การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน
เพื่อใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร

ISOLATION OF BACTERIOCIN PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA FOR EXTENDING THE SHELF LIFE OF FOOD

คณิน อิ่มทองคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน
เพื่อใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร

คณิน อิ่มทองคำ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ปีการศึกษา 2561
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร
	Isolation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria for Extending the Shelf Life of Food
ชื่อ-นามสกุล	นายคณิน อิ่มทองคำ
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา, Ph.D.
ปีการศึกษา	2561

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์, ปร.ด.)

.... กรรมการ

(อาจารย์อัษฎาวุธ อารีย์สิริสุข, Ph.D.)

.... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา, Ph.D.)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อนุมัติวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นิพัทธ์ จงสวัสดิ์, ปร.ด.)

วันที่ 30 เดือน มีนาคม พ.ศ. 2561

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร
ชื่อ-นามสกุล	นายคณิน อิ่มทองคำ
สาขาวิชา	ชีววิทยาประยุกต์
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา, Ph.D.
ปีการศึกษา	2561

บทคัดย่อ

ในปัจจุบันมีการสำรวจภาคอุตสาหกรรมส่วนใหญ่พบว่ามีการนำสารถนอมอาหารทางเคมีเข้ามาใช้ซึ่งอาจจะส่งผลกระทบในระยะยาว ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีแนวคิดและความสนใจที่จะนำแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สามารถย่อยสลายในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้อย่างสมบูรณ์มาเป็นสารถนอมอาหารทดแทน

กระบวนการวิจัยจะเริ่มจากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติค (LAB) จากอาหารพื้นเมืองของไทยและอาหารสดในท้องถิ่น และทำการคัดเลือก LAB จากประสิทธิภาพการผลิตแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเป้าหมาย โดยวิธี agar-well diffusion แล้วนำ LAB ที่ทำการคัดเลือกไว้ทดสอบการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารที่ใช้ในการทดสอบ ได้แก่ เต้าหู้แผ่น ก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่และขนมจีนเส้นสด โดยเติมแบคทีเรียก่อโรคลงในตัวอย่างและทำการตรวจติดตามการเจริญในสภาวะอุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการทดลองพบว่า สามารถคัดแยก LAB ได้ทั้งสิ้น 464 สายพันธุ์ และจากการทดลองให้ผลว่า LAB รหัส L.459 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคเป้าหมายได้ดีที่สุด โดยสามารถชะลอการเน่าเสียของเต้าหู้แผ่นและก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ รวมถึงสายพันธุ์ L.13 สามารถยับยั้งการเน่าเสียในขนมจีนเส้นสด เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งจะยืดอายุการเก็บรักษาได้อย่างน้อย 48 ชั่วโมงของการทดลอง และชุด Positive control จะให้ผลที่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ และเมื่อทำการระบุสายพันธุ์โดย L.459 และ L.13 ใช้ 16S rDNA และนำข้อมูลมาเปรียบเทียบโดย BLAST พบว่ามีความใกล้เคียงทางลำดับพันธุกรรมกับ *Lactobacillus plantarum* เท่ากับ 99%

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติค แบคเทอริโอซิน ยืดอายุการเก็บรักษา อาหาร

Thesis Title	Isolation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria for Extending the Shelf Life of Food
Name-Surname	Mr. Kanin Imtongkhum
Program	Applied Biology
Thesis Advisor	Assistant Professor Chiraporn Ananchaipattana, Ph.D.
Academic Year	2018

ABSTRACT

At present, in the industry sector chemical preservatives are mostly used to preserve food, which may have a long-term negative impact. Therefore, this study aimed to adopt bacteriocin, a substance that inhibits the growth of microorganisms and can be digested in the gastrointestinal tract of human beings as a bio-preservative for food.

The research started with the isolation of Lactic acid bacteria (LAB) from Thai fermented food and local fresh food. LAB was primarily screened and selected from the effectiveness of bacteriocin production using the agar-well diffusion technique. The selected LAB was subsequently used to test for the shelf-life extension of tofu, flat noodles and Thai rice noodles. Four pathogenic bacteria were added to the sample and monitored for growth at room temperature for 72 hours.

The results showed that LAB could be grouped into 464 isolates, LAB Code L.459 had the best ability to inhibit the growth of target pathogenic bacteria and preserve tofu and noodles. Additionally, an L.13 had the best ability to inhibit pathogenic bacteria in Thai rice noodles. When compared to the control samples, the shelf life extended for at least 48 hours. The experiment and positive control were not significantly different. Finally, when identifying strains of L.459 and L.13 by 16S rDNA, and the data were compared by BLAST, it was found to be similar to the genetic sequence of *Lactobacillus plantarum* at 99% identity.

Keywords: lactic acid bacteria, bacteriocin, extending the shelf-life, food

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา อาจารย์ที่ปรึกษาเป็นอย่างสูงที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ ช่วยเหลือเป็นอย่างดียิ่งตลอดจนตรวจสอบแก้ไขรูปเล่มและการทำการทดลองต่างๆในการจัดทำวิทยานิพนธ์ตลอดมาเสมอกระทั่งสำเร็จเรียบร้อยด้วยดี และขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทธิชา ณ ระนอง ธรรมสิทธิรงค์ ประธานการสอบวิทยานิพนธ์และสำหรับการชี้แนะข้อบกพร่องในส่วนการทดลองเสมอมา และ ขอบพระคุณ ดร. อัษฎาวุธ อารีสิริสุข ที่ได้สละเวลาในการเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และข้อเสนอแนะเพื่อแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ของข้าพเจ้า รวมถึงคณาจารย์สาขาชีววิทยาทุกท่าน เป็นอย่างสูง

ขอขอบคุณเจ้าของงานวิจัยทุกฉบับที่ข้าพเจ้านำมาใช้ในการประกอบและอ้างอิงในครั้งนี้เป็นอย่างสูง ซึ่งข้าพเจ้าได้รับความรู้และเปิดโลกทัศน์ในการทำวิจัยเป็นอย่างมากและ ขอขอบคุณ พี่ๆ น้องๆ สาขาวิชาชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้คำปรึกษาและกำลังใจมาโดยตลอดการทำวิทยานิพนธ์และ ขอบคุณปัญหาอุปสรรคต่างๆ ที่สอนให้รู้จักการอดทน มานะ และพยายามเพื่อจะให้ผ่านพ้นไปได้ด้วยดี

คณิน อิ่มทองคำ

สารบาญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .... (3)

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .... (4)

กิตติกรรมประกาศ.................... (5)

สารบาญ .... (6)

สารบัญตาราง.................... (9)

สารบัญรูปภาพ.................... (10)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.................... (12)

บทที่ 1 บทนำ 13

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา 13

1.2 วัตถุประสงค์ 14

1.3 สมมติฐานการวิจัย 14

1.4 ขอบเขตของการวิจัย 15

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 16

บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร.................... 17

2.1 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติค.................... 17

2.2 แบคเทอริโอซิน 21

2.3 เชื้อก่อโรคในอาหาร.................... 25

2.4 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมัก.................... 25

2.5 การประยุกต์นำแบคเทอริโอซิน.................... 26

บทที่ 3 วิธีดำเนินการทดลอง.................... 30

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี.................... 30

3.2 วิธีการทดลอง.................... 31

3.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากอาหารหมักดอง.................... 31

3.2.2 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการและระบุสายพันธุ์การหาลำดับทางพันธุกรรม.................... 32

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2.1 ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase test).. 32

3.2.2.2 ทดสอบปฏิกิริยาคะตาเลส (Catalase test).. 32

3.2.2.3 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียการหาลำดับทางพันธุกรรม................. 32

3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้.................... 32

3.2.3.1 การเตรียมแบคเทอริโอซินเพื่อทดสอบจากแบคทีเรีย
กรดแลคติคที่คัดแยกได้………………………………………………… 32

3.2.3.2 การเตรียมจานเพาะเชื้อและการทดสอบด้วยวิธี
Agar well diffusion……………………………………………………... 32

3.2.4 การทดสอบยืนยันคุณสมบัติบางประการของสารละลายที่ปราศจากเซลล์
(cell-free supernatant) ของแบคทีเรียกรดแลคติค……………………………..……. 33

3.2.4.1 การทนต่ออุณหภูมิสูงและจุดเยือกแข็ง……………………………….. 33

3.2.4.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเนส เค (Proteinase K)……………….. 33

3.2.5 การทดสอบความสามารถของ cell-free supernatant ที่คัดเลือกในการยับยั้ง
การเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในสภาวะควบคุม……………………………... 33

3.2.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด cell-free supernatant ที่สามารถยับยั้งการเจริญ
และกำจัดแบคทีเรียก่อโรคบางสายพันธุ์………………………………………… 34

3.2.7 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารสด…………… 34

3.2.7.1 การเตรียมเต้าหู้แผ่นและการนำแบคเทอริโอซินประยุกต์ใช้
ในการเคลือบผิวเต้าหู้แผ่น………………………………………………. 34

3.2.7.2 การเตรียมเส้นก๋วยเตี๋ยว……………………………………….…….. 35

3.2.7.3 การเตรียมขนมจีนเส้นสด……………………………………………… 35

3.2.7.4 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคเพื่อใช้ในการทดสอบ………...…………... 35

3.2.8 การทดสอบทางด้านจุลชีววิทยา…………………………………………...……... 36

3.2.9 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ………………………………………………..………… 36

สารบาญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการทดลอง 37

4.1 ผลการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคจากอาหารหมักดอง.................................... 37

4.2 ผลการทดสอบยืนยันคุณสมบัติบางประการของ cell-free supernatant

ของแบคทีเรียกรดแลคติค... 38

4.3 ผลการทดสอบความสามารถของ cell-free supernatant ที่คัดเลือกในการยับยั้งการเจริญ

ของแบคทีเรียก่อโรคในสภาวะควบคุม... 40

4.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด cell-free supernatant ที่สามารถยับยั้งการเจริญและกำจัด

แบคทีเรียก่อโรคบางสายพันธุ์.. 43

4.5 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารสด.................................. 43

4.6 การระบุสายพันธุ์โดยการหาลำดับทางพันธุกรรม.. 49

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.. 50

บรรณานุกรม 51

ภาคผนวก.. 56

ภาคผนวก ก. 57

ภาคผนวก ข. 63

ภาคผนวก ค. 67

ภาคผนวก ง. 70

ประวัติผู้เขียน.. 100

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางภาคผนวก

ตารางที่ 1 ตัวอย่างอาหารหมักดองและอาหารสดที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติค
เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซิน.. 67

ตารางที่ 2 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก
จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) ……………………………..…… 71

สารบัญรูปภาพ

หน้า

รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบยืนยันคุณสมบัติความเป็นโปรตีน โดยการเติมเอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (P+) และชุดควบคุม (P-) เมื่อทดสอบกับ CFS จาก *Lactococcus lactis* (Pos), *Lactobacillus plantarum* L.175 (L. 459) และ *Lb. plantarum* L.180 (L. 464) โดยใช้แบคทีเรียก่อโรคเป็นดัชนีชี้วัดได้แก่ *Y. enterocolitica* (ก.) *B. cereus* (ข.) *S. aureus* (ค.) และ *Cr. sakazakii*(ง.)..... 37

รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบความทนต่ออุณหภูมิสูง (95 องศาเซลเซียส) ระยะเวลา 10 นาที (1), 15 นาที (2), 20 นาที (3) และ 30 นาที (4) และอุณหภูมิเยือกแข็ง (0 องศาเซลเซียส) ระยะเวลา 7 วัน (F) เมื่อทดสอบกับ CFS จาก *Lc. lactis* (Pos), *Lb. plantarum* L.175 (L. 459) และ *Lb. plantarum* L. 180 (L. 464)) และ LAB ที่ไม่ให้ผลการยับยั้ง (Neg; ง.)……………………..……… 38

รูปที่ 4.3 การเจริญของ *Bacillus cereus* ในสภาวะควบคุมด้วย 50% CFS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที……………………………………………………………………… 39

รูปที่ 4.4 การเจริญของ *Staphylococcus aureus* ในสภาวะควบคุมด้วย 50% CFS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที……………………………………………… 39

รูปที่ 4.5 การเจริญของ *Cronobacter sakazakii* ในสภาวะควบคุมด้วย 50% CFS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที…………………………………………… 40

รูปที่ 4.6 การเจริญของ *Yersinia enterocolitica* ในสภาวะควบคุมด้วย 50% CFS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที.. 40

รูปที่ 4.7 การเจริญและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *B. cereus* (A), *S. aureus* (B), *Y. enterocolitica* (C) และ *Cr. sakazakii* (D) ในก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ที่เคลือบด้วย CFS จาก *Lb. plantarum* (L. 459) ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมง.. 43

รูปที่ 4.8 การเจริญและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *B. cereus* (A), *S. aureus* (B), *Y. enterocolitica* (C) และ *Cr. sakazakii* (D) ในเต้าหู้แผ่นที่เคลือบด้วย CFS จาก *Lb. plantarum* (L. 459) ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมง.. 44

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

หน้า

รูปที่ 4.9 การเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ก่อโรคและก่อการเน่าเสียภายใต้สภาวะการยับยั้งของ CFS ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติครหัส Lc.13 ที่คัดเลือกไว้ Total plate count (A), *B. cereus* (B), *S. aureus* (C) และ *E. coli* (D) ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการทดลอง............. 45

รูปที่ 4.10 ลักษณะทางกายภาพของก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ในเวลาที่ 0 ชั่วโมง (ก1) และ 72 ชั่วโมง (ก2)……...46

รูปที่ 4.11 ลักษณะทางกายภาพของเต้าหู้แผ่นในเวลาที่ 0 ชั่วโมง (ข1) และ 72 ชั่วโมง (ข2)……….…….. 46

รูปที่ 4.12 ลักษณะทางกายภาพของขนมจีนเส้นสดในเวลาที่ 0 ชั่วโมง (ค1) และ 72 ชั่วโมง (ค2)……..… 47

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ATP	Adenosine triphosphate
Aw	ค่ากิจกรรมน้ำอิสระ
CFU/mL	เซลล์ต่อมิลลิลิตร
FAO	องค์การอาหารและการเกษตรแห่งสหประชาชาติ
FDA	องค์การอาหารและยาแห่งสหรัฐอเมริกา
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
pKa	ค่าความสามารถในการแตกตัวของกรด
pH	ความเป็นกรดหรือด่างของสารละลาย
v/v	อัตราส่วนปริมาตรต่อปริมาตร
w/v	อัตราส่วนน้ำหนักต่อปริมาตร
WHO	องค์การอนามัยโลก

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

อาหารเป็นสิ่งที่มนุษย์ต้องมีการบริโภคเพื่อเป็นแหล่งพลังงานในการดำรงชีวิตประจำวัน โดยที่อาหารในปัจจุบันมีอยู่หลากหลายรูปแบบทั้งที่เป็นวัตถุดิบเพื่อนำไปปรุงอาหารเอง อาหารพร้อมบริโภคที่วางขายในตลาดของท้องถิ่นหรือแม้กระทั่งอาหารที่พร้อมรับประทานที่อยู่ในรูปของอาหารแช่แข็ง ทำให้ผู้บริโภคมีทางเลือกในการบริโภคอาหารมากขึ้นและสิ่งสำคัญประการหนึ่งที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญเป็นอย่างมากคือ ความปลอดภัยทางด้านอาหารซึ่งมีอยู่หลายด้าน เช่น ความปลอดภัยทางกายภาพ ความปลอดภัยทางเคมี และความปลอดภัยทางชีวภาพ หนึ่งในนั้นคือความปลอดภัยทางชีวภาพ หากอาหารที่ผู้บริโภคเลือกซื้อมาเพื่อการบริโภคนั้นมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรคก็จะส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคโดยตรงซึ่งในบางรายอาจจะมีการแสดงอาการหนักถึงขั้นเสียชีวิตได้ ดังนั้นผู้ผลิตจึงเริ่มมีการนำวัตถุกันเสียมาใช้ในการบวนการผลิตอาหาร แต่พบว่าวัตถุกันเสียที่มีความนิยมนำมาใช้จะเป็นวัตถุกันเสียเชิงเคมี เช่น กรดเบนโซอิก ซึ่งหากผู้บริโภคได้รับในปริมาณมากเกินกำหนดหรือได้รับอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานก็จะส่งผลเสียในระยะยาวแก่ผู้บริโภคเอง เช่น คลื่นไส้ อาเจียรและการเกิดมะเร็งที่ตับรวมถึงอวัยวะในระบบทางเดินอาหารเมื่อมีการบริโภคเป็นเวลานาน [1]

จากการศึกษาทางด้านจุลชีววิทยาทางอาหารจากแบคทีเรียที่มีส่วนในการแปรสภาพอาหารพบว่ามีแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและก่อการเน่าเสียได้ซึ่งสารนั้นผลิตได้จากจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ เรียกว่า แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) โดยสามารถผลิตได้จากจุลินทรีย์บางกลุ่มในสภาวะเฉพาะ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติคบางสายพันธุ์ *Bacillus* sp. และ *Actinomyces* sp. เป็นต้น ซึ่งสามารถนำแบคเทอริโอซินมาใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารได้ สามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้ในหลายรูปแบบ เช่น การทำให้บริสุทธิ์หรือกึ่งบริสุทธิ์เพื่อนำไปผสมในอาหารกระป๋อง การตึงให้อยู่ในวัสดุตรึงหรือแม้กระทั่งการประยุกต์ในการทำแผ่นวัสดุห่อหุ้มอาหารที่

ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งเมื่อผู้บริโภครับประทานไปสามารถย่อยสลายในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์เป็นกรดอะมิโนได้อย่างสมบูรณ์ [2] ดังนั้นหากนำแบคเทอริโอซินในรูป cell-free supernatant ที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติคจึงมาประยุกต์ใช้ในการยืดอายุอาหารเป็นอีกทางเลือกที่ใช้สำหรับมาควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและก่อการเน่าเสียในอาหาร ซึ่งจะเป็นการที่ลดความเสียหายทางด้านเศรษฐกิจและเพิ่มความปลอดภัยทางอาหารแก่ผู้บริโภค ซึ่งลดอัตราการเจ็บป่วยอันเนื่องมาจากแบคทีเรียก่อโรคและก่อการเน่าเสียในอาหารได้อีกทางหนึ่ง

1.2 วัตถุประสงค์

1.2.1 เพื่อคัดแยกและคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักดองของไทย

1.2.2 เพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือก

1.2.3 เพื่อทดสอบการนำแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติคมาประยุกต์ใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารสดในสภาวะอุณหภูมิห้อง

1.3 สมมติฐานการวิจัย

อาหารหมักดองพื้นบ้านของไทยและต่างประเทศโดยมากมีการพบแบคทีเรียกรดแลคติค ดังงานวิจัยของ Jiang *et al.* [3] คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินมาจากหัวไช้เท้าดอง ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus* sp. Liu *et al.* [4] คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินมาจากผักดองของจีน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes*, *E. coli* และ *Bacillus subtilis* สำหรับประเทศไทย Pringsulaka *et al.* [5] คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อและปลาหมัก พบว่าสามารถคัดแยก *Weissella* spp. ได้หลายสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ และ Sonsa-Ard *et al.* [6] ทำ

