



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

.....
วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (จุฬชีววิทยา)

ปริญญา

.....
จุฬชีววิทยา

สาขา

.....
จุฬชีววิทยา

ภาควิชา

เรื่อง การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำมะพร้าวเหลือทิ้งเป็นสับสเตรทเพื่อการผลิตสาร
แบคทีเรียโอซิน โดยแบคทีเรียกรดแลคติก

Optimization of Coconut Waste Water as a Substrate for Bacteriocin
Production by Lactic Acid Bacteria

นามผู้วิจัย นางสาวสุพรรณิการ์ เนตรวีระ

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณา มาลาพันธุ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(..... รองศาสตราจารย์ฉัตรณี ดุ้ยเต็มวงศ์, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(..... ผู้ช่วยศาสตราจารย์นันทนา สีสุข, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

.....
(..... รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำมะพร้าวเหลือทิ้งเป็นสับสเตรท
เพื่อการผลิตสารแบคทีริโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

Optimization of Coconut Waste Water as a Substrate for
Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria

โดย

นางสาวสุพรรณิการ์ เนตรวีระ

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

สุพรรณิการ์ เนตรวีระ 2557: การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำมะพร้าวเหลือทิ้งเป็นสับสเตรท เพื่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (จุลชีววิทยา) สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์วรรณา มาลาพันธุ์, Ph.D. 115 หน้า

การใช้สารเคมีในการควบคุมจุลินทรีย์ก่อโรค มักพบปัญหาสารเคมีตกค้าง ซึ่งก่อผลเสียต่อผู้บริโภค จึงมีความพยายามเปลี่ยนมาใช้สารแบคทีเรียโอซิน ซึ่งในปัจจุบันการศึกษาการผลิตสารแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ยังคงศึกษาโดยใช้อาหารสังเคราะห์ MRS ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นถ้าสามารถหาแหล่งของสารอาหารราคาถูกมาทดแทนจะเป็นประโยชน์ต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินในอนาคต

ในการศึกษานี้ เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 สามารถเจริญในน้ำมะพร้าวตัดแปลงเติม 1% Yeast Extract, 0.5% K_2HPO_4 และ 0.1% Tween 80 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้ดีเทียบเท่ากับอาหารเลี้ยงเชื้อสังเคราะห์ MRS โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เท่ากับ 12,800 AU/ml และสารแบคทีเรียโอซินยังมีความเสถียรที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสไม่น้อยกว่า 17 เดือน

สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ที่เลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวตัดแปลงมีศักยภาพในการลดปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนผักกะหล่ำปลีในระดับต่ำ (3 Log CFU/g) เมื่อทำการแช่ในน้ำล้างที่มีสารแบคทีเรียโอซิน 512 AU/ml ได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยืดอายุการเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นได้นานถึง 6 วัน โดยที่เชื้อปนเปื้อนไม่เพิ่มจำนวน เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อบนผักกะหล่ำปลีที่ปนเปื้อนเทียมในระดับสูง (5 Log CFU/g) โดยใช้สารแบคทีเรียโอซิน 5,120 AU/ml เปรียบเทียบกับสารเคมีที่ใช้ในทางการค้าคือไฮโปคลอไรท์ 100 ppm พบว่ามีประสิทธิภาพในการลดจำนวนเชื้อที่ปนเปื้อนได้ใกล้เคียงกันคือสามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ 3-4 Log CFU/g ผลจากการศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความเป็นไปได้ในการประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอซินเป็นสารมาเชื้อในน้ำล้างผักทดแทนสารเคมีเพื่อลดความเสี่ยงจากสารเคมีปนเปื้อนและช่วยเพิ่มความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

Supannika Netweera 2014: Optimization of Coconut Waste Water as a Substrate for Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria. Master of Science (Microbiology), Major Field: Microbiology, Department of Microbiology. Thesis Advisor: Assistant Professor Wanna Malaphan, Ph.D. 115 pages.

Chemical preservatives have been used for controlling of food borne pathogens in foods. But it always caused adverse effect to human healths due to its residual contaminant in foods. Therefore, bacteriocin of LAB is one alternative to use as biological food preservative. At present, study on bacteriocin production by LAB usually performed on synthetic medium MRS which is quite expensive. Replacement by cheap medium would be beneficial for bacteriocin production in the future

In this study, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 capable of growth in modified coconut water supplemented with 1% Yeast Extract, 0.5% K₂HPO₄ and 0.1% Tween 80, incubated at 37°C support bacteriocin production with antilisterial activity similar to in MRS broth (12,800 AU/ml). In addition, stability of bacteriocin at -20°C still effective as long as 17 months.

Bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 grown in modified coconut water medium showed a potent antilisterial activity. Artificially inoculated of *Listeria monocytogenes* DMST 17303 on fresh cabbage at initial contamination of 3 Log CFU/g then applied in wash water containing 512 AU/ml of bacteriocin resulted in 100% of decontamination. In addition, treated fresh cabbage can be kept prolong at refrigeration temperature for 6 days without any increasing of bacterial cells. At high contamination of 5 Log CFU/g, bacteriocin activity 5,120 AU/ml was as effective as 100 ppm hypochlorite solution and can reduced 3-4 Log CFU/g. The data obtain demonstrated the potent sanitizing agent of bacteriocin for fresh vegetables in order to reduce the chemical residues and increase food safety.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณ มาลาพันธุ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานและให้คำปรึกษาในการทำงาน ตลอดจนแนะนำและตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ฆรณี ดุ้ยเต็มวงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุรางค์ สุทธิราช ประธานการสอบ และขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร. พัทรี สุนทรนนท์ ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณบุคลากรในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่าน ที่ให้การสนับสนุนและช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการทำงาน ขอขอบคุณ คุณนิสา ร่มสัมช่า คุณปวีณา สุขสอาด คุณปริยาภรณ์ คล้ายปัญญา คุณสุพัตรา เมืองฮาม ตลอดจน พี่ๆ น้องๆ ในภาควิชาจุลชีววิทยาทุกคน ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณมูลนิธิโครงการหลวง ในมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ที่พักสวดเพื่องานวิจัยวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่ออดุลย์ และคุณแม่ละเอียด เนตรวีระ รวมทั้งคุณพัชรินทร์ เนตรวีระ พี่สาวที่คอยให้ความช่วยเหลือ ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนมาโดยตลอด

สุพรรณิการ์ เนตรวีระ

มิถุนายน 2557

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	30
อุปกรณ์	30
วิธีการ	34
ผลและวิจารณ์	45
สรุปและข้อเสนอแนะ	80
สรุป	80
ข้อเสนอแนะ	81
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	82
ภาคผนวก	96
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	97
ภาคผนวก ข ตารางผนวก	101
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	115

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณส่งออกกะทิสำเร็จรูปของไทยไป 10 ตลาดแรกปี 2555 (ม.ค.-มิ.ย.)	4
2	ความแตกต่างระหว่างสารแบคทีเรียโอซินและสารปฏิชีวนะ	11
3	ปริมาณและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ST461BZ และ ST462BZ	18
4	การปนเปื้อนเชื้อก่อโรคต่างๆ ในตัวอย่างผักสดและผลไม้สด	23
5	การพบเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> จากตัวอย่างผักสดชนิดต่าง ๆ	26
6	เชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษที่พบในตัวอย่างผักจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร	27
7	L9 (3 ³) Orthogonal Array	33
8	ปัจจัยและระดับของแต่ละปัจจัยในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินในน้ำมะพร้าวโดยแบคทีเรียกรดแลคติก	38
9	การออกแบบการทดลองโดยวิธีทาคูชิ ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินในอาหารน้ำมะพร้าวโดยแบคทีเรียกรดแลคติก	39
10	ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS	47
11	ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารน้ำมะพร้าวเมื่อบ่มในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 15 ชั่วโมง	56
12	ผลของแหล่งไนโตรเจนและสารอื่นต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารน้ำมะพร้าว เมื่อบ่มในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 15 ชั่วโมง	58

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่		หน้า
13	ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน โดยแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ ในอาหารน้ำมะพร้าวคัดแปลง	63
14	ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อของสารแบคทีเรียโอซินที่สกัดในชั้นตอนต่าง ๆ	65
15	การปนเปื้อนของเชื้อ <i>Listeria</i> spp. ในผักสดพร้อมบริโภค	68
ตารางผนวกที่		
ข1	การเจริญของเชื้อ <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5 ในอาหารเหลว MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ	102
ข2	การเจริญของเชื้อ <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5 ในอาหารน้ำมะพร้าว เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ	103
ข3	การเจริญของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารเหลว MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ	104
ข4	การเจริญของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารน้ำ มะพร้าวเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ	105
ข5	การเจริญของเชื้อ <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12 ในอาหารเหลว MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ	106
ข6	การเจริญของเชื้อ <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12 ในอาหารน้ำ มะพร้าวเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ	107

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่		หน้า
ข7	การเปรียบเทียบการเจริญของ <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5 ในอาหารชนิดต่าง ๆ	108
ข8	การเปรียบเทียบการเจริญของ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารชนิดต่าง ๆ	109
ข9	การเปรียบเทียบการเจริญของ <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12 ในอาหารชนิดต่าง ๆ	110
ข10	การเปรียบเทียบการเจริญของ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวคัดแปลงที่มีการปรับปรุงโดยวิธีทาทุชิ	111
ข11	การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวคัดแปลงที่มีการปรับปรุงโดยวิธีทาทุชิ	112
ข12	ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินโดยเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวคัดแปลงที่มีการปรับปรุงโดยวิธีทาทุชิ	113
ข13	ผลของสารแบคทีเรียโอซินต่อการรอดชีวิตของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมในกะหล่ำปลีสดในระดับต่าง ๆ และอายุการเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส)	113
ข14	ผลของสารแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 บนผักสดที่มีการปนเปื้อนเทียมในระดับสูง และผลต่ออายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน	114
ข15	ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (Log CFU/g) ที่พบบนผักสดที่ปนเปื้อนเทียมในระดับสูง เมื่อล้างด้วย น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (SDW) น้ำประปา (TW) น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm (SDW+Hp) และ แบคทีเรียโอซิน 5,120 AU/ml (SDW+B)	114

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แบบจำลองการเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (Mode of pore formation on cell membrane of target strain by bacteriocin from lactic acid bacteria)	14
2 แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก	15
3 ลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ	16
4 อิทธิพลจากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ST461BZ และ ST462BZ	21
5 วงจรการปนเปื้อนของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> ในผักสด	25
6 (ก) การติดสีแกรมบวก รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ของ <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1,500X) (ข) ลักษณะโคโลนีของ <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5 บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ CaCO_3	45
7 (ก) การติดสีแกรมบวก รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ของ <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1,500X) (ข) ลักษณะโคโลนีของ <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12 บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ CaCO_3	46
8 (ก) การติดสีแกรมบวก รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ของ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1,500X) (ข) ลักษณะโคโลนีของ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ CaCO_3	47
9 โซนใสของการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ของสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี spot on lawn	48

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
10 การเจริญของเชื้อ <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5 (A,B), <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 (C,D) และ <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12 (E,F) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS และอาหารน้ำมะพร้าว (CW) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆในสภาวะนิ่ง	50
11 การเปลี่ยนแปลงค่า pH ของเชื้อ <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5 (A,B) <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 (C, D) และ <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12 (E, F) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS และอาหารน้ำมะพร้าว (CW) บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในสภาวะนิ่ง	52
12 ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (AU/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5 (A, B), <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 (C, D) และ <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12 (E, F) ในอาหาร MRS และอาหารน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในสภาวะนิ่ง	54
13 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าฟิเอช เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหาร MRS อาหารน้ำมะพร้าว และอาหารน้ำมะพร้าวเติม yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์: (A,B) <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5, (C,D) <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 และ (E,F) <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12	60
14 การสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS อาหารน้ำมะพร้าว และอาหารน้ำมะพร้าวเติม yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์: (A) <i>Enterococcus faecium</i> KU-B5, (B) <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 และ (C) <i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12	61
15 การเจริญของเชื้อ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ที่เวลาต่าง ๆ ในอาหารน้ำมะพร้าวดัดแปลง โดยวิธีทาคุชิ	64

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
16	ค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ของสารแบคทีริโอซินที่ผ่านการสกัดแยกโดยวิธี Amberlite adsorption โดยวิธี critical dilution assay 66
17	ลักษณะเฉพาะของโคโลนี <i>Listeria monocytogenes</i> บนอาหาร L.mono Differential Agar Base 69
18	การยึดเกาะของเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 บนตัวอย่างผักกะหล่ำปลีสดเมื่อแช่ในเซลล์ซัสเพนชันที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกันที่ระยะเวลาต่าง ๆ 71
19	ผลของสารแบคทีริโอซินต่อการลดปริมาณเชื้อบนกะหล่ำปลีสดที่ปนเปื้อนเทียมด้วยเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (A) ในระดับต่ำ (3 Log CFU/g) และ (B) ระดับสูง (5 Log CFU/g) (SDW: Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 512 AU/ml) 73
20	ผลของสารแบคทีริโอซินต่ออายุการเก็บรักษาของกะหล่ำปลีสดที่ปนเปื้อนเทียมด้วย <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ในระดับต่ำ (3 Log CFU/g) และระดับสูง (5 Log CFU/g) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 7 วัน (SDW: Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 512 AU/ml) 74
21	ผลของสารแบคทีริโอซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนกะหล่ำปลีสดในปริมาณ 5 Log CFU/g (SDW: Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 512 AU/ml, SDW+5,120 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 5,120 AU/ml, SDW+12,800 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 12,800 AU/ml) 75

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	ผลของสารแบคทีริโอซินต่ออายุการเก็บรักษาของผักสดที่ผ่านการล้างในสารละลายแบคทีริโอซินความเข้มข้นต่าง ๆ และเก็บรักษาที่ (A) อุณหภูมิห้อง และ (B) อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 3 วัน (SDW: Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 512 AU/ml, SDW+5,120 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 5,120 AU/ml และ SDW+12,800 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 12,800 AU/ml)	77
23	ประสิทธิภาพของสารชนิดต่าง ๆ ต่อการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนผักกะหล่ำปลีในระดับสูง (SDW: Sterile distilled water, TW: tap water, SDW+ Hp: Sterile distilled water + hypochlorite 100 ppm และ SDW+B : Sterile distilled water + bacteriocin activity 5,120 AU/ml)	78
24	ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 บนผักสดที่ผ่านการแช่ในสารละลายต่างๆ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างๆ (SDW: Sterile distilled water, TW: tap water, SDW+ Hp: Sterile distilled water + hypochlorite 100 ppm และ SDW+B: Sterile distilled water + bacteriocin activity 5,120 AU/ml)	79

การศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการใช้น้ำมะพร้าวเหลือทิ้งเป็นสับสเตรทเพื่อการผลิต สารแบคทีเรียโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

Optimization of Coconut Waste Water as a Substrate for Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria

คำนำ

ในปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญและเอาใจใส่ด้านสุขภาพมากขึ้น และเลือกบริโภคอาหารที่มีความสดใหม่หรือที่ผ่านกระบวนการปรุงสุก หรือมีการใช้สารเคมีในการถนอมอาหารน้อยที่สุด ดังนั้นอุตสาหกรรมอาหารหลายๆประเภทจึงให้ความสนใจและหาทางเลือกอื่นเพื่อทดแทนการใช้สารเคมี ซึ่งการใช้สารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหารกำลังได้รับความนิยมเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ อีกทั้งสารแบคทีเรียโอซิน ยังได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยา (FDA) (Eckner, 1992) และ FAO/WHO (Schillinger *et al.*, 1996) ว่ามีความปลอดภัยต่อการบริโภค (Generally Recognized As Safe หรือ GRAS) ไม่ก่อให้เกิดสารตกค้างในอาหาร โดยสารแบคทีเรียโอซินที่มีการใช้ประโยชน์มากในทางอุตสาหกรรมอาหารคือ สาร Nisin มีชื่อทางการค้าว่า Nisaplin™ (Aplin and Barett Ltd., UK) ผลิตโดย *Lactococcus lactis* และ สาร Pediocin PA-1/AcH มีชื่อทางการค้าว่า ALTA™ 2431 (Quest International, Australia) ผลิตโดย *Pediococcus acidilactici* ส่วนแบคทีเรียโอซินชนิดอื่นแม้ว่าจะมีการศึกษาการใช้ประโยชน์มากมาย แต่ยังไม่ได้มีการผลิตในระดับการค้าเหมือน Nisaplin และ ALTA 2431 เช่น Diplococcin, Acidophilin, Bulgaricin, Helveticin, Lacticin และ Plantaricin (อรอนงค์, 2550; Nettles and Barefoot, 1993)

อย่างไรก็ตาม การศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคทีเรียโอซินจะอาศัยการเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนและวิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญเพียงพอ เช่น อาหาร MRS ซึ่งมีราคาค่อนข้างสูง ดังนั้นหากสามารถหาแหล่งของสารอาหารที่มีราคาถูกมาใช้ทดแทนอาหารสังเคราะห์ได้ จะช่วยให้การนำสารแบคทีเรียโอซินมาใช้ประโยชน์ทำได้ง่ายขึ้น ซึ่งสารอาหารที่ได้จากผลิตภัณฑ์เหลือทิ้งทางอุตสาหกรรม เช่น น้ำมะพร้าว น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้สูงที่จะนำมาใช้ให้เกิดประโยชน์สูงสุด ซึ่งจะสามารถช่วยลดต้นทุนของอาหารเลี้ยงเชื้อ และยังเป็นการใช้ประโยชน์จากวัสดุเหลือทิ้งอีกด้วย

ในการศึกษานี้ได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถสร้างสาร
แบคเทรีโอซินได้ ในอาหารน้ำมะพร้าวตัดแปลงเปรียบเทียบกับอาหาร MRS และศึกษาปัจจัยของ
สารประกอบที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างสารแบคเทรีโอซินในอาหารน้ำมะพร้าว



วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารสังเคราะห์ (MRS) และอาหารน้ำมะพร้าว
2. ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการใช้น้ำมะพร้าวเป็นสับสเตรท เพื่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน
3. ศึกษาความเสถียรของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากข้อ 2
4. การศึกษาเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอซินเป็น biopreservation ในผักสดพร้อมบริโภค

การตรวจเอกสาร

1. องค์ประกอบของน้ำมะพร้าว

ในแต่ละปีอุตสาหกรรมการผลิตมะพร้าวในประเทศไทย มีการใช้น้ำมะพร้าวเป็นของเสียในปริมาณที่สูงมาก เนื่องจากมีการขยายตัวของอุตสาหกรรมที่ใช้มะพร้าวเป็นวัตถุดิบเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ไม่ว่าจะเป็น อุตสาหกรรมกะทิสำเร็จรูป (Coconut milk) น้ำมันมะพร้าว (Coconut oil) แป้งมะพร้าว (Coconut flour) และเนื้อมะพร้าวแห้งเกรด (Dried coconut chips) ข้อมูลจากสถาบันอาหารในปี 2556 พบว่าประเทศไทยมีการส่งออกกะทิสำเร็จรูปรวมทั้งสิ้นมากกว่า 50,864.57 ตัน ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณส่งออกกะทิสำเร็จรูปของไทยไป 10 ตลาดแรกปี 2555 (ม.ค.-มิ.ย.)

ตลาด	ปริมาณ (ตัน)
สหรัฐอเมริกา	18,174.43
ออสเตรเลีย	5,095.69
สหราชอาณาจักร	4,221.55
เยอรมนี	2,869.32
เนเธอร์แลนด์	3,154.23
แคนาดา	2,015.61
สวีเดน	1,487.92
นิวซีแลนด์	1,414.31
ฝรั่งเศส	1,078.16
ฮ่องกง	1,004.82
อื่นๆ	10,348.53
รวมทั้งสิ้น	50,864.57

ที่มา: สถาบันอาหาร (2555)

สำหรับประเทศไทยโดยเฉลี่ยแล้วพบว่ามื่อน้ำมะพร้าวที่เป็นของเสียที่เกิดขึ้นใน พ.ศ. 2555 ประมาณ 150,000 ตัน (คำนวณจากผลผลิตทางการเกษตร โดยดูจากค่าสถิติผลผลิตทางการเกษตร ของไทยในปี พ.ศ. 2553-2555) นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มการขยายตัวของอุตสาหกรรมการผลิต มะพร้าวอย่างต่อเนื่อง ทำให้ปริมาณของเสียจากน้ำมะพร้าวมีปริมาณสูงตามไปด้วยเช่นกัน และ อาจก่อให้เกิดปัญหามลภาวะทางน้ำได้ง่ายเนื่องจากน้ำมะพร้าวมีค่าบีโอดี (BOD) สูงถึง 22,837 มิลลิกรัมต่อลิตร (วิเชียร, 2521) ดังนั้นการนำวัสดุเหลือทิ้งนี้มาใช้ให้เกิดประโยชน์ จึงเป็นที่ น่าสนใจ และยังสามารถช่วยแก้ปัญหาสิ่งแวดล้อมได้อีกทางหนึ่งด้วย

จากการศึกษาองค์ประกอบหลักในน้ำมะพร้าวแก้วพบว่าประกอบด้วย น้ำตาล วิตามิน และ แร่ธาตุต่างๆ โดย Caray (1924) พบว่าในน้ำมะพร้าวประกอบด้วยน้ำตาล 3 ชนิดคือ เด็กซ์โตรส เลวโลส และซูโครส Child and Nathanael (1947) พบว่าในน้ำมะพร้าวแก้ว 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วย ส่วนที่เป็นของแข็ง (total solid) 4.93 กรัม ซูโครส 1.14 กรัม กลูโคส 0.12 กรัม ฟรุคโตส 0.83 กรัม น้ำตาลทั้งหมด 3.09 กรัม ซึ่งรวมถึงแมนนิทอล (Child and Nathanael, 1950) ซึ่งแมนนิทอลที่พบนั้น เกิดจากการรีดิวซ์น้ำตาลเด็กซ์โตรสโดยแบคทีเรียชนิดอื่น จากการศึกษา การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลในน้ำมะพร้าวแก้วเปรียบเทียบกับน้ำมะพร้าวอ่อนของ Gonzalez (1950) พบว่าในน้ำมะพร้าวอ่อน 100 มิลลิลิตร มีน้ำตาลที่เป็น reducing sugar ประมาณ 5.5 กรัม ส่วนใน น้ำมะพร้าวแก้วนั้นพบว่ามีน้ำตาลเพียงแค่ 2 กรัม และน้ำตาลส่วนใหญ่ที่พบเป็นซูโครส ซึ่งผล ดังกล่าวสอดคล้องกับผลการวิเคราะห์น้ำมะพร้าวของ Thuan-Chew *et al.* (2014) พบว่าในน้ำ มะพร้าวอ่อนจะมีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบมากกว่าในน้ำมะพร้าวแก้ว คือในน้ำมะพร้าวอ่อน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบน้ำตาลฟรุคโตส 39.04 มิลลิกรัม กลูโคส 35.43 มิลลิกรัม และซูโครส 0.85 มิลลิกรัม แต่ในน้ำมะพร้าวแก้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบน้ำตาลฟรุคโตส 21.48 มิลลิกรัม กลูโคส 19.06 มิลลิกรัม และซูโครส 14.37 มิลลิกรัม ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบจะเห็นได้ว่าอายุของมะพร้าวมีผล ต่อปริมาณน้ำตาลที่เปลี่ยนไป โดยน้ำมะพร้าวอ่อนจะมีน้ำตาลฟรุคโตสและกลูโคสมากกว่า แต่ใน น้ำมะพร้าวแก้วจะพบน้ำตาลซูโครสที่มากกว่า อัจฉรา (2510) วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำ มะพร้าวแก้ว 100 มิลลิลิตร พบคาร์โบไฮเดรต 2.1 กรัม ส่วน Santos *et al.* (1996) รายงานว่าในน้ำ มะพร้าวแก้วอายุ 12 เดือนในปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเถ้า 0.47 กรัม ซูโครส 0.51 กรัม กลูโคส 1.48 กรัม และฟรุคโตส 1.43 กรัม

Verderbelt (1954) รายงานว่า น้ำมะพร้าว 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วยวิตามินบีรวมดังนี้ กรดนิโคตินิก 0.64 ไมโครกรัม กรดแพนโทธิก 0.52 ไมโครกรัม ไบโอติน 0.02 ไมโครกรัม ไรโบฟลาวิน 0.01 ไมโครกรัม กรดโฟลิก 0.003 ไมโครกรัม และยังพบ กรดมาลิก กรดไซคลิก

และกรดควินิก อะลานีน กรดแกมมาอะมิโนบิวทีริก กรดกลูตามิก เช่นเดียวกับ Tulecke *et al.* (1961) พบว่าในน้ำมะพร้าวแก่ประกอบด้วยกรดมาลิก กรดซึกิมิก และกรดควินิก และวิตามินซี 0.7-3.7 มิลลิกรัม นอกจากนี้ อัจฉรา (2510) วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตร พบว่าประกอบด้วยวิตามินซี 1.4 มิลลิกรัม และวิตามินบีรวม Santoso *et al.* (1996) รายงานว่าในน้ำมะพร้าวแก่อายุ 12 เดือนในปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยวิตามินซี 7.08 ppm วิตามินบี1 0.01 ppm และวิตามินบี2 0.01 ppm และยังประกอบด้วยกรดอะมิโนอะลานีน 3.88 ไมโครกรัม อาร์จินีน 0.81 ไมโครกรัม กรดแอสปาร์ติก 0.76 ไมโครกรัม กรดกลูตามิก 3.75 ไมโครกรัม ไกลซีน 0.11 ไมโครกรัม ไอโซลิวซีน 0.27 ไมโครกรัม ฮิสติดีน 0.67 ไมโครกรัม ลิวซีน 0.58 ไมโครกรัม ไลซีน 3.41 ไมโครกรัม เมทไทโอนีน 0.21 ไมโครกรัม โพรลีน 0.95 ไมโครกรัม เซอรีน 1.06 ไมโครกรัม ทรีโอนีน 0.33 ไมโครกรัม และวาเลีน 0.82 ไมโครกรัม

นอกจากนี้ยังพบสารอื่นๆ อัจฉรา (2510) วิเคราะห์ส่วนประกอบของน้ำมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตร พบว่าประกอบด้วยน้ำ 94.6 กรัม โปรตีน 1.0 กรัม แคลเซียม 20.7 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 25.4 กรัม เหล็ก 0.4 มิลลิกรัม Satyavati (1984) รายงานว่าในน้ำมะพร้าวแก่ปริมาตร 100 มิลลิลิตร พบโพแทสเซียม 247 มิลลิกรัม โซเดียม 48 มิลลิกรัม แคลเซียม 40 มิลลิกรัม แมกนีเซียม 15 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 6.3 มิลลิกรัม และส่วนที่เป็นของแข็ง (total solid) 5.4 กรัม และยังพบโปรตีน และไขมันเป็นส่วนประกอบโดยคิดรวมเป็น 0.1 เปอร์เซ็นต์ ส่วน Santoso *et al.* (1996) รายงานว่า ในน้ำมะพร้าวแก่อายุ 12 เดือนในปริมาตร 100 มิลลิลิตร ประกอบด้วยส่วนที่เป็นเถ้า 0.47 กรัม โพแทสเซียม 255 มิลลิกรัม กำมะถัน 4 มิลลิกรัม แคลเซียม 31.3 มิลลิกรัม โซเดียม 15.9 มิลลิกรัม แมกนีเซียม 9.3 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 12.6 ไมโครกรัม แมงกานีส 0.08 ไมโครกรัม อะลูมิเนียม 0.06 ไมโครกรัม สังกะสี 0.03 ไมโครกรัม เหล็ก 16 ไมโครกรัม และทองแดง 29.3 ไมโครกรัม เช่นเดียวกับ Thampan and Rethinam (2004) รายงานว่าน้ำมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตร พบ โพแทสเซียม 247 มิลลิกรัม คลอรีน 108 มิลลิกรัม กำมะถัน 80 มิลลิกรัม แคลเซียม 40 มิลลิกรัม โซเดียม 48 มิลลิกรัม แมกนีเซียม 15 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 6.3 ไมโครกรัม เหล็ก 79 ไมโครกรัม และทองแดง 26 ไมโครกรัม Richter *et al.* (2005) พบแร่ธาตุต่างๆในน้ำมะพร้าวแก่ 100 มิลลิลิตร คือ โพแทสเซียม 164 มิลลิกรัม คลอรีน 131 มิลลิกรัม แคลเซียม 18.2 มิลลิกรัม โซเดียม 4.1 มิลลิกรัม แมกนีเซียม 7.8 มิลลิกรัม และฟอสฟอรัส 21 ไมโครกรัม เช่นเดียวกับ Uphade *et al.* (2008) พบโพแทสเซียม 273 มิลลิกรัม แคลเซียม 47.7 มิลลิกรัม โซเดียม 45.4 มิลลิกรัม แมกนีเซียม 11.7 มิลลิกรัม ฟอสฟอรัส 9.2 ไมโครกรัม เหล็ก 112 ไมโครกรัม และทองแดง 28.7 ไมโครกรัมต่อน้ำมะพร้าว 100 มิลลิลิตร

นอกจากนี้ Thuan-Chew *et al.* (2014) ได้เปรียบเทียบปริมาณแร่ธาตุพบในน้ำมะพร้าวอ่อนปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบโพแทสเซียม 220.94 มิลลิกรัม โซเดียม 7.61 มิลลิกรัม แมกนีเซียม 22.03 มิลลิกรัม แคลเซียม 8.75 มิลลิกรัม เหล็ก 0.294 มิลลิกรัม และโปรตีน 0.041 มิลลิกรัม ส่วนในน้ำมะพร้าวแก่ปริมาตร 1 มิลลิลิตร พบโพแทสเซียม 35.11 มิลลิกรัม โซเดียม 36.51 มิลลิกรัม แมกนีเซียม 31.65 มิลลิกรัม แคลเซียม 23.98 มิลลิกรัม เหล็ก 0.322 มิลลิกรัม และโปรตีน 0.217 มิลลิกรัม จะเห็นได้ว่าในน้ำมะพร้าวแก่มีส่วนประกอบแร่ธาตุชนิดเดียวกันที่สูงกว่า จึงเป็นที่น่าสนใจว่า น้ำมะพร้าวแก่ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งในอุตสาหกรรมมะพร้าวจะสามารถนำมาใช้เป็นแหล่งของสารอาหารทดแทนที่มีคุณภาพ และยังสามารถลดต้นทุนของการเติมสารที่เป็น supplement ต่างๆ ได้เป็นอย่างดีอีกด้วย

