579 3
ส237ก
ร.1

บริจาค

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก

Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากงบประมาณรายได้
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
ประจำปีงบประมาณ 2546

11 เม.ย. 2549

คณะผู้ดำเนินงานวิจัย

สมใจ ศิริโภค
ขจีนาฏ โพธิเวชกุล
ประวัติ อังประภาพรชัย
สุมาลี เหลืองสกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ว224505

คำนำ

ในปัจจุบันผู้บริโภคมีแนวโน้มในการบริโภคอาหารสำเร็จรูป อาหารกึ่งสำเร็จรูป อาหารพร้อมปรุง อาหารพร้อมรับประทาน รวมทั้งอาหารแช่เย็นและอาหารแช่แข็งกันมากขึ้น เพราะสะดวกและประหยัดเวลา ในขณะเดียวกันผู้บริโภคก็ให้ความสนใจเกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพกันมากขึ้น (Abbe *et al.*, 1995) และไม่นิยมบริโภคอาหารที่ใส่สารเคมีกันเสียหรือสารปฏิชีวนะ ผู้ผลิตอาหารจึงต้องนำวิธีการอื่น ๆ เข้ามาช่วยในการถนอมอาหารแทน ซึ่งวิธีการหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคโดยทั่วไป คือ การใช้แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) เนื่องจาก LAB เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ทั้งผลิตภัณฑ์นม เนื้อ ปลา ผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากธัญญพืช ซึ่งมนุษย์ได้บริโภคมาเป็นเวลานานแล้ว ดังนั้นผู้บริโภคส่วนใหญ่จึงยอมรับว่า LAB เป็น food-grade organism และแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก LAB เป็น natural antimicrobial substance ด้วยเหตุผลดังกล่าวนี้จึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับ LAB ที่ผลิตแบคทีริโอซินซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ กันอย่างกว้างขวาง เพื่อหาแนวทางที่จะนำมาใช้ประโยชน์เป็น food biopreservative หรือ natural food preservative (Lindgren and Dobrogosz, 1990; Adams and Nicolaodes, 1997; Bredholt *et al.*, 2001; Rodriguez *et al.*, 2002)

ในประเทศไทยมีอาหารหมักพื้นบ้านหลายชนิดที่เกิดจากกิจกรรมของ LAB ซึ่งส่วนใหญ่มีการผลิตในระดับครัวเรือน โดยอาศัยเชื้อ LAB ที่ปนเปื้อนมาในวัตถุดิบตามธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารหมัก แหล่งผลิต และวิธีการผลิต ดังนั้นจึงเห็นว่าควรจะมีการแยกเชื้อ LAB จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ เหล่านี้ และนำมาทดสอบเพื่อคัดเลือกเชื้อ LAB ที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) ในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัย และเป็นแนวทางในการผลิตแบคทีริโอซินสำหรับใช้ในการถนอมอาหารแทนสารเคมีอื่นซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ นอกจากนี้ LAB ที่ผลิตแบคทีริโอซินได้ยังสามารถนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์เพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับยีนที่สร้างแบคทีริโอซินซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์เป็น marker แทนการใช้ antibiotic gene หรือใช้ในการสร้าง food-grade cloning vector เพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารได้อีกด้วย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณงานส่งเสริมวิจัยและตำรา และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ที่ให้การสนับสนุนการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ รศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อให้เชื้อทดสอบสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้

สมใจ ศิริโภค และคณะ

ธันวาคม 2547

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อ LAB จากอาหารหมักจำนวน 21 ตัวอย่าง พบว่าได้แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส หรือสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้เล็กน้อย ทั้งหมด 75 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียรูปท่อน 57 ไอโซเลท ส่วนใหญ่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ยกเว้นเพียงไอโซเลทเดียวคือ KJN3 ซึ่งสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้เล็กน้อย ในขณะที่แบคทีเรียรูปทรงกลมที่แยกได้ 18 ไอโซเลท สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท และเมื่อนำ LAB ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JMC 1157 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 โดยวิธี agar spot assay พบว่าเชื้อ LAB ที่แยกได้ 26 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. sakei* ได้ และ 21 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยเชื้อที่ยับยั้ง *L. sakei* ได้ดีที่สุดได้แก่ FUB5 ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Pediococcus* ทำให้เกิดวงใสขนาด 25 มิลลิเมตร และ LAB ที่ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดได้แก่ SLB2 ซึ่งจัดอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* ทำให้เกิดวงใสขนาด 18 มิลลิเมตร

Abstract

Seventy five isolates of lactic acid bacteria (LAB) were isolated from 21 fermented food samples. Among these, 57 isolates were rod-shaped LAB and 18 isolates were cocci. Most of the rod-shaped LAB were catalase negative, except KJN3 which produced a small amount of O_2 from H_2O_2. Nine of the 18 cocci isolates showed catalase positive. Agar spot assay of bacteriocin production using *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JMC 1157 and *Staphylococcus aureus* TISTR 118 as the test organisms revealed that 26 of the 75 isolates could inhibit *L. sakei* and 21 isolates could inhibit *S. aureus*. The isolate which gave the largest inhibition zone (25 mm) on *L. sakei*, FUB5, was identified as *Pediococcus* sp. and the isolate which gave the largest inhibition zone (18 mm) on *S. aureus*, SLB2, was identified as *Lactobacillus* sp.

