

การเพิ่มการผลิตสารแบคทีเรียโอซินโดยเชื้อ *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 ที่แยกได้จากปลาตุ๊กตาเพื่อยับยั้งเชื้อ

Listeria monocytogenes

Enhancement of Bacteriocin Production by *Enterococcus faecium* PDN-Ta10, Isolated from Pladukra to Inhibit *Listeria monocytogenes*

ศิรินาถ ศรีอ่อนนวล *, เสาวณีย์ ชัยเพชร และ อภิญญา วณิชพันธุ์

Sirinath Srionnual *, Saowanee Chaipetch and Apinya Vanichpan

Received: 26 June 2020, Revised: 20 October 2020, Accepted: 8 December 2020

บทคัดย่อ

Enterococcus faecium PDN-Ta10 เป็นแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST17303 ได้ ในงานวิจัยนี้ศึกษาถึงการเติบโตของเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 และกิจกรรมของสารแบคทีเรียโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางการค้า 4 ชนิด คือ APT broth, BHI broth, M17 broth และ MRS broth และอาหารธรรมชาติ ได้แก่ นมเปรี้ยว และถั่วเหลืองบดผสมโมลาส พบว่า เชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 เติบโตและสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางการค้า คือ MRS broth และอาหารธรรมชาติ คือ นมเปรี้ยว โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 เป็น 5,020 AU/ml และ 1,280 AU/ml ตามลำดับ โดยค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน คือ 6.0 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 14 ชั่วโมง เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงเพื่อศึกษาแหล่งไนโตรเจน 4 ชนิด คือ beef extract, peptone, yeast extract และ tryptone ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน พบว่า เชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 สร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรดัดแปลงที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจน คือ tryptone ร้อยละ 3 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 2,560 AU/ml และเมื่อเสริมด้วยแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด คือ fructose, lactose, maltose และ

สาขานวัตกรรมอาหารและการจัดการ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ตำบลทุ่งใหญ่ อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240

Department of Food Innovation and Management, Faculty of Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Thungyai, Thungyai, Nakhon Si Thammarat 80240, Thailand.

* ผู้รับผิดชอบประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): sirinat.s@rmutsv.ac.th Tel. 082-430-8651

mannose พบว่าน้ำตาลทั้ง 4 ชนิด ไม่ทำให้เชื้อมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น และเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำมะพร้าวที่เสริมด้วย tryptone ร้อยละ 3 และ mannose ร้อยละ 3 เป็น 2,560 AU/ml

คำสำคัญ: *Enterococcus faecium* PDN-Ta10, *Listeria monocytogenes* DMST17303, สารแบคทีริโอซิน, ปลาตุ๋น

ABSTRACT

Enterococcus faecium PDN-Ta10 is lactic acid bacteria (LAB) which has bacteriocin like activity against *L. monocytogenes* DMST17303. This research aimed to study the growth phase and bacteriocin production of *E. faecium* PDN-Ta10 in 4 commercial culture media (APT broth, BHI broth, M17 broth and MRS broth) and 2 types of natural media (coconut water broth and soy flour with molasses broth). The maximum growth and bacteriocin production were observed when *E. faecium* PDN-Ta10 was cultured in MRS broth and coconut water broth with bacteriocin activity of 5,020 AU/ml and 1,280 AU/ml, respectively. The optimum initial pH and temperature for bacteriocin production by *E. faecium* PDN-Ta10 were pH 6.0 and 35 °C, respectively after 14 h of incubation. Four nitrogen sources including beef extract, peptone, yeast extract and tryptone were used as the sole nitrogen source in MRS broth to optimize the production of bacteriocin. The results showed that maximal bacteriocin production (2,560 AU/ml) was recorded in the presence of 3% tryptone. Bacteriocin production was not stimulated by the addition of 4 carbon sources (fructose, lactose, maltose and mannose). *E. faecium* PDN-Ta10 showed bacteriocin activity of 2,560 AU/ml in coconut water supplemented with 3% tryptone and 3% mannose.

Key words: *Enterococcus faecium* PDN-Ta10, *Listeria monocytogenes* DMST17303, bacteriocin, pladukra

บทนำ

แบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เติบโตได้ในที่ไม่มีออกซิเจน หรือ เติบโตได้ทั้งในที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน มีรูปร่างกลมหรือแท่ง สามารถผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากกระบวนการหมักน้ำตาล (Quinto *et al.*, 2014) สกุลของแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกที่จัดโดย Bergey's manual of systematic bacteriology ประกอบด้วย *Aerococcus* *Lactobacillus* *Leuconostoc* *Pediococcus* และ

Streptococcus (Sneath *et al.*, 1986) ต่อมาได้จัดให้แบคทีเรียสกุลต่อไปนี้เป็นแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ *Aerococcus* *Carnobacterium* *Enterococcus* *Lactobacillus* *Lactococcus* *Leuconostoc* *Oenococcus* *Pediococcus* *Streptococcus* *Tetragenococcus* *Vagococcus* และ *Weissella* (Axelsson, 2004) แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิด ในทวีปเอเชียมีการแบ่งกลุ่มอาหารหมักเป็น 5 กลุ่ม ได้แก่ ผลิตภัณฑ์ถั่วเหลืองหมัก ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ผลิตภัณฑ์ผักดอง ผลิตภัณฑ์แป้งหมัก และผลิตภัณฑ์

เครื่องดื่มแอลกอฮอล์โดยพบว่าในทุกกลุ่มของผลิตภัณฑ์ที่มีเชื้อแบคทีเรียแลคติกเข้าไปเกี่ยวข้องทั้งในแง่ที่เป็นประโยชน์ และเป็นโทษ (Rhee *et al.*, 2011) สิ่งที่ทำให้แบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญในการผลิตอาหารหมัก คือ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีอายุการเก็บที่ยาวนานขึ้นเมื่อเทียบกับวัตถุดิบ โดยพบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สำคัญ คือ กรดแลคติกที่ทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังสร้างสารยับยั้งอื่นๆ อีก เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไคอะซิดิล และแบคเทอริโอซิน (De Vuyst and Vandamme, 1994; Atrih *et al.*, 2001; Messens and De Vuyst, 2002) แบคเทอริโอซินเป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีนที่ผลิตจากไรโบโซม (Jack *et al.*, 1995) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Klaenhammer, 1993) หรือสามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Coventry *et al.*, 1997; Ennahar *et al.*, 2000; Garneau *et al.*, 2002) หรือแบคทีเรียแกรมลบ (Ko and Ahn, 2000; Messi *et al.*, 2001; Caridi, 2002) โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต แบคเทอริโอซินสร้างได้จากทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ โดยพบว่าในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกนั้นแบคทีเรียแลคติกจัดเป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ที่สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินและมีการนำไปใช้ในอาหารได้เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าสามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย (Generally Recognized as Safe-GRAS) (Savadogo *et al.*, 2004; Widyastuti *et al.*, 2014)

