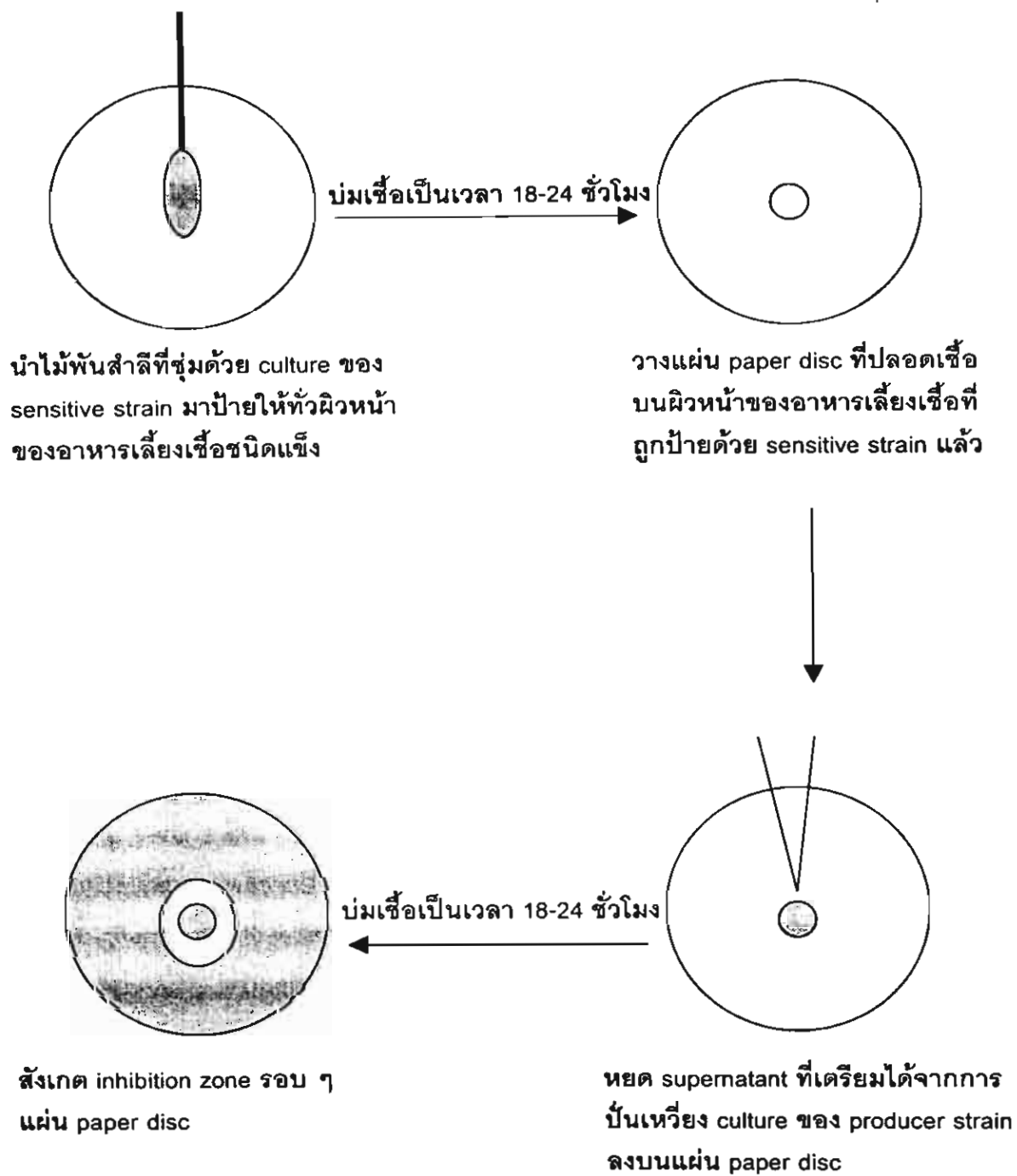




รูปที่ 3 การทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีริโอซินของแบคทีเรีย โดยวิธี swab-paper disc

ปัจจัยที่มีผลต่อการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรีย

การทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น

- วิธีการที่ใช้ในการทดสอบ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้นว่าวิธีการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียมีหลายวิธี เช่น วิธี agar spot test วิธี well diffusion และ วิธี swab-paper disc เป็นต้น ซึ่งวิธีการดังกล่าวแต่ละวิธีจะมีความไว (sensitivity) ที่แตกต่างกัน ดังนั้นถ้าใช้วิธีการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียที่แตกต่างกันก็อาจจะทำให้ผลการทดสอบที่ได้มีความแตกต่างกัน

ผลของวิธีการทดสอบที่มีต่อการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียได้ถูกยืนยันโดยการทดลองของธิดาทิพย์ และคณะ โดยธิดาทิพย์ และคณะได้ทำการทดสอบความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 7 ไอโซเลต (isolate) ในการผลิตแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* และพบว่าเมื่อใช้วิธี agar spot test ในการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตจะถูกตรวจพบว่าสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้ แต่เมื่อใช้วิธี swab-paper disc ในการทดสอบแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลตจะถูกตรวจพบว่าไม่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ได้

- ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ

ผลของชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีต่อการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียได้ถูกยืนยันโดยการทดลองของ Lewus และ Montville (1991) โดย Lewus และ Montville ได้ทำการทดลองโดยนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 22 สายพันธุ์มาทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซิน และจากการทดลองพบว่าถ้าทำการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียดังกล่าวทั้ง 22 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) จะมีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 19 สายพันธุ์ที่ถูกตรวจพบว่าสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ ในขณะที่ถ้าทำการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียดังกล่าวทั้ง 22 สายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth medium) จะมีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 2 สายพันธุ์เท่านั้นที่ถูกตรวจพบว่าสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้

- สายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นจุลินทรีย์ทดสอบ (indicator strain)

ผลของสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ทดสอบที่มีต่อการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียได้ถูกยืนยันโดยการทดลองของ Lewus และคณะ (1991) และ Okereke และ Montville (1991) โดย Lewus และคณะได้ทำการทดสอบความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากเนื้อสัตว์ในการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยใช้ *Listeria monocytogenes* เป็นจุลินทรีย์ทดสอบ และพบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 19 สายพันธุ์ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ แต่เมื่อ Okereke และ Montville นำแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวทั้ง 19 สายพันธุ์มาทำการทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินโดยใช้ *Clostridium botulinum* เป็นจุลินทรีย์ทดสอบ กลับพบว่า มีแลคติกแอซิดแบคทีเรียเพียง 4 สายพันธุ์เท่านั้นที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้

การสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

วิธีการที่ใช้ในการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียมีหลายวิธี ซึ่งวิธีการต่าง ๆ เหล่านี้ได้ถูกพัฒนาและปรับปรุงโดยนักวิทยาศาสตร์หลายท่าน

Cords และคณะ (1974) ได้ทำการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยใช้วิธี cesium chloride-ethidium bromide density gradient centrifugation วิธีการสกัด plasmid DNA ดังกล่าวมีข้อเสีย คือ เป็นวิธีการสกัด plasmid DNA ที่ต้องใช้ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และให้ปริมาณของ plasmid DNA ที่ค่อนข้างต่ำ เนื่องจากขั้นตอนการย่อยสลายเซลล์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียของวิธีการดังกล่าวมีประสิทธิภาพค่อนข้างต่ำ Kleanhammer และคณะ (1978) ได้ทำการปรับปรุงวิธีการสกัด plasmid DNA ของ Cords และคณะ เพื่อให้การย่อยสลายเซลล์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียมีประสิทธิภาพมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้สามารถสกัด plasmid DNA ได้ในปริมาณที่มากขึ้น

วิธีการที่ Gasson และ Davies (1980) ใช้ในการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียมีข้อจำกัด คือ มักจะไม่สามารถสกัด plasmid DNA ที่มีขนาดใหญ่กว่า 30 MDa ได้ Walsh และ McKay (1981) จึงได้พัฒนาวิธีการที่ใช้ในการสกัด plasmid DNA ที่มีขนาดใหญ่จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย โดยการปรับปรุงวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียของ Hansen และ Olsen (1978) ซึ่งวิธีการที่ Walsh และ McKay พัฒนาขึ้นสามารถใช้สกัด plasmid DNA ที่มีขนาดตั้งแต่ 30 MDa ขึ้นไปจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้

