บทคัดย่อ

จากการนำเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินชนิดต่าง ๆ คือ pediocin PA-1 จาก *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 ที่คัดแยกได้จากแหนม nisin Z จาก *Lactococcus lactis* spp. *lactis* N12 ที่คัดแยกได้จากขนมจีน nisin A จาก *Lc. lactis* spp. *lactis* Sb2 ที่คัดแยกได้จากลำไส้ปลากระพง และสาร plantaricin W จาก *Lactobacillus plantarum* NF3 ที่คัดแยกได้จากแหนมปลา มาศึกษาดูปริมาณการผลิตแบคเทอริโอซินในช่วงการเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* N12 สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุด (12,800 AU/ml) โดยใช้ระยะเวลาในการเจริญ 16 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *Lb. plantarum* NF3 สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียได้มากที่สุด (12,800 AU/ml) โดยใช้ระยะเวลาในการเจริญ 16-24 ชั่วโมง สาหรับ *Lc. lactis* Sb 2 ซึ่งสร้างสาร nisin A มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 12,800 AU/ml ในเวลา 18 ชั่วโมง ส่วน *P. pentosaceus* TISTR 536 สามารถสร้างสาร pediocin PA-1 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 3200 AU/ml ในช่วงเวลา 18-20 ชั่วโมง เมื่อนำแบคเทอริโอซินที่ผลิต จากเชื้อทั้งหมดดังกล่าวข้างต้นไปศึกษาผลของกลูต้าไธโอนความเข้มข้น 50 125 และ 250 mM ที่พบมากใน เนื้อสัตว์แทบทุกชนิด เพื่อดูผลต่อประสิทธิภาพของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ พบว่าประสิทธิภาพของสาร nisin A และ nisin Z จะลดลงตามระดับความเข้มข้นของสารกลูต้าไธโอนที่สูงขึ้น โดยค่ากิจกรรมการยับยั้ง(activity) ของสาร nisin A และ nisin Z ที่มีต่อ *Lis. innocua* ถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ในระดับความเข้มข้นของสารกลูต้าไธโอน 250 mM ที่อุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) และ 4 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่สารกลูต้าไธโอนที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีผลต่อค่ากิจกรรมการยับยั้งของสารแบคเทอริโอซิน plantaricin W และ pediocin PA-1 ทั้งในอุณหภูมิห้อง (30-32 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพียงเล็กน้อย จึงสรุปได้ว่า สารแบคเทอริโอซินในกลุ่ม nisin A nisin Z รวมถึงเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินในกลุ่ม nisin ไม่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยทางด้านจุลินทรีย์ของเนื้อสัตว์รวมถึงใช้เป็นกล้าเชื้อเพื่อควบคุมคุณภาพการหมักของเนื้อสัตว์ สาร pediocin PA-1 และ plantaricin W ร่วมถึงเชื้อที่ผลิตแบคเทอริโอซินทั้งสองจึงเป็นแนวโน้มที่น่าจะมีโอกาสนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อควบคุมคุณภาพและความปลอดภัยทางด้านจุลินทรีย์ของเนื้อสัตว์และอาหารหมักที่มีเนื้อสัตว์เป็นองค์ประกอบต่อไป

แต่เนื่องจากในการศึกษานี้พบว่า เชื้อ *Lb. plantarum* NF3 ซึ่งเป็นเชื้อที่ผลิต plantaricin W โดยมีการผลิตที่สูงกว่า pediocin PA-1 ที่ *P. pentosaceus* TISTR 536 ผลิตได้ และเชื้อสายพันธุ์ *P. pentosaceus* TISTR 536 มีการศึกษาถึงประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อมามากแล้ว ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้ จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาเฉพาะผลของ plantaricin W ที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* NF3 โดยเพิ่มความเข้มข้นของ crude แบคเทอริโอซินเริ่มต้นที่ผลิตได้จาก 12,800 AU/ml เป็น 51,200 AU/ml จากนั้นนำ crude แบคเทอริโอซินที่ทำให้เข้มข้นขึ้นไปศึกษาถึงผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์ *S.* Anatum ที่พบมากใน