Listeria monocytogenes เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เซลล์มีขนาดเล็ก เติบโตได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซิเจน หรือชอบ

ออกซิเจนน้อยๆ และก่อให้เกิดโรคลิสเทอริโอซิส (Listeriosis) ในคนและสัตว์ (Ryser and Marth, 1991) สำหรับในคนพบว่าการเกิดโรคลิสเทอริโอซิสโดยทั่วไปแล้วจะเกิดเฉพาะกับคนที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่อง หญิงมีครรภ์ ทารกในท้อง และผู้สูงอายุเท่านั้น ซึ่งผู้ป่วยที่เป็นโรคลิสเทอริโอซินั้นเกิดจากสารพิษประเภทเอนเทอโรทอกซิน (Enterotoxin) ที่สร้างจากเชื้อ *L. monocytogenes* โดยจะมีอาการแตกต่างกันไป เช่น โลหิตเป็นพิษ วิงเวียนศีรษะ เชื้อหุ้มสมองอักเสบ เป็นไข้และอาเจียน ทำให้เกิดอาการแพ้ในหญิงมีครรภ์ เป็นต้น แต่เดิมเชื่อว่าการติดเชื้อนี้เกิดจากการสัมผัสกับสัตว์ที่เป็นพาหะ แต่ต่อมาได้มีการค้นพบว่าการตรวจพบเชื้อในอาหารประเภทนม ผักและเนื้อสัตว์ จึงทำให้ทราบว่าเชื้อ *L. monocytogenes* สามารถติดต่อทางอาหารได้ (foodborne pathogen) ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนแบคทีเรีย *L. monocytogenes* ในอาหารย่อมทำให้เกิดผลเสียต่างๆ ตามมา (Chanwitayanuchit, 2010) ด้วยเหตุนี้การศึกษาการเพิ่มการผลิตสารแบคเทอริโอซินโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 ที่แยกได้จากปลาตุ๋นเพื่อยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* จึงเป็นแนวทางหนึ่งที่จะลดการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคในอาหารโดยไม่ใช้สารเคมีได้

แบคทีเรียแลคติกเป็นเชื้อกลุ่มที่ต้องการอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความอุดมสมบูรณ์มากในการเติบโต ดังนั้นเพื่อที่จะเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณเซลล์สูงและมีการสร้างสารต่างๆ ที่ต้องการได้สูง จึงต้องมีการพัฒนาให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพเอื้อต่อการผลิตมวลเซลล์ของแบคทีเรียแลคติกสำหรับองค์ประกอบต่างๆ ในอาหารนั้นพบว่าการผลิตสารแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลคติกต่างชนิดกันก็จะมีความสามารถในการผลิตที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ อุณหภูมิ และค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอริโอซิน

ของแบคทีเรียแลคติกต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างกันไปด้วย (Yunchalard and Nontasen, 2011) งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาการเพิ่มการผลิตสารแบคเทอรีโอซินจากเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคเทอรีโอซิน เพื่อยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การผลิตสารแบคเทอรีโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆ

1.1 การเตรียมแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคเทอรีโอซิน

ถ่ายเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากปลาตุ๋น ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จาก glycerol stock ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 10 มิลลิลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบการผลิตสารแบคเทอรีโอซินปริมาตร 500 มิลลิลิตร (2 % inoculums; v/v) โดยชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มีดังนี้

อาหารสำเร็จรูป ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ APT broth ยี่ห้อ : Fluka อาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion Broth (BHI broth) ยี่ห้อ : Fluka อาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS Broth (MRS broth) ยี่ห้อ : Himedia และอาหารเลี้ยงเชื้อ M17 broth ยี่ห้อ : Himedia

อาหารธรรมชาติ ได้แก่ อาหารน้ำมะพร้าว มีส่วนประกอบ คือ น้ำมะพร้าว (น้ำมะพร้าวแก่ และน้ำมะพร้าวอ่อน) 1000 มิลลิลิตร Peptone 10 กรัม Yeast extract 5 กรัม Tween 80 1 กรัม Ammonium

sulphate 2 กรัม Sodium acetate 5 กรัม (Hongeak *et al.*, 2009) และ อาหารถั่วเหลืองบดผสมโมลาส มีส่วนประกอบ คือ ถั่วเหลืองบดร้อยละ 10 และ โมลาสร้อยละ 2, 4, 6, 8, 10 โดยอัตราส่วนจะเปลี่ยนแปลงเฉพาะโมลาส ส่วนถั่วเหลืองบดไม่เปลี่ยนแปลง

1.2 การเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ถ่ายเชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 ปริมาตร 10 ไมโครลิตร จาก Glycerol stock ลงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient soft agar 4 มิลลิลิตร

1.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี agar well diffusion

นำเชื้อแบคทีเรีย *E. faecium* PDN-Ta10 ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบการผลิตสารแบคเทอรีโอซิน บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปศึกษาความหนาแน่นของเซลล์ โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 โดยหมุนแยกเซลล์ออกโดยใช้ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปปรับ pH ให้เป็นกลาง (โดยใช้ 1 N NaOH) จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงหลอดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 8 มิลลิเมตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่เททับด้วยเชื้อแบคทีเรีย *L. monocytogenes* DMST17303 จากข้อ 1.2 บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง รายงานผลเป็นค่า Arbitrary Unit/ml (AU/ml) โดยนำส่วนใส มาทำ 2 fold dilution ตรวจสอบผลการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์

ของสารแบคทีเรียโอซินโดยดูจากระดับความเจือจาง
สุดท้ายที่ทำให้เกิดวงใสในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์

(Srionnual *et al.*, 2007)

