Research Article

Received: August 29, 2019; Accepted: January 24, 2020

การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* โดยสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Leuconostoc lactis* BAN1.1

Inhibition of *Listeria monocytogenes* by Bacteriocin-like Substance Produced by *Leuconostoc lactis* BAN1.1

ศรีสุดา กวยาสกุล*

ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร ตำบลท่าโพธิ์ อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

Srisuda Kawayasakul*

Department of Microbiology and Parasitology, Faculty of Medical Science,

Naresuan University, Tha Pho, Meung, Phitsanulok 65000

บทคัดย่อ

Leuconostoc lactis BAN1.1 เป็นแบคทีเรียแลคติก (LAB) ที่แยกได้จากเปลือกกล้วย สามารถสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในอาหารที่สำคัญ คือ *Listeria monocytogenes* สารออกฤทธิ์ดังกล่าวพบว่าเป็นสารโปรตีน เนื่องจากมีความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้มุ่งเน้นที่จะศึกษาสภาวะที่จำเป็นต่อการสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินนี้ โดยผลการศึกษาพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยน้ำตาลฟรุคโตส 2 % yeast extract 2 % KH_2PO_4 ความเข้มข้น 0.2 % และ Tween 80 ความเข้มข้น 0.2 % จะส่งเสริมให้เกิดกิจกรรมการยับยั้งสูงสุด รวมทั้งอุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม คือ 25-30 องศาเซลเซียส และ 6.5 ตามลำดับ นอกจากนี้ขั้นตอนการทำ dialysis สารออกฤทธิ์ทางชีวภาพพบว่าทำให้สารมีเข้มข้นเพิ่มขึ้น และเมื่อนำสารที่ผ่านการ dialysis มาทดสอบพบว่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า สารนี้ยังทนต่อพีเอชในช่วงกว้างและทนอุณหภูมิสูงได้ ส่วนขั้นตอนการจุ่มผักกาดหอมสดลงในสารคล้ายแบคเทอริโอซินพบว่าสามารถลดปริมาณ *L. monocytogenes* ลงได้ 3.49±0.07 log CFU/g โดยที่กล่าวมาทั้งหมดนั้นเห็นได้ว่าสารคล้ายแบคเทอริโอซินนี้มีศักยภาพในการนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหารทางชีวภาพกับผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้สดได้

คำสำคัญ : *Leuconostoc lactis; Listeria monocytogenes*; สารคล้ายแบคเทอริโอซิน; แบคทีเรียแลคติก

Abstract

Leuconostoc lactis BAN1. 1,a lactic acid bacterium isolated from banana peel, produces bacteriocin- like substance which could inhibit the important foodborne pathogen*; Listeria*

***ผู้รับผิดชอบบทความ :** srisudak@nu.ac.th

monocytogenes. The bioactive compound was sensitive to proteolytic enzyme, confirming its proteinaceous nature. This research aim was to optimize the condition that was suitable for bacteriocin-like substance production. The results found that the growth medium consisted of 2% fructose, 2 % yeast extract, 0.2 % KH_2PO_4 and 0.2 % Tween 80, enhanced maximum antibacterial activity of bacteriocin-like substance, with the optimum temperature and pH as 25-30 ^{o}C and 6.5, respectively. In addition, it was found that bioactive compound was concentrated and showed strong inhibitory increasing almost two times in the dialysis step. This compound was stable over wide ranges of pH and high temperature. The effect of soaking with bacteriocin-like substance solution on survival of *L. monocytogenes* was also evaluated in fresh lettuce. The results showed that this substance decreased *L. monocytogenes* counts by 3.49±0.07 log CFU/g. These results revealed that the high potential of bacteriocin-like substance could be used as biopreservative in fresh fruit and vegetable products.

Keywords: *Leuconostoc lactis; Listeria monocytogenes*; bacteriocin like substance; lactic acid bacteria

1. บทนำ

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ สามารถเจริญเพิ่มจำนวนที่อุณหภูมิต่ำ [1] จัดเป็นแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษที่ปัญหาสำคัญทางสาธารณสุขโดยก่อให้เกิดโรค Listeriosis ในหญิงที่กำลังตั้งครรภ์ เด็กเล็ก และผู้สูงอายุ แบคทีเรียนี้มักพบว่าปนเปื้อนมากับอาหารสด เนื้อสัตว์ ผักสด และผักพร้อมบริโภค โดยในปี ค.ศ. 2011 พบการปนเปื้อนของเชื้อในแคนตาลูป ทำให้มีคนเสียชีวิตราว 300 คน และในปี ค.ศ. 2015 และ 2016 พบการปนเปื้อนของเชื้อในผักแช่แข็ง ผลไม้เปลือกแข็ง และแอปเปิล [2] และเมื่อเร็ว ๆ นี้พบว่าโรคนี้เป็นปัญหาสำคัญของประเทศแอฟริกาใต้ ซึ่งการวิเคราะห์ลำดับเบสบนจีโนมทั้งหมดของผู้ป่วยพบว่า 91 % เกิดจาก *L. monocytogenes* Sequence Type 6 (ST6) ที่ติดมากับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์แปรรูปพร้อมบริโภค [3]

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซมและมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย แต่ฤทธิ์ในการยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน [4] ที่ผ่านมา 10 กว่าปี มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้นและพบว่ามีแบคเทอริโอซินหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งกว้างขึ้น โดยเฉพาะที่สร้างขึ้นจากกลุ่มแบคทีเรียแลคติก ปัจจุบันได้รับความสนใจมากขึ้น โดยเฉพาะแบคเทอริโอซินที่ออกฤทธิ์ได้ที่อุณหภูมิสูงและที่พีเอชช่วงกว้าง แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น และไม่มีรสชาติ สมบัติดังกล่าวทำให้มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารตามธรรมชาติ ปัจจุบันการนำแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกมาประยุกต์ใช้กับอาหารและได้รับการยอบรับจากองค์การอาหารและยา (FDA) ว่าสารดังกล่าวมีความปลอดภัยสามารถใส่ในอาหารของมนุษย์ (GRAS) [4,5] ขณะที่การประยุกต์ใช้ในทางการแพทย์นั้น แบคเทอริโอซินถูกเสนอให้เป็นทางเลือกหนึ่ง แบคเทอริโอซินแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ class I เป็นแบคเทอริโอซินที่มีชื่อเรียกว่าแลนติไบโอติก (lantibiotic) ได้แก่ nisin และ lactocin มวลโมเลกุลมีขนาดเล็กกว่า 5 กิโลดาลตัน และทนความร้อนได้ class II

(non- lanthionine- containing bacteriocin) มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน ทนความร้อน ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเหมือน class I ทำให้แบ่งเป็นกลุ่มย่อย ได้แก่ class IIa กลุ่มเพดดิโอซิน (pediocin-like bacteriocin) ได้แก่ pediocin PA1 และ leucocin A ส่วนใหญ่เป็นแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ผักหมัก และในทางเดินอาหารของคน ส่วน class IIb ได้แก่ แบคเทอริโอซินที่มี 2 เปปไทด์ประกอบกัน เช่น plantaricin A และ enterocinX [5,6] และ class III เป็นแบคเทอริโอซินที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่กว่า 30 กิโลดาลตัน ไม่ทนความร้อน ตัวอย่างของกลุ่มนี้ เช่น helveticin J และ M, millericin B และ enterolysin A [7] แบคเทอริโอซินที่มีความซับซ้อน ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ plantaricin และ lactocin 27 ปัจจุบันแบคเทอริโอซินที่สามารถนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารอย่างถูกกฎหมาย คือ นิซิน (nisin) ส่วนใหญ่ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารประเภทนมพาสเจอร์ไรซ์และผลิตภัณฑ์เนยแข็งโดยกำหนดให้ใช้ที่ความเข้มข้น 3-12.5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม และใช้ได้กับผลิตภัณฑ์ผักพร้อมบริโภคได้โดยจุ่มผักลงในสารละลายที่มีนิซิน ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดปริมาณ *L. monocytogenes* ได้มากกว่า 2 log CFU/g โดยไม่ส่งผลต่อสมบัติทางประสาทสัมผัส [4,8] แบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่จัดเป็นสารเมตาโบไลท์ปฐมภูมิที่สร้างขึ้นในช่วงกลางของ log phase ของการเจริญ ดังนั้นปริมาณของแบคเทอริโอซินจึงมักขึ้นกับปริมาณชีวมวลที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตาม การเพิ่มประสิทธิภาพและปริมาณผลผลิตของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติกขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อและสภาพแวดล้อม ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจน พีเอช อุณหภูมิ สารลดแรงตึงผิว เป็นต้น การเพิ่มปริมาณผลผลิตของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตในเชิงการค้า มักนิยมเลี้ยงเชื้อในอาหาร ได้แก่ de Man, Rogosa and Sharpe (MRS), brain heart infusion (BHI), M17 และ trypticase soy broth yeast extract (TSBYE) อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะไปส่งเสริมการเจริญและเพิ่มการสร้างแบคเทอริโอซิน ดังมีรายงานการวิจัยชี้ให้เห็นว่าถ้าบ่มเชื้อที่อุณหภูมิและสภาพความเป็นกรดด่างที่ต่ำกว่าระดับที่เชื้อต้องการจะทำให้สร้างแบคเทอริโอซินได้มากขึ้น เชื้อจะสร้างแบคเทอริโอซินที่พีเอชต่ำกว่า 5 [9,10] นอกจากนี้เปปโตนจะส่งผลให้เชื้อเจริญได้เร็ว เข้าสู่สภาวะ stationary phase ที่ 20 ชั่วโมง ทำให้สร้างแบคเทอริโอซินได้เพิ่มขึ้นและมีประสิทธิภาพ [11] ซึ่งที่กล่าวมาเห็นได้ว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารที่มีแนวโน้มที่จะนำมาใช้ร่วมกับสารถนอมอาหารหรือใช้แทนสารกันบูดที่เป็นสารเคมีและเป็นอันตรายต่อสุขภาพได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเพิ่มประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลไม้สด คือ *Ln. lactis* BAN1.1 ต่อการยับยั้ง *L. monocytogenes* รวมทั้งการทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยการตกตะกอนและกำจัดเกลือด้วยการ dialysis แล้วทดสอบกับผักกาดหอมสด เพื่อจะได้นำข้อมูลไปพัฒนาใช้เป็นสารถนอมอาหารทางชีวภาพที่ใช้กับผลไม้ ผักสด และผักพร้อมบริโภคได้อย่างเหมาะสมและปลอดภัย

