แบบรายงานเรื่องเต็มผลการวิจัยที่สิ้นสุด ปีงบประมาณ 2556

1. แผนงานวิจัย วิจัยและพัฒนาการเพิ่มมูลค่าผลผลิต

2. โครงการวิจัย การวิจัยและพัฒนาการใช้จุลินทรีย์ในการแปรรูปผลิตผลทางการเกษตรเป็นอาหาร

กิจกรรม การผลิตสารสำคัญจากจุลินทรีย์และการใช้ประโยชน์

3. ชื่อการทดลอง การยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารด้วยแบคทีริโอซิน

4. คณะผู้ดำเนินงาน

การทดลองที่ 1.1 การยับยั้งจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารด้วยแบคทีริโอซิน (ปี 2554-2556)

หัวหน้าการทดลองที่ 1.1	นางพัชรี ลิมปิษเฐียร	สังกัด	สวป.
ผู้ร่วมงาน	นางสาวสุปรียา ศุขเกษม	สังกัด	สวป.
ผู้ร่วมงาน	นางพัจนา สุภาสูรย์	สังกัด	สมพ.

5. บทคัดย่อ

ไนซินจัดเป็นสารกันบูดชีวภาพที่ผลิตได้จาก Lactic acid bacteria (LAB) มีคุณสมบัติเป็นสารโพลีเปปไทม์ ประกอบด้วยกรอะมิโนด 34 ชนิด ไม่มีความเป็นพิษ ทนความร้อนได้สูง มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษได้หลายชนิดได้แก่ *Listeria monocytogene, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus* และ *Clostridium botulinum* การผลิตไนซินทางการค้ามีต้นทุนสูงและยังไม่มีกระบวนการผลิตแบบต่อเนื่อง งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อให้ได้เทคโนโลยีการผลิตไนซินในถังหมักและการใช้ประโยชน์กับผลิตภัณฑ์อาหาร ดำเนินการวิจัย ณ สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร มีการควบคุมอุณหภูมิถังหมักที่ 30 °C ภายใต้แก๊สไนโตรเจน อัตราการคนที่ 80 รอบต่อนาที และการควบคุมความเป็นกรดระหว่าง 6.4 ถึง 3.8 ด้วยการหมักเชื้อ *Lactococcus* 1520 (*Lc*. 1520) ร่วมกับการหมักเชื้อ *Lactobacillus* 892 (*Lb*. 892) พบว่า การหมักด้วย *Lc*. 1520 ควบคู่กับ *Lb*. 892 ช่วยเร่งอัตราความเป็นกรดให้ลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 ชั่วโมง จาก 6.4 เป็น 4 และลดลงเป็น 3.8 ในเวลา 24 ชม. และมีผลต่ออัตราการผลิตไนซินของเชื้อ *Lc*. 1520 อย่างมีนัยสำคัญ คือปริมาณไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc*. 1520. ร่วมกับ *Lb*. 892 ในเวลา 24 ชม. มีปริมาณมากกว่าไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc*. 1520 อย่างเดียว ในเวลา 48 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ

($p<0.01$). งานวิจัยนี้พบว่าการประยุกต์ใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไนซินได้ การใช้ประโยชน์จากไนซินในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วยการเติมไนซินมาตรฐานและการเติมเชื้อ *Lc.* 1520 พบว่าการเติมไนซินมาตรฐานโดยตรงสามารถยืดอายุการเก็บรักษานมพลาสเจอไรซ์ นมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์ และผลไม้ตัดแต่งจากการเสื่อมเสียของ LAB โดยมีผลยับยั้งเชื้อให้มีปริมาณลดลง นอกจากนี้การเติมเชื้อ *Lc.* 1520 ลงในอาหารสามารถยืดอายุโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองให้มีรสเปรี้ยวน้อยลงได้

6. คำนำ

ปัจจุบันการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการผลิตอาหารเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง เป็นการลดอัตราความเสี่ยงโรคมะเร็งจากการใช้สารเคมี (Preservatives) ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร แบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ สารไนซิน (Nisin) จากแบคทีเรียชนิด *Lactococcus lactis* สารแพนทาลิซิน (Plantaricin) จากแบคทีเรียชนิด *Lactobacillus plantarum* หรือสารพีดิโอซิน (Pediocin) จากแบคทีเรียชนิด *Pediococcus acidilactici* เป็นต้น แบคทีริโอซินที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียเหล่านี้เป็นสารโพลีเปปไทด์ (Polypeptides) มีกรดอะมิโน ตั้งแต่ 12 ถึง 100 ชนิด สารไนซินประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 ชนิด มีขนาด 3500 DA สามารถย่อยได้ในระบบย่อยอาหารของคนปกติ ใช้ควบคุมแบคทีเรียเช่นเดียวกับสารแอนตี้ไบโอติก มีผลต่อ Cell membrane และ RNA ได้แก่เชื้อ *Listeria monocytogene, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus,* และ *Clostridium botulinum* แบคทีริโอซินบางชนิดได้รับการรับรองความปลอดภัยและไม่เป็นอันตรายต่อผู้บริโภค องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาอนุญาตให้ใช้สารไนซินเป็นสารเจือปนในอาหารในปริมาณสูงถึง 10,000 IU/กรัม และมีแนวโน้มการนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ในต่างประเทศ ประเทศอังกฤษใช้ไนซิน 2.5-5 มก./ลิตร ในการยืดอายุการเก็บรักษาไข่ที่ผ่านการพลาสเจอร์ไรซ์ที่อุณหภูมิ 64.4 °C นาน 2.5 นาที ซึ่งไม่เพียงพอต่อการฆ่าเชื้อแบคทีเรียสปอร์และแบคทีเรียที่ทนความร้อนสูง ประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ อนุญาตให้ใช้ไนซินปริมาณไม่เกิน 10 มก/กก. ในผลิตภัณฑ์ประเภทครีม (flavoured, whipped, thickened, sour cream) และใช้ในผลิตภัณฑ์แป้งแผ่น (hot plate flour) ในปริมาณ 3.75 มก/กก. เพื่อยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ซึ่งไม่ถูกทำลายระหว่างกระบวนการให้ความร้อน นอกจากนี้ยังอนุญาตให้ใช้ในปริมาณที่เหมาะสมในผลิตภัณฑ์เนยแข็ง ผลิตภัณฑ์จากมะเขือเทศ ที่มีค่าความเป็นกรดที่ 4.5 ผลิตภัณฑ์ไข่เหลว ผลิตภัณฑ์ขนมจากนมและไขมัน ซอส มายองเนส น้ำสลัด ซึ่งต้องควบคุมค่าความเป็นกรดที่ 4.2 เพื่อเพิ่มรสชาติแต่อาจเสื่อมเสียได้จาก LAB จึงมีการเติมไนซิน

2.5 – 5 มก/ลิตร และได้อนุญาตให้ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อและสัตว์ปีกในปี 2007 ในปริมาณ 6.9 และ 5.5 มก./กก ตามลำดับ FSANZ (2007) Food Standards Australian and New Zealand และ Codex Standards อนุญาตให้ใช้ไนซินในเนื้อและสัตว์ปีกปริมาณ 12.5 มก/กก. และ ระดับ GMP กับผลิตภัณฑ์นม ไข่ และ น้ำผักผลไม้ งานวิจัยนี้จึงดำเนินการศึกษาถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อและการใช้ประโยชน์จากไนซินที่ผลิตจาก LAB เพื่อควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย

7. อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

- ถังหมักแบบควบคุมอุณหภูมิ
- เครื่องสกัดนมถั่วเหลือง
- อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS
- เชื้อจุลินทรีย์ LAB จัดซื้อจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ
- เอนไซม์ Catalase from bovine liver 2000-5000 units/mg protein, Sigma
- สารมาตรฐานไนซิน จัดซื้อจากบริษัท B&K Technology Group โดยมีความคงตัวในสภาวะความเป็นกรด Activity ภายใต้อุณหภูมิ 121°C 30 นาที pH 2 และสูญเสีย Activity 47% ที่อุณหภูมิ 110°C 30 นาที ในนม pH 6.5 และสูญเสีย Activity อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 63°C 30 นาที pH 11
- วัตถุดิบและผลิตภัณฑ์อาหารที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ ถั่วเหลือง เต้าหู้แผ่น แคนตาลูปตัดแต่ง มะม่วงตัดแต่ง เฉาก๊วย และน้ำส้ม

วิธีการมี 4 ขั้นตอนดังนี้

1) ทดสอบเชื้อ LAB ที่สามารถผลิตไนซิน
2) ทดสอบวิธีวิเคราะห์ค่า Activity ของไนซิน
3) ทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ MRS และ นมถั่วเหลือง
4) ทดสอบไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหาร

1. การทดสอบเชื้อ LAB ที่สามารถผลิตไนซิน

การคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์แลคติกแอซิกที่สามารถผลิตไนซินได้แก่เชื้อ *Lactococcus lactis* 1401 *(Lc.* 1401*)*, *Lactococcus lactis* 1520 *(Lc.* 1520*)*, *Lactobacillus acidophilus* 1034 *(Lb.*1034*)*, และ *Lactobacillus curvatus* 938 (*Lb.* 938)

1.1 ขยายเชื้อแห้ง (Lyophilized) 4 สายพันธุ์ข้างต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ซึ่งประกอบด้วยกลีเซอรอล 40% และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C เก็บไว้ใช้ตลอดงานการทดลอง

1.2 เชื้อแห้งจากข้อ 1.1 ทั้ง 4 สายพันธุ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth และ MRS agar เพื่อวิเคราะห์ Exponential phase ด้วยการนับจำนวนโคโลนีทุก 24 48 และ 72 ชม.

1.3 เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ ที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth นำไปทดสอบในข้อ 2 ต่อไป เพื่อวิเคราะห์หาสายพันธุ์ที่ผลิตไนซิน

2. การทดสอบวิธีวิเคราะห์ค่า Activity ของไนซิน (Klaenhammer, 1993)

การทดสอบการวิเคราะห์ Bacteriocin activity ด้วยเทคนิคการใช้เอนไซม์ และ Clear zone

2.1 การใช้เอนไซม์ (ประยุกต์จาก Cintas, 1998)

1) เลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 °C 6 ชม. ในตู้บ่มเชื้อ
2) นำเชื้อจากข้อ 1) มาเหวี่ยงเซลล์ 12000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อเก็บส่วนใส
3) จากนั้นทำให้เป็นกลางที่ pH 6.2 ด้วย 1 M NaOH
4) เติมเอนไซม์ Catalase 130 units/มล. จากนั้นกรองผ่านเมมเบรน 0.22 µm
5) นำสารที่กรองได้ (Bacteriocin extract) มาทดสอบ Growth inhibition strain ของ *Lb. leichmannii* (*Lb*. 449: Nisin sensitive strain) ด้วย Microplate assay
6) เติม 50 µl Bacteriocin extract จากข้อ 4 ลงในหลุม
7) เติม Growth inhibition strain ของ *Lb.* 449 ลงในหลุมอีก 120 µl บ่มในตู้บ่มเชื้อที่ 37 °C ที่ 14 ชม.
8) อ่านค่า cell density (OD) กับการเจริญเติบโตของเชื้อด้วย Spectrophotometre 600 nm
9) เลี้ยงเชื้อ *Lc*. 1401 *Lb.* 938 และ *Lb.*1034 แต่ละเชื้อเช่นเดียวกัน ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 8
10) ดำเนินการในข้อ 2.2 ต่อไปสำหรับเชื้อทั้ง 4 เชื้อ

2.2 การวิเคราะห์ Clear zone (Yousef, 2002)

1) เลี้ยงเชื้อ *Lc*. 1520 ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 °C ในตู้บ่มเชื้อ เก็บตัวอย่างที่ 24 48 และ 72 ชม.

