



# รายงานโครงการวิจัย

เรื่อง

## สารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Antimicrobial Substance of Lactic Acid Bacteria from Fermented Fish)

- I. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จากปลาหมัก(ส้มผัก)
- II. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและผลิตแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)
- III. การทำบริสุทธิ์บางส่วน of แบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)
- IV. การประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอซินในอาหาร

เลขที่

เลขหมู่	OR121.L333	สว 2 2544
Bib Key	214293	จ.1
	1	8 ต.ค. 2555

โดย

ดร.สุกัญญา                      จันทะชุม  
ผศ.ดร. อริญ                      หันพงศ์กิตติกุล

คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

2544

# I. การคัดเลือกแบคทีเรียแล็กติกที่สร้างสารแบคเทอร์ิโอซินจาก ปลาหมัก (ส้มผัก)



## บทคัดย่อ

จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักสามารถแยกแบคทีเรียแล็กติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด 40 ไอโซเลต พบว่า 3 ไอโซเลต มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sake*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes* 018 และ *Carnobacterium* sp. M114-25) ได้สูง

เมื่อศึกษาสมบัติด้านสัณฐานวิทยา และชีวเคมี พบว่า แบคทีเรียแล็กติกทั้ง 3 ไอโซเลต คือ *Lactobacillus casei* ssp. *ramnosus* (SN11) และ *Streptococcus lactis* (SN33, SN48)

ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH เริ่มต้นและเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ของแบคทีเรียแล็กติกทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *L. casei* ssp. *ramnosus* SN11, *S. lactis* SN33 และ *S. lactis* SN48 มีการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS pH เริ่มต้น 5.5 เวลา 18 ชั่วโมง เมื่อศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ พบว่า แบคทีเรียแล็กติกที่ทำการทดลองมีการเจริญไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และ 35 °ซ ยกเว้น *S. lactis* SN48 มีการเจริญที่อุณหภูมิ 30 °ซ สูงกว่าที่อุณหภูมิ 35 °ซ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 สำหรับค่าประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ (AU/ml.) ของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และ 35 °ซ มีค่าไม่แตกต่างกัน

ผลของอุณหภูมิ pH และเอนไซม์ ต่อความคงตัวของสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จากแบคทีเรียแล็กติกที่คัดเลือกได้ พบว่า สารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียแล็กติกทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน โดยยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิ 90 °ซ นาน 45 นาที ผลของ pH ต่อความคงตัวของสารยับยั้ง พบว่า สารยับยั้งที่สร้างจาก *L. casei*

ssp. *rhamnosus* SN11 และ *S. lactis* SN33 ยังคงมีกิจกรรมที่ pH 5.0 5.5 6.0 และ 7.0 ส่วนสารยับยั้งจาก *S. lactis* SN48 จะสูญเสียกิจกรรมในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ที่ pH 5.0 5.5 6.0 และ 7.0 แต่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* 0157 : H7 ที่ pH 5.0 สำหรับผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ catalase ต่อความคงตัวของสารยับยั้งพบว่าเอนไซม์ pronase-E proteinase-K trypsin และ  $\alpha$ -chymotrypsin สามารถยับยั้งกิจกรรมของสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกทั้ง 3 สายพันธุ์ได้ แสดงว่าสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ เป็นสารโปรตีนหรือสารเปปไทด์

แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินทั้ง 3 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้น และระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารแบคเทอริโอซิน พบว่าสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูงถึงร้อยละ 89–99 ภายในเวลา 48 ชม.

## I. Screening for Lactic Acid Bacteria Producing Bacteriocin from Som-Fak (Fermented Fish)

### Abstract

Lactic acid bacteria producing bacteriocin were isolated from fermented fish "Som-Fak". Three isolates from 40 isolates could inhibit the growth of all indicator microorganisms (*Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus sake*, *Escherichia coli*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Lactobacillus plantarum*, *Listeria monocytogenes* 018 and *Carnobacterium* sp. M114-25). These 3 isolates were identify to be *Lactobacillus casei* spp. *rhamnosus* (SN11) and *Streptococcus lactis* (SN33 and SN48).

Optimization of growth and bacteriocin production by these 3 isolates were studied in MRS and APT medium with initial pH of 5.0-7.15 M17, BHI. *L. casei* spp. *rhamnosus* SN11, *S. lactis* SN33 and *S. lactis* SN48 grew and produced bacteriocin well in MRS medium with initial pH 5.5 after 18 h of cultivation, APT pH 6.7 at 18 h and ATP pH 6.7 at 12 h, respectively. No significant difference in growth and bacteriocin production for *L. casei* spp. *rhamnosus* (SN11) and *S. lactis* SN33 growing at 30 and 35 °C. However, *S. lactis* SN48 grew better at 30°C than at 35°C.