2. การใช้ประโยชน์จากน้ำมะพร้าวในทางจุลชีววิทยา

จากองค์ประกอบของสารอาหารและแร่ธาตุต่างๆ ในน้ำมะพร้าวที่มีอยู่มากมาย จึงมีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

2.1 การเลี้ยงเชื้อยีสต์

ปราโมทย์ (2517) พบว่าน้ำมะพร้าวมีน้ำตาลและเกลือแร่เพียงพอที่จะเลี้ยงยีสต์ได้ เช่นเดียวกับ อโณทัย และ นภา (2518) ได้ศึกษาการเจริญของ *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida utilis* และ *C. tropicalis* ในน้ำมะพร้าว เปรียบเทียบกับอาหาร Malt yeast extract broth พบว่าเชื้อยีสต์เจริญได้ดีในน้ำมะพร้าว แม้ว่าอัตราการเจริญและปริมาณเซลล์จะน้อยกว่าใน MY broth และเมื่อเติมแอมโมเนียมซัลเฟต 1 เปอร์เซ็นต์ อัตราการเจริญของเชื้อยีสต์จะใกล้เคียงกับใน MY broth แต่ปริมาณเซลล์จะเพิ่มขึ้นมากกว่า นอกจากนี้ การเติมไบโอตินและกรดนิโคตินิกในอาหารน้ำมะพร้าวยังช่วยเพิ่มปริมาณเซลล์ของ *Saccharomyces fragilis* ในการเพาะเลี้ยงแบบ chemostat culture ด้วย (Smith and Bull, 1976)

2.2 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดน้ำส้ม

ในช่วงต้นปี ค.ศ. 1960 Alaban (1962) ได้ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตวุ้นมะพร้าว หรือ Nata de coco โดยใช้น้ำมะพร้าวแก่ซึ่งเป็นวัสดุเหลือทิ้งเป็นวัตถุดิบ โดยอาศัยกระบวนการหมักของเชื้อ *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum* หรือ *A. xylinum* หมักเพื่อให้เกิดแผ่นวุ้น โดยเกิดจากโพลีเมอร์ของน้ำตาลกลูโคสต่อกันด้วยพันธะเบตา-1,4 ไกลโคซิดิก (b-1,4 glycosidic bond) โดยวุ้นมะพร้าวสามารถนำไปแปรรูปเป็นอาหารได้หลายชนิดและยังมีประโยชน์ในการส่งเสริมระบบขับถ่ายได้ เนื่องจากวุ้นดังกล่าวจัดเป็นเนื้อเยื่อเซลลูโลสซึ่งระบบย่อยอาหารของมนุษย์ไม่สามารถย่อยได้ (De Gallardo *et al.*, 1971)

สายชล และ นภา (2517) ใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดน้ำส้ม โดยการเติมเอทานอล 4 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อ *Acetobacter* spp. สามารถเจริญในน้ำมะพร้าวได้ใกล้เคียงกับ *Acetobacter* medium เช่นเดียวกับการศึกษาของ รสสุคนธ์ (2528) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Acetobacter* spp. หลายสายพันธุ์ในน้ำมะพร้าวที่มีเอทานอล 8 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดอะซิติกได้

2.3 การเลี้ยงสาหร่าย

Unagul *et al.* (2007) ทดลองใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ GPY ที่ความเข้มข้น 50 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เพื่อเพาะเลี้ยงสาหร่าย *Schizochytrium mangrovei* Sk-02 เพื่อส่งเสริมการผลิตกรดไขมัน DHA พบว่าสามารถเพิ่มมวลชีวภาพ (biomass) และผลผลิตกรดไขมันชนิด docosahexaenoic acid (C22:6) ได้มากกว่าถึงสามเท่าเมื่อเทียบกับอาหารสูตรปกติที่ไม่มีการเติมน้ำมะพร้าว

2.4 การเลี้ยงเชื้อรา

วิภา และ นภา (2517) ทดลองใช้น้ำมะพร้าวเลี้ยงเชื้อราบางชนิด พบว่า น้ำมะพร้าวซึ่งไม่ได้เติมสารอะไรเลย สามารถใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อราได้ดีมากเมื่อเปรียบเทียบกับอาหาร Potato Dextrose Agar นอกจากนี้ นารัตกษณ์ และ ศิริวรรณ (2546) ได้ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อราในน้ำมะพร้าวแก่เพื่อผลิต Pigment พบว่า *Penicillium* sp. สามารถเจริญได้ดีในน้ำมะพร้าวแก่ที่มีความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าพีเอช 5.0 และ *Monascus* sp. สามารถเจริญได้ดีในน้ำมะพร้าวแก่ที่มีความเข้มข้น 90 เปอร์เซ็นต์ และมีค่าพีเอช 7 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และยังมีการทดลอง

ของนวลพรรณ และ สุกัญญา (2541) ที่ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Aspergillus oryzae* NRRL 484 ในน้ำมะพร้าว เพื่อผลิตกรดโคจิก พบว่าให้ผลดีกว่าสูตรอาหารดั้งเดิมที่ใช้อยู่ Arseculteratre *et al.* (1969) ทำการทดลองใช้น้ำมะพร้าวเลี้ยงเชื้อรา *Aspergillus flavus* พบว่าเชื้อสามารถเจริญและผลิตสาร aflatoxin ได้

2.5 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

สายชล (2520) พบว่าอาหารน้ำมะพร้าวที่เติม peptone 1 เปอร์เซ็นต์, yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์, sodium acetate 0.5 เปอร์เซ็นต์, ammonium citrate 0.2 เปอร์เซ็นต์ และ Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ ให้อัตราการเจริญของ *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus parvulus*, *Leuconostoc mesenteroides* ได้ดีเทียบเท่ากับอาหาร MRS นอกจากนี้ เพิ่มพงษ์ (2524) ได้ทดลองเก็บเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก *Lactobacillus casei* สายพันธุ์ shirota ในอาหารน้ำมะพร้าว พบว่าสามารถเก็บเชื้อได้นานกว่าในอาหาร MRS อีกทั้งการเติมกากถั่วเหลือง 5 เปอร์เซ็นต์ ในน้ำมะพร้าวแก่ สามารถเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกได้เป็นอย่างดี และยังมีการศึกษาของ อัสนี และ นวลพรรณ (2550) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus pentosus* SR 4-2 มีการผลิตชีวมวลในอาหารน้ำมะพร้าวสูงกว่าในอาหาร MRS ทั้งในสถานะนิ่งและสถานะเขย่า

นอกจากนี้ยังมีการนำน้ำมะพร้าวมาใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆอีกมาก เช่น การศึกษาการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชของ Van Overbeek *et al.* (1941) และ Pollard *et al.* (1961) พบว่าน้ำมะพร้าวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการแบ่งเซลล์ของพืชบางชนิดได้ ตัวอย่างเช่น การเจริญของเนื้อเยื่อผักขมบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติม 10-15 เปอร์เซ็นต์ (v/v) น้ำมะพร้าวแก่ พบว่าสามารถเพิ่มน้ำหนักของแคลลัส (callus) หรือเซลล์พื้นฐานได้หลังจากเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 5 สัปดาห์ และยังสามารถเร่งการเกิดหน่อของต้นผักขมได้ภายในเวลา 4-5 สัปดาห์ เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงเซลล์บนอาหารที่ไม่ได้เติมน้ำมะพร้าวคือ 6-12 สัปดาห์ ส่วน Prabakaran *et al.* (2008) ได้ทดลองใช้น้ำมะพร้าวในการเพาะเลี้ยง *Bacillus thuringiensis* var. israelensis พบว่าเชื้อสามารถผลิต δ -endotoxin ได้ดี และสามารถนำไปใช้ในการควบคุมยุง

3. แบคทีริโอซิน (Bacteriocin)

3.1 ประวัติการค้นพบ

แบคทีริโอซินถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1925 โดย Gratia พบว่า *E. coli* V (หรือที่รู้จักในชื่อ *E. coli* CA7) สามารถผลิตสารโปรตีนกลุ่มหนึ่งออกมายับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. coli* ΦV (หรือที่รู้จักในชื่อ *E. coli* CA81) และเรียกโปรตีนยับยั้งดังกล่าวว่า colicin ต่อมาพบว่าในแบคทีเรียแกรมบวกบางกลุ่มมีการผลิตสารที่มีลักษณะคล้าย colicin จึงเรียกสารกลุ่มโปรตีนที่มีคุณลักษณะดังกล่าวว่า แบคทีริโอซิน (Bacteriocin) และมีนักวิจัยได้ให้คำจำกัดความของแบคทีริโอซินไว้โดย Tagg *et al.* (1976) ให้คำจำกัดความของแบคทีริโอซินว่าเป็นสารประกอบในกลุ่มโปรตีนที่มีคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทำลาย (bactericidal) เฉพาะแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคทีริโอซิน โดยกลไกการออกฤทธิ์คือ โปรตีนกลุ่มดังกล่าวจะจับกับตำแหน่งที่จำเพาะกับเซลล์เป้าหมาย ส่วนยีนที่ควบคุมการสร้างและการต้านทานต่อแบคทีริโอซินนั้นอยู่บนพลาสมิด (plasmid) แต่จากการศึกษาต่อมาในภายหลังพบว่าผลที่ได้ไม่สอดคล้องกับคำจำกัดความข้างต้น โดย Konisky (1982) กล่าวว่าสารแบคทีริโอซินเป็นสารประกอบกลุ่มโปรตีนที่ไม่ทำลายเซลล์ที่สร้างสารแบคทีริโอซิน Andersson (1986) พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lactobacillus lactis* สามารถทำลายเชื้อ *Staphylococcus aureus* และแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่มีผนังเซลล์ได้

อย่างไรก็ตามคำนิยามของสารแบคทีริโอซินในปัจจุบันที่ใช้กันอย่างแพร่หลายคือสารประกอบโปรตีนที่ผลิตจากไรโบโซม ซึ่งควบคุมโดยยีนที่ควบคุมการสร้างแบคทีริโอซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้าง และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต (Konisky, 1982; De Vuyst and Vandamme, 1992)

แบคทีเรียหลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคทีริโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียได้เช่นเดียวกับสารปฏิชีวนะ แต่ความแตกต่างระหว่างสารแบคทีริโอซินกับสารปฏิชีวนะคือฤทธิ์ในการยับยั้ง โดยแบคทีริโอซินจะออกฤทธิ์ยับยั้งแคบกว่า โดยจะยับยั้งเฉพาะสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ที่สร้าง เนื่องจากแบคทีริโอซินจะจับกับบริเวณจำเพาะซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายจึงทำให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้เฉพาะกลุ่มและมีฤทธิ์ในการยับยั้งแคบนอกจากนี้ยังมีความแตกต่างในด้านอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ความแตกต่างระหว่างสารแบคทีริโอซินและสารปฏิชีวนะ

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

ที่มา: Cleveland *et al.* (2001)

ถึงแม้จากการศึกษาจะพบว่ามีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคทีริโอซินได้ไม่ว่าจะเป็น *Escherichia coli* (Braun *et al.*, 1994) *Bacillus coagulans* (Hyronimus *et al.*, 1998) หรือ *Staphylococcus aureus* (Netz *et al.*, 2002) อย่างไรก็ตามแบคทีริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นที่นิยมมากที่สุดเนื่องจากการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS) ซึ่งมีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกไปใช้เป็นโปรไบโอติก (Probiotic) และใช้ในด้านอุตสาหกรรมทางอาหารอย่างมากมาย ดังนั้นสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกจึงเป็นที่ยอมรับว่ามีความปลอดภัย สามารถประยุกต์ใช้กับอาหารได้

3.2 การจัดจำแนกแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก

Klaenhammer (1993) ได้จัดจำแนกแบคทีริโอซินทั้งหมดออกเป็น 4 class โดยอาศัยลักษณะโครงสร้าง มวลโมเลกุลและความคงตัวต่อความร้อน ซึ่งแบคทีริโอซินส่วนใหญ่ที่พบมักจัดอยู่ใน class I และ class II ซึ่งแต่ละ class มีรายละเอียดดังนี้

3.2.1 Class I

แบคทีเรียโอซิน Class I นี้มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่สามารถทนความร้อนได้ มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 5 กิโลดาลตัน) ภายหลังจากกระบวนการแปลรหัสแล้วจะเข้าร่วมตัวกับกรดอะมิโนแลนไธโอนีน (lanthionine) ซึ่งเป็นกรดอะมิโนที่มีไธโออีเธอร์ (thioether) อยู่ในโมเลกุลและเมทิลแลนไธโอนีน (methyllanthionine) (Hurst, 1981) ในบางครั้งจึงเรียก class I นี้ว่า แลนติไบโอติก (lantibiotics) และแลนติไบโอติกยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 subclass คือ subclass Ia หรือ type A มีโครงสร้างเปปไทด์ที่มีประจุเป็นบวก สายยาว ไม่คงรูป มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2.16 กิโลดาลตัน และออกฤทธิ์โดยการทำให้เชื้อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมายเกิดรู ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้คือไนซิน อีกกลุ่มหนึ่งคือ subclass Ib หรือ type B มีโครงสร้างเปปไทด์เป็นก้อน คงรูป มีประจุเป็นลบหรือไม่มีประจุ มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 1.95 กิโลดาลตัน กลไกการออกฤทธิ์คือรบกวนการทำงานของเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียเป้าหมาย (Delves-Broughton, 1990 และ Klaenhammer, 1993)

3.2.2 Class II

มีโครงสร้างเป็นเปปไทด์ที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสได้ประมาณ 15-30 นาที มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (น้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน) แต่ไม่มีอนุพันธ์ของกรดอะมิโนแลนไธโอนีน ในปัจจุบันพบมากได้ 2 subclass คือ subclass IIa (มักเรียกว่า Listeria-active หรือ antilisterial bacteriocin) ซึ่งในปัจจุบันได้รับความสนใจเป็นอย่างมากเนื่องจากฤทธิ์การยับยั้งไม่กว้างเหมือนไนซิน โดยจะยับยั้งเฉพาะเชื้อในกลุ่ม Listeria เท่านั้น และ subclass IIb เป็นกลุ่มของแบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างประกอบด้วยองค์ประกอบ 2 ส่วน คือเปปไทด์ 2 ชนิดทำงานโดยการเสริมฤทธิ์กัน

3.2.3 Class III

ประกอบด้วยแบคทีเรียโอซินขนาดใหญ่ (มากกว่า 10 กิโลดาลตัน) และไวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60-100 องศาเซลเซียส 10-15 นาที (Delves-Broughton, 1990)

3.2.4 Class IV

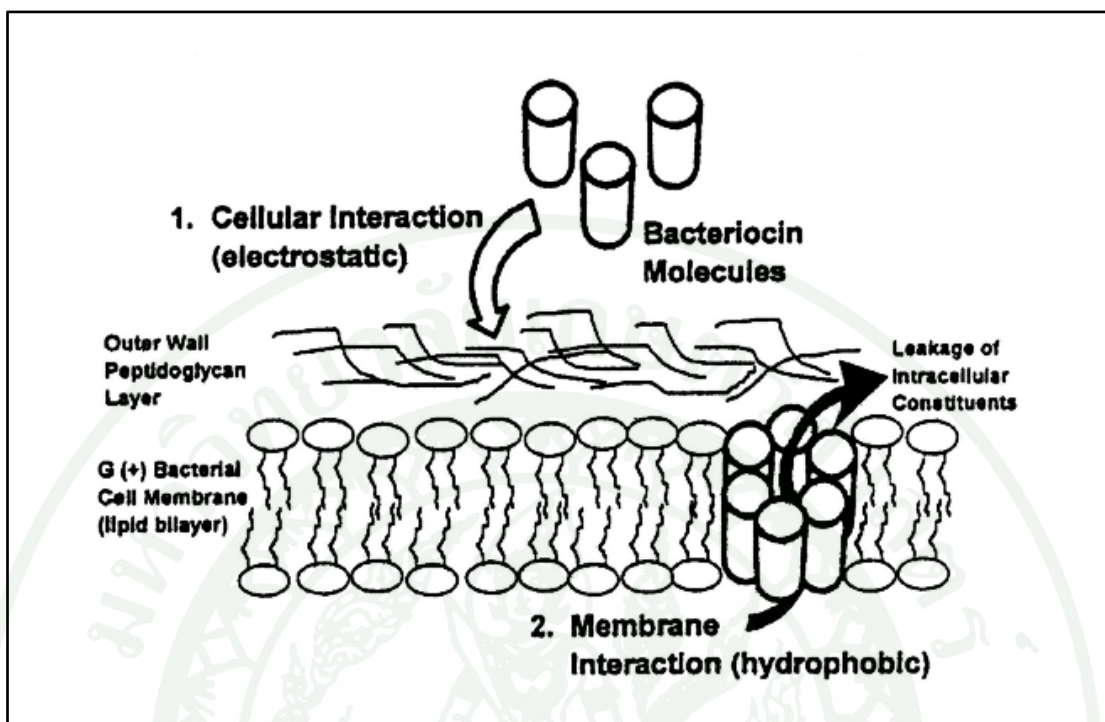
class IV เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีความแตกต่างจากกลุ่มอื่นคือ เป็น complex bacteriocin ประกอบด้วยไขมันหรือคาร์โบไฮเดรตเกาะร่วมอยู่ในโครงสร้างนอกเหนือจากส่วนที่เป็นโปรตีน

3.3 การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซิน

การสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินเกิดขึ้นในไรโบโซม ควบคุมโดยยีนโครงสร้าง (structural gene) ที่ทำหน้าที่ถอดรหัสเพื่อสร้างเป็นสารแบคทีเรียโอซิน โดยส่วนมากมักพบอยู่บนพลาสมิด (plasmid) ทรานสโปซอน (transposons) หรือโครโมโซม (chromosome) (Jack *et al.*, 1995)

3.4 กลไกการออกฤทธิ์ของสารแบคทีเรียโอซิน

แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีคุณสมบัติแตกต่างกัน ซึ่งรวมถึงความสามารถและกลไกในการยับยั้งด้วย พบว่าแบคทีเรียโอซินบางชนิดทำให้จุลินทรีย์เป้าหมายตายโดยไม่มีการแตกสลายของเซลล์ (bactericidal mode of action without cell lysis) แต่บางชนิดก็ทำให้เซลล์จุลินทรีย์เป้าหมายแตกสลาย (bacteriolytic mode of action) สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของสารแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกนั้น โดยทั่วไปมักออกฤทธิ์ต่อเยื่อหุ้มเซลล์ โดยแบคทีเรียโอซินที่มีการศึกษาการออกฤทธิ์มากที่สุดคือ ไนซิน โดยจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์โดยอาศัยแรง electrostatic และเหนี่ยวนำให้เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายเกิดรู เมื่อสารเข้าสู่ภายในเซลล์จะไปขัดขวางกระบวนการ proton motive force และรบกวนสมดุลของค่าความเป็นกรด-ด่าง ภายในเซลล์ ส่งผลให้เกิดการรั่วไหลของไอออน และ ATP ทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Deegan *et al.*, 2006) แบบจำลองดังแสดงในภาพที่ 1 โดยรูที่เกิดจากแบคทีเรียโอซินจะทำให้เกิดการเสียสมดุลของไอออนภายในเซลล์ ทำให้เซลล์เป้าหมายสูญเสียกรดอะมิโนและสารประกอบอนินทรีย์ในกลุ่มฟอสเฟต ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญในการสร้างพลังงานภายในเซลล์ (Klaenhammer, 1993; Abee, 1995; Jack *et al.*, 1995; Ennahar and Deschamps, 2000)



ภาพที่ 1 แบบจำลองการเกิดรูที่เชื่อมเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก (Mode of pore formation on cell membrane of target strain by bacteriocin from lactic acid bacteria)

ที่มา: Muriana (1996)

3.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

ปัจจัยที่ส่งผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก อาจเกิดได้จากหลายปัจจัย เช่น สายพันธุ์ของเชื้อที่ผลิต องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระยะของการเจริญ เป็นต้น

3.5.1 สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีลักษณะแตกต่างกัน เช่น ลักษณะโครงสร้าง ขนาดของโปรตีน หรือคุณสมบัติในการทนความร้อน

นอกจากนี้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคก็แตกต่างกันด้วยดังแสดงในภาพที่ 2 และภาพที่ 3

Genus	Bacteriocin	Activity against				
		<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Clostridium botulinum</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>Carnobacterium</i>	Unnamed from <i>C. piscicola</i> LK5	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Carnobacteriocins A and B	+	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
	Piscicolin 61	+	—	—	n.d.	n.d.
<i>Lactobacillus</i>	Bavaricin A	+	—	—	n.d.	n.d.
	Bavaricin MN	+	—	n.d.	—	n.d.
	Curvacin A	+	(+)	—	n.d.	n.d.
	Curvaticin 13	+	+	+	n.d.	n.d.
	Plantaricin BN	+	—	n.d.	+	n.d.
	Sakacin A	+	—	n.d.	—	n.d.
	Sakacin M	+	(+)	—	(+)	(+)
	Sakacin P	+	—	—	n.d.	n.d.
	Carnocin 44	+	—	—	n.d.	n.d.
<i>Leuconostoc</i>	Leucocin UAL 187	+	—	n.d.	n.d.	n.d.
	Leuconocin S	+	+	n.d.	+	n.d.
	Mesenterocin 5	+	—	n.d.	n.d.	n.d.
	Mesenterocin 52	+	—	—	n.d.	n.d.
	Mesenterocin Y 105	+	—	—	n.d.	n.d.
	Unnamed from <i>Leuconostoc gelidium</i> IN 139	+	—	—	—	—
	Pediocin A	+	+	n.d.	+	+
	Pediocin AcH	+	+	+	— (spores)	+
<i>Pediococcus</i>	Pediocin PA-1	+	—	n.d.	n.d.	n.d.
	Pediocin PC	+	—	—	n.d.	+
	Pediocin SJ1	+	—	n.d.	n.d.	+

ภาพที่ 2 แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกและมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวก

ที่มา: Holzapfel *et al.* (1995)

Producing species	Bacteriocin	Spectrum of action	Characteristics
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	Nisin	Gram-positive bacteria	Class I lantibiotic, 3,5 kDa, 34 amino-acids, commercially available
	Lacticin 3147	<i>Clostridium</i> sp <i>Listeria monocytogenes</i> <i>Staphylococcus aureus</i> <i>Streptococcus dysgalactiae</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Propionibacterium acne</i> <i>Streptococcus mutans</i>	Class I two-component lantibiotic, 4,2 kDa, heat-stable, active under acid and physiological pH
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	Lactococcin B	<i>Lactobacillus</i>	Class II bacteriocin, approx. 5 kDa, narrow spectrum of action
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Acidocin CH5	Gram-positive bacteria <i>Lactobacillus</i>	Class II bacteriocin, forms high molecular weight aggregates
	Lactacin F	<i>Lactobacillus fermentum</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i>	Class II bacteriocin, 6,3 kDa, 57 amino-acids, heat-stable at 121° C for 15 minutes
	Lactacin B	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Class III bacteriocin, 6,3 kDa, heat-stable, detected only in cultures maintained between pH 5.0 to 6.0
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	Lactobin A	<i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus delbrueckii</i>	Class II bacteriocin, 4,8 kDa, 50 amino-acids, narrow spectrum of activity
<i>Lactobacillus casei</i>	Lactocin 705	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Lactobacillus plantarum</i>	Class II two-component bacteriocin (33 amino-acids each component), 3,4 kDa,
<i>Leuconostoc gelidum</i>	Leucocin A	<i>Lactobacillus</i> <i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 3,9 kDa, 37 amino-acids, stable at low pH values, even after heating (100°C for 20 min)
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	Mesentericin Y105	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 3,8 kDa, 37 amino-acid residues, heat stable (60°C for 120 min at pH 4.5)
<i>Pediococcus acidilactici</i>	Pediocin F	Gram-positive bacteria	Class II bacteriocin, 4,5 kDa, sensitive to proteolytic enzymes, resistant to heat and organic solvents, active under a wide range of pH
	Pediocin PA-1	<i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 4,6 kDa, 44 amino-acids,
	Pediocin AcH	Gram-positive and Gram-negative bacteria under stressing situations	Class II bacteriocin, 4,6 kDa, 44 amino-acids, broad spectrum of action
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Pediocin A	<i>Lactobacillus</i> <i>Lactococcus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i> <i>Staphylococcus</i> <i>Enterococcus</i> <i>Clostridium</i>	Class II bacteriocin, 2,7 kDa, sensitive to proteolytic enzymes and heat stable (10 min 100°C)
<i>Enterococcus faecium</i>	Enterocin A	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Pediococcus</i>	Class II bacteriocin, 4,8 kDa, 47 amino-acid residues, heat-stable
<i>Lactobacillus sake</i>	Lactocin S	<i>Lactobacillus</i> <i>Leuconostoc</i> <i>Pediococcus</i>	Class I bacteriocin, 3,7 kDa, active between pH of 4,5 and 7,5
	Sakacin P	<i>Listeria monocytogenes</i>	Class II bacteriocin, 4,4 kDa, heat-stable
<i>Lactobacillus curvatus</i>	Curvacin A	<i>Listeria monocytogenes</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Class II bacteriocin, 4,3 kDa
<i>Lactobacillus helveticus</i>	Helveticin J	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactococcus lactis</i>	Class III bacteriocin, 37 kDa, narrow spectrum of action, sensitive to proteolytic enzymes, reduction of activity after 100° C for 30 min

ภาพที่ 3 ลักษณะจำเพาะของแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ

ที่มา: Parada *et al.* (2007)

3.5.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

มีงานวิจัยหลายฉบับที่พยายามศึกษาถึงปัจจัยต่าง ๆ ที่มีส่วนช่วยส่งเสริมการผลิตแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก ไม่ว่าจะเป็นการพัฒนาสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้เหมาะสมต่อการเจริญและส่งเสริมการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน ดังจะเห็นได้จากตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อแบคทีเรียกลุ่มแลคติก เช่น CM (De Vuyst and Vandamme, 1992), SM8 (De Vuyst, 1995), M17 (Terzaghi and Sandine, 1975) M17S (Li *et al.*, 2000) และ MRS (De Man *et al.*, 1960) เป็นต้นเนื่องจากการเจริญและความสามารถในการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ปริมาณกลูโคส ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ Tween 80, peptone, yeast extract และอีกหลายปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน ดังแสดงในตารางที่ 3 จะเห็นได้ว่าถึงแม้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นสายพันธุ์เดียวกัน แต่ก็มีความต้องการสารอาหารเพื่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่แตกต่างกัน

ตารางที่ 3 ปริมาณและองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ST461BZ และ ST462BZ

Component	Concentration (g/l)	Bacteriocin ST461BZ activity (AU/ml)	Bacteriocin ST462BZ activity (AU/ml)
MRS	50.0	12 800	12 800
BHI	37.0	400	400
M17	42.5	200	400
soy milk	100	0	0
molasses	100	400	200
Tryptone	20.0	12 800	12 800
Meat extract	20.0	3200	3200
Yeast extract	20.0	3200	6400
Tryptone + meat extract	12.5 + 7.5	12 800	6400
Tryptone + yeast extract	12.5 + 7.5	12 800	12 800
Meat extract + yeast extract	10.0 + 10.0	6400	3200
Tryptone + meat extract + yeast extract	10.0 + 5.0 + 5.0	12 800	12 800
Glycerol	0	12 800	12 800
"	1.0	12 800	3200
"	5.0	3200	1600
"	10.0, 20.0, 50.0	3200	400
Concentration (mg/l)			
Cyanocobalamin (Vit. B ₁₂)	1.0	6400	12 800
Thiamine (Vit. B ₁)	1.0	12 800	6400
DL-6,8-thioctic acid	1.0	12 800	25 600
L-ascorbic acid (Vit. C)	1.0	400	12 800
Control	0	12 800	12 800

ที่มา: Todorov and Dicks (2005b)

เนื่องจากอาหารสังเคราะห์ที่ใช้ศึกษาการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นมีราคาที่สูง จึงมีงานวิจัยหลายฉบับที่มีความพยายามดัดแปลงสูตรอาหาร MRS โดยใช้แหล่งไนโตรเจน หรือแหล่งคาร์บอนอื่นทดแทน เช่น Parente and Hill (1992) พบว่า tryptone, yeast extract และ Tween 80 มีผลส่งเสริมการเจริญและการสร้างแบคทีเรียโอซินอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 และ MRS เช่นเดียวกับ Luca *et al.* (2008) ได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Enterococcus mundtii* 5 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ดัดแปลงที่ไม่มีการเติมแหล่งไนโตรเจน พบว่าเชื้อเจริญได้เล็กน้อย และไม่ผลิตสารแบคทีเรียโอซิน และพบว่า K₂HPO₄, MgSO₄, MnSO₄ และ Tween 80 ไม่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินต่อเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ ในขณะที่การเติม NaCl

ลงไปในการอาหารทำให้ความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอสตินลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ในงานวิจัยของ Todorov and Dicks (2009) ได้ดัดแปลงส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยเพิ่มความเข้มข้นของ yeast extract เป็น 20 กรัมต่อลิตร (จาก 4 กรัมต่อลิตร) พบว่ากิจกรรมของสารแบคทีเรียโอสตินที่ผลิตโดยเชื้อ *Enterococcus mundtii* เพิ่มขึ้น จาก 51,200 AU/ml เป็น 102,400 AU/ml และการเติมวิตามินซี ความเข้มข้น 1.0 ppm ก็ส่งเสริมการผลิตแบคทีเรียโอสตินเช่นเดียวกัน ส่วนการเติม KH_2PO_4 แทน K_2HPO_4 พบว่าค่ากิจกรรมลดลงเหลือเพียง 25,600 AU/ml และการเติมกลีเซอรอลไม่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอสติน ส่วนงานวิจัยของ Sharma *et al.* (2010) ได้ดัดแปลงส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยแทนที่ yeast extract ด้วยสารสกัดจากถั่วเหลือง นอกจากจะสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตแล้ว ยังมีผลส่งเสริมการเจริญและการผลิตสารแบคทีเรียโอสติน และพบว่าในขั้นตอนการทำแบคทีเรียโอสตินให้บริสุทธิ์ยังมีความซับซ้อนน้อยลงด้วย จะเห็นได้ว่า yeast extract นั้นเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่มีความสำคัญต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอสติน แต่การเติมให้อยู่ในความเข้มข้นที่เหมาะสม เพราะถ้าหากความเข้มข้นสูงเกินไปก็ส่งผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอสตินได้เช่นเดียวกัน เห็นได้จากการทดลองของ Pantev *et al.* (2002) ทดลองเติม yeast extract เพิ่มขึ้น 2.5 กรัมต่อลิตร พบว่าเพิ่มกิจกรรมของแบคทีเรียโอสตินที่ผลิตจากเชื้อ *Enterococcus faecium* A2000 จาก 800 AU/ml เป็น 3,200 AU/ml และพบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้น yeast extract เพิ่มขึ้นเป็น 7.5 กรัมต่อลิตร ส่งผลให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอสตินลดลงเหลือเพียง 400 AU/ml

นอกเหนือจากการใช้อาหารสังเคราะห์แล้ว การผลิตสารแบคทีเรียโอสตินยังสามารถใช้วัสดุเหลือทิ้งประเภทหางนม (whey) หรือ กากถั่วเหลือง (soybean mill) เช่น Guerra *et al.* (2001) พบว่า *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CECT 539 และ *Pediococcus acidilactici* NRRL B-5627 สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอสตินเมื่อเพาะเลี้ยงในวัสดุเหลือทิ้งประเภท diluted whey ซึ่งได้จากอุตสาหกรรมการผลิตเนยแข็ง เช่นเดียวกับ Nicolas *et al.* (2004) ที่สามารถผลิตสาร mutacin จาก *Streptococcus mutan* เมื่อเพาะเลี้ยงใน cheese whey permeate ส่วนงานวิจัยของ Todorov and Dicks (2005a) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Enterococcus faecium* ST311LD ในอาหาร MRS ที่เติม 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) กากน้ำตาล พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีแต่ไม่พบการผลิตสารแบคทีเรียโอสติน แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ดัดแปลงโดยการเติม tryptone (20 กรัมต่อลิตร) แซคคาไรส (5 กรัมต่อลิตร) หรือ วิตามินซี (1.0 ppm) เชื้อสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอสตินได้ 12,800 AU/ml และ Dominguez *et al.* (2007) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* 8A ใน soybean protein พบว่าสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอสติน cerein 8A ได้ดี Archana *et al.* (2008) ได้ดัดแปลงอาหาร

เลี้ยงเชื้อจากสารสกัด soya nutri nuggets เพื่อเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCSUB202 พบว่าสามารถส่งเสริมการเจริญและการผลิตสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อได้เทียบเท่ากับอาหาร MRS อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

3.5.3 อุณหภูมิ

แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ต่างกันจะมีความสามารถในการเจริญเติบโตและสร้างสารแบคทีเรียโอซินแตกต่างกัน ซึ่ง Sofia *et al.* (2008) พบว่าเชื้อ *Pediococcus acidilactici* H และ *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627 มีค่ากิจกรรมดีที่สุดในเมื่อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เช่นเดียวกับ Delgado *et al.* (2005) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus casei* CRL 705 มีค่ากิจกรรมดีที่สุดในเมื่อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสและเชื้อ *Lactobacillus pentosus* B96 มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินคือ 22 องศาเซลเซียส (Delgado *et al.*, 2005) แต่ก็ยังมีเชื้อบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินในอุณหภูมิสูงได้เช่นเชื้อ *Pediococcus acidilactici* LS2-30 ที่มีการเจริญในอาหารเหลว MRS โดยสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส (ชุนันท์, 2547)

3.5.4 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

แบคทีเรียกรดแลคติกต่างสายพันธุ์กันจะมีค่าพีเอชที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ต่างกัน เช่น Todorov and Dicks (2009) รายงานว่าเชื้อ *Enterococcus mundtii* สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดถึง 102,400 AU/ml เมื่อค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 6.0-6.5 นอกจากนี้ Todorov and Dicks (2005b) ได้ทำการศึกษาอิทธิพลของค่าพีเอชต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ST461BZ และ ST462BZ พบว่าค่าพีเอชเริ่มต้นส่งผลต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน โดยหากค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อมีค่า 4.5 ส่งผลให้เชื้อผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้เพียง 1,600 AU/ml และเมื่อปรับค่าพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 พบว่าสามารถส่งเสริมการสร้างสารแบคทีเรียโอซินเพิ่มขึ้นเป็น 12,800 AU/ml ทั้ง 2 สายพันธุ์ดังแสดงในภาพที่ 4 แต่จากการศึกษาของ Delgado *et al.* (2005) พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่มีผลกระทบต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* B96

	Bacteriocin ST461BZ					Bacteriocin ST462BZ				
Initial pH	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5	4.5	5.0	5.5	6.0	6.5
Final pH	3.5	3.6	3.6	3.7	3.8	3.5	3.6	3.6	3.7	3.7
Bacteriocin activity (AU/ml)	1600	6400	6400	6400	12 800	1600	3200	3200	6400	12 800
Reduction of bacteriocin activity (%)*	87.5	50	50	50	0	87.5	75	75	50	0
*Based on the highest activity, recorded as 12 800 AU/ml in MRS broth.										

