

บทที่ 1

บทนำ

กล้าเชื้อ (starter culture) เป็นจุลินทรีย์ที่เติมในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก กล้าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารหมักที่ดีควรมีคุณสมบัติหลายประการเช่น ความเป็นโปรไบโอติก มีกิจกรรมสลายโปรตีนและไขมัน การไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์กรดอะมิโนดีคาร์บอกซิเลส มีกิจกรรมของเอนไซม์อะเลส ไนเตรทรีดักเตส และไนโตรทรีดักเตส โดยเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อมีกลไกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยการผลิตกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไลโซไซม์ โคอะซิติก และแบคทีริโอซิน (Holzapfel, 1994)

แบคทีริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนหรือเปปไทด์ที่สร้างจากแบคทีเรีย แบคทีริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการใช้ในการถนอมอาหารหลายประการเช่นเป็นสารที่มีความปลอดภัย (generally recognized as safe substances) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ของสัตว์และพืชชั้นสูง (eukaryotic cells) ถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์โปรติเอสในทางเดินอาหาร (digestive proteases) มีผลเล็กน้อยต่อจุลินทรีย์ประจำถิ่นในทางเดินอาหาร มักจะทนต่อพีเอชและความร้อน มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นซึ่งเจริญแข่งขันได้กว้างเช่น ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* และ *Bacillus cereus* รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสีย สารแบคทีริโอซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยการทำให้เกิดรูที่เชื่อมหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคทีริโอซิน เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งจะช่วยป้องกันสารแบคทีริโอซินและสารประกอบชนิดอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 600 ดาลตัน (Da) ไม่ให้เข้าถึงเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Ammor และ Mayo, 2007; Gálvez และคณะ, 2007) ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะผลิตแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียเหล่านี้เพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพทดแทนการใช้สารเคมีในการถนอมอาหารเพื่อการผลิตอาหารที่ปลอดภัย

แบคทีริโอซินบางชนิดมีศักยภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Clostridium botulinum*, *Bacillus* spp., *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus*. (Carolissen-Maclay และคณะ, 1996) มีการทดลองของนักวิจัยหลายท่านที่ทดลองเติมแบคทีริโอซินลงไปในอาหารเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น Vignolo และคณะ (1996) ที่เติม Lactocin 705 ซึ่งเป็นแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus casei* CRL 705 เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในเนื้อวัวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30

องศาเซลเซียส โดยเติมสารแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรม 2 ระดับคือ 8,400 และ 16,800 AU ต่อ มิลลิลิตร พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ทั้งสองระดับสามารถลดการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้อย่างน้อย 1 log cycle หรือการใช้กล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกร่วมกับแบคทีเรียโอซินเช่นการทดลองของ Kingcha และคณะ (2012) ที่เติมแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* BCC 772 ร่วมกับกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในแฮมเพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์แฮมพบว่าจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในแฮมลดลงจาก 5.9-6.1 log CFUต่อกรัม เหลือ 2.5 log CFUต่อกรัมเมื่อหมักไปแล้ว 96 ชั่วโมง

ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียโอซินมาใช้ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในเนื้อสัตว์ หรือการเติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียร่วมกับการเติมแบคทีเรียโอซินเพื่อใช้ในการลดจำนวนหรือยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในแฮม พร้อมทั้งเปรียบเทียบคุณภาพทางจุลินทรีย์ เคมี และกายภาพกับแฮมที่ไม่เติมกล้ำและไม่เติมแบคทีเรียโอซิน

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกและความคงตัวของแบคทีเรียโอซินต่อพีเอช อุณหภูมิและเอนไซม์
2. เพื่อเปรียบเทียบวิธีการทำแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกให้บริสุทธิ์
3. เพื่อศึกษาการผลิตแบคทีเรียโอซินและการประยุกต์ใช้ในอาหาร

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม

แบคทีเรียเป็นแหล่งของ antimicrobial peptides แบคทีเรียโอซินเป็นแหล่งของเปปไทด์ที่ต่อต้านจุลินทรีย์ซึ่งใช้ประโยชน์สำหรับการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร แบคทีเรียโอซินประกอบด้วยกลุ่มของสารต่างชนิดกัน (heterogenous group) ถึงแม้ว่าจะประกอบด้วยสารที่มีความแตกต่างกันทางเคมีแต่คุณสมบัติหนึ่งที่เป็นจุดเด่นของแบคทีเรียโอซินก็คือมีโปรตีนเป็นส่วนสำคัญ การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ที่จำเพาะ (โปรติเอสและไลเปส เป็นต้น) ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของโมเลกุลสารแบคทีเรียโอซิน จากหลักการนี้มีผู้รายงานว่า streptocin STH อาจเป็น โมเลกุลที่ประกอบด้วยหมู่ของโปรตีน ไขมันและฟอสเฟตที่สำคัญ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารแบคทีเรียโอซินบ่งชี้ได้ว่าสารแบคทีเรียโอซินบางชนิดประกอบด้วยโปรตีนอย่างง่าย อย่างไรก็ตามจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียโอซินของ *Staphylococcal*, *Clostridial* และ *Lactobacillus* เป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างซับซ้อนซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของไขมันและคาร์โบไฮเดรตนอกเหนือจากโปรตีนที่มีอยู่ในโมเลกุลสำหรับองค์ประกอบของ staphylococin 414 คล้ายกับองค์ประกอบโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Staphylococcus* จากการวิเคราะห์สาร colicins พบว่ามีส่วนประกอบของแอกทิฟโปรตีนที่ซับซ้อนซึ่งมีไลโปพอลิแซคคาไรด์แอนติเจน (lipopolysaccharide antigen) อยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างสาร colicins นั้น โมเลกุลของสาร butyricin 7423 และ perfringocin 11105 ประกอบด้วยส่วนที่เป็นแอมพิฟิลิกโปรตีน (amphiphilic protein) และคาดการณ์ว่ามีส่วนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ด้วยซึ่งอาจช่วยในการกระทำกับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อสารแบคทีเรียโอซินเกิดได้ง่ายขึ้น (Tagg และคณะ. 1976)

สารที่จัดเป็นแบคทีเรียโอซินประกอบด้วย โปรตีนขนาดต่างๆ กัน อยู่ในช่วงตั้งแต่ขนาดโมเลกุลเล็กอย่างง่ายและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น streptococin A-FF22 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8,000 ดาลตัน จนกระทั่งถึงขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ซับซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลมากถึง 10^6 แบคทีเรียโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำโดยทั่วไปแล้วจะมีความไวต่อเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) สูงแต่มีความไวต่อความร้อนต่ำ นักวิจัยได้เคยตรวจสอบแบคทีเรียโอซินในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและพยายามที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของสารแบคทีเรียโอซินกับโครงสร้างที่เห็นภายใต้กล้อง ซึ่งคุณลักษณะของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

แกรมบวทที่พบได้บ่อยคือมีโครงสร้างทางกายภาพ 2 แบบหรือมากกว่านั้น ซึ่งโมเลกุลของสารแบคทีเรียโอซินที่แตกต่างกันในแบคทีเรียโอซินเหล่านี้ ดูเหมือนว่าจะมีความสมดุลในแง่ของสัดส่วนของโมเลกุลที่มีขนาดเล็กและโมเลกุลขนาดใหญ่ที่รวมกันอยู่โดยค่าพีเอชและความแรงของไอออน (ionic strength) จะมีอิทธิพลต่อแบคทีเรียโอซินเหล่านี้ (Tagg และคณะ, 1976)

ความคงตัวของสารแบคทีเรียโอซินจะลดลงอย่างมาก เมื่อสารแบคทีเรียโอซินถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นและพบว่าการเติม bovine serum albumin จะช่วยป้องกันสารแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากการถูกยับยั้งการทำงาน (inactivation) ตัวอย่างสารแบคทีเรียโอซิน เช่น staphylococcin 1580 และสารปฏิชีวนะที่เกิดจาก *Staphylococcus aureus* จะมีความไวสูงต่อการเสียดสภาพทางกล (mechanical denaturation) (Tagg และคณะ, 1976)

ความคงตัวของสารแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมาก โดยความไวของสารแบคทีเรียโอซินต่อการถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชสารแบคทีเรียโอซิน และ bacteriocin-like substrate ส่วนใหญ่สามารถทนกรดได้สูงกว่าด่าง ซึ่งหลักเกณฑ์ของความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารแบคทีเรียโอซินสามารถอธิบายได้ยากเนื่องจากขึ้นอยู่กับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และปัจจัยอื่นๆ เช่น พีเอช ความแรงของไอออนและการมีโมเลกุลที่ช่วยปกป้องแบคทีเรียโอซินจากการเสียดสภาพอยู่ด้วย (protective molecules) (Tagg และคณะ, 1976)

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียโอซิน (Classification of bacteriocins)

