บทความวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผลิตสารแบคเทอริโอซิน เพื่อใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาขนมจีน

คณิน อิ่มทองคำ[1] สายทิพย์ สุรโชติ[1] และ จิราภรณ์ อนันต์ชัยพัทธนา[1*]

ได้รับบทความ: 15 กุมภาพันธ์ 2561
ได้รับบทความแก้ไข: 18 มิถุนายน 2561
ยอมรับตีพิมพ์: 20 มิถุนายน 2561

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลคติค (Lactic acid bacteria; LAB) บางสายพันธุ์มีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Bacillus cereus* TISTR 1449, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Escherichia coli* TISTR 527 ได้ จึงเป็นอีกหนึ่งทางเลือกที่ควรนำมาใช้ประโยชน์ในด้านการถนอมอาหาร ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากอาหารหมักพื้นบ้านไทยจำนวน 30 ตัวอย่าง โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคได้ 157 ไอโซเลทพร้อมทั้งทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุดโดยวิธี agar well diffusion หลังจากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการยืดอายุการเก็บรักษาขนมจีนเส้นสดโดยใช้ความเข้มข้นของ cell-free supernatant (CFS) ร้อยละ 20 ในขั้นตอนการแช่เส้นขนมจีนที่มีแบคทีเรียก่อโรคผสมอยู่ พบว่าแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ LC.13 มีความสามารถในการยืดอายุการเก็บรักษาขนมจีนได้นานกว่าชุดควบคุมและ CFS จากแบคทีเรียกรดแลคติคไอโซเลทอื่นที่แยกได้ในการทดลองนี้ถึง 24 ชั่วโมง และเมื่อระบุความใกล้เคียงของสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์ LC.13 มีร้อยละของความเหมือน กับ *Lactobacillus plantarum* เท่ากับ 99 จึงสรุปว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ คือ *L. plantarum* LC.13 ซึ่งมีความสามารถในผลิตสารต้านจุลชีพที่มีเพปไทด์เป็นองค์ประกอบที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและยืดอายุการเก็บรักษาขนมจีนซึ่งเป็นแนวทางหนึ่งในการพัฒนาต่อยอดสู่สารกันเสียทางชีวภาพที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติค แบคเทอริโอซิน ยืดอายุการเก็บรักษา ขนมจีน

[1]สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี
[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: chiraporn_a@rmutt.ac.th

Isolation of Bacteriocin Producing Lactic Acid Bacteria for Extending the Shelf Life of Kanom Jeen

Kanin Imtongkhum[1], Saithip Surachot[1], and Chiraporn Ananchaipattana[1*]

Received: 15 February 2018
Revised: 18 June 2018
Accepted: 20 June 2018

ABSTRACT

Some lactic acid bacteria (LAB) can produce bacteriocin, which is a potent inhibitor of pathogenic bacteria include of *Bacillus cereus* TISTR 1449, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 and *Escherichia coli* TISTR 527. It is an alternative source that should be used in the field of food preservation. In this study, 30 samples of Thai traditional fermented foods can be isolated form 157 isolates were selected. The lactic acid bacteria with the best ability to inhibit pathogens were selected by agar well diffusion method. The effectiveness of extending shelf-life of fresh rice noodles by using 20% ‹cell-free supernatant (CFS). Found, LC.13 lactic acid bacteria were able to prolong the retention time of the fresh rice noodles by up to 24 hours longer than the control and CFS from other lactic acid bacteria. The 16S rDNA sequence was found to be 99% similar to *Lactobacillus plantarum.* It was concluded that the isolated bacteria *L. plantarum* LC.13 can produce peptide antimicrobial agents. Compositions that have the ability to inhibit pathogens, and prolong the storage life of noodles, is one way to develop a bio-preservative that is safe for consumers.

Keywords: Lactic acid bacteria, Bacteriocin, Shelf life, Rice noodles

[1]Division of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajamangala University of Technology Thanyaburi, Pathum thani

