บรรณานุกรม

นภา โล่ห์ทอง. 2534. **กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต**. พับลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ

สาโรจน์ ศิริศันสนียกุล. 2547. **เทคโนโลยีชีวภาพทางอาหาร การหมักและสิ่งแวดล้อม**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 326 น.

สุโขทัยธรรมมาธิราช. มหาวิทยาลัย. 2543. **โภชนะศาสตร์และอาหารสัตว์**. สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์ มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมาธิราช กรุงเทพฯ.

เอกชัย ชูเกียรติโรจน์. 2536. **การผลิตกรดแลคติกโดยแบคทีเรียแลคติกที่ย่อยแป้งได้**. ปัญหาพิเศษ วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาเชียงใหม่.

Allgaier, H., G. Jung, G.G. Werner, U. Schneiderand H. Zahner. 1986. Epidermin: sequencing of a heterodettetracyclic 21-peptide amide antibiotic. **Eur. J. Biochem**. 160: 474-484.

Altena, K., A. Guder, C. Cramer and G.bierbaum. 2000. Biosynthesis of the lantibiotic mersacidin: organization of a typy B lantibiotic gene cluster. **Appl. Environ. Microbiol**. 66: 2565-2571.

Ander, R.F. 1970. Formation of hydrogenperoxide by group N *Streptococcus* and its effect on their growth and metabolism. **Appl. Microbiol**. 19: 602-616.

Arici, M., B. Bilgin, O. Sagdic and C. Ozdemic. 2004. Some characteristics of *Lactobacillus* isolates from infant faeces. **Food Microbiol**. 21: 19-24.

Aymerich. T., H. Holo, L.S. Havarstein, M. Hugas, M. Garriga and I.F. Nes. 1996. Biochemical and genetic characterization of enterocin A from *Enterococcus faecium*, a new antilisterial bacteriocin in the pediocin family of bacteriocins. **Appl. Environ. Microbiol**. 62: 1676-1682.

Banks, J.G., R.G. Broad and N.H.C. Sparks. 1986. Natural antimicrobial system and their potential in food preservation of the future. **Biotech. Appl. Biochem.** 8: 103-147.

Bik, E.M., P.B. Eckburg, S.R. Gill, K.E. Nelson, E.A. Purdom, F. Francois, G. Perez-Perez, M.J. Blaser and D.A. Relman. 2006. Molecular analysis of the bacterial microbiota in the human stomach. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A**. 103: 732-737.

Booth, S.J., J.L. Johnson and T.D. Wilkins. 1977. Bacteriocin production by strains of bacteroides isolated from human feces and the role of these strains in the bacterial ecology of the colon. **Antimicrob. Agents Chemother**.Apr. 718-724.

Bourlioux, P., B. Koletzko, F. Guarner and V. Braesco. 2003. The intestine and its microflora are partners for the protection of the host: report on the Danone Symposium "The Intelligent Intestine," held in Paris, June 14, 2002.. **Am. J. Clin. Nutr**. 78: 675-683.

Brock, T.D., B. Peacher and D. Pierson. 1963. Survey of the bacteriocins of enterococci. **J. Bacteriol**. 86 (4):702-707.

Caplice E. and G.F. Fitzgerald. 1999. Food fermentation : role of microorganisms in food production and preservation. **Int. J. Food Microbiol**. 50: 131-149.

Cataloluk, O. and C.G. Gurakan. 2003. Characterization of salivaricin B, a protein expressed by *Lactobacillus salivarius* M7. **Turk. J. Biol**. 27: 131-136.

Chen, H. and D.G. Hoover. 2003. Bacteriocins and their foods applications. **Comprehensive reviews in food science and food** .[Online]. 2:82-100 (July). Available http:www.ift.org/publications/crfsfs (20 May 2006).

Clarke, D. J., R.M. Robson, and J.G. Morris. 1975. Purification of two *Clostridium* bacteriocins by procedures appropriate to hydrophobic proteins. **Antimicrob. Agents Chemother**. 7: 256-264.

Cleveland, J., T.J. Montville, I.F. Nes and M.L. Chikindas. 2001. Bacteriocins: Safe, natural antimicrobials food preservation. **Int. J. Food Microbiol**. 71: 1-20.

Dajani, A.S., and L.W. Wannamak. 1969. Demonstration of a bactericidal substance against beta-hemolytic streptococci in supernatant fluids of staphylococcal cultures. **J. Bacteriol**. 97: 985-991.

Dajani, A.S., and Z. Taube. 1974. Plasmidmediated production of staphylococcin in bacteriophage type 71 *Staphylococccus aureus*. **Antimicrob. Agents Chemother**. 5: 594-598.

Davison, P.M. 1990. **Antimicrobial agents** , p. 83-117. In Branen, A.L., Davison, P.M. and S. Saminen (eds.). Antimicrobials in foods.

Delvels-Broughton, J.D., G.C. Wilkinson and S. Wilkinson. 1992. The use of the bacteriocin, nisin, as a preservation in pasteurized liquid whole egg. **Lett. Appl. Microbiol**. 15: 133-136.

Dethlefsen, L., P.B. Eckburg, E.M. Bik and D.A. Relman. 2006. Assembly of the human intestinal microbiota. **Trends Ecol. Evol.** 21: 517-523.

De Vuyst, L., R. Callewaert and K. Crabbe. 1996. Primary metabolite kinetics of bacteriocin biosynthesis by *Lactobacillus amylovorus* and evidence for stimulation of bacteriocin production under unfavorable growth condition. **Microbiol**. 142: 817-827.

Diep, D.B., L.S. Havarstein and I.F. Nes. 1996. Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. **J. Bacteriol**. 178: 4472-4483.

Enan, G., A.A. 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. Microbiol**. 30(3) :189-215.

Fanaro, S., R. Chierici, P. Guerrini and V. Vigi. 2003. Intestinal microflora in early infancy: composition and development. **Acta Paediatr. Suppl.** 91: 48-55.

FAO/WHO, 2001. Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with lactic acid bacteria (LAB). October. 2001.

Fredericq, P. 1946. Surla sensibilite et l'activite antibiotique des Stapgylocoques. **C. R. Seances Soc. Biol. Paris.** 140:1167-1170.

Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animal. **J. Appl. Bacterial**. 66: 365-378.

_____. 1992. Beneficial interrelationships between certain microorganism and humans: candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. **J. Food Prot**. 42:164.

Gilliland, S.E. and M.C. Speck. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in association culture. **J. Food Prot.** 40: 820-823..

Grooss, E. and J.L. Morell. 1971. The structure of nisin. **J. Am. Chem. Soc**. 93: 4634-4635.

Guarner, F. 2006. Enteric flora in health and disease. **Digestion.** 73 (1)**:** 5-12.

Hardy, K.G. 1975. Colicinogeny and related phenomena. **Bacteriol. Rev**. 39:464-515.

Hastings, J. W., M. Sailer, K. Johnson, K. L. Roy, J. C. Vederas and M. E. Stiles. 1991. Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. **J. Bacteriol**. 173: 7491-500.

Hill, C. 1995. **Bacteriocin: natural antimicrobials from microorganisms In** : Gould G.W. Editor. New methods of food preservation. New York : Blackie academic and professional.

Hoover, D.G. and L.R. Steenson. 1993. **Bacteriocin of lactic acid bacteria**. New York; Academic Press Inc. 63-86.

James , B.L. and M.C. Baker. 2003. Introduction to Veterinary Science. Thomson Learning : Canada.

James , R.G. 2000. Modern Livestock and Poultry Production. 6th ed. Thomson Learning : Canada. Mello, J. P. F. 2000. Farm Animal Metabolism and Nutrition. Biotechnology Department The Scottish Agricultural College Ediburgh , UK.

Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol**. 44: 525-532.

Jennes, W., L.M.T. Dicks and D.J. Verwoerd. 2000. Enterocin O12, a bacteriocin produced by *Enterococcus gallinarum* isolated from the intestinal tract of ostrich. **J. Appl. Microbiol**. 88: 349-357.

Joerger, M.C. and T.R. Klaenhammer. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. **J. Bacteriol.** 167: 439-46.

Kamau, D.N., S. Doores and K.M. Pruitt. 1990. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by lactoperoxidase system. **Appt. Environ. Microbiol.** 5: 2711-2716.

Kang, D.H. and D.Y.C. Fung. 1999. Effect of diacetyl on controlling *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. **J. food Prot**. 62(9): 975-979.

Kim, W.J. 1993. Bacteriocins of lactic acid bacteria : their potentials as food biopreservative. **Food Rev**. 9 (2): 299-313.

Kim, M.H., Y.J. Kong, H. Baek and H.H. Hyun. 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* sp. GO5. **J. Biotechnol**. 121: 54-61.

