื่อว่า *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* P 1, P 2, Sb 2 ดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ผลการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่สร้างสารแบคเทอรีโอซิน

ไอโซเลท	16s rDNA	% identity
D 4	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%
D8	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%
D9	<i>Lactobacillus salivarius</i>	99%
P 1	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	99%
P 2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	99%
Sb 2	<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	99%

เมื่อทำการศึกษานิคของสารแบคเทอรีโอซินที่สร้างจากเชื้อที่แยกได้ พบว่า *Lactobacillus salivarius* D 4, D8, D9 สร้างสารแบคเทอรีโอซิน Abp 118 bacteriocin beta peptide *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* P 1 สร้างสารแบคเทอรีโอซิน Lantibiotic nisin-A ส่วน peptide *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* P 2 และ Sb 2 สร้างสารแบคเทอรีโอซิน Lantibiotic nisin-Z ดังแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยไอโซเลท D 4, D 8, D 9, P 1, P 2 และ Sb 2

ไอโซเลท	ยีนแบคทีเรียโอซิน
D 4	Abp 118 bacteriocin beta peptide
D8	Abp 118 bacteriocin beta peptide
D9	Abp 118 bacteriocin beta peptide
P 1	Lantibiotic nisin-A
P 2	Lantibiotic nisin-Z
Sb 2	Lantibiotic nisin-Z

ตารางที่ 15 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติก ไอโซเลท D 4, P 1, P 2 และ Sb 2 ด้วย API 50 CHL

Test	Isolates							
	D 4		P 1		P 2		Sb 2	
	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr	24 hr	48 hr
1. Control	-	-	-	-	-	-	-	-
2. Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-
3. Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-
4. D-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
5. L-arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
6. D-ribose	-	-	+	+	+	+	+	+
7. D-xylose	-	-	+	+	+	+	+	+
8. L-xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
9. D-adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
10. Methyl- β -D-xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-
11. D-galactose	+	+	?	+	+	+	+	+
12. D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
13. D-fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
14. D-mannose	+	+	-	-	+	+	+	+
15. L-sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-
16. L-rhamnose	?	?	-	-	-	-	-	-
17. Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
18. Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
19. D-mannitol	+	+	+	+	-	-	-	-

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Test	Isolates							
	D 4		P 1		P 2		Sb 2	
20. D-sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-
21. Methyl- α D-mannopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-
22. Methyl- α D-glucopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-
23. N-acetylglucosamine	+	+	+	+	+	+	+	+
24. Amygdalin	-	-	?	+	+	+	+	+
25. Arbutin	+	+	+	+	+	+	+	+
26. Esculin ferric citrate	+	+	?	+	+	+	+	+
27. Salicin	?	+	+	+	+	+	+	+
28. D-cellobiose	-	-	+	+	+	+	+	+
29. D-maltose	+	+	+	+	+	+	+	+
30. D-lactose(bovine origin)	+	+	?	+	?	?	+	+
31. D-melibiose	+	+	-	-	+	+	-	-
32. D-saccharose(sucrose)	+	+	+	+	+	+	+	+
33. D-trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+
34. Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-
35. D-melezitose	-	-	-	-	-	-	-	-
36. D-raffinose	+	+	-	-	+	+	-	-
37. Amidon(starch)	-	-	?	+	+	+	+	+
38. Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-
39. Xylitol	-	?	-	-	-	-	-	-
40. Gentiobiose	-	-	+	+	+	+	+	+
41. D-turanose	-	-	-	-	-	-	-	-
42. D-lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-
43. D-tagatose	-	-	-	-	-	-	-	-
44. D-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
45. L-fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
46. D-arabitol	+	+	-	-	-	-	-	-
47. L-arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
48. Potassium gluconate	-	-	?	?	?	?	?	?

ตารางที่ 15 (ต่อ)

Test	Isolates							
	D 4	P 1	P 2	Sb 2				
49. Potassium 2-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-
50. Potassium 5-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-

+, acid production (positive); -, no acid produce, ?, weakly positive

Query	1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAAC	60
Sbjct	74520	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCCTAATACATGCAAGTCGAAC	74579
Query	61	GAAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCAATCACCCTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGA	120
Sbjct	74580	GAAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCAATCACCCTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGA	74639
Query	121	GTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATAC	180
Sbjct	74640	GTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGGGGATAACACTTGGAACAGGTGCTAATAC	74699
Query	181	CGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAG	240
Sbjct	74700	CGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGATGAAAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAG	74759
Query	241	ATGGACCCGCGGCGTATTAAC TAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGT	300
Sbjct	74760	ATGGACCCGCGGCGTATTAAC TAGTTGGTGGGGTAACGGCCTACCAAGGTGATGATACGT	74819
Query	301	AGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGG	360
Sbjct	74820	AGCCGAACCTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCCTACGG	74879
Query	361	GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA	420
Sbjct	74880	GAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGA	74939
Query	421	GTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAA	480
Sbjct	74940	GTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACACGAGTGAGAGTAA	74999
Query	481	CTGTTCAATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG	540
Sbjct	75000	CTGTTCAATTCGATGACGGTATCTAACCAGCAAGTCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCG	75059
Query	541	CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCG	600
Sbjct	75060	CGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTATTGGGCGTAAAGGGAACGCAGGCG	75119
Query	601	GTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCCTTAACCGGAGGGAGTGCATTGGAAACTG	660
Sbjct	75120	GTCTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCCTTAACCGGAGT-AGTGCATTGGAAACTG	75177
Query	661	GAAGACTTGAGGGCAGAAGAGGGAGAGTGGAACTCCATTGTGTAGCGGTGAAATGCGTAG	720
Sbjct	75178	GAAGACTTGAGTGCAGAAGAGG-AGAGTGGAACTCCAT-GTGTAGCGGTGAAATGCGTAG	75235

Query	721	ATATATGGAAGAACACCAGGGGCGAAAGCGGCTTTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGTT	780
Sbjct	75236	ATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGTCTGTAACGACGCTGAGGTT	75295
Query	781	CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAAATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAA	840
Sbjct	75296	CGAAAGCGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAA	75355
Query	841	TGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTCGGC	900
Sbjct	75356	TGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCAATAAGCATTCGGC	75415
Query	901	CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG	960
Sbjct	75416	CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGG	75475
Query	961	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTT	1020
Sbjct	75476	TGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTT	75535
Query	1021	GACCACCTAAGAGATTAGGTTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGT	1080
Sbjct	75536	GACCACCTAAGAGATTAGGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGCTGT	75595
Query	1081	CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTC	1140
Sbjct	75596	CGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCAGCAACGAGCGCAACCCTTGTTGTC	75655
Query	1141	AGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGCGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGT	1200
Sbjct	75656	AGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGCGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGT	75715
Query	1201	GGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA	1260
Sbjct	75716	GGGGACGACGTCAAGTCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGA	75775
Query	1261	CGGTACAACGAGTCGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTC	1320
Sbjct	75776	CGGTACAACGAGTCGCGAGACCGCGAGGTTTAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTC	75835
Query	1321	GGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCA	1380
Sbjct	75836	GGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGAATCAGCA	75895
Query	1381	TGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTG	1440
Sbjct	75896	TGTCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTG	75955
Query	1441	TAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGA	1500
Sbjct	75956	TAACACCCAAAGCCGGTGGGGTAACCGCAAGGAGCCAGCCGTCTAAGGTGGGACAGATGA	76015
Query	1501	TTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA	1524
Sbjct	76016	TTGGGGTGAAGTCGTAACAAGGTA	76039

ภาพที่ 8 แสดงลำดับเบสของไอโซเลท D 4 (Accession No. CP000233.1 Date 14/01/52)

Query	1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTGAGC	60
Sbjct	537569	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTGAGC	537628
Query	61	GCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGG	120
Sbjct	537629	GCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGG	537688
Query	121	AATCTGCCTTTGAGCGGGGACAAACATTTGGAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTT	180
Sbjct	537689	AATCTGCCTTTGAGCGGGGACAAACATTTGGAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTT	537748
Query	181	TAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTG	240
Sbjct	537749	TAAACACAAGTTTTAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTG	537808
Query	241	TATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAG	300
Sbjct	537809	TATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAG	537868
Query	301	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGG	360
Sbjct	537869	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGG	537928
Query	361	GAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTT	420
Sbjct	537929	GAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTT	537988
Query	421	CGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGT	480
Sbjct	537989	CGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGT	538048
Query	481	GACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG	540
Sbjct	538049	GACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG	538108
Query	541	GTCCCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCT	600
Sbjct	538109	GTCCCGAGCGTTGTCCGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCT	538168
Query	601	GGTGTAAGGAGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAG	660
Sbjct	538169	GGTGTAAGGAGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAAACTGGTAGACTTGAGTGCAG	538228
Query	661	GAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCG	720
Sbjct	538229	GAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCG	538288
Query	721	GTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAA	780
Sbjct	538289	GTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAA	538348
Query	781	ACAGGATTAGAAACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAATGTAGGGAGCT	840
Sbjct	538349	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGATGTAGGGAGCT	538408
Query	841	ATAAGTTCCTGTATCGCAGCTAACGCAAAAAGCACCCCGCTGGGGAGTACGACCCCAA	900
Sbjct	538409	ATAAGTTCCTGTATCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCCTGGGGAGTACGACCCCAA	538468
Query	901	GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT	960
Sbjct	538469	GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT	538528
Query	961	CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTATTCTTAGAGATAGG	1020
Sbjct	538529	CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTATTCTTAGAGATAGG	538588
Query	1021	AAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGCTGAG	1080

Sbjct	538589	 AAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGTCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAG	538648
Query	1081	ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTG	1140
Sbjct	538649	 ATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAGTTG	538708
Query	1141	GGCACTCTAACGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT	1200
Sbjct	538709	 GGCACTCTAACGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT	538768
Query	1201	CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAG	1260
Sbjct	538769	 CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAG	538828
Query	1261	ACAGTGATGTTTAGCTAATCTCTTAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC	1320
Sbjct	538829	 ACAGTGATGTTTAGCTAATCTCTTAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC	538888
Query	1321	GCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTT	1380
Sbjct	538889	 GCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTT	538948
Query	1381	CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTGGGAGTACCCGAAGTAGGTTG	1440
Sbjct	538949	 CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTGGGAGTACCCGAAGTAGGTTG	539008
Query	1441	CCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTCCTAAGGTAAGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA	1500
Sbjct	539009	 CCTAACCGCAAGGAGGGCGCTTCCTAAGGTAAGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA	539068
Query	1501	AGGTA 1505	
Sbjct	539069	 AGGTA 539073	

ภาพที่ 9 แสดงลำดับเบสของไอโซเลต P 1 (Accession No AE006456.1 Date 14/01/52)

Query	1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTGAGC	60
Sbjct	537569	AGAGTTTGATCCTGGCTCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTTGAGC	537628
Query	61	GCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGG	120
Sbjct	537629	GCTGAAGGTTGGTACTTGTACCGACTGGATGAGCAGCGAACGGGTGAGTAACGCGTGGGG	537688
Query	121	AATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTT	180
Sbjct	537689	AATCTGCCTTTGAGCGGGGGACAACATTTGGAAACGAATGCTAATACCGCATAAAAACTT	537748
Query	181	TAAACACAAGTTTAAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTG	240
Sbjct	537749	TAAACACAAGTTTAAAGTTTGAAAGATGCAATTGCATCACTCAAAGATGATCCCGCGTTG	537808
Query	241	TATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAG	300
Sbjct	537809	TATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGATGATACATAGCCGACCTGAGAG	537868
Query	301	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGG	360
Sbjct	537869	GGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACCTCTACGGGAGGCAGCAGTAGG	537928
Query	361	GAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTT	420
Sbjct	537929	GAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTT	537988
Query	421	CGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGT	480
Sbjct	537989	CGGATCGTAAAACTCTGTTGGTAGAGAAGAACGTTGGTGAGAGTGGAAGCTCATCAAGT	538048
Query	481	GACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG	540
Sbjct	538049	GACGGTAACTACCCAGAAAGGGACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG	538108
Query	541	GTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCT	600
Sbjct	538109	GTCCCGAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGTGGTTTATTAAGTCT	538168
Query	601	GGTGTAAGGAGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAACTGGTAGACTTGAGTGCAG	660
Sbjct	538169	GGTGTAAGGAGCAGTGGCTCAACCATTGTATGCATTGGAACTGGTAGACTTGAGTGCAG	538228
Query	661	GAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCG	720
Sbjct	538229	GAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCG	538288
Query	721	GTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAACAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAA	780
Sbjct	538289	GTGGCGAAAGCGGCTCTCTGGCCTGTAACAGTACACTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAA	538348
Query	781	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAAATGTAGGGAGCT	840
Sbjct	538349	ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAGATGTAGGGAGCT	538408
Query	841	ATAAGTTCTCTGTATCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCCCCTGGGGAGTACCACCCCAA	900
Sbjct	538409	ATAAGTTCTCTGTATCGCAGCTAACGCAATAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACCACCCCAA	538468
Query	901	GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT	960
Sbjct	538469	GGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATT	538528
Query	961	CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTATTCCCTAGAGATAGG	1020
Sbjct	538529	CGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATACTCGTGCTATTCCCTAGAGATAGG	538588
Query	1021	AAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAG	1080
Sbjct	538589	AAGTTCCTTCGGGACACGGGATACAGGTGGTGATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTGAG	538648

Query	1081	ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAAGTTG	1140
Sbjct	538649	ATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATTGTTAGTTGCCATCATTAAAGTTG	538708
Query	1141	GGCACTCTAACGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT	1200
Sbjct	538709	GGCACTCTAACGAGACTGCCGGTGATAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCAT	538768
Query	1201	CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAG	1260
Sbjct	538769	CATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAG	538828
Query	1261	ACAGTGATGTTTAGCTAATCTCTTAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC	1320
Sbjct	538829	ACAGTGATGTTTAGCTAATCTCTTAAACCATTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTC	538888
Query	1321	GCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTC	1380
Sbjct	538889	GCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATACGTTC	538948
Query	1381	CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTGGGAGTACCCGAAGTAGGTTG	1440
Sbjct	538949	CCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGGGAGTTGGGAGTACCCGAAGTAGGTTG	539008
Query	1441	CCTAACCGCAAGGAGGCGCTTCCTAAGGTAAGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA	1500
Sbjct	539009	CCTAACCGCAAGGAGGCGCTTCCTAAGGTAAGACCGATGACTGGGGTGAAGTCGTAACA	539068
Query	1501	AGGTA	1505
Sbjct	539069	AGGTA	539073

ภาพที่ 10 แสดงลำดับเบสของไอโซเลท P 2 (Accession No AE006456.1 Date 14/01/52)

