ชื่อวิทยานิพนธ์ การผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรีย Lactobacillus ที่แยกได้จากอาหาร

หมักพื้นบ้านของไทย

ผู้เขียน นางสาวศศิธร บัวเกตุ

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2547

บทคัดย่อ

ผลของ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus 4 สายพันธุ์ คือ L. plantarum A49a, L. plantarum A61a, Lactobacillus sp. P5 และ Lactobacillus sp. A2 ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านของไทยเมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ ต่อการยับยั้งเชื้อ Staphylococcus aureus ATCC 29213 พบว่า เชื้อ 3 สายพันธุ์แรกสร้างสารยับยั้งใด้ดีที่ สุดที่อุณหภูมิ 30 °ซ โดยไม่มีการเขย่า ในขณะที่ Lactobacillus sp. A2 สร้างสารยับยั้งได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 °ซ และมีการเขย่า 150 rpm เชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์สร้างสารยับยั้งได้ ดีที่สุดในอาหาร de Man Rogosa and Sharpe (MRS) และอาหาร Coconut juice (CJ) การ สร้างสารยับยั้งของเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์เกิดขึ้นได้แม้ในสภาวะที่มีการจำกัดการสร้างกรด อินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้มาก กว่าเชื้อ Lactobacillus สายพันธุ์ใกล้เคียง และยับยั้งเชื้อก่อโรคที่เป็นแกรมลบได้ด้วย การสร้างสารยับยั้งสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ โดย Lactobacillus sp. A2, L. plantarum A49a และ L. plantarum A61a สร้างสารยับยั้งได้มากที่สุดในระยะที่เข้าสู่ การเจริญคงที่ โดย L. plantarum A49a ซึ่งสร้างสารยับยั้งได้สูงสุด สามารถเติบโตและ สร้างสารยับยั้งในอาหาร MRS broth และ CJ broth ได้ไม่แตกต่างกัน

โปรตีนที่ได้จากการตกตะกอน culture broth จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ที่ความเข้มข้นแอมโมเนียมซัลเฟต 50-70 % ให้ผลการยับยั้งสูงสุด นอกจากนี้พบ ว่าสารยับยั้งที่ได้มีสมบัติในการทนความร้อนที่อุณหภูมิ 121 °ซ นาน 15 นาที มีความไว ต่อเอนไซม์ catalase และเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ไม่ไวต่อเอนไซม์ ∞-amylase และ

สามารถทำลาย เชื้อ S. aureus ATCC 29213 ได้หมดในเวลา 4 ชั่วโมง ดังนั้นสารยับยั้งนี้ จึงมีคุณสมบัติคล้ายกับแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำ *L. plantarum* A49a มาเลี้ยงแบบ batch โดยใช้ถังหมักแบบ stirred tank ขนาด 5 ลิตร ที่บรรจุอาหาร CJ ปริมาตร 3.5 ลิตร พบว่าเชื้อเติบโตและสร้างสารยับยั้งได้ ดีที่สุดเมื่อไม่มีการควบคุม pH ให้อากาศ 0.5 vvm และมีอัตราการกวน 80 rpm โดยเวลา ที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อให้ได้สารยับยั้งมากที่สุดในถังหมักเร็วกว่าในฟลาสก์คือ 22 ชั่วโมง ส่วนในฟลาสก์ใช้เวลา 30 ชั่วโมง

Thesis Title Production of Inhibition Substances from Lactobacillus Isolated

from Traditional Thai Fermented Foods

Author Miss Sasithon Buakate

Major Program Microbiology

Academic Year 2004

Abstract

Culture filtrates from four strains of Lactobacillus, L. plantarum A49a, L. plantarum A61a, Lactobacillus sp. P5 and Lactobacillus sp. A2 isolated from traditional Thai fermented food inhibited bacterial growth. Using Staphylococcus aureus ATCC 29213 as the test organism the first 3 strains produced most inhibition when grown in flasks at 30 °C under non shaking conditions whereas the optimum conditions for production from Lactobacillus sp. A2 were at 35 °C and a shaking speed of 150 rpm. All strains produced maximum amounts of inhibitory substances in de Man Rogosa and Sharpe (MRS) and Coconut juice (CJ) medium. The inhibitory substances were still produced with conditions that limited the production of hydrogen peroxide and organic acids. The substances from all strains inhibited foodborne bacterial pathogens better than closely related strains of Lactobacillus and also inhibited Gram negative foodborne pathogens. The production of inhibitory substances was growth related with most inhibitor being present at stationary phase from Lactobacillus sp. A2, L. plantarum A49a and L. plantarum A61a. Lactobacillus plantarum A49a produced the highest amount of inhibitory substances in MRS and CJ media.

A protein fraction from the culture fluid of *L. plantarum* A49a that precipitated from 50-70% ammonium sulfate saturation showed maximum inhibitory activity. The substances were heat stable for 15 minutes at 121 °C, susceptible to catalase and

proteolytic enzymes, but resistant to ∞-amylase and completely inhibited *S. aureus* ATCC 29213 within 4 hours. The substances had bacteriocin-like properties.

A 5 L stirred tank fermentor containing 3.5 liter of CJ medium was used to grow *L. plantarum* A49a. Optimum conditions for maximum growth and production of inhibitory substances were, uncontrolled pH, an aeration rate of 0.5 vvm and an agitation speed of 80 rpm. The time taken for maximum production was 22 hour compared to 30 hours for flask cultivation.