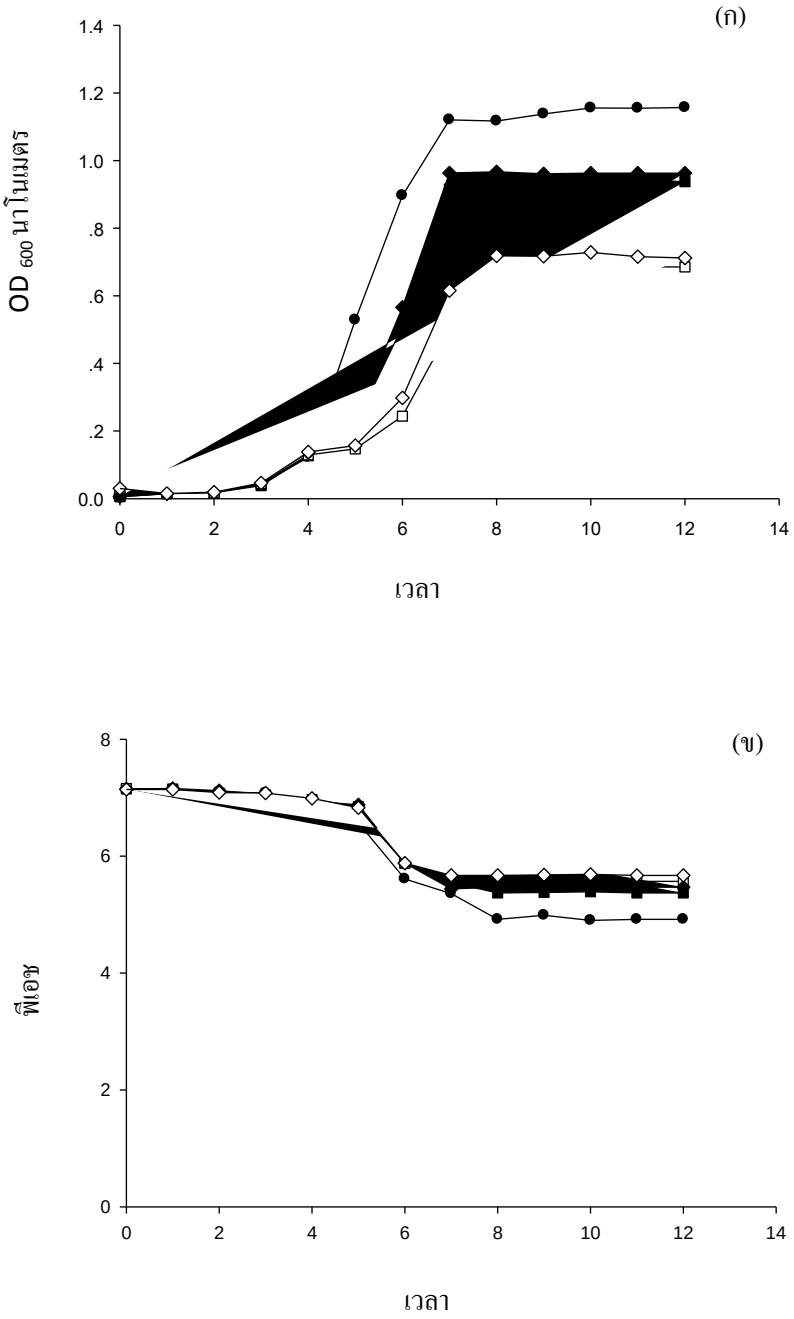


รูปที่ 4.1 ผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว Tryptic Soy broth (TSB) ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904 (รูป ก) การเปลี่ยนแปลงค่าความขุ่น (OD_{600} นาโนเมตร) และ(รูป ข) การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของอาหาร TSB ขณะบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สัญลักษณ์ : ● ชุดควบคุม (ไม่เติมแบคเทอริโอซิน) ■ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ16.7 □ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ23.1 ♦ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ16.7 ◊ อาหาร TSB ที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ23.1