2) ดูดตัวอย่าง 1000 µl ใส่ใน Microfuge tube นำไปเข้าเครื่องเหวี่ยงความเร็ว 3000 รอบ/นาที

3) เตรียมการเจือจาง ด้วยน้ำเกลือ NaCl 0.85 % จำนวน 100 µl ต่อ 1 Microfuge tube ของตัวอย่าง 100 µl จากข้อ 1 (2^1)

4) ทำการเจือจาง 2^0 2^{-1} 2^{-2} 2^{-3} 2^{-4} 2^{-5} โดยเติมตัวอย่างจากข้อ 1 ลงไปในข้อ 2 ปริมาตร 100 µl ดังแสดงในตารางที่ 1 ต่อไปนี้

ตารางที่ 1 แสดงการเจือจางตัวอย่างด้วยน้ำเกลือ NaCl 0.85 % จำนวน 100 µl ต่อ 1 Microfuge tube

การเจือจาง	NaCl 0.85% (µl)	Sample Volume (µl)
2^0	0	ตัวอย่างจากข้อ 2) จำนวน 100
2^{-1}	100	ตัวอย่างจาก 2^0 จำนวน 100
2^{-2}	100	ตัวอย่างจาก 2^{-1} จำนวน 100
2^{-3}	100	ตัวอย่างจาก 2^{-2} จำนวน 100
2^{-4}	100	ตัวอย่างจาก 2^{-3} จำนวน 100
2^{-5}	100	ตัวอย่างจาก 2^{-4} จำนวน 100

5) เตรียม Soft agar โดยใช้อัตราส่วน 0.75 % Agar ใส่ในหลอดทดลอง จำนวน 9 มล. 2 หลอด

6) ละลาย Soft agar ที่อุณหภูมิ 50 ^{o}C ใน water bath

7) เติมเชื้อ *Lb*. 449 ลงใน Soft agar 10 µl แล้วใช้มือหมุน (Vortex) ให้เชื้อผสมกับ Soft agar

8) เชื้อที่ผสมกับ Soft agar แล้วจำนวน 9 มล. เทลงใน MRS plate agar ที่เตรียมไว้แล้ว ให้เทตรงกึ่งกลางของอาหารใน Plate แล้วปล่อยให้ Soft agar ไหลกระจายไปเอง ทำเช่นนี้จำนวน 2 Plates ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม.

9) ตีตารางแบ่งช่องข้างหลัง Plate นำตัวอย่างที่ทำการเจือจาง แล้ว 2^0 2^{-1} 2^{-2} 2^{-3} 2^{-4} 2^{-5} หยดลงไปในช่องตารางใน Plate หยดละ 5 µl

10) เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C 24 ชม.

11) วัดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Clear zone (มม.) และบันทึก การเจือจาง factor

12) เลี้ยงเชื้อ *Lc*. 1401 *Lb.* 938 และ *Lb.*1034 แต่ละเชื้อเช่นเดียวกัน ตั้งแต่ข้อ 1 ถึง 11

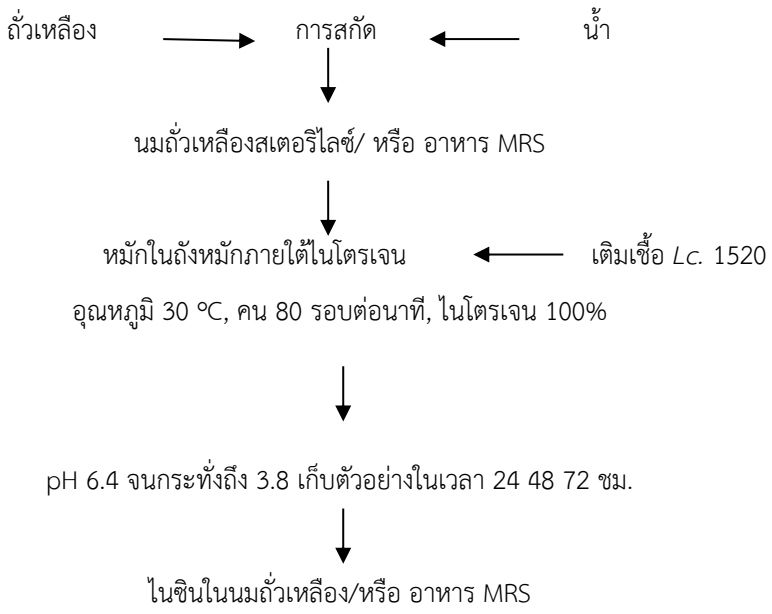
13) ดำเนินการในข้อ 3 ต่อไปสำหรับเชื้อที่พบ Clear zone

3. การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ MRS และ นมถั่วเหลืองสำหรับเชื้อที่ผลิตไนซิน

วิเคราะห์นมถั่วเหลืองที่ใช้หมักมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solid) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) และเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในถังหมักด้วยอาหาร MRS และในนมถั่วเหลือง โดยมีขั้นตอนการเลี้ยงเชื้อในนมถั่วเหลืองดังนี้คือ

ขั้นตอนการหมักไนซินด้วยนมถั่วเหลือง



รูปที่ 1 ขั้นตอนการหมักไนซินด้วยนมถั่วเหลือง

3.1 การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในอาหาร MRS

1) ขยายเชื้อ *Lc.* 1520 จากเชื้อที่เก็บแช่แข็งไว้ – 80 ° C ด้วยการเลี้ยงเชื้อตั้งต้นใน MRS broth 2 ครั้ง ที่อุณหภูมิ 37 °C 24 ชม. แล้วนำไปเหวี่ยงตกตะกอนด้วยความเร็ว 4000 รอบต่อนาที ให้ได้น้ำหนักเชื้อ 1.4 กรัม
2) เตรียม MRS broth 700 มล. ใส่ใน ขวดแก้วฝาเกลียว นำไปสเตอริไลซ์ที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที
3) นำเชื้อ *Lc.* 1520 1.4 กรัม จาก 1) เลี้ยงใน MRS broth 700 มล. 0.2 % เก็บข้อมูล การเจริญเติบโตของเชื้อที่เวลา 24, 48, และ 72 ชม. โดยการทำให้เจือจาง 1:10 (10^{-1}) โดยใช้สารละลาย Peptone 0.1% เติมลงใน Microfuge tube 0.9 มล. และเติมตัวอย่าง 0.1 มล. คนแบบเหวี่ยง (Vortex) และทำการเจือจางต่อไป $10^{-2}10^{-3}10^{-4}$ และ 10^{-5} ตามลำดับ
4) นำไปหาปริมาณของเชื้อ โดยวิธี Spread plate โดยใช้ตัวอย่างในแต่ละการเจือจางแล้วปิเปต 0.1 มล. หยดลงใน Plate MRS agar จากนั้นเขี่ยให้กระจาย ทั่วทั้ง plate ด้วยแท่งแก้ว
5) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24, 48, และ 72 ชม. จึงอ่านผล นับจำนวนจุลินทรีย์

3.2 การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในนมถั่วเหลือง

1) สเตอริไลซ์ถังหมักและอุปกรณ์

2) เลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS อุณหภูมิ 37 °C 24 ชม. จึงเหวี่ยงแยกเซลล์ 4000 รอบต่อนาที

3) เติมนมถั่วเหลืองสเตอริไลซ์ซึ่งปรับปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำด้วยน้ำตาลให้ได้ 15 Brix ในถังหมัก ปริมาตร 1 ลิตร

4) เติมเชื้อ *Lc.* 1520 0.2% หรือ 2 กรัม จากข้อ 2) ในนมถั่วเหลือง 1 ลิตร

5) หมักนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 30°C ควบคุมการเป็นสูญญากาศด้วยไนโตรเจน คนด้วยความเร็ว รอบ 80 รอบ/นาที และบันทึกความเป็นกรดในช่วง 6.0-4.0

6) เก็บตัวอย่างที่ 24 48 และ 72 ชม. เพื่อวิเคราะห์ Clear zone ตามข้อ 2.2

3.3 การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในนมถั่วเหลืองแบบควบคุมความเป็นกรด

1) สเตอริไรซ์ถังหมักและอุปกรณ์

2) เติมนมถั่วเหลืองสเตอริไรซ์ในถังหมัก ปริมาตร 3 ลิตร ปรับความหวานด้วยน้ำตาลให้ได้ 15 Brix

3) ทำ Starter โดย เติมเชื้อ *Lc.* 1520 0.2% หรือ 2 กรัม ในนมถั่วเหลือง 1 ลิตร จากข้อ 2) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 °C นาน 24 ชม. ปรับปริมาตรเป็น 3 ลิตร เพื่อบรรจุในถังหมัก

4) หมักนมถั่วเหลืองที่อุณหภูมิ 30°C ที่ 24 ชม. ควบคุมการเป็นสุญญากาศด้วยไนโตรเจน คนด้วยความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที

5) ควบคุมความเป็นกรดในช่วง 6.0 – 4.5 ด้วยการเติม NaOH 0.1 N. ในถังหมักตลอด 24 ชม ให้ความเป็นกรดอยู่ที่ 6.0 – 5.8 ตามตารางที่ 2 (Yang, 1994)

ตาราง 2 การควบคุม อุณหภูมิ และ pH ในถังหมักเชื้อ *Lc.* 1520 ในอาหารเลี้ยงเชื้อนมถั่วเหลือง

จำนวนชม.	**อุณหภูมิ**	**pH**
1	33.1	4.81
2	30.3	5.74
3	29.8	5.81
4	29.6	5.73
5	30.6	5.74
6	30.8	5.77
7	30	5.76
8	31	5.76
9	29.4	5.8
10	30.3	5.75
11	29.4	5.8

12	30	5.77
13	30	5.77
14	28.9	5.78

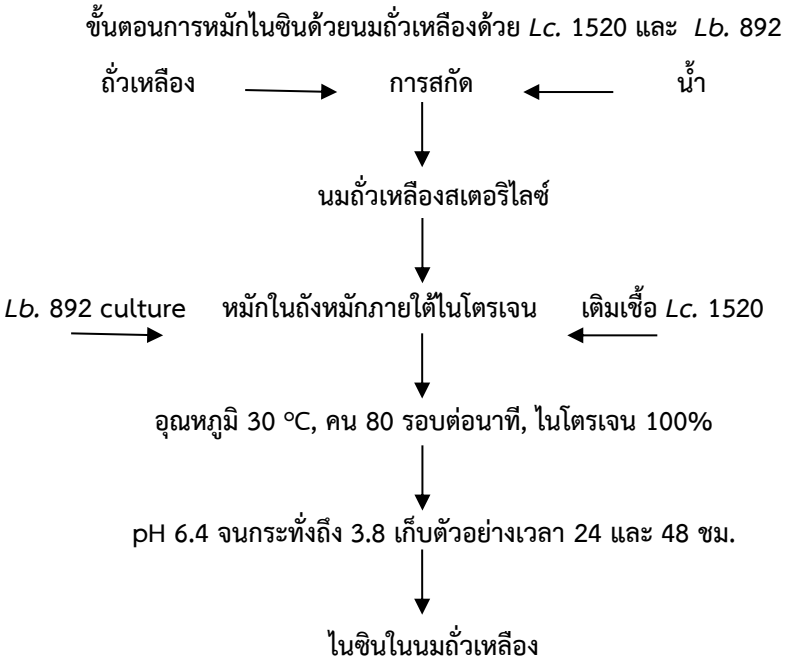
15	29.8	5.75
16	30.6	5.75
17	29.8	5.78

7) เก็บตัวอย่างนมถั่วเหลืองจากถังหมักกรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน