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 *Leuconostoc lactis* BAN1.1

Ln. lactis BAN1.1 เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากโครงการวิจัย เรื่อง ผลของสารถนอมอาหารทางชีวภาพของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากผลไม้สด ผักสด และผักพร้อมบริโภคต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ

แบคทีเรียก่อโรค ซึ่งเก็บรักษาไว้ในอาหารเหลว MRS ผสมกลีเซอรอล 20 % ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส

2.2 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ (indicator microorganism)

Listeria monocytogenes DMST 1327 เพาะเลี้ยงในอาหาร TSB

2.3 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

2.3.1 แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Ln. lactis* BAN 1.1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมแหล่งคาร์บอนต่าง ๆ ความเข้มข้น 2 % ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส มอลโตส แลคโตส แมนนิทอล และไซโลส โดยมีอาหาร MRS ที่ใช้ในเชิงการค้าเป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้มาปรับพีเอชให้เป็น 6.5 และป้องกันผลการยับยั้งที่จะเกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการเติมเอนไซม์คะตะเลส ความเข้มข้นสุดท้าย 200 ไมโครลิตรต่อมิลลิลิตร นำไปกรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูพรุนขนาด 0.45 ไมโครเมตร จะได้ cell free supernatant (CFS) จากนั้นหยอด CFS ลงในหลุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ที่เจาะไว้แล้วในจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร TSA ที่ได้เตรียมเพาะเชื้อแบคทีเรียทดสอบอยู่ก่อนแล้ว หลุมละ 100 ไมโครลิตร นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการวัดการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) รอบ ๆ หลุม วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (mm) และนำมาหาค่ากิจกรรมการยับยั้งในรูปของ arbitary units per milliliter (AU/mL) โดยการใช้สูตรคำนวณดังนี้ [12-14] AU/mL = [diameter of the inhibition zone (mm) × 1,000] ÷ volume added in the well (μL)

2.3.2 แหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Ln. lactis* BAN 1.1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ tryptone 20 กรัมต่อลิตร beef extract 20 กรัมต่อลิตร yeast extract 20 กรัมต่อลิตร tryptone : beef extract อัตราส่วน 12.5 : 7.5 กรัมต่อลิตร tryptone : yeast extract อัตราส่วน 12.5 : 7.5 กรัมต่อลิตร beef extract : yeast extract อัตราส่วน 10 : 10 กรัมต่อลิตร tryptone : beef extract : yeast extract อัตราส่วน 10 : 5 : 5 กรัมต่อลิตร peptone 10 กรัมต่อลิตร โดยมีอาหาร MRS ที่ใช้ในเชิงการค้าเป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1

2.3.3 ชนิดของบัฟเฟอร์หรือแหล่งฟอสเฟตในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Ln. lactis* BAN 1.1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 ที่ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1

2.3.4 ชนิดของสารลดแรงตึงผิว

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Ln. lactis* BAN 1.1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมชนิดของสารลดแรงตึงผิวที่แตกต่างกัน ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตร คือ Triton X-100, Tween 20 และ ชุดควบคุม คือ Tween 80 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1

2.3.5 พีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Ln. lactis* BAN 1.1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีการการปรับพีเอชเริ่มต้นก่อนการเพาะเลี้ยงเชื้อให้ต่างกัน คือ 4.5, 5.0, 5.5 และ 6.5

และพีเอช 6.5 ให้เป็นชุดควบคุม บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1

2.3.6 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Ln. lactis* BAN 1.1 ในอาหารเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิต่างกัน คือ 15, 20, 25, 37 และ 45 องศาเซลเซียส โดยชุดควบคุมบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดำเนินการทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1

2.4 การตกตะกอนสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เพาะเลี้ยงเชื้อ *Ln. lactis* BAN 1.1 ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับองค์ประกอบของอาหารปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสม และบ่มที่อุณหภูมิที่ดีที่สุด ที่ได้จากการศึกษาข้อ 2.3 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำ CFS มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยเติมทีละน้อย อย่างช้า ๆ ขณะกวนด้วยเครื่องกวนสาร ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โปรตีนจะตกตะกอน จากนั้นนำมาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แยกส่วนตะกอนที่ได้ละลายตะกอนด้วย potassium phosphate buffer (pH 6.6) แล้วนำไปกำจัดเกลือแอมโมเนียมโดยการ dialysis ด้วยถุง dialysis ที่มี molecular weight cut off 3,500 ดาลตัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสารที่แยกได้มาทดสอบประสิทธิภาพ โดยหยอดหลุมละ 50 ไมโครลิตร แล้วทำเช่นเดียวกับข้อ 2.3.1

2.5 การศึกษาสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากข้อ 2.4

2.5.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงทนของสาร

นำสารที่แยกได้จากข้อ 2.4 ไปแช่ในอ่างน้ำร้อนที่อุณหภูมิ 60 และ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 และ 20 นาที จากนั้นนำมาทดสอบประสิทธิภาพโดยหยอดลงในหลุมที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ที่เจาะไว้แล้วในจานเพาะเชื้อที่บรรจุอาหาร TSA ที่ได้เตรียมเพาะแบคทีเรียทดสอบอยู่ก่อนแล้ว หลุมละ 50 ไมโครลิตร นำจานเพาะเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการวัดการเกิดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) รอบ ๆ หลุม วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง (mm) และนำมาหาค่ากิจกรรมการยับยั้งในรูปของ arbitary units per milliliter (AU/mL)

2.5.2 ผลของพีเอชต่อความคงทนของสาร

สารที่แยกได้จากข้อ 2.4 ไปปรับพีเอชเป็น 2, 5, 7, 9 และ 12 ด้วย HCl หรือ NaOH จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณภูมิห้อง เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1

2.5.3 ทดสอบความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme)

นำแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากข้อ 2.4 ที่ปรับสภาพพีเอชให้เป็นกลางมาเติมเอนไซม์ proteinase K , alpha chymotrypsin และ trypsin โดยให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารทั้งที่เติมเอนไซม์และไม่เติมเป็นชุดควบคุม มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จึงนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ทดสอบเช่นเดียวกับข้อ 2.5.1

2.6 การประเมินประสิทธิภาพของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากข้อ 2.4 ต่อการลดปริมาณเชื้อทดสอบ *L. monocytogenes* บนผักกาดหอมสด

นำผักกาดหอมมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วตัดใบผักกาดหอมให้มีขนาด 2×2 ตารางเซ็นติเมตร นำไปแช่ในตู้เย็น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำมาสร้างการปนเปื้อนด้วยเชื้อทดสอบ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารเหลว TSB ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นจุ่มผักกาดหอมลงในสารแขวนลอยเชื้อ เป็นเวลา 30 นาที วางในถุงพลาสติกปลอดเชื้อที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อให้เชื้อทดสอบติดอยู่บนผิวผัก ต่อมาจุ่มผักกาดหอมลงในสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากข้อ 2.4 เป็นเวลา 5 นาที และ 30 นาที โดยชุดควบคุมให้จุ่มลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ จากนั้นผึ่งผักกาดหอมให้สะเด็ดน้ำบนภาชนะปลอดเชื้อ เก็บตัวอย่างผักดังกล่าวลงในถุงพลาสติกชนิดระบายอากาศแบบปลอดเชื้อที่อุณหภูมิตู้เย็น เป็นเวลา 7 วัน แล้วสุ่มเก็บตัวอย่างผักในวันที่ 0, 3, 5 และ 7 วัน นำมาวิเคราะห์ปริมาณเชื้อ

2.7 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (analysis of variance) ตามวิธีการ CRD แบบจำนวนซ้ำเท่ากัน และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 %

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 สภาวะที่เหมาะสมบางประการต่อการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ

สารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกนั้นมีสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหาร เพราะว่าเป็นสารที่ผลิตได้ง่าย ไม่เป็นพิษต่อมนุษย์ มีความคงทนต่อพีเอชเป็นกรด นอกจากนี้แบคเทอริโอซินหลาย ๆ ชนิด ยังคงมีประสิทธิภาพเมื่อนำมาใช้กับอาหารหลายรูปแบบ เช่น อาหารที่ต้องผ่านอุณหภูมิสูง อาหารที่เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำ อาหารแช่แข็งหรืออาหารแห้งได้นานหลายเดือน โดยทั่วไปแบคทีเรียแลคติกจะสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด ได้แก่ MRS, TGE, BHI, TSB, TSBYE เป็นต้น และปัจจัยแวดล้อมที่ส่งผลต่อการสร้างแบคเทอริโอซิน ได้แก่ สภาพการบ่มในที่มีหรือไม่มีออกซิเจน พีเอช อุณหภูมิ และระยะการเจริญ [15,16] นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้ออาจไม่ใช่ปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอซิน ดังนั้นการศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างแบคเทอริโอซินจึงเป็นสิ่งจำเป็น [15,17,18]

3.1.1 ผลของแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนต่างกัน พบว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลฟรุคโตสและกลูโคส เชื้อสามารถสร้างสารออกมายับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหาร MRS สูตรทางการค้า) โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 163.3±0.75 และ 153.7±0.57 AU/mL ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 160.0±0.01 AU/mL (รูปที่ 1) ทั้งนี้น้ำตาลทั้ง 2 ชนิด เป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว จุลินทรีย์นำมาใช้เพื่อการเจริญได้ง่าย และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลซูโครสและมอลโตสพบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 151.3±0.30 และ 149±0.3 AU/mL ตามลำดับ โดยแตกต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ขณะที่เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีน้ำตาลแลคโตส แมนนิทอล และไซโลส ซึ่งเป็นน้ำตาลที่จุลินทรีย์บางชนิดใช้ได้ดี ขณะที่ *Ln. lactis* BAN1.1 ไม่สามารถเจริญอย่างสมบูรณ์ จึงส่งผลให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อต่ำลง ทั้งนี้แสดงให้เห็นว่าชนิดและ

ปริมาณของแหล่งคาร์บอนและปริมาณของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีผลต่อปริมาณของแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้น และถ้าชีวมวลของเชื้อเพิ่มขึ้นก็อาจส่งให้เชื้อผลิตแบคเทอริโอซินได้มากขึ้นด้วย [10,15] ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Drosinos และคณะ [19] ที่ศึกษาจลศาสตร์การเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของ *Ln. mesenteriodes* E131 พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสภายใต้สภาพการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสม เชื้อสามารถใช้น้ำตาลฟรุคโตสเป็นแหล่งพลังงานดีกว่าการใช้กลูโคส ซึ่งเป็นผลให้ผลิตแบคเทอริโอซินออกมาได้มากกว่าด้วย และกรณีที่เลี้ยงในอาหารที่มีกลูโคส เชื้อสร้างกรดแลคติกออกมาในปริมาณที่สูงกว่าเมื่อเลี้ยงในน้ำตาลฟรุคโตส โดยกรดแลคติกนั้นมีผลเสียโดยตรงต่อการเจริญของเซลล์

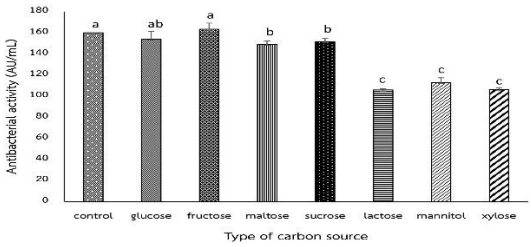

Figure 1 Effect of carbon sources on anti-bacterial activity against *L. monocytogenes*. Values are means of three replications and error bars indicate the mean standard deviation. Different small letters indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

3.1.2 ผลของแหล่งอินทรีย์ไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีแหล่งไนโตรเจนต่างกัน 8 แบบ จะพบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ต่างกันอย่างมีนัยยะสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (อาหาร MRS สูตรทางการค้า) โดยพบว่า yeast extract 20 กรัม/ลิตร จะให้ผลดีที่สุด รองลงมาคือ อาหารที่มี tryptone :yeast extract และอาหารที่มี tryptone : beef extract : yeast extract ในอัตราส่วน 10 : 5 : 5 กรัมต่อลิตร จะส่งเสริมให้ *Ln. lactis* BAN1.1 สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ดี โดยวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อได้ 147±0.46, 145.7±0.15 และ 142.3±0.25 AU/mL ตามลำดับ (รูปที่ 2) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ การเลี้ยงในอาหาร MRS สูตรทางการค้าที่ประกอบด้วย peptone, beef extract และ yeast extract อัตราส่วน 10 : 10 : 5 กรัม/ลิตร มีค่าการยับยั้งเชื้ออยู่ที่ 160±0.01 AU/mL ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Jana และคณะ [20] ที่ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่า yeast extract 1.5 % ส่งผลให้เชื้อผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีขึ้น (3,200 AU/mL) และ beef extract 1.5 % ผลิตแบคเทอริโอซินได้ต่ำสุด (600 AU/mL) ส่วนรายงานการวิจัยของ Todorov และ Dicks [21] พบว่า *L. pentosus* ST151BR เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี tryptone หรือ tryptone : meat extract จะกระตุ้นการสร้างแบคเทอริโอซิน ขณะที่กิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะต่ำลงเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี meat extract, yeast extract, tryptone : yeast extract, beef extract : yeast extract หรือ tryptone : beef extract : yeast extract และต่างจากรายงานการวิจัยของ Hartayanie และคณะ [22] ที่พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ bacteriocin C19 จะเกิดได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี tryptone เป็น

องค์ประกอบมากกว่าที่มี yeast extract ขณะที่ bacteriocin C29 กิจกรรมการยับยั้งจะเกิดได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract เป็นองค์ประกอบ และ bacteriocin D44 จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ดี เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มี yeast extract 2 % โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้ง 3,179 AU/mL ซึ่งเห็นได้ว่า tryptone และ yeast extract จะส่งเสริมการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซิน โดยทั่วไปความต้องการกรดอะมิโนของเชื้อ LAB จะต่างกันไป ขึ้นกับสายพันธุ์ของเชื้อ กรดอะมิโนจะได้มาจากแหล่งของไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ papain- digested skim milk, yeast extract, tryptone (trypsine- treated casein), soy peptones, peptones of animal origin, beef extract, corn steep liquor, liver extracts และ whey protein hydrolysates เป็นต้น อย่างไรก็ตาม peptone, beef extract และ yeast extract เป็นส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ LAB และมีผลดีต่อการเจริญของเชื้อ มีรายงานการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า การเติม beef extract ร่วมกับ casitone แทน yeast extract จะทำให้เชื้อมีการเจริญลดลง และยังพบอีกว่าการเติม beef extract หรือ malt extract ลงไปแทนที่ yeast extract ในปริมาณครึ่งส่วน จะส่งผลให้การผลิตแบคเทอริโอซินของ *L. sakei* CCUG 42687 ลดลง นอกจากนี้ yeast extract, beef extract และ peptone ยังเป็นแหล่งของวิตามินและเกลือแร่อีกด้วย [19-21] และรายงานของ Barbosa และคณะ [23] กล่าวว่า *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 ผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหาร M17 ที่มี yeast extract เป็นองค์ประกอบ แต่ขณะที่ yeast extract จะไปลดอัตราการเจริญของเชื้อ เนื่องจาก yeast extract จะสัมพันธ์กับการเพิ่มปริมาณแร่ธาตุ วิตามินและกรดอะมิโน เช่น serine, cystein และ threonine โดยกรดอะมิโนเหล่านี้จะทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์แบคเทอริโอซิน แต่ในทางตรงกันข้าม การเติม yeast extract และ peptone ในปริมาณที่มากเกินไป (มากกว่า 12 กรัมต่อลิตร) จะส่งผลให้เชื้อเจริญได้น้อยลง และการเพิ่มปริมาณ tryptone จาก 0.25 เป็น 5 กรัมต่อลิตร ก็ไม่ส่งผลให้เชื้อมีการเจริญเพิ่มขึ้น ดังนั้นที่สำคัญ คือ ปริมาณของ yeast extract, beef extract และ peptone ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องมีปริมาณที่เหมาะสมและสมดุลกัน จึงจะทำให้เชื้อ LAB เจริญได้ดีและมีการผลิตแบคเทอริโอซินได้มากขึ้น [20-22,24]

