วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาการผลิตแบคทีริโอซินที่สามารถต้านการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร การทำบริสุทธิ์ และการประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินเพื่อยืดอายุการเก็บผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ผลิตในท้องถิ่น การทดลองประกอบด้วย

1) การผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงที่มีน้ำมะพร้าวแทนน้ำตาลซูโครส และน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน เปรียบเทียบกับอาหารสำเร็จ MRS และสูตรอาหารดัดแปลง

2) การทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณสมบัติบางประการของแบคทีริโอซินผลิตได้จากเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

3) การคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ประสิทธิภาพสูง และชนิดที่ทนความร้อนได้สูง โดยคัดเลือกจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้รับจากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

4) การประยุกต์ใช้แบคทีริโอซินที่ไม่บริสุทธิ์กับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ ได้แก่ ลูกชิ้นหมูและลูกชิ้นไก่ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา

5) การประยุกต์ใช้แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่ทนความร้อนได้สูง สำหรับการใช้เป็นแนวทางการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์ทนร้อนสูงสำหรับเร่งการผลิตไส้กรอกอีสาน

การผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ด้วยน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ

วัตถุประสงค์การทดลองนี้เพื่อการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอไรซ์ในอัตราส่วน 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 เพื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ M 1 (ควบคุม) ที่ปราศจาก beef extract และ dextrose เพาะกล้าเชื้อ *Lc. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ปริมาณ 5% ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด บ่มที่ 37 °C เก็บตัวอย่างหมัก ณ เวลา 0, 12, 18, 36 และ 48 ชั่วโมง ปรับ pH เป็น 6.5 เพื่อวิเคราะห์กิจกรรมของ แบคทีริโอซิน ด้วยวิธี agar well diffusion ใช้ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อทดสอบ แสดงกิจกรรมการยับยั้งเป็นค่า arbitrary unit per ml (AU/ml)

การใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวเป็นแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่จะเจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS โดยให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น 20 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ถึง 24 ซึ่งเป็นช่วง late log phase ถึงระยะ early stationary phase ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลงที่มีการใช้ปริมาณน้ำมะพร้าวเพิ่มขึ้นเป็น 1:1, 1:2, 1:3 และ 1:4 มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 10 AU/ml เชื้อเริ่มผลิตแบคทีริโอซินตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลองที่ 48 ชั่วโมง และในสูตรอาหารที่มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเพิ่มขึ้น 2 และ 3 เท่า ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml โดยตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีริโอซินตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญ และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 16 ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในสูตรอาหารที่ไม่มีน้ำนึ่งทูน่า และสูตรที่มีน้ำนึ่งปลาทูน่าเพิ่มขึ้น 4 เท่า

ดังนั้นเมื่อเพิ่มอัตราส่วนปริมาณน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวให้มากขึ้นมีผลทำให้การเจริญของเชื้อและการผลิตแบคทีริโอซินลดลง ทั้งนี้เนื่องมาจากปริมาณสารอาหารที่มากเกินพอ เข้าไปมีผลในการยับยั้งการเจริญและการสร้างแบคทีริโอซิน

การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

การทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ด้วยการตกตะกอนโปรตีนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต gel filtration chromatography, cation exchange chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography and HPLC and Amberlite XAD-4 polymeric Resins followed by fast protein liquid chromatography

ตกตะกอนแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่มีกิจกรรมการยับยั้ง 20 AU/ml ด้วย ammonium sulfate เข้มข้น 40 และ 80% ต่อเนื่องกัน ที่อุณหภูมิ 4 °C เวลา 2 และ 3 ชั่วโมงตามลำดับ ละลายเกลือที่ได้ใน 0.2 M acetate buffer, pH 3.0 แล้วแยกเกลือด้วยการทำ dialysis ใน acetate buffer เช่นกัน ใช้ถุงไนลอน ที่มี molecular weight cut off 3.5 KDa ผสมสารละลายที่ได้ในถุงไนลอนด้วย carboxymethylcellulose เพื่อทำให้สารละลายเข้มข้นขึ้น และวิเคราะห์กิจกรรมของแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินที่ได้มีค่ากิจกรรมการยับยั้ง 100 AU/ml มีผลผลิต 0.05%

ทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินด้วยวิธี gel filtration chromatography ใช้ Sephadex G-50 column, ชะด้วย 0.2 M acetate buffer, pH 3.0 เก็บรวม fractions ที่มีกิจกรรมของแบคทีริโอซิน และวิเคราะห์กิจกรรมการยับยั้ง พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าการยบยั้ง 800 AU/ml และมีผลผลิต 0.87%.

ทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินด้วยวิธี cation exchange chromatography ใช้ Hitrap CM FF column ชะ column ด้วย 0.2 M acetate buffer, pH 3.0 แล้วแยกตัวอย่างโดยใช้ NaCl ที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น

จาก 0.05-0.2 M เก็บ fractions วิเคราะห์กิจกรรมของแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าการยบยั้ง 400 AU/ml และมีผลผลิต 0.40%.

ทำบริสุทธิ์แบคทีริโอซินด้วยวิธี reversed-phase HPLC ใช้ Lichrosorb RP18 column ชะด้วย 1% trifluoroacetic acid (TFA) ในน้ำ และ 0.1% TFA ใน acetonitrile ได้พีคเดี่ยว และเก็บสารที่พีคนั้นวิเคราะห์กิจกรรมแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าการยบยั้ง 100 AU/ml และมีผลผลิต 0.05%.

การใช้ Amberlite XAD-4 เป็นตัวดูดซับร่วมกับเทคนิคโครมาโทกราฟีสามารถลดการสูญเสียและลดขั้นตอนในการทำบริสุทธิ์ได้ โดยดูดซับด้วย Amberlite XAD-4 สกัดแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้โดยใช้ methanol:H_2O (1:1) และ 0.1 M HCl:methanol (1:9) ละลายสารสกัดใน 0.2 M phosphate buffer, pH 6.5 ทำบริสุทธิ์ต่อด้วย fast protein liquid chromatography เก็บ fractions วิเคราะห์กิจกรรมของแบคทีริโอซิน พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ได้มีค่าการยบยั้ง 80 AU/ml และมีผลผลิต 30%.

แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,975.71 Da เมื่อวิเคราะห์ด้วย SDS-PAGE และมีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 3,454 Da เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิค electrospray mass spectroscopy พบว่าแบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 0.8 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถลดปริมาณเชื้อ *Staphylococcus aureus* ลงได้ 2 log cfu/ml และลด *Escherichia coli* และ *Streptococcus lactis* ได้ 1 log cycle แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้

แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 30 นาทีได้ โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* เท่ากับ 320, 20 และ 160 AU/ml ตามลำดับ และทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C เป็นเวลา 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 และ 100 °C เป็นเวลา 15 นาทีได้ โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* ลดลงเป็น 160, 20 และ 80 AU/ml ตามลำดับ

แบคทีริโอซินบริสุทธิ์ที่ผลิตโดยเชื้อ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN11 ทน pH ได้ในช่วงกว้าง โดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Strep. lactis* ที่ pH 2 ถึง 8 และพบว่าแบคทีริโอซินถูกย่อยสลายโดย trypsin, α-chrymotrypsin และ Proteinase K แต่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ catalase

การคัดเลือกและการผลิตแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดลองเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีริโอซินได้ โดยใช้เชื้อ *Lb. plantarum* TISTR 050, *Pd. acidilactici* TISTR 051, *Leu. mesenteriodes* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb.*

sake TISTR 911, *Lc. lactis* TISTR 1401 และ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 ทดสอบแบคทีริโอซินด้วยแบคทีเรียทดสอบประกอบด้วย *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B. subtilis* TISTR 008 และ *S. aureus* TISTR 118 พบว่าแบคทีริโอซินจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 มีความสามารถยับยั้งสูงที่สุด โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ 8 จาก 13 สายพันธุ์ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแกรมลบได้

ภาวะการผลิตแบคทีริโอซินที่เหมาะสมของ *Lc. lactis* TISTR 1401 คือ การควบคุมระดับ pH ที่ 6.5 ณ อุณหภูมิ 37 °C ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติม 2% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) glucose และ 2% (w/v) meat extract แบคทีริโอซินที่ได้ยังมีความสามารถในการทดความร้อนได้สูงถึง 80 °C และคงตัวที่ pH ต่ำจนถึงระดับ pH ที่เป็นกลาง (pH 2-7)

การใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นหมู

สารแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ (crude bacteriocin supernatant, CBS) ที่ผลิตได้จาก LAB สายพันธุ์ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ใช้แบคทีริโอซินที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง เมื่อใช้กับผลิตภัณฑ์ลูกชิ้นหมูโดยจุ่มเคลือบผิวด้วย CBS ความเข้มข้นเต็มที่ (F-CBS) และเจือจางให้เจือจางลงครึ่งหนึ่ง (F-CBS) บรรจุลูกชิ้นเคลือบแล้วในถุงพลาสติกแบบปกติและแบบสุญญากาศ และเก็บที่อุณหภูมิ 4 °C พบว่าการบรรจุลูกชิ้นแบบปกติ ตัวอย่างลูกชิ้นเคลือบด้วย F-CBS เก็บได้นานกว่า 12 วัน ขณะที่ ใช้ H-CBS และตัวอย่างควบคุมเก็บได้นานประมาณ 9 วัน ทำนองเดียวกันสำหรับการบรรจุแบบสุญญากาศ ลูกชิ้นเคลือบด้วย F-CBS เก็บได้นานกว่า 12 วัน ขณะที่ลูกชิ้นเคลือบด้วย H-CBS และลูกชิ้นตัวอย่างเก็บได้นานเพียง 6 วัน (จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 1 x 10^5 cfu/g sample ตามมาตรฐาน มอก. 2533) ค่า pH และปริมาณกรดของตัวอย่างทั้งหมดไม่มีการเปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บ ค่าสีของตัวอย่างใกล้เคียงกัน ทั้งนี้ลูกชิ้นที่เคลือบด้วย CBS มีสีเหลืองกว่าตัวอย่างควบคุม คุณภาพทางประสาทสัมผัสของลูกชิ้นทั้งหมดใกล้เคียงกัน แต่การยอมรับโดยรวม กลิ่นผิดปกติ และสีของลูกชิ้นเคลือบด้วย CBS ต่ำกว่าของลูกชิ้นควบคุม เนื่องจากสีและกลิ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับผลิต CBS

การคัดและจำแนกแบคทีเรียทดสอบและการใช้แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 เพื่อยืดอายุการเก็บลูกชิ้นไก่

เชื้อแบคทีเรียปนเปื้อนลูกชิ้นไก่ปริมาณมากที่จำแนกได้และใช้เป็นเชื้อทดสอบ 3 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Staphylococcus lentus* PN-1, 3%, *Stap. Saprophyticus* PN-2, 12% และ *Bacillus spp.*

PN-3, 85% และแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ที่ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ โดยยับยั้ง *Bacillus spp.* PN-3 ได้สูงที่สุด

เตรียมแบคทีริโอซินสำหรับการใช้ 4 ชนิด คือ filtered crude bacteriocin supernatant (FCBS), heated crude bacteriocins supernatant (HCBS), concentrated crude bacteriocin (CCB) and freeze dried crude bacteriocins (FDCB) สารละลาย 2 ชนิดแรกใช้โดยเคลือบผิวลูกชิ้น ส่วน 2 ชนิดหลังใช้ผสมในส่วนสับผสมของลูกชิ้น บรรจุลูกชิ้นในถุงพลาสติกแบบปกติและแบบสุญญากาศ และเก็บที่ 4 °C

แบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์จาก *Lactococcus lactis* TISTR 1401 ทุกชนิดสามารถยืดอายุการเก็บของลูกชิ้นไก่เก็บที่อุณหภูมิ 4 °C ในสภาวะการบรรจุแบบปกติ และแบบสุญญากาศได้นานกว่าเมื่อเทียบกับลูกชิ้นควบคุม ทั้งนี้การใช้แบบเคลือบผิวลูกชิ้นสามารถเก็บลูกชิ้นได้นานประมาณ 15-18 วัน และการใช้แบบผสมในสูตรลูกชิ้นสามารถเก็บได้นานประมาณ 21 วัน ขณะที่ลูกชิ้นควบคุมทั้ง 2 สภาวะเก็บได้นานเพียง 9 และ 12 วัน ตามลำดับ และพบว่าแบคทีริโอซินไม่บริสุทธิ์ผลิตจาก *Lc. lactis* TISTR 1401 มีประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนลูกชิ้นไก่ดีใกล้เคียงกับสาร nisin ทางการค้าที่ผลิตจากเชื้อ LAB สายพันธุ์ *Lc. lactis* เช่นกัน แต่ต่าง strain กัน

การคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกทนความร้อน สำหรับผลิตไส้กรอกอีสาน

การทดลองคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ที่สามารถทนความร้อนได้ไม่ต่ำกว่า 70 °C จาก 8 สายพันธุ์ ประกอยด้วย *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 และ *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 หลังจากให้ความร้อนที่ 60, 70 และ 80 °C นาน 3 ชั่วโมง พบว่า *Lb. acidophilus* TISTR 450 ทนความร้อนได้สูงที่สุด ที่ 80 °C ยังมีจำนวนเซลล์รอดชีวิตประมาณครึ่งหนึ่งของจำนวนเซลล์เริ่มต้น เมื่อใช้ *Lb. acidophilus* TISTR 450 เป็นกล้าเชื้อผลิตไส้กรอกอีสานที่มีการผลิตโดยอบให้ความร้อนประมาณ 70 °C เพื่อให้ผิวไส้กรอกแห้งหมาดก่อนการหมัก พบว่าการใช้กล้าเชื้อ LAB ที่ทนความร้อนสำหรับผลิตไส้กรอกอีสานสามารถเร่งการผลิตไส้กรอกได้เร็วขึ้นกว่าการผลิตที่ไม่มีการใช้กล้าเชื้อ ไส้กรอกผสมกล้าเชื้อมี pH ลดต่ำกว่า 5 ในเวลา 1-2 วัน ขณะที่ไส้กรอกผลิตแบบปกติต้องใช้เวลานานประมาณ 3-4 วัน แต่พบว่าไส้กรอกผสมกล้าเชื้อมีสีสว่าง (ค่า L*) สูงกว่าและมีสีแดง (ค่า a*) อ่อนกว่าไส้กรอกปกติ

The objectives of this research experiment were to investigate the production, purification and use of bacteriocins for extension of shelf life of local meat products. The main experiments were performed as followed:

1) production of bacteriocins from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 by using modified microbial media with substitution coconut juice for sucrose and tuna condensate for nitrogen source. The different modified media formulas were compared with MRS media.
2) Purification and study of some propertied of purified bacteriocins produced from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11.
3) Selection of lactic acid bacteria capable of producing high activity bacteriocins and having high heat tolerance. The lactic acid bacteria used in this part were obtained from Thailand Institute of Scientific and Technological Research (TISTR) and Prince of Songkla University.
4) The uses of crude bacteriocins for extension shelf life of meat products, i.e., pork meatballs and chicken meatballs.
5) Selection and use of high heat tolerant lactic acid bacteria as starter culture for fermentation acceleration of Isan sausages.

Production of bacteriocins from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 using coconut juice and tuna condensate in culture media

The objective of this experiment was to use tuna condensate and coconut juice in culture media as carbon and nitrogen sources for bacteriocin production from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11. The culture media were prepared using pasteurized tuna condensate and coconut juice in the ratio of 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 in comparison with MRS and M 1 (control) media without which beef extract and dextrose. The starter culture of 5% *Lc. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 was grown in each media, incubated at 37 °C. The fermentate was sampled at 0, 6, 12, 18, 24, 36 and 48 h, pH adjusted to 6.5 for determination of inhibition activity of bacteriocins by agar well diffusion method against *Staphylococcus aureus*. Inhibition activity of bacteriocins was expressed in term of arbitrary unit per ml (AU/ml).

The uses of coconut juice and tuna condensate in the culture media as carbon and nitrogen source in the bacteriocins produced from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 could provide good bacterial growth in all modified media formulas. However, the highest bacterial growth observed in the MRS media with an inhibiting activity on *Staphylococcus aureus* was 20 AU/ml starting from 16 to 24 h during which was in the late log phase to early stationary phase. The media added tuna condensate and coconut juice in the ratios of 1:1, 1:2, 1:3 and 1:4 had the activity of 10 AU/ml, bacteriocin production was found from 16 h through the end of culturing at 48 h. In the media added 2 and 3 fold tuna condensate had the inhibiting activity of 10 AU/ml at the initial growth but not found the activity after 16 h. The inhibiting activity was not found in the media without and with 4 fold of tuna condensate added.

Therefore, increasing amount of tuna condensate and coconut juice decreased microbial growth and bacteriocin production. This could be due to other constituents in the media that could suppress microbial growth and bacteriocin production.