King, A.D.J. and C.W. Nagel. 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. **J. Food Sci**. 40: 362-366.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev**. 12: 39-85.

_____ 1988 . Bacteriocins of lactic acid bacteria. **J. Biochem**. 70: 337-349.

Klein, C., Kaletta, C., Schnell, N. and Entian, K.D., 1992. Analysis of genes involved in biosynthesis of the lantibiotic subtilin. **Appl. Environ. Microbiol**. 60: 2793-2801.

Krylova, M.D. 1969. A study of bacteriocines of mitis type diphtheria bacilli. Zh. **J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol**. 46(3): 11-15.

Lachowicz, T. 1965. Investigations on staphylococcins. **Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1 Orig. Reihe A**. 196: 340-351.

Larsen, A.G. and B. Norrung. 1993. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bavaricin A, a bactericin produced by Lactobacillus bavaricus M1041. Lett.Appl.Microbiol. 17:132-134.

Leer, R.J., van J.M. der Vossen , M. van Giezen, J.M. van Noort, and P.H. Pouwels. 1995. Genetic analysis of acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. **J. Microbiol**. 141: 1629-1635.

Li, C., J. Bai, Z. Cai and F. Ouyang. 2002. Optimization of a cultural medium for bacteriocin production by *Lactococcus lactis* using response surface methodology. **J. Biotechnology**. 93: 27-34.

Lilly, D.M. and R.H. Stillwell. 1965. Probiotics: Groeth promoting factors produced by microoganisims. **Science**. 147: 744-748.

Lindgren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiol**. 19: 602-616.

Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenal reagent. **J. Biol. Chem**. 193: 265-275.

Mao, Y., P.M. Muriana and M.A. Cousin. 2001. Purification and transpositional inactivation of Lacticin FS92, abroad-spectrum bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* FS92. **Food Microbiol.** 18(2):169-175.

Matsusaki, H., N. Endo, N. Sonomoto and A. Ishizaki. 1996. Lantibiotic nisin Z fermentative production by *Lactococcus lactis* 10-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth. **Appl. Microbiol. Biotechnol**. 45: 36-40.

Metchikoff, E. 1907. **The prolongation of life**. In optimidtic studies (Heinemann W., Ed.) pp. 1-100. G. P. Putnam and Sons, London, UK.

Montville, T.J. and T. Winkowskin. 1997. **Biologically based preservation systems and probiotic bacteria**. In: Doyle, M. P., L.R. Beuchat and T. J. Montvill. (Eds.) Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. ASM Press, USA, pp. 557-576.

Mortved, C.I., J. Nissen-Meyer, K. Sletten and I.F. Nes. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. **Appl. Environ. Microbiol**. 57: 1829-1834.

Niamsup, P., N. Sujaya, M. Tanaka, T. Sone, S. Hanada, Y. Kamagata, S. Lumyong, A. Assavaning, K. Asano, F. Tomita and A. Yokota. 2003. *Lactobacillus thermotolerans sp.nov*., anovel thermotolerant species isolated from chicken faeces. **Int. J. Systematic Evol. Microbiol**. 53: 2256- 2263.

Nes, I.F., D.B. Diep, L.S. Havarstein, M.B. Brurberg, V. Eijsink and H.Holo. 1996. Biosynthesis of bacteriocins in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek** 70: 113-128.

Nettles, C.G. and S.F. Barefoot. 1993. Biochem and genet characteristics of bacteriocins of food associated lactic acid bacteria. **J. Food Prot**. 56 (4): 338-356.

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 (2) :137-145.

Nousianean, R.J. and A.T. Setala. 1992. Lactic acid bacteria as animal probiotics, in lactic acid bateria in health and disease: volume1. **London. E. Appl. Sci**. 25: 260-268.

Ocana, V.S., A.A. Pesce de Ruiz Holgado and M.E. Nader-macias. 1999. Selection of vaginal H_2O_2 generating *Lactobacillus* species for probiotic use. **Curr. Microbiol**. 38: 279-284.

Oh, S., S.H. Kim and R.W. Worobo. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC . **J. Dairy Sci.** 83 : 2747-2752.

Osmanagaoglu, O., U. Gonduz, Y. Beyati and U. Gunduz. 1998. Purification and characterization of pediocin F, a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* F. **Tr. J. Biol**. 22: 217-228.

Ouwehand, A.C. 1998. **Antimicrobial components from lactic acid bacteria**, pp. 139-159. In S. Salminen and A. von Wright (eds.). Lactic acid bacteria. 2nd ed., Mercel Dekker Inc., New York.

Parente, E., A. Ricciandi and G. Addario. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *lactococcus lactis* subsp.*lactis* 140 VWC during batch fermentation. **Appl.Microbiol**. 14(4):388-394.

Parente, E. and A. Ricciandi. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocin from lactic acid bacteria. **App. Microbiol. Biotechnol.** 52:628-638.

Parker, R.B. 1974. Probiotics, The other half of the antibiotic story. **Anim. Nutr. Health**. 29:4-8.

Pilasombut, K., T. Sakpuarum, W. Wajiwalku, S. Nitisinprasert, A. Swetwiwathana, T. Zendo, K. Fujita, J. Nakayama and K. Sonomoto. 2006. Purification and amino acid sequence of a bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolate from chicken intestine. **Songklanakarin J. Sci. Technol**. 28: 121-131.

Robredo, B. and C. Torres. 2000. Bacteriocin production by *Lactobacillus salivarius* of animal origin . **J. Clin. Microbiology**. 38(10): 3908-3909.

Rogers, A.H. 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. **Appl. Microbiol**. 24: 294-295.

Roos, S., L Engstrand and H. Jonsson. 2005. *Lactobacillus gastricus* sp. nov., *Lactobacillus antri* sp. nov., *Lactobacillus kalixensis* sp. nov. and *Lactobacillus ultunensis* sp. nov., isolated from human stomach mucosa. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 55: 77-82.

Rubin, H.E. 1978. Toxicology model for a two-acid system. **Appl. Environ. Microbiol**. 36: 623-624.

Sablon, E., B. Contreras and E. Vandamme. 2000. Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria : mode of action, geneties and biosynthesis. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.** 68: 21-60.

Schillinger, U. and F. Lucke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol**. 55: 1901-1906.

Schlegel, R., and H.D. Slade. 1973. Properties of a *Streptococcus sanguis* (Group H) bacteriocin and its separation from the competence factor of transformation. **J. Bacteriol**. 155: 655-661.

Schrezenmeir, J. and M. De Vrese, 2001. Probiotic, prebiotics and synbiotics- approaching a definition. **Am. J. Clin**. **Nutr**.73: 361-364.

Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Share and J.G. Holt. 1986. **Berger's manual of systematic bacteriology**. Volume 2 . Williams and Wilkins, Baltimore.

Stern, N.J., E.A. Svetoch, B.V. Eruslanob, V.V. Perelygin, E.V. Mitsevich, I.P. Mitsevich, V.D. Pokhilenko, V.p. Levchuk, O.E. Svetoch and B.S. Seal. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to *Campylobacter jejuni* in the chicken gastrotestinal. **Antimicrob. Agents Chemother**. 50(9): 3111-3116.

Strompfova, V. and A. Laukova. 2007. *In Vitro* study on bacteriocin production of enterococci associated with chickens. Doi:10.1016/J.

Tannock, G.W. 1995. Sticky microbes: the association of microbes with host surfaces. In *Normal Microflora*. Chapman and Hall. London. 49-62. pp.

Todorov, S.D., C.A. Recnen and L.M.T. Dicks. 2004. Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST13BR, a strain isolated from barley beer. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 50: 149-157.

Todorov, S.D. and L.M.T. Dicks. 2006. Effect of medium componemts on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. **Microbiol. Res**. 161: 102-108.

_____. 2004. Effect of medium componemts on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST15BR, astrain isolated from beer produced by the fermention of maize, barley and soy flour. World J. Microbiol. Biotechnol. 20:643-650.

Tubylewicz, H. 1963. Studies on the bacteriocinogeny of *Listeria monocytogenes*Strains. **Bull. Acad. Pol. Sci. (Biol.)** 11: 519-521.

Verellen, T.L.J., G. Bruggeman, C.A. Van Reenen, L.M.T. Dicks and E.J. Vandamme. 1998. Fermentation optimization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* 423. **J. Ferm. Bioeng.** 86: 174-179.

Wood, B.J.B. and W.H. Holzapfel. 1995. **The general of lactic acid bacteria**. United Kinndom: St Edmundsbury Press. 398p.

Zoetendal, E.G., A. von Wright, T. Vilpponen-Salmela, K. Ben-Amor, A.D.L. Akkermans and W.M. de Vos. 2002. Mucosa-associated bacteria in the human gastrointestinal tract are uniformly distributed along the colon and differ from the community recovered from feces. **Appl. Environ. Microbiol.** 3401-3407.