อย่างไรก็ตามปริมาณของ plasmid DNA ที่ได้จากการสกัด plasmid DNA โดยวิธีการต่าง ๆ ที่กล่าวมาข้างต้นยังไม่เป็นที่พอใจของนักวิทยาศาสตร์ ดังนั้น Anderson และ McKay (1983) จึงได้

พัฒนาวิธีการในการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียขึ้น โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อให้เป็นวิธีการสกัด plasmid DNA ที่ให้ปริมาณ plasmid DNA มาก และสามารถใช้ในการสกัด plasmid DNA ที่มีขนาดใหญ่ได้ วิธีการดังกล่าวเป็นวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นิยมใช้กันในปัจจุบัน โดยอาจมีการดัดแปลงวิธีการดังกล่าวเล็กน้อยเพื่อให้เหมาะสมกับชนิดของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ และวัสดุอุปกรณ์ที่แต่ละห้องทดลองมี

วิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่กล่าวมาข้างต้นต้องใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ log phase โดยไม่สามารถใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืน (overnight culture) (แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืนมักอยู่ในระยะ stationary phase) ทั้งนี้เนื่องจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืนมักมีการสะสมของโปรตีนต่าง ๆ ค่อนข้างมาก ซึ่งไปมีผลต่อการย่อยสลายเซลล์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จากการที่วิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่กล่าวมาข้างต้นต้องใช้แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อยู่ในระยะ log phase ทำให้วิธีการเหล่านั้นเป็นวิธีการสกัด plasmid DNA ที่กินเวลา เนื่องจากต้องมีการถ่ายเชื้อที่เลี้ยงข้ามคืนลงในอาหารใหม่ และรอเวลาให้แลคติกแอซิดแบคทีเรียเข้าสู่ระยะ log phase ดังนั้นจึงได้มีความพยายามในการพัฒนาวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืน O'Sullivan และ Klaenhammer (1993) ได้พัฒนาวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืน แต่วิธีการดังกล่าวต้องใช้ ethidium bromide ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และมีขั้นตอนการตกตะกอน DNA (DNA precipitation) ถึง 2 ครั้ง ส่วน Duan และคณะ (1999) ได้พัฒนาวิธีการสกัด plasmid DNA จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ถูกเลี้ยงข้ามคืน โดยวิธีการดังกล่าวใช้ acetone ช่วยในการย่อยสลายเซลล์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ทำให้เซลล์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียถูกย่อยสลายอย่างมีประสิทธิภาพ

การนำแบคทีเรียโอสินไปใช้ประโยชน์

ในปัจจุบันผู้บริโภคพยายามหลีกเลี่ยงการใช้สารเคมีถนอมอาหาร (chemical preservative) และหันมาให้ความนิยมในการบริโภคอาหารที่ใช้สารถนอมอาหารทางชีวภาพ (biopreservative) ทั้งนี้เนื่องจากผู้บริโภคเชื่อว่าสารถนอมอาหารทางชีวภาพเป็นสารที่ได้มาจากธรรมชาติ ดังนั้นจึงน่าที่จะมีความปลอดภัยในการใช้มากกว่าสารเคมีถนอมอาหาร

nisin เป็นแบคทีเรียโอสินเพียงชนิดเดียวที่ได้รับการยอมรับจาก American Food and Drug Administration ให้สามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหารได้ และจากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการทดลองนำเอา nisin ไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่าง ๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 3 อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่า

แบคทีเรียโอซินชนิดอื่น ๆ จะยังไม่ได้รับการยอมรับให้สามารถใช้ได้อย่างถูกต้องตามกฎหมาย แต่ก็มีความพยายามในการศึกษาเพื่อพัฒนาแบคทีเรียโอซินหลายชนิดให้สามารถใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร และ/หรือในทางการแพทย์ได้อย่างปลอดภัย (ตารางที่ 4)

อุตสาหกรรมอาหาร	เอกสารอ้างอิง
Dairy industry (cheeses, milk and milk drinks)	Hugenholtz และ De Veer 1991, Delves-Broughton 1990, Chiu และคณะ 1989
Canned industry (canned foods such as carrot puree, mushrooms, soups, peas and beans)	Vas 1964
Fish industry (fillets of cod, herring and smoked mackerel)	Taylor และคณะ 1990

ตารางที่ 3 อุตสาหกรรมอาหารที่ได้มีการทดลองนำเอา nisin ไปใช้

แบคทีเรียโอซิน	แบคทีเรียที่สร้างแบคทีเรียโอซิน	การนำไปใช้	เอกสารอ้างอิง
Sakacin A	<i>Lactobacillus sake</i> Lb 706	Meat industry	Schillinger และคณะ 1991
Sakacin 674	<i>Lactobacillus sake</i> Lb 674	Meat industry	Yousef และคณะ 1991
Bifidocin B	<i>Bifidobacterium bifidum</i> NCFB 1454	Food preservation	Yildirim และ Johnson 1998b
Plantaricin LP 84	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIM 2084	Food preservation	Suma และคณะ 1998
Lacticin 3147	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> DPC 3147	Prevention of bovine mastitis	Ryan และคณะ 1998
Gallidermin	<i>Staphylococcus gallinarum</i>	Treatment of endocarditis, abscesses, Skin infections	Kellner และคณะ 1988

ตารางที่ 4 ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินบางชนิดที่ได้มีการนำไปทดลองใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและ/หรือ
ในทางการแพทย์

วัสดุและวิธีการทดลอง (Materials and methods)

จุลินทรีย์และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง

แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ (producer strain) ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักของไทย ซึ่งได้แก่ ปลาซั่ม แหนม หม่า และผักดอง ส่วนแบคทีเรียที่ใช้เป็นแบคทีเรียทดสอบ (indicator strain) เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย ซึ่งได้แก่ *Bacillus cereus* (ATCC 11778) *Escherichia coli* (ATCC 25922) *Klebsiella pneumonia* (ATCC 27736) *Proteus mirabilis* (ATCC 21100) *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) *Salmonella paratyphi A* (DMS 5785) *Salmonella typhi* (DMS 5784) *Shigella dysenterisae* (DMS 2137) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) *Streptococcus pneumonia* (P.785) และ *Streptococcus pyogenes* (DMS 3393)

แลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้ ซึ่งได้แก่ แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก *S. pneumonia* และ *S. pyogenes* ถูกเลี้ยงใน 0.2% glucose MRS agar หรือ 0.2% glucose MRS broth ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคส 0.2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรียที่เหลือ ซึ่งได้แก่ *B. cereus* *E. coli* *K. pneumonia* *P. mirabilis* *P. vulgaris* *P. aeruginosa* *S. paratyphi A* *S. typhi* *S. dysenterisae* และ *S. aureus* ถูกเลี้ยงใน Nutrient agar (NA) หรือ Nutrient broth (NB)

การคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก

การคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักทำได้โดยการนำอาหารหมักปริมาณ 10 กรัมมาผสมกับสารละลาย phosphate buffer ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปริมาณ 1 loop มาลากเป็นแนว (streak) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ 0.2% glucose MRS agar นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic condition) หลังจากนั้นทำการเทอาหาร soft nutrient agar (soft NA) ที่มีความเข้มข้นของวุ้น (agar) เท่ากับ 0.7 เปอร์เซ็นต์ ทับโคโลนีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร 0.2% glucose MRS agar โดยในอาหาร soft NA ดังกล่าวมี *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียทดสอบอยู่ จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศา

เซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการตรวจสอบว่าโคโลนีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียโคโลนีใดที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ โดยอาศัยหลักเกณฑ์ว่าโคโลนีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียโคโลนีใดที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ จะมี inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีนั้น หลังจากนั้นทำการเก็บแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ไว้ใช้ในการทดลองต่อไป

การเตรียม soft NA ที่มีแบคทีเรียทดสอบอยู่สามารถทำได้โดยนำแบคทีเรียทดสอบไปเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (NB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำแบคทีเรียทดสอบดังกล่าวปริมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงใน soft NA ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน ก่อนนำไปเททับโคโลนีของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมัก

ในการทดลองนี้ทำการเลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล glucose ต่ำ (เพียง 0.2% เท่านั้น) และในสภาวะที่ไม่มีอากาศ ทั้งนี้เพื่อให้แลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวไม่สามารถผลิตกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ หรือผลิตได้ในปริมาณที่น้อยมากจนไม่สามารถไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้

การตรวจสอบสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้

สายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินถูกตรวจสอบโดยวิธี Api ร่วมกับการทดสอบต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ การย้อมแกรม (Gram stain) catalase test arginine hydrolysis test และการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 10 และ 45 องศาเซลเซียส

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ เมื่อใช้แบคทีเรียก่อโรคเป็นแบคทีเรียทดสอบ ทำโดยเลี้ยง *L. mesenteroides* TFF5 ใน 0.2% glucose MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จากนั้นนำ culture ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อเก็บเอาส่วนใส (culture supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงซึ่งมีแบคทีเรียโอซินละลายอยู่ ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc (Rattanachaikunsopon and Phumkhachorn 1998) ซึ่งสามารถทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิดในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบแต่ละชนิด จากนั้นนำ culture ของแบคทีเรียดังกล่าวไปบ่มที่

อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำมาป้าย (swab) ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียทดสอบให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำแผ่น paper disc ที่ปลอดเชื้อ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตรมาวางบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง ดังกล่าว แล้วหยด culture supernatant ของ *L. mesenteroides* TFF5 ที่เตรียมไว้แล้ว ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ลงบนแผ่น paper disc นำจานอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนสังเกตว่ามี inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc หรือไม่ ถ้าเห็น inhibition zone เกิดขึ้นรอบ ๆ แผ่น paper disc ก็แสดงว่าแบคทีเรียโอสินที่นำมาทดสอบมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการทดลอง

การศึกษาผลของความร้อน เอ็นไซม์ต่าง ๆ และความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต่อความสามารถของแบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

การศึกษาผลของความร้อนต่อความสามารถของแบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ทำโดยนำส่วนใส (culture supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง culture ของ *L. mesenteroides* TFF5 ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที และไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำส่วนใสดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยวิธี swab-paper disc

การศึกษาผลของเอ็นไซม์ต่าง ๆ ต่อความสามารถของแบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ทำโดยนำส่วนใส (culture supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง culture ของ *L. mesenteroides* TFF5 ไปเติมด้วยสารละลาย papain pepsin pronase E proteinase K trypsin α -amylase lipase และ lysozyme โดยให้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของเอ็นไซม์ต่าง ๆ ดังกล่าวเป็น 1 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตร จากนั้นจึงนำส่วนใสดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยวิธี swab-paper disc

การศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต่อความสามารถของแบคทีเรียโอสินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ทำโดยนำส่วนใส (culture supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง culture ของ *L. mesenteroides* TFF5 ไปปรับค่าความเป็นกรดเป็นด่างโดยใช้สารละลาย HCl หรือ NaOH เพื่อให้ culture supernatant ดังกล่าวมีค่าความเป็นกรด

เป็นด่างเท่ากับ 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 และ 14 จากนั้นจึงนำส่วนผสมดังกล่าวแต่ละอันไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยวิธี swab-paper disc

การศึกษากลไกการทำงาน (mode of action) ของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

การศึกษากลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ทำโดยเลี้ยง *S. aureus* ใน nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จน culture ของแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในระยะ log phase หรือ stationary phase จากนั้นนำเอา culture ของแบคทีเรียดังกล่าวไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบ นำตะกอนเซลล์ดังกล่าวไปทำการแขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer ซึ่งมีความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิโมลต่อลิตร (mmol/l) และ pH เท่ากับ 6.5 โดยใช้สารละลาย phosphate buffer ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเติมส่วนผสม (culture supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง culture ของ *L. mesenteroides* TFF5 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในสารละลาย phosphate buffer ที่มีเซลล์ของ *S. aureus* แขวนลอยอยู่ และทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียทดสอบที่เวลา 30 60 90 และ 120 นาทีหลังจากที่มีการเติม culture supernatant ตัวอย่างแบคทีเรียทดสอบที่เก็บมาได้ถูกนำไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำไปนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียทดสอบที่ยังมีชีวิตอยู่ (viable counts) ในการทดลองนี้มีชุดการทดลองควบคุม (control) ด้วย โดยในชุดการทดลองควบคุมจะเติม 0.2% glucose MRS broth ลงไปในสารละลาย phosphate buffer ที่มีเซลล์ของ *S. aureus* แขวนลอยอยู่ แทนการใช้ culture supernatant ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง culture ของ *L. mesenteroides* TFF5

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตแบคทีเรียโอซินของ *L. mesenteroides* TFF5

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตแบคทีเรียโอซินของ *L. mesenteroides* TFF5 ทำโดยเลี้ยง *L. mesenteroides* TFF5 ใน 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จากนั้นทำการถ่ายแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าวที่เลี้ยงไว้ข้ามคืนปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ (flask) ที่มี 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร นำ culture ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่อยู่ในขวดรูป

ชมพูไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากขูดรูปชมพูดังกล่าวทุก ๆ หนึ่งชั่วโมงหลังจากที่มีการถ่ายเชื้อ เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ในการเก็บตัวอย่างแบคทีเรียจากขูดรูปชมพูแต่ละครั้งจะเก็บตัวอย่างแบคทีเรียมา 3 มิลลิลิตร จากนั้นทำการแบ่งตัวอย่างแบคทีเรียออกเป็น 2 ส่วน โดยตัวอย่างแบคทีเรียส่วนที่หนึ่งมีปริมาตร 2 มิลลิลิตร และตัวอย่างแบคทีเรียส่วนที่สองมีปริมาตร 1 มิลลิลิตร ตัวอย่างแบคทีเรียส่วนที่หนึ่งถูกนำไปวิเคราะห์การเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งทำโดยการนำตัวอย่างแบคทีเรียไปตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร และนำค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวไปสร้าง growth curve ส่วนตัวอย่างแบคทีเรียส่วนที่สองถูกนำไปวิเคราะห์ปริมาณของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจาก *L. mesenteroides* TFF5 เนื่องจากการวัดปริมาณของแบคทีเรียโอซินโดยตรงทำได้ยาก ดังนั้นในการศึกษานี้จึงใช้การวัดความสามารถของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (bacteriocin activity) แทนการวัดปริมาณของแบคทีเรียโอซินโดยตรง การวัดความสามารถของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ ทำโดยนำตัวอย่างแบคทีเรียที่เก็บมา ปริมาตร 1 มิลลิลิตรไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูเอาเฉพาะส่วนใส (culture supernatant) ซึ่งมีแบคทีเรียโอซินละลายอยู่ไปเจือจางที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ดังนี้คือ ที่ระดับความเจือจาง 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 และ 1:128 ตามลำดับ จากนั้นนำเอา culture supernatant ที่มีระดับความเจือจางต่าง ๆ เหล่านี้ไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยใช้วิธี swab-paper disc ความสามารถของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบถูกแสดงในหน่วย AU (arbitrary unit)/ml

ค่าความสามารถของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในหน่วย AU/ml สามารถหาได้จากค่าส่วนกลับของระดับความเจือจางสูงสุดของ culture supernatant ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ตัวอย่างเช่น ถ้าใช้ culture supernatant ที่เตรียมได้จาก culture ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ปริมาตร 25 ไมโครลิตร ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ และพบว่าระดับความเจือจางสูงสุดของ culture supernatant ที่ยังสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ คือ 1:16 ดังนั้นค่าความสามารถของแบคทีเรียโอซินในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (bacteriocin activity) จะมีค่าเท่ากับ 16 AU/25 ไมโครลิตร หรือ 640 AU/ml