บทนำ

ความปลอดภัยของอาหารเป็นเรื่องที่มีความสำคัญอย่างยิ่งสำหรับผู้ผลิตอาหารและผู้ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการออกกฎหมายเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับประทานอาหารที่ปลอดภัย ปราศจากเชื้อโรคและสารเคมีที่เป็นพิษต่อร่างกาย ในปัจจุบันแม้ว่าความรู้ทางจุลชีววิทยาจะมีความก้าวหน้าขึ้นมาก และมีการควบคุมให้ผู้ผลิตอาหารต้องปฏิบัติตามวิธีการเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค เช่น HACCP ก็ตาม แต่อัตราการเกิดโรคอาหารเป็นพิษทั่วโลกก็ยังคงเพิ่มสูงขึ้น (Kelly *et al.*, 1996) เนื่องจากวัฒนธรรมในการบริโภคอาหารของมนุษย์ได้เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพเศรษฐกิจ กล่าวคือมีการบริโภคอาหารสำเร็จรูป อาหารกึ่งสำเร็จรูป อาหารพร้อมปรุง อาหารพร้อมรับประทาน รวมทั้งอาหารแช่เย็นและอาหารแช่แข็งกันมากขึ้น เพราะสะดวกและประหยัดเวลา ในขณะเดียวกันผู้บริโภคในปัจจุบันก็ได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพกันมากขึ้น (Abbe *et al.*, 1995) ผู้ผลิตอาหารจึงได้มีการลดการใช้เกลือ น้ำตาล และสารเคมีกันเสียที่ใช้ใส่ในอาหารให้น้อยลง โดยมีการนำวิธีการอื่น ๆ เข้ามาช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารแทน เช่น การใช้ระบบทำความเย็น และการใช้ภาชนะบรรจุที่ดัดแปลงสภาพบรรยากาศหรือทำให้เกิดสภาพสูญญากาศเพื่อลดปัญหาการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ รวมทั้งการใช้แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก (LAB) เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีหรือสารปฏิชีวนะซึ่งอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้ (Lindgren and Dobrogosz, 1990; Kim, 1993; Abbe *et al.*, 1995; Holzapfel *et al.*, 1995; Jack *et al.*, 1995; Schillinger *et al.*, 1996; Stiles, 1996; Caplice and Fitzgerald, 1999; Hugas *et al.*, 1999)

แบคทีริโอซิน เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีน หรือเปปไทด์ ซึ่งสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิด แต่ที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ แบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นจาก LAB (Rodriguez *et al.*, 2002) โดยเฉพาะอย่างยิ่ง LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักซึ่งได้รับการยอมรับว่าเป็นจุลินทรีย์ที่ปลอดภัย (Generally recognized as safe, GRAS) เนื่องจากเกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมักมาเป็นเวลานานหลายศตวรรษแล้ว (De Martinis, 2003) ดังนั้นแบคทีริโอซินที่ผลิตจาก LAB เหล่านี้จึงมีแนวโน้มที่จะปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหารได้ด้วย (Garver and Muriana, 1993; Kelly *et al.*, 1996; Rodriguez *et al.*, 2002) แบคทีริโอซินที่สร้างจาก LAB ส่วนใหญ่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับ LAB ชนิดที่สร้างแบคทีริโอซินนั้น อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีริโอซินที่สร้างจาก LAB บางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* (Tagg *et al.*, 1976.; Lindgren and Dobrogosz, 1990; Okereke and Montville, 1991a, b; Maisnier-Patin *et al.*, 1992; Klaenhammer, 1993; Adams and Nicolaides, 1997; Halami *et al.*, 2000; Noonpakdee *et al.*, 2003)

การค้นพบแบคทีริโอซินจาก LAB มีรายงานครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1928 โดย Rogers พบว่า *Lactococcus lactis* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus bulgaricus* ได้ ต่อมาในปี ค.ศ.

1947 Mattick และ Hirsch ได้ศึกษาพบว่าสารที่ยับยั้งการเจริญของ *Lb. bulgaricus* ได้นี้มีโครงสร้างทางเคมีเป็นเปปไทด์ และตั้งชื่อว่าไนซิน (nisin) หลังจากนั้นก็ได้มีการศึกษาพบว่าไนซินนอกจากจะยับยั้งการเจริญของ lactobacilli ได้แล้วยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้อีกหลายชนิด คือ streptococci, staphylococci, *Bacillus* spp. และ clostridia (Lindgren and Dobrogosz, 1990) ในปัจจุบันไนซินได้รับการยอมรับในสหรัฐอเมริกาว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัย (GRAS) (FDA, 1988) และมีการใช้ไนซินเป็นสารเสริมเพื่อช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดทั่วโลก (Delves-Broughton, 1990) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า LAB สายพันธุ์ที่สร้างไนซินได้สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Clostridium botulinum* (Okereke and Montville, 1991a, b) และยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในระหว่างการผลิต Camembert cheese ได้ (Maisnier-Patin *et al.*, 1992)

ในระยะเวลากว่า 20 ปีที่ผ่านมานี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตแบคทีโอซินจาก LAB ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารจากแหล่งต่าง ๆ กันอย่างกว้างขวาง (Lewus *et al.*, 1991; Sobrino *et al.*, 1991; Uhlman *et al.*, 1992; Garriga *et al.*, 1993; Kristian and Muriana 1993; Fricourt *et al.*, 1994; Gonzalez *et al.*, 1994; Samelis *et al.*, 1994; Rekhif *et al.*, 1995; Rodriguez *et al.*, 1995; Enan *et al.*, 1996; Kelly *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 1997; Coventry *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 1998; Olasupo *et al.*, 1999; Swetwiwat and Lothong, 1999; Choi *et al.*, 2000; Halami *et al.*, 2000; Messi *et al.*, 2001; Noonpakdee *et al.*, 2003; De Martinis and Freitas, 2003) และมีรายงานว่า LAB หลายชนิดในจีนัส *Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissella* สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ (Stiles and Holzapfel, 1997; Adams and Nicolaides, 1997; Halami *et al.*, 2000)

วิธีการแยกและคัดเลือกเชื้อ LAB ที่ผลิตแบคทีริโอซินได้จากผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่าง ๆ ในระยะแรกนิยมใช้อาหาร MRS ทั้ง 2 ขั้นตอน แต่เนื่องจาก LAB เมื่อเจริญในอาหาร MRS จะสร้างกรดแลคติก และกรดอะซิติก ซึ่งทำให้ pH ของอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว จึงสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นที่ไม่ต้องการ รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Salmonella* (Adams and Hall, 1988; Lindgren and Walter, 1990) ได้ ดังนั้นในระยะต่อมาจึงมีผู้คัดแปลงอาหารที่ใช้คัดเลือก LAB ที่สร้างแบคทีริโอซิน เพื่อลด false positive ที่เกิดจากกรด เช่น Lewus and Montville (1991) ได้ใช้ yeast extract-supplemented trypticase soy agar (TSAYE) ที่ปราศจากกลูโคสในการคัดเลือกเชื้อที่สร้างแบคทีริโอซินได้ และ Tichaczek *et al.* (1992) ได้ใช้ bacteriocin screening medium (BSM) ซึ่งดัดแปลงมาจาก MRS โดยลดปริมาณกลูโคสจาก 2% เป็น 0.2% เพื่อลดการสร้างกรดแลคติก เป็นต้น นอกจากนี้ในสภาวะที่มีออกซิเจน LAB ยังสามารถผลิต H_2O_2 ซึ่งเป็น antimicrobial substance ได้ด้วย (Lindgren and Dobrogosz, 1990) ดังนั้นในการทดสอบการสร้างแบคทีริโอซินของ LAB จึงนิยมบ่มเชื้อภายใต้สภาวะปราศจากออกซิเจน หรืออาจใช้เอนไซม์ catalase ผสมใน soft agar ร่วมด้วย เพื่อลด false positive ที่อาจเกิดจาก H_2O_2 (Swetwiwat and Lothong, 1999; Noonpakdee *et al.* 2003)

สำหรับเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการสร้างแบคทีริโอซินของ LAB นั้น อาจใช้วิธี spot-on-the-lawn assay หรือ flip-streak method ซึ่งเป็น indirect method หรือ well diffusion assay ซึ่งเป็น direct method (Lewus and Montville, 1991) แต่โดยทั่วไปการคัดเลือกเชื้อในขั้นต้นนิยมใช้ spot-on-the-lawn assay (agar spot assay) โดย spot LAB ที่ต้องการทดสอบบน agar medium บ่มให้เชื้อเจริญขึ้นมาเป็นโคโลนี แล้วจึงเททับ (overlay) ด้วย soft agar ที่ผสม indicator strain แล้วบ่มต่อ ถ้ารอบ ๆ โคโลนีใดมี inhibition zone เกิดขึ้น แสดงว่าสามารถสร้าง antimicrobial substance ได้ สำหรับ flip-streak method นั้นทำได้โดย streak LAB ที่ต้องการทดสอบว่าสร้างแบคทีริโอซินได้หรือไม่ลงบน agar medium ในจานเพาะเชื้อ บ่มให้เชื้อเจริญ แล้วจึงตัดอาหารออกไปใส่ฝาจานเพื่อให้เชื้อ LAB ที่เจริญขึ้นมาอยู่ด้านล่าง จากนั้น streak เชื้อ indicator strain ในแนวตั้งฉากกับ LAB เดิม แล้วบ่มต่อ สังเกตผลโดยดูการเกิด inhibition zone รอบ ๆ จุดตัดระหว่าง producer กับ indicator strain และวิธี well diffusion assay ทำได้โดยเลี้ยงเชื้อใน MRS broth แล้วเซนตริฟิวจ์แยกเซลล์ออก นำส่วนใสที่ได้ไปปรับ pH ให้เป็นกลาง (pH 7) แล้วสเตอริไลส์โดยการกรอง จากนั้นจึงนำไปใส่ในหลุมในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งผสม indicator strain ซึ่งเจาะหลุมไว้แล้ว บ่มเชื้อ แล้วสังเกตการเกิด inhibition zone รอบ ๆ หลุม ถ้าการทดสอบในขั้นต้นพบว่ามี inhibition zone เกิดขึ้นแล้ว อาจทำการทดสอบยืนยันว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้ง indicator strain เป็นโปรตีนได้โดยนำมา treat ด้วย proteolytic enzyme ชนิดต่าง ๆ เช่น proteinase K, trypsin, α-chymotrypsin, pepsin ฯลฯ ก่อนนำไปทดสอบเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ treat ด้วยเอนไซม์ (Swetwiwat and Lothong, 1999; Noonpakdee *et al.* 2003) ถ้าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเป็นโปรตีน เมื่อถูก treat ด้วย proteolytic enzyme แล้วจะไม่สามารถยับยั้ง indicator strain ได้

ตัวอย่างอาหารที่มีรายงานว่าพบแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้ มีทั้งผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น mixed salad, fermented carrot (Uhlman *et al.*, 1992), alfalfa sprouts, coleslaw, grapefruit juice (Kelly *et. al.*, 1996), bean-sprouts (Cai *et al.*, 1997), ready-to-eat salad (Franz *et al.*, 1998), kimchi (Choi *et al.*, 2000) ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ground beef, ground chicken, bologna, ham, roast beef, salami, smoked mackerel (Garver and Muriana, 1993; Kelly *et. al.*, 1996), fermented sausage (Garriga *et al.*, 1993; Rekhif *et al.*, 1995), processed channel catfish (Fricourt *et al.*, 1994), dry fermented sausage (Sobrino *et al.*, 1991; Samelis *et al.*, 1994; Hugas *et al.*, 1995, Rodriguez *et al.*, 1995), dry sausage (Enan *et al.*, 1996), Italian sausages (Messi *et al.*, 2001), แหนม (Swetwiwathana and Lothong, 1999; Noonpakdee *et al.*, 2003), Brazillian meat (De Martinis *et al.*, 2003) และผลิตภัณฑ์นม เช่น Farmhouse cheese, Gruyere cheese (Kelly *et. al.*, 1996), Wara (a traditional Nigerian cheese) (Olasupo *et al.*, 1999)

จะเห็นได้ว่าผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดที่มนุษย์เราบริโภคกันตามปกติมี LAB ที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้อยู่แล้ว ดังนั้นการแยกเชื้อเหล่านี้ออกมาเพื่อศึกษาเกี่ยวกับการสร้างแบคทีริโอซินจึงมีแนวโน้มที่จะทำให้ได้แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัย และเป็นแนวทางในการผลิตแบคทีริโอซินเพื่อใช้ในการถนอมอาหารแทนสารเคมีอื่นซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้

วัตถุประสงค์

1. แยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก
2. คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้โดยวิธี agar spot assay
3. จำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้

ขอบเขตของโครงการวิจัย

แยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ในประเทศไทย ประมาณ 20 ตัวอย่าง นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีริโอซินโดยวิธี agar spot assay เพื่อคัดเลือกเชื้อที่ผลิตแบคทีริโอซินได้ และจัดจำแนกชนิด (identification) ของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้ในระดับจีนัส

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับและหน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

ผลการวิจัยที่ได้ คือ แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น (starter) ในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัย และเป็นแนวทางในการผลิตแบคทีริโอซินสำหรับใช้ในการถนอมอาหารแทนสารเคมีอื่นซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ รวมทั้งนำไปใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุศาสตร์เพื่อหาข้อมูลเกี่ยวกับยีนที่สร้างแบคทีริโอซินซึ่งอาจนำไปใช้ประโยชน์เป็น marker แทนการใช้ antibiotic gene หรือใช้ในการสร้าง food-grade cloning vector เพื่อประโยชน์ในการศึกษาทางด้านพันธุวิศวกรรมของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารต่อไป