ภาพที่ 4 อิทธิพลจากค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus rhamnosus* ST461BZ และ ST462BZ

ที่มา: Todorov and Dicks (2005b)

3.5.5 ระยะการเจริญของเชื้อ

Piard and Desmazaud (1992) พบว่าการสร้างสารแบคทีริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ โดยแบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างในช่วง logarithmic phase และ stationary phase การสร้างสารแบคทีริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่แล้วมีการผลิตที่เป็นแบบ growth-associated แต่จากการศึกษาของ Delgado *et al.* (2005) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus pentosus* B96 มีช่วงที่สามารถผลิตสารแบคทีริโอซินได้สูงสุดที่ 42-48 ชั่วโมง โดยเป็นช่วง late exponential phase ของเชื่อดังกล่าว หลังจากนั้นเชื้อจะหยุดสร้างสารแบคทีริโอซิน และค่ากิจกรรมที่วัดได้ก็จะลดลงอย่างต่อเนื่องหลังจากชั่วโมงที่ 48

3.6 การทำแบคทีริโอซินให้บริสุทธิ์

แบคทีริโอซินเป็นโปรตีนที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นและปลดปล่อยออกสู่นอกเซลล์ เนื่องจากแบคทีริโอซินแต่ละชนิดนั้นมีคุณสมบัติและลักษณะที่แตกต่างกันซึ่งขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่สร้างและยีนที่ควบคุม ดังนั้นการสกัดสารแบคทีริโอซินเพื่อนำมาใช้ประโยชน์อาจทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนด้วย ammonium sulphate (Muriana and Luchansky, 1993) วิธี Vacuum concentration (Upreti and Hinsdill, 1973) การดูดซับแบคทีริโอซินด้วย Amberlite XAD-16 (Cintas *et al.*, 2000) เป็นต้น

Pingitore *et al.* (2007) กล่าวว่าวิธีที่นิยมใช้มากที่สุดคือเทคนิคการตกตะกอนด้วยเกลือชนิดต่าง ๆ ร่วมกับวิธีอื่น เช่น ion-exchange (IEC) และ reverse phase C18 solid phase extraction, absorption-desorption (AD), reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) และ Sodium Dodecyl Sulphate Polyacrilamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE)

Casaus *et al.* (1997) ใช้ amberlite XAD-16 ในการสกัด enterocin B ที่ผลิตโดยเชื้อ *Enterococcus faecium* T136 ให้บริสุทธิ์ พบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น 40 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวกับ Pilasombut (2006) ใช้ amberlite XAD-16 ในการทำบริสุทธิ์สารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 พบว่าภายหลังจากขั้นตอนการสกัดพบค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินเพิ่มขึ้น 4 เท่าโดยเพิ่มขึ้นจาก 3,200 AU/ml เป็น 12,800 AU/ml

4. การปนเปื้อนจุลินทรีย์ในผักสดพร้อมบริโภค

ปัจจุบันการบริโภคผักสดเป็นที่นิยมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งผักสดที่วางจำหน่ายทั้งในตลาดสด และซูเปอร์มาร์เก็ตนั้นจะผ่านกระบวนการแปรรูปน้อยมาก (minimally processes) ส่วนใหญ่จะเป็นเพียงการล้างและตัดแต่ง และบางครั้งมีการจัดการด้านสุขลักษณะที่ไม่ได้มาตรฐาน ซึ่งอาจนำไปสู่การปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรคได้ ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 การปนเปื้อนเชื้อก่อโรคต่างๆในตัวอย่างผักสดและผลไม้สด

Pathogen	Product
<i>Aeromonas</i>	alfalfa sprouts, asparagus, broccoli, cauliflower, celery, lettuce, pepper, spinach
<i>Bacillus cereus</i>	alfalfa sprouts, cress sprouts, cucumbers, mustard sprouts, soybean sprouts
<i>Campylobacter jejuni</i>	green onions, lettuce, mushroom, potato, parsley, pepper, spinach
<i>Clostridium botulinum</i>	cabbage, mushrooms, pepper
<i>E. coli</i> O157:H7	alfalfa sprouts, apple juice, cabbage, celery, cilantro, coriander, cress sprouts, lettuce
<i>Listeria monocytogenes</i>	bean sprouts, cabbage, chicory, cucumber, eggplant, lettuce, mushrooms, potatoes, radish, salad vegetables, tomato
<i>Salmonella</i>	alfalfa sprouts, artichokes, beet leaves, celery, cabbage, cantaloupe, cauliflower, chili, cilantro, eggplant, endive, fennel, green onions, lettuce, mungbean sprouts, mustard cress, orange juice, parsley, pepper, salad greens, spinach, strawberries, tomato, watermelon
<i>Shigella</i>	celery, cantaloupe, lettuce, parsley, scallions
<i>Staphylococcus</i>	alfalfa sprouts, carrot, lettuce, onions sprouts, parsley, radish
<i>Vibrio cholerae</i>	cabbage, coconut milk, lettuce

ที่มา: Buck *et al.* (2003)

อาหารเป็นพิษที่เกิดจากการรับประทานผักและผลไม้สดนั้นสามารถพบได้ในชีวิตประจำวันโดยมีอาการ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสีย ถ่ายเป็นเลือดซึ่งอาการจะรุนแรงแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อน หรือสารพิษที่เชื้อสร้างขึ้น โดยเชื้อก่อโรคที่สำคัญคือ *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. และ *Listeria monocytogenes* โดยเชื่อดังกล่าวสามารถพบได้ในธรรมชาติ โดยการปนเปื้อนเชื้ออาจเกิดได้จาก กระบวนการเพาะปลูก เช่น ปนเปื้อนจากดินในแปลงเพาะปลูก ปุ๋ยคอกที่ใช้ หรือปนเปื้อนจากกระบวนการเก็บเกี่ยวเนื่องจากสุขอนามัยของ

ผู้ปฏิบัติงาน สุขลักษณะของสิ่งอำนวยความสะดวกในกระบวนการผลิตไม่ได้มาตรฐาน และในระหว่างการขนส่ง

4.1 *Listeria monocytogenes*

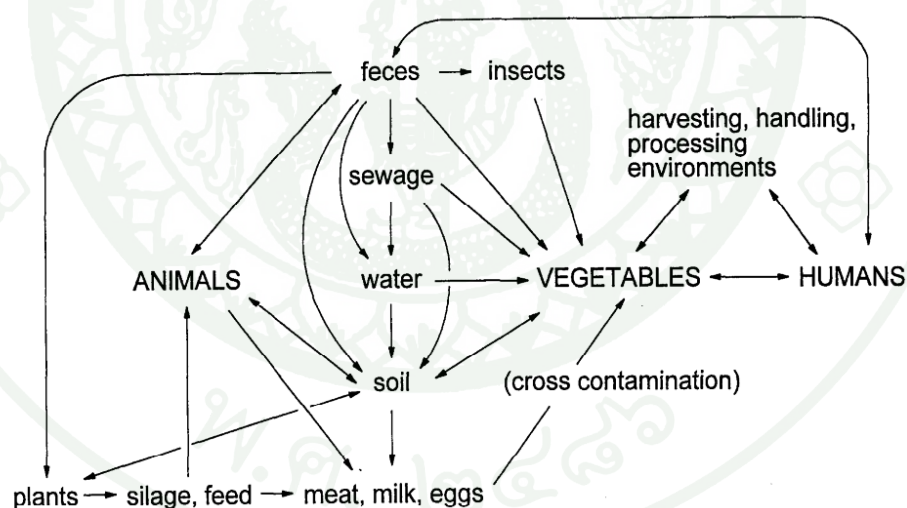
Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนสั้น ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ผลการทดสอบกะตะเลส เป็นบวก และออกซิเดสเป็นลบ ผลการทดสอบบน blood agar ให้ผล β -hemolysis ที่อุณหภูมิ 20-25 องศาเซลเซียส สามารถเคลื่อนที่ได้โดย peritrichous flagella แต่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เชื้อจะไม่สร้างแฟลกเจลลา สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างตั้งแต่ต่ำกว่า 1 ถึง 50 องศาเซลเซียส และมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญอยู่ที่ 37 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชที่กว้าง 4.3-9.6 หรือสภาวะที่มีค่า water activity ต่ำในช่วง 0.9-0.97 (Marriott, 1997; Robinson *et al.*, 2000) *Listeria monocytogenes* เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (food borne pathogen) ซึ่งเป็นปัญหาทางสาธารณสุข เนื่องจากความรุนแรงของเชื้อทำให้เกิดโรคเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) การติดเชื้อในกระแสเลือด (septicemia) และการแท้ง (abortion) พบว่าอัตราการเสียชีวิตจากเชื้อโรคชนิดนี้สูงถึงร้อยละ 20-30 *Listeria monocytogenes* ยังเป็นสาเหตุที่ก่อโรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis) มีลักษณะอาการคือ มีไข้ ปวดเมื่อยกล้ามเนื้อ คลื่นไส้ ท้องร่วง ในผู้ป่วยบางรายที่อาการหนักอาจล้มพับและหมดสติ หากการติดเชื้อแพร่กระจายไปถึงระบบประสาทส่วนกลาง จะมีอาการ ปวดศีรษะ เมื่อยคอ มึนงง เสียการทรงตัว ชัก และเข้าขั้นโคม่า การติดเชื้อชนิดนี้ในระหว่างตั้งครรภ์อาจทำให้แท้งบุตร หรืออาจทำให้เด็กทารกติดเชื้อได้

4.2 ระบาดวิทยาของ *Listeria monocytogenes* ที่เกี่ยวข้องกับผักและผลไม้

การระบาดที่เกิดจากเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่ก่อให้เกิดโรค listeriosis ที่เกิดจากการรับประทานผักได้มีการศึกษาครั้งแรกโดย Blendon and Szatalowicz (1967) พบว่าในช่วงปี ค.ศ. 1933-1966 มีผู้ป่วยมากถึง 731 ราย ที่ป่วยเป็นโรคนี้และมีสาเหตุมาจากการรับประทานผักสด ที่ปนเปื้อนเชื้อ *Listeria monocytogenes* ต่อมาในปี ค.ศ. 1996-1997 พบว่าในประเทศสหรัฐอเมริกาพบผู้ป่วยที่เกิดจากการระบาดของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด 2,518 ราย ซึ่งต้องรับการรักษาในโรงพยาบาล 2,322 ราย และมีผู้เสียชีวิตทั้งหมด 504 ราย (Mead *et al.*, 1999) นอกจากนี้ยังพบการระบาดอีกหลายครั้ง เช่น ในปี ค.ศ. 2008 ในประเทศแคนาดาพบการระบาดของโรคลิสเทอริโอซิสจากการปนเปื้อนเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แช่เย็น จากบริษัท

Maple Leaf Foods โดยมีผู้ป่วยทั้งสิ้น 57 ราย และมีผู้เสียชีวิต 22 ราย (Canadian Press, 2008) ในสหรัฐอเมริกาเกิดการระบาดของโรคครั้งรุนแรงในปี ค.ศ. 2011 เกิดในพื้นที่ทั้งหมด 28 รัฐ ซึ่งมีสาเหตุมาจากการบริโภคแคนตาลูปที่ปนเปื้อนเชื้อ *Listeria monocytogenes* ทำให้มีผู้ป่วยทั้งสิ้น 146 ราย และมีผู้เสียชีวิต 30 ราย (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2011) ในประเทศไทยได้มีการรายงานพบผู้ป่วยจากโรค listeriosis เช่นกัน Rusemechan (1995) รายงานว่าพบผู้ป่วย 2 ราย เป็นชายอายุ 46 และ 66 ปี ประกอบอาชีพเกษตรกร มีอาการปวดศีรษะ ตาพร่ามัว คลื่นไส้ และอาเจียน ผลจากการตรวจเลือดของผู้ป่วยทั้ง 2 รายพบเชื้อ *Listeria monocytogenes* และมีอาการโรคเชื้อหุ้มสมองอักเสบ และเสียชีวิตเนื่องจากระบบการหายใจล้มเหลว

Listeria monocytogenes สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ และมีโอกาสปนเปื้อนผักสดได้จากหลายปัจจัย เช่น พื้นที่เพาะปลูก น้ำที่ใช้เพาะปลูก ปุ๋ยคอก อุปกรณ์ในการเก็บเกี่ยว น้ำล้างผัก ภาชนะบรรจุ พาหนะในการขนส่ง และแมลงต่างๆ รวมถึงคนก็สามารถเป็นแหล่งแพร่เชื้อชนิดนี้ได้ วงจรการปนเปื้อนเชื้อในผักสดดังแสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 วงจรการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผักสด

ที่มา: Beuchat (1996)

การปนเปื้อนเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผักส่วนใหญ่มักพบปนเปื้อนในผักที่มีการสัมผัสกับพื้นดินที่ใช้เพาะปลูก โดย Beuchat (1996) ได้รวบรวมข้อมูลการปนเปื้อนเชื้อชนิดนี้ในผักสดชนิดต่าง ๆ ในหลายประเทศ ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 การพบเชื้อ *Listeria monocytogenes* จากตัวอย่างผักสดชนิดต่าง ๆ

Vegetable	Country	Prevalence ^a
Bean sprouts	Malaysia	6/7 (85.7%)
Cabbage	Canada	2/92 (2.2%)
	USA	1/92 (1.1%)
Cucumber	Malaysia	4/5 (80%)
	Pakistan	1/15 (6.7%)
	USA	2/92 (2.2%)
Leafy vegetables	Malaysia	5/22 (22.7%)
Potatoes	USA	19/70 (27.1%)
	USA	28/132 (21.2%)
Prepacked salads	Northern Ireland	3/21 (14.3%)
	UK	4/60 (13.3%)
Radish	USA	25/68 (36.8%)
	USA	19/132 (14.4%)
Salad vegetables	Germany	6/263 (2.3%)
	Northern Ireland	7/66 (10.6%)
	The Netherlands	11/25 (44%)
Tomato	Pakistan	2/15 (13.3%)
Vegetables	Italy	7/102 (6.9%)
	Spain	8/103 (7.8%)
	Taiwan	6/49 (12.2%)
	UK	4/64 (6.2%)

ที่มา: Beuchat (1996)

ในประเทศไทยได้มีการศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสดจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานครของสำนักคุณภาพและความปลอดภัยอาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (ปรีชา และคณะ, 2553) พบ *Listeria monocytogenes* 2 ตัวอย่างจากตัวอย่างผักจากตลาดสด 58 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.4 และพบ *Listeria* spp. ทั้งหมด 36 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 61.1 แต่ตัวอย่างผักจากซูเปอร์มาร์เก็ตตรวจไม่พบเชื้อ (ตารางที่ 6)

สุจิตา (2553) ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสดจากตัวอย่างผักสดพร้อมบริโภคทั้งหมด 102 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria* spp. ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง คิดเป็น 21.6

เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบ *Listeria monocytogenes* จากตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นฝอยจำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.0 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างกะหล่ำปลีทั้งหมดที่นำมาศึกษา

ตารางที่ 6 เชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษที่พบในตัวอย่างผักจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตใน กรุงเทพมหานคร

แหล่งของ ตัวอย่าง	จำนวน ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบ					
		เชื้อโรคอาหารเป็นพิษ					
		<i>Salmonella</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>L. monocytogenes</i> spp.	<i>Shigella</i> spp. <i>V. parahaemolyticus</i>	<i>S. aureus</i>	<i>Listeria</i> spp.
ตลาดสด	58	16	13	2	0	0	36
ซูเปอร์ มาร์เก็ต	39	0	1	0	0	0	11
รวม	97	16	14	2	0	0	47

ที่มา: ปรีชา และคณะ (2553)

5. การใช้ประโยชน์จากสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหาร

มีการนำสารแบคทีเรียโอซินมาประยุกต์กับผลิตภัณฑ์อาหารอย่างแพร่หลาย เช่น ผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มแอลกอฮอล์ โดยเฉพาะสารแบคทีเรียโอซินโนซิน ซึ่งได้รับการยอมรับจาก CODEX ให้ใช้ในอาหารได้อย่างปลอดภัย ส่วนในผลิตภัณฑ์ประเภทผักและผลไม้ เพิ่งเริ่มมีการนำสารแบคทีเรียโอซินมาใช้มากขึ้นเมื่อไม่นานมานี้เองและมักจะเป็นผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้หมัก แต่กับผักและผลไม้สดยังไม่เป็นที่แพร่หลายนัก อย่างไรก็ตามมีงานวิจัยหลายฉบับที่ศึกษาความเป็นไปได้ ในการใช้สารแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อลดปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนในผักและผลไม้สด เช่น lettuce, melon and apple slices, honey dew, cabbage, alfalfa, soybean sprout, apparagus, broccoli โดยเฉพาะอย่างยิ่งสามารถลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคที่สำคัญคือ *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* (Leverentz *et al.*, 2003; Bhagwat *et al.*, 2004; Bari *et al.*, 2005; Lucas *et al.*, 2006; Galvez *et al.*, 2007; Allende *et al.*, 2007; Ponce *et al.*, 2008; Settanni and Corsetti, 2008; Molinos *et al.*, 2005)

Leverentz *et al.* (2003) ทดลองยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ใน melon และ red apple โดยใช้ Lytic bacteriophage พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อได้ 2.0 ถึง 4.6 Log CFU/g เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติม bacteriophage และเมื่อทดลองใช้ nisin ในการยับยั้งเชื้อสามารถลดจำนวนเชื้อได้ 3.2 Log CFU/g เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติม nisin และผลจากการทดลองใช้ bacteriophage ร่วมกับ nisin พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้มากถึง 5.7 Log CFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม

Bari *et al.* (2005) ทดลองใช้ nisin (50µg/ml), pediocin (100 AU/ml), Sodium Lactate (NaL, 2%), Potassium Sorbate (KS, 0.02%), Phytic acid (0.02%) และ Citric acid (10mM) ในการทดสอบยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในตัวอย่างกะหล่ำปลี broccoli และ soybean sprout โดยปนเปื้อนเทียมตัวอย่างด้วย *Listeria monocytogenes* 5 สายพันธุ์ ที่ความเข้มข้นเซลล์ 4.61, 4.34 และ 4.67 Log CFU/g ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างล้างในสารละลายที่ได้กล่าวไว้ข้างต้น จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่เหลือรอด พบว่าปัจจัยเดี่ยวที่ศึกษาสามารถลดเชื้อในตัวอย่างผักได้โดยเฉลี่ย 2.2 log CFU/g และเมื่อศึกษาการใช้ปัจจัยร่วม พบว่า nisin-Phytic acid และ nisin-pediocin-Phytic acid สามารถยับยั้งเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยสามารถยับยั้งเชื้อในกะหล่ำปลีได้ 3.70 Log CFU/g, broccoli 3.90 Log CFU/g และ 2.31 Log CFU/g ใน soybean sprout

Molinos *et al.* (2005) ได้ใช้ enterocin AS-48 ร่วมกับสารกันเสียชนิดต่าง ๆ ทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* CECT 4032 ใน alfalfa, soybean sprout และ apparagus พบว่าสารละลาย AS-48 (25µg/ml) สามารถลดจำนวน *Listeria monocytogenes* ใน alfalfa และ soybean sprout ได้ 2.0-2.4 Log CFU/g เมื่อเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ แต่สารละลายชนิดเดียวกันนี้สามารถยับยั้งเชื้อได้เพียงเล็กน้อยในตัวอย่าง apparagus จากผลทดสอบปัจจัยร่วมระหว่าง enterocin AS-48 และกรดชนิดต่างๆคือ Acetic acid, Citric acid, Sodium propionate และ Potassium sorbate พบว่าส่งเสริมประสิทธิภาพของการยับยั้งเชื้อได้เพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยเมื่อเทียบกับการใช้ enterocin AS-48 เพียงอย่างเดียว โดยประสิทธิภาพการยับยั้งเพิ่มเป็น 2.6-2.7 Log CFU/g

สุธิตา (2553) ใช้สารแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 มาประยุกต์ใช้ในการล้างเพื่อลดจำนวนเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนตัวอย่างแดงกวาสด พบว่าสารแบคทีริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้ง 512 AU/ml สามารถทำลายเชื้อปนเปื้อนในปริมาณ 10^2 CFU/g ได้อย่างมีประสิทธิภาพ อย่างไรก็ตามสารแบคทีริโอซินก็มีข้อจำกัด เนื่องจากสารดังกล่าวมีรูปแบบการยับยั้งเป็นแบบ narrow spectrum และมักจะยับยั้งได้ดีกับแบคทีเรียแกรมบวกด้วยกันเท่านั้น ซึ่งการใช้สารแบคทีริโอซินอาจใช้อย่างเดียวหรือใช้ร่วมกับสารอื่น เช่น sodium lactate, potassium sorbate, phytic acid, citric acid เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพให้สูงขึ้น โดยสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในขั้นตอนของการล้างผักและผลไม้ (washing step)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการศึกษาการเจริญและผลิตสารแบคทีเรียโอซินในครั้งนี้มี 3 สายพันธุ์ คือ *Enterococcus faecium* KU-B5 คัดแยกจากชมพู *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 คัดแยกจาก สับปะรด (สุริดา, 2553) และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 คัดแยกจากลำไส้ไก่และจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินคือ *Listeria monocytogenes* DMST 17303

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2.1 De Man Rogosa and Sharpe broth (MRS, Merck)
- 2.2 De Man Rogosa and Sharpe agar (MRS agar, Merck)
- 2.3 Tryptic soy agar (TSA, Merck)
- 2.4 Tryptic soy broth + 0.6% yeast extract (TSBYE, Merck)
- 2.5 Tryptic soy broth + 0.6% yeast extract + 0.75% agar (TSAYE soft agar, Merck)
- 2.6 L.mono Differential Agar Base (HIMEDIA)

3. สารเคมี

- 3.1 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 โมลาร์ (Anala R, England)
- 3.2 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลาร์ (Merck)
- 3.3 Tween 80 (Lab Centre)
- 3.4 Yeast Extract (Difco)
- 3.5 Dipotassium phosphate (Ajax Finechem)
- 3.6 เอทานอล (Merck)
- 3.7 ไอโซโพรพานอล (Fisher Scientific)
- 3.8 ไตรฟลูออโรอะซิติก (Fluka)

3.9 Amberlite XAD 16 (Sigma)

4. วัสดุและเครื่องมือ

- 4.1 เครื่องชั่งแบบ 2 ตำแหน่ง (Sartorius BP 1200)
- 4.2 เครื่องชั่งแบบ 4 ตำแหน่ง (Sartorius BP 210S)
- 4.3 เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (Meterscan 20^{PH})
- 4.4 หม้อน้ำเชื่อมระบบความดันไอน้ำ (Tomy SS-325)
- 4.5 ตู้บ่มปรับอุณหภูมิ (Fisher Scientific Isotemp)
- 4.6 ตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส (Whirlpool)
- 4.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Gemmyco-YCW-010)
- 4.8 เครื่องตีผสมตัวอย่าง (Seward-stomacher 400)
- 4.9 เครื่องผสม (Vortex-2 Gennie)
- 4.10 เครื่องกวนสารละลายด้วยระบบแม่เหล็ก (HL Instrument, Magnetic stirrer-MS 115)
- 4.11 เครื่องปั่นเหวี่ยง (Labnet-Spectrafuge)
- 4.12 ตู้ปลอดเชื้อ (Flow dryer mark และ Biohazard Gelman Sciences Australia BH143)
- 4.13 เครื่องแยกสารแบบหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Fotodyne และ Kokusan รุ่น H18
- 4.14 เครื่องระเหย Rotary evaporator (Buchi Rotavapor R-200)
- 4.15 Econo column (BioRad)

5. การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิ

การออกแบบการทดลองด้วยวิธีการทากูชิมีแนวคิดและพัฒนาโดยนักวิทยาศาสตร์ชาวญี่ปุ่นโดย Dr. Genichi Taguchi เมื่อปี ค.ศ. 1980 ซึ่งเป็นเทคนิคทางวิทยาศาสตร์สำหรับการกำหนดค่า และการปรับปรุงเครื่องมือ กระบวนการ และวัตถุดิบที่เกี่ยวข้องกับการผลิตผลิตภัณฑ์ต่างๆ ให้ง่ายหรือสะดวกขึ้น โดยมีจุดประสงค์เพื่อปรับปรุงลักษณะ และลดจำนวนของทริตเมนต์ และความผิดพลาดลงพร้อม ๆ กัน ซึ่งวิธีการดังกล่าวมุ่งเน้นศึกษาถึงการควบคุมตัวแปรหลักในกระบวนการ และการหาสภาวะที่เหมาะสมของการทดลอง หรือออกแบบการทดลองเพื่อคำนวณหาค่าการตอบสนองที่เหมาะสม และให้ได้ผลลัพธ์ที่ดีที่สุด (Madhav, 1989) วิธีการทากูชิออกแบบการทดลองโดยใช้ fractional factorial ร่วมกับ orthogonal array (OA) (Box *et al.*, 1988)

(ตารางที่ 7) ซึ่งประกอบไปด้วยจำนวนปัจจัยในการทดลอง และระดับของปัจจัยในแต่ละการทดลอง โดยวิธีการทางสถิติประกอบด้วย 5 ขั้นตอนหลัก (Roy, 2001) คือ

1. การวางแผนการทดลอง (planning experiment) เป็นขั้นตอนการพิจารณาตัวแปรต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง และเป็นขั้นตอนที่กำหนดจุดประสงค์ที่ต้องการ
2. การออกแบบการทดลอง (designing experiment) เป็นขั้นตอนการเลือก orthogonal array (OA) ที่เหมาะสม และรวมถึงการกำหนดตัวแปรและระดับของตัวแปรที่จะใช้ในการทดลอง
3. การทดลอง (conducting experiment) ทำการทดลองตามตัวแปรและระดับของตัวแปรที่ได้กำหนดไว้ใน orthogonal array
4. การวิเคราะห์ผลการทดลอง (analyzing experiment) เป็นขั้นตอนของการพิจารณาผลจากการทดลองของตัวแปรและระดับของตัวแปร ว่าตัวแปรใดบ้างที่มีผลต่อระบบ และทำการหาสถานะที่เหมาะสมและให้ผลดีที่สุด
5. ทำการทดลองซ้ำเพื่อยืนยันผลการทดลอง (confirming) เพื่อเป็นขั้นตอนการพิสูจน์สถานะที่เหมาะสมที่สุดที่ได้โดยยืนยันจากผลการทดลอง