การคัดแยกมาจากผลิตภัณฑ์ปลาร้าของไทย ที่มีความสามารถผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ซึ่งยังมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนสูงได้เป็นระยะเวลานาน โดยที่แบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดแยกและคัดเลือกมานั้นสามารถผลิต แบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและก่อการเน่าเสียได้หลายสายพันธุ์ ซึ่งในประเทศไทยมีอาหารหมักดองที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคอีกหลายชนิด เช่น ผลไม้ดอง วัตถุดิบอาหารดองพื้นบ้านของไทยซึ่งอาจพบสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์ที่มีความเหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน สามารถยืดอายุการเก็บรักษาคุณภาพของอาหารในสภาวะอุณหภูมิห้องได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 ขอบเขตของสถานที่ทำการวิจัย

สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

1.4.2 ขอบเขตของงานวิจัย

1.4.2.1 ขอบเขตการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามามารถผลิตแบคเทอริโอซิน

ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีคุณสมบัติที่สามารถผลิตสารต้านแบคทีเรียจากอาหารหมักดองพื้นบ้านของไทย เช่น ผลไม้ดอง ผักดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักดอง แล้วทำการศึกษาคุณลักษณะของสารต้านแบคทีเรีย

1.4.2.2 ขอบเขตการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มเป้าหมายในตัวอย่างอาหาร

ทำการศึกษาประสิทธิภาพของการควบคุมการเน่าเสียโดยใช้ของแบคเทอริโอซินในรูปสารละลายจากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติคที่ปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant; CFS) ที่ผลิตมาจากแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดแยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักดองต่ออาหารทดสอบ ได้แก่ เส้นก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ เต้าหู้แผ่น และขนมจีนเส้นสด

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 สามารถคัดแยกและคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักดองของไทยได้

1.5.2 ทราบถึงคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือก

1.5.3 สามารถนำแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติคมาประยุกต์ใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารสดในสภาวะอุณหภูมิห้องได้

บทที่ 2
ทบทวนเอกสาร

อาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยสี่สำหรับการดำรงชีพของมนุษย์ โดยตระหนักว่าอาหารมีความสำคัญ ต่อสุขภาพทั้งด้านร่างกาย สมอง และจิตใจ การบริโภคอาหารที่สะอาดและปลอดภัยเป็นประโยชน์ ต่อร่างกาย ในทางตรงกันข้ามหากบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยเชื้อโรคและสารพิษต่างๆ จะส่งผลให้เกิด การเจ็บป่วยพิการและอาจถึงแก่ชีวิตได้ เช่น ท้องร่วง อาเจียน การเกิดอัมพาต เป็นต้น อาหารปรุงสำเร็จเป็นอาหาร ที่คนไทยทุกภูมิภาคนิยมบริโภค เนื่องจากมีความสะดวก ราคาถูก แต่อาหารที่มีขายตามตลาดในทั่วไปไม่ได้อุ่นให้ร้อนอยู่เสมอ จึงทำให้อาหารมีความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคส่งผลให้อาหารเป็นพิษต่อผู้บริโภค

2.1 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติค

แบคทีเรียกรดแลคติคจะผลิตกรดแลคติคซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จากกระบวน การหมักน้ำตาลเฮกโซสแบบ homofermentation และได้กรดอะซิติก เอธานอล และคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักแบบ heterofermentation การสะสมของกรดอินทรีย์ควบคู่กับการลดลงของค่าพีเอชมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ [7] การยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากแบคทีเรียกรดแลคติคจะอาศัยกลไกหรือผลของการผลิต กรดอินทรีย์จากการหมักน้ำตาลซึ่งมีผลให้ค่าพีเอชของอาหารลดลงและสารอาหารลดลงด้วย [8] นอกจากกรดอินทรีย์แล้วยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคสามารถผลิต สารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆได้เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิติล คาร์บอนไดออกไซด์ และ แบคเทอริโอซิน เป็นต้น [9]

2.1.1 สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติค

2.1.1.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid) กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติคจะได้กรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติค และกรดอะซิติก การสะสมของกรดอินทรีย์ส่งผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยอาศัยฤทธิ์ของกรดที่ไม่แตกตัวในกรดอ่อน เนื่องจากกรดอินทรีย์เมื่ออยู่ในรูปที่ไม่

แตกตัวจะละลายในไขมันทำให้สามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เกิดการสะสมทำให้พีเอชภายในเซลล์สูงกว่าภายนอกเซลล์ กรดอินทรีย์ที่สะสมภายในเซลล์จะแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออน (hydrogen ion) เป็นจำนวนมากไฮโดรเจนไอออนจะไปรบกวนกระบวนการเมทาบอลิซึมของเซลล์แบคทีเรีย [10] ความสามารถในการยับยั้ง การเจริญหรือเพิ่มจำนวนต่อเชื้อจุลินทรีย์ของกรดอินทรีย์จะขึ้นอยู่กับค่า pH ของตัวกรดแลคติค และกรดอะซิติกจะมีผลต่อการยับยั้งในวงกว้างรวมทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ และรา [11] แต่ในสภาวะ pH ต่ำ กรดอะซิติกซึ่งมีค่า pKa สูง (pKa = 4.74) จะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดแลคติคที่มีค่า pKa ต่ำ (pKa = 3.85) ทำให้มีฤทธิ์ในการยับยั้งมากกว่ากรดแลคติค [8]

กรดแลคติคสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่เป็นสาเหตุของอาหารเสื่อมเสีย [12] รวมทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษเช่น *Staphylococcus aureus* , *Salmonella* spp., *E. coli* ที่ก่อโรคในลำไส้ รวมถึง *Listeria monocytogenes* ส่วนกรดอะซิติกมีผลต่อการลดจำนวนของ *Salmonella* spp. ในการผลิตเนยแข็งที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 5.4 [11] กรดอะซิติกที่ผลิตโดย *Leuconostoc citrovorum* มีฤทธิ์ในการยับยั้ง Phychrotrophic bacteria และ *Salmonella* spp. [8] นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงฤทธิ์ในการยับยั้ง *Salmonella* Thyphimurium โดยการใช้กรดแลคติคและกรดอะซิติกร่วมกันซึ่งมีประสิทธิภาพสูงกว่าเมื่อใช้เพียงชนิดใดชนิดหนึ่ง [13] เช่น เดียวกับ Adam และ Hall [14] พบว่ากรดแลคติคและกรดอะซิติกสามารถทำงานส่งเสริมกันโดยยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *Salmonella* spp. ได้

2.1.1.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ในสภาพที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลคติคจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) โดยการทำงานของฟลาโวโปรตีนออกซิเดส (flavoprotein oxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) เพื่อกำจัดอิเล็กตรอนส่วนเกินออกจาก NADH โดยปราศจากการสร้าง ATP ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กแบคทีเรีย-กรดแลคติค ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสซึ่งทำหน้าที่สลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและออกซิเจนได้ ดังนั้นจึงพบการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกสร้างขึ้นและมีการปล่อยออกมานอกเซลล์การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไปอาจจะไปยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติคอย่างเช่น Forntaine *et al.* [15] พบว่าจะไม่มีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์เพราะไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถถูกทำลายโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) และซูโดคะตะเลส (pseudocatalase) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดซ์ที่มีฤทธิ์รุนแรงต่อเซลล์ของแบคทีเรียโดยจะออกซิไดซ์

หมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl) ทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีนในเซลล์และมีผลต่อไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์โดยทำให้เกิด peroxidation ของไขมันที่อยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแล้วทำให้ permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์สูงขึ้นความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกจากเยื่อหุ้มเซลล์ของสารต่าง ๆ จึงเสียไป นอกจากนี้ในปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขนส่งออกซิเจนจึงทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่น ไม่สามารถเจริญได้ [15] ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังมีส่วนในการสร้าง superoxide และ hydroxylradicals ที่สามารถทำให้เกิดการทำลายกรดนิวคลีอิก [16] ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์นอกจากจะมีผลต่อเซลล์โดยตรงแล้วยังมีผลในทางอ้อมด้วย เช่น เมื่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกซิไดซ์ไธโอไซยาเนท (thiocyanate) โดยมีเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาจะทำให้เกิดสาร ไฮโปไซยาไนท์ (hypocynite, $OSCN^-$) ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ได้ โดยไฮโปไซยาไนท์จะทำให้โครงสร้างเสียหายและมีผลในการเปลี่ยนแปลงเยื่อหุ้มเซลล์เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า lactoperoxidase antibacterial system กลไกหลักในการยับยั้งจุลินทรีย์คือการขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิส โดยอาจไปยับยั้งขั้นตอนการขนส่งกลูโคส รวมทั้งขัดขวางการทำงานของเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) และกลีเซอราลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) ทำให้เกิดการ ออกซิเดชั่นของหมู่ซัลฟไฮดริลในองค์ประกอบของเอนไซม์เหล่านี้ดังสมการ 1

Thiocyanate (SCN^-)+H_2O_2 $\rightarrow$ hypothiocyanite ($OSCN^-$)+H_2O ---------------------- สมการ 1

สมการที่ 1 การเกิด hypothiocyanite จากปฏิกิริยาระหว่าง Thiocyanate และ H_2O_2

จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีอยู่หลายชนิด เช่น *S. aureus* ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* นอกจากนี้ยังมีรายงานการยับยั้ง *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของอาหารที่อุณหภูมิต่ำโดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *L. plantarum* ระหว่างการเก็บรักษาหอยนางรมโดยการแช่แข็ง [17] เป็นต้น

2.1.1.3 คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมักน้ำตาลเฮกโซสโดยแบคทีเรียกรด แลคติกกลุ่ม heterofermentative การยับยั้งจุลินทรีย์โดยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดขึ้นโดยทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ โดยการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งมีผลในการยับยั้งการเกิด decarboxylations นอกจากนี้พบว่าการสะสม

ของคาร์บอนไดออกไซด์ในไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์จะมีผลต่อสมบัติในการเลือกผ่านของเมมเบรน ดังนั้นจึงทำให้คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกกลุ่ม Psychrotrope อย่างไรก็ตามพบว่าคาร์บอนไดออกไซม์ความเข้มข้นต่ำสามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด ความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นจะช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์ที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 10% (v/v) จะช่วยลดจำนวนของแบคทีเรียได้ถึง 50% [18] และสามารถยับยั้งราได้ที่ความเข้มข้น 20-50% [7]

2.1.1.4 ไดอะซิติล (Diacetyl) หรือ 2,3-butanedione เป็นสารที่ให้กลิ่นรสในเนย เนยแข็งและผลิตภัณฑ์นม นอกจากนั้นยังพบในไวน์ขาว ไวน์แดง บรั่นดี กาแฟคั่ว หญ้าหมักและอาหารหมักชนิดอื่นๆ [11] และพบฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ไดอะซิติลเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการ เมทาบอลิซึมของ pyruvate ทั้งแบบใช้และไม่ใช้ออกซิเจน โดยแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถหมักซิเตรทได้ [19] ไดอะซิติลสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และราได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวกรวม ทั้งแบคทีเรียกรดแลคติค กลไกการยับยั้งของไดอะซิติลเกิดจากไดอะซิติลจะไปทำปฏิกิริยากับ arginine-binding protein ของแบคทีเรีย แกรมลบจึงมีผลต่อการใช้อาร์จินิน (arginine) ภายในเซลล์ ไดอะซิติลที่ความเข้มข้นมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทั่วไปความเข้มข้นของไดอะซิติลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปเช่น Ferrari *et al.* [20] รายงานว่า ไดอะซิติลที่ระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรสามารถยับยั้งยีสต์และแบคทีเรีย แกรมลบ และที่ระดับความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ยกเว้นกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติค ส่วนที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบว่าไดอะซิติลความเข้มข้น 334 ppm จะมีผลในการยับยั้ง *Yersinia* sp., *Aeromonas* sp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. และ *Listeria* sp. ไดอะซิติลจะให้ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่ค่า pH น้อยกว่า 7 ถึงแม้ว่า ไดอะซิติลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่การนำไปใช้ต้องใช้ในปริมาณค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารที่ให้กลิ่นหอมไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) เพื่อหวังผลในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ แต่มักจะนิยมใช้เป็น antiseptic agent ในการทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องมือต่างๆในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่าเนื่องจากไดอะซิติลเป็นสารที่ระเหยได้เร็ว [19]

2.1.1.5 รูเทอริน (Reuterin) *Lactobacillus reuteri* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคที่พบในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์หลายชนิด *L. reuteri* สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำที่เรียกว่า รูเทอริน เมื่อเจริญในสภาวะไร้อากาศ และมีแหล่งอาหารที่ส่วนประกอบด้วยกลูโคส และกลีเซอรอลหรือกรีเซอรอลดีไฮด์ รูเทอรินไม่ใช่โปรตีนเนื่องจากไม่ถูกทำลายจาก proteolytic enzyme จึงทำให้รูเทอรินแตกต่างจากแบคเทอริโอซิน ความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นของ รูเทอรินค่อนข้างกว้างสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว และไวรัส แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญจากรูเทอริน ได้แก่ *Salmonella* spp., *Shigella* sp., *Clostridium* sp., *Staphylococcus* sp. และ *Listeria* sp. เป็นต้น ซึ่งกลไกในการยับยั้งเกิดจาก รูเทอรินจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์กลุ่มซัลฟไฮดริล ได้แก่ เอนไซม์ไรโบนิวคลีโอไทด์รีดักเทส (ribonucleotide reductase) ทำให้ไม่เกิดการจับกันระหว่างเอนไซม์กับสับสเตรต ส่งผลให้เซลล์จุลินทรีย์ไม่สามารถสังเคราะห์ดีเอ็นเอได้ [20]

2.1.1.6 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins) แบคเทอริโอซินเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีการใช้มากในอุตสาหกรรมอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติคหลายชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน (สารประกอบโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 30-60 โมเลกุล) แบคเทอริโอซินสามารถกำจัด และยับยั้งจุลินทรีย์โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่มีสปีชีส์เดียวกันหรือสปีชีส์ใกล้เคียงกันกับสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินโดยส่วนใหญ่จะไม่มีผลต่อสายพันธุ์ที่ผลิต [21] กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์เกิดจากการทำให้เกิดรูที่ฟอสโฟไลปิดในเซลล์เมมเบรนของจุลินทรีย์เป้าหมายแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เช่น *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Clostridium botulinum* และ *Staphylococcus aureus* เป็นต้น ในปัจจุบันมีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติคหลายชนิดสามารถผลิต แบคเทอริโอซิน ได้แก่ *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp., *Lactococcus* sp. และ *Streptococcus* sp. เป็นต้น แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติคบางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งที่เฉพาะเจาะจง

ดังนั้นการนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารจะช่วยลดการใช้วัตถุกันเสียทางเคมีซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคต้องการโดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้เป็นสารถนอมอาหาร ได้แก่ ไนซินซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย และได้รับการรับรองโดยองค์การอนามัยโลก (WHO) ให้ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารที่ปลอดภัย และอนุญาตให้ใช้ในประเทศต่างๆถึง 47 ประเทศทั่วโลก กลไกการยับยั้งจุลินทรีย์ของไนซินเกิดจาก ไนซินทำให้เกิดรูและขัดขวางกระบวนการ proton motive force รวมทั้งรบกวนสมดุลของค่า pH เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออนและการสลายตัวของ ATP ทำให้เซลล์เกิดการตายที่สุด [22]

แบคเทอริโอซินมีคุณสมบัติที่เหมาะสมในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหารเนื่องจากเป็นสารที่ปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยน้ำย่อยประเภท โปรติเอสจึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร มักจะทนต่อพีเอช และความร้อน บางชนิดมีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้างสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* แบคเทอริโอซินมักถูกควบคุมการสร้างโดยพลาสมิดจึงง่ายต่อการทำ genetic manipulation [14]

2.2 แบคเทอริโอซิน

ความปลอดภัยของอาหารด้านชีวภาพเป็นสิ่งที่ผู้บริโภคควรตระหนักถึงความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากการเจ็บป่วยจากบริโภคจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเป็นพิษ ก่อให้เกิดการสูญเสียทรัพย์สิน หรือแม้แต่ชีวิต ถึงแม้ว่าผลิตภัณฑ์อาหารนั้นได้ผ่านกระบวนการแปรรูปอย่างถูกสุขลักษณะก่อนเข้าสู่ตลาดแล้วก็ตาม แต่การปนเปื้อนของเชื้อโรคอาจเกิดขึ้นได้ระหว่างการขนส่งที่ไม่ระมัดระวัง รวมทั้งในระหว่างสินค้าในวางจำหน่าย หรือแม้แต่การเตรียมอาหารอย่างไม่ถูกสุขลักษณะของผู้บริโภคเอง ดังนั้นเพื่อให้อาหารมีความปลอดภัยมากขึ้น และเป็นการยืดอายุการวางจำหน่ายอาหาร จึงมีการใช้วัตถุกันเสียสังเคราะห์ เพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและเชื้อที่ก่อโรค อย่างไรก็ตามปัจจุบันผู้บริโภคจำนวนมากตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นจากการบริโภควัตถุกันเสียสังเคราะห์ ปัจจุบันจึงเกิดงานที่พยายามคิดค้นวัตถุกันเสียจากธรรมชาติมาใช้ทดแทน เพื่อลดความเสี่ยงของผู้บริโภคในเรื่องผลข้างเคียงของสารเคมีต่อสุขภาพ ในขณะเดียวกันยังคงสามารถเชื่อมั่นในความปลอดภัยของอาหาร และผลิตภัณฑ์ก็ยังคงมีอายุการเก็บที่เหมาะสม เช่นในปี พ.ศ.2535 ได้มีการใช้สารปฏิชีวนะในด้านการแพทย์ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อใช้เป็นยารักษาโรคที่เกิดจากการติดเชื้อได้อย่างจำเพาะแต่การใช้สารปฏิชีวนะก็มีขีดจำกัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากไม่ได้รับอนุญาตให้เติมสารปฏิชีวนะลงในอาหาร ไม่ว่าจะใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร สารปรุงแต่งอาหาร หรือสารฆ่าเชื้อในอาหารก็ตาม ซึ่งการนำสารปฏิชีวนะไปใช้ในอาหารหรือเครื่องดื่มจะถือว่าเป็นเรื่องที่ผิดกฎหมาย [22] ในปีค.ศ. 2017 Ahmad *et al.* [2] ได้แบคเทอริโอซินสามารถแบ่งออกตามคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีได้ 4 คลาส ได้แก่

แบคเทอริโอซินคลาส 1 มีลักษณะเป็นเปปไทด์สายสั้น (มีมวลน้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน หรือ มีกรดอะมิโนประมาณ 19-37 โมเลกุล) และโดยทั่วไปจะมีกรดอะมิโนชนิด แลนไธโอนีน

