

การคัดเลือกแบบที่เรียกลักษณะที่สร้างสารต้านจุลชีพได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก
ประเภทเนื้อสัตว์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพ

ปริญญานิพนธ์
ของ
กวรรณิการ์ กำลัง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา
ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา
ตุลาคม 2549

การคัดเลือกแบบที่เรียบแลกติกที่สร้างสารต้านจุลชีพได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก
ประเภทเนื้อสัตว์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพ

บทคัดย่อ

ของ

กรรณิการ์ กำลัง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ตุลาคม 2549

กรรณิการิ กำลัง. (2549) . การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารต้านจุลชีพได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพ. ปริญญา นิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). กรุงเทพฯ: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ. คณะกรรมการควบคุม: รองศาสตราจารย์ สมใจ ศิริโชค, อาจารย์ ดร. ประวิติ อังประภาพรชัย.

จากการแยกแบคทีเรียแลคติก (LAB) จากอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าได้ LAB 174 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียรูปท่อน 147 ไอโซเลท ทรงกลม 13 ไอโซเลท และรูปไข่ 14 ไอโซเลท เมื่อนำเชื้อ LAB ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ด้วยวิธี agar spot assay พบว่ามี LAB ที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้จำนวน 44 และ 12 ไอโซเลท ตามลำดับ และเมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay พบว่ามี LAB ที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้ 18 ไอโซเลท และ 1 ไอโซเลท ตามลำดับ โดย LAB ที่ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือ NJ3, NJ4, SC3, SC4, ES3 และ PO2 (inhibition zone 10 mm) และมี LAB ที่ยับยั้งได้ทั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 เพียงไอโซเลท เดียว คือ SK2 (inhibition zone 8 และ 10 mm ตามลำดับ) จากการศึกษสมบัติของสารยับยั้งที่ได้ จาก LAB เหล่านี้พบว่าสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SC3, SC4 (แยกได้จากไส้กรอกปลา) และ SK2 (แยกได้จากแหนมปลา) มีสมบัติเป็นโปรตีน โดยสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SC3 และ SC4 ทน ความร้อนได้ไม่เกิน 80°C เป็นเวลา 20 นาที ในขณะที่สารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SK2 ทนความ ร้อนได้สูงถึง 100°C เป็นเวลา 10 นาที และมีความคงตัวที่ pH 4-7 การทดสอบ antibacterial spectrum ของสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SK2 พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *Lb. sakei* 912, *B. cereus*, *En. aerogenes*, *Leuc. mesenteroides*, *L. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. monocytogenes* ได้ โดยยับยั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของ commercial nisin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2500 IU) และเมื่อนำ LAB สายพันธุ์ SK2 มาจัดจำแนกโดยใช้ API 20 Strep (bioMerieux) พบว่าเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

Screening of Antimicrobial Substance-Producing Lactic Acid Bacteria
and Characterization of the Substance

AN ABSTRACT
BY
KANNIKAR KAMLANG

Presented in Partial Fulfillment of the Requirements for the
Master of Science Degree of Biology
At Srinakharinwirot University
October 2006

Kannikar Kamlang. (2006). *Screening of Antimicrobial Substance-Producing Lactic Acid Bacteria and Characterization of the Substance*. Master thesis, M.Sc.(Biology). Bangkok: Graduate School, Srinakharinwirot University. Advisor Committee: Assoc. Prof. Somjai Siripoke, Dr. Prawat Aungpraphapornchai.

One hundred and seventy four isolates of LAB were isolated from 50 fermented meat samples. Among these, 147 were rod-shaped, 13 were coccoid, and 14 were oval-shaped. Agar spot assay for the antibacterial activity using *S. aureus* and *Lb. sakei* 912 as the test organisms revealed that 44 isolates could inhibit *S. aureus* and 12 isolates could inhibit *Lb. sakei* 912. Agar well diffusion assay showed that 18 isolates could inhibit *S. aureus* and only 1 isolate could inhibit *Lb. sakei* 912. The isolates which gave the largest inhibition zone (10 mm) when tested on *S. aureus* were NJ3, NJ4, SC3, SC4, ES3 and PO2. Only one isolate, SK2, could inhibit both *S. aureus* and *Lb. sakei* 912, and gave the inhibition zone of 8 and 10 mm on *S. aureus* and *Lb. sakei* 912, respectively. Characterization of antibacterial substances from these LAB showed that the antibacterial substances of SC3, SC4 (isolated from fish sausage) and SK2 (isolated from nham pla) were proteins. The antibacterial substances from SC3, SC4 were stable when treated at 80°C for 20 min, while the antibacterial substance from SK2 could withstand 100°C for 10 min, and it was stable at pH 4-7. The antibacterial substance from SK2 showed a broad inhibitory spectrum against *S. aureus*, *Lb. sakei* 912, *B. cereus*, *En. aerogenes*, *Leuc. mesenteroides*, *L. lactis* subsp. *cremoris*, and *L. monocytogenes*, and gave ~ 50% activity when compared with commercial nisin on *S. aureus* and *Lb. sakei* 912. SK2 was identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* by using API 20 Strep (bioMerieux).

การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารต้านจุลชีพได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก
ประเภทเนื้อสัตว์และศึกษาสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพ

ปริญญานิพนธ์

ของ

กวรรณิการ์ คำลั่ง

เสนอต่อบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา

ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

ตุลาคม 2549

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ประกาศคุณูปการ

ปริญญานิพนธ์นี้สำเร็จได้ด้วยดีเป็นเพราะผู้วิจัยได้รับความกรุณาจาก รองศาสตราจารย์ สมใจ ศิริโชค ประธานกรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ และอาจารย์ ดร.ประวิติ อังประภาพรชัย กรรมการควบคุมปริญญานิพนธ์ ผู้ซึ่งให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่าง ๆ ในการปฏิบัติงานวิจัย ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี รวมทั้งรองศาสตราจารย์ พรพรรณ เลิศทวีสินธุ์ และอาจารย์ ดร.อรอนงค์ พริ้งศุลกะ ที่ร่วมเป็นกรรมการในการสอบ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ให้ความรู้แก่ผู้วิจัยตลอดระยะเวลาการศึกษา ทำให้ผู้วิจัยสามารถนำความรู้ที่ได้ไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยครั้งนี้ และสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอนาคตข้างหน้าต่อไป

ท้ายที่สุดผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา คุณตา คุณยาย รวมทั้งขอขอบคุณพี่ น้อง และเพื่อน ๆ ที่ให้การสนับสนุน ช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจตลอดมา

กรรณิการ์ กำลัง

สารบัญ

บทที่	หน้า
1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง.....	1
ความมุ่งหมายของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของการวิจัย.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
สมมติฐานในการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
แบคทีเรียแลกติก.....	4
LAB ที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน.....	12
ไนซิน (Nisin).....	23
การสังเคราะห์ไนซิน.....	25
กลไกการออกฤทธิ์ของไนซิน.....	27
การประยุกต์ใช้ไนซิน.....	28
เพดิโอซิน (Pediocin).....	30
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	31
อุปกรณ์การทดลอง.....	31
วิธีการทดลอง.....	32
4 ผลการทดลอง.....	35
5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง.....	54
บรรณานุกรม.....	56
ภาคผนวก.....	65
ประวัติย่อผู้วิจัย.....	74

บัญชีตาราง

ตาราง	หน้า
1 LAB ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก.....	4
2 กลุ่มของ LAB ที่แบ่งตามผลผลิตที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคส.....	8
3 LAB ที่ผลิตแบคทีริโอซิน.....	12
4 ตัวอย่างสิทธิบัตรการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินในอาหาร.....	21
5 ปริมาณไนซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารชนิดต่าง ๆ.....	28
6 ตัวอย่างการใช้ไนซินในประเทศต่าง ๆ.....	29
7 Antibacterial activity ของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมัก เมื่อทดสอบโดยวิธี agar spot assay.....	36
8 Antibacterial activity ของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมัก เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay.....	43
9 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อ antibacterial activity ของ SC3, SC4 และ SK2 เมื่อใช้ <i>S. aureus</i> เป็นเชื้อทดสอบ.....	47
10 ผลของการให้ความร้อนต่อ antibacterial activity ของ SC3, SC4 และ SK2 เมื่อใช้ <i>S. aureus</i> เป็นเชื้อทดสอบ.....	48
11 ผลของ pH ต่อ antibacterial activity ของ SK2 เมื่อใช้ <i>S. aureus</i> เป็นเชื้อทดสอบ.....	49
12 ผลของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 ต่อแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ.....	50
13 Antibacterial activity ของ SK2 เปรียบเทียบกับ commercial nisin.....	51
14 ลักษณะทางสรีระวิทยาบางประการของ LAB สายพันธุ์ SK2.....	52
15 การจัดจำแนก LAB สายพันธุ์ SK2 ด้วย API 20 Strep	53
16 BaSO ₄ standard หรือ McFarland standard.....	68

บัญชีภาพประกอบ

ภาพประกอบ

หน้า

1	การผลิตกรดแลกติกโดย homofermentative lactic acid bacteria และ heterofermentative lactic acid bacteria.....	9
2	โครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน Z.....	23
3	การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไนซิน.....	25
4	แบบจำลองขั้นตอนการสังเคราะห์ไนซิน.....	26
5	กลไกการทำให้เกิดรูในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยไนซิน.....	27
6	ผลการทดสอบความสามารถของ LAB สายพันธุ์ SK 2 ในการยับยั้ง การเจริญของ <i>S. aureus</i> โดยวิธี agar spot assay.....	46
7	ผลการทดสอบความสามารถของ LAB สายพันธุ์ SK 2 ในการยับยั้ง การเจริญของ <i>S. aureus</i> และ <i>Lb. sakei</i> 912 โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับ commercial nisin	46
8	ลักษณะของ strip สำเร็จรูป API 20 Strep.....	70
9	ผลการจัดจำแนก SK2 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 20 Strep.....	71
10	การเจริญของ LAB สายพันธุ์ SK2 บนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3	72
11	ลักษณะรูปร่างของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมัก.....	73

บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ปัจจุบันผู้บริโภคอาหารได้ให้ความสำคัญ และหันมาสนใจเกี่ยวกับความปลอดภัยของอาหารกันมากขึ้น ดังนั้นจึงได้มีการหาสารกันเสียธรรมชาติ (natural biopreservative) มาใช้แทนสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร (chemical preservative) และแนวทางหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจคือการใช้สารต้านจุลินทรีย์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตอาหารหมัก ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่า มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe, GRAS) ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB) เนื่องจาก LAB สามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์และสารอื่น ๆ ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย และแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนในอาหารได้ (Farias; et al. 1994: 1013-1015) ซึ่งสารต้านจุลินทรีย์ที่สำคัญที่มีการนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร คือ แบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซิน เป็นสารประเภทโปรตีน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินนั้นและแบคทีริโอซินบางชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกก่อโรคอาหารเป็นพิษบางชนิดได้

การค้นพบแบคทีริโอซินจาก LAB มีรายงานครั้งแรกว่า *Lactococcus lactis* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus bulgaricus* ได้ (Rogers. 1928: 321) ต่อมา มีรายงานว่าสารที่ยับยั้งการเจริญของ *Lb. bulgaricus* ได้นี้มีโครงสร้างทางเคมีเป็นเปปไทด์ และตั้งชื่อว่าไนซิน (nisin) (Mattick; & Hirsch. 1947: 5-7) ไนซินเป็นเปปไทด์ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 หน่วย (Gross; & Morrell. 1971: 4634-4635) ซึ่งนอกจากจะยับยั้งการเจริญของ lactobacilli ได้แล้วยังสามารถยับยั้ง streptococci, staphylococci, *Bacillus* spp. และ clostridia ได้อีกด้วย (Lindgren; & Dobrogosz. 1990: 149-163) ในปัจจุบันไนซินได้รับการยอมรับในสหรัฐอเมริกาว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัย (GRAS) (FDA. 1988: 11247) และมีการใช้ไนซินในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดทั่วโลก (Delves-Broughton. 1990: 100-112) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าไนซินสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Clostridium botulinum* (Okereke; & Montville. 1991a: 349-353, 1991b: 3423-3428) และยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในกระบวนการผลิต Camembert cheese (Maisnier-Patin; et al. 1992: 249-263)

ผู้บริโภคส่วนใหญ่ยอมรับว่า LAB เป็น food-grade organisms และแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก LAB เป็น natural antimicrobial substance เนื่องจากมีโครงสร้างเป็นโปรตีน จึงถูกย่อยสลายได้

ในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ (Messens; & de Vuyst. 2002: 31-43) แบคทีเรียโอสินจาก LAB จึงมีแนวโน้มสูงที่จะเป็นที่ยอมรับใช้ในการถนอมอาหาร

ประเทศไทยมีที่ตั้งอยู่ในบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูงและมีอาหารหมักพื้นบ้านหลายชนิดที่เกิดจากกิจกรรมของ LAB ซึ่งส่วนใหญ่มีการผลิตในระดับครัวเรือน โดยอาศัยเชื้อ LAB ที่ปนเปื้อนมาในวัตถุดิบตามธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารหมัก แหล่งผลิต และวิธีการผลิต ดังนั้นจึงมีโอกาที่จะแยกเชื้อ LAB ที่ผลิตแบคทีเรียโอสินได้จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ เหล่านี้ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัยและเป็นแนวทางในการผลิตแบคทีเรียโอสินสำหรับการใช้ในการถนอมอาหารแทนสารเคมีอื่น ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

ความมุ่งหมายของการวิจัย

1. เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์
2. คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารต้านจุลชีพได้
3. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารต้านจุลชีพที่ผลิตได้
4. จำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารต้านจุลชีพได้

ความสำคัญของการวิจัย

ได้แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอสินได้ เพื่อนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) ในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัย และเป็นแนวทางในการนำไปผลิตแบคทีเรียโอสินสำหรับการถนอมอาหารแทนสารเคมีอื่น ซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภค

ขอบเขตของการวิจัย

1. แยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย ประมาณ 50 ตัวอย่าง
2. นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตสารต้านจุลชีพโดยวิธี agar spot assay และ agar well diffusion assay
3. ทดสอบว่าสารที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (indicator strain) เป็นแบคทีเรียโอสิน โดยใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน
4. ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโอสินที่ผลิตได้ โดยทดสอบการทนความร้อน และความคงตัวที่ pH ต่าง ๆ ทดสอบ antibacterial spectrum และศึกษา antibacterial activity เปรียบเทียบกับ commercial nisin

5. จัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลกดึกที่สร้างแบคทีริโอซินได้

สมมติฐานในการวิจัย

แบคทีเรียแลกดึกบางชนิดในอาหารหมักของประเทศไทยสามารถสร้างแบคทีริโอซินยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษบางชนิดได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria, LAB)

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการผลิตอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ทั้งผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ปลา ผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากธัญพืช ซึ่งมนุษย์ได้บริโภคมาเป็นเวลานานแล้ว ดังตัวอย่างในตาราง 1

ตาราง 1 LAB ที่ใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ผลิตภัณฑ์อาหาร	แบคทีเรียแลคติก
Acidophilus milk	<i>Lb. acidophilus</i>
Balao balao	<i>Lactobacillus</i> spp.
Breads	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>S. thermophilus</i>
Bulgarian buttermilk	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Burong dalag	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Butter	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Buttermilk	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leuc. lactis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Cheeses	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Leuconostoc</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp.
Coffee	Various strains

ตาราง 1 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์อาหาร	แบคทีเรียแลกติก
Crackers	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Cucumber (pickles)	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Cured ham	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Distillery mashes	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
Dosa	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Feed additives	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. reuteri</i>
Fermented fish products	Various strains
Fermented milks	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. bifidus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Gari	<i>Leuconostoc</i> spp.
Green olives	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Idli	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Izushi	<i>Lactobacillus</i> spp.
Kefir	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Kenkey	<i>Lactobacillus</i> spp.
Kimchi	Various strains
Kishk	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Kisra	<i>Lactobacillus</i> spp.
Koumiss	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>

ตาราง 1 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์อาหาร	แบคทีเรียแลกติก
Lactic butter	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Lebanon bologna	<i>P. acidilactici</i>
Magon	<i>Lactobacillus</i> spp.
Miso	<i>Lactobacillus</i> spp.
Ogi	<i>Lb. plantarum</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>
Probiotics	<i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. casei</i>
Pulque	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Leuconostoc</i> spp.
Puto	<i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>E. faecalis</i>
Sauerkraut	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Sausages , meats	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. curvatus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. sake</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>P. acidilactici</i>
Shoyu	<i>Lactobacillus</i> spp.
Silage starters	<i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i>
Sour bread	<i>Lb. sanfrancisco</i> , <i>Lb. brevis</i>
Sour cream	<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Sour pumpernickel	<i>Leuc. mesenteroides</i>
Soy sauce	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>delbrueckii</i>
Sweet dough	<i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Taette	<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>taette</i>
Tempeh	<i>Lactobacillus</i> spp.
Wine	<i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. hilgardii</i> , <i>P. damnosus</i> , <i>Leuc. mesenteroides</i> , <i>Leuc. oenos</i>

ตาราง 1 (ต่อ)

ผลิตภัณฑ์อาหาร	แบคทีเรียแลคติก
Yoghurt	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>

หมายเหตุ: *Lb.* = *Lactobacillus*, *Leuc.* = *Leuconostoc*, *S.* = *Streptococcus*,
P. = *Pediococcus*, *L.* = *Lactococcus*, *E.* = *Enterococcus*

ที่มา: De Vuyst; & Vandamme. (1994). *Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. pp. 3-4.

