SWU Sci. J. Vol. 23 No. 2 (2007)

บทความวิจัย

การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

สมใจ ศิริโภค* ประวัติ อังประภาพรชัย
ขจีนาฏ โพธิเวชกุล และ อรอนงค์ พริ้งศุลกะ

บทคัดย่อ

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) จากอาหารหมักจำนวน 50 ตัวอย่าง พบว่าได้แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ทั้งหมด 131 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างท่อน 110 ไอโซเลท รูปไข่ 7 ไอโซเลท และทรงกลม 14 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR 118 โดยวิธี agar spot assay พบว่า LAB ที่แยกได้ 73 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ เมื่อนำไปทดสอบต่อโดยวิธี agar well diffusion assay พบว่า 21 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยมี 8 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูงที่สุด แต่ไอโซเลทที่มีความคงตัวในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ เชื้อรหัส FFL17-2 ซึ่งแยกได้จากปลาส้มฟัก กลุ่มแม่บ้านเกษตรกรเชียงงา จังหวัดลพบุรี การจัดจำแนกเชื้อรหัส FFL17-2 โดยใช้ API 20 Strep (BioMerieux) พบว่าเป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* เมื่อนำ culture supernatant ที่ได้จากเชื้อรหัส FFL17-2 ไป treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่ายับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้น้อยลง แสดงว่าสารที่ออกฤทธิ์เป็นโปรตีน และน่าจะเป็นแบคทีริโอซิน

การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 พบว่าทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 นาที มีความคงตัวดีในช่วง pH 4-7 มี antibacterial spectrum ค่อนข้างกว้าง เพราะนอกจากจะยับยั้ง *S. aureus* ซึ่งเป็นเชื้อโรคอาหารเป็นพิษได้ดีแล้ว ยังสามารถยับยั้ง *Lactobacillus sakei, Lb. plantarum, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus pentosaceus, Streptococcus salivarius, Lactococcus cremoris, Bacillus cereus, B. circulans, B. coagulans* และ *Listeria monocytogenes* ได้อีกด้วย และเมื่อเปรียบเทียบ antibacterial activity กับไนซิน พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ประมาณ 75% ของ commercial nisin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก แบคทีริโอซิน

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ
*ผู้นิพนธ์ประสานงาน, email: somjaisi@swu.ac.th

Screening and Identification of Bacteriocin-Producing Lactic acid Bacteria from Fermented Foods and Preliminary Characterization of the Bacteriocin

Somjai Siripoke*, Prawat Aungpraphapornchai, Kajeenart Pothivejkul and Onanong Pringsulaka

ABSTRACT

One hundred and thirty-one isolates of lactic acid bacteria (LAB) were isolated from 50 fermented food samples. Among these isolates, 110 were rod-shaped, 7 were oval-shaped and 14 were coccoid-shaped. Agar spot assay using *Staphylococcus aureus* TISTR 118 as the test organism revealed that 73 isolates could inhibit *S. aureus*. Furthermore, agar well diffusion assay of the 73 isolates showed that 21 isolates could inhibit *S. aureus*. Among these, there were 8 isolates which showed the highest antibacterial activities, however, the antibacterial capability of the isolate FFL17-2, isolated from fermented minced-fish (Pla-Som-Fug) from Lopburi Province, was found to be more stable than those of the others. The isolate FFL17-2 was identified as *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* using API 20 Strep (BioMerieux). Treatment of culture supernatant obtained from the isolate FFL17-2 with proteolytic enzymes could neutralize its antibacterial activity, therefore, suggesting that the antibacterial substance was protein, probably bacteriocin.

Characterization of the bacteriocin from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 showed that its activity was not affected when treated at 100 °C for 10 minutes, and was stable at pH 4-7. In addition, it was found to be a broad-spectrum bacteriocin which could inhibit *S. aureus*, *Lactobacillus sakei, Lb. plantarum, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus pentosaceus, Streptococcus salivarius,*

Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University
*Corresponding author, email: somjaisi@swu.ac.th

Lactococcus cremoris, Bacillus cereus, B. circulans, B. coagulans and *Listeria monocytogenes.* The antibacterial activity against *S. aureus* was estimated to be equivalent to 75% of 50 mg/ml commercial nisin.

Keywords: Lactic acid bacteria, bacteriocin

บทนำ

ความปลอดภัยของอาหารเป็นเรื่องสำคัญยิ่งสำหรับผู้ผลิตอาหารและผู้ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการออกกฎหมายเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับประทานอาหารที่ปลอดภัย ปราศจากเชื้อก่อโรคและสารเคมีที่เป็นพิษต่อร่างกาย ในปัจจุบันแม้ว่าความรู้ทางจุลชีววิทยาจะก้าวหน้าขึ้นมาก แต่อัตราการเกิดโรคอาหารเป็นพิษทั่วโลกก็ยังคงเพิ่มสูงขึ้น [1] เนื่องจากวัฒนธรรมในการบริโภคอาหารของมนุษย์ได้เปลี่ยนแปลงไปตามสภาพเศรษฐกิจ กล่าวคือมีการบริโภคอาหารสำเร็จรูป อาหารกึ่งสำเร็จรูป อาหารพร้อมปรุง อาหารพร้อมรับประทาน อาหารแช่เย็น และอาหารแช่แข็งกันอย่างแพร่หลาย เพราะสะดวกและประหยัดเวลา ขณะเดียวกันผู้บริโภคก็มีความสนใจเกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพกันมากขึ้น ผู้ผลิตอาหารจึงต้องลดปริมาณการใช้เกลือ น้ำตาล และสารกันเสีย และนำวิธีการอื่นเข้ามาช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารแทน เช่น การใช้ระบบทำความเย็น การใช้ภาชนะบรรจุที่ดัดแปลงสภาพบรรยากาศ หรือทำให้เกิดสภาพสุญญากาศ เพื่อลดปัญหาการเสื่อมเสียเนื่องจากจุลินทรีย์ รวมทั้งการใช้แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) ทดแทนการใช้สารเคมีหรือสารปฏิชีวนะ ซึ่งอาจก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของผู้บริโภค [2-6]