Effect of temperature, pH and enzymes on the stability of bacteriocin produced by the 3 isolates were studied. The bacteriocins still had inhibitory activity against indicator microorganisms although they were kept at 90 ° C for 45 minutes. The bacteriocins produced by *casei* ssp. *rhamnosus* SN11 and *S. lactis* SN33 still showed inhibitory activity from pH 5–7. The bacteriocin of *S. lactis* SN48 did not show inhibitory activity against *E. coli* at all tested pH but it could inhibit growth of *E. coli* 0157:H7 at pH 5.0.

The inhibitory activities of bacteriocins from the 3 isolates were destroyed by protease enzymes, pronase-E, proteinase-K, trypsin and  $\alpha$ -chymotrypsin .

When the 3 isolates were co-cultivated with the indicator microorganisms in the optimized medium for 12 – 18 h. the number of the indicator microorganisms were decreased by 89 – 99%.

## II. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอสตินจากเชื้อ

*Lactobacillus casei* ssp. *ramnosus* (SN11)

### บทคัดย่อ

*Lactobacillus casei* ssp. *ramnosus* (SN11) ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์ส้มผักผลิตแบคทีเรียโอสตินที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* เมื่อเติมปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 5 ในอาหารเหลว MRS ที่มีพีเอชเริ่มต้น 5.5 เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิห้อง พบว่า *L. casei* ssp. *ramnosus* (SN11) เจริญและผลิตแบคทีเรียโอสตินได้ดีกว่าการใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 1 และ 10 โดยชั่วโมงที่ 16 มีการเจริญสูงสุดในรูปน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.48 กรัมต่อลิตร และเมื่อแทนที่กลูโคสในอาหารเหลว MRS ด้วยกากน้ำตาลร้อยละ 2 (ปริมาณน้ำตาลเริ่มต้นทั้งหมดร้อยละ 58) *L. casei* ssp. *ramnosus* (SN11) เจริญอย่างช้า ๆ โดยชั่วโมงที่ 72 มีการเจริญสูงสุดในรูปน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 2.64 กรัมต่อลิตร และวัฏจักรกรรมการยับยั้งได้เท่ากับ 20 AU/ml เมื่อแทนที่กลูโคสในอาหารเหลว MRS ด้วยซูโครสร้อยละ 1 *L. casei* ssp. *ramnosus* (SN11) เจริญสูงสุดในชั่วโมงที่ 16 มีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.18 กรัมต่อลิตร และมีกิจกรรมการยับยั้ง 30 AU/ml เมื่อแทนที่แหล่งไนโตรเจนทั้งหมดในอาหารเหลว MRS ด้วยน้ำนิ่งปลาทูน่า (ปริมาณไนโตรเจนเริ่มต้นทั้งหมดร้อยละ 7) เจือจางร้อยละ 50 ซึ่งมีซูโครสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน *L. casei* ssp. *ramnosus* (SN11) เจริญสูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.08 กรัมต่อลิตร และมีกิจกรรมการยับยั้ง 30 AU/ml และพบว่าการไม่เติมแมงกานีสซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟตในอาหารเหลว MRS ซึ่งมีกลูโคสร้อยละ 1 เป็นแหล่งคาร์บอน และน้ำนิ่งปลาทูน่าเจือจางร้อยละ 50 เป็นแหล่งไนโตรเจน ไม่มีผลต่อการเจริญและผลิตแบคทีเรียโอสติน อย่างไรก็ตามเมื่อไม่เติมสารประกอบบัพเฟอร์ (แอมโมเนียมอะซิเตท โซเดียมซิเตรท และไดโพตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต) และ tween 80 การเจริญและการผลิตแบคทีเรียโอสตินจะลดลงโดยมีกิจกรรมการยับยั้งเหลือ 20 AU/ml