การที่แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ได้ดีสอดคล้องกับการทดลองของ Pinto และคณะ (2009) ที่เติมแบคเทอริโอซินคือ bacALP7 (มีกิจกรรมแบคเทอริโอซินที่ 25, 600 AUต่อมิลลิลิตร) และ bacALP57 (มีกิจกรรมแบคเทอริโอซินที่ 12, 800 AUต่อมิลลิลิตร) ที่เติมเมื่อเข้าสู่ระยะ exponential phase ช่วงต้น พบว่าแบคเทอริโอซินทั้งสองชนิดมีฤทธิ์ในการเชื้อยับยั้งเชื้อในสายพันธุ์ *Listeria* ได้ดีเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้ Lücke (2000) ได้กล่าวว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียของชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน เช่น *Listeria*, *Bacillus*, *Clostridium* และ *Staphylococcus* ทั้งนี้แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบเนื่องจาก cytoplasmic membrane ของแบคทีเรียแกรมบวกไวกว่าจึงถูกแบคเทอริโอซินทำลายได้ง่าย

4.3 การควบคุมการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็นโดยใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

4.3.1 การศึกษาผลของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในหมูบดแช่เย็น

ก) การเปลี่ยนแปลงของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดในเนื้อหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

จากการศึกษาผลของแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 2 และ ร้อยละ 4) ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และ *Lactobacillus brevis* LT0904 ต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหมดในหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วัน พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดทุกชุดการทดลองลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเก็บรักษาครบ 3 วัน โดยจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดชุดควบคุมที่ไม่เติมสารใด ๆ ลดลงน้อยที่สุด (0.59 log cycle) เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดชุดอื่นที่เติมสารแบคเทอริโอซิน ทั้งนี้หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 4 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนจุลินทรีย์ลดลงมากที่สุด (1.42 log cycle) หลังจากเก็บรักษาครบ 3 วัน (รูปที่ 4.2 ก) และเมื่อระยะเวลาในการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจำนวนจุลินทรีย์ในแต่ละชุดการทดลองเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่ทุกช่วงเวลาของการเก็บรักษา โดยพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดชุดควบคุมลดลงน้อยกว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินทุกชุดการทดลองเช่นเดียวกัน และเมื่อเก็บรักษาจนครบ 10 วัน หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.85 log cycle ซึ่งลดลงมากกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดของชุดการทดลองอื่น ๆ (ได้แก่ หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น

50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.25 log cycle และหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ที่ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดลง 0.28-0.29 log cycle) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อพิจารณาระดับความเข้มข้นของแบคเทอริโอซินที่เติมในหมูบดที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 พบว่าหมูบดที่เติมสารแบคเทอริโอซินร้อยละ 4 มีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่าจำนวนจุลินทรีย์ในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