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ โดยศึกษาความเข้มข้นของ plantaricin W 5,120 AU/ml ร่วมกับการใช้กรดแลคติกที่ความเข้มข้น 0.5 0.75 และ 1.0 % และ กลูต้าไธโอน 50 mM ในการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum ในหลอดทดลอง ซึ่งพบว่า plantaricin W และกลูต้าไธโอน ไม่ผลต่อต่อการยับยั้งเชื้อ *S.* Anatum แต่การยับยั้งเชื้อโรคอาหารเป็นพิษดังกล่าวจะเกิดขึ้นได้เนื่องจากกรดแลคติก ซึ่งความเข้มข้นของกรดแลคติกยิ่งมาก จะสามารถลดปริมาณเชื้อ *S.* Anatum ให้หมดไปได้เร็วกว่าและทำให้เซลล์ของ *S.* Anatum เกิดการบาดเจ็บขึ้นได้มาก ซึ่งจากการศึกษาพบว่าการใช้กรดแลคติก 1.0 และ 0.75 % จะลดเชื้อ *S.* Anatum ให้หมดไปในเวลา 4 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ และ plantaricin W ในระดับ 5,120 AU/ml มีส่วนช่วยในการเร่งให้การตายของ *S.* Anatum เกิดได้เร็วขึ้นในหลอดที่มีความเข้มข้นของกรดแลคติกอยู่ โดยที่หลอดที่มีความเข้มข้นของกรดแลคติก 1.0 % เชื้อ *S.* Anatum จะตายหมดในเวลา 4 ชั่วโมงเท่ากับหลอดที่ไม่มีการเติม plantaricin W แต่หลอดที่มีความเข้มข้นของกรด แลคติก 0.75 และ 0.5 % ร่วมกับ plantaricin W 5,120 AU/ml เชื้อ *S.* Anatum จะถูกทำลายจนหมดในเวลา 4 และ 6 ชั่วโมงตามลำดับ ซึ่งอัตราการตายของ *S.* Anatum เป็นผลจากการเกิดการบาดเจ็บของเซลล์ที่เกิดจากการอยู่ในสภาวะความเป็นกรดที่นาน จนทำให้ plantaricin W สามารถเข้าไปทำลายเซลล์ที่บาดเจ็บจนตายไปในที่สุด

เมื่อนำเอาความเข้มข้นของกรดแลคติก 0.75 และ 1.0 % ร่วมกับ crude plantaricin W 5,120 AU/ml ไปศึกษาถึงผลของสารทั้งสองต่อการควบคุมคุณภาพทางจุลินทรีย์และคุณภาพทางเคมีของเนื้อสันนอกโค พบว่า เนื้อโคที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 1 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับสาร plantaricin W ความเข้มข้น 5,120 AU/ml จะให้ผลในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดในเนื้อโคได้ดีที่สุด (2.70 log cfu/g) นอกจากนี้ยังพบว่าเนื้อโคที่สัมผัสสารผสมของสารละลายดังกล่าว มีค่าอัตราการเพิ่มขึ้นของเปอร์เซ็นต์การสูญเสียน้ำหนักของตัวอย่างเนื้อโค (1.87±0.25 %) ที่น้อยกว่ากลุ่มที่สัมผัสสารละลายกรดแลคติก 0.75 เปอร์เซ็นต์ เพียงอย่างเดียว ($P>0.05$) รวมถึงลดค่าความเป็นกรด-ด่าง (5.08±0.07) และค่าความสว่างของสีเนื้อโค (L^*) (50.51±0.12) ได้ดีกว่าการใช้สารละลายกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว ซึ่งเมื่อทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสทางด้านสี กลิ่น และความชอบโดยรวม พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) ซึ่งจะส่งผลดีต่อผู้ประกอบในการนำสารผสมดังกล่าวไปประยุกต์ใช้ในเนื้อสัตว์ประเภทต่างๆ เพื่อลดการใช้สารละลายกรดแลคติก ซึ่งจะส่งทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์มีความปลอดภัย สามารถยืดอายุ การเก็บรักษา พร้อมทั้งยังเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากยิ่งขึ้น