กิจกรรมการยับยั้ง = $\frac{1,000 \times \text{ความเจือจางสุดท้ายที่ทำให้เกิดวงใสในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์}}{100}$
(AU/ml)

2. ศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อและอุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก *E. faecium* PDN-Ta10 ความเข้มข้นร้อยละ 2 (2% inoculums; v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียแลคติกสามารถ
สร้างสารแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดปริมาณ 500 มิลลิกรัม โดยปรับ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ
เป็น 4.5, 5.0, 5.5, 6.0 และ 6.5 (Todorov and Dicks, 2006) และเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 20, 25, 30, 35, 37, 40
และ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 2 ชั่วโมง
เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปศึกษาความหนาแน่นของ
เซลล์ โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร (OD
660 nm) และหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ
แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *L. monocytogenes*
DMST17303 โดยวิธี agar well diffusion และ
รายงานผลการยับยั้งในหน่วย Arbitrary Unit/ml

3. ศึกษาแหล่งของสารคาร์บอน และ สารไนโตรเจนที่ เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติก *E. faecium* PDN-Ta10 ความเข้มข้นร้อยละ 2 (2% inoculums; v/v)
ในสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียแลคติกสามารถ
สร้างสารแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดปริมาณ 500
มิลลิกรัม (โดยมีการดัดแปลงให้เป็นสูตรอาหาร
พื้นฐานที่มีส่วนผสมทุกอย่างเหมือนอาหารเลี้ยงเชื้อ
ทางการค้าแต่ไม่มีสารอินทรีย์ และน้ำตาล) เสริม
ด้วยแหล่งไนโตรเจน คือ Tryptone, Meat extract,
Yeast extract และ Peptone (ร้อยละ 0.1, 1.0, 2.0
และ 3.0 w/v) และแหล่งคาร์บอน คือ น้ำตาล

Fructose, Lactose, Maltose และ Mannose (ร้อยละ
0.1, 1.0, 2.0 และ 3.0 w/v) ปรับ pH และบ่มที่
อุณหภูมิที่เชื้อสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้
สูงสุด เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่เชื้อสามารถสร้างสาร
แบคทีเรียโอซินได้สูงสุด ไปศึกษาความหนาแน่น
ของเซลล์ โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร
และหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเค
เตอร์ *L. monocytogenes* DMST17303 โดยวิธี agar
well diffusion และรายงานผลการยับยั้งในหน่วย
Arbitrary Unit/ml และทำการเสริมแหล่งของสาร
คาร์บอน และ สารไนโตรเจนที่ทำให้เชื้อแบคทีเรีย
แลคติก *E. faecium* PDN-Ta10 ผลิตสารแบคทีเรีย
โอซินได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปลงใน
อาหารสูตรธรรมชาติ บ่มที่อุณหภูมิที่เชื้อสามารถ
สร้างสารแบคทีเรียโอซินได้สูงสุด และเก็บตัวอย่าง
ที่ชั่วโมงที่เชื้อสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้
สูงสุด ไปศึกษาความหนาแน่นของเซลล์ โดยวัดค่า
ดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และหาประสิทธิภาพ
การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *L.*
monocytogenes DMST17303 โดยวิธี agar well
diffusion และรายงานผลการยับยั้งในหน่วย
Arbitrary Unit/ml

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

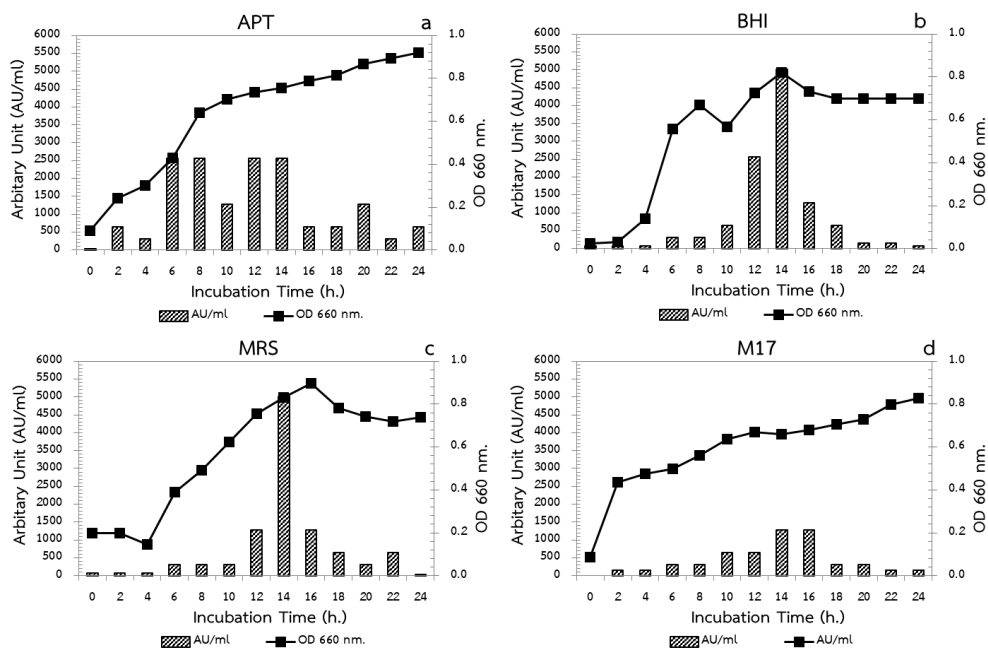
เชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ที่ใช้ในงานวิจัย
นี้เป็นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากปลาตุ๋น
และสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ในการ

ยับยั้งเชื้อก่อโรค *L. monocytogenes* DMST17303 (Srionnual and Mahae, 2013)

แบคทีเรียโอซินมีปริมาณเพิ่มขึ้นตามการเติบโตของเซลล์แบคทีเรียที่สร้าง โดยเฉพาะแบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติก ดังนั้น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และสภาวะในการเติบโตจึงมีความสำคัญต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน ซึ่งพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมจะเป็นอาหารที่มีองค์ประกอบที่ซับซ้อน เช่น APT BHI MRS และ M17 เป็นต้น โดยในการผลิตแบคทีเรียโอซินจะต้องคำนึงถึงแหล่งและปริมาณสารคาร์บอน ปริมาณไนโตรเจน ปริมาณฟอสเฟต และสารลดแรงตึงผิวต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยพบว่าปัจจัยที่จะส่งผลต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