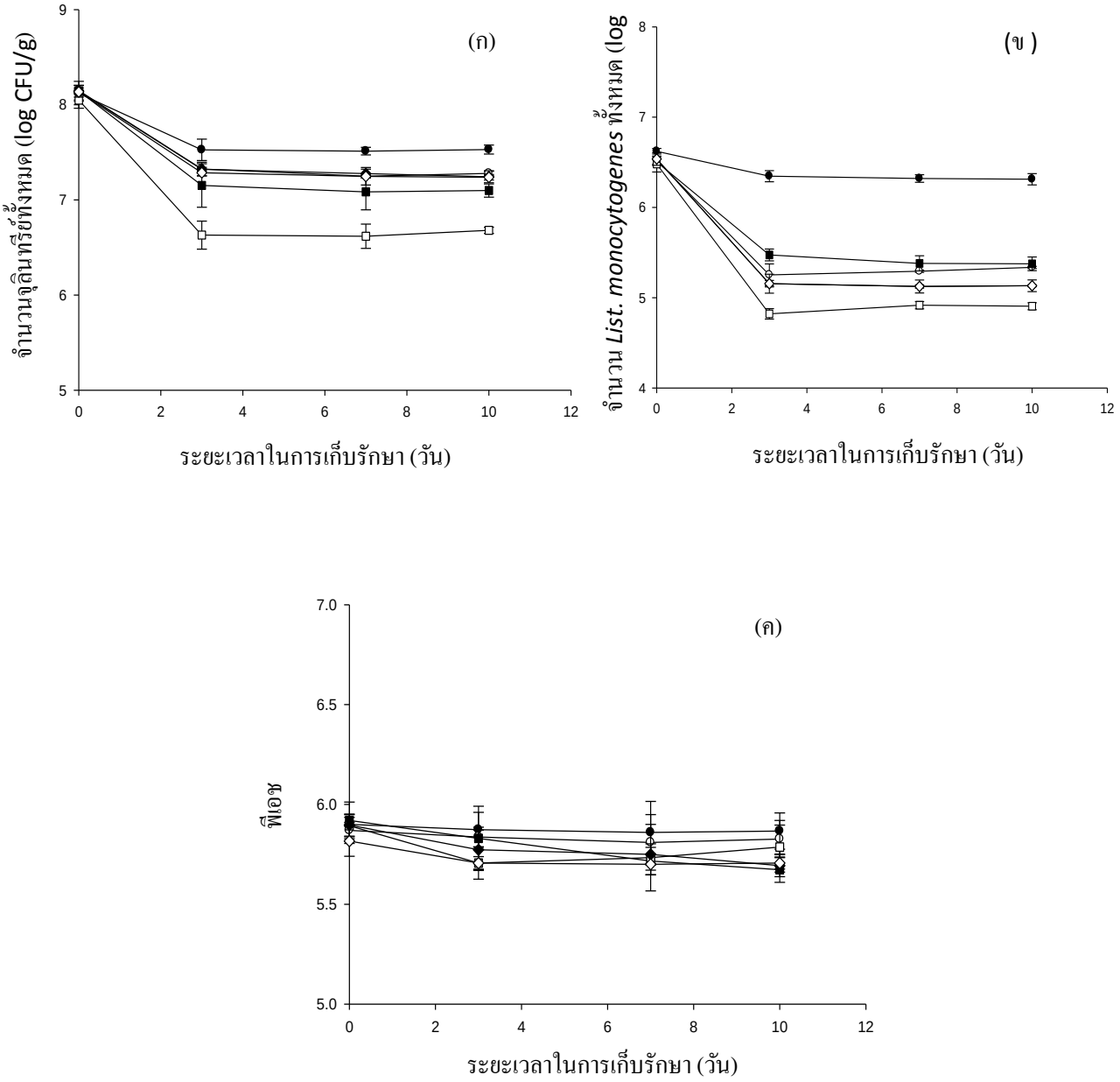
เมื่อพิจารณาจำนวน *Listeria monocytogenes* พบว่าหลังจากเก็บหมูบดแช่เย็นครบ 3 วัน จำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในหมูบดชุดควบคุมลดลงน้อยกว่าจำนวน *L. monocytogenes* ในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินทุกชุดการทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (รูปที่ 4.2ข) โดยหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินร้อยละ 4 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ลดลงมากที่สุดถึง 1.7 log cycle หลังจากนั้นจำนวน *L. monocytogenes* ในหมูบดทุกชุดการทดลองมีจำนวนค่อนข้างคงที่เมื่อระยะเวลาการเก็บรักษาเพิ่มขึ้นจนครบ 10 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับวันแรกที่เก็บรักษา พบว่าเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาจำนวน *L. monocytogenes* ในหมูบดชุดควบคุมมีจำนวนลดลงเพียง 0.31 log cycle จากจำนวนเริ่มต้นซึ่งลดลงน้อยกว่าจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินทุดชุดการทดลอง (ลดลงมากถึง 1.40-1.58 log cycle) โดยหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ให้ผลดีกว่าหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ในการลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ทั้งหมด

ข) การเปลี่ยนแปลงพีเอชของเนื้อหมูบดแช่เย็นระหว่างการเก็บรักษา

ค่าพีเอชของหมูบดทุกชุดการทดลองเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาโดยพีเอชเริ่มต้นอยู่ในช่วงพีเอช 5.7-6.0 (รูปที่ 4.2 ค) และเมื่อเก็บรักษาต่อไปจนครบ 10 วันหมูบดทุกชุดการทดลองมีพีเอชลดลงเพียงเล็กน้อย (พีเอช 5.5-5.8) เมื่อพิจารณาค่าพีเอชของหมูบดตลอดระยะเวลาของการทดลองในแต่ละชุดการทดลอง พบว่าการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของหมูบดในแต่ละชุดการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$)