(Lanthionine) และ เมธิลแลนไธโอนีน (Methyllanthionine) รวมอยู่ในโครงสร้างแบบปฐมภูมิ ซึ่งแบคเทอริโอซินในคลาสนี้จะมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนได้สูง โดยเป้าหมายของการออกฤทธิ์จะเข้าจับกับโครงสร้างของผนังเซลล์ของแบคทีเรียก่อโรคกลุ่มที่เป็นเป้าหมายซึ่งโดยส่วนมากแล้วจะเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ซึ่งแบคเทอริโอซินคลาสนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ซับคลาส ได้แก่

ซับคลาส 1a เป็นแบคเทอริโอซินที่จะมีประจุเป็นบวก มีลักษณะเป็นเส้นยาว โดยจะออกฤทธิ์กับแบคทีเรียเป้าหมายโดยการสร้างรูที่ผนังเซลล์ ตัวอย่างแบคเทอริโอซิน เช่น ไนซิน (Nisin)

ซับคลาส 1b เป็นแบคเทอริโอซินมีลักษณะการจัดเรียงเป็นทรงกลม ลักษณะคงที่มีค่าประจุเป็นลบหรือไม่มีประจุ จะเข้ายับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไม่ให้อยู่ในรูปแบบที่สมบูรณ์ ซึ่งจะมีผลต่อการดำรงชีวิตของเซลล์เป้าหมายโดยตรง ตัวอย่างของแบคเทอริโอซิน เช่น แลคติซิน (Lacticin) ไซโทไลซิน (Cytolysin) และ ซาลิวาริซิน (Salivaricin)

แบคเทอริโอซินคลาส 2 จะมีคุณสมบัติทนความร้อนสูง มีขนาดเล็ก (มวลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้ไม่มีแลนไธโอนีนประกอบในโครงสร้าง ซึ่งจะมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ แบคเทอริโอซินกลุ่มดั่งเดิม ซึ่งสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ซับคลาส ได้แก่

ซับคลาส 2a เป็นกลุ่มแบคเทอริโอซินที่ออกฤทธิ์กับแบคทีเรีย *Listeria* spp. ได้เป็นอย่างดี โดยในกลุ่มนี้ประกอบไปด้วย ลิวโคซิน เอ (Leucocin A) เมเซนเทอริซิน (Mecentericin) พีดิโอซิน PA-1 (Pediocin PA-1) และ ซาคาซิน พี (Sakacin P) เป็นต้น

ซับคลาส 2b เป็นแบคเทอริโอซินที่จะมีเปปไทด์อย่างน้อย 2 สายอยู่ร่วมกันถึงจะแสดงกิจกรรมได้ซึ่งจะส่งเสริมการแสดงออกต่อการกำจัดแบคทีเรียเป้าหมายได้อย่างมาก แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น แลคโตซิน จี (Lactocin G) และ แพลนทาริซิน พี (Plantaricin P) เป็นต้น

ซับคลาส 2c เป็นแบคเทอริโอซินมีขนาดเล็ก สามารถทนความร้อนได้ดีโดยจะมีโครงสร้างสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ ไธโอลไบโอติก (Thiolbiotic) คือ แบคเทอริโอซินที่มีกรดอะมิโนซีสเทอีนอยู่ 2 รูปแบบ แต่ซีสติไบโอติก (Cystibiotic) จะมีกรดอะมิโนซีสเทอีนเพียง 1 รูปแบบเท่านั้น แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น แลคโตซิน เอ (Lactocin A) ไดเวอจิซิน เอ (Divergicin A) และเอซิโดซิน บี (Acidocin B) เป็นต้น

แบคเทอริโอซินคลาส 3 เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดใหญ่ (มวลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน) มีคุณสมบัติที่ไม่ทนต่ออุณหภูมิสูง โดยจะมีกลไกการออกฤทธิ์กับการเกิดกระบวนการเมทาบอลิซึมภายในเซลล์โดยจะเข้าขัดขวางการเกิดการสร้างพันธะระหว่าง phosphoenolpyruvate โดยจะขึ้นอยู่กับ

น้ำตาลกลูโคสและแมนโนสในกระบวนการ phosphotransferase transport system แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ เช่น เฮลวิติซิน (Helveticin) ดิสกาแลคติซิน (Dysgalacticin) และ สเตรบโตคอคซิน (Streptococcin)

แบคเทอริโอซินคลาส 4 เป็นแบคเทอริโอซินที่มีความซับซ้อนทางโครงสร้างและองค์ประกอบ โดยจะมีชื่ออื่นที่ใช้เรียกได้แก่ Complex bacteriocins และ Cyclic bacteriocins โดยจะมีองค์ประกอบในกลุ่มของลิพิดและคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบเชิงซ้อน ซึ่งทำให้มีคุณสมบัติที่ไม่ทนต่อความร้อนและมีการตอบสนองที่ไวต่อการย่อยของเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตและเอนไซม์ย่อยลิพิด แบคเทอริโอซินในกลุ่มนี้ได้แก่ ลิวโคนอคซิน (Leuconocin) และ อูเบอโรไลซิน (Uberolycin) เป็นต้น

สำหรับในประเทศไทย ก็มีผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านหลายชนิด เช่น ไส้กรอกอีสาน แหนม และขนมจีนที่ทำโดยภูมิปัญญาชาวบ้านในอดีตโดยอาศัยแบคทีเรียที่ติดมากับวัตถุดิบ จนกระทั่งพัฒนามาเป็นอุตสาหกรรมในปัจจุบันโดยใช้ต้นเชื้อแบคทีเรีย ในกระบวนการหมักนี้มีการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกลุ่มแลคติค (lactic acid bacteria) เช่น แบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* sp., *Pediococcus* sp. และ *Lactococcus* sp. เป็นต้น

ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มแลคติคนอกจากจะผลิตกรดแลคติคออกมาทำให้อาหารหมักมีรสเปรี้ยวแล้วยังสามารถช่วยเพิ่มคุณค่าของอาหารหมักในด้านความปลอดภัย และอายุการเก็บรักษา เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สร้างสาร แบคเทอริโอซินออกมาด้วยเช่นกัน [2] แบคเทอริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกเมื่อปี พ.ศ.2468 ในแบคทีเรียแกรมลบคือ *Escherichia coli* เรียกว่า โคลิซิน (colicin) ซึ่งโคลิซินนี้จะมีผลยับยั้งแบคทีเรียเฉพาะกลุ่มที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้าง แบคเทอริโอซิน เพปไทด์หรือโปรตีนที่ใช้ในการฆ่าแบคทีเรีย (bacteriocidal) ซึ่งออกฤทธิ์ได้ในวงแคบและถูกดูดซับได้โดยตัวรับ (receptor) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย หรืออาจกล่าวได้ว่า แบคเทอริโอซิน เป็นเพปไทด์หรือโปรตีนที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ไวต่อสารนี้ได้เรียกว่า แบคเทอริโอซิน [4] สามารถผลิตได้ทั้งจากแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมลบและที่เป็นที่รู้จักมีอยู่ 2 ชนิด คือ โคลิซิน (colicin) ซึ่งผลิตโดย *E. coli* และไมโคลิซิน (micolicin) ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียในวงศ์ Enterobacteriaceae ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยจากแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนใหญ่จะผลิตจาก แบคทีเรียแลคติค (lactic acid bacteria; LAB) สำหรับ

แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแกรมบวกที่ถูกค้นพบเป็นตัวแรก ในปี พ.ศ.2471 คือ ไนซิน (nisin) ซึ่งผลิตโดยเชื้อแบคทีเรีย *Lactococcus lactis*

การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในอุตสาหกรรมอาหารเนื่องจากแบคเทอริโอซินได้รับการยอมรับว่า มีความปลอดภัยและใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมอาหารมานานแล้ว ในปัจจุบันไนซินเป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *Lactococcus lactis* ที่ได้รับการยอมรับในด้านความปลอดภัยจาก FDA และ FAO/WHO โดยไนซินถูกนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารชนิดต่าง ๆ เช่น เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ เนย อาหารกระป๋อง เนื้อสัตว์ มากกว่า 50 ประเทศทั่วโลก [23] ซึ่งสาเหตุสำคัญของการที่แบคเทอริโอซินได้รับการยอมรับและนำมาใช้ประโยชน์ให้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม เนื่องจากสาเหตุสำคัญ 3 ประการคือ

ประการที่ 1 แบคเทอริโอซินจัดเป็นสารที่ถูกผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียที่มีสมบัติคล้ายกันสารปฏิชีวนะ แต่ไม่ได้ถูกจัดเป็นสารปฏิชีวนะที่ใช้เพื่อการรักษาโรคทางการแพทย์ซึ่งห้ามใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม [24] เนื่องจากแบคเทอริโอซิน มีข้อแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ ในเรื่องของสมบัติการยับยั้งแบคทีเรีย กล่าวคือแบคเทอริโอซินจะมีขอบเขตการยับยั้งที่แคบและยับยั้งได้ในกลุ่มสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันเท่านั้น

ประการที่ 2 แบคเทอริโอซินมีความปลอดภัยต่อการบริโภค เนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นเพปไทด์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น จึงทำให้เป็นสารฆ่าแบคทีเรียที่ถูกย่อยสลายได้อย่างรวดเร็วโดยโปรตีเอสในลำไส้ของมนุษย์ [25]

ประการที่ 3 แบคทีเรียกรดแลคติค ซึ่งจัดเป็นแหล่งผลิตแบคเทอริโอซินที่สำคัญที่ใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมีความปลอดภัย เนื่องจากแบคทีเรียแลคติค และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแบคทีเรียแลคติค มีการบริโภคกันมาอย่างยาวนาน และไม่เคยมีรายงานว่าก่อให้เกิดอันตราย หรือส่งผลเสียให้แก่มนุษย์ นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติคยังจัดอยู่ในบัญชีรายชื่อสารซึ่งเป็นที่ยอมรับว่าปลอดภัย (Generally recognized as safe; GRAS) [26]

แบคเทอริโอซินที่นำมาใช้ทางการค้าคือ ไนซิน (nisin) ซึ่งมีจำหน่ายโดยใช้ชื่อว่า Nisaplin™ สร้างจาก *Lactococcus lactis* และ เพดิโอซิน (pediocin PA-1) จำหน่ายภายใต้ชื่อ ALTATA2431 สร้างจาก *Pediococcus acidilactici* ไนซินมีการใช้แพร่หลายมากกว่า 48 ประเทศ โดยองค์การอาหารและยา (FDA) ได้ยอมรับว่า Nisaplin™ สามารถจำหน่ายในรูปของสารป้องกันการเน่าเสียที่มาจากธรรมชาติ ไนซินมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียกลุ่มแกรมบวกได้หลายสปีชีส์ รวมทั้ง *Listeria monocytogenes* ซึ่งมักก่อโรคในอาหารกระป๋อง และผลิตภัณฑ์นม นอกจาก Nisaplin™ แล้วยังมีผลิตภัณฑ์ของแบคเทอริโอซิน ที่นำมาใช้ทางการค้า เช่น lacticin3147 และ lacticin481 ซึ่งมี

ประสิทธิภาพในการใช้ถนอมอาหาร รวมทั้งช่วยเพิ่มรสชาติด้วย ดังนั้นแบคเทอริโอซินจึงน่าจะมีศักยภาพในการเป็นสารถนอมอาหารทางเลือกที่ปลอดภัย

2.3 เชื้อก่อโรคในอาหาร

แบคทีเรียเป็นสาเหตุของโรคอาหารเป็นพิษหลายชนิด ลักษณะอาการของโรค ได้แก่ ปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง ถ่ายอุจจาระเป็นมูกเลือด อาการเหล่านี้มักจะเกิดภายหลังการรับประทานอาหารชนิดเดียวกัน เกิดเวลาใกล้เคียงกัน อาการคลื่นไส้อาเจียน มักเกิดจากสารเคมีที่เป็นพิษ และเชื้อโรคในระบบทางเดินอาหารทั้งหมด อาการปวดท้องรุนแรงอาจเกิดจากสารพิษ เช่น เกลือปรอท สารหนู สารที่ทำให้ระคายเคืองอย่างมาก และเชื้อโรคทางเดินอาหารบางชนิด จากรายงานของ Ananchaipattana *et al.* [27] พบการปนเปื้อนของ coliform bacteria 67%, *B. cereus* 41%, *S. aureus* 26% และ *E. coli* 28% จากเต้าหู้ 133 ตัวอย่างที่จำหน่ายในเขตกรุงเทพและปทุมธานี ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าเต้าหู้ที่มีขายตามท้องตลาดที่ไม่ได้มีการจัดการเรื่องสุขอนามัยที่ดีนั้น มีความเสี่ยงต่อการเป็นพาหะของการเกิดโรคจากอาหารได้

2.4 จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมัก

การหมัก (Fermentaion) คำว่า การหมัก แปลว่าการทำให้เกิดฟองหรือสภาพเดือด ทั้งนี้เนื่องจากการเกิดฟองซึ่งเป็นผลมาจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกปล่อยออกมาในระหว่างการเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ ต่อมา Gay Luss ac ได้ให้คำจำกัดความของ “การหมัก” ว่า เป็นการแตกตัวของน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ จนกระทั่ง Louis Pasteur สามารถสาธิตให้เห็นถึงความสัมพันธ์ของยีสต์ต่อปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลให้เป็นแอลกอฮอล์ [28] ดังนั้น คำว่า การหมักดอง จึงไปเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์และเอมไซน์มากที่สุด อย่างไรก็ตามในปัจจุบันนี้คำว่า การหมัก หมายถึง กระบวนการที่เปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารประกอบอินทรีย์ (เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน) โดยอาศัยกิจกรรมของเอมไซน์ (หรือตัวเร่งทางเคมี) ซึ่งผลิตขึ้นมาจากจุลินทรีย์ที่จำเพาะสำหรับความหมายของคำว่า อาหารหมัก (Fermented foods) หมายถึง กลุ่มของอาหารที่พิเศษกลุ่มหนึ่ง ซึ่งส่วนประกอบของอาหาร (คาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน) ถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในสภาพที่ดีเหมาะต่อผู้บริโภคโดยอาศัยการหมัก แต่ทั้งนี้ต้องขึ้นกับปัจจัยต่างๆ ดังนี้คือ สภาพธรรมชาติของอาหาร ชนิดของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ รวมถึงสภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ เป็นต้น อย่างไรก็ตาม สำหรับอาหารหมักดองนี้จำเป็นอย่างยิ่งที่เรา

ต้องควบคุมชนิดของจุลินทรีย์ และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้เป็นไปตามความต้องการ

ชนิดของการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในอาหารหมัก (Types of Microbial Changes in Fermented Foods) จุลินทรีย์มีอยู่ตามธรรมชาติและเกี่ยวข้องกับอาหาร จะสามารถก่อให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการย่อยสลายหลายชนิด โดยขึ้นกับส่วนประกอบหลักของอาหารที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ ที่อยู่ในอาหารนั้น รวมถึงชนิดของจุลินทรีย์ด้วยในบางครั้งจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารอาจจัดเป็นกลุ่ม โดยกลุ่มแรกคือ proteolytic organisms ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายโปรตีนและสารประกอบไนโตรเจนอื่น ๆ ก่อให้เกิดกลิ่นและการเหม็นเน่า ซึ่งทำให้ผู้บริโภคไม่ยอมรับถึงแม้จะมีปริมาณเพียงเล็กน้อยก็ตาม กลุ่มที่สองคือ lipolytic organisms ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ย่อยสายไขมัน ฟอสโฟลิพิด (phospholipids) และสารอื่น ๆ ที่มีไขมันเป็นองค์ประกอบ ก่อเกิดกลิ่นและรสชาติเหม็นหืน ส่วนกลุ่มสุดท้าย fermentative organisms เป็นจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนคาร์โบไฮเดรต และสารประกอบที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ให้เป็นแอลกอฮอล์ กรดและก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ [29]

การควบคุมการหมักในอาหาร (Controlling Fermentation in Foods) ปัจจัยที่มีผลต่อการควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ และเมทาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ในการหมักอาหารประกอบไปด้วย กรด แอลกอฮอล์ การใช้หัวเชื้อ อุณหภูมิ ออกซิเจน และเกลือ โดยที่ปัจจัยเหล่านี้จะบ่งถึงชนิดของจุลินทรีย์ซึ่งอาจเจริญในอาหารหมักในช่วงของการเก็บรักษาได้

2.5 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซิน

การนำแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติคมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและก่อการเน่าเสียนั้นสามารถทำได้ในหลากหลายรูปแบบ ซึ่งมีการทำการทดลองและการรายงานการวิจัยสู่สากล ได้แก่

Pingitore *et al.* [30] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินจาก *Enterococcus mundtii* CRL35 และ *Enterococcus faecium* ST88Ch ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในไมนัสชีสซึ่งได้ทำการทำลองระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *E. mundtii* CRL35 และ *E. faecium* ST88Ch พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินอยู่ระหว่าง 15-18 ชั่วโมง เมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วเมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในชีสภายใต้สภาวะแช่เย็นที่อุณหภูมิ 8-10

องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 วัน โดยผลของการทดสอบแสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอซินจาก *E. mundtii* CRL35 สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ตลอดระยะเวลา 12 วันของการทดลอง ซึ่งดังงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นได้ว่ามีความเป็นไปได้ที่จะนำแบคเทอริโอซินนี้ไปประยุกต์ใช้ในอาหารและ Chen *et al.* [31] ได้ทำการศึกษาการผลิต แบคเทอริโอซินจาก *Weissella hellenica* D1501 ในการยืดอายุการเก็บรักษาเต้าหู้แผ่น โดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยง *W. hellenica* D1501 ร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคและก่อการเน่าเสียคือ *Kurthia gibsonii, S. aureus* และ *E. coli* ในแผ่นเต้าหู้ แล้วทำการติดตามความเปลี่ยนแปลงทั้งทางด้านกายภาพและจุลชีววิทยาในสภาวะการทดสอบด้านอุณหภูมิที่แตกต่างกัน ผลพบว่า เต้าหู้แผ่นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ 21 วันเต้าหู้แผ่นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ 14 วันและเต้าหู้แผ่นที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาได้ 7 วัน ซึ่งเป็นวิธีการใหม่ในการเก็บรักษาเต้าหู้โดยการใช้แบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินผสมในแผ่นเต้าหู้ Barbosa *et al.* [32] ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับการประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินจาก *Lactobacillus curvatus* ที่คัดแยกมาจากซาลามิซึ่งเป็นอาหารประเภทเนื้อที่มีการถนอมโดยการแปรรูปและรมควันเพื่อนำมายับยั้งการเจริญของ *L. monocytogynes* ในซาลามิโดยการศึกษาปัจจัยร่วมต่าง ๆ เช่น ค่า pH ค่า A_w และการทำให้บริสุทธิ์อย่างง่าย พบว่า การใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตในการเพิ่มความบริสุทธิ์สามารถเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้มากขึ้นสูงสุดถึง 4 เท่า และค่า pH ที่แบคเทอริโอซินทำงานอย่างเหมาะสมคือ pH 6 ซึ่งตลอดการติดตามการเจริญของ *L. monocytogenes* ในตัวอย่างซาลามิตลอดระยะเวลา 30 วันจะพบการเจริญของ *L. monocytogenes* เริ่มมีความแตกต่างจากชุดควบคุมตั้งแต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 4 วันของการทดลอง ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า แบคเทอริโอซินจาก *L. curvatus* ที่มีการเพิ่มความบริสุทธิ์นั้นสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในซาลามิได้เป็นอย่างดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมแบคเทอริโอซินลงไป และงานวิจัยของ Gao *et al.* [33] ได้ทำการศึกษาการเพาะเลี้ยง *Lb. sakei* C2 ร่วมกับ sakacin C2 ในรูปแบบการทำงานร่วมกันเพื่อยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในตัวอย่างแฮมสไลด์โดยทำการศึกษาสภาวะที่เปลี่ยนไปะหว่างการเพาะเลี้ยง เช่น ค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไป ปริมาณแบคทีเรียก่อโรคที่เปลี่ยนแปลงไปตลอดระยะเวลาในการทดลอง 60 วัน พบว่า ในระหว่างการเพาะเลี้ยงตั้งแต่วันแรกของการเพาะเลี้ยงค่า pH ลดลงอย่างต่อเนื่องจนวันสุดท้ายของการทดลองค่าอยู่ที่ 5.2 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการเจริญจะเห็นได้ว่ามีการลดจำนวนลงของ