## II. Optimization of Bacteriocin Production by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)

### Abstract

*Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) was isolated from fermented fish "Som Fak". It produced bacteriocin inhibiting growth of *Staphylococcus aureus*. The inoculum effect was studied in MRS medium with initial pH 5.5. 5% inoculum provided better growth and bacteriocin production than 1% and 10% inoculum with cell dry mass of 3.48 g/L. When 2% molasses (58% initial sugar) was used to substitute glucose in MRS medium the *L. casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) grow slowly with maximum growth of 2.64 g/L and inhibitory activity of 20 AU/ml at 72 h. When sucrose was used instead of glucose the maximum growth was at 16 h. with cell dry mass of 3.18 g/L and inhibitory activity of 30 AU/ml. When all the nitrogen in MRS medium was substituted with 50% tuna condensate (total nitrogen 7%) in MRS medium with 1% sucrose as carbon source the isolate had maximum growth at 24 h. with dry mass 3.08 g/L and inhibitory activity of 30 AU/ml. Omitting of manganese sulfate and magnesium sulfate from the MRS medium with 50% tuna condensate did not effect growth and bacteriocin production. However buffering agents (ammonium citrate, sodium citrate and dipotassium hydrogen phosphate) and tween 80 cause decrease in growth and bacteriocin production. The inhibitory activity 20 AU/ml.

### III. การทำบริสุทธิ์บางส่วนของแบคทีริโอซิน

#### บทคัดย่อ

สกัดแยกแบคทีริโอซินที่สร้างจาก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) ได้โดยการเหวี่ยงแยกเพื่อแยกเซลล์ออกแล้วกรองด้วย Ultrafiltration ขนาด 100 kDa แล้วตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต แบบ 2 ขั้นตอน ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 40 และ 80 กรองผ่าน Ultrafiltration ขนาด 10 kDa แล้วกำจัดเกลือออกไป โดยการไดอะไลซิสด้วยถุงไดอะไลซิส มีขนาดโมเลกุลผ่าน 3,500 Da แบคทีริโอซินที่ได้มีขนาดอยู่ในช่วง 3,500 – 10,000 Da หลังจากทำแห้งโดยการ freeze dry ได้แบคทีริโอซินที่มีกิจกรรมการยับยั้ง 320 AU/mg

### III. Production and Partially Purification of Bacteriocin by *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)

#### Abstract

Bacteriocin from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) was produced and partialy purification by centrifugation at 6000xg and ultrafiltration of 100 k Da and 10 k Da. The filtrate was precipitate by two steps of ammonium sulphate (40, 80%) and dialysis against phosphate buffer pH 6.5. The activity of bacteriocin in the range of 3,500 – 10,000 Da was 80 AU/ml. After freeze drying and dissolving in phosphate buffer pH 6.5 (1 g/ml), the activity was 320 AU/ml.

## IV. การประยุกต์ใช้สารแบคทีเรียโอสินในอาหาร

### บทคัดย่อ

การทดลองหมักส้มผักโดยใช้ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)  $10^4$  CFU/g เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น ร่วมกับ *Staphylococcus aureus* เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่หมักโดยเชื้อธรรมชาติที่เดิม *S. aureus* เพียงอย่างเดียว พบว่า เมื่อระยะเวลาหมักผ่านไป 72 ชั่วโมง ปริมาณ *S. aureus* จะลดลง ซึ่งคิดเป็นค่าร้อยละของการยับยั้งในส้มผักที่เดิม หัวเชื้อเทียบกับชุดควบคุมได้เท่ากับ 92.66 และ 95.17 ตามลำดับ และค่าร้อยละการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้น

การใช้สารแบคทีเรียโอสินที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนที่ระดับ 150 AU/ml เปรียบเทียบกับ Nisin 150 AU/ml ในการยืดอายุการเก็บรักษากุ้งกุลาดำตัดหัว โดยใช้ในรูปแบบสารละลายที่แช่เป็นเวลา 15 นาที และเก็บที่  $4^{\circ}\text{C}$  สามารถชะลอการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างได้ภายใน 1 สัปดาห์ และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งใกล้เคียงกับ Nisin เมื่อทดลองใช้สารแบคทีเรียโอสินที่ทำบริสุทธิ์บางส่วนในระดับ 80 AU/ml ในน้ำนมดิบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องสามารถชะลอการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดได้ 6 ชม. (TVC < 4.7 log CFU/ml) และถ้าเก็บที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  สามารถเก็บรักษาได้ 6 วัน

## IV. Application of Lactic Acid Bacteria and Bacteriocin in Food Products

### Abstract

*Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11)  $10^4$  CFU/g was used as starter for fermenting Som-fag which was challenged by adding *Staphylococcus aureus*  $10^4$  CFU/g. Total viable count and *Staphylococcus aureus* count was determined during 72 hr. incubation. The number of *S. aureus* was decreased during incubation and could not found at 72 hr.

Partial purified bacteriocin from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) was applied to storage shrimp at  $4^{\circ}\text{C}$ . The shelf life of shrimp was extended to 10 days. When the bacteriocin was applied to raw-milk and kept at room temperature the shelf life was extended to 6 h. at room temperature and to 6 days at  $4^{\circ}\text{C}$ .