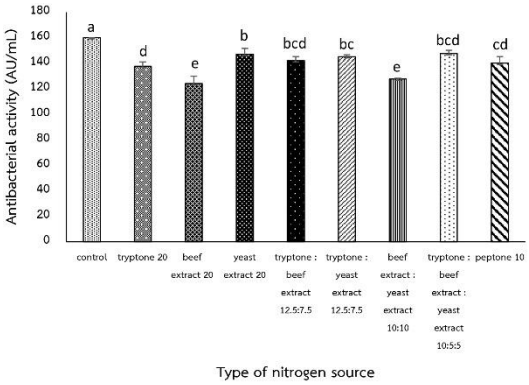

Figure 2 Effect of nitrogen sources on anti-bacterial activity against *L. Monocytogenes*. Values are means of three replications and error bars indicate the mean standard deviation. Different small letters indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

3.1.3 ผลของการเติม KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารที่มี KH_2PO_4 เป็นองค์ประกอบจะให้ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดีกว่าใน

อาหารที่มี K_2HPO_4 (ชุดควบคุม) โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 157.6±7.5 และ 135.0±2.0 AU/mL ตามลำดับและแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ ผลการทดลองจะพบว่า KH_2PO_4 จะสนับสนุนการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินได้มากกว่าที่มีการเติม K_2HPO_4 โดย KH_2PO_4 เป็นเกลือฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ดี นอกจากจะทำหน้าที่เป็นบัฟเฟอร์แล้วยังเป็นแหล่งของฟอตเฟสให้กับเชื้อด้วย เมื่อเติมลงไปในอาหารจะทำให้อาหารมีพีเอชน้อยกว่า 6.8 ซึ่งจะเหมาะกับการเจริญและการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อ ขณะที่ K_2HPO_4 ซึ่งเป็นเกลือฟอสเฟตที่ละลายน้ำได้ดีเช่นกัน เมื่อเติมลงไปในอาหารจะทำให้อาหารมีพีเอชค่อนข้างเป็นด่าง ไม่ค่อยเหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ LAB อย่างไรก็ตาม ในอาหาร MRS หรือ M17 ที่เป็นสูตรในเชิงการค้า จะมีการเติม disodium phosphate (Na_2HPO_4) และ ammonium citrate ($NH_4C_6H_5O_7$) ลงไป เพื่อรักษาระดับพีเอชระหว่างการเพาะเลี้ยง เนื่องจากเชื้อ LAB ที่กำลังเจริญจะมีการสร้างกรดโดยเฉพาะกรดแลคติกเพิ่มมากขึ้น ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อมีความเป็นกรดสูงขึ้น จึงส่งผลให้เชื้อเจริญได้ช้าลงหรือไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ [25]

3.1.4 ผลของชนิดของสารลดแรงตึงผิว

เมื่อเปรียบเทียบชนิดของสารลดแรงตึงผิว พบว่าในอาหารที่มีการเติม Tween 20 ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ไม่แตกต่างจากอาหารที่มีการเติม Tween 80 (ชุดควบคุม) ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ใช้ในอาหาร MRS ที่ใช้ในเชิงการค้า โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 148.3±5.0 และ 155.0±5.0 AU/mL ตามลำดับ ขณะที่ Triton X-100 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 135.0±5.0 AU/mL โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Jana และคณะ [20] ที่ได้ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อและปัจจัยอื่นที่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน พบว่า Tween 80 เข้มข้น 0.2 % จะส่งผลให้เชื้อผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีขึ้น (3,200 AU/mL) และ Tween 40 เข้มข้น 0.05 % ผลิตแบคเทอริโอซินได้ต่ำสุด (600 AU/mL) โดย Tween 80 เป็นสารประเภทที่ไม่แตกตัวเป็นอิออนเมื่ออยู่ในน้ำ [26] ประกอบด้วยกรดโอเลอิก (oleic acid) ซึ่งเป็นปัจจัยการเจริญที่สำคัญของเชื้อ LAB หลาย ๆ สายพันธุ์ การเติม Tween 80 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้กรดโอเลอิกผ่านเข้าสู่เมมเบรนและเปลี่ยนรูปเป็น cyclopropane fatty acid ซึ่งกรดไขมันนี้จะส่งผลให้เชื้อทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม เช่น ที่พีเอชเป็นกรดสูง ๆ หรือที่มีออกซิเจนมาก และเมื่อเชื้อเจริญได้ดีก็จะสามารถสร้างแบคเทอริโอซินมากขึ้นด้วย ดังรายงานการศึกษาพบว่า Tween 80 จะส่งเสริมการผลิต enterocin 1146 และ lactocin D โดยทั่วไปการลดปริมาณ Tween 80 ในอาหารเลี้ยงเชื้อลงต่ำกว่า 1 มิลลิลิตรต่อลิตร จะส่งผลให้การเจริญของ LAB ลดลงด้วยเช่นกัน [19]

3.1.5 ผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

เมื่อเปรียบเทียบผลของพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า *Ln. lactis* BAN1.1 สร้างสารออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ได้ดีที่พีเอชเริ่มต้น 4.5, 5 และ 5.5 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ เลี้ยงที่พีเอชเริ่มต้น 6.5 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 143±11.5 AU/mL ส่วนที่พีเอชเริ่มต้น 5 และ 5.5 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 130±0.1 และ 127±5.8 AU/mL ตามลำดับ (รูปที่ 3) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อนั้นอาจไม่สัมพันธ์กับพีเอชที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน อาหารเลี้ยงเชื้อที่ปรับสภาพพีเอชเป็นกลางหรือค่อนมา

ทางกรดเล็กน้อยจะเหมาะสมต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซิน โดยมีพีเอชประมาณ 5.0-6.5 [11,15,16]. ดังรายงานการวิจัยของ Jana และคณะ [20] พบว่าที่พีเอชเริ่มต้น 6.8 และ 5.5 เชื้อ LAB ผลิตแบคเทอริโอซินได้ดี โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 3,200 และ 2,600 AU/mL ตามลำดับ และที่พีเอช 10.5 ก็ยังคงพบว่ามีการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งได้ 2,000 AU/mL และที่พีเอช 12.5 ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจะมีสภาพเป็นด่าง ส่งผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินได้ลดลงด้วย [27,28]

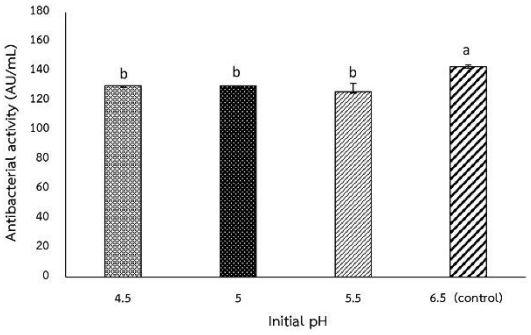

Figure 3 Effect of initial pH of growth medium on antibacterial activity against *L. monocytogenes*. Values are means of three replications and error bars indicate the mean standard deviation. Different small letters indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