*Corresponding author, email: chiraporn_a@rmutt.ac.th

บทนำ

ขนมจีน เป็นอาหารที่อยู่คู่กับประเทศไทยมาอย่างช้านาน ในปัจจุบันมีการทำขนมจีนอย่างกว้างขวางและมีการทำเป็นอุตสาหกรรมตั้งแต่อุตสาหกรรมในครัวเรือนจนกระทั่งถึงโรงงานขนาดใหญ่ แต่ขนมจีนยังมีข้อจำกัดในแง่ของการเก็บรักษาสภาพของขนมจีนมีอายุของการเก็บที่สั้นเพียงแค่ 1-2 วัน ฉะนั้นในปัจจุบันโรงงานอุตสาหกรรมขนาดใหญ่จึงได้มีการนำสารเคมีมาใช้เป็นวัตถุกันเสีย ตัวอย่างเช่น กรดเบนโซอิค โซเดียมเบนโซเอท [1] ในปัจจุบันความต้องการของผู้บริโภคเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้ผู้ผลิตอาหารเพิ่มมากขึ้นและผู้ผลิตอาหารจำหน่ายมีความต้องการเก็บรักษาอาหารที่ผลิตได้ให้ได้นานยิ่งขึ้นเพื่อที่จะสามารถส่งจำหน่ายได้ในพื้นที่ห่างไกลจากแหล่งผลิตจึงทำให้ผู้ผลิตส่วนใหญ่นิยมใช้สารเคมีในการถนอมอาหารมากขึ้นและบ่อยครั้งที่พบรายงานว่ามีการใช้ของสารดังกล่าวในปริมาณที่เกินมาตรฐานที่คณะกรรมการอาหารและยา (อย.) กำหนด ซึ่งหากผู้บริโภครับประทานติดต่อกันเป็นเวลานานจะทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบต่างๆ ในร่างกาย เช่น ระบบทางเดินอาหาร ระบบไหลเวียนโลหิต และระบบการขับถ่ายของเสีย เป็นต้น [2] อย่างไรก็ตามพบว่าสารต้านจุลชีพจากแบคทีเรียกรดแลคติคบางสายพันธุ์สามารถประยุกต์ใช้เป็นสารต้านจุลชีพทางชีวภาพในอาหารที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค ได้แก่ แบคเทอริโอซิน จัดเป็นสารต้านจุลชีพที่สามารถรับประทานได้และไม่ส่งผลเสียทางด้านสุขภาพแก่ผู้บริโภค เนื่องจากเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนขนาดเล็กจึงสามารถย่อยสลายได้ในกระเพาะอาหารและลำไส้ของผู้บริโภค จึงจัดเป็นสารในกลุ่มของ Generally recognized as safe (GRAS) [3] ซึ่งมีแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตสารแบคเทอริโอซินได้มีหลายสายพันธุ์แต่สายพันธุ์ที่ได้รับความนิยม คือ แบคทีเรียกรดแลคติค (Lactic acid bacteria; LAB) ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในการหมักและการถนอมอาหารที่มีรสเปรี้ยวที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ [4] เช่น แหนม ส้ม ปลาส้ม ปลาร้า อาหารดอง เป็นต้น แต่เนื่องจากปัจจุบันสารต้านจุลชีพแบคเทอริโอซินในรูปของสารบริสุทธิ์นั้นมีราคาสูงจึงทำให้อุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดเล็กยังไม่นิยมในการนำมาใช้เนื่องจากทำให้ต้นทุนการผลิตสูงขึ้น ดังนั้นเพื่อเป็นการส่งเสริมให้เกิดคุณภาพด้านความปลอดภัยของอาหารให้กับอุตสาหกรรมอาหารในกลุ่มของอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อมให้มีศักยภาพในการผลิตอาหารที่สามารถเก็บรักษาได้นานและปลอดภัยจากสารเคมีและการปนเปื้อนของแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งการนำแบคทีเรียกรดแลคติคที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้มาประยุกต์ใช้เพื่อยืดอายุผลิตภัณฑ์อาหารจึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีความเป็นไปได้ งานวิจัยนี้จึงคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากอาหารหมักต่างๆ ของไทย และคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตสารต้านจุลชีพที่มีเพปไทด์เป็นองค์ประกอบ เพื่อนำมาประยุกต์ใช้ยืดอายุการเก็บรักษาเส้นขนมจีน เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยต่อยอดและปรับประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมต่อไป

อุปกรณ์และวิธีทดลอง

1. การเลือกและการเตรียมตัวอย่างที่จะใช้ในการแยกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติค

ในการวิจัยได้ทำการคัดเลือกอาหารหมักดองพื้นเมืองของไทยจำนวน 30 ตัวอย่าง ที่สามารถพบได้ในท้องถิ่น 4 ภาค คือ ภาคเหนือ ภาคกลาง ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคใต้ ได้แก่ แหนมหมู แหนมปลา ไตปลา ผักเสี้ยนดอง ปลาร้า และผลไม้ดอง จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างทดสอบปริมาณ 25 กรัม โดยวิธีปลอดเชื้อ แล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีบดตัวอย่างด้วยเครื่อง stomacher

ด้วยความเร็วสูงสุด เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง [5]

2. การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างอาหารในการทดสอบ

นำตัวอย่างที่บ่มจนครบเวลามาทำการเจือจางตามลำดับส่วนในระดับการเจือจางที่เหมาะสมในสารละลาย peptone salt solution แล้วทำการปิเปตสารละลาย 0.1 มิลลิลิตร ลงบนผิวอาหาร MRS agar ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต ร้อยละ 0.3 แล้วทำการเกลี่ยสารละลายให้กระจายทั่วผิวหน้าอาหาร [6] พักไว้ประมาณ 5 นาทีให้อาหารเลี้ยงเชื้อดูดซับสารละลายแล้วเททับหน้าด้วยอาหาร MRS agar หนาประมาณ 2-3 มิลลิเมตร รอจนอาหารแข็งตัวแล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงและการเจริญทุก 24 ชั่วโมง ซึ่งโคโลนีที่ต้องการจะต้องเจริญอยู่ใต้อาหารที่เททับ มีโซนใสรอบโคโลนี สีขาวขุ่น หรือสีเหลือง และนำโคโลนีเดี่ยวที่ตรงตามลักษณะที่ต้องการทำการเลี้ยงบนอาหาร MRS agar อีกครั้ง เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วนำไปทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีบางประการได้แก่ การทดสอบปฏิกิริยาคะตาเลส [7] และการทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส [7] และทำการย้อมแกรมเพื่อสังเกตลักษณะของเซลล์ได้แก่ การติดสีที่ผนังเซลล์ รูปร่างและขนาดของเซลล์ เป็นต้น

3. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติคในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

3.1 การเตรียมจานทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion

นำแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Bacillus cereus* TISTR 1449, *Staphylococcus aureus* TISTR 746 และ *Escherichia coli* TISTR 527 เลี้ยงในอาหาร TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด นำแบคทีเรียก่อโรคแต่ละชนิดถ่ายใส่ในอาหาร soft TSA (Agar ร้อยละ 0.75 (w/v)) อัตราส่วนร้อยละ 1 (v/v) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน จากนั้นเทใส่จานเพาะเชื้อจานละ 25 มิลลิลิตร [8] ตั้งรอให้อาหารแข็งตัวแล้วจากนั้นเจาะรูวงกลมเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร เพื่อใช้ในข้อ 3.3

3.2 การเตรียม Cell-free supernatant (CFS) เพื่อทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคบางสายพันธุ์

นำแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่แรงเหวี่ยง 10,000 *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีแล้วแยกส่วนใสออก แล้วนำส่วนใสไปให้ความร้อนด้วยการต้มที่อุณหภูมิมากกว่า 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที [9]

3.3 การทดสอบ CFS เพื่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางสายพันธุ์ โดยวิธี Agar well diffusion

ปิเปต CFS 80 ไมโครลิตร ลงในหลุมในจานทดสอบที่เตรียมได้จากข้อ 3.1 โดยจะทำการทดสอบกับแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ แล้วจึงนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง และทำการวัดโซนใสรอบหลุมทดสอบ โดยทำการวัดทั้ง 4 ด้านในหน่วย มิลลิเมตร แล้วทำการหาค่าเฉลี่ย โดยแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกจะต้องมีโซนใสรอบหลุมทดสอบมากกว่า 2 มิลลิเมตรขึ้นไป [10]

4. การทดสอบยืนยันคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินใน CFS ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติค

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์ที่คัดเลือกไว้ในอาหาร MRS broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง แล้วถ่ายกล้าเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปบ่มเพาะในสภาวะเดิมอีกครั้ง ต่อไปทำการแยกตัวเซลล์ออกโดยการปั่นเหวี่ยงที่แรงเหวี่ยง 8,000 *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการแยกสารละลายส่วนใส (Supernatant) ออกใส่ภาชนะทำการปรับค่า pH ให้อยู่ที่ pH 5.0 ด้วย 1N NaOH แล้วกรองอีกครั้งด้วยหัวกรองที่มีขนาดรูพรุนที่ 0.22 ไมโครเมตร [11] โดยกรองใส่ภาชนะที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไปทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ ได้แก่

4.1 การทดสอบความทนต่ออุณหภูมิสูงและจุดเยือกแข็ง

นำ CFS มาทดสอบการทนต่ออุณหภูมิสูง โดยใช้อุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 10, 15, 20 และ 30 นาทีตามลำดับ และการทดสอบการทนต่อจุดเยือกแข็งที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 0, 1, 3, 5 และ 7 วัน ตามลำดับ แล้วนำสารที่ผ่านการทดสอบในสภาวะดังกล่าว มาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion แล้วนำไปบ่มที่สภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เป้าหมายแต่ละสายพันธุ์ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของโซนยับยั้งการเจริญ [12]

4.2 การทดสอบการเสียสภาพต่อ Proteolytic enzyme

นำ CFS มาบ่มที่อุณหภูมิที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นตั้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเท่าอุณหภูมิห้อง ทำการเติมเอนไซม์ Proteinase K ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ที่ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคด้วยวิธี Agar well diffusion แล้วนำไปบ่มที่สภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์เป้าหมายแต่ละสายพันธุ์ เป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง แล้ววัดขนาดของโซนยับยั้งการเจริญ [13]

5. การประยุกต์ใช้ CFS ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในขนมจีนเส้นสด

5.1 การเตรียมขนมจีนเส้นสด

นำแป้งข้าวเจ้าโม่ขนมจีนสำหรับทำเส้นสดจากโรงงานทำขนมจีน ในจังหวัดนนทบุรี ผสมน้ำสะอาดและเกลือตามอัตราส่วน จากนั้นทำการโรยเส้นที่น้ำร้อนอุณหภูมิ 85-95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 1-2 นาที สังเกตการลอยของเส้นขึ้นสู่ผิวน้ำ จึงตักเส้นขนมจีนที่ได้แช่ในน้ำเย็นทันที จากนั้นนำไปทดสอบในขั้นต่อไป