โดยทั่วไปแบคทีเรียโอซินสามารถแบ่งได้เป็น 3-4 กลุ่ม ไนซิน (nisin) ค้นพบในปี ค.ศ. 1928 และซับทีลิน (subtilin) พบในปี ค.ศ. 1948 เป็นสารที่คล้ายไนซินต่างกันโดย 12 กรดอะมิโน ทั้งคู่จัดอยู่ใน Class I เรียกว่าเป็นแลนติไบโอติก (lantibiotics) การจำแนกแบคทีเรียโอซินในปัจจุบันมีการปรับปรุง แสดงให้เห็นความเหมือนและความต่างซึ่งสังเกตได้ในโมเลกุลที่ค้นพบใหม่ Class I แบ่งย่อย เป็น Class Ia และ Class Ib โดยทั่วไปเปปไทด์ของ Class I มีกรดอะมิโน 19 ชนิดถึงมากกว่า 50 ชนิด แบคทีเรียโอซิน Class I ถูกจัดจำแนกโดยอาศัยกรดอะมิโนที่ต่างออกไป (unusual amino acid) ตัวอย่างเช่น lanthionine, methyl-lanthionine, dehydrobutyrin Class Ia จะรวมถึงไนซินด้วย ประกอบด้วย cationic และ hydrophobic peptides ซึ่งทำให้เกิดลักษณะเป็นรูใน target membrane และมีโครงสร้างที่ยืดหยุ่นได้เมื่อเปรียบเทียบกับโครงร่างแข็งของ Class Ib bacteriocins ซึ่งเป็นเปปไทด์รูปกลม (globular peptides) (Cleveland และคณะ, 2001)

Class II ประกอบด้วยเปปไทด์สายสั้น ๆ ที่คงตัวต่อความร้อนและสามารถแบ่งย่อยได้เป็น Class IIa รวมถึงเปปไทด์ที่คล้าย pediocin ที่แอกทิฟกับเชื้อ *Listeria* ที่มีลำดับของกรดอะมิโนด้าน N-terminal ต่อกับ Tyr-Gly-Asn-Gly-Val และต่อกับ 2 cyteinnnes ทำให้เกิด s-s brige ใน N-terminal ครึ่งหนึ่งของสายเปปไทด์แบคทีเรียโอซิน ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สายที่ต่างกัน ประกอบกันจัดเป็น Class IIb สายเปปไทด์ 2 สายของแบคทีเรียโอซินจำเป็นทั้งคู่ในการเกิดกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน ลำดับของกรดอะมิโนสายแรกของเปปไทด์นั้นแตกต่างกัน แม้ว่าแต่ละอันจะถูกกำกับไว้โดยยีนของตัวเองที่อยู่ใกล้เคียงกันแต่มีเพียงยีนเดียวซึ่งจำเป็นที่เป็นยีนภูมิคุ้มกัน แบคทีเรียโอซิน Class IIc เริ่มแรกถูกเสนอขึ้นว่าถูกปล่อยโดย general sec-system และแบคทีเรียโอซิน Class III เป็นแบคทีเรียโอซินที่ไม่ทนความร้อน สำหรับแบคทีเรียโอซิน Class III นี้ยังมีข้อมูลไม่มากนัก สำหรับแบคทีเรียโอซิน Class ที่ 4 ได้ถูกเสนอว่าอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับสารโมเลกุลใหญ่อื่น ๆ (Cleveland และคณะ, 2001)

ประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซินในอาหาร

ถึงแม้ว่าจากผลการทดลองในอาหารเหลวได้แสดงให้เห็นว่า แบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เป้าหมายแต่ก็จะต้องทำการศึกษาในเชิงประยุกต์เพื่อยืนยันประสิทธิภาพในอาหาร การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียโอซิน โดยเฉพาะในชีนในอาหาร ได้มีการรายงานไว้แล้วว่าองค์ประกอบทางเคมีอาหารและกระบวนการทางกายภาพมีอิทธิพลต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน ตัวอย่างเช่น ในชีนสามารถละลายได้ดีที่พีเอช 2 มากกว่าพีเอช 8 ถึง 228 เท่า (Cleveland และคณะ, 2001)

การนำแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ไปใช้ในอาหาร

-ระบบการถนอมอาหารชีวภาพ (Biopreservation Systems)

ได้มีการรายงานถึงการประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอซินเกี่ยวกับความสามารถในการเป็นตัวยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารและจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย แม้ว่าประสิทธิภาพของการยับยั้ง จุลินทรีย์จะถูกพิสูจน์แล้วใน synthetic media แต่ก็ยังไม่เป็นที่แน่นอนว่าแบคทีเรียโอซินจะให้ผลแบบเดียวกันในอาหาร ในชีน (nisin) เป็นแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่รู้จักกันดีที่สุดและเป็นที่ยอมรับในการนำมาใช้ในอาหาร ในสหรัฐอเมริกาได้มีการนำในชีนมาใช้ใน cheese spreads ที่ผ่านการพาสเจอร์ไรส์เพื่อยับยั้งการเจริญของสปอร์ *Clostridium*

botulinum และใช้ในซันกันทั่วโลกในผลิตภัณฑ์ที่หลากหลายรวมถึงนมพาสเจอร์ไรซ์นมปรุงแต่ง และนมที่มีอายุการเก็บยาวนาน รวมทั้งเนยแข็งที่ผ่านการบ่มและเนยแข็งที่ผ่านการแปรรูป ผักกระป๋องและซูปกระป๋อง เมื่อเร็ว ๆ นี้มีการนำในซันไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่เป็นที่ต้องการในไวน์และเบียร์ แต่การนำในซันไปใช้ประโยชน์ในอาหารบางครั้งก็ถูกจำกัด เพราะว่าในซันมีความสามารถในการละลายต่ำ ราคาแพง และมีความผันแปรในแง่ของความไวต่อแบคทีเรียเป้าหมายและปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น พีเอช โซเดียมคลอไรด์ อุณหภูมิ มีผลต่อกิจกรรมการทำงานของในซัน (Muriana และ Luchansky, 1993) ตัวอย่างการใช้แบคทีเรียโอซินในการถนอมอาหารแสดงดังตารางที่ 1 ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงพยายามมุ่งไปสู่การผลิตแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ชนิดใหม่และจัดจำแนกแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับการประยุกต์ใช้ในอาหาร

การเติมแบคทีเรียโอซินลงในอาหาร

การเติมแบคทีเรียโอซินลงในอาหารสามารถทำได้โดยเติมในรูปของแบคทีเรียโอซินที่เตรียมได้หรือโดยการเติมเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคทีเรียโอซิน ในกรณีแรกจะต้องมีการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินในถังหมักในระดับอุตสาหกรรมแล้วเก็บเกี่ยวแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้ ทำให้แบคทีเรียโอซินเข้มข้นที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ ปัจจุบันมีแบคทีเรียโอซินเพียงชนิดเดียวที่จดลิขสิทธิ์เป็นสารถนอมอาหาร โดยอาจเติมแบคทีเรียโอซินลงในอาหารในรูปของ

1) raw concentrates ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินในสับสเตรทที่เป็นอาหาร (food-grade substrate) เช่น นมหรือ เวย์ ซึ่งจะทำได้ food additives หรือ food ingredients ที่ใช้ได้อย่างปลอดภัยตามและถูกกฎหมาย องค์ประกอบของสารที่ผลิตได้อาจทำหน้าที่อื่นด้วยเช่น ช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนหรือทำให้อาหารข้น และอาจมีสารเมแทบอลิซึมอื่นจากจุลินทรีย์เช่น กรดแลคติกซึ่งทำหน้าที่ช่วยเสริมการยับยั้ง concentrates ที่มีจำหน่ายแล้วเช่น ALTA™ 2341 หรือ Microgard™ ซึ่งเป็น grade A skim milk ที่ผ่านการหมักโดย *Propionibacterium freudenreichii* subsp. *shermanii* แล้วผ่านการพาสเจอร์ไรส์ ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้ได้ผ่านการยอมรับโดย FDA ให้ใช้ได้ ในอาหาร เช่นใน cottage cheese และ fruit-flavoured yogurt (Salih และคณะ, 1990)

2) immobilized preparations แบคทีเรียโอสินที่ถูกทำให้บริสุทธิ์บางส่วนหรือ concentrated cultured broth จะถูกจับไว้โดยตัวพา (carrier) ตัวพานี้จะทำหน้าที่เป็นแหล่งหรือตัวกระจายโมเลกุลของแบคทีเรียโอสินที่ถูกทำให้เข้มข้นในอาหารเพื่อการกระจายตัวอย่างทั่วถึง ตัวพานี้อาจช่วยป้องกันการแบคทีเรียโอสินจากการถูกทำให้เสียสภาพโดยองค์ประกอบในอาหารและเอนไซม์ จากการศึกษาวิจัยเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียโอสินในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวกับในอาหารหมักพบว่า แบคทีเรียโอสินในอาหารมีประสิทธิภาพต่ำกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมาก บางครั้งจะต้องเติมแบคทีเรียโอสินในระดับความเข้มข้นสูงกว่าอย่างน้อย 10 เท่าเพื่อให้ได้ผลการยับยั้งเท่ากัน

ถึงแม้ว่าจะมีการนำแบคทีเรียโอสินมาใช้ในอาหารหลายชนิดแต่ก็ไม่ควรถนอมอาหารไว้ด้วยแบคทีเรียโอสินอย่างเดียวนั้น ควรใช้แบคทีเรียโอสินควบคู่ไปกับการควบคุมสภาวะต่างๆ แม้ว่าแบคทีเรียโอสินส่วนใหญ่แยกได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับอาหาร แต่ก็อาจไม่มีประสิทธิภาพในอาหารทุกชนิดอย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอสินหลายชนิดมีศักยภาพโดยสามารถนำมาใช้ได้ในการอาหาร เมื่อมีการควบคุมภายใต้สภาวะต่าง ๆ อย่างเหมาะสมตัวอย่างสำคัญที่สนใจคือการใช้ในชีนในผลิตภัณฑ์เนื้อปอกติใช้ในเตรตในการป้องกันการเจริญของ *Clostridium* ในเนื้อสัตว์ แต่มีข้อจำกัดด้านความปลอดภัยในแง่ของการมีไนโตรดจึงทำให้อุตสาหกรรมอาหารพยายามที่จะหาวิธีอื่นมาทดแทน เช่น การนำไนชินมาใช้ หรือใช้ไนชินร่วมกับไนเตรดที่ระดับความเข้มข้นต่ำลง สามารถป้องกันการเจริญของ *Clostridium* ได้ (Cleveland และคณะ, 2001)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 วัสดุดิบ