แบคทีริโอซิน เป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีน หรือเปปไทด์ ซึ่งสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียหลายชนิด แต่ที่สำคัญในอุตสาหกรรมอาหาร ได้แก่ แบคทีริโอซินที่สร้างขึ้นจาก LAB [7] เนื่องจาก LAB เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมักชนิดต่างๆ ซึ่งมนุษย์บริโภคมาเป็นเวลานานแล้ว ดังนั้นผู้บริโภคส่วนใหญ่จึงยอมรับว่า LAB ที่แยกได้จากอาหารหมัก เป็น food-grade organism ที่ปลอดภัย (generally recognized as safe, GRAS) [8] และเนื่องจากแบคทีริโอซินมีโครงสร้างเป็นโปรตีนซึ่งถูกย่อยสลายได้ในระบบย่อยอาหารของมนุษย์ จึงมีแนวโน้มที่ปลอดภัยสำหรับใช้ในอาหารได้ [1, 7, 9]

แบคทีริโอซินที่สร้างจาก LAB ส่วนใหญ่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับ LAB ชนิดที่สร้างแบคทีริโอซินนั้น อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีริโอซินจาก LAB บางชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* [10-15] ดังนั้นจึงทำให้มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับ LAB ที่ผลิตแบคทีริโอซินได้จากผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง เพื่อหาแนวทางในการนำมาใช้เป็น natural food preservative [11, 16, 17]

การค้นพบแบคทีริโอซินจาก LAB มีรายงานครั้งแรกตั้งแต่ปี ค.ศ. 1928 โดย Rogers พบว่า *Lactococcus lactis* สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus bulgaricus* ได้ [18] ต่อมาในปี ค.ศ. 1947 Mattick และ Hirsch ได้ศึกษาพบว่าสารที่ยับยั้งการเจริญของ

Lb. bulgaricus ได้นี้มีโครงสร้างทางเคมีเป็นเปปไทด์และตั้งชื่อว่าไนซิน [19] หลังจากนั้นมีการศึกษาพบว่าไนซินนอกจากจะยับยั้งการเจริญของ lactobacilli ได้แล้ว ยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้อีกหลายชนิด คือ streptococci, staphylococci, *Bacillus* spp. และ clostridia [11] และมีรายงานว่า LAB สายพันธุ์ที่สร้างไนซินได้สามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของ *Clostridium botulinum* [12] และยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes* ในระหว่างการผลิต Camembert cheese ได้ [13] ปัจจุบันไนซินได้รับการยอมรับในสหรัฐอเมริกาว่าปลอดภัย (GRAS) [20] และมีการนำไปใช้เป็นสารเสริมเพื่อช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดทั่วโลก [21]

ในระยะเวลากว่า 20 ปีที่ผ่านมานี้มีการศึกษาเกี่ยวกับการผลิตแบคทีริโอซินจาก LAB ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง และมีรายงานว่า LAB หลายชนิดในจีนัส *Carnobacterium, Enterococcus, Lactococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissella* สามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ [16, 22]

ตัวอย่างอาหารที่มีรายงานว่าพบแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้ มีทั้งผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น alfalfa sprouts, coleslaw, grapefruit juice [1], mixed salad, fermented carrot [23], bean-sprouts [24], ready-to-eat salad [25], kimchi [26] ผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ เช่น ground beef, ground chicken, bologna, ham, roast beef, salami, smoked mackerel [1, 27], Brazillian meat [8], fermented sausage [28], processed channel catfish [29], dry fermented sausage [30], dry sausage [31], Italian sausages [32], แหนม [15, 33] และผลิตภัณฑ์นม เช่น Farmhouse cheese, Gruyere cheese [1]

ประเทศไทยตั้งอยู่ในบริเวณที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง และมีอาหารหมักพื้นบ้านหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่มีการผลิตในระดับครัวเรือนโดยอาศัยกิจกรรมของ LAB ที่ปนเปื้อนมาในวัตถุดิบตามธรรมชาติ ซึ่งแตกต่างกันไปตามชนิดของอาหารหมัก แหล่งผลิต และวิธีการผลิต ดังนั้นจึงเห็นว่าควรทำการแยกเชื้อ LAB จากอาหารหมักชนิดต่างๆ เหล่านี้ นำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีริโอซินได้ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter) ในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัย และเป็นแนวทางในการผลิตแบคทีริโอซินสำหรับใช้ในการถนอมอาหารแทนสารเคมีอื่นซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างอาหารหมัก

ตัวอย่างอาหารหมักที่ใช้ในการแยกเชื้อ LAB ได้แก่ แหนมหมู แหนมใบมะยม แหนมเนื้อ แหนมปลากราย ปลาส้มฟัก ปลาส้ม ปลาจ่อม กุ้งจ่อม กุ้งส้ม ไส้กรอกเปรี้ยว ไส้กรอกปลาหอมดอง ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง กระหล่ำปลีดอง และแป้งขนมจีนหมัก จำนวนทั้งหมด 50 ตัวอย่าง

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

Staphylococcus aureus TISTR 118, *Lactobacillus sakei* 912 (ได้รับการเอื้อเฟื้อจาก รศ.ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์), *Lactobacillus plantarum* ATCC8014, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* JCM6124, *Pediococcus pentosaceus* JCM5890, *Streptococcus salivarius* JCM5707, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus coagulans*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium*

การแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก

นำตัวอย่างอาหารมาเจือจางให้เหมาะสม แล้วนำไป spread ลงบนอาหาร MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) agar ที่เติม $CaCO_3$ 1.0% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี นำไป restreak บนอาหาร MRS agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้อมสีแกรม ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส แล้วเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

การทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบ

การทดสอบด้วยวิธี agar spot assay

ทำโดย spot เชื้อ LAB ลงบนอาหาร bacteriocin screening medium (BSM) ซึ่งดัดแปลงมาจาก MRS และมีส่วนประกอบดังนี้คือ glucose 0.2%, meat extract 0.2%, tryptone 1%, yeast extract 0.4%, tween 80 0.1%, citric acid diammonium salt 0.2%, $MgSO_4.7H_2O$ 0.02%, $MnSO_4.4H_2O$ 0.005%, $K_2HPO_4.3H_2O$ 0.87%, KH_2PO_4 0.8% และวุ้น 1.5% [34] บ่มในสภาพไร้ออกซิเจนเพื่อป้องกันการสร้าง H_2O_2 และกรดอะซิติก [35] ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20-24 ชั่วโมง จากนั้นเททับด้วย NA soft agar (วุ้น 0.7%) ที่ผสมเชื้อทดสอบ (*S. aureus* TISTR 118) 7 มิลลิลิตร บ่มต่อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยดูการเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีของ LAB

การทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

นำ LAB ไปเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เซนตริฟิวจ์แยกเซลล์ออก นำส่วนใสไปปรับ pH ให้เป็นกลาง กรองให้ปราศจากเชื้อ โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร ได้เป็น crude filtrate supernatant fluid (CFSF) จากนั้นปิเปต CFSF 50 ไมโครลิตร ใส่ลงหลุมในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็งผสมเชื้อทดสอบซึ่งเจาะหลุมไว้แล้ว บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณใสรอบๆ หลุม

การทดสอบยืนยันว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นโปรตีน

นำ CFSF ที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบได้มา treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (pancreatin และ trypsin) โดยใช้ตัวอย่าง CFSF 50 ไมโครลิตร ผสมเอนไซม์ (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) 10 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ treat ด้วยเอนไซม์ (เติมน้ำกลั่น 10 ไมโครลิตร แทนเอนไซม์)

การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้

นำ LAB ที่สร้างแบคทีริโอซินได้ไปศึกษาสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ API 20 Strep (BioMerieux, France) นำผลที่ได้มาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม APILAB Plus (v.3.2.2)

การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้

การทดสอบความสามารถในการทนความร้อนของแบคทีริโอซิน

นำ CFSF ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ กัน ก่อนนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

การทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินที่ pH ต่างๆ

นำ CFSF มาปรับ pH ให้อยู่ในช่วง pH 3-9 โดยใช้ 1 M HCl หรือ NaOH บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับ pH เป็น 7 แล้วจึงนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay

การศึกษา antibacterial spectrum

นำ CFSF ไปทดสอบ antibacterial spectrum ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดต่างๆ ดังนี้คือ *Staphylococcus aureus* TISTR118, *Lactobacillus sakei* 912, *Lb. plantarum* ATCC8014, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides* JCM6124, *Pediococcus pentosaceus* JCM5890, *Streptococcus salivarius* JCM5707, *Bacillus cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans*, *B. subtilis*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium*

การศึกษา antibacterial activity เปรียบเทียบกับ commercial nisin

นำ CFSF ไปทดสอบ antibacterial activity เปรียบเทียบกับ commercial nisin (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *S. aureus* TISTR118 เป็นเชื้อทดสอบ

ผลการทดลอง

การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ด้วยวิธี agar spot assay

การแยก LAB จากอาหารหมักชนิดต่างๆ จำนวน 50 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0% พบว่าได้แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสทั้งหมด 131 ไอโซเลท มีรูปร่างท่อน 110 ไอโซเลท รูปไข่ 7 ไอโซเลท และทรงกลม 14 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* TISTR118 ด้วยวิธี agar spot assay พบว่า 73 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยไอโซเลทที่ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือ FPB11-1 และ FPB11-3 (แยกได้จากแหนมใบมะยม) ซึ่งทำให้เกิดวงใสขนาด 26 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลท รูปร่าง และความสามารถในการผลิตสารยับยั้ง *S. aureus* TISTR118 ของ LAB ที่แยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar spot assay

ตัวอย่างอาหาร	จำนวนไอโซเลท	รูปร่าง	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm)
1. แหนมหมู ตลาดอโศก จ.กรุงเทพฯ	3	ท่อนสั้น	FPB1-1	12
		ท่อนสั้น	FPB1-2	12
		ท่อนสั้น	FPB1-3	-
2. แหนมหมู ตลาดอโศก จ.กรุงเทพฯ	3	รูปไข่	FPB2-1	12
		รูปไข่	FPB2-2	10
		ท่อนสั้น	FPB2-3	-
3. แหนมหมู เขตบางเขน จ.กรุงเทพฯ	2	ท่อนสั้น	FPB3-1	-
		ท่อนสั้น	FPB3-2	-
4. แหนมหมู ตลาดอุดมสุข จ.กรุงเทพฯ	2	ท่อนสั้น	FPB4-1	-
		ท่อนสั้น	FPB4-2	-
5. แหนมหมู จ.สมุทรปราการ	2	ทรงกลม	FPS5-1	-
		ท่อนสั้น	FPS5-2	10
6. แหนมหมู จ.ปทุมธานี	2	ท่อนสั้น	FPP6-1	12
		รูปไข่	FPP6-2	12