Purification of bacteriocins produced from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11

Purification of bacteriocins produced from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 by precipitation of proteins with ammonium sulfate, gel filtration chromatography, cation exchange chromatography, reversed-phase high performance liquid chromatography and HPLC and Amberlite XAD-4 polymeric Resins followed by fast protein liquid chromatography.

Crude bacteriocins supernatant having inhibition activity of 20 AU/ml was precipitated with consecutively 40 and 80 % ammonium sulfate at 4 °C for 2 and 3 h, respectively, salt was dissolved with 0.2 M acetate buffer, pH 3.0 and then, dialyzed to separate salt in the same acetate buffer using nylon dialysis bag with molecular weight cut off 3.5 KDa. The retentate was mixed with carboxymethylcellulose for concentration and determined for bacteriocin activity. It was found that the bacteriocins obtained had an inhibition activity of 100 AU/ml with production yield of 0.05%.

Crude bacteriocin supernatant was purified by gel filtration chromatography using Sephadex G-50 column, eluted with 0.2 M acetate buffer, pH 3.0. Fractions containing bacteriocin activity were collected and determined for bacteriocin activities. The purified bacteriocins obtained had an inhibition activity of 800 AU/ml, with production yield of 0.87%.

Crude bacteriocin supernatant was purified by cation exchange chromatography using Hitrap CM FF column, eluted with 0.2 M acetate buffer, pH 3.0, followed by stepwise gradient elution by 0.05-0.2 M NaCl, fractions were determined for bacteriocin activities. It was found that purified bacteriocins had an inhibition activity of 400 AU/ml with production yield of 0.40%.

Crude bacteriocin supernatant was purified by reversed-phase HPLC using Lichrosorb RP18 column, eluted with 1% trifluoroacetic acid (TFA) in water and 0.1% TFA in acetonitrile. Single peak was obtained and collected for bacteriocin activity. Purified bacteriocins had an inhibition activity of 100 AU/ml with production yield of 0.05%.

The use of Amberlite XAD-4 as an adsorbance in combination with chromatographic technique could decrease the yield loss and reduced steps for purification. Purified bacteriocins obtained from adsorption with Amberlite XAD-4 then, extracted by methanol:H_2O (1:1) and 0.1 M HCl:methanol (1:9), dissolved the extract in 0.2 M phosphate buffer, pH 6.5 and determined bacteriocin activity. Bacteriocin extract was further purified using FPLC and fractions were determined for bacteriocin activity. It was found that purified bacteriocins had an inhibition activity of 80 AU/ml with the production yield of 30%.

Molecular weight of purified bacteriocins produced from *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 was 3,975.71 Da determined by SDS-PAGE and 3,454 Da determined by electrospray mass spectroscopy technique. It was found that purified bacteriocins with the concentration of 0.8 mg/ml and 1 mg/ml could decrease *Staphylococcus aureus* by 2 log cycles and decrease *Escherichia coli* and *Streptococcus lactis* by 1 log cycle but could not inhibit growth of *Listeria monocytogenes*.

Purified bacteriocins produced from *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 could tolerate the heat at 60 °C for 30 min with the inhibition activity of 320, 20, and 160 AU/ml against *S. aureus*, *E. coli* and *Strep. lactis*, respectively. Purified bacteriocins could tolerate the heat at 100 °C for 30 and 60 min, and at 121 and 100 °C for 15 min and had an inhibition activity of 160, 20 and 80 AU/ml against *S. aureus*, *E. coli* and *Strep. lactis*, respectively.

Purified bacteriocins produced from *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 could give an inhibition activity in a wide pH range of 2-8 against *S. aureus*, *E. coli* and *Strep. lactis*. Purified bacteriocins were hydrolyzed by trypsin, α-chrymotrypson and Proteinase K but not by catalase enzyme.

Screening and production of bacteriocins from lactic acid bacteria

The experiment was conducted to screen bacteriocin producing lactic acid bacteria using the following culture strains: *Lb. plantarum* TISTR 050, *Pd. acidilactici* TISTR 051, *Leu. mesenteriodes* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbruckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911, *Lc. lactis* TISTR 1401 and *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11. The indicator bacteria for testing an inhibition activity of bacteriocins were *Bacillus* sp. TISTR 908, *B. cereus* TISTR 687, *B. subtilis* TISTR 008 and *S. aureus* TISTR 118. It was found that bacteriocins obtained from *Lc. lactis* TISTR 1401 had the highest inhibition activity. The bacteriocins obtained had ability to inhibit growth of 8 Gram-positive out of 13 strains but could not inhibit Gram-negative bacterial tested.