8) ทดสอบ Clear zone ตามข้อ 2.2

3.4 การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในนมถั่วเหลืองแบบควบคุมความเป็นกรดด้วยเชื้อ *Lb.* 892

การหมัก *Lc.* 1520 และ *Lb.* 892 ในนมถั่วเหลืองภายใต้ไนโตรเจนเพื่อควบคุมการหมักให้มีสภาวะการไม่มีอากาศ และควบคุมอุณหภูมิที่ 30°C สภาวะการเป็นกรดในช่วง 6.4 ถึง 3.8 พร้อมทั้งการควบคุมการคนที่ระดับ 80 รอบต่อนาที



รูปที่ 2 ขั้นตอนการหมักไนซินด้วยนมถั่วเหลืองด้วย *Lactococcus ssp.* และ *Lactobacillus ssp.*

4. การทดสอบไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหาร

4.1 การทดสอบเติมไนซินมาตรฐานในผลิตภัณฑ์อาหาร

สารมาตรฐานไนซินมีความคงตัวในสภาวะความเป็นกรด มี Activity ภายใต้อุณหภูมิ 121°C 30 นาที ระดับ pH 2 และสูญเสีย Activity 47% ที่อุณหภูมิ 110°C 30 นาที ในนม pH 6.5 และสูญเสีย Activity อย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 63°C 30 นาที pH 11 มีการอนุญาติให้ใช้ในต่างประเทศในปริมาณที่แตกต่างกันในแต่ละผลิตภัณฑ์อาหาร (ตารางที่ 17)

<u>น้ำผลไม้ ผลไม้ตัดแต่ง และเฉาก๊วย</u>

1) เตรียมตัวอย่าง น้ำผลไม้ได้แก่ น้ำส้ม 100 % 3 กล่อง (ยี่ห้อ มาลี ปริมาตรสุทธิ 200 มล. ส่วนประกอบ น้ำส้ม 100 % จากน้ำส้มเข้มข้น ไม่ใช้วัตถุกันเสีย ผลิตโดยบริษัทมาลีสามพรานจำกัด มหาชน เทใส่ขวดฝาเกลียวที่ผ่านการสเตอริไลซ์ ขนาด 250 มล.

2) เตรียมไนซินมาตรฐาน 20 50 100 และ 500 ppm โดยชั่ง 0.02 0.05 0.1 และ 0.5 กรัม ต่อน้ำส้ม 0.5 ลิตร เติมไนซินเขย่าให้ละลายเข้ากันทั้ง 3 ซ้ำ

3) เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์เชื้อ Enterobacteriaceae และ LAB

4) เตรียมตัวอย่างมะม่วงสุกและแคนตาลูปตัดแต่ง (Fresh cut) ซื้อจากท้อปซุปเปอร์มาเก็ต

5) เตรียมไนซินมาตรฐาน 200 500 1000 และ 5000 ppm โดยชั่งไนซิน 0.2 0.5 1.0 และ 5.0 กรัม ต่อน้ำ 0.5 ลิตร

6) แช่มะม่วงสุกในกะละมังที่มีไนซินจนท่วมจับเวลา 1 นาที ผึ่งให้แห้งและแพคใส่โฟมปิดด้วยพลาสติกห่ออาหารทั้ง 3 ซ้ำ

7) แช่แคนตาลูปในกะละมังที่มีไนซินจนท่วมจับเวลา 1 นาที ผึ่งให้แห้งและแพคใส่โฟมปิดด้วยด้วยพลาสติกห่ออาหาร 3 ซ้ำ เช่นเดียวกับข้อ 6)

8) เก็บตัวอย่างที่อุณหภูมิ 10°C เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ Enterobacteriaceae และ LAB

9) เตรียมตัวอย่างเฉาก๊วย ยี่ห้อชากังราว ผลิตโดย 141/3 ม.6 ต.หนองปลิง อ.เมือง จ.กำแพงเพชร ส่วนประกอบสำคัญโดยประมาณ เฉาก๊วย 62.70% และน้ำตาล 27.89%

10) เทใส่ขวดฝาเกลียวที่ผ่านการสเตอริไลซ์ ขนาด 250 มล. ขวดละ 200 กรัม ทั้ง 3 ซ้ำ

11) เตรียมไนซินมาตรฐาน 50 150 300 และ 1500 ppm โดยชั่งไนซิน 0.02 0.05 0.1 และ 0.5 กรัมต่อขวด เติมไนซินเขย่าให้ละลายเข้ากันทั้ง 3 ซ้ำ

12) เก็บรักษาเฉาก๊วยที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 1 เดือน

13) วิเคราะห์ปริมาณจุลินทรีย์ได้แก่ Flat Sour mesophiles/2 มล., Flat Sour thermophiles/2 มล., Mesophilic anaerobes/2 กรัม โดยใช้วิธีการตรวจ BAM Online 2001, Chapter 21A และ LAB count (cfu/มล.) ใช้วิธี ISO 15214: 1998

4.2 การทดสอบเติมเชื้อ *Lc.* 1520 ในผลิตภัณฑ์อาหาร

<u>ผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่น</u>

1) เลือกเมล็ดถั่วที่เสียออก ล้างน้ำแล้วแช่น้ำ 1 คืน จนเมล็ดถั่วพองและอมน้ำเต็มที่ บี้เอาเปลือกออกให้หมด
2) ใส่ถั่วและน้ำลงในโถปั่น ครั้งละ 1/3 ของโถปั่น ปั่นเข้าด้วยกันจนละเอียด
3) กรองส่วนผสมด้วยผ้าขาวบาง บีบเอาน้ำนมถั่วเหลืองออกให้หมด

4) นำน้ำนมถั่วเหลืองมาต้ม โดยใช้ไฟกลางค่อนข้างแรง พอเดือดสักครู่ ปิดไฟ ยกลงแช่ในอ่างน้ำประมาณ 10 จนกระทั่งอุณหภูมิ 70-80 °C
5) แบ่งน้ำถั่วเหลืองออกเป็น 4 ส่วนๆ ละ 1 ลิตร
6) เติมไนซิน 0, 30, 150 และ 750 ppm หรือ 0, 0.6, 1.5 และ 7.5 กรัม ตามลำดับ คนให้ละลาย
7) เทน้ำดีเกลือครึ่งช้อนโต๊ะลงในนมถั่วเหลืองแต่ละส่วน คนให้เข้ากัน ใส่น้ำดีเกลืออีกจนข้นและโปรตีนถั่วเหลืองจับตัวเป็นก้อน จนหมดน้ำดีเกลือ ตั้งทิ้งไว้สักครู่ให้โปรตีนตกตะกอน
8) ตักโปรตีนถั่วเหลืองใส่พิมพ์ที่รองด้วยผ้าขาวบางจนเต็ม ห่อผ้าให้เรียบร้อย
9) ทับด้วยของหนักๆ ประมาณ 3-4 ชม. จะได้เต้าหู้แข็งตัวอย่างละ 3 ซ้ำ บรรจุใส่ถุงปิดปากถุงให้สนิท
10) เก็บเข้าตู้เย็นอุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 7 วัน วิเคราะห์ Enterobacteriaceae โดยวิธี ISO 21528-2: 2004 และ LAB โดยวิธี ISO 15214: 1998

<u>ผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองด้วยการเติมเชื้อ *Lc.* 1520</u>

1) ชั่งถั่วเหลืองแห้ง 160 กรัม ล้างสะอาดและแช่น้ำให้เมล็ดพองเต็มที่ โดยแช่น้ำทิ้งไว้ในตู้เย็น 1 คืน ประมาณ 16 ชม.
2) เติมน้ำสะอาด 1,300 มล. ต้มจนอุณหภูมิสูงถึง 83 °C จึงปั่นถั่วเหลืองให้ละเอียด กรองผ่านตะแกรง แยกกากออก
3) สเตอริไลซ์ถังหมักอุปกรณ์และนมถั่วเหลืองที่กรองได้จากข้อ 2)
4) เติมนมถั่วเหลืองสเตอริไรซ์ในถังหมัก ปริมาตร 1 ลิตร ปรับความหวานด้วยน้ำตาลให้ได้ 15 Brix
5) หมักนมถั่วเหลือง โดย เติมเชื้อ *Lc.* 1520 0.2% หรือ 2 กรัม ต่อนมถั่วเหลือง 1 ลิตร และเติมเชื้อ *Lactobacillus* ssp. 0.2% หรือ 2 กรัม พร้อมกันในถังหมัก
6) ควบคุมการเป็นสูญญากาศด้วยไนโตรเจน คนด้วยความเร็วรอบ 80 รอบ/นาที อุณหภูมิ 30 °C
7) บันทึก อุณหภูมิ และ pH
8) เก็บตัวอย่างนมถั่วเหลืองจากถังหมัก ที่เวลา 24 และ 72 ชม. กรองผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน
9) ทดสอบ Clear zone ตามข้อ 2.2

8. ระยะเวลา (เริ่มต้น-สิ้นสุด)

เริ่มต้น.....2554.....สิ้นสุด.....2556.....รวม.....3.....ปี

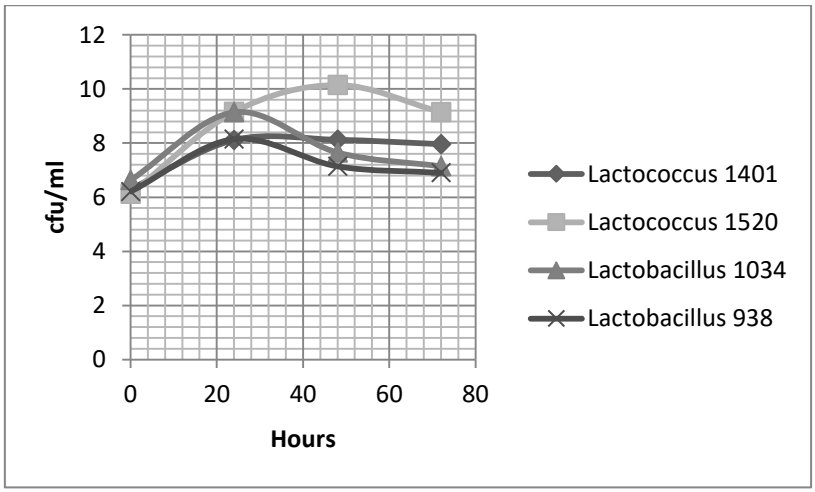
9. สถานที่ดำเนินการ

ณ สำนักวิจัยและพัฒนาวิทยาการหลังการเก็บเกี่ยวและแปรรูปผลิตผลเกษตร

10. ผลการทดลองและวิจารณ์

1) การทดสอบเชื้อ LAB ที่สามารถสร้างไนซิน

การคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ LAB ที่สามารถผลิตไนซินได้แก่เชื้อ *Lc.* 1401, *Lc*. 1520, *Lb.*1034 และ *Lb.*938 การวิเคราะห์ Exponential phase และนับจำนวนโคโลนีทุก 24 48 และ 72 ชม. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่า *Lc.* 1401 *Lb.*1034 และ *Lb.*938 Exponential phase อยู่ในช่วงระหว่าง 24 ชม. มีปริมาณจำนวนเซลล์เป็น 1.14×10^8, 1.38×10^9, 1.45×10^8 ยกเว้น *Lc*. 1520 Exponential phase อยู่ในช่วงระหว่าง 48 ชม. มีปริมาณจำนวนเซลล์เป็น 1.43×10^{10} (รูปที่ 3) เชื้อ *Lc*. 1520 จึงมีการเจริญเติบโตที่สูงที่สุด และมีช่วง Exponential phase ยาวนานกว่า *Lc.* 1401 *Lb.*1034 และ *Lb.*938 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการพบการสร้างไนซินของเชื้อ *Lactococcus* ssp. ได้แก่ สายพันธุ์ ATCC 11454, 354/07; University of Minnessota, 7960; University of Oregon, DL 16; University of Utah, 150; University of Minnessota, และ 148; University of Minnessota ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE (Yang, 1994) อย่างไรก็ตามมีรายงานการพบแบคทีริโอซินในสายพันธุ์ *Lb. curvatus* ซึ่งมีความใกล้เคียงกับ *Lb*. 938 ในการยืดอายุการเก็บรักษาเนื้อ ทั้งนี้การสร้างแบคทีริโอซินอาจแตกต่างชนิดกันคือ Lacticin และมีผลยับยั้ง *Listeria monocytogenes* (อรอนงค์, 2550)