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์ คือสถาบันวิจัยที่มีงานวิจัยทางด้านแบคทีเรียแลคติก และบริษัทเอกชนที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมักจากแบคทีเรียแลคติก

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. ตัวอย่างอาหารหมัก

ตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้ในการแยกเชื้อ LAB ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ไส้กรอกเยอรมัน ปลาส้ม กุ้งส้ม ปูเค็ม หอยดอง หอมดอง ผักเสี้ยนดอง กระหล่ำปลีดอง นมเปรี้ยว และขนมจีน จำนวนทั้งหมด 21 ตัวอย่าง

2. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ (indicator organism)

Lactobacillus sakei subsp. *sakei* JMC 1157 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ซึ่งได้รับการเอื้อเฟื้อจาก รศ. ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก

นำตัวอย่างอาหารมาเจือจางให้เหมาะสม แล้วนำไป spread ลงบนอาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 1-2 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยว ๆ ที่ทำให้เกิดบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี นำไป restreak บนอาหาร MRS agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้อมสีแกรม ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทดสอบ catalase activity แล้วเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก และให้ผล catalase negative ไปทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีริโอซินต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรียแลคติก

ทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี agar spot assay (Swetwiwat and Lothong, 1999) โดย spot เชื้อ LAB ที่ต้องการทดสอบลงบนอาหาร bacteriocin screening medium (BSM) ซึ่งดัดแปลงมาจากอาหาร MRS (Tichaczek *et al.*, 1992) และมีส่วนประกอบดังนี้คือ glucose 0.2%, meat extract 0.2%, tryptone 1%, yeast extract 0.4%, tween 80 0.1%, citric acid diammonium salt 0.2%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02%, $MnSO_4.4H_2O$ 0.005%, $K_2HPO_4.3H_2O$ 0.87%, KH_2PO_4 0.8% และ agar 1.5% บ่มเชื้อในสภาพปราศจากออกซิเจนเพื่อป้องกันการสร้าง H_2O_2 และกรดอะซิติก (Schillinger and Luecke, 1989) ที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 20-24 ชม. จากนั้นเททับด้วย MRS soft agar (0.7% agar) ที่ผสม indicator strain (*Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JMC 1157 หรือ *S. aureus* TISTR 118) ปริมาตร 7 มล. บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30°C เป็นเวลา 18-24 ชม. ตรวจผลโดยดูการเกิด inhibition zone รอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเกิดเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสร้างสารยับยั้งการเจริญของ indicator strain ได้ เก็บเชื้อที่ทำให้เกิด inhibition zone ไว้ศึกษาต่อไป

5. การจัดจำแนกชนิด (identification) แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้

นำ LAB ที่ยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JMC 1157 และ/หรือ *S. aureus* TISTR 118 ได้ ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้าง CO_2 จากการหมักกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45°C การเจริญใน MRS ที่มีเกลือ 6.5 และ 18% และการเจริญที่ pH 4.4 และ 8.5 แล้วนำผลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียแลคติกโดยเทียบเคียงกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath *et al.*, 1986) และ The Genera of Lactic Acid Bacteria (Wood and Holzapfel, 1995)

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก

การแยกเชื้อ LAB จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0% พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน หรือทรงกลม ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส หรือสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้เล็กน้อย ทั้งหมด 75 ไอโซเลท ในจำนวนนี้มีแบคทีเรียรูปร่างท่อน 57 ไอโซเลท และทรงกลม 18 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปท่อนที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ยกเว้นเพียงไอโซเลทเดียวคือ KJN3 ซึ่งสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้เล็กน้อย ในขณะที่แบคทีเรียรูปทรงกลมที่แยกได้สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท คือ NLP2, NLP4, NAN2, NAN4, FUB5, FUB6, CCB2, CPK1 และ OSW2 ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การติดสีแกรม รูปร่าง และความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส ของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ

ตัวอย่างอาหาร	รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	Catalase Activity
1. แหนม	NLP1	แกรมบวก	ท่อน	-
จ. ลำพูน	NLP2	แกรมบวก	กลม	+
	NLP3	แกรมบวก	ท่อน	-
	NLP4	แกรมบวก	กลม	+
	NLP5	แกรมบวก	ท่อน	-
2. แหนมใบมะยม	NAN1	แกรมบวก	ท่อน	-
จ. อำนาจเจริญ	NAN2	แกรมบวก	กลม	+
	NAN3	แกรมบวก	ท่อน	-
	NAN4	แกรมบวก	กลม	+
3. ไส้กรอกเปรี้ยว	SLB1	แกรมบวก	กลม	-
จ. ลพบุรี	SLB2	แกรมบวก	ท่อน	-
4. ไส้กรอกเยอรมัน	GSS1	แกรมบวก	ท่อน	-
บ. ซี.พี. อินเตอร์ฟู้ด	GSS2	แกรมบวก	ท่อน	-
5. ปลาส้ม	FFN1	แกรมบวก	ท่อน	-
จ. นครนายก				
6. ปลาส้ม	FUB1	แกรมบวก	ท่อน	-
จ. อุบลราชธานี	FUB2	แกรมบวก	ท่อน	-
	FUB3	แกรมบวก	กลม	-
	FUB4	แกรมบวก	ท่อน	-
	FUB5	แกรมบวก	กลม	+
	FUB6	แกรมบวก	กลม	+