ภาคผนวก

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเหลวสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion
ส่วนประกอบมีดังนี้

Meat peptone	10.0 กรัม
Beef extract	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Glucose	20.0 กรัม
Tween 80	1.0 กรัม
Soduim acetrate	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	2.0 กรัม
Ammonium citrate	2.0 กรัม
Magnesium sulfate	0. 01 กรัม
Manganese sulfate	0.05 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) อาหารสำเร็จรูป จำนวน 55 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่ในหลอดขนาด 16 x 50 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว De Man, Rogosa and Sharpe สูตร (0.7% agar) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion
ส่วนประกอบมีดังนี้

Meat peptone	10.0 กรัม
Beef extract	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Glucose	20.0 กรัม
Tween 80	1.0 กรัม
Soduim acetrate	5.0 กรัม

Dipotassium phosphate	2.0 กรัม
Ammonium citrate	2.0 กรัม
Magnesium sulfate	0. 01 กรัม
Manganese sulfate	0.05 กรัม
ผงวุ้น	7. 0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) อาหารสำเร็จรูป จำนวน 55 กรัม และเติมผงวุ้น จำนวน 7 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. อาหารแข็งสูตร De Man, Rogosa and Sharpe (1.5 % agar) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Criterion ส่วนประกอบมีดังนี้

Meat peptone	10.0 กรัม
Beef extract	10.0 กรัม
Yeast extract	5.0 กรัม
Glucose	20.0 กรัม
Tween 80	1.0 กรัม
Soduim acetrate	5.0 กรัม
Dipotassium phosphate	2.0 กรัม
Ammonium citrate	2.0 กรัม
Magnesium sulfate	0. 01 กรัม
Manganese sulfate	0.05 กรัม
ผงวุ้น	15. 0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) อาหารสำเร็จรูป จำนวน 55 กรัม และเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. อาหารเหลวสูตร Brain Heart Infusion (BHI) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Scharlau, ส่วนประกอบมีดังนี้

Brain extract	12.5 กรัม
Heart extract	9.8 กรัม
Peptone	10.0 กรัม
Dextrose	2.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Disodium phosphate	2.5 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร Brain Heart Infusion อาหารสำเร็จรูป จำนวน 37.0 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปใส่ในหลอดขนาด 16 x 50 มิลลิลิตร ปริมาตรหลอดละ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสูตร Brain Heart Infusion (0.7 % agar) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Scharlau ส่วนประกอบมีดังนี้

Brain extract	12.5 กรัม
Heart extract	9.8 กรัม
Peptone	10.0 กรัม
Dextrose	2.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Disodium phosphate	2.5 กรัม
ผงวุ้น	7.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร Brain Heart Infusion อาหารสำเร็จรูป จำนวน 37.0 กรัม และเติมผงวุ้น จำนวน 7 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. อาหารแข็งสูตร Brain Heart Infusion (1.5 % agar) อาหารสำเร็จรูปของบริษัท Scharlau ส่วนประกอบมีดังนี้

Brain extract	12.5 กรัม
Heart extract	9.8 กรัม
Peptone	10.0 กรัม
Dextrose	2.0 กรัม
Sodium chloride	5.0 กรัม
Disodium phosphate	2.5 กรัม
ผงวุ้น	15.0 กรัม
น้ำกลั่น	1,000 มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร Brain Heart Infusion อาหารสำเร็จรูป จำนวน 37.0 กรัม และเติมผงวุ้น จำนวน 15 กรัม ผสมและละลายในน้ำกลั่น ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ให้เข้ากัน แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การเตรียมสารเคมี

สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับพีเอช

1. สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 5.0 นอร์มอล

ทำการชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Mw = 40 กรัมต่อลิตร) ของบริษัท Merck จำนวน 20 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายหมด แล้วปรับด้วยปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร เก็บไว้ในขวดสีชา

2. สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5.0 นอร์มอล

ปิเปตสารละลายกรดไฮโดรคลอริกจาก stock ที่มีความเข้มข้น 37% (v/v) ปริมาตร 41.46 มิลลิลิตร มาละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร เก็บไว้ในขวดสีชา

สารเคมีที่ใช้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

1. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 % เจือจางด้วยน้ำ ในอัตราส่วน 1:16

ทำการปิเปตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 % ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจาง แบบ two–fold ตามลำดับ ในหลอด microcentrifuge จนได้อัตราส่วนเป็น 1:16 เก็บไว้ทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินซึ่งใช้เป็น positive control

2. เอนไซม์ต่าง ๆ เช่น proteinase K และ protease

นำเอนไซม์แต่ละชนิด มาทำการละลายด้วยน้ำกลั่นที่ปราศเชื้อ ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บไว้ในหลอด microcentrifuge พร้อมใช้งาน

สารเคมีที่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียโดยวิธีการหาลำดับของ DNA ในส่วนของยีน 16S rDNA

1. เอทานอล ความเข้มข้น 70 % (v/v)

เตรียมเอทานอล ความเข้มข้น 70 % (v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จากเอทานอลเกรดวิเคราะห์ ความเข้มข้น 95 % (v/v) โดยทำการคำนวณจากสูตรดังนี้

$$C1V1 = C2V2$$

$$70 \times 100 = 95 \times V2$$

$$V2 = 73.68$$

ดังนั้นทำการปิเปตเอทานอล ความเข้มข้น 95 % (v/v) ปริมาตร เท่ากับ 7 มิลลิลิตร ละลายด้วยน้ำกลั่น ทำการปรับปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

2. สารละลาย TE buffer (พีเอช 8.5) ประกอบสารต่าง ๆ ดังนี้

Tris base	10 mM
EDTA	1 mM

ชั่งสาร Tris base จำนวน 0.12 กรัม และสาร EDTA จำนวน 0.0372 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร จากนั้นนำไปปรับพี-เอชให้ได้เท่ากับ 8.5 ด้วยกรดไฮโดรคลอริก แล้วนำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. สารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 1X

เตรียมสารละลาย TAE buffer ความเข้มข้น 1X จาก TAE buffer ความเข้มข้น 50X ซึ่งมีวิธีเตรียมดังนี้

TAE buffer ความเข้มข้น 50X มีส่วนประกอบดังนี้

Tris base	242 กรัม
Glacial acetic acid	57.1 มิลลิลิตร
0.5M EDTA (พีเอช 8.0)	100 มิลลิลิตร

ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเตรียม TAE buffer ความเข้มข้น 1X ปริมาตร 500 มิลลิลิตร โดยคำนวณจากสูตรดังนี้

$$C1V1 = C2V2$$

$$1 \times 500 = 50x\ V2$$

$$V2 = 10$$

ดังนั้น ต้องปิเปต TAE buffer ความเข้มข้น 50X ปริมาตร 10 มิลลิลิตร มาละลายด้วยน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้เป็น 500 มิลลิลิตร

4. เตรียม 1.5 % (w/v) agarose gel

ทำการชั่งผงวุ้นอะกาโรส สำหรับทำ electrophoresis จำนวน 1.5 กรัม ละลายใน TAE buffer มีความเข้มข้นเท่ากับ 1X ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำไปหลอมให้ละลายด้วยเครื่อง Microwave

5. สารละลายเอธิเดียมโบรไมด์

ทำการผสมสารละลายเอธิเดียมโบรไมด์สำเร็จรูป ปริมาตร 40 ไมโครลิตร ในน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน

การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธีของ Lowry และ คณะ (1951) เตรียมสารเคมีดังนี้

1. สารละลาย A

ประกอบด้วย Na_2CO_3 ความเข้มข้น 2.0 % (w/v) ในสารละลาย NaOH ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ โดยชั่ง NaOH จำนวน 0.4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง Na_2CO_3 จำนวน 2.0 กรัม ใส่ลงไปคนให้ละลายจนเข้ากันดี

2. สารละลาย B

ประกอบด้วย $CuSO_4 .5H_2O$ ความเข้มข้น 0.5 % (w/v) ละลายใน Na-K-tartrate ที่มีความเข้มข้น 1 % (w/v) โดยชั่ง Na-K-tartrate จำนวน 1.0 กรัม ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 100.0 มิลลิลิตร จากนั้นชั่ง $CuSO_4 .5H_2O$ จำนวน 0.5 กรัมใส่ลงไปคนให้ละลายจนเข้ากันดี

3. สารละลาย C

ประกอบด้วยสารละลาย A ปริมาตร 50.0 มิลลิลิตร และผสมกับสารละลาย B ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร

4. สารละลาย D

ประกอบด้วย Folin ciocateus phenol reagent ละลายในน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1: 1

สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์มวลโมเลกุลโปรตีน

1. Sample buffer ประกอบด้วย

Deionized water	5.0 มิลลิลิตร
1.0 M Tris-HCl, pH 6.8	1.0 มิลลิลิตร
87 % Glycerol	2.4 มิลลิลิตร
10 % SDS	1.0 มิลลิลิตร
0.5 % Coomassie G-250	0.4 มิลลิลิตร
B-mercaptoethnol	0.2 มิลลิลิตร
Total	10.0 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ปิเปตน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร , 1.0 M Tris-HCl (pH เท่ากับ 6.8) ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร, 87 % Glycerol ปริมาตร 2.4 มิลลิลิตร , 10 % SDS ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร, 0.5 % Coomassie G-250 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร ใส่ในบีกเกอร์ละลายให้เข้ากัน ก่อนนำไปใช้เติม B-mercaptoethnol 0.2 มิลลิลิตร

2. Running buffer (0.1M tris, 0.1M tricine, 0.1 % SDS) ประกอบด้วย

Tris base	6.055 กรัม
Tricine	8.960 กรัม
SDS	0.500 กรัม
Deionized water	500 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ชั่งสาร Tris base จำนวน 6.055 กรัม และสาร Tricine จำนวน 8.960 กรัม ละลายในน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นปรับปริมาตรให้ได้เท่ากับ 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

3. Coomassie blue staining solution

Coomassie blue	0.1 % (w/v)
Methanol	40 % (v/v)
Acetic acid	10 % (v/v)
Deionized water	125 มิลลิลิตร

วิธีการเตรียม

ตวง Methanol เกรดวิเคราะห์ ความเข้มข้น 40 % (v/v) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และตวง Acetic acid ความเข้มข้น 10 % (v/v) ปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเติมสาร Coomassie blue จำนวน 0.25 กรัม แล้วทำการปรับปริมาตรโดยละลายในน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 250 มิลลิลิตร

4. Destaining solution

Methanol	40 % (v/v)
Acetic acid	10 % (v/v)
Deionized water	250 มิลลิลิตร

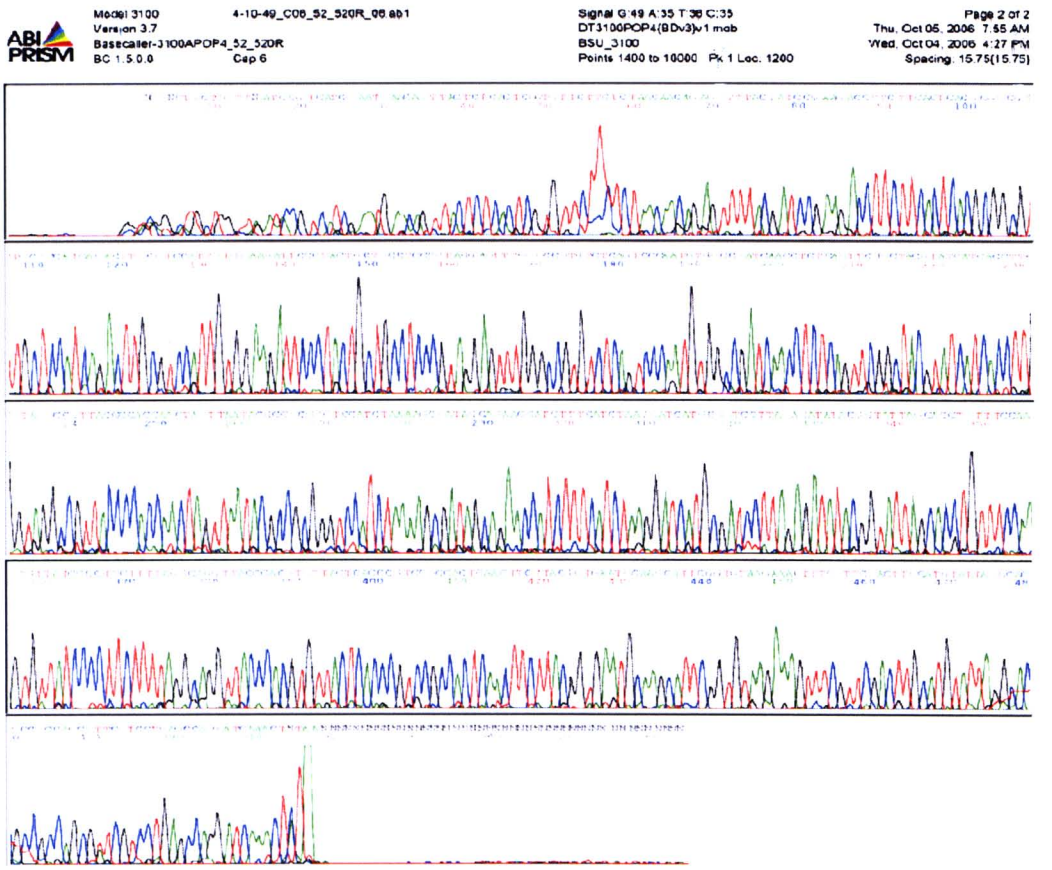
วิธีการเตรียม

ตวง Methanol เกรดวิเคราะห์ ความเข้มข้น 40 % (v/v) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร และตวง Acetic acid ความเข้มข้น 10 % (v/v) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน แล้วทำการปรับปริมาตรโดยละลายในน้ำปราศจากอิออน (Deionized water) ให้ได้ปริมาตรเท่ากับ 500 มิลลิลิตร

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

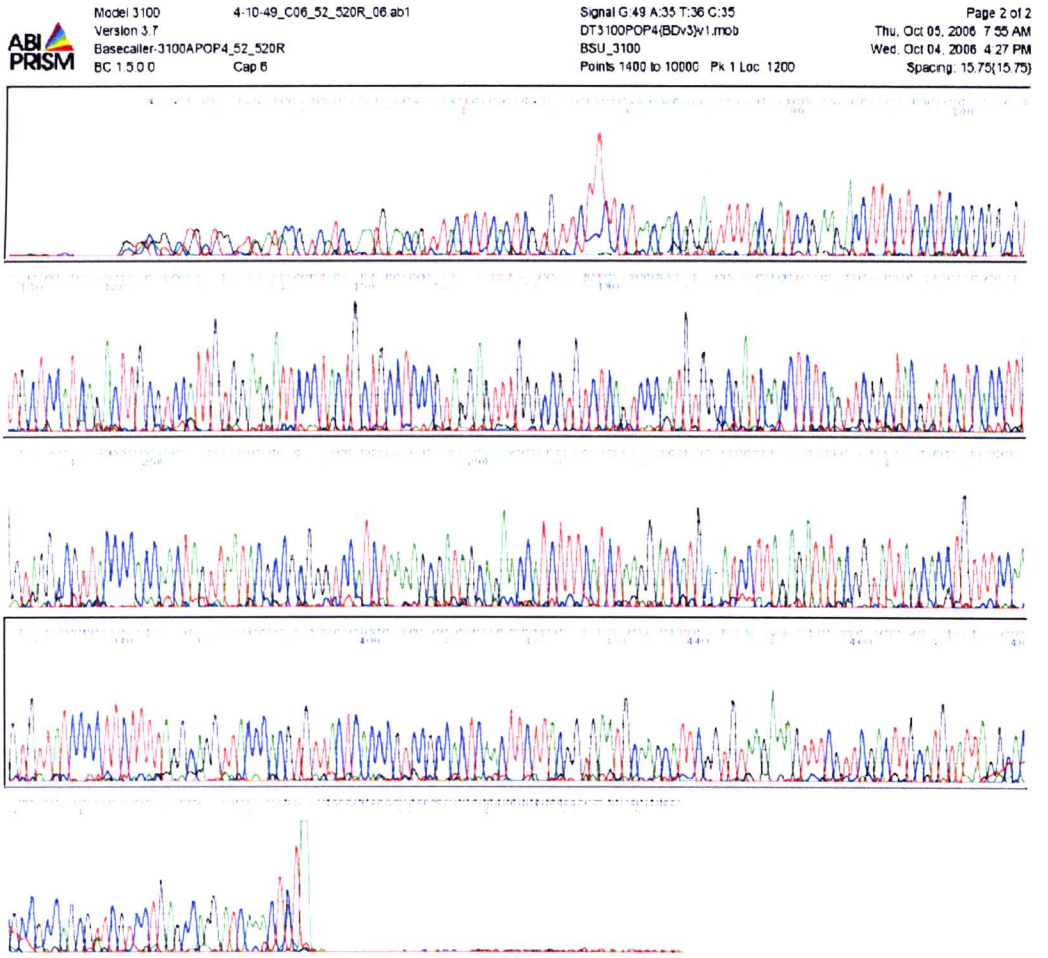
ภาคผนวก ค

ลำดับเบสของ DNA ในส่วนของยีน 16S rRNA



5'ACTGGCGGCGTGCCTATCATGCAAGTCGAACGAAACTTTCTTACACCGAATGCTTGCATTCA
CCGTAAGAAGTTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCTAAAAGAAGGG
GATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATATCTCTAAGGATCGCATGATCCTTAGATGA
AAGATGGTTCTGCTATCGCTTTTAGATGGACCCGCGGCGTATTAACTAGTTGGTGGGGTAAC
GGCCTACCAAGGTGATGATACGTAGCCGAACTGAGAGGTTGATCGGCCACATTGGGACTGA
GACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTC
TGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTCTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGA
AGAACACGAGTGAGAGTAACTGTTCATTCGATGACGGTATCTAACCAGCANGTCACGGCTAA
CTACGTGCCAGCCGCCGCGGTA3'