รูปที่ 3 จำนวนเซลล์ในการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lc*. 1401, *Lc*. 1520, *Lb*. 1034 และ *Lb*. 938 ในอาหาร MRS

2) การทดสอบการวิเคราะห์ค่า activity ของไนซิน

การทดสอบการวิเคราะห์ Bacteriocin activity ด้วยเทคนิคการใช้เอนไซม์ และ Clear zone ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ถึงระดับการสร้างไนซิน

2.1 การใช้เอนไซม์

การทดลองหาปริมาณไนซินด้วย Bacteriocin extract และเติมเอนไซม์ catalase 130 units/ml และทดสอบแบคทีริโอซินที่สกัดได้ด้วย Growth inhibition strain ของ *Lb.* 449 ด้วย microplate assay โดยทดสอบกับเชื้อ *Lc.* 1401, *Lc.* 1520, *Lb.* 1034, และ *Lb.* 938 วัดค่า OD ที่ 600 nm และพบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตไม่สม่ำเสมอ มีความแปรปรวนสูง ไม่สามารถวัดค่า activity ของไนซินได้ ทั้งนี้เป็นไปได้ว่าการสกัดด้วยเอนไซม์ไม่ได้ผล หรือไม่มีการสร้างไนซินเกิดขึ้นในช่วงการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 6 ชม.ตามวิธีการนี้

2.2 การวิเคราะห์ Clear zone

จากผลการทดสอบปริมาณไนซินด้วยการใช้สารมาตรฐานไนซินในการยับยั้งเชื้อ *Lb.* 449 ซึ่งเป็นเชื้อ LAB ที่ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารที่มีไนซิน ในการวิเคราะห์ Clear zone นั้นด้วยการวัดขนาดของเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่วงกลมใสรอบๆ จุดที่หยดตัวอย่าง พบว่า ไนซินที่ 20, 50, 100, และ 500 ppm มีค่าเฉลี่ย 9.29, 13.29, 17.25, และ 24.12 มม. ตามลำดับ (ตารางที่ 3)

ตารางที่ 3 แสดงผลการทดสอบประสิทธิภาพของสารมาตรฐานไนซินด้วยวิธี Clearzone

ไนซิน (ppm)	**20**	**50**	**100**	**500**
Average Clear zone (มม.)	9.29	13.29	17.25	24.12

สำหรับการเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1401 *Lc.* 1520 *Lb.*938 และ *Lb.*1034 ในอาหาร MRS เพื่อทดสอบ Clearzone พบว่า ไม่มีการสร้าง Clear zone สำหรับเชื้อ *Lc.* 1401 *Lb.*938 และ *Lb.*1034 ยกเว้น *Lc.* 1520 พบ Clear zone ที่การเจือจาง 2^0 เวลา 24, 48, และ 72 ชม. เป็น 15.4, 11.3 และ 11.75 มม. ตามลำดับ โดยพบ Clear zone ในระดับสูงสุดที่ 24 ชม. (ตารางที่ 4) เมื่อเทียบ Activity ของไนซิน กับปริมาณไนซินมาตรฐาน (ตารางที่ 3) ปริมาณไนซินอยู่ในช่วง 50-100 ppm หรือประมาณ 89.5$\pm$3.5 ppm โดยสามารถคำนวณค่า AU/มล. (Jay, 1998) ซึ่งเป็นค่าที่ใช้ในการเปรียบเทียบผลการทดลองของ Bacteriocin activity ได้ดังนี้

AU/มล. = Arbitrary unit per milliliter of fermentate

= 1000 µl Supernatant filtered/5 µl spotted x 1/Df

Activity ของไนซิน = 200 x 2^0 = 200 AU/มล.

ตารางที่ 4 แสดงค่า Clearzone ของไนซินที่เกิดจากเชื้อ *Lc.* 1520 บนอาหาร MRS

เวลา (ชม)	เส้นผ่าศูนย์กลาง (Clear zone, มม.)
24	15.4
48	11.3
72	11.75

ช่วงเวลาที่มีค่า Activity ของไนซินสูงสุด ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อ โดยเฉลี่ยอยู่ที่จุดกลางของช่วง Exponential phase (Nissen-Meyer, 1992)

3) การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ MRS และ นมถั่วเหลืองสำหรับเชื้อที่ผลิตไนซินผลวิเคราะห์นมถั่วเหลืองที่ใช้หมักมีปริมาณคาร์โบไฮเดรต โปรตีน ไขมัน ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ (Total soluble solid) ปริมาณของแข็งทั้งหมด (Total solid) เป็น 15.88, 0.83, 0.53, 15, 17% ตามลำดับ ส่วนประกอบอื่นๆ ได้แก่ ความชื้น สารเยื่อใย เถ้า แคลลอรี่จากไขมัน และแคลลอรี่ทั้งหมดเป็น 82.64, 0.17, 0.12, 4.77, และ 71.61% ตามลำดับ (ตารางที่ 5) ปริมาณของคาร์โบไฮเดรตส่งผลต่อการสร้างไนซิน ด้วยเชื้อ LAB ใช้คาร์โบไฮเดรตในการเปลี่ยนเป็น Lactic acid ในช่วงของการเจริญเติบโตระยะ Logarithmic growth และเริ่มกระบวนการสร้างไนซินต่อไป (Klaenhammer, 1993) เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แล้ว ปริมาณคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนในสูตรนมถั่วเหลืองที่ใช้มีมากกว่า (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 แสดงปริมาณสารอาหารในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อนมถั่วเหลือง

คุณค่าทางโภชนาการ	ปริมาณ (%)
คาร์โบไฮเดรต	15.88
โปรตีน	0.83
ไขมัน	0.53
ความชื้น	82.64
สารเยื่อไย	0.17
ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำ	15
ปริมาณของแข็งทั้งหมด	17
เถ้า	0.12
แคลลอรี่จากไขมัน	4.77
แคลลอรี่ทั้งหมด	71.61

3.1 การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในอาหาร MRS

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อ LAB ประกอบด้วย Peptone, Beef extract, Yeast extract, Glucose และ Tween 80 เป็นส่วนใหญ่คิดเป็นส่วนของคาร์โบไฮเดรต 2% และส่วนของโปรตีน 0.564% ซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญต่อการเจริญเติบโต จากผลการเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในอาหาร MRS เป็นเวลา 24, 48, และ 72 ชม. จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็น 1.47 x 10^9 1.43 x 10^{10} และ 1.46 x 10^9 cfu/มล. จำนวนเซลล์สูงสุดที่ 48 ชม. (ตารางที่ 6) Nettles, 1993 รายงานการสร้างไนซินในช่วงของ Logarithmic growth ซึ่งเกิดการสังเคราะห์เปปไทม์ รวมทั้งเกิดการ Transcription และ Translation ของโปรไนซิน ซึ่งประกอบด้วย Serine Cysteine และ Threonine จากนั้นจึงส่งไปยังผนังเซลล์ในช่วงของ Exponential growth และสอดคล้องกับรายงานของ Yang, 1994 ว่าการเจริญเติบโตของเซลล์มีผลต่อการสร้างไนซิน และชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งส่งผลต่อค่าความเป็นกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย การสร้างไนซินยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ อีก ได้แก่ สายพันธุ์ของเชื้อ (Strain) ความเป็นกรดช่วงสุดท้าย และเวลาในการเลี้ยงเชื้อที่มีอุณหภูมิเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

ตารางที่ 6 แสดงการเจริญเติบโตของเชื้อ *Lc.*1520 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

***Lc.* 1520** (cfu/มล.)				
จำนวนชม.	**Rep./การเจือจาง**	**-6**	**-7**	**-8**
24	1	>200	139	<20
	2	>200	160	<20
	3	>200	142	<20
48	1	>200	>200	154
	2	>200	>200	128
	3	>200	>200	147
72	1	>200	139	32
	2	>200	148	34
	3	>200	152	29

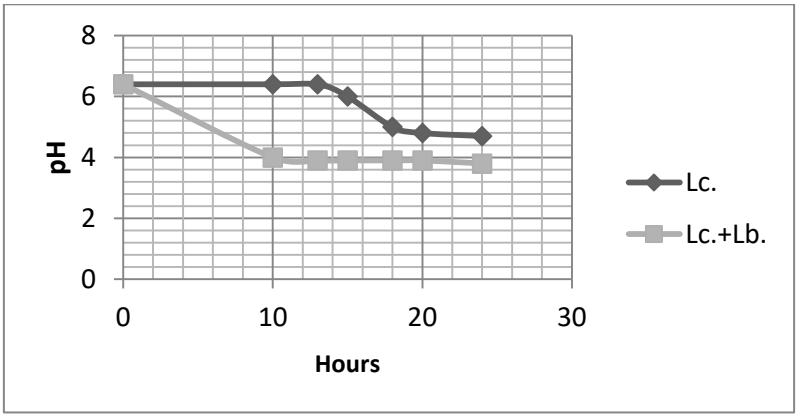
3.2 การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในนมถั่วเหลืองแบบควบคุมความเป็นกรด

การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในนมถั่วเหลืองในถังหมักภายใต้ไนโตรเจน อุณหภูมิ 30 °C 24 ชม. อัตราการคนที่ 80 รอบต่อนาที และควบคุมความเป็นกรดที่ช่วง 6.0-5.8 ด้วยการเติม NaOH 0.1 N และ 1 N ไม่พบการผลิตไนซินจากการวิเคราะห์ด้วย Clearzone แต่อย่างใด ซึ่งไม่สอดคล้องกับการ

ทดลองของ Yang, 1994 ที่ระบุว่าการสร้างไนซินอยู่ในช่วง pH ที่ 6.0 อย่างไรก็ตาม การสร้างไนซินยังขึ้นกับปัจจัยของอาหารเลี้ยงเชื้อด้วย สำหรับงานวิจัยนี้อาหารเลี้ยงเชื้อนมถั่วเหลืองไม่พบการสร้างไนซินที่ความเป็นกรด 6.0

