จิตราภรณ์ แสนสิทธิ์ : การตรวจหาแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้งและผลิตกรดแลคติก (DETECTION OF BACTERIOCINS FROM STARCH-UTILIZING AND LACTIC ACID-PRODUCING BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง, 104 หน้า. ISBN 974-533-377-8

แบคทีริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่ผลิตจากแบคทีเรียซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นโดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย และมีการนำไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมอาหาร การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจหาและศึกษาแบคทีริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้งและผลิตกรดแลคติก เพื่อเพิ่มศักยภาพของกระบวนการผลิตกรดแลคติกและการผลิตสารแบคทีริโอซิน จากการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรียที่สามารถใช้แป้งและผลิตกรดแลคติกจำนวน 119 ไอโซเลท พบหนึ่งไอโซเลทคือ A5UVU25 ซึ่งจัดอยู่ในสกุล *Lactococcus* ที่สามารถผลิตแบคทีริโอซิน แบคทีเรียไอโซเลทดังกล่าวผลิตสารได้เมื่อเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสหรือแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน โดยผลิตแบคทีริโอซินได้สูงสุด 20.31 หน่วยสากลต่อมิลลิลิตร (เทียบกับสารมาตรฐานไนซิน) เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ประกอบด้วย แป้งมันสำปะหลัง ทริปโตน สารสกัดจากเนื้อ สารสกัดจากยีสต์ ได-โพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต โพแทสเซียม-ได-ไฮโดรเจนฟอสเฟต แมกนีเซียมซัลเฟต แมงกานีสซัลเฟต ไตร-แอมโมเนียมซิเตรต และทวีน 80 ปริมาณ 1.0, 1.0, 0.15, 0.4, 0.87, 0.8, 0.02, 0.005, 0.2 และ 0.1 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และใช้กล้าเชื้อ (10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) 10 เปอร์เซ็นต์ แบคทีริโอซินที่ผลิตโดยไอโซเลทที่คัดเลือกนี้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยเฉพาะอย่างยิ่ง *Bacillus stearothermophilus* TISTR329, *Listeria monocytogenes* DSM1327 และ *Micrococcus luteus* TISTR884 และเป็นสารโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 12 กิโลดาลตัน มีความเสถียรต่อไลโซไซม์และความร้อนที่ 80 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที แต่ถูกทำลายด้วยโปรตีเอส โปรติเนสเค และความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที เมื่อตรวจหายีนที่ควบคุมการผลิตแบคทีริโอซินของไอโซเลท A5UVU25 ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับยีนที่ควบคุมการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรียแลคติก ชนิดที่ใกล้เคียงกัน สามารถตรวจจับยีนได้ด้วยไพรเมอร์ที่จำเพาะกับไนซินซึ่งได้ชิ้นดีเอ็นเอขนาด 218 คู่เบส ที่มีลำดับเบสเหมือน (100 เปอร์เซ็นต์) กับยีนที่ควบคุมการสร้างไนซิน Z ของ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*

สาขาวิชาจุลชีววิทยา	ลายมือชื่อนักศึกษา จิตราภรณ์ แสนสิทธิ์
ปีการศึกษา 2547	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

JITRAPORN SANSIT : DETECTION OF BACTERIOCINS FROM STARCH-UTILIZING AND LACTIC ACID-PRODUCING BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREELAK RODTONG, Ph.D. 104 PP. ISBN 974-533-377-8

BACTERIOCIN/BACTERIA/CASSAVA STARCH/LACTIC ACID

Bacteriocins, proteinaceous compounds produced by bacteria that have antimicrobial activity especially against bacteria, are currently much applied widely in food industry. This study aims to detect and study bacteriocins produced by starch-utilizing and lactic acid-producing bacteria for increasing the potential production of both lactic acid and bacteriocins. A total of 119 isolates of starch-utilizing and lactic acid-producing bacteria were tested for their bacteriocin production capability. Only one isolate, A5UVU25, identified as belonging to the genus *Lactococcus*, was found to produce bacteriocins in the medium containing either glucose or cassava starch as a carbon source. The maximum production of bacteriocins, 20.31 IU/ml, was obtained when the isolate A5UVU25 was cultured in the medium containing (%): cassava starch, 1.0; tryptone, 1.0; beef extract, 0.15; yeast extract, 0.4; di-potassium hydrogen phosphate, 0.87; potassium di-hydrogen phosphate, 0.8; magnesium sulfate, 0.02; manganese sulfate, 0.005; tri-ammonium citrate, 0.2, and tween 80, 0.1, under anaerobic condition at 30°C for 18 h, and the inoculum size (10^6 cells/ml) at 10% (v/v) was used. The bacteriocin produced by the selected isolate showed its antimicrobial activity, especially against *Bacillus stearothermophilus* TISTR329, *Listeria monocytogenes* DMS1327, and *Micrococcus luteus* TISTR884. The

bacteriocin was a protein having its molecular weight of 12 kDa. It was stable to lysozyme and heat at 80°C for 15 min but it was sensitive to protease, protinase K, and heat at 100°C for 30 min. When the gene(s) encoding bacteriocin of the isolate A5UVU25 was detected using bacteriocin-specific primers of closely related lactic acid bacterial species, the amplified product (218 bp) was obtained when nisin-specific primers were applied. The amplicon had similar sequence (100% homology) to gene encoding nisin Z of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*.

School of Microbiology

Academic Year 2004

Student's Signature Jitraporn Sansit

Advisor's Signature Sureelak Rodtong