ของแบคทีเรียแลกติกมาก คือ สารคาร์บอน และสารไนโตรเจน

การทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว APT BHI MRS และ M17 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 1 พบว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 มีการเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิด โดยมีค่าความหนาแน่นของเซลล์ใกล้เคียงกัน ($OD_{660\text{ nm}} = 0.7 - 0.9$ ในระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 24 ชั่วโมง) และพบว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้สูงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI และ MRS (ภาพที่ 1b และ c) โดยมีค่าการผลิตสารแบคทีเรียโอซินเท่ากับ 5,020 AU/ml. ในชั่วโมงที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อ



ภาพที่ 1 การเติบโตและผลิตสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อทางการค้า

เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตจำหน่ายทางการค้ามักมีราคาแพง เมื่อเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับแบคทีเรียทั่วไป การผลิตสารแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียแลกติกจึงมีต้นทุนค่อนข้างสูงถ้ามีการใช้อาหารสำเร็จรูปทาง

การค้าในการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตแบคทีเรียโอซิน แต่การหาแหล่งอาหารที่มีราคาถูกมาใช้ในการผลิตต้องคำนึงถึงปริมาณสารอาหารที่จำเป็นต่อการเติบโต และปริมาณสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตได้จากอาหารนั้น และในอาหารนั้นต้องไม่มีสารพิษที่เป็นอันตราย

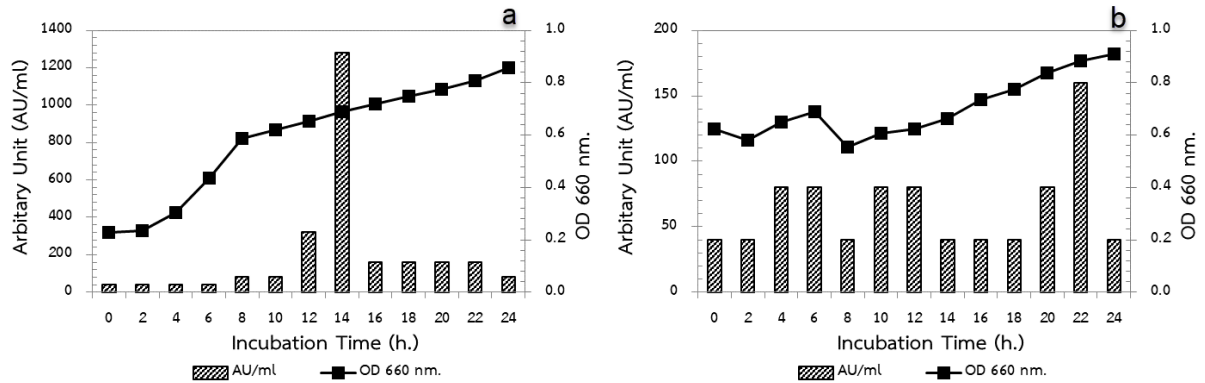
ต่อเชื้อแบคทีเรียแลคติก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการทดลองใช้อาหารน้ำมะพร้าวและอาหารถั่วเหลืองบดผสมโมลาสมาใช้เป็นอาหารสำหรับเลี้ยงเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 เพื่อลดค่าใช้จ่ายของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดลองเลี้ยงเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารธรรมชาติ ได้แก่ น้ำมะพร้าวแก่ น้ำมะพร้าวอ่อน และอาหารถั่วเหลืองบดร้อยละ 10 ผสมโมลาสร้อยละ 2 - 10 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่เวลา 12, 14 และ 16 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นช่วงเวลาที่พบว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้สูง พบว่า เชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดในอาหารน้ำมะพร้าวแก่ และในอาหารถั่วเหลืองบดร้อยละ 10 ที่มีโมลาสร้อยละ 6 (ไม่ได้แสดงข้อมูล) จึงได้คัดเลือกอาหาร 2 สูตรดังกล่าวไปศึกษากิจกรรมการยับยั้งโดยแบคทีเรียโอซินจากเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 - 24 ต่อไป

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารน้ำมะพร้าวแก่ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 มีการผลิตสารแบคทีเรียโอซินด้วยค่าสูงสุด เท่ากับ 1,280 AU/ml ในชั่วโมงที่ 14 (ภาพที่ 2a) ในขณะที่เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารถั่วเหลืองบดร้อยละ 10

ผสมโมลาส ร้อยละ 6 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 มีการผลิตสารแบคทีเรียโอซินด้วยค่าสูงสุด เท่ากับ 160 AU/ml ในชั่วโมงที่ 22 (ภาพที่ 2b)

สำหรับน้ำมะพร้าวจัดเป็นแหล่งอาหารราคาถูกที่สามารถนำมาใช้สำหรับการผลิตแบคทีเรียโอซินได้ เนื่องจากในน้ำมะพร้าวมีสารอาหารต่างๆ ที่จุลินทรีย์สามารถนำไปใช้ในการเติบโตได้ โดยพบว่าน้ำมะพร้าวแก่มีสารอาหารต่างๆ รวมทั้งน้ำตาลรีดิวซ์ซึ่งมากกว่าในน้ำมะพร้าวอ่อน (Krishnankutty, 1987) และจากการทดลองของ Hongek et al. (2009) พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Pediococcus acicilactici* CP7-3 และ *Weissella confusa* CP3-1 มีการสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบได้ดีเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรน้ำมะพร้าวสำหรับในอาหารถั่วเหลืองบดร้อยละ 10 ผสมโมลาสร้อยละ 6 พบว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 สามารถเติบโตและผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้น้อยอาจเนื่องมาจากเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 มีความต้องการสารอาหารที่เฉพาะเจาะจง (specific nutrients) สำหรับการเติบโต เช่นเดียวกับการทดลองของ Todorov and Dicks (2007) ที่พบว่าเชื้อ *Lactobacillus pentosus* ST712BZ มีการเติบโตและผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้น้อยมากเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารนมถั่วเหลืองและโมลาสร้อยละ 10



ภาพที่ 2 การเติบโตและผลิตสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารน้ำมะพร้าวแก่ (a) และอาหารถั่วเหลืองบดร้อยละ 10 ผสมโมลาสร้อยละ 6 (b)