Query	5	TACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATCGGTCTTACCTTAGGAAGCGCCCTCCTTGCGG	64
Sbjct	539073	TACCTTGTTACGACTTCACCCAGTCATCGGTCTTACCTTAGGAAGCGCCCTCCTTGCGG	539014
Query	65	TTAGGCAACCTACTTCGGGTACTCCCAACTCCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGG	124
Sbjct	539013	TTAGGCAACCTACTTCGGGTACTCCCAACTCCCGTGGTGTGACGGGCGGTGTGTACAAGG	538954
Query	125	CCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATG	184
Sbjct	538953	CCCGGGAACGTATTACCGCGGCGTGTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATG	538894
Query	185	TAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACATC	244
Sbjct	538893	TAGGCGAGTTGCAGCCTACAATCCGAAGTGAAGATGGTTTTAAGAGATTAGCTAAACATC	538834
Query	245	ACTGTCTCGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG	304
Sbjct	538833	ACTGTCTCGCGACTCGTTGTACCATCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGG	538774
Query	305	GCATGATGATTTGACGTCATCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCGTTAGA	364
Sbjct	538773	GCATGATGATTTGACGTCATCCACCTTCCTCCGGTTTATCACCGGCAGTCTCGTTAGA	538714
Query	365	GTGCCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC	424
Sbjct	538713	GTGCCCCAACTTAATGATGGCAACTAACAATAGGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCC	538654
Query	425	AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCCGTGTCCCGAAGG	484
Sbjct	538653	AACATCTCACGACACGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTATCCCGTGTCCCGAAGG	538594
Query	485	AACTTCCTATCTCTAGGAATAGCACGAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG	544
Sbjct	538593	AACTTCCTATCTCTAGGAATAGCACGAGTATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTG	538534
Query	545	CTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT	604
Sbjct	538533	CTTCGAATTAACACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTT	538474
Query	605	CAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTATTGCGTTAGCTGCGATACAGAGAA	664
Sbjct	538473	CAACCTTGCGGTCGTACTCCCCAGGCGGAGTGCTTATTGCGTTAGCTGCGATACAGAGAA	538414
Query	665	CTTATAGCTCCCTACATCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT	724
Sbjct	538413	CTTATAGCTCCCTACATCTAGCACTCATCGTTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAAT	538354
Query	725	CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGTGTGAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCTTTC	784
Sbjct	538353	CCTGTTTGCTCCCCACGCTTTCGAGCCTCAGTGTGAGTTACAGGCCAGAGAGCCGCTTTC	538294
Query	785	GCCACCGGTGTTCCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTCTC	844
Sbjct	538293	GCCACCGGTGTTCCCTCCATATATCTACGCATTTACCGCTACACATGGAATTCCACTCTC	538234
Query	845	CTCTCCTGCACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGCATACAATGGTTGAGCCACTGCCTTTT	904
Sbjct	538233	CTCTCCTGCACTCAAGTCTACCAGTTTCCAATGCATACAATGGTTGAGCCACTGCCTTTT	538174
Query	905	ACACCAGACTTAATAAACCACCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTC	964
Sbjct	538173	ACACCAGACTTAATAAACCACCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGACAACGCTC	538114
Query	965	GGGACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCCTTTCTGGGTAGTTA	1024
Sbjct	538113	GGGACCTACGTATTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCGTCCCTTTCTGGGTAGTTA	538054
Query	1025	CCGTCACTTGATGAGCTTTCCACTCTACCAACGTTCTTCTCTACCAACAGAGTTTTACG	1084

Sbjct	538053	CCGTCACTTGATGAGCTTCCACTCTCACCAACGTTCTCTCTACCAACAGAGTTTACG	
	537994		
Query	1085	ATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAA	1144
Sbjct	537993	ATCCGAAAACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTTCGTCCATTGCCGAA	537934
Query	1145	GATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGA	1204
Sbjct	537933	GATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGA	537874
Query	1205	TCACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGC	1264
Sbjct	537873	TCACCCTCTCAGGTCGGCTATGTATCATCGCCTTGGTGAGCCTTTACCTCACCAACTAGC	537814
Query	1265	TAATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAGACTTAAACTTGT	1324
Sbjct	537813	TAATACAACGCGGGATCATCTTTGAGTGATGCAATTGCATCTTTCAGACTTAAACTTGT	537754
Query	1325	GTTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGC	1384
Sbjct	537753	GTTTAAAGTTTTTATGCGGTATTAGCATTTCGTTTCCAAATGTTGTCCCCCGCTCAAAGGC	537694
Query	1385	AGATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTTGGTACAAGTACCAACCT	1444
Sbjct	537693	AGATTCCCCACGCGTTACTCACCCGTTTCGCTGCTCATCCAGTCGGTACAAGTACCAACCT	537634
Query	1445	TCAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAA	1504
Sbjct	537633	TCAGCGCTCAACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGATCAA	537574
Query	1505	ACTCT 1509	
Sbjct	537573	ACTCT 537569	

ภาพที่ 11 แสดงลำดับเบสของไอโซเลต Sb 2 (Accession No AE006456.1 Date 14/01/52)

Good identification of D 4

Significant taxonomy	%ID	T	Tests against
<i>Lactobacillus salivarius</i>	99.8	0.35	SOR 98% DARL 1%
Next taxon	%ID	T	Tests against
<i>Lactobacillus raffinolactis</i>	0.1	0.01	DXYL 83% CEL 100% AMD 100% DARL 0%

Good identification of P 1

Significant taxonomy	%ID	T	Tests against
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	86.1	0.6	RIB 16% MDG16%
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	13.6	0.76	MDG22% MEL 13% RAF 9%
Next taxon	%ID	T	Tests against
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	0.1	0.39	MDG14% AMD 0%

Good identification of P 2

Significant taxa	%ID	T	Tests against
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	99.8	0.76	
Next taxon	%ID	T	Tests against
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 2	0.1	0.31	LARA 4% DXYL1% MAN20% SAC20%

Good identification of Sb 2

Significant taxonomy	%ID	T	Tests against
<i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i> 1	93.1	0.45	
Next taxon	%ID	T	Tests against
<i>Lactobacillus brevis</i> 1	3.2	0.34	

4. การศึกษาผลของการใช้สารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* D 4, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 2 และ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ร่วมกับกรดแลกติก ต่อจำนวนเชื้อ *Salmonella* spp.

4.1. ผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ร่วมกับกรดแลกติกที่มีต่อเชื้อ

S. Typhimurium

จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* D 4 ร่วมกับกรดแลกติก พบว่าในกลุ่มที่เติมแบคทีเรียโอซินนั้นสามารถลดปริมาณของเชื้อ *S. Typhimurium* เมื่อเวลาผ่านไป

โดยเฉพาะที่ pH 4.5 นั้นพบว่าในกลุ่มที่เติมแบคทีเรียโอซินมีปริมาณของเชื้อ *S. Typhimurium* เพียง 1.72 log cfu/ml ในขณะที่กลุ่มที่ไม่ใส่แบคทีเรียโอซินพบปริมาณของเชื้อ *S. Typhimurium* ถึง 3.45 log cfu/ml ในชั่วโมงที่ 30 นอกจากนี้ยังพบว่าที่ pH 5, 5.5 และ 6 ในกลุ่มที่เติมแบคทีเรียโอซินและกลุ่มที่ไม่ใส่แบคทีเรียโอซินนั้นมีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นถึง 7 log cfu/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ยกเว้นใน pH 5.5 ในกลุ่มที่เติมแบคทีเรียโอซินมีการลดลงของเชื้อ *S. Typhimurium* ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* D 4 ต่อจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium*

ชั่วโมงที่	ปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> (log cfu/ml)							
	pH 4.5		pH 5		pH 5.5		pH 6	
	+	-	+	-	+	-	+	-
0	6.22	6.22	6.26	6.18	6.21	6.15	6.15	6.01
6	5.76	6.05	7.13	7.31	7.28	7.90	7.41	7.83
12	5.55	5.89	7.79	7.72	7.90	7.76	7.97	7.64
18	4.95	5.50	7.57	7.70	7.83	7.84	7.72	7.92
24	3.04	6.84	7.29	7.79	7.82	7.91	7.86	7.91
30	1.72	3.45	7.49	7.62	4.52	7.76	7.00	7.08

+ หมายถึง เติมแบคทีเรียโอซิน

- หมายถึง ไม่เติมแบคทีเรียโอซิน

4.2. ผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1 ร่วมกับกรดแลกติกที่มีต่อเชื้อ

S. Typhimurium

จากการนำเชื้อ *S. Typhimurium* ใส่ในอาหาร TSB (0.5 เปอร์เซ็นต์ YE) ที่ปรับค่า pH โดยกรดแลกติกเป็น 4.5, 5, 5.5, และ 6 แล้วแบ่งออกเป็นสองกลุ่มคือ กลุ่มที่เติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1 กับ กลุ่มที่ไม่เติมแบคทีเรียโอซิน โดยทดสอบการเจริญของเชื้อทุก 6 ชั่วโมงจนครบ 30 ชั่วโมงโดยใช้วิธี standard plate count เพื่อทดสอบผลของแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการลดปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium*

พบว่าที่ pH 4.5 กลุ่มที่เติมกรดแลกติกและแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1 นั้นเชื้อ *S. Typhimurium* มีปริมาณลดลงในทุกๆ 6 ชั่วโมง โดยเชื้อ *S. Typhimurium* เพียง 1.13 log cfu/ml ในขณะที่กลุ่มที่ไม่เติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1 มีจำนวนเชื้อถึง 1.47 log Cfu/ml ในชั่วโมงที่ 24 แต่ในชั่วโมงที่ 30 ทั้งสองกลุ่มการทดลองสามารถทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* ได้ คือไม่ตรวจพบเชื้อ *S. Typhimurium* เลย ส่วนที่ pH 5, 5.5 และ 6 นั้นพบว่ามีการเจริญ

ของเชื้อ *S. Typhimurium* ในช่วงโม่งที่ 30 กลุ่มที่เติมกรดแลคติกและแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1 นั้นมีปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* 2.58, 2.33 และ 4.09 log cfu/ml ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มที่ไม่เติมแบคทีเรียโอซินมีปริมาณเชื้อ *S. Typhimurium* ถึง 8.38, 8.34 และ 8.36 log cfu/ml ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1 ต่อจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium*

ชั่วโมงที่	ปริมาณเชื้อ <i>S. Typhimurium</i> (log cfu/ml)							
	pH 4.5		pH 5		pH 5.5		pH 6	
	+	-	+	-	+	-	+	-
0	6.20	6.20	6.23	6.22	6.24	6.09	6.14	6.14
6	5.89	5.89	6.03	6.53	7.07	7.95	7.00	7.52
12	4.33	4.34	7.60	7.27	8.17	8.25	7.64	8.22
18	2.19	3.87	5.93	6.63	5.48	6.56	5.60	6.00
24	1.13	1.47	5.21	8.17	4.99	8.20	5.42	8.29
30	0	0	2.58	8.38	2.33	8.34	4.09	8.36

+ หมายถึง เติมแบคทีเรียโอซิน

- หมายถึง ไม่เติมแบคทีเรียโอซิน

4.3. ผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ P 1 ร่วมกับกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

Salmonella Anatum

จากการศึกษาความสามารถของสารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1 ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกรดแลคติก ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Anatum* (เชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE ที่มีค่า pH 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตรอดที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียโอซิน จากนั้นนำมาตรวจหาเชื้อ *S. Anatum* ในอาหาร TSA โดยวิธีการ pour plate จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่เมื่อเติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1 ทำให้เชื้อ *S. Anatum* มีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้นและค่า pH ต่ำลง เมื่อระยะเวลาการบ่มเท่ากับ 12 ชั่วโมง เชื้อ *S. Anatum* มีจำนวนเท่ากับ 4.41, 5.26, 6.26 และ 7.67 log cfu/ml เมื่อค่า pH เท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ตามลำดับ แต่เมื่อบ่มไว้ที่ 18 ชั่วโมงขึ้นไป พบว่าเชื้อ *S. Anatum* ไม่สามารถมีชีวิตรอดในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ เมื่อค่า pH 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1 ต่อการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum

ชั่วโมง	pH			
	4.5	5	5.5	6
0	6.37±0.05	6.3±0.23	6.51±0.10	6.44±0.04
6	5.82±0.20	5.84±0.17	7.97±0.44	7.73±0.28
12	4.41±0.70	5.26±1.15	6.26±1.65	7.67±0.07
18	0	0.00	0.00	0.00
24	0	0.00	0.00	0.00
30	0	0.00	0.00	0.00

แต่ในขณะเดียวกันในกลุ่มที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียโอซิน พบว่าเมื่อไม่เติมแบคทีเรียโอซินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เพียงกรดแลกติกกลับพบว่า เชื้อ *S. Anatum* มีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้นและค่า pH ต่ำ แต่ลดลงน้อยกว่าเมื่อเติมแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติก เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง พบว่าเชื้อไม่มีชีวิตรอดที่ค่า pH เท่ากับ 4.5 ในขณะที่ที่ระดับ pH เท่ากับ 5.0, 5.5 และ 6.0 เชื้อมีจำนวนเท่ากับ 3.70, 4.10 และ 4.16 cfu/ml ตามลำดับ ดังแสดงดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงผลของการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum เมื่อไม่เติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1

ชั่วโมง	pH			
	4.5	5	5.5	6
0	6.70±0.57	6.69±0.59	6.99±0.90	6.81±0.62
6	5.32±0.41	6.64±0.86	7.58±0.86	7.81±0.78
12	4.80±0.49	7.74±0.49	7.50±0.94	8.20±0.01
18	3.89±0.50	7.07±0.02	7.44±0.60	7.83±0.40
24	3.84±0.45	7.00±0.05	6.99±0.18	7.12±0.34
30	0.00	3.70±0.04	4.10±0.21	4.16±0.26

จากการศึกษา พบว่าเมื่อนำแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* P 1 มาใช้ร่วมกับกรดแลกติกที่ pH 4.5 สามารถยับยั้งและทำลายเชื้อ *S. Typhimurium* โดยทำลายได้ในชั่วโมงที่ 30 และแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus salivarius* D 4 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. Typhimurium* ที่ pH 4.5 เมื่อใช้ร่วมกับกรดแลกติกได้ โดยทำให้เชื้อมีจำนวนลดลง ซึ่ง ชาญญา กงทะสร (2547) ได้รายงานถึงผลของการใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกในการลดปริมาณเชื้อ *S. Derby*, *S. Anatum* และ *S. aureus* โดยใช้

pediocin PA-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่แยกได้จากหมักหมมร่วมกับกรดแลกติก พบว่าในกลุ่มที่ใช้ pediocin PA-1 ร่วมกับกรดแลกติก 1 เปอร์เซ็นต์ นั้นสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. Derby* ในทันทีที่สัมผัสสารละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ pediocin PA-1 หรือกรดแลกติก 1 เปอร์เซ็นต์ เพียงอย่างเดียว แต่การใช้ pediocin PA-1 ร่วมกับกรดแลกติก 1 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลในการลดปริมาณเชื้อ *S. Anatum* ไม่แตกต่างจาก pediocin PA-1 หรือกรดแลกติก 1 เปอร์เซ็นต์ เพียงอย่างเดียว ในขณะที่การใช้กรดแลกติก 1 เปอร์เซ็นต์ เพียงอย่างเดียวสามารถลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* ได้ดีกว่าการใช้ pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียว หรือการใช้ pediocin PA-1 ร่วมกับกรดแลกติก 1 เปอร์เซ็นต์ แสดงให้เห็นว่ากรดแลกติก 1 เปอร์เซ็นต์ สามารถควบคุมปริมาณเชื้อ *S. Derby*, *S. Anatum* และ *S. aureus* ในขณะเดียวกันกลุ่มที่ใช้กรดแลกติก 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ pediocin PA-1 จะมีปริมาณเชื้อจุลินทรีย์น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) และประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ *S. Derby*, *S. Anatum* และ *S. aureus* จะยังมีมากขึ้นเมื่อปล่อยให้เชื้อได้สัมผัสกับสารละลายนานขึ้น Veerawanayotin *et al.* (2010) ศึกษาการทำงานร่วมกันระหว่างแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งสร้างแบคทีเรียโอซิน Pediocin PA-1 ร่วมกับกรดแลกติกบนเชื้อ *S. Anatum* และ *S. Ratchaburi* ในแบบจำลองการหมักหมม โดยปรับ pH ด้วยกรดแลกติกความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ พบว่าหลังจากการบ่มเป็นเวลา 30 ชั่วโมงนั้น ในกลุ่มที่เติม Pediocin PA-1 ที่ pH 4.5 เป็นสถานะที่สามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 ของการทดลอง Smulder and Woolthuis (1985) กล่าวว่า กรดแลกติกมีผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เนื่องจากทำให้ค่าความเป็นกรดต่ำลง ทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ซึ่งในสถานะนี้จะทำให้ช่วงเจริญเติบโตใช้เวลานานขึ้นจึงทำให้อัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ช้าลง กรดแลกติกจัดว่าเป็น สารที่มีความปลอดภัย (Generally Regognized as Safe, GRAS) ซึ่งมนุษย์ได้นำมาใช้ประโยชน์มานานนับศตวรรษ โดยนำไปใช้ในการถนอมอาหารและใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารหลายประเภทเนื่องจากกรดแลกติกมีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ โดยสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่นแบคทีเรียโอซินและกรดอินทรีย์ต่างๆ (อัจฉรา เพิ่ม. 2550) แบคทีเรียโอซินสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบและแกรมบวกหลายสปีชีส์ แต่แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากกลุ่มแบคทีเรียแลกติก (lactic acid bacteria) กลับเป็นที่ได้รับความสนใจมากที่สุด (อรอนงค์ พริ้งสุลละ. 2550)