ตารางที่ 7 L9 (3³) Orthogonal Array

ชุดการทดลอง	ปัจจัย		
	1	2	3
1	1	1	1
2	1	2	2
3	1	3	3
4	2	1	2
5	2	2	3
6	2	3	1
7	3	1	3
8	3	2	1
9	3	3	2

ข้อดีของการออกแบบการทดลองโดยอาศัยวิธีการทากูชิ

วิธีทากูชิสามารถช่วยลดจำนวนของการทดลอง ทำให้ประหยัดเวลา และต้นทุนในการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกับวิธี full factorial combination นอกจากนี้ยังสามารถนำไปใช้ได้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมการสื่อสาร และโทรคมนาคม เป็นต้นและยังให้ผลลัพธ์ที่น่าเชื่อถือได้ และตรงตามวัตถุประสงค์ของการทดลอง

วิธีการ

1. การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มาตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ได้แก่ การติดสีแกรม รูปร่างเซลล์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1,500X) การสร้างเอนไซม์อะไมเลส และลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง MRS

2. การทดสอบการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งประเภทแบคทีเรียโอซิน โดยวิธี Spot on lawn (Ahn and Stiles, 1990)

2.1 การเตรียมจุลินทรีย์ทดสอบ

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในอาหาร TSBYE บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงใน TSBYE soft agar (ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส) ปริมาตร 5 มิลลิตร ผสมให้เข้ากันก่อนนำไปเททับบนผิวหน้าอาหาร TSA รोजनผิวหน้าอาหารแข็ง แล้วจึงทำให้ผิวหน้าอาหารแห้งก่อนนำไปใช้ทดสอบต่อไป

2.2 การทดสอบยืนยันการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เพื่อให้เจริญและสร้างสารยับยั้งปลดปล่อยออกมานอกเซลล์ โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16-18 ชั่วโมง นำเซลล์ซึ่งเข้มข้นมาทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ค่าอยู่ในช่วง 5.5-6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5.0 โมลาร์ เพื่อลดค่าความเป็นกรดที่มาจากกรดที่เกิดจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งอาจมีผลต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่นอกเหนือจากฤทธิ์การยับยั้งโดยแบคทีเรียโอซินเพียงอย่างเดียว จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์จุลินทรีย์ออกที่ความเร็ว 10,000 Xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้มารองผ่านแผ่นเยื่อกรองปลดเชื้อขนาด 0.22 ไมครอน เก็บส่วนใสที่กรองได้ใน eppendorf ปลอดเชื้อ จากนั้น pipette ส่วนใสที่กรองแล้ว 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียทดสอบตาม

ข้อ 2.1 รวบรวมสารละลายใสซึมผ่านวุ้น นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตโซนใส (clear zone) ซึ่งเกิดขึ้นจากการที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างสารยับยั้งประเภทแบคเทอรีโอซิน

2.3 การหาค่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ โดยวิธี Critical dilution assays (Yousef, 2003)

การหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคเทอรีโอซิน โดยวิธี critical dilution assays นำน้ำเลี้ยงเชื้อใสที่ผ่านการกรองด้วยแผ่นเยื่อกรองปลอดเชื้อจากข้อ 2.2 มาเจือจางแบบอนุกรมลำดับละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ โดยเริ่มจากระดับการเจือจางที่ 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128..... จากนั้นเปิดตัวอย่างในแต่ละความเจือจางปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารเพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียทดสอบตามข้อ 2.1 รวบรวมสารละลายใสซึมผ่านวุ้น นำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หาค่ากิจกรรมการยับยั้งจากค่าการเจือจางสูงสุดที่ยังคงเห็นบริเวณโซนใส (clear zone) ของการยับยั้งชัดเจนและคำนวณค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อมิลลิลิตร (Arbitrary Unit, AU/ml) จากสมการดังนี้

$$AU/ml = \frac{DF_i \times 1000}{V}$$

DF_i = ค่าส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดที่พบการยับยั้ง
 V = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อใสที่ผ่านการกรอง (μl)

3. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหาร MRS และอาหารน้ำมะพร้าว

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ในอาหารสังเคราะห์ MRS และอาหารน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อให้มีความเข้มข้นของเซลล์อยู่ในช่วง 10^6 CFU/ml เพื่อใช้เป็นต้นเชื้อในการศึกษาการเจริญ ใส่เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารสังเคราะห์ MRS และอาหารน้ำมะพร้าว ปริมาตร 99 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นในช่วง 10^4 CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง เพื่อศึกษากราฟการเจริญ โดยทำการ

วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ (CFU/ml) บนอาหาร MRS ด้วยวิธี spread plate รายงานผลเป็น Log CFU/ml และวัดการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชและเปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารทั้ง 2 ชนิด

4. ศึกษาการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ในอาหารสังเคราะห์ MRS และอาหารน้ำมะพร้าว บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ได้จากข้อ 3 ในสภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาต่างๆ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง มาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ นำเฉพาะส่วนของสารละลายไปทดสอบการสร้างสารแบคทีเรียโอซินโดยการหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อเป้าหมายโดยวิธี spot on lawn และรายงานผลค่าการยับยั้งเป็น Arbitrary Unit (AU/ml)

5. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำมะพร้าวเพื่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

5.1 การศึกษาปัจจัยเดี่ยว

นำน้ำมะพร้าวมาเติมสารประกอบต่าง ๆ ดังนี้

1. น้ำมะพร้าว (control)
2. น้ำมะพร้าวเติมแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ คือ

กลูโคส 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์
 ซูโครส 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์
 แลคโตส 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์

3. นํ้ามะพร้าวเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ได้แก่

เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$ 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์
 yeast extract 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์
 peptone 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์
 beef extract 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์
 soybean powder 1.0, 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์
 whey 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์

4. นํ้ามะพร้าวเติมสารประกอบอื่น ๆ ได้แก่

Tween 80 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์
 K_2HPO_4 0.2 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ลงในอาหารนํ้ามะพร้าวที่ได้เติมสารประกอบแต่ละชนิด บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญในสภาวะนิ่ง ทำการเก็บตัวอย่างมาทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ นำเฉพาะส่วนของสารละลายใสมาทดสอบหาสารแบคทีเรียโอซินโดยการหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย *Listeria monocytogenes* DMST 17303 โดยวิธี spot on lawn และเลือกสารประกอบที่ส่งเสริมการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน มาทำการศึกษาปัจจัยร่วมต่อไป

5.2 การศึกษาปัจจัยร่วมและหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกโดยออกแบบการทดลองโดยวิธีทางสถิติ

เลือกสารประกอบที่เหมาะสมจากข้อ 5.1 ที่มีผลต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน มาศึกษาปัจจัยร่วม (Yeast extract, Tween 80 และ K_2HPO_4) ต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินในอาหารนํ้ามะพร้าว ทำการวิเคราะห์ปริมาณเซลล์ (CFU/ml) และวัดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช และนำเซลล์ที่ปั่นเหวี่ยงแล้วมาปั่นเหวี่ยง และนำสารละลายใสที่ได้มาหาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียเป้าหมาย *Listeria monocytogenes* DMST 17303 โดยวิธี spot on lawn และเลือกเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 มาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน โดยออกแบบการทดลองและวิเคราะห์ผลโดยหลักการของทางสถิติ และใช้แผนการทดลองแบบ

Orthogonal Array L9 (3^3) โดยกำหนดตัวแปรเป็น 3 ปัจจัย ปัจจัยละ 3 ระดับ ดังนี้ yeast extract 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์, Tween 80 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ และ K_2HPO_4 0.2, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ ดังแสดงในตารางที่ 8 และ 9

จากนั้นหาสภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการสร้างสารแบคทีเรียโอซินโดยเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 โดยสภาวะที่เหมาะสมที่สุด จะถูกเลือกใช้เป็นสภาวะที่จะนำไปใช้สำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซินขนาด 1 ลิตร เพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์และใช้ในการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 8 ปัจจัยและระดับของปัจจัยในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินในน้ำมะพร้าวโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ระดับ	ปัจจัย		
	Yeast Extract (w/v)	Tween 80(v/v)	K_2HPO_4 (w/v)
1	0.5	1.0	2.0
2	0.1	0.5	1.0
3	0.2	0.5	1.0

ตารางที่ 9 การออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิ ในการหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินในอาหารน้ำมะพร้าวโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ชุดการทดลอง	ปัจจัย และความเข้มข้นของปัจจัย		
	Yeast extract (%w/v)	Tween 80 (%v/v)	K ₂ HPO ₄ (%w/v)
1	0.5	0.1	0.2
2	0.5	0.5	0.5
3	0.5	1.0	1.0
4	1.0	0.1	0.5
5	1.0	0.5	1.0
6	1.0	1.0	0.2
7	2.0	0.1	1.0
8	2.0	0.5	0.2
9	2.0	1.0	0.5

6. การสกัดแยกสารแบคทีเรียโอซินจากอาหารน้ำมะพร้าว

เพาะเลี้ยง *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวที่สภาวะเหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากการออกแบบการทดลองโดยวิธีทากูชิ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดแยกสารแบคทีเรียโอซินโดยวิธี Amberlite adsorption โดยอาศัยหลักการ hydrophobic adsorption ของ Amberlite XAD-16 (Sigma) ในการแยกสารโปรตีน โดยการปั่นแยกเซลล์ออกที่ 10,000 Xg ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำเอาสารละลายใสปราศจากเซลล์ใส่ในฟลาสก์ขนาด 2 ลิตร เติมเรซิน amberlite ปริมาณ 20 กรัม (ที่ผ่านการ pretreat ด้วย 50 เปอร์เซ็นต์ isopropanol) นำไปใส่ในเครื่องเขย่าแบบ reciprocal อย่างน้อย 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง บรรจุเม็ดยาลงใน econo คอลัมน์

ขนาด 2.5 x 30 cm ปล่อยส่วนใสออกจากคอลัมน์จนหมดให้เหลือเพียง amberlite ที่มีสารโปรตีนดูดซับอยู่ไว้ในคอลัมน์ ทำการล้างสิ่งปนเปื้อนที่ละลายได้ในน้ำออกจาก amberlite ด้วยน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และทำการล้างสิ่งปนเปื้อนที่ละลายได้ในเอทานอลออกจาก amberlite ด้วยเอทานอลเข้มข้น 40 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นทำการชะสารแบคทีเรียไอซินิกออกจาก amberlite ด้วยสารละลาย isopropanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ที่เติม trifluoroacetic acid (TFA) ผสมอยู่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นชะด้วยสารละลาย isopropanol ความเข้มข้น 100 เปอร์เซ็นต์ 30 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ชะด้วย 70 เปอร์เซ็นต์ isopropanol ไปทำการระเหย solvent ออกจนหมด ด้วยเครื่องระเหยสารละลายแบบหมุนเหวี่ยง เดิมฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 5.7 ให้ได้ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำแบคทีเรียไอซินิกที่ได้ไปศึกษาความเสถียรเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

7. การทดสอบความเสถียรของสารแบคทีเรียไอซินิก

นำสารแบคทีเรียไอซินิกที่ทำให้บริสุทธิ์บางส่วนจากข้อ 6 มาศึกษาความเสถียรเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิแช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส) จากนั้นเก็บตัวอย่างทุกเดือนมาวิเคราะห์หาค่ากิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียเป้าหมาย *Listeria monocytogenes* DMST 17303

8. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผักสดพร้อมบริโภคชนิดต่าง ๆ

ทำการเก็บตัวอย่างผักสดพร้อมบริโภคที่วางจำหน่ายในตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในเขตกรุงเทพฯ มาทำการตรวจวิเคราะห์การปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ โดยใช้วิธีมาตรฐาน ISO 112901/1A-2004 โดยนำตัวอย่างผักสดปริมาณ 25 กรัม เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ปลอดเชื้อ (0.85 เปอร์เซ็นต์ NaCl) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปเข้าเครื่องตีผสมตัวอย่าง (Seward-stomacher 400) เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นปั่นตัวอย่างสารละลายปริมาณ 200 ไมโครลิตร spread ลงบนอาหาร L. mono Differential Agar Base (HiMedia) จำนวน 5 plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตลักษณะโคโลนีสีฟ้าและมีโซนขุนขาวล้อมรอบซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Listeria monocytogenes* บนอาหาร selective agar และเลือกผักสดพร้อมบริโภค 1 ชนิด เป็นต้นแบบการทดลองเพื่อศึกษาการยับยั้งโดยสารแบคทีเรียไอซินิกต่อไป

9. การศึกษาการยึดเกาะของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผักสด

9.1 การเตรียมเซลล์ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เพื่อใช้ในการปนเปื้อนเทียม

ถ่ายเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว TSBYE ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้ง และทำการล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 0.85 เปอร์เซ็นต์ โซเดียมคลอไรด์ ทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 Xg จำนวน 2 ครั้ง จากนั้นนำเซลล์ของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ได้ไปเจือจางในน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 1 ลิตร โดยให้ความเข้มข้นเซลล์เริ่มต้นประมาณ 10^4 และ 10^6 CFU/ml เพื่อจำลองการปนเปื้อนในระดับต่ำ และระดับสูงต่อไป

9.2 การปนเปื้อนเทียมเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผักสด

นำตัวอย่างผักกะหล่ำปลีสดมาตัดแบ่งให้ได้น้ำหนักของผักแต่ละชิ้นเท่ากับ 25 ± 1 กรัม โดยให้มีลักษณะใบซ้อนกันเป็นชั้นและยึดติดกันด้วยแกนกลางของผัก เพื่อป้องกันการหลุดของใบผัก นำไปแช่ในสารละลาย 70 เปอร์เซ็นต์ เอทานอล เป็นเวลา 2 นาที เพื่อให้ผักปลอดจากการปนเปื้อนเชื้ออื่น จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 ครั้ง และผึ่งตัวอย่างให้แห้ง นำตัวอย่างผักสดที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อแล้ว มาแช่ในซัสเพนชันของเซลล์ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในข้อ 9.1 เป็นเวลา 5 และ 10 นาที จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อที่ยึดเกาะบนผิวผัก โดยวิธี spread plate บนอาหาร Tryptic Soy Agar (TSA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนอาหาร TSA (HIMEDIA) และรายงานผลเป็น Log CFU/g

10. การประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อที่ปนเปื้อนเทียมบนตัวอย่างผักในปริมาณต่าง ๆ

10.1 การปนเปื้อนเทียมเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผักสด

ทำการปนเปื้อนเทียมผักกะหล่ำปลีสดที่เตรียมไว้ดังกล่าวในข้อ 9.2 ด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในเซลล์ซัสเพนชันเข้มข้น 10^4 และ 10^6 CFU/ml โดยการแช่เป็นเวลา 5 นาที เพื่อจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ระดับต่ำ (10^3 CFU/g) และระดับสูง (10^5 CFU/g) ตามลำดับ จากนั้นนำตัวอย่างผักดังกล่าวไปศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งโดยสารแบคทีเรียโอซินต่อไป

10.2 การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อทดสอบ และผลต่ออายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส)

นำตัวอย่างผักที่ปนเปื้อนเทียมด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 จากข้อ 10.1 มาแช่ในสารละลายต่างๆเป็นเวลา 5 นาที ดังนี้

- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (control)
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซินให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 512 AU/ml

เมื่อครบระยะเวลา ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่เหลือรอดบนผิวผักสด โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ด้วยวิธี spread plate (5 จานๆละ 200 ไมโครลิตร) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง รายงานประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 จากนั้นเก็บรักษาผักสดที่ผ่านการแช่ในสารละลายต่างๆที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 7 วัน และทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ทุกวัน จากนั้นรายงานปริมาณเชื้อที่พบเป็น Log CFU/g

11. การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ และผลต่ออายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

ทำการปนเปื้อนเทียมผักกะหล่ำปลีสดที่เตรียมไว้ดังกล่าวในข้อ 9.2 ด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในเซลล์ซัสเพนชันเข้มข้น 10^6 CFU/ml โดยการแช่เป็นเวลา 5 นาที เพื่อจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ระดับสูง (10^5 CFU/g) จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายต่างๆ เป็นเวลา 5 นาทีดังนี้

- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (control)
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซินมีความเข้มข้นสุดท้าย 512 AU/ml
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซินมีความเข้มข้นสุดท้าย 5,120 AU/ml
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซินมีความเข้มข้นสุดท้าย 12,800 AU/ml

เมื่อครบระยะเวลา ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่เหลือรอดบนผิวผักสด โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหาร TSA ด้วยวิธี spread plate (5 จานๆ ละ 200 ไมโครลิตร) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง รายงานประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 จากนั้นเก็บรักษาผักสดที่ผ่านการแช่ในสารละลายต่างๆ ที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน และทำการตรวจนับปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ทุกวัน รายงานปริมาณเชื้อที่พบเป็น Log CFU/g

12. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินกับสารเคมีที่ใช้ในทางการค้า

ทำการปนเปื้อนเทียมผักกะหล่ำปลีสดที่เตรียมไว้ดังกล่าวในข้อ 9.2 ด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในเซลล์ซัสเพนชันเข้มข้น 10^6 CFU/ml โดยการแช่เป็นเวลา 5 นาที เพื่อจำลองการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ระดับสูง (10^5 CFU/g) จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายต่างๆ เป็นเวลา 5 นาทีดังนี้

- น้ำกลั่นปลอดเชื้อ (control)
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีเรียโอซินมีความเข้มข้นสุดท้าย 5,120 AU/ml
- น้ำประปา
- น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารละลายไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 100 ppm

เมื่อครบระยะเวลา ทำการวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่เหลือรอดบนผิวผักสด โดยเฉพาะเลื่อยบนอาหาร TSA ด้วยวิธี spread plate (5 จานๆละ 200 ไมโครลิตร) และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง รายงานประสิทธิภาพของสารแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 จากนั้นเก็บรักษาผักสดที่ผ่านการแช่สารละลายต่างๆที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และตรวจนับปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 อีกครั้งหนึ่ง รายงานปริมาณเชื้อที่พบเป็น Log CFU/g

สถานที่ทำการทดลอง

ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ระยะเวลาในการทดลอง

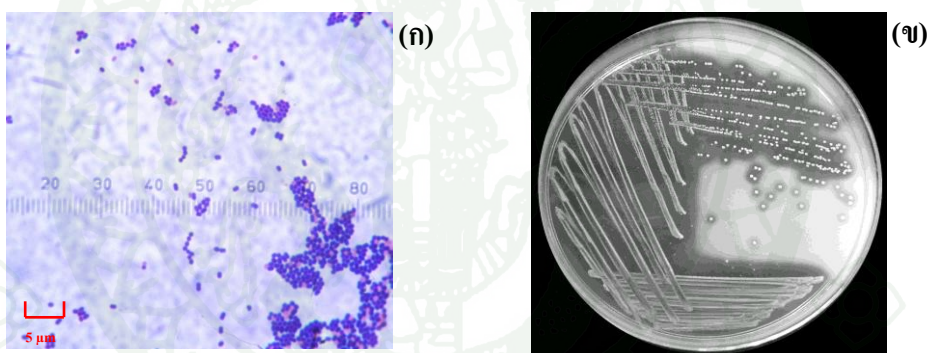
การทดลองนี้เริ่มตั้งแต่ภาคปลายปีการศึกษา 2554 ถึง ภาคปลายปีการศึกษา 2556

ผลและวิจารณ์

1. การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก

1.1 เชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5

จากการตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาพบว่าเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก การจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือสายโซ่สั้น ๆ (ภาพที่ 6ก) ไม่สร้างเอนไซม์อะเลสส์ ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) มีลักษณะกลม สีขาว กว้าง 1-2 มิลลิเมตร สามารถสร้างกรดอินทรีย์ทำให้เกิดโซนาไฮส (ภาพที่ 6ข)

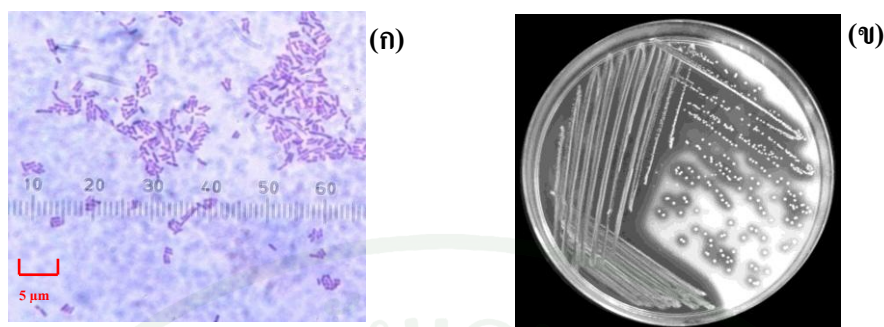


ภาพที่ 6 (ก) การติดสีแกรมบวก รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ของ *Enterococcus faecium* KU-B5 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1,500X)

(ข) ลักษณะโคโลนีของ *Enterococcus faecium* KU-B5 บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ CaCO_3

1.2 เชื้อ *Lactobacillus salivarius* KU-N12

จากการตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนสั้น ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมโครเมตร ยาว 1.1-3.0 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก การจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือสายโซ่สั้น ๆ (ภาพที่ 7ก) ไม่สร้างเอนไซม์อะเลสส์ ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) มีลักษณะกลม สีขาว กว้าง 1-2 มิลลิเมตร สามารถสร้างกรดอินทรีย์ทำให้เกิดโซนาไฮส (ภาพที่ 7ข)

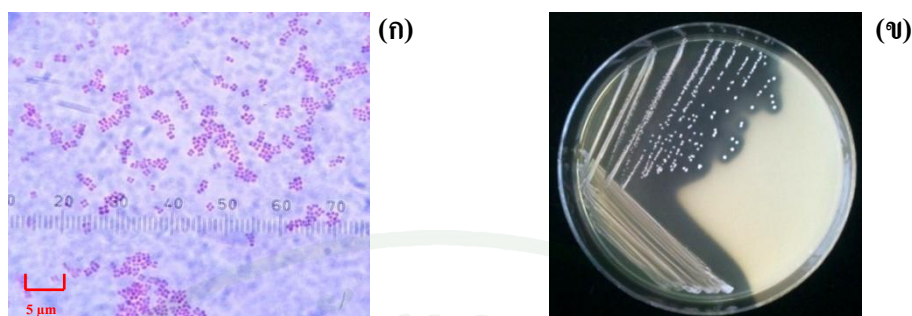


ภาพที่ 7 (ก) การติดสีแกรมบวก รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ของ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1,500X)

(ข) ลักษณะโคโลนีของ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ CaCO_3

1.3 เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2

เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 เมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.4-1.4 ไมโครเมตร ติดสีแกรมบวก การจัดเรียงตัวของเซลล์มักพบเซลล์สี่เซลล์ติดกัน (Tetrad) (ภาพที่ 8ก) และลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) มีลักษณะกลม สีขาว กว้าง 1-2 มิลลิเมตร สามารถสร้างกรดอินทรีย์ทำให้เกิดโซนใส (ภาพที่ 8ข)



ภาพที่ 8 (ก) การติดสีแกรมบวก รูปร่าง และการเรียงตัวของเซลล์ของ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (1,500X)

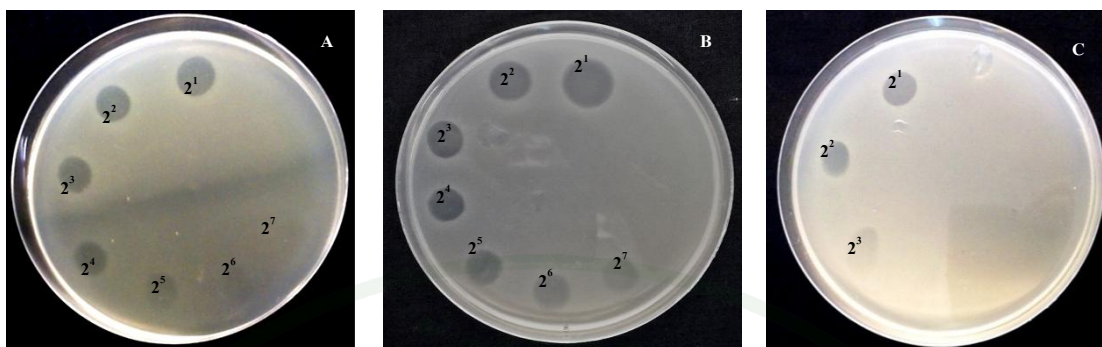
(ข) ลักษณะโคโลนีของ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม 0.5 เปอร์เซ็นต์ CaCO_3

2. การทดสอบการสร้างสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งประเภทแบคทีเรียโอสิน โดยวิธี Spot on lawn (Ahn and tiles, 1990)

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารสังเคราะห์ MRS และทำการปรับค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเลี้ยงเชื้อให้มีค่าพีเอชในช่วง 5.5-6.5 ก่อนนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 โดยวิธี spot on lawn พบว่าเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เท่ากันคือ 12,800 AU/ml ส่วนเชื้อ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพียง 800 AU/ml ดังแสดงในตารางที่ 10 และภาพที่ 9

ตารางที่ 10 ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ของสารแบคทีเรียโอสินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS

แบคทีเรียกรดแลคติก	ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ
	<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (AU/ml)
<i>Enterococcus faecium</i> KU-B5	12,800
<i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2	12,800
<i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12	800



ภาพที่ 9 โชนใสของการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ของสารแบคทีเรียโอซิน
ที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ โดยวิธี spot on lawn

A: *Enterococcus faecium* KU-B5

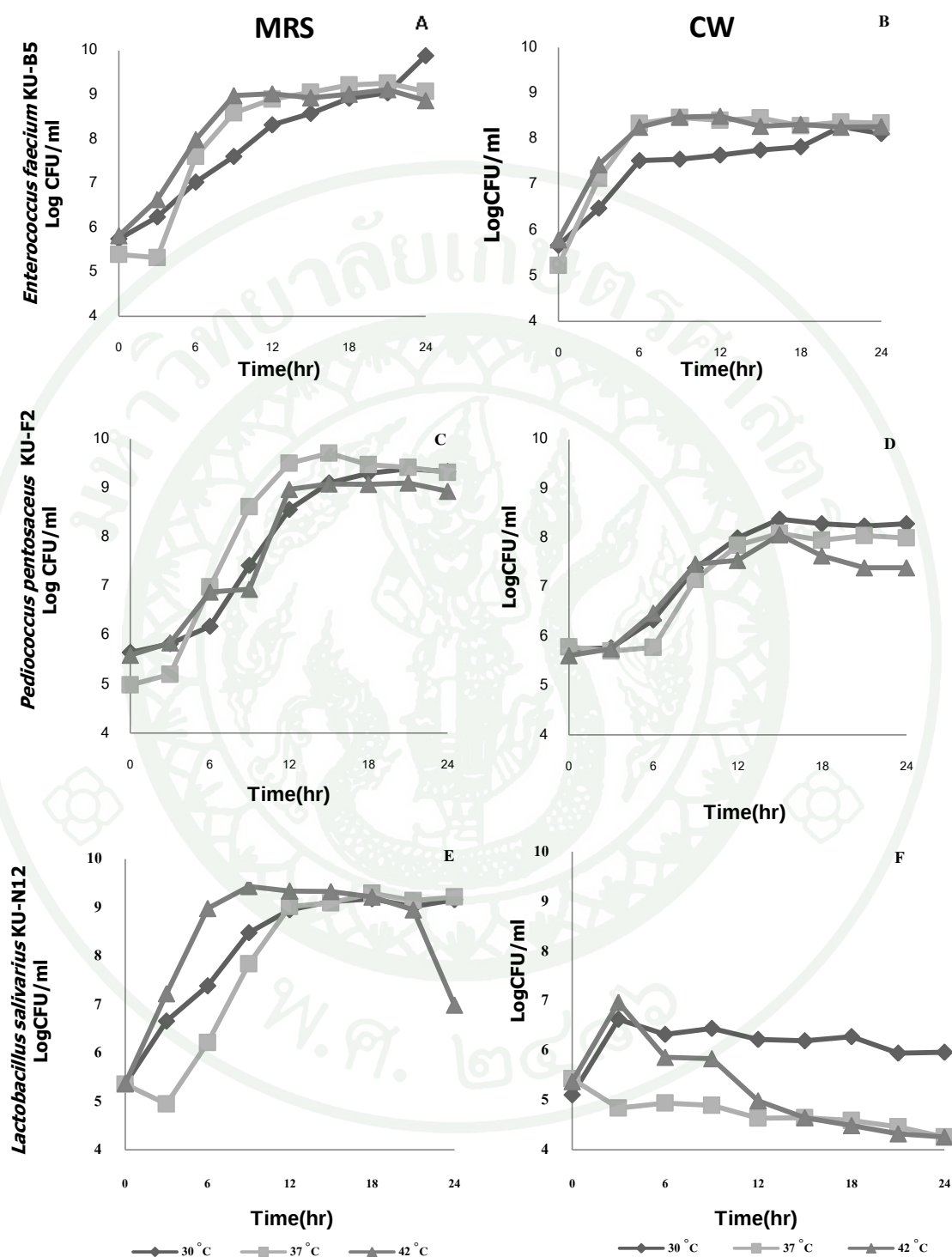
B: *Pediococcus pentosaceus* KU-F2

C: *Lactobacillus salivarius* KU-N12

3. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก

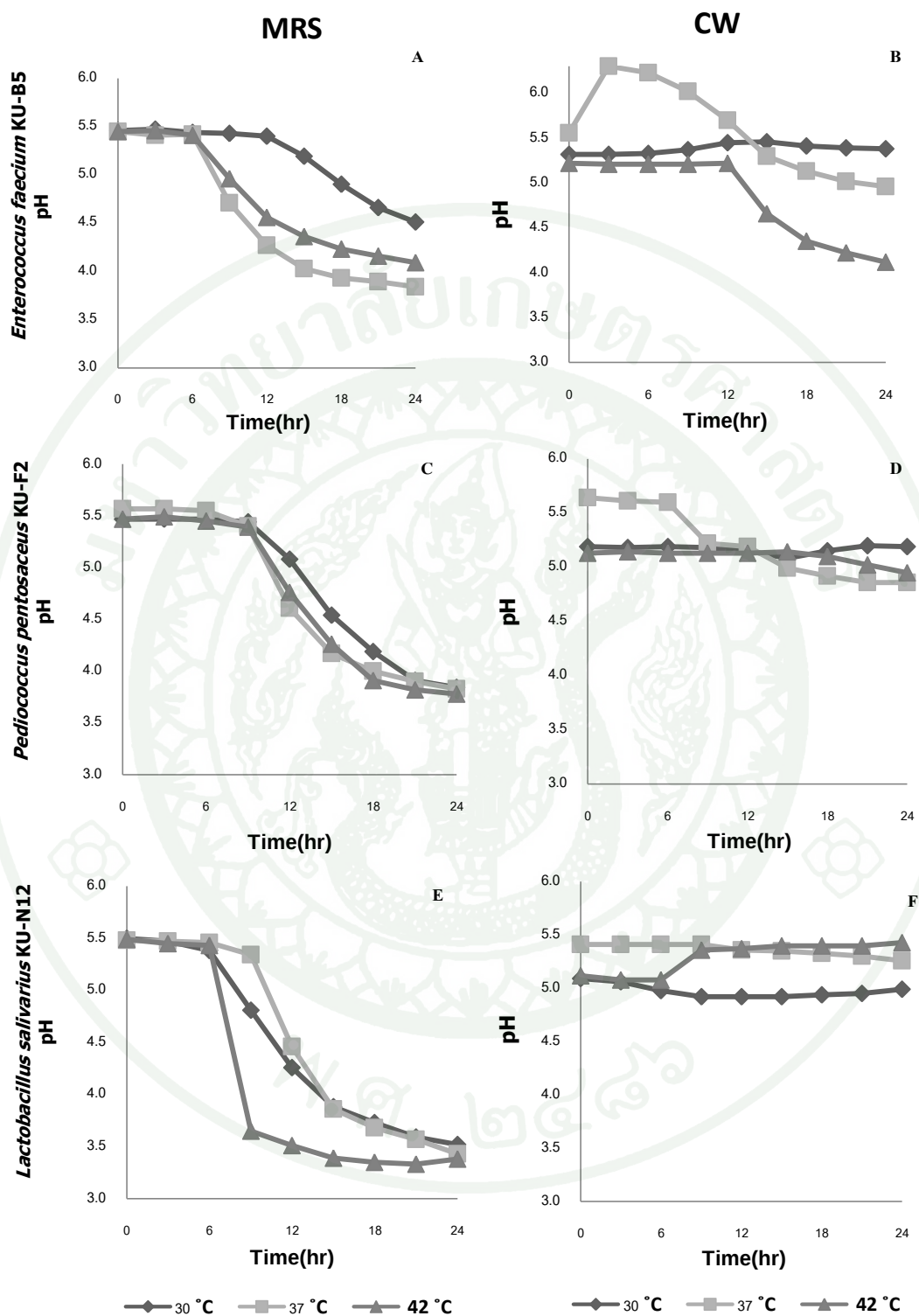
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ คือ *Enterococcus faecium* KU-B5, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และอาหารน้ำมะพร้าว เพื่อศึกษาหาอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 42 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง และเก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบการเจริญของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ วิเคราะห์ปริมาณเซลล์โดยวิธี spread plate รายงานผลเป็นค่า Log CFU/ml พบว่าอาหารสังเคราะห์ MRS ซึ่งเป็นอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก เชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.39 Log CFU/ml (ภาพที่ 10A) ในขณะที่ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 เจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส และมีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.71 Log CFU/ml (ภาพที่ 10C) ส่วน *Lactobacillus salivarius* KU-N12 เจริญได้ดีที่สุดที่ 42 องศาเซลเซียส โดยมีปริมาณเซลล์สูงสุดเท่ากับ 9.43 Log CFU/ml (ภาพที่ 10E) แต่เมื่อเปรียบเทียบการเจริญในอาหารน้ำมะพร้าว พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ในอาหารน้ำมะพร้าว แต่ปริมาณเซลล์สูงสุดจะต่ำกว่าในอาหาร MRS ประมาณ 1-3 Log CFU/ml โดย *Enterococcus faecium* KU-B5, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 มีปริมาณเซลล์สูงสุดในอาหารน้ำมะพร้าวเท่ากับ 8.49, 8.37 และ 6.45 Log CFU/ml ตามลำดับ