L. monocytogenes อย่างต่อเนื่องจนกระทั่งวันที่ 30 ของการทดลองไม่พบการเจริญของ *L. monocytogenes* จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง จึงแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยง *Lb. sakei* C2 ร่วมกับ sakacin C2 ยับยั้งการเจริญและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ได้เป็นอย่างดีตลอดช่วงเวลาของการทดลอง

บทที่ 3

วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 วัสดุ อุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 กระดาษกรอง (Filter paper)

3.1.2 ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ (Media button)

3.1.3 จานเพาะเชื้อ (Petri dish)

3.1.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (Alcohol burner)

3.1.5 ตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ (Incubator)

3.1.6 ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

3.1.7 ห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)

3.1.8 หลอดทดลอง (Test tube)

3.1.9 หม้อนึ่งความดันไอ (Autoclave)

3.1.10 เครื่องดูดจ่ายสารละลาย (Micropipette)

3.1.11 เครื่องชั่งสาร (Balance)

3.1.12 เครื่องตีบดตัวอย่างอาหาร (Stomacher)

3.1.13 เครื่องผสมสารละลาย (Vortex mixer)

3.1.14 เครื่องหมุนเหวี่ยงแบบควบคุมอุณหภูมิ (Refrigerated centrifuge)

3.1.15 เตาให้ความร้อน (Hot plate)

3.1.16 แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ (Spreader)

3.1.17 แท่นวางหลอดทดลอง (Lack)

3.1.18 เครื่องจ่ายสารอัตโนมัติแบบหมุนวน (Spiral plate)

3.1.19 Agar-agar

3.1.20 Baird-parker agar base

3.1.21 Calcium carbonate ($CaCO_3$)

3.1.22 Egg-yolk solution

3.1.23 *Enterobacter sakazakii* agar

3.1.24 Kovac's oxidase reagent

3.1.25 MacConkey agar

3.1.26 Magnesium sulfate ($MgSO_4$•$7H_2O$)

3.1.27 MRS broth

3.1.28 MYP agar base

3.1.29 Plate count agar

3.1.30 Potassium tellurite hydrate

3.1.31 Sodium chloride (NaCl)

3.1.32 Trypticase soya broth

3.1.33 Vivantis GF-1 Nucleic Acid Extraction kits

3.1.34 3% Hydrogen peroxide (3% H_2O_2)

3.1.35 80% Glycerol

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากอาหารหมักดอง

อาหารหมักดองที่ใช้ได้มาจากตลาดในพื้นที่โดยรอบมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี จำนวน 50 ตัวอย่าง ชั่งตัวอย่างอาหารปริมาณ 25 กรัม จากนั้นเติมอาหาร MRS broth ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นตีบดตัวอย่างอาหารให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีบดอาหาร (stomacher) ด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการเจือจางลำดับส่วน (Serial dilution) ให้อยู่ในระดับเจือจางที่เหมาะสมจากนั้นดูดสารละลายปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหาร MRS agar ที่มีการเติม $CaCO_3$ ร้อยละ 0.3 จากนั้นทำการเกลี่ยเชื้อ (Spread plate) ให้ทั่วอาหารเพื่อทำการแยกเชื้อ จากนั้นเททับหน้าด้วยอาหาร MRS agar ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บนผิวหน้าอาหารแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง โดยจะเลือกโคโลนีที่เจริญให้

อาหารที่เททับหน้าโดยมีโซนใสรอบโคโลนี จากนั้นนำไปตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาของโดยการย้อมสีแกรมเซลล์และส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์

3.2.2 การทดสอบสมบัติทางชีวเคมีบางประการและระบุสายพันธุ์การหาลำดับทางพันธุกรรม

3.2.2.1 ทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส (Oxidase test)

ทดสอบโดยใช้ไม้แหลมที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อจากโคโลนีมาเล็กน้อยขีดเป็นเส้นตรงบนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วจากนั้นหยด Oxidase reagent ทับเส้นขีดเชื้อ สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใน 10 วินาทีหลังจากหยดสารทดสอบ [34]

3.2.2.2 ทดสอบปฏิกิริยาคะตาเลส (Catalase test)

ทดสอบโดยใช้ 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไม้แหลมที่ฆ่าเชื้อแล้วเขี่ยเชื้อจากโคโลนีมาเล็กน้อยผสมเข้ากับหยดของ 3% H_2O_2 แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงทันทีเมื่อเชื้อสัมผัสกับสารทดสอบ [34]

3.2.2.3 การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียการหาลำดับทางพันธุกรรม

นำแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตกตะกอนเซลล์แบคทีเรียด้วยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการสกัดสารพันธุกรรมด้วย Vivantis GF-1 Nucleic Acid Extraction kits แล้วนำสารพันธุกรรมที่ได้ส่งตรวจหาลำดับ 16S rDNAทางพันธุกรรมที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ โดยจะส่งตรวจในสายพันธุ์ที่คัดเลือก

3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้

3.2.3.1 การเตรียมแบคเทอริโอซินเพื่อทดสอบจากแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนใสนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.2.3.2 การเตรียมจานเพาะเชื้อและการทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion

นำแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Cronobacter sakazakii* เลี้ยงในอาหาร TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วน *Yersinia enterocolitica* เลี้ยงในอาหาร TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบกำหนดนำแบคทีเรียก่อโรคที่ได้ถ่ายใส่ในอาหาร soft TSA (0.75% Agar (w/v)) และเติมเชื้อตั้งต้นให้มีความเข้มข้นอยู่ที่ 10^5-10^6 CFU/ml จากนั้นผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทใส่จานเพาะเชื้อจานละ 25 มิลลิลิตร ตั้งรอให้อาหารแข็งตัวแล้วจากนั้นใช้แท่งเจาะรูเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร จากนั้นนำแบคเทอริโอซินถ่ายลงหลุมที่เจาะแล้วนำไปบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง [35]

3.2.4 การทดสอบยืนยันคุณสมบัติบางประการของสารละลายที่ปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) ของแบคทีเรียกรดแลคติค

3.2.4.1 การทนต่ออุณหภูมิสูงและจุดเยือกแข็ง

ทำการเตรียม cell-free supernatant โดยแยกส่วนใสออกจากเซลล์แล้วนำส่วนใสที่ได้แบ่งออกเป็นส่วนย่อย ๆ ใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็กแล้วนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 15, 20 และ 30 นาที นำไปเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แล้วนำสารไปทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion

3.2.4.2 การย่อยสลายด้วยเอนไซม์โปรติเนส เค (Proteinase K)

ทำการเตรียม cell-free supernatant แล้วเติมเอนไซม์ Proteinase K โดยปรับความเข้มข้นของ Proteinase K เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำสารไปทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion โดยทำการทดสอบเปรียบเทียบกับ แบคเทอริโอซินที่ไม่ใส่เอนไซม์ Proteinase K ซึ่งใช้เป็นชุดควบคุม

3.2.5 การทดสอบความสามารถของ cell-free supernatant ที่คัดเลือกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในสภาวะควบคุม

ทำการนำแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกไว้เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วแยกส่วนใสออก แล้วนำส่วนใสไปให้ความร้อนด้วย ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำมาผสมในอาหาร 2X BHI ปริมาตร 100 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus* และ *Cr. sakazakii* ส่วน *Y. enterocolitica* โดยแยกทดสอบ ลงไปในสารละลายทดสอบให้มีค่าความขุ่นในช่วงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เขย่า 150 รอบต่อนาที แล้วทำการเก็บตัวอย่างสารละลายวัดค่าความขุ่นในช่วงของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรทุก ๆ 3 ชั่วโมง

3.2.6 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด cell-free supernatant ที่สามารถยับยั้งการเจริญและกำจัดแบคทีเรียก่อโรคบางสายพันธุ์

ทำการทดสอบการหาค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งการเจริญ (Minimum Inhibitory Concentration) และค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถกำจัดแบคทีเรียได้ (Minimum Bactericidal Concentration) ของแบคทีเรียก่อโรค โดยทำการเตรียม cell-free supernatant จากแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกไว้โดยใช้วิธีการทดสอบใน 96- well plates โดยใช้การเจือจาง 2 เท่าในการเจือจางความเข้มข้นสารทดสอบ โดยก่อนที่จะมีการเจือจางจะทำการถ่ายอาหาร BHI ความเข้มข้น 2 เท่าลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตรและใช้สารทดสอบเริ่มต้น 100 ไมโครลิตร จากนั้นเมื่อทำการเจือจางเสร็จสิ้นจึงใส่แบคทีเรียเป้าหมายลงไปที่มีความเข้มข้นเซลล์ 10^4 CFU/mL. ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ *B. cereus*, *S. aureus* และ *Cr. sakazakii* ส่วน *Y. enterocolitica* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการตรวจวัดการการเจริญของเซลล์แบคทีเรียโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ช่วงคลื่น 600 นาโนเมตร โดยเครื่อง Microplate Reader รุ่น Biochrom EZ Read 2000 และจากนั้นทำการนำช่องที่ไม่มีการเจริญ ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร TSA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับ *B.*

cereus, *S. aureus* และ *Cr. sakazakii* ส่วน *Y. enterocolitica* บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ

3.2.7 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารสด

3.2.7.1 การเตรียมเต้าหู้แผ่นและการนำแบคเทอริโอซินประยุกต์ใช้ในการเคลือบผิวเต้าหู้แผ่น

นำถั่วเหลืองที่ลอกเปลือกออกแล้วมาแช่น้ำทิ้งไว้ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นให้ละเอียดโดยอัตราส่วนของถั่วเหลืองต่อน้ำสะอาดเท่ากับ 1 ต่อ 3 เท่าจากนั้นปั่นให้ถั่วเหลืองแตกออกแล้วใช้ผ้าขาวบางกรองแยกกากกับส่วนที่เป็นน้ำออกจากกัน ทำการกรองซ้ำอีก 1 ครั้ง แล้วนำน้ำเต้าหู้ที่ได้ไปต้มให้ความร้อนจนเดือด จากนั้นพักไว้จนอุณหภูมิลดลงเหลือ 70-80 องศาเซลเซียส จึงเติมแมกนีเซียมซัลเฟต 1.5 กรัมต่อลิตร แล้วคนให้ผสมกันจนเกิดการตกตะกอน แล้วจึงตักใส่แม่พิมพ์เต้าหู้แล้วใช้ของหนักประมาณ 2 กิโลกรัมทับไว้ประมาณ 30 นาที จากนั้นนำไปนึ่งฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นเตรียม cell-free supernatant ปริมาตร 200 มิลลิลิตร แล้วนำเต้าหู้แผ่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อมาแช่ใน cell-free supernatant เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 1 ครั้ง จากนั้นนำเต้าหู้แผ่นใส่จานเพาะเชื้อที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาณ 10 กรัม จากนั้นนำแบคทีเรียตั้งต้นใส่ในเต้าหู้แผ่นตัวอย่างละ 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและคุณภาพด้านจุลชีววิทยาทุก ๆ 6 ชั่วโมง

3.2.7.2 การเตรียมเส้นก๋วยเตี๋ยว

นำแป้งสาลี แป้งข้าวเจ้าและแป้งมันสำปะหลังผสมกันตามอัตราส่วนที่กำหนดแล้วจากนั้นทำการนวดแป้งและทำให้อยู่ในรูปของเส้นก๋วยเตี๋ยวแล้วจึงทำการลวกเส้นให้สุกจากนั้นตักเส้นลงแช่ในน้ำเย็น 1 ครั้ง แล้วจากนั้นทำการแช่เส้นก๋วยเตี๋ยวใน cell-free supernatant เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นก็ทำการล้างด้วยน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วอีก 1 จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แล้วทำการเก็บตัวอย่างมาตรวจสอบลักษณะทางกายภาพและคุณภาพด้านจุลชีววิทยาทุก ๆ 6 ชั่วโมง

3.2.7.3 การเตรียมขนมจีนเส้นสด

การเตรียมขนมจีนเส้นสดเพื่อการทดสอบนำแป้งข้าวโม่ขนมจีนสำหรับทำเส้นสดจากโรงงานทำขนมจีน ในจังหวัดนนทบุรี ผสมน้ำสะอาดและเกลือตามอัตราส่วน จากนั้นทำการโรยเส้นที่น้ำร้อนอุณหภูมิ 85-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที สังเกตการณ์ลอยของเส้นขึ้นสู่ผิวน้ำ จึงตักเส้นขนมจีนที่ได้แช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

3.2.7.4 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคเพื่อใช้ในการทดสอบ

นำแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *B. cereus*, *S. aureus, E. coli* และ *Cr. sakazakii* เลี้ยงในอาหาร TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ส่วน *Y. enterocolitica* เลี้ยงในอาหาร TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเมื่อครบกำหนดทำการเจือจางให้แต่ละแบคทีเรียปริมาณเท่ากับ 10^3 CFU/mL. จากนั้นจึงแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมดมาผสมกันแล้วเติมในเต้าหู้แผ่นปริมาตร 1 มิลลิลิตรต่อกิโลกรัม

3.2.8 การทดสอบทางด้านจุลชีววิทยา

นำตัวอย่างใส่ถุงตีบดตัวอย่าง แล้วใส่ peptone salt solution 90 มิลลิลิตร จากนั้นตีบดด้วยความเร็วสูงสุดเป็นเวลา 2 นาที แล้วจึงทำการเจือจางลำดับส่วนให้ได้ช่วงที่เหมาะสม แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณจุลินทรีย์เป้าหมาย ได้แก่ total plate count, *B. cereus*, *S. aureus, E. coli, Cr. sakazakii* และ *Y. enterocolitica* บนอาหาร PCA, MYPEA, Baird-Parker, EMB agar, *Enterobacter* agar และ MacConkey agar ตามลำดับ จากนั้นนำอาหาร PCA, Baird-Parker และ EMB agar บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อาหาร MYPEA, *Enterobacter* agar และ MacConkey agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง [36]

3.2.9 การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้จากการทดลองหาค่าความแตกต่างทางสถิติด้วย paired sample test ที่ $P < 0.05$ โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS statistic เวอร์ชัน 24.0

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคจากอาหารหมักดอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากอาหารหมักดองพื้นบ้านของไทยทั้งหมด 50 ตัวอย่าง ซึ่งแบ่งออกเป็นอาหารกลุ่มเนื้อสัตว์ กลุ่มผัก กลุ่มผลไม้และกลุ่มธัญพืช จำนวน 18, 17, 10 และ 5 ตัวอย่างตามลำดับ โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคได้ทั้งสิ้น 464 สายพันธุ์ ตามภาคผนวก ค. ซึ่งจากแบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมดที่คัดแยกได้มีเพียง 343 สายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ คิดเป็นร้อยละ 73.92 โดยใช้จุลินทรีย์ในการทดสอบการยับยั้งได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* และ *Cronobacter sakazakii* ซึ่งแบ่งตามความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดังนี้

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 4 สายพันธุ์ (*B. cereus*, *S. aureus*, *Y. enterocolitica* และ *Cr. sakazakii*) จำนวน 65 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 19.0

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 3 สายพันธุ์ (*B. cereus*, *S. aureus* และ *Y. enterocolitica*) จำนวน 111 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 32.4

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 3 สายพันธุ์ (*B. cereus*, *Cr. sakazakii* และ *Y. enterocolitica*) จำนวน 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 0.3

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 3 สายพันธุ์ (*B. cereus*, *Cr. sakazakii* และ *S. aureus*) จำนวน 8 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 2.4

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 3 สายพันธุ์ (*B. cereus*, *Y. enterocolitica* และ *Cr. sakazakii*) จำนวน 6 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 2.0

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 3 สายพันธุ์ (*S. aureus*, *Y. enterocolitica* และ *Cr. sakazakii*) จำนวน 21 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 6.1

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 2 สายพันธุ์ (*B. cereus* และ *Y. enterocolitica*) จำนวน 11 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 3.2

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 2 สายพันธุ์ (*B. cereus* และ *S. aureus*) จำนวน 7 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 2.1

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 2 สายพันธุ์ (*Y. enterocolitica* และ *S. aureus*) จำนวน 41 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 12.0

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 2 สายพันธุ์ (*Y. enterocolitica* และ *Cr. sakazakii*) จำนวน 1 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 0.3

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 2 สายพันธุ์ (*S. aureus* และ *Cr. sakazakii*) จำนวน 15 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 4.4

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 1 สายพันธุ์ (*S. aureus*) จำนวน 38 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 11.1

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 1 สายพันธุ์ (*B. cereus*) จำนวน 8 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 2.33

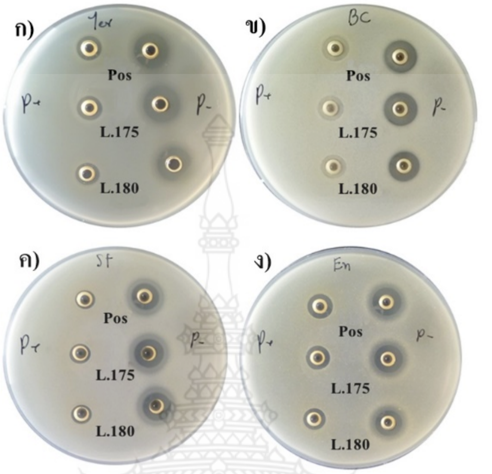
แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 1 สายพันธุ์ (*Y. enterocolitica*) จำนวน 5 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 1.5

แบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถยับยั้งได้ 1 สายพันธุ์ (*Cr. sakazakii*) จำนวน 5 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 1.5