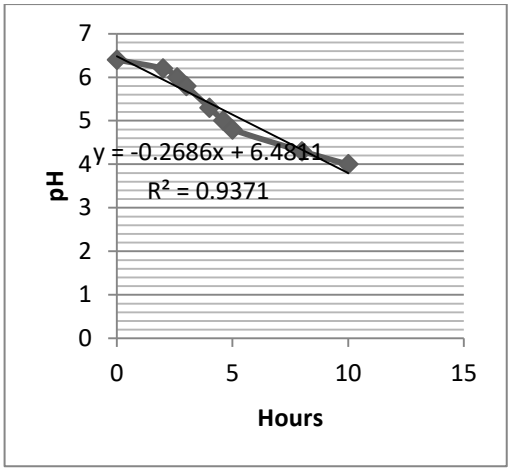
3.3 การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในนมถั่วเหลืองและการเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 แบบควบคุมความเป็นกรดด้วยเชื้อ *Lb*. 892 ในนมถั่วเหลือง

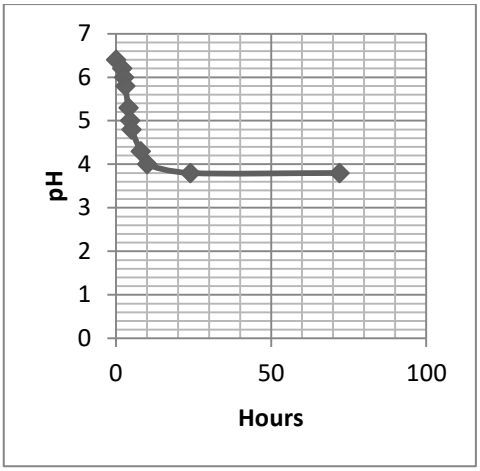
การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับเชื้อ *Lb.* 892 ในถังหมักนมถั่วเหลือง ภายใต้ไนโตรเจน การควบคุมการคนที่ 80 รอบต่อนาที และอุณหภูมิที่ 30°C และความเป็นกรดในช่วง 6.4 ถึง 3.8 และเก็บตัวอย่างทดสอบที่เวลา 24 และ 48 ชม. พบว่าตัวอย่างจากถังหมักเชื้อ *Lc.*1520 เพียงเชื้อเดียวที่ 24 ชม. ไม่พบ clear zone เกิดขึ้นเลย หากแต่การเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ร่วมกับเชื้อ *Lb.* 892 ในเวลา 24 ชม. พบปริมาณไนซินเพิ่มขึ้นวัดจากค่า Clear zone 13.19 มม. และเมื่อเก็บตัวอย่างที่ 48 ชม. พบว่า ถังหมักที่มีการเลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 เพียงอย่างเดียว มีปริมาณไนซินเพิ่มขึ้นโดยมีค่า Clear zone 11.7 มม. และพบปริมาณไนซินเพิ่มขึ้นเช่นกันสำหรับถังหมักที่เลี้ยงเชื้อ *Lc.*1520 ร่วมกับเชื้อ *Lb.* 892 โดยมีค่า Clear zone 16.5 มม. ในเวลา 48 ชม. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติของ Clear zone ระหว่างการเลี้ยงเชื้อร่วมกันที่ 24 และ 48 ชม. (รูปที่ 8)



รูปที่ 4 แสดงความเป็นกรดในการเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 และ *Lb.* 892 ในถังหมักนมถั่วเหลือง

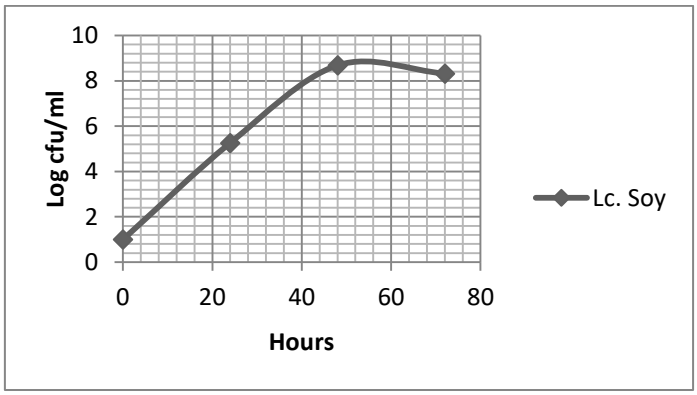
เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดในช่วง 10 ชม.แรกของการเลี้ยง *Lc.* 1520 อย่างเดียวความเป็นกรดไม่ลดลง (รูปที่ 4) เปรียบเทียบกับการเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับ *Lb.* 892 ลดลงอย่างรวดเร็วเป็น 4 ในช่วง 10 ชม และลดลงเป็น 3.8 ในเวลา 24 ชม. ดังแสดงในรูปที่ 5 และ 6





รูปที่ 5 **รูปที่ 6**

รูปที่ 5 และ 6 แสดงความเป็นกรดในการเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 และ *Lb.* 892 ในถังหมักนมถั่วเหลืองในช่วง 10 ชม. (รูปที่ 5) และ 72 ชม. (รูปที่ 6)



รูปที่ 7 จำนวนเซลล์ในการเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ในอาหารเลี้ยงเชื้อนมถั่วเหลือง

การเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 เพียงอย่างเดียวในนมถั่วเหลืองปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นในเวลา 24, 48, และ 72 ชม. เป็น 1.47×10^{9} 1.43×10^{10} และ 1.46×10^{9} cfu/มล. (รูปที่ 7) ไม่พบปริมาณ Clear zone ในช่วง 24 ชม. แต่พบในช่วง 48 ชม. โดยมีค่าเฉลี่ยของ Clear zone อยู่ที่ 11.7 มม.

ตารางที่ 7 แสดงค่า Clear zone ของไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับเชื้อ *Lb.* 892

ปริมาณ Nisin จาก *Lc.* 1520 + *Lb.* 892	
Clear zone (มม.) 24 ชม.	Clear zone (มม.) 48 ชม.
15	16
16	14
15	17
14	15
10	18
13	18
11	16
15	17
13	14
15	14
14	17
15	17
14	20
10	17
13	18
11	18
12	20
13	13
14	14
15	19
14	17
13	22
10	15
12	16
11	16
17	15
12	15
15	13
15	17
13	15
13	19
10	16
14	16
12	15
14	14
12	21
14.75	14.25
15	16.75
14.25	16.5
13.5	19
10	16.5
13	17
11.25	16.25
14.5	16.5
12.5	15.75

ตารางที่ 8 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติโดยการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณไนซินที่เกิดจากการหมัก *Lc.* 1520 และ *Lb.* 892 ในเวลา 24 และ 48 ชม.

	Lc+Lb 24 ชม.	**Lc+Lb 48 ชม.**
	Variable 1	*Variable 2*
Mean	13.19444	16.5
Variance	3.153093	4.119318
Observations	45	45
df	44	44
F	0.765441	
P(F<=f) one-tail	0.189369	
F Critical one-tail	0.605718	

ผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 ควบคู่กับ *Lb.* 892 ในเวลา 24 และ 48 ชม. ปริมาณไนซินไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) นั่นหมายความว่าสามารถเก็บเกี่ยวไนซินได้ในเวลา 24 ชม. ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อ *Lb.* 892 ช่วยให้ปริมาณกรดลดต่ำลง ภายในเวลา 10 ชม.

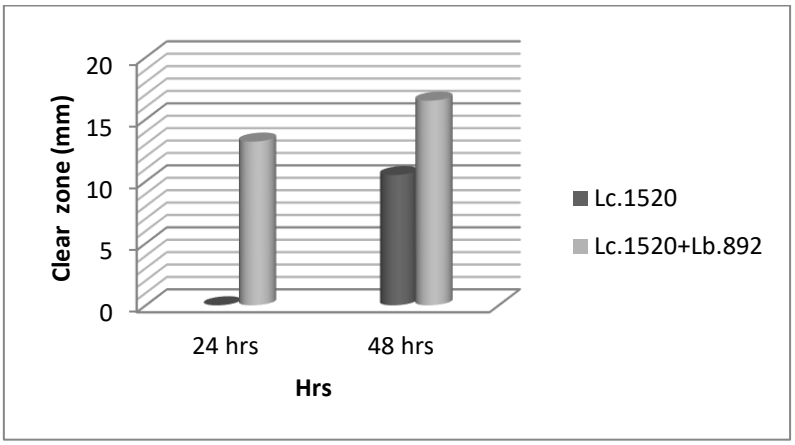
ตารางที่ 9 แสดงผลวิเคราะห์ Clear zone โดยการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณไนซินที่เกิดจากการหมัก *Lc.* 1520 และ *Lb.* 892

***Lc.* 1520**	***Lc.* 1520 + *Lb.* 892**
Clear zone (มม.) 48 ชม.	**Clear zone (มม.) 24 ชม.**
15	15
11	16
11	15
10	15
12	15
10	15
11	15
10	17
15	15
10	15
12	14
11	14.75
14	15
14	14.25
10	14.5

ตารางที่ 10 แสดงผลวิเคราะห์ทางสถิติโดยการเปรียบเทียบระหว่างปริมาณไนซินที่เกิดจากการหมัก *Lc.* 1520 และ *Lb.* 892

	Lc. 48 ชม.	**Lc.+Lb. 24 ชม.**
	Variable 1	*Variable 2*
Mean	11.73333	15.03333
Variance	3.495238	0.489881
Observations	15	15
df	14	14
F	7.134872	
P(F<=f) one-tail	0.000369	
F Critical one-tail	2.483726	

ผลวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การหมักด้วย *Lc.* 1520 ควบคู่กับ *Lb.* 892 ช่วยเร่งอัตราความเป็นกรดให้ลดลงอย่างรวดเร็วภายในเวลา 10 ชั่วโมง จาก 6.4 เป็น 4.0 และลดลงเป็น 3.8 ในเวลา 24 ชม. และมีผลต่ออัตราการผลิตไนซินของเชื้อ *Lc.*1520 อย่างมีนัยสำคัญคือปริมาณไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับ *Lb.* 892 ในเวลา 24 ชม. โดยมีค่าเฉลี่ยของ Clear zone อยู่ที่ 15.0 มม. ซึ่งมีปริมาณมากกว่าไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 อย่างเดียวในเวลา 48 ชม. มีค่าเฉลี่ยของ clearzone อยู่ที่ 11.7 มม. อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$) (ตารางที่ 10 และ รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงปริมาณไนซินจากการวัดค่า Clearzone ในถังหมักของการเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 และ *Lc.* 1520 ร่วมกับเชื้อ *Lb.* 892 ในนมถั่วเหลือง

จากผลการทดลองอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างไนซินซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Yang, 1994 ซึ่งได้ทดลองเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus* 5 สายพันธุ์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE (Tryticase glucose yeast extract broth) ซึ่งสรุปว่าความเป็นกรดสุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อและชนิดของ

อาหารเลี้ยงเชื้อมีผลต่อการสร้างไนซินที่แตกต่างกันและพบว่าไนซินมี Activity สูงสุดที่ความเป็นกรด 6.0 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE buffer broth

4) การทดสอบไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหาร

4.1 การทดสอบเติมไนซินมาตรฐานในผลิตภัณฑ์อาหาร

<u>ผลิตภัณฑ์น้ำผลไม้ ผลไม้ตัดแต่งและผลิตภัณฑ์เฉาก๊วย</u>

ผลการทดสอบการเติมไนซินมาตรฐานในมะม่วงตัดแต่งโดยใช้การแช่ด้วยไนซินความเข้มข้น 100, 200 และ 1000 ppm ในเวลา 1 นาที เก็บรักษา 7 วัน ที่อุณหภูมิ 10 °C พบว่า ปริมาณ LAB ลดลงเป็น $9.7x10^5$ $3.0x10^4$ และ $1.1x10^3$ cfu/มล. ตามลำดับ และ Enterobacteriaceae ลดลงเป็น $2.8x10^6$ $1.4x10^6$ และ $2.9x10^5$ cfu/มล. ตามลำดับ และไม่พบการลดลงของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิดในน้ำส้ม แคนตาลูปตัดแต่ง อาจเนื่องจากผลิตภัณฑ์ทั้งสองชนิดมีความสดและสามารถเก็บรักษาไว้ได้มากกว่า 7 วัน ที่อุณหภูมิ 10 °C และไม่พบจุลินทรีย์ชนิด Flat sour mesophiles, Flat sour thermophile, Mesophilic anaerobes และ LAB ในเฉาก๊วยอายุการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 °C นาน 1 เดือนเช่นกันทุกระดับความเข้มข้นของไนซิน 50 150 300 และ 1500 ppm