เมแทบอลิท์ที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก

กรดแลคติก กรดที่เกิดขึ้นเมื่อมีการสะสมมากขึ้นจะทำให้ค่า pH ลดลง ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมบวก และแกรมลบ โดยกรดแลคติกสามารถแทรกผ่านเข้าไปภายในเซลล์จุลินทรีย์ซึ่งมีค่า pH สูงกว่าภายนอกเซลล์ ทำให้กรดแลคติกเกิดการแตกตัว และไฮโดรเจนไอออนที่เกิดขึ้นจะไปมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมต่าง ๆ ภายในเซลล์ (Baird-Parker. 1980: 126-135)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เนื่องจาก LAB ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสที่สามารถสลาย H_2O_2 ได้ จึงทำให้เกิดการสะสม H_2O_2 ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิด (Condon. 1987: 269-280) โดยทำให้เกิดการออกซิไดซ์อย่างรุนแรง ซึ่งมีผลต่อไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้ไม่สามารถควบคุมการผ่านเข้าออกของสารได้ นอกจากนี้ยังมีผลทำลายโครงสร้างของกรดนิวคลีอิกและโปรตีนที่อยู่ภายในเซลล์ (Dahl; Midden; & Hartman. 1989: 2188-2194; Piard; & Desmazeaud. 1991: 525-541)

คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) สร้างขึ้นจากการหมักแบบ heterolactic มีผลเสียต่อการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน โดยมีกลไกการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจน ทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ ส่งผลให้ pH ทั้งภายในและภายนอกเซลล์ลดลง ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เสื่อมสภาพ (Eklund.1984: 179-185)

ไดอะเซทิล (diacetyl) เป็นผลผลิตจากการสลาย citrate ไดอะเซทิลเป็นสารที่ให้กลิ่นรสในเนยและผลิตภัณฑ์นมหมักอื่น ๆ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก โดยไดอะเซทิลจะเข้าไปจับกับ arginine-binding protein ทำให้แบคทีเรียแกรมลบไม่สามารถใช้อาร์จินีนได้ (De Vuyst; & Vandamme. 1994: 104-106)

แบคทีเรียโอซิน เป็นสารประเภทโปรตีนซึ่งยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับ LAB ที่สร้างแบคทีเรียโอซินนั้น และยับยั้งจุลินทรีย์บางชนิดที่ทำให้อาหารเสียและทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ

ประเภทของ LAB

LAB สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม ตามผลผลิตที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคส คือ homofermentative และ heterofermentative LAB ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง 2 กลุ่มของ LAB ที่แบ่งตามผลผลิตที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคส

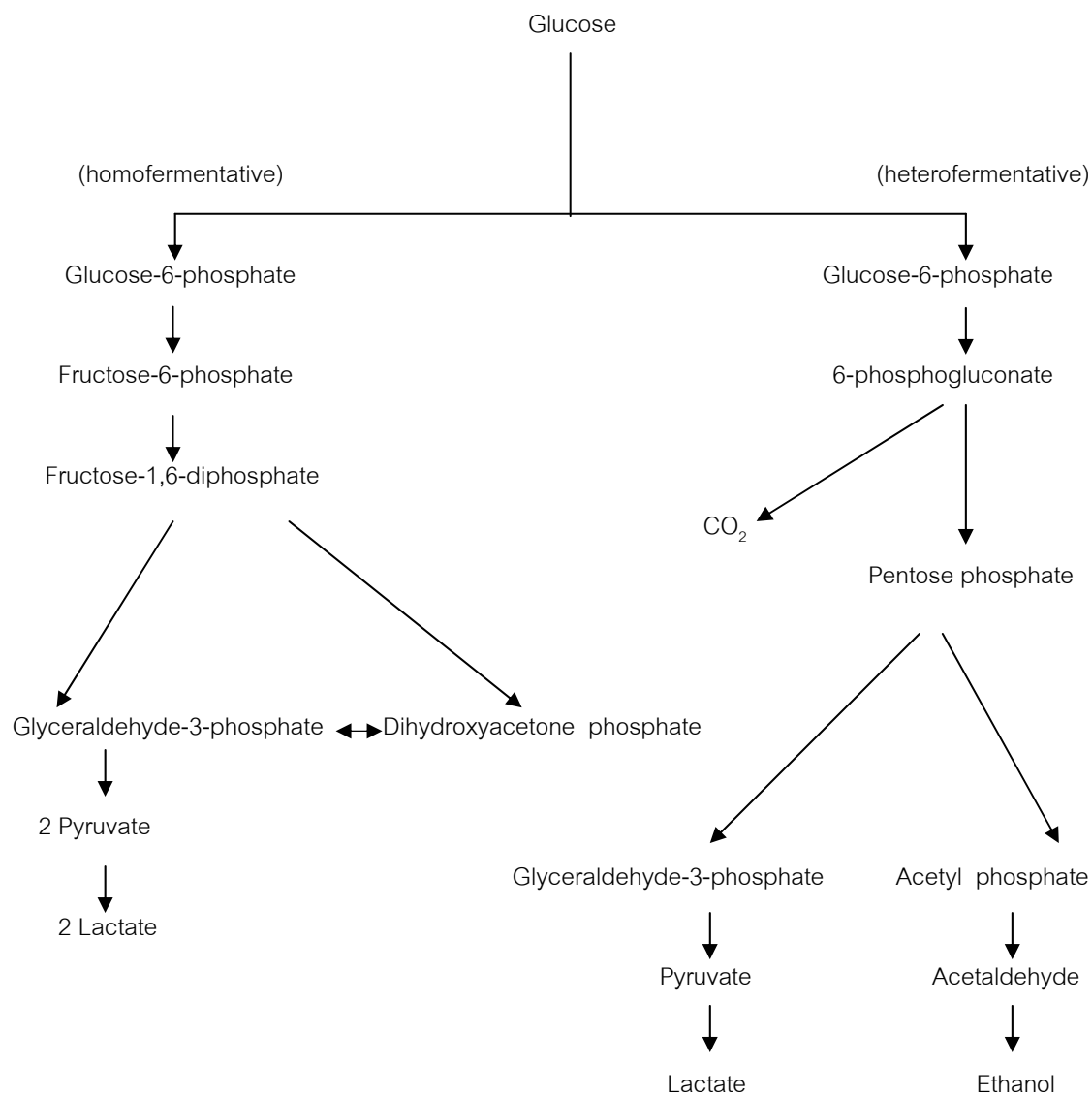
Fermentation type	Main products	Lactate isomer	Organism
Homofermentative	Lactate	L(+)	<i>Lactobacillus bavaricus</i> , <i>Enterococcus faecalis</i>
Homofermentative	Lactate	DL , L(+)	<i>Pediococcus</i> <i>pentosaceus</i>
Homofermentative	Lactate	D(-) , L(+) , DL	<i>Lactobacillus plantarum</i>
Heterofermentative	Lactate, ethanol, CO ₂	DL	<i>Lactobacillus brevis</i>
Heterofermentative	Lactate, ethanol, CO ₂	D(-)	<i>Leuconostoc</i> <i>mesenteroides</i>

ที่มา: Forsythe. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. p. 123.

Homofermentative LAB เป็น LAB กลุ่มที่ย่อยสลายน้ำตาลผ่าน Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) pathway แล้วให้กรดแลกติกเป็นผลผลิตหลัก มีกรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้นบ้างเล็กน้อย LAB ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* และ lactobacilli บางชนิด

Heterofermentative LAB เป็น LAB กลุ่มที่ย่อยสลายน้ำตาลผ่าน Phosphoketolase pathway แล้วให้กรดแลกติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน LAB ในกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc* และ lactobacilli บางชนิด

วิธีเมแทบอลิซึมในการหมักน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลกติก แสดงในภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 การผลิตกรดแลกติกโดย homofermentative lactic acid bacteria และ heterofermentative lactic acid bacteria

ที่มา: Forsythe. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. p. 124.

สมบัติและลักษณะต่าง ๆ ของ LAB ที่สำคัญ

Streptococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร มักพบอยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะตะเลส ส่วนใหญ่เจริญในที่ที่มีออกซิเจนหรือไม่มีก็ได้ (facultative anaerobe) แต่บางชนิดต้องการคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อการเจริญ และบางชนิดก็เป็นพวกที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ (strictly anaerobe) ได้พลังงานจากการออกซิโดรีดักชันอินทรีย์ (chemoorganotroph) หมักคาร์โบไฮเดรตได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ ไม่ผลิตก๊าซ จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative LAB บางสายพันธุ์จะหมักกรดอินทรีย์ เช่น มาลิก และ ซิตริก และหมักกรดอะมิโน เช่น ซีรีน และ อาร์จินีน มีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37°C ไม่เจริญที่ 10°C แต่เจริญที่ 45°C มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 34-46 โมลเปอร์เซ็นต์ (Sneath; et al. 1986: 1043)

Leuconostoc เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลม แต่ส่วนใหญ่จะเป็นรูปเลนส์ (lenticular) มักพบอยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะตะเลส เจริญในที่ที่มีออกซิเจนหรือไม่มีก็ได้ โคโลนีขนาดเล็ก เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร ขอบเรียบ กลม สีเทาขาว อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ 20-30°C เป็นพวกที่ได้พลังงานจากการออกซิโดรีดักชันอินทรีย์ ต้องการอาหารที่ซับซ้อน และต้องการกรดอะมิโน กรดนิโคตินิก ไทอามีน และไบโอติน ในการหมักคาร์โบไฮเดรตจะให้เอทานอล และ D(-) lactic acid จัดอยู่ในกลุ่ม heterofermentative LAB มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 38-44 โมลเปอร์เซ็นต์ (Sneath; et al. 1986: 1071)

Pediococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลม มักพบอยู่เป็นคู่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะตะเลส เจริญในที่ที่มีออกซิเจนหรือไม่มีก็ได้ โคโลนีเส้นผ่าศูนย์กลางขนาด 1.0-2.5 มิลลิเมตร ขอบเรียบ กลม สีเทาขาว อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ 25-40°C เป็นพวกที่ได้พลังงานจากการออกซิโดรีดักชันอินทรีย์ ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน และต้องการกรดอะมิโน กรดนิโคตินิก กรดแพนโทนิค และไบโอติน ในการหมักคาร์โบไฮเดรตจะให้ DL หรือ L-(+) lactate แต่ไม่สร้างก๊าซ มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 34-42 โมลเปอร์เซ็นต์ (Sneath; et al. 1986: 1075)

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างท่อน ส่วนมากจะเป็นท่อนยาวต่อกันเป็นสาย ไม่สร้างสปอร์ มีทั้งที่เป็น homofermentative และ heterofermentative LAB เจริญได้ดีในที่ที่มีออกซิเจนน้อย (microaerophilic) ไม่สร้างเอนไซม์อะตะเลส แต่อาจพบการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์อะตะเลส (pseudocatalase) ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน เช่น กรดอะมิโน เปปไทด์ กรดนิโคตินิก วิตามิน เกลือ กรดไขมัน สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 2-53°C แต่อุณหภูมิ

ที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30-40°C pH ที่เหมาะสม 5.5-6.2 มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ (Sneath; et al. 1986: 1209-1210)

Lactococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเซลล์ 0.5-1.2×0.5-1.5 ไมโครเมตร มักพบเป็นคู่หรือต่อเป็นสายสั้น ๆ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่มีแคปซูล และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ส่วนใหญ่เจริญในที่ที่มีออกซิเจนหรือไม่มีก็ได้ เป็นพวกที่ได้พลังงานจากการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ ในการหมักคาร์โบไฮเดรตจะให้ L-(+)lactic acid แต่ไม่สร้างก๊าซ จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative LAB ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 30°C สามารถเจริญได้ที่ 10°C แต่ไม่เจริญที่ 45°C (Buchanan; & Gibbons. 1974: 528-529) มีปริมาณของเบส G+C 38.5 โมลเปอร์เซ็นต์ (Williams; Fryer; & Collins. 1990: 109)

Enterococcus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเซลล์ 0.6-2.0×0.6-2.5 ไมโครเมตร มักพบเป็นคู่หรือต่อเป็นสายสั้น ๆ เคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลา ไม่สร้างเอนโดสปอร์ ไม่มีแคปซูล และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เจริญในที่ที่มีออกซิเจนหรือไม่มีก็ได้ เป็นพวกที่ได้พลังงานจากการออกซิไดซ์สารอินทรีย์ ในการหมักคาร์โบไฮเดรตจะให้ L-(+) lactic acid แต่ไม่สร้างก๊าซ จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative LAB ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญคือ 37°C เจริญได้ที่ pH 9.6 และในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และเกลือน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์ (Buchanan; & Gibbons. 1974: 528) มีปริมาณของเบส G+C ระหว่าง 38-42 โมลเปอร์เซ็นต์ (Fontana; Cellini; & Dainelli. 1993: 2108)

LAB ที่ผลิตแบคทีริโอซิน

LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักหลายชนิด สามารถผลิตแบคทีริโอซินซึ่งเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ LAB ชนิดที่สร้างแบคทีริโอซินนั้น รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสีย และทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus* spp., *Clostridium botulinum*, *Enterococcus* spp. และ *Bacillus* spp. ตัวอย่าง LAB ที่ผลิตแบคทีริโอซิน แสดงในตาราง 3

ตาราง 3 LAB ที่ผลิตแบคทีริโอซิน

Producing microorganism	Bacteriocin (like) compound
<i>Lactococcus</i> (L)	
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	
ATCC 11454	nisin A
NIZO 22186	nisin Z
10	lactostrepcin 1
300	lactostrepcin 2 and 3
71	lactostrepcin 4
6F3	Bac V , VI and VII
CNRZ 481	lacticin 481
DRC1	dricin
ADRIA 85LO30	lactococcin DR
<i>L. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i>	
6F7	Bac VIII
WM4	Bac WM4
<i>L. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>	
346	diplococcin
202	lactostrepcin 5

ตาราง 3 (ต่อ)

Producing microorganism	Bacteriocin (like) compound
9B4, 4G6	Bac I , II, III and IV
LMG 2130	lactococcin A
9B4	lactococcin A ,B and M
LMG2081	lactococcin G
<i>Lactobacillus (Lb)</i>	
<i>Lb. acidophilus</i>	
(not specified)	lactocidin
DDS1	acidophilin
2181	acidolin
N2	lactacin B
11088	lactacin F
M46	bacteriocin M46
LAPT 1060	acidophilucin A
TK8912	acidocin 8912
<i>Lb. bavaricus</i>	
MI401	bavaricin A
<i>Lb. brevis</i>	
(not specified)	lactobrevin
B37	brevicin 37
<i>Lb. casei</i>	
B80	caseicin 80
LHS	caseicin LHS
<i>Lb. curvatus</i>	
LTH 1174	curvacin A
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>	
DDS 14	bulgarican

ตาราง 3 (ต่อ)

Producing microorganism	Bacteriocin (like) compound
<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i>	
(not specified)	lactobacillin
JCM 1106, JCM 1107	lacticin A
JCM 1248	lacticin B
<i>Lb. fermentum</i>	
466	bacteriocin 466
<i>Lb. gasseri</i>	gassericin A
<i>Lb. helveticus</i>	
LP27	lactocin 27
481	helveticin J
1829	helveticin V-1829
<i>Lb. plantarum</i>	
A2	lactolin
NCDO 1193	plantacin B
C-11	plantaricin A
BN	plantacin BN
LPCO-10	plantaricin S
MI 406	plantaricin 406
<i>Lb. reuteri</i>	
LA6	reuterin 6
<i>Lb. sake</i>	
Lb 706	sakacin A
L45	lactocin S
LTH 673	sakacin P
<i>Carnobacterium</i> (C)	
<i>C. piscicola</i>	
LV17	carnobacteriocin A, B1 and B2

ตาราง 3 (ต่อ)

Producing microorganism	Bacteriocin (like) compound
LV61	piscicolin 61
UI49	carnocin UI49
<i>Pediococcus</i> (P)	
<i>P. acidilactici</i>	
H, E, F, M	pediocin Ach
PAC 1.0	pediocin PA-1
JD1-23	pediocin JD
SJ-1	pediocin SJ-1
<i>P. pentosaceus</i>	
FBB-61, L-7230	pediocin A
N5p	pediocin N5p
<i>Leuconostoc</i> (Leuc)	
<i>Leuc. carnosum</i> Lm1	leuconocin Lcm1
<i>Leuc. gelidum</i>	
UAL 187	leucocin A-UAL 187
<i>Leuc. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	
UL5	mesenterocin 5
Y105	mesentericin Y105
FR52	mesenterocin 52
<i>Leuc. paramesenteroides</i>	
OX	leuconocin S
<i>Streptococcus</i> (S)	
<i>S. thermophilus</i>	
STB40	bacteriocin STB40
St10	bacteriocin St10
SFi13	thermophilin 13

ตาราง 3 (ต่อ)

Producing microorganism	Bacteriocin (like) compound
<i>Enterococcus</i> (E)	
<i>E. faecalis</i>	
S-48	bacteriocin Bc-48
226	enterocin 226 NWC
<i>E. faecium</i>	
DPC 1146	enterocin 1146
<i>Enterococcus</i> spp.	enterococcins (I-V)

ที่มา: De Vuyst; & Vandamme. (1994). *Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. pp. 110-112.