The optimal conditions for bacteriocin production were controlled pH at 6.5 and temperature at 37 °C. The MRS broth media was modified by adding 2% (w/v) yeast extract, 2% (w/v) glucose and 2% (w/v) meat extract. In addition, bacteriocins obtained could withstand high temperature up to 80 °C and stable in a wide pH range of 2-7.

The use of crude bacteriocins produced from Lactobacillus lactis TISTR 1401 for extension shelf life of pork meatballs.

Crude bacteriocins produced from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 were used to extend the shelf life of pork meatballs by surface coating with full strength (F-CBS) and half strength concentration (H-CBS). The meatballs were aerobically and vacuum packed in plastic bags and kept at 4 °C. It was found that the meatballs coated with F-CBS and aerobically packed could be kept longer than 12 days while those coated with H-CBS and control meatballs could be kept around 9 days. Similarly for the vacuum package, the meatballs coated with F-CBS could be kept longer than 12 days as well while those coated with H-CBS and control meatballs could be kept only 6 days (according to the total plate count of 1 x 10^5 cfu/g sample of TIS standard, 2533). Acidity and pH of all meatball samples did not change during storage. Similar color values of all samples were observed. However, slightly more yellow in color of CBS treated meatballs than control samples was also observed. All the meatballs of each treatment had similar sensory quality except for the CBS coated meatballs received lower scores in total acceptance, off-flavor and color due to the color and flavor of the culture media for CBS production.

Selection and identification of indicator bacteria and use of crude bacteriocins from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 to extend shelf life of chicken meatballs

Contaminant bacteria were collected from chicken meatball and 3 dominant flora were identified consisting of *Staphylococcus lentus* PN-1, 3%; *Stap. Saprophyticus* PN-2, 12% and *Bacillus spp.* PN-3, 85%. These microbial flora were used as indicator bacteria to test the inhibition activity of bacteriocins produced from *Lactococcus lactis* TISTR 1401. It was found that all three bacterial strains were inhibited by crude bacteriocins produced from *Lactococcus lactis* TISTR 1401. The highest inhibition activity was observed on *Bacillus spp.* PN-3.

Four forms of crude bacteriocins were prepared, i.e., filtered crude bacteriocin supernatant (FCBS), heated crude bacteriocins supernatant (HCBS), concentrated crude bacteriocin (CCB) and freeze dried crude bacteriocins (FDCB). The first 2 forms were used by coating on chicken meatballs surface and the other 2 forms were used by mixing in the meatball batter. The treated meatballs were aerobically and vacuum packed in plastic bags and kept at 4 °C.

Crude bacteriocins from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 in all 4 forms could extend longer shelf life of chicken meatballs aerobically and vacuum packed and kept at 4 °C compared with control samples. However, the meatballs coated with bacteriocin supernatant could be kept 15-18 days while those mixed in the batter with concentrated bacteriocins could be kept longer for 21 days while control samples for both conditions could be kept only 9 and 12 days, respectively. It was also observed that crude bacteriocins produced from *Lactococcus lactis* TISTR 1401 had good inhibition against microbial contaminant on chicken meatballs similar commercial nisin produced from lactic acid bacteria, *Lc. lactis* as well but different strains.

Screening for thermo-tolerant lactic acid bacteria for Isan sausage production

The experiment was conducted to screen lactic acid bacteria (LAB) that could be able to withstand heat not less than 70 °C from 8 culture strains consisting of *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053, *Lb. acidophilus* TISTR 450, *Lb. brevis* subsp. *brevis* TISTR 860, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* TISTR 892, *Lb. sake* TISTR 911 and *Lb. casei* subsp. *rhamnosus* SN11. After being heated at 60, 70 and 80 °C, it was found that *Lb. acidophilus* TISTR 450 could withstand the heat the most with viable cells about an a half of original cells. The starter culture of *Lb. acidophilus* TISTR 450 was

used for Isan sausage production which initial heating at about 70 °C was applied to dry off the surface before fermentation taking off. It was found that the use of thermo-tolerant LAB could accelerate sausage production faster compared with control sample. The sausages mixed with starter culture had pH lower than pH 5 in about 1-2 days while it took about 3-4 days for control sausages. However, lighter color in terms of L* and a* was observed for the sausages with starter culture.