ABSTRACT

Optimum conditions in bacteriocins production from various strains of bacteriocin-producing lactic acid bacteria (LAB) were investigated. The results revealed that *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* N12 (nisin Z producer) and *Lactobacillus plantarum* NF3 (plantaricin W producer) could produce the highest amount of bacteriocin (12,800 AU/ml) at 30 °C for 16 hr and 16-24 hr, respectively. Nisin A from *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* Sb2 and pediocin PA-1 from *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 were obtained the highest amount of bacteriocin (12,800 and 3,200 AU/ml, respectively) at 30°C for 18 hr and 18-20 hr, respectively. Stability of bacteriocins (nisin A, nisin Z, pediocin PA-1 and plantaricin W on glutathione (50, 125 and 250 mM) were later investigated by analyzed for antimicrobial activity against of bacteriocins reacted with GSH in vitro by Indicator. It was implied that activity of nisin A and nisin Z were completely inhibited by 250 mM glutathione at room temperature (30-32°C) within 12 and 16 hr, respectively. Contrary, the activity of plantaricin W and pediocin PA-1 in the same concentration of glutathione (250 mM) were slightly inhibited at both room temperature and 4°C within 24 hr.

According to the higher productivity of plantaricin W produced from *Lb. plantarum* compared to pediocin PA-1 produced from *P. pentosaceus* TISTR 536 and numerous reports on the effect pediocin PA-1 produced from *P. pentosaceus* TISTR 536 on various bacterial pathogens in meat and meat products, thus, the further study of this project was mostly aimed on the effect of plantaricin W on some bacterial pathogens associated in meat. Increasing the concentration of crude plantaricin W was performed by using Amberlite XAD-16 resins to adsorb bacteriocins. Then, crude bacteriocins were eluted by 70 % isopropanol and followed by evaporator to remove all isopropanal. The results indicated that plantaricin W activities by using these steps were increased from 12,800 to 51,200 AU/ml, respectively. When effect of these concentrated crude bacteriocins were studied in combination with lactic acid and glutathione on growth inhibition and injury cells of *Salmonella* Anatum in an *In vitro* models, the results implied that at 0.75 and 1.0 % lactic acid with 5,120 AU/ml of plantaricin W with and without glutathione could completely inhibited the growth of all studied cells for 4 and 6 hr, respectively.

When the effect of lactic acid (0.75 and 1.0 %) and plantaricin W (5,120 AU/ml) on total bacteria was performed on surface of beef samples compared to the control ones (without dipped in any mixed solution), the results indicated that beef samples dipped in mixed solution (1.0 % lactic acid and 5,120

AU/ml plantaricin W) for 5 minutes and kept in the refrigerator (4 ± 1 ^{o}C) for 7 days could rapidly reduce the number of total bacteria count to 2.70 log cfu/g. Moreover, beef samples which dipped in this same mixed solution for 7 days, exhibited the statistically significant ($P \leq 0.05$) in pH decreasing (5.08±0.07), but no statistically significant in percentage of drip loss (1.87±0.25%) and lightness (L*) value (50.51±0.12). Organoleptic assessments (color, odor and overall acceptance) of all studied beef samples kept in the refrigerator (4 ± 1 ^{o}C) for 5 days by 30 panelists were undertaken using a 7-Hedonic scale. The results informed that the scores of beef samples dipped in 1.0 % lactic acid with plantaricin W 5,120 AU/ml was in the range of like/unlike scores to like scores, and the scores showed no statistically significant ($P > 0.05$) among other beef samples which dipped in 0.75 and 1.0 % of lactic acid, mixed solution of 0.75 % lactic acid and plantaricin W, and control samples. Beef samples dipped in crude plantaricin W (5,120 AU/ml) solution alone implied to be significantly accepted in color, odor and overall acceptance by panelists. From the overall results in this study, hence, it is implied that the natural bacteriocin "plantaricin W" produced from *Lb. plantarum* NF3 can be used in combination with lactic acid to reduce the contamination of bacterial pathogens in meat in order to ensure the safety during keeping period of meat for consumers.