นอกจากนี้ยังมีรายงานการค้นพบ LAB อีกหลายชนิดที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ เช่น ฮาสติงส์ และคนอื่น ๆ (Hastings; et al. 1994: 75-81) รายงานว่าแยกได้ *Leuconostoc gelidum* UAL 187, *Leuconostoc paramesenteroides* La7a, *Leuconostoc carnosum* Ta11a และ *Leuconostoc carnosum* La54a จากเนื้อ LAB เหล่านี้สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ที่อุณหภูมิต่ำ (refrigeration temperatures) ในช่วง pH 4-7 แบคทีริโอซินที่ผลิตได้นี้สามารถทนความร้อนได้ดีในสภาวะที่เป็นกรด และยับยั้ง *Listeria monocytogenes* รวมทั้ง LAB อื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำให้น้ำเน่าเสีย

อินาน และคนอื่น ๆ (Enan; et al. 1996: 189-215) รายงานว่า *Lactobacillus plantarum* UG1 ที่แยกได้จาก dry sausage สามารถผลิต plantaricin UG1 ปริมาณมากในระยะ exponential ถึง early stationary phase เมื่อเลี้ยงใน MRS broth ที่ pH 6.5 อุณหภูมิ 25-30°C และจากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของ plantaricin UG1 พบว่ามีความคงตัวที่ pH 4.5-7.0 ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ α -amylase และ dextranase สามารถยับยั้ง *Lactobacillus*, *Lactococcus* และจุลินทรีย์ก่อโรคทางอาหารบางชนิด เช่น *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* และ *Clostridium sporogenes*

ออสเตอร์การ์ด (Ostergaard. 1998: 223-233) รายงานว่าแยก LAB จากผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทยได้ 4,150 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการผลิตแบคทีริโอซินโดยวิธี agar overlay พบว่ามี 58 ไอโซเลท ที่ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ในจำนวนนี้มี LAB ที่สามารถยับยั้ง *Vibrio cholerae* และ *V. parahaemolyticus* ได้ 44 ไอโซเลท ยับยั้ง *Listeria monocytogenes* ได้ 43 ไอโซเลท และยับยั้ง *Aeromonas* sp. ได้ 37 ไอโซเลท และเมื่อนำไปจัดจำแนกพบว่าเป็น *Lactobacillus* spp. ทุกไอโซเลท ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37°C และทนโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ได้

มอริโพร และคนอื่น ๆ (Moretro; et al. 2000: 536-545) รายงานว่า *Lactobacillus sakei* CCUG 42687 สามารถเจริญและผลิต sakacin P ได้ที่อุณหภูมิ 4-30°C แต่จะผลิต sakacin P ได้ปริมาณมากที่อุณหภูมิประมาณ 20°C เมื่อเลี้ยงใน completely defined medium DML-B (0.3% Tween-80) ในถังหมักที่ควบคุม pH 6.3 และความเข้มข้นของ sakacin P จะลดลงระหว่าง late growth และ stationary phase ที่อุณหภูมิสูง และ pH ต่ำ

ลี และเพค (Lee; & Paik 2001: 17-24) รายงานว่า *Lactococcus lactis* NK 24 สามารถผลิต lacticin NK 24 ในระหว่าง mid-log phase จนถึง maximum early stationary phase แต่ปริมาณจะลดลงหลัง late stationary phase และจากการศึกษาสมบัติของ lacticin NK 24 พบว่ามีความคงตัวที่ pH 2.0-9.0 ทนความร้อน 100°C 30 นาที แต่ถูกทำลายได้โดย protease IX หรือ protease XIV สามารถยับยั้ง *Leuconostoc mesenteroides* KCCM 11324 รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและไม่ก่อโรคอื่น ๆ

ดี มาร์ตินิส และฟรีทาส (De Martinis; & Freitas 2003: 197-200) รายงานว่าแยก LAB จากผลิตภัณฑ์เนื้อจากประเทศบราซิล ได้ 3 ไอโซเลท คือ *Enterococcus* sp. 18, *Leuconostoc* sp. 20 และ *Lactobacillus sakei* 29 เมื่อนำไปทดสอบการผลิตแบคทีริโอซินโดยวิธี agar overlay พบว่า *Leuconostoc* sp. 20 และ *Lactobacillus sakei* 29 สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Brochothrix thermosphacta*, *Enterobacter* sp., *Salmonella* sp. หรือ *Escherichia coli*

หนูนักดี และคนอื่น ๆ (Noonpakdee; et al. 2003: 137-145) รายงานว่าแยก LAB จากแฮม ได้ 14,020 ไอโซเลท และคัดเลือกได้ *Lactococcus lactis* WNC 20 ซึ่งสามารถผลิตโนซินยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* และจากการศึกษาสมบัติของโนซินที่ผลิตได้พบว่าทนความร้อน 121°C 15 นาที ทน pH ในช่วง 2-10 และถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ α -chymotrypsin และ proteinase k

ดีราซ และคนอื่น ๆ (Deraz; et al. 2005: 343-354) รายงานว่า acidocin D 20079 ที่ผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C 30 นาที และทำงานได้ในช่วง pH กว้าง มีความไวต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เช่น trypsin, ficin, pepsin, papain และ proteinase k และมี narrow inhibitory spectrum โดยยับยั้ง *Lactobacillus sakei* NCDO 2714 ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของเนื้อที่เก็บในสภาพสุญญากาศ การผลิต acidocin D 20079 จะสูงสุดเมื่อเลี้ยง *Lb. acidophilus* DSM 20079 ใน MRS broth ที่ pH 6.0

การจัดจำแนกชนิดของแบคทีริโอซิน

แบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นจาก LAB สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่มโดยพิจารณาจากชนิดของกรดอะมิโน โมเลกุลโมเลกุล โครงสร้างพื้นฐาน และสมบัติอื่น ๆ เช่น การทนความร้อน

Class I : lantibiotics

แบคทีริโอซินกลุ่มนี้มีขนาดเล็ก ประกอบด้วยเปปไทด์ 1 หรือ 2 โมเลกุล มีจำนวนกรดอะมิโนระหว่าง 19-38 หน่วย เป็นแบคทีริโอซินที่ทนความร้อน และที่เรียก lantibiotics เนื่องจากมีการดัดแปลงกรดอะมิโนบางตัวหลังการแปลรหัส (post-translational modification) ก่อนที่จะส่งออกภายนอกเซลล์ ทำให้ในสายเปปไทด์มีกรดอะมิโนที่แตกต่างจากกรดอะมิโนที่พบทั่วไป เช่น didehydrobutyrine และ didehydroalanine ซึ่งเกิดจากปฏิกิริยา dehydration ของ threonine และ serine ตามลำดับ นอกจากนี้ยังประกอบด้วยวงแหวนที่ชื่อ lanthionine และ β -methylanthionine ที่เชื่อมด้วย thioether bridge (Skaugen; et al. 1994: 27183-27185; Ryan; et al. 1999a: 37544-37550, 1999b: 71-77)

lantibiotics แบ่งย่อยได้เป็น 2 กลุ่มขึ้นอยู่กับโครงสร้าง ได้แก่ **Type A** มีลักษณะโมเลกุลยาว บิดเป็นเกลียว และยืดหยุ่นได้ มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2– 5 kDa ตัวอย่างเช่น ไนซิน ซึ่งจะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียอื่น ส่วน **Type B** มีลักษณะโมเลกุลเป็นก้อน มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 2 kDa ไม่มีประจุ หรือมีประจุสุทธิเป็นลบ (Altena; et al. 2000 : 2565-2571) ตัวอย่าง เช่น mersacidin และ actagardine ซึ่งจะมีผลไปรบกวนเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ผนังเซลล์ในแบคทีเรียแกรมบวก (Sahl; Jack; & Bierbaum. 1995 : 827-853)

Class II : unmodified bacteriocins

แบคทีริโอซินกลุ่มนี้เป็นเปปไทด์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 10 kDa ประกอบด้วยกรดอะมิโน 20-60 หน่วย เป็นแบคทีริโอซินที่ทนความร้อน แบ่งย่อยได้เป็น 2 กลุ่มคือ แบคทีริโอซินที่คล้ายเพติโอซิน

(pediocin-like bacteriocin) และแบคทีริโอซินที่ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สาย (two-peptide bacteriocin)

Pediocin-like bacteriocin ผลิตโดย LAB ที่หลากหลาย มีลำดับกรดอะมิโนที่คล้ายกัน ประมาณ 40-60 เปปไทด์ ที่ปลายด้าน N (N-terminal) ในสายเปปไทด์ของแบคทีริโอซินแต่ละชนิด ในกลุ่มนี้จะมีลำดับของกรดอะมิโนที่เป็นลักษณะจำเพาะเหมือนกัน (conserved N-terminal sequence) ได้แก่ Tyr-Gly-Asn-Gly-Val และมีการสร้างพันธะไดซัลไฟด์ระหว่างกรดอะมิโนซิสเทอีน 2 โมเลกุลที่อยู่ก่อนมาทางปลายด้าน N ของสายเปปไทด์ (Klaenhammer. 1993: 39-85) เปปไทด์ กลุ่มนี้สามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria* ได้ดี ตัวอย่างเช่น sakacin A, pediocin PA-1 (Henderson; Chopko; & Van Wassenaar. 1992: 5-12; Holck; et al. 1992: 2715-2720), acidocin B (Leer; et al. 1995: 1629-1635), sakacin P (Tichaczek; et al. 1992 : 460-468), leucocin A (Hastings; et al. 1991: 7491-7500), mesentericin Y105 (Hechard; et al. 1992: 2725-2731), carnobacteriocin BM1 และ B2 (Quadri; et al. 1994: 12204-12221), enterocin A (Aymerich; et al. 1996: 1676-1682) และ piscicollin 126 (Jack; et al. 1996: 2897-2903) อย่างไรก็ตามแม้ว่าแบคทีริโอซินเหล่านี้จะมีโครงสร้างปฐมภูมิลำดับคล้ายกัน แต่มีความจำเพาะต่อเซลล์เป้าหมายต่างกัน (Fimland; et al. 1996: 3313-3318) เนื่องจากบริเวณปลาย C (C-terminal) จะเป็นส่วนที่ทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการรั่ว (Chikindas; et al. 1993: 3577-3584)

two-peptide bacteriocin แต่ละเปปไทด์มีกรดอะมิโนแตกต่างกัน 25-40 หน่วย ปกติจะสร้างเป็น prepeptide ในเซลล์ หลังจากนั้นจะถูกตัดที่ปลาย N (N-terminal leader) บริเวณ specific double glycine ของแต่ละเปปไทด์ ได้เป็น mature bacteriocin ซึ่งจะถูกส่งออกนอกเซลล์โดยไม่มีการดัดแปลงกรดอะมิโน (Garneau; Martin; & vederas. 2002: 577-592; Higgins. 1992: 67-113; Buchman; Banerjee; & Hansen. 1988: 16260-16266 , Kaletta; et al. 1989: 16-19) ตัวอย่างเช่น lactococcin G

Lactococcin G ผลิตโดย *Lactococcus lactis* เป็นแบคทีริโอซินชนิดแรกที่พบว่าประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สาย มีกลไกในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้โดยแอลฟาและเบต้าเปปไทด์ของ lactococcin G จะเข้าไปเกาะที่ช่องที่มีความจำเพาะต่อการส่งผ่านโพแทสเซียม (potassium-selective channel) ในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย ทำให้ช่องดังกล่าวขยายกว้างขึ้น เป็นผลให้เซลล์สูญเสียโพแทสเซียมออกมานอกเซลล์อย่างรวดเร็ว และทำให้เซลล์ตายในที่สุด (Moll; et al. 1996: 600-605)

นอกจาก lactococcin G แล้ว ยังมีรายงานพบว่าพบแบคทีริโอซินที่ประกอบด้วยเปปไทด์ 2 สายอื่น ๆ อีก เช่น ABP-118 (*Lactobacillus salivarius*), brochocin-C (*Brochothrix campestris*), enterocins 1071 และ L50 (*Enterococcus* spp.), lactacins F และ 705 (*Lactobacillus* spp.), leucocin H (*Leuconostoc* spp.), mutacin IV (*Streptococcus mutans*), plantaricin EF, JK และ S (*Lactobacillus plantarum*) (Papagianni. 2003: 481-482)

Class III : large heat-labile bacteriocin

แบคทีริโอซินกลุ่มนี้มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 30 kDa ประกอบด้วยโปรตีนที่ไม่ทนความร้อน (heat-labile protein) ตัวอย่างแบคทีริโอซินในกลุ่มนี้ ได้แก่ helvetin J ผลิตโดย *Lactobacillus helveticus* (Joerger; & Klaenhammer. 1986: 439-446) และ enterolysin ผลิตโดย *Enterococcus faecium* (Nilson. 1999)

Class IV :

แบคทีริโอซินกลุ่มนี้มีโครงสร้างแตกต่างจาก 3 กลุ่ม ที่กล่าวมาแล้ว คือนอกจากจะมีโปรตีนเป็นส่วนประกอบหลักแล้วยังมีสารอื่น ๆ เช่น ไขมัน หรือคาร์โบไฮเดรต

การประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินในอาหาร

ปัจจุบันมีการจดสิทธิบัตรการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินในอาหารชนิดต่าง ๆ จำนวนมาก ดังตัวอย่างในตาราง 4

ตาราง 4 ตัวอย่างสิทธิบัตรการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินในอาหาร

Author / US Patent	Patent Title	Use
Vandenbergh et al. / 5,817,362 (10.06.98)	Method for inhibiting bacteria using a novel lactococcal bacteriocin	A method for inhibiting Gram-positive bacteria in foods by using a novel bacteriocin produced by <i>Lac. lactis</i> NRRL-B-18535
Blackburn et al. / 5,753,614 (05.19.98)	Nisin compositions for use as enhanced, broad range bactericides	Combination of nisin, a chelating agent and a surfactant to inhibit both Gram-positive and Gram-negative microorganism in meat, eggs, cheese and fish, use as food preservative
Wilhoit / 5,573,801 (11.12.96)	Surface treatment of foodstuffs with antimicrobial compositions	Use of Streptococcus-derived or Pediococcus-derived bacteriocins in combination with a chelating agent to protect food against <i>Listeria</i>
Vedamuthu / 5,445,835 (08.29.95)	Method of producing a yogurt product containing bacteriocin PA-1	A yogurt product with increased shelf life containing a bacteriocin derived from a <i>P. acidilactici</i>
Boudreaux et al. / 5,219,603 (06.15.93)	Composition for extending the shelf life of processed meats	Use of a bacteriocin from <i>P. acidilactici</i> and a propionate salt to inhibit bacterial growth and to extend shelf life of raw and processed meat

ตาราง 4 (ต่อ)

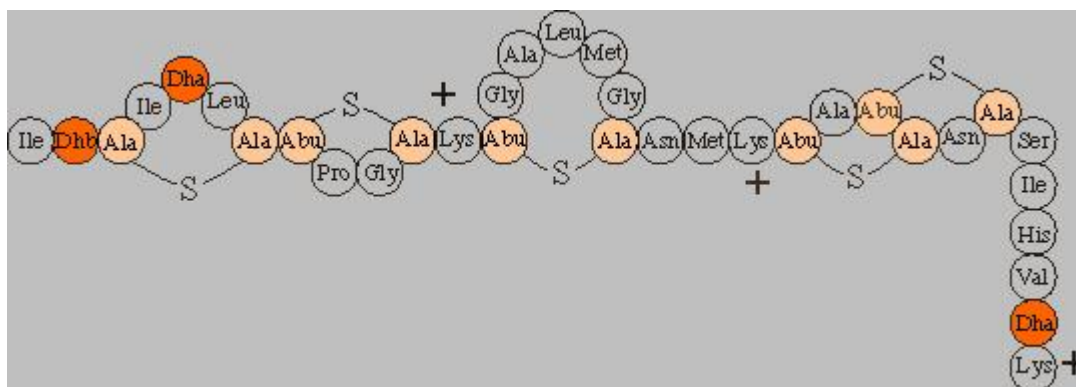
Author / US Patent	Patent Title	Use
Hutkins et al. / 5,186,962 (02.16.93)	Composition and method for inhibiting pathogens and spoilage organisms in foods	Use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria to inhibit growth of food-born pathogens
Collison et al. / 5,015,487 (05.14.91)	Use of lanthionines for control of post-processing contamination in processed meat	Inhibiting the contamination of processed meat products by pathogenic or spoilage microorganisms by treating the surface of the meat product with a lantibiotic
Vandenbergh et al. / 4,929,445 (05.29.90)	Method for inhibiting <i>L. monocytogenes</i> using a bacteriocin	Inhibition of <i>L. monocytogenes</i> by a bacteriocin product by <i>P. acidilactici</i>
Gonzalez / 4,883,673 (11.28.89)	Method for inhibiting bacterial spoilage and resulting compositions	Inhibition of food spoilage microorganisms in salads and salad dressings by a bacteriocin from <i>P. acidilactici</i>
Matrozza et al. / 4,790,994 (12.13.88)	Method for inhibiting psychrotrophic bacteria in cream or milk based products using a pediococcus	Inhibition of bacterial growth in cottage cheese by a bacteriocin-producing <i>P. pentosaceus</i> cells

ที่มา: Cleveland. (2001). Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 4.