(ภาพที่ 10B, D, F) เป็นที่น่าสังเกตว่า *Lactobacillus salivarius* KU-N12 เจริญได้น้อยที่สุดในอาหารน้ำมะพร้าว แม้ว่าจะเจริญได้ดีในอาหาร MRS แสดงว่าเชื้อ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 มีความต้องการสารอาหารอื่นในการเจริญมากกว่า *Enterococcus faecium* KU-B5 และ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 นอกจากนี้สำหรับเชื้อ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ซึ่งเจริญได้ดีที่ 42 องศาเซลเซียส เนื่องจากเชื่อดังกล่าวคัดแยกมาจากลำไส้ไก่ ซึ่งอุณหภูมิในร่างกายของไก่เท่ากับ 42 องศาเซลเซียส ส่วน *Enterococcus faecium* KU-B5 และ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ซึ่งคัดแยกมาจากขมพูและสับปะรด จะเจริญที่อุณหภูมิต่ำกว่าคือ 37 องศาเซลเซียส ดังนั้นในการทดลองต่อไปจะเลือกอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ 42 องศาเซลเซียส สำหรับการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus salivarius* KU-N12



ภาพที่ 10 การเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 (A,B), *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 (C,D) และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 (E,F) เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS และอาหารน้ำมะพร้าว (CW) บ่มที่อุณหภูมิต่างๆในสภาวะนี้

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ เจริญในอาหาร MRS และใช้น้ำตาลในการเจริญ และผลิตกรดอินทรีย์ จึงทำให้ค่าพีเอชลดลง อย่างเห็นได้ชัดโดย *Enterococcus faecium* KU-B5, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 เมื่อเจริญในอาหาร MRS จะได้ค่าพีเอชสุดท้ายเป็น 3.84, 3.78 และ 3.38 ตามลำดับ (ภาพที่ 11A, C, E) อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชในอาหารน้ำมะพร้าว พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชลดลงน้อยกว่าในอาหาร MRS กล่าวคือ เชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 มีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชต่ำสุดในอาหารน้ำมะพร้าว เท่ากับ 4.12, 4.95 และ 4.99 ตามลำดับ (ภาพที่ 11B, D, F) ซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณเซลล์สูงสุด ที่ในอาหารน้ำมะพร้าวจะน้อยกว่าในอาหาร MRS แสดงว่ามีการใช้น้ำตาลในการเจริญ และเปลี่ยนเป็นกรดอินทรีย์ได้น้อยกว่าเมื่อเจริญในอาหารน้ำมะพร้าว ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่า องค์ประกอบในน้ำมะพร้าวซึ่งมีสารอาหาร วิตามินและแร่ธาตุบางอย่าง อาจทำหน้าที่เป็นสารบัฟเฟอร์ควบคุมการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชได้

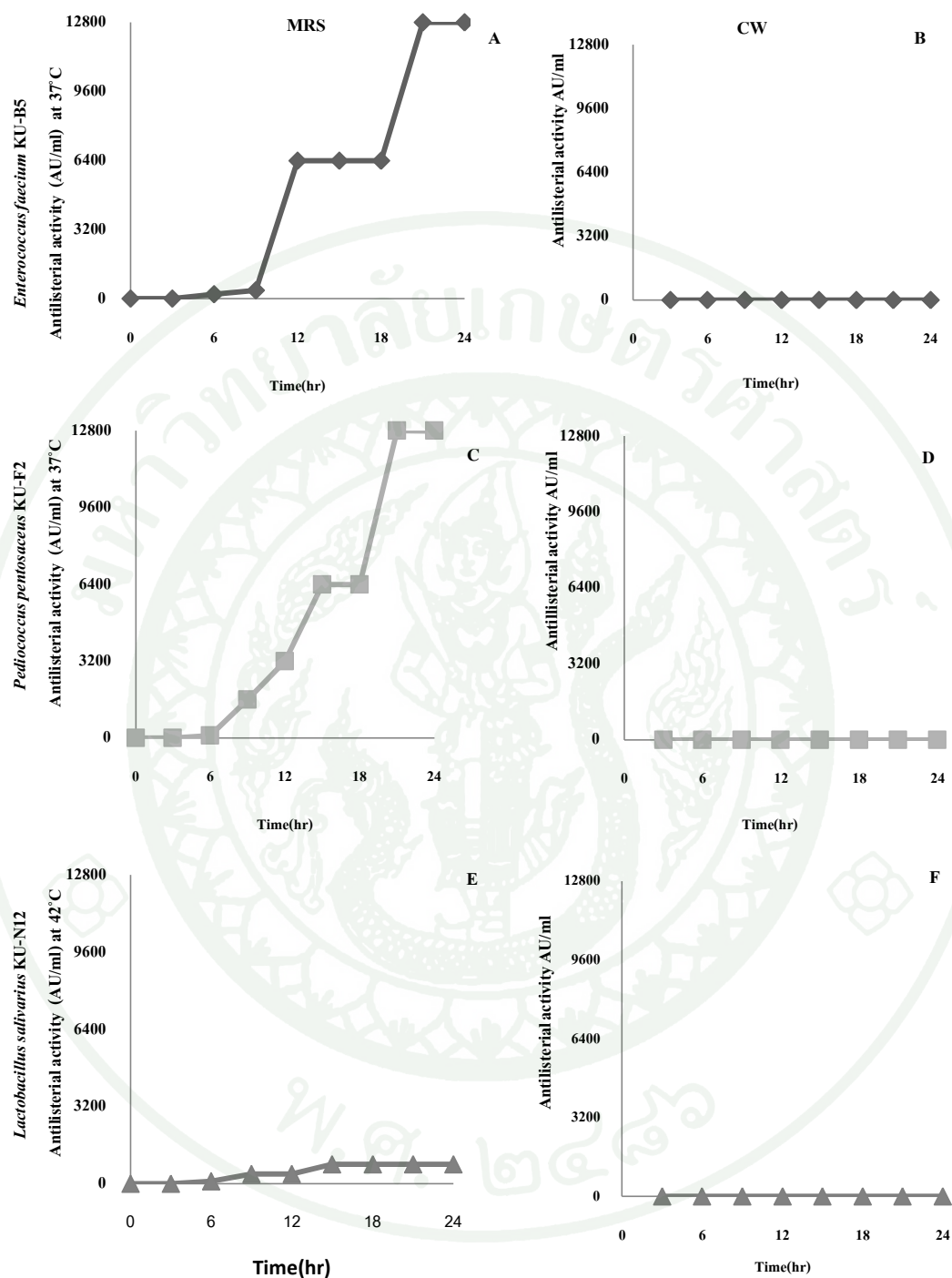


ภาพที่ 11 การเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5

(A,B), *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 (C,D) และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 (E,F) ในอาหาร MRS และอาหารน้ำมะพร้าว (CW) บ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในสภาวะนิ่ง

4. การศึกษาการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหาร MRS และอาหารน้ำมะพร้าวในสถานะนิ่ง บ่มในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมจากข้อ 3 พบว่า เชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 และ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ได้เท่ากันคือ 12,800 AU/ml ส่วน *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เพียง 800 AU/ml (ภาพที่ 12A, C, E) อย่างไรก็ตามเมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารน้ำมะพร้าว ไม่พบการสร้างสารแบคทีเรียโอซินเลย (ภาพที่ 12B, D, F) แม้ว่าจะสามารถเจริญในอาหารน้ำมะพร้าวได้ดี (ภาพที่ 10B, D, F) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าในอาหารน้ำมะพร้าวอาจมีสารประกอบบางอย่างไม่เพียงพอที่จะสนับสนุนการสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ ซึ่งจะได้มีการศึกษาต่อไป อย่างไรก็ตามมีรายงานของ Todorov and Dicks (2005a) ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Enterococcus faecium* ST311LD ในอาหาร MRS ที่เติม 10 เปอร์เซ็นต์ (w/v) กรากน้ำตาล พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีแต่ไม่พบการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน แต่เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ดัดแปลงโดยการเติม tryptone (20 กรัมต่อลิตร) แซคคาไรส (5 กรัมต่อลิตร) หรือ วิตามินซี (1.0 ppm) เชื้อสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้ 12,800 AU/ml



ภาพที่ 12 ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 (AU/ml) เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 (A,B), *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 (C,D) และ *Lactobacillus* MRS และ *salivarius* KU-N12 (E,F) ในอาหารอาหารน้ำมะพร้าวที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในสภาวะนี้

5. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการใช้น้ำมะพร้าวเพื่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารน้ำมะพร้าวในข้อ 4 จะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถเจริญได้ดี แต่ไม่พบการสร้างสารแบคทีเรียโอซินในอาหารน้ำมะพร้าวเลย ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาปัจจัยของสารประกอบที่อาจจำเป็นต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินดังนี้

5.1 การศึกษาปัจจัยเดี่ยว

5.1.1 แหล่งคาร์บอน

จากการเติมน้ำตาลชนิดต่างๆในน้ำมะพร้าวได้แก่ กลูโคส ซูโครส และแลคโตส โดยปรับความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าการเติมน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ไม่สามารถส่งเสริมการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารน้ำมะพร้าวได้ ซึ่งแตกต่างจากงานวิจัยของ De Vuyst and Vandamme (1992) ที่เติม 1 เปอร์เซ็นต์ กลูโคส เป็นแหล่งคาร์บอนในอาหาร CM medium พบว่าเชื้อ *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* NIZ022186 สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ 2,000 AU/ml เป็นที่น่าสังเกตว่าการเติมน้ำตาลไม่ได้ส่งเสริมการสร้างสารแบคทีเรียโอซินเลย แม้ว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดี (ตารางที่ 11) อาจเป็นไปได้ว่าในน้ำมะพร้าวมีปริมาณน้ำตาลที่เพียงพอต่อการเจริญของเชื้อ แต่น้ำตาลเพียงอย่างเดียวอาจไม่เพียงพอต่อการสนับสนุนการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

ตารางที่ 11 ผลของแหล่งคาร์บอนต่อการเจริญและการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารน้ำมะพร้าวเมื่อบ่มในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 15 ชั่วโมง

แหล่งคาร์บอน	<i>Enterococcus faecium</i> KU-B5 (37°C)		<i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 (37°C)		<i>Lactobacillus salivarius</i> KU-N12 (42°C)	
	Log CFU/ml	Antilisterial activity (AU/ml)	Log CFU/ml	Antilisterial activity (AU/ml)	Log CFU/ml	Antilisterial activity (AU/ml)
CW control	6.19±0.11	0	6.18±0.07	0	5.60±0.05	0
0.5% glucose	6.42±0.02	0	6.23±0.03	0	5.67±0.05	0
1.0% glucose	6.34±0.04	0	6.31±0.01	0	5.84±0.05	0
2.0% glucose	6.38±0.02	0	6.24±0.08	0	5.82±0.00	0
0.5% sucrose	6.89±0.04	0	6.03±0.61	0	6.06±0.07	0
1.0% sucrose	6.92±0.08	0	5.93±0.07	0	6.11±0.09	0
2.0% sucrose	6.90±0.03	0	6.11±0.02	0	6.09±0.06	0
0.5% lactose	6.37±0.10	0	5.78±0.09	0	6.06±0.03	0
1.0% lactose	6.43±0.04	0	5.84±0.02	0	6.07±0.02	0
2.0% lactose	6.41±0.03	0	5.77±0.03	0	6.05±0.07	0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

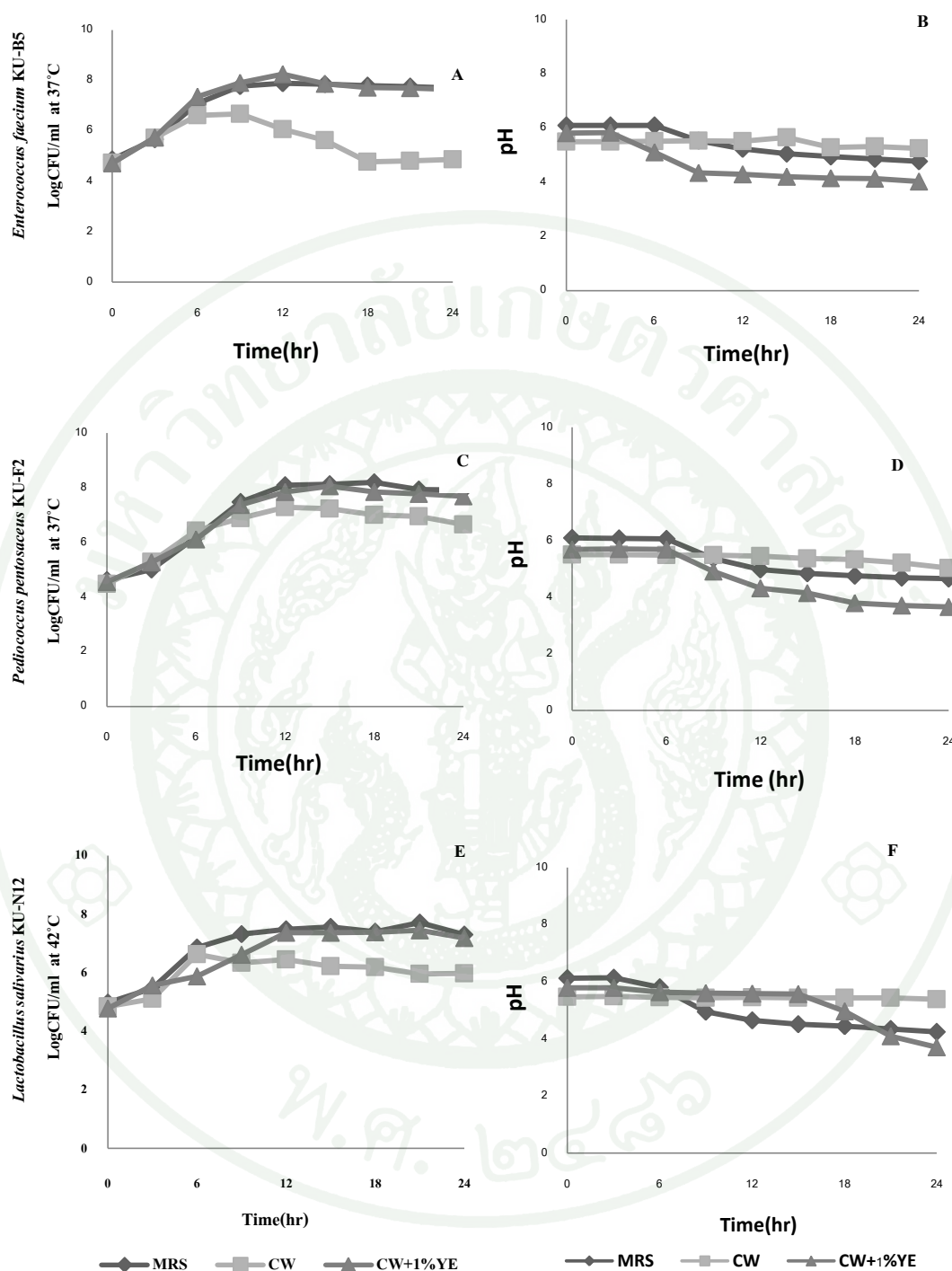
5.1.2 แหล่งไนโตรเจนและปัจจัยอื่น

เมื่อทำการเติมแหล่งไนโตรเจนชนิดต่าง ๆ ในน้ำมะพร้าวได้แก่ เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต $[(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4]$, yeast extract, peptone, beef extract และ whey ที่ความเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ และ soybean powder ที่ความเข้มข้น 1.0, 3.0 และ 5.0 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้ง Tween 80 ที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ และ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 0.2, และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารประกอบไนโตรเจนชนิดต่างๆ ส่งผลต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 12 โดยการเติม yeast extract ในน้ำมะพร้าวสามารถส่งเสริมการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 และ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ได้ดีที่สุด โดยพบค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ได้เท่ากับ 12,800 AU/ml เมื่อเติม 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ yeast extract ซึ่งเทียบเท่ากับอาหารสังเคราะห์ MRS ส่วนการเติม $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ และ Whey นั้นไม่สามารถส่งเสริมการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ศึกษาในอาหารน้ำมะพร้าวได้ ส่วน *Lactobacillus salivarius* KU-N12 นั้นพบว่ามีเพียงปัจจัยเดียวที่สามารถส่งเสริมการสร้างสารแบคทีเรียโอซินในอาหารน้ำมะพร้าวได้ คือการเติม yeast extract 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 200 AU/ml ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ซึ่งสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้งได้สูงสุด 800 AU/ml ดังนั้นจึงเลือก yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์ เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับการผลิตสารแบคทีเรียโอซินในน้ำมะพร้าวต่อไป

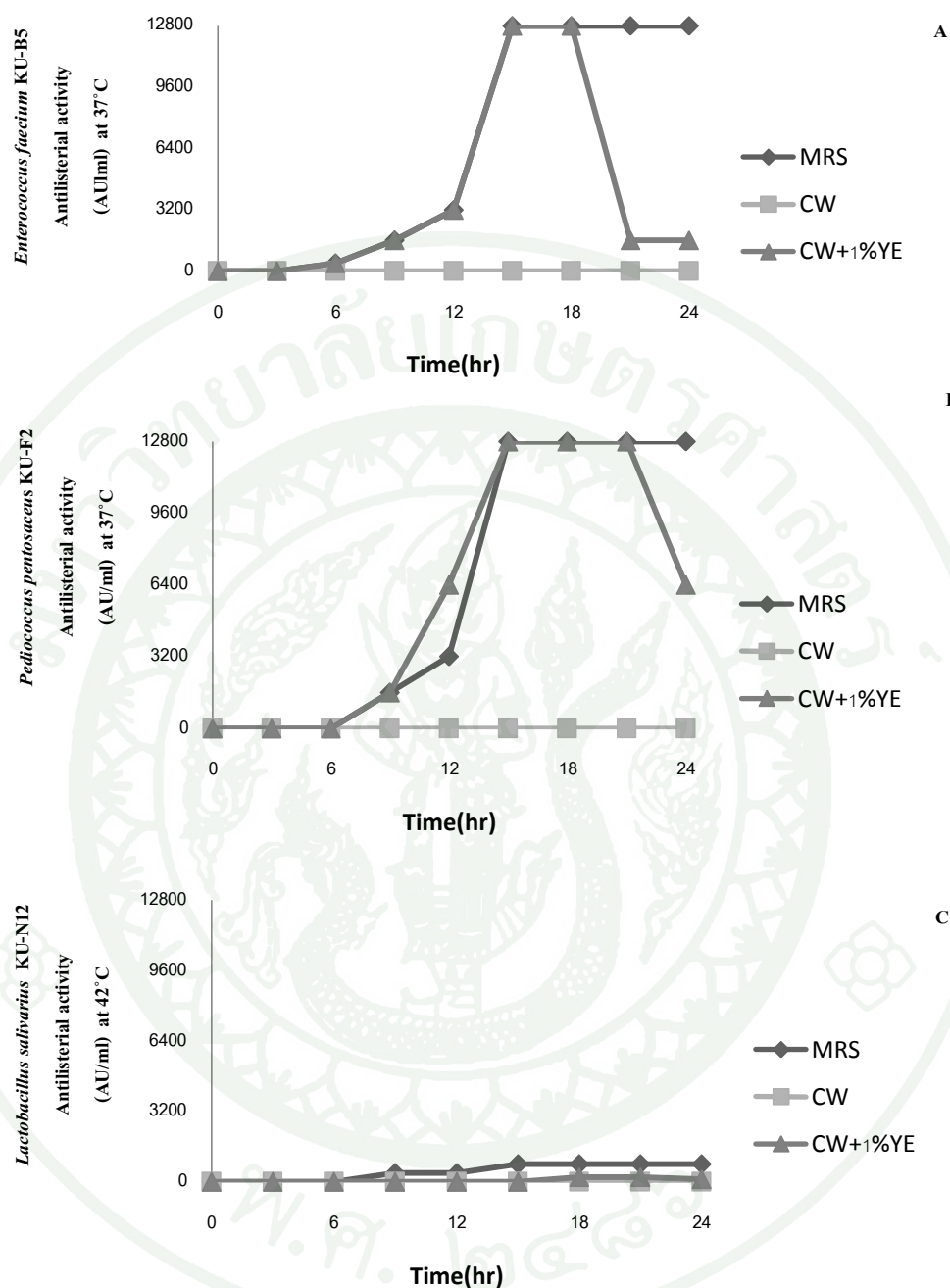
ตารางที่ 12 ผลของแหล่งไนโตรเจนและสารอื่นต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ ในอาหารน้ำมะพร้าว เมื่อบ่มในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 15 ชั่วโมง

ชนิดของปัจจัย	ความเข้มข้น (% w/v or v/v)	ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ		
		<i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303 (AU/ml)		
		<i>Enterococcus</i> <i>faecium</i> KU-B5 37°C 15 hr	<i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i> KU-F2 37°C 15 hr	<i>Lactobacillus</i> <i>salivarius</i> KU-N12 42°C 15 hr
แหล่งไนโตรเจน				
Yeast extract	0.5	3,200	800	0
	1.0	12,800	12,800	200
	2.0	12,800	12,800	200
Peptone	0.5	400	800	0
	1.0	800	1,600	0
	2.0	800	1,600	0
Beef extract	1.0	6400	800	0
Soy bean powder	1.0	400	0	0
	3.0	400	0	0
	5.0	400	0	0
Whey	0.5	0	0	0
	1.0	0	0	0
	2.0	0	0	0
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.5	0	0	0
	1.0	0	0	0
	2.0	0	0	0
สารอื่น				
Tween 80	0.1	0	0	0
	0.5	0	0	0
	1.0	0	0	0
	2.0	0	0	0
K ₂ HPO ₄	0.2	800	0	0
	1.0	800	0	0

ผลจากตารางที่ 12 พบว่า การเติม yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุด จึงได้ทำการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ในอาหารน้ำมะพร้าว และอาหารน้ำมะพร้าวที่เติม yeast extract เปรียบเทียบกับอาหารสังเคราะห์ MRS พบว่า การเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ในอาหารน้ำมะพร้าวเติม yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์ มีการเจริญที่ใกล้เคียงกับอาหาร MRS ดังแสดงในภาพที่ 13 สำหรับการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า *Enterococcus faecium* KU-B5 และ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินเมื่อเพาะเลี้ยงในน้ำมะพร้าวที่เติม yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์ ได้ดีเทียบเท่ากับอาหาร MRS คือ 12,800 AU/ml (ภาพที่ 14A, B) ส่วน *Lactobacillus salivarius* KU-N12 พบกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินเพียง 200 AU/ml (ภาพที่ 14C) อย่างไรก็ตามในอาหารสังเคราะห์ MRS จะมีองค์ประกอบของสารอื่นๆ เช่น 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80, 0.2 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 ซึ่งอาจมีผลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินด้วย ดังนั้นจึงได้นำปัจจัยดังกล่าวมาศึกษาปัจจัยร่วมว่าองค์ประกอบใดจะส่งเสริมการผลิตแบคทีเรียโอซินได้อย่างมีประสิทธิภาพ



ภาพที่ 13 การเจริญและการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหาร MRS อาหารน้ำมะพร้าว และอาหารน้ำมะพร้าวเติม yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์: (A, B) *Enterococcus faecium* KU-B5, (C, D) *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ (E, F) *Lactobacillus salivarius* KU-N12



ภาพที่ 14 การสร้างสารแบคทีริโอซินของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ต่าง ๆ เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS อาหารน้ำมะพร้าว และอาหารน้ำมะพร้าวเติม yeast extract 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมของเชื้อแต่ละสายพันธุ์: (A) *Enterococcus faecium* KU-B5, (B) *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ (C) *Lactobacillus salivarius* KU-N12

เมื่อนำน้ำมะพร้าวที่เติม yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์ มาศึกษาพร้อมกับองค์ประกอบอื่นที่มีในอาหาร MRS คือ Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ K_2HPO_4 0.2 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 9) พบว่าอาหารน้ำมะพร้าวเติม Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ K_2HPO_4 0.2 เปอร์เซ็นต์ สามารถสนับสนุนการสร้างสารแบคทีเรียโอซินใน *Enterococcus faecium* KU-B5 โดยพบค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เพิ่มขึ้น 6,400 AU/ml อย่างไรก็ดีตามทั้ง Tween 80 และ K_2HPO_4 ไม่สนับสนุนการสร้างสารแบคทีเรียโอซินในเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ Tween 80 และ K_2HPO_4 เป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ ก็ให้ผลเช่นเดิม แสดงว่า Tween 80 และ K_2HPO_4 มีผลสนับสนุนการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 ได้ดี แต่เมื่อเติม yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ K_2HPO_4 0.2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า *Enterococcus faecium* KU-B5 สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 12,800 AU/ml ซึ่งจากผลการทดลองก่อนหน้านี้ในตารางที่ 15 การเติม yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างเดียว สนับสนุนการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพียง 3,200 AU/ml ส่วนเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 การเติม yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ ส่งเสริมการผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพียง 800 AU/ml แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ yeast extract เป็น 1.0 เปอร์เซ็นต์ การสร้างสารแบคทีเรียโอซินโดย *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มเป็น 12,800 AU/ml แสดงว่า yeast extract มีอิทธิพลต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินโดยเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 มากกว่า Tween 80 และ K_2HPO_4 สำหรับ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 การเติม 0.5 หรือ 1.0 เปอร์เซ็นต์ yeast extract มีผลสนับสนุนการสร้างสารแบคทีเรียโอซินไม่ต่างกันคือ มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพียง 200 AU/ml

ตารางที่ 13 ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์
เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวคัดแปลง

อาหาร น้ำมะพร้าวคัดแปลง	Antilisterial activity (AU/ml)		
	<i>Enterococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Lactobacillus</i>
	<i>faecium</i> KU-B5	<i>pentosaceus</i> KU-F2	<i>salivarius</i> KU-N12
เติม 0.1T+0.2K ₂	6400	—	—
เติม 1.0T+1.0K ₂	6400	—	—
เติม 0.5YE+0.1T+0.2K ₂	12800	800	800
เติม 1YE+0.1T+0.2K ₂	12800	12800	800

หมายเหตุ YE คือ Yeast Extract, K₂ คือ K₂HPO₄ และ T คือ Tween 80

ตัวเลขด้านหน้าของแต่ละปัจจัยที่ใช้คือความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ (เปอร์เซ็นต์)