ตารางที่ 1 การติดสีแกรม รูปร่าง และความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส ของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	Catalase Activity
7. ปลาส้ม จ. ลพบุรี	FFL1	แกรมบวก	ท่อน	-
	FFL2	แกรมบวก	ท่อน	-
	FFL3	แกรมบวก	ท่อน	-
8. ปลาส้ม จ. พะเยา	FFP1	แกรมบวก	ท่อน	-
	FFP2	แกรมบวก	ท่อน	-
	FFP3	แกรมบวก	ท่อน	-
	FFP4	แกรมบวก	ท่อน	-
9. ปลาส้ม ตลาดนัด มศว	FSW1	แกรมบวก	ท่อน	-
	FSW2	แกรมบวก	ท่อน	-
	FSW3	แกรมบวก	ท่อน	-
	FSW4	แกรมบวก	ท่อน	-
	FSW5	แกรมบวก	ท่อน	-
10. กุ้งส้ม จ. ประจวบคีรีขันธ์	KSP1	แกรมบวก	ท่อน	-
	KSP2	แกรมบวก	ท่อน	-
	KSP3	แกรมบวก	ท่อน	-
	KSP4	แกรมบวก	ท่อน	-
	KSP5	แกรมบวก	ท่อน	-
	KSP6	แกรมบวก	ท่อน	-
11. ปูเค็ม จ. ชลบุรี	CCB1	แกรมบวก	ท่อน	-
	CCB2	แกรมบวก	กลม	+
12. ปูเค็ม จ. ประจวบคีรีขันธ์	CPK1	แกรมบวก	กลม	+
13. หอยดอง จ. สมุทรสาคร	HSK1	แกรมบวก	ท่อน	-
	HSK2	แกรมบวก	ท่อน	-
14. หอมดอง ตลาดนัด มศว	OSW1	แกรมบวก	ท่อน	-
	OSW2	แกรมบวก	กลม	+
	OSW3	แกรมบวก	ท่อน	-
	OSW4	แกรมบวก	ท่อน	-
	OSW5	แกรมบวก	ท่อน	-

ตารางที่ 1 การติดสีแกรม รูปร่าง และความสามารถในการผลิตเอนไซม์คะตะเลส ของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	รหัสเชื้อ	การติดสีแกรม	รูปร่าง	Catalase Activity
15. ผักเสี้ยนดอง จ. นครสวรรค์	PSN1	แกรมบวก	ท่อน	-
	PSN2	แกรมบวก	ท่อน	-
	PSN3	แกรมบวก	ท่อน	-
16. กระหล่ำปลีดอง จ. กรุงเทพฯ	SKK1	แกรมบวก	ท่อน	-
	SKK2	แกรมบวก	ท่อน	-
17. นมเปรี้ยวดัชมิลล์	DFM1	แกรมบวก	ท่อน	-
18. ขนมจีน จ. กรุงเทพฯ	KJK1	แกรมบวก	กลม	-
19. ขนมจีน จ. ลพบุรี	KJL1	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJL2	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJL3	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJL4	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJL5	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJL6	แกรมบวก	ท่อน	-
20. ขนมจีน จ. นครสวรรค์	KJN1	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJN2	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJN3	แกรมบวก	ท่อน	+
	KJN3	แกรมบวก	กลม	-
	KJN4	แกรมบวก	กลม	-
	KJN5	แกรมบวก	ท่อน	-
21. ขนมจีน จ. ฉะเชิงเทรา	KJC1	แกรมบวก	กลม	-
	KJC2	แกรมบวก	กลม	-
	KJC3	แกรมบวก	กลม	-
	KJC4	แกรมบวก	กลม	-
	KJC5	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJC6	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJC7	แกรมบวก	ท่อน	-
	KJC8	แกรมบวก	ท่อน	-

2. การทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรียแลคติก

เมื่อนำ LAB ที่แยกได้จากข้อ 1 มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JMC 1157 และ *S. aureus* TISTR 118 พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 เชื้อ LAB ที่แยกได้ 26 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. sakei* ได้ และ 21 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ โดย LAB บางไอโซเลทยับยั้งได้ทั้ง *L. sakei* และ *S. aureus* ในขณะที่ LAB บางไอโซเลทยับยั้งได้เฉพาะ *L. sakei* หรือ *S. aureus* เพียงอย่างใดอย่างหนึ่ง LAB ที่ยับยั้ง *L. sakei* ได้ดีที่สุดได้แก่ FUB5 ซึ่งทำให้เกิดวงใสขนาด 25 มิลลิเมตร และ LAB ที่ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดได้แก่ SLB2 ซึ่งทำให้เกิดวงใสขนาด 18 มิลลิเมตร

ตารางที่ 2 ความสามารถของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยวิธี agar spot test

ตัวอย่างอาหาร	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone (mm)	
		L. sakei subsp. *sakei* JMC 1157	*S. aureus* TISTR 118
1. แหนม จ. ลำพูน	NLP1	6	-
	NLP2	-	-
	NLP3	15	-
	NLP4	9	-
	NLP5	-	-
2. แหนมใบมะยม จ. อำนาจเจริญ	NAN1	-	6
	NAN2	-	4
	NAN3	-	9
	NAN4	-	-
3. ไส้กรอกเปรี้ยว จ. ลพบุรี	SLB1	-	-
	SLB2	6	18
4. ไส้กรอกเยอรมัน บ. ซี.พี. อินเตอร์ฟู้ด	GSS1	6	-
	GSS2	13	11
5. ปลาส้ม จ. นครนายก	FFN1	-	-
6. ปลาส้ม จ. อุบลราชธานี	FUB1	16	-
	FUB2	-	-
	FUB3	-	-
	FUB4	-	-
	FUB5	25	11
	FUB6	-	-

ตารางที่ 2 ความสามารถของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยวิธี agar spot test (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone (mm)	
		L. sakei subsp. *sakei* JMC 1157	*S. aureus* TISTR 118
7. ปลาส้ม จ. ลพบุรี	FFL1	7	-
	FFL2	4	-
	FFL3	-	6
8. ปลาส้ม จ. พะเยา	FFP1	-	-
	FFP2	-	-
	FFP3	-	-
	FFP4	-	-
9. ปลาส้ม ตลาดนัด มศว	FSW1	-	-
	FSW2	-	-
	FSW3	-	-
	FSW4	10	-
	FSW5	4	-
10. กุ้งส้ม จ. ประจวบคีรีขันธ์	KSP1	-	-
	KSP2	-	-
	KSP3	-	-
	KSP4	9	8
	KSP5	7	-
	KSP6	7	7
11. ปูเค็ม จ. ชลบุรี	CCB1	-	10
	CCB2	-	-
12. ปูเค็ม จ. ประจวบคีรีขันธ์	CPK1	-	-
13. หอยดอง จ. สมุทรสาคร	HSK1	9	-
	HSK2	-	-
14. หอมดอง ตลาดนัด มศว	OSW1	7	13
	OSW2	-	-
	OSW3	6	-
	OSW4	7	16
	OSW5	9	15