4.4. ผลการศึกษาการใช้แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Salmonella Anatum*

จากการศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ร่วมกับกรดแลกติกในการยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ที่มีจำนวนเริ่มต้น 10^6 cfu/ml ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE ที่ค่า pH 4.5, 5, 5.5 และ 6 เพื่อตรวจหาจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดที่ระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อ 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมงเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียโอซิน จากการทดลองพบว่า กลุ่มที่มีการเติมแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกมีผลให้จำนวนเชื้อ *S. Anatum* มีจำนวนลดลง เมื่อระยะเวลาที่สารสัมผัส

เชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยที่ค่า pH 4.5, 5, 5.5 และ 6 ในระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อ 12 ชั่วโมงนั้นเชื้อ *S. Anatum* มีจำนวน 4.84, 5.50, 7.35 และ 7.53 log cfu/ml ตามลำดับ แต่เมื่อระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อ 18 ชั่วโมงขึ้นไปพบว่าเชื้อ *S. Anatum* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ในทุกๆ ค่า pH ดังนั้นในการใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกที่ค่า pH 4.5 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ได้ดีกว่าค่า pH ที่สูงมากขึ้น ดังแสดงในตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงผลของการยับยั้งเชื้อ *Salmonella Anatum* เมื่อเติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE agar

ชั่วโมง	pH (log cfu/ml)			
	4.5	5	5.5	6
0	6.41±0.01	6.44±0.03	6.51±0.11	6.52±0.06
6	5.33±0.50	5.82±0.14	7.62±0.06	7.58±0.07
12	4.84±0.07	5.50±0.81	7.35±0.12	7.53±0.13
18	0.00	0.00	0.00	0.00
24	0.00	0.00	0.00	0.00
30	0.00	0.00	0.00	0.00

และจากการทดลองในกลุ่มที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียโอซินใช้เพียงกรดแลกติก พบว่าเชื้อ *S. Anatum* มีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อเพิ่มมากขึ้น โดยที่ค่า pH 5, 5.5 และ 6 *S. Anatum* สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ไปจนถึงระยะเวลาการบ่มที่ 30 ชั่วโมง ซึ่งมีจำนวน 3.66, 4.22 และ 4.33 log cfu/ml แต่ในขณะที่ค่า pH 4.5 นั้นเชื้อ *S. Anatum* สามารถมีชีวิตอยู่รอดได้ถึงเพียง 24 ชั่วโมง ซึ่งมีจำนวน 3.86 log cfu/ml ดังนั้นกลุ่มที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียโอซินมีผลทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ลดลงกว่ากลุ่มที่มีการเติมแบคทีเรียโอซิน ดังแสดงในตารางที่ 19

ตารางที่ 19 แสดงผลของการยับยั้งเชื้อ *Salmonella Anatum* เมื่อไม่เติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2

ชั่วโมง	pH (log cfu/ml)			
	4.5	5	5.5	6
0	6.27±0.03	6.30±0.04	6.49±0.20	6.36±0.02
6	5.63±0.57	7.27±0.02	8.18±0.01	8.31±0.07
12	5.14±0.00	8.11±0.03	8.07±0.13	8.26±0.06
18	4.08±0.47	7.13±0.11	7.91±0.06	7.60±0.08
24	3.86±0.47	6.99±0.04	6.58±0.40	6.64±0.35
30	0.00	3.66±0.02	4.22±0.04	4.33±0.02

จากการศึกษาเบื้องต้นของความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lc. Lactis* subsp. *lactis* P 2 ในการยับยั้งเชื้อต่างๆ นั้น พบว่าแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียบางกลุ่มได้ รวมถึงกรดแลกติกที่ใช้มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคได้เช่นกัน

จากผลการศึกษาการใช้แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ร่วมกับกรดแลกติก พบว่าแบคทีเรียโอซินจากเชื้อดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *S. Anatum* ได้ ซึ่งจากการทดลองสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Anatum* ได้หมดจนกระทั่งระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อ 18 ชั่วโมง ส่วนผลการใช้กรดแลกติกเพียงอย่างเดียว นั้น พบว่ามีผลทำให้การเจริญของเชื้อ *S. Anatum* ลดลงเพียงเล็กน้อย และมีชีวิตรอดไปจนถึงระยะเวลาที่สารสัมผัสเชื้อ 30 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Veerawatanayotin *et al.* (2010) ได้ศึกษาผลของแบคทีเรียโอซิน Pediocin PA-1 ที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ร่วมกับกรดแลกติก 90 เปอร์เซ็นต์ ต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Salmonella* *Anatum* และ *Salmonella* *Ratchaburi* ในแบบจำลองการหมักแฮมซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่มีการเติมแบคทีเรียโอซิน และกลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียโอซินซึ่งทั้งสองกลุ่มมีการปรับ pH ด้วยกรดแลกติกเป็น 4.5, 5, 5.5 และ 6 จากการทดลองพบว่า การใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* ทั้งสองสายพันธุ์ได้ดีกว่ากลุ่มที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียโอซิน ซึ่งสภาวะที่มีค่า pH 4.5 นั้นมีผลในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* ได้ดีที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าที่ระยะเวลาการบ่ม 30 ชั่วโมง สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella* ได้หมด ดังนั้นแบคทีเรียโอซินและในสภาวะที่มีความเข้มข้นของกรดสูงมีผลทำให้เซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคเกิดความเครียดและเกิดการบาดเจ็บ

การทดลองของ Thongbai *et al.* (2009) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างพื้นฐานในสภาพความเครียดที่เกิดจากอุณหภูมิ และค่า pH ของเชื้อ *Salmonella* โดยใช้สาร cetylpyridinium-nisin (CPC-nisin) แบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มที่อยู่ในสภาวะเครียดจากอุณหภูมิ (heating, chilling และ freezing) 2. กลุ่มที่อยู่ในสภาวะเครียดจากค่า pH (4.5, 5.0 และ 6) และ 3. กลุ่มที่อยู่ในสภาวะเครียดจากการเติมสาร CPC-nisin ต่อการลดจำนวนของเชื้อ *Salmonella* ผลการทดลองพบว่า ในกลุ่มที่อยู่ในสภาวะเครียดจากอุณหภูมิแบบ freezing มีจำนวนเชื้อ *Salmonella* ลดลงมากที่สุดซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่น และหลังจากที่ผ่านความเครียดจากอุณหภูมิ และการเติม CPC-nisin แบบ freezing นั้นมีจำนวนลดลงมากที่สุดประมาณ 5.16 log cfu/ml รองลงมา คือ heating และ chilling ส่วนผลความเครียดที่เกิดจาก pH ที่ค่า pH ต่ำสุด (4.5) และมีการเติมสาร CPC-nisin มีผลในการลดจำนวนของเชื้อ *Salmonella* มากที่สุดเท่ากับ 5.36 log cfu/ml ในขณะที่ความเครียดที่เกิดจาก pH 5.0 ที่มีการเติมสาร CPC-nisin ทำให้มีจำนวนเชื้อ *Salmonella* ลดลงน้อยกว่าประมาณ 3.77 log cfu/ml

นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของชนัญญา กงทะสร(2547) ได้ศึกษาการใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับการแลกติกต่อการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสุกร โดยใช้แบคทีเรียโอซินชนิด pediocin PA-1 ที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งการทดลองนี้เป็นการใช้แบคทีเรียโอซินร่วมกับกรด

แลกติกต่อการลดปริมาณเชื้อ *S. Derby*, *S. Anatum* และ *S. aureus* ในหลอดทดลอง โดยมีปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $4 \log \text{ cfu/ml}$ โดยใช้กรดแลกติก 2 ระดับ (0% และ 1%) แบคทีเรียโอซิน 4 ระดับ (0, 320, 640 และ 1280 AU/ml) และระยะเวลาที่ศึกษา 6 ระยะ (0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง) ผลการทดลองพบว่า การใช้ pediocin PA-1 ร่วมกับกรดแลกติก 1% นั้น สามารถลดปริมาณเชื้อ *S. Derby* ในทันทีที่สัมผัสสารละลายได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าการใช้ pediocin PA-1 หรือกรดแลกติก 1% แต่เพียงอย่างเดียว โดยเมื่อใช้ร่วมกับ pediocin PA-1 ที่ระดับ 640 และ 1280 AU/ml ลดลงได้มากกว่าการใช้กรดแลกติก 1% เพียงอย่างเดียว และมากกว่าการใช้ pediocin PA-1 ที่ระดับ 640 และ 1280 AU/ml เพียงอย่างเดียว แต่การใช้ pediocin PA-1 ร่วมกับกรดแลกติก 1% ให้ผลในการลดปริมาณเชื้อ *S. Anatum* ไม่แตกต่างจากการใช้ pediocin PA-1 หรือกรดแลกติก 1% แต่เพียงอย่างเดียว ซึ่งการใช้ pediocin PA-1 ในระดับสูง (1280 AU/ml) เพียงอย่างเดียวสามารถลดเชื้อลงได้ประมาณ $0.06 \log \text{ cfu/ml}$ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ส่วนการใช้กรดแลกติก 1% เพียงอย่างเดียวให้ประสิทธิภาพไม่แตกต่างจากการใช้ pediocin PA-1 320 AU/ml ในขณะที่การใช้กรดแลกติก 1% เพียงอย่างเดียวให้ประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ *S. aureus* ดีกว่าการใช้ pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับกรดแลกติก ซึ่งกรดแลกติกสามารถปริมาณเชื้อได้ถึง $0.11 \log \text{ cfu/ml}$ ที่ชั่วโมงที่ 24 ของการศึกษา ดังนั้นจากการศึกษานี้สรุปได้ว่าการใช้กรดแลกติก 1% เพียงอย่างเดียวไม่น่าทำให้ปริมาณเชื้อ *S. Derby* ลดลงได้มากขึ้น ส่วนการใช้ pediocin PA-1 เพียงอย่างเดียวนั้นจะต้องใช้ที่ระดับความเข้มข้น 640 AU/ml ขึ้นไปจึงจะให้ประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ได้มากขึ้น หรือหากใช้ในระดับต่ำกว่านี้ (320 AU/ml) จะต้องปล่อยให้เชื้อสัมผัสสารนานถึง 12 ชั่วโมงก่อน แต่ถ้าใช้กรดแลกติก 1% ร่วมกับ pediocin PA-1 แล้ว พบว่าประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อ *S. Derby* เพิ่มขึ้นมากเนื่องจาก synergistic effect ระหว่างกรดแลกติก และ pediocin PA-1

4.5. ผลของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ร่วมกับกรดแลกติกต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Salmonella Anatum*

จากการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับกรดแลกติก ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. Anatum* (เชื้อเริ่มต้น 10^6 cfu/ml) เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB-YE ที่มีค่า pH 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ตรวจสอบเชื้อที่มีชีวิตรอดที่ระยะเวลาการบ่ม 0, 6, 12, 18, 24 และ 30 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้เติมแบคทีเรียโอซิน จากนั้นนำมาตรวจหาเชื้อ *S. Anatum* ในอาหาร TSA โดยวิธีการ pour plate จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่เมื่อเติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 เชื้อ *S. Anatum* มีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้นและค่า pH ต่ำลง เมื่อระยะเวลาการบ่มเท่ากับ 30 ชั่วโมง เชื้อ *S. Anatum* มีจำนวนเท่ากับ 2.48, 5.57, 6.18 และ 6.12 $\log \text{ cfu/ml}$ เมื่อค่า pH เท่ากับ 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.0 ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 20

ตารางที่ 20 แสดงผลของการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum เมื่อเติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

ชั่วโมง	pH			
	4.5	5	5.5	6
0	6.63±0.10	6.83±0.14	6.91±0.22	7.00±0.34
6	5.63±0.67	6.37±0.40	6.43±0.45	6.45±0.43
12	5.43±0.86	6.41±0.49	6.44±0.47	6.45±0.40
18	5.30±0.91	6.27±0.55	6.74±0.06	6.77±0.10
24	6.13±1.47	5.78±1.16	6.31±0.49	6.26±0.61
30	2.48±3.51	5.57±0.86	6.18±0.47	6.12±0.61

แต่ในขณะเดียวกันพบว่า ในกลุ่มที่ไม่เติมแบคทีเรียโอซินลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้เพียงกรดแลคติกกลับพบว่า มีจำนวนลดลงเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้นและค่า pH ต่ำ แต่ลดลงน้อยกว่าเมื่อเติมแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลคติก เมื่อบ่มเป็นระยะเวลา 30 ชั่วโมง ค่า pH เท่ากับ 4.5 เชื้อลดลงมากที่สุดเท่ากับ 5.99 cfu/ml ในขณะที่ระดับ pH 5.0, 5.5 และ 6.0 จำนวนเชื้อ มีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มมากขึ้น โดยมีค่าเท่ากับ 7.03, 7.05 และ 7.12 cfu/ml ดังแสดงในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แสดงผลของการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* Anatum เมื่อไม่เติมแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb 2

ชั่วโมง	pH			
	4.5	5	5.5	6
0	6.82±0.14	6.78±0.03	6.79±0.13	6.76±0.04
6	7.07±1.21	7.59±0.93	8.22±0.10	8.2±0.04
12	7.03±1.32	8.00±0.27	8.17±0.01	8.43±0.17
18	6.93±0.35	8.12±0.33	8.21±0.21	8.52±0.18
24	6.36±0.93	7.94±0.22	8.08±0.13	8.22±0.02
30	5.99±0.06	7.03±0.02	7.05±0.04	7.12±0.04

การทดลองที่ 2 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติก

1. ศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินสายพันธุ์ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, และ Sb 2

1.1 ศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อกิจกรรมการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ

Lb. salivarius D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, และ Sb 2

จากการทดสอบค่าความเป็นกรดต่างที่มีผลต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก 4 สายพันธุ์ได้แก่ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, และ Sb 2 โดยทำการเลี้ยงเชื้อที่ pH 3-10 พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ที่ทดสอบ สร้างสารแบคเทอริโอซินได้น้อย เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรด และเชื้อสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกลาง คือ ค่า pH 6-7 ในขณะที่เชื้อสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ลดลงเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นด่างมากขึ้น ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 22

ตารางที่ 22 ผลการศึกษาค่าความเป็นกรดต่างที่มีต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ

Lb. salivarius D 4 *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2

Treatment	Antibacterial activity (Au/ml)			
	D 4	P 1	P 2	Sb 2
pH 3	400	200	800	200
4	400	400	800	200
5	12800	1600	12800	1600
6	12800	6400	51200	12800
7	51200	6400	51200	6400
8	51200	6400	25600	6400
9	25600	1600	12800	3200
10	- 1600	400	12800	3200

1.2 การศึกษาความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีต่อการสร้างสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, Sb 2

จากการทดสอบความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่มีต่อการสร้างสารของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl 1, 2, 3, 4 และ 5 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ในสภาวะที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ เชื้อสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับผลการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ในขณะที่เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากขึ้น เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้นมากขึ้น พบว่า สายพันธุ์ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1 และ Sb 2

สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ลดลง ยกเว้น *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ที่สามารถเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้คงเดิมเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีเกลือ 1-4 เปอร์เซ็นต์ (51200 Au/ml) และการสร้างสารแบคทีเรียโอซินลดลง (12800 Au/ml) เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีเกลือความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 23

ตารางที่ 23 ผลการศึกษาความเข้มข้นของเกลือ NaCl ที่มีต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, และ Sb 2