เนื้อหมูสด หนั้หมู เกลือ กระเทียม

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ได้แก่ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์ การแพทย์ *Lactobacillus plantarum* LS0602 แยกได้จากแหนม และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกอีสาน (Charoenrak และ Nanasombat, 2011)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลองได้แก่ de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS, พีเอช 7.2 ± 0.2 , Difco) Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE soft Agar, 7.1 ± 0.2), Tryptic Soy Broth/Agar (TSB/TSA พีเอช 7.1 ± 0.2 , Difco), Nutrient Agar (NA), PALCAM *Listeria* Selective Agar (PALCAM พีเอช 7.2 ± 0.2 , Difco) ที่เติม selective agents

3.1.4 สารเคมีและชุดทดสอบ

สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่างได้แก่ สารละลายเปปโทนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองได้แก่ แอมโมเนียมซัลเฟต กรดไตรคลอโรแอซิดิก

เอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เอนไซม์คะตะเลส (catalase, จาก bovine liver, Fluka) เอนไซม์ α -chymotrypsin (จาก bovine pancreas, Merck) เอนไซม์ trypsin (จาก porcine pancreas, Fluka) เอนไซม์ pepsin (จาก porcine gastric mucosa, Fluka) เอนไซม์ α -amylase (จาก *Aspergillus oryzae*, Fluka) เอนไซม์ papain (จาก carica papaya, Merck)

ชุดทดสอบที่ใช้ได้แก่ชุด Quick start Bradford (Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา) เพื่อการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารแบคทีเรียโอินตามวิธีการของ Bradford

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เครื่องตีปั่นอาหาร (stomacher masticator, บริษัท IUL instrument ประเทศอังกฤษ) เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (AquaLAB, รุ่น Series 3 TE ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องวัดพีเอช (pH meter, รุ่น 510 บริษัท Cyberscan ประเทศสิงคโปร์) เครื่องวัดพีเอชสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (รุ่น Testo 205 ประเทศเยอรมนี) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (UV 1601 บริษัท Shimadzu ประเทศออสเตรเลีย) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (รุ่น SS-325 บริษัท Tommy ประเทศญี่ปุ่น) เครื่องหมุนเหวี่ยง (รุ่น Z383K บริษัท Harmle ประเทศเยอรมนี) ตู้ถ่ายเชื้อ (รุ่น ABS 1200 บริษัท Astec Microflow ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องนับจำนวนโคโลนี (บริษัท Reichert ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate reader/Washer, รุ่น iEM Reader MF บริษัท LabSystems ประเทศสหรัฐอเมริกา) ถังไดอะไลซิสเบอร์ 6 ซึ่งมี MWCO ขนาด 1000 ดาลตัน (Spectrapor, บริษัท Spectrum ประเทศสหรัฐอเมริกา) เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ ปีกเกอร์ หลอดทดลอง กระจกดวงและอุปกรณ์ที่จำเป็นเช่น ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อใช้สำหรับตีปั่น ลูบ เชื้อ เชื้อ งานเพาะเชื้อ ปิเปต ลูกยาง

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดลองนี้ได้ใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกัปปินเชื้ออาหารหมักซึ่งสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ จำนวน 2 ชนิด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* LS0602 ซึ่งแยกได้จากแฮม และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกอีสาน (Charoenrak และ Nanasombat, 2011) นำมาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินตลอดจนศึกษาการทำให้บริสุทธิ์ของแบคทีเรียโอซิน และความคงทนของสารแบคทีเรียโอซินต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ รวมทั้งทดลองนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคนิโคที่แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดสามารถยับยั้งได้ตามการทดลองในขั้นตอนต่อไปนี้ดังนี้

3.2.1.1 การเตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

วิธีการทดสอบนี้ดัดแปลงจากวิธีของ Cuozzo และคณะ (2001) ; Schillinger และ Lücke. (1989) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิกรัมตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสที่ได้ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จนส่วนใสมีพีเอชเท่ากับ 6.5 และนำไปกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.2 ไมครอนเมตร แล้วเติม

เอนไซม์อะไมเลส (จากbovine liver บริษัท Sigma-Aldrich) ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.2 การศึกษาการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยการใช้สารแบคทีเรียโอซิน การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion (Cuozzo และคณะ. 2001; Schillinger และ Lücke. 1989) โดยใช้แบคทีเรียสำหรับทดสอบ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว TSB นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ 2 ครั้ง เพื่อเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบและปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard ที่มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นเปิดสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียดังกล่าวปริมาณ 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหาร TSYE Soft Agar ซึ่งมี agar ร้อยละ 0.7 ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex แล้วเทเชื้อแต่ละชนิดลงในอาหารแข็ง TSYE ซึ่งมี agar ร้อยละ 1.2 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรลง ทิ้งไว้ให้ผิวหน้าแห้ง แล้วจะให้ได้หลุมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร นำส่วนใสที่เตรียมไว้มาจากข้อ 3.2.1.1 มาทำการเจือจาง โดยทำการเจือจางแบบ 2 เท่า (two-fold serial dilutions) จนได้หลาย ๆ ระดับความเจือจาง ก่อนหยดตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจางลงหลุมของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตรหลุมละ 40 ไมโครลิตร และนำไปบ่มต่ออีกครั้งที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งการเจริญ โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดรอบ ๆ หลุม

3.2.1.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

ก) การหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

ทำการศึกษาเพื่อหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมส่งผลให้มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุดซึ่งทำตามวิธีการของ Altuntas และคณะ (2010) โดยเปิดเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 30, 35, 37, 39 และ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์อะไมเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.1.1) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion ตามวิธีการข้อ 3.2.1.2 โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

ข) การหาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

ทำการศึกษาเพื่อหาระดับพีเอชที่เหมาะสมส่งผลให้มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุดซึ่งทำตามวิธีการของ Altuntas และคณะ (2010) โดยปีเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มีพีเอช 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับจากจากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์อะตาดเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.1.1) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion เช่นเดียวกับวิธีการข้อ 3.2.1.2 โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

ค) การศึกษาผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

ทำการเปรียบเทียบผลของส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมซึ่งให้กิจกรรมของสารแบคทีเรียโอซินสูงสุดตามวิธีการ Todorov และคณะ (2011) ทำได้ดังนี้ โดยปีเปตเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 60 มิลลิลิตรที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบของอาหารต่าง ๆ กัน จำนวน 31 สูตร ได้แก่ สูตรที่1) อาหารเหลว MRS สูตรปกติตามสูตรของ Difco ซึ่งประกอบด้วย Proteose peptone no 3 ปริมาตร 10 กรัม beef extract 10 กรัม yeast extract 5 กรัม glucose 20 กรัม sodium acetate 5 กรัม Tween 80 ปริมาตร 1 กรัม Dipotassium hydrogen phosphate 2 กรัม Ammonium citrate 2 กรัม Magnesium sulfate 0.1 กรัม Manganese sulfate 0.05 กรัม (ชุดควบคุม) สูตรที่2-6) อาหาร MRS ปกติที่เติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส มอลโตส และซูโครส จำนวน 20 กรัมแทนน้ำตาลกลูโคสตามลำดับ สูตรที่7-9) อาหาร MRS ปกติที่เติมกลูโคสเพิ่มเป็น 30, 40 และ 50 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่10-11) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทรีปโติน 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 ตามลำดับ สูตรที่12-13) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมยีสต์สกัดเพิ่มเป็น 10 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่14) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทรีปโติน 12.5 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 7.5 กรัมต่อลิตร สูตรที่15) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทรีปโติน 20 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 10 กรัมต่อลิตร สูตรที่16) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมทรีปโติน 10 กรัมต่อลิตรแทน proteose peptone no 3 และเพิ่มยีสต์สกัดเป็น 20 กรัมต่อลิตร สูตรที่17-19) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมไคโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตเพิ่มเป็น 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่20-23) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 2, 5, 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทนไคโปแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต สูตรที่24) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมวิตามินบี 1 ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตรแทนสูตรปกติที่ไม่เติมวิตามินบี 1

สูตรที่25) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมวิตามินบี 12 ความเข้มข้น 0.001 กรัมต่อลิตรแทนสูตรปกติที่ไม่เติมวิตามินบี 12 สูตรที่26-28) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟตเพิ่มเป็น 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ สูตรที่29-31) อาหาร MRS สูตรปกติที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต 2, 5 และ 10 กรัมต่อลิตรตามลำดับ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาทดสอบให้เตรียมส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ที่ได้ปรับพีเอชและเติมเอนไซม์อะไมเลสแล้ว (ตามข้อ 3.2.1.1) และนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้วิธี agar well diffusion ตามข้อ 3.2.1.2 โดยสังเกตและวัดขนาดของโซนใสที่เกิดและคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินตามสูตรการคำนวณในภาคผนวก ค