ภาพภาคผนวก 1 ลำดับเบสของยีน16S rRNAของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ที่ได้จาก primer 27F



5'GGNCTGCTGGTTNATCCGTCATCGAATGAACAGTTACTCTCACTCGGTGTTCTTCTCTAACA
ACAGAGTTTTACGATCCGAAGACCTTCTTCACTCACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTC
CATTGTGGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAAT
GTGGCCGATCAACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAGGCCGTTACCCCACCA
ACTAGTTAATACGCCGCGGGTCCATCTAAAAGCGATAGCAGAACCATCTTTCATCTAAGGATC
ATGCGATCCTTAGAGATATACGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCTTCTTTTAGGC
AGGTTACCCACGTGTTACTCACCCGTCCGCCACTCAACTTCTTACGGTGAATGCAAGCATTCG
GTGTAAGAAAGTTTCGTTCGACTTGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGNTCGTCCTG
AGCCAGGATCAAACT3'

ภาพภาคผนวก 2 ลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท CF52 ที่ได้จาก primer 520R

ภาคผนวก ง
กราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน

การทำกราฟมาตรฐานของสารละลายโปรตีน

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

เตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐาน BSA (bovine serum abumin) ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่ง BSA 0.002 กรัม ละลายในน้ำกลั่นจนเข้ากันดี ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร นำมาเตรียมเป็นสารละลายโปรตีนมาตรฐานความเข้มข้น 0, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 140, 160, 180 และ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ดังตารางภาคผนวก 1) จากนั้นเติมสารละลาย C ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที แล้วเติมสารละลาย D ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectronic โดยเทียบกับ blank (ดังตารางภาคผนวก 2) สร้างกราฟมาตรฐานเพื่อใช้หาปริมาณโปรตีน โดยการสร้างกราฟระหว่างค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร กับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน (ภาพภาคผนวก 3)

การเตรียมปริมาณโปรตีนจากสารละลายแบคเทอริโอซิน

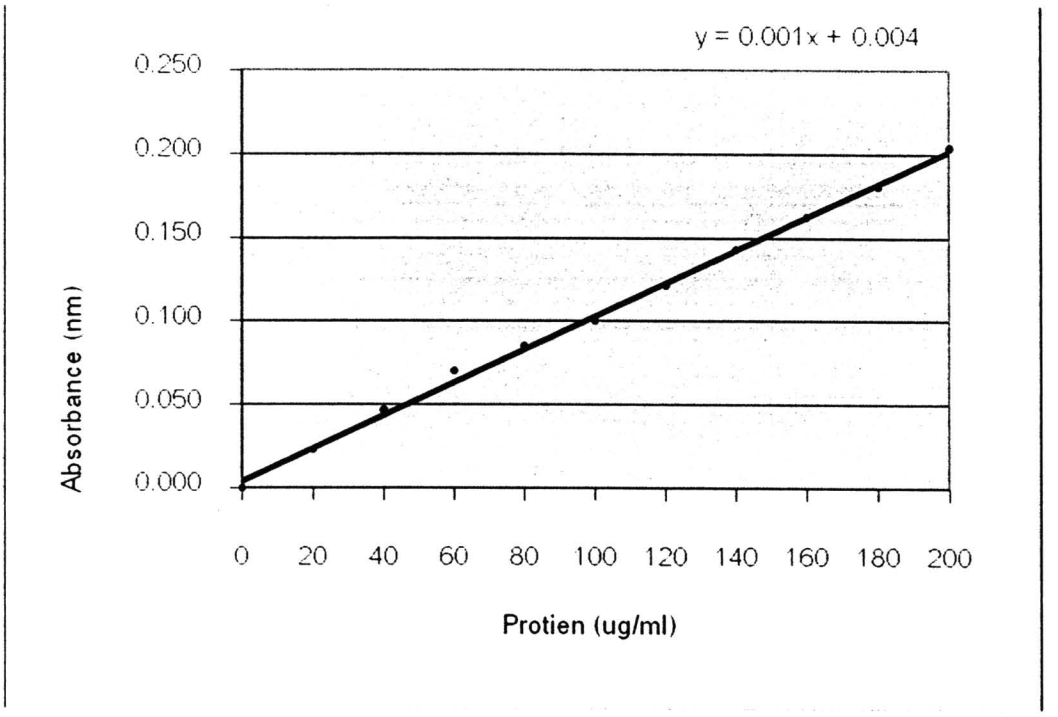
ทำโดยนำสารละลายแบคเทอริโอซิน 0.05 มิลลิลิตร มาละลายในน้ำกลั่น ให้ได้มีปริมาตรเท่ากับ 1.0 มิลลิลิตร จากนั้นเติมสารละลายจากนั้นเติมสารละลาย C และ D เช่นเดียวกับการเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานข้างต้น วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร แล้วทำการหาความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลาย แบคเทอริโอซินโดยอ่านค่าจากกราฟมาตรฐาน

ตารางภาคผนวก 1 แสดงปริมาณของสารละลายต่าง ๆ ที่ใช้สำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

หลอดทดลอง	สารละลาย BSA มาตรฐาน (ml)	สารละลายแบคเทอริโอซิน (ml)	น้ำกลั่นที่เติม (ml)	ความเข้มข้นของโปรตีน (ug/ml)
Blank	-	-	1	0
1	0.1	-	0.9	20
2	0.2	-	0.8	40
3	0.3	-	0.7	60
4	0.4	-	0.6	80
5	0.5	-	0.5	100
6	0.6	-	0.4	120
7	0.7	-	0.3	140
8	0.8	-	0.2	160
9	0.9	-	0.1	180
10	1	-	0	200
bacteriocin	-	0.5	0.95	-

ตารางภาคผนวก 2 ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตรของสารละลายโปรตีนมาตรฐาน

ความเข้มข้นของโปรตีนมาตรฐาน (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 750 นาโนเมตร
0	0.000
20	0.023
40	0.046
60	0.070
80	0.085
100	0.100
120	0.121
140	0.143
160	0.162
180	0.180
200	0.203



ภาพภาคผนวก 3 แสดงกราฟมาตรฐานสำหรับหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry

ภาคผนวก จ
มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน
(Polypeptide SDS-PAGE standards)

ตารางภาคผนวก 3 มวลโมเลกุลของโปรตีนมาตรฐาน (Polypeptide SDS-PAGE standards)

Poly peptide	Molecular weigh (Daltons)
Triosephosphate isomerase	26,625
Myoylobin	16,950
α-lactabumin	14,437
Aprotinin	6,512
Insulin b chain, Oxidized	3,496
Bacitracin5	1,423

ภาคผนวก ฉ
บทความสำหรับการเผยแพร่ทางวิชาการ

1. **Boonkumklao, P.**, Ketkaew, W., Yokota, A. and Assavanig, A. Bacteriocin production from lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract. Poster presentation at the 3rd Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. Sanur, Bali, Indonesia. 25-27 August, 2005.

2. วันดี เกตุแก้ว และ**ปิยะนุช เนียมทรัพย์**. 2550. การผลิตสารแบคเทอริโอซินจาก Lactobacillus salivarius CF52 ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหาร. รายงานการประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 5 มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 29-30 พฤษภาคม 2550. ณ ศูนย์การศึกษาและฝึกอบรมนานาชาติ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่. หน้า 355-361.

Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. Sanur, Bali, Indonesia. 25-27 August, 2005.

Bacteriocin production from lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract

Piyanuch Boonkumklao[1], Wandee Ketkaew[1], Atsushi Yokota[2] and Apinya Assavanig[3]

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290, Thailand
[2]Laboratory of Microbial Resources and Ecology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan
[3]Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd., Bangkok 10400, Thailand

Bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) have been the subject of considerable researches and industrial interest due to their potential as food biopreservatives. There has been very little research on the occurrence of bacteriocin production among LAB in the gastrointestinal (GI) tract. The microbial populations of the GI tract include a very dense bacterial population. The extent of bacterial diversity in the GI tract is still not completely defined, but estimates of diversity have increased dramatically over the last decades. The objective of this study was to detect bacteriocin production in LAB isolated from human and animal GI tract in order to determine their inhibitory spectrum to other LAB and pathogens.