เครื่องหมาย — คือไม่พบการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

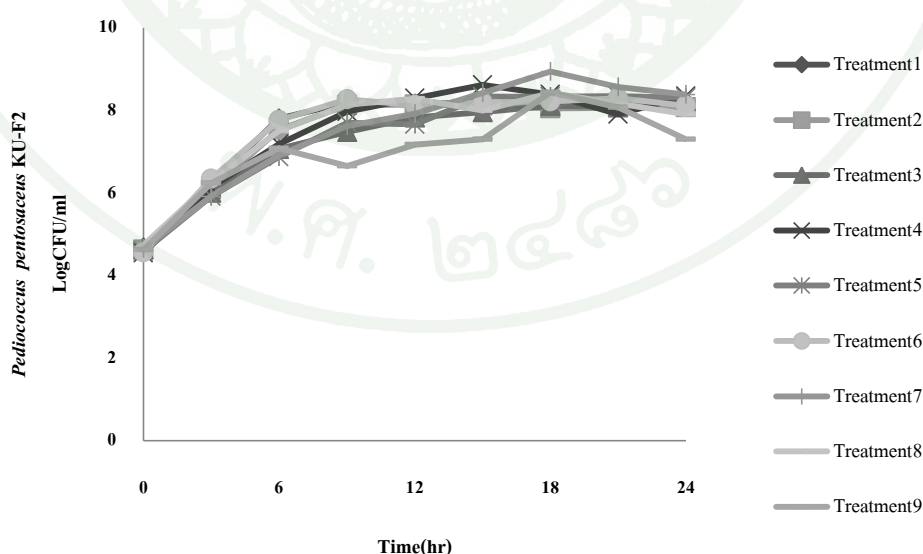
5.2 การศึกษาปัจจัยร่วมและสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินโดย *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 โดยวิธีทาคุชิ

จากผลการทดลองเติมปัจจัยของสารประกอบ yeast extract, K₂HPO₄ และ Tween 80 ในอาหารน้ำมะพร้าว พบว่าปัจจัยทั้ง 3 ต่างก็มีผลต่อการส่งเสริมการสร้างสารแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกได้แตกต่างกันในการทดลองต่อไปได้เลือกเฉพาะ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 มาศึกษาผลของปัจจัยร่วมดังกล่าวโดยวิธีการทางสถิติซึ่งออกแบบโดยวิธีทาคุชิ (Roy, 2001) และได้กำหนดระดับความเข้มข้นของปัจจัยดังกล่าวเป็น 3 ระดับ โดยความเข้มข้นของปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง คือ 0.5, 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ yeast extract, 0.2, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ K₂HPO₄ และ 0.1, 0.5 และ 1.0 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 ซึ่งเมื่อแทนค่าของแต่ละปัจจัยในระดับต่างๆ จะได้ชุดการทดลองทั้งหมด 9 ชุดการทดลอง (ตารางที่ 9)

จากผลการทดลองของทั้ง 9 ชุดการทดลองพบว่า ในชุดการทดลองที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 0.5 เปอร์เซ็นต์ นั้น *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 สามารถสร้างสาร

แบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งได้ 3,200 AU/ml เท่ากันทั้ง 3 ชุดการทดลอง ส่วนชุดการทดลองที่ 4, 5, 6, 7, 8 และ 9 ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 1.0 และ 2.0 เปอร์เซ็นต์ พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 12,800 AU/ml โดยชุดการทดลองที่ 4 ซึ่งประกอบด้วย yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์, 0.1 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ K_2HPO_4 นั้นเป็นชุดการทดลองที่เติมปัจจัยทั้ง 3 ที่ความเข้มข้นน้อยที่สุด แต่ยังคงให้ผลการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งได้เทียบเท่ากับชุดการทดลองอื่น (ภาพที่ 15) จึงได้เลือกสภาวะดังกล่าวเป็นสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 สำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซินในปริมาตรขนาด 1 ลิตร เพื่อใช้ในการทำให้บริสุทธิ์และใช้ในการศึกษาต่อไป

ผลจากการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Parente *et al.* (1992) พบว่า tryptone, yeast extract และ Tween 80 มีผลส่งเสริมการเจริญและการสร้างแบคทีเรียโอซินอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 และ MRS และในงานวิจัยของ Todorov and Dicks (2009) ได้เพิ่มความเข้มข้นของ yeast extract เป็น 20 กรัมต่อลิตร (จาก 4 กรัมต่อลิตร) ในอาหาร MRS พบว่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Enterococcus mundtii* เพิ่มขึ้น จาก 51,200 AU/ml เป็น 102,400 AU/ml และได้ทดลองเติม KH_2PO_4 แทน K_2HPO_4 พบว่ากิจกรรมลดลงเหลือเพียง 25,600 AU/ml จาก 51,200 AU/ml



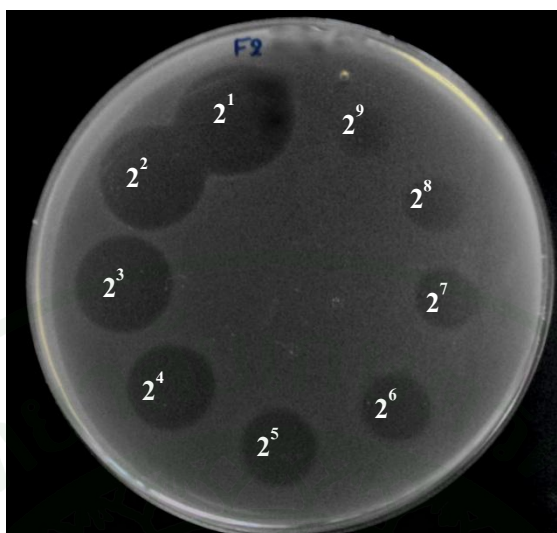
ภาพที่ 15 การเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวตัดแปลงโดยวิธีทากูชิ

6. การสกัดแยกสารแบคทีเรียโอสติน

เมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าว ที่เติม yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์ Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ K_2HPO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 ลิตร เป็นเวลา 16 ชั่วโมง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง พบว่าเชื้อสามารถสร้าง สารแบคทีเรียโอสตินปลดปล่อยออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เท่ากับ 12,800 AU/ml เมื่อทำการสกัดแยกสารแบคทีเรียโอสตินจาก อาหารน้ำมะพร้าวโดยวิธี Amberlite adsorption โดยอาศัยหลักการ hydrophobic adsorption และทำการชะด้วย isopropanol 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม TFA 0.1 เปอร์เซ็นต์ และนำไปผ่านขั้นตอน evaporation และเติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าพีเอช 5.7 พบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้น 4 เท่า เป็น 51,200 AU/ml (ภาพที่ 13) และเมื่อทำการวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งจากขั้นตอนการล้าง Amberlite ที่ใช้ในการดูดซับเพื่อชะเอาสิ่งปนเปื้อนออก พบว่า Amberlite ที่ใช้ในการทดลอง สามารถดูดซับสารแบคทีเรียโอสตินไว้ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เนื่องจากไม่พบค่ากิจกรรมการยับยั้ง ในน้ำหรือสารละลายเอทานอลที่ล้าง (ตารางที่ 14) ซึ่งผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับผลงานวิจัย ของ Pilasombut (2006) ทำการสกัดแยกแบคทีเรียโอสตินโดยใช้ Amberlite XAD-16 ที่สร้างโดยเชื้อ *Lactobacillus salivarius* K4 และชะโปรตีนโดยใช้สารละลาย isopropanol ความเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ ที่เติม trifluoroacetic acid (TFA) ผสมอยู่ 0.1 เปอร์เซ็นต์ พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ สารแบคทีเรียโอสตินเพิ่มขึ้น 4 เท่า โดยเพิ่มขึ้นจาก 3,200 AU/ml เป็น 12,800 AU/ml

ตารางที่ 14 ค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอสตินที่สกัดในขั้นตอนต่าง ๆ

ขั้นตอนของการสกัดสารแบคทีเรียโอสติน	ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303(AU/ml)
สารละลายไฮปราสาจากเซลล์ก่อนที่จะเติม Amberlite	12,800
ส่วนใสที่ผ่านคอลัมน์หลังจากผ่านการดูดซับด้วย Amberlite	0
ส่วนใสที่ได้จากการล้างเม็ดเรซินด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร	0
หลังจากล้างด้วยเอทานอล 40% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	0
หลังจากชะด้วย isopropanol 70% ที่เติม TFA 0.1% ปริมาตร 100 มิลลิลิตร	25,600
หลังจากขั้นตอน evaporation	51,200



ภาพที่ 16 ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ของสารแบคทีริโอซินที่ผ่านการสกัดแยกโดยวิธี Amberlite adsorption โดยวิธี critical dilution assay

7. การทดสอบความเสถียรของสารแบคทีริโอซิน

เมื่อนำ partially purified bacteriocin ที่ได้จากข้อ 6 มาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และทำการหาค่ากิจกรรมการยับยั้งทุกเดือน พบว่าแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวตัดแปลง มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ 51,200 AU/ml ตลอดระยะเวลา 17 เดือนของการเก็บ ซึ่งผลการทดลองนี้คล้ายคลึงกับ Anastasiadou *et al.* (2008) ซึ่งทดลองเก็บ pediocin SM-1 ที่ผลิตโดยเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้นานเป็นเวลา 1 ปี

8. ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผักสดพร้อมบริโภคชนิดต่าง ๆ

จากตัวอย่างผักสดพร้อมบริโภคทั้งสิ้น 22 ชนิด รวมทั้งหมด 52 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria* spp.ทั้งสิ้น 41 ตัวอย่าง คิดเป็น 78.85 เปอร์เซ็นต์ (ตารางที่ 15) และไม่พบ *Listeria monocytogenes* ในตัวอย่างใดเลย จะเห็นได้จากลักษณะโคโลนีที่ตรวจพบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ L.mono Differential Agar Base นั้นถ้าหากเป็น *Listeria monocytogenes* จะมีลักษณะเฉพาะของโคโลนีคือ มีสีฟ้าและมีโซนขุนขาวล้อมรอบ (ภาพที่17) แต่จากผลการตรวจนับโคโลนีสีฟ้าที่พบใน

ตัวอย่างผักสดทั้งหมด พบเพียงโคโลนีสีฟ้าที่ไม่มีโซนขาวช่นล้อมรอบ ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Listeria* sp. อื่น ๆ ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Listeria innocua*



ตารางที่ 15 การปนเปื้อน *Listeria* spp. ในผักสดพร้อมบริโภค

ตัวอย่างผัก	จำนวนตัวอย่าง ที่ศึกษา	จำนวนตัวอย่างที่พบการปนเปื้อน	
		<i>Listeria</i> spp.	<i>Listeria monocytogenes</i>
กะหล่ำปลีหั่นฝอย	3	3	-
กะหล่ำปลีม่วงหั่นฝอย	4	4	-
ผักสลัดเรดโอ๊ค	7	6	-
ผักสลัดกรีนโอ๊ค	2	2	-
แครอทหั่นฝอย	3	2	-
วอเตอร์เครส	3	3	-
แตงกวาสไลด์	4	4	-
เบบี๋คอส	3	2	-
หอมหัวใหญ่สไลด์	1	1	-
มะเขือเทศลูกใหญ่ผ่าซีก	1	1	-
มะเขือเทศราชินี	2	2	-
ผักกาดขาว	2	1	-
ผักกาดหวาน	1	1	-
ผักกาดแก้ว	6	5	-
พริกหยวกเขียว	1	1	-
พริกหยวกแดง	2	1	-
พริกหยวกเหลือง	1	1	-
ร็อกเก็ตป่า	1	1	-
มิชุนา	1	1	-
เรดเคอโรล	2	2	-
เบบี้สปีแนช	1	1	-
ฟิลเลย์ ไช้เบิร์ค 1		-	-
รวม	52	41 (78.85%)	(0%)



ภาพที่ 17 ลักษณะเฉพาะของโคโลนี *Listeria monocytogenes* บนอาหาร L.mono Differential Agar Base

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าตัวอย่างผักสดพร้อมบริโภคที่วางขายตามซูเปอร์มาร์เก็ตพบการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria* spp. เป็นจำนวนมากถึง 78.85 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากผักที่นำมาตรวจวิเคราะห์เป็นตัวอย่างผักสดที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน จึงอาจเป็นสาเหตุให้พบการปนเปื้อนเชื้อดังกล่าวได้สูง ซึ่งการปนเปื้อนเชืวดังกล่าวอาจมาจากหลายขั้นตอน เช่น ขั้นตอนการล้างทำความสะอาดอาจไม่ดีพอเนื่องจากบริเวณโคนต้น หรือใบนอกของผักมีเศษดินติดอยู่ คุณภาพของน้ำที่ใช้ล้าง การตัดแต่งผักหรือการหั่นฝอยก็เป็นการเพิ่มอัตราการปนเปื้อนเชื้อได้ เนื่องจากการเพิ่มพื้นที่ผิวในการสัมผัสกับอุปกรณ์หรือภาชนะที่ใช้บรรจุ นอกจากนี้การหั่นฝอยและตัดแต่งยังทำให้สารอาหารในผักไหลออกมา และเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญได้ และการวางผักขายบนชั้นวางที่ไม่ได้มีการควบคุมอุณหภูมิก็มีผลกระทบต่อการรอดชีวิตของเชื้อบนผักสด แต่อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าการตรวจตัวอย่างผักข้างต้นพบเพียงการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ก่อให้เกิดโรค แต่มีแนวโน้มที่จะพบการปนเปื้อนของ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ก่อโรคได้ เนื่องจากแหล่งที่พบการปนเปื้อนของ *Listeria* spp. และ *Listeria monocytogenes* มักพบการปนเปื้อนจากแหล่งเดียวกัน (อดิสร และ ปรีชา, 2538) อีกทั้งการสุ่มเก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ใช้ตัวอย่างเพียง 25 กรัม ซึ่งอาจทำให้ตรวจไม่พบเชื้อได้ ซึ่ง ปรีชา และคณะ (2553) ได้ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสดจากตลาดสดและซูเปอร์มาร์เก็ตในกรุงเทพมหานคร พบผักสดที่ปนเปื้อน *Listeria monocytogenes* 2 ตัวอย่าง จากตัวอย่างผักจากตลาดสด 58 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 3.4 และพบ *Listeria* spp. ทั้งหมด 36 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 61.1

นอกจากนี้ สุริดา (2553) ศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสดจากตัวอย่างผักสดพร้อมบริโภครวม 102 ตัวอย่าง พบการปนเปื้อนเชื้อ *Listeria* spp. ทั้งหมด 22 ตัวอย่าง คิดเป็น 21.6 เปอร์เซ็นต์ และตรวจพบ *Listeria monocytogenes* จากตัวอย่างกะหล่ำปลีหั่นฝอยจำนวน 2 ตัวอย่าง คิดเป็น 8.0 เปอร์เซ็นต์ ของตัวอย่างกะหล่ำปลีทั้งหมดที่นำมาศึกษา

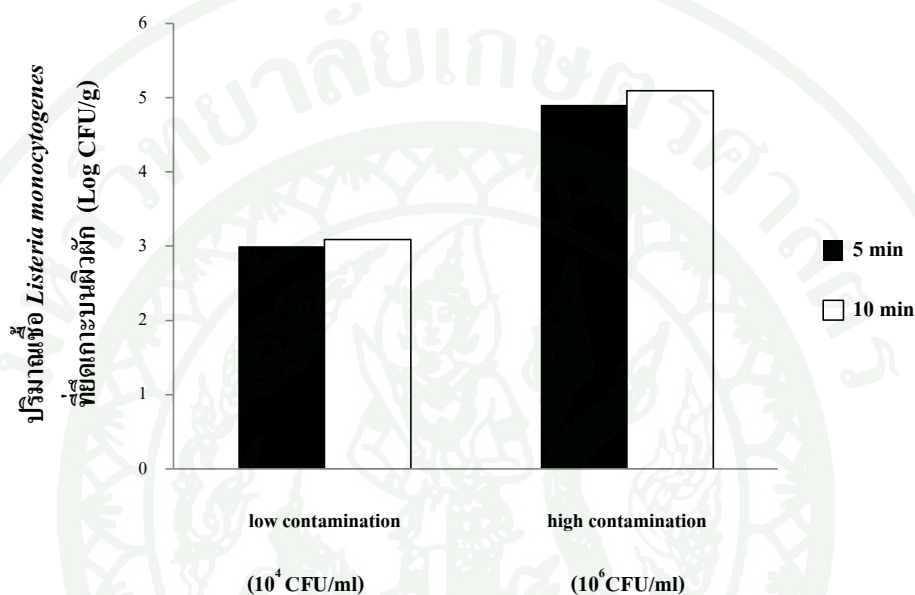
ถึงแม้ว่าจากการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างผักสดข้างต้นยังไม่มีตรวจพบ *Listeria monocytogenes* แต่ก็ควรมีการเฝ้าระวังเพื่อไม่ให้เกิดการระบาดของเชื้อหรือก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษเนื่องจากข้อมูลทางสถิติพบว่าอัตราการตรวจพบเชื้อ *Listeria* spp. นั้นมีแนวโน้มที่เพิ่มสูงขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2537 พบ *Listeria* spp. เพียงร้อยละ 3.8 และไม่มีตรวจพบ *Listeria monocytogenes* (อดิสร และ ปรีชา, 2538) แต่ในปี 2553 พบผักสดปนเปื้อน *Listeria* spp. สูงถึงร้อยละ 61.1 และพบการปนเปื้อน *Listeria monocytogenes* ร้อยละ 3.4 (ปรีชา และคณะ, 2553)

ถึงแม้ว่าในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการระบาดของเชื้อ *Listeria monocytogenes* จากการบริโภคผักสด แต่พบว่ามีผู้ป่วยโรค listeriosis อยู่บ้าง โดยในประเทศไทยพบผู้ป่วยที่มีสาเหตุจากเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในปี 1995 จำนวน 2 ราย (Rusemechan, 1995) ปี 2006 1 ราย (Treebupachatsakul *et al.*, 2006) และในปี 2013 พบผู้ป่วยเป็นฝีในสมองอีก 2 ราย (Limmahakhum and Chayakulkeeree, 2013)

9. การศึกษาการปนเปื้อนเทียมเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผักสด

ในการศึกษานี้ได้เลือกผักกะหล่ำปลีสดเป็นต้นแบบของผักสดพร้อมบริโภค เนื่องจากผักชนิดดังกล่าวเป็นผักที่รับประทานแบบสดได้ และนิยมรับประทานเป็นเครื่องเคียงในอาหารหลายชนิด เช่น น้ำพริก ส้มตำ หรือใส่กรอกอีสาน หรือเป็นผักสลัด ซึ่งเมื่อทำการปนเปื้อนเทียมผักกะหล่ำปลีสดในเซลล์ซัสเพนชันที่มีความเข้มข้นระดับต่ำ (10^4 CFU/ml) และระดับสูง (10^6 CFU/ml) ในระยะเวลา 5 นาที และ 10 นาทีพบว่า ปริมาณเซลล์เริ่มต้นมีผลต่อการยึดเกาะของเชื้อบนตัวอย่างผักสด โดยปริมาณเซลล์เริ่มต้นสูงกว่าจะทำให้มีการยึดเกาะของเชื้อบนตัวอย่างเพิ่มขึ้น เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของกะหล่ำปลีเป็นผักประเภทใบซ้อนกัน จึงทำให้จุลินทรีย์เกาะติดได้มากขึ้น (ภาพที่ 18) จากการทดลองพบว่าการแช่ผักในเซลล์ซัสเพนชันที่มีความเข้มข้นระดับต่ำ (10^4 CFU/ml) ที่เวลา 5 นาที และ 10 นาที พบปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะไม่แตกต่างกัน โดยเชื้อสามารถยึดเกาะได้ 3 Log CFU/g ส่วนในเซลล์ซัสเพนชันความเข้มข้นระดับสูง (10^6 CFU/ml) ที่

เวลา 5 นาที และ 10 นาที พบปริมาณเซลล์ที่ยึดเกาะได้ 5 Log CFU/g ดังนั้นจึงเลือกระยะเวลาที่ 5 นาที ในการจำลองการปนเปื้อนของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เนื่องจากถ้าหากเวลาที่ใช้ในการแช่นานเกินไป อาจจะทำให้น้ำซึมเข้าไปในตัวอย่างผักและทำให้ลักษณะทางกายภาพเสียไปได้



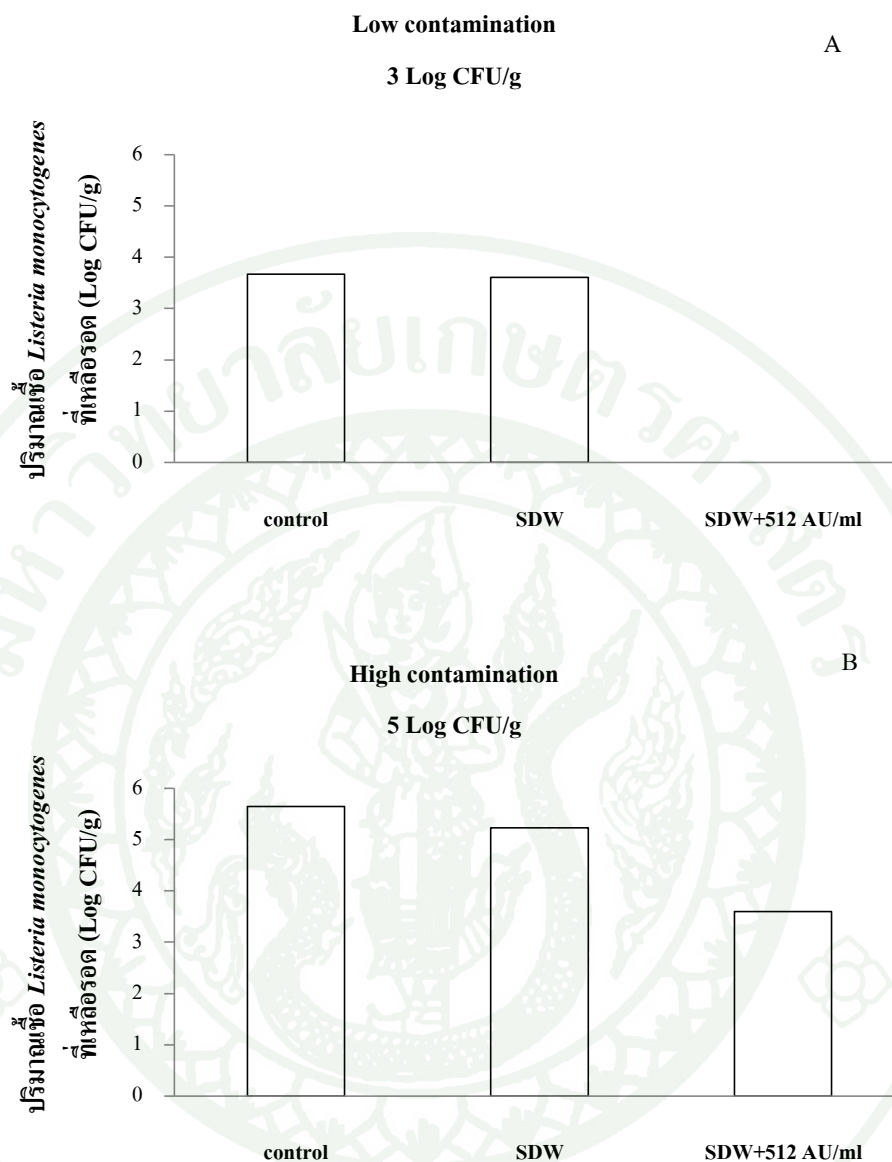
ภาพที่ 18 การยึดเกาะของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนตัวอย่างผักกะหล่ำปลีสด เมื่อแช่ในเซลล์ซัสเพนชันที่มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นแตกต่างกันที่ระยะเวลาต่าง ๆ

10. การประยุกต์ใช้สารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนตัวอย่างผักในปริมาณระดับต่ำ/สูง

10.1 การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผักสดที่มีการปนเปื้อนเทียมในระดับต่ำ/สูง และผลต่ออายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส)

เมื่อนำตัวอย่างผักกะหล่ำปลีสดที่ผ่านการปนเปื้อนเทียมให้มีปริมาณเซลล์บนผัก 10^3 และ 10^5 CFU/g มาแช่ในสารละลายน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีริโอซินความเข้มข้น 512 AU/ml เป็นเวลา 5 นาที เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่เป็นน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ไม่เติมสารแบคทีริโอซิน พบว่า ที่การปนเปื้อนระดับต่ำ (ประมาณ 3 Log CFU/g) ในชุดควบคุมที่ผ่านการ

ล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ไม่เติมแบคทีเรียโอสตินพบเชื้อปนเปื้อนในปริมาณ 3.67 Log CFU/g ส่วนชุดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบคทีเรียโอสติน 512 AU/ml นาน 5 นาทีพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ได้ทั้งหมด 100 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการศึกษาของ สุริดา (2553) พบว่าการล้างเตงกวาสดที่ปนเปื้อนเทียมโดยเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในระดับต่ำ (2.77 Log CFU/g) เมื่อนำไปแช่ในน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ไม่เติมสารแบคทีเรียโอสติน พบว่ามีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเพียง 8.50 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดทดลองที่ล้างด้วยสารแบคทีเรียโอสติน 512 AU/ml นาน 5 นาที พบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 สูงถึง 96.6 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชุดทดลองที่มีการปนเปื้อนระดับสูง (ประมาณ 5 Log CFU/g) เมื่อนำชุดควบคุมไปผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ไม่เติมสารแบคทีเรียโอสตินยังคงพบเชื้อในปริมาณสูง 5.15 Log CFU/g ส่วนชุดทดลองที่ผ่านการล้างในสารละลายแบคทีเรียโอสติน ปริมาณเชื้อลดลง 2 Log CFU/g (ภาพที่ 19) เช่นเดียวกับการทดลองของ สุริดา (2553) ที่พบว่าเตงกวาปนเปื้อนเทียมในระดับ 5 Log CFU/g เมื่อล้างในสารละลายแบคทีเรียโอสติน 512 AU/ml มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อเพียง 27 เปอร์เซ็นต์

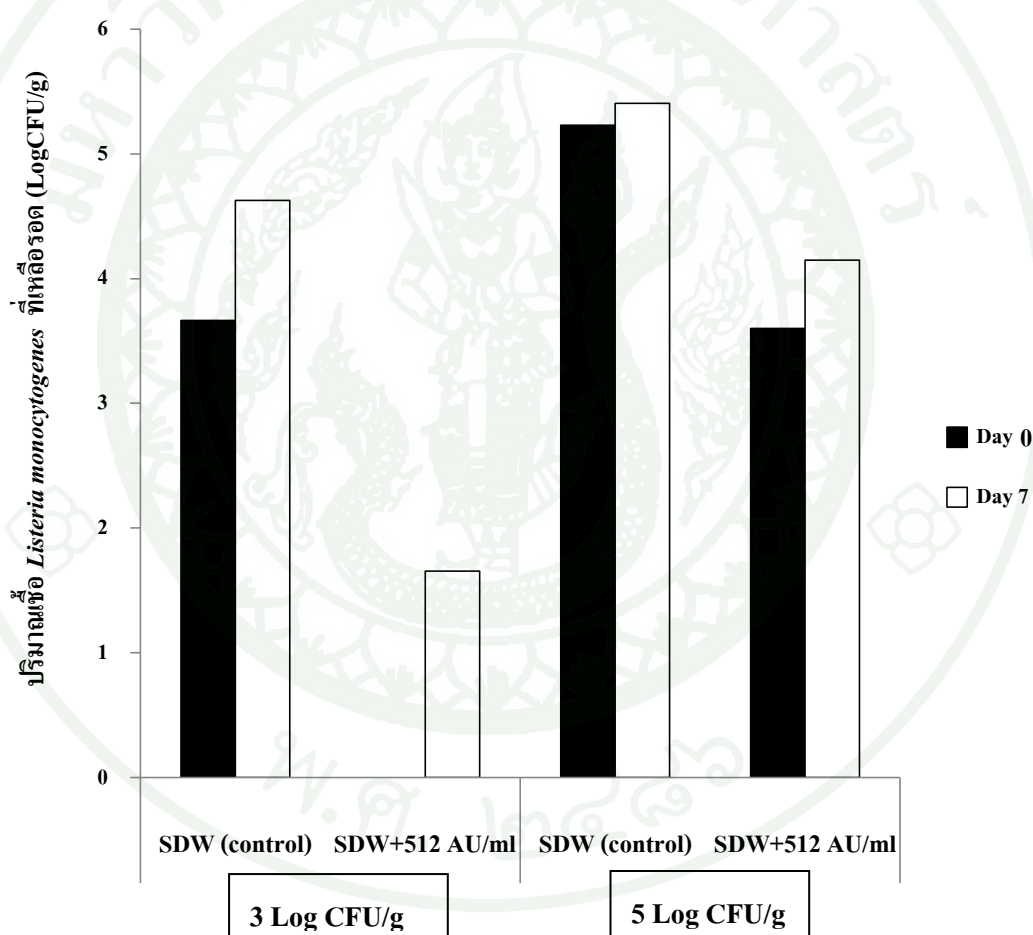


ภาพที่ 19 ผลของสารแบคทีริโอซินต่อการลดปริมาณเชือบนกะหล่ำปลีสดที่ปนเปื้อนเทียมด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 (A) ในระดับต่ำ (3 Log CFU/g) และ (B) ระดับสูง (5 Log CFU/g) (SDW: Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 512 AU/ml)

ตัวอย่างผักกะหล่ำปลีที่ผ่านการล้างในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ และน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีริโอซิน 512 AU/ml เมื่อนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 7 วันพบว่า ชุดควบคุมที่มีการปนเปื้อนระดับต่ำและล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ไม่เติมสารแบคทีริโอซินพบปริมาณเชื้อ

เพิ่มขึ้นเป็น 3.63 Log CFU/g ส่วนชุดทดลองที่ผ่านการล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมสารแบคทีริโอซิน พบเชื้อมีปริมาณเพิ่มขึ้น 1.65 Log CFU/g ในวันที่ 7 ของการเก็บรักษา แต่ในช่วง 0-6 วันไม่พบเชื้อปนเปื้อนเลย แสดงว่าสารแบคทีริโอซินมีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้ดี