3.2.1.4 การศึกษาการทำแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

จากการทดสอบสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคทีเรียโอซินของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ การหาระดับอุณหภูมิ ระดับพีเอช และส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อสูงสุดและนำสภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวมาใช้ในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารแบคทีเรียโอซิน ซึ่งทำการทดลองโดยทำการเพาะเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดในอาหารเหลว MRS ที่มีส่วนประกอบที่เหมาะสม ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและทำการทดลองในขั้นต่อไปจนกระทั่งได้ส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ตามวิธีการในข้อ 3.2.1.1 จากนั้นทำให้สารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป ได้แก่ การนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำส่วนใสที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตมาทำไดอะไลซิส ตลอดจนนำส่วนใสที่ผ่านการไดอะไลซิสมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติกและทำการตรวจหากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคโดยใช้สารที่ทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนได้แก่ 1) ส่วนใสก่อนการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต 2) สารตัวอย่างที่ได้จากการตกตะกอนส่วนใสหลังนำมาทำไดอะไลซิส 3) สารตัวอย่างที่ได้จากการตกตะกอนส่วนใสผ่านการทำไดอะไลซิสแล้วตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรอะซิติก เพื่อหาวิธีการทำให้สารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ที่จะให้กิจกรรมในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด ตามวิธีการต่อไปนี้

ก) การตกตะกอนโปรตีนโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟต

การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตทำตามวิธีที่ได้ดัดแปลงมาจาก Ogunbanwo และคณะ. (2003) และ Doonan.(2004) โดยทำการแบ่งส่วนใสที่ปราศจากเซลล์(bacteriocin-containing supernatant) ซึ่งผ่านการปรับพีเอชและเติมอะไมเลสแล้วออกเป็น 3 ส่วนดังนี้ ส่วนใสส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปทดสอบตามการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.5.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ตามวิธีการในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 นำไปตกตะกอนด้วยแอมโมเนียม

ซัลเฟตร้อยละ 60 (ใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 36.1 กรัม) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยค่อย ๆ ละลาย แอมโมเนียมซัลเฟตทีละน้อยและคนช้า ๆ เพื่อป้องกันการเกิดฟอง (ทิ้งไว้นานหลายนาทีเพื่อให้แน่ใจว่าแอมโมเนียมซัลเฟตที่เติมลงไปนั้นละลายแล้วก่อนเติมเข้าไปอีก) จากนั้นให้ทิ้งไว้นาน 10 นาทีเพื่อให้แน่ใจว่าเกิดตะกอนของโปรตีนอย่างสมบูรณ์ และปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำตะกอนโปรตีนให้อยู่ในรูปของสารแขวนลอยโดยนำไปละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ที่พีเอช 7 ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วแบ่งสารละลายโปรตีนเป็น 3 ส่วน ดังนี้ สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตร ให้ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.1.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 นำไปทำโคอะไลซิสในขั้นตอนต่อไป

ข) การทำโคอะไลซิส (Dialysis)

เมื่อทำการตกตะกอนโปรตีนของส่วนใสโดยใช้แอมโมเนียมซัลเฟตตามวิธีการข้างต้นแล้ว นำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นด้วยการใช้วิธีการทำโคอะไลซิส (Doonan, 2004) โดยใช้ถุงโคอะไลซิสเบอร์ 6 ซึ่งมี MWCO ขนาด 1000 ดาลตัน (Spectrapor, บริษัท Spectrum ประเทศสหรัฐอเมริกา) ตัดถุงโคอะไลซิสตามความยาวที่ต้องการ (สารละลายโปรตีน 4.6 มิลลิลิตรต่อถุงโคอะไลซิส ความยาว 1 เซนติเมตร) โดยให้มีความยาวเพิ่มขึ้นอีกเพื่อให้มีช่องว่าง (head space) เนื้อสารละลายโปรตีนเล็กน้อย (เพิ่มพื้นที่ว่างอีกประมาณร้อยละ 10 ของปริมาตรตัวอย่างทั้งหมด) จากนั้นแช่เมมเบรนลงในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เพื่อล้างสารกันเสียเช่น กลีเซอรินหรือโซเดียมแอไซด์ (sodium azide) จากนั้นล้างเมมเบรนอีกครั้งด้วยน้ำกลั่น เปิดที่หนีบถุงโคอะไลซิสซึ่งเป็นตัวล็อกออกแล้วสอดถุงโคอะไลซิสเข้าไปในตัวหนีบที่เปิดไว้ และกดตัวหนีบเข้าด้วยกันยึดถุงโคอะไลซิสไว้โดยให้ปลายถุงยื่นออกมาจากตัวหนีบ 3-5 เซนติเมตร ทดสอบด้วยการเติมน้ำกลั่นลงไปในถุง เพื่อให้มั่นใจว่าตัวหนีบปิดสนิทดีแล้วก่อนเติมสารละลายโปรตีนที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตแล้ว ปรับความยาวของถุงเพื่อให้มีที่ว่างเนื้อสารละลายโปรตีนตามต้องการ แล้วใช้ตัวหนีบปิดด้านปลายของถุงโคอะไลซิส นำไปวางลงในบีกเกอร์หรือภาชนะที่มีฝาปิดที่มีฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 100 เท่าของปริมาตรสารละลายโปรตีน (หากตัวอย่างปริมาตร 10 มิลลิลิตรต้องใช้บัฟเฟอร์ปริมาตร 1 ลิตร) นำแท่งแม่เหล็กที่สะอาดใส่ลงในบีกเกอร์หรือภาชนะสำหรับทำโคอะไลซิสที่ตั้งบนเครื่องกวน (stirrer) ควรแน่ใจว่าแท่งแม่เหล็กใหญ่พอที่จะกวนสารละลายทั้งหมดได้แต่ไม่ควรจะใหญ่เกินไปจนหมุนอย่างอิสระไม่ได้ ก่อนปรับความเร็วของเครื่องกวนให้สูงพอที่จะไม่ทำให้เกิดการดึงถุงลงไปด้านล่าง โดยทำโคอะไลซิสที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในชั่วโมงที่ 12 ให้เปลี่ยนสารละลายที่ใช้ทำโคอะไลซิส (บัฟเฟอร์) เป็นสารละลายใหม่ (fresh dialysis solution) ได้ (ในกรณีที่มีการปนเปื้อนมาก อาจทำโคอะไลซิสเป็นเวลานานและเปลี่ยนบัฟเฟอร์บ่อย ๆ ซึ่งควรให้มีการเกิดโคอะไลซิสอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 2-4 ชั่วโมง

หลังจากที่เปลี่ยนบัฟเฟอร์ครั้งสุดท้าย) สารละลายโปรตีนที่มีความบริสุทธิ์หรือเข้มข้นขึ้นที่ได้จากการทำไดอะไลซิสจะถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วนดังนี้สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.1.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ในภาคผนวก ข และส่วนที่ 3 นำไปตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิกในขั้นตอนต่อไป

ค) การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิก (Trichloroacetic acid)

การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิกตามวิธีของ Ogunbanwo และ คณะ (2003) โดยนำสารละลายโปรตีนที่ผ่านการทำไดอะไลซิสแล้วมาตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิก (สารละลายโปรตีน 100 มิลลิลิตรต่อไตรคลอโรแอซิดิก 5 กรัม) แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสทิ้งและนำตะกอนมาทำสารแขวนลอยตะกอนด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปริมาตร 4 มิลลิลิตร จากนั้นแบ่งสารแขวนลอยโปรตีนออกเป็น 2 ส่วนดังนี้สารละลายโปรตีนส่วนแรกปริมาตร 10 มิลลิลิตรนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี agar well diffusion (ตามข้อ 3.2.1.2) ส่วนที่ 2 ปริมาตร 2 มิลลิลิตรนำไปหาปริมาณโปรตีนตามวิธีการของ Bradford ในภาคผนวก ข

3.2.1.5 การศึกษาอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารแบคทีเรียโอซิน

จากการทดสอบการทำแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ข้างต้นแล้วจึงเลือกขั้นตอนซึ่งให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุดเพื่อนำมาทดสอบความคงตัวของอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ดังต่อไปนี้

ก) ความคงตัวของสารแบคทีเรียโอซินต่ออุณหภูมิ

การทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคทีเรียโอซินคัดแปลงจาก Ogunbanwo และคณะ (2003) และ Castro และคณะ (2011) นำสารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ปรับพีเอชเท่ากับ 6.5 (เพื่อกำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรด) จากนั้นกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.2 ไมโครเมตร (เพื่อกำจัดจุลินทรีย์) แล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 37, 63, 72 และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100 และ 121 เป็นเวลา 15 นาที (ทั้งหมด 8 ชุดการทดลอง) ในอ่างน้ำร้อน (water bath) และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.1.2

ข) การทดสอบผลของพีเอชที่มีต่อสารแบคทีเรียโอซิน

การทดสอบผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคทีเรียโอซินคัดแปลงจาก Ogunbanwo และคณะ (2003) และ Castro และคณะ (2011) นำสารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาปรับพีเอชเป็น 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ด้วยสารละลายกรด

ไฮโดรคลอริก หรือ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.1.2

ค) การทดสอบผลของเอนไซม์ที่มีต่อสารแบคทีเรียโอซิน

การทดสอบผลของเอนไซม์ที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคทีเรียโอซิน คัดแปลงจาก Lee และคณะ (1999) นำสารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร มาผสมกับ เอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ trypsin (จาก porcine pancreas บริษัท Fluka), pepsin (จาก porcine gastric mucosa บริษัท Fluka), α -amylase (จาก *Aspergillus oryzae* บริษัท Fluka), lipase (จาก porcine pancreas บริษัท Fluka) และ เอนไซม์ papain (จาก carica papaya บริษัท Merck) ที่ละลายในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์) ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นเอนไซม์ pepsin ให้ละลายในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล และให้น้ำกลั่น เป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง (ยกเว้น trypsin , α -amylase บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.1.2