พีเอชเปลี่ยนแปลงไม่มากนักเพราะหมูบดไม่ได้อยู่ในสภาวะของการหมักเนื่องจากเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำดังนั้นจึงมีเพียงเชื้อ *List. monocytogenes* ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะดังกล่าวเท่านั้น เช่นเดียวกับการทดลองของ Vignolo และคณะ (1996) ที่ทดลองเติม Lactocin 705 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. casei* CRL 705 เพื่อยับยั้งการเจริญของ *List. monocytogenes* ในเนื้อวัวที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียสโดยเติมแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรม 2 ระดับคือ 8,400 และ 16,800 AU ต่อมิลลิลิตร พบว่าแบคเทอริโอซินที่ทั้งสองระดับสามารถลดการเจริญของเชื้อ *List. monocytogenes* ได้อย่างน้อย 1 log cycle โดยที่แบคเทอริโอซินที่ความเข้มข้นสูงสุดสามารถลดจำนวนเชื้อ *List. monocytogenes* ในเนื้อวัวได้ร้อยละ 40 หลังจากเก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิ -30 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 1 วันและการที่แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของ *List. monocytogenes* อาจเนื่องมาจาก cytoplasmic membrane ไวต่อการถูกทำลายด้วยแบคเทอริโอซิน (Lücke. 2000)



รูปที่ 4.2 ผลการเปลี่ยนแปลง (ก) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (ข) จำนวน *List. monocytogenes* ทั้งหมด (ค) พีเอช ของหมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก สัญลักษณ์ : ● ชุดควบคุม (ไม่เติมแบคเทอริโอซิน) ○ หมูบดที่เติมไนซินความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ■ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 2 □ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LS0602 ร้อยละ 4 ♦ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 2 ◊ หมูบดที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. brevis* LT0904 ร้อยละ 4

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

เชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 ผลิตแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* เท่ากับ 12,800 AU ต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยมีระดับพีเอชที่เหมาะสมในการสร้างแบคเทอริโอซินอยู่ที่พีเอช 6 และพีเอช 7 ตามลำดับ และ *L. plantarum* LS0602 มีการสร้างแบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ดีที่สุดในอาหารเหลว MRS สูตรปกติที่เติมเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคสเป็น 30 กรัมต่อลิตร มีทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร และมีไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 5 กรัมต่อลิตร สำหรับเชื้อ *L. brevis* LT 0904 ควรเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรปกติที่เติมกลูโคสเพิ่มเป็น 40 กรัมต่อลิตร มีทริปโตน 10 กรัมต่อลิตร มียีสต์สกัดเพิ่มเป็น 20 กรัมต่อลิตร และมีโพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 2 กรัมต่อลิตร เพื่อให้มีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินสูงสุด สำหรับวิธีการทำแบคเทอริโอซินให้บริสุทธิ์ปรากฏว่า วิธีที่จะทำให้ได้แบคเทอริโอซินที่มีกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคสูงสุดจะต้องนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาผ่านกระบวนการต่างๆหลายขั้นตอน ตั้งแต่การตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำไดอะไลซีสและการตกตะกอนแบคเทอริโอซินด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก สำหรับการทดสอบความคงตัวของแบคเทอริโอซินที่ผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่อระดับการให้ความร้อน (ที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน) ระดับพีเอชและสภาพที่มีเอนไซม์ชนิดต่างๆ พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีความคงตัว (ไม่สูญเสียกิจกรรม) เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิระดับต่ำจนถึงอุณหภูมิ 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 819,200 AUต่อมิลลิลิตร) ส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* LT 0904 มีความคงตัวต่อความร้อนน้อยกว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* LS0602 คือมีกิจกรรมแบคเทอริโอซินไม่ลดลงหากให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่ำกว่าหรือเท่ากับ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับผลของพีเอชที่ระดับพีเอช 2-10 พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์มีความคงตัว (ค่ากิจกรรมไม่ลดลง) เมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชในช่วงพีเอช 2-7 แต่ค่ากิจกรรมของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อทั้งสองสายพันธุ์จะค่อย ๆ ลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่มีพีเอชสูงกว่าพีเอช 8 และเมื่อศึกษาผลของเอนไซม์ α-amylase เอนไซม์ lipase เอนไซม์ papain เอนไซม์ pepsin และเอนไซม์ trypsin ที่ความเข้มข้น 30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรต่อความคงตัวของกิจกรรมของแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT 0904 พบว่าเอนไซม์ดังกล่าวไม่มีผลทำให้แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สูญเสียกิจกรรม และเมื่อนำแบคเทอริ

โอซินจากแบคทีเรียทั้งสองชนิดมาใช้ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารเหลว พบว่าแบคเทอริโอซินจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* ในอาหารเหลวที่เติมแบคเทอริโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ปริมาตรร้อยละ 23.1