การสกัด plasmid จากเซลล์ของ *L. mesenteroides* TFF5

การสกัด plasmid จากเซลล์ของ *L. mesenteroides* TFF5 ทำโดยนำ *L. mesenteroides* TFF5 มาเลี้ยงใน 0.2% glucose MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการถ่ายเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร 0.2% glucose MRS broth ใหม่ ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4-5 ชั่วโมง เพื่อให้ culture ของ *L. mesenteroides* TFF5 อยู่ในระยะ log phase นำ culture ของแลคติกแอซิด แบคทีเรียที่อยู่ในระยะ log phase ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตรมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อ แล้วนำไปตกตะกอนโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำตะกอนที่ได้มาเติม solution I ปริมาตร 379 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลาย lysozyme (ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรใน solution II) ปริมาตร 96.5 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เติม solution III ปริมาตร 48.2 ไมโครลิตร และสารละลาย SDS (ความเข้มข้น 20% wt/vol ใน solution IV) ปริมาตร 27.6 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นเติม สารละลาย 3 N NaOH ปริมาตร 27.6 ไมโครลิตร ผสมกลับไปกลับมาเบา ๆ เป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม solution V ปริมาตร 49.6 ไมโครลิตร ผสมกลับไปกลับมาเบา ๆ อีกครั้งเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติมสารละลาย VI ปริมาตร 71.7 ไมโครลิตร แล้วจึงเติม phenol ที่อิ่มตัวใน 3% NaCl ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมกลับไปกลับมาเบา ๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นดูดส่วนใสชั้นบนใส่ Eppendorf tube อันใหม่ เติม phenol : chloroform : isoamyl alcohol (25 : 24 : 1) ปริมาตร 700 ไมโครลิตร ผสมกลับไปกลับมาเบา ๆ ก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนใส่ Eppendorf tube อันใหม่ เติม isopropanol ปริมาตร 700 ไมโครลิตร แล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา อย่างน้อย 30 นาที จากนั้นจึงนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอน DNA ที่ได้ไปล้างด้วย 70% alcohol ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และทำการตกตะกอน DNA อีกครั้งหนึ่งโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที นำตะกอน DNA ที่ได้ ไปทำให้แห้ง แล้วละลายตะกอน DNA ด้วย TE buffer ปริมาตร 20 ไมโครลิตร จากนั้นนำสารละลาย DNA ที่ได้ไปวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis

ส่วนประกอบของสารละลายที่ใช้ในการสกัด plasmid จากเซลล์ของ *L. mesenteroides*

TFF5

solution I : 6.7% sucrose, 50 mM Tris, 1 mM EDTA (pH 8.0)

solution II : 25 mM Tris (pH 8.0)

solution III : 0.25 M EDTA, 50 mM Tris (pH 8.0)

solution IV : 20 mM EDTA, 50 mM Tris (pH 8.0)

solution V : 2 M Tris-hydrochloride (pH 7.0)

solution VI : 5 M NaCl

ผลการทดลอง (Results)

การคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินจากอาหารหมัก

จากการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้จากอาหารหมักหลายชนิด โดยใช้เชื้อ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียทดสอบ พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 15 ไอโซเลต (isolate) ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากปลาหมัก (fermented fish) จำนวน 4 ไอโซเลต เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากแหนม (fermented pork) จำนวน 3 ไอโซเลต เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากหม่า (fermented beef) จำนวน 2 ไอโซเลต และเป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากผักดอง (fermented vegetable) จำนวน 6 ไอโซเลต ด้วยเหตุที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้เหล่านี้ต้องถูกนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไป ดังนั้นเพื่อความสะดวกและป้องกันการสับสนที่อาจเกิดขึ้น จึงได้มีการให้รหัสแก่แลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าว โดยรหัสจะขึ้นต้นด้วย TFF และตามด้วยตัวเลข (TFF ย่อมาจาก Thai fermented food) เมื่อนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ทั้ง 15 ไอโซเลตดังกล่าวข้างต้นไปทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซิน โดยวิธี swab-paper disc และใช้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียทดสอบ พบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกไอโซเลต ยกเว้นเชื้อ TFF2 TFF12 และ TFF14 ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยเชื้อ TFF5 เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ทำให้เกิด inhibition zone ได้กว้างที่สุด (ตารางที่ 5) ดังนั้นเชื้อ TFF5 จึงเป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่น่าสนใจและถูกนำไปใช้ในการทดลองขั้นต่อไปเพื่อศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียดังกล่าว

จากการตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อ TFF5 โดยวิธี Api ร่วมกับการทดสอบต่าง ๆ ซึ่งได้แก่การย้อมแกรม (Gram stain) catalase test arginine hydrolysis test และการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 4 10 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อ TFF5 เป็น *Leuconostoc mesenteroides* ดังนั้นเชื่อดังกล่าวจึงถูกเรียกว่า *Leuconostoc mesenteroides* TFF5

Bacterial isolates	Food sources	Sizes of inhibition zones from swab-paper disc test (mm)
TFF1	Fermented fish	10
TFF2	Fermented fish	0
TFF3	Fermented fish	10
TFF4	Fermented fish	12
TFF5	Fermented pork	15
TFF6	Fermented pork	12
TFF7	Fermented pork	10
TFF8	Fermented beef	10
TFF9	Fermented beef	10
TFF10	Fermented vegetable	12
TFF11	Fermented vegetable	12
TFF12	Fermented vegetable	0
TFF13	Fermented vegetable	10
TFF14	Fermented vegetable	0
TFF15	Fermented vegetable	10

ตารางที่ 5 การทดสอบความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมักในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยวิธี swab-paper disc

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

ในการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ได้ใช้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบหลายชนิดเป็นแบคทีเรียทดสอบ ซึ่งได้แก่ *B. cereus* *E. coli* *K. pneumonia* *P. mirabilis* *P. vulgaris* *P. aeruginosa* *S. paratyphi A* *S. typhi* *S. dysenterisae* *S. aureus* *S. pneumonia* และ *S. pyogenes* จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* *S. aureus* *S. pneumonia* และ *S. pyogenes* ได้ แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบที่เหลือได้ (ตารางที่ 6)

Indicator organisms	Sizes of inhibition zones (mm)
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 11778)	13
<i>Eschericia coli</i> (ATCC 25922)	0
<i>Klebsiella pneumonia</i> (ATCC 27736)	0
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC 21100)	0
<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 13315)	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 27853)	0
<i>Salmonella paratyphi A</i> (DMS 5785)	0
<i>Salmonella typhi</i> (DMS 5784)	0
<i>Shigella dysenterisae</i> (DMS 2137)	0
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	10
<i>Streptococcus pneumonia</i> (P.785)	15
<i>Streptococcus pyogenes</i> (DMS 3393)	15

ตารางที่ 6 ความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค

การศึกษาผลของความร้อน เอนไซม์ต่าง ๆ และความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ต่อความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

ในการศึกษาผลของความร้อนต่อความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยการนำแบคทีเรียโอซินดังกล่าวไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 20 และ 30 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ก่อนนำแบคทีเรียโอซินดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc พบว่าความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบไม่มีการเปลี่ยนแปลง (ตารางที่ 7)

ในการศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยการนำแบคทีเรียโอซินดังกล่าวไปเติมด้วยเอนไซม์ต่าง ๆ ซึ่งได้แก่ papain pepsin pronase E proteinase K trypsin α -amylase lipase A และ lysozyme ก่อนนำแบคทีเรียโอซินดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc พบว่าความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบถูกทำลายโดยเอนไซม์ papain pepsin pronase E proteinase K และ trypsin แต่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ α -amylase lipase A และ lysozyme (ตารางที่ 7)

ในการศึกษาผลของความเป็นกรดเป็นด่างต่อความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยการนำแบคทีเรียโอซินดังกล่าวไปไว้ในสภาวะที่มี pH ตั้งแต่ 1 ถึง 14 ก่อนนำแบคทีเรียโอซินดังกล่าวไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี swab-paper disc พบว่าแบคทีเรียโอซินดังกล่าวยังคงมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ หลังจากถูกนำไปไว้ในสภาวะที่มี pH ตั้งแต่ 2 ถึง 10 แต่ความสามารถของแบคทีเรียโอซินดังกล่าวในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบจะสูญหายไปหลังจากที่แบคทีเรียโอซินดังกล่าวถูกนำไปไว้ในสภาวะที่มี pH 1 และ ในสภาวะที่มี pH ตั้งแต่ 11 ถึง 14 (ตารางที่ 7)

Treatment	Antimicrobial activity
Heat	
100°C for 10, 20, or 30 min	+
121°C for 15 min	+
Enzymes	
Papain	-
Pepsin	-
Pronase E	-
Proteinase K	-
Trypsin	-
α -amylase	+
Lipase A	+
Lysozyme	+
pH	
1	-
2 to 10	+
11 to 14	-