ตารางที่ 2 ความสามารถของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ โดยวิธี agar spot test (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone (mm)	
		L. sakei subsp. *sakei* JMC 1157	*S. aureus* TISTR 118
15. ผักเสี้ยนดอง จ. นครสวรรค์	PSN1	-	10
	PSN2	7	-
	PSN3	7	-
16. กระหล่ำปลีดอง จ. กรุงเทพฯ	SKK1	6	-
	SKK2	8	-
17. นมเปรี้ยวดัชมิลล์	DFM1	-	-
18. ขนมจีน จ. กรุงเทพฯ	KJK1	-	-
19. ขนมจีน จ. ลพบุรี	KJL1	-	-
	KJL2	-	-
	KJL3	-	-
	KJL4	-	-
	KJL5	-	-
	KJL6	-	-
20. ขนมจีน จ. นครสวรรค์	KJN1	-	-
	KJN2	-	-
	KJN3	17	-
	KJN4	-	5
	KJN5	-	8
	KJN6	-	-
21. ขนมจีน จ. ฉะเชิงเทรา	KJC1	-	12
	KJC2	-	-
	KJC3	-	-
	KJC4	-	14
	KJC5	-	-
	KJC6	-	10
	KJC7	15	10
	KJC8	-	10

5. การจัดจำแนกชนิด (identification) แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้

จากการนำ LAB ที่ยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JMC 1157 และ *S. aureus* TISTR 118 ได้ ไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้าง CO_2 จากการหมักกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45°C การเจริญใน MRS ที่มีเกลือ 6.5 และ 18% และการเจริญที่ pH 4.4 และ 8.5 พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 3 เมื่อนำผลที่ได้มาใช้ในการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียแลคติกโดยเทียบเคียงกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Sneath *et al.*, 1986) และ The Genera of Lactic Acid Bacteria (Wood and Holzapfel, 1995) พบว่า เชื้อรูปท่อนส่วนใหญ่มีสมบัติเหมือน LAB ในจีนัส *Lactobacillus* ยกเว้นเชื้อรหัส NLP3, NAN1 และ FFL3 มีสมบัติเหมือน LAB ในจีนัส *Carnobacterium* ซึ่งมีความแตกต่างจากเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* คือ สามารถเจริญได้ในอาหารที่มี pH สูงถึง 8.5 ได้ สำหรับเชื้อรูปทรงกลมทั้งหมด 7 ไอโซเลท คือ NLP4, NAN2, FUB5, KJN4, KJN5, KJC1 และ KJC4 มีสมบัติเหมือน LAB ในจีนัส *Pediococcus* เนื่องจากมีลักษณะการเรียงตัวของเซลล์แบบ tetrad แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นสูง 18% ได้

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และสมบัติทางสรีรวิทยา ของ LAB ที่ยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JMC 1157 และ *S. aureus* TISTR 118 ได้

รหัสเชื้อ	Inhibition Zone (mm)		Cell shape	Tetrad formation	Catalase	CO_2 from Glucose	Growth at 10°C	Growth at 45°C	Growth at 6.5% NaCl	Growth at 18% NaCl	Growth at pH 4.4	Growth at pH 8.5
	L.sakei	*S. aureus*										
NLP1	6	-	MR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
NLP3	15	-	SR	-	-	-	+	-	+	-	-	+
NLP4	9	-	CC	+	+	-	+	+	+	-	+	-
NAN1	-	6	SR	-	-	-	+	-	+	-	-	+
NAN2	-	4	CC	+	+	-	+	+	+	-	+	-
NAN3	-	9	MR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
SLB2	6	18	SR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
GSS1	6	-	SR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
GSS2	13	11	SR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
FUB1	16	-	MR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
FUB5	25	11	CC	+	+	-	+	+	+	-	+	-
FFL1	7	-	SR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
FFL2	4	-	MR	-	-	-	+	-	+	-	+	-

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และสมบัติทางสรีรวิทยา ของ LAB ที่ยับยั้งเชื้อ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JMC 1157 และ *S. aureus* TISTR 118 ได้ (ต่อ)

รหัสเชื้อ	Inhibition Zone (mm)		Morphology	Tetrad formation	Catalase	CO_2 from Glucose	Growth at 10°C	Growth at 45°C	Growth at 6.5% NaCl	Growth at 18% NaCl	Growth at pH 4.4	Growth at pH 8.5
	L.sakei	*S. aureus*										
FFL3	-	6	SR	-	-	-	+	-	+	-	-	+
FSW4	10	-	SR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
FSW5	4	-	MR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
KSP4	9	8	LR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
KSP5	7	-	MR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
KSP6	7	7	LR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
CCB1	-	10	MR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
HSK1	9	-	SR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
OSW1	7	13	MR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
OSW3	6	-	MR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
OSW4	7	16	SR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
OSW5	9	15	SR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PSN1	-	10	MR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PSN2	7	-	SR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
PSN3	7	-	SR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
SKK1	6	-	SR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
SKK2	8	-	SR	-	-	-	+	-	+	-	+	-
KJN3	17	-	MR	-	+	-	-	+	+	-	+	-
KJN4	-	5	CC	+	-	-	+	-	+	-	+	-
KJN5	-	8	CC	+	-	-	+	-	+	-	+	-
KJC1	-	12	CC	+	-	-	+	-	+	-	+	-
KJC4	-	14	CC	+	-	-	+	-	+	-	+	-
KJC6	-	10	MR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
KJC7	15	10	LR	-	-	-	-	+	+	-	+	-
KJC8	-	10	MR	-	-	-	-	+	+	-	+	-