3.2.2 การทดลองนำสารแบคทีเรียโอซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว

การทดลองนี้ได้เปรียบเทียบผลการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการที่เหมาะสม (ระดับความเข้มข้นคือ ร้อยละ 16.7 และ ร้อยละ 23.1) ซึ่งผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมทั้ง 2 สายพันธุ์ในอาหารเหลวโดยทำการทดลองตามวิธีของ Pinto และคณะ (2009) ดังนี้ ทำการเติมแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสายพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้นระดับหนึ่ง (ร้อยละ 16.7 และ ร้อยละ 23.1) ลงในพลาสติกที่มีอาหารเหลว Tryptic Soy Broth (TSB, Difco) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร ที่มีเชื้อแบคทีเรียก่อโรคเจริญอยู่ซึ่งผ่านการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จนครบ 4 ชั่วโมง (การเจริญเติบโตของเซลล์อยู่ในระยะ exponential phase ช่วงต้น) นำไปบ่มต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยสุ่มตัวอย่างไปวัดค่าดูดกลืนแสง (optical density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ในระหว่างการบ่ม ทุก ๆ 1 ชั่วโมง จนครบ 12 ชั่วโมง

3.2.3 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์เนื้อโดยใช้แบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

3.2.3.1 การศึกษาผลของแบคทีเรียโอสินจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในหมูปดแช่เย็น

การทดลองนี้ได้ศึกษาผลของแบคทีเรียโอสิน (ร้อยละ 2 และร้อยละ 4) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในหมูปดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ต่อการอยู่รอดหรือการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งทำการทดลองตามวิธีการดังนี้

ก) การเตรียมแบคทีเรียโอสินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

นำ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มาผลิตแบคทีเรียโอสิน โดยใช้สภาวะที่เหมาะสมได้แก่ อุณหภูมิของการบ่ม ค่าพีเอชและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคทีเรียโอสินที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด (ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2.1.3 ค) จากนั้นนำแบคทีเรียโอสินมาทำให้บริสุทธิ์ตามวิธีการที่เหมาะสมซึ่งจะทำให้กิจกรรมการยับยั้งสูงสุด (ได้จากผลการทดลองในข้อ 3.2.1.4) ก่อนนำมาเติมในหมูปด

ข) การเตรียมเชื้อ *L. monocytogenes*

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในอาหารเหลว TSB แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้งและล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใสทิ้งไปและทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมให้เข้ากันและปรับความขุ่นของเซลล์แต่ละสายพันธุ์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 เพื่อให้มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^9 CFUต่อมิลลิลิตร

ค) การใช้แบคทีเรียโอสินในการควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในหมูปดแช่เย็น

ทำการเตรียมหมูปดซึ่งประกอบด้วยเนื้อหมูบดร้อยละ 80 และมันหมูร้อยละ 20 ซึ่งมีวิธีการดังนี้คือ นำเนื้อหมูและมันหมูมาล้างให้สะอาดก่อนจึงนำมาหั่นและบดให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ ผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (KitchenAid model 5K5SS) ที่อัตราความเร็ว 2 เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นแบ่งส่วนผสมทั้งหมดออกเป็น 6 ส่วนเพื่อนำมาเติมแบคทีเรียโอสินทั้งหมด 6 ทริตเมนต์ ดังนี้ ส่วนที่ 1) หมูสดควบคุม (ไม่เติมแบคทีเรียโอสิน) ส่วนที่ 2) หมูปดที่เติมในซัน ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (ชุดควบคุมที่เติมแบคทีเรียโอสิน) ส่วนที่ 3) หมูปดที่เติมแบคทีเรียโอสินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร้อยละ 2 ส่วนที่ 4) หมูปดที่เติมแบคทีเรียโอสินที่ผลิต

จากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 1 ร้อยละ 4 ส่วนที่ 5) หมูบดที่เติมแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร้อยละ 2 ส่วนที่ 6) หมูบดที่เติมแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ 2 ร้อยละ 4 หลังจากเติมแบคทีเรียโอซินและผสมให้เข้ากันดีแล้วใส่ลงในถุงปลอดเชื้อก่อนเติมสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อก่อโรคที่ได้เตรียมไว้แล้วข้างต้นซึ่งมีความเข้มข้นเซลล์เท่ากับ 10^9 CFUต่อมิลลิลิตรลงในหมูบด (ปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหมูบด 25 กรัม) เพื่อให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^5 CFUต่อกรัม นำเนื้อหมูบดทั้งหมดไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วัน จากนั้นทำการสุ่มตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 7 และ 10 วันของการเก็บรักษา เพื่อนำมาวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนแบคทีเรียก่อโรคทั้งหมด และทำการวัดค่าพีเอช

ง) การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวน *Listeria monocytogenes* ทั้งหมด การวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดทำตามวิธีการของ Maturin และ Peeler, 2001 และจำนวน *L. monocytogenes* ทั้งหมดทำตามวิธีการของ Hitchins และ Jinneman, 2011 โดยนำตัวอย่างหมูบด จำนวน 25 กรัม ใส่ถุงตีปนที่ปลอดเชื้อ แล้วเติมสารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร จากนั้นตีปนด้วยเครื่องตีปนอาหารเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางให้ได้ระดับที่เหมาะสม ในการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดให้ทำการเจือจางถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-5} และจำนวน *L. monocytogenes* ทั้งหมด ทำการเจือจางถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-4} โดยใช้เทคนิค spread plate ซึ่งเปิดตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 3 ระดับสุดท้าย ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรในแต่ละระดับความเจือจางลงบนอาหารแข็ง PCA สำหรับการหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และอาหาร selective media (PALCAM ที่เติม antimicrobic supplement) สำหรับเชื้อ *L. monocytogenes* แล้วใช้แท่งแก้วอเกลียบนผิวหน้าอาหารให้ทั่วทั้งไว้ให้แห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับอาหารแข็ง PCA ส่วนจานอาหาร selective media นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนับจำนวนโคโลนิบนจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 25-250 โคโลนี และคำนวณจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ *L. monocytogenes* ทั้งหมด (CFU ต่อกรัมตัวอย่างของหมูบด)

จ) การวัดค่าพีเอช

การวัดค่าพีเอชของเนื้อหมูบดโดยใช้เครื่องวัดพีเอชในอาหาร (Testo 205)

ฉ) การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองทั้ง 3 ซ้ำมาวิเคราะห์ทางสถิติ โดยใช้วิธี analysis variance (ANOVA) และ Duncan 's multiple range test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของข้อมูลในแต่ละชุด การทดลองที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 คำนวณโดยใช้โปรแกรม SPSS version 17.0

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์

4.1 การผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.1.1 ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

ก) ผลการศึกษาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน

จากการทดสอบหาระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลต คือ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT 0904 ที่ระดับอุณหภูมิต่างกัน 6 ระดับ คือ 25, 30, 35, 37, 39 และ 42 องศาเซลเซียส พบว่าที่อุณหภูมิทั้ง 6 ระดับนั้นเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร อย่างไรก็ตามจากการเปรียบเทียบการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดที่อุณหภูมิต่าง ๆ กันพบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส มีผลทำให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนการยับยั้งสูงที่สุด คือ 21.0 และ 18.0 มิลลิลิตรตามลำดับ (ตารางที่ 4.1) ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียโอซินต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* คือ 34 องศาเซลเซียส

จากการทดลองนี้พบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคทีเรียโอซินโดยแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 คือ 37 องศาเซลเซียสซึ่งที่ระดับอุณหภูมินี้ให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุดผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของ Karthikeyan และ Santosh (2009) ที่พบว่าเชื้อ *L. plantarum* มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุดที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (12,800 AUต่อมิลลิลิตร) Altuntas และคณะ (2010) รายงานว่า *Pediococcus acidilactici* 13 มีกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียโอซินมากที่สุดถึง 204,800 AUต่อมิลลิลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งต่างจาก Drosinos และคณะ (2006) ที่พบว่าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* E131 ผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมสูงสุดที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ข) ผลการศึกษาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซิน

สำหรับทดสอบหาระดับพีเอชที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีระดับพีเอชต่างกัน 5 ระดับ คือ พีเอช 4-8 พบว่าที่เชื้อ *L. plantarum*

LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ที่เพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีระดับพีเอช 4-8 พบว่าสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเปรียบเทียบกับขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโชนการยับยั้งพบว่าเชื้อ เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโชนการยับยั้งสูงที่สุด คือ 10.50 และ 12.0 มิลลิลิตรตามลำดับ เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่มีพีเอช 6 และ พีเอช 7 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

ค่าพีเอชที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 6-7 เช่นเดียวกับการรายงานโดยนักวิจัยท่านอื่นซึ่งได้พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* สายพันธุ์ ST23LD มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้นคือ 6.5 ขณะที่ *L. plantarum* สายพันธุ์ ST341LD มีกิจกรรมสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีพีเอชเริ่มต้นคือ 6.0 (Todorov และ Dicks. 2006) อย่างไรก็ตาม Mataragas และคณะ. 2003 ได้รายงานว่าเชื้อ *L. curuatus* L442 และ *Leuconostoc mesenteroides* L124 มีกิจกรรมได้สูงสุดเมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีพีเอช 5.5 ทั้งนี้ De Vuyst และคณะ (1996) และ Mataragas และคณะ (2003) ได้กล่าวว่าการผลิตแบคทีเรียโอซินถูกส่งเสริมในสภาวะแวดล้อมระดับที่ต่ำกว่าสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมทั้งนี้อาจเนื่องมาจากกระบวนการสังเคราะห์แบคทีเรียโอซินเกิดขึ้นได้ดีขณะที่มีอัตราการเจริญค่อนข้างต่ำ อัตราการเจริญที่สูงขึ้นไม่ได้มีผลทำให้การผลิตแบคทีเรียโอซินเกิดขึ้นได้ดีขึ้นเสมอไป แต่อย่างไรก็ตามยังมีรายงานว่าการผลิตแบคทีเรียโอซินเกิดขึ้นได้ดีที่อุณหภูมิใกล้เคียงกันกับอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (Daba และคณะ. 1993)