+ = have antimicrobial activity

- = have no antimicrobial activity

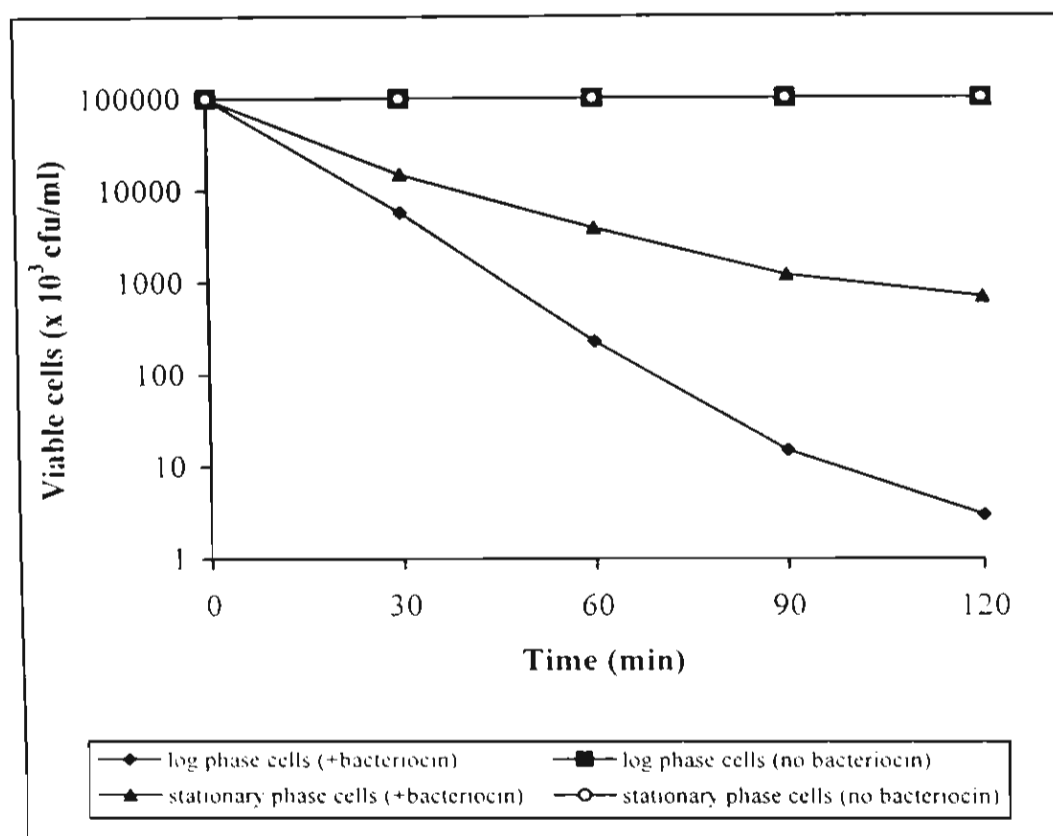
ตารางที่ 7 ผลของความร้อน เอนไซม์ต่าง ๆ และความเป็นกรดเป็นด่างต่อความสามารถของ
แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของ
S. aureus

การศึกษากลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

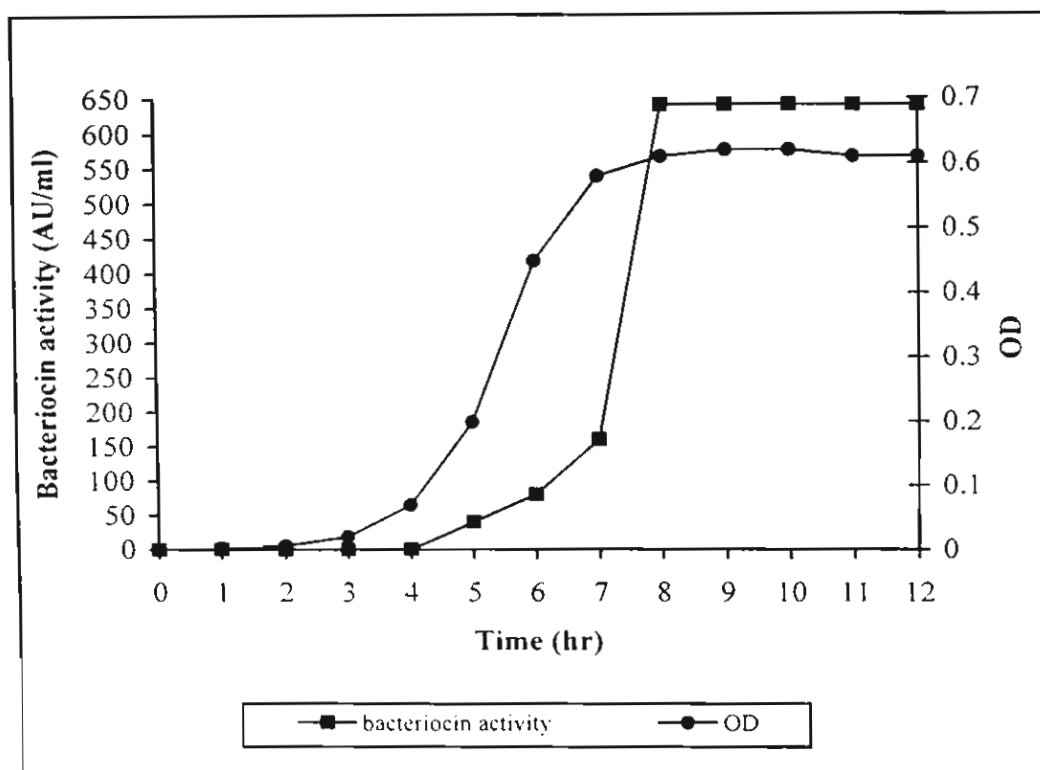
จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (viable cell) ของ *S. aureus* และต่อค่าการดูดกลืนแสง (optical density) ของเซลล์ของ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer ซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการทดลองกับเซลล์ของ *S. aureus* ทั้งที่อยู่ในระยะ log phase และที่อยู่ในระยะ stationary phase พบว่า ในการทดลองกับเซลล์ของ *S. aureus* ที่อยู่ในระยะ log phase แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *S. aureus* ลดลงจาก 10^8 CFU/ml เป็น 3×10^3 CFU/ml (รูปที่ 4) แต่ไม่มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ของ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer เปลี่ยนแปลง และในการทดลองกับเซลล์ของ *S. aureus* ที่อยู่ในระยะ stationary phase แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ทำให้จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *S. aureus* ลดลงจาก 10^8 CFU/ml เป็น 7×10^5 CFU/ml (รูปที่ 4) แต่ไม่มีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ของ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer เปลี่ยนแปลง ส่วนผลที่ได้จากชุดการทดลองควบคุม (control) พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ เกิดขึ้นกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *S. aureus* (ทั้งที่อยู่ในระยะ log phase และที่อยู่ในระยะ stationary phase) และกับค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ของ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer (ทั้งที่อยู่ในระยะ log phase และที่อยู่ในระยะ stationary phase)

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตแบคทีเรียโอซินของ *L. mesenteroides* TFF5

จากการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตแบคทีเรียโอซินของ *L. mesenteroides* TFF5 พบว่าค่า bacteriocin activity ยังไม่สามารถตรวจวัดได้ ในขณะที่ *L. mesenteroides* TFF5 อยู่ในระยะ lag phase แต่จะเริ่มตรวจวัดได้ เมื่อเชื้อมีจำนวนอยู่ในระยะ log phase หลังจากเริ่มตรวจวัดได้ค่า bacteriocin activity จะสูงขึ้นเรื่อย ๆ จนมีค่าสูงสุด (640 AU/ml) เมื่อ *L. mesenteroides* TFF5 เข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากนั้นค่า bacteriocin activity จะคงที่ตลอดการทดลอง (รูปที่ 5)



รูปที่ 4 ผลของแบคทีริโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *S. aureus* ทั้งที่อยู่ในระยะ log phase และที่อยู่ในระยะ stationary phase



รูปที่ 5 ความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญกับการผลิตแบคทีริโอซินของ *L. mesenteroide* TFF5