Treatment	Antibacterial activity (Au/ml)			
	D 4	P 1	P 2	Sb 2
control	51200	3200	51200	3200
NaCl 1%	25600	6400	51200	3200
2%	6400	6400	51200	1600
3%	3200	3200	51200	1600
4%	1600	800	51200	1600
5%	1600	400	12800	800

1.3 การศึกษาความเข้มข้นของ Bile salts ที่มีต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, และ Sb 2

จากการศึกษาความเข้มข้นของ Bile salts ที่มีต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. salivarius* D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, และ Sb 2 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มี Bile salts ความเข้มข้น 0.3, 0.6 และ 0.9 เปอร์เซ็นต์ พบว่า เชื้อ *Lb. salivarius* D 4 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้เมื่อสัมผัสกับ Bile salts ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบโดยมีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 400 Au/ml ส่วนเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1 และ Sb 2 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้เมื่อสัมผัสกับ Bile salt ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์ แต่สามารถสร้างได้น้อยเพียง 200 Au/ml เท่านั้น และไม่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้เมื่อสัมผัสกับ Bile salts ความเข้มข้นสูงขึ้น ในขณะที่เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ไม่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้เมื่อสัมผัสกับ Bile salts ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 24

ตารางที่ 24 ผลศึกษาความเข้มข้นของ Bile salts ที่มีต่อการสร้างสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ

Lb. salivarius D 4, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, และ Sb 2

Treatment	Antibacterial activity (Au/ml)			
	D 4	P 1	P 2	Sb 2
control	51200	3200	51200	3200
Bile salts 0.3%	400	200	0	200
0.6%	400	0	0	0
0.9%	400	0	0	0

1.4 ศึกษาคุณสมบัติของเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2 ในการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

จากการศึกษาการต้านทานยาปฏิชีวนะที่ใช้ในคน สัตว์บก และสัตว์น้ำ พบว่า เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความสามารถในการต้านทานยา Gentamycin, Kanamycin, Nalidixic acid, Neomycin, Norfloxacin และ Oxolinic acid เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2 มีความสามารถในการต้านทาน Salfamethoxazole/trimethoprim ในขณะที่ *Lb. salivarius* D 4 ไม่สามารถต้านทานยาดังกล่าว ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 25

Orberg and Sandine. (1985) รายงานว่า *Lc. lactis* subsp. *cremoris* และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* จำนวน 26 สายพันธุ์ สามารถต้านทาน trimethoprim, sulfathiazole, gentamicin, kanamycin, lincomycin, nafcillin, neomycin, nisin, rifampin และ streptomycin ในส่วนของ *Lactococcus lactis* sp. *lactis* Sb 2 ที่ไม่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ampicillins, chloramphenicol, erythromycin และ tetracycline และ De Fabrizio et al. (1994) ได้รายงานว่า *Lactococcus lactis* ไม่สามารถต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ amikacin, ampicillin, 1st generation cephalosporin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, imipenem, oxacillin, penicillin, piperacillin, sulphonamide, tetracycline, trimethoprim/ sulfomethoxazole และ vancomycin นอกจากนี้ Mathur and Singh (2005) รายงานว่า ยาปฏิชีวนะที่ *Lc. lactis* สามารถต้านทานได้น้อย ได้แก่ carbenicillin, ciprofloxacin, dicloxacillin และ norfloxacin

ตารางที่ 25 การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะของ *Lb. salivarius* D 4 และ *Lc.lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2

Antimicrobial agent	Disk content (µg)	Isolates							
		D 4		P 1		P 2		Sb 2	
		Zone diameter (mm)	Acceptable inhibitory	Zone diameter (mm)	Acceptable inhibitory	Zone diameter (mm)	Acceptable inhibitory	Zone diameter (mm)	Acceptable inhibitory
Ampicillins	10	30	S	34	S	36	S	36	S
Chloramphenicol	30	29	S	28	S	35	S	34	S
Cephalothin	30	30	S	30	S	42	S	34	S
Erythromycin	15	25	S	28	S	29	S	28	S
Gentamycin	10	0	R	0	R	0	R	0	R
Kanamycin	30	0	R	0	R	0	R	10	R
Nalidixic acid	30	0	R	0	R	0	R	0	R
Neomycin	30	0	R	0	R	0	R	0	R
Nitrofurantoin	300	19	S	28	S	38	S	18	S
Norfloxacin	10	0	R	0	R	12	R	0	R
Novabincin	5	15	I	14	I	13	I	18	S
Oxolinic acid	2	0	R	0	R	0	R	0	R
Tetracyclin	30	9	R	32	S	12	R	38	S
Sulfamethoxazole/Trimethoprim	25/1.5	20	S	0	R	0	R	0	R
Oxytetracyclin	30	0	R	34	S	35	S	38	S
Penicillin G	10	30	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Amoxycillin	10	30	S	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Streptomycin	10	0	R	ND	ND	ND	ND	ND	ND

S = Susceptible; I = Intermediate; R = Resistant; ND = Non detect เนื่องจากไม่ใช้ยาที่ใช้กับปลา

1.5 ศึกษาการอยู่รอดของเชื้อในกระเพาะและลำไส้จำลอง

1.5.1 การอยู่รอดของเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ผ่านกระเพาะและลำไส้จำลอง

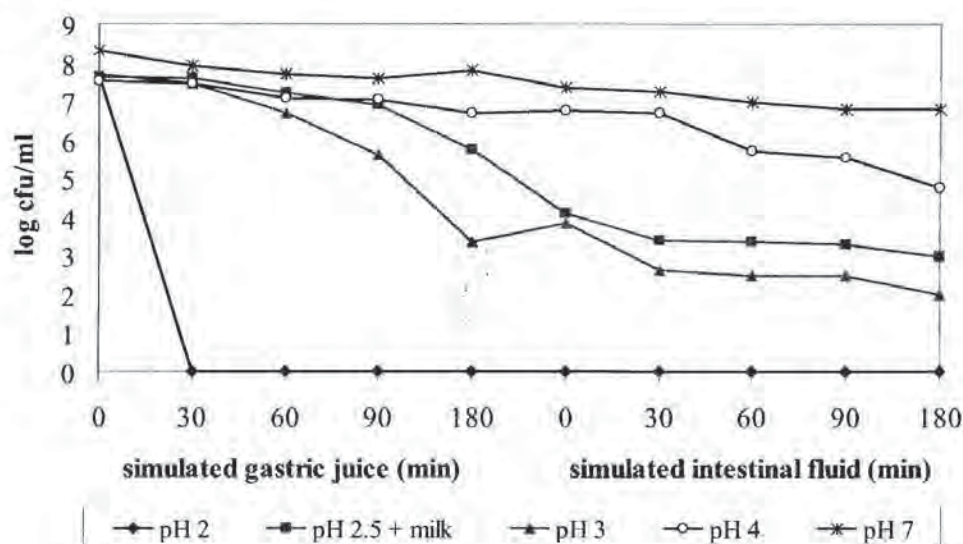
การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ในการมีชีวิตรอดผ่านน้ำย่อยกระเพาะ และน้ำย่อยลำไส้จำลอง ในสภาวะความเป็นกรดที่ต่างกัน ได้แก่ pH 2, 2.5 เดิมนมสด (เนื่องจากว่าที่ pH 2 ซึ่งเป็นค่า pH ในกระเพาะที่ยังไม่มีอาหาร เชื้อส่วนใหญ่ถูกทำลาย แต่การนำไปใช้จริง เชื้อโปรไบโอติกจะถูกเคลือบเซลล์ (encapsulation) เพื่อป้องกันไม่ให้เชื้อถูกทำลายที่กระเพาะ จึงได้ทดลองเพิ่มเติมที่ pH 2.5 แล้วเคลือบเซลล์เบื้องต้นด้วย skim milk), pH 3, 4 และ 7 จากการทดลองพบว่า เมื่อมีเชื้อเริ่มต้น 7 log cfu/ml น้ำย่อยกระเพาะที่มีค่า pH 2 *Lb. salivarius* D 4 ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ จึงไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ในลำไส้ ส่วนน้ำย่อยที่มีค่า pH 2.5 ซึ่งมีส่วนผสมของนมสด พบว่า *Lb. salivarius* D 4 สามารถมีชีวิตรอดได้ 73.56 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะเป็นเวลา 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดได้ 38.38 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยลำไส้เป็นเวลา 180 นาที ในน้ำย่อยที่มีค่า pH 3 *Lb. salivarius* D 4 สามารถมีชีวิตรอดได้ 70.21 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะเป็นเวลา 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดได้ 25.03 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยลำไส้เป็นเวลา 180 นาที ส่วนในน้ำย่อยที่มีค่า pH 4 *Lb. salivarius* D 4 สามารถมีชีวิตรอดได้ 85.20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะเป็นเวลา 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดได้ 60.84 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยลำไส้เป็นเวลา 180 นาที ในน้ำย่อยที่มีค่า pH 7 *Lb. salivarius* D 4 สามารถมีชีวิตรอดได้ 97.50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะเป็นเวลา 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดได้ 84.89 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยลำไส้เป็นเวลา 180 นาที ในน้ำย่อยกระเพาะที่มีค่า pH 2.5, 3, 4, 7 พบว่า *Lb. salivarius* D 4 สามารถมีชีวิตรอดได้จนกระทั่งผ่านไปยังลำไส้ แต่จะมีปริมาณเชื้อลดลงเมื่อระยะเวลาในการสัมผัสน้ำย่อยทั้งในกระเพาะและลำไส้มากขึ้น จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* D 4 แสดงในตารางที่ 26 และภาพที่ 12 ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Lb. salivarius* D 4 แสดงในตารางที่ 27

ตารางที่ 26 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lb. salivarius* D 4 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

pH	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง						จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง				
	(log cfu/ml)						(log cfu/ml)				
	เชื้อเริ่มต้น	เวลา (นาที)					เวลา (นาที)				
		0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	7.7	7.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.5+milk	7.79	7.62	7.60	7.22	6.90	5.73	4.09	3.39	3.35	3.28	2.99
3	7.99	7.72	7.46	6.69	5.61	3.36	3.86	2.63	2.47	2.47	2.00
4	7.84	7.54	7.62	7.06	7.04	6.68	6.76	6.68	5.71	5.52	4.77
7	8.01	8.29	7.93	7.71	7.59	7.81	7.37	7.26	6.98	6.79	6.80

ตารางที่ 27 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

pH	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในกระเพาะจำลอง					เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในลำไส้จำลอง				
	เวลา (นาที)					เวลา (นาที)				
	0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	99.61	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.5+milk	97.82	97.56	92.68	88.58	73.56	52.50	43.52	43.00	42.11	38.38
3	96.62	93.37	83.73	70.21	42.05	48.31	32.92	30.91	30.91	25.03
4	96.17	95.28	90.05	89.80	85.20	86.22	85.20	72.83	70.41	60.84
7	103.50	99.00	96.25	94.76	97.50	92.01	90.64	87.14	84.77	84.89



ภาพที่ 12 การอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลองของเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 เมื่อเลี้ยงในน้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ

1.5.2 การอยู่รอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

จากการศึกษาความทนต่อสภาวะกระเพาะและลำไส้จำลองของ เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1 ที่สภาวะของน้ำย่อยในกระเพาะที่มีค่า pH 2, 3, 4, 7 และ pH 2.5 เติมนมสด ในช่วงเวลา 0, 30, 60, 90 และ 180 นาที และผ่านเข้าสู่ลำไส้จำลอง (pH 8) ที่เวลา 0, 30, 60, 90 และ 180 นาที พบว่า เชื้อสามารถมีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับน้ำย่อยในกระเพาะจำลองที่มีค่า pH 2 ได้นาน 180 นาที แต่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ในลำไส้จำลอง ที่น้ำย่อยในกระเพาะ pH 2.5 และมีการเติมนมสดลงไป สามารถช่วยให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้น โดยเชื้อมีชีวิตรอดผ่านกระเพาะไปยังลำไส้ที่เวลา 90 นาที โดยมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดเพียง 3.62 log cfu/ml เท่านั้น ส่วนที่น้ำย่อย pH 3 เชื้อสามารถเจริญผ่านกระเพาะเป็นเวลา 180 นาที แต่ไม่สามารถเจริญในลำไส้ และสำหรับน้ำย่อยในกระเพาะที่ค่า pH 4 และ 7 นั้น เชื้อสามารถอยู่รอดผ่านกระเพาะไปจนถึงลำไส้ได้ โดย

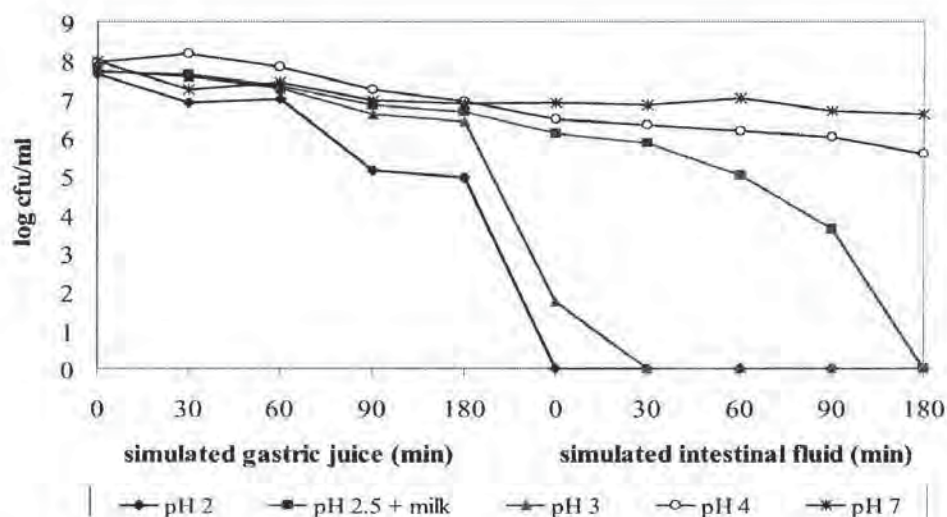
มีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดที่เวลา 180 นาทีในลำไส้เท่ากับ 5.57 และ 6.59 ตามลำดับ (ตารางที่ 28 และภาพที่ 13)

ตารางที่ 28 แสดงจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

pH	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง						จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง				
	(log cfu/ml)						(log cfu/ml)				
	เชื้อเริ่มต้น	เวลา (นาที)					เวลา (นาที)				
		0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	7.85	7.65	6.90	6.98	5.13	4.95	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.5+milk	7.80	7.71	7.65	7.32	6.84	6.65	6.09	5.83	5.02	3.62	0.00
3	7.88	7.88	7.73	7.59	7.27	6.60	6.41	1.72	0.00	0.00	0.00
4	8.18	7.96	8.15	7.81	7.23	6.94	6.46	6.30	6.17	6.01	5.57
7	7.57	7.99	7.24	7.42	6.97	6.88	6.91	6.84	7.03	6.67	6.59

ตารางที่ 29 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Lc. lactis* ssp. *lactis* P 1 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

pH	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในกระเพาะจำลอง					เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในลำไส้จำลอง				
	เวลา (นาที)					เวลา (นาที)				
	0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	97.45	87.98	88.95	65.42	63.08	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.5+milk	98.85	98.04	93.76	87.65	85.22	78.09	74.75	64.29	46.39	0.00
3	98.10	96.32	92.22	83.68	81.35	21.78	0.00	0.00	0.00	0.00
4	97.35	99.63	95.52	88.35	84.80	79.01	77.02	75.47	73.43	68.13
7	105.55	95.68	98.06	92.03	90.89	91.28	90.40	92.82	88.07	87.10



ภาพที่ 13 การอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลองของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *Lactis* P 1 เมื่อเลี้ยงในน้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ

1.5.3 การอยู่รอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

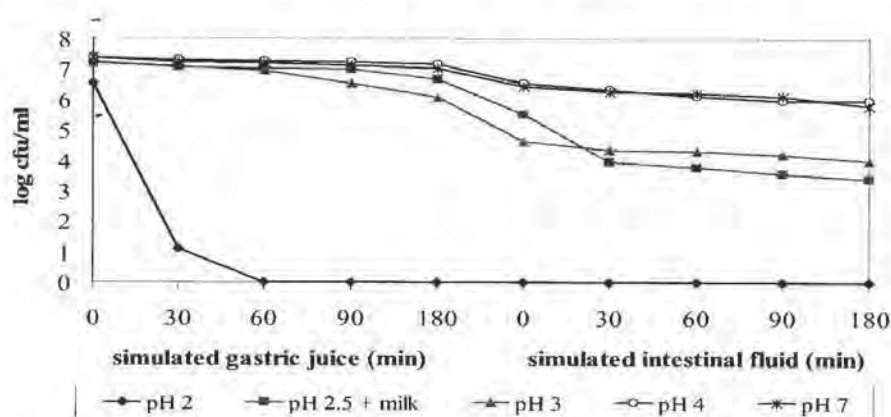
การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ในการมีชีวิตรอดผ่านน้ำย่อยกระเพาะ และน้ำย่อยลำไส้จำลอง ในสภาวะความเป็นกรดที่ต่างกัน ได้แก่ pH 2, pH 2.5 ที่มีส่วนผสมของนมสด pH 3, 4 และ 7 จากการทดลองพบว่า เมื่อมีเชื้อเริ่มต้น 7 log cfu/ml น้ำย่อยกระเพาะที่มีค่า pH 2 *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ไม่สามารถมีชีวิตรอดได้ จึงไม่สามารถมีชีวิตรอดไปยังลำไส้ ส่วนน้ำย่อยที่มีค่า pH 2.5 และมีส่วนผสมของนมสด พบว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 สามารถมีชีวิตรอดได้ 91.12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะเป็นเวลา 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดได้ 46.45 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยลำไส้เป็นเวลา 180 นาที ในน้ำย่อยที่มีค่า pH 3 *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 สามารถมีชีวิตรอดได้ 82.25 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะเป็นเวลา 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดได้ 54.20 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยลำไส้เป็นเวลา 180 นาที ส่วนในน้ำย่อยที่มีค่า pH 4 เชื้อสามารถมีชีวิตรอดได้ 93.12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะเป็นเวลา 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดได้ 78.01 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยลำไส้เป็นเวลา 180 นาที ในน้ำย่อยที่มีค่า pH 7 *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 สามารถมีชีวิตรอดได้ 92.26 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยกระเพาะเป็นเวลา 180 นาที และสามารถมีชีวิตรอดได้ 78.48 เปอร์เซ็นต์ เมื่อสัมผัสน้ำย่อยลำไส้เป็นเวลา 180 นาที จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 แสดงในตารางที่ 19 และภาพที่ 8 ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 แสดงในตารางที่ 31

ตารางที่ 30 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

pH	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง						จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง				
	เชื้อเริ่มต้น	(log cfu/ml)					(log cfu/ml)				
		เวลา (นาที)					เวลา (นาที)				
		0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	7.43	6.52	1.09	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.5+milk	7.32	7.22	7.06	7.03	6.99	6.67	5.50	3.96	3.76	3.56	3.40
3	7.38	7.20	7.09	6.94	6.53	6.07	4.63	4.35	4.29	4.20	4.00
4	7.64	7.35	7.30	7.27	7.24	7.16	6.51	6.32	6.08	5.97	5.96
7	7.62	7.37	7.23	7.18	7.13	7.03	6.42	6.25	6.19	6.11	5.79

ตารางที่ 31 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

pH	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในกระเพาะจำลอง					เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในลำไส้จำลอง				
	เวลา (นาที)					เวลา (นาที)				
	0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	87.75	14.67	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
2.5+milk	98.63	96.45	96.04	95.49	91.12	75.14	54.10	51.37	48.63	46.45
3	97.56	96.07	94.04	88.48	82.25	62.34	58.94	58.13	56.91	54.20
4	96.2	95.55	95.16	94.76	93.12	85.21	82.72	79.58	78.14	78.01
7	96.72	94.88	94.23	93.57	92.26	84.25	82.02	81.23	80.18	78.48



ภาพที่ 14 การอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลองของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 เมื่อเลี้ยงใน
น้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ

1.5.4 การอยู่รอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

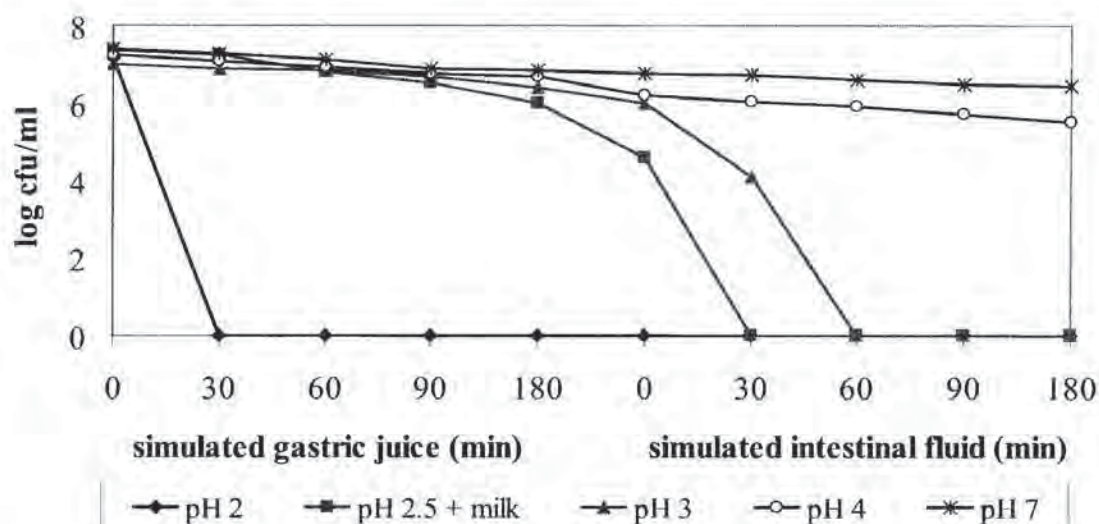
เมื่อนำ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกระเพาะและลำไส้จำลอง โดยใช้ลำไส้จำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างต่างๆ เท่ากับ 2, 3, 4 และ 7 ผลปรากฏว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ไม่สามารถมีชีวิตรอดในลำไส้จำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2 แต่เมื่อนำ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ทดสอบกับลำไส้จำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2.5 และ 3 ผลปรากฏว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าในลำไส้จำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2 และ 3 โดยสามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลองนาน 180 นาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.00 และ 6.38 log cfu/ml ตามลำดับ หลังจากนั้น พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท Sb 2 มีชีวิตรอดลดลงในลำไส้จำลอง จนกระทั่งมีค่าเท่ากับ 0 เมื่อเวลาผ่านไป 30 และ 60 นาทีตามลำดับ และเมื่อนำ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 มาทดสอบกับลำไส้จำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4 และ 7 ผลปรากฏว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานกว่าการทดสอบการมีชีวิตรอดในลำไส้จำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2.5 และ 3 โดยสามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะจำลองนาน 180 นาที ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.67 และ 6.83 log cfu/ml ตามลำดับ และหลังจากนั้นพบว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง เมื่อเวลาผ่านไปนาน 180 นาที โดยจำนวนเชื้อมีค่าลดลงเท่ากับ 5.52 และ 6.42 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 32 และภาพที่ 15 เมื่อนำ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกระเพาะและลำไส้จำลอง โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิต พบว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 สามารถรอดชีวิตในลำไส้จำลองที่มีค่า pH 7 มากที่สุด โดยมีเชื้อที่รอดชีวิตเท่ากับ 85.49 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ ในลำไส้จำลองที่มีค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 4, 3 และ 2.5 ที่มีส่วนผสมของนมสด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 73.02, 54.37 และ 60.96 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 33

ตารางที่ 32 จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดของ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

pH	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในกระเพาะจำลอง						จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดในลำไส้จำลอง				
	เชื้อเริ่มต้น	(log cfu/ml)					(log cfu/ml)				
		เวลา (นาที)					เวลา (นาที)				
		0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	7.81	7.17	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.5+milk	7.51	7.36	7.22	6.81	6.50	6.00	4.58	0	0	0	0
3	7.56	6.98	6.89	6.84	6.66	6.38	6.01	4.11	0	0	0
4	7.56	7.24	7.06	6.9	6.75	6.67	6.18	6.04	5.91	5.7	5.52
7	7.51	7.4	7.26	7.1	6.89	6.83	6.76	6.71	6.58	6.49	6.42

ตารางที่ 33 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ในกระเพาะและลำไส้จำลอง

pH	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในกระเพาะจำลอง					เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในลำไส้จำลอง				
	เวลา (นาที)					เวลา (นาที)				
	0	30	60	90	180	0	30	60	90	180
2	91.8	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2.5+milk	98	96.14	90.68	86.55	79.89	60.96	0	0	0	0
3	92.32	91.14	90.48	88.1	84.39	79.5	54.37	0	0	0
4	95.77	93.39	91.27	89.29	88.23	81.75	79.89	78.17	75.4	73.02
7	98.54	96.67	94.54	91.74	90.95	90.01	89.35	87.62	86.42	85.49



ภาพที่ 15 การอยู่รอดผ่านกระเพาะและลำไส้จำลองของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 เมื่อเลี้ยงในน้ำย่อยที่มีค่า pH ต่างๆ

ความสามารถในการทนต่อกรดเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก (Vinderola and Reinheimer, 2003) ค่า pH ของน้ำย่อยในกระเพาะอาจจะแตกต่างกันตั้งแต่ 2.0-3.5 ขึ้นอยู่กับระยะเวลาในการกินอาหาร ระยะการเจริญหรือชนิดของสัตว์ pH ภายในกระเพาะอาหารของคนซึ่งมีค่า pH อยู่ระหว่าง 1.0-2.5 (McDowell *et al.* 2007) แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อมีอาหารค่า pH ในกระเพาะอาหารจะเพิ่มขึ้นถึงระดับ pH 3 และอาหารจะใช้เวลาอยู่ในกระเพาะอาหารของมนุษย์นาน 2-4 ชั่วโมง (Erkkilä and Petäjä, 2000) เมื่อไปถึงลำไส้โปรไบโอติกต้องเกาะติดกับ brush border ของ microvilli หรือยึดเกาะกับชั้นเยื่อเมือก (mucus layer) โดยไม่ถูกขับออกจากลำไส้ใหญ่จากการเคลื่อนไหวแบบ peristalsis และสามารถทนต่อกรดที่ถูกหลั่งเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น (Fernández *et al.* 2003) เคลื่อนน้ำดีความเข้มข้นสูงสามารถละลายไขมันของเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว เป็นเหตุให้โปรตีนแทรกที่เยื่อหุ้มเซลล์ (integral membrane protein) แยกออกมา ซึ่งส่งผลให้ส่วนประกอบภายในเซลล์ไหลออกมา และเซลล์ตายไปในที่สุด (Begley *et al.* 2005) Zárate *et al.* (2000) รายงานว่า การย่อยที่ pH 4 ไม่มีผลต่อการอยู่รอดของ propionibacteria ที่ทำการทดสอบ และ *P. acidipropionici* Q4 เท่านั้นที่ไวต่อการย่อยที่ pH 3 และที่ pH 2 จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตลดลงอย่างรวดเร็ว ในระหว่างการทดลองในกระเพาะ แต่อย่างไรก็ตาม Zárate *et al.* (2000) กล่าวว่า การบริโภคโยเกิร์ตและนม จะทำให้ pH ของกระเพาะเพิ่มขึ้นมากกว่า 3.5 ในช่วง 60 นาทีแรก และยังคงสูงกว่า 2.7 หลังจากได้รับอาหารเข้าไป 3 ชั่วโมง นอกจากนี้ Vinderola and Reinheimer (2003) ได้ทำการศึกษาความเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรีย *Lc. lactis* โดยทดสอบความคงทนต่อน้ำย่อยจำลองที่มีการปรับค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2 และ 3 เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลล์เชื้อ พบว่า ในน้ำย่อยจำลองที่ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 2 แบคทีเรีย *Lc. lactis* มีค่าลดลง $3.8 \pm 0.3 \log \text{ cfu/ml}$ ส่วนในน้ำย่อยจำลองที่ค่าความเป็นกรดและด่างเท่ากับ 3 แบคทีเรีย *Lc. lactis* มีค่าลดลงมากกว่า $6.0 \log \text{ cfu/ml}$

1.6 การทดสอบการมีชีวิตระหว่างสายพันธุ์ (compatibility between strains)

1.6.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Spot-on-lawn method

จากตารางที่ 34 เมื่อนำส่วนใสที่ค่าความเป็นกรดค่าประมาณ 4 จากเชื้อ *Lc. lactis* supsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2, *Lb. salivarius* D 4, D8, D9, K4 และ K7, *Pediococcus pentosaceus* 536 มาทดสอบการยับยั้งเชื้อชนิดเดียวกัน เพื่อพิสูจน์ว่าเชื้อแต่ละชนิดสามารถเจริญร่วมกันได้หรือไม่ ผลการทดลองพบว่าส่วนใสที่สร้างจากเชื้อ *Lc. lactis* supsp. *lactis* P 2 และ Sb 2 มีคุณสมบัติในการทำลายเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* 536 ในขณะที่ส่วนใสของเชื้อดังกล่าวไม่สามารถทำลายเชื้อชนิดอื่นได้

ตารางที่ 34 การทดสอบ compatibility ระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่นำมาใช้เป็นกลั่นเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี spot-on-lawn

CFS	เชื้อที่ใช้ทดสอบ (เชื้อที่ถูกทำลาย)								
	P 1	P 2	Sb 2	P536	D 4	D8	D9	K4	K7
P 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P 2	-	-	-	+	-	-	-	-	-
Sb 2	-	-	-	+	-	-	-	-	-
P536	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D8	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K4	-	-	-	-	-	-	-	-	-
K7	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ สายพันธุ์ P 1, P 2, Sb 2 คือ *Lc. lactis* supsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2

สายพันธุ์ D 4, D8, D9, K4, K7 คือ *Lb. salivarius* D 4, D8, D9, K4 และ K7

สายพันธุ์ P536 คือ *Pediococcus pentosaceus* 536

1.6.2. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบโดยวิธี Direct Method

จากตารางที่ 35 พบว่า เชื้อ *Lc. Lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, Sb 2 เมื่อเจริญเติบโตเต็มที่แล้วสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ออกมานอกเซลล์และสามารถยับยั้งเชื้อหลายชนิด ได้แก่ *P. pentosaceus* 536, *Lb. salivarius* D 4, D8, D9, K4 และ K7 โดยเชื้อ *P. pentosaceus* 536 ถูกทำลายมากที่สุด ในขณะที่เชื้อ *P. pentosaceus* 536 ที่เจริญเต็มที่แล้วไม่สามารถทำลายเชื้อชนิดอื่นๆ ที่ทดสอบได้เลย ส่วนเชื้อกลุ่ม *Lb. salivarius* D 4, D8, D9, K4 และ K7 เมื่อเจริญเต็มที่แล้วสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ในการยับยั้งเชื้อในกลุ่ม *Lc. Lactis* subsp. *lactis* ที่ใช้ทดสอบ

ตารางที่ 35 การทดสอบ compatibility ระหว่างสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Direct method

เชื้อที่สร้าง antimicrobial substance	เชื้อที่ใช้ทดสอบ (เชื้อที่ถูกทำลาย)								
	P 1	P 2	Sb 2	P536	D 4	D8	D9	K4	K7
P 1	-	-	-	1.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.3
P 2	-	-	-	1.2	0.3	-	0.3	0.4	0.5
Sb 2	-	-	-	1.0	0.1	-	0.3	0.3	0.2
P536	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D 4	0.1	-	0.1	-	-	-	-	-	-
D8	0.1	0.1	0.1	-	-	-	-	-	-
D9	0.1	0.1	0.1	0.3	-	-	-	-	-
K4	0.3	-	0.2	-	-	-	-	-	-
K7	0.3	-	0.2	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ สายพันธุ์ P 1, P 2, Sb 2 คือ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2 และ Sb 2