อย่างไรก็ตามมีเพียงไนซินชนิดเดียวเท่านั้นที่ได้รับการยอมรับ และใช้ในการถนอมอาหารอย่างกว้างขวาง เนื่องจากแบคทีเรียอื่นที่มีการค้นพบแต่ละชนิดจะมีข้อจำกัดต่าง ๆ กัน เช่น ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่น ความคงตัวต่ออุณหภูมิและ pH รวมทั้งความสามารถในการละลาย (O'Sullivan; Ross; & Hill. 2002: 593-604)

ไนซิน (Nisin)

เป็นแบคทีเรียโชนชนิดเดียวที่นิยมใช้ในทางการค้าอย่างแพร่หลาย ผลิตโดย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ประกอบด้วยกรดอะมิโน 34 หน่วย (Shiba; et al. 1991: 113-122) มี lanthionine 1 หน่วย และ β -methyllanthionine 4 หน่วย ดังแสดงในภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 โครงสร้างปฐมภูมิของไนซิน z

หมายเหตุ: สีส้มอ่อน = lanthionine residues, สีส้มเข้ม = dehydrated residues,

Dha = didehydroalanine, Dhb = didehydrobutyrine,

Ala-S-Ala = lanthionine, Abu-S-Ala = β -methyllanthionine

ที่มา: Kramer. (2005). *Sensitivity and resistance of pathogenic bacteria for nisin*. (Online).

ไนซินมีประจุสุทธิเป็นบวก มีทั้งส่วนที่ชอบน้ำและไม่ชอบน้ำ (amphiphilic) โดยที่ปลาย N เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) และที่ปลาย C เป็นส่วนที่ชอบน้ำ (hydrophilic) (De Vuyst; & Vandamme. 1994: 163) ไนซินแบ่งออกได้เป็น ไนซิน A และไนซิน Z

โนซิน Z ถูกผลิตจาก *L. lactis* subsp. *lactis* NIZO 22186 (Mulders; et al. 1991: 581-584) ซึ่งจะต่างจากโนซิน A ที่กรดอะมิโนตำแหน่ง 27 โดยเป็นฮิสทีดินในโนซิน A และแอสพาราจีนในโนซิน Z

โนซินสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เนื่องจาก โนซินจะไปมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวก แต่ในแบคทีเรียแกรมลบจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ที่มี LPS (lipopolysaccharide) เป็นส่วนประกอบจึงมีความต้านทานต่อโนซิน ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (Abee; Krockel; & Hill. 1995: 169-185; Sahl; Jack; & Bierbaum. 1995: 827-853; Ray. 1993: 285-291; Venema; & Kok. 1995: 299-304) แต่ก็มีรายงานว่าโนซินสามารถยับยั้ง *Salmonella* sp. และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ เมื่อใช้ร่วมกับ chelating agent เช่น EDTA ซึ่งจะไปรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย ทำให้เซลล์มีความไวต่อแบคทีริโอซินมากขึ้น (Blackburn; et al. 1989; Stevens; et al. 1991: 3613-3615) นอกจากนี้ *E.coli* จะไวต่อโนซิน เมื่อเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกถูกทำลาย (Kordel; & Sahl. 1986: 139-144) ความสามารถในการยับยั้ง และค่าความเข้มข้นที่น้อยที่สุดในการยับยั้งของโนซิน Z เมื่อเทียบกับโนซิน A ใกล้เคียงกัน (Hugenholtz; & De Veer. 1991: 440-447)

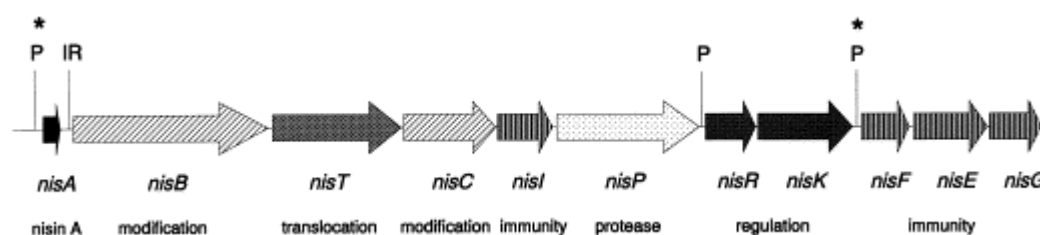
โนซินไม่ละลายในสภาวะที่เป็นกลางและเบส (Hirsch. 1951: 208-221; Hall. 1966: 461-464; Hurst. 1981: 85-123; Liu; & Hansen. 1990: 2551-2558) มีรายงานว่า การละลายจะอยู่ในช่วง 57.0 mg/ml ที่ pH 2.0 , ประมาณ 1.5 mg/ml ที่ pH 6.0 และจะลดลงเหลือ 0.25 mg/ml ที่ pH 8.5 (Liu; & Hansen. 1990: 2551-2558) แต่โนซิน Z จะละลายได้ดีกว่า โนซิน A ที่ pH สูงขึ้น เนื่องจากมีแอสพาราจีน ซึ่งรวมตัวกับน้ำได้ดีกว่าเมื่อเทียบกับฮิสทีดินในโนซิน A (Kuipers; et al. 1991: 250-259)

โนซินสามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 115.6°C ที่ pH 2.0 แต่ที่ pH 5.0 จะสูญเสีย activity ไป 40 เปอร์เซ็นต์ และจะสูญเสียมากกว่า 90 เปอร์เซ็นต์ ที่ pH 6.8 (Tramer. 1966: 446-450) ความคงตัวของสารละลายโนซินต่อความร้อน และการเก็บรักษาไม่ได้ขึ้นกับค่า pH เท่านั้น แต่ขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ เช่น องค์ประกอบทางเคมีและโปรตีนที่ปนเปื้อนอยู่ในสารละลาย รวมทั้งอุณหภูมิ (Hall. 1966: 461-464)

โนซินจะถูกทำลายโดยเอนไซม์ α -chymotrypsin (Jarvis; & Mahoney. 1969: 1448-1450 ; Wilimowska-Pelc; et al. 1976: 71-77) , pancreatin (Heinemann; & Williams. 1966: 312-313 ; Jarvis; & Mahoney. 1969: 1448-1450) และ subtilopeptidase (Jarvis. 1967: 33-48) แต่จะไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ carboxypeptidase A (Cheeseman; & Berridge. 1959: 185-194; Jarvis; & Mahoney. 1969: 1448-1450) , pepsin (Wilimowska-Pelc; et al. 1976: 71-77) และ trypsin (Jarvis; & Mahoney. 1969: 1448-1450)

การสังเคราะห์ไนซิน

กระบวนการสังเคราะห์ไนซิน เกิดจากกลุ่มยีนที่ประกอบด้วย 11 ยีน คือ *nisABTCIPRKFE*G และ 3 โปรโมเตอร์ คือ *nis A* และ *nis F* promoter ซึ่งเป็น inducible promoter และ *nis R* promoter ซึ่งเป็น constitutive promoter ทำงานร่วมกัน (Kuipers; et al.1995: 27299-27304) ดังแสดงในภาพประกอบ 3 และมีขั้นตอนการสังเคราะห์ แสดงในภาพประกอบ 4



ภาพประกอบ 3 การจัดเรียงตัวของยีนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไนซิน

หมายเหตุ: P* = inducible promoter, P = constitutive promoter

nisA กำหนดรหัสไนซิน A เริ่มต้น (nisin A precursor) ซึ่งประกอบด้วยกรดอะมิโน 57

โมเลกุล

nisB และ *nisC* กำหนดรหัสเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการดัดแปลงโปรตีนภายหลังการแปลรหัส

nisT กำหนดรหัสโปรตีนขนส่งซึ่งจัดอยู่ในกลุ่ม ABC translocator โดยเกี่ยวข้องในการขนส่งไนซินเริ่มต้นที่ดัดแปลงแล้วออกนอกเซลล์

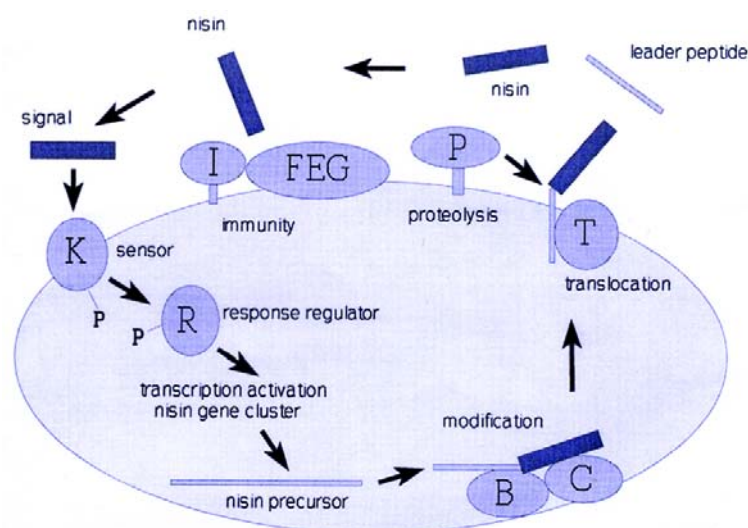
nisl กำหนดรหัสไลโปโปรตีนที่เกี่ยวข้องในการป้องกันเซลล์จากการทำลายโดยไนซินที่ตัวเองผลิตขึ้น

nisP กำหนดรหัสเอนไซม์โปรติเอสภายนอกเซลล์ที่เกี่ยวข้องในการตัด leader peptide ออกจากไนซินเริ่มต้น (precursor processing)

nisR และ *nisK* กำหนดรหัสเอนไซม์ histidine kinase (Nis K) และ response regulator protein (Nis R) โปรตีนทั้ง 2 ชนิดนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์ไนซินในรูปแบบ two-component regulatory system

nisFEG กำหนดรหัสโปรตีนขนส่งซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบป้องกันตัวเอง

ที่มา: Kuipers; et al. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64: 17.



ภาพประกอบ 4 แบบจำลองขั้นตอนการสังเคราะห์นินซิน

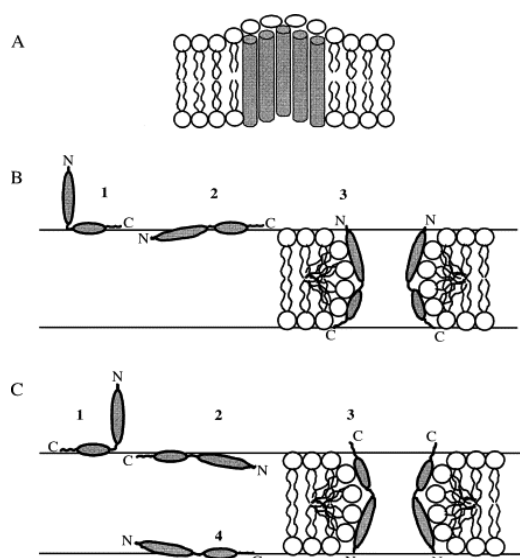
ที่มา: *Bacteriocin*. (2004). (Online).

จากภาพประกอบ 4 ยีน *nisRK* มี *nis R* promoter ดังนั้นจึงแสดงออกได้โดยไม่จำเป็นต้องมีสารชักนำ ทำให้เกิดโปรตีน 2 ชนิด คือ histidine kinase (NisK) และ response regulator protein (Nis R) เมื่อไนซินจากภายนอกมาสัมผัสกับ NisK ซึ่งเป็นโปรตีนที่แทรกอยู่ในเยื่อหุ้มเซลล์ จะทำให้เกิด autophosphorylation ที่ histidine residue ที่จำเพาะของ Nis K และมีการเคลื่อนย้ายหมู่ฟอสเฟตไปที่ Asp residue ที่จำเพาะของ NisR ที่อยู่ในไซโตพลาสซึม ทำให้ Nis R อยู่ในรูปที่ active และจะเข้าไปเกาะที่ *nisA* และ *nisF* promoters ทำให้มีการถอดรหัสของยีนโครงสร้าง *nisA*, ยีน *nisBTCIP* และยีน *nisFEG* ที่อยู่ถัดไป

โปรตีน NisB จะทำให้ nisin A precursor เกิด dehydration และ NisC จะดัดแปลงไนซินตั้งต้น โดยการสร้างพันธะ thioethers จากนั้น NisT จะขนส่งไนซินตั้งต้นที่ถูกดัดแปลงแล้วออกนอกเซลล์ และ NisP จะตัด leader peptide ออกจากไนซินตั้งต้น ทำให้ได้ mature nisin สำหรับโปรตีน NisI และ NisFEG จะทำหน้าที่ป้องกันเซลล์จากการทำลายโดยไนซินที่ตัวเองผลิตขึ้น โดยกลไกยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด

กลไกการออกฤทธิ์ของไนซิน

ไนซินทำให้เกิดการสร้างรู (pore) ในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่ไวต่อไนซิน (sensitive bacteria) โดยจะเกิด electrostatic interaction ระหว่างประจุบวกที่ปลาย C ของเปปไทด์ กับประจุลบของฟอสโฟลิปิดที่เยื่อหุ้มเซลล์ ทำให้เกิดการรั่วไหลของสารโมเลกุลเล็ก เช่น กรดอะมิโน โพแทสเซียม กลูตาเมต อนินทรีย์ฟอสเฟต และ ATP ออกนอกเซลล์ เป็นผลให้เกิดการสูญเสียแรงขับเคลื่อนของโปรตอน (proton motive force; PMF) และทำให้ความต่างศักย์ลดลง จึงไม่มีการสร้างพลังงานเกิดขึ้น (Ruhr; & Sahl. 1985: 841-845; Sahl; Kordel; & Benz. 1987: 120-124; Benz; Jung; & Sahl. 1991: 359-372) ดังแสดงในภาพประกอบ 5



ภาพประกอบ 5 กลไกการทำให้เกิดรูในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียโดยไนซิน

A แสดง Barrel-stave pore

B,C แสดง แบบจำลองการสร้างรู

ขั้นตอนที่ 1 บริเวณปลาย C ของไนซินเข้าจับที่เยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

ขั้นตอนที่ 2 ไนซินแทรกเข้าเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

ขั้นตอนที่ 3 การสร้างรูเริ่มจากการเคลื่อนเข้าของปลาย C หรือปลาย N ของไนซิน

ขั้นตอนที่ 4 ไนซินเคลื่อนเข้าด้านในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเป้าหมาย

ที่มา: Bauer; & Dicks. (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics.

International Journal of Food Microbiology. 101: 207.

การประยุกต์ใช้นิซิน

ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้นิซินปริมาณแตกต่างกันเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์เป้าหมายในอาหารชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตาราง 5 และมีหลายประเทศที่อนุญาตให้ใช้นิซินในอาหารได้ ดังแสดงในตาราง 6

ตาราง 5 ปริมาณนิซินที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหารชนิดต่าง ๆ

Food product	Target organism	Effective nisin Concentration (IU/ml)
Cottage cheese	<i>L. monocytogenes</i>	2000
Ricotta cheese	<i>L. monocytogenes</i>	100
Skim milk	<i>B. cereus</i> spores	4000
Bologna-type sausage	<i>Lb. sake</i> and <i>Lb. curvatus</i>	1000
Lean beef	<i>Brochothrix thermosphacta</i>	400
Kimchi	<i>lactobacilli</i>	100

หมายเหตุ: 1 IU (International Unit) ของนิซิน = activity ของ Nisaplin 1 µg

Nisaplin เป็น commercial nisin ผลิตโดย Aplin and Barrett Ltd ประกอบด้วย
นิซิน 2.5%, โซเดียมคลอไรด์ 77.5%, โปรตีน 12%, คาร์โบไฮเดรต 6% และความชื้น 2%
Nisaplin 1 g มี activity 10^6 IU
Pure nisin 1 g มี activity 40×10^6 IU

ที่มา: Cleveland. (2001). Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 7.

ตาราง 6 ตัวอย่างการใช้ไนซินในประเทศต่าง ๆ

Country	Food in which nisin is permitted	Maximum level (IU/g)
Argentina	Processed cheese	500
Australia	Cheese, processed cheese, canned tomatoes	no limit
Belgium	Cheese	100
Cyprus	Cheese, clotted cheese, canned vegetables	no limit
EU	E234, may also be labeled as “natural preservative”	varies according to product and member state
France	Processed cheese	no limit
Italy	Cheese	500
Mexico	Nisin is a permitted additive	500
Netherlands	Factory cheese, processed cheese, cheese powder	800
Peru	Nisin is a permitted additive	no limit
Russia	Dietetic, processed cheese, canned vegetables	8000
UK	Cheese, canned foods, Clotted cream	no limit
US	Pasteurized processed cheese spread	10,000

ที่มา: Cleveland.(2001). Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 9.