หมายเหตุ : CC = cocci, SR = short rods, MR = medium rods, LR = long rods

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกเชื้อ LAB จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ จำนวน 21 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0% พบว่าได้เชื้อแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน หรือทรงกลม ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส หรือสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้เล็กน้อย ทั้งหมด 75 ไอโซเลท ในจำนวนนี้มีแบคทีเรียรูปร่างท่อน 57 ไอโซเลท และทรงกลม 18 ไอโซเลท แบคทีเรียรูปท่อนที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ยกเว้นเพียงไอโซเลทเดียวคือ KJN3 ซึ่งสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้เล็กน้อย ในขณะที่แบคทีเรียรูปทรงกลมที่แยกได้สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ทั้งหมด 9 ไอโซเลท คือ NLP2, NLP4, NAN2, NAN4, FUB5, FUB6, CCB2, CPK1 และ OSW2 และเมื่อนำ LAB ที่แยกได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* JMC 1157 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 พบว่า LAB ที่แยกได้ 26 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. sakei* ได้ และ 21 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดย LAB ไอโซเลทที่ยับยั้ง *L. sakei* ได้ส่วนใหญ่ไม่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และในทางกลับกัน LAB ไอโซเลทที่ยับยั้ง *S. aureus* ได้ ส่วนใหญ่ก็ไม่ยับยั้ง *L. sakei* เช่นกัน ยกเว้นบางไอโซเลทซึ่งยับยั้งได้ทั้ง *L. sakei* และ *S. aureus* แต่มักให้ผลยับยั้งต่างกัน ซึ่งแสดงว่าความสามารถของ LAB ที่แยกได้ในการยับยั้ง test organism ทั้ง 2 ชนิดนี้ ไม่มีความสัมพันธ์โดยตรงต่อกัน ดังนั้นถ้าต้องการคัดเลือก LAB ที่ยับยั้งเชื้อชนิดใดได้ ก็ควรใช้เชื้อชนิดนั้นเป็น test organism ในการทดสอบโดยตรง

LAB ที่ยับยั้ง *L. sakei* ได้ดีที่สุดได้แก่ FUB5 (แยกได้จากปลาส้ม จังหวัดอุบลราชธานี) ทำให้เกิดวงใสขนาด 25 มิลลิเมตร และ LAB ที่ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดได้แก่ SLB2 (แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยว จังหวัดลพบุรี) ทำให้เกิดวงใสขนาด 18 มิลลิเมตร และเมื่อนำ LAB ที่ยับยั้งเชื้อ *L. sakei* และ *S. aureus* ได้ทั้งหมดไปศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สมบัติทางชีวเคมี และสมบัติทางสรีรวิทยา พบว่า เชื้อรูปท่อนส่วนใหญ่อยู่ในจีนัส *Lactobacillus* ยกเว้นเชื้อรหัส NLP3, NAN1 และ FFL3 ซึ่งมีลักษณะเหมือน LAB ในจีนัส *Carnobacterium* สำหรับเชื้อรูปทรงกลมทั้ง 7 ไอโซเลท คือ NLP4, NAN2, FUB5, KJN4, KJN5, KJC1 และ KJC4 จัดอยู่ในจีนัส *Pediococcus*

ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าอาหารหมักแต่ละชนิดจากแหล่งต่าง ๆ ในประเทศไทย มีเชื้อ LAB ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษชนิดหนึ่งได้แตกต่างกัน ดังนั้นการคัดเลือกเชื้อ LAB ที่มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษได้นี้ จึงอาจนำไปใช้ประโยชน์เป็น starter ในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัยได้โดยตรง หรือนำไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีริโอซินเพื่อนำไปใช้ในการยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

ความคิดเห็นและข้อเสนอแนะ

งานวิจัยนี้แม้จะเป็นงานวิจัยพื้นฐาน แต่ก็ทำให้ได้ข้อมูลเบื้องต้นและได้เชื้อ LAB จากอาหารหมักที่มีความปลอดภัยเนื่องจากเป็นอาหารหมักพื้นบ้านที่บริโภคกันมาเป็นเวลานานแล้ว ซึ่งในประเทศไทยเรายังมีการศึกษาและรวบรวมจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในอุตสาหกรรมอาหารค่อนข้างน้อย อย่างไรก็ตามในงานวิจัยนี้เนื่องจากได้รับงบประมาณจำกัด จึงทำการศึกษาได้ในระดับหนึ่ง และยังแยกได้เชื้อ LAB จำนวนไม่มากนัก ควรจะมีการแยกเชื้อจากอาหารหมักที่หลากหลายทั้งชนิดและจำนวนให้มากกว่านี้ โดยเก็บตัวอย่างจากแหล่งผลิตต่าง ๆ กัน เนื่องจากการผลิตอาหารหมักในประเทศไทยส่วนใหญ่มีการผลิตในระดับครัวเรือน โดยอาศัยเชื้อ LAB ที่ปนเปื้อนมาในวัตถุดิบตามธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารหมัก แหล่งผลิต และวิธีการผลิต ดังนั้นถ้าเก็บตัวอย่างหมักชนิดต่าง ๆ จากแหล่งต่าง ๆ กัน จำนวนมาก ก็จะมีโอกาสได้เชื้อต่าง ๆ กันมากขึ้น และมีโอกาสได้เชื้อที่มีศักยภาพสูงตามต้องการได้มากขึ้นด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Abbe, T., L. Krockel and C. Hill. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **Int. J. Food Microbiol.** 28: 169-185.
2. Adams, M. R. and C. J. Hall. 1988. Growth inhibition of food-borne pathogens by lactic and acetic acids and their mixtures. **Int. J. Food Sci. Technol.** 23: 287-292.
3. Adams, M. R. and L. N. Nicolaides. 1997. Review of the sensitivity of different foodborne pathogens to fermentation. **Food Control.** 8: 227-239.
4. Bredholt, S., T. Nesbakken and A. Holck. 2001. Industrial application of an antilisterial strain of *Lactobacillus sakei* as a protective culture and its effect on the sensory acceptability of cooked, sliced, vacuum-packaged meats. **Int. J. Food Microbiol.** 66: 191-196.
5. Cai, Y., L. K. Ng and J. M. Farber. 1997. Isolation and characterization of nisin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from bean-sprouts. **J. Appl. Microbiol.** 83: 199-507.
6. Caplice, E. and G. F. Fitzgerald. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol.** 50: 131-149.
7. Choi, H. J., C. I. Cheigh, S. B. Kim and Y. R. Pyun. 2000. Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. **J. Appl. Microbiol.** 88: 563-571.
8. Coventry, M. J., J. B. Gordon, A. Wilcock, K. Harmark, B. E. Davidson, M. W. Hickey, A. J. Hillier and J. Wan. 1997. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from foods and comparison with pediocin and nisin. **J. Appl. Microbiol.** 83: 248-258.
9. De Martinis, E. C. P. and F. Z. Freitas. 2003. Screening of lactic acid bacteria from Brazilian meats for bacteriocin formation. **Food Control.** 14: 197-200.
10. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. **Food Technol.** 40: 100-112.
11. Enan, G., A. A. el Essawy, M. Uyttendaele and J. Debevere. 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from dry sausage: characterization, production and bactericidal action of plantaricin UG1. **Int. J. Food Microbiol.** 30: 189-215.
12. FDA. 1988. Nisin preparation: affirmation of GRAS status as a direct human food ingredient. **Fed. Reg.** 53: 11247.
13. Franz, C. M. A. P., M. Du Toit, N. A. Olasupo and W. H. Holzapfel. 1998. Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from ready-to-eat salad. **J. Appl. Microbiol.** 26: 231-235.