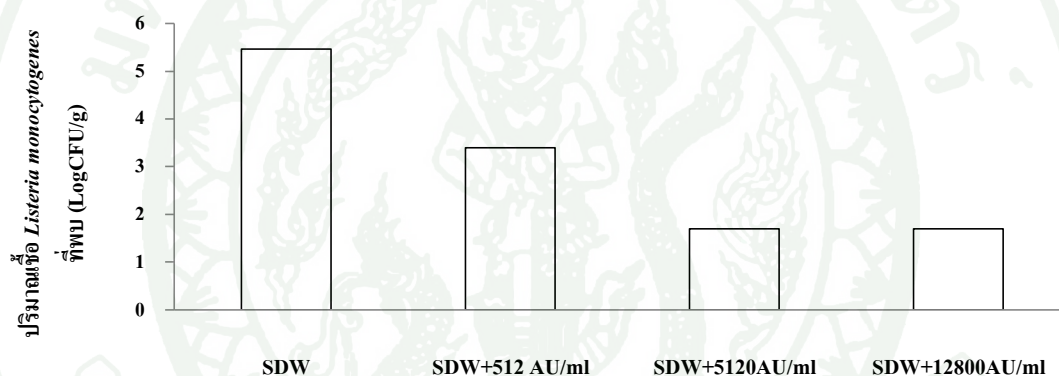
ส่วนชุดที่มีการปนเปื้อนระดับสูง (5 Log CFU/g) มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อทั้ง 2 ชุดการทดลอง เนื่องจากเชื้อ *Listeria monocytogenes* เป็นเชื้อ psychrophile ที่สามารถเจริญเพิ่มจำนวนได้ที่อุณหภูมิตู้เย็น ถ้าเก็บไว้เป็นเวลานาน (ภาพที่ 20)



ภาพที่ 20 ผลของสารแบคทีริโอซินต่อการเก็บรักษาของกะหล่ำปลีสดที่ปนเปื้อนเทียมด้วย *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในระดับต่ำ (3 Log CFU/g) และระดับสูง (5 Log CFU/g) เมื่อเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 7 วัน (SDW: Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 512 AU/ml)

11. การศึกษาประสิทธิภาพของสารแบคทีริโอซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ และผลต่ออายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส)

จากผลการทดลองในข้อ 10.2 จะเห็นได้ว่าความเข้มข้นสารแบคทีริโอซินที่ใช้คือ 512 AU/ml นั้น ไม่เพียงพอในการลดการปนเปื้อนในระดับสูง (5 Log CFU/g) กล่าวคือสามารถลดจำนวนเซลล์ลงได้ประมาณ 2 Log CFU/g เท่านั้น ดังนั้นจึงได้ทำการทดลองเพิ่มความเข้มข้นของสารแบคทีริโอซินในการล้างผักให้มีความเข้มข้น 5,120 และ 12,800 AU/ml เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมสารแบคทีริโอซิน (ภาพที่ 21)

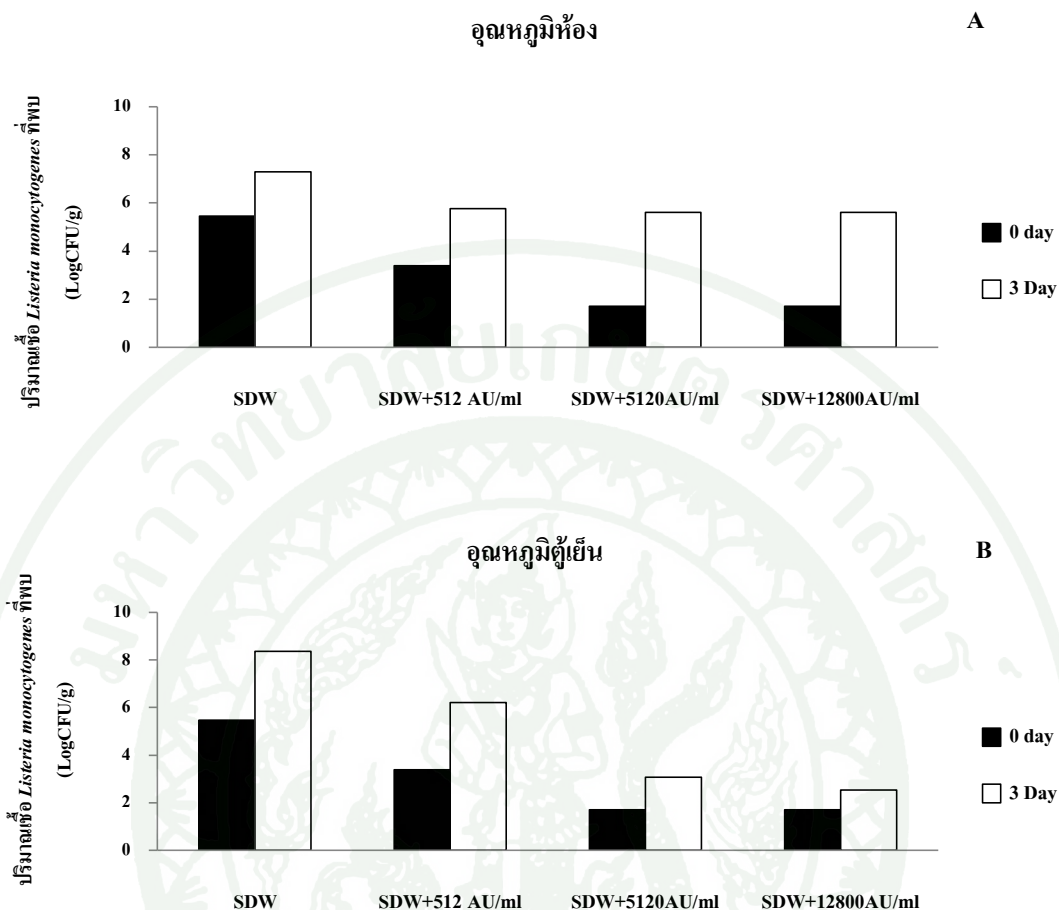


ภาพที่ 21 ผลของสารแบคทีริโอซินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนกะหล่ำปลีสดในปริมาณ 5 Log CFU/g (SDW: Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 512 AU/ml, SDW+5,120 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 5,120 AU/ml, SDW+12,800 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 12,800 AU/ml)

พบว่า การเพิ่มความเข้มข้นของสารแบคทีริโอซินเป็น 5,120 และ 12,800 AU/ml มีประสิทธิภาพยับยั้งเชื้อได้เพิ่มขึ้น ประมาณ 4 Log CFU/g แต่ยังคงไม่สามารถยับยั้งได้ทั้งหมด อาจเนื่องจากลักษณะของกะหล่ำปลีเป็นใบซ้อนกันเป็นชั้น จึงทำให้การเข้าถึงของสารแบคทีริโอซินไม่ทั่วถึง แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของสารแบคทีริโอซินเป็น 12,800 AU/ml ทั้งนี้อาจต้องอาศัย

วิธีการอื่นร่วมด้วยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้ง เช่น เพิ่มระยะเวลาในการแช่ผัก หรืออาศัยการกวนเพื่อเพิ่มการสัมผัสของสารแบคทีเรียไอซอินและเชื้อให้มากขึ้น

อย่างไรก็ตาม เมื่อนำผักที่ผ่านการแช่ในสารละลายแบคทีเรียไอซอินไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิตู้เย็นเป็นเวลา 3 วัน พบว่า ที่อุณหภูมิห้อง ปริมาณเชื้อที่เหลือรอดสามารถเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้นได้มากกว่า 5 Log CFU/g (ภาพที่ 22) แต่ถ้าเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น การเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อจะช้ากว่า เนื่องจากอุณหภูมิต่ำจะช่วยชะลอการเจริญของเชื้อได้ แต่เนื่องจากเชื้อ *Listeria monocytogenes* สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิตู้เย็น จึงยังคงพบปริมาณเชื้อเพิ่มขึ้น เมื่อเก็บไว้นานขึ้น

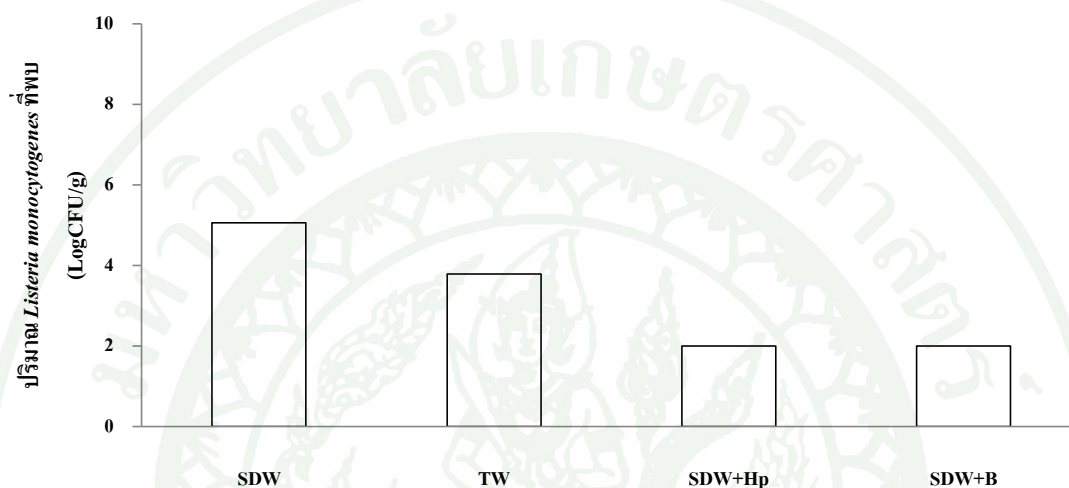


ภาพที่ 22 ผลของสารแบคทีริโอซินต่ออายุการเก็บรักษาของผักสดที่ผ่านการล้างในสารละลายแบคทีริโอซินความเข้มข้นต่าง ๆ และเก็บรักษาที่ (A) อุณหภูมิห้อง และ (B) อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 3 วัน (SDW: Sterile distilled water, SDW+512 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 512 AU/ml, SDW+5,120 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 5,120 AU/ml และ SDW+12,800 AU/ml: Sterile distilled water + bacteriocin activity 12,800 AU/ml)

12. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารแบคทีริโอซินกับสารเคมีที่ใช้ในทางการค้า

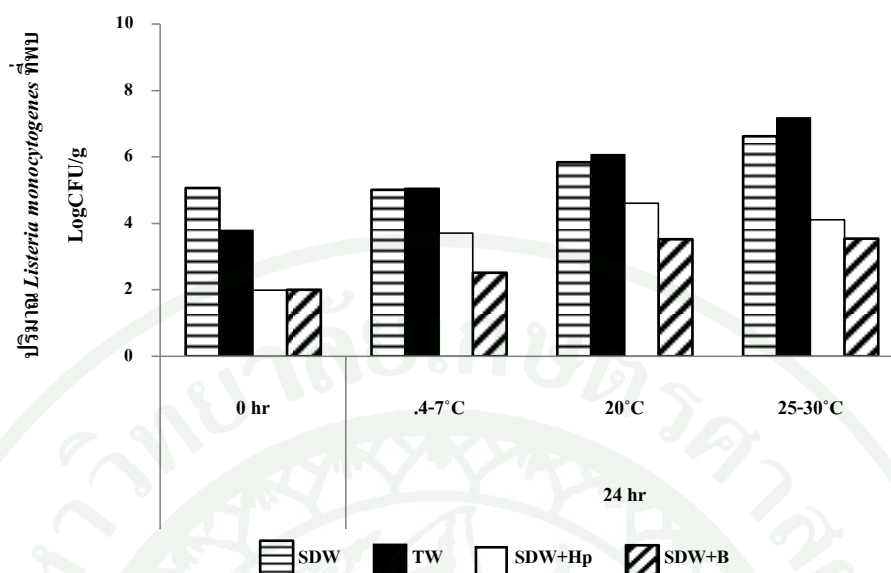
การทดลองนี้ได้ศึกษาเปรียบเทียบการใช้สารละลายต่างๆในการล้างผักได้แก่ น้ำกลั่น ปลอดภัย น้ำประปา น้ำกลั่นปลอดภัยที่เติมไฮโปคลอไรท์ 100 ppm และน้ำกลั่นปลอดภัยที่เติมสารแบคทีริโอซิน 5,120 AU/ml เมื่อทดลองล้างผักกะหล่ำปลีสดที่ปนเปื้อนเทียมเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ในปริมาณ 5 Log CFU/g โดยแช่ผักในสารละลายต่างๆข้างต้นเป็น

เวลา 5 นาที และเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งพบว่าสารไฮโปคลอไรท์ 100 ppm ที่ใช้ในทางการค้ามีประสิทธิภาพไม่ต่างจากการใช้สารแบคทีริโอซิน แต่การใช้สารเคมีอาจมีสารตกค้างบนผักที่อาจทำให้เกิดความไม่ปลอดภัยต่อผู้บริโภคได้ แต่น้ำกลั่น และน้ำประปา ไม่มีประสิทธิภาพในการลดปริมาณการปนเปื้อน



ภาพที่ 23 ประสิทธิภาพของสารชนิดต่างๆต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมบนผักกะหล่ำปลีในระดับสูง (5 Log CFU/) (SDW: Sterile distilled water, TW: tap water, SDW+ Hp: Sterile distilled water + hypochlorite 100 ppm และ SDW+B : Sterile distilled water + bacteriocin activity 5,120 AU/ml)

ส่วนผักสดที่ผ่านการแช่สารละลายฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าเมื่ออุณหภูมิการเก็บรักษาสูงขึ้น การเจริญของจุลินทรีย์จะเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย อย่างไรก็ตามชุดการทดลองที่แช่ในสารละลายไฮโปคลอไรท์ 100 ppm และสารแบคทีริโอซิน การเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อจะน้อยกว่าชุดควบคุมอย่างชัดเจน แสดงว่า สารแบคทีริโอซินนั้นมีประสิทธิภาพในการลดปริมาณเชื้อได้ดีบนผักสด (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 ปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผักสดที่ผ่านการแช่ในสารละลายต่าง ๆ เมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่าง ๆ (SDW: Sterile distilled water, TW: tap water, SDW+ Hp: Sterile distilled water + hypochlorite 100 ppm และ SDW+B: Sterile distilled water + bacteriocin activity 5,120 AU/ml)

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพการยับยั้งพบว่าชุดทดลองที่ผ่านการแช่ในสารละลายแบคทีริโอซิน มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณเชื้อน้อยกว่าในชุดการทดลองอื่น ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิเดียวกัน แม้ว่าสารไฮโปคลอไรด์จะเป็นสารที่ใช้มาเชื่อในการล้างผักทั่วไปก็ตาม แต่อย่างไรก็ตามในขั้นตอนของการเตรียมสารดังกล่าวต้องใช้ความระมัดระวังเป็นอย่างมาก เนื่องจากเป็นสารเคมีที่เป็นอันตรายต่อผิวหนังและดวงตา และสารเคมีดังกล่าวอาจเกิดการตกค้างในผัก ซึ่งส่งผลเสียต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ ดังนั้นการใช้สารแบคทีริโอซินมาประยุกต์ใช้ในการล้างผักน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความปลอดภัย เนื่องจากเป็นสารที่สร้างโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติที่มีความปลอดภัย และไม่เป็นพิษหรือก่อผลข้างเคียงต่อยูคาริโอตเซลล์ (Antonio *et al.*, 2007) และถ้าหากมีการเพิ่มความเข้มข้นของแบคทีริโอซินให้เพียงพอต่อการยับยั้งเชื้อ หรือใช้วิธีอื่นร่วม เช่น การกวน หรือการใช้ร่วมกับสารบางชนิดที่สามารถใช้ในอาหารได้ เช่น food-grade ethylene diamine tetraacetate (EDTA) ซึ่งจะไปจับกับแมกนีเซียมไอออนในชั้นของลิโปพอลิแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide) บริเวณผนังเซลล์ด้านนอกของแบคทีเรียเป้าหมาย จะส่งผลให้เพิ่มความไวต่อการเข้าทำลายของแบคทีริโอซินได้ (Stevens *et al.*, 1991.)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

1. แบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์คือ *Enterococcus faecium* KU-B5, *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 เท่ากับ 12,800 AU/ml, 12,800 AU/ml และ 800 AU/ml ตามลำดับ
2. แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์มี optimum temperature สำหรับการเจริญแตกต่างกัน โดย *Enterococcus faecium* KU-B5 และ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 เจริญได้ดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส และ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 เจริญได้ดีที่สุดที่ 42 องศาเซลเซียส
3. แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารน้ำมะพร้าวพบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ดีใกล้เคียงกับเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS แต่ไม่พบการสร้างสารแบคเทอริโอซิน แต่เมื่อเติม yeast extract พบว่าส่งเสริมการสร้างแบคเทอริโอซินในอาหารน้ำมะพร้าวได้อย่างมีนัยสำคัญ
4. สภาวะที่เหมาะสมที่สุดในการผลิตสารแบคเทอริโอซินของ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวที่เติม yeast extract 1.0 เปอร์เซ็นต์, Tween 80 0.1 เปอร์เซ็นต์ และ K_2HPO_4 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งได้สูงถึง 12,800 AU/ml เทียบเท่าอาหาร MRS
5. partially purified bacteriocin มีความเสถียรที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส นานถึง 17 เดือน โดยค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ยังคงเท่าเดิม
6. สารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 สามารถประยุกต์ใช้ในน้ำล้างผักเพื่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผักกะหล่ำปลีที่มีการปนเปื้อนเทียมปริมาณ 3 Log CFU/g ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (100 เปอร์เซ็นต์) และสามารถเก็บรักษาผักที่อุณหภูมิตู้เย็นได้นาน 6 วันโดยที่เชื้อไม่เพิ่มขึ้น

ข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้เป็นเพียงการศึกษาเบื้องต้นในการประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอซินในน้ำล้างผัก เพื่อลดการปนเปื้อนของแบคทีเรียบนกะหล่ำปลีสดที่ปนเปื้อนเทียมด้วยเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ซึ่งพบว่าลักษณะทางกายภาพของผักมีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อได้ ดังนั้นอาจต้องใช้วิธีการอื่นร่วมด้วย เพื่อให้การยับยั้งเป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพแต่ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับลักษณะทางกายภาพของผักด้วยว่าเป็นผักประเภท ใบ หัว ดอก เพราะมีผลต่อการเกาะติด และรอดชีวิตของเชื้อได้

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- ชุตินันท์ รัตนไพฑูรย์สวัสดิ์. 2547. การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นารีลักษณ์ นาแก้ว และ ศิริวรรณ วิชัย. 2546. การผลิตและสกัด pigment จากเชื้อราที่เลี้ยงบนอาหารแข็ง, มหาวิทยาลัยนเรศวร.
- นวลพรรณ ณ ระนอง และ สุกัญญา สายธิ. 2541. การผลิตกรดโคจิกโดยเชื้อ *Aspergillus oryzae* จากน้ำมะพร้าว. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 36. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปราโมทย์ ศิริโรจน์. 2517. การทดลองเลี้ยงเชื้อยีสต์ด้วยน้ำมะพร้าว. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ปรีชา จิงสมานกุล นวรัตน์ รัตนดิถก ณ ภูเก็ต และ กมลวรรณ กันแต่ง. 2553. การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในผักสด. วารสารกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 52: 30–39.
- เพิ่มพงษ์ ศรีประเสริฐศักดิ์. 2524. การผลิตและการเก็บเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นอาหารเสริมสุกรในรูปเชื้อผง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รสสุคนธ์ เหล่าไพฑูรย์. 2528. การคัดเลือกสายพันธุ์เชื้อน้ำส้มสายชูที่เหมาะสมต่อวิธีการผลิตแบบต่าง ๆ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิเชียร กิจปรีชาวนิช. 2521. ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญและการผลิตวิตามินบี 12 ของเชื้อ *Bacillus megaterium* ATCC 13639 ในน้ำมะพร้าวแก่. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิชา ผลสมบุญ และ นภา โล่ห์ทอง. 2517. การใช้กล้วยชนิดต่าง ๆ มันเทศ และน้ำมะพร้าวแกง
เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อรา. การประชุมทางวิชาการการเกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่
13. สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สถาบันอาหาร. 2555. อุตสาหกรรมมะพร้าวและผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้อง. แหล่งที่มา:
<http://fic.nfi.or.th>, 9 มกราคม 2557.

สายชล ชิวปรีชา. 2520. การศึกษาการใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเชื้อแบคทีเรียกรด
แลคติก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

_____ และ นภา โล่ห์ทอง. 2517. การใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อและเก็บเชื้อแบคทีเรีย
แลคติกเพื่อเสริมในอาหารสุกร. รายงานการประชุมทางวิชาการเกษตรและชีววิทยา ครั้งที่
13. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุธิดา เชื้อพานิช. 2553. การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอรีโอซินเพื่อ
ใช้ในการควบคุม *Listeria monocytogenes* ในแตงกวาสด. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อโณทัย คมเสวต และ นภา โล่ห์ทอง. 2518. การใช้น้ำมะพร้าวเลี้ยงยีสต์. การประชุมทางวิชาการ
เกษตรศาสตร์และชีววิทยา ครั้งที่ 14. สาขาพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อดิสร เสวตวิวัฒน์ และ ปรีชา จิ่งสมานกุล. 2538. ซาลโมเนลลาและลิสทีเรียในผักสด. วารสาร
อาหาร. 25: 185–189.

อรอนงค์ พริ้งสุลกะ. 2550. แบคเทอรีโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. มหาวิทยาลัยศรีนคริน-
ทรวิโรฒ. วารสารวิทยาศาสตร์. 23: 145–160.

อัจฉรา มีวาสนา. 2510. การแสดงส่วนประกอบอาหารพื้นเมืองของประเทศ. วารสาร
กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์. 9 (14): 1–29.

อัสนี วิจิตรกะ และ นวลพรรณ ณ ระนอง. 2550. การผลิตไดอะซิติลและอะซิโตนจากน้ำ
มะพร้าวโดยเชื้อ *Lactobacillus pentosus* SR 4-2. การประชุมวิชาการของ
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 45 เล่ม 6. สาขาวิทยาศาสตร์ (30 มกราคม – 2
กุมภาพันธ์ 2550): 322–329.

Abee, T. 1995. Pore-forming bacteriocins of Gram-positive bacteria and self-protection
mechanisms of producer organisms. **FEMS Microbiol Lett.** 129: 1–10.

Ahn, C. and M.E. Stiles. 1990. Antibacterial activity of lactic acid bacteria from vacuum-
packaged meats. **J Appl Bacteriol.** 69: 302–310.

Alaban, C.A. 1962. Studies on the optimum conditions for “nata de coco” bacterium for “nata”
formation in coconut water. **Philipp Agric.** 45: 490–516.

Allende, A., B. Martínez, V. Selma, M.I. Gil, J.E. Suarez and A. Rodriguez. 2007. Growth and
bacteriocin production by lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at
reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce. **Food Microbiol.** 24:
759–766.

Anastasiadou, S., M. Papagianni, G. Filiouis, I. Ambrosiadis and P. Koidis. 2008. Growth and
metabolism of a meat isolated strain of *Pediococcus pentosaceus* in submerged
fermentation, purification, characterization and properties of the produced pediocin
SM-1. **Enzyme Microb Technol.** 43: 448–454.

Antonio, G., H. Abriouel, R.L. Lopez and N.B. Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for
food biopreservation. **Int J Food Microbiol.** 120: 51–70.

Archana, K., A.P. Garg, K. Makeen, M. Lal, C. Gupta and S. Chandra. 2008. A bacteriocin
production on soya nutri nuggets extract medium by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*
CCSUB202. **Int J Dairy Science.** 3 (1): 49–54.

- Arseculteratre, S.N., L.M.D. Silva., S. Wijesundera and C.H.S.R.Bandunatho. 1969. Coconut as a medium for experimental production of alfla toxin. **Appl Microbiol.** 18 (1): 88–94.
- Bari, M.L., D.O. Ukuku, T. Kawasaki, Y. Inatsu, K. Isshiki and S. Kawamota. 2005. Combined efficacy of nisin and pediocin with sodium lactate, citric acid, phytic acid and potassium sorbate and EDTA in reducing the *Listeria monocytogenes* population of inoculated fresh-cut produce. **J Food Protect.** 68: 1381–1387.
- Beuchat, L.R. 1996. *Listeria monocytogenes*: Incidence on vegetables. **Food Control.** 7: 223–228.
- Bhagwat, A.A., R.A. Saffner and J.A. Abbott. 2004. Evaluation of wash treatments for survival of foodborne pathogen and maintenance of quality characteristics of fresh-cut apple slices. **Food Microbiol.** 21: 319–326.
- Blendon, D.C. and F.T. Szatalowicz. 1967. Ecological aspects of listeriosis. **J Am Vet Med Assoc.** 151: 1761–1766.
- Box, G., S. Bisgaard and C. Fung. 1998. An explanation and critique of Taguchi's contributions to quality engineering. **Qual Reliab Eng Int.** 4: 123–131.
- Braun, V., H. Pilsel and P. Grob. 1994. Colicins: structures, modes of action, transfer through membranes and evolution. **Arch Microbiol.** 161: 199–206.
- Buck, J.W., R.R. Walcott and L.R. Beuchat. 2003. Recent trends in microbiological safety of fruits and vegetables. **Plant Health Progress**.doi: 10.1094/PHP-2003-0121-01-RV.
- Canadian Press. 2008. **Canadian listeriosis outbreak**. Available Source: http://en.wikipedia.org/wiki/2008_Canada_listeriosis_outbreak, January 22, 2014.

- Caray, E.M. 1924. Changes in the sugar composition of coconut water during maturation and germination. **J Sci Food Agri.** 13: 229.
- Casaus, P., T. Nilsen, L.M. Cintas, I. Nes, P.E. Hernandez and H. Helge. 1997. Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. **Microbiol.** 143: 2287–2294.
- Centers for Disease Control and Prevention. 2011. **Listeria (Listeriosis)**. Available Source <http://www.cdc.gov/listeria/outbreaks/>, January 22, 2014.
- Child, R. 1964. **Coconuts**. Longmans & Co., London.
- _____ and W.R.N. Nathanael. 1947. Utilization of coconut water. **The Tropical Agriculturist** (Ceylon). 103: 85–89.
- _____. 1950. Changes in the sugar composition of coconut water during maturation and germination. **J Sci Food Agri.** 1: 326–329.
- Cintas, L.M., P. Casaus, C. Herranz, L.S. Havarstein, H. Holo, P.E. Hernandez and I.F. Nes. 2000. Biochemical and genetic evidence that *Enterococcus faecium* L50 produces enterocins L50A and L50B, the sec-dependent enterocin P, and a novel bacteriocin secreted without an N-terminal extension termed enterocin Q. **J. Bacteriol.** 182: 6806–6814.
- Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. **Int J Food Microbiol.** 71: 1–20.
- De Gallardo, J.E., R.M. Andres and E.T. Magno. 1971. A study on the isolation and screening of microorganisms for production of diverse textured nata. **Philipp Sci.** 100: 41–51.

- Deegan, L.H., P.D. Cotter, C. Hill and P. Ross. 2006. Bacteriocin: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. **Int Dairy J.** 16 (9): 1058–1071.
- Delgado, A., D. Brito, C. Peres, F. Noe-Arroyo and A. Garrido-Fernandez. 2005. Bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* B96 can be expressed as a function of temperature and NaCl concentration. **Food Microbiol.** 22: 521–528.
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its use as food preservative. **Int J Dairy Technol.** 43 (3): 73–76.
- De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharpe. 1960. A medium for cultivation of *Lactobacilli*. **J Appl Bacteriol.** 23: 130–135.
- De Vuyst, L. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria, pp. 91-142. In L.De Vuyst and E.J. Vandamme, eds. **Bacteriocins of lactic acid bacteria: Microbiology, genetic and application.** Blackie-Academic & Professional, London
- _____. 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* NIZO22186 in a synthetic medium. **J Applied Microbiol.** 78: 28–33.
- _____ and E.J. Vandamme. 1992. Influence of the carbon source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* batch fermentations. **J General Microbiol.** 138: 571–578.
- Dominguez, A.P.M., D. Bizani, F. Cladera-Olivera and A. Brandelli. 2007. Cerein 8A production in soybean protein using response surface methodology. **Biochem Engineer J.** 35: 238–243.
- Eckner, K.F. 1992. Bacteriocins and food application. **Dairy Food Environ Sani.** 12: 204–209.

- Ennahar, S. and N. Deschamps. 2000. Anti-Listeria effect of enterocin A, produced by cheese isolated *Enterococcus faecium* EFM01, relative to other bacteriocins from lactic acid bacteria. **J Appl Microbiol.** 88: 449–457.
- Galvez, A., H. Abriouel, R.L. Lopez and N.B. Omar. 2007. Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. **Int J Food Microbiol.** 120: 51–70.
- Gonzalez, B.M. 1950. Changes in the sugar composition of coconut water during maturation and germination. **J Sci Food Agri.** 1: 326–329.
- Guerra, N.P., M.L. Rua and L. Pastrana. 2001. Nutritional factors affecting the production of two bacteriocin from lactic acid bacteria on whey. **Int J Food Microbiol.** 70: 267–281.
- Holzappel, W.H., R. Geisen and U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food grade enzymes. **Int J Food Microbiol.** 24: 343–362.
- Hurst, A. 1981. Nisin. **Adv Appl Microbiol.** 27: 85–123.
- Hyronimus, B., C. Le-Marrec and M.C. Urdaci. 1998. Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I4. **J Appl Microbiol.** 85: 42–50.
- Jack, R.W., J.R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocin of gram-positive bacteria. **Microbiol Rev.** 59: 171–200.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocin produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol Rev.** 12: 39–86.

- Konisky, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. **Annu Rev Microbiol.** 36: 125–144.
- Leverentz, B., W.S. Conway, M.J. Camp, J. Janisiewicz, T. Abulladze, M. Yang, R. Saftner and A. Sulakvelidze. 2003. Biocontrol of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut produce by treatment with lytic bacteriophages and a bacteriocin. **Appl Environ Microbiol.** 69 (8): 4519–4526.
- Li, C., F. Ouyang and J. Bai. 2000. Extractive cultivation of *Lactococcus lactis* using a polyethylene glycol/ $\text{Mg SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ aqueous two-phase system to produce nisin. **Biotechnol.** 22: 843–847.
- Limmahakhun, S. and M. Chayakulkeeree. 2013. *Listeria monocytogenes* brain abscess: two cases and review of the literature. **Southeast Asian J Trop Med Public Health.** 44: 468–478.
- Luca, S., S. Valmorri, G. Suzzi and A. Corsetti. 2008. The role of environmental factors and medium composition on bacteriocin-like inhibitory substances (BLIS) production by *Enterococcus mundtii* strains. **Food Microbiol.** 25: 722–728.
- Lucas, R., M.J. Grande, H. Abriouel, M. Maqueda, N.B. Omar, E. Valdivia, M. Martinez-Canamero and A. Galvez. 2006. Application of the broad-spectrum bacteriocin enterocin AS-48 to inhibit *Bacillus coagulans* in canned fruit and vegetable foods. **Food Chem Toxicol.** 44: 1774–1781.
- Madhav, S. P. 1989. Quality engineering using robust design. **AT&T Bell Laboratories.** 67–68.
- Marriott, N.G. 1997. **Essentials of food sanitation.** Chapman and Hall., New York.