นอกจากนี้ยังมีการใช้ไนซินร่วมกับวิธีการอื่น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ในอาหาร ตัวอย่างเช่น

การใช้ ไนซิน A ร่วมกับ ก๊าซไนโตรเจน คาร์บอนไดออกไซด์ และอุณหภูมิต่ำเพื่อเพิ่มระยะ lag phase และยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* (Szabo; & Cahill. 1998: 21-31)

การใช้ ไนซิน ร่วมกับ sucrose fatty acid esters เพื่อยับยั้ง *L. monocytogenes*, *B. cereus*, *S. aureus* และ *Lb. plantarum* (Thomas; et al. 1998:1013 -1022)

การใช้ ไนซิน ร่วมกับ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อยับยั้ง *L. monocytogenes* (Nilsson; et al. 2000: 769 -774)

เพดิโอซิน (Pediocin)

นอกจากไนซินที่มีการนำมาใช้อย่างแพร่หลายแล้ว แบคทีริโอซินที่มีแนวโน้มว่าจะมีการนำมาใช้ในอนาคตอันใกล้ก็ได้แก่ เพดิโอซิน

Pediocin AcH เป็นโปรตีน น้ำหนักโมเลกุล 2.7 kDa ถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Lactobacillus* spp., *Leuconostoc* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Lactococcus* spp., *Propionibacterium* spp., *Bacillus* spp., *Clostridium* spp., *Listeria* spp., *Staphylococcus* spp., *Brochothrix thermosphacta* และสปอร์ของ *Bacillus* และ *Clostridium* บางชนิด โดยจะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียเหล่านี้ แต่ไม่มีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ (Hoover; & Ray. 1993: 181-199) ตัวอย่างอาหารที่แยกเชื้อที่ผลิตเพดิโอซินได้ เช่น เนื้อหมัก ผัก ไข่กรอกดิบ (Reuter. 1970: 1397-1399) เนื้อไก่ดิบ (Teuber; & Geis. 1981: 1614-1630) และปลาสด (Blood. 1975: 195-208) และตัวอย่างเชื้อ LAB ที่ผลิตเพดิโอซิน เช่น *Pediococcus pentosaceus* และ *P.acidilactici* (Hoover; & Ray. 1993: 181-199)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์การทดลอง

1. วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

ตู้อบเชื้อ (10°C, 30°C, 37°C และ 45°C)

ตู้เก็บเชื้อ (4°C, -20°C)

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

เครื่องวัด pH

ไมโครเวฟ

อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิได้

เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge)

เครื่องวัดการดูดกลืนแสง

Anaerobic jar

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง และอาหารเลี้ยงเชื้อ

Staphylococcus aureus (NB)

Lactobacillus sakei 912 (MRS)

Listeria monocytogenes (BHI)

Bacillus cereus (NB)

Escherichia coli (NB)

Salmonella typhimurium (NB)

Enterobacter aerogenes (NB)

Streptococcus salivarius JCM 5707 (MRS)

Leuconostoc mesenteroides JCM 6124 (MRS)

Lactococcus lactis subsp. *cremoris* TUA 1344L (MRS)

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อ LAB จากอาหารหมัก

นำตัวอย่างอาหารมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ แล้วนำไป streak ลงบนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3 0.5% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนี นำไปเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS agar ตรวจดูการติดสีแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส แล้วเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส เก็บเชื้อไว้ใน MRS agar เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการผลิตสารต้านจุลชีพ โดย subculture ทุก 2 สัปดาห์ และเก็บ stock culture ใน MRS broth ที่เติมกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ ในตู้แช่แข็ง -20°C

2. การคัดเลือก LAB ที่สร้างสารต้านจุลชีพ

2.1 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารต้านจุลชีพของ LAB ด้วยวิธี agar spot assay (Swetwivat; & Lothong. 1999: 543-548) โดย spot เชื้อ LAB ที่ต้องการทดสอบลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM (Tichaczek; et al.1992: 460-468) ซึ่งดัดแปลงมาจากอาหาร MRS โดยลดปริมาณกลูโคสจาก 2 เปอร์เซ็นต์ เป็น 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อลดการสร้างกรดแลกติก และบ่มเชื้อในสภาพปราศจากออกซิเจนเพื่อป้องกันการสร้าง H_2O_2 และกรดอะซิติก (Schillinger; & Luecke. 1989: 1901-1906) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วย MRS soft agar ที่ผสม indicator strain (*Lb. sakei* 912 ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิตร) ปริมาตร 7 มิลลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30°C ในสภาวะปราศจากออกซิเจน เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หรือใช้ NA soft agar ที่ผสม indicator strain (*S. aureus* ปริมาตร 30 ไมโครลิตรต่ออาหาร 100 มิลลิตร) ปริมาตร 7 มิลลิตร เททับ บ่มต่อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูการเกิด inhibition zone รอบโคโลนีของ LAB ซึ่งเป็นผลมาจากการที่ LAB สร้างสารยับยั้งการเจริญของ indicator strain ได้ จากนั้นเก็บเชื้อที่ทำให้เกิด inhibition zone ไว้ศึกษาต่อไป

2.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารต้านจุลชีพของ LAB ในอาหารเหลว ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยนำ LAB ที่ผลิตสารต้านจุลชีพได้จากข้อ 2.1 ไปเลี้ยงในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเซนตริฟิวจ์แยกเซลล์ออก นำส่วนใสที่ได้ไปปรับ pH ให้เป็นกลาง (pH 7) หลังจากนั้นปิเปตส่วนใสปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งปริมาตร 25 มิลลิตร ผสม indicator strain (OD_{660} 0.3-0.5) 30 ไมโครลิตรต่ออาหาร

100 มิลลิลิตร ซึ่งเจาะหลุมไว้แล้ว บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเกิด inhibition zone รอบหลุม จากนั้นเก็บเชื้อที่ทำให้เกิด inhibition zone ไว้ศึกษาต่อไป

3. การทดสอบว่าสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง indicator strain เป็นโปรตีน

ทดสอบว่าสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง indicator strain เป็นโปรตีน โดยนำส่วนใสที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง indicator strain มา treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ดังนี้ proteinase k, trypsin, pepsin, alcalase, bacterial protease, pancreatin, savinase 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 10 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ treat ด้วยเอนไซม์ ถ้าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเป็นโปรตีน เมื่อถูก treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนแล้วจะไม่สามารถยับยั้ง indicator strain หรือมี antibacterial activity ลดลง

4. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้

4.1 การทดสอบความสามารถในการทนความร้อนของแบคทีเรียโอซิน

นำส่วนใสที่ได้ทดสอบยืนยันแล้วว่าเป็นแบคทีเรียโอซิน ไปบ่มที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100°C เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที ก่อนนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay

4.2 การทดสอบความคงตัวของแบคทีเรียโอซินที่ pH ต่าง ๆ

นำส่วนใสที่ได้ทดสอบยืนยันแล้วว่าเป็นแบคทีเรียโอซิน มาปรับ pH ให้อยู่ในช่วง pH 3-9 โดยใช้ 1 M HCl หรือ 1 M NaOH บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับ pH กลับเป็น 7 แล้วจึงนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay

4.3 การศึกษา antibacterial spectrum

นำส่วนใสที่ได้ทดสอบยืนยันแล้วว่าเป็นแบคทีเรียโอซินไปทดสอบ antibacterial spectrum ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยการใช้ indicator strain ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Enterobacter aerogenes*, *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus salivarius*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris*

4.4 การศึกษา antibacterial activity เปรียบเทียบกับ commercial nisin

นำส่วนใสที่ทดสอบยืนยันแล้วว่าเป็นแบคทีเรียโคโนซิมไปทดสอบ antibacterial activity เปรียบเทียบกับ commercial nisin (Fluka, Switzerland) 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ด้วยวิธี agar well diffusion assay

5. การจัดจำแนกชนิด (identification) แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีเรียโคโนซิมได้

5.1 การจัดจำแนกในระดับจิ้นส์ นำ LAB ที่สร้างแบคทีเรียโคโนซิมได้ไปศึกษาวิเคราะห์ชนิด โดยเทียบเคียงตามวิธีการของ Axelsson 1998 โดยศึกษาดังนี้

5.1.1 การติดสีแกรม รูปร่างและการสร้างก๊าซเมื่อเจริญในอาหาร MRS broth

5.1.2 การเจริญในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 10 และ 45°C

5.1.3 การเจริญในอาหาร MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 4, 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์

5.1.4 การเจริญในอาหาร MRS broth ที่ปรับค่า pH เป็น 4.4, 7.0, 8.5 และ 9.6

5.2 การจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ นำ LAB ที่ผ่านการจัดจำแนกในระดับจิ้นส์ มาจัดจำแนกในระดับสปีชีส์ โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 20 Strep (bioMerieux, France) (ภาคผนวก ค)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกดิจจากอาหารหมัก

การแยก LAB จากอาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยเลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี (ภาพประกอบ 10 ภาคผนวก ง) บนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3 นำมาย้อมสีแกรม (ภาพประกอบ 11 ภาคผนวก ง) ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ และทดสอบการสร้างเอนไซม์ คีตาเลส คัดเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างเอนไซม์คีตาเลส ได้ 174 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างเป็นท่อน 147 ไอโซเลท ทรงกลม 13 ไอโซเลท และรูปไข่ 14 ไอโซเลท

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารต้านจุลชีพ

2.1 การทดสอบด้วยวิธี agar spot assay

จากการนำเชื้อ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ด้วยวิธี agar spot assay พบว่ามี LAB 44 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยตัวที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ NJ1, NJ3 (inhibition zone 26 mm) และมี LAB 12 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *Lb. sakei* 912 ได้ โดยตัวที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ SK2 (inhibition zone 12 mm) ดังแสดงในตาราง 7 และภาพประกอบ 6

2.2 การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

จากการนำเชื้อ LAB ที่ให้ผลบวกในวิธี agar spot assay มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่ามี LAB 18 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยตัวที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ NJ3, NJ4, SC3, SC4, ES3 และ PO2 (inhibition zone 10 mm) และมี LAB 1 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *Lb. sakei* 912 ได้ คือ SK2 (inhibition zone 10 mm) ดังแสดงในตาราง 8 และภาพประกอบ 7

ตาราง 7 Antibacterial activity ของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมัก เมื่อทดสอบโดยวิธี agar spot assay

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
1. แหนมใบมะยม (บางเขน กทม.)	NJ1 / ท่อนสั้น	26	-
	NJ2 / ท่อนสั้น	24	-
	NJ3 / ท่อนสั้น	26	-
	NJ4 / ท่อนสั้น	24	-
2. ไส้กรอกปลา (ชัยภูมิ)	SC1 / ท่อนสั้น	-	-
	SC3 / ท่อนสั้น	10	-
	SC4 / ท่อนสั้น	10	-
3. แหนมหมู (อโศก กทม.)	NA1 / ท่อนสั้น	12	-
	NA2 / ท่อนสั้น	12	-
	NA3 / ท่อนสั้น	-	-
	NA4 / ท่อนสั้น	-	-
4. ไส้กรอกอีสาน (อโศก กทม.)	EA1 / ท่อนสั้น	-	-
	EA2 / ท่อนสั้น	-	-
	EA3 / ท่อนสั้น	-	-
	EA4 / ท่อนสั้น	-	-
5. กุ้งจ่อม (แม่กลอง)	KJ1 / ท่อนสั้น	2	-
	KJ2 / ท่อนสั้น	2	-
	KJ3 / กลม	2	-
	KJ4 / กลม	2	-
6. แหนมหมู (สมุทรปราการ)	NM1 / ท่อนสั้น	-	-
	NM2 / ท่อนสั้น	-	-
	NM3 / ท่อนสั้น	-	-
	NM4 / ท่อนสั้น	-	-
7. กุ้งจ่อม (สมุทรปราการ)	GJ1 / กลม	2	10
	GJ2 / กลม	2	10
	GJ3 / กลม	2	10
	GJ4 / ท่อนยาว	1	-

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
8. ปลาต้ม (ตลาดนัด มศว)	PS1 / ท่อนสั้น	2	-
	PS2 / ท่อนสั้น	2	-
	PS3 / ท่อนยาว	20	-
	PS4 / ท่อนยาว	14	-
9. ไส้กรอกอีสาน (หน้าโลตัส อ่อนนุช)	EL1 / ท่อนสั้น	-	-
	EL2 / ท่อนสั้น	-	-
	EL3 / ท่อนสั้น	-	-
	EL4 / ท่อนสั้น	-	-
10. ไส้กรอกอีสาน (อโศก กทม.)	ES1 / ท่อนสั้น	12	-
	ES2 / ท่อนสั้น	10	-
	ES3 / ท่อนสั้น	10	-
	ES4 / ท่อนสั้น	12	-
11. แหนมหมู (สมุทรปราการ)	NS1 / กลม	-	-
	NS2 / กลม	-	-
	NS3 / กลม	-	-
	NS4 / ท่อนสั้น	10	-
12. ไส้กรอกอีสาน (สมุทรปราการ)	EM1 / ท่อนสั้น	-	-
	EM2 / ท่อนสั้น	-	-
	EM3 / ท่อนสั้น	-	-
	EM4 / ท่อนสั้น	-	-
13. ไส้กรอกอีสาน (สมุทรปราการ)	EB1 / ท่อนสั้น	-	-
	EB2 / ท่อนสั้น	-	-
	EB3 / ท่อนสั้น	-	-
	EB4 / ท่อนสั้น	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
14. ปลาต้ม (สมุทรปราการ)	PO1 / ท่อนสั้น	12	-
	PO2 / ท่อนสั้น	12	-
	PO3 / ท่อนสั้น	-	-
	PO4 / ท่อนสั้น	-	-
15. ไส้กรอกอีสาน (หน้าโลตัส ขอนแก่น)	EO1 / รูปไข่	-	-
	EO2 / รูปไข่	-	-
	EO3 / ท่อนสั้น	10	-
	EO4 / ท่อนสั้น	4	-
16. กุ้งปลาจ่อม (ตลาดอุดมสุข กทม.)	PJ1 / ท่อนสั้น	-	4
	PJ2 / ท่อนสั้น	-	4
	PJ3 / ท่อนสั้น	-	6
	PJ4 / ท่อนสั้น	-	6
17. ปลาต้ม (สุพรรณบุรี)	PA1 / กลม	-	-
	PA2 / กลม	-	-
	PA3 / กลม	-	-
	PA4 / ท่อนสั้น	-	6
18. ปลาต้ม (ตลาดอุดมสุข)	PB1 / ท่อนสั้น	-	-
	PB2 / ท่อนสั้น	-	-
19. ปลาจ่อม (ตลาดนัด มศว)	PC1 / รูปไข่	-	-
	PC2 / รูปไข่	-	-
	PC3 / ท่อนยาว	-	-
	PC4 / ท่อนยาว	-	-
20. ปลาต้ม (อ่างทอง)	PD1 / ท่อนยาว	-	-
	PD2 / ท่อนยาว	-	-
	PD3 / ท่อนยาว	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
21. ไส้กรอกอีสาน (สมุทรปราการ)	ED1 / ท่อนสั้น	10	-
	ED2 / ท่อนสั้น	10	-
22. แหนมหมู (ตลาดอุดมสุข)	NB1 / ท่อนสั้น	-	4
	NB2 / ท่อนสั้น	-	4
23. แหนมเนื้อ (ตลาดอุดมสุข)	NC2 / ท่อนสั้น	-	-
	NC3 / ท่อนสั้น	-	-
	NC4 / ท่อนสั้น	-	-
24. ไส้กรอกอีสาน (หน้าโลตัส อ่อนนุช)	EN1 / ท่อนสั้น	10	-
	EN2 / ท่อนสั้น	10	-
	EN3 / ท่อนสั้น	10	-
	EN4 / ท่อนสั้น	10	-
25. ไส้กรอกอีสาน (อโศก กทม.)	EF1 / ท่อนยาว	-	-
	EF2 / รูปไข่	-	-
26. แหนมหมู (อโศก กทม.)	NF1 / รูปไข่	12	-
	NF2 / รูปไข่	10	-
	NF3 / ท่อนสั้น	-	-
	NF4 / ท่อนสั้น	-	-
27. แหนมหมู (บางเขน)	NG1 / ท่อนสั้น	-	-
	NG2 / ท่อนสั้น	-	-
	NG3 / ท่อนสั้น	-	-
	NG4 / ท่อนสั้น	-	-
28. ไส้กรอกอีสาน (ตลาดสำโรง)	ER1 / รูปไข่	-	-
	ER2 / รูปไข่	-	-
29. ปลาจ่อม (ตลาดสำโรง)	PR1 / ท่อนสั้น	-	-
	PR2 / ท่อนสั้น	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
30. ปลาต้ม (ตลาดสำโรง)	PH1 / ท่อนสั้น	-	-
	PH2 / ท่อนสั้น	12	-
31. ปลาต้ม (ตลาดสำโรง)	PL1 / ท่อนสั้น	-	-
	PL2 / ท่อนยาว	-	6
32. ปลาต้ม (สุพรรณบุรี)	PV1 / กลม	-	-
	PV2 / กลม	-	-
	PV3 / ท่อนสั้น	-	-
	PV4 / ท่อนสั้น	-	-
33. ปลาต้ม (สมุทรปราการ)	PE1 / ท่อนยาว	-	-
	PE2 / ท่อนยาว	-	-
	PE3 / ท่อนสั้น	-	-
	PE4 / ท่อนยาว	-	-
34. ปลาจ่อม (สมุทรปราการ)	PN1 / ท่อนยาว	-	-
	PN2 / ท่อนยาว	-	-
	PN3 / ท่อนยาว	-	-
	PN4 / ท่อนยาว	-	-
35. แหนมหมู (ปทุมธานี)	NV1 / ท่อนสั้น	-	-
	NV2 / ท่อนสั้น	12	-
	NV3 / รูปไข่	12	-
	NV4 / รูปไข่	12	-
36. ปลาต้ม (ลพบุรี)	PT1 / ท่อนสั้น	-	-
	PT2 / ท่อนสั้น	-	-
37. ปลาต้มพริก (ส. กิจวัฒน์ฟู้ดส์ จำกัด)	SF1 / ท่อนสั้น	-	-
	SF2 / ท่อนสั้น	-	-
	SF3 / ท่อนสั้น	-	-
	SF4 / ท่อนสั้น	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
38. แหนมปลากลาย หลอด (ส.กิจวัฒนาฟู้ดส์ จำกัด)	NP1 / ท่อนสั้น	-	-
	NP2 / ท่อนสั้น	-	-
	NP3 / ท่อนสั้น	-	-
	NP4 / ท่อนสั้น	-	-
39. แหนมหมู (ปทุมธานี)	NW1 / ท่อนสั้น	-	-
	NW2 / ท่อนสั้น	-	-
	NW3 / ท่อนสั้น	-	-
	NW4 / ท่อนสั้น	-	-
40. ปลาฉม้นวลจันทร์ นวัตน์	SJ1 / ท่อนยาว	-	-
	SJ2 / ท่อนสั้น	-	-
	SJ3 / ท่อนสั้น	-	-
	SJ4 / ท่อนสั้น	-	-
41. ปลาฉม้นปัก (ประกอบจิตร ลพบุรี)	SG1 / ท่อนสั้น	-	-
	SG2 / ท่อนสั้น	-	-
	SG3 / ท่อนสั้น	-	-
	SG4 / ท่อนสั้น	-	-
42. ปลาฉม้นปัก (ลพบุรี)	SW1 / ท่อนสั้น	-	-
	SW2 / ท่อนสั้น	-	-
	SW3 / ท่อนสั้น	-	-
	SW4 / ท่อนสั้น	-	-
43. แหนมปลากลาย (บางซื่อ)	NK1 / ท่อนสั้น	-	-
	NK2 / ท่อนสั้น	-	-
44. ปลาฉม้น (บางซื่อ)	SU1 / ท่อนสั้น	-	-
	SU2 / ท่อนสั้น	-	-
	SU3 / ท่อนสั้น	-	-
	SU4 / ท่อนสั้น	-	-