3.1.6 ผลของอุณหภูมิที่เหมาะสมของการบ่มเชื้อ

เมื่อพิจารณาผลของอุณภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ พบว่าอุณหภูมิ 20-37 องศาเซลเซียส ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบชุดควบคุม (รูปที่ 4) โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 150±10.0 AU/mL ชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 143.3±26.4 AU/mL ขณะที่บ่มที่อุณหภูมิ 20, 30 และ 37 องศาเซลเซียส เชื้อสามารถสร้างสารออกฤทธิ์ที่มีประสิทธิภาพใกล้เคียงกับที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส แสดงให้เห็นว่าเชื้อสร้างสารดังกล่าวได้ดีที่อุณหภูมิช่วงกว้าง คือ 20-37 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสม คือ อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส เชื้อเจริญได้น้อย ส่วนที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อไม่สามารถเจริญ ทำให้ไม่สามารถวัดกิจกรรมการยับยั้ง (รูปที่ 4) มีรายงานการศึกษาพบว่า *Leuconostoc* sp. J2 สามารถสร้างแบคเทอริโอซินสูงสุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และแบคเทอริโอซินจะลดลงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส [29] และรายงานของ Thakul และ Roy [30] ที่ศึกษาประสิทธิภาพของ leuconocin ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Ln. lactis* ที่แยกได้จากน้ำนมวัวดิบ พบว่าเชื้อดังกล่าวจะสร้างสารแบคเทอริโอซินชนิดนี้ได้ปริมาณสูงสุดที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส ขณะที่อุณหภูมิที่ส่งเสริมการเจริญ คือ 25 และ 28 องศาเซลเซียส

ขณะที่ *Ln. carnosum* LA44 ผลิต carnosin ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 และ *Ln. mesenteroides* E131 เจริญได้ดีและผลิตแบคเทอริโอซินได้มากที่อุณหภูมิ 25 องศาสเซลเซียส [19] อย่างไรก็ตาม พบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะส่งผลต่อการเจริญและประสิทธิภาพการสร้างแบคเทอริโอซิน [16,28]

ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน กล่าวคือ แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์เพื่อส่งเสริมการเจริญ แต่ขณะที่การสร้างแบคเทอริโอซินจะลดลงถ้าสภาพแวดล้อมสมบูรณ์เกินไป ซึ่งเป็นกลไกตาม

ธรรมชาติของจุลินทรีย์ที่ต้องเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่น ๆ จึงส่งผลให้อัตราการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินไม่จำเป็นต้องแปรผันตาม ดังเช่นรายงานของ Barbosa และคณะ [24] กล่าวว่าปริมาณแบคเทอริโอซินจะสูงก็ต่อเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ พีเอช และปริมาณสารอาหาร ที่ต่ำกว่าที่เชื้อต้องการเพื่อการเจริญ และที่สำคัญชนิดและความเข้มข้นของแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อก็ส่งผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินด้วยเช่นกัน [21]

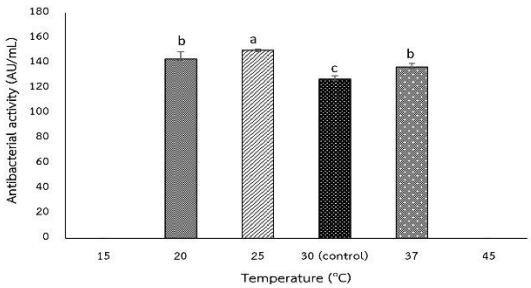

Figure 4 Effect of temperature for incubation on antibacterial activity against *L. monocytogenes*. Values are means of three replications and error bars indicate the mean standard deviation. Different small letters indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

3.2 ประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผ่านการตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต

เมื่อเพาะเชื้อ *Ln. lactis* BAN 1.1 ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชเริ่มต้น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำ CFS มาตกตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต และทำให้เข้มข้นขึ้นโดยผ่านการ dialysis และนำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้ง *L. monocytogenes* ผลการทดลองพบว่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบหลังจากตกตะกอนที่ความเข้มข้น 60 % ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด โดยวัดกิจกรรมการยับยั้งได้ 516.6±7.6 AU/mL เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม คือ CFS ที่ไม่ผ่านการตกตะกอน ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้ง 316.0±2.8 AU/mL พบว่ามีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับระดับ $p < 0.05$ (รูปที่ 5) โดยพบกิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับขั้นตอนที่ยังไม่ตกตะกอน ส่วนสารละลายนอกถุง dialysis ไม่พบกิจกรรมการยับยั้งเกิดขึ้น อย่างไรก็ตาม ไม่ได้มีการศึกษาขนาดโมเลกุลของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพนี้ แต่รายงานการศึกษาขนาดโมเลกุลของแบคเทอริโอซินที่สร้างโย *Leuconostoc* sp. ซึ่งส่วนใหญ่มีขนาดเล็กไม่เกิน 10 กิโลดาลตัน และสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ที่พีเอชช่วงกว้างและแบคเทอริโอซินนี้ทนอุณหภูมิได้ดี ซึ่งเป็นคุณลักษณะของ class II bacteriocin เช่น แบคเทอริโอซินที่สร้างโดย *Ln. lactis* SD501 มีขนาดโมเลกุลประมาณ 7 กิโลดาลตัน [24] leuconocin J ที่สร้างโดย *Leuconostoc* sp. J2 มีขนาดโมเลกุลประมาณ 2.5-3.5 กิโลดาลตัน [29] *Ln. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52 ผลิตแบคเทอริโอซิน mesenterosin 52A ที่ขนาดโมเลกุลประมาณ 3.5 กิโลดาลตัน ขณะที่ *Ln. mesenteroides* strain 406 ผลิตแบคเทอริโอซินที่ขนาดโมเลกุล 3.3 กิโลดาลตัน นอกจากนี้ยังพบว่าพีเอชนั้นมีบทบาทที่สำคัญต่อการดูดซับแบคเทอริโอซินไว้ที่ผิวเซลล์ โดยจะดูดซับไว้ได้ที่พีเอช 5.0-6.0 และการตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นั้นเป็นผลให้แบคเทอริโอซินหลุดออกมาจากผิวเซลล์ได้ [20,30-32] และจะถูกปล่อยออกมาอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยอาศัยสมบัติการไม่ชอบน้ำของแบคเทอริโอซิน (hydrophobicity) และ

การเป็นสารที่มีประจุทำให้ถูกปล่อยออกมาจากเซล์ [33]

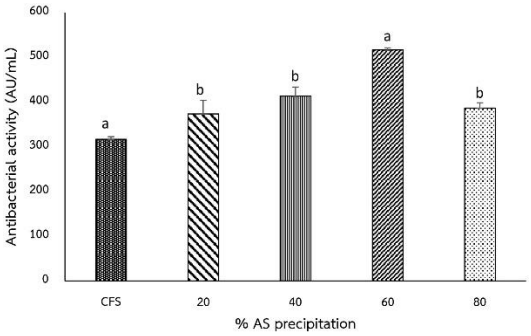

Figure 5 Partial purification of bacteriocin by ammonium sulphate precipitation. Values are means of three replications and error bars indicate the mean standard deviation. Different small letters indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

3.3 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากการทำ dialysis

แบคเทอริโอซินนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารถนอมอาหารกันอย่างกว้างขวาง เนื่องจากมีความปลอดภัยต่อมนุษย์ และไม่ส่งผลต่อคุณภาพด้านประสาทสัมผัสและคุณค่าทางอาหาร จึงจัดเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อทดแทนการใช้สารเคมีกันบูดในอุตสาหกรรมอาหาร อย่างไรก็ตาม การสังเคราะห์แบคเทอริโอซินโดยจุลินทรีย์หลากหลายสายพันธุ์ขึ้นกับ องค์ประกอบของอาหารและสภาวะแวดล้อมของการเพาะเลี้ยง เช่น พีเอชและอุณหภูมิ ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลต่อต้นทุนการผลิตแบคเทอริโอซินในระดับอุตสาหกรรม [34] นอกจากนี้การนำมาใช้ในเชิงการค้าเพื่อให้เกิดประสิทธิภาพสูงสุด แบคเทอริโอซินยังต้องมีสมบัติที่เหมาะสมต่อการนำมาใช้เป็นสารถนอมอาหารอีกด้วย ได้แก่ ความคงตัวที่อุณหภูมิต่ำหรืออุณหภูมิสูง เพื่อจะได้นำไปปรับใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องผ่านความร้อนหรือแช่เย็น การคงตัวที่พีเอชช่วงกว้างจะทำให้นำไปประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหารหมักหรือใช้เป็นหัวเชื้อร่วมในผลิตภัณฑ์นมหมัก เป็นต้น [35,37]