แบคเทอริโอซินจาก *L. plantarum* LS0602 และ *L. brevis* LT0904 มีประสิทธิภาพในการใช้เป็นสารชีวภาพต้านจุลินทรีย์ *L. monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็นโดยแบคเทอริโอซินจาก *L. plantarum* LS0602 ที่ความเข้มข้นร้อยละ 4 ให้ผลดีที่สุดในการลดจำนวน *L. monocytogenes* งานวิจัยขั้นต่อไปควรศึกษาสภาวะต่างๆในการผลิตแบคเทอริโอซินในระดับอุตสาหกรรมเพื่อการจำหน่าย

บรรณานุกรม

Altunta, E.G., Cosansu. S. and Ayhan. K. 2010. "Some growth parameters and antimicrobial activity of a bacteriocin-producing strain *Pediococcus acidilactici* 13**." International Journal of Food Microbiology**. 141 : 28-31.

Andersson, R.E., Daeschel, M.A. and Hassan, H.M. 1988. "Antibacterial activity of plantaricin SIL-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*." **Biochimie**. 70 : 381-90.

Ammor, M.S. and Mayo, B. 2007. "Selection criteria for lactic acid bacteria used as function starter cultures in dry sausage production: an update. **Meat Science** 76 : 138-146.

Carolissen-Mackay, V., Arendse, A., Hastings, J.W. 1997. "Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers." **International Journal of Food Microbiology.** 34 : l-16.

Castro, M.P., Palavecino, N.Z., Herman, C., Garro, O.A., Campos, C.A. 2011. Lactic acid bacteria isolated from artisanal dry sausages: characterization of antibacterial compounds and study of the factors affecting bacteriocin production. **Meat science.** 87: 321-329.

Charoenrak, N. and Nanasombat, S. 2011. Characterization of lactic acid bacteria and coagulase negative staphylococci isolated from raw meat and cured meat products, pp. 323-331. In the Proceeding of the 12th Asean Food Conference, 16-18 June, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand.

Cheigh, C.I.,Choi , H.J., Park ,H., Kim, S.K.,Kook, M.C., Kim, T.S., Hwang, J.K. Pyun a, Y.R. 2002. "Influence of growth conditions on the production of a nisin-like bacteriocin by Lactococcus lactis subsp. Lactis A164 isolated from kimchi**." Journal of Biotechnology**. 95 (2002) 225-235.

Cleveland, J., Montville, T. J., Nes, I. F., & Chikidas, M. L. (2001). Bacteriocin:safe, natural antimicrobials for food preservation. International Journal of Food Microbiology. 7: 1-20.

Copeland, R.A. 1994. **Methods for protein analysis : A practical Guide to laboratory protocols.** New York. USA : Chapman and Hall.

Cuozzo, S.A., Sesma, F.J.M., Pesce de R. Holgago, A.A. and Raya, R.R. 2001. "Methods for the

detection and concentration of bacteriocins produced by lactic acid bacteria." in Spencer, J.F.T. and Ragout de Spencer, A. L. **Food Microbiology Protocols.** New Jersey : Humana Press Inc.

Doonan, S. 2004. "Concentration of extracts." in Cutler, P. **Protein Purification Protocols**, 2nd ed. Totowa, New Jersey : Humama press Inc.

Daba, H., Lacroix, C., Huang, J. and Simard, R.E. 1993. "Influence of growth conditions on production and activity of mesenterocin 5 by a strain of *Leuconostoc mesenteroides*." **Applied Microbiology and Biotechnology**. 39 (2) : 166-173.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994. **Bacteriocins of lactic acid bacteria.** UK : Blackie academic & professional.

Drosinos, E.H., Mataragas, M. and Metaxopoulos, J. 2006. "Modeling of growth and bacteriocin production by *Leuconostoc mesenteroides* E131." **Meat Science.** 74 : 690-696.

Enan, G., Essawy, A.A., Uyttendaele, M. and Debevere, J. 1996. "Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1." **International Journal of Microbiology.** 30 : 189-215.

Gálvez, A. Abriouel, H., López, R. L., and Omar, N. B. 2007. "Bacteriocin-based strategies for food biopreservation." **International Journal of Food Microbiology** 120: 51-70.

Hitchins, A.D. and Jinneman, K. 2011. Detection and Enumeration of *Listeria monocytogenes* in Foods. Available from: www.fda.gov/food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/ BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm071400.htm

Holzapfel, W.H., Geisen, R. and Schillinger, U. 1994. "Biological preservation of food with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes." **Food Microbiology** 24 : 343-362.