ตาราง 7 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
45. ปลาต้ม (คาร์ฟูร์ รัชดาภิเษก)	SD1 / ท่อนสั้น	-	-
	SD2 / ท่อนสั้น	-	-
	SD3 / ท่อนสั้น	-	-
	SD4 / ท่อนสั้น	-	-
46. ปลาต้ม (ชัยนาท)	SH1 / ท่อนสั้น	-	-
	SH2 / ท่อนสั้น	-	-
	SH3 / ท่อนสั้น	-	-
	SH4 / ท่อนสั้น	-	-
47. ปลาต้ม (ชัยนาท)	SI1 / ท่อนสั้น	-	-
	SI2 / ท่อนสั้น	-	-
	SI3 / ท่อนยาว	-	-
	SI4 / ท่อนสั้น	8	-
48. ปลาต้มฟัก (แหลมปลา) (กลุ่มแม่บ้าน เกษตรกรเชียงใหม่)	SK1 / ท่อนสั้น	-	-
	SK2 / รูปไข่	10	12
	SK3 / ท่อนสั้น	-	-
	SK4 / ท่อนสั้น	-	-
49. ปลาต้ม (ประกอบจิตร ลพบุรี)	SL1 / ท่อนยาว	-	-
	SL2 / รูปไข่	8	-
	SL3 / รูปไข่	-	-
50. ไส้กรอกอีสาน (ตลาดอุดมสุข)	EG1 / ท่อนสั้น	-	-
	EG2 / ท่อนสั้น	-	-

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone

ตาราง 8 Antibacterial activity ของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมัก เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
1. แหนมใบมะยม (บางเขน กทม.)	NJ1 / ท่อนสั้น	-	-
	NJ2 / ท่อนสั้น	-	-
	NJ3 / ท่อนสั้น	10	-
	NJ4 / ท่อนสั้น	10	-
2. ไส้กรอกปลา (ชัยภูมิ)	SC3 / ท่อนสั้น	10	-
	SC4 / ท่อนสั้น	10	-
3. แหนมหมู (อโศก กทม.)	NA1 / ท่อนสั้น	-	-
	NA2 / ท่อนสั้น	-	-
4. กุ้งจ่อม (แม่กลอง)	KJ1 / ท่อนสั้น	-	-
	KJ2 / ท่อนสั้น	-	-
	KJ3 / กลม	-	-
	KJ4 / กลม	-	-
5. กุ้งจ่อม (สมุทรปราการ)	GJ1 / กลม	-	-
	GJ2 / กลม	-	-
	GJ3 / กลม	-	-
	GJ4 / ท่อนยาว	-	-
6. ปลาต้ม (ตลาดนัด มศว)	PS1 / ท่อนสั้น	-	-
	PS2 / ท่อนสั้น	-	-
	PS3 / ท่อนยาว	8	-
	PS4 / ท่อนยาว	-	-
7. ไส้กรอกอีสาน (อโศก กทม.)	ES1 / ท่อนสั้น	-	-
	ES2 / ท่อนสั้น	-	-
	ES3 / ท่อนสั้น	10	-
	ES4 / ท่อนสั้น	8	-
8. แหนมหมู (สมุทรปราการ)	NS4 / ท่อนสั้น	-	-

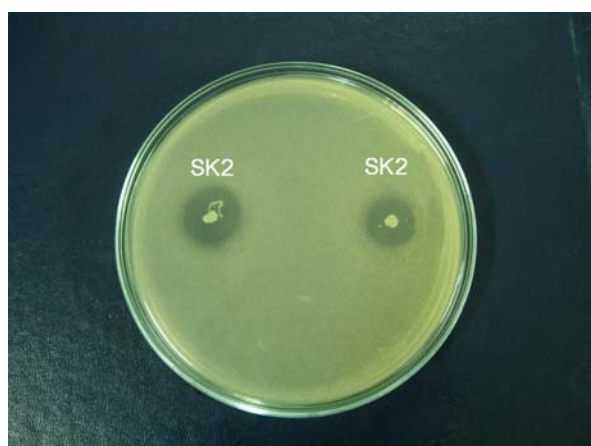
ตาราง 8 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
9. ปลาต้ม (สมุทรปราการ)	PO1 / ท่อนสั้น	8	-
	PO2 / ท่อนสั้น	10	-
10. ไส้กรอกอีสาน (หน้าโลตัส ขอนแก่น)	EO3 / ท่อนสั้น	-	-
	EO4 / ท่อนสั้น	-	-
11. กุ้งปลากุ้ง (ตลาดอุดมสุข กทม.)	PJ1 / ท่อนสั้น	-	-
	PJ2 / ท่อนสั้น	-	-
	PJ3 / ท่อนสั้น	-	-
	PJ4 / ท่อนสั้น	-	-
12. ปลาต้ม (สุพรรณบุรี)	PA4 / ท่อนสั้น	-	-
13. ไส้กรอกอีสาน (สมุทรปราการ)	ED1 / ท่อนสั้น	-	-
	ED2 / ท่อนสั้น	2	-
14. แหนมหมู (ตลาดอุดมสุข)	NB1 / ท่อนสั้น	-	-
	NB2 / ท่อนสั้น	-	-
15. ไส้กรอกอีสาน (หน้าโลตัส ขอนแก่น)	EN1 / ท่อนสั้น	-	-
	EN2 / ท่อนสั้น	-	-
	EN3 / ท่อนสั้น	-	-
	EN4 / ท่อนสั้น	2	-
16. แหนมหมู (อโศก กทม.)	NF1 / รูปไข่	-	-
	NF2 / รูปไข่	-	-
17. ปลาต้ม (ตลาดสำโรง)	PH2 / ท่อนสั้น	4	-
18. ปลาต้ม (ตลาดสำโรง)	PL2 / ท่อนยาว	-	-

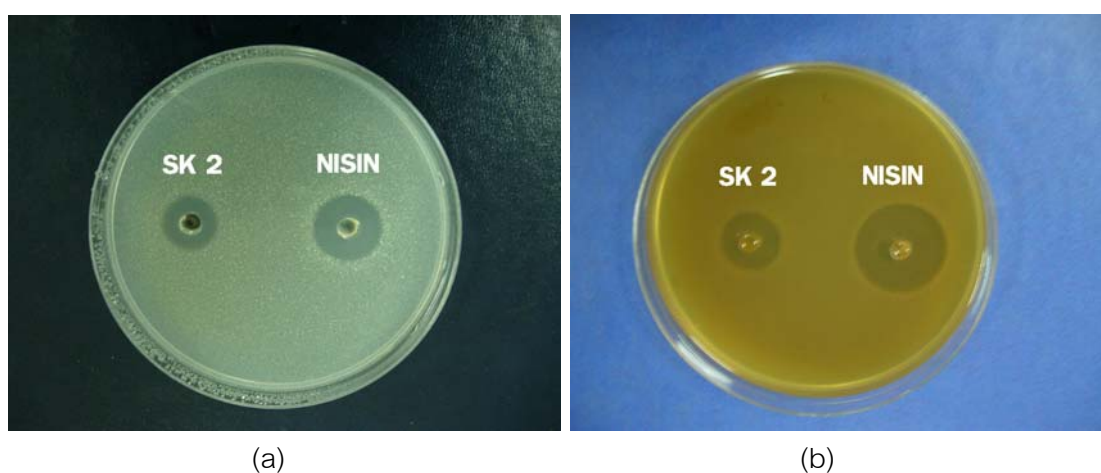
ตาราง 8 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร (แหล่งที่มา)	รหัสเชื้อ/รูปร่าง	Inhibition zone, mm	
		<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i>
19. แหนมหมู (ปทุมธานี)	NV2 / ท่อนสั้น	6	-
	NV3 / รูปไข่	6	-
	NV4 / รูปไข่	6	-
20. ปลาต้ม (ชัยนาท)	SI4 / ท่อนสั้น	4	-
21. ปลาต้มฟัก (แหนมปลา) (กลุ่มแม่บ้าน เกษตรกรเชียงงา)	SK2 / รูปไข่	8	10
22. ปลาต้ม (ประกอบจิตร ลพบุรี)	SL2 / รูปไข่	4	-

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone



ภาพประกอบ 6 ผลการทดสอบความสามารถของ LAB สายพันธุ์ SK2 ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยวิธี agar spot assay



ภาพประกอบ 7 ผลการทดสอบความสามารถของ LAB สายพันธุ์ SK2 ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* (a) และ *Lb. sakei* 912 (b) โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับ commercial nisin (2,500 IU)

3. การทดสอบว่าสารต้านจุลชีพที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง indicator strain เป็นโปรตีน

การทดสอบในขั้นนี้ใช้ LAB ที่แยกได้เพียง 3 ไอโซเลท เนื่องจาก LAB ไอโซเลทอื่นที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบมีความคงตัวต่ำ activity ลดลงเรื่อย ๆ จนทำให้ไม่สามารถอ่านผลได้

จากการนำเชื้อ LAB ที่ให้ผลบวกจากการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion ได้แก่ SC3, SC4 และ SK2 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth แล้วนำส่วนใสที่ได้ไป treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) 7 ชนิด คือ bacterial protease, savinase, pepsin, alcalase, pancreatin, trypsin และ proteinase k โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นจึงนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. aureus* เปรียบเทียบกับส่วนใสที่ไม่ได้ผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ พบว่า antibacterial activity ของสารต้านจุลชีพจากเชื้อ SC3, SC4 และ SK2 จะลดลงเมื่อนำไป treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนก่อนการทดสอบ ดังแสดงในตาราง 9

จากผลการทดลองที่ได้ เป็นการยืนยันว่าสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบที่สร้างจาก SC3, SC4 และ SK2 เป็นแบคทีริโอซินที่มีสมบัติเป็นโปรตีน เนื่องจากสารดังกล่าวถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนทำให้ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ หรืออาจมี antibacterial activity ลดลง

ตาราง 9 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อ antibacterial activity ของ SC3, SC4 และ SK2 เมื่อใช้ *S. aureus* เป็นเชื้อทดสอบ

Treatment (proteolytic enzyme)	Inhibition zone, mm		
	Agar well diffusion assay		
	SC3	SC4	SK2
Control	6	6	8
bacterial protease	-	-	2
savinase	2	2	2
pepsin	4	-	8
alcalase	-	2	-
pancreatin	6	2	-
trypsin	6	2	2
proteinase k	6	4	8

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone

4. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

4.1 การทดสอบความสามารถในการทนความร้อนของแบคทีริโอซิน

การทดสอบความสามารถในการทนความร้อนของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SC3, SC4 และ SK2 โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100°C เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SC3 และ SC4 ทนความร้อนได้ไม่เกิน 80°C เป็นเวลา 20 นาที ในขณะที่แบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 ทนความร้อนได้สูงถึง 100°C เป็นเวลา 10 นาที แต่เมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานกว่านี้ antibacterial activity จะค่อย ๆ ลดลง ดังแสดงในตาราง 10

ตาราง 10 ผลของการให้ความร้อนต่อ antibacterial activity ของ SC3, SC4 และ SK2 เมื่อใช้ *S. aureus* เป็นเชื้อทดสอบ

Treatment (Temperature / Time)	Inhibition zone, mm Agar well diffusion assay		
	SC3	SC4	SK2
Control	6	6	8
60°C / 10 min	6	6	8
60°C / 20 min	4	4	8
60°C / 30 min	2	2	8
80°C / 10 min	2	6	8
80°C / 20 min	4	2	8
80°C / 30 min	-	-	8
100°C / 10 min	-	-	8
100°C / 20 min	-	-	6
100°C / 30 min	-	-	5

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone

4.2 การทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินที่ pH ต่างๆ

ในการทดลองนี้ใช้แบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 เพียงชนิดเดียว เนื่องจากมีความคงตัวดี ในขณะที่ antibacterial activity ของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SC3 และ SC4 ลดลงจนไม่สามารถทดสอบได้อีก

จากการทดลองนำแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 ไปปรับ pH ให้อยู่ในช่วง pH 3-9 บ่มที่ อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับ pH เป็น 7 แล้วทดสอบ activity ด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้ *S. aureus* เป็นเชื้อทดสอบ พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 มีความคงตัวที่ pH 4-7 ดังแสดงในตาราง 11

ตาราง 11 ผลของ pH ต่อ antibacterial activity ของ SK2 เมื่อใช้ *S. aureus* เป็นเชื้อทดสอบ

pH	Inhibition zone, mm Agar well diffusion assay
3	4
4	8
5	8
6	8
7	8
8	6
9	6

4.3 การศึกษา antibacterial spectrum

จากการทดลองนำแบคทีเรียที่สร้างจาก SK2 ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าแบคทีเรียที่สร้างจาก SK2 นอกจากจะยับยั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* ได้ดีแล้ว ยังสามารถยับยั้ง *B. cereus*, *En. aerogenes*, *Leuc. mesenteroides*, *L. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. monocytogenes* ได้อีกด้วย แต่ไม่ยับยั้ง *E. coli*, *S. typhimurium* และ *S. salivarius* ดังแสดงในตาราง 12

ตาราง 12 ผลของแบคทีเรียที่สร้างจาก SK 2 ต่อแบคทีเรียทดสอบชนิดต่าง ๆ

Indicator strains	Inhibition zone, mm Agar well diffusion assay
<i>Staphylococcus aureus</i>	8
<i>Lactobacillus sakei</i> 912	10
<i>Listeria monocytogenes</i>	2
<i>Bacillus cereus</i>	2
<i>Escherichia coli</i>	-
<i>Salmonella typhimurium</i>	-
<i>Enterobacter aerogenes</i>	2
<i>Streptococcus salivarius</i> JCM 5707	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> JCM 6124	6
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> TUA 1344L	4