สายพันธุ์ D 4, D 8, D 9, K4, K7 คือ *Lb. salivarius* D 4, D 8, D 9, K4 และ K7

สายพันธุ์ P536 คือ *Pediococcus pentosaceus* 536

**การทดลองที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นกล้าเชื้อแบคทีเรียใน
อาหารหมักประเภทเนื้อ**

การทดลองที่ 3 การศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียในอาหารหมักประเภทเนื้อ

1. การทดสอบผลของการใช้ในไตรท์ที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* D4, *Lc. Lactis* subsp. *lactis* P1, P2 และ Sb2 ในแบบจำลองการหมักแหนม (Nham model broth, NMB) (Swetwathana *et al.* 1999)

การทดสอบครั้งนี้ทำการศึกษามีชีวิตของกล้ำเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, Sb 2 และ *Lb. salivarius* D 4 ในการทนต่อสภาวะที่มีโซเดียมไนไตรท์ในแบบจำลองแหนม โดยใช้ความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ 100 ppm โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 ไม่มีการเติมโซเดียมไนไตรท์ลงไปแบบจำลองแหนม (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่ 2 มีการเติมโซเดียมไนไตรท์ลงไปแบบจำลองแหนม ซึ่งทั้งสองกลุ่มนี้จะเกิดกระบวนการหมักถึง 3 วัน ผลการทดลองพบว่ากล้ำเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, Sb 2 และ *Lb. salivarius* D 4 สามารถมีชีวิตรอดในสภาวะแหนมจำลองที่มีโซเดียมไนไตรท์เป็นองค์ประกอบความเข้มข้น 100 ppm ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ทำการศึกษามีจำนวนลดลงเล็กน้อยเมื่อเลี้ยงในสภาวะแหนมจำลองที่มีโซเดียมไนไตรท์เป็นองค์ประกอบ โดยจำนวนกล้ำเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์นี้สามารถมีชีวิตรอดปริมาณใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่มีโซเดียมไนไตรท์เป็นองค์ประกอบ

จากการศึกษามีชีวิตของเชื้อ *Lc. Lactic* subsp. *lactis* P 1 ในแบบจำลองแหนม โดยแบ่งการทดลองเป็นกลุ่ม คือ แบบจำลองที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm ทำการทดลองโดยเติมเชื้อ *Lc. Lactic* subsp. *lactis* P 1 จำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^7 log cfu/ml ลงในแหนมจำลองเพื่อตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตรอด ในวันที่ 1, 2 และ 3 ผลการทดลองพบว่า *Lc. Lactic* subsp. *lactis* P 1 ในกลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm มีจำนวนเชื้อลดลงเล็กน้อยในวันที่ 2 และ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ โดยมีค่าจำนวนเชื้อในวันที่ 2 และ 3 ในกลุ่มควบคุมมีค่าคือ 7.47 และ 6.55 log cfu/ml ตามลำดับ และกลุ่มที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์มีค่า 6.40 และ 6.23 log cfu/ml ตามลำดับ จากผลการทดลองแสดงใน ตารางที่ 36

ตารางที่ 36 แสดงผลของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1

วัน	จำนวนเชื้อ (log cfu/ml)	
	ควบคุม	โซเดียมไนไตรท์
0	7.35 ± 0.28	7.02 ± 0.20
1	7.73 ± 0.27	7.72 ± 0.31
2	7.47 ± 0.21	6.40 ± 0.53
3	6.55 ± 0.51	6.23 ± 0.86

จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ในแบบจำลองແໜ່ນ โดยแบ่งการทดลองเป็นกลุ่ม คือ แบบจำลองที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 100 ppm ทำการทดลองโดยเติมเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 จำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^7 log cfu/ml ลงในແໜ່ນจำลอง เพื่อตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตรอด ในวันที่ 1, 2 และ 3 ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2 ในกลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm มีจำนวนเชื้อลดลงเล็กน้อย ในวันที่ 2 และ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ โดยมีค่าจำนวนเชื้อในวันที่ 2 และ 3 ในกลุ่มควบคุมมีค่าคือ 6.76 และ 6.38 log cfu/ml ตามลำดับ และกลุ่มที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์มีค่า 6.68 และ 5.63 log cfu/ml ตามลำดับจากผลการทดลองแสดงใน ตารางที่ 37

ตารางที่ 37 แสดงผลของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2

วัน	จำนวนเชื้อ (log cfu/ml)	
	ควบคุม	โซเดียมไนไตรท์
0	7.12 ± 0.31	7.09 ± 0.16
1	8.30 ± 0.87	7.84 ± 0.34
2	6.76 ± 0.32	6.68 ± 0.33
3	6.38 ± 0.22	5.63 ± 0.34

จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ในแบบจำลองແໜ່ນ โดยแบ่งการทดลองเป็นกลุ่ม คือ แบบจำลองที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ ความเข้มข้น 100 ppm ทำการทดลองโดยเติมเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 จำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^7 log cfu/ml ลงในແໜ່ນจำลอง เพื่อตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตรอด ในวันที่ 1, 2 และ 3 ผลการทดลองพบว่า *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 ในกลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm มีจำนวนเชื้อลดลงเล็กน้อย ในวันที่ 2 และ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ โดยมีค่าจำนวนเชื้อในวันที่ 2 และ 3 ในกลุ่มควบคุมมีค่าคือ 7.11 และ 6.61 log cfu/ml ตามลำดับ และกลุ่มที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์มีค่า 7.33 และ 6.79 log cfu/ml ตามลำดับจากผลการทดลองแสดงใน ตารางที่ 38

ตารางที่ 38 แสดงผลของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2

วัน	จำนวนเชื้อ (log cfu/ml)	
	ควบคุม	โซเดียมไนไตรท์
0	7.12 ± 0.42	7.34 ± 0.89
1	8.50 ± 0.30	8.42 ± 0.56
2	7.11 ± 0.40	7.33 ± 0.40
3	6.61 ± 0.43	6.79 ± 0.42

จากการศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 ในแบบจำลองแฮมม โดยแบ่งการทดลองเป็นกลุ่ม คือ แบบจำลองที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ (กลุ่มควบคุม) และกลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm ทำการทดลองโดยเติมเชื้อ *Lb. salivarius* D 4 จำนวนเชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^7 log cfu/ml ลงในแฮมจำลอง เพื่อตรวจหาเชื้อที่มีชีวิตรอด ในวันที่ 1, 2 และ 3 ผลการทดลองพบว่า *Lb. salivarius* D 4 ในกลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm มีจำนวนเชื้อลดลงเล็กน้อย ในวันที่ 2 และ 3 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ โดยมีค่าจำนวนเชื้อในวันที่ 2 และ 3 ในกลุ่มควบคุมมีค่าคือ 7.26 และ 6.29 log cfu/ml ตามลำดับ และกลุ่มที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์มีค่า 7.30 และ 6.40 log cfu/ml ตามลำดับจากผลการทดลองแสดงในตารางที่ 39

ตารางที่ 39 แสดงผลของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* D 4

วัน	จำนวนเชื้อ (log cfu/ml)	
	ควบคุม	โซเดียมไนไตรท์
0	7.12 ± 0.10	7.03 ± 0.28
1	8.80 ± 0.50	7.43 ± 1.48
2	7.26 ± 0.27	7.30 ± 1.01
3	6.29 ± 0.749	6.40 ± 0.70

โซเดียมไนไตรท์ที่ใส่ลงในแบบจำลองของแฮมนั้นจะมีผลในการเป็นพิษต่อกลไกเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, Sb 2 และ *Lb. salivarius* D 4 เนื่องจากโซเดียมไนไตรท์ที่ใส่ลงในอาหารหมักนั้นจะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อแบคทีเรียกรดแลกติกที่อยู่ในอาหารหมักคอง ซึ่งจะเกิดการสะสมของโซเดียมไนไตรท์อยู่ภายในเซลล์ นั่นคือโซเดียมไนไตรท์ที่สะสมอยู่จะไปรบกวนกระบวนการ active transport ของ

เซลล์แบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในอาหารหมัก เป็นผลที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกมีชีวิตรอดน้อยลง เพราะโดยการเติมโซเดียมไนไตรท์ปริมาณต่าง ๆ นั้นมีผลต่อเชื้อ *Streptococcus mutans* (Leroy and De Vuyst, 2005) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองในครั้งนี้ โดยกล้าเชื้อ *lactis* subsp. *lactis* P 1 และ P 2 ในกลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ที่มีจำนวนเชื้อมีปริมาณลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่เติมโซเดียมไนไตรท์ ส่วนกล้าเชื้อ *lactis* subsp. *lactis* Sb 2 พบว่าทนต่อโซเดียมไนไตรท์

Kouakou *et al.* (2009) ได้ทำการทดสอบโดยเติมโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 20 ppm และการเติมกล้าเชื้อ *Lb. curvatus* สายพันธุ์ CWBI - B28wt ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีเรียโอซินเพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* โดยมีการตรวจเชื้อที่ระยะเวลาในวันที่ 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป ในกลุ่มที่ไม่มีการเติมโซเดียมไนไตรท์เชื้อ *L. monocytogenes* จะเจริญได้ดีกว่ากลุ่มที่เติมโซเดียมไนไตรท์ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่มีเนื้อสุกรไขมันต่ำมีการเจริญได้ดีกว่ากลุ่มที่มีเนื้อสุกรไขมันสูง ทั้งนี้จะเห็นได้ว่าการเสริมไนไตรท์ในเนื้อสุกรที่มีไขมันสูงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. monocytogenes* ได้ถึง 200 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่มีไขมันต่ำและไม่ใส่โซเดียมไนไตรท์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

Radcliffe *et al.* (2003) รายงานว่า ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมักใส่โซเดียมไนไตรท์เป็นส่วนผสม เพื่อช่วยพัฒนาสีของผลิตภัณฑ์ ช่วยป้องกันการหืนของไขมัน และช่วยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *clostridium* spp. ความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่ใช้ใส่ลงไปไม่ควรเกิน 200 ppm ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก การใช้โซเดียมไนไตรท์เกินที่กำหนดไว้จะทำให้ปฏิกิริยาเคมีแล้วเกิดเป็นสารประกอบไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งได้

Radcliffe *et al.* (2003) รายงานว่า การใช้โซเดียมไนไตรท์ร่วมกับกรดวิตามินซีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Streptococcus mutans* ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง พบว่าสารทั้งสองมีฤทธิ์เสริมกันคือ เมื่อเก็บรักษาเบคอนที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส เชื้อดังกล่าวการรอดชีวิตน้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้โซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว

บุญกร อภิชาติ (2547) รายงานว่า จุลินทรีย์บางชนิด เช่น บางสายพันธุ์ของ *Lactobacilli*, *Pediococci*, *Enterococci* และแบคทีเรียแกรมลบต่างๆ เช่น *Salmonellae* ค่อนข้างทนต่อโซเดียมไนไตรท์ ภายใต้สภาวะไร้อากาศ โซเดียมไนไตรท์จะทำลายเชื้อ *Lb. plantarum* มากขึ้น โซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 150 ppm ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Yersinia enterocolitica* ที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส และ *Bacillus cereus* หรือ *Salmonella* ที่อุณหภูมิ 10 - 20 องศาเซลเซียส

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1, P 2, Sb2 และ *Lb. salivarius* D 4 สามารถมีชีวิตรอดได้ในสภาวะที่มีโซเดียมไนไตรท์ความเข้มข้น 100 ppm เป็นองค์ประกอบใน

แบบจำลองการหมักแหมน โดยมีจำนวนใกล้เคียงกับกลุ่มที่ไม่มีโซเดียมไนไตรต์เป็นองค์ประกอบ แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียกรดแลกติก *Lc. lactis* susp. *lactis* P 1, P 2, Sb 2 และ *Lb. salivarius* D 4 มีคุณสมบัติเบื้องต้นในการนำมาใช้เป็นกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารหมักประเภทเนื้อหมัก

2. ผลการการใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกร่วมกับกระเทียมในการทำลายเชื้อ *Salmonella* sp. ในแบบจำลองการหมักแหมน

2.1 ผลของการใช้กระเทียมที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* D4 และ ค่า pH ในแบบจำลองการหมักแหมน

จากการทดลองผลของการใช้กระเทียมที่มีต่อการเจริญของเชื้อ *Lb. salivarius* D4 และ ค่า pH ในแบบจำลองการหมักแหมน พบว่าการใช้กระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* D4 ช่วยให้เชื้อสามารถเจริญได้ดีในวันที่ 0-1 โดยมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดประมาณ 6 log cfu/ml หลังจากนั้นในวันที่ 2-3 ของกระบวนการหมักเชื้อมีการเจริญลดลง โดยมีจำนวนเชื้อรอดชีวิตประมาณ 5 log cfu/ml ซึ่งสอดคล้องกับค่า pH ที่ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของกระบวนการหมัก หลังจากนั้นพบว่า มีการลดลงของค่า pH เพียงเล็กน้อยจนถึงวันที่ 3 ของกระบวนการหมักและเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแบบจำลองการหมักแหมนที่เดิมเชื้อเพียงอย่างเดียว กับแบบจำลองการหมักแหมนที่เดิมกระเทียมร่วมกับเชื้อ พบว่า แบบจำลองการหมักแหมนที่เดิมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* D4 จะช่วยให้เชื้อเจริญได้ดีกว่า และมีค่า pH ลดลงต่ำกว่าแบบจำลองการหมักแหมนที่เดิมเชื้อเพียงอย่างเดียว ผลการทดลองดังแสดงใน ตารางที่ 40

ตารางที่ 40 การเจริญของ *Lb. salivarius* D4 และ ค่า pH ในแบบจำลองการหมักแหมนที่ทำการหมักเป็นเวลา 3 วัน

NMB	จำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอด (log cfu/ml)				ค่า pH (lactic acid)			
	จำนวนวันในการหมัก				จำนวนวันในการหมัก			
	0	1	2	3	0	1	2	3
D4	6.42	5.62	5.08	4.11	5.63	5.05	4.84	4.61
G + D4	6.66	6.23	5.46	5.03	5.62	4.75	4.70	4.51

หมายเหตุ : D4 หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* D4

G + D4 หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* D4 และกระเทียม 5 %

- pH D4 หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2
- pH G + D4 หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2

2.2 ผลของการใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* D4 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนม

จากการศึกษาการใช้กระเทียม ร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* D4 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนม พบว่า แบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อหรือกระเทียมเพียงอย่างเดียว จะส่งผลให้มีจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ลดลงเพียงเล็กน้อย ในขณะที่แบบจำลองการหมักเหนมที่มีการเติมกระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lb. salivarius* D4 ทำให้มีค่า pH ลดลงอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการหมัก ซึ่งส่งผลให้การลดลงของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 อย่างรวดเร็วและตรวจไม่พบเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในวันที่ 3 ของกระบวนการหมัก ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 41

ตารางที่ 41 ผลของการใช้กระเทียม ร่วมกับ *Lb. salivarius* D4 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักเหนม

NMB	จำนวน <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292 (log cfu/ml)				ค่า pH (lactic acid)			
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
S	7.27	8.28	7.67	7.29	5.80	4.32	4.10	3.94
D4 + S	7.49	8.8	6.68	5.37	5.72	4.19	4.04	3.87
G + S	7.19	7.45	6.84	5.76	5.72	4.41	3.99	3.98
G+ D4 + S	7.20	4.64	3.62	0.00	5.65	4.69	4.52	4.50

- หมายเหตุ : S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292
- D4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* D4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292
- G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + D4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lb. salivarius* D4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

2.3 ผลของการใช้กระเทียมที่มีผลต่อการเจริญของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 และค่า pH ในแบบจำลองการหมักเหนม