<u>ผลิตภัณฑ์นมพลาสเจอไรซ์</u>

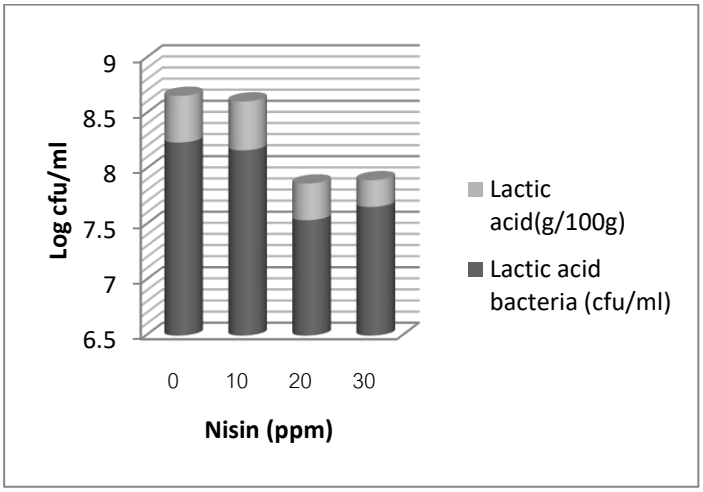
ทดสอบการเติมไนซินมาตรฐานลงในผลิตภัณฑ์นมพลาสเจอไรซ์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 20, และ 30 ppm และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 °C เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่าปริมาณ LAB ลดลง (เติมลงไปเพื่อทดสอบ) เป็น 2.4×10^8 1.7×10^8 5.4×10^7 และ 6.6×10^7 cfu/มล. ตามลำดับ ที่ระดับความเข้มข้นของไนซินเป็น 20 ppm ปริมาณ LAB ซึ่งเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการเปรี้ยวบูดในนมลดลงอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณ Lactic acid ที่ลดลงเป็น 0.42, 0.44, 0.33, และ 0.24 กรัมต่อ 100 กรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 11) ได้มีรายงานการใช้แบคทีริโอซินในประเทศไทยโดยแยกจากอาหารหมักดองชนิดต่างๆ และพบว่าเชื้อ LAB SR 36 และ 37 ที่คัดแยกได้จากปูดองและพบ Clear zone ในวงกว้างที่สุดในช่วง 13 - 13.5 และใช้ทดลองหมักนม โดยระบุว่าเป็นเชื้อรูปร่างกลม แกรมบวก มีผลในการยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* และมีการทดสอบผลทางประสาทสัมผัสของนมหมักแต่ไม่มีการระบุสายพันธุ์ (ศรัณย์, 2549)

ตารางที่ 11 ปริมาณ LAB และ Lactic acid ในนมพลาสเจอไรซ์ อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ อุณหภูมิ 10°C

เก็บรักษา 3 สัปดาห์ 10°C ไนซิน (ppm)	LAB[1] cfu/มล.	Lactic acid[2] g/100g
	21 วัน	21 วัน
0	2.4×10^8	0.42
10	1.7×10^8	0.44
20	5.4×10^7	0.33
30	6.6×10^7	0.24

1= ISO: 15214: 1998

2= In house method based on Food Research International; HPLC analysis



รูปที่ 9 การลดลงของปริมาณ LAB และ Lactic acid ในนมพลาสเจอไรซ์อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ อุณหภูมิ 10°C โดยเติมไนซินในปริมาณ 0, 10, 20, 30 ppm

การทดสอบสารมาตรฐานไนซินด้วยการเติมลงในนมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์ที่ระดับ 0, 10, 20, และ 30 ppm อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ พบว่า ปริมาณไนซินตั้งแต่ 10 20 และ 30 ppm มีผลต่อ LAB และมีผลต่อปริมาณ Lactic acid ลดลงอย่างเห็นได้ชัด โดยปริมาณ LAB ลดลงจาก 4.3×10^6 cfu/มล. ที่ 0 ppm หรือไม่มีการเติมไนซินเลย เป็น 2.1×10^6 1.0×10^6 5.2×10^5 cfu/มล. ตามลำดับ และปริมาณ Lactic acid ก็ลดลงจาก 0.19 กรัม/100 กรัม ที่ 0 ppm เป็น 0.09 0.11 0.07 กรัม/100 กรัม ตามลำดับ เมื่อปริมาณไนซินเพิ่มขึ้น 10 ppm ปริมาณ LAB ลดลงครึ่งหนึ่ง และมีผลให้ Lactic acid ลดลงทำให้นมถั่วเหลืองมีรสเปรี้ยวน้อยลงสามารถยืดอายุการเก็บรักษานมถั่วเหลืองได้ (ตารางที่ 12)

ตารางที่12 เปรียบเทียบปริมาณ LAB และ Lactic acid ในนมถั่วเหลือง เก็บรักษา **3** สัปดาห์ อุณหภูมิ 10°C

เก็บรักษา 3 สัปดาห์ 10°C ไนซิน (ppm)	**LAB[1] cfu/มล.**	**Lactic acid[2] g/100g**
	21 วัน	**21 วัน**
0	4.3×10^6	0.19
10	2.1×10^6	0.09
20	1.0×10^6	0.11
30	5.2×10^5	0.07

1= ISO: 5214: 1998

2= In house method based on Food Research International; HPLC analysis

<u>ผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่น</u>

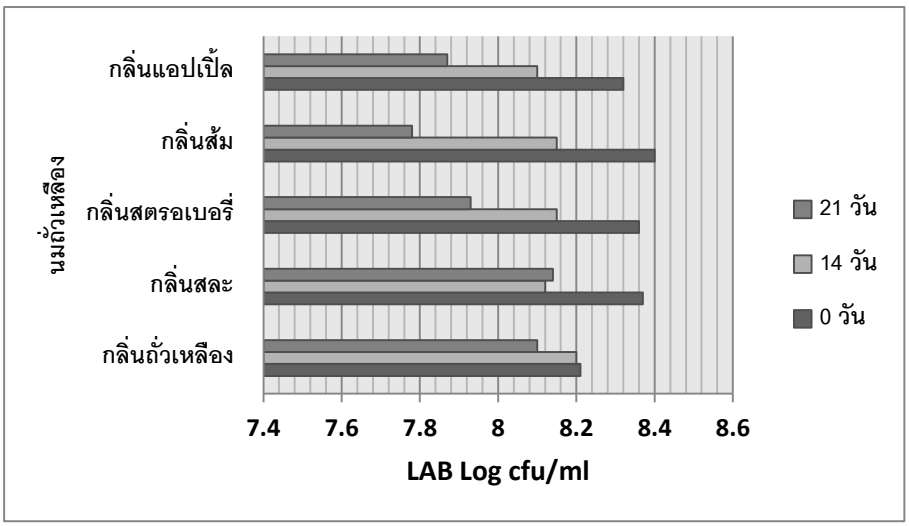
การทดสอบประสิทธิภาพของไนซินในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์กับเต้าหู้แผ่น อายุการเก็บรักษา 7 วัน ปริมาณ Enterobacteriaceae และ LAB ลดลงมากกว่า 50% เมื่อความเข้มข้นของไนซินเพิ่มขึ้น 5 เท่า และลดลงเหลือน้อยกว่า 10 cfu/มล. เมื่อความเข้มข้นของไนซินเท่ากับ 750 ppm (ตารางที่ 13) ดังนั้นไนซินจึงมีแนวโน้วในการใช้ยับยั้งการเสื่อมเสียได้ในผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่นทุกชนิด **ตารางที่ 1**3 แสดงผลของไนซินต่อการลดลงของจำนวนจุลินทรีย์ Enterobacteriaceae และ LAB ในเต้าหู้แผ่นอายุเก็บรักษา 7 วัน

เต้าหู้แผ่นอายุเก็บรักษา 7 วัน 10°C ไนซิน (ppm)	**Enterobacteriaceae cfu/มล.**	**LAB cfu/มล.**
0	2.8×10^4	1.1×10^4
30	3.9×10^3	1.2×10^2
150	4.0×10^2	1.0×10^2
750	1.6×10^2	<10 (None)

4.2 การทดสอบเติมเชื้อ *Lc.* 1520 ในผลิตภัณฑ์อาหาร

มีรายงานการวิจัยการใช้ LAB ในการเติมลงในอาหารหมักเพื่อการใช้ประโยชน์ของแบคทีริโอซินควบคู่กับกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารชนิดนั้นๆ เสื่อมเสีย รวมทั้งมีการทดสอบเชื้อ LAB หลายสายพันธุ์เพื่อให้สร้างแบคทีริโอซินที่แตกต่างกันในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียได้หลายชนิด ได้แก่อาหารแช่เย็น ผักดอง เครื่องดื่ม ไส้กรอก เนื้อ ไข่ และเนยแข็ง เป็นต้น (Nettles, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ในการทดสอบการเติมเชื้อ *Lc.* 1520 ลงในโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง ปริมาณ LAB ในโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองมีปริมาณลดลง

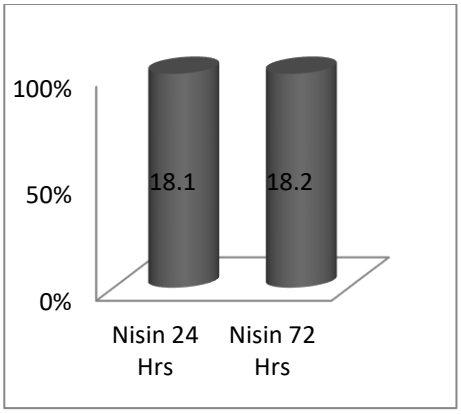
เล็กน้อยเมื่อเก็บรักษา 2 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิต่ำ 10 °C (Chilling temperature) ในตู้เย็นคือมีปริมาณลดลงอย่างไม่มีนัยสำคัญจาก 2.1 x 10^8 เป็น 2.0 x 10^8 cfu/มล. และลดลงครึ่งหนึ่งเมื่อเก็บรักษาไว้ 3 สัปดาห์ สำหรับนมถั่วเหลืองที่มีการเติมรสได้แก่ รสสละ รสสตรอเบอรี่ รสส้ม และรสแอปเปิ้ล ปริมาณ LAB ที่เก็บรักษาที่ 0 วัน เป็น 3.7 x 10^8 3.6 x 10^8 4.0 x 10^8 และ 3.2 x 10^8 cfu/มล. ตามลำดับ และเมื่อเก็บรักษาไว้ 2 สัปดาห์พบว่าปริมาณ LAB ลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่ง เป็น 1.2 x 10^8 1.5 x 10^8 1.5 x 10^8 และ 1.0 x 10^8 cfu/มล. ตามลำดับ และลดลงใกล้เคียง 10^7 ที่อายุการเก็บรักษา 3 สัปดาห์ จำนวน LAB ที่ลดลงมีผลให้ปริมาณกรดลดต่ำลงด้วย โยเกิร์ตที่มีการเติม *Lc.* 1520 จึงมีรสเปรี้ยวช้า สามารถยืดอายุการเก็บรักษาไว้ได้ (รูปที่10) สอดคล้องกับรายงานของ ในการใช้เชื้อ *Lc. lactis* DPC 3147 ในการยืดอายุการเก็บรักษาโยเกิร์ตและชีส โดยใช้ในการยับยั้ง *L. monocytogenes* Scott A และ *B. cereus* (Deegan, 2006) อย่างไรก็ตามการบริโภคผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนั้น ผู้บริโภคมีวัตถุประสงค์ต้องการบริโภคจุลินทรีย์ *Lactobacillus* ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วยไนซินเช่นกัน หากมีการเติมไนซินเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผู้ผลิตจำเป็นต้องเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ชนิดนี้ให้สูงขึ้นด้วย