- Mead, P.S., S. Laurence, D. Vance, F.M. Linda, S.B. Joseph, S. Craig, M.G. Patricia and V.T. Robert. 1999. Food-related illness and death in the United States. Centers for disease control and prevention, Atlanta, Georgia, USA. **Emerging Infectious Diseases**. 5: 607–625.
- Molinos, A.C., H. Abriouel, R.L. Lopez, N.B. Omar, E. Valdivia, M. Maqueda, M.M. Canamero and A. Galvez. 2005. Effect of immersion Solutions containing enterocin AS-48 on *Listeria monocytogenes* in vegetable foods. **Appl Environ Microbiol**. 71 (12): 7781–7787.
- _____ and E. Valdivia. 2008. Inhibition of *Bacillus cereus* weihenstephanensis in raw vegetables by application of washing solutions containing enterocin AS-48 alone and in combination with other antimicrobials. **J Food Microbiol**.doi: 10.1016/j.fm.2008.05.001
- Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. **J Food Prot**. 59: 54–63.
- _____ and J.B. Luchansky. 1993. Biochemical methods for purification of bacteriocins, pp. 41-61. In D.G. Hoover and L.R. Steenson, eds. **Bacteriocins of lactic acid bacteria**. Academic Press, New York.
- Nettles, C.G and S.F. Barefoot. 1993. Biochem and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. **J Food Protect**. 56: 338–356.
- Netz, D.J., R. Pohl, A.G. Beck-Sickinger, T. Selmer, A.J. Pierik, M.C. Bastos and H.G. Sahl. 2002. Biochemical characterization and genetic analysis of aureocin A53 a new atypical bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. **J Molecular Biology**. 319: 745–756.

Nicolas, G., Auger, I., Beaudoin, M., Halle, F., Morency, H., LaPointe, G. and M.C Lavoie.

2004. Improved methods for mutacin detection and production. **J Microbiol Methods**. 59: 351–361.

Pantev, A., P. Kabadjova, R. Valcheva, S. Danova, X. Dousset, T. Haertle, J.M. Chobert and

I. Ivanova. 2002. Effect of nitrogen sources on bacteriocin production by *Enterococcus faecium* A2000. **Folia Microbiol**. 47(6): 659–662.

Parada, J.L., C.R. Caron, A.B.P. Medeiros and C. R. Socol. 2007. Bacteriocins from lactic

acid bacteria: Purification, properties and use as biopreservatives. **Int J Braz Biotechnol**. 50: 521–542.

Parente, E. and C. Hill. 1992. A comparison of factors affecting the production of two

bacteriocin from lactic acid bacteria. **J Appl Microbiol**. 73: 290–298.

Piard, J.C. and M. Desmazaud. 1992. Inhibiting factor produced by lactic acid bacteria. 2.

Bacteriocins and other antibacterial substances. **Lait**. 72: 113–142.

Pilasombut, K. 2006. Purification and characterization of bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K4 and K7 isolated from chicken intestine. Ph.D. thesis, Kasetsart University.

Pingitore, E.V., E. Salvucci, F. Sesma and M.E. Nader-Macias. 2007. Different strategies for

purification of antimicrobial peptides from Lactic Acid Bacteria (LAB). **Appl Microbiol**. 557–568.

Pollard, J.K., E.M. Shantz and F.C. Steward. 1961. Hexitols in coconut milk: Their role in

nature of dividing cells. **Plant Physiol**. 36 (4): 492–501.

- Ponce, A.G., M.R. Moreira, C.E. del Valle and S.I Roura. 2008. Preliminary characterization of bacteriocin-like substances from lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables. **LWT-Food Science and Technology**. 41: 432–441.
- Prabakaran, G., S.L. Hoti, A.M. Manonmani and K. Balaraman. 2008. Coconut water as a cheap source for the production of δ -endotoxin of *Bacillus thuringiensis* var. israelensis, a mosquito control agent. **Acta Trop**. 105: 35–38.
- Richter, E.M., D.P. Jesus, R.A.A. Munoz, C.L.D. Lago and L. Angnes. 2005. Determination of anions, cations and sugars in coconut water by capillary electrophoresis. **J Braz Chem Soc**. 16: 1134–1139.
- Robinson, R.K., C.A. Batt and P.D. Patel. 2000. **Encyclopedia of Food Microbiology**, Vol. 2. Academic Press, New York.
- Roy, R. K. 2001. **Design of experiments using the Taguchi approach**. John Wiley & Sons, Inc., Canada.
- Rusemechan, S. 1995. Listeria Meningitis: Report of two cases in Thailand. **J Infect Dis Antimicrob Agents**. 12: 69–71.
- Santoso, U., K. Kubo, T. Ota, T. Tadokoro and A. Maekawa. 1996. Nutrient composition of kopyor coconuts (*Cocos nucifera*). **Food Chem**. 57: 299–304.
- Satyavati, K., C. Krishnaswamy, A. Jayalakshmi, C. Balachandran, N. Sreedhara, P.P. Thomas, N. Sreemula and A.G. Mathew. 1984. Innovations in edible products from coconut. **Proceedings of the seminar on coconut processing and utilization**, TVM 8th Feb 1984.

- Schillinger, U., R. Geisen and W.H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci Technol.** 7: 158–164.
- Settanni, L. and A. Corsetti. 2008. Application of bacteriocins in vegetable food biopreservation. **Int J Food Microbiol.** 121: 123–138.
- Sharma, S., A.P. Garg and G. Singh. 2010. Optimization of fermentation conditions for Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* CCSULAC1 on modified MRS medium. **Int J of Dairy Science.** 5 (1): 1–9.
- Smith, M.E. and A.T Bull. 1976. Studies of the utilization of coconut water waste for the production of the food yeast *Saccharomyces fragilis*. **J Appl Bacteriol.** 41: 81–95.
- Sofia, A., M. Papagianni, G. Filiousis, I. Ambrosiadis and P. Koidis. 2008. Pediocin SA-1, an antimicrobial peptide from *Pediococcus acidilactici* NRRL B5627, Production condition, purification and characterization. **Bioresource Technology.** 99: 5384–5390.
- Stevens, K.A., B.W. Sheldon, N.A. Klapes and T.R. Klaenhammer. 1991. Nisin Treatment for Inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. **Appl Environ Microbiol.** 57: 3613–3615.
- Tagg, J.R., A.S. Dajani and L.W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Bacteriol Rev.** 40: 722–756.
- Terzaghi, B.E. and W.E. Sandine. 1975. Improved medium for *Lactic Streptococci* and their bacteriophages. **J Appl Microbiol.** 29: 807–813.

- Thampan, P.K. and P. Rethinam. 2004. Coconut products for health and medicine. **Indian Coconut J.** 35: 6–15.
- Thuan-Chew, T., L.H. Cheng, R. Bhat, G. Rusul and A.M. Easa. 2014. Composition, physiochemical properties and thermal inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase from coconut (*Cocos nucifera*) water obtained from immature, mature and overly-mature coconut. **Food Chem.** 142: 121–128.
- Todorov, S.D. and L.M.T. Dicks. 2005a. Optimization of bacteriocin ST311LD production by *Enterococcus faecium* ST311LD isolated from spoiled black olives. **J Microbiol.** 43: 370–374.
- _____. 2005b. Growth parameter influencing the production of *Lactobacillus rhamnosus* bacteriocins ST461BZ and ST462BZ. **Ann Microbiol.** 55: 283–289.
- _____. 2009. Effect of modified MRS medium on production and purification of antimicrobial peptide ST4SA produced by *Enterococcus mundtii*. **Anaerobe.** 15: 65–73.
- Treebupachatsakul, P., S. Srifeungfung and M. Chayakulkeeree. 2006. Brain abscess due to *Listeria monocytogenes*: First case report in Thailand. **J Med Assoc Thai.** 89: 1516–1520.
- Tulecke, W., L.M. Weinstein, A. Rutner and H.I. Laurengot. 1961. The biochemical composition of coconut water as related to its use in plant tissue culture. **Contrib Boyce Thomson Inst** 21: 115–128.

- Unagul, P., C. Assantachai, S. Phadungruengluij, M. Supphantharika, M. Tanticharoen and C. Verduyn. 2007. Coconut water as a medium additive for the production of docosahexaenoic acid (C22:6 n3) by *Schizochytrium mangrovei* Sk-02. **Bioresource Technology**. 98: 281–287.
- Uphade, B.K., S.S. Shelke and D.G. Thorat. 2008. Studies on some physico-chemical characteristics of coconut water near sugar and chemical factory. **Int J Chem Sci**. 6: 2052–2054.
- Upreti, G.C. and R.D. Hinsdill. 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. **Antimicrob Agents Chemother**. 4: 487–494.
- Van Overbeek, J., M.E. Conklin and A.F. Blakeslee. 1941. Factors in coconut water essential for growth and development of very young *Datura* embryos. **Science**. 94: 350–351.
- Verderbelt, J.M. 1954. Nutritive value of coconut. **Nature**. 156: 174–175.
- Yousef, A.E. 2003. Lactic acid fermentation and bacteriocin production, p. 227. *In* A.E. Yousef and C. Carlstrom, eds. **Food microbiology a laboratory manual**. Wiley-Interscience, USA.





อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Tryptic soy broth

Peptone from casein	17	กรัม
Peptone from soymeal	3	กรัม
Dextrose	2	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.3	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic soy agar ให้เติมผงวุ้นลงไป 15 กรัม และในกรณีที่ต้องการเตรียม soft agar ให้เติมผงวุ้นลงไป 7.5 กรัม

2. De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth

Peptone from casein	10	กรัม
Meat extract	8	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Di-ammonium hydrogen citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.04	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-เบส	5.8	

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man, Rogosa and Sharpe agar ให้เติมผงวุ้นลงไป 15 กรัม

3. L. mono Differential Agar Base

Meat peptone	18	กรัม
Casein enzymic hydrolysate	6	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Sodium pyruvate	2	กรัม
Glucose	2	กรัม
Magnesium glycerophosphate	1	กรัม
Magnesium sulphate	0.5	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Lithium chloride	10	กรัม
Disodium hydrogen phosphate anhydrous	2.5	กรัม
Chromogenic substrate	0.05	กรัม
Agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร
ค่าความเป็นกรด-เบส	7.2	

4. L. mono Differential Agar Base Selective Supplement (vial contents for 500 ml of medium)

Polymyxin B sulphate	38,350	IU
----------------------	--------	----

5. L. mono Differential Agar Base Selective Supplement (vial contents for 500ml of medium)

Ceftazidime	10	มิลลิกรัม
Amphotericin B	5	มิลลิกรัม
Nalidixic acid,sodium salt	10	มิลลิกรัม

6. L. mono Differential Agar Base Slective Supplement (vial contents for 500ml of medium)

L-Phosphatidylinositol

1 กรัม

สารละลายเคมี**1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 5 โมลาร์**

เตรียมโดยละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 20 กรัมในน้ำกลั่น ทั้งไว้ให้เย็นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5 โมลาร์

เตรียมโดยนำกรดไฮโดรคลอริก 12.06 โมลาร์ ปริมาตร 414.59 มาปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรโดยน้ำกลั่น



ตารางผนวกที่ ข1 การเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 ในอาหารเหลว MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Time(hr)	30°C			37°C			42°C		
	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)
0	5.75±0.30	5.46±0.46	0	5.40±0.12	5.45±0.01	0	5.83±0.02	5.45±0.06	0
3	6.25±0.24	5.47±0.30	0	5.53±0.10	5.41±0.02	0	6.64±0.02	5.46±0.41	0
6	7.04±0.46	5.44±0.14	200	7.61±0.21	5.42±0.01	400	8.00±0.03	5.41±0.03	100
9	7.61±0.06	5.43±0.34	400	8.60±0.04	4.71±0.01	1,600	8.99±0.01	4.96±0.09	200
12	8.33±0.24	5.40±0.54	6,400	8.91±0.07	4.27±0.03	3,200	9.03±0.01	4.56±0.15	200
15	8.59±0.34	5.19±0.28	6,400	9.06±0.21	4.03±0.02	12,800	8.93±0.05	4.36±0.32	200
18	8.92±0.17	4.90±0.36	6,400	9.23±0.30	3.93±0.01	12,800	9.02±0.14	4.23±0.16	200
21	9.05±0.14	4.66±0.02	12,800	9.27±0.12	3.89±0.03	12,800	9.13±0.07	4.16±0.08	200
24	9.39±0.16	4.51±0.47	12,800	9.08±0.05	3.84±0.02	12,800	8.88±0.06	4.09±0.07	200

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข2 การเจริญของเชื้อ *Enterococcus faecium* KU-B5 ในอาหารน้ำมะพร้าวเมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Time(hr)	30°C			37°C			42°C		
	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)
0	5.67±0.14	5.32±0.27	0	5.23±0.16	5.56±0.02	0	5.79±0.02	5.22±0.01	0
3	6.48±0.13	5.32±0.58	0	7.13±0.14	6.30±0.02	0	7.43±0.02	5.21±0.00	0
6	7.52±0.35	5.33±0.35	0	8.33±0.38	6.23±0.03	0	8.25±0.02	5.21±0.01	0
9	7.56±0.10	5.37±0.39	0	8.46±0.02	6.02±0.00	0	8.48±0.03	5.21±0.02	0
12	7.64±0.05	5.45±0.14	0	8.40±0.14	5.70±0.01	0	8.49±0.01	5.22±0.03	0
15	7.75±0.12	5.46±0.12	0	8.45±0.12	5.30±0.01	0	8.28±0.00	4.66±0.02	0
18	7.83±0.11	5.41±0.35	0	8.28±0.05	5.13±0.02	0	8.32±0.03	4.35±0.01	0
21	8.26±0.03	5.39±0.14	0	8.36±0.13	5.02±0.01	0	8.25±0.01	4.22±0.01	0
24	8.11±0.38	5.38±0.10	0	8.34±0.10	4.96±0.00	0	8.26±0.01	4.12±0.04	0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ๓ การเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารเหลว MRS เมื่อบ่มที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Time(hr)	30°C			37°C			42°C		
	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)
0	5.64±0.23	5.47±0.10	0	5.29±0.21	5.57±0.01	0	5.59±0.01	5.47±0.04	0
3	5.82±0.14	5.47±0.31	0	5.20±0.10	5.57±0.01	0	5.85±0.02	5.49±0.01	0
6	6.18±0.28	5.47±0.25	0	6.99±0.07	5.55±0.01	0	6.88±0.01	5.45±0.02	0
9	7.42±0.52	5.44±0.23	0	8.62±0.03	5.40±0.02	1,600	6.93±0.01	5.39±0.02	0
12	8.56±0.14	5.08±0.10	200	9.51±0.18	4.61±0.03	3,200	8.97±0.02	4.76±0.03	400
15	9.10±0.10	4.54±0.09	1,600	9.71±0.14	4.17±0.02	12,800	9.08±0.03	4.26±0.01	3,200
18	9.30±0.21	4.19±0.19	3,200	9.48±0.08	4.00±0.02	12,800	9.08±0.01	3.91±0.01	6,400
21	9.39±0.10	3.91±0.17	6,400	9.42±0.01	3.90±0.02	12,800	9.10±0.02	3.82±0.02	6,400
24	9.33±0.07	3.84±0.08	12,800	9.31±0.03	3.83±0.01	12,800	8.93±0.00	3.78±0.02	6,400

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข4 การเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวเมื่อป้อนที่อุณหภูมิต่างๆ

Time(hr)	30°C			37°C			42°C		
	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)
0	5.74±0.11	5.19±0.16	0	5.79±0.08	5.64±0.02	0	5.61±0.03	5.13±0.01	0
3	5.77±0.02	5.18±0.30	0	5.70±0.14	5.61±0.02	0	5.75±0.02	5.14±0.02	0
6	6.33±0.09	5.19±0.45	0	5.78±0.23	5.60±0.03	0	6.48±0.02	5.13±0.02	0
9	7.38±0.13	5.18±0.36	0	7.15±0.11	5.22±0.00	0	7.47±0.02	5.13±0.01	0
12	8.00±0.25	5.15±0.37	0	7.85±0.10	5.19±0.01	0	7.54±0.01	5.13±0.03	0
15	8.37±0.31	5.08±0.41	0	8.09±0.28	4.99±0.01	0	8.06±0.03	5.14±0.01	0
18	8.28±0.23	5.15±0.30	0	7.95±0.14	4.92±0.01	0	7.63±0.00	5.10±0.01	0
21	8.24±0.17	5.20±0.14	0	8.04±0.11	4.86±0.02	0	7.39±0.01	5.02±0.02	0
24	8.28±0.10	5.19±0.08	0	8.00±0.10	4.86±0.01	0	7.39±0.01	4.95±0.01	0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข5 การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ในอาหารเหลว MRS เมื่อป้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Time(hr)	30°C			37°C			42°C		
	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)
0	5.36±0.15	5.50±0.23	0	5.35±0.19	5.48±0.01	0	5.37±0.02	5.49±0.03	0
3	6.66±0.09	5.47±0.14	0	4.85±0.16	5.47±0.02	0	7.22±0.02	5.45±0.02	0
6	7.38±0.10	5.38±0.28	0	6.21±0.21	5.46±0.02	0	8.98±0.02	5.43±0.01	100
9	8.48±0.27	4.81±0.30	0	7.84±0.34	5.34±0.02	400	9.43±0.01	3.65±0.02	200
12	8.95±0.32	4.26±0.37	0	9.02±0.35	4.46±0.00	400	9.34±0.03	3.51±0.02	200
15	9.12±0.25	3.88±0.11	0	9.09±0.46	3.86±0.11	800	9.33±0.00	3.39±0.02	200
18	9.18±0.14	3.73±0.13	0	9.29±0.28	3.68±0.01	800	9.21±0.01	3.35±0.01	200
21	9.02±0.16	3.59±0.10	0	9.14±0.16	3.57±0.01	800	8.95±0.02	3.33±.00	200
24	9.16±0.11	3.52±0.21	0	9.21±0.17	3.43±0.02	800	6.99±0.04	3.38±0.01	200

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข6 การเจริญของเชื้อ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ในอาหารน้ำมะพร้าวเมื่อป้อนที่อุณหภูมิต่าง ๆ

Time(hr)	30°C			37°C			42°C		
	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)	Log CFU	pH	Bacteriocin (AU/ml)
0	5.10±0.11	5.09±0.09	0	5.43±0.14	5.41±0.01	0	5.38±0.02	5.12±0.01	0
3	6.62±0.10	5.06±0.07	0	4.34±0.23	5.41±0.01	0	6.97±0.02	5.08±0.02	0
6	6.33±0.18	4.98±0.05	0	4.94±0.10	5.41±0.01	0	5.86±0.02	5.08±0.03	0
9	6.45±0.32	4.92±0.18	0	4.89±0.10	5.41±0.02	0	5.83±.02	5.36±0.04	0
12	6.22±0.14	4.92±0.21	0	4.63±0.05	5.36±0.03	0	4.99±0.01	5.37±0.01	0
15	6.19±0.08	4.92±0.32	0	4.64±0.03	5.35±0.02	0	4.64±0.03	5.40±0.02	0
18	6.28±0.02	4.94±0.36	0	4.59±0.14	5.33±0.02	0	4.49±0.00	5.40±0.00	0
21	5.95±0.11	4.95±0.23	0	4.46±0.28	5.30±0.00	0	4.33±0.01	5.40±0.02	0
24	5.96±0.09	4.99±0.15	0	4.26±0.17	5.26±0.01	0	4.26±0.01	5.43±0.02	0

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข7 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Enterococcus faecium* KU-B5 ในอาหารชนิดต่าง ๆ

Time(hr)	viable cell count (LogCFU/ml)			pH		
	MRS	CW	CW+1%YE	MRS	CW	CW+1%YE
0	4.87±0.03	4.73±0.00	4.70±0.07	6.10±0.00	5.49±0.01	5.81±0.01
3	5.66±0.04	5.72±0.05	5.74±0.14	6.10±0.00	5.50±0.00	5.84±0.02
6	7.09±0.15	6.62±0.27	7.35±0.65	6.10±0.00	5.51±0.06	5.11±0.13
9	7.78±0.02	6.66±0.59	7.90±0.05	5.54±0.00	5.53±0.01	4.36±0.00
12	7.88±0.10	6.05±0.09	8.24±0.44	5.23±0.00	5.51±0.14	4.29±0.01
15	7.85±0.03	5.62±0.07	7.86±0.09	5.05±0.01	5.66±0.35	4.20±0.01
18	7.79±0.10	4.75±0.31	7.72±0.13	4.94±0.01	5.28±0.03	4.15±0.01
21	7.75±0.09	4.80±0.26	7.69±0.02	4.86±0.01	5.32±0.03	4.13±0.01
24	7.69±0.18	4.85±0.20	7.64±0.08	4.78±0.00	5.26±0.07	4.04±0.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ๗8 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารชนิดต่าง ๆ

Time(hr)	viable cell count (LogCFU/ml)			pH		
	MRS	CW	CW+1%YE	MRS	CW	CW+1%YE
0	4.61±0.14	4.47±0.16	4.55±0.58	6.08±0.02	5.49±0.01	5.69±0.04
3	5.012±0.16	5.29±0.12	5.27±0.39	6.06±0.02	5.49±0.01	5.69±0.04
6	6.19±0.12	6.42±0.27	6.11±0.17	6.05±0.01	5.48±0.03	5.67±0.04
9	7.47±0.38	6.88±0.25	7.37±0.13	5.35±0.02	5.47±0.02	4.90±0.25
12	8.08±0.39	7.29±0.14	7.85±0.35	4.96±0.02	5.45±0.00	4.30±0.09
15	8.12±0.06	7.23±0.01	8.06±0.05	4.830.02	5.36±0.03	4.15±0.04
18	8.19±0.12	6.99±0.02	7.83±0.10	4.76±0.01	5.32±0.00	3.78±0.01
21	7.93±0.02	6.95±0.14	7.77±0.00	4.69±0.01	5.20±0.01	3.71±0.01
24	7.91±0.03	6.65±0.11	7.69±0.12	4.64±0.01	5.02±0.00	3.65±0.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข9 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Lactobacillus salivarius* KU-N12 ในอาหาร
ชนิดต่าง ๆ

Time(hr)	viable cell count (LogCFU/ml)			pH		
	MRS	CW	CW+1%YE	MRS	CW	CW+1%YE
0	4.98±0.00	4.84±0.08	4.78±0.01	6.13±0.03	5.47±0.01	5.78±0.01
3	5.47±0.26	5.19±0.07	5.55±0.23	6.14±0.03	5.48±0.01	5.79±0.00
6	6.85±0.30	3.55±0.23	5.86±0.19	5.80±0.11	5.45±0.01	5.64±0.03
9	7.31±0.17	2.63±0.14	6.60±0.03	4.95±0.06	5.43±0.02	5.60±0.03
12	7.46±0.12	1.97±0.17	7.36±0.06	4.65±0.01	5.45±0.01	5.58±0.04
15	7.56±0.09	1.54±0.09	7.35±0.03	4.52±0.01	5.44±0.01	5.57±0.04
18	7.38±0.03	0±0.00	7.37±0.02	4.44±0.02	5.44±0.02	4.96±0.59
21	7.71±0.05	0±0.00	7.44±0.02	4.35±0.01	5.44±0.01	4.10±0.14
24	7.29±0.03	0±0.00	7.17±0.08	4.24±0.01	5.39±0.02	3.70±0.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข10 การเปรียบเทียบการเจริญของ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวสดแปรรูปที่มีการปรับปรุงโดยวิธีทาคุชิ

เวลา(ชั่วโมง)	ปริมาณ <i>Pediococcus pentosaceus</i> KU-F2 ในแต่ละชุดการทดลอง (Log CFU/ml)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	4.66±0.12	4.61±0.14	4.63±0.02	4.54±0.08	4.57±0.12	4.56±0.03	4.64±0.18	4.73±0.12	4.62±0.29
3	6.22±0.05	6.07±0.16	6.00±0.01	6.13±0.05	5.91±0.19	6.33±0.01	5.91±0.23	6.25±0.13	6.24±0.14
6	7.80±0.09	7.53±0.58	7.06±0.14	7.18±0.38	6.87±0.12	7.76±0.18	6.90±0.37	7.49±0.16	7.07±0.38
9	8.18±0.24	8.12±0.01	7.47±0.02	7.97±0.49	7.69±0.12	8.26±0.29	7.61±0.49	8.13±0.38	6.65±0.42
12	8.16±0.32	8.13±0.03	7.82±0.35	8.29±0.27	7.65±0.17	8.12±0.16	7.91±0.03	8.27±0.27	7.17±0.13
15	8.17±0.12	8.10±0.00	7.95±0.06	8.61±0.42	8.32±0.32	8.19±0.12	8.42±0.32	7.99±0.47	7.29±0.03
18	8.18±0.05	8.04±0.11	8.10±0.02	8.38±0.14	8.33±0.37	8.21±0.27	8.93±0.13	8.42±0.01	8.43±0.30
21	8.17±0.02	8.05±0.12	8.08±0.03	7.90±0.59	8.34±0.23	8.28±0.47	8.55±0.11	8.15±0.02	8.07±0.19
24	8.19±0.16	8.07±0.03	8.22±0.16	8.34±0.65	8.30±0.14	8.11±0.38	8.37±0.35	7.90±0.01	7.30±0.38

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข11 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2 ในอาหารน้ำมะพร้าวคั่วดัดแปลงที่มีการปรับปรุงโดยวิธีทางจุลินทรีย์

เวลา(ชั่วโมง)	ชุดการทดลอง								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	6.22±0.03	6.60±0.02	6.86±0.03	6.71±0.07	6.84±0.03	6.45±0.01	6.74±0.02	6.53±0.03	6.68±0.01
3	6.16±0.05	6.60±0.03	6.86±0.01	6.68±0.02	6.85±0.10	6.40±0.02	6.74±0.02	6.50±0.02	6.69±0.01
6	5.30±0.02	6.15±0.01	6.75±0.02	6.44±0.14	6.80±0.05	5.48±0.01	6.68±0.03	6.10±0.01	6.52±0.01
9	4.04±0.02	5.34±0.02	6.39±0.01	5.71±0.12	6.53±0.04	4.05±0.02	6.38±0.03	4.81±0.02	5.91±0.03
12	3.81±0.01	4.36±0.01	5.87±0.04	4.55±0.10	6.06±0.01	3.82±0.04	5.89±0.04	4.10±0.01	4.62±0.02
15	3.71±0.04	4.12±0.00	5.22±0.02	4.14±0.08	5.30±0.00	3.73±0.06	4.87±0.00	3.93±0.01	4.28±0.00
18	3.65±0.08	3.96±0.05	4.57±0.04	3.94±0.06	4.46±0.04	3.64±0.00	4.38±0.01	3.92±0.03	4.11±0.01
21	3.57±0.14	3.89±0.03	4.29±0.03	3.84±0.02	4.39±0.00	3.59±0.02	4.34±0.01	3.90±0.07	4.12±0.04
24	3.55±0.07	3.85±0.03	4.27±0.01	3.84±0.01	4.35±0.01	3.57±0.01	4.35±0.02	3.91±0.03	4.12±0.01

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข12 ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินโดยเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* KU-F2
ในอาหารน้ำมะพร้าวสดที่ผ่านการปรับปรุงโดยวิธีทางจุลินทรีย์

เวลา (ชั่วโมง)	กิจกรรมของสารแบคทีเรียโอซินของ 9 ชุดการทดลอง (AU/ml)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0
9	800	800	800	1600	1600	1600	1600	1600	1600
12	1600	1600	1600	3200	3200	3200	3200	3200	3200
15	3200	3200	3200	12800	12800	12800	12800	12800	12800
18	3200	3200	3200	12800	12800	12800	12800	12800	12800
21	3200	3200	3200	12800	12800	12800	12800	12800	12800
24	3200	3200	3200	12800	12800	12800	12800	12800	12800

ตารางผนวกที่ ข13 ผลของสารแบคทีเรียโอซินต่อการรอดชีวิตของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ที่ปนเปื้อนเทียมในกะหล่ำปลีสดในระดับต่างๆและอายุการเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส)

ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> DMST 17303				
	3 Log CFU/g		5 Log CFU/g	
	0 Day	7 Days	0 Day	7 Days
SDW (control)	2.67±0.09	3.62±0.37	4.23±0.11	4.40±0.16
SDW+512 AU/ml	0±0.00	1.65±0.38	2.60±0.16	3.14±0.64

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข14 ผลของสารแบคทีริโอซินที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 บนผักสดที่มีการปนเปื้อนเทียมในระดับสูง และผลต่ออายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (7-10 องศาเซลเซียส) และ อุณหภูมิห้อง (25-30 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน

ปริมาณเชื้อ <i>Listeria monocytogenes</i> ที่เหลือรอดบนผัก (Log CFU/g)					
	ระยะเวลา การเก็บ	SDW (control)	SDW+512 AU/ml	SDW+5120 AU/ml	SDW+12800 AU/ml
อุณหภูมิห้อง	0 Day	4.46±0.06	2.38±0.46	0.69±0.71	0.69±0.71
	3 Days	7.30±0.34	5.76±0.14	5.62±0.30	5.61±0.44
อุณหภูมิตู้เย็น	3 Days	5.37±0.04	2.06±0.08	2.23±0.19	1.52±0.12

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ตารางผนวกที่ ข15 ปริมาณเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 (Log CFU/g) ที่พบบนผักสดที่ปนเปื้อนเทียมในระดับสูง เมื่อล้างด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (SDW) น้ำประปา (TW) น้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมไฮโปคลอไรท์ 100ppm (SDW+Hp) และน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่เติมแบคทีริโอซิน 5,120 AU/ml (SDW+B)

ชั่วโมงที่	อุณหภูมิ(°C)	SDW	TW	SDW+Hp	SDW+B
0		4.061±0.25	3.79±0.02	1.00±0.00	1.17±0.21
	4-7	4.01±0.18	4.06±0.19	2.72±0.44	1.51±0.14
24 hr	20	4.84±0.11	5.08±0.05	3.61±0.25	2.52±0.17
	25-30	5.62±0.35	6.18±0.09	4.12±0.25	2.54±0.08

หมายเหตุ ค่าเฉลี่ยจากการทดลอง 2 ซ้ำ ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (mean±standard deviation)

ประวัติการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	สุพรรณิการ์ เนตรวีระ
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 25 มกราคม พ.ศ. 2529
สถานที่เกิด	จังหวัดน่าน
ประวัติการศึกษา	-มัธยมศึกษาตอนต้นและตอนปลาย โรงเรียนเชียงกลาง “ประชาพัฒนา” จ. น่าน พ.ศ. 2546 - วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา) มหาวิทยาลัยราชภัฏสวนสุนันทา พ.ศ. 2551
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ผลงานทางวิชาการ	TSB International Forum 2013: Coconut Water: a low cost medium for bacteriocin production by Lactic Acid Bacteria
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-