Kim, W.S., Hall, R.J. and Dunn, N.W., 1997. "The effect of nisin concentration and nutrient depletion on nisin production of *Lactococcus lactis."* **Applied Microbiology and Biotechnology.** 50 : 657-662.

Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P., Charoenpornsook, K.,Valyyasevi, Ruud. And Sonomoto, K. 2012. "Anti-listeria activity of Pediococcus

pentosaceus BCC 3772 and application as starter culture of Nham, traditional fermented pork sausage." **Food control.** 25 : 190-196.

Lee, H.J., Joo, Y.J., Park, C.S., Kim, S.H., Hwang, I.K., Ahn, J.S., Mheen, T.I. 1999."Purification and characterization of a bacteriocin produced by Lactococcus lactis subsp. lactis H-559 isolated from kimchi." **Journal of Bioscience and Bioengineering.** 88 : 153-159.

Lücк, F.K. 2000. "Utilization of microbes to process and preserve meat." **Meat Science.** 56 : 105-115.

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

Mataragas, M., Metaxopoulos, J., Galiotou, M. and Drosinos, E.H. 2003. "Influence of pH and temperature on growth and bacteriocin production by Leuconostoc mesenteroides L124 and Lactobacillus curvatas L442." **Meat Science**. 64 : 265-271.

Matsusaki, H. Endo, N. Sonomoto, K. Ishikazi, A. 1996. "Lantibiotic nisin Z fermentative production by Lactococcus lactis IO-1: relationship between production of the lantibiotic and lactate and cell growth." **Applied Microbiology and Biotechnology.** 45 : 36-40.

Mehta, A.M., Patel, K.A. and Dave, P.J. 1983. "Purification and properties of the inhibitory protein isolated from Lactobacillus acidophilus AC1." Microbios. 38 : 73-81.

Muriana, P. M., & Luchansky, J. B. 1993. Biochemical methods for purification of bacteriocin. In D. G. Hoover, & L. R. Steenson, *Bacteriocin of lactic acid bacteria*. San diego: Academic Press.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2002. "Isolation of nisin-producing Lactococcus lactis WNC 20 strain from nham, a traditional Thai fermentaed sausage." **Internationak Journal of Food Microbiology**. 81 : 137-145.

Parente. E. and Ricciardi, A. 1994. "Effect of nitrogen and carbohydrate sources on lactic acid and bacteriocin production by Enterococcus faecium DPC1146." **Agro-Industry Hi-Tech**. 5 : 35-39.

Pinto, A.L., Fernandes, M., Pinto, C. Albano, H., Castilho, F., Teixeira, P. and Gibbs, P.A. 2009.

"Characterization of anti-*Listeria* bacteriocins isolated from shellfish: Potential antimicrobials to control non-fermented seafood. ." **International Journal of Food Microbiology.** 129 : 50-58.

Salih, M. A., Sandine, W. E. and Ayres, J. W. 1990. "Inhibitory effects of Microgard™ on yogurt and cottage cheese spoilage organisms." **Journal of Dairy Science.** 73: 887-893.

Schillinger, U. and LÜcke F.K. 1989. "Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat." **Applied and Environmental Microbiology.** 55(8): 1901-1906.

Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. "Bacteriocin of gram positive bacteria."

Bacteriological Reviews. 40: 722-756.

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

Todorov, S.D., Prévost, H., Lebois, M., Dousset, X., LeBlanc, J.G. and Franco, B.D.G.M. 2011. "Bacteriocinogenic *Lactobacillus plantarum* ST16Pa isolated from papaya (Carica papaya)-from isolation to application: Characterization of a bacteriocin." **Food Research International**. 44 : 1351-1363.

Vignolo, G., Fadda, S., de Kairuz, M.N., de Ruiz Holgado, A.A.P., 1996. "Control of *Listeria monocytogenes* in ground beef by Lactocin 705, a bacteriocin produced by *Lactobacillus casei* CRL 705. **International Journal of Food Microbiology.** 29 : 397-402.

Yousef, A.E. and Carlstrom, C 2003. **Food Microbiology : a laboratory manual.** Hoboken, New York : John Wiley.