รูปที่ 10 การลดลงของ LAB ในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนมถั่วเหลืองกลิ่นต่างๆ ที่มีการเติม *Lc.* 1520

การทดสอบค่าไนซินโดยวิธี Clear zone ในโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองพบว่ามีค่าเฉลี่ย Clear zone ที่ 24 และ 72 ชม. ที่ 18.1 และ 18.2 มม. ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (รูปที่11 และตาราง 14) ดังนั้นปริมาณไนซินสามารถเกิดขึ้นได้ภายในเวลา 24 ชม. หลังจากการหมัก คือ ในช่วงที่โยเกิร์ตสามารถรับประทานได้ โดยทั่วไปความเป็นกรดที่ใช้บ่มโยเกิร์ตนมอยู่ที่ 4.9 ในเวลา 5-6 ชม. ซึ่งความเป็นกรดและเวลาที่ใกล้เคียงกับโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองกล่าวคือความเป็นกรดของนมถั่ว

เหลืองอยู่ที่ 4.8 ในเวลา 8 ชม. แต่ในการบ่มโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองนั้นปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ที่ 17% ทำให้โยเกิร์ตที่ได้มีลักษณะเป็นโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองพร้อมดื่ม ดังแสดงคุณลักษณะในตารางที่ 15 และ 16



รูปที่ 11 เปรียบเทียบปริมาณไนซินจากการวิเคราะห์ Clear zone ในโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่เวลาหมัก 24 และ 72 ชม. ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ตารางที่ 14 แสดงปริมาณไนซินจากการวัดค่า Clear zone ที่เกิดจากการหมักโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองที่เวลา 24 และ 72 ชม.

ปริมาณ Nisin จากโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง	
Clear zone (มม.) 24 ชม.	Clear zone (มม.) 72 ชม.
17.75	19.25
16.5	16
18	17.75
20.75	20.75
20.25	16.75
20.25	15.25
19.5	20.5
20.25	20
19.5	17.25
15	19.25
18	16
18.5	17.75
17.5	20.75
16.5	16.75

จากการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองที่เติม LAB (โซเกิร์ตพร้อมดื่ม) 8 รส ได้แก่ ลิ้นจี่ วานิลา ส้ม แอปเปิ้ล ใบเตย สตรอเบอรี่ สละและรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) ผู้ตอบแบบสอบถาม

จำนวน 34 คน จากผู้บริโภคที่คุ้นเคยกับการบริโภคนมถั่วเหลืองและโยเกิร์ตจากนม จากการวิเคราะห์ผลทางสถิติพบว่าผู้ชิมส่วนใหญ่ชอบรสสละ รองลงไปคือรสสตรอเบอรี่ รสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) ส้ม แอปเปิ้ล และใบเตย ตามลำดับ ส่วนรสวานิลาและลิ้นจี่ มีคะแนนการทดสอบชิมที่แตกต่างจากรสนมถั่วเหลือง และได้คะแนนโดยรวมต่ำกว่า 5 ซึ่งน้อยกว่ารสสละ นมถั่วเหลือง ส้ม สตรอเบอรี่ และแอปเปิ้ล สำหรับรสใบเตยนั้นได้คะแนนรวมเฉลี่ยต่ำกว่า 5 เช่นกันหากแต่ไม่มีความต่างจากนมถั่วเหลือง (ตารางที่15) จึงมีแนวโน้มที่ผู้บริโภคจะให้การยอมรับได้ ผู้บริโภคทดสอบชิมบางส่วนต้องการให้ปรับปรุง ความหนืด สีและกลิ่นให้เป็นธรรมชาติมากขึ้น คะแนนคุณลักษณะได้แก่ ความหวาน สี ความหนืด ความเปรี้ยว กลิ่นและการยอมรับ โดยมีค่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานเป็น 0.4, 0.78, 0.43, 0.63, 0.64, และ 0.69 ตามลำดับ โดยที่ค่าส่วนเบี่ยงเบนของสีมีค่ามากที่สุด สีจึงเป็นคุณลักษณะที่มีความแตกต่างทั้ง 5 รสมากที่สุด รองลงไปได้แก่ การยอมรับรวม กลิ่น ความเปรี้ยว ความหนืด และความหวาน ตามลำดับ (ตารางที่15)

ตารางที่15 แสดงค่าเฉลี่ยของคะแนนการทดสอบชิมจำนวน 34 คน ของโยเกิร์ตนมถั่วเหลือง

กลิ่น	ความหวาน	สี	ความหนืด	ความเปรี้ยว	กลิ่น	การยอมรับ	เฉลี่ย
สละ	6.33	6.65	5.62	6.14	6.43	6.43	6.27abc
นมถั่วเหลือง	6.00	5.21	4.90	5.53	5.79	5.84	5.54ab
ส้ม	5.95	6.44	4.79	5.39	5.21	5.47	5.54b
สตรอเบอรี่	5.63	6.53	5.42	5.42	5.84	5.47	5.72ab
แอปเปิ้ล	5.84	5.74	4.63	5.37	4.84	5.16	5.26ab
ลิ้นจี่	5.37	5.74	4.68	4.53	4.79	4.63	4.96ac
ใบเตย	5.21	5.63	4.95	4.47	4.63	4.58	4.91ab
วานิลา	5.26	4.32	4.32	4.37	5.00	4.47	4.62c
Std Dev.	0.40	0.78	0.43	0.63	0.64	0.69	

สำหรับคุณลักษณะความเป็นกรด ได้แก่ pH อยู่ในช่วง 3.4-3.5 ปริมาณ Citric acid อยู่ในช่วง 1.3-2.0 และ Lactic acid อยู่ในช่วง 0.9-0.6 ปริมาณของแข็งที่ละลายน้ำได้อยู่ในช่วง 15-16 และปริมาณของแข็งทั้งหมดอยู่ในช่วง 17-18.5 โดยกรดที่พบส่วนใหญ่เป็น Citric acid มากกว่า Lactic acid เกือบเท่าตัว (ตารางที่ 16) ทั้งในรสนมถั่วเหลืองและรสอื่นๆ ซึ่งเป็นกรดที่มีอยู่ในผลไม้ ส่วนกรด Lactic acid นั้นเป็นกรดที่เกิดจากการเติมเชื้อ *Lactobacillus* ssp. รวมทั้งเกิดจาก *Lactococcus* ssp. ที่เติมลงไปเพื่อผลิตไนซิน

ตารางที่ 16 แสดงคุณลักษณะโยเกิร์ตนมถั่วเหลืองชนิดพร้อมดื่ม

กลิ่น	pH	Citric acid[1]	Lactic acid[2]	Soluble solid	Total solid
สละ	3.42	2.06	0.93	15.6	17.7
นมถั่วเหลือง	3.44	1.36	0.64	15	17.03
ส้ม	3.48	1.86	0.87	15	17.59
สตรอเบอรี่	3.43	1.93	0.9	15	18.51
แอปเปิ้ล	3.4	1.83	0.86	15	17.47
ลิ้นจี่	3.53	1.82	0.86	16	18.42
ใบเตย	3.52	1.91	0.9	15.8	17.03
วานิลา	3.56	1.86	0.87	15	17.08

1, 2= In house method based on Food Research International; HPLC analysis

11. สรุปผลการทดลอง

การเลี้ยงเชื้อ LAB ได้แก่ *Lc.* 1401 *Lc.* 1520 Lb.938 และ *Lb.*1034 เพื่อทดสอบการผลิตไนซิน โดยการวิเคราะห์เปรียบเทียบการหาค่า Activity ของไนซินโดยการเติมเอนไซม์ และการวิเคราะห์ Clearzone โดยไม่พบการสร้างไนซินสำหรับเชื้อ *Lc.* 1401 *Lb.*938 และ *Lb.*1034 ยกเว้น *Lc.* 1520 พบว่ามีการสร้างไนซิน ด้วยการวิเคราะห์ค่า Clear zone ซึ่งให้ผลดีกว่าการใช้เอนไซม์และการวัดค่า OD ซึ่งมีความแปรปรวนสูงและไม่สามารถแปลผลค่า Activity ของไนซินได้ ในการทดสอบอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 ควบคู่กับ *Lb.*892 เพื่อช่วยเร่งอัตราความเป็นกรดให้ลดลงอย่างรวดเร็วและมีผลต่ออัตราการสร้างไนซินของเชื้อ *Lc.* 1520 อย่างมีนัยสำคัญ คือปริมาณไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับ *Lb.*892 ในเวลา 24 ชม. มีปริมาณมากกว่าไนซินที่เกิดจากการหมักเชื้อ *Lc.* 1520 อย่างเดียว ในเวลา 48 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.01$). งานวิจัยนี้เป็นการค้นพบครั้งแรกว่าการใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับ *Lb.*892 เพื่อผลิตไนซินทางการค้ามีความเป็นไปได้สูง ดังนั้นนมถั่วเหลืองจึงมีศักยภาพในการเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตไนซินและสามารถลดต้นทุนได้เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ อีกทั้งถั่วเหลืองยังเป็นพืชเศรษฐกิจที่ได้รับผลกระทบจากการเปิดตลาดการค้าเสรีอาเซียน งานวิจัยนี้ยังได้ประยุกต์การใช้ประโยชน์จากไนซินในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ด้วยการเติมไนซินมาตรฐานและการเติมเชื้อ *Lc.* 1520 พบว่าการเติมไนซินมาตรฐานโดยตรงสามารถยืดอายุการเก็บรักษานมพลาสเจอไรซ์ นมถั่วเหลืองพลาสเจอไรซ์ ผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่น และมะม่วงตัดแต่งโดยมีผลให้ LAB ซึ่งทำให้อาหารเกิดการบูดเปรี้ยวมีปริมาณลดลง ซึ่งมีความเป็นไปได้ในการขยายผลการใช้ไนซินในการยับยั้งการบูดจากเชื้อ LAB ในการเพิ่มอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์เต้าหู้แผ่นและผลไม้ตัดแต่งชนิดอื่นๆ อาจครอบคลุมถึงผัก