เนื่องจากงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่าการผลิตสารแบคทีเรียโอซินจากแบคทีเรียแลคติกนั้นขึ้นอยู่กับ การเติบโตของเชื้อที่ผลิต โดยเมื่อการเติบโตของแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้น ก็จะสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีค่าการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สูงขึ้นเช่นกัน (Parente and Riccardi, 1999) ดังนั้นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อจะส่งผลให้การผลิตสารแบคทีเรียโอซินมีปริมาณมากที่สุดด้วย และจากผลการทดลองที่ได้ข้างต้นทางผู้วิจัยจึงได้คัดเลือกอาหารสำเร็จรูป คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เนื่องจากมีราคาถูกกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI และแหล่งอาหารธรรมชาติ คือ น้ำมะพร้าวแก่ เป็นอาหารสำหรับศึกษา pH อุณหภูมิ และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยง

เชื้อที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตแบคทีเรียโอซินโดยเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10

จากการศึกษาผลของค่า pH และอุณหภูมิ ที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อแบคทีเรียแลคติก *E. faecium* PDN-Ta10 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth พบว่าแบคทีเรียแลคติก *E. faecium* PDN-Ta10 สร้างสารแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดในช่วงชั่วโมงที่ 14 ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำเร็จรูป MRS ในทุกค่า pH ที่ทำการทดลอง คือ pH 4.5 5.0 5.5 6.0 และ 6.5 อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 35 องศาเซลเซียส โดยเชื้อมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *L. monocytogenes* DMST17303 ได้สูงสุดเป็น 1,280 AU/ml (ภาพที่ 3)



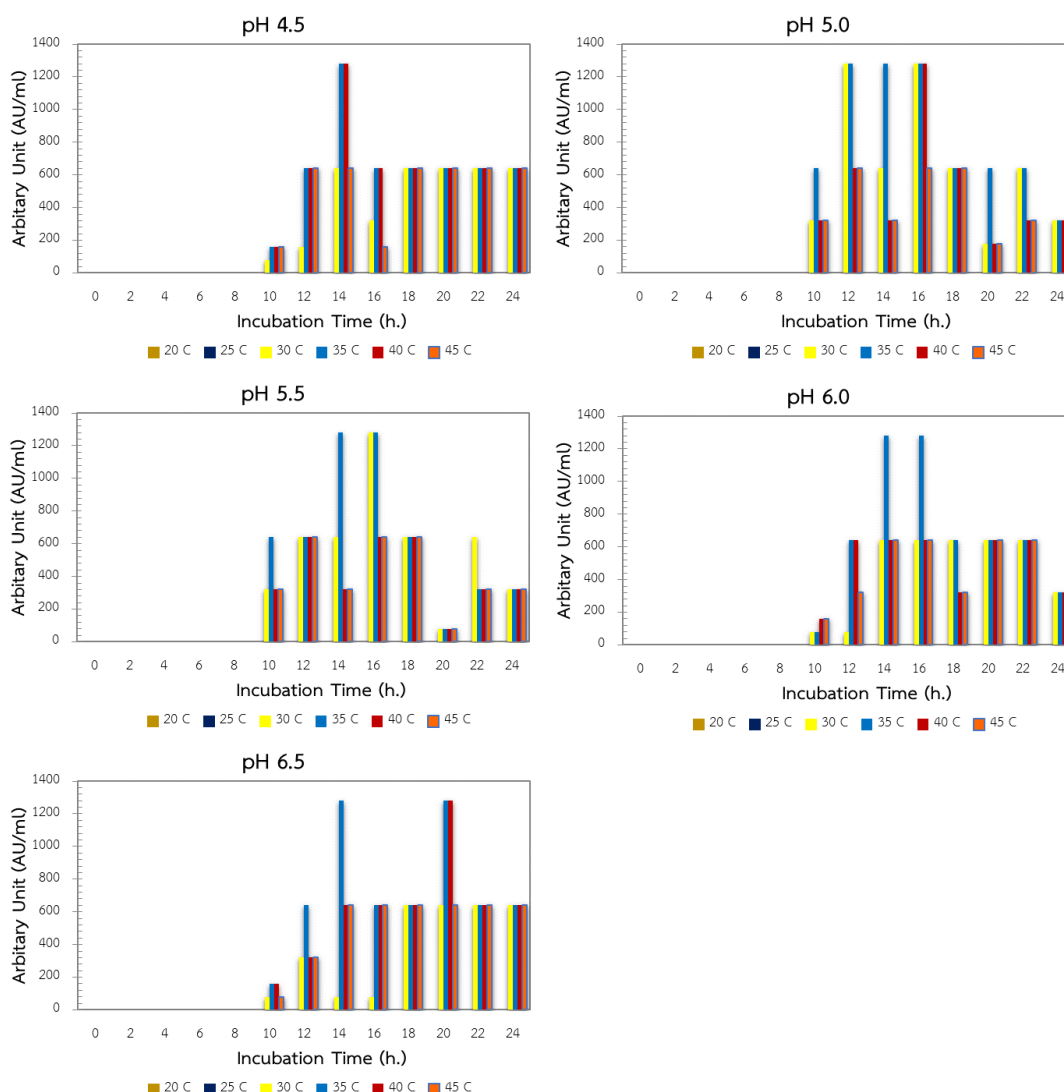
ภาพที่ 3 การเติบโตและผลิตสารแลกเทอริโอซินของเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหาร MRS broth ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารน้ำมะพร้าวแก่ พบว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรีย *L. monocytogenes* DMST17303 ได้สูงสุดเป็น 1,280 AU/ml ที่อุณหภูมิในการเพาะเลี้ยง 35 องศาเซลเซียส ที่ทุกค่า pH ที่ทำการทดลอง (ภาพที่ 4) แต่ที่ค่า pH 6.0 เชื้อจะมีค่าความหนาแน่นของเซลล์ที่ค่า OD 660 nm มากที่สุด (ไม่ได้แสดงข้อมูล) และจะเห็นได้ว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 เริ่มมีการผลิตสารแลกเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 ของการบ่มเชื้อ แต่จะเริ่มผลิตสารแลกเทอริโอซินในอาหารน้ำมะพร้าวแก่ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 10 ของการบ่มเชื้อ อาจเนื่องมาจากเชื้อแบคทีเรียแลกติกสามารถเติบโตในอาหาร MRS ได้เร็วกว่าอาหาร