ผลของการใช้กระเทียมต่อการเจริญของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 พบว่าการเติมกระเทียมในแบบจำลองการหมักเหนมมีผลทำให้เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 เจริญได้ดีกว่าแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 และพบว่าแบบจำลองการหมักเหนมที่มีการเติมกระเทียมลงไปนั้นส่งผลให้เชื้อเจริญได้เพิ่มขึ้นในวันที่ 0-1 ของกระบวนการหมัก หลังจากนั้นในวันที่ 2-3 ของกระบวนการหมักพบว่าเชื้อมีการเจริญลดลงโดยมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตรอดประมาณ $6 \log \text{ cfu/ml}$ ซึ่งสอดคล้องค่า pH ของแบบจำลองการหมักเหนมที่พบว่า แบบจำลองการหมักเหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อนั้น ส่งผลให้ค่า pH ลดลงอย่างรวดเร็วในวันที่ 1 ของกระบวนการหมัก หลังจากนั้นในวันที่ 2-3 ของกระบวนการหมักค่า pH ของแบบจำลองการหมักเหนมลดลงเพียงเล็กน้อย และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อเพียงอย่างเดียวกับแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อพบว่า แบบจำลองการหมักเหนมที่เติมกระเทียมร่วมกับเชื้อจะทำให้เชื้อเจริญได้ดีกว่า และส่งผลให้มีค่า pH ต่ำกว่าแบบจำลองการหมักเหนมที่เติมเชื้อเพียงอย่างเดียว ข้อมูลแสดงในตารางที่ 42

ตารางที่ 42 การเจริญของ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 และค่า pH ในแบบจำลองการหมักเหนมที่ทำการหมักเป็นเวลา 3 วัน

NMB	จำนวนเชื้อ <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> P2 ที่มีชีวิตรอด ($\log \text{ cfu/ml}$)				ค่า pH (lactic acid)			
	จำนวนวันในการหมัก				จำนวนวันในการหมัก			
	0	1	2	3	0	1	2	3
P2	7.53	7.35	6.47	6.03	5.89	3.92	3.84	3.57
G + P2	7.61	7.89	6.56	6.32	5.63	3.89	3.81	3.44

หมายเหตุ : P2 หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2

G + P2 หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 และกระเทียม 5 %

จากผลการทดลองดังกล่าวข้างต้น พบว่า สอดคล้องกับการทดลองของ พรพิมล เทียนทอง. (2548) ที่พบว่า แบบจำลองการหมักแหมนที่มีการเติมกระเทียมจะมีการเจริญของกล้าเชื้อในช่วงเวลาของการหมักแหมน 9 ชั่วโมง มากกว่าแบบจำลองการหมักแหมนที่ไม่เติมกระเทียม มีผลทำให้ในช่วงเวลาการหมักแหมน 48 ชั่วโมง มีค่า pH ต่ำลงกว่า แบบจำลองการหมักแหมนที่ไม่มีการเติมกระเทียม ทั้งนี้เนื่องจาก ในกระเทียมมีสารที่จำเป็นต่อการเจริญ และสร้างกรดแลกติก เช่น แอมงานีส เป็นต้น (Swetwivathana *et al.* 1999) นอกจากนี้เชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งเป็นกลุ่มที่เจริญโดยไม่ต้องการออกซิเจน และมีรายงานว่า หน่อสาร allicin ที่พบมากในกระเทียม (อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2542 อ้างโดย พรพิมล เทียนทอง. 2548) จึงทำให้เชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้

2.4. ผลของการใช้กระเทียมร่วมกับ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 ที่มีต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักแหมน

ผลของการใช้กระเทียมและไม่ใช้กระเทียมร่วมกับเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 ต่อการยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักแหมน พบว่าการใส่เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 เพียงอย่างเดียว และใส่เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 ร่วมกับกระเทียมสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 อย่างสมบูรณ์ในวันที่ 1, 2 และ 3 ของการหมักแหมน ในขณะเดียวกันพบว่าค่า pH ของกระบวนการหมักลดลงอย่างต่อเนื่อง ส่วนการใส่กระเทียมเพียงอย่างเดียวมีผลต่อการลดลงของเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 เพียงเล็กน้อย แสดงในตารางที่ 43 และภาพที่ 23

ตารางที่ 43 ผลของการใช้กระเทียมร่วมกับ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 ที่มีผลต่อการเจริญของ *S. Typhimurium* TISTR 292 ในแบบจำลองการหมักแหมน

NMB	จำนวน <i>S. Typhimurium</i> TISTR 292				ค่า pH (lactic acid)			
	(log cfu/ml)							
	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 0	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3
S	7.56	8.51	8.67	6.76	5.82	4.19	3.95	3.69
P2 + S	7.19	0	0	0	5.95	3.89	3.83	3.56
G + S	7.19	9.13	8.71	7.78	5.88	4.07	3.85	3.6
G + P2 + S	7.32	0	0	0	5.86	4.02	3.94	3.65

สรุปผลการทดลอง

1. สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแบคทีเรียที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินจากแหล่งต่างๆ ได้ 4 สายพันธุ์ *Lb. salivarius* D 4 แยกได้จากลำไส้เป็ดสร้างแบคทีเรียโอซิน $abp118\beta$, *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1 และ P 2 แยกได้จากลำไส้ปลาสร้อยสร้างแบคทีเรียโอซิน nizin Z และ *Lc. lactis* subsp. *lactis* Sb 2 แยกได้จากลำไส้ปลากะพงสร้างแบคทีเรียโอซิน nizin A

2. เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติเบื้องต้นเป็นโปรไบโอติก คือสามารถมีชีวิตรอดและสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ในสภาวะที่เป็นกรด pH 3 สภาวะที่มี NaCl 5 % และสภาวะที่มีน้ำดี นอกจากนี้เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ยังสามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะลำไส้จำลองที่ค่า pH 2 และ 3

3. ในการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นกล้ำเชื้อ พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มีคุณสมบัติของการเป็นกล้ำเชื้อ คือมีชีวิตรอดในสภาวะที่มีไนโตรเจน และมีชีวิตรอดในแฮมจำลอง นอกจากนี้ในการศึกษา *In Vitro* พบว่า เมื่อเติมเชื้อดังกล่าวในสภาวะการหมักแฮมสามารถทำลายเชื้อ *Salmonella* ได้ และประสิทธิภาพในการทำลายเชื้อ มีมากขึ้นเมื่อใช้เชื้อดังกล่าวร่วมกับกระเทียมในสภาวะการหมักแฮม

ข้อเสนอแนะ

ในการศึกษาคุณสมบัติการเป็นกล้ำเชื่อนั้น ยังมีคุณสมบัติบางประการที่ควรศึกษาเพิ่มเติมได้แก่

- 1.) การลดการเกิด biogenic amine ในผลิตภัณฑ์
- 2.) การมีชีวิตรอดของกล้ำเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ โดยมีปริมาณกล้ำเชื้อที่มากพอที่จะทำให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค
- 3.) การพิสูจน์ว่ากล้ำเชื้อโปรไบโอติกที่เติมลงในผลิตภัณฑ์ เมื่อผู้บริโภครับประทานเข้าไปแล้วจะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) ในระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภค
- 4.) การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการนำไปใช้จริงในภาคอุตสาหกรรม เช่น การเคลือบเซลล์ (encapsulation) เพื่อให้เหมาะแก่การนำไปใช้และทำให้เชื้อโปรไบโอติกมีชีวิตรอดมากขึ้น

บรรณานุกรม

- ชนัญญา กงทะสร. 2547. “ผลของแบคทีเรียโอซินร่วมกับกรดแลกติกต่อการลดจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ในเนื้อสุกร.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพมหานคร.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2544. *จุลชีววิทยาทั่วไป*. ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์.
- พงษ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. “แบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในปลาร้า.” วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ภักดี สุขพันธ์. 2548. “การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกผลิตแบคทีเรียโอซินและเจริญได้ดีในสารโพลิโกแซคคาไรด์.” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- สุริยรัตน์ เงินดวง. 2545. “การศึกษาแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท.” กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- อัญญา เพิ่ม. 2550. *แบคทีเรียกรดแลกติก*. ครั้งที่ 1. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. สงขลา.
- อรอนงค์ พริ้งสุลกะ. 2550. *แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติก*. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 23 (2) : 145-160.
- Abee, T. 1995. “Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms.” **FEMS Microbiol. Lett.** 129 : 1-10.
- Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria in Fish and Fish Farming, pp. 1-66. In Salminen, S. and Von Wright, A. (eds). *Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects*. New York : Marcel Dekker.
- Begley, M. Cormac, G.M.G. and Hill, C. 2005. “The interaction between bacteria and bile.” **FEMS Microbiol. Rev.** 29 : 625-651.
- Bojana, B.M. and R. Irena. 1998. “Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221-production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009.” **Process Biochem.** 33 : 345-352.
- Campos, C.A., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barrois-Velázquez, J. 2006. “Preliminary characterization of bacteriocin from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*).” **Int. Food Res.** 39 : 356-364.

- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. 1999. "Food fermentations : role of microorganism in food product and preservation." **Int. J. Food. Microbiol.** 50 : 131-149.
- Ennahar, S. Sashihara, T. Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. "Investigation of bacteriocin production and purification from Nukadoko isolates displaying antimicrobial activity." **Japanese Journal of Lactic Acid Bacteria.** 10 : 29-36.
- Ennahar, S., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1999. "Class IIa bacteriocins from Food Preservation," **J. Biosci. Bioeng.** 6 : 705-716.
- Erkkilä, S. and Petäjä, E. 2000. "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use." **Meat Sci.** 55 : 297-300.
- Ennahar, S., Sashihara, T. Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. "Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity." **FEMS Microbiol. Rev.** 24 : 85-106.
- Fernández, M.F., Boris, S. and Barbés, C. 2003. "Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract." **J. Appl. Microbiol.** 94 : 449-445.
- Flynn, S., Van Sinderen, D., Thornton, G. M., Holo, H., Nes, I.F. and Collins, J.K. 2002. "Characterization of the genetic locus responsible for the production of ABP-118, a novel bacteriocin produced by the probiotic bacterium *Lactobacillus salivarius* subsp. *salivarius* UCC118." **Microbiol.** 148 : 973-984.
- Franz, C.M.A.P., Du Toit, M., Olasupo, N.A., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1998. "Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad." **Lett. Appl. Microbiol.** 26 : 231-235.
- Gatesoupe, F.J. 1999. "The use of probiotics in aquaculture." **Aquaculture.** 180 : 147-165.
- Gu, R.X., Yang, Z.Q., Li, Z.H., Chen, S.L. and Luo, Z. L. 2008. "Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from stool samples of longevous people in regions of Hotan, Xinjiang and Bama, Guangxi, China." **Anaerobe.** 14 : 313-317.
- Kanokratana, P., Chanapan, S., Pootanakit, K. and Eurwililaichitr, L. 2004. "Diversity and abundance of bacteria and archaea in the Bor Khlueng hot spring in Thailand." **J. Basic Microbiol.** 44 : 430-444.
- Klaenhammer, T.R. 1993. "Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." **FEMS Microbiol. Rev.** 12 : 39-85.

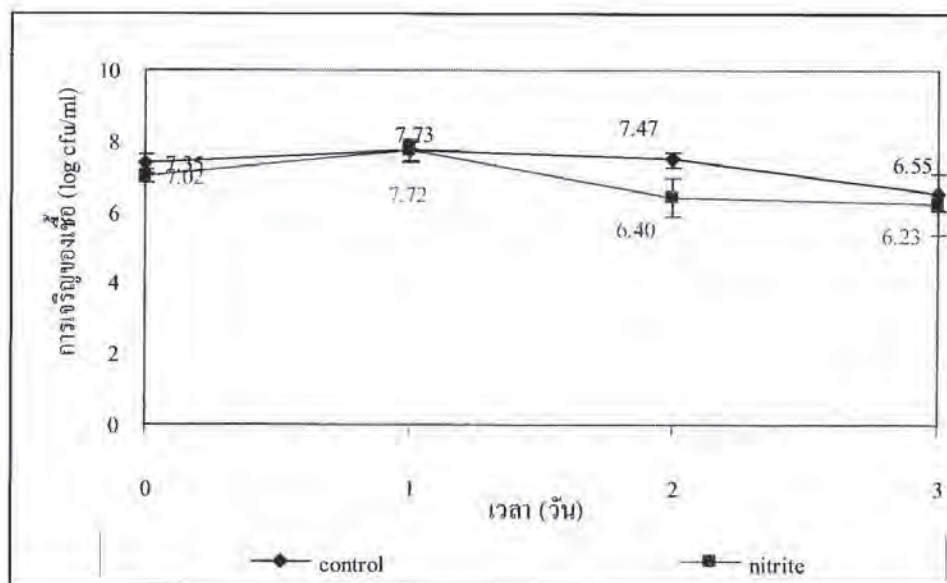
- Klaenhammer, T.R. 1998. "Bacteriocin of lactic acid bacteria." **Biochem.** 70 : 337-349
- Kouakou, P., H. Ghalfi, J. Destain, R.D. Dauphin, P. Evrard and P. Thonart. 2009. Effects of curing sodium nitrite additive and natural meat fat on growth control of *Listeria monocytogenes* by the bacteriocin-producing *Lactobacillus curvatus* strain CWBI-B28. **Food Microbiol.** 26 : 623-628.
- Krier, F., Revol-Junelles, A.M. and Germain, P. 1998. "Influence of temperature and pH on Production of two bacteriocins by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 during batch fermentation." **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 50 : 359-363.
- Leroy, F., J. Verluyten and L.De Vuyst. 2005. Functional meat starter cultures for improved sausage fermentation. **Food Microbiol.** 106 : 270-285.
- Mathur, S. and Singh, R. 2005. "Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria-a review." **Int. J. Food Microbiol.** 105 : 281-295.
- Muyanja, C.M.B.K., Narvhus, J.A., Treimo, J. and Langsrud, T. 2002. "Isolation, characterization and identification of lactic acid bacteria from busherra: a Ugandan traditional fermented beverage." **Int. J. Food Microbiol.** 80 : 201-210.
- NCCLS. 2002. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals. 2nd. Wayne. United State of America.
- Orberg, P.K. and Sandine, W.E. 1985. "Survey of antimicrobial resistance in lactic streptococci." **Appl. Environ. Microbiol.** 49 : 538-542.
- Pilasombut, K. 2006. "Purification and characterization of bacteriocins by *Lactobacillus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine." Ph.D. Thesis, Kasetsart University, Bangkok. Thailand.
- Pilasombut, K., Wajjwalku, W., Nitisinprasert, S., Swetwiwathana, A., Zendo, T., Fujita, K., Nakayama, J., Sonomoto, K. and Sakpuaram, T. 2006a. "Screening and characterization of bacteriocin producing lactic acid bacteria isolated from chicken intestine." **Kasetsart J. (Nat. Sci.)** 39 : 612-621.
- Pilasombut, K., Sakpuaram, T., Wajjwalku, Nitisinprasert, S., Swetwiwathana, A., Zendo, T., Fujita, K., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. "Purification and amino acid sequence of a bacteriocin produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine." **Songklanakarin J. Sci. Technol.** 28 (Suppl. 1) : 121-132.