5.2 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

นำแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *B. cereus* TISTR 1449, *S. aureus* TISTR 746 และ *E. coli* TISTR 527 เลี้ยงในอาหาร TSB ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เขย่าที่ 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้น ดูดแบคทีเรียสายพันธุ์ละ 2 มิลลิลิตร ผสมกันแล้วจากนั้นทำการเจือจางตามอัตราส่วน โดยจะใช้ปริมาณของเซลล์รวมสุดท้ายอยู่ที่ 10^1 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการทดสอบต่อไป

5.3 การเตรียม CFS เพื่อการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในขนมจีนเส้นสด

นำแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกไว้ถ่ายลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และถ่ายกล้าเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่สภาวะเดิม จากนั้นถ่ายกล้าเชื้อทั้งหมดลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 950 มิลลิลิตร และทำการบ่มสภาวะเดิมอีกครั้ง แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่แรงเหวี่ยง 8,000 *g* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีแล้วแยกส่วนใสออก นำส่วนใสไปให้ความร้อนด้วยการต้มที่อุณหภูมิมากกว่า 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

5.4 การทดสอบการยับยั้งของ CFS ต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในขนมจีนเส้นสด

ทำการเจือจาง CFS กับน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วให้มีระดับความเข้มข้นของ CFS ที่ร้อยละ 0, 20, 40, 60, 80 และ 100 แล้วนำเส้นขนมจีน 200 กรัม ที่เตรียมไว้ทำการแช่ใน CFS ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในระดับความเจือจางที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 2 นาที แล้วทำการล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ จากนั้นทำการแบ่งใส่จานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วจานละ 10 กรัม จากนั้นทำการถ่ายกล้าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่เตรียมไว้ ถ่ายลงในเส้นขนมจีนปริมาตร 10 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 72 ชั่วโมง โดยทำการเก็บตัวอย่างวิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ที่เปลี่ยนแปลงไปทุกๆ 6 ชั่วโมง

5.5 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและชีวภาพ

5.5.1 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ

ทำการตรวจติดตามทางกายภาพจะตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของค่า pH โดยใช้เครื่องวัด pH ระบบอัตโนมัติ สังเกตการเปลี่ยนแปลงทางด้านกายภาพ และการเปลี่ยนแปลงของแอคติวิตีของน้ำ (Water activity; Aw) โดยใช้เครื่องวัดค่า Aw ระบบอัตโนมัติ

5.5.2 การตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงของปริมาณจุลินทรีย์โดยวิธีทางจุลชีววิทยา

การตรวจติดตามทางด้านจุลชีววิทยาจะดำเนินการตรวจติดตามปริมาณจุลินทรีย์รวมโดยวิธี Total Viable Plate Count (BAM chapter 3) [14] ปริมาณของ *E. coli* โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก BAM chapter 4 [15] ปริมาณของ *S. aureus* โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก BAM chapter 12 [16] และปริมาณของ *B. cereus* โดยวิธีที่ดัดแปลงจาก BAM chapter 14 [17] โดยเปลี่ยนแปลงค่าการนับจำนวนให้อยู่ในรูปของ $\log_{10}$

6. การระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกโดยวิธีทางอณูชีววิทยา

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติคสายพันธุ์ที่คัดเลือกในอาหาร MRS broth ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่แรงเหวี่ยง 8,000 *xg* อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีแล้วแยกส่วนใสออก ทำการล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อและทำการปั่นเหวี่ยงเก็บตะกอนเซลล์เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอ โดยใช้ชุด ™GF-1 Bacterial DNA extraction kit จากนั้นทำการวิเคราะห์ลำดับเบสบริเวณ 16S rDNA ที่บริษัท Macrogen ประเทศเกาหลีใต้ ทำการวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสโดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ด้วยโปรแกรม BLASTn (www.ncbi.nlm.nih.gov)

ผลการทดลอง

1. การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคจากอาหารหมัก

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากอาหารหมัก 30 ชนิด สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 157 ไอโซเลต โดยแบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมดมีสัณฐานวิทยาเป็นเซลล์รูปท่อน เมื่อย้อมแกรมจะติดสีแกรมบวก และเกิดโซนใสรอบโคโลนีภายใต้อาหาร MRS agar [18] ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียพบว่า ทั้ง 157 ไอโซเลต ให้ผลการทดสอบทั้ง 2 ปฏิกิริยาเป็นผลลบ คือ ไม่เกิดฟองก๊าซออกซิเจนเมื่อทดสอบปฏิกิริยาคะตาเลส และเมื่อทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส ไม่เกิดรอยเส้นสีม่วงบนแผ่นกระดาษกรองที่หยดน้ำยาทดสอบ [19] จึงนำแบคทีเรียที่ทำการคัดแยกและคัดเลือกเบื้องต้นไปทำการทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

2. การทดสอบประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคที่แยกได้จากอาหารหมักในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

จากการทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติคทั้ง 157 ไอโซเลต ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่ามี 41 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 3 สายพันธุ์ คิดเป็นร้อยละ 26.11 จากจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดแยกได้ (ตารางที่ 1)

