

ณัฐริดา จันทร์ประเสริฐ : การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารโดย
แบคทีเรียโอซินแบบหยาบซึ่งผลิตจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์
มะดันดอง (GROWTH INHIBITION OF FOODBORNE PATHOGENS BY CRUDE
BACTERIOCIN PRODUCED FROM LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM
PICKLED *Garcinia schomburgkiana* pierre PRODUCTS) อาจารย์ที่ปรึกษา :
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปิยะวรรณ กาสลัก, 129 หน้า.

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากมะดันดอง จำนวน 8 ตัวอย่าง โดยใช้อาหารแข็ง MRS ผสมกับแคลเซียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่าคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกได้ทั้งหมด 160 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างแท่งสั้น 141 ไอโซเลท (ร้อยละ 88) รูปร่างกลม 11 ไอโซเลท (ร้อยละ 7) และรูปไข่ 8 ไอโซเลท (ร้อยละ 5) เมื่อทดสอบด้วยวิธี spot agar test มีเพียง 18 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Bacillus cereus* TISTR 687 และ/หรือ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ได้ หลังจากนั้นทดสอบเพื่อยืนยันการผลิตแบคทีเรียโอซินแบบหยาบ (Crude bacteriocin) โดยวิธี agar well diffusion พบว่ามี 2 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญทั้ง *B. cereus* TISTR 687 และ *S. aureus* TISTR 118 ได้ และมี 6 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งการเจริญ *B. cereus* TISTR 687 ได้เพียงสายพันธุ์เดียว ทุกไอโซเลทไม่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Escherichia coli* TISTR 780 ได้ เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้ง 18 ไอโซเลทโดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี สรีรวิทยา และความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ พบว่าจัดเป็น *Lactobacillus plantarum* 1 ทั้งหมด 13 สายพันธุ์ สำหรับ *Lactobacillus brevis* 1, *Lactobacillus pentosus* และ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 พบอย่างละ 1 สายพันธุ์ ที่ระดับความถูกต้องของการจัดจำแนกร้อยละ 91.1-99.9, 99.8, 99.9 และ 99.7 ตามลำดับ สำหรับ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* และ *Lactobacillus plantarum* 1 มีระดับความถูกต้องของการจัดจำแนกต่ำ ร้อยละ 47.4 และ 57.8 ตามลำดับ สายพันธุ์ *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 สามารถผลิต crude bacteriocin ได้มากที่สุด ดังนั้นจึงเลือกมาตรวจสอบสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการผลิต crude bacteriocin โดยใช้ *B. cereus* TISTR 687 เป็นแบคทีเรียทดสอบ พบว่าสายพันธุ์ดังกล่าวเมื่อเจริญในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน มีค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 พร้อมทั้งเติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง สามารถเจริญได้ดีและผลิต crude bacteriocin ได้มากที่สุด กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินเมื่อผลิตในสภาวะที่เหมาะสมมีค่าเท่ากับ 320 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (Arbitrary unit, AU/ml) และเมื่อใช้วิธี simple parallel line model มีค่าเท่ากับ 1.97 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับไนซิน คุณสมบัติของ

crude bacteriocin เป็นโปรตีน ทนความร้อนได้ไม่เกิน 100 องศาเซลเซียส และมีความคงตัวดีในช่วงความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5-7 ออกฤทธิ์แบบฆ่าทำลายเซลล์พร้อมทั้งทำให้เซลล์แตก ผลจากการศึกษาโครงสร้างภายในเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบรูที่เชื่อมเซลล์ของ *B. cereus* TISTR 687 และสังเกตเห็นสารต่างๆ ที่อยู่ภายในเซลล์ผ่านรูที่เชื่อมเซลล์นี้

NATTHIDA CHANPRASERT : GROWTH INHIBITION OF FOODBORNE PATHOGENS BY CRUDE BACTERIOCIN PRODUCED FROM LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM PICKLED *Garcinia schomburgkiana* pierre PRODUCTS. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. PIYAWAN GASALUCK, Ph.D., 129 PP.

PICKLED *Garcinia schomburgkiana* pierre/*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1/
CRUDE BACTERIOCIN/ TRANSMISSION ELECTRON MICROSCOPY/
FOODBORNE PATHOGENS

One hundred and sixty isolates of lactic acid bacteria (LAB) were isolated from 8 natural lactic acid fermentations of pickled *Garcinia schomburgkiana* pierre (Madan) on de Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS) medium supplemented with 1% calcium carbonate. Among these isolates, 141 were short rod-shaped (88%), 11 were coccoid-shaped (7%) and 8 were oval-shaped (5%). The eighteen out of one hundred and sixty isolates could inhibit *Bacillus cereus* TISTR 687 and/or *Staphylococcus aureus* TISTR 118 by using agar spot test. Afterwards, confirmed test by well diffusion method of 18 isolates showed that 2 isolates could inhibit both *B. cereus* TISTR 687 and *S. aureus* TISTR 118, 6 isolates could inhibit only *B. cereus* TISTR 687 but not against *Escherichia coli* TISTR 780. Morphological, biochemical, physiological characteristics and carbohydrate fermentation by API 50 CHL kits were preliminarily examined. Eighteen antimicrobial substances producing LAB were potentially identified as *Lactobacillus plantarum* 1, 3 isolates were *Lactobacillus brevis* 1, *Lactobacillus pentosus* and *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 1 with high

preciseness of identification at 91.1-99.9%, 99.8%, 99.9% and 99.7%, respectively. The remaining 2 isolates were identified as *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *delbrueckii* and *Lactobacillus plantarum* 1 with low preciseness of identification at 47.4% and 57.8%, respectively. *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 provided the maximum crude bacteriocin, thus this strain was selected for optimization study of bacteriocin production and further investigation by using only *B. cereus* TISTR 687 as test microorganism. The growth of *Lc. lactis* ssp. *lactis* 1 in the initial pH 6.5 of MRS broth using glucose as carbon source containing 2% NaCl concentration (w/v) incubated at 35°C for 18 h could produce the highest crude bacteriocin. The bacteriocin activity of crude bacteriocin produced under the condition mentioned above was 320 AU/ml and was quantified as 1.97 mg/ml compared with nisin using a simple parallel line model. Characterizations of crude bacteriocin were heat resistant protein at not more than 100°C and stable at pH 5-7. The mode of action of crude bacteriocin was bactericidal with concomitant cell lysis. Cell morphological study results drawn from transmission electron microscopy showed disintegrated cells with loss of protoplasmic materials through cell membrane pores.

School of Food Technology

Academic Year 2010

Student's Signature_____

Advisor's Signature_____