At present, one hundred and seventy isolates of LAB, obtained from human and animal GI tract, have been examined for their ability to produce bacteriocins. Three isolates showed antagonism against at least one of the indicatior strains, by the well diffusion assay. These strains were identified by 16S rDNA sequencing as *Enterococcus faecium* (from human), *Weisella confusa* and *Lactobacillus salivarius* (from duck). Of these isolates, only one designated *Enterococcus faecium* HF84 from human feces stably secreted inhibitory substance into culture broth. It produces an inhibitory compound, which reach its maximum activity at the beginning of the stationary phase of growth. This bacteriocin has a proteinaceous nature, is stable over a broad range of pH, and shows a bactericidal action against *Enterococcus durans* JCM 8725.

Asian Conference on Lactic Acid Bacteria. Sanur, Bali, Indonesia. 25-27 August, 2005.

Bacteriocin production from lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract

Piyanuch Boonkumklao[1], Wandee Ketkaew[1], Atsushi Yokota[2] and Apinya Assavanig[3]

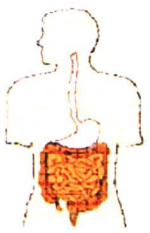
[1]*Department of Biology, Faculty of Science, Maejo University, Sansai, Chiang Mai 50290, Thailand*
[2]*Laboratory of Microbial Resources and Ecology, Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Sapporo 060-8589, Japan*
[3]*Department of Biotechnology, Faculty of Science, Mahidol University, Rama VI Rd., Bangkok 10400, Thailand*

[Abstract] Bacteriocins produced by lactic acid bacteria (LAB) have been the subject of considerable researches and industrial interest due to their potential as food biopreservatives. There has been very little research on the occurrence of bacteriocin production among LAB in the gastrointestinal (GI) tract. The microbial populations of the GI tract include a very dense bacterial population. The extent of bacterial diversity in the GI tract is still not completely defined, but estimates of diversity have increased dramatically over the last decades. The objective of this study was to detect bacteriocin production in LAB isolated from human and animal GI tract in order to determine their inhibitory spectrum to other LAB and pathogens. At present, one hundred and seventy isolates of LAB, obtained from human and animal GI tract, have been examined for their ability to produce bacteriocins. Three isolates showed antagonism against at least one of the indicator strains, by the well diffusion assay. These strains were identified by 16S rDNA sequencing as *Enterococcus faecium* (from human), *Weissella confusa* and *Lactobacillus salivarius* (from duck). Of these isolates, only one designated *Enterococcus faecium* HF84 from human feces stably secreted inhibitory substance into culture broth. This strain produces an inhibitory compound, which reaches its maximum activity at the last log phase of growth and shows a bactericidal action against *E. durans* JCM 8725. This bacteriocin has a proteinaceous nature, is stable over a broad range of pH, and resistant to the temperature at 65°C but not at 95°C and 121°C.

Background

Intestinal LAB

- closely associated with the host's health
- is an importance biodefense factor in preventing colonization of pathogenic bacteria
- LAB produce a number of antimicrobial substances, including bacteriocins



Bacteriocins producing LAB

- produce peptides or proteins, which exhibit inhibitory activity against sensitive bacteria
- potential candidate for probiotic strain?

Objectives

To detect bacteriocin production in LAB isolated from human and animals gastrointestinal tract in order to determine their spectrum of action, including pathogens.

Isolation of LAB

sample + GPY broth

⇩

Incubate at 37°C, anaerobically for 24 hr

⇩

Spread on GPY agar + 5% CaCO3 and BCP

anaerobically at the same temperature

Streak to isolate pure colony

Colony with clear zone

Source of samples

Fecal samples and/or intestinal content collected from
- Human
- Animals e.g. chicken, duck, pig and cow

170 isolates

Bacteriocin assay

LAB in MRS broth

Incubate at 37°C, anaerobically For 16 h

Supernatant pH 6.5

Well diffusion assay

Indicator strains	Gram	Indicator strains	Gram
Lactobacillus casei JCM 1134	+	*Bacillus subtilis* TISTR 008	+
Lb. fermentum JCM 1173	+	*Listeria monocytogenes* DMST 4553	+
Lb. agilis JCM 1187	+	*L. monocytogenes* DMST 1127	+
Lb. pentosus JCM 1558	+	*L. murrayi* DMST 4564	+
Lb. thermotolerans JCM 11425	+	*Staphylococcus aureus* TISTR 517	+
Enterococcus durans JCM 8725	+	*Micrococcus luteus* MJU	+
E. avium JCM 8722	+	*Escherichia coli* TISTR 887	-
E. gallinarum JCM 8728	+	*Salmonella typhimurium* TISTR 292	-
E. faecium HF 92	+	*Serratia marcescens* MJU	-
Pediococcus pentosaceus PU 78	+	*Enterobacter aerogenes* MJU	-
Bacillus cereus MJU	+	*Proteus vulgaris* MJU	-

16s rDNA sequencing of the isolates

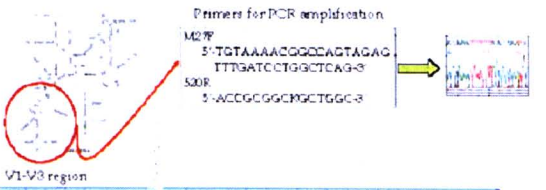


Table 2. Three bacteriocin producing LAB identified by 16S rDNA sequencing.

Bacteriocin producing isolates	source	Indicator strain
Enterococcus faecium HF84	Human feces	*E. durans* JCM 8725
Weissella confusa DF112	Duck feces	*L. casei* JCM 1134
Lactobacillus salivarius DF114	Duck feces	*L. fermentum* JCM 1173

Table 3. Effect of various treatments on bacteriocin from *E. faecium* HF84

Treatment	Result
Proteinase K	-
Protease	-
Catalase	+
pH 3.0	+
pH 5.0	+
pH 7.0	+
pH 9.0	+
pH 10.0	+
Heat treatment at 65°C for 40 min	+
Heat treatment at 95°C for 20 min	-
Heat treatment at 121°C for 20 min	-
Control	+

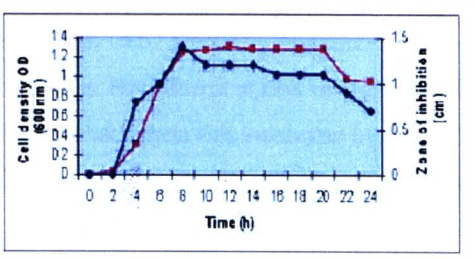


Fig. 1. Growth (■) and bacteriocin production (◆) of *E. faecium* HF84 in MRS broth with uncontrolled pH condition at 37°C.

Conclusion

- 170 LAB were isolated from human and animals GI tract which three isolates showed antagonism against at least one indicator strain.
- *Enterococcus faecium* HF84 from human feces stably secreted bacteriocin, which reaches its maximum activity at the last log phase of growth.
- This bacteriocin has a proteinaceous nature, is stable over a broad range of pH, and resistant to the temperature at 65°C but not at 95°C and 121°C.

Acknowledgments

This work was supported by a grant from the Thailand Research Fund (TRF)

การผลิตสารแบคเทอริโอซินจาก *Lactobacillus salivarius* CF52 ที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหาร

Production of Bacteriocin by *Lactobacillus salivarius* CF52 Isolated from Gastrointestinal Tract

วันดี เกตุแก้ว และปิยะนุช เนียมทรัพย์

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ เชียงใหม่ 50290

E-mail: piyanuch@mju.ac.th

บทคัดย่อ

จากแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 26,765 โคโลนีที่แยกได้จากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เมื่อนำมาทดสอบการผลิตสารแบคเทอริโอซินพบว่ามีเพียงไอโซเลทเดียว คือ *Lactobacillus salivarius* CF52 ที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มใกล้เคียงและแบคทีเรียที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารบางชนิดได้ นอกจากนี้แบคเทอริโอซินที่ได้ยังมีความเสถียรต่อความร้อน มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วง pH ที่กว้างและทำให้เสียสภาพกิจกรรมการยับยั้งด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน เมื่อนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ซึ่งประกอบด้วย 2.5% Maltose, 0.5% Peptone, 1.0% Beef extract, 0.1-0.2% K_2HPO_4, 1.0% $MgSO_4.7H_2O$, 0.5% Na-acetate, 0.2% $(NH_4)_2$ citrate, 0.004% $MnSO_4.H_2O$ และ 0.1% Tween 80 ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5-7.0 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{c}C

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก แบคเทอริโอซิน ระบบทางเดินอาหาร

Abstract

A total 26,765 lactic acid bacteria (LAB) were isolated from human and animal gastrointestinal tract and screened for bacteriocin production. One *Lactobacillus salivarius* strain CF52 produced a bacteriocin that not only inhibited closely related LAB, but also some food-borne pathogens. Biochemical studies revealed that the bacteriocin was heat-stable and was active over a wide pH range. The bacteriocin was inactivated by proteolytic enzyme. Optimization of culture condition and medium composition for the production when grown modified MRS medium containing 2.5% Maltose,0.5% Peptone, 1.0% Beef extract, 0.1-0.2% K_2HPO_4 ,1.0% $MgSO_4.7H_2O$, 0.5% Na-acetate, 0.2% $(NH_4)_2$ citrate, 0.004% $MnSO_4.H_2O$ and 0.1% Tween 80. The optimal initial pH and temperature for bacteriocin production were 6.5-7.0 and 37 ^{o}C respectively.