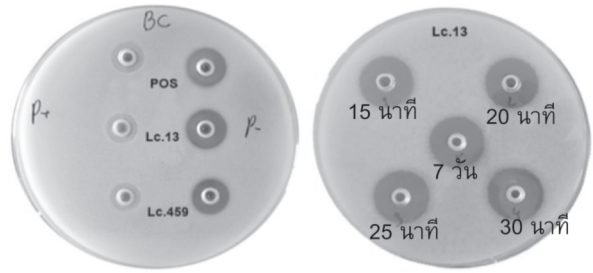
ตารางที่ 1 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเน่าเสียได้แก่ *E. coli, S. aureus* และ *B. cereus* ของแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดอง

รูปแบบการยับยั้ง	สายพันธุ์ที่ยับยั้ง	จำนวน (ไอโซเลต)	ร้อยละจากแบคทีเรียกรดแลคติคทั้งหมดที่คัดแยก
ยับยั้งการเจริญได้สายพันธุ์เดียว	*E. coli*	7	4.46
	S. aureus	20	12.74
	B. cereus	1	0.63
ยับยั้งการเจริญได้ 2 สายพันธุ์	*S. aureus* และ *E. coli*	14	8.91
	B. cereus และ *E. coli*	18	11.46
	B. cereus และ *S. aureus*	11	7.00
ยับยั้งการเจริญได้ 3 สายพันธุ์	*E. coli, S. aureus* และ *B. cereus*	41	16.11

3. การยืนยันคุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติครหัส LC.13

จากการคัดเลือกการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ จึงคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติครหัส LC.13 ซึ่งมีความสามารถมีโซนการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทั้ง 3 สายพันธุ์ได้กว้างที่สุด จึงทำการทดสอบคุณสมบัติบางประการซึ่งได้แก่ การทนต่ออุณหภูมิสูง ณ ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลาสูงสุด 30 นาที และการทนต่ออุณหภูมิที่จุดเยือกแข็ง เป็นระยะเวลาสูงสุดที่ 7 วัน พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของ CFS

ยังคงมีการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบอย่างเห็นได้ชัด โดยเมื่อทำการวัดรัศมีการยับยั้งก็ยังพบว่าไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุมในช่วงเวลาที่ 0 ของการทดลองในระดับความเชื่อมั่นทางสถิติที่ร้อยละ 95 แต่เมื่อทำการทดสอบกับเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติการย่อยโปรตีน ซึ่งในการทดลองใช้เอนไซม์ Proteinase K แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่ากิจกรรมการยับยั้งมีค่าความแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดจากการวัดขนาดรัศมีการยับยั้ง



รูปที่ 1 การทดสอบคุณสมบัติทางด้านเพปไทด์ โดยเติมเอนไซม์ proteinase K ที่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (A) แบบเติม proteinase K (P+) และไม่เติม proteinase K (P-) แบคทีเรีย *Lactobacillus lactis* TISTR 1401 เป็นสายพันธุ์ที่ใช้เป็นสายพันธุ์ positive ในการทดลอง (POS) และคุณสมบัติการทนต่ออุณหภูมิ (B) ที่ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15, 20, 25 และ 30 นาที และที่ 0 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

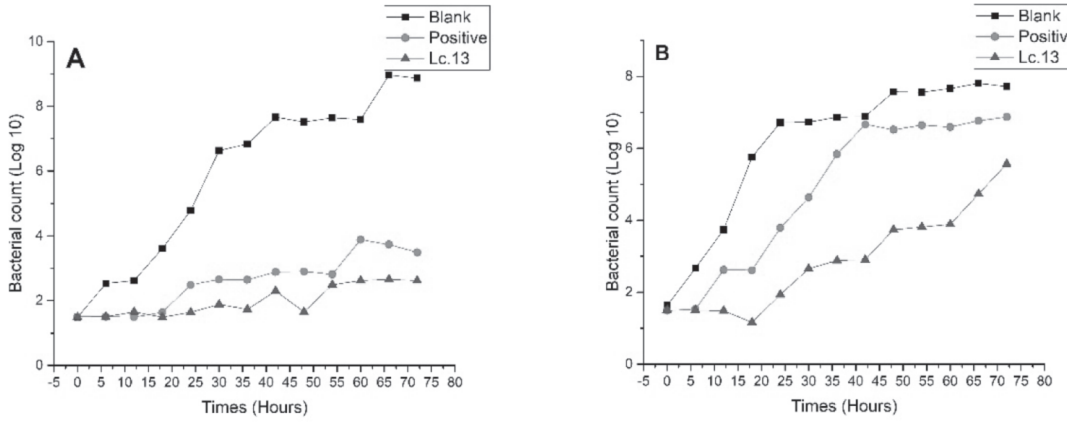
4. ผลของแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคในการยืดอายุการเก็บรักษาขนมจีน

เมื่อทำการทดลองในกระบวนการผลิตขนมจีนเส้นสดและเก็บตัวอย่างอาหารเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยจะมีการเปลี่ยนปริมาณแบคทีเรียจากหน่วย cfu/g. ให้เป็น Log10

$$A = \log B$$

A = ผลลัพธ์ที่จะใช้ในการสร้างกราฟจำนวน

B = ปริมาณแบคทีเรียก่อโรคในหน่วย cfu/g.