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone

4.4 การศึกษา antibacterial activity เปรียบเทียบกับ commercial nisin

จากการทดลองนำแบคทีเรียที่สร้างจาก SK2 ไปทดสอบ antibacterial activity ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 เป็นเชื้อทดสอบ เปรียบเทียบกับ commercial nisin พบว่า แบคทีเรียที่สร้างจาก SK2 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ inhibition zone 8 mm ในขณะที่ commercial nisin ยับยั้ง *S. aureus* ได้ inhibition zone 14 mm และแบคทีเรียที่สร้างจาก SK2 สามารถยับยั้ง *Lb. sakei* 912 ได้ inhibition zone 10 mm ในขณะที่ commercial nisin ยับยั้ง *Lb. sakei* 912 ได้ inhibition zone 18 mm ดังแสดงในตาราง 13 และภาพประกอบ 7 จะเห็นได้ว่า แบคทีเรียที่สร้างจาก SK2 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 2 ชนิด ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของ commercial nisin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2500 IU)

ตาราง 13 Antibacterial activity ของ SK2 เปรียบเทียบกับ commercial nisin (Fluka, Switzerland)

	Inhibition zone, mm	
	Agar well diffusion assay	
	<i>S. aureus</i>	<i>Lb. sakei</i> 912
แบคทีเรียที่สร้างจาก SK2	8	10
commercial nisin (50 mg/ml)	14	18

5. การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลกดิกที่สร้างแบคทีริโอซิน

5.1 การจัดจำแนกในระดับจีแนส

เมื่อนำ LAB สายพันธุ์ SK2 ที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ มาทดสอบการสร้างก๊าซจากกลูโคส และการเจริญในสภาวะต่าง ๆ พบว่าได้ผลดังแสดงในตาราง 14 ซึ่งเทียบเคียงได้กับเชื้อในสกุล *Lactococcus* เนื่องจาก ไม่สร้างก๊าซจากกลูโคส เจริญที่อุณหภูมิ 10°C แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45°C ไม่เจริญในที่ที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และ 18 เปอร์เซ็นต์ ไม่เจริญที่ pH 4.4 และ 9.6 (Axelsson. 1998 : 1-23)

ตาราง 14 ลักษณะทางสรีระวิทยาบางประการของ LAB สายพันธุ์ SK2

Characteristic	result
Morphology	oval
Catalase test	-
Gram stain	+
Gas from glucose	-
Growth at 10°C	+
Growth at 45°C	-
Growth in 4% NaCl	-
Growth in 6.5% NaCl	-
Growth in 18% NaCl	-
Growth in pH 4.4	-
Growth in pH 7.0	+
Growth in pH 8.5	+
Growth in pH 9.6	-

หมายเหตุ: + = positive result

- = negative result

5.2 การจัดจำแนกในระดับสปีชีส์

เมื่อนำ LAB สายพันธุ์ SK2 มาจัดจำแนกชนิดโดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 20 Strep (bioMerieux) พบว่าได้ผลดังแสดงในตาราง 15 และภาพประกอบ 9 (ภาคผนวก ค) เมื่อนำผลที่ได้ไปผ่านการประมวลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ที่ใช้สำหรับชุดจัดจำแนก API 20 Strep พบว่า LAB สายพันธุ์ SK2 ถูกจัดจำแนกเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนก 98 เปอร์เซ็นต์

ตาราง 15 การจัดจำแนก LAB สายพันธุ์ SK2 ด้วย API 20 Strep

Characteristic	Result
acetoin production (voges Proskauer)	+
Hydrolysis (hippuric acid)	-
β -glucosidase hydrolysis (esculin)	+
Pyrrolidonyl arylamidase	-
α -Galactosidase	-
β -Glucoronidase	-
β -Galactosidase	-
Alkaline phosphatase	-
Leucine aminopeptidase	-
Arginine dihydrolase	+
Ribose	+
Arabinose	-
Mannitol	+
Sorbitol	-
Lactose	+
Trehalose	+
Inulin	-
Raffinose	-
Amidon	+
Glycogen	-

บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากการแยก LAB จากแหนมหมู แหนมเนื้อ ได้กรอกอีสาน ได้กรอกปลา ปลาส้ม ปลาส้มปัก (แหนมปลา) ปลาจ่อม กุ้งจ่อม จำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าแยกได้ LAB 174 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียรูปท่อน 147 ไอโซเลท ทรงกลม 13 ไอโซเลท และรูปไข่ 14 ไอโซเลท

เมื่อนำเชื้อ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 2 ชนิด คือ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ด้วยวิธี agar spot assay พบว่ามี LAB 44 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยตัวที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ NJ1, NJ3 (inhibition zone 26 mm) และมี LAB 12 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *Lb. sakei* 912 ได้ โดยตัวที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ SK2 (inhibition zone 12 mm)

เมื่อนำเชื้อ LAB ที่ให้ผลบวกในวิธี agar spot assay มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่ามี LAB 18 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยตัวที่ยับยั้งได้ดีที่สุดคือ NJ3, NJ4, SC3, SC4, ES3 และ PO2 (inhibition zone 10 mm) และมี LAB 1 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *Lb. sakei* 912 ได้ คือ SK2 (inhibition zone 10 mm)

จะเห็นได้ว่าเชื้อ LAB ที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar spot assay บางไอโซเลท ไม่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้เมื่อใช้วิธี agar well diffusion assay สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องมาจากสภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน และในการทดสอบโดยวิธี agar spot assay ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบบางส่วนอาจเกิดจากกรดที่ LAB สร้างขึ้น แม้จะเลี้ยงใน BSM agar ที่ใช้น้ำตาลเพียง 0.2 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay มีการปรับ pH ของส่วนใสที่นำมาทดสอบให้เป็นกลางก่อน จึงทำให้ลดผลการยับยั้งที่อาจเกิดจากกรด

เมื่อนำสารต้านจุลชีพที่สร้างจากเชื้อ SC3, SC4 (แยกได้จากไส้กรอกปลา) และ SK2 (แยกได้จากแหนมปลา) ซึ่งมีความคงตัวค่อนข้างดี ไป treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน 7 ชนิด คือ bacterial protease, savinase, pepsin, alcalase, pancreatin, trypsin และ proteinase k เปรียบเทียบกับส่วนใสที่ไม่ได้ผ่านการ treat ด้วยเอนไซม์ พบว่าสารต้านจุลชีพที่สร้างจาก SC3 ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ bacterial protease และ alcalase แต่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pancreatin, trypsin และ proteinase k ในขณะที่สารต้านจุลชีพที่สร้างจาก SC4 ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ bacterial protease และ pepsin และสารต้านจุลชีพที่สร้างจาก SK2 ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ alcalase และ pancreatin แต่ไม่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ pepsin และ proteinase K แสดงว่าสารต้านจุลชีพที่สร้างจาก SC3, SC4

และ SK2 มีสมบัติเป็นโปรตีน แต่อาจจะต่างชนิดกันเนื่องจากสารต้านจุลชีพดังกล่าวมีความจำเพาะต่อการถูกย่อยด้วยเอนไซม์ที่ต่างกัน จึงอาจเป็นไปได้ว่าเป็นแบคทีริโอซินต่างชนิดกัน

การทดสอบความสามารถในการทนความร้อนของแบคทีริโอซิน โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60, 80 และ 100°C พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SC3 และ SC4 ทนความร้อนได้ไม่เกิน 80°C เป็นเวลา 20 นาที ในขณะที่แบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 ทนความร้อนได้สูงถึง 100°C เป็นเวลา 10 นาที แต่เมื่อให้ความร้อนเป็นเวลานานกว่านี้ antibacterial activity จะค่อย ๆ ลดลง

การทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินที่ pH 3-9 พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 มีความคงตัวที่ pH 4-7 แต่ที่ pH สูงหรือต่ำกว่านี้ antibacterial activity จะลดลง

การทดสอบ antibacterial spectrum ของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 นอกจากยับยั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* ได้ดีแล้ว ยังยับยั้ง *B. cereus*, *En. aerogenes*, *Leuc. mesenteroides*, *L. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. monocytogenes* ได้อีกด้วย แต่ไม่ยับยั้ง *E. coli*, *S. typhimurium* และ *S. salivarius*

แบคทีริโอซินที่ผลิตจาก SK2 น่าจะไม่ใช้ในชิน เนื่องจากมีสมบัติแตกต่างจากในชิน คือแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก SK2 มีความคงตัวที่ pH 4-7 ถูกย่อยได้โดยเอนไซม์ alcalase, pancreatin และ trypsin ไม่ถูกย่อยโดย pepsin และ proteinase k สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Enterobacter* ได้เล็กน้อย ในขณะที่ในชินมีความคงตัวที่ pH 2-7 ถูกย่อยโดยเอนไซม์ proteinase k, α -chymotrypsin และ pancreatin ไม่ถูกย่อยโดยเอนไซม์ pepsin และ trypsin สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด แต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Noonpakdee; et al. 2003: 137-145)

การทดสอบ antibacterial activity ของแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 เปรียบเทียบกับ commercial nisin พบว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก SK2 สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *Lb. sakei* 912 ได้ประมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ของ commercial nisin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (2500 IU)

การจัดจำแนก LAB สายพันธุ์ SK2 โดยทดสอบการสร้างก๊าซจากกลูโคส และการเจริญในสภาวะต่าง ๆ พบว่า LAB สายพันธุ์ SK2 ไม่สร้างก๊าซจากกลูโคส เจริญที่อุณหภูมิ 10°C แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45°C ไม่เจริญในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ไม่เจริญที่ pH 4.4 และ 9.6 ซึ่งเทียบเคียงได้กับเชื้อในสกุล *Lactococcus* (Axelsson. 1998 : 1-23) และเมื่อจัดจำแนกชนิดโดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 20 Strep (bioMerieux) พบว่าจัดจำแนกได้เป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนก 98 เปอร์เซ็นต์

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

- Abee, T.; Krockel, L.; & Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potential in food preservation and control of food poisoning. *International Journal of Food Microbiology*. 28: 169-185.
- Altena, K.; et al. (2000). Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a type B lantibiotic gene cluster. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 2565-2571.
- Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Salminen, S.; & Wright, A.V. editors. *Lactic acid bacteria*, New York: Marcel Dekker. pp. 1-23.
- Aymerich, T.; et al. (1996). Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 1676-1682.
- Bacteriocin*. (2004). Retrieved September 7, 2006, from [class.fst.ohio-state.edu/fst736/bacteriocin%20day%20\(2004\).pdf](http://class.fst.ohio-state.edu/fst736/bacteriocin%20day%20(2004).pdf)
- Baird-Parker, A.C. (1980). Organic acids. In: Silliker, J.H.; et al. editors. *Microbial Ecology of Foods*, New York: Academic Press. pp. 126-135.
- Bauer, R.; & Dicks, L.M.T. (2005). Mode of action of lipid II-targeting lantibiotics. *International Journal of Food Microbiology*. 101: 207.
- Benz, R.; Jung, G.; & Sahl, H-G. (1991). Mechanism of channel-forming lantibiotics in black lipid membranes. In: Jung, G; & Sahl, H-G. editors. *Nisin and novel lantibiotics*. Leiden: ESCOM. pp. 359-372.
- Blackburn, P.; et al. (1989). *Nisin compositions for use as enhanced, broad range bacteriocins*. International patent application number PCT/US89/0265: international publication number W089/12399.
- Blood, R.M. (1975). Lactic acid bacteria in marinated herring. In: Carr, J.G.; Cutting, C.V.; & Whiting, G.C. editors. *Lactic acid bacteria in Beverages and Food*. New York: Academic Press. pp. 195-208.
- Buchanan, R.E.; & Gibbons, N.E. (1974). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Baltimore. The Williams Wilkin company, Waverly Press, TNC.

- Buchman, G.W.; Banerjee, S.; & Hansen, J.N. (1988). Structure and expression of the gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *Journal of Biological Chemistry*. 263: 16260-16266.
- Cheeseman, G.C.; & Berridge, N.J. (1959). Observations on the molecular weight and chemical composition of nisin A. *Biochemical Journal*. 71: 185-194.
- Chikindas, M.L.; et al. (1993). Pediocin PA-1, a bacteriocin from *Pediococcus acidolactici* PAC 1.0, forms hydrophilic pores in the cytoplasmic membrane of target cells. *Applied and Environmental Microbiology*. 59: 3577-3584.
- Cleveland, J. (2001). Bacteriocin: safe, natural antimicrobials for food preservation. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 1-20.
- Condon, S. (1987). Responses of lactic acid bacteria to oxygen. *FEMS Microbiology Reviews*. 46: 269-280.
- Dahl, T.A.; Midden, W.R.; & Hartman, P.E. (1989). Comparison of killing of Gram-negative and Gram-positive bacteria by pure singlet oxygen. *Journal of Bacteriology*. 171: 2188-2194.
- Delves-Broughton, J. (1990). Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technology*. 40: 100-112.
- De Martinis, E.C.P.; & Freitas, F.Z. (2003). Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. *Food Control*. 14: 197-200.
- Deraz, S.F.; et al. (2005). Purification and characterization of acidocin D20079, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. *Journal of Biotechnology*. 117: 343-354.
- De Vuyst, L.; & Vandamme, E.J. (1994). *Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria: Microbiology, Genetics and Applications*. London: Chapman & Hall.
- Eklund, T. (1984). The effect of carbon dioxide on bacterial growth and on uptake processes in the bacterial membrane vesicles. *International Journal of Food Microbiology*. 1: 179-185.
- Enan, G.; et al. (1996). Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. *International Journal of Food Microbiology*. 30: 189-215.

- Farias, M.E.; et al. (1994). Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from regional cheese: inhibition of food-borne pathogens. *Journal of Food Protection*. 57: 1013-1015.
- FDA. (1988). Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. *Federal Register*. 53: 11247.
- Fimland, G.; et al. (1996). New biologically active hybrid bacteriocins constructed by combining regions from various pediocin-like bacteriocins: the C-terminal region is important for determining specificity. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 3313-3318.
- Fontana, C.; Cellini, L.; & Dainelli, B. (1993). Twelve aberrant strains of *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* from clinical specimens. *Journal of Clinical Microbiology*. 31(8): 2108.
- Forsythe, S.J. (2000). *The Microbiology of Safe Food*. Oxford: Blackwell Science Ltd. pp. 122-124.
- Garneau, S.; Martin, N.; & Vederas, J.C. (2002). Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie*. 84: 577-592.
- Gross, E.; & Morrell, J.L. (1971). The structure of nisin. *Journal of the American Chemical Society*. 93: 4634- 4635.
- Hall, R.H. (1966). Nisin and food preservation. *Process Biochemistry*. 1: 461-464.
- Hastings, J.W.; et al. (1991). Characterization of leucocin A-UAL187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *Journal of Bacteriology*. 173: 7491-7500.
- Hastings, J.W.; et al. (1994). Bacteriocins of *Leuconostocs* isolated from meat. *International Journal of Food Microbiology*. 24: 75-81.
- Hechard, Y.; et al. (1992). Characterization and purification of mesentericin Y105, an anti-*Listeria* bacteriocin from *Leuconostoc mesenteroides*. *Journal of General Microbiology*. 138: 2725-2731.
- Heinemann, B.; & Williams, R. (1966). The inactivation of nisin by pancreatin. *Journal of Dairy Science*. 49: 312-313.

- Henderson, J.T.; Chopko, A.L.; & Van Wassenaar, P.D. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 295: 5-12.
- Higgins, C.F. (1992). ABC transporters: from microorganism to man. *Annual Review of Cell Biology*. 8: 67-113.
- Hirsch, A. (1951). Growth and nisin production of a strain of *Streptococcus lactis*. *Journal of General Microbiology*. 5: 208-221.
- Holck, A.; et al. (1992). Purification and amino acid sequence of sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb 706. *Journal of General Microbiology*. 138: 2715-2720.
- Hoover, D.G.; & Ray, B. (1993). *Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria*. New York: Academic Press, Inc. pp. 181-199.
- Hughenoltz, J.; & De Veer, G. J. C. M. (1991). Application of nisin A and nisin Z in dairy technology. In: Jung, G.; & Sahl, H.-G. editors. *Nisin and Novel Lantibiotics*, Leiden: ESCOM Science Publishers B.V. pp. 440-447.
- Hurst, A. (1981). *Advances in Applied Microbiology*. 27: pp. 85-123.
- Jack, R.W.; et al. (1996). Characterization of the chemical and antimicrobial properties of piscicolin 126, a bacteriocin produced by *Carnobacterium piscicola* JG 126. *Applied and Environmental Microbiology*. 62: 2897-2903.
- Jarvis, B. (1967). Resistance to nisin and production of nisin-inactivating enzymes by several *Bacillus* species. *Journal General Microbiology*. 47: 33-48.
- Jarvis, B.; & Mahoney, R.R. (1969). Inactivation of nisin by alpha-chymotrypsin. *Journal of Dairy Science*. 52: 1448-1450.
- Joerger, M.C.; & Klaenhammer, T.R. (1986). Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *Journal of Bacteriology*. 167: 439-446.
- Kaletta, C.; et al. (1989). Pep5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence. *Archives of Microbiology*. 152: 16-19.

- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 12: 39-85.
- Kordel, M.; & Sahl, H-G. (1986). Susceptibility of bacterial, eukaryotic and artificial membranes to the disruptive action of the cationic peptide Pep5 and nisin. *FEMS Microbiology Letters*. 34: 139-144.
- Kramer, N. (2005). *Sensitivity and resistance of pathogenic bacteria for nisin*. Retrieved July 25, 2005, from cble.chem.uu.nl/biomem/naomi.htm
- Kuipers, O.P.; et al. (1991). Expression of wild-type and mutant nisin genes in *Lactococcus lactis*. In: Jung, G.; & Sahl, H.-G. editors. *Nisin and Novel Lantibiotics*, Leiden: ESCOM Science Publishers B.V. 250-259.
- Kuipers, O.P.; et al. (1995). Autoregulation of Nisin Biosynthesis in *Lactococcus lactis* by Signal Transduction. *Journal of Biological Chemistry*. 270: 27299-27304.
- Kuipers, O.P.; et al. (1998). Quorum sensing-controlled gene expression in lactic acid bacteria. *Journal of Biotechnology*. 64: 15-21
- Lee, N.-K.; & Paik, H.-D. (2001). Partial characterization of lacticin NK24, a newly identified bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 isolated from Jeot-gal. *Food Microbiology*. 18: 17-24.
- Leer, R.J.; et al. (1995). Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Microbiology*. 141: 1629-1635.
- Lindgren, S.E.; & Dobrogosz, W.J. (1990). Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiology Reviews*. 87: 149-163.
- Liu, W.; & Hansen, J.N. (1990). Some chemical and physical properties of nisin, a small-protein antibiotic produced by *Lactococcus lactis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 2551-2558.
- Maisnier-Patin, S.; et al. (1992). Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. *Lait*. 72: 249-263.
- Mattick, A.T.R.; & Hirsch, A. (1947). Further observation on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. *Lancet* ii: 5-7.

- Messens, W.; & de Vuyst, L. (2002). Inhibitory substances produced by lactobacilli isolated from sourdoughs-a review. *International Journal of Food Microbiology*. 72: 31-43.
- Moll, G.; et al. (1996). Lactococcin G is a potassium ion-conducting, two-component bacteriocin. *Journal of Bacteriology*. 178: 600-605.
- Moretro, T.; et al. (2000). Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. *Journal of Applied Microbiology*. 88: 536-545.
- Mulders, J.W.M.; et al. (1991). Identification and characterization of the lantibiotic nisin Z, a natural nisin variant. *European Journal of Biochemistry*. 201: 581-584.
- Nilson, T. (1999). Novel enterococcal bacteriocins: optimization of production, purification, biochemical and genetic characterization. PhD thesis. Agricultural University of Norway. As, Norway.
- Nilsson, L.; et al. (2000). Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 769-774.
- Noonpakdee, W.; et al. (2003). Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermented sausage. *International Journal of Food Microbiology*. 81: 137-145.
- Okereke, A.; & Montville, T.J. (1991a). Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. *Journal of Food Protection*. 54: 349-353.
- Okereke, A.; & Montville, T.J. (1991b). Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 3423-3428.
- Ostergaard, A. (1998). Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiology*. 15: 223-233.
- O' Sullivan, L.; Ross, R.P.; & Hill, C. (2002). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. *Biochimie*. 84: 593-604.
- Papagianni, M. (2003). Ribosomally synthesized peptides with antimicrobial properties: biosynthesis, structure, function and applications. *Biotechnology Advances*. 21: 481-482.

- Piard, J.C.; & Desmazeaud, M. (1991). Inhibiting factors produced by lactic acid bacteria. 1. Oxygen metabolites and catabolism end-products. *Lait*. 71: 525-541.
- Quadri, L.E.N.; et al. (1994). Chemical and genetic characterization of bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* LV17B. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 12204-12221.
- Ray, B. (1993). Sublethal injury, bacteriocins and food microbiology. *ASM News*. 59: 285-291.
- Reuter, G. (1970). Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischerzeugnissen. 4. Mitterlung: Die Okologie von Laktobazillen, *Leuconostoc* spezies und *Pediococcus*. *Fleischwirtschaft*. 50: 1397-1399.
- Rogers, L.A. (1928). The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology*. 16: 321.
- Ruhr, E.; & Sahl, H-G. (1985). Mode of action of the peptide antibiotic nisin and influence on the membrane potential of whole cells and on artificial membrane vesicles. *Antimicrob Agents Chemother*. 27: 841-845.
- Ryan, M.P.; et al. (1999a). Extensive post-translational modification, including a serine to D-alanine conversion, in the two-component lantibiotic, lacticin 3147. *Journal of Biological Chemistry*. 274: 37544-37550.
- Ryan, M.P.; et al. (1999b). Heterologous expression of lacticin 3147 in *Enterococcus faecalis*: comparison of biological activity with cytolysin. *Letters in Applied Microbiology*. 32: 71-77.
- Sahl, H-G.; Kordel, M.; & Benz, R. (1987). Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Archives of Microbiology*. 149: 120-124.
- Sahl, H-G.; Jack, R.W.; & Bierbaum, G. (1995). Biosynthesis and biological activities of lantibiotics with unique post-translational modifications. *European Journal of Biochemistry*. 230: 827-853.
- Schillinger, U.; & Luecke, F-K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from Nham. *Applied and Environmental Microbiology*. 55(8): 1901-1906.

- Shiba, T.; et al. (1991). Structure of the lanthionine peptide nisin, ancovenin and lanthiopeptin. In: Jung, G.; & Sahl H-G editors. *Nisin and novel lantibiotics*. Leiden: ESCOM Science. 113-122.
- Skaugen, M.; et al. (1994). In vitro conversion of L-serine to D-alanine in a ribosomally synthesized polypeptide. *Journal of Biological Chemistry*. 269: 27183-27185.
- Sneath, P.H.A.; et al. (1986). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 2. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Stevens, K.A.; et al. (1991). Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 57: 3613-3615.
- Swetwivat, A.; & Lothong, N. (1999). Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Nham (Thai fermented meat). *International Conference on Asian Network on Microbial Research*.: 543-548.
- Szabo, E.A.; & Cahill, M.E. (1998). The combined affects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 43: 21-31.
- Teuber, M.; & Geis, A. (1981). The family Streptococcaceae (nonmedical aspects). In Starr, M.P.; et al. editors. *The Prokaryotes*. Vol. II. Berlin. pp. 1614-1630.
- Thomas, L.V.; et al. (1998). Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of gram positive bacteria. *Journal of Applied Microbiology*. 85: 1013-1022.
- Tichaczek, P.S.; et al. (1992). Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin from *L. sake* LTH 673. *Systematic and Applied Microbiology*. 15: 460-468.
- Tramer, J. (1966). Nisin in food preservation. *Chemistry & Industry* 11: 446-450.
- Venema, K.; Venema, G.; & Kok, J. (1995). Lactococcal bacteriocins: mode of action and immunity. *Trends in Microbiology*. 3: 299-304.
- Wilimowska-Pelc; et al. (1976). The use of gel-filtration for the isolation of pure nisin from commercial products. *Acta Microbiologica Polonica*. 25: 71-77.
- Williams, A.M.; Fryer, J.L.; & Collins, M.D. (1990). *Lactococcus piscium* sp. nov. a new *Lactococcus* species from salmonid fish. *FEMS Microbiology Letters*. 68: 109.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

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

Peptone	10	g
Beef extract	10	g
Yeast extract	5	g
Glucose	20	g
Dipotassium hydrogen phosphate	2	g
Tween 80	1	g
Diammonium hydrogen citrate	2	g
Sodium acetate	5	g
Magnesium sulfate	0.1	g
Manganese sulfate	0.05	g
น้ำกลั่น	1000	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัม แต่ถ้าเตรียมเป็น MRS soft agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 0.7 กรัม

2. Bacteriocin screening medium (BSM)

(Developed on the basis of MRS medium)

Tryptone	10	g
Beef extract	2	g
Yeast extract	4	g
Glucose	2	g
Dipotassium hydrogen phosphate	8.7	g
Potassium dihydrogen phosphate	8	g
Tween 80	1	g
Diammonium hydrogen citrate	2	g

Magnesium sulfate	0.2	g
Manganese sulfate	0.05	g
น้ำกลั่น	1000	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัม

3. Nutrient Broth (NB)

Peptone	5	g
Beef extract	3	g
น้ำกลั่น	1000	ml

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที ในกรณีที่ต้องการเตรียมเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 15 กรัม แต่ถ้าเตรียมเป็น NA soft agar ให้เติมวุ้นผงลงไป 0.7 กรัม

4. Brain Heart Infusion (BHI) broth

Calf brain infusion	200	g
Beef infusion	250	g
Proteose peptone	10	g
Dextrose	2	g
Sodium chloride	5	g
Disodium phosphate	2.5	g

ใช้เป็นอาหารสูตรสำเร็จ โดยใช้ BHI broth 37 กรัม เติมน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

1. BaSO_4 standard หรือ McFarland standard แสดงในตาราง 16

ตาราง 16 BaSO_4 standard หรือ McFarland standard

Tube No.	1	2	3	4	5
Barium chloride (ml)	0.1	0.2	0.3	0.4	0.5
Sulfuric acid (ml)	9.9	9.8	9.7	9.6	9.5
Approx.cell density ($\times 10^8$ / ml)	3	6	9	12	15

วิธีการเตรียมสาร

- 1.1 ชั่ง $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 1.175 กรัม เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
 - 1.2 ปิเปต กรด H_2SO_4 เข้มข้น ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร
 - 1.3 ปิเปต Barium chloride จากข้อ 1 มา 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
 - 1.4 ปิเปต กรด H_2SO_4 ที่เตรียมจากข้อ 2 มา 9.6 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองเดียวกัน
- เพราะฉะนั้น จะได้ McFarland standard No. 4

วิธีการใช้

เตรียมซัสเพนชันของเชื้อในหลอดทดลอง แล้วนำมาเทียบความขุ่นกับ McFarland ที่เตรียมไว้

2. NIN reagent

Ninhydrin	7	g
Methanol	40	ml
Dimethylsulfoxide (DMSO)	60	ml

3. VP 1 reagent

Potassium hydroxide	40	g
H_2O	100	g

4. VP 2 reagent

α -naphthol	6	g
Ethanol	100	ml

5. ZYM A

Tris-hydroxymethyl-aminomethane	25	g
Hydrochloric acid (37%)	11	ml
Sodium lauryl sulfate	10	g
H ₂ O	100	ml

6. ZYM B

Fast Blue BB (active ingredient)	0.12	g
Methanol	40	ml
DMSO	60	ml

ภาคผนวก ค

การจัดจำแนก LAB ในระดับสปีชีส์ โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 20 Strep (bioMerieux) มีวิธีการดังนี้

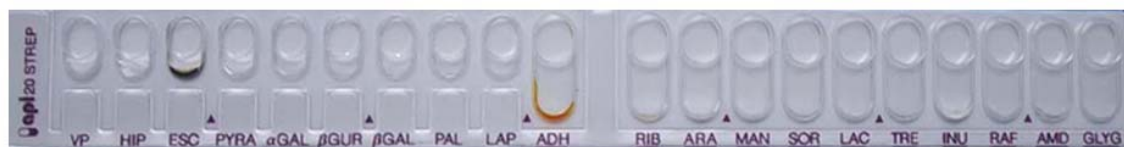
1. การเตรียม inoculum

ใช้สำลี swab เชื้อจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ มาละลายในน้ำกลั่นปราศจากสารเจือปน ปริมาตร 2 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง ให้ได้ความเข้มข้นของเชื้อมากกว่า McFarland No.4 ชั่งเพนชันของเชื้อที่เตรียมขึ้นจะต้องนำไปใช้ทดสอบทันที

2. การเติมชั่งเพนชันของเชื้อลงใน strip

2.1 แถบ strip จะแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกประกอบด้วย การทดสอบ VP ถึง ADH (ภาพประกอบ 8) เพื่อหลีกเลี่ยงการเกิดฟองอากาศ ให้วางกล่อง incubate ที่มี strip ในลักษณะเอียง ตั้งขึ้นและวางปลายของปิเปตตรงด้านข้างของหลุมทดสอบ

ช่อง VP ถึง LAP หยดชั่งเพนชันของเชื้อประมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในช่องแต่ละช่องและสำหรับช่อง ADH หยดหรือเติมไม่เต็มช่องคือ เติมเฉพาะถึงส่วนโค้งของช่องเท่านั้น



ภาพประกอบ 8 ลักษณะของ strip สำเร็จรูป API 20 Strep

2.2 ส่วนที่ 2 ของแถบ strip (RIB ถึง GLYG)

ดูดชั่งเพนชันของเชื้อที่เตรียมไว้ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงใน GP medium เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นดูดชั่งเพนชันของเชื้อ (จาก GP medium) เติมลงในช่อง RIB ถึง GLYG โดยเติมไม่เต็มช่อง เติมเฉพาะถึงส่วนโค้งของช่อง

2.3 หยด mineral oil ลงไปในช่อง ADH ถึง GLYG ให้เต็มช่อง จากนั้นนำไปบ่มเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C ในสภาวะมีออกซิเจน เป็นเวลา 4-4.5 ชั่วโมงสำหรับการอ่านผลครั้งแรก และ 24 ชั่วโมง สำหรับการอ่านผลครั้งที่สอง (กรณีที่เป็น)

3. การอ่านผล

ภายหลังการบ่มเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 4-4.5 ชั่วโมง เติม reagent ดังนี้

- หยด VP1, VP2 reagent อย่างละ 1 หยด ลงในช่อง VP test
- หยด NIN reagent 2 หยด ลงในช่อง HIP test
- หยด ZYM A และ ZYM B อย่างละ 1 หยด ลงในช่อง PYRA, α GAL, β GUR, β GAL, PAL และ LAP test รอ 10 นาที จึงอ่านผลโดยใช้ตารางอ่านผล

4. การแปลผล

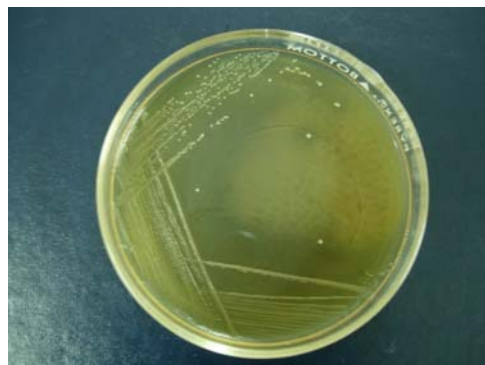
ใช้ software ในการแปลผล โดยใส่เป็นเครื่องหมาย +,-



ภาพประกอบ 9 ผลการจัดจำแนก SK2 โดยใช้ชุดจำแนกแบคทีเรียชนิดสำเร็จรูป API 20 Strep

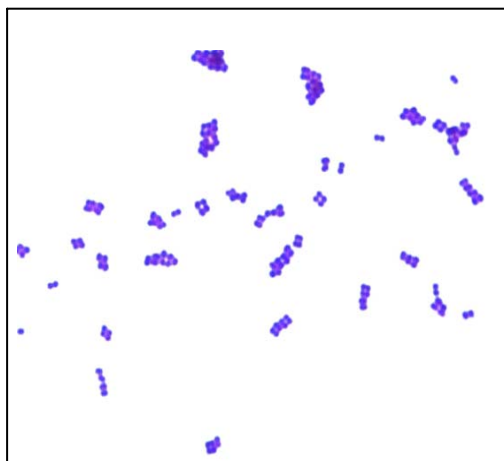
ภาคผนวก ง

การเจริญของ LAB สายพันธุ์ SK2 บนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3



ภาพประกอบ 10 การเจริญของ LAB สายพันธุ์ SK2 บนอาหาร MRS ที่เติม CaCO_3

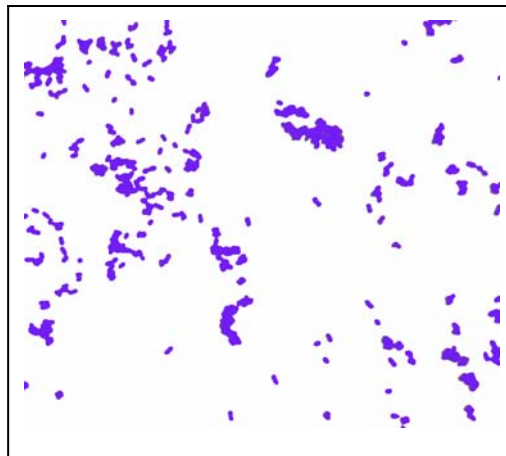
ลักษณะรูปร่างของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมัก



(1) เซลล์รูปทรงกลม



(2) เซลล์รูปท่อน



(3) เซลล์รูปไข่

ภาพประกอบ 11 ลักษณะรูปร่างของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมัก

ประวัติย่อผู้วิจัย

ประวัติย่อผู้วิจัย

ชื่อ ชื่อสกุล	นางสาวกรรณิการ์ กำลัง
วันเดือนปีเกิด	21 มกราคม 2524
สถานที่เกิด	พญาไท กรุงเทพฯ
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	307/1 ถนนเทพารักษ์ ตำบลเทพารักษ์ อำเภอเมือง สมุทรปราการ 10270
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	-
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	-
ประวัติการศึกษา	
พ.ศ. 2541	ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียน สิริวัฒนาธร
พ.ศ. 2545	วท.บ. (ชีววิทยา) จากมหาวิทยาลัยมหิดล
พ.ศ. 2549	วท.ม. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทร วิโรฒ