Key word: lactic acid bacteria, bacteriocin, gastrointestinal tract

คำนำ

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) ในระบบทางเดินอาหารมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับสุขภาพของคนและสัตว์ เพราะสามารถช่วยป้องกันการแข่งขันและการแพร่กระจายของแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติเป็นโปรไอโอติก (Oh *et al.*, 2000) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารต้านทานจุลชีพได้หลายชนิดรวมทั้งแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน หรือกลุ่มใกล้เคียงได้ (Gilliand and Speck, 1997) นักวิจัยส่วนใหญ่ศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารและผลิตภัณฑ์นม เพื่อมุ่งเน้นในการนำไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร งานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งใหม่ๆ เช่น ระบบทางเดินอาหาร เพื่อที่สามารถนำไปพัฒนาใช้เป็นโปรไอโอติกในอาหารคนและสัตว์ ซึ่งช่วยส่งเสริมสุขภาพและช่วยลดปัญหาการเกิดโรคติดเชื้อในคนและสัตว์ได้ นอกจากนั้นยังเป็นประโยชน์ต่อกลุ่มเกษตรกรในการเพิ่มคุณภาพมาตรฐานของสัตว์เศรษฐกิจได้

อุปกรณ์และวิธีการ

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้โดยวิธี direct plating บนอาหารแข็งสูตร MRS ตามวิธีของ Noonpakdee et al., (2003) โดยใช้เชื้อทดสอบ 4 ชนิดคือ *Lactobacillus fermentum* JCM 1173, *Lactobacillus casei* JCM 1134, *Enterococcus durans* JCM 8725 และ *Pediococcus pentosaceus* MJU 78 ทำการคัดเลือกเฉพาะโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบมาทำให้บริสุทธิ์และเก็บรักษาเชื้อในกลีเซอรอล 20% (v/v) ที่อุณหภูมิ -80 °C ต่อมาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตต่อเชื้อทดสอบ 36 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Pediococcus* spp. และแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารบางชนิด เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Bacillus cereus* โดยวิธี well diffusion assay ตามวิธีของ Schillinger and Lücke (1989) จากนั้นทำการคัดเลือกไอโซเลทที่มีฤทธิ์การยับยั้งที่ดีที่สุดมาทำการจำแนกแบคทีเรียโดยใช้วิธี 16S rDNA sequencing ในส่วน V1-V3 ซึ่งมีความยาวประมาณ 500 bp หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม BioEdit และเปรียบเทียบความเหมือนจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้ BLASTn ของ The National Center for Biotechnolgy Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nil.gov/) จากนั้นทำการศึกษาลักษณะกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่มีผลต่ออุณหภูมิ 3 ระดับ คือ อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 40 นาที 95 °C เป็นเวลา 40 นาที และ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที ค่าความเป็นกรดด่างที่ต่างกันคือ 3 4 5 6 7 8 9 และ 10 และเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนบางชนิด คือ proteinase K และ protease โดยใช้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (Ogunbanwo *et al.*, 2003) จากนั้นวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งที่เหลือต่อเชื้อทดสอบด้วยวิธี well diffusion assay โดยทำการเจือจางตัวอย่างแบบ 2 เท่า (two fold) และวัดค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินในหน่วยของ Arbitrary unit (AU/ml) ซึ่งคำนวณได้จากนำส่วนกลับของค่าอัตราการเจือจางสูงสุดที่มีค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อมิลลิลิตร หลังจากนั้นทำการทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย ได้แก่ pH เริ่มต้นของ

อาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน เพื่อเพิ่มผลผลิตและกิจกรรมการยับยั้งแบคเทอริโอซินให้มากยิ่งขึ้น

ผลการทดลอง

ผลการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์โดยทำการเก็บตัวอย่างจากอุจจาระคนและมูลสัตว์ชนิดต่างๆ เช่น มูลโค มูลไก่ และ มูลสุกร โดยใช้วิธี direct plating แสดงผลใน Figure 1 จากแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS ทั้งสิ้นจำนวน 26,765 โคโลนี พบว่ามีโคโลนีที่เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบจำนวน 66 โคโลนี (คิดเป็น 0.25% เทียบกับจำนวนโคโลนีทั้งหมด) โดยพบผลบวกต่อเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Lactobacillus fermentum* JCM 1173, *Lactobacillus casei* JCM 1134, *Enterococcus durans* JCM 8725 และ *Pediococcus pentosaceus* MJU 78 จำนวน 27, 11, 12 และ 16 โคโลนี ตามลำดับดังแสดงผลใน Table 1

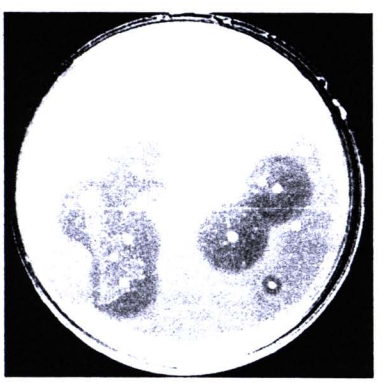


Figure 1 Bacteriocin-producing bacteria were isolated by the direct plating method

Table 1 Percentage detection rates of bacteriocin-producing isolates

Sources	Tested colonies	Inhibition of indicator strains			
		L. fermentum JCM 1173	*L. casei* JCM 1134	*E. faeclum* JCM 8725	*P. pentosaceus* MJU 78
Human	7,251	-	3	5	8
Chicken	11,113	9	-	-	4
Cow	697	16	7	5	1
Pig	7,704	2	1	2	3
Total	26,765	27	11	12	16
%	100	Total = 66 (0.25%*)			

* % detection rate was determined by dividing the number of positive colonies by the total tested colonies x 100

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 66 ไอโซเลทที่ได้จากการแยกในการทดลองข้างต้น (เกิดวงใสต่อเชื้อทดสอบ) มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่ผลิตต่อเชื้อทดสอบ 36 ชนิด ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียก่อโรคโดยวิธี well diffusion assay พบว่าไอโซเลท CF50 CF51 และ CF52 มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ 11 ชนิด และเมื่อทำการเปรียบเทียบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท พบว่าไอโซเลท CF52 มีฤทธิ์การยับยั้งต่อเชื้อทดสอบได้ดีที่สุดดังแสดงผลใน Table 2

Table 2 Antimicrobial spectrum of bacteriocin by well diffusion assay

Indicator strains	Sensitivity*		
	CF50	CF51	CF52
L. fermentum JCM 1173	+++	+++	+++
E. durans JCM 8725	++	++	++
E. gallinarum JCM 8728	++	++	+++
P. pentosaceus MJU 78	++	+++	+++
E. faecium MJU 92	+++	+++	+++
L. monocytogenes DMST 1327	+	++	+++
L. monocytogenes DMST 1783	+	++	++
L. monocytogenes DMST 2871	++	++	++
L. monocytogenes DMST 4553	++	++	++
B. cereus MJU	++	++	++
M. luteus MJU	+++	+++	+++

*Inhibition zone (mm): +++, 11-15 : ++, 6-10 : +, 1-5 : -, no inhibition

นำแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CF52 มาทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้วิธี 16S rDNA sequencing ในส่วน V1-V3 ซึ่งมีความยาวประมาณ 500 bp หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม BioEdit และเปรียบเทียบความเหมือนจากฐานข้อมูลลำดับเบสใน GenBank โดยใช้ BLASTn ของ The National Center for Biotechnolgy Information (NCBI) (http://www.ncbi.nlm.nil.gov/) พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท CF52 มีลำดับเบสของยีนในส่วน 16S rDNA คล้ายกับ *Lactobacillus salivarius* 16S ribosomal RNA gene ที่เปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.2 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียไอโซเลท CF52 เป็น *L. salivarius* และกำหนดให้ชื่อว่า *L. salivarius* CF52