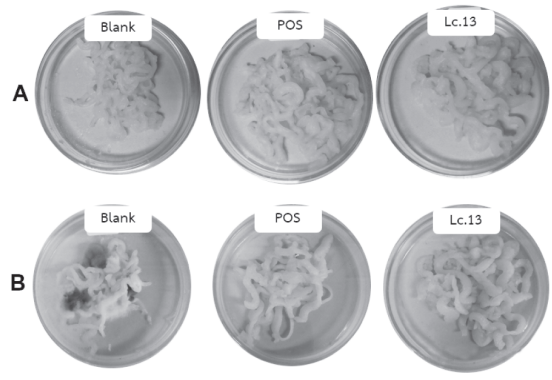
รูปที่ 2 การเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียก่อโรคชนิดต่างๆ โดยเปรียบเทียบกันระหว่าง Blank (MRS broth pH 5.5) (■), Positive (CFS จาก *Lc. lactis* TISTR 1401) (●) และ CFS ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติครหัส LC.13 (▲) โดยเป็นการทดสอบหาปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยวิธี Total plate count (A), ทดสอบกับ *B. cereus* (B), ทดสอบกับ *S. aureus* (C) และ ทดสอบกับ *E. coli* (D) ระยะเวลา 72 ชั่วโมงของการทดลอง

CFS ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 ของแบคทีเรียผลิตกรดแลคติคจากชุดทดสอบ LC.13 มีความสามารถในการยืดอายุของขนมจีนเส้นสดในการทดลองนี้ในเชิงทางชีวภาพโดยมีการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ซึ่งสามารถยืดระยะเวลาการเน่าเสียไปได้ชุด Blank และชุด Positive มากกว่า 24 ชั่วโมง ซึ่งจะเน่าเสียหลังจากชั่วโมงที่ 48 ของการทดสอบ ซึ่งตลอดช่วงระยะเวลาการทดลองไม่พบการเจริญของ *S. aureus* และ *E. coli* แต่ในทางกลับกันพบปริมาณของ *B. cereus* ที่เพิ่มขึ้นตลอดทุกช่วงเวลาในการทดสอบจนกระทั่งถึงชั่วโมงที่ 48 การเพิ่มจำนวนของ *B. cereus* เข้าสู่ช่วง stationary phase (รูปที่ 2)

การเปลี่ยนของค่า pH ของตัวอย่างเส้นขนมจีนจะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงไปตลอดช่วงการทดสอบ โดยชุด Blank เมื่อค่า pH อยู่ที่ 7.13 จะเริ่มสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพและเริ่มสังเกตเห็นการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคบนตัวอย่างขนมจีน แต่ในชุด POS และ LC.13 มีการเปลี่ยนแปลงไปในช่วงใกล้ค่าเป็นกลางมาก โดยในชั่วโมงที่ 72 ของการทดลอง เริ่มมีการสังเกตการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพในบางส่วน (รูปที่ 3) ซึ่งจะสังเกตได้ว่าการเปลี่ยนแปลงนี้จะสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ ซึ่งการเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์และการลดลงของแบคทีเรียในแต่ละช่วงนั้นมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่า pH และค่า Aw (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของค่า pH และค่า Aw ของขนมจีนเส้นสดทั้ง 3 ชุดการทดลอง (Blank POS และ LC.13) ในช่วงการทดลองเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ช่วงเวลา	Blank		POS		Lc.13	
(ชั่วโมงของการทดลอง)	ค่า pH	ค่า Aw	ค่า pH	ค่า Aw	ค่า pH	ค่า Aw
0	6.56	0.969	6.42	0.956	6.45	0.955
6	6.66	0.963	6.58	0.960	6.42	0.958
12	6.80	0.971	6.62	0.958	6.50	0.962
18	6.91	0.966	6.65	0.961	6.54	0.955
24	7.13	0.985	6.53	0.958	6.58	0.968
30	7.26	0.979	6.65	0.966	6.65	0.964
36	7.35	0.977	6.69	0.965	6.71	0.968
42	8.06	0.978	6.78	0.960	6.75	0.969
48	8.52	0.986	6.92	0.963	6.66	0.970
54	8.34	0.980	6.78	0.966	6.95	0.968
60	8.65	0.978	6.86	0.968	6.85	0.975
66	8.54	0.987	7.01	0.970	7.05	0.973
72	8.34	0.983	7.12	0.972	6.96	0.970



รูปที่ 3 ลักษณะการเปลี่ยนแปลงภายนอกของขนมจีนเส้นสดที่ผ่านการแช่ CFS ในชั่วโมงที่ 0 ของการทดลอง (A) และชั่วโมงที่ 72 ของการทดลอง (B) ซึ่งประกอบด้วย Blank (MRS broth pH 5.5), POS (CFS จาก *L. lactis* TISTR 1401) และ CFS ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติครหัส LC.13

5. การวิเคราะห์ข้อมูลลำดับเบสที่บริเวณ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติครหัส LC.13

