**รายงานการวิจัย**

**ชื่อโครงการภาษาไทย: การผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพ**

**ชื่อโครงการภาษาอังกฤษ: Production of bacteriocins from lactic acid bacteria for use as food biopreservatives**

**ชื่อผู้วิจัย: นางสาวสุรีย์ นานาสมบัติ หัวหน้าโครงการวิจัย**

ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ

พ. ศ. 2554

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ชื่อโครงการวิจัยภาษาไทย: การผลิตแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพ

ชื่อโครงการวิจัยภาษาอังกฤษ: Production of bacteriocins from lactic acid bacteria for use as food biopreservatives

แหล่งเงิน เงินรายได้

ประจำปีงบประมาณ 2554 จำนวนเงินที่ได้รับการสนับสนุน 152,210 บาท

ระยะเวลาดำเนินการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม พ.ศ. 2553 ถึง กันยายน พ.ศ. 2554

หัวหน้าโครงการวิจัย: รศ .ดร .สุรีย์ นานาสมบัติ

หน่วยงานต้นสังกัด: สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อีเมลล์: knsuree@kmitl.ac.th

คำสำคัญ (Keywords): bacteriocins, lactic acid bacteria, *Listeria monocytogenes*, biopreservatives, chilled ground pork

## บทคัดย่อ

ในการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LS0602 และเชื้อ *Lactobacillus brevis* LT0904 ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ (25-42 องศาเซลเซียส) และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชต่างกัน (พีเอช 4-8) ไม่มีผลทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินแตกต่างกัน (12,800 AUต่อมิลลิลิตรเท่ากัน) การเพิ่มความเข้มข้นของกลูโคส (30-40 กรัมต่อลิตร) และทริปโตน (10 กรัมต่อลิตร) ในอาหาร MRS สูตรปกติช่วยกระตุ้นการผลิตแบคเทอริโอซิน นอกจากนี้การเติม $K_2HPO_4$ ทำให้เชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีกิจกรรมสูงถึง 25,000 AUต่อมิลลิลิตรเช่นเดียวกับการเพิ่มความเข้มข้นของยีสต์สกัดเป็น 20 กรัมต่อลิตร และ $K_2HPO_4$ ความเข้มข้น 20 กรัมต่อลิตรเพื่อผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ทั้งนี้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 จะมีกิจกรรมสูงเมื่อเติม $KH_2PO_4$ ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรแทน $K_2HPO_4$ ความเข้มข้น 2 กรัมต่อลิตรในสูตรอาหาร MRS ปกติ จากนั้นนำส่วนใสที่ปราศจากเซลล์มาผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ด้วยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต การทำไดอะไลซิส และการตกตะกอนด้วยกรดไตรคลอโรแอซิติกและนำมาศึกษาความคงตัวต่ออุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ผลปรากฏว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* LS0602 มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิสูงสุด 85 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที และส่วนแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. brevis* LT0904 ไม่สูญเสียกิจกรรมการยับยั้งเมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิสูงสุด 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แบคเทอริโอซินจากเชื้อทั้งสองชนิดมีความคงตัวในสภาพที่มี pH 7 และในสภาพที่มีเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ เช่น α-amylase, lipase, papain, pepsin และ trypsin trypsin นอกจากนี้แบคเทอริ

โอซินจากเชื้อทั้งสองยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลวได้ดีจึงได้ทดลองใช้แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อทั้งสองในการควบคุมการเจริญของ *L. monocytogenes* ในหมูบดแช่เย็นและในแหนม พบว่าการเติมแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 4) ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 ให้ผลดีกว่าการเติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. brevis* LT0904 ในการลดจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในหมูบดระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และได้ศึกษาผลของแบคเทอริโอซิน (ร้อยละ 4) ร่วมกับกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการควบคุมเชื้อ *L. monocytogenes* ในระหว่างการหมักแหนมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ผลปรากฏว่าการเติมแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* LS0602 (ร้อยละ 4) ร่วมกับกล้าเชื้อ *L. plantarum* LS0602 ในแหนมสามารถลดจำนวน *L. monocytogenes* ได้ถึง 1.5 log cycle เมื่อหมักครบ 3 วัน

# Abstract

The optimum temperature, pH and medium components for bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* LS0602 and *Lactobacillus brevis* LT0904 to inhibit the growth of *Listeria monocytogenes* were studied. No significant differences in bacteriocin activity were observed when both strains were cultured in MRS broth at 25-42 $^{o}$C and pH 4-8 (12,800AU/ml). High concentration of glucose (30-40 g/l) and tryptone (10g/l) in MRS broth stimulated their bacteriocin production. Maximum bacteriocin activity by *L. plantarum* LS0602 (25,600 AU/ml) was recorded in MRS broth with 5g/l $K_2HPO_4$, while 20g/l yeast extract and 20g/l $K_2HPO_4$ in MRS broth resulted in the same bacteriocin activity by *L. brevis* LT0904. In addition, bacteriocin production by *L. brevis* LT0904 was stimulated in MRS broth with 2g/l $K_2HPO_4$ replaced by 2g/l $KH_2PO_4$. The bacteriocins in cell-free supernatant were partial purified by ammonium sulfate precipitation, dialysis and trichloroacetic acid precipitation, and subsequently tested for their stability to heat, pH and enzymes. The bacteriocins from *L. plantarum* LS0602 and *L. brevis* LT0904 were not inactivated after treatment at highest temperature of 85$^{o}$C for 30 min and 72$^{o}$C for 30 min, respectively. The bacteriocins from both strains maintained full stability at pH 7 and after treatments with α-amylase, lipase, papain, pepsin and trypsin. They also exhibited strong inhibitory activity against *Listeria monocytogenes* in MRS broth. Then, these bacteriocins were used to control the growth of *L. monocytogenes* in ground pork during storage at 4$^{o}$C and in nham during fermentation at 30$^{o}$C. The bacteriocins (4%) produced by *L. plantarum* LS0602 were more effective to reduce the total bacterial counts and *L. monocytogenes* counts in chilled ground pork than those produced by *L. brevis* LT0904, whereas the bacteriocins (4%) in combination with *L. plantarum* LS0602 could reduce the number of *L. monocytogenes* in nham for 1.5 log cycle after 3-day fermentation.

# สารบัญ


| | หน้า |
|---|---|
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง/การทบทวนวรรณกรรม | 3 |
| บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย | 8 |
| บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิจารณ์ | 18 |
| บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ | 35 |
| บรรณานุกรม | 37 |