เมื่อทำการศึกษาความคงทนต่อความร้อนของแบคเทอริโอซิน ที่มีลักษณะกิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียทดสอบ คือ *L. fermentum* JCM1173 พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *L. salivarius* CF52 สามารถทนต่อความร้อนได้ทั้ง 3 ระดับ คือ อุณหภูมิ 65 °C เป็นเวลา 40 นาที มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 320 AU/ml ที่อุณหภูมิ 95 °C เป็นเวลา 40 นาที มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 160 AU/ml และที่อุณหภูมิ 121 °C เป็นเวลา 20 นาที มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 80 AU/ml เมื่อทำการศึกษาความคงทนต่อค่า pH ต่าง ๆ ที่มีลักษณะกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินต่อแบคทีเรียทดสอบ *L. fermentum* JCM1173 พบว่ามีความคงทนที่ค่า pH ตั้งแต่ 3-10 แต่พบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบมีค่าลดลงเมื่อเลี้ยงในสภาวะมีความเป็นกรดและด่างมาก เมื่อทำการศึกษาลักษณะกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินที่มีผล

ต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินต่อเชื้อทดสอบ ถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนทั้ง 2 ชนิด คือ proteinase K และ protease ดังแสดงผลใน Table 3

Table 3 Stability of bacteriocin from *L. salivarius* CF52 against *L. fermentum* JCM1173

Treatment	Bacteriocin activity (AU/ml)*
Enzymes	
Proteinase k	0
Protease	0
pH	
3	160
4	160
5	320
6	320
7	160
8	160
9	80
10	80
Heat	
65 °C. 40 min	320
95 °C. 20 min	160
121 °C. 20 min	80

*The activity was expressed as arbitrary units (AU/ml)

เมื่อทำการศึกษาหาส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus salivarius* CF52 เพื่อผลิตสารแบคเทอริโอซิน พบว่าเมื่อทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงซึ่งประกอบด้วย 2.5% Maltose, 0.5% Peptone, 1.0% Beef extract, 0.1-0.2% K_2HPO_4, 1.0% $MgSO_4.7H_2O$, 0.5% Na-acetate, 0.2% $(NH_4)_2$ citrate, 0.004% $MnSO_4.H_2O$ และ 0.1% Tween 80 แบคเทอริโอซินที่ได้มีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดคือ 3,413 AU/ml ซึ่งดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ทั่วไป คือ 320 AU/ml ดังแสดงผลใน Table 4

Table 4 Optimization of culturing medium for bacteriocin production

Composition	MRS (%)	Modified MRS (%)
Glucose	2	-
Maltose	-	2.5
Peptone	1	0.5
Yeast extract	0.5	-
Beef extract	1.0	1
K_2HPO_4	0.2	0.1-0.2
$MgSO_4.7H_2O$	0.002	1
+ 0.5% Na-acetate, 0.2% $(NH_4)_2$ citrate, 0.004% $MnSO_4.H_2O$, 0.1% Tween 80		
Activity (AU/ml)	320	3,413

หลังจากนั้นจึงได้ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก *L. salivarius* CF52 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรดัดแปลงที่ได้ เพื่อนำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยปรับอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH ต่างๆ กัน คือ 4.5 5.0 5.5 6.0 6.5 และ 7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นนาน 18 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจน พบว่า pH เริ่มต้นของอาหารเหลว MRS ที่ 6.5-7.0 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบสูงสุดต่อ *L. fermentum* JCM1173 คือ 4,266 AU/ml และเมื่อทำการเพาะเลี้ยง *L. salivarius* CF52 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH เป็น 6.5 ทำการบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 30 37 และ 45 ° C เป็นเวลา 12 15 และ 18 ชั่วโมง พบว่าการเพาะเลี้ยง *L. salivarius* CF52 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีค่า pH เริ่มต้นของอาหารที่ pH เป็น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 ° C เป็นเวลา15-18 ชั่วโมงให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดคือ 4,266 AU/ml ดังแสดงผลใน Figure 2

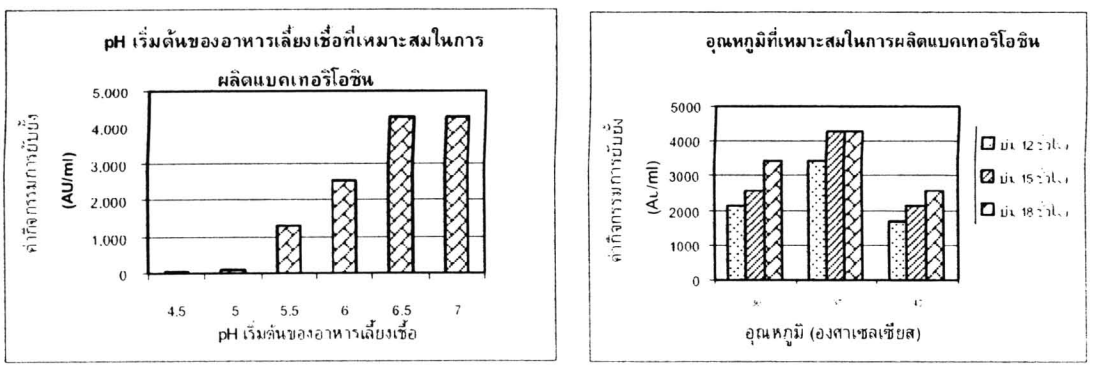


Figure 2 The optimal initial pH and temperature for bacteriocin production

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์โดยใช้วิธี direct plating จำนวนทั้งสิ้น 26,765 โคโลนี เมื่อนำมาทดสอบการผลิตสารแบคเทอริโอซิน พบว่ามีเพียงไอโซเลทเดียวคือ *Lactobacillus salivarius* CF52 ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแลคติกในกลุ่มใกล้เคียงกันและแบคทีเรียที่ก่อโรคในอาหารบางชนิดได้ สอดคล้องกับงานทดลองของ Oh *et al.* (2000) ที่ทดสอบฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. acidophilus* 30SC พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นในกลุ่มเดียวกันหรือกลุ่มใกล้เคียงกัน รวมทั้งแบคทีเรียก่อโรคแกรมบวกบางชนิดได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ

นอกจากนี้ลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ผลิตสามารถคงทนต่อช่วง pH ที่กว้างตั้งแต่ 3-10 และสามารถทนความร้อนได้ถึงอุณหภูมิ 121 ° C เป็นเวลา 20 นาที ถูกทำให้เสียสภาพโดยเอนไซม์ด้วย proteinase K และ protease สอดคล้องกับงานทดลองของ Oh *et al.* (2000) ที่ทำการศึกษาลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. acidophilus* 30SC พบว่า มีความเสถียรต่อความร้อน มีกิจกรรมการยับยั้งในช่วง pH ที่กว้าง ถูกทำให้เสียสภาพกิจกรรมการยับยั้งด้วยเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน

สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิตแบค-เทอริโอซินของ *L. salivarius* CF52 คือการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงซึ่งประกอบด้วย 2.5% Maltose, 0.5% Peptone, 1.0% Beef extract, 0.1-0.2% K_2HPO_4 ,1.0% $MgSO_4.7H_2O$, 0.5% Na-acetate, 0.2% $(NH_4)_2$ citrate, 0.004% $MnSO_4.H_2O$ และ 0.1% Tween 80 ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 6.5-7.0 บ่มที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Kim *et al.* (2006) ที่ทดลองหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อในการผลิต micococcin GO จากเชื้อ *Micrococcus* sp. GO5 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง พบว่าสามารถทำให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินสูงขึ้นกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS ทั่วไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว) ที่สนับสนุนทุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Gilliland, S. E. and M. C. Speck. 1997. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogens in association culture. **J. Food Prot**. 40: 820-823

Kim, M. H., Y. J. Kong, H. Baek and H. H. Hyun. 2006. Optimization of culture conditions and medium composition for the production of micrococcin GO5 by *Micrococcus* GO5. **J. Biotechnology**. 121: 54-61.

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(2): 137-145.

Ogunbanwo, S. T., A. I. Sanni and A. A. Onilude. 2003. Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* F1 and *Lactobacillus brevis* OG1. **Afr. J. Biotechnol.** 2(8): 219-227.

Oh,S., S. H. Kim, and R. W. Worobo. 2000. Characterization and purification of a bacteriocin produced by a potential probiotic culture, *Lactobacillus acidophilus* 30SC. **J. Dairy Sci.** 83: 2747-2752

Schillinger, U. and F.K. Lücke. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 55: 1901-1906.