3.3.1 ผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสาร

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากการ dialysis พบว่าสามารถทนอุณหภูมิในช่วงกว้าง โดยที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 20 นาที ยังคงมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 353.3±10.6 AU/mL ส่วนชุดควบคุมมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 516.6±7.6 AU/mL (รูปที่ 6) ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบจะลดลงเมื่อสัมผัสกับอุณหภูมิสูงขึ้นและระยะเวลานานขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าสารดังกล่าวสามารถทนอุณหภูมิสูง 100 °C เป็นเวลา 10 นาที (ไม่ได้แสดงข้อมูล) แต่สารออกฤทธิ์จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบเมื่อสัมผัสความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที มีรายงานการศึกษาว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อ LAB ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหาร สามารถทนอุณหภูมิที่ระดับต่างกัน การที่ทนอุณหภูมิสูงได้นั้นจะให้ผลดีต่อการนำไปประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารที่ต้องผ่านกระบวนการให้ความร้อนระดับพาสเจอร์ไรซ์ [36]

3.3.2 ผลของพีเอชต่อความคงตัวของสาร

เมื่อเปรียบเทียบผลความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากการ dialysis ที่พีเอชต่าง ๆ พบว่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ให้ผลดี ที่พีเอช 5-7 โดยที่พีเอช 7 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่พีเอช 6.5 โดยมีค่า

กิจกรรมการยับยั้งเชื้อ 476.6±12.5 และ 516.6±7.6 AU/mL ตามลำดับ (รูปที่ 7) จากนั้นกิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบจะลดลงที่พีเอช 2, 9 และ 12 รายงานการศึกษาพบว่าแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยเชื้อ LAB หลาย ๆ สายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่จะสามารถทนต่อสภาพพีเอชที่เป็นกรดและกลาง ซึ่งนำมาประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารหมักได้ดี [36,37,42]

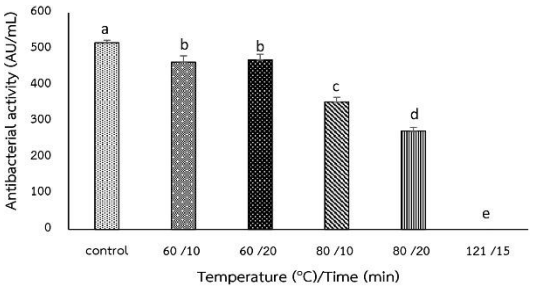

Figure 6 Effect of temperature treatment on stability of bacteriocin. control means unheated bacteriocin. Values are means of three replications and error bars indicate the mean standard deviation. Different small letters indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

3.3.3 ผลของเอนไซม์ต่อความคงตัวของสาร

การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่แยกได้จากการ dialysis โดยเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ proteinase K , alpha chymotrypsin และ trypsin จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *L. monocytogenes* ด้วยวิธี well diffusion assay ผลการทดลองพบว่าสารดังกล่าวมีความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนทั้ง 3 ชนิด (ตารางที่ 1) โดยทั่วไปสารแบคเทอริโอซินเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มีโครงสร้างเป็นสารประกอบโปรตีนที่สร้างขึ้นโดยเชื้อกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก เช่น lactic acid bacteria หรือ propionibacteria ประสิทธิภาพการออกฤทธิ์แคบ (narrow spectrum) ส่วนใหญ่ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียกลุ่มใกล้เคียงกัน เช่น lactobacilli ดังนั้นการตรวจคัดกรองกิจกรรมทางชีววิทยาของแบคเทอริโอซินเบื้องต้น จึงมักใช้เอนไซม์โปรติเอสมาทดสอบเพื่อยืนยันสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าวสามารถทำให้โครงสร้างของแบคเทอริโอซินเสียสภาพชั่วคราว Faye และคณะ [38] ได้ศึกษาผลของเอนไซม์โปรติเอสต่อประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Propionibacterium jensenii* ด้วยวิธี colony assay โดยการเติมเอนไซม์โปรติเอส ได้แก่ proteinase K, pronase, chymotrypsin และ rennet ลงในจานอาหารวุ้นที่ไม่มีการเติม *P. jensenii* ลงไป ผลพบว่าเอนไซม์ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ จึงแสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ proteinase K,

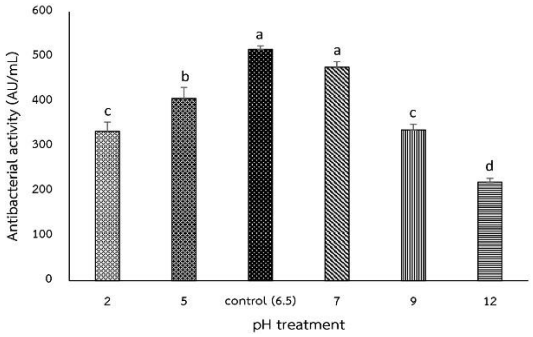

Figure 7 Effect of pH treatment on stability of bacteriocin. Values are means of three replications and error bars indicate the mean standard deviation. Different small letters indicate statistically significant difference ($p < 0.05$).

Table 1 Effect of proteolytic enzyme treatment on stability of bacteriocin

Enzyme treatments	Antibacterial activity (AU/mL) mean ± SD
control *	516.6±7.6
Proteinase K	0.0±0.0
Trypsin	0.0±0.0
Chymotrypsin	0.0±0.0

* Control means untreated with enzyme. Values are means of three replications and error bars indicate the mean standard deviation.

alpha chymotrypsin และ trypsin ไม่มีส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญเชื้อ *L. monocytogenes* แต่เป็นผลจากแบคเทอริโอซินถูกทำให้เสียสภาพจากการเติมเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิด จึงไม่พบกิจกรรมการยับยั้งเชื้อเกิดขึ้น ดังนั้นผลของเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารแสดงให้เห็นว่า *Ln. lactis* BAN1.1 สร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่เป็นสารประกอบโปรตีน (proteinous substance) [31,37,39-40]

3.4 ผลการประเมินประสิทธิภาพของสารคล้ายแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* บนผักกาดหอมสด

ผลการทดลองพบว่าเมื่อจุ่มผักกาดหอมลงในสารละลายของสารคล้ายแบคเทอริโอซิน เป็นเวลา 5 และ 30 นาที สามารถลดปริมาณของจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณ *L. monocytogenes* ลงได้ โดยเมื่อจุ่มผักกาดหอมเป็นเวลา 30 นาที และบ่มเป็นเวลา 5 วัน พบว่า สามารถลดปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลงได้ 3.43±0.27 log CFU/g และลดปริมาณของ *L. monocytogenes* ลงได้ 3.49±0.07 log CFU/g เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่จุ่มผักกาดหอมลงในน้ำปราศจากเชื้อ พบว่าปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 1.77±0.33 log CFU/g และลดปริมาณของ *L. monocytogenes* ได้ 1.39±0.46 log CFU/g ส่วนในวันที่ 7 ผักกาดหอมมีลักษณะเหี่ยว จึงไม่สามารถนับปริมาณเชื้อ (รูปที่ 8) สอดคล้องกับการศึกษาของ Cobo และคณะ [41] ที่เติมแบคเทอริโอซิน enterocin AS-48 ลงในถั่วอัลฟาฟา ถั่วเหลือง และหน่อไม้ฝรั่ง พบว่าลดปริมาณ *L. monocytogenes* ลงได้ 2.0-2.4 log CFU/g และเมื่อเติมควบคู่กับน้ำมันหอมระเหยจะทำให้ลดปริมาณเชื้อได้มากขึ้น และถ้าล้างผักกาดแก้วด้วย nisin และ bacteriocin RUC9 จะสามารถลดปริมาณ *L. monocytogenes* ลง 1.9 และ 2.7 log CFU/g ตามลำดับ [42] Allende และคณะ [43] ศึกษาผลของการล้างผักกาดหอมสดด้วยสารละลายผสมแบคเทอริโอซิน พบว่าลดปริมาณ *L. monocytogenes* ลงได้ 1.2-1.6 log CFU/g ส่วนสารละลาย pediocin DT 016 สามารถควบคุมการเพิ่มจำนวนของ *L. monocytogenes* อย่างน้อย 3.2 log CFU/g ซึ่งลดลงได้มากกว่าผักที่ล้างด้วยน้ำผสมคอรีนที่สามารถลดเชื้อเพียง 2.7 log CFU/g [23,24,44] โดยที่กล่าวมาเห็นว่าปัจจุบันมีรายงานการนำแบคเทอริโอซินมาใช้เป็นสารถนอมอาหารโดยเฉพาะกับผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้พร้อมบริโภค ได้แก่ nisin, enterocin AS-48, bovicin HC5, enterocin 416K1, pediocin และ bificin C6165 แต่มีเพียง nisin และ pediocin เท่านั้นที่มีประสิทธิภาพนำมาใช้ได้ในเชิงการค้า โดยประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์ผลไม้และยังคงจำกัดการใช้กันในบางประเทศเท่านั้น [23,45,46]