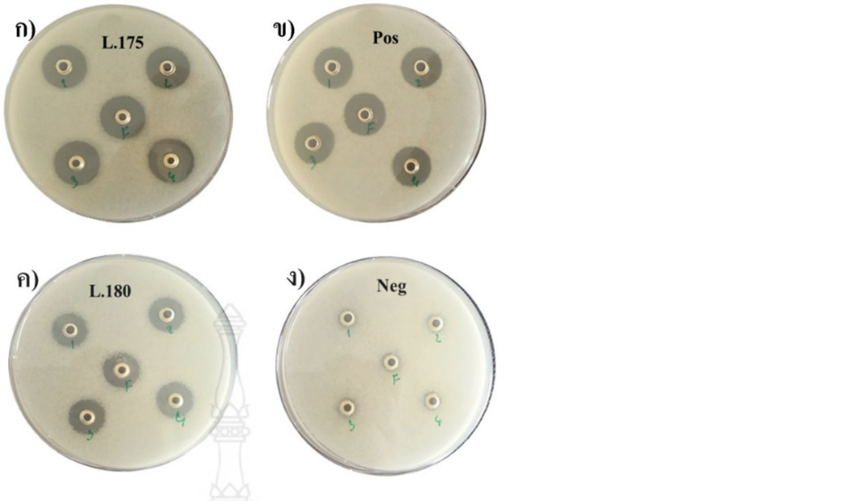
4.2 ผลการทดสอบยืนยันคุณสมบัติบางประการของ cell-free supernatant ของแบคทีเรียกรดแลคติค

จากการที่ได้มีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการเพื่อเป็นการยืนยันในเบื้องต้นถึงคุณสมบัติการเป็นโปรตีนของแบคเทอริโอซิน โดยคุณสมบัติแรกที่ทดสอบยืนยันคือความมีสมบัติเป็นโปรตีน พบว่า เมื่อมีการเติมเอนไซม์ Proteinase K ลงไปในชุดทดสอบและมีการบ่มตามสภาวะที่กำหนด และทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion จะปรากฏให้เห็นกิจกรรมการยับยั้งที่หายไปจากแบคเทอริโอซินที่มีการเติมเอนไซม์ Proteinase K ซึ่งสามารถนำมาเป็นผลเพื่อยืนยันถึงการมีคุณสมบัติที่เป็นโปรตีน และคุณสมบัติในแง่การทนต่ออุณหภูมิสูง โดยในการทดสอบใช้อุณหภูมิในการทดสอบที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสูงสุด 30 นาที พบว่า กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายนั้นยังคงมีอยู่ในระดับที่ไม่มีความเปลี่ยนแปลงในแง่ของการเกิดโซนยับยั้งในการทดสอบ ซึ่งตรงตามคุณสมบัติในแง่ของการทนต่ออุณหภูมิที่สูง และเมื่อทำการทดสอบการทนต่ออุณภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งเป็นเวลา 7 วัน พบว่ากิจกรรม

การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มียังมีค่าที่ใกล้เคียงกับชุดควบคุมซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์ที่คัดเลือกสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ต่ำกว่าจุดเยือกแข็งได้เช่นกัน



รูปที่ 4.1 ผลการทดสอบยืนยันคุณสมบัติความเป็นโปรตีน โดยการเติมเอนไซม์ Proteinase K ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (P+) และชุดควบคุม (P-) เมื่อทดสอบกับ CFS จาก *Lactococcus lactis* (Pos), *Lactobacillus plantarum* L.175 (L. 459) และ *Lactobacillus plantarum* L.180 (L. 464) โดยใช้แบคทีเรียก่อโรคเป็นดัชนีชี้วัดได้แก่ *Y. enterocolitica* (ก.) *B. cereus* (ข.) *S. aureus* (ค.) และ *Cr. sakazakii* (ง.)

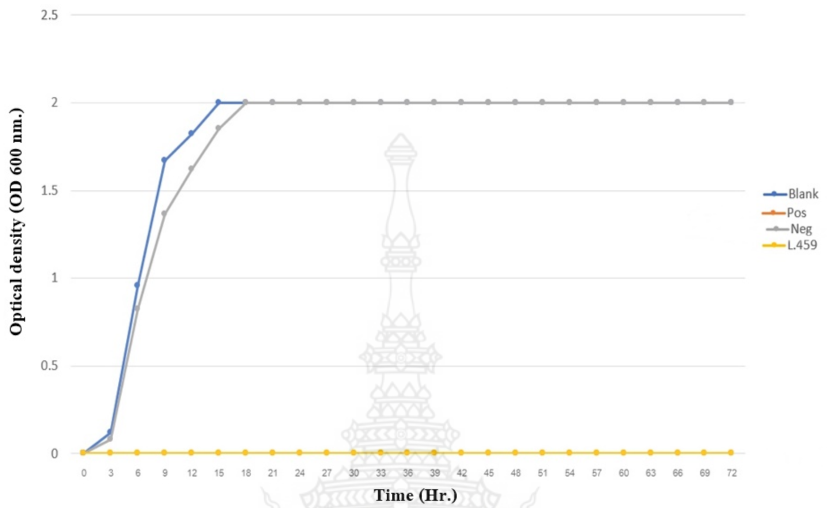


รูปที่ 4.2 ผลการทดสอบความทนต่ออุณหภูมิสูง (95 องศาเซลเซียส) ระยะเวลา 10 นาที (1), 15 นาที (2), 20 นาที (3) และ 30 นาที (4) และอุณหภูมิเยือกแข็ง (0 องศาเซลเซียส) ระยะเวลา 7 วัน (F) เมื่อทดสอบกับ CFS จาก *Lactobacillus plantarum* L.175 (L. 459; ก.), *Lactococcus lactis* (Pos; ข.) , *Lactobacillus plantarum* L. 180 (L. 464; ค.) และ LAB ที่ไม่ให้ผลการยับยั้ง (Neg; ง.)

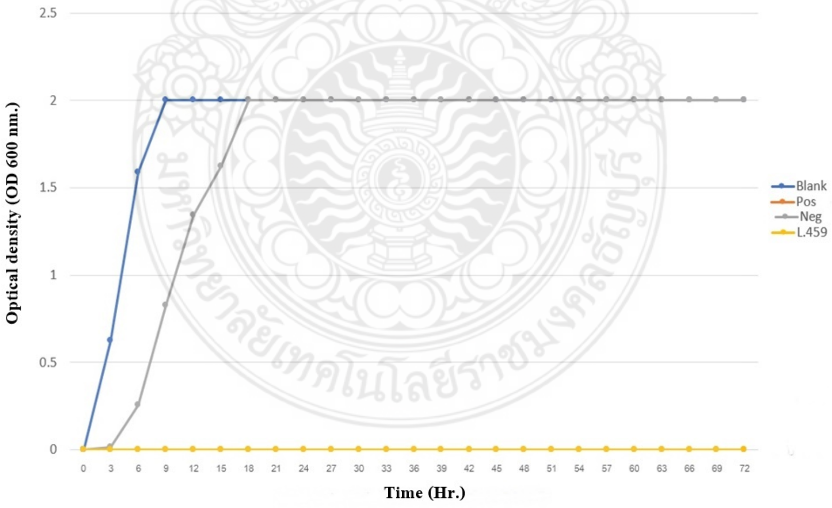
4.3 ผลการทดสอบความสามารถของ cell-free supernatant ที่คัดเลือกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในสภาวะควบคุม

จากการทดสอบการใช้ CFS จากแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกไว้ ทำการผสมในอาหาร 2X BHI และได้เติมจุลินทรีย์ก่อโรคและวัดผลในการเจริญ พบว่า ชุดควบคุมมีการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์มีการเจริญตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดสอบและมีอัตราการเจริญที่เพิ่มอย่างต่อเนื่อง ซึ่งผลแสดงในแนวโน้มเช่นเดียวกับชุดการทดสอบ Neg ซึ่งมีการเจริญในช่วงตั้งแต่หลังชั่วโมงที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งแตกต่างจากชุดทดลองอื่น โดยตั้งแต่ชั่วโมงแรกของการทดลองจนกระทั่งชั่วโมงที่ 72 ของการทดลอง ไม่มีการปรากฏการเพิ่มจำนวนของเซลล์ของแบคทีเรีย ซึ่งเมื่อทำการนำตัวอย่างสารละลายในชุดทดลองมาทำการเพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA จะไม่พบการเจริญของ *S. aureus*, *Y. enterocolitica* และ *Cr. sakazakii* แต่มีการพบการเจริญในชุดของการทดสอบที่มีการเติม *B. cereus* ซึ่งแสดงได้ว่าแบคเทอริโอซินที่มาอยู่ใน CFS สามารถยับยั้งการเจริญและฆ่าจุลินทรีย์ทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ แต่เนื่องจาก *B. cereus* อยู่ในรูปของเอนโดสปอร์ ซึ่งแบคเทอริโอซินสามารถทำลายในส่วนของผนังเซลล์ของ

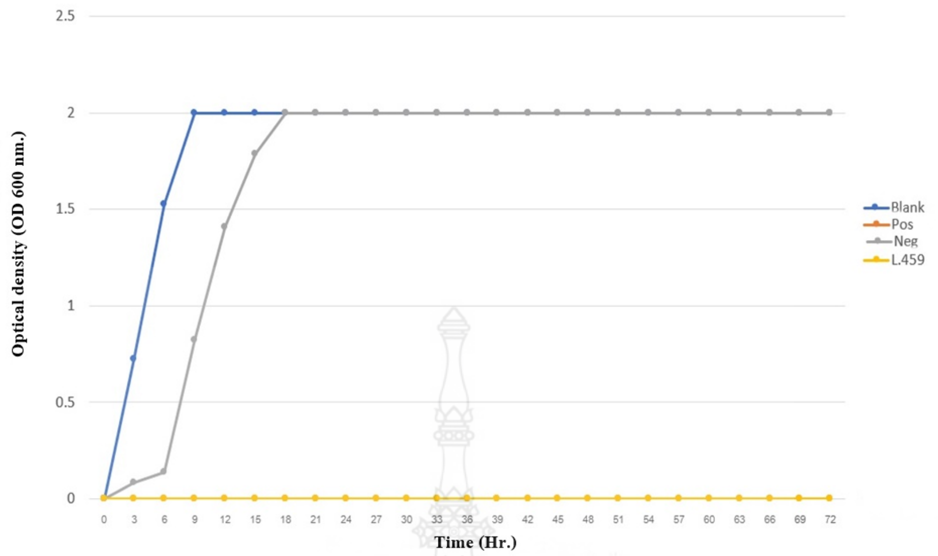
แบคทีเรียได้ แต่ไม่สามารถทำให้เอนโดสปอร์ของแบคทีเรียเกิดความเสียหายซึ่งเป็นการฆ่าจุลินทรีย์ที่สร้างเอนโดสปอร์ได้



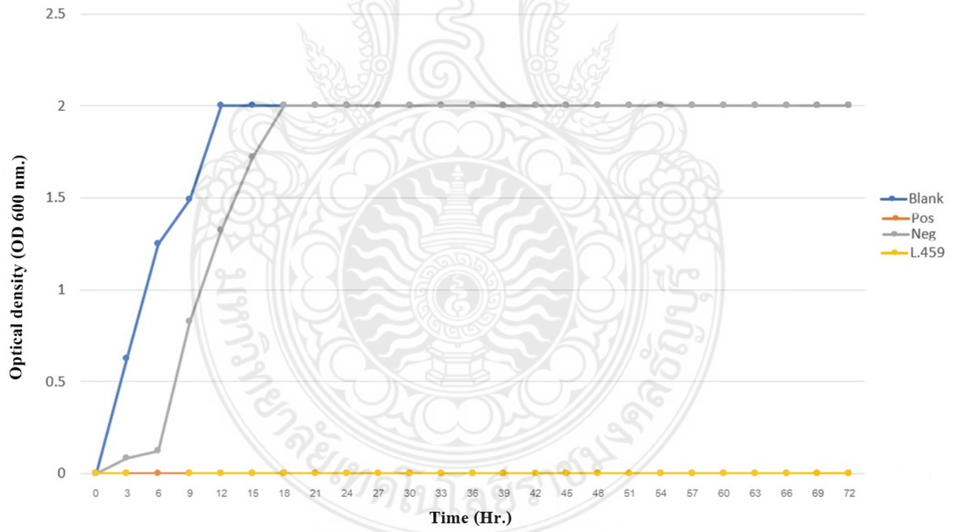
รูปที่ 4.3 การเจริญของ *Bacillus cereus* ในสภาวะควบคุมด้วยความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50% ของ CFS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.4 การเจริญของ *Staphylococcus aureus* ในสภาวะควบคุมด้วยความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50% ของ CFS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.5 การเจริญของ *Cronobacter sakazakii* ในสภาวะควบคุมด้วยความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50% ของ CFS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที



รูปที่ 4.6 การเจริญของ *Yersinia enterocolitica* ในสภาวะควบคุมด้วยความเข้มข้นสุดท้ายที่ 50% ของ CFS อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่า 150 รอบต่อนาที

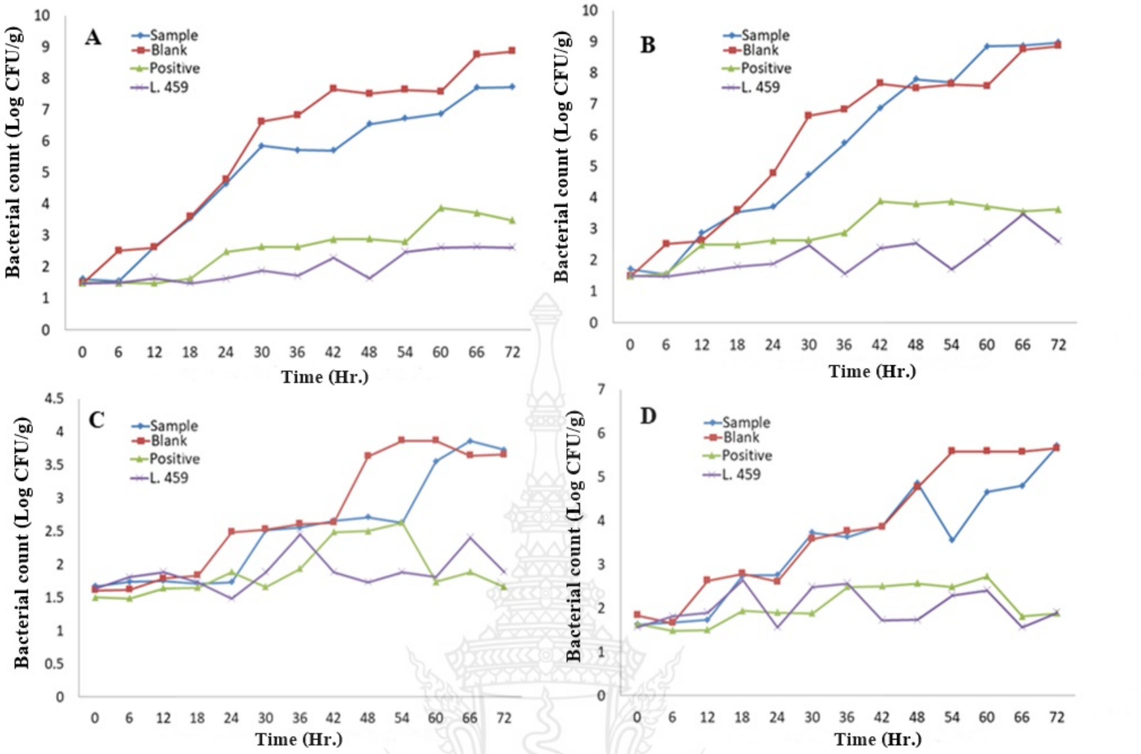
4.4 การหาค่าความเข้มข้นต่ำสุด cell-free supernatant ที่สามารถยับยั้งการเจริญและกำจัดแบคทีเรียก่อโรคบางสายพันธุ์

จากการคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินที่ดีที่สุดแล้วได้ทำการเพาะเลี้ยง จากนั้นนำ CFS ที่ได้ทำการทดสอบค่า MIC และ MBC ต่อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ได้แก่ *S. aureus*, *Y. enterocolitica*, *Cr. Sakazakii* และ *B. cereus* (รูปแบบเอนโดสปอร์และเซลล์ปกติ) พบว่า สายพันธุ์ L.175 มีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ต่อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ แต่แบคเทอริโอซินที่อยู่ในรูป CFS ไม่สามารถกำจัด *B. cereus* ที่อยู่ในรูปแบบของเอนโดสปอร์ได้ L.180 มีค่า MIC และ MBC อยู่ที่ 12.5 และ 25 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร ต่อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ และแบคเทอริโอซินที่นำไปผ่านกระบวนการ spray dry โดยมีการใช้ maltodextrin ปริมาณคิดเป็นร้อยละ 10 (w/v) ของปริมาตร CFS ที่นำมาผ่านกระบวนการเพื่อการทำให้เป็นผงได้อย่างสมบูรณ์พบว่า กิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคของ CFS จากแบคทีเรียกรดแลคติคทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยค่า MIC ของแบคทีเรียกรดแลคติครหัสL.459 (L.175 เดิม) และ L. 464 (L.180 เดิม) มีค่าอยู่ที่ 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรของทั้ง 2 สายพันธุ์ ซึ่ง CFS ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากทั้ง 2 สายพันธุ์นี้และที่อยู่ในรูปแบบของเหลวและแบบผงแห้งไม่สามารถกำจัด *B. cereus* ที่อยู่ในรูปแบบของเอนโดสปอร์ได้เช่นกัน เนื่องจากแบคเทอริโอซินนั้นจะมีกลไกในการทำลายในส่วนของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกได้เป็นอย่างดี แต่ผนังของเอนโดสปอร์นั้นมีโครงสร้างที่มีความแตกต่างกับโครงสร้างของผนังเซลล์ ซึ่งไม่มีส่วนที่เป็นตัวรับกับแบคเทอริโอซิน

4.5 การประยุกต์ใช้แบคเทอริโอซินในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารสด

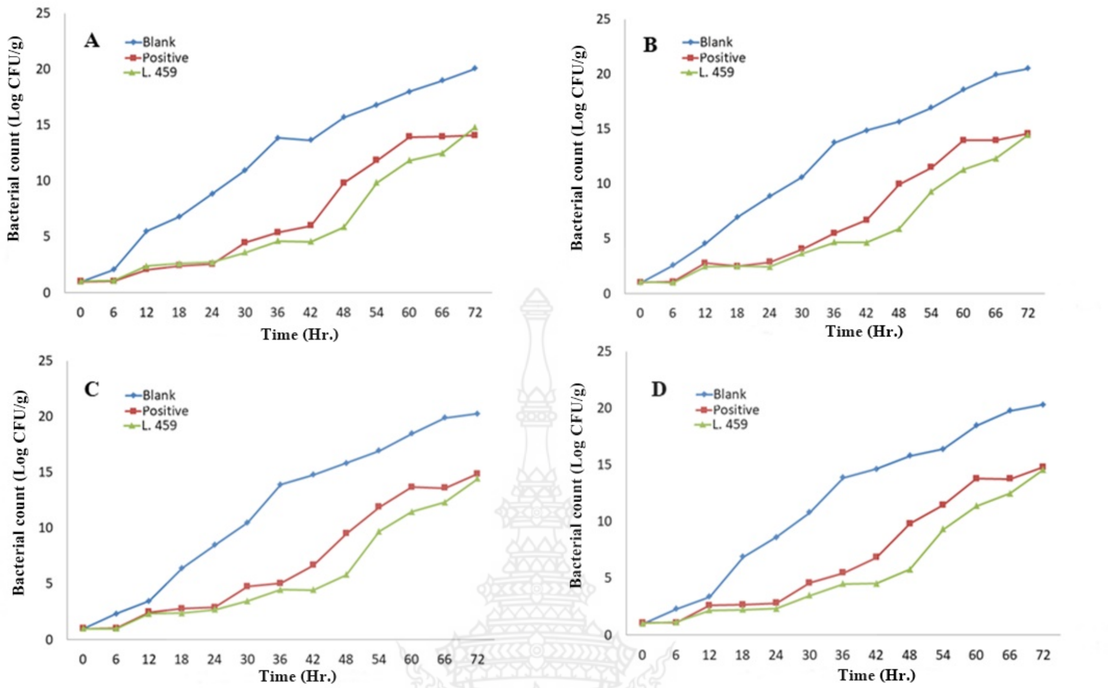
เมื่อนำแบคเทอริโอซินที่อยู่ในรูป CFS ของแบคทีเรียกรดแลคติครหัส L. 459 ทำการทดสอบการยืดอายุการเก็บรักษาของตัวอย่างอาหาร 2 ชนิดได้แก่ เต้าหู้แผ่นและก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ โดยมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ พบว่า ในชุดควบคุม (อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS) ของตัวอย่างอาหารทั้ง 2 ชนิดให้ผลการทดสอบที่สอดคล้องกัน โดยการเน่าเสียของตัวอย่างอาหารทั้ง 2 ชนิดเกิดการเน่าเสียที่

รวดเร็วกว่าตัวอย่างอาหารที่ไม่ผ่านการเติมใดๆ เพิ่มเติม (Blank) ซึ่งเบื้องต้นสรุปได้ว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth เมื่อเคลือบบนตัวอย่างอาหารนั้นจะทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียที่รวดเร็วขึ้น แต่เมื่อมีการนำ CFS ของแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกไว้เคลือบตัวอย่างทดสอบทั้ง 2 ชนิดไว้และได้เติมกล้าเชื้อของแบคทีเรียก่อโรค พบว่าการเจริญและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียที่เป็นเป้าหมายในการทดสอบมีการเพิ่มจำนวนที่ช้ากว่าเมื่อเปรียบเทียบในชุดควบคุมซึ่งจะแสดงให้เห็นจากภาพที่ 4.7 ซึ่งแสดงให้เห็นได้ว่าการเจริญของ *B. cereus*, *S. aureus, Y. enterocolitica* และ *Cr. sakazakii* มีการเพิ่มจำนวนของตัวเซลล์ที่เพิ่มขึ้นในอัตราที่น้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งเริ่มต้นที่แบคทีเรียเริ่มต้นประมาณ 1.5 x 10^1 CFU/ml และเมื่อเปรียบเทียบกับ *Lactococcus lactis* (positive) ก็มีอัตราการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 ได้ในระดับที่ใกล้เคียงกันโดยที่ *Lactobacillus plantarum* (L. 459) มีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดีกว่าเล็กน้อย แต่เมื่อทำการหาค่าความแตกต่างทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95% จึงสรุปได้ว่า CFS ของ *Lb. plantarum* ที่คัดเลือกนั้นสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ในอาหารก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่



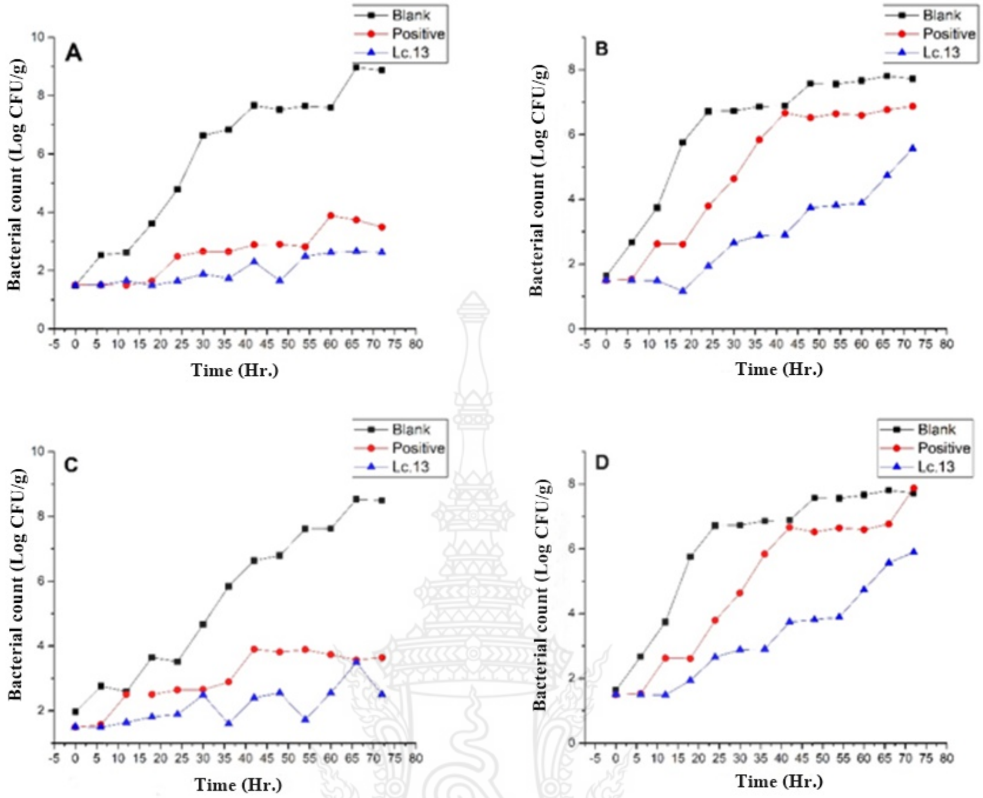
รูปที่ 4.7 การเจริญและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *B. cereus* (A), *S. aureus* (B), *Y. enterocolitica* (C) และ *Cr. sakazakii* (D) ในก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ที่เคลือบด้วย CFS จาก *Lb. plantarum* (L. 459) ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมง

ผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ในตัวอย่างเต้าหู้พบการเจริญในทิศทางกับที่มีการเจริญในตัวอย่างก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ ซึ่งจากรูปที่ 4.7 แสดงให้เห็นถึงกิจกรรมการเจริญที่เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมจะสังเกตได้ว่าการเจริญของแบคทีเรียเป้าหมายมีการยับยั้งการเจริญลงได้แต่เมื่อเปรียบเทียบกับ *Lc. lactis* จะมีความสามารถในการยับยั้งที่ใกล้เคียงกันเมื่อวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างทางสถิติพบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%



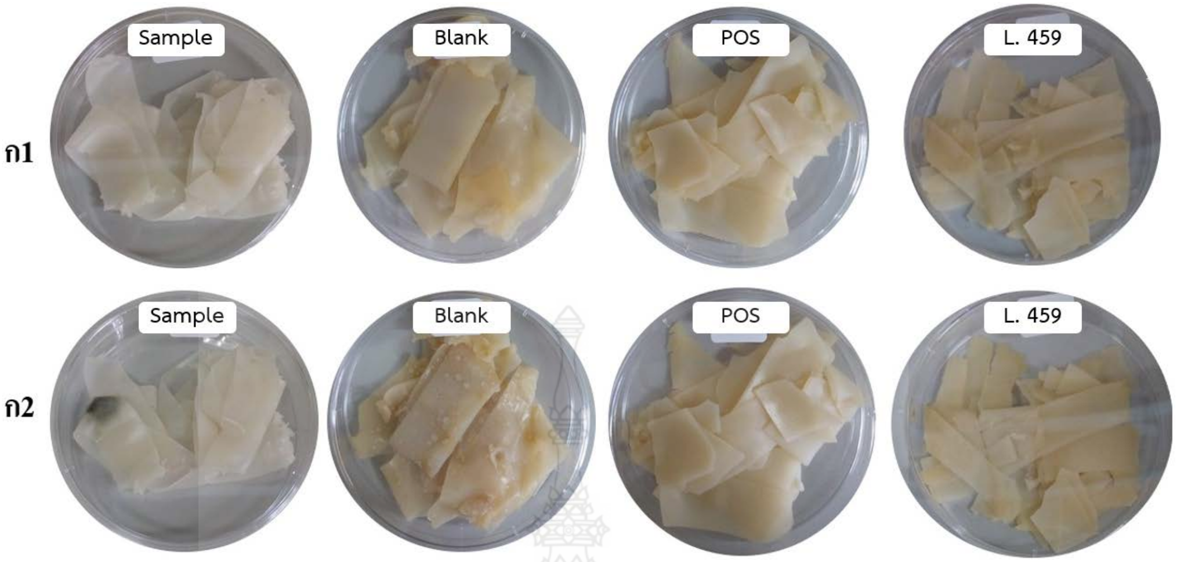
รูปที่ 4.8 การเจริญและการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *B. cereus* (A), *S. aureus* (B), *Y. enterocolitica* (C) และ *Cr. sakazakii* (D) ในเต้าหู้แผ่นที่แช่ด้วย CFS จาก *Lb. plantarum* (L. 459) ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมง

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี



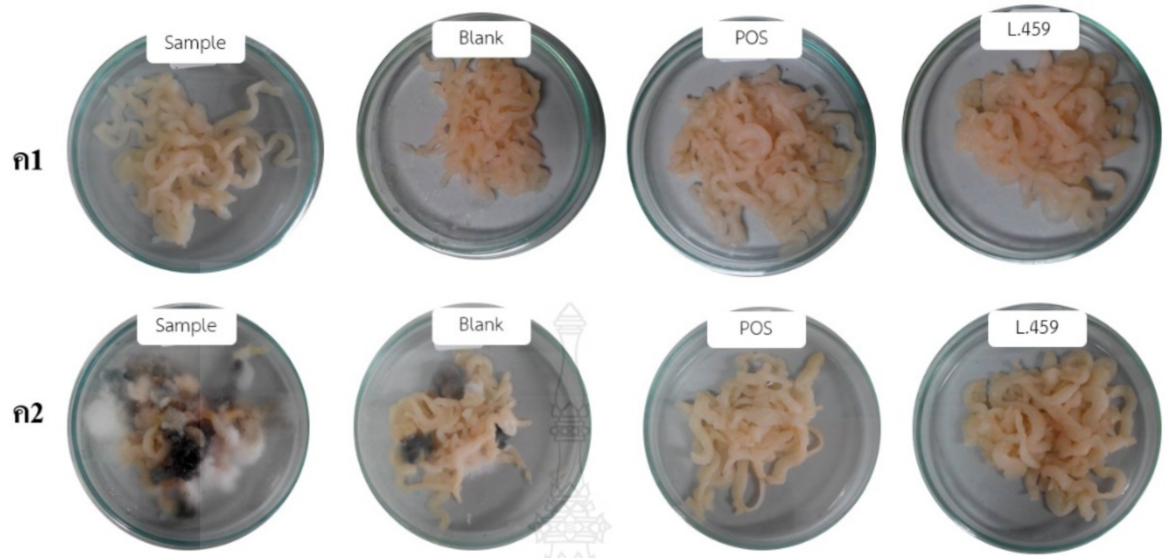
รูปที่ 4.9 การเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ก่อโรคและก่อการเน่าเสียภายใต้สภาวะการยับยั้งของ CFS ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติครหัส Lc.13 ที่คัดเลือกไว้ Total plate count (A), *B. cereus* (B), *S. aureus* (C) และ *E. coli* (D) ตลอดระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการทดลอง

จากรูปที่ 4.9 พบว่า แบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติคจากชุดทดสอบ LC. 13 ความสามารถในการยืดอายุการเก็บรักษาของขมจีนเส้นสดในการทดลองนี้ในเชิงทางชีวภาพโดยมีการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งสามารถยืดระยะเวลาการเน่าเสียไปได้มากกว่าชุดควบคุมและชุดการทดสอบอื่นๆในการทดลอง ได้ระยะเวลา 48 ชั่วโมงของการทดลอง ซึ่งจะเน่าเสียหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการทดลองผ่านไป เริ่มพบการเพิ่มจำนวนของ *B. cereus* แต่ในทางกลับกันพบการลดจำนวนลงของ *S. aureus* และ *E. coli* จำนวนของจุลินทรีย์และการลดลงของจุลินทรีย์ในแต่ละช่วงนั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH และทางกายภาพ ดังรูปที่ 4.10 4.11 และ 4.12



รูปที่ 4.10 ลักษณะทางกายภาพของก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ในเวลาที่ 0 ชั่วโมง (ก1) และ 72 ชั่วโมง (ก2)

รูปที่ 4.11 ลักษณะทางกายภาพของเต้าหู้แผ่นในเวลาที่ 0 ชั่วโมง (ข1) และ 72 ชั่วโมง (ข2)



รูปที่ 4.12 ลักษณะทางกายภาพของขนมจีนเส้นสดในเวลาที่ 0 ชั่วโมง (ค1) และ 72 ชั่วโมง (ค2)

4.6 การระบุสายพันธุ์โดยการหาลำดับทางพันธุกรรม

เมื่อทำการส่งตัวอย่าง DNA ของแบคทีเรียกรดแลคติครหัส L.13 และ L. 459 ทำการหาลำดับทางพันธุกรรม เพื่อการวิเคราะห์สายพันธุ์เมื่อทำการวิเคราะห์ด้วย Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) ในฐานข้อมูล NCBI พบว่า มีความใกล้เคียงกับสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* เท่ากับ 99%

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นเมืองของไทยและตัวอย่างวัตถุดิบอาหารของไทยทั้งสิ้น 50 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคได้ทั้งสิ้น 464 สายพันธุ์ ซึ่งจากจำนวนสายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีเพียง 65 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินได้ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 19.00 ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 4 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทดสอบได้ จากนั้นได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญได้ดีที่สุดคือ L.459 จากการยับยั้งในตัวอย่างเต้าหู้แผ่นและก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ และ L.13 จากการยับยั้งในขนมจีนเส้นสด และเมื่อทำการทดสอบการยับยั้งในตัวอย่างอาหารที่ผลิตขึ้นในห้องปฏิบัติการเพื่อใช้ในการทดสอบครั้งนี้ซึ่งได้แก่ เต้าหู้แผ่นและก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ พบว่าแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์ L.459 และ L.13 มีความสามารถยับยั้งการเน่าเสีย การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคและการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของตัวอย่างอาหารได้เป็นอย่างดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับชุด Positive control จะแสดงผลที่ไม่แตกต่างกัน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกมานั้นมีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและก่อการเน่าเสียที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับแบคทีเรียกรดแลคติคที่ใช้อ้างอิง ซึ่งจากการวิเคราะห์ลำดับทางด้านพันธุกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติคทั้ง 2 สายพันธุ์ พบว่า ทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus plantarum*

ซึ่งในอนาคตควรมีการนำไปศึกษาต่อยอดงานวิจัยในเรื่องการสารถนอมอาหารทางชีวภาพเพื่อให้เป็นส่วนหนึ่งของของการพัฒนาความปลอดภัยทางอาหารในระดับภาคอุตสาหกรรมที่มีความปลอดภัยและลดการใช้สารถนอมอาหารเชิงเคมีเพื่อสุขภาพของผู้บริโภคที่สมบูรณ์

บรรณานุกรม

[1] ณัฐพันธุ์ ศุภกา. 2555. แบคเทอริโอซินสารจากธรรมชาติสำหรับการถนอมอาหารเพื่อสุขภาพ. innolab magazine. 39 : 28-32.

[2] V. Ahmad, M. S. Khan, Q. M. S. Jamal, M. A. Alzohairy, M. A. A. Karaawi, M. U.Siddiqui. 2017. Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. India. International Journal of Antimicrobial Agents 49 : 1-11.

[3] Jiang, J., Shi, B., Zhu, D., Cai, Q., Chen, Y., Li, J., Qi, K., Zhang, M. 2012. Characterization of a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* LSJ618 isolated from traditional Chinese fermented radish. China. Food Control 23 : 338-344.

[4] Liu, G., R, L., Song, Z., Wong, C., Sun, B. 2015. Purification and characteristics of bifodocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animals* BB04 from centenarians intestine. China. Food control 50 : 889-895.

[5] Pringsulaka, O., Thongngam, N., Suwannasai, N., Atthakor, W., Pothivejkul, K., Rangsiruji, A. 2012. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. Thailand. Food Control 23 : 547-551.

[6] Sonsa-Ard, N., Rodtong, S., Chikindas, M. L., Yongsawatdigul, J. 2015. Characterization of bacteriocin produced by Enterococcus faecium CN-25 isolated from traditionally Thai fermented fish roe. Thailand. Food Control 54 : 308-316.

[7] Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiology 87: 149-164

[8] Davidson, P.M. and Hoover. D.G. 1993. Antimicrobial components from lactic acid bacteria,. *In* S. Salminen and A. V. Wright, eds. Lactic Acid Bacteria. Marcel Dekker, Inc., New York. pp 127–160

บรรณานุกรม (ต่อ)

[9] Ouwehand A. C. and Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, *In* S. Salminen, A. Von Wright and A. Ouwehand, eds. Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects. Marcel Dekker, Inc., New York. pp. 375–395.

[10] Hauser, C., Thielmann, J., Muranyi, P. 2016. Antimicrobial Food Packaging. Elsevier. London. 646 pp.

[11] De Vuyst, L. and E.J. Vandamme. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, *In* L.D. Vuyst and E.J. Vandamme, eds. Bactreiocin of Lactic Acid Bacteria. Chapman and Hall, Glasgow, UK. pp. 91-142.

[12] Tramer, J. 1966. Inhibitiory effect of *Lactobacillus acidophilus*. Nature. 211: 204-205.

[13] Rubin, H. E. 1978. Taxicological model for a two-acid system. Applied and Environmental Microbiology 36: 623-624.

[14] Adams, M. R. and Hall, C. J. 1988. Growth inhibition of food borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. International Journal of Food Science & Technology. 23: 287-292.

[15] Fontaine E.A., Clajdon, E., Tayler-Robinson, D. 1996. Lactobacilli from women with without bacterial vaginosis and observation on the significance of hydrogen peroxide. Current Mirobiology. 60: 253-260.

[16] Byczkowski, J. and Gessner, T. 1988. Biological role of superoxide ion-radical. International Biochemistry. 20: 569–580.

[17] Price, R. J. and Lee, J. S. 1970. Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. Journal of Milk and Food Technology. 33: 13-18.

[18] Wagner, M. K. and Moberg, L. J. 1989. Present and future use of traditional antimicrobials. Food Technology. 43: 143–147.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[19] Hugenholtz, J. 1993. Citrate metabolism in lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Rev. 12: 165-178.

[20] Ferrari, I. S., Souza, J. V., Ramos, C. L., Costa, M. M., Schwan, R. F., Dias, F. S. 2016. Selection of autochthonous lactic acid bacteria from goat dairies and their addition to evaluate the inhibition of *Salmonella typhi* in artisanal cheese. Brazil. Food Microbiology 60 : 29-38.