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	จำนวนไอโซเลท	รูปร่าง	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm)
7. แหนมหมู จ.ลำพูน	3	ท่อน	FPL7-1	-
		ท่อนสั้น	FPL7-2	-
		ทรงกลม	FPL7-3	-
8. แหนมหมู จ.ปราจีนบุรี	3	ท่อน	FPP8-1	7
		ท่อน	FPP8-2	12
		ทรงกลม	FPP8-3	-
9. แหนมหมู จ.ร้อยเอ็ด	3	ท่อน	FPR9-1	10
		ท่อน	FPR9-2	6
		ทรงกลม	FPR9-3	-
10. แหนมหมู จ.พิจิตร	3	ท่อน	FPP10-1	-
		ท่อน	FPP10-2	10
		ทรงกลม	FPP10-3	-
11. แหนมใบมะยม เขตบางเขน จ.กรุงเทพฯ	4	ท่อนสั้น	FPB11-1	26
		ท่อนสั้น	FPB11-2	24
		ท่อนสั้น	FPB11-3	26
		ท่อนสั้น	FPB11-4	24
12. แหนมใบมะยม จ.อำนาจเจริญ	3	ท่อนสั้น	FPA12-1	6
		ทรงกลม	FPA12-2	4
		ท่อน	FPA12-3	9
13. แหนมเนื้อ ตลาดอุดมสุข จ.กรุงเทพฯ	2	ท่อนสั้น	FBB13-1	-
		ท่อนสั้น	FBB13-2	-
14. แหนมปลากราย ตลาดนัด มศว จ.กรุงเทพฯ	3	ท่อน	FFB14-1	19
		ท่อน	FFB14-2	22
		ท่อน	FFB14--3	4
15. แหนมปลากราย ส. กิจวัฒนาฟู้ดส์ จำกัด จ.กรุงเทพฯ	3	ท่อนสั้น	FFB15-1	-
		ท่อนสั้น	FFB15-2	-
		ท่อนสั้น	FFB15-3	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	จำนวนไอโซเลท	รูปร่าง	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm)
16. แหนมปลากราย ตลาดบางซื่อ จ.กรุงเทพฯ	2	ท่อนสั้น	FFB16-1	-
		ท่อนสั้น	FFB16-2	-
17. ปลาส้มฟัก กลุ่มแม่บ้านเกษตรกร เชียงงา จ.ลพบุรี	3	ท่อนสั้น	FFL17-1	5
		รูปไข่	FFL17-2	15
		ท่อนสั้น	FFL17-3	-
18. ปลาส้มฟัก ประกอบจิตร์ จ.ลพบุรี	2	ท่อนสั้น	FFL18-1	-
		ท่อนสั้น	FFL18-2	5
19. ปลาส้ม ตลาดนัด มศว จ.กรุงเทพฯ	3	ท่อน	FFB19-1	-
		ท่อน	FFB19-2	-
		ท่อน	FFB19-3	-
20. ปลาส้ม ตลาดนัด มศว จ.กรุงเทพฯ	4	ท่อนสั้น	FFB20-1	4
		ท่อนสั้น	FFB20-2	4
		ท่อนยาว	FFB20-3	20
		ท่อนยาว	FFB20-4	14
21. ปลาส้ม ตลาดบางซื่อ จ.กรุงเทพฯ	2	ท่อนสั้น	FFB21-1	-
		ท่อนสั้น	FFB21-2	5
22. ปลาส้ม ตลาดอุดมสุข จ.กรุงเทพฯ	2	ท่อนสั้น	FFB22-1	-
		ท่อนสั้น	FFB22-2	-
23. ปลาส้ม ตลาดยิ่งเจริญ จ.กรุงเทพฯ	3	ท่อน	FFB23-1	7
		ท่อน	FFB23-2	16
		ท่อน	FFB23-3	14
24. ปลาส้ม ตลาดสำโรง จ.สมุทรปราการ	4	ท่อนสั้น	FFS24-1	15
		ท่อนสั้น	FFS24-2	15
		ท่อนยาว	FFS24-3	-
		ท่อนยาว	FFS24-4	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	จำนวนไอโซเลท	รูปร่าง	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm)
25. ปลาส้ม จ.อ่างทอง	3	ท่อนยาว	FFA25-1	-
		ท่อนยาว	FFA25-2	-
		ท่อนยาว	FFA25-3	-
26. ปลาส้ม จ.สุพรรณบุรี	2	ทรงกลม	FFS26-1	-
		ท่อนสั้น	FFS26-2	-
27. ปลาส้ม จ.ชัยนาท	2	ท่อนยาว	FFC27-1	-
		ท่อนสั้น	FFC27-2	10
28. ปลาส้ม จ.นครนายก	2	ท่อนสั้น	FFN28-1	-
		ท่อนยาว	FFN28-2	-
29. ปลาส้ม จ.อุบลราชธานี	3	ท่อน	FFU29-1	-
		ทรงกลม	FFU29-2	11
		ทรงกลม	FFU29-3	-
30. ปลาส้ม จ.ลพบุรี	3	ท่อนสั้น	FFL30-1	-
		ท่อน	FFL30-2	-
		ท่อนสั้น	FFL30-3	11
31. ปลาส้ม จ.พะเยา	2	ท่อน	FFP31-1	-
		ท่อน	FFP31-2	-
32. ปลาจ่อม ตลาดนัด มศว จ.กรุงเทพฯ	2	รูปไข่	PJB32-1	5
		ท่อนยาว	PJB32-2	-
33. ปลาจ่อม ตลาดสำโรง จ.สมุทรปราการ	2	ท่อนสั้น	PJS33-1	7
		ท่อนยาว	PJS33-2	-
34. กุ้งจ่อม ตลาดอุดมสุข จ.กรุงเทพฯ	2	ท่อนสั้น	KJB34-1	5
		ท่อนสั้น	KJB34-2	-
35. กุ้งจ่อม แม่กลอง จ.สมุทรสงคราม	2	ท่อนสั้น	KJS35-1	4
		ทรงกลม	KJS35-2	4