14. Fricourt, B. V., S. F. Barefoot, R. F. Testin and S. S. Hayasaka. 1994. Detection and activity of plantaricin F an antimicrobial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. **J. Food Prot.** 57: 698-702.

15. Garriga, M., M. Hugas, T. Aymerich and J. M. Monfort. 1993. Bacteriocinogenic activity of lactobacilli from fermented sausages. **J. Appl. Bacteriol.** 75: 142-148.

16. Garver, K. I. and P. M. Muriana. 1993. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. **Int. J. Food Microbiol.** 19: 241-258.

17. Gonzalez, B., P. Arca, B. Mayo and J. E. Suarez. 1994. Detection, purification, and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 2158-2163.

18. Halami, P. M., A. Chandrashekar and K. Nand. 2000. *Lactobacillus farciminis* MD, a new strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. **Lett. Appl. Microbiol.** 30: 197-202.

19. Holzapfel, W. H., R. Geizen and U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food grade enzymes. **Int. J. Food Microbiol.** 24: 343-362.

20. Hugas, M., M. Garriga, T. Aymerich and J. M. Montfort. 1995. Inhibition of *Listeria* in dry fermented sausages by the bacteriocinogenic *Lactobacillus sake* CTC494. **J. Appl. Bacteriol.** 79: 322-330.

21. Jack, R. W., J. R. Tagg and B. Ray. 1995. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Microbiol. Rev.** 59: 171-200.

22. Kelly, W. J., R. V. Asmundson and C. M. Huang. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. **Int. J. Food Microbiol.** 33: 209-218.

23. Kim, W. J. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria: their potentials as food biopreservative. **Food Rev. Int.** 9: 199-313.

24. Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 12:39-86.

25. Kristian, I. G. and P. M. Muriana. 1993. Detection, identification and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from retail food products. **Int. J. Food Microbiol.** 19: 241-258.

26. Lindgren, S. E. and W. J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Letters.** 87: 149-163.

ห ส 184805

27. Lewus, C. B., A. Kaiser and T. J. Montville. 1991. Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 57: 1683-1688.

28. Maiser-Patin, S., N. Deschamps, S. R. Tatini and J. Richard. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert cheese made with a nisin-producing starter. **Lait.** 72: 249-263.

29. Mattick, A. T. R. and A. Hirsch. 1947. Further observation on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. **Lancet** ii: 5-7.

30. Messi, P., M. Bondi, C. Sabia, R. Battini and G. Manicardi. 2001. Detection and preliminary characterization of bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **Int. J. Food Microbiol.** 64: 193-198.

31. Noonpakdee, W., C. Santivarangkna, P. Jumriangrit, K. Sonomoto and S. Panyim. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. **Int. J. Food Microbiol.** 81: 137-145.

32. Okereke, A. and T. J. Montville. 1991a. Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. **J. Food Prot.** 54: 349-353.

33. Okereke, A. and T. J. Montville. 1991b. Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. **Appl.Environ. Microbiol.** 57: 3423-3428.

34. Olasupo, N. A., U. Schillinger, A. Narbad, H. Dodd and W. H. Holzapfel. 1999. Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from *wara*, a traditional Nigerian cheese product. **Int. J. Food Microbiol.** 53: 141-152.

35. Rekhif, N., A. Atrith and G. Lefebvre. 1995. Activity of plantaricin SA6, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 isolated from fermented sausage. **J. Appl. Bacteriol.** 78: 349-358.

36. Rodriguez, J. M., L. M. Cintas, P. Casaus, H. M. Dodd, P. E. Hernandez and M. J. Gasson. 1995. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* strains from dry fermented sausages. **J. Appl. Bacteriol.** 78: 109-115.

37. Rodriguez, J. M., M. I. Martinez, N. Horn and H. M. Dodd. 2002. Heterologous production of bacteriocins by lactic acid bacteria. **Int. J. Food Microbiol.** 80: 101-116.

38. Rogers, L. A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. **J. Bacteriol.** 16: 321.

39. Samelis, J., S. Roller and J. Metaxopuolos. 1994. Sakacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* isolated from Greek dry fermented sausages. **J. Appl. Bacteriol.** 76: 475-486.

40. Schillinger, U. and F-K. Luecke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from Nham. **Appl. Environ. Microbiol.** 55 (8): 1901-1906.

41. Schillinger, U., R. Geisen and W. H. Holzapfel. 1996. Potential of antagonistic microorganisms and bacteriocins for the biological preservation of foods. **Trends Food Sci. Technol.** 7: 158-164.

42. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe and J. G. Holt (editors). 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.** Vol 2. Baltimore: Williams and Wilkins.

43. Sobrino, O. J., J. M. Rodriguez, W. L. Moreira, M. F. Fernandez, B. Sanz and P. E. Hernandez. 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. **Int. J. Food Microbiol.** 13: 1-10.

44. Stiles, M. E. 1996. Biopreservation by lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek.** 70: 331-345.

45. Stiles, M. E. and W. H.Holzapfel. 1997. Lactic acid bacteria in foods and their current taxonomy. **Int J. Food Microbiol.** 36: 1-29.

46. Swetwiwat, A. and N. Lothong. 1999. Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Nham (Thai fermented meat). **International Conference on Asian Network on Microbial Research.** (Nov. 29-Dec. 1, 1999). pp. 543-548.

47. Tagg, J. R., A. S. Dajani and L. W. Wannamaker. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. **Bacteriol. Rev.** 40: 722-756.

48. Tichaczek, P. S., J. Nissen-Meyer, I. F. Nes, R. F. Vogel and W. P. Hammes. 1992. Characterization of the bacteriocins curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin P from *L. sake* LTH 673. **System. Appl. Microbiol.** 15: 460-468.

49. Uhlman, L., U. Schillinger, J. R. Rupnow and W. H. Holzapfel. 1992. Identification and characterization of two bacteriocin-producing strains of *Lactococcus lactis* isolated from vegetables. **Int. J. Food Microbiol.** 16: 141-151.

50. Wood, B. J. B. and W. H. Holzapfel. 1995. **The Genera of Lactic Acid Bacteria.** London: Blackie Academic & Professional.