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 de Man Rogosa and sharpe medium (MRS agar) ประกอบด้วย

Proteose peptone no 3	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Dipotassium hydrogen phosphate	2	กรัม
Triammonium citrate	2	กรัม
Magnesium sulfate	0.2	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Agar	10	กรัม

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE Soft Agar) ประกอบด้วย

Tryptic soy broth	30	กรัม
Yeast extract	6	กรัม
Agar	10	กรัม

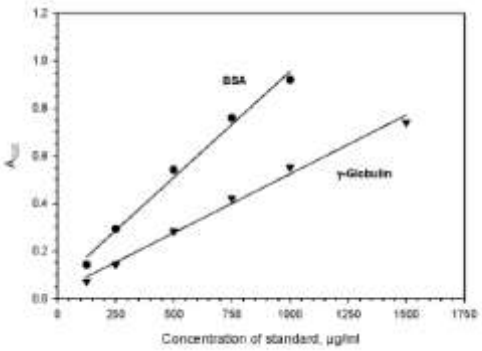
นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
วิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารแบคเทอริโอซินในแต่ละส่วน

ในการวิเคราะห์หาปริมาณโปรตีนในสารแบคเทอริโอซินตามวิธีการของ Bradford ด้วยชุด Quick start Bradford (Bio-Rad ประเทศสหรัฐอเมริกา) ทำได้โดย ปิเปตส่วนใส (cell-free supernatant) ส่วนใสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต ส่วนใสที่ผ่านการทำไดอะไลซีส และส่วนใสที่ผ่านการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติก ทั้งหมด 4 ส่วน โดยปิเปตตัวอย่างละ 100 ไมโครลิตรลงในหลอดทดลองที่สะอาดแล้วเติมสีย้อม 5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง vortex mixer และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้องอย่างน้อย 5 นาที (ไม่เกิน 1 ชั่วโมง) ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 ไมโครลิตรเพื่อบันทึกผลค่าการดูดกลืนแสง จากนั้นคำนวณหาปริมาณโปรตีน (ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ในการคำนวณจะต้องเปรียบเทียบการสารละลายโปรตีนมาตรฐานดังนี้

การเตรียมสารละลายโปรตีนมาตรฐานที่มีความเข้มข้น 125, 250, 500, 750, 1,000 และ 2,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมพร้อมกับ Blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นเพื่อสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อเตรียมเทียบปริมาณโปรตีนในสารแบคเทอริโอซินที่ทำให้บริสุทธิ์หรือเข้มข้นขึ้นด้วยวิธีการต่าง ๆ



รูปที่ 1 ตัวอย่างกราฟมาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบความเข้มข้นของโปรตีน

2. การตกตะกอนโปรตีนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

ตารางด้านล่างจะใช้ในการกำหนดปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟต (กรัม) สำหรับสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยคิดเป็นร้อยละของความอิ่มตัว เมื่อต้องการใช้ตารางเริ่มต้นด้วยการหารายการในคอลัมน์แรกที่ให้ร้อยละความอิ่มตัว เริ่มจากสารละลายตัวอย่าง (เช่น ครั้งแรกจะใช้ที่ร้อยละ 0 ก่อนเติมแอมโมเนียมซัลเฟต) แล้วหารายการในแถวบนสุดที่แสดงถึงร้อยละของความอิ่มตัวที่

ต้องการ โดยค่าที่ได้จะเป็นค่าที่จุดตัดของแถวและคอลัมน์ที่เป็นจำนวนของแอมโมเนียมซัลเฟต (ของแข็ง) ที่เติมลงในสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตัวอย่าง: มีสารละลายปริมาตร 25 มล. ที่ความอิ่มตัวร้อยละ 40 ถ้าหากต้องการที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 จะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟตกี่กรัม

ตอบ ความเข้มข้นเริ่มต้นที่ความอิ่มตัวร้อยละ 40 ดังนั้นให้ลากไปที่คอลัมน์แรกที่ร้อยละ 40 และความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการคือ ที่ความอิ่มตัวร้อยละ 80 ดังนั้นให้ลากแถวบนไปที่ร้อยละ 80 ที่จุดตัดของแถวและคอลัมน์นี้คือ "26.3" ดังนั้นจะต้องใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 26.3 กรัมเพื่อเติมในสารละลายปริมาตร 100 มิลลิลิตร แต่มีสารละลายเพียง 25 มิลลิลิตร ดังนั้นจึงใช้แอมโมเนียมซัลเฟตจำนวน 6.6 กรัม