เมื่อทำการนำข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ลำดับเบสที่บริเวณ 16S rDNA ด้วยโปรแกรม BLASTn ซึ่งเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์จาก GenBank พบว่ามีความใกล้เคียงทางลำดับเบสกับ *Lactobacillus plantarum* เท่ากับร้อยละ 99 ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงว่าแบคทีเรียกรดแลคติคที่คัดเลือกรหัส LC.13 คือสายพันธุ์ *L. plantarum* โดย Liu และคณะ [11] ได้คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากโยเกิร์ตจากประเทศธิเบตสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *S. aureus Pseudomonas aeruginosa Listeria monocytogenes* และ *Salmonella* Typhimurium ผลิตแบคเทอริโอซิน Plantaricin Q7 และ Zhu และคณะ [8] คัดแยก *L. plantarum* จากนม ซึ่งผลิต plantaricin ZJ008 โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคจากตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านของไทยและศึกษาความสามารถในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคแสดงให้เห็นถึงประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้มีความสามารถในการยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบจากแบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ในการทดสอบ แต่เนื่องจากแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากจุลินทรีย์นั้นมีความแตกต่างกับสารปฏิชีวนะอยู่ในส่วนการที่มีความจำเพาะกับชนิดของแบคทีเรียเป้าหมายในวงแคบหรือมีความจำเพาะกับจุลินทรีย์ในกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งสูง [20] และเมื่อนำผลการยืนยันการทดสอบคุณสมบัติบางประการของสารต้านจุลชีพที่แบคทีเรียกรดแลคติครหัส LC.13 ผลิตขึ้น พบว่าสามารถทนต่อสภาวะอุณหภูมิที่สูงและที่จุดเยือกแข็ง และเสียสมบัติการต้านจุลชีพไปหลังจากถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งตรงกับคุณสมบัติในด้านโครงสร้างของแบคเทอริโอซินที่เป็นโพลีเพปไทด์ที่มีความซับซ้อนทำให้ทนต่ออุณหภูมิในดังกล่าวและยังมีสมบัติในการเป็นเพปไทด์ [21] ดังนั้น CFS ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติคมีแบคเทอริโอซินที่มีสมบัติเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ [22] และเมื่อทำการนำ CFS ที่ได้จากสายพันธุ์ที่ได้คัดเลือกไว้ไปทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขนมจีนเส้นสดที่ได้ทำการจัดเตรียมและมีการตรวจติดตามผล จึงสรุปได้ว่าจุลินทรีย์ก่อโรคในขนมจีนเส้นสดเริ่มเจริญสู่ช่วง log phase ในชั่วโมงที่ 12 ของการทดลองและเริ่มเข้าสูงช่วง stationary phase ในชั่วโมงที่ 36 ของการทดลองซึ่งมีความสอดคล้องกับลักษณะทางกายภาพที่มีการเปลี่ยนแปลงไป ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Griffiths and Schraft (2017) [23] โดยการเน่าเสียของขนมจีนคือการที่มีแบคทีเรียรวมมากกว่า 106 cfu/g ซึ่งขนมจีนเป็นอาหารจำพวกที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบหลัก จึงมีจุลินทรีย์ที่ส่งผลต่อการเน่าเสียหรือการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะทางกายภาพหลักคือ *B. cereus* และเนื่องจาก *B. cereus* มีกลไกการอยู่รอดโดยการอยู่ในรูปของเอนโดสปอร์ ซึ่งทำให้สารต้านจุลชีพที่มีเพปไทด์เป็นองค์ประกอบไม่สามารถเข้าจับกับส่วนของชั้นผนังของเอนโดสปอร์ได้ เนื่องจากไม่มีโปรตีนตัวรับที่จำเพาะต่อแบคเทอริโอซิน [24] จากการวิจัยในครั้งนี้สามารถแสดงให้เห็นถึงความสามารถของสารต้านจุลชีพที่มีเพปไทด์เป็นองค์ประกอบในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคบางสายพันธุ์ได้ ซึ่งอาจนำเป็นแนวทางในการศึกษาวิจัยและพัฒนาในแง่มุมของการเพิ่มอัตราการผลิต การเพิ่มความบริสุทธิ์ การทำให้อยู่ในรูปแบบพร้อมใช้ต่อไป เพื่อให้เป็นประโยชน์แก่ทางด้านอุตสาหกรรมอาหารขนาดเล็กเพื่อเพิ่มความปลอดภัยในอาหารได้