- Quinn, P.J. Carter, M.E. Markey, B.K. and Carter G.R. 1994. **Clinical Veterinary Microbiology**. London WC1W9LB, England.
- Radcliffe, C.E., L. Rebecca, A.S. Blinkhorn and D.B. Drucker. 2003. Effect of sodium nitrite and ascorbic acid on the growth and acid production of *Streptococcus mutans*. *J. Dent.* 31 : 367–370.
- Riley, M.A. and Wertz, J.E. 2002. “Bacteriocin diversity : ecological and evolutionary perspectives.” **Biochimie.** 84 : 357-364.
- Smulders, F.J.M and C.H.J. Woolthuis. 1985. “Microbial decontamination of calf carcasses by lactic acid sprays.” **J. Food Protection.** 48 (10) : 832-837.
- Thongbai, B., Gasaluck P. and Waites, W.M. 2006. “Morphological changes of temperature-and pH-stressed *Salmonella* following exposure to cetylpyridinium chloride and nisin”. **LWT.** :1180–1188.
- Vaughan, A., V.G.H. Eijsink, T.E. O’ Sullivan, K. O’ Hanlon and D. Van Sinderen. 2001. “Analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley.” **J. Appl. Microbiol.** 91 : 131-138.
- Veerawatanayotin, S., A. Jindaprasert, K. Pilasombut, J. Sethakul and A. Swetwiwathana, 2010. “Effect of PA-1, pH and nitrite on *Salmonella* Anatum and *S. Ratchaburi* in simulated Nham (traditional Thai fermented meat sausage) model broth” Paper presented at 56th International Congress of Meat Science and Technology (ICoMST), Korea, Jeju, August 2010. 5 p.
- Vincent, G.H.E., Lars, A., Dzung, B.D., Leiv, S.H., Helge, H. and Ingof, F.N. 2002. “Production of class II bacteriocins by lactic acid bacteria; An example of biological warfare and communication.” **Antonie van Leeuwenhoek.** 81 : 639-654.
- Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. “Lactic acid starter and probiotic bacteria : a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance.” **Food Res. Int.** 36 : 895-904.
- Worobo, R.W., Van Belkum, M.J., Sailer, M., Roy, K.L., Vederas, J.C. and Stiles, M.E. 1995. “A signal peptide secretion-dependent bacteriocin from *Carnobacterium divergens*.” **J. Bacteriol.** 177 : 3143–3149.

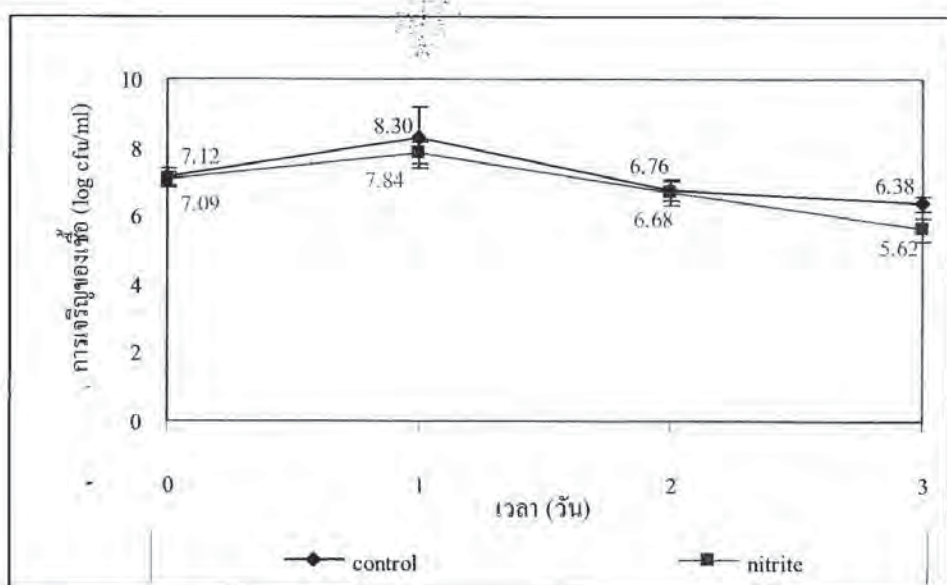
Zárate, G., Chaia, A.P., González, S. and Oliver, G. 2000. "Viability and β -galactosidase activity of dairy propionibacteria subjected to digestion by artificial gastric and intestinal fluids." **J. Food Prot.** 63(9) : 1214-1221.

ภาคผนวก

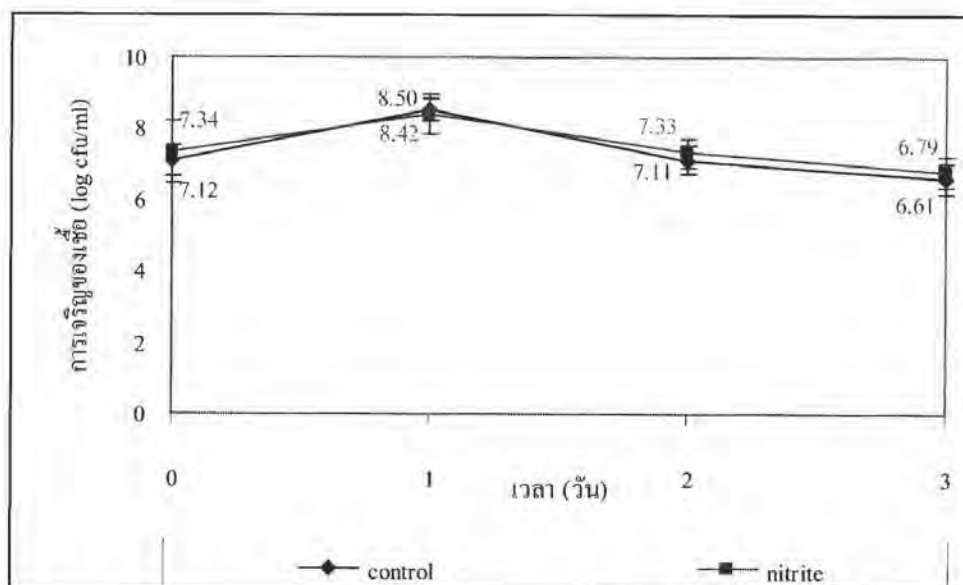
๒๕



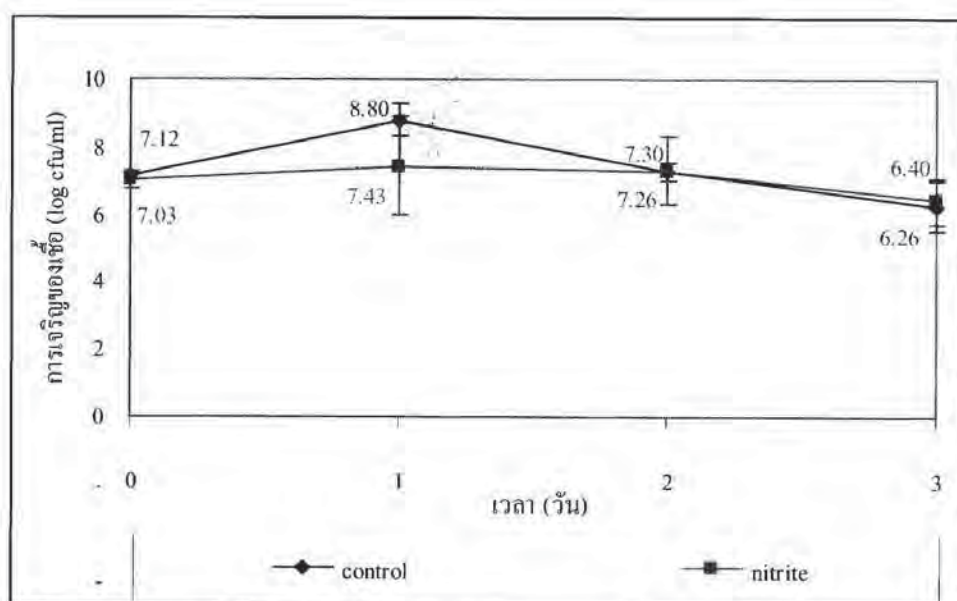
ภาพที่ 16 แสดงผลของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 1



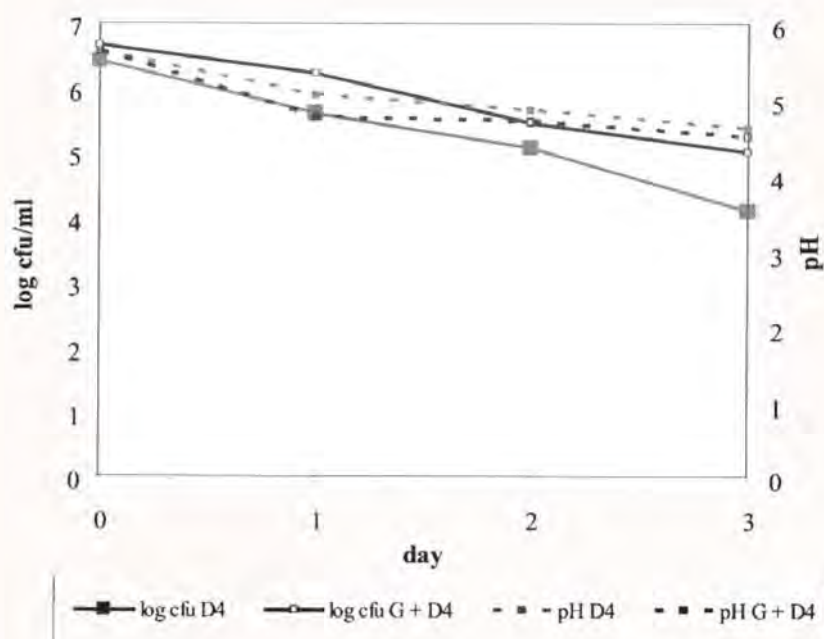
ภาพที่ 17 แสดงผลของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P 2



ภาพที่ 18 แสดงผลของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lc. lactis subsp. lactis* Sb 2



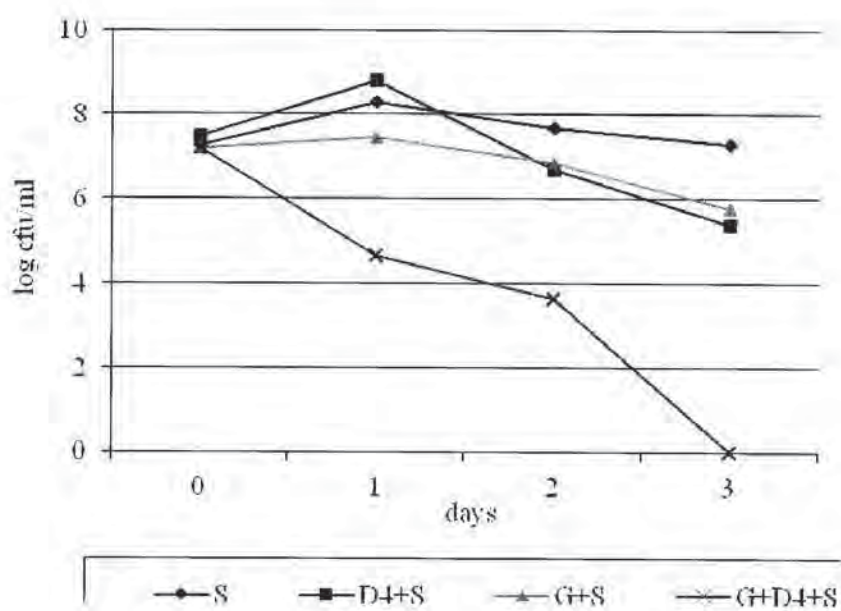
ภาพที่ 19 แสดงผลของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อการมีชีวิตรอดของเชื้อ *Lb. salivarius* D 4



ภาพที่ 20 จำนวนเชื้อ *Lb. salivarius* D4 ในแบบจำลองการหมักแทนนมที่เต็ม และไม่เต็มกระเทียม

หมายเหตุ : log cfu D4 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2

log cfu G + D4 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 ในแบบจำลองการหมักแทนนมที่เต็มกระเทียม



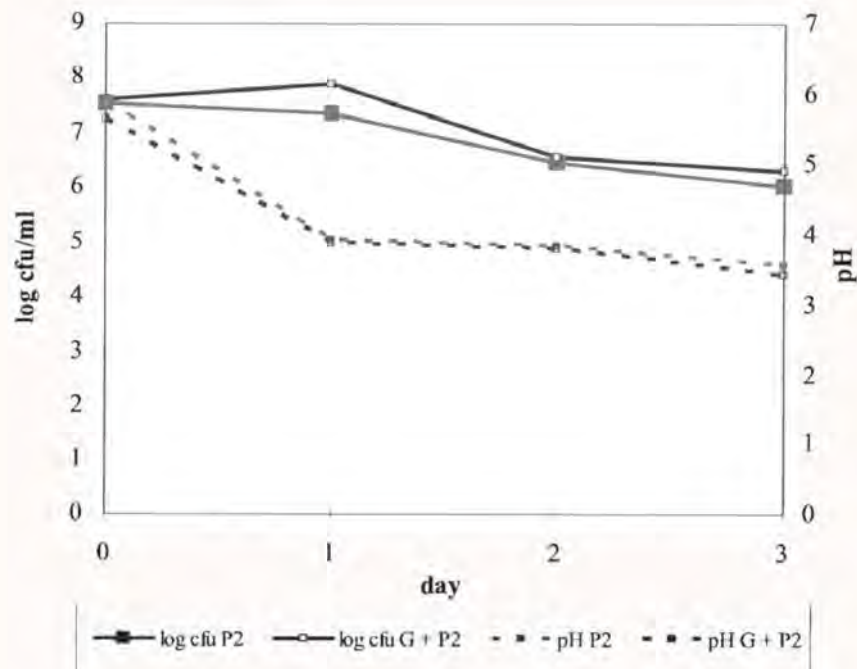
ภาพที่ 21 จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่มีชีวิตรอดในแบบจำลองการหมักแพน

หมายเหตุ : S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

D4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lb. salivarius* D4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + D4 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lb. salivarius* D4 และ *S. Typhimurium* TISTR 292



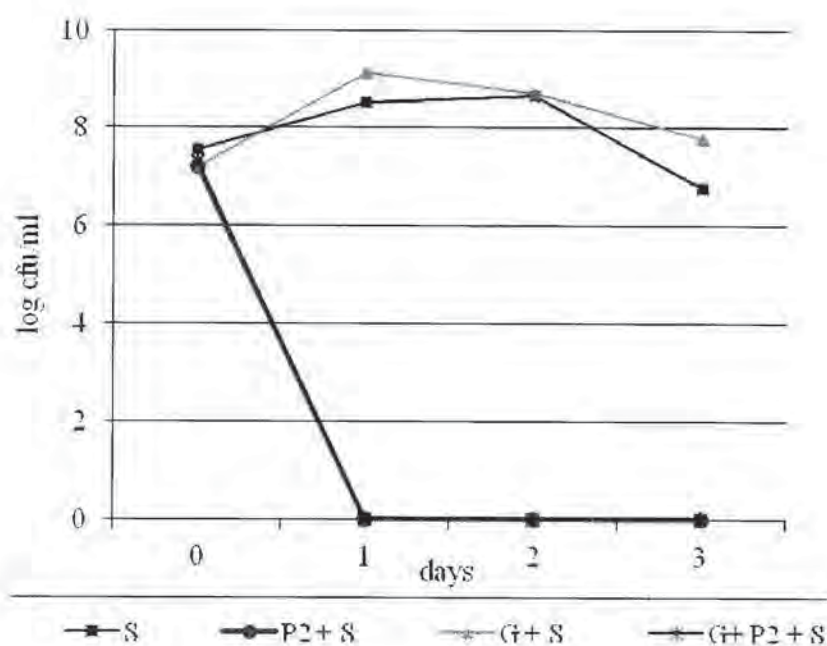
ภาพที่ 22 จำนวนเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 ในแบบจำลองการหมักเหานที่เติม และไม่เติมกระเทียม

หมายเหตุ : log cfu P2 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2

log cfu G + P2 หมายถึง จำนวนเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 ในแบบจำลองการหมักเหานที่เติมกระเทียม

pH P2 หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหานที่เติมเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2

pH G + P2 หมายถึง ปริมาณกรดแลกติกในแบบจำลองการหมักเหานที่เติมเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2



ภาพที่ 23 จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292 ที่มีชีวิตรอดในแบบจำลองการหมักเหนม

หมายเหตุ : S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

P2 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 และ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % และเชื้อ *S. Typhimurium* TISTR 292

G + P2 + S หมายถึง Nham Model Broth ที่มีกระเทียม 5 % ร่วมกับ *Lc. lactis* subsp. *lactis* P2 และ *S. Typhimurium* TISTR 292