สลัดตัดแต่งซึ่งวางจำหน่ายในตู้แช่ตามซูปเปอร์มาเก็ตซึ่งยากต่อการควบคุมอุณหภูมิให้คงที่เนื่องจากตู้แช่ถูกเปิดอยู่ตลอดเวลาหรือไม่ก็ไม่มีประตู นอกจากนี้แล้วการเติมเชื้อ *Lc.* 1520 สามารถยืดอายุโยเกิร์ตจากนมถั่วเหลืองให้มีรสเปรี้ยวน้อยลงได้อีกด้วย ผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองที่เติม *Lc.* 1520 (โซเกิร์ตพร้อมดื่ม) 8 รส ได้แก่ ลิ้นจี่ วานิลา ส้ม แอปเปิ้ล ใบเตย สตรอเบอรี่ สละและรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) ผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 34 คน ผู้ชิมส่วนใหญ่ชอบรสสละ รองลงไปคือ รสสตรอเบอรี่ รสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) ส้ม แอปเปิ้ล และใบเตย ตามลำดับ ผู้ทดสอบชิมบางส่วนต้องการให้ปรับปรุง ความหนืด สีและกลิ่นให้เป็นธรรมชาติมากขึ้น อย่างไรก็ตามการบริโภคผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตนั้นผู้บริโภคมีวัตถุประสงค์ต้องการบริโภคจุลินทรีย์ *Lactobacillus* ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วยไนซินเช่นกัน หากมีการเติมไนซินเพื่อยืดอายุการเก็บรักษาผู้ผลิตจำเป็นต้องคำนึงถึงการเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ชนิดนี้ให้สูงขึ้นด้วย จากผลการวิจัยการใช้ประโยชน์ของไนซินกับผลิตภัณฑ์อาหารอาจนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ชนิดอื่นๆที่มีนมหรือนมถั่วเหลืองเป็นส่วนประกอบ รวมทั้งผลไม้ตัดแต่งชนิดอื่นๆ

12. การนำไปใช้ประโยชน์

1) การใช้นมถั่วเหลืองเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์เพื่อผลิตไนซินเป็นงานวิจัยที่มีการค้นพบเป็นครั้งแรก สามารถขยายผลการผลิตไนซินเพื่อการค้าซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีเทคโนโลยีและไม่มีการผลิตในประเทศไทยแต่อย่างใด ด้วยการเลี้ยงเชื้อ *Lc.* 1520 ร่วมกับเชื้อ *Lb.* 892 ในถังหมักที่ควบคุมอุณหภูมิภายใต้แก๊สไนโตรเจนและควบคุมความเป็นกรดระหว่าง 6.4-3.8
2) สามารถขยายผล ผลิตภัณฑ์ที่ใช้ไนซินในการยืดอายุการเก็บรักษาได้แก่ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองอย่างน้อย 1 ผลิตภัณฑ์

ปัจจุบันการใช้ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติในการผลิตอาหารเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคนับว่ามีความสำคัญอย่างยิ่ง เป็นการลดอัตราความเสี่ยงโรคมะเร็งจากการใช้สารเคมี (Preservatives) ในการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหาร แบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์จัดเป็นสารธรรมชาติ ไม่มีพิษ ทนความร้อน มีความคงตัวสูง ย่อยได้ด้วยเอนไซม์ ไม่มีรสและกลิ่น มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดได้แก่ ไนซิน จากแบคทีเรีย *Lactococcus* ssp. มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเป็นพิษหลายชนิดได้แก่ *Listeria monocytogene* ซึ่งทำให้อาหารแช่เย็นเสื่อมเสีย, *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียปนเปื้อนจากสุขลักษณะในการผลิตอาหารซึ่งทำให้เกิดเชื้อท้องเสีย, *Bacillus cereus* สามารถสร้างสปอร์ของสารพิษและทนความร้อนได้สูง และ *Clostridium botulinum* เป็นเชื้อที่สร้างสารพิษในอาหารภาชนะปิดสนิท งานวิจัยนี้จึงเป็น

การใช้ประโยชน์จากแบคทีริโอซินชนิดไนซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lc.* 1520 เป็น Biopreservative ซึ่งเป็นสารโพลีเปปไทม์และจัดเป็น GRAS (Generally recognized as safe) ทดแทนสารกันบูดที่เป็นสารเคมีและสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีการใช้ประโยชน์ได้ โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ได้ทดสอบในงานวิจัยนี้ ได้แก่ผลไม้ตัดแต่ง และผลิตภัณฑ์จากถั่วเหลืองและสามารถขยายผลการใช้ไนซินในการยืดอายุนมถั่วเหลืองพลาสเจอไลซ์ได้อีกด้วย

3) เผยแพร่ผลิตภัณฑ์ในงานนิทรรศการงานวิจัย ครบรอบ 10 ปี สวป. ทำการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์นมถั่วเหลืองที่เติม LAB (โซเกิร์ตพร้อมดื่ม) 8 รส ได้แก่ ลิ้นจี่ วานิลา ส้ม แอปเปิ้ล ใบเตย สตรอเบอรี่ สละและรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) ผู้ตอบแบบสอบถามจำนวน 34 คน ผู้ชิมส่วนใหญ่ชอบรสสละ รองลงไปคือรสถั่วเหลือง (ไม่เติมกลิ่น) รสสตรอเบอรี่ แอปเปิ้ล และวานิลา ตามลำดับ ผู้ทดสอบชิมบางส่วนต้องการให้ปรับปรุง ความหนืด สีและกลิ่นให้เป็นธรรมชาติมากขึ้น

13. เอกสารอ้างอิง

ศรัณย์ พรหมสาย 2549. การแยกและการสกัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีริโอซิน. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์. 23, 145-160.

Cintas, LM., Casaus, P, Fernandez, MF., Hernandez, PE. 1998. Comparative Antimicrobial Activity of Enterocin L50, Pediocin PA-1, Nisin A and Lactocin S Against Spoilage and Foodborne Pathogenic Bacteria. *Food Microbiol*. 15, 289-98.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biologinal Tools for Bio-Preservation and Shelf-Life Extension. *International Dairy Journal*. 16, 1058-1071.

Delves-Broughton, J. 2005. Nisin as a Food Preservative. *Food Australia*. 57, 525-527.

FDA (U.S. Food & Drug Administration) /Federal Register. 1988. Nisin Preparation: Affirmation of GRAS Status as a Direct Human Food Ingredient. 21 CFR Part 184, *Fed Reg*. 53, 11247-11251.

IFT/FDA Report on Task order 4. 2003. Factors that Influence Microbail Growth. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2, 21-32.

Jay, J. M. 1998. *Modern Food Microbiology*. Aspen Publisher, Inc. Maryland. 291.

Jenssen, H., Hamill, P., and Lobert, E.W. 2006. Peptide Antimicrobial Agents. *Clinical Microbiology Review*. 19, 491.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of Bacteriocins Produced by Lactic Acid Bacteria. FEMS Microbiol, Rev. 12, 39-89.

Nettles, C.G. and Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and Genetic Characteristics of Bacteriocins of Food-Associated Lactic Acid Bacteria. Journal of Food Protection. 4, 338-356.

Nissen-Meyer, J., Holo, H., Havarstein, L.S., Sletten, K., and Nes, I.F. 1992. A Novel Lactococcal Bacteriocin Whose Activity Depends on the Complementary Action of Two Peptides. *Journal of Bacteriology*. 174, 5686-5692.

Yang, R., Johnson, M.C. and Ray, B. 1992. Novel Method to Extract Large Amounts of Bacteriocins from LAB. *Apply Environmental Microbiology*. 58, 3355-3359.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Factors Influencing Production of Bacteriocins by LAB. *Food Microbiology*, 11, 281-291.

Yousef A. and Carlstrom. 2002. Food Microbiology Laboratory Manual. Chapter 11: p3-6.

14. ภาคผนวก

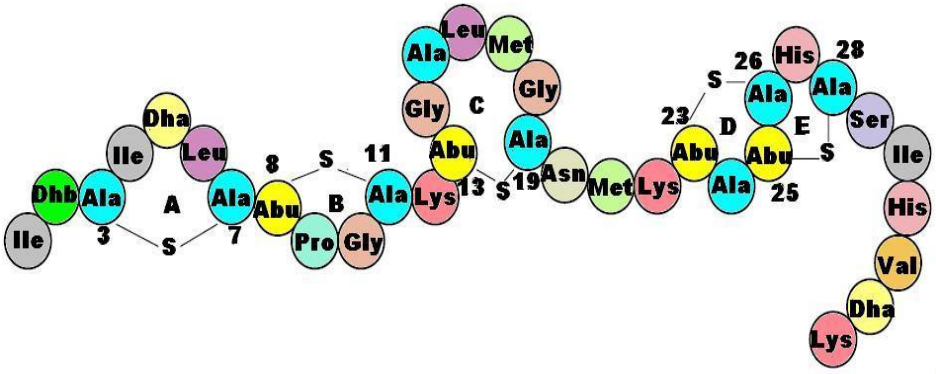
อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

สารละลาย Peptone	10.0	กรัม = 0.25% N (Peptone 2.5% N)			
Beef extract	10.0	กรัม = 0.25% N (BE 2.5% N)			
Yeast extract	5.0	กรัม = 0.062% N (YE 1.25% N)			
Glucose	20.0	กรัม = 20 x 100/1000 = 2% คาร์โบไฮเดรต			
Tween 80	1.0	กรัม = 0.002% N (Tween 0.25% N)			
K2HPO4	2.0	กรัม	$MgSO_4$.7H2O	0.2	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม	MnSO44H2O	0.2	กรัม
Tri-ammonium citrate	2.0	กรัม	Distilled water	1.0	ลิตร

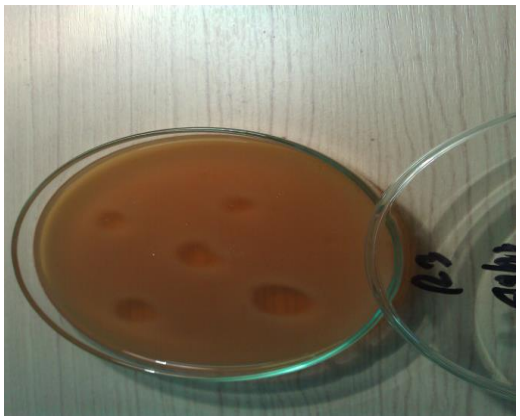
ตารางที่17 ปริมาณไนซินที่เติมในผลิตภัณฑ์พลาสเจอไรซ์

Food application	Typical target organism	Level of nisin (mg/kg,L)
Process cheese	*Clostridium spp.,* *Bacillus spp.*	5-15
Pasteurised milk and milk products	*Clostridium spp.,* *Bacillus spp.*	0.25-10.0
Pasteurised chilled soups	*B. cereus,* *C. pasteurianum*	2.5-6.25
Crumpets	*B. cereus*	4-6.25
Canned foods (high acid)	*C. botulinum,* *C. thermosaccharolyticum*	2.5-5.0
Ricotta cheese	*Listeria monocytogenes*	2.5-5.0
Continental type cooked sausage	*LAB* *Brochothrix thermosphacta,* *L. monocytogenes*	5-25
Dipping sauces	*LAB*	1.25-6.25
Salad dressings	*LAB*	1.25-5
Beer: Pitching yeast wash Post fermentation	*LAB* *Lactobacillus,* *Pediococcus*	 25.0-37.5 0.25-1.25

ที่มา: Delves-Broughton, J. 2005.



รูปที่12 แบคทีริโอซินชนิดไนซินประกอบด้วยโมเลกุลของอะมิโนแอซิค 34 โมเลกุล



รูปที่ 13 แสดง Clear zone ที่เกิดจากแบคทีริโอซินชนิดไนซินจากเชื้อ *Lactococcus* 1520

รูปที่ 14 การเลี้ยงเชื้อ *Lactococcus* 1520 ในถังหมักด้วยอาหารนมถั่วเหลืองภายใต้ไนโตรเจน อุณหภูมิ 30°C อัตราการคน 80 รอบต่อนาที