ตารางที่ ข3 การหาปริมาณแอมโมเนียมซัลเฟตเพื่อใช้ในการตกตะกอนโปรตีน

Init %	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70	75	80	85	90	95	100
0	10.6	13.4	16.4	19.4	22.6	25.8	29.1	32.6	36.1	39.8	43.6	47.6	51.6	55.9	60.3	65.0	69.7
5	7.9	10.8	13.7	16.6	19.7	22.9	26.2	29.6	33.1	36.8	40.5	44.4	48.4	52.6	57.0	61.5	66.2
10	5.3	8.1	10.9	13.9	16.9	20.0	23.3	26.6	30.1	33.7	37.4	41.2	45.2	49.3	53.6	58.1	62.7
15	2.6	5.4	8.2	11.2	14.1	17.2	20.4	23.7	27.1	30.6	34.3	38.1	42.0	46.0	50.3	54.7	59.2
20	0	2.7	5.5	8.3	11.3	14.3	17.5	20.7	24.1	27.6	31.2	34.9	38.7	42.7	46.9	51.2	55.7
25		0	2.7	5.6	8.4	11.5	14.6	17.9	21.1	24.5	28.0	31.7	35.5	39.5	43.6	47.8	52.2
30			0	2.8	5.6	8.6	11.7	14.8	18.1	21.4	24.9	28.5	32.3	36.2	40.2	44.5	48.8
35				0	2.9	5.7	8.7	11.8	15.1	18.4	21.8	25.8	29.6	32.9	36.9	41.0	45.3
40					0	2.9	5.8	8.9	12.0	15.3	18.7	22.2	26.3	29.6	33.5	37.6	41.8

ภาคผนวก ค

วิธีการคำนวณ

1. คำนวณหา bacteriocin activity โดยวิธี critical dilution assay

วิธี critical dilution assay เป็นวิธีที่นิยมใช้เพื่อวัดกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเมื่อไม่มีสารมาตรฐานที่ใช้เพื่อเปรียบเทียบ เมื่อพิจารณาตามหลักการแล้ววิธีการนี้คล้ายกับเทคนิคการหาความเข้มข้นต่ำสุดที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญ (minimum inhibitory concentration) เทคนิคสำหรับวัดค่า antibiotic potency วิธีการ critical dilution assay นี้จะต้องทำการเจือจางเชื้อจุลินทรีย์ที่เพาะเลี้ยง (culture) หรือ สารที่ได้จากการหมัก (fermentate) ที่จะนำทดสอบ (ปกติมักทำการเจือจางแบบ 2 เท่าหลาย ๆ ระดับความเจือจาง) และใช้หยดในปริมาณน้อย เช่น 5 ไมโครลิตร) ลงบนผิวหน้าอาหาร soft agar ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์อยู่ หลังจากนำจานเพาะเชื้อไปบ่มแล้ว สังเกตบริเวณของการยับยั้งรอบบริเวณที่ได้หยดสารซึ่งได้ทำการเจือจางเพื่อทดสอบถึงการมีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ค่า dilution factor สูงที่สุดที่สามารถทำให้เกิดบริเวณการยับยั้งชี้ให้เห็นถึงกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ดังนั้นกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน (bacteriocin activity) ซึ่งทราบกันว่าคือค่า arbitrary units (AU) ซึ่งสามารถคำนวณได้ดังนี้ (Yousef และ Carlstrom. 2003)

$$\frac{\text{AU}}{\text{ml culture}} = \frac{1}{\text{dilution factor ที่สูงสุดที่เกิดการยับยั้ง (DFi)}} \quad \frac{1000}{\text{ปริมาตรของ dilution ที่หยดลงในหลุม (ไมโครลิตร)}}$$

เช่น ถ้าหยดครั้งละ 5 ไมโครลิตร ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้ออินดิเคเตอร์อยู่ดังนั้น AU/ml เท่ากับ 200/DFi ตัวอย่างเช่น ถ้าสารที่ได้จากการหมักซึ่งทำการเจือจางตั้งแต่ระดับความเจือจางที่ $1/2^1$ - $1/2^8$ ทำให้เกิดบริเวณยั้บยั้งการเจริญ (เช่นวงใส) ที่ทุกระดับการเจือจางตั้งแต่ที่ $1/2^1$ - $1/2^7$ แต่ที่ระดับความเจือจาง $1/2^8$ ไม่เกิดโซนการยับยั้งดังนั้นค่า AU/ml = $200/(1/2^7)$ = 25,600 ซึ่งมีค่า AU จะต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาวะที่ทดสอบ