เอกสารอ้างอิง

1. Shu, Y., Yu, B., He, J., Zheng, P., Yuan, Z., Chen, D., & Mao, X. (2016). Excess of dietary benzoic acid supplementation leads to growth retardation, hematological abnormality and organ injury of piglets. *Livestock Science, 190,* 94-103.
2. Zu, K., Pizzurro, D. M., Lewandoski, T. A., & Goodman, J. E. (2017). Pharmacokinetic data reduce uncertainty in the acceptable daily intake for benzoic acid and its salts. *Regulatory Toxicology and Pharmacology, 89,* 83-94.
3. Pringsulaka, O. (2007). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Srinakharinwirot Science Journal, 23*(2), 145-160.
4. Tanganurat, P., Sombutmee, W. & Sridan, K. (2013). Effects of lactic acid bacteria on quality of chinese mustard green (*Brassica juncea L.*) fermentation. *Journal of Agricultural Science, 44*(2), 321-324. (in Thai)
5. Plessas, S., Nouska, C., Karapetsas, A., Kazakos, S., Alexopoulos, A., Mantzourani, I., Chondrou, F., M., Galanis, A & Bezirtzoglou, E (2017). Isolation, characterization and evaluation of the probiotic potential of a novel *Lactobacillus* strain isolated from feta-type cheese. *Food Chemistry, 226,* 102-108.
6. Woraprayote, W., Pumpuang, L., Tosukhowong, A., Roytrakul, S., Perez, R. H., Zendo, T., Sonomoto, K., ..., Visessanguan, W. (2015). Two putatively novel bacteriocins active against gram-negative food borne pathogens produced by *Weissella hellenica* BCC 7293. *Food Control, 55,* 176-184.
7. Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y., & Haertle, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control, 78,* 187-195.
8. Zhu, X., Zhao, Y., Sun, Y., & Gu, Q. (2014). Purification and characterization of plantaricin ZJ008, novel bacteriocin against *Staphylococcus* spp. From *Lactococcus plantarum* ZJ008. *Food Chemistry, 165,* 216-223.
9. Malheiros, P. M., Cuccovia, I. M., & Franco, B. D. G. M. (2016). Inhibition of *Listeria monocytogenes in vitro* and in goat milk by liposomal nanovesicles containing bacteriocins produced by *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* 2a. *Food Control, 63,* 158-164.
10. Tayuan, C., Salasawat, Y. & Pollok, R. (2015). Preliminary characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented rice during Khanom-jeen fermentation process. *Journal of Agricultural Science, 46*(3), 365-368. (in Thai)

11. Liu, H., Zhang, L., Yi, H., Han, X., & Chi, C. (2016). Identification and characterization of plantaricin Q7, a novel plantiricin produced by *Lactobacillus plantarum* Q7. *LWT-Food Science and Technology, 71,* 386-390.
12. Wen, L. S., Philip, K., & Ajam, N. (2016). Purification, characterization and mode of action of plantaricin K25 produced by *Lactobacillus plantarum. Food Control, 60,* 430-439.
13. Todorov, S. D., Prevost, H., Lebois, M., Dousset, X., le Blanc, J. G., & 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,* 1,351-1,363.
14. Muturin, L., & Peeler, J. T. (1995). Aerobic Plate Count. in G. J. Jackson, R. I. Merker, & R. Bandler (Eds.), *Bacteriological Analytical Manual.* 8th ed. Maryland: Gaithersburg.
15. Feng, P., Weagant, S. D., Grant, M. A., & Burkhardt, W. (1995). Enumeration of *Escherichia coli* and the Coliform Bacteria. in G. J. Jackson, R. I. Merker, & R. Bandler (Eds.), *Bacteriological Analytical Manual.* 8th ed. Maryland: Gaithersburg.
16. Bennett, R. W. & Lancette, G. A. (1995). *Staphylococcus aureus. Bacteriological Analytical Manual.* G. J. Jackson, R. I. Merker, & R. Bandler (Eds.), 8th ed. Maryland: Gaithersburg.
17. Tallent, S. M., Rhodehamel, E. J., Harmon, S. M., & Bennett R. W. (1995). *Bacillus cereus* in G. J. Jackson, R. I. Merker, & R. Bandler (Eds.), *Bacteriological Analytical Manual.* 8th ed. *Maryland:* Gaithersburg.
18. Miao, J., Guo, H., Ou, Y., Liu, G., Fang, X., Liao, Z., Ke, C., ..., Zhao, L., Cao. (2014). Purification and Characterization of Bacteriocin F1, a Novel bacteriocin produced *by Lactobacillus paprcasei* subsp. *tolerans* FX-6 from Tibetan Kefir, a traditional fermented milk from Tibet. *Food Control,* 42, 48-53.
19. Barbosa, M. S., Todorov, S. D., Ivanova, I. V., Belguesmia, Y., Choiset, Y., Rabesona, H., Chobert, J. M., ..., & Franco, B. D. G. M. (2016). Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 Isolated from Brazilian Salami. *Food Control, 60,* 103-112.
20. Perez, R. H., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2014). Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. *Microbial Cell Factories, 13*(1), 1-13.
21. Ahmad, V., Khan, M. S., Jamal, Q. M. S., Alzohairy, M. A., Kareewi, M. A., & Siddiqui, M. U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents, 49,* 1-11.

22. Nishie, M., Nagao, J., & Sonomoto, K. (2012). Antibacterial peptides "bacteriocins": An Overview of their diverse characteristics and applications. *Biocontrol Science, 17*(1), 1-16.
23. Griffiths, W. M., & Schraft, H. (2017). *Bacillus cereus* Food Poisoning: 3th edition. Canada, ON: Academic Press. p. 395-405.
24. Chikindas, M. L., Weeks, R., Drider, D., Chistyakov, V. A., & Dicks, L. M. T. (2018). Functions and emerging applications of bacteriocins. *Current Opinion in Biotechnology, 49,* 23-28.