ตารางที่ 4.1 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการสร้างแบคทีเรียโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*

อุณหภูมิที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ (องศาเซลเซียส)	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโชนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (AUต่อมิลลิลิตร)	
	<i>Lactobacillus plantarum</i> LS0602	<i>Lactobacillus brevis</i> LT0904
25	13.0 (12,800)	11.0 (12,800)
30	15.0 (12,800)	15.0 (12,800)
35	19.0 (12,800)	16.0 (12,800)
37	21.0 (12,800)	18.0 (12,800)
39	18.25 (12,800)	15.0 (12,800)
42	10.83 (12,800)	12.0 (12,800)

ตารางที่ 4.2 พีเอชที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคทีเรียโอซินต่อการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes*

พีเอชของ อาหารเลี้ยงเชื้อ	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (AUต่อมิลลิลิตร)	
	<i>Lactobacillus plantarum</i> LS0602	<i>Lactobacillus brevis</i> LT0904
4	8.67 (12,800)	6.0 (12,800)
5	9.0 (12,800)	8.0 (12,800)
6	10.50 (12,800)	9.0 (12,800)
7	9.50 (12,800)	12.0 (12,800)
8	9.0 (12,800)	8.50 (12,800)

ค) ผลการศึกษาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินจากการทดลองหาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยเลี้ยงเชื้อที่คัดเลือกได้คือ เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 ในอาหารเหลว MRS (Difco) ชุดควบคุมเปรียบเทียบกับอาหารเหลว MRS ที่มีการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบในอาหารเหลว MRS เช่น แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน ตลอดจนสารที่ส่งเสริมการเจริญของเชื้อ พบว่าเมื่อพิจารณาผลการเติมสารประกอบที่ใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าการมีกลูโคส จำนวน 20 กรัมต่อลิตรใน MRS ชุดควบคุม มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 12,800 AUต่อมิลลิลิตร (ตามตารางที่ 4.9) แต่เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงสารประกอบที่เป็นแหล่งคาร์บอนให้ต่างไปจากชุดควบคุมพบว่า การเติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส มอลโตส และซูโครส มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงกว่าชุดควบคุม และเมื่อเติมกลูโคส จำนวน 30 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อดังกล่าวมีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุดถึง 102,400 AUต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ได้ผลแตกต่างกันคือ เมื่อเติมฟรุกโตส แมนโนส แลคโตส และมอลโตส จำนวน 20 กรัมต่อลิตร พบว่ามีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับชุดควบคุมซึ่งเติมกลูโคส จำนวน 20 กรัมต่อลิตร แต่ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงถึง 25,600 AUต่อมิลลิลิตร เมื่อเติมน้ำตาลซูโครส และเมื่อเติมกลูโคส จำนวน 40 กรัมต่อลิตร จะทำให้เชื้อมีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงที่สุดถึง 102,400 AUต่อมิลลิลิตร เมื่อพิจารณาแหล่งไนโตรเจนของส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมทริปโตเนน จำนวน 10 และ 20 กรัมต่อลิตรแทนโปรตีนโอสเปปโตเนน เบอร์ 3 สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ทำให้มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงกว่าชุดควบคุม โดยปริมาณทริปโตเนน จำนวน 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน

สูงที่สุด (51,200 AUต่อมิลลิลิตร) แต่การเพิ่มปริมาณยีสต์สกัด จำนวน 10 และ 20 กรัมต่อลิตร (จากเดิม 5 กรัมต่อลิตร) ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเพิ่มขึ้น สำหรับการเติมทริปโตนร่วมกับยีสต์สกัดไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามก็ไม่มีผลในการทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมเช่นเดียวกับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ที่เติมทริปโตนแทนโปรตีนไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 พบว่า การเติมทริปโตน จำนวน 10 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงกว่าการเติมทริปโตน 20 กรัมต่อลิตร แต่การเติมยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร จะทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 25,600 AUต่อมิลลิลิตร ส่วนการเติมทริปโตนร่วมกับยีสต์สกัดไม่ว่าที่ความเข้มข้นใดก็ตามก็ไม่มีผลต่อการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเช่นเดียวกัน และเมื่อพิจารณาการเติมสารที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเชื้อเช่น การเติมโคโคแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตมากถึง จำนวน 5 กรัมต่อลิตรแทนโคโคแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงที่สุดคือ 25,600 AUต่อมิลลิลิตร ซึ่งต่างกับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ที่การเติมโคโคแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 20 กรัมต่อลิตร มีผลทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงที่สุดคือ 25,600 AUต่อมิลลิลิตร สำหรับการเติมโคโคแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตรเพิ่มในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อ *L. brevis* LT 0904 พบว่ามีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงที่สุด 51,200 AUต่อมิลลิลิตร ซึ่งสูงกว่าสูตรควบคุมที่เติมโคโคแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จะเห็นได้ว่าการเพิ่มโคโคแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตที่ระดับสูงกว่า 2 กรัมต่อลิตรไม่มีผลต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเพิ่มขึ้น เมื่อพิจารณาสูตรอาหารเหลว MRS ที่เติมวิตามินบี 1 และวิตามินบี 12 เทียบกับชุดควบคุมซึ่งไม่ได้เติมวิตามินดังกล่าว พบว่าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับสูตรควบคุมที่ไม่ได้เติมวิตามินคือ 12,800 AUต่อมิลลิลิตร รวมทั้งการเติมแมกนีเซียมซัลเฟตและแมงกานีสซัลเฟตในระดับความเข้มข้นที่เพิ่มสูงขึ้นกว่าในอาหารชุดควบคุมที่เติมแมกนีเซียมซัลเฟต จำนวน 0.1 กรัมต่อลิตร และแมงกานีสซัลเฟต จำนวน 0.05 กรัมต่อลิตร ก็ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LS0602 เพื่อให้มีการสร้างแบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดคือ อาหารเหลว MRS ปกติที่เติมกลูโคสจำนวน 30 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร และโคโคแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 5 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ควรเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปกติที่เติมกลูโคส 40 กรัมต่อลิตร ทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร ยีสต์สกัด 20 กรัมต่อลิตร และโคโคแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต จำนวน 2 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด ตามตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

ลำดับที่ของ สูตรอาหาร	ชนิดและปริมาณของส่วนประกอบอาหาร (กรัมต่อลิตร)		กิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (AU/ มิลลิลิตร)	
	ส่วนประกอบที่เติมเพิ่ม ^a	ทดแทนส่วนประกอบในอาหารMRS สูตรควบคุม	<i>Lactobacillus</i> <i>plantarum</i> LS0602	<i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> LT0904
1	ชุดควบคุม (MRS, Difco) ^b	-	12,800	12,800
2	Fructose (20)	Glucose (20)	25,600	12,800
3	Mannose (20)	Glucose (20)	51,200	12,800
4	Lactose (20)	Glucose (20)	25,600	12,800
5	Maltose (20)	Glucose (20)	51,200	12,800
6	Sucrose (20)	Glucose (20)	25,600	25,600
7	Glucose (30)	Glucose (20)	102,400	51,200
8	Glucose (40)	Glucose (20)	51,200	102,400
9	Glucose (50)	Glucose (20)	25,600	25,600
10	Tryptone (10)	Proteose peptone (10)	51,200	25,600
11	Tryptone (20)	Proteose peptone (10)	25,600	12,800
12	Yeast extract (10)	Yeast extract (5)	12,800	12,800
13	Yeast extract (20)	Yeast extract (5)	12,800	25,600
14	Tryptone (12.5)+Yeast extract (7.5)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
15	Tryptone (20)+Yeast extract (10)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
16	Tryptone (10)+Yeast extract (20)	Proteose peptone (10)+Yeast extract (5)	12,800	12,800
17	K ₂ HPO ₄ (5)	K ₂ HPO ₄ (2)	25,600	12,800
18	K ₂ HPO ₄ (10)	K ₂ HPO ₄ (2)	12,800	12,800
19	K ₂ HPO ₄ (20)	K ₂ HPO ₄ (2)	12,800	25,600
20	KH ₂ PO ₄ (2)	K ₂ HPO ₄ (2)	6,400	51,200
21	KH ₂ PO ₄ (5)	K ₂ HPO ₄ (2)	12,800	6,400
22	KH ₂ PO ₄ (10)	K ₂ HPO ₄ (2)	12,800	12,800
23	KH ₂ PO ₄ (20)	K ₂ HPO ₄ (2)	12,800	12,800
24	วิตามินบี1 (0.001)	0	12,800	12,800
25	วิตามินบี12 (0.001)	0	12,800	12,800
26	MgSO ₄ (2)	MgSO ₄ (0.1)	12,800	12,800
27	MgSO ₄ (5)	MgSO ₄ (0.1)	12,800	12,800
28	MgSO ₄ (10)	MgSO ₄ (0.1)	12,800	12,800
29	MnSO ₄ (2)	MnSO ₄ (0.05)	12,800	12,800
30	MnSO ₄ (5)	MnSO ₄ (0.05)	12,800	6,400
31	MnSO ₄ (10)	MnSO ₄ (0.05)	12,800	6,400