4. สรุป

Leuconostoc lactis (*Ln. lactic* BAN1.1) ที่แยกได้จากโครงการวิจัย ผลของสารถนอมอาหารทางชีวภาพของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากผลไม้สด ผักสด

และผักพร้อมบริโภคต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค สามารถสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินออกมายับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่ใช้ในเชิงการค้า หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลฟรุคโตสหรือกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยเติม yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน ปรับพีเอชเริ่มต้นในอาหารเป็น 6.5 และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ส่วนผลการแยกสารคล้ายแบคเทอริโอซินพบว่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อทดสอบหลังจากตกตะกอนที่ความเข้มข้น 60 % ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด โดยมีค่าการยับยั้งเพิ่มขึ้นเกือบ 2 เท่า สารคล้ายแบคเทอริโอซินเป็นสารโปรตีนที่ทนอุณหภูมิได้สูงและทนพีเอชได้ในช่วงกว้าง และสามารถลดปริมาณการเจริญของจุลินทรีย์ทั้งหมดและปริมาณ *L. monocytogenes* บนผักกาดหอมสด ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารคล้ายแบคเทอริโอซินดังกล่าวคาดว่าจะมีแนวโน้มนำไปประยุกต์ใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาและลดการใช้สารเคมีกับผักและผลไม้สดได้

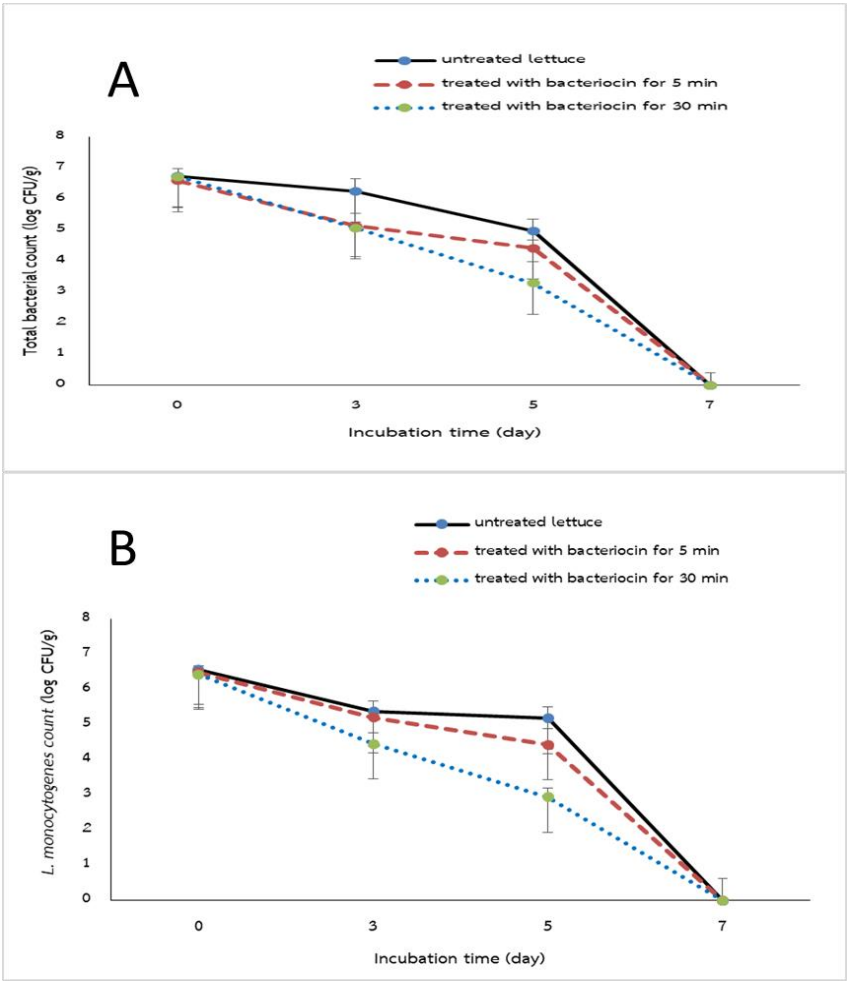

Figure 8 Effect of bacteriocin BAN1.1 against total bacterial count (A) and *L. monocytogenes* (B) on fresh lettuce. Values are means of three replications and error bars indicate the mean standard deviation.

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ภาควิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา และทุนสนับสนุนการวิจัยจากกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ภายใต้ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดิน ตามสัญญาเลขที่ *R2558B123

6. References

[1] Leong, D., NicAogáin, K., Luque-Sastre, L., McManamon, O., Hunt, K., Alvarez-Ordóñez, A., Scollard, J., Schmalenberger, A., Fanning, S., O'Byrne, C. and Jordan, K., 2017, A 3-year multi-food study of the presence and persistence of *Listeria monocytogenes* in 54 small food businesses in Ireland, Int. J. Food Sci. Technol. 249: 18-26.

[2] Pouillot, R., Klontz, K.C., Chen, Y., Burall, L.S., Macarisin, D., Doyle, M. and van Doren, J.M., 2016, Infectious dose of *Listeria monocytogenes* in outbreak linked to ice cream, United States, 2015, Emerging Infec. Dis. 22: 2113-2119.

[3] Chen, Y., Burall, L.S., Macarisin, D., Pouillot, R., Strain, E., de Jesus, A.J. and Datta, A.R., 2016, Prevalence and level of *Listeria monocytogenes* in ice cream linked to a listeriosis outbreak in the united states, J. Food Protect. 79: 1828-1832.

[4] Gomez-Sala, B., Munoz-Atienza, E., Diep, D.B., Feito, J., del Campo, R., Nes, I.F., Herranz, C., Hernandez, P.E. and Cintas, L.M., 2019, Biotechnological potential and *in vitro* safety assessment of *Lactobacillus curvatus* BCS35, a multibacteriocinogenic strain isolated from dry-salted cod (*Gadus morhua*), LWT-Food Sci. Technol. 112: 108219.

[5] Mokoena, M.P., 2017, Lactic acid bacteria and their bacteriocins: classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review, Molecules 22: 1255.

[6] Zacharof, M.P., Lovitt, R.W., 2012, Bacteriocins produced by lactic acid bacteria: A review article, APCBEE Procedia 2: 50-56.

[7] Alvarez-Sieiro, P., Montalbán-López, M., Mu, D. and Kuipers, O.P., 2016, Bacteriocins of lactic acid bacteria: Extending the family, Appl. Microbiol. Biotechnol. 7: 2939-2951.

[8] McManamon, O., Kaupper, T., Scollard, J. and Schmalenberger, A., 2019, Nisin application delays growth of *Listeria monocytogenes* on fresh-cut iceberg lettuce in modified atmosphere packaging, while the bacterial community structure changes within one week of storage, Postharvest Biol. Technol. 147: 185-195.

[9] Bárcena, B.J.M., Siñeriz, F., de Gonzáles Llana, D., Rodríguez, A. and Suárez, B.E., 1998, Chemostat production of plantaricin C by *Lactobacillus plantarum* LL41, Appl. Environ. Microbiol. 64: 3512-3514.

[10] Callewaert, R. and de Vuyst, L., 2000, Bacteriocin production with *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 is improved and stabilized by fed- batch fermentation, Appl. Environ. Microbiol. 66: 606-613.

[11] Kumar, M., Jain, A.K., Ghosh, M. and Ganguli, A., 2012, Statistical optimization of physical parameters for enhanced bacteriocin production by *L. casei*, Biotech. Bioprocess Eng. 17: 606-616.

[12] Bhuvaneswari, S., Madhavan, S. and Panneerselvam, A., 2015, Optimization of bacteriocin production by *Bacillus subtilis* BMP01 isolated from *Solanum trilobatum* L., Int. J. Curr. Microbiol. Appl. Sci. 4: 617-626.

[13] Lyapparaj, P., Maruthiah, T., Ramasubbura yan, R., Prakash, S., Kumar, C., Immanuel, G. and Palavesam, A., 2013, Optimization of bacteriocin production by *Lactobacillus* sp. MSU3IR against shrimp bacterial pathogens, Aquat. Biosyst. 9: 12.

[14] Embaby, A.M., Heshmat, Y., Hussein, A. and Marey, H.S., 2014, A sequential statistical approach towards an optimized production of a broad spectrum bacteriocin substance from a soil bacterium *Bacillus* sp. YAS 1 strain, Sci. World J. 2014: 396304.