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	จำนวนไอโซเลท	รูปร่าง	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm)
36. กุ้งจ่อม จ.สมุทรสาคร	2	รูปไข่	KJS36-1	4
		ท่อนยาว	KJS36-2	3
37. กุ้งส้ม จ.ประจวบคีรีขันธ์	3	ท่อนยาว	KSP37-1	13
		ท่อนยาว	KSP37-2	-
		ท่อน	KSP37-3	7
38. ไส้กรอกเปรี้ยว ตลาดอโศก จ.กรุงเทพฯ	4	ท่อนสั้น	PSB38-1	12
		ท่อนสั้น	PSB38-2	10
		ท่อนสั้น	PSB38-3	15
		ท่อนสั้น	PSB38-4	17
39. ไส้กรอกเปรี้ยว หน้าโลตัส อ่อนนุช จ.กรุงเทพฯ	3	รูปไข่	PSB39-1	-
		ท่อนสั้น	PSB39-2	10
		ท่อนสั้น	PSB39-3	4
40. ไส้กรอกเปรี้ยว ตลาดยิ่งเจริญ จ.กรุงเทพฯ	2	ท่อน	PSB40-1	12
		ท่อน	PSB40-2	-
41. ไส้กรอกเปรี้ยว จ.นครราชสีมา	3	ท่อน	PSN41-1	9
		ท่อนยาว	PSN41-2	10
		ท่อน	PSN41-3	8
42. ไส้กรอกเปรี้ยว จ.สมุทรปราการ	2	ท่อนสั้น	PSS42-1	10
		ท่อนสั้น	PSS42-2	10
43. ไส้กรอกเปรี้ยว จ.ลพบุรี	2	ทรงกลม	PSL43-1	-
		ท่อนสั้น	PSL43-2	18
44. ไส้กรอกปลา จ.ชัยภูมิ	3	ท่อนสั้น	FSC44-1	-
		ท่อนสั้น	FSC44-2	15
		ท่อนสั้น	FSC44-3	15

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างอาหาร	จำนวนไอโซเลท	รูปร่าง	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm)
45. หอมดอง ตลาดนัด มศว จ.กรุงเทพฯ	4	ท่อน	FOB45-1	13
		ท่อน	FOB45-2	-
		ท่อนสั้น	FOB45-3	16
		ท่อนสั้น	FOB45-4	15
46. ผักกาดดอง จ.นครสวรรค์	2	ท่อน	FCN46-1	-
		ท่อนสั้น	FCN46-2	15
47. ผักเสี้ยนดอง จ.นครสวรรค์	2	ท่อน	PSN47-1	10
		ท่อนสั้น	PSN47-2	-
48. กระหล่ำปลีดอง จ.กรุงเทพฯ	2	ท่อนสั้น	SKB48-1	7
		ท่อนสั้น	SKB48-2	-
49. แป้งขนมจีนหมัก จ.ฉะเชิงเทรา	4	ทรงกลม	KJC49-1	12
		ทรงกลม	KJC49-2	14
		ท่อน	KJC49-3	10
		ท่อนยาว	KJC49-4	10
50. แป้งขนมจีนหมัก จ.นครสวรรค์	2	ท่อน	KJN50-1	-
		ทรงกลม	KJN50-2	10

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone

การทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

เมื่อนำ LAB จำนวน 73 ไอโซเลท ที่ยับยั้ง *S. aureus* ได้ จากการทดสอบด้วยวิธี agar spot assay มาทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่ามี 21 ไอโซเลทที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ และมี 8 ไอโซเลท ที่ให้ผลการยับยั้งดีที่สุด คือ เชื้อรหัส FPB11-3, FPB11-4, FFL17-2, FFS24-2, KSP37-1, PSB38-3, FSC44-2 และFSC44-3 ซึ่งทำให้เกิดบริเวณใสขนาด 15 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 2

อย่างไรก็ตามเนื่องจาก LAB เหล่านี้ส่วนใหญ่ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบไม่คงตัว เมื่อทำการทดลองไปได้ระยะหนึ่งพบว่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบลดลงค่อนข้างมาก ยกเว้นเชื้อรหัส FFL17-2 ดังนั้นในการทดลองต่อไปจึงทำการทดสอบเฉพาะเชื้อ FFL17-2 เท่านั้น

ตารางที่ 2 ความสามารถของ LAB ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay

ตัวอย่างอาหาร	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm)
1. แหนมหมู จ. ปทุมธานี	FPP6-1	8
	FPP6-2	8
2. แหนมใบมะยม จ. กรุงเทพฯ	FPB11-3	15
	FPB11-4	15
3. แหนมปลากราย จ. กรุงเทพฯ	FFB14-1	8
4. ปลาส้มฟัก จ. ลพบุรี	FFL17-2	15
5. ปลาส้ม จ. กรุงเทพฯ	FFB20-3	13
6. ปลาส้ม จ. สมุทรปราการ	FFS24-1	13
	FFS24-2	15
7. ปลาส้ม จ. ชัยนาท	FFC27-2	9
8. ปลาส้ม จ. ลพบุรี	FFL30-3	14
9. กุ้งส้ม จ. ประจวบคีรีขันธ์	KSP37-1	15
10. ไส้กรอกเปรี้ยว จ. กรุงเทพฯ	PSB38-3	15
	PSB38-4	13
11. ไส้กรอกเปรี้ยว จ. นครราชสีมา	PSN41-1	12
	PSN41-2	8
	PSN41-3	11
12. ไส้กรอกเปรี้ยว จ. สมุทรปราการ	PSS42-2	7
13. ไส้กรอกปลา จ. ชัยภูมิ	FSC44-2	15
	FSC44-3	15
14. ผักกาดดอง จ. นครสวรรค์	FCN46-2	12