^a ส่วนประกอบที่เติมเพิ่มทดแทนส่วนประกอบบางอย่างในสูตรอาหาร MRS

^b อาหาร MRS ประกอบด้วย Proteose peptone no 3 จำนวน 10 กรัมต่อลิตร Beef extract จำนวน 10 กรัมต่อลิตร Yeast extract จำนวน 5 กรัมต่อลิตร Dextrose จำนวน 20 กรัมต่อลิตร Sodium acetate จำนวน 5 กรัมต่อลิตร Tween 80 จำนวน 1 กรัมต่อลิตร Dipotassium hydrogen phosphate จำนวน 2 กรัมต่อลิตร Ammonium citrate จำนวน 2 กรัมต่อลิตร Magnesium sulfate จำนวน 0.1 กรัมต่อลิตร Manganese sulfate จำนวน 0.05 กรัมต่อลิตร Agar จำนวน 10 กรัมต่อลิตร

การที่พบว่า การเติมปริมาณกลูโคสเพิ่มสูงขึ้นในอาหารเหลว MRS ส่งผลให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเพิ่มขึ้นอาจเนื่องมาจากปริมาณกลูโคสที่สูงขึ้นส่งผลต่อสภาวะเครียด (เกิดจากความดันออสโมติกที่เพิ่มสูงขึ้น) De Vuyst และ Vandamme (1994) สอดคล้องกับการทดลองของ Todorov และคณะ (2006) ที่พบกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด 102,400 AU ต่อ มิลลิเมตร ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST16Pa เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เติมกลูโคส 30 กรัมต่อลิตร ส่วนการทดลองของ Enan และคณะ (1996) กล่าวว่า กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซินชนิด plantaricin UG1 ได้ดี นอกจากนี้การใช้แหล่งคาร์บอนอื่นก็สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ดีเช่นกัน โดยการศึกษาของ Cheigh และคณะ (2002) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีซูโครสและไซโลสเป็นแหล่งคาร์บอนพบว่าเชื้อผลิตแบคทีเรียโอซินที่ให้กิจกรรมการยับยั้งได้ดี แต่ถ้าใช้มอลโตสจะพบว่า มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงกว่า และ Parente และ Ricciardi (1994) กล่าวว่า ซูโครสเป็นแหล่งคาร์บอนที่ดีกว่ากลูโคสสำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซินอย่าง enterocin 1146 นอกจากนี้แหล่งไนโตรเจนก็ช่วยส่งเสริมในการผลิตแบคทีเรียโอซินด้วยเช่นกัน จากการศึกษาของ Kim และคณะ (1997) โดยเปลี่ยนแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นทริปโตเนนหรือยีสต์สกัดก็ส่งเสริมให้เชื้อสามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน ขณะที่ Todorov และ Dicks (2006) ได้เพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST341LD ในอาหารเหลว MRS ที่มีแหล่งไนโตรเจนเป็นทริปโตเนน 12.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับยีสต์สกัด 7.5 กรัมต่อลิตร และเป็นทริปโตเนน 12.5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับมีทสกัด 7.5 กรัมต่อลิตร พบว่าได้แบคทีเรียโอซินที่มีกิจกรรมสูงกว่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ใช้เปปโตเนนเป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MRS สำหรับเพาะเลี้ยงเชื้อ และการเติมสารอนินทรีย์อย่างหมู่ฟอสเฟตอย่างเช่น ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต หรือ โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต ก็มีผลช่วยกระตุ้นให้เกิดการสร้างแบคทีเรียโอซิน แต่อาจขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และชนิดของเชื้อ เช่น การทดลองของ Matsusaki และคณะ (1996) ซึ่งเติมไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตความเข้มข้น 50 กรัมต่อลิตร ทำให้แบคทีเรียโอซินมีกิจกรรมสูงแต่ก็ไม่ใช้เชื้อทุกสายพันธุ์

4.1.2 การศึกษาการทำแบคทีเรียโอซินให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีต่าง ๆ ต่อกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารแบคทีเรียโอซิน

จากการศึกษาการนำแบคทีเรียโอซินมาทำให้บริสุทธิ์ในแต่ละขั้นตอนดังนี้คือ การนำส่วนใสซึ่งปราศจากเซลล์ (cell-free supernatant) มาผ่านขั้นตอนการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แล้วนำตะกอนที่ละลายด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มาทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการทำไดอะไลซิส และนำมาตกตะกอนอีกครั้งด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิก พบว่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อย ๆ ในขั้นตอนสุดท้ายคือ การตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิก (Fraction 2) โดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน

ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร และ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4) สอดคล้องกับค่ากิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) ที่เพิ่มขึ้นจาก 80.3 AUต่อไมโครกรัมของโปรตีนเป็น 1,853.4 AUต่อไมโครกรัมของโปรตีนเป็น สำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 โปรตีนในแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ใน Fraction 2 และเพิ่มเป็น 1,163.6 AUต่อไมโครกรัมของโปรตีนใน Fraction 2 ของเชื้อ *L. brevis* LT 0904 และให้ปริมาณการได้กลับคืน (Recovery) เท่ากับ ร้อยละ 34.7 และ ร้อยละ 29.3 ของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ตามลำดับ เมื่อกล่าวถึงปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (purification factor) แล้วจะเท่ากับ 2.9 สำหรับเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และเท่ากับ 3.4 สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904

การทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์มีหลายขั้นตอนและจากการทดลองพบว่าการตกตะกอนด้วยไตรคลอโรแอซิดิก ส่งผลต่อกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุดสอดคล้องกับการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* F1 และ *Lactobacillus brevis* OG1 มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุดเมื่อผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิก ต่างจาก Rajarm และคณะ. 2010 พบว่าส่วนใสที่ปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus lactis* มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูงสุด (7,350 AUต่อมิลลิลิตร) Copeland (1994) กล่าวว่าโปรตีนส่วนใหญ่จะตกตะกอนออกจากสารละลายเมื่ออยู่ในสภาพที่มีกรดไตรคลอโรแอซิดิกความเข้มข้นสูง วิธีการนี้ทำให้โปรตีนเสียสภาพซึ่งไม่สามารถกลับคืนสภาพเดิมได้ ด้วยเหตุนี้จึงควรใช้วิธีการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิกเพียงเพื่อวิเคราะห์โปรตีนที่ไม่จำเป็นต้องให้มีการเปลี่ยนกลับไปเป็นโปรตีนรูปร่างเดิม ขณะที่ Carolissen-Mackay (1997) วิธีการทำให้แบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์นั้นทำได้หลายวิธี เช่น การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต (Ammonium sulphate precipitation) อีออนเอ็กซ์เชนจ์โครมาโตกราฟี (ion-exchange chromatography) แรงที่เกิดจากปฏิกิริยาของสารที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic interaction) และ การแยกสารโดยวิธี reverse phase HPLC เพื่อความบริสุทธิ์ของ curvacin A, sakacin P, lactosin S และ bavaricin A ส่วนแบคทีเรียโอซินอย่าง helveticin J and lactacin F ถูกทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ขณะที่ lactacin B ใช้เทคนิคเจลเพอมีเอชันโครมาโตกราฟี (gel permeation chromatography)

ตารางที่ 4.4 การทำแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ

ชนิดของจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำให้สารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์	ปริมาณแบคทีเรียโอซิน (มล.)	กิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (AU/มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (Total activity: AV) _a	ความเข้มข้นของโปรตีน (Protein) _b (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) _c (AU/ไมโครกรัม)	ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) _d	ปริมาณการได้กลับคืน (% Recovery) _e
<i>L. plantarum</i>	ส่วนใส	200	102,400	20,480,000	1,275	80.3	1	100
LS0602	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	50	204,800	10,240,000	953	214.9	2.7	74.7
	ไดอะไลซิส (Fraction 1) (ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต)	30	409,600	12,288,000	642	638.0	3.0	50.4
	ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอสติก (Fraction 2)	2	819,200	1,638,400	442	1,853.4	2.9	34.7

_a กิจกรรมรวม (Total activity) คือ ผลคูณระหว่างปริมาณแบคทีเรียโอซินกับกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ได้

_b ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณจากวิธีการของเบรดฟอร์ด (Bradford method) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

_c กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) หาได้จากการนำกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินมาหารด้วยความเข้มข้นโปรตีน (AU/ไมโครกรัม)

_d ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) คือการนำค่า Specific activity ที่เพิ่มขึ้นมาหารกัน

_e ปริมาณร้อยละของการได้กลับคืน (% Recovery) คือค่าความเข้มข้นของโปรตีนคิดเป็นร้อยละหารด้วยความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น

ตารางที่ 4.4 การทำแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *Lactobacillus brevis* ให้บริสุทธิ์ด้วยวิธีการต่าง ๆ (ต่อ)