[15] Yang, E., Fan, L., Yan, J., Jiang, Y., Doucette, C., Fillmore, S. and Walker, B. 2018, Influence of culture media, pH and temperature on growth and bacteriocin production of bacteriocinogenic lactic acid bacteria, AMB Expr. 8: 10.

[16] Balciunas, E.M., Al-Arni, S., Converti, A., Leblanc, J.G. and de Souza Oliveira, R.P., 2016, Production of bacteriocin- like inhibitory substances (BLIS) by *Bifidobacterium lactis* using whey as a substrate, Int. J. Dairy Technol. 69: 236-242.

[17] Masuda, Y., Perez, R.H., Zendo, T. and Sonomoto, K., 2016, Nutrition- adaptive control of multiple- bacteriocin production by *Weissella hellenica* QU 13, J. Appl. Microbiol. 120: 70-79.

[18] Telke, A.A., Ovchinnikov, K.V., Vuoristo, K.S., Mathiesen, G., Thorstensen, T. and Diep, D.B., 2019, Over 2000-fold increased production of the leaderless bacteriocin Garvicin KS by increasing gene dose and optimization of culture conditions, Front. Microbiol. 10: 389.

[19] Drosinos, E.H., Mataragas, M., Nasis, P., Galiotou, M. and Metaxopoulos, J., 2005, Growth and bacteriocin production kinetics of *Leuconostoc mesenteroides* E131, J. Appl. Microbiol. 99: 1314-1323.

[20] Jana, S.C., Madhusree, C. and Utpal, R., 2019, Optimization of media and culture conditions for improved production of bacteriocin by using conventional one-factor- at- a- time (OFAT) method, EC. Microbiol. 15: 251-258.

[21] Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T., 2004, Effect

of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus pentosus* ST151BR, a strain isolated from beer produced by the fermentation of maize, barley and soy flour, World J. Microbiol. Biotechnol. 20: 643-650.

[22] Hartayanie, L., Lindayani, and Lorentia, S., 2018, The effect of carbon and nitrogen supplementation on bacteriocin produc tion of Lactic acid bacteria from pickled yellow bamboo shoots (*Dendrocalamus asper*), Microbiol. Indonesia 12: 7-14.

[23] Barbosa, A.A.T., Mantovani, H.C. and Jain, S., 2017, Bacteriocins from lactic acid bacteria and their potential in the preservation of fruit products, Crit. Rev. Biotechnol. 37: 852-864.

[24] Barbosa, M.S., Jurkiewicz, C., Landgraf, M., Todorov, S.D. and Franco, B.D.G.M., 2018, Effect of proteins, glucose and NaCl on growth, biosynthesis and functionality of bacteriocins of *Lactobacillus sakei* subsp. *sake*i 2a in foods during storage at 4 ºC: Tests in food models, LWT-Food Sci. Technol. 95: 167-171.

[25] Lechiancole, T., Ricciardi, A. and Parente, E. , 2002, Optimization of media and fermentation conditions for the growth of *Lactobacillus sakei*, Ann. Microbiol. 52: 257-274.

[26] Dey, B.C., Rai, N., Das, S., Mandal, S. and Mandal, V. , 2019, Partial purification, characterization and mode of action of bacteriocins produced by three strains of *Pediococcus* sp., J. Food Sci. Technol. 56: 2594-2604.

[27] Danial, E.N. , Al- Zahrani, S.H.M. and Al-Mahmoudi, Z.A.M., 2016, Enhancement of novel extracellular bacteriocin production by media optimization using LAB isolate from meat, J. Appl. Pharm. Sci. 6: 020-027.

[28] Hayek, S.A. and Ibrahim, S.A., 2013, Current limitations and challenges with Lactic acid bacteria: A review, Food Nutr. Sci. 4: 73-87.

[29] Choi, H., Lee, H., Her, S., Oh, D. and Yoon, S., 1999, Partial characterization and cloning of leuconocin J, a bacteriocin produced by *Leuconostoc* sp. J2 isolated from the Korean fermented vegetable kimchi, J. Appl. Microbiol. 86: 175-181.

[30] Thakur, R.L. and Roy, U., 2009, Anti bacterial activity of *Leuconostoc lactis* Isolated from raw cattle milk and its preliminary optimization for the bacteriocin production, Res. J. Microbiol. 4: 122-131.

[31] Wulijideligen, Asahina, T., Hara, K., Arakawa, K., Nakano, H. and Miyamoto, T., 2012, Production of bacteriocin by *Leuconostoc mesenteroides* 406 isolated from Mongolian fermented mare's milk, airag, Anim. Sci. J. 83: 704-711.

[32] Revol-Junelles, A.M. , Mathis, R. , Krier, F. , Fleury, Y. , Delfour, A. and Lefebvre, G. , 1996, *Leuconostoc mesenteroides* subsp.

mesenteroides FR52 synthesizes two distinct bacteriocins, Lett. Appl. Microbiol. 23: 120-124.

[33] de Giani, A., Bovio, F., Forcella, M., Fusi, P., Sello, G. and di Gennaro, P., 2019, Identification of a bacteriocin- like compound from *Lactobacillus plantarum* with antimicrobial activity and effects on normal and cancerogenic human intestinal cell, AMB Express 9: 88.

[34] Sidooski, T., Brandelli, A., Bertoli, S.L., Souza, C.K. and Carvalho, L.F., 2019, Physical and nutritional conditions for optimized production of bacteriocins by lactic acid bacteria – A review, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 59: 2839-2849.

[35] Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Tengku Ibrahim, T.A., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N.R., Mustafa, S. and Ariff, A.B., 2017, Fermenta tion factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review, RSC Adv. 47: 29395-29420.

[36] Hwang, I.C., Oh, JK., Kim, SH., Oh, S. and Kang, D.K., 2018, Isolation and characteri zation of an antilisterial bacteriocin from *Leuconostoc lactis* SD501, Korean J. Food Sci. Anim. Res. 38: 1008-1018.

[37] Silva, C.C.G, Silva, S.P.M. and Ribeiro, S.C., 2018, Application of bacteriocins and protective cultures in dairy food preservation, Front. Microbiol. 9: 594.

[38] Faye, T., Brede, D.A., Langsrud, T., Nes, I.F. and Holo, H., 2002, An antimicrobial peptide is produced by extracellular processing of a protein from *Propioni bacterium jensenii*, J. Bacteriol. 84: 3649-3656.

[39] Lisboa, M.P., Bonatto, D., Bizani, D., Henriques, J.P. and Brandelli, A., 2006, Characterization of a bacteriocin- like substance produced by *Bacillus amyloliquefaciens* isolated from the Brazilian, Atlantic forest. Int. Microbiol. 9: 111-118.

[40] Kindoli, S., Lee, H.A. and Kim, J.H., 2012, Properties of Bac W4 2, a bacteriocin produced by *Bacillus subtilis* W4 2 isolated from cheonggukjang, J. Microbiol. Biotech. 22: 1092-1100.

[41] Cobo, H., Abriouel, R., Lucas, N., Ben, E., Valdivia, R. and Gálvez, A., 2009, Enhanced bactericidal activity of enterocin AS-48 in combination with essential oils, natural bioactive compounds and chemical preservatives against *Listeria monocyto genes* in ready-to-eat salad, Food Chem. Toxicol. 47: 2216-2223.

[42] Ponce, A., Moreira, M.R., del Valle, C. and Roura, S., 2008, Preliminary characteriza tion of bacteriocin-like substances from Lactic acid bacteria isolated from organic leafy vegetables, LWT-Food Sci. Technol. 41: 432-441.

[43] Allende, A., Martínez, B., Selma, V., Gil, M.I., Suárez, J.E. and Rodríguez, A., 2007, Growth and bacteriocin production by

Lactic acid bacteria in vegetable broth and their effectiveness at reducing *Listeria monocytogenes* in vitro and in fresh-cut lettuce, Food Microbiol. 24: 759-766.

[44] Ramos, B., Brandão, T.R.S., Teixeira, P. and Silva C.L.M., 2020, Biopreservation approaches to reduce *Listeria monocytogenes* in fresh vegetables, Food Microbiol. 85: 103282.

[45] Ziegler, M., Kent, D., Stephan, R. and Guldimann, C., 2019, Growth potential of *Listeria monocytogenes* in twelve different types of RTE salads: Impact of food matrix, storage temperature and storage time, Int. J. Food Microbiol. 296: 83-92.

[46] Truchado, P., Elsser-Gravesen, A., Maria, I. and Ana Allende, G., 2020, Post-process treatments are effective strategies to reduce *Listeria monocytogenes* on the surface of leafy greens: A pilot study, Int. J. Food Microbiol. 313: 108390.