การศึกษา plasmid ที่สกัดจาก *L. mesenteroides* TFF5

จากการสกัด plasmid จากเซลล์ของ *L. mesenteroides* TFF5 และนำ plasmid ดังกล่าวมาวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่า *L. mesenteroides* TFF5 เป็นแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ไม่มี plasmid

วิจารณ์ผลการทดลอง (Discussion)

ในขั้นแรกของการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักของไทยที่มีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทยได้ใช้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียทดสอบ ด้วยเหตุผลหลักสองประการ คือ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่พบได้บ่อยในอาหารหมักของไทย และแบคทีเรียดังกล่าวเป็นแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งจะมีความไวต่อแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

ในขั้นแรกของการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักของไทยที่มีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทย พบว่ามีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 15 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ แต่เมื่อนำแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้ง 15 ไอโซเลตดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยวิธี swab-paper disc กลับพบว่า มีแลคติกแอซิดแบคทีเรียจำนวน 12 ไอโซเลตจาก 15 ไอโซเลตดังกล่าวที่ยังคงสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ เหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นไปได้ว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียอีก 3 ไอโซเลตที่เหลือ (TFF2 TFF12 และ TFF14) มีคุณสมบัติคล้ายกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้เฉพาะเมื่อถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง (agar medium) ดังนั้นเมื่อนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว (broth) แลคติกแอซิดแบคทีเรียเหล่านี้จึงไม่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ (Fricourt และคณะ 1994, Barefoot และ Klaenhammer 1983) ในบรรดาแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ถูกตรวจพบที่มีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินไปยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยวิธี swab-paper disc เชื้อ TFF5 เป็นเชื้อที่ถูกเลือกเพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อดังกล่าวให้ inhibition zone กว้างที่สุด และจากการตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อ TFF5 พบว่าเชื้อดังกล่าวเป็น *Leuconostoc mesenteroides* จากการศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียโอซินที่ผ่านมาพบว่ามีแบคทีเรียในสกุล (genus) *Leuconostoc* หลายชนิดที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ เช่น *L. mesenteroides* BC2 (Janes และคณะ 1999) *L. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* (Kyung และคณะ 1996) *L. carnosum* La54a (Hastings และคณะ 1994) *L. carnosum* Ta11a (Hastings และคณะ 1994) *L. gelidum* UAL187 (Hastings และคณะ 1994) *L. paramesenteroides* La7a (Hastings และคณะ 1994) *L. paramesenteroides* XO (Lewus

และคณะ 1992, Lewus และคณะ 1991) และ *L. mesenteroides* UL5 (Daba และคณะ 1991) เป็นต้น

ด้วยเหตุที่แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 สามารถถูกทำลายได้โดย เอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ทนต่อเอนไซม์ α -amylase lipase และความร้อน ดังนั้นแบคทีเรียโอซินดังกล่าวจึงน่าที่จะเป็นโปรตีนที่ทนความร้อน และมีการทำงานที่ไม่ขึ้นอยู่กับคาร์โบไฮเดรต และไขมัน ซึ่งอาจจะเป็นส่วนประกอบของแบคทีเรียโอซิน คุณสมบัติดังกล่าวคล้ายกับคุณสมบัติของแบคทีเรียโอซินโดยทั่วไป ยกเว้น leucocin S ซึ่งเป็นแบคทีเรียโอซินที่สามารถถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ α -amylase (Lewus และคณะ 1992) นอกจากนี้แล้วแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ยังมีคุณสมบัติคล้ายกับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ในแง่ของการมีความสามารถในการคงสภาพได้ดีในช่วง pH ที่ค่อนข้างกว้าง คือ ตั้งแต่ pH 2 ถึง pH 10 (Jane และคณะ 1999, Franz และคณะ 1998, Kelly และคณะ 1996)

คุณสมบัติที่สำคัญประการหนึ่งของแบคทีเรียโอซินโดยทั่วไปคือมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซิน เช่นแบคทีเรียที่ผลิตโดยแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นปัญหาสาธารณสุขของประเทศไทยพบว่าผลที่ได้สอดคล้องกับข้อมูลดังกล่าว โดยแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 สามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะแบคทีเรียทดสอบที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น

จากการศึกษาผลของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ต่อจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตของ *S. aureus* และต่อค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ของ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer พบว่าแบคทีเรียโอซินดังกล่าวสามารถทำให้เซลล์ที่มีชีวิตของ *S. aureus* (ทั้งที่อยู่ในระยะ log phase และที่อยู่ในระยะ stationary phase) ลดลง แต่ไม่มีผลต่อค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์ของ *S. aureus* ที่แขวนลอยในสารละลาย phosphate buffer (ทั้งที่อยู่ในระยะ log phase และที่อยู่ในระยะ stationary phase) จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้พอที่จะสรุปได้ว่ากลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 เป็นไปในลักษณะที่ไปทำให้เซลล์ของ *S. aureus* (ทั้งที่อยู่ในระยะ log phase และที่อยู่ในระยะ stationary phase) ตาย แต่ไม่ทำให้เซลล์ดังกล่าวแตกสลายไป (bacteriocidal effect without cell lysis) กลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 มีลักษณะคล้ายกับกลไกการทำงานของแบคทีเรียโอซิน

หลายชนิด เช่น แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus acidophilus* LF221 (Bogovic-Matijasic และ Rogelj 1998) แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Pediococcus damnosus* NCFB1832 (Green และคณะ 1997) และ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* KW30 (Kelly และคณะ 1996) เป็นต้น อย่างไรก็ตามมีแบคทีเรียโอซินบางชนิดที่มีกลไกการทำงานที่แตกต่างจากแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 เช่น lactococcin R (Yildirim และ Johnson 1998a) และ plantaricin C (Gonzalez และคณะ 1994) เป็นต้น โดยแบคทีเรียโอซินเหล่านี้มีกลไกการทำงานในลักษณะที่ไปทำให้เซลล์ของแบคทีเรียอื่นแตกสลายไป (bacteriolytic effect)

bacteriocin activity ของ *L. mesenteroides* TFF5 เริ่มถูกตรวจพบเมื่อเชื้อมีค่าสูงที่สุดในระยะ log phase และมีค่าสูงสุดเมื่อ *L. mesenteroides* TFF5 เริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase หลังจากนั้นค่าของ bacteriocin activity จะคงที่ในระดับสูงสุดไปตลอดการทดลอง ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองที่ได้จากการศึกษาแบคทีเรียโอซินหลายชนิด เช่น pediocin PD-1 (Green และคณะ 1997) และ plantaricin KW30 (Kelly และคณะ 1996) เป็นต้น ในขณะที่แบคทีเรียโอซินบางชนิดถึงแม้จะให้ค่า bacteriocin activity สูงสุด เมื่อเชื้อที่ผลิตแบคทีเรียโอซินเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase แต่ค่า bacteriocin activity จะตกลงทันทีหลังจากที่มีค่าสูงสุด แบคทีเรียโอซินที่มีคุณสมบัติดังกล่าว เช่น แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* (Rattanachaiakunsopon และ Phumkhachorn 2000) และ แบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus curvatus* IFPL105 (Casla และคณะ 1996)

จากการศึกษาเกี่ยวกับตำแหน่งของยีนสำหรับแบคทีเรียโอซินหลายชนิด พบว่ายีนสำหรับแบคทีเรียโอซินบางชนิดเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม (Franz และคณะ 1998, Kelly และคณะ 1996) ในขณะที่ยีนสำหรับแบคทีเรียโอซินบางชนิดเป็นยีนที่อยู่บน plasmid (Hyronimus และคณะ 1998, Stahl 1989) ดังนั้นในการศึกษานี้จึงได้ทำการศึกษาเพื่อหาตำแหน่งของยีนสำหรับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 ซึ่งจากการทดลองโดยการสกัด plasmid จากเซลล์ของ *L. mesenteroides* TFF5 และนำ plasmid ดังกล่าวไปวิเคราะห์โดยวิธี agarose gel electrophoresis พบว่าเชื้อมีค่าสูงไม่มี plasmid ดังนั้นจึงทำให้พอที่จะสรุปได้ว่ายีนสำหรับแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดย *L. mesenteroides* TFF5 น่าจะเป็นยีนที่อยู่บนโครโมโซม

เอกสารอ้างอิง (References)