น้ำมะพร้าว เช่นเดียวกับการทดลองของ Hongsak et al. (2009) ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Pediococcus acidilactici* CP7-3 เติบโตได้เร็วในอาหาร MRS broth แต่เติบโตได้ช้าในอาหารน้ำมะพร้าวโดยมีค่า Specific growth rate (μ) เท่ากับ 0.62 h^{-1} และ 0.39 h^{-1} ตามลำดับ สำหรับอุณหภูมิ และ pH ที่เหมาะสมในการผลิตสารแลกเทอริโอซินในอาหารสำเร็จรูป และอาหารธรรมชาติโดยเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 มีความสอดคล้องกับการผลิตสารแลกเทอริโอซินจากเชื้อ *E. faecium* สายพันธุ์อื่นๆ หลายสายพันธุ์ เช่น จากการทดลองของ Kang and Lee (2005) พบว่าเชื้อ *E. faecium* GM-1 ที่แยกได้จากอุจจาระของเด็กทารกสามารถผลิตสารแลกเทอริโอซินได้สูงสุดที่ค่า pH 6.0-6.5 อุณหภูมิ 35 - 40 องศาเซลเซียส ในขณะที่

ที่เชื้อ *E. faecium* CTC492 ผลิตสารแบคเทอริโอซิน A และ B ได้สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ค่า pH 6-7.5 อุณหภูมิตั้งแต่ 25 ถึง 35 องศาเซลเซียส (Aymerich *et al.*, 2000) เช่นเดียวกับการทดลองของ Kumar and Srivastava (2010) ที่พบว่าเชื้อ *E. faecium* LR/6 ผลิต enteriocin ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่า pH 6.0

การทดลองนี้จึงทำการคัดเลือกเวลาในการเพาะเลี้ยง เชื้อที่ เวลา 14 ชั่วโมง อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และค่า pH 6.0 ในการทดลองศึกษาแหล่งไนโตรเจน และแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตสาร แบคเทอริโอซิน



ภาพที่ 4 การเติบโตและผลิตสารแบคเทอริโอซินของเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารน้ำมะพร้าวแก่ ที่ pH และอุณหภูมิต่างๆ

จากการศึกษาผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซิน พบว่า เชื้อแบคทีเรียแลคติก *E. faecium* PDN-Ta10 ผลิตสาร

แบคเทอริโอซินได้ดีที่สุดในอาหาร MRS broth สูตรพื้นฐานที่มีการเสริมด้วย Tryptone ร้อยละ 3 รองลงไป คือ Beef extract ร้อยละ 3 ส่วนใน Peptone และ

Yeast extract ไม่แสดงกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 (ตารางที่ 1) จากการศึกษาสารอาหารที่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าเมื่อมี Tryptone อยู่ในสูตรอาหารจะทำให้เชื้อผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้มาก สอดคล้องกับการทดลองของ Saraniya and Jeevaratnam (2014) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus pentosus* ผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้สูงในอาหารที่มีส่วนผสมประกอบด้วย Tryptone หรือ Soy peptone, Yeast extract, Glucose, Triammonium citrate, $MnSO_4$, Dipotassium hydrogen phosphate และ Tween 80 เช่นเดียวกับ Khay *et al.* (2013) ที่พบว่าเชื้อ *Enterococcus durans* E204 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากนมอูฐสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เสริมด้วย

Tryptone, Yeast extract, Glucose และ Tween 80 ได้สูงกว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS สูตรปกติ และจากการทดลองของ Todorov and Dicks (2006) พบว่าการผลิตสารแบคทีเรียโอซินโดยเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ST341LD เพิ่มขึ้นได้เมื่อมี Tryptone เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ และการผลิตสารแบคทีเรียโอซินจะลดลงร้อยละ 50 เมื่อมี Glucose ปริมาณ 10 หรือ 40 กรัมต่อลิตร หรือมี KH_2PO_4 ปริมาณ 5 หรือ 10 กรัมต่อลิตรในอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงเลือกใช้อาหาร MRS broth สูตรพื้นฐานร่วมกับ Tryptone ร้อยละ 3 ในการศึกษาผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินต่อไป

ตารางที่ 1 ผลของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินในอาหาร MRS สูตรพื้นฐาน

ร้อยละของ แหล่งไนโตรเจน	Tryptone				Beef extract				Peptone				Yeast extract			
	0.1	1	2	3	0.1	1	2	3	0.1	1	2	3	0.1	1	2	3
OD 660 nm	0.14	0.24	0.32	0.51	0.20	0.31	0.44	0.55	0.15	0.25	0.42	0.49	0.13	0.28	0.60	0.67
ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)	80	320	640	2,560	40	80	160	1,280	0	0	0	0	0	0	0	0

เมื่อมีการใช้แหล่งไนโตรเจนคือ Tryptone ร้อยละ 3 ร่วมกับแหล่งคาร์บอน คือ Fructose, Lactose, Maltose และ Mannose ในอาหาร MRS สูตรพื้นฐาน พบว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเสริมด้วย Tryptone ร้อยละ 3 ร่วมกับการใช้น้ำตาล Mannose ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 เป็น 2,560 AU/ml. และพบว่าการเพิ่มแหล่งคาร์บอนอื่นๆ คือ Fructose, Lactose และ Maltose ร่วมกับแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสม ไม่มีผลต่อการเพิ่มการผลิตสารแบคทีเรียโอซินของเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 และแหล่ง

คาร์บอนบางอย่างทำให้การผลิตสารแบคทีเรียโอซินลดลงด้วย (ตารางที่ 2) สำหรับผลของแหล่งคาร์บอนต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี แต่ในบางครั้งพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกบางชนิดสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้ดีเมื่อมีการใช้น้ำตาลชนิดอื่นๆ เป็นแหล่งคาร์บอน โดยเฉพาะเชื้อ *E. faecium* เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการเมตาบอลิซึมแหล่งคาร์บอนได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับกิจกรรมจำเพาะของเอนไซม์ที่เชื้อผลิตขึ้นว่าจะมีความสามารถในการย่อยสลายแหล่งคาร์บอนได้หรือไม่ ในบางครั้งการเติมน้ำตาลชนิดต่างๆ เป็นแหล่งคาร์บอน ทำให้การผลิตสาร