[21] Garneau, S., N. I. Martin and J. C. Vederas. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie. 84: 577–592

[22] อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว 23 (2) : 145-160.

[23] Swetwawathana, A. and Visessanguan W. 2015. Potentail of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. Thailand. Meat science 109 : 101-105.

[24] Malheiros, P. S., Cuccovia I, M., Franco B. D.G.M. 2016. Inhobition of *Listeria monocytocynes in vitro* and in goat milk by liposomal nanovesicle containing bacteriocin produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sake*i 2a. Brazil. Food control 63 : 158-164.

[25] Budde, B. B., Hornbaek, T., Jacobsen, T., Barkholt, V., and Koch, A. G. 2003. *Leuoconostoc carnosum* 4010 has the Potential for Use as a Protective Culture for Vacuum-Packed Meats: Culture Isolation, Bacteriocin Identification, and Meat Application Experiments. Denmark. International Journal of Food Microbiology 83: 171-184.

[26] Bello, B. D., Cocolin, L., Zeppa, G., Field, D., Cotter, P. D., Hill, C. 2012. Technological characterization of bacteriocin producing *Lactococcus lactis* strains employed to control *Listeria monocytogenes* in Cottage cheese. Italy. International Journal of Food Microbiology 153 : 58-65.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[27] Ananchaipattana, C., Hosotani, Y., Kawasaki, S., Inatsu, Y. 2012. Bacterial Contamination of Soybean Curd (Tofu) Sold in Thailand. Japan. Food Science and Technology Research 18 : 843-848.

[28] Noriega-Medrano, L. J., Vega-Estrada, J., Ortega-López, J., Ruiz-Medrano, R., Cristiani-Urbina, E., Montes-Horcasitas, M. C. 2016. Alternative non-chromatographic method for alcohols determinationin *Clostridium acetobutylicum* fermentations. Mexico. Journal of Microbiological Methods 126 : 48-53.

[29] Leis, B., Angelov, A., Li, H., Liebl, W. 2014. Genetic analysis of lipolytic activities in Thermus thermophilus HB27. Germany. Journal of Biotechnology 191 : 150-157.

[30] Pingitore, E. V., Todorov S. D., Sesma, F., Franco, B. D. G. M. 2012. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. Brazil. Food Microbiology 32 : 38-47.

[31] Chen, C., Rui, X., Lu, Z., Li, W., Dong, W. 2014. Enhanced Shelf-Life of Tofu Using Bacteriocin *Weissella hellenica* D1501 as Bioprotective Culture. China. Food Control 46 : 203-209.

[32] Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Ivanova, I., Chobert, J. M., Haertl, T., Franco, B. D. G. 2015. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. Brazil. Food Microbiology 46 : 254-262.

[33] Gao, Y., Li, D., Liu, X., 2015. Effects of *Lactobacillus sakei* C2 and sakacin C2 individually or in combination on the growth of *Listeria monocytogenes*, chemical and odor changes of vacuum-packed sliced cooked ham. China. Food Control 47 : 27-31.

บรรณานุกรม (ต่อ)

[34] Kittikun, A. H., Biscola, V., Ghaish, S. E., Jaffrès, E., Dousset, X., Pillot, G., Haertlé, T., Chobert, J. M., Hwanhlem, N. 2015. Bacteriocin-producing *Enterococcus faecalis* KT2W2G isolated from mangrove forests in southern Thailand: Purification, characterization and safety evaluation. Thailand. Food Control 54 : 126-134.

[35] Liu, W., Zhang, L., Shi, J., Yi, H., Zhang Y., Zhang, S., Gao, W., Du, M., Han, X., Yu, X. 2015. Assessment of the safety and application of bacteriocinogenic *Enterococcus Faecium* Y31 as an adjunct culture in North-eastern Chinese traditional fermentation paocai. China. Food Control 50 : 637-644.

[36] Miao, J., Guo, H., Ou, Y., Liu, G., Fang, X., Liao, Z., Ke, C., Chen, Y., Zhao, L., Cao, Y. 2014. Purification and characterization of bacteriocin F1, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan kefir, a traditional fermented milk from Tibet, China. China. Food Control 42 : 48-53.

.

ภาคผนวก ก.
สูตรการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Lactobacillus MRS broth/ MRS agar

<u>ส่วนประกอบ</u>

Proteose peptone	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2	กรัม
Polysorbate 80	1	กรัม
Agar	10	กรัม (ในกรณีเตรียม MRS agar)

<u>วิธีเตรียม</u>

1. ชั่งอาหาร 55.15 กรัม (เนื่องจากการทดลองใช้อาหารสำเร็จ) ผสมกับน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร
2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. บรรจุลงขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหรือบรรจุภัณฑ์เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อ
4. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Plate Count Agar (PCA)

<u>ส่วนประกอบ</u>

Tryptone	5	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Dextrose	1	กรัม
Agar	15	กรัม

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหาร 23.5 กรัม (เนื่องจากในการทดลองใช้อาหารสำเร็จ) ผสมกับน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. บรรจุลงขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหรือบรรจุภัณฑ์เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อ

4. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. MYP Agar

ส่วนประกอบ

Agar	15	กรัม
Beef extract	1	กรัม
Peptic digest of animal tissue	10	กรัม
D-Mannitol	10	กรัม
Sodium chloride	10	กรัม
Phenol Red	0.025	กรัม

วิธีเตรียม

1. ผสมกับน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 900 มิลลิลิตร

2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. บรรจุลงขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหรือบรรจุภัณฑ์เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อ

4. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. ลดอุณหภูมิอาหารให้อยู่ประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเติม Sterile Egg yolk solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน

4. Eosin Methylene Blue Agar (EMB Agar)

ส่วนประกอบ

Peptone	10.0	กรัม
Agar	13.5	กรัม
Lactose	5.0	กรัม
Sucrose	5.0	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.0	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene blue	0.065	กรัม

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหาร 35.96 กรัม (เนื่องจากการทดลองใช้อาหารสำเร็จ) ผสมกับน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร
2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. บรรจุลงขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหรือบรรจุภัณฑ์เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อ
4. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. MacConkey agar

ส่วนประกอบ

Peptones (meat and casein)	3.0	กรัม
Pancreatic digest of gelatin	17.0	กรัม
Lactose monohydrate	10.0	กรัม
Bile salts	1.5	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Neutral red	0.03	กรัม
Agar	13.5	กรัม

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหาร 49.53 กรัม (เนื่องจากการทดลองใช้อาหารสำเร็จ) ผสมกับน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร
2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. บรรจุลงขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหรือบรรจุภัณฑ์เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อ
4. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Enterobacter sakazakii Agar (Merck)

ส่วนประกอบ

ไม่ระบุ

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหาร 24.6 กรัม (เนื่องจากการทดลองใช้อาหารสำเร็จ) ผสมกับน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร
2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. บรรจุลงขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหรือบรรจุภัณฑ์เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อ
4. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

7. **Tryptic Soy Broth (TSB)/ Tryptic Soy Agar (TSA)**

ส่วนประกอบ

Tryptone (Pancreatic Digest of Casein)	17.0	กรัม
Soytone (Peptic Digest of Soybean)	3.0	กรัม
Glucose	2.5	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.5	กรัม
Agar	15.0	กรัม (เติมในกรณีเตรียม TSA)

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหาร 30.0 กรัม (เนื่องจากการทดลองใช้อาหารสำเร็จ) ผสมกับน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร หาก เตรียม TSA ให้เติม agar 15.0 กรัม

2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. บรรจุลงขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหรือบรรจุภัณฑ์เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อ

4. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Brain Heart Infusion Broth (BHI broth)

ส่วนประกอบ

Peptic digest of animal tissue	10.0	กรัม
Calf brain, infusion (solids)	12.5	กรัม
Beef heart, infusion (solids)	5.0	กรัม
Dextrose	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Disodium phosphate	2.5	กรัม

วิธีเตรียม

1. ชั่งอาหาร 37.0 กรัม (เนื่องจากการทดลองใช้อาหารสำเร็จ) ผสมกับน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร หาก ต้องการเตรียม 2X BHI ชั่งอาหาร 74.0 กรัม (เนื่องจากการทดลองใช้อาหารสำเร็จ) ผสมกับน้ำและปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร

2. ต้มจนเดือด หรือใช้ไมโครเวฟ คนให้อาหารละลายเป็นเนื้อเดียวกัน

3. บรรจุลงขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อหรือบรรจุภัณฑ์เพื่อนึ่งฆ่าเชื้อ

4. ทำอาหารให้ปราศจากเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข.

วิธีการทดสอบย่อยที่เกี่ยวข้อง

วิธีภาคผนวก ข1 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคบริสุทธิ์เพื่อใช้ในการทดสอบ

1. ใช้ไม้แหลมที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วมาเก็บเชื้อที่ผ่านการทดสอบในข้อ 3.3 ทางทำการเก็บลงใน microtube ที่บรรจุ MRS broth+0.3% CaCO3 ปริมาตร 700 ไมโครลิตร
2. บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 °C เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง
3. เติม 80% glycerol ปริมาตร 300 ไมโครลิตร แล้วทำการกลับ microtube
ขึ้น-ลง ประมาณ 10 ครั้งจนสารผสมกันดี
4. นำไปเก็บในตู้อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80°C

วิธีภาคผนวก ข2 การสกัด DNA จากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคและการหาลำดับนิวคลิโอไทล์ที่ต้องการ

1 นำเชื้อแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคจาก เพาะเลี้ยงในหลอด microtube ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร
2. บ่มที่อุณหภูมิ 30±1 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24±2 ชั่วโมง
3. นำไปแช่ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง
4. เก็บเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง Microcentrifuge ที่ความเร็ว 10,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแยกเก็บเฉพาะตะกอนเซลล์
5. กระจายตะกอนเซลล์ในสารละลาย TE buffer ปริมาตร 570 ไมโครลิตรที่มี Lysozyme เข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรผสมให้เข้ากันบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
6. เติมสารละลาย 10% SDS ปริมาตร 30 ไมโครลิตร และ Proteinase K 20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
7. เติมสารละลาย Chloroform ปริมาตร 1 เท่าของสารในหลอดทั้งหมด เขย่าให้เข้ากันแล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที
8. ดูดสารละลายชั้นน้ำ ซึ่งอยู่ส่วนบนออกใส่ลงใน microtube หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ตะกอนขาวของโปรตีนในชั้น interphase ติดขึ้นมา
9. เติมสารละลาย phenol/chloroform (1:1) ปริมาตร 1 เท่าของสารละลายชั้นน้ำที่นำมา ผสมให้เข้ากัน
10. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วดูดสารละลายส่วนบนใส่หลอดใหม่
11. เติม 5M NaCl ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน
12. เติม isopropyl alcohol ปริมาตร 0.6 เท่าของปริมาตรสารละลายที่มีอยู่ ผสมให้เข้ากันโดยการกลับหลอดไปมา เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ จากนั้นนำไปแช่ที่ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

13. ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้ง

14. เติม 70% ethanol ปริมาตร 1 เท่า จากนั้นน าไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งและทำซ้ำอีกครั้งแล้วปล่อยให้ตะกอนของดีเอ็นเอแห้ง

15. ละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วย TE buffer ปริมาตร 50 ไมโครลิตร

16. นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

17. ทำการส่งตะกอนดีเอ็นเอที่ได้พร้อมกับไพรเมอร์ยีนส์ที่ต้องการไปทดสอบที่สถาบันที่รับทำการทดสอบเพื่อระบุชนิด

วิธีภาคผนวก ข3 การยืนยันแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติค

1 เตรียมเชื้อก่อโรคและก่อการเน่าเสียได้แก่ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica* และ *Cronobacter sakazakii* จำนวน 1 โคโลนี ใส่ในอาหาร TSB ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 150 rpm. เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

2 เตรียมแบคเทอริโอซินโดย การเติมแบคทีเรียแลคติคใส่ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วนำไปทำการแยกเซลล์จากสารละลายส่วนใส (supernatant)

3. นำสารละลายส่วนใสไปปรับค่า pH ให้มีค่าเท่ากับ 5.0 โดยใช้ 0.05M NaOH

4. นำไปต้มที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5. นำเชื้อก่อโรคที่เตรียมไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาเติมลงในอาหาร TSA ที่มี 0.75% Agar ปริมาตร 99 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วผสมให้เข้ากัน

6. ถ่ายอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมแบคทีเรียก่อโรคและก่อการเน่าเสียลงในจานเพาะเชื้อปริมาตร 25 มิลลิลิตรและเมื่ออาหารแข็งตัวแล้วท าการเจาะวุ้นขนาด 6 มิลลิเมตร จ านวน 5 รูต่อจานเพาะเชื้อ

7. นำแบคเทอริโอซินจากข้อ 3.2.5.2 เติมลงในหลุมบนจานเพาะเชื้อปริมาตร 80 ไมโครลิตรของทุกแบคทีเรียทดสอบ

8. บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแบบหงายจานเพาะเชื้อ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินทำการทดสอบต่อไป

ภาคผนวก ค.

ตัวอย่างอาหารหมักดองและอาหารสดที่ใช้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติค
เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซิน

ตารางที่ 1 ตัวอย่างอาหารหมักดองและอาหารสดที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติค เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซิน

ลำดับ	ตัวอย่างคัดแยก	สถานที่เก็บ	จำนวนไอโซเลต
1	แหนมหมู (1)	ตลาด บขส.สระบุรี จ.สระบุรี	12
2	แหนมหมู (2)	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	15
3	แหนมหมู (3)	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	16
4	มะยมดอง	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	7
5	มะม่วงดอง (1)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	8
6	องุ่นดอง	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	0
7	แป้งขนมจีนหมัก	ตลาด บขส.สระบุรี จ.สระบุรี	16
8	ผักกาดดอง (1)	ตลาด บขส.สระบุรี จ.สระบุรี	12
9	ผักกาดดอง (2)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	10
10	กะหล่ำปลีดอง	ตลาด บขส.สระบุรี จ.สระบุรี	13
11	แตงกวาดอง (1)	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	12
12	แตงกวาดอง (2)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	4
13	ผักเสี้ยนดอง	ตลาด บขส.สระบุรี จ.สระบุรี	11
14	ปูดองจืด	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	10
15	ปูดองจืด	ตลาด บขส.สระบุรี จ.สระบุรี	10
16	ปูดองเค็ม	ตลาดสดเทศบาลลพบุรี จ.ลพบุรี	10
17	หอยดอง (1)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	10
18	หอยดอง (2)	ตลาดสดเทศบาลลพบุรี จ.ลพบุรี	10
19	น้ำปลาร้าดิบ (1)	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	15
20	น้ำปลาร้าดิบ (2)	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	14
21	น้ำปลาร้าดิบ (3)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	14
22	น้ำปลาร้าดิบ (4)	ตลาดสดเทศบาลลพบุรี จ.ลพบุรี	16
23	ผักกาดดอง (3)	ตลาดสดเทศบาลลพบุรี จ.ลพบุรี	13
24	น้ำปลาร้าสุก (1)	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	12
25	น้ำปลาร้าสุก (2)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	8
26	น้ำปลาร้าสุก (3)	ตลาดสดเทศบาลลพบุรี จ.ลพบุรี	11

ตารางที่ 1 ตัวอย่างอาหารหมักดองและอาหารสดที่ใช้ในการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติค เพื่อทดสอบความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซิน (ต่อ)

ลำดับ	ตัวอย่างคัดแยก	สถานที่เก็บ	จำนวนไอโซเลต
27	ปลาส้ม (ปลาสวาย)	ตลาดสดเทศบาลลพบุรี จ.ลพบุรี	8
28	ปลาส้ม (ปลาช่อน)	ตลาดสดเทศบาลลพบุรี จ.ลพบุรี	11
29	ปลาส้ม (ปลากระดี่)	ตลาดสดเทศบาลลพบุรี จ.ลพบุรี	10
30	กิมจิ	มทร.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี	12
31	มะม่วงดอง (2)	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	0
32	มะม่วงดอง (3)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	5
33	ขิงดอง (1)	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	5
34	ขิงดอง (2)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	4
35	กระเทียมดอง	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	6
36	มะม่วงดอง (4)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	12
37	มะดันดอง (1)	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	5
38	มะดันดอง (2)	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	3
39	ตะลิงปลิงดอง	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	0
40	มะขามดอง	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	2
41	เต้าเจี้ยวสด	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	6
42	เต้าหู้ยี้สด	ตลาดเคหะฯ จ.ปทุมธานี	5
43	มะเขือเปาะดอง	ตลาดเหรียญทอง จ.ปทุมธานี	5
44	ผักรวมดอง	มทร.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี	10
45	ถั่วลิสงหมัก	มทร.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี	12
46	ถั่วเหลืองหมัก	มทร.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี	12
47	ผักบุ้งดอง	มทร.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี	10
48	ดอกกะหล่ำดอง	มทร.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี	10
49	กะหล่ำปลีดอง	มทร.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี	10
50	แตงกวาดอง	มทร.ธัญบุรี จ.ปทุมธานี	12

ภาคผนวก ง.

ผลการยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมักจำนวน 464 สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Yersinia enterocolitica*, *Cronobacter sakazakii* และ *Escherichia coli* โดยวิธี Agar well diffusion

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.001	1.0	1.75	2.5	2.5	2.5
L.002	0	0	0	1	0
L.003	1.0	0	0.75	0	0.75
L.004	2.0	2.0	1.5	0	1.5
L.005	1.5	2.75	1.75	0	1.75
L.006	0.5	0	0.25	3	0.25
L.007	1.75	0	1.25	2.5	1.25
L.008	0	0	0.5	2.5	0.5
L.009	0.5	0	0.875	1	0.875
L.010	0	0	0	2	0
L.011	0.5	0	1.0625	1.5	1.0625
L.012	0	0	0	2	0
L.013	3.25	3.0	3.0	3.0	2.5
L.014	1.625	2.5	1.0	0	1.0
L.015	0.5	0	0.5	0	0.5
L.016	2.25	1.5	1.675	0	1.675
L.017	1.0	0	1.625	0	1.625

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.018	0	0	1.0	0	1.0
L.019	0	0	0	2.5	0
L.020	1.0	0	1.25	2	1.25
L.021	0	0	0	2	0
L.022	0	0	0	2	0
L.023	1.6875	2.25	1.875	1.75	1.875
L.024	1.0	0	1.25	2.825	1.25
L.025	1.5	2.0	2.125	2.125	2.125
L.026	0.5	0	0.5	3.5	0.5
L.027	0	0	1.5	2.25	1.0
L.028	2.0	2.0	2.0	2.0	0.75
L.029	1.0	0	1.75	1.5	1.25
L.030	1.0	0	1.75	0.5	1.25
L.031	1.0	0	1.25	2.0	1.625
L.032	0	0	1.0	2.0	0.5
L.033	0	0	2.0	0	0
L.034	0	0	1.0	0	2.0

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.035	0	0	0.75	0	1.75
L.036	2.75	3.0	1.25	1.75	2.825
L.037	2.5	2.75	1.25	2.0	1.25
L.038	1.5	1.0	1.625	2.0	1.625
L.039	0	0	0.5	1.5	0.5
L.040	0	0	0	1.5	0
L.041	2.25	2.5	2.0	2.0	2.0
L.042	1.75	0	1.75	2.0	1.75
L.043	3.625	4.3125	2.825	1.0	2.825
L.044	3.875	3.375	2.125	0.5	2.125
L.045	2.75	2.0	3.5	0	3.5
L.046	2.5	3.125	2.25	0	2.25
L.047	2.0	2.5	2.0	0	2.0
L.048	1.75	1.5	1.5	2.0	1.5
L.049	0	0	0.5	2.0	0.5
L.050	2.5	3.9375	2.0	2.0	2.0
L.051	2.0	2.75	2.0	1.5	2.0

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.052	0	0	0	2.0	0
L.053	0	0	0	2.0	0
L.054	0	0	0	1.5	0
L.055	2.0	2.0	1.75	0	1.75
L.056	2.0	1.5	2.0	0	2.0
L.057	2.0	1.75	2.0	2.0	2.0
L.058	1.5	1.75	1.5	1.75	1.5
L.059	2.0	1.5	1.5	0	1.5
L.060	2.0	1.75	2.0	2.0	2.0
L.061	2.5	1.75	2.0	0	2.0
L062	1.0	1.5	1.0	2.25	1.0
L.063	0	0	0.5	2.25	0.5
L.064	1.75	2.25	1.75	3.0	1.75
L.065	2.0	2.25	1.5	0	1.5
L.066	1.5	3.0	1.5	2.0	1.5
L.067	0	0	2.0	2.0	2.0
L.068	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมักจำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.069	1.5	2.0	2.0	1.75	2.0
L.070	0	0	0.5	0	0.5
L.071	0	0	0	2.25	0
L.072	0	0	0	2.25	0
L.073	2.0	2.0	0	2.25	0
L.074	0	0	1.0	1.5	1.0
L.075	0	0	0	1.25	0
L.076	1.5	1.5	2.0	0	2.0
L.077	0	1.5	2.0	0	2.0
L.078	1.0	0.5	1.5	0	1.5
L079	0	0	0	2.0	0
L.080	0.5	0	0	0	0
L.081	3.25	3.25	2.0	0	2.0
L.082	2.0	1.75	1.75	0	1.75
L.083	0	0	0	0	0
L.084	2.0	2.0	2.0	0	2.0
L.085	0	0	0	0	0

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.086	3.25	2.0	2.0	0	2.0
L.087	2.25	1.75	1.75	3.25	1.75
L.088	0	0	0	3	0
L.089	2.75	2.0	2.25	0	2.25
L.090	2.75	1.5	2.25	0	2.25
L.091	3.0	2.0	2.25	2.25	2.25
L.092	1.25	1.0	1.5	3	1.5
L.093	1.5	0	1.25	0	1.25
L.094	0	0	0	0	0
L.095	0	0	0	0	0
L.096	0	0	0	3	0
L.097	2.75	2.0	2.0	3.25	2.0
L.098	0	2.0	0	0	0
L.099	0	0	0	2.75	0
L.100	0	2.0	0	3.5	0
L.101	0	2.0	0	3	0
L.102	0	2.0	0	2.75	0

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.103	0	2.0	0	3	0
L.104	2.5	2.5	0	0	0
L105	0	2.0	0	3	0
L.106	1.75	0.5	0	0	0
L.107	2.25	3.5	0	0	0
L.108	0	0	0	3	0
L.109	0	0	0	3.75	0
L.110	3.19	3.75	0	4	0
L.111	2.5	1.25	0	0	0
L.112	2.0	1.5	0	2	0
L.113	1.5	1.75	0	2	0
L.114	0	1.5	0	3	0
L.115	3.06	3.5	0	3.5	0
L.116	0	2.5	2.25	3	2.25
L.117	0	2.5	2.0	0	2.0
L.118	0	2.5	2.25	0	2.25
L.119	0	2.5	2.0	1.5	2.0

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.120	0	2.0	2.0	2	2.0
L.121	0	2.5	2.5	3	2.5
L.122	2.5	2.0	2.5	0	2.5
L.123	2.25	2.0	2.5	3	2.5
L.124	2.0	2.0	1.75	3	1.75
L.125	0	0	0	0	0
L.126	0	2.0	1.75	2.75	1.75
L.127	2.0	2.0	2.0	0	2.0
L.128	0	1.75	0	2.5	0
L.129	0	0	0	1.5	0
L.130	0	1.75	0	0	0
L.131	0	1.5	0	0	0
L.132	0	0	0	2.25	0
L.133	0	0	0	2	0
L.134	0	0	1.0	0	1.0
L.135	2.44	1.5	2.25	1	2.25
L.136	0	0	0	0	0

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.137	2.0	1.5	2.0	2	2.0
L.138	0	1.0	1.0	2.25	1.0
L.139	2.0	1.5	2.0	0	2.0
L.140	2.0	2.25	0	3	0
L.141	0	0	0	2.75	0
L.142	3.0	2.5	0	2.5	0
L.143	2.25	2.25	0	2.75	0
L.144	0	1.5	0	3	0
L.145	0	2.5	0	0	0
L.146	2.38	1.25	0	2.25	0
L.147	0	1.5	0	3	0
L.148	0	2.0	0	3	0
L.149	0	1.0	0	0	0
L.150	0	3.0	0	0	0
L.151	0	3.0	0	2	0
L.152	0	1.0	0	2.75	0
L.153	0	1.0	0	1	0

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมักจำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.154	0	0	0	2	0
L.155	0	2.25	0	0	0
L.156	0	2.0	0	3	0
L.157	0	1.75	0	3	-
L.158	2.5	3.25	3	1	-
L.159	1.5	3	3	1	-
L.160	0	0	0	3.5	-
L.161	0	0	0	3	-
L.162	2.25	2.25	2	5	-
L.163	2	3	2.75	4.75	-
L.164	0	0	1	5.5	-
L.165	1	0	2	5.75	-
L.166	0	0	0	0	-
L.168	2	3	3	5.25	-
L.169	2.25	3.25	3	5.5	-
L.171	3	2.75	1	5	-
L.172	2.75	3.5	3.5	5	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.173	2.5	3	3	6	-
L.174	2.75	2.75	2.5	5	-
L.175	3	3	2.5	6	-
L.176	0	0	1	5.5	-
L.177	2.25	3	0	4	-
L.178	1.5	0	0	5	-
L.179	0.5	0	0	6	-
L.180	2	3	3	6.25	-
L.181	2	3.75	2.5	7	-
L.182	2	4	2.5	6	-
L.183	0	0	1	6	-
L.184	2	2	2	6	-
L.185	1	2	1.5	6	-
L.186	2	3	2	6	-
L.187	2	3.5	0	6.5	-
L.188	2	3	0	6	-
L.191	1.5	1.5	0	6	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.192	1.5	2	0	6	-
L.193	2	3	2.5	8	-
L.194	0	0	2	6	-
L.195	2	3	2	6	-
L.196	2	3	2	6	-
L.197	0	0	0	0	-
L.198	2	2.75	2	6.5	-
L.199	0	0	2	6	-
L.200	2	2	2	6	-
L.201	2	2	2	6.25	-
L.202	2.25	3	0	6.5	-
L.203	3	3	0	6.5	-
L.204	0	0	0	6	-
L.205	0.5	1.5	0	6	-
L.206	1.5	2	0	6.5	-
L.207	1.5	2	0	6.5	-
L.208	0	0	0	6.25	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมักจำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.209	1.5	1.75	0	6	-
L.210	2.5	2.5	0	6.5	-
L.211	2	2.25	0	5.75	-
L.212	3.25	3	0	7	-
L.213	3.25	3.5	0	6	-
L.214	3	3	0	0	-
L.215	0	0	0	0	-
L.216	2.75	4.5	0	0	-
L.217	0	0	0	0	-
L.218	2.25	2.75	0	6.5	-
L.219	2.75	3.5	0	6	-
L.220	2	3.5	0	7	-
L.221	0	3.5	0	6	-
L.222	2	3.5	0	6	-
L.223	0	0	0	0	-
L.224	0	0	0	4.5	-
L.225	1	1.25	0	4.5	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.226	1	0	0	3.5	-
L.227	0	0	0	5	-
L.228	0	0	0	0	-
L.229	1	1.5	0	4.5	-
L.230	3	2.25	3.5	6	-
L.231	0	0	0	0	-
L.232	3	3	3	6	-
L.233	0	0	0	0	-
L.234	1	2	0	4.5	-
L.235	0	0	0	0	-
L.236	3	3.25	0	5	-
L.237	1	1.5	0	4.25	-
L.238	0	0	0	0	-
L.239	0	0	0	4.75	-
L.240	3	3.25	0	5	-
L.241	0	0	0	0	-
L.242	0	0	0	6	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.243	1.25	2.5	0	5.25	-
L.244	0	0	0	0	-
L.245	1.5	2	0	5	-
L.246	2.25	2	0	5.5	-
L.247	0	0	0	0	-
L.248	1.25	2	0	4.25	-
L.249	0	0	0	0	-
L.250	1.5	2.5	0	5.5	-
L.251	0	0	0	0	-
L.252	1	1.5	0	4.75	-
L.253	3.5	2.5	0	5.5	-
L.255	2.25	3.25	0	6.5	-
L.256	0	0	0	0	-
L.257	0	0	0	0	-
L.258	1.25	3	0	6	-
L.259	0	0	0	0	-
L.260	2	3.25	0	6.25	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.261	1.75	3.75	0	5.25	-
L.262	0	0	0	0	-
L.263	1.75	2.25	0	5.25	-
L.243	1.25	2.5	0	5.25	-
L.244	0	0	0	0	-
L.245	1.5	2	0	5	-
L.246	2.25	2	0	5.5	-
L.247	0	0	0	0	-
L.248	1.25	2	0	4.25	-
L.249	0	0	0	0	-
L.250	1.5	2.5	0	5.5	-
L.251	0	0	0	0	-
L.252	1	1.5	0	4.75	-
L.253	3.5	2.5	0	5.5	-
L.255	2.25	3.25	0	6.5	-
L.256	0	0	0	0	-
L.257	0	0	0	0	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.258	1.25	3	0	6	-
L.259	0	0	0	0	-
L.260	2	3.25	0	6.25	-
L.261	1.75	3.75	0	5.25	-
L.262	0	0	0	0	-
L.263	1.75	2.25	0	5.25	-
L.264	1.25	2	0	0	-
L.265	1.25	3	0	5.25	-
L.266	0	0	0	0	-
L.267	3	3.75	1.5	6	-
L.268	2.25	4	1.5	6.25	-
L.269	3	4.825	2.5	6	-
L.270	2	2.75	0.75	5.25	-
L.271	2.25	3	0	4.5	-
L.272	2.5	4	2.25	6	-
L.273	0	0	0	0	-
L.274	2	3	0	5	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.275	2.75	4	0	5	-
L.276	2.75	3.75	0	7	-
L.277	0	0	0	0	-
L.278	0.5	1.5	0	0	-
L.279	0	0	0	0	-
L.280	1.5	3	0	6.5	-
L.281	2.25	3	0	6	-
L.283	0	0	0	0	-
L.284	0	0	0	0	-
L.285	0	0	0	0	-
L.286	3	3	0	0	-
L.287	3	3.25	0	6	-
L.288	0	0	0	0	-
L.289	2.25	3.25	0	5	-
L.290	0	0	0	0	-
L.291	0	0	0	0	-
L.292	0	0	0	0	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.293	2	2	0	0	-
L.294	0	0	0	0	-
L.295	2	2.5	0	6	-
L.296	2	2.75	0	5	-
L.297	2	3	2	7	-
L.298	4.25	4	2.5	6.25	-
L.299	0	0	0	0	-
L.300	0	0	0	0	-
L.301	2	3.25	1.5	5.75	-
L.302	1	0.75	1.75	5	-
L.303	2.5	2	1.75	5	-
L.304	1	2	1.25	4.5	-
L.305	2	3.5	0	5	-
L.306	2	2.25	0	5	-
L.307	0	0	0	0	-
L.308	0	0	0	0	-
L.309	2.75	3	0	6	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.310	0	0	0	0	-
L.311	2.5	3.25	0	6.25	-
L.312	2.75	3.75	0	6.5	-
L.313	2.75	3	0	6	-
L.314	2.25	3.5	2	6	-
L.315	0	0	0	0	-
L.316	0	0	0	0	-
L.317	3	4	2.75	7	-
L.318	0	0	0	0	-
L.319	2	3	1	6	-
L.320	1.5	2.75	1.75	6	-
L.321	1.75	3	1	6.25	-
L.322	2	3	1	5	-
L.323	0	0	0	0	-
L.324	1	2	0	6	-
L.325	1	2.25	1.75	6	-
L.326	3.75	4.5	2.5	6.5	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.327	1	2.5	0	6.25	-
L.328	0	0	0	0	-
L.329	0	0	0	5	-
L.330	1.5	1.5	0	5.25	-
L.331	2	3	2	5	-
L.332	0	3	2	4	-
L.333	0	2	2	4	-
L.334	1	2	3	4	-
L.335	0	1.5	2	4	-
L.336	1	3	2	3	-
L.337	1	2	2	4	-
L.338	0	2	2	4	-
L.339	1	3	2	3.5	-
L.340	0.5	2	2	4	-
L.341	1	2.5	2	3.5	-
L.342	1	2.5	2	3.5	-
L.343	1	1	2	4	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.344	1	2	2	3	-
L.345	0.5	2	2	4	-
L.346	2.5	2.5	2.5	5	-
L.347	1	2	2	5	-
L.348	0.5	2	2	4	-
L.349	2	2	2.5	4.5	-
L.350	0.5	2	2	5	-
L.351	0.5	2	2	4	-
L.352	0	2	2	4	-
L.353	0.5	2	2	4	-
L.354	0.5	2	0	4	-
L.355	1	2	2	4	-
L.356	1	2	2	4	-
L.357	1	2	2	4	-
L.358	1	2	2	4	-
L.359	1	2	2	4	-
L.360	1	2	2	4	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.361	1	2	2	4	-
L.362	1	2	2	4	-
L.363	0.5	2	2	4	-
L.364	1	2	2	4	-
L.365	1	2	2	4	-
L.366	1	2	2	4	-
L.367	0.5	2	2	4	-
L.368	1	2	2	4	-
L.369	1	2	2	4	-
L.370	1	2	2	4	-
L.371	2	2	2	4	-
L.372	1	2	2	4	-
L.373	0.5	2	2	4	-
L.374	1	2	2	4	-
L.375	0.5	1.5	2	4	-
L.376	0.5	2	2	4	-
L.377	1	2	2	4	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.378	1	2	2	4	-
L.379	1	2	2	5.5	-
L.380	1	2	2	4	-
L.381	1	2	2	4	-
L.382	1	2	2	4	-
L.383	1	2	2	4	-
L.384	2	2	2	4	-
L.385	0	1.5	2	3	-
L.386	0	1.5	1.5	4	-
L.387	1.5	2	2	4	-
L.388	1	2	2	4	-
L.389	1	2	2	4	-
L.390	0.5	2	2	4	-
L.391	1	2	2	5.5	-
L.392	1	2	2	6	-
L.393	1.5	2	2	7	-
L.394	1	2	2	5.5	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมักจำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.395	1	2	2	5.5	-
L.396	1	2	2	5	-
L.397	1.5	2	0	6	-
L.398	1	2	2	4	-
L.399	1	2	2	5.5	-
L.400	1	2	2	6	-
L.401	1	2	2	5.5	-
L.402	1	2	0	4	-
L.403	1	2	2	4	-
L.404	1	2	0	6	-
L.405	1	2	0	6.5	-
L.406	1	2	0	4	-
L.407	1	2	2	6.5	-
L.408	1	2	2	4	-
L.409	1	2	2	6	-
L.410	1	2	2	5.5	-
L.411	0	2	0	4	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.412	1	2	2	4	-
L.413	0.5	2	2	4	-
L.414	1	2	2	4	-
L.415	2.5	3	3	6.5	-
L.416	1	2	2	5	-
L.417	1.5	2	2	5	-
L.418	1.5	2	2	5	-
L.419	0	2	2	6	-
L.420	0	2	2	5	-
L.421	1.5	2	1	5	-
L.422	1.5	2	0	6	-
L.423	1.5	2	1	5	-
L.424	1.5	2	1	5	-
L.425	1.5	2	1	5	-
L.426	1.5	2	1	5	-
L.427	1	2	0	4	-
L.428	0	2	0	4	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.429	0	2	0	4	-
L.430	1	2	0	4	-
L.431	1	2	0	4	-
L.432	1	2	0	4	-
L.433	2	2	0	5	-
L.434	2	2	1	5.5	-
L.435	2	2	0	4	-
L.436	2	2	1	4	-
L.437	1.5	2	2	4	-
L.438	2	2	1	6	-
L.439	2	2	2	6	-
L.440	2	2	2	5.5	-
L.441	2	2	2	6	-
L.442	6	3.5	4.25	5	-
L.443	5	0	1.5	3	-
L.444	6.5	3.75	4.5	4.75	-
L.445	6	3.75	4.25	5	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.446	7	4	4	5	-
L.447	6.25	4	4.25	5	-
L.448	6.5	4	3.5	5	-
L.449	7	3.5	3.25	5	-
L.450	6	3.75	3.5	4.5	-
L.451	7	4	3.25	5.25	-
L.452	7	3.25	4	5.25	-
L.453	7	3.75	4	6	-
L.454	6.5	4	4	5	-
L.455	6.75	3.5	4.75	5	-
L.456	6.25	4.25	5	5	-
L.457	7.25	4	4.75	5.5	-
L.458	7.5	3.75	4.25	5.25	-
L.459	8	4	4.75	5.5	-
L.460	7	4	4	5	-
L.461	6.25	3	4.25	5	-
L.462	6	3.5	4.25	5	-

ตารางที่ 1 การยับยั้งของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมัก จำนวน 464สายพันธุ์ต่อแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร (mm.) (ต่อ)

รหัสเชื้อ	*B. cereus*	*S. aureus*	*Y. enterocolitica*	*Cr. sakazakii*	*E. coli*
L.463	6	4	4	5.5	-
L464	6	4	4	6	-

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นายคณิน อิ่มทองคำ
วัน เดือน ปีเกิด	5 มีนาคม 2536
ที่อยู่	61 หมู่. 1 ซอยติวานนท์ 52 ถนนติวานนท์ แขวงท่าทราย อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000
การศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต (ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
ประสบการณ์ทำงาน	เจ้าหน้าที่ฝ่ายพัฒนาบุคลากรห้องปฏิบัติการ (เทคนิคปฏิบัติการ) บริษัท ซีพีแรม จำกัด (มหาชน) พ.ศ. 2558 ถึง พ.ศ. 2560 หัวหน้างานวิจัยและพัฒนาฝ่ายปฏิบัติการจุลชีววิทยา บริษัท ศูนย์สมาร์ทเทค จำกัด พ.ศ. 2560 ถึง ปัจจุบัน
เบอร์โทรศัพท์	09-9805-0326
อีเมล์	imtongkhum.k@gmail.com