- ธิดาทิพย์ วงศ์สุรวัฒน์ พงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ ปาวิชาติ พุ่มขจร และยุภารัตน์ เครือวงษา (2544) ความสามารถของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และ *Staphylococcus aureus*. วารสารเทคนิคการแพทย์และกายภาพบำบัด 13, 48-56.
- Aktypis A, Kalantzopoulos JHJ, Huis in't Veld JH and ten Brink B (1998) Purification and characterisation of thermophilin T, a novel bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* ACA-DC 0040. J Appl Microbiol **84**, 568-576.
- Allgaier H, Jung G, Werner RG, Schneider U and Zahner H (1986) Epidermin: sequencing of a heterodet tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. Eur J Biochem **160**, 9-22.
- Alonso G, Vilchez G and Lemoine VR (2000) How bacteria protect themselves against channel-forming colicins. Int Microbiol **3**, 81-88.
- Anderson DG and McKay LL (1983) Simple and rapid method for isolating large plasmid DNA from lactic Streptococci. Appl Environ Microbiol **46**, 549-552.
- Andersson RE, Daeschel MA and Hassan HM (1988) Antibacterial activity of plantaricin SIK-83, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. Biochimie **70**, 381-390.
- Banerjee S and Hansen JN (1988) Structure and expression of a gene encoding the producer of subtilin, a small protein antibiotic. J Biol Chem **263**, 9508-9514.
- Barefoot SF and Klaenhammer TR (1984) Purification and characterization of the *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin lactacin B. Antimicrob Agents Chemother **26**, 328-334.
- Barefoot SF and Klaenhammer TR (1983) Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl Environ Microbiol **45**, 1808-1815.
- Benkerroum N, Oubel H, Zahar M, Dlia S and Filali Maltouf A (2000) Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. J Appl Microbiol **89**, 960-968.

- Berry ED, Liewen MB, Mandigo RW and Hutkins RW (1990) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by bacteriocin-producing *Pediococcus* during the manufacture of fermented semi-dry sausage. *J Food Prot* 53, 194-197.
- Bhunia AK, Johnson MC and Ray B (1988) Purification, characterization and antimicrobial spectrum of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* H. *J Appl Bacteriol* 65, 261-268.
- Bogovic-Matijasic B and Rogelj I (1998) Bacteriocin complex of *Lactobacillus acidophilus* LF221-production studies in MRS media at different pH values and effect against *Lactobacillus helveticus* ATCC 15009. *Process Biochem* 33, 345-352.
- Casla D, Requena T and Gomez R (1996) Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. *J Appl Bacteriol* 81, 35-41.
- Chatterjee S, Chatterjee DK, Jani RH, Blumbach J, Ganguli BN, Klesel N, Limbert M and Seibert G (1992) Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. In vitro and in vivo antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)* 45, 839-845.
- Chiu I, Skoog JA, Tatini SR and McKay LL (1989) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by associative growth of nisin producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in fermented milk. *J Animal Sci* 67 (Suppl. 1), 138.
- Choi HJ, Cheigh CI, Kim SB and Pyun YR (2000) Production of a nisin-like bacteriocin by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* A164 isolated from Kimchi. *J Appl Microbiol* 88, 563-571.
- Cintas LM, Casaus P, Holo H, Hernandez PE, Nes IF and Havarstein LS (1998) Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins *J Bacteriol* 180, 1988-1994.
- Cords BR, McKay LL and Guerry P (1974) Extrachromosomal elements in group N streptococci. *J Bacteriol* 117, 1149-1152.
- Daba H, Pandian S, Gosselin JF, Simard RE, Huang J and Lacroix C (1991) Detection and activity of a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl Environ Microbiol* 57, 3450-3455.

- Daeschel MA (1989) Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservative. *Food Technol* **43**, 164-467.
- Dahiya RS and Speck ML (1968) Hydrogen peroxide formation by *Lactobacilli* and its effect on *Staphylococcus aureus*. *J Dairy Sci* **51**, 1568-1572.
- Delves-Broughton J (1990) Nisin and its application as a food preservative. *J Soc Dairy Technol* **43**, 73-76.
- Duan K, Dunn NW and Kim WS (1999) Rapid plasmid DNA isolation from *Lactococcus lactis* using overnight culture. *Biotechnol Tech* **13**, 519-521.
- Ennahar S, Sashihara T, Sonomoto K and Ishizaki A (2000) ClassIIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. *FEMS Microbiol Rev* **24**, 85-106.
- Franz CMAP, Du Toit M, Olasupo NA, Schillinger U and Holzapfel WH (1998) Plantaricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from read-to-eat salad. *Let Appl Microbiol* **26**, 231-235.
- Fredericq P (1948) Actions antibiotiques reciproques chez les Enterobacteriaceae. *Rev Belge Pathol Med Exp* **19** (Suppl. 4), 1-107.
- Fricourt BV, Barefoot SF, Testin RF and Hayasaka SS (1994) Detection and activity of plantaricin F, an antibacterial substance from *Lactobacillus plantarum* BF001 isolated from processed channel catfish. *J Food Prot* **57**, 698-702.
- Gasson MJ and Davies FL (1980) High-frequency conjugation associated with *Streptococcus lactis* donor cell aggregation. *J Bacteriol* **143**, 1260-1264.
- Gilliland SE and Speck ML (1975) Inhibition of psychrotrophic bacteria by *Lactobacilli* and *Pediococci* in nonfermented refrigerated foods. *J Food Sci* **40**, 903-905.
- Gonzalez B, Arca P, Mayo B and Suarez JE (1994) Detection, purification and partial characterization of plantaricin C a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. *Appl Environ Microbiol* **60**, 2158-2163.
- Gonzalez-Pastor JE, San Millan JL and Moreno F (1994) The smallest known gene. *Nature* **369**, 281.
- Gratia A (1925) Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de colibacille. *Compt Rend Soc Biol* **93**, 1040-1041.

- Green G, Dicks LMT, Bruggeman G, Vandamme EJ and Chikindas ML (1997) Pediocin PD-1, a bactericidal antimicrobial peptide from *Pediococcus damnosus* NCFB 1832. J Appl Microbiol **83**, 127-132.
- Hansen JB and Olsen RH (1978) Isolation of large bacterial plasmids and characterization of the P2 incompatibility group plasmids pMG1 and pMG5. J Bacteriol **135**, 227-238.
- Hastings JW, Stiles ME and von Holy A (1994) Bacteriocins of *Leuconostocs* isolated from meat. Int J food Microbiol **24**, 75-81.
- Hastings JW, Sailer M, Johnson K, Roy KL, Vederas JC and Stiles ME (1991) Characterization of leuconocin A-UAL 187 and cloning of bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidium*. J Bacteriol **173**, 7491-7500.
- Hughenoltz J and De Veer GJCM (1991) Application of nisin A and nisin Z in dairy technology. In: Nisin and novel lantibiotics (Edited by Jung G and Sahl H-G), pp 440-447. ESCOM Science Publishers BV, Leiden.
- Hur JW, Hyun TH, Pyun YR, Kim TS, Yeo LH and Paik HD 2000. Identification and partial characterization of lacticin BH5, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* BH5 isolated from kimchi. J Food Prot **63**, 1707-1712.
- Hurst A (1978) Nisin: its preservative effect and function in the growth cycle of the producer organism. Soc Appl Bacteriol Symp Ser **7**, 297-314.
- Hyronimus B, Le Marrec C and Urdaci MC (1998) Coagulin, a bacteriocin-like inhibitory substance produced by *Bacillus coagulans* I₄. J Appl Microbiol **85**, 42-50.
- Itoh T, Fujimoto Y, Kawai Y, Toba T and Saito T (1995) Inhibition of food-borne pathogenic bacteria by bacteriocins from *Lactobacillus gasseri*. Let Appl Microbiol **21**, 137-141.
- Jack RW, Tagg JR and Ray B (1995) Bacteriocins of gram positive bacteria. Microbiol Rev **59**, 171 -200.
- Jacob F, Lwoff A, Siminovitch A and Wollman EL (1953) Definition de quelques termes relatifs a la lysogenie. Ann Inst Pasteur **84**, 222-224.
- Janes ME, Nannapaneni R and Johnson MG (1999) Identification and characterization of two bacteriocin-producing bacteria isolated from garlic and ginger root. J Food Prot **62**, 899-904.