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone

การทดสอบยืนยันว่าสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นโปรตีน

เมื่อนำ CFSF ที่ได้จากเชื้อรหัส FFL17-2 มา treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนก่อนนำไปวิเคราะห์ antibacterial activity พบว่าจะไม่ยับยั้งเชื้อทดสอบหรือยับยั้งได้น้อยลง เมื่อเปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ treat ด้วยเอนไซม์ ดังตารางที่ 3 แสดงว่าสารที่ยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นโปรตีนและอาจเป็นแบคทีริโอซิน

ตารางที่ 3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อ antibacterial activity ของ CFSF ที่ได้จากเชื้อรหัส FFL17-2 ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay

proteolytic enzyme	inhibition zone (mm)
control	15
pancreatin	-
trypsin	2

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone

การจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้

การจัดจำแนกชนิดของเชื้อรหัส FFL17-2 โดยการทดสอบสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ API 20 Strep (BioMerieux) พบว่าได้ผลดังตารางที่ 4 เมื่อนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม APILAB Plus (v.3.2.2) พบว่าเป็นเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนก 98%

ตารางที่ 4 ผลการวิเคราะห์สมบัติทางชีวเคมีของเชื้อรหัส FFL17-2 โดยใช้ API 20 Strep

tests	result
Acetoin production (VP)	+
Hippurate hydrolysis (HIP)	-
Esculin hydrolysis (ESC)	+
Pyrrolidonyl arylamidase (PYRA)	-
α-Galactosidase (αGAL)	-
β-Glucuronidase (βGUR)	-

ตารางที่ 4 (ต่อ)

tests	result
β-Galactosidase (βGAL)	-
Alkaline phosphatase (PAL)	-
Leucine aminopeptidase (LAP)	-
Arginine dihydrolase (ADH)	+
Acid production from	+
Ribose (RIB)	
Arabinose (ARA)	-
Mannitol (MAN)	+
Sorbitol (SOR)	-
Lactose (LAC)	+
Trehalos (TRE)	+
Inulin (INU)	-
Raffinose (RAE)	-
Amidon (AMD)	+
Glycogen (GLYG)	-

การทดสอบความสามารถในการทนความร้อนของแบคทีริโอซิน

การนำ CFSF ของเชื้อรหัส FFL17-2 ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63, 80, 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลาต่างๆ กัน ก่อนนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay เปรียบเทียบกับตัวอย่างที่ไม่ได้ผ่านความร้อน พบว่าได้ผลดังตารางที่ 5 แบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ FFL17-2 สามารถทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 นาที แต่ถ้าใช้เวลามากกว่า 10 นาที activity จะค่อยๆ ลดลง และถ้าใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

ตารางที่ 5 ผลของอุณหภูมิต่อ antibacterial activity ของ CFSF ที่ได้จากเชื้อรหัส FFL17-2 ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay

treatment (temperature/time)	inhibition zone (mm)
Control	12
63 °C 10 min	12
63 °C 20 min	12
63 °C 30 min	12
80 °C 10 min	12
80 °C 20 min	12
80 °C 30 min	12
100 °C 10 min	12
100 °C 20 min	8
100 °C 30 min	6
121 °C 15 min	-

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone

การทดสอบความคงตัวของแบคทีริโอซินที่ pH ต่าง ๆ

จากการนำ CFSF ของเชื้อรหัส FFL17-2 ไปปรับ pH ให้อยู่ในช่วง 3-9 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปรับ pH เป็น 7 แล้วจึงนำไปทดสอบ antibacterial activity โดยวิธี agar well diffusion assay พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 6 แบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อรหัส FFL17-2 มีความคงตัวดีในช่วง pH 4-7 แต่ถ้าเก็บที่ pH ต่ำหรือสูงกว่านี้ activity จะลดลง

ตารางที่ 6 ผลของ pH ต่อ antibacterial activity ของ CFSF ที่ได้จากเชื้อรหัส FFL17-2 ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* เมื่อทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay

pH	inhibition zone (mm)
3	6
4	12
5	12
6	12
7	12
8	9
9	9

การศึกษา antibacterial spectrum

การทดสอบ antibacterial spectrum ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้เชื้อทดสอบชนิดต่างๆ พบว่าได้ผลดังแสดงในตารางที่ 7 แบคทีริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อรหัส FFL17-2 สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ LAB ชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบได้ดี ยกเว้น *Lactococcus lactis* สำหรับแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ พบว่ายับยั้ง *B. cereus*, *B. circulans*, *B. coagulans* และ *L. monocytogenes* ได้เล็กน้อย แต่ไม่ยับยั้ง *B. subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้ทดสอบทุกชนิด

ตารางที่ 7 ผลของ CFSF ที่ได้จากเชื้อรหัส FFL17-2 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่างๆ เมื่อทดสอบ โดยวิธี agar well diffusion assay

indicator strains	inhibition zone (mm)
Staphylococcus aureus	12
Lactobacillus sakei 912	15
Lactobacillus plantarum ATCC8014	10
Lactococcus lactis	-
Leuconostoc mesenteroides JCM6124	10
Pediococcus pentosaceus JCM5890	8
Streptococcus salivarius JCM5707	8

ตารางที่ 7 (ต่อ)

indicator strains	inhibition zone (mm)
Bacillus cereus	4
Bacillus circulans	4
Bacillus coagulans	4
Bacillus subtilis	-
Listeria monocytogenes	4
Enterobacter aerogenes	-
Escherichia coli	-
Salmonella typhimurium	-