แบคทีเรียโอซินลดลงได้ เนื่องจากน้ำตาลที่ใช้ไม่เหมาะสมต่อการเติบโตของแบคทีเรียแลคติก ทำให้เกิดความเครียดออสโมติก (osmotic stress) ส่งผลให้เชื้อแบคทีเรียแลคติกมีความต้องการพลังงานมากขึ้น

การผลิตสารแบคทีเรียโอซินจึงลดลง (Abbasilasi *et al.*, 2017)

ตารางที่ 2 ผลของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซินในอาหาร MRS สูตรพื้นฐานเมื่อใช้ Tryptone ร้อยละ 3 เป็นแหล่งไนโตรเจน

ร้อยละของแหล่งคาร์บอน	Fructose				Lactose				Maltose				Mannose			
	0.1	1	2	3	0.1	1	2	3	0.1	1	2	3	0.1	1	2	3
OD 660 nm	0.62	0.56	0.7	0.82	0.41	0.53	0.64	0.78	0.53	0.67	0.71	0.79	0.65	0.7	0.85	0.93
ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)	0	0	160	160	0	0	160	320	0	0	0	20	640	640	2,560	2,560

จะเห็นได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งของเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แต่ละครั้งมีความแตกต่างกันโดยในส่วนของการเปรียบเทียบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางการค้า พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเป็น 5,020 AU/ml. แต่เมื่อทำการศึกษาผลของอุณหภูมิ และค่า pH ที่เหมาะสมต่อการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 1,280 AU/ml. อาจเนื่องมาจากการเลี้ยงเชื้อในครั้งนี้ใช้เชื้อที่เก็บไว้นาน โดยไม่ได้ทำการ subculture ใหม่จึงทำให้การผลิตสารแบคทีเรียโอซินลดลง ทางผู้วิจัยจึงทำการ subculture เชื้อใหม่ และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรพื้นฐานเสริมด้วยแหล่งไนโตรเจนและคาร์บอน พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 2,560 AU/ml. ซึ่งยังน้อยกว่าในอาหาร MRS สำเร็จรูปทางการค้า ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าส่วนผสมต่างๆ ในอาหาร MRS สูตรพื้นฐานมีคุณภาพที่แตกต่างกับอาหาร MRS สำเร็จรูปทางการค้า จึงควรมีการควบคุมคุณภาพของสารต่างๆ ที่นำมาใช้เป็นส่วนผสมในอาหาร MRS สูตรพื้นฐานให้มีคุณภาพที่ได้มาตรฐาน

เดียวกับส่วนผสมในอาหาร MRS สำเร็จรูปทางการค้า

การที่แบคทีเรียแลคติกต้องการอาหารที่มีความอุดมสมบูรณ์มากในการเติบโต ดังนั้นเพื่อการเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาณเซลล์และสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้สูงเพียงพอต่อความต้องการ จึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องพัฒนาให้ได้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีประสิทธิภาพต่อการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยพบว่า อาหารที่นิยมใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก คือ อาหาร MRS ซึ่งสามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดเมื่อเทียบกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่นๆ สำหรับองค์ประกอบต่างๆ ในอาหารนั้นพบว่าการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแลคติก ต่างชนิดกันก็จะมีความสามารถในการผลิตที่แตกต่างกันโดยแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีกว่าน้ำตาลฟรุคโตส และสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ที่ไม่ซับซ้อน เช่น Tryptone ได้ดีกว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนที่เป็นสารอินทรีย์ซับซ้อน เช่น Meat extract (Yunchalard and Nontasen, 2011) ซึ่งผลการศึกษาในงานวิจัยนี้พบว่า เชื้อ *E. faecium*

PDTa10 ผลิตภัณฑ์แบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุดในอาหาร MRS broth สูตรพื้นฐานที่มีการเสริมด้วย Tryptone และ Mannose สำหรับอุณหภูมิ และค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแลคติกต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างกันไปด้วย

เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 ในสูตรอาหารน้ำมะพร้าวแก่ที่มีการเติมแหล่งอาหารต่างๆ เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจน คือ

Tryptone 30 กรัม และ แหล่งไนโตรเจน คือ Mannose 30 กรัม พบว่าเชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST 17303 เป็น 2,560 AU/ml. (ตารางที่ 3) เท่ากับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรพื้นฐาน จึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้แหล่งอาหารจากธรรมชาติมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

ตารางที่ 3 การผลิตสารแบคทีเรียโอซินในอาหารน้ำมะพร้าวแก่เสริมด้วย Tryptone และ Mannose

สูตรอาหารน้ำมะพร้าวแก่	น้ำมะพร้าวแก่	Bacto-peptone	Yeast extract	Tween 80	Ammonium citrate	Sodium acetate	Tryptone	Mannose
	1 ลิตร	10 กรัม	5 กรัม	1 มิลลิลิตร	2 กรัม	5 กรัม	30 กรัม	30 กรัม
OD 660 nm	0.81							
ค่ากิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)	2,560							

สรุป

เชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 เติบโตและสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปทางการค้า คือ MRS broth และอาหารธรรมชาติ คือ น้ำมะพร้าว โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 เป็น 5,020 AU/ml และ 1,280 AU/ml ตามลำดับ ที่ค่า pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน คือ 6.0 และ 35 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 14 ชั่วโมง

เชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 สร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรดัดแปลงที่เสริมด้วยแหล่งไนโตรเจน คือ tryptone ร้อยละ 3 โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 2,560 AU/ml และแหล่งคาร์บอน 4 ชนิด คือ Fructose, Lactose, Maltose และ Mannose ไม่ทำให้เชื้อมีค่า

กิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้น แต่เชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 สามารถผลิตสารแบคทีเรียโอซินได้สูงสุดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเสริมด้วย Tryptone ร้อยละ 3 ร่วมกับการใช้น้ำตาล Mannose ร้อยละ 3 เป็นแหล่งคาร์บอน โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 2,560 AU/ml