ชนิดของจุลินทรีย์	ขั้นตอนการทำให้สารแบคทีเรียโอซินบริสุทธิ์	ปริมาณแบคทีเรียโอซิน (มล.)	กิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (AU/มล.)	กิจกรรมทั้งหมด (Total activity: AV) _a	ความเข้มข้นของโปรตีน (Protein) _b (ไมโครกรัม/มล.)	กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) _c (AU/ไมโครกรัม)	ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) _d	ปริมาณการได้กลับคืน (% Recovery) _e
<i>L. brevis</i>	ส่วนใส	200	51,200	10,240,000	1,202	42.6	1	100
LT0602	ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต	50	102,400	5,120,000	910	112.5	2.6	75.7
	ไดอะไลซิส (Fraction 1) (ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต)	30	204,800	6,144,000	598	342.5	3.0	49.8
	ตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอสติก (Fraction 2)	2	409,600	819,200	352	1,163.6	3.4	29.3

_a กิจกรรมรวม (Total activity) คือ ผลคูณระหว่างปริมาณแบคทีเรียโอซินกับกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ได้

_b ความเข้มข้นของโปรตีนคำนวณจากวิธีการของเบรดฟอร์ด (Bradford method) (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)

_c กิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) หาได้จากการนำกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินมาหารด้วยความเข้มข้นโปรตีน (AU/ไมโครกรัม)

_d ปัจจัยของการทำให้บริสุทธิ์ (Purification factor) คือการนำค่า Specific activity ที่เพิ่มขึ้นมาหารกัน

_e ปริมาณร้อยละของการได้กลับคืน (% Recovery) คือค่าความเข้มข้นของโปรตีนคิดเป็นร้อยละหารด้วยความเข้มข้นของโปรตีนเริ่มต้น

4.1.3 ผลของอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ต่อความคงตัวของแบคทีเรียโอซิน

จากการทดสอบหาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยนำแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิก (Fraction 2) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกัน 8 ระดับดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ 37, 63, 72, และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100, และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินไม่ลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร) แต่จะมีการสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ตารางที่ 4.5) ส่วนแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีค่ากิจกรรมต่ำกว่าและมีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมแบคทีเรียโอซินไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (มีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร) แต่จะสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีขึ้นไป

สำหรับการศึกษาผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 ต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคทีเรียโอซิน พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียที่เรียกกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคงตัว (ค่ากิจกรรมไม่ลดลง) เมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 โดยแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตรซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 (มีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร) ตามตารางที่ 4.5 แต่ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอช 8

เมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ α -amylase เอนไซม์ lipase เอนไซม์ papain เอนไซม์ pepsin และเอนไซม์ trypsin ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่เรียกกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรม (ตารางที่ 4.5)

จากการทดสอบหาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยนำแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์โดยการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิดิก (Fraction 2) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกัน 8 ระดับดังนี้คือ ที่อุณหภูมิ 37, 63, 72, และ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และที่อุณหภูมิ 72, 85, 100, และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L.*

plantarum LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินไม่ลดลงเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร) แต่จะมีการสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (ตารางที่ 4.5) ส่วนแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีค่ากิจกรรมต่ำกว่าและมีความคงตัวของความร้อนน้อยกว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมแบคทีเรียโอซินไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (มีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร) แต่จะสูญเสียกิจกรรมเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงกว่าหรือเท่ากับ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีขึ้นไป

สำหรับการศึกษาผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 ต่อความคงตัวของกิจกรรมแบคทีเรียโอซิน พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียที่เรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคงตัว (ค่ากิจกรรมไม่ลดลง) เมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 โดยแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตรซึ่งสูงกว่าค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 (มีค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 409,600 AUต่อมิลลิลิตร) ตามตารางที่ 4.5 แต่ค่ากิจกรรมของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอช 8

เมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ α -amylase, lipase, papain, pepsin และ trypsin ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรม

การที่แบคทีเรียโอซินไม่สูญเสียกิจกรรมในสภาวะที่เป็นพีเอชกรด ทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงแต่ไม่ถึงจุดเดือด และทนต่อสภาวะที่มีเอนไซม์ต่าง ๆ ที่นำมาทดสอบสอดคล้องกับการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) พบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* F1 และ *L. brevis* OG1 มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินสูง (6,400 AUต่อมิลลิลิตร) ขณะอยู่ในสภาวะที่มีพีเอช 2-6 แต่เมื่อพีเอชเพิ่มขึ้น (ตั้งแต่พีเอช 8) กลับพบว่าการสูญเสียกิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน ทั้งนี้เมื่อนำแบคทีเรียโอซินมาทดสอบด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ คือ เอนไซม์ lipase, pronase E, catalase, lysozyme, α -amylase แล้ว แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* F1 มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินลดลงเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ pronase E ขณะที่แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* OG1 กลับไม่สูญเสียกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเลย

ตารางที่ 4.5 ผลของความคงตัวของสารแบคทีเรียโอซินต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์

พรีทเมนต์	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโซนใส (มิลลิเมตร)/ กิจกรรมของแบคทีเรียโอซิน (AU/มิลลิลิตร)	
	<i>Lactobacillus plantarum</i> LS0602	<i>Lactobacillus brevis</i> LT0904
อุณหภูมิ/เวลา (นาที)	819,200	409,600
30 °C/30 (ชุดควบคุม)	819,200	409,600
37 °C/30	819,200	409,600
63 °C/30	819,200	409,600
72 °C/15	819,200	409,600
72 °C/30	819,200	409,600
85 °C/15	819,200	0
85 °C/30	819,200	0
100 °C/15	0	0
121 °C/15	0	0
พีเอช		
2	819,200	409,600
3	819,200	409,600
4	819,200	409,600
5	819,200	409,600
6	819,200	409,600
7	819,200	409,600
8	409,600	204,800
9	204,800	102,400
10	102,400	25,600
เอนไซม์		
ชุดควบคุม (ไม่เติมเอนไซม์)		
α-amylase	819,200	409,600
Lipase	819,200	409,600
Papain	819,200	409,600
Pepsin	819,200	409,600
Trypsin	819,200	409,600

ส่วนการทดลองของ Noonpaldee และคณะ (2002) ที่ผลิตโนซินจากเชื้อ *Lactococcus lactis* ซึ่งแยกมาจากແໜມ ໄສ້ກອກหมักของไทย พบว่าโนซินมีกิจกรรมถึง 12,800 AUต่อมิลลิลิตรที่พีเอช 2-7 และเมื่อทดสอบกิจกรรมของโนซินที่พีเอช 8-10 โนซินมีกิจกรรมลดลงอยู่ในช่วง 6400-3200 AUต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้เมื่อนำโนซินมา ทดสอบที่พีเอช 3 ระดับคือ พีเอช 3, 5 และ 7 ตามลำดับโดยที่พีเอชแต่ละระดับมีการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทั้งนี้ที่พีเอช 3 พบว่าโนซินยังคงมีกิจกรรมปกติ (12,800 AUต่อมิลลิลิตร) เมื่อให้อุณหภูมิทั้ง 2 ระดับ แต่เมื่อทดสอบที่พีเอช 5 และ 7 ที่อุณหภูมิทั้งสองระดับ ทำให้กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินลดลง นอกจากนี้โนซินจะสูญเสียกิจกรรมเมื่อทดสอบความคงทนต่อเอนไซม์ proteinase K และ α -chymotrypsin นอกจากนี้มีรายงานจากนักวิจัยท่านอื่นที่พบว่าสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. acidophilus* AC1 สูญเสียกิจกรรมเมื่อทดสอบด้วยเอนไซม์ trypsin และ α -chymotrypsin แต่จะทนต่อเอนไซม์ pepsin มีกิจกรรมเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีพีเอชระหว่างพีเอช 4.0-7.5 แต่จะไม่มีกิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเลยเมื่อให้อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Mehta และคณะ 1983) และ แบคทีเรียโอซินที่มีโครงสร้างแบบแมโครโมเลกุล (macromolecule) จะไม่ทนต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน (เอนไซม์ pepsin และ trypsin) และทนต่อสภาวะที่มีอุณหภูมิสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (Andersson และคณะ. 1988)

4.2 ผลการนำแบคทีเรียโอซินมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลว

จากการนำแบคทีเรียโอซิน (ร้อยละ 16.7 และร้อยละ 23.1) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 เติบโตในอาหารเหลว TSB เพื่อยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* พบว่า หลังจากเติม แบคทีเรียโอซินเมื่อเข้าสู่ระยะ exponential phase ช่วงต้น (เมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 4) ค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคทีเรียโอซินร้อยละ 23.1 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มีค่าต่ำกว่าค่าดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตรของอาหารเหลว TSB ชุดการทดลองอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* จะเริ่มคงที่เมื่อตั้งแต่วินาทีที่ 8 จนถึงวินาทีสุดท้ายของการทดสอบ (ชั่วโมงที่ 12) พบว่าอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคทีเรียโอซิน (ร้อยละ 23.1) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ได้ดีกว่า อาหารเหลว TSB ที่เติมแบคทีเรียโอซิน (ร้อยละ 16.7) คืออยู่ที่ 0.77-0.80 และ 0.85-0.97 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช พบว่าค่าพีเอชของอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคทีเรียโอซินที่ทั้ง 2 ระดับมีค่าพีเอชลดลงไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในทุกช่วงเวลาของการบ่มและเมื่อถึงชั่วโมงที่ 12 พบว่ามีค่าพีเอชลดลงอยู่ในช่วงพีเอช 5.4-5.6 จากพีเอชเริ่มต้นคือพีเอช 7.1 ขณะที่พีเอชของอาหาร TSB ชุดควบคุมมีค่าพีเอชลดลงมากที่สุด (พีเอช 4.9) ซึ่งมีพีเอชน้อยกว่าค่าพีเอชของอาหารเหลว TSB ที่เติมแบคทีเรียโอซินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) รูปที่ 4.1