หมายเหตุ: - = ไม่มี inhibition zone

การศึกษา antibacterial activity เปรียบเทียบกับ commercial nisin

จากการนำ CFSF ของเชื้อรหัส FFL17-2 ไปทดสอบ antibacterial activity เปรียบเทียบกับ commercial nisin ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *S. aureus* เป็นเชื้อทดสอบ พบว่าได้ผลดังตารางที่ 8 CFSF ของเชื้อรหัส FFL17-2 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ประมาณ 75% ของ commercial nisin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ตารางที่ 8 Antibacterial activity ของ CFSF ของเชื้อ FFL17-2 เปรียบเทียบกับไนซิน

sample	inhibition zone (mm)
commercial nisin (50 mg/ml)	16
CFSF ของเชื้อ FFL17-2	12

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกเชื้อ LAB จากอาหารหมักจำนวน 50 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร MRS ที่เติม $CaCO_3$ 1.0% พบว่าได้แบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส จำนวน 131 ไอโซเลท เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* TISTR 118 โดยวิธี agar spot assay พบว่ามี 73 ไอโซเลท ที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ และเมื่อนำไปทดสอบต่อโดยวิธี agar well diffusion assay พบว่ามี 21 ไอโซเลท ที่ยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยมี 8 ไอโซเลทที่ยับยั้ง *S. aureus* ได้มากที่สุด 15 มิลลิเมตร แต่เชื้อที่มีความคงตัวในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือเชื้อรหัส FFL17-2 ซึ่งเป็นเชื้อรูปไข่ ที่แยกได้จาก

ปลาส้มฟักของกลุ่มแม่บ้านเกษตรกรเชียงงา จ.ลพบุรี และเมื่อทดสอบโดยใช้ API 20 Strep (BioMerieux) พบว่ามีความน่าจะเป็นเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนกสูงถึง 98%

เมื่อนำสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบจากเชื้อรหัส FFL17-2 ไป treat ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (pancreatin และ trypsin) พบว่าจะยับยั้งเชื้อทดสอบได้น้อยลง แสดงว่าสารที่ยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นโปรตีนและอาจเป็นแบคทีริโอซิน

การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 พบว่ามีความคงตัวดีในช่วง pH 4-7 ทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 นาที แต่ถ้าใช้เวลามากกว่า 10 นาที activity จะค่อยๆ ลดลง และถ้าใช้อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus*

การศึกษา antibacterial spectrum ของแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อรหัส FFL17-2 พบว่ายับยั้ง *S. aureus* และ LAB ชนิดต่างๆ ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบได้ดี คือ *Lactobacillus sakei, L. plantarum, Leuconostoc mesenteroides, Pediococcus pentosaceus, Streptococcus salivarius* และยับยั้ง *Latococcus cremoris* ได้เล็กน้อย แต่ไม่สามารถยับยั้ง *Lactococcus lactis* ได้ สำหรับแบคทีเรียกลุ่มอื่นๆ พบว่ายับยั้ง *Bacillus cereus*, *B. circulans, B. coagulans* และ *Listeria monocytogenes* ได้เล็กน้อย แต่ไม่ยับยั้ง *B. subtilis* และแบคทีเรียแกรมลบทุกชนิดที่ใช้ทดสอบ คือ *Enterobacter aerogenes, Escherichia coli* และ *Salmonella typhimurium* จะเห็นได้ว่าแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อรหัส FFL17-2 มี antibacterial activity ค่อนข้างกว้าง (broad spectrum) คล้ายไนซิน [3, 15) และจากการทดสอบ antibacterial activity เปรียบเทียบกับ commercial nisin พบว่าแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ FFL17-2 สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ประมาณ 75% ของ commercial nisin ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากงานวิจัยนี้จะเห็นได้ว่า *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษได้หลายชนิด โดยเฉพาะยับยั้ง *S. aureus* ได้ดี นอกจากนี้ยังยับยั้ง *B. cereus* และ *Listeria monocytogenes* ได้อีกด้วย ดังนั้นจึงอาจนำไปใช้เป็น starter ในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัยและได้มาตรฐาน หรือนำไปใช้ในการผลิตสารยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษในอาหารที่มี pH 4-7 หรือใช้ถนอมอาหารร่วมกับความร้อนไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส 10 นาทีได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ รศ.ดร.สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ได้เอื้อเฟื้อให้เชื้อทดสอบสำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ และขอบคุณ ผศ.ดร.เอก แสงวิเชียร ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ซึ่งได้อนุเคราะห์ให้เอนไซม์มาใช้ในการทดสอบ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปี 2548-2549

เอกสารอ้างอิง

1. Kelly, W. J., Asmundson, R. V. and Huang, C. M. 1996. Isolation and Characterization of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Ready-to-eat Food Products. *International Journal of Food Microbiology* 33: 209-218.
2. Kim, W. J. 1993. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria: Their Potentials as Food Biopreservative. *Food Reviews International* 9: 199-313.
3. Abbe, T., Krockel, L. and Hill, C. 1995. Bacteriocins: Modes of Action and Potentials in Food Preservation and Control of Food Poisoning. *International Journal of Food Microbiology* 28: 169-185.
4. Holzapfel, W. H., Geizen, R. and Schillinger, U. 1995. Biological Preservation of Foods with Reference to Protective Cultures, Bacteriocins and Food Grade Enzymes. *International Journal of Food Microbiology* 24: 343-362.
5. Schillinger, U., Geisen, R. and Holzapfel, W. H. 1996. Potential of Antagonistic Microorganisms and Bacteriocins for the Biological Preservation of Foods. *Trends in Food Science and Technology* 7: 158-164.
6. Caplice, E. and Fitzgerald, G. F. 1999. Food Fermentations: Role of Microorganisms in Food Production and Preservation. *International Journal of Food Microbiology* 50: 131-149.
7. Rodriguez, J. M., Martinez, M. I., Horn, N. and Dodd, H. M. 2002. Heterologous Production of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80: 101-116.
8. De Martinis, E. C. P. and Freitas, F. Z. 2003. Screening of Lactic Acid Bacteria from Brazilian Meats for Bacteriocin Formation. *Food Control* 14: 197-200.
9. Messens, W. and de Vuyst, L. 2002. Inhibitory Substances Produced by Lactobacilli Isolated from Sourdoughs-A Review. *International Journal of Food Microbiology* 72: 31-43.
10. Tagg, J. R., Dajani A. S. and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of Gram-Positive Bacteria. *Bacteriological Review* 40: 722-756.
11. Lindgren, S. E. and Dobrogosz, W. J. 1990. Antagonstic Activities of Lactic Acid Bacteria in Food and Feed Fermentations. *FEMS Microbiology Letters* 87: 149-163.
12. Okereke, A. and Montville, T. J. 1991. Bacteriocin Inhibition of *Clostridium botulinum* Spores by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Food Protection* 54: 349-353.