เชื้อ *E. faecium* PDN-Ta10 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารน้ำมะพร้าวที่เสริมด้วย Tryptone ร้อยละ 3 และ Mannose ร้อยละ 3 เป็น 2,560 AU/ml ซึ่งมีความเป็นไปได้ที่จะใช้แหล่งอาหารจากธรรมชาติมาเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตสารแบคทีเรียโอซิน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน งบประมาณประจำปี 2558

เอกสารอ้างอิง

- Abbasiliasi, S., Tan, J.S., Ibrahim, T.A.T., Bashokouh, F., Ramakrishnan, N.R., Mustafaab, S. and Ariff, A.B. 2017. Fermentation factors influencing the production of bacteriocins by lactic acid bacteria: A review. **The Royal Society of Chemistry** 7: 29395-29420.
- Atrih, A., Rekhif, N., Moir, A.J.G., Lebrihi, A. and Lefebvre, G. 2001. Mode of action, purification and amino acid sequence of plantaricin C19, an anti-*Listeria* bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* C19. **International Journal of Food Microbiology** 68: 93-104.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, pp. 1-66. In Salminen, S., von Wright and Ouwehand, A., eds. **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**. Marcel Dekker, Inc, New York.
- Aymerich, T., Artigas, M.G., Garriga, M., Monfort, J.M. and Hugas, M. 2000. Effect of sausage ingredients and additives on the production of enterocin A and B by *E. faecium* CTC492. Optimization of in vitro production and anti-listerial effect in dry fermented sausages. **Journal of Applied Microbiology** 88(4): 668-694.
- Caridi, A. 2002. Selection of *Escherichia coli*-inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 29: 303-308.
- Chanwitayanuchit, S. 2010. *Corynebacterium*, *Listeria*, *Erysipelothrix* and *Lactobacillus*, pp. 157-172. In Chanwitayanuchit, I. and Rungseephanurat, W., eds. **Medical Bacteriology**. ChulaPress, Bangkok. (in Thai)
- Coventry, M.J., Gordon, J.B.A., Wilcock, K., Harmark, B.E., Davidson, M.W., Hickey, A.J. Hillier and Wan, J. 1997. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from food and comparison with pediocin and nisin. **Journal of Applied Microbiology** 83: 248-258.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Lactic acid bacteria and bacteriocins: Their practical importance, pp. 1-11. In De Vuyst, L. and Vandamme, E.J., eds. **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria**. Blackie Academic & Professional, Glasgow.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class Ila bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews** 24: 85-106.
- Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas, J.C. 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie** 84: 577-592.
- Hongek, S., Vatanyoopaisarn, S. and Phalakornkule, C. 2009. Cell growth and bacteriocinogenic activity of *Pediococcus acidilactici* CP7-3 and *Weissella confusa* CP3-1 under different culture media, pp. 620-629. In **The 47th Kasetsart University Annual Conference**. Kasetsart university, Bangkok. (in Thai)

- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews** 59: 171-200.
- Kang, J.H. and Lee, M.S. 2005. Characterization of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. **Journal of Applied Microbiology** 98(5): 1169-1176.
- Khay, E.O., Ouhsassi, M., Harsal, A., Idaomar, M. and AbriniI, J. 2013. Optimization of bacteriocin-like production by *Enterococcus durans* E204 isolated from camel milk of Morocco. **Current Research in Microbiology and Biotechnology** 1(4): 155-159.
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews** 12: 39-85.
- Ko, S.H. and Ahn, C. 2000. Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from white kimchi. **Food Science and Biotechnology** 9: 263-269.
- Krishnankutty, S. 1987. **Tender Coconut Water**. Available Source: http://www.navimpex.com/fic_bdd/produits_pdf_fr_fichier/12500044750_Tender_Coconut_Water.pdf, January 9, 2020.
- Kumar, M. and Srivastava, S. 2010. Enhanced production of enteriocin from *E. faecium* LR/6 by statistical optimization of the growth medium. **Trakia Journal of Sciences** 8(4): 12-21.
- Messens, W. and De Vuyst, L. 2002. Inhibitory substances produced by *Lactobacilli* isolated from sourdoughs-A review. **International Journal of Food Microbiology** 72: 31-43.
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R. and Manicardi, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **International Journal of Food Microbiology** 64: 193-198.
- Parente, E. and Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. **Applied Microbiology and Biotechnology** 52(5): 628-638.
- Quinto, E.J., Jiménez1, P., Caro, I., Tejero, J., Mateo, J. and Girbés, T. 2014. Probiotic lactic acid bacteria: A Review. **Food and Nutrition Sciences** 5: 1765-1775.
- Rhee, S.J., Lee, J.E. and Lee, C.H. 2011. Importance of lactic acid bacteria in Asian fermented foods, pp. 1-13. *In* 10th **Symposium on Lactic Acid Bacterium**. Microbial Cell Factories, Netherlands.
- Ryser, E.T. and Marth, E.H. 1991. **Listeria, Listeriosis and Food Safety**. Marcel Dekker, New York.
- Saraniya, A. and Jeevaratnam, K. 2014. Optimization of nutritional and non-nutritional factors involved for production of antimicrobial compounds from *Lactobacillus pentosus* SJ65 using response surface methodology. **Brazilian Journal of Microbiology** 45(1): 81-88.
- Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N. and Traore, A.S. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from

- Burkina Faso fermented milk. **Pakistan Journal of Nutrition** 3(3): 174-179.
- Sneath, P.H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E. and Holt, J.G. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**. (1st ed. vol. 2). Williams & Wilkins, Baltimore.
- Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L.H., Hsiao, K.N. and Chen, Y.S. 2007. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from *plaa-som*, a fermented fish product from Thailand. **Applied and Environmental Microbiology** 73: 2247-2250.
- Srionnual, S. and Mahae, N. 2013. Screening of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from dry fermented catfish (pla-duk-ra). **RMUTSV Research Journal** 5(2): 1-14. (in Thai)
- Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2006. Effect of medium components on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* strains ST23LD and ST341LD, isolated from spoiled olive brine. **Microbiological Research** 161: 102-108.
- Widyastuti, Y., Rohmatussolihat, R. and Febrisiantosa, A. 2014. The role of lactic acid bacteria in milk fermentation. **Food and Nutrition Sciences** 5(4): 435-442
- Yunchalard, S. and Nontasen, K. 2011. Bacteriocin from lactic acid bacteria which is used instead of food preservatives. **Journal of Academic Service, Khon Kaen University** 19(1-2): 4-10. (in Thai)