13. Maiser-Patin, S., Deschamps, N., Tatini, S. R. and Richard, J. 1992. Inhibition of *Listeria monocytogenes* in Camembert Cheese Made with a Nisin-Producing Starter. *Le Lait* 72: 249-263.
14. Adams, M. R. and Hall, C. J. 1988. Growth Inhibition of Food-Borne Pathogens by Lactic and Acetic Acids and Their Mixtures. *International Journal of Food Science and Technology* 23: 287-292.
15. Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. Isolation of Nisin-Producing *Lactococcus lactis* WNC 20 Strain from *Nham*, a Traditional Thai Fermented Sausage. *International Journal of Food Microbiology* 81: 137-145.
16. Adams, M. R. and Nicolaides, L. N. 1997. Review of the Sensitivity of Different Foodborne Pathogens to Fermentation. *Food Control* 8: 227-239.
17. Bredholt, S., Nesbakken, T. and Holck, A. 2001. Industrial Application of an Antilisterial Strain of *Lactobacillus sakei* as a Protective Culture and Its Effect on the Sensory Acceptability of Cooked, Sliced, Vacuum-Packaged Meats. *International Journal of Food Microbiology* 66: 191-196.
18. Rogers, L. A. 1928. The inhibiting effect of *Streptococcus lactis* on *Lactobacillus bulgaricus*. *Journal of Bacteriology* 16: 321.
19. Mattick, A. T. R. and Hirsch, A. 1947. Further Observation on an Inhibitory Substance (Nisin) from Lactic Streptococci. *Lancet* ii: 5-7.
20. FDA. 1988. Nisin Preparation: Affirmation of GRAS Status as a Direct Human Food Ingredient. *Federal Register* 53: 11247.
21. Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and Its Uses as a Food Preservative. *Food Technology* 40: 100-112.
22. Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. 1997. Lactic Acid Bacteria in Foods and Their Current Taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.
23. Uhlman, L., Schillinger, U., Rupnow, J. R. and Holzapfel, W. H. 1992. Identification and Characterization of Two Bacteriocin-Producing Strains of *Lactococcus lactis* Isolated from Vegetables. *International Journal of Food Microbiology* 16: 141-151.
24. Cai, Y., Ng, L. K. and Farber, J. M. 1997. Isolation and Characterization of Nisin-Producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from Bean-Sprouts. *The Journal of Applied Bacteriology* 83: 199-507.

25. Franz, C. M. A. P., Du Toit, M., Olasupo, N. A. and Holzapfel, W. H. 1998. Plantaricin D, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from Ready-To-Eat Salad. *The Journal of Applied Bacteriology* 26: 231-235.
26. Choi, H. J., Cheigh, C. I., Kim, S. B. and Pyun, Y. R. 2000. Production of a Nisin-Like Bacteriocin by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* A164 Isolated from Kimchi. *The Journal of Applied Bacteriology* 88: 563-571.
27. Garver, K. I. and Muriana, P. M. 1993. Detection, Identification and Characterization of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria from Retail Food Products. *International Journal of Food Microbiology* 19: 241-258.
28. Rekhif, N., Atrith, A. and Lefebvre, G. 1995. Activity of Plantaricin SA6, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* SA6 Isolated from Fermented Sausage. *The Journal of Applied Bacteriology* 78: 349-358.
29. Fricourt, B. V., Barefoot, S. F., Testin, R. F. and Hayasaka, S. S. 1994. Detection and Activity of Plantaricin F an Antimicrobial Substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 Isolated from Processed Channel Catfish. *Journal of Food Protection* 57: 698-702.
30. Rodriguez, J. M., Cintas, L. M., Casaus, P., Dodd, H. M., Hernandez, P. E and Gasson, M. J. 1995. Isolation of Nisin-Producing *Lactococcus lactis* Strains from Dry Fermented Sausages. *The Journal of Applied Bacteriology* 78: 109-115.
31. Enan, G., el Essawy, A. A., Uyttendaele, M. and Debevere, J. 1996. Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 Isolated from Dry Sausage: Characterization, Production and Bactericidal Action of Plantaricin UG1. *International Journal of Food Microbiology* 30: 189-215.
32. Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R. and Manicardi, G. 2001. Detection and Preliminary Characterization of Bacteriocin (Plantaricin 35d) Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain. *International Journal of Food Microbiology* 64: 193-198.
33. Swetwiwathana, A., and Lothong, N. 1999. Selection of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Nham (Thai Fermented Meat). *International Conference on Asian Network on Microbial Research* (Nov. 29-Dec. 1, 1999). p. 543-548.
34. Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. 1992. Characterization of the Bacteriocins Curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and Sakacin P from *L. sake* LTH 673. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 460-468.

35. Schillinger, U. and Luecke, F.-K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Nham. *Applied and Environmental Microbiology* 55 (8): 1901-1906.

ได้รับบทความวันที่ 29 สิงหาคม 2550
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 17 ตุลาคม 2550