- Joerger MC and Klaenhammer TR (1986) Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J Bacteriol* **167**, 439-446.
- Joerger MC and Klaenhammer TR (1990) Cloning, expression and nucleotide sequence of the *Lactobacillus helveticus* 481 gene encoding the bacteriocin helveticin J. *J Bacteriol* **171**, 6339-6347.
- Jung G (1991) Lantibiotics: ribosomally synthesized biologically active polypeptides containing sulfide bridges and α , β didehydroamino acids. *Angew Chem Ed Engl* **30**, 1051-1068.
- Kaletta C, Entian KD and Jung G (1991) Prepeptide sequence of cinnamycin (Ro 09-0198): the first structural gene of a duramycin-type lantibiotic. *Eur J Biochem* **199**, 411-415.
- Kekessy DD and Piguet JD (1970) New method for detecting bacteriocin production. *Appl Environ Microbiol* **20**, 282-283.
- Kellner R and Jung G (1989) Sequencing of peptide antibiotics containing unusual amino acids. *Biosyst Eur News* **7**, 2-3.
- Kellner R, Jung G, Horner T, Zahner H, Schnell N, Entian K-D and Gotz F (1988) Gallidermin: a new lanthionine-containing polypeptide antibiotic. *Eur J Biochem* **177**, 53-59.
- Kelly WJ, Asmundson RV and Huang CM (1996) Characterization of plantaricin KW 30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. *J Appl Bacteriol* **81**, 657-662.
- Klaenhammer TR (1993) Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev* **12**, 39-86.
- Klaenhammer TR, McKay LL and Baldwin KA (1978) Improved lysis of group N streptococci for isolation and rapid characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Appl Environ Microbiol* **35**, 592-600.
- Kolter R and Moreno F (1992) Genetics of ribosomally synthesized peptide antibiotics. *Annu Rev Microbiol* **46**, 141-163.
- Kozak W, Bardowski J and Dobrzanski WT (1978) Lactostreptocins-acid bacteriocins produced by lactic streptococci. *J Dairy Res* **45**, 247-257.

- Kozak W, Bardowski J and Dobrzanski WT (1977) Lactostrepcin-a bacteriocin produced by *Streptococcus lactis*. Bull Acad Pol Sci (Biol) 25, 217-221.
- Kyung KH, Park KS and Kim YS (1996) Isolation and characterization of bacteria resistant to the antimicrobial activity of garlic. J Food Sci 61, 226-229.
- Lancini G and Lorenzetti R (1993) Biotechnology of antibiotics and other bioactive microbial metabolites. pp 1-5. Plenum press, New York.
- Lewus CB, Sun S and Montville TJ (1992) Production of an amylase-sensitive bacteriocin by a atypical *Leuconostc paramesenteroides*. Appl Environ Microbiol 58, 143-149.
- Lewus C, Kaiser A and Montville TJ (1991). Inhibition of food-borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl Environ Microbiol 57, 1683-1688.
- Lewus CB and Montville TJ (1991) Detection of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. J Microbiol Methods 13, 145-150.
- Lyon WJ and Glatz BA (1993) Isolation and purification of Propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by a strain of *Propionibacterium thoenii*. Appl Environ Microbiol 59, 83-88.
- Mortvedt CI, Nissen-Meyer J, Stetten K and Nes IF (1991) Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. Appl Environ Microbiol 57, 1829-1834.
- Nielsen. JW, Dickson JS and Crouse JD (1990) Use of a bacteriocin produced by *Pediococcus acidilactici* to inhibit *Listeria monocytogenes* associated with fresh meat. Appl Environ Microbiol 56, 2142-2145.
- Nissen-Meyer J, Holo H, Havarstein LS, Sletten K and Nes IF (1992) A novel lactococcal bacteriocin whose activity depends on the complementary action of two peptides. J Bacteriol 174, 5686-5692.
- Okereke A and Montville TJ (1991) Bacteriocin inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria. J Food Prot 54, 349-353.
- Olasupo NA, Olukoya DK and Odunfa SA (1997) Assessment of a bacteriocin-producing *Lactobacillus* strain in the control of spoilage of a cereal-based African fermented food. Folia Microbiol (Praha) 42, 31-34.

- Olasupo NA, Schillinger U, Narbad A, Dodd H and Holzapfel WH (1999) Occurrence of nisin Z production in *Lactococcus lactis* BFE 1500 isolated from wara, a traditional Nigerian cheese product. *Int. J Food Microbiol* **53**, 141-145.
- O'Sullivan DJ and Klaenhammer TR (1993) Rapid mini-prep isolation of high-quality plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2730-2733.
- Paik HD, Bae SS, Park SH and Pan JG (1997) Identification and partial characterization of tochicin, a bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis* subsp. *tochigiensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **19**, 294-298.
- Piard JC, Muriana PM, Desmazeaud MJ and Klaenhammer TR (1992) Purification and partial characterization of lacticin 481, a lanthionine-containing bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ481. *Appl Environ Microbiol* **58**, 279-284.
- Piuri M, Sanchez Rivas C and Ruzal SM (1998) A novel antimicrobial activity of a *Paenibacillus polymyxa* strain isolated from regional fermented sausages. *Lett Appl Microbiol* **27**, 9-13.
- Price RT and Lee JS (1970) Inhibition of *Pseudomonas* species by hydrogen peroxide producing lactobacilli. *J Milk Food Tech* **33**, 13-16.
- Pucci MJ, Vedamuthu FR, Kunka BS and Vandenberg PA (1988) Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produce by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0. *Appl Environ Microbiol* **54**, 2349-2353.
- Pugsey AP and Oudega B (1987) Methods for studying colicins and their plasmids. In: "Plasmids" (Edited by Hardy MS), pp. 105-111. IRL Press, Oxford.
- Rattanachaikunsopon P and Phumkhachorn P (2000) A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from Thai fermented foods. *ScienceAsia* **26**, 195-200.
- Rattanachaikunsopon P and Phumkhachorn P (1998) A simple method for detecting bacteriocin production : swab-paper disc. *The Journal of Science KhonKaen University* **26**, 281-288.

- Reis M, Eschbach-Bludau M, Iglesias-Wind MI, Kupke T and Sahl HG (1994) Producer immunity towards the lantibiotic Pep5: identification of the immunity gene *pepI* and localization and functional analysis of its gene product. *Appl Environ Microbiol* 60, 2876-2883.
- Ryan MP, Meaney WJ, Ross RP and Hill C (1998) Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. *Appl Environ Microbiol* 64, 2287-2290.
- Schillinger U and Lucke FK (1989) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. *Appl Environ Microbiol* 55, 1901-1906.
- Schillinger U, McKay LL and Lucke FK (1991) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in meat and its control by a bacteriocin-producing strain of *Lactobacillus sake*. *J Appl Bacteriol* 70, 473-478.
- Sobrino OJ, Rodriguez JM, Moreira WL, Fernandez MF, Sanz B and Hernandez PE (1991) Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. *Int J Food Microbiol* 13, 1-10.
- Stahl S (1989) A new bacteriocinogenic activity: megacin BII encoded by plasmid pSE 203 in strains of *Bacillus megaterium*. *Arch Microbiol* 151, 159-165.
- Stoffels G, Nes IF and Gudmundsdottir A (1992) Isolation and properties of a bacteriocin-producing *Carnobacterium piscicola* isolated from fish. *J Appl Bacteriol* 73, 309-316.
- Suma K, Misra MC and Varadaraj MC (1998) Plantaricin LP84, a broad spectrum heat-stable bacteriocin of *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 produced in a simple glucose broth medium. *Int J Food Microbiol* 40, 17-25.
- Tagg JR, Dajani AS and Wannamaker LW (1976) Bacteriocin of gram positive bacteria. *Bacteriol Rev* 40, 722-756.
- Tahara T and Kanatani K (1996) Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J 1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. *J Appl Bacteriol* 81, 669-677.
- Taylor LY, Cann DD and Welch BJ (1990) Antibotulinal properties of nisin in fresh fish packaged in an atmosphere of carbon dioxide. *J Food Prot* 53, 953-957.

- Toba T, Yoshioka E and Itoh T (1991) Acidophilucin A, a new heat-labile bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* LAPT 1060. *Lett Appl Microbiol* 12, 106-108.
- Upreti GC and Hinsdill RD (1975) Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob Agents Chemother* 7, 139-145.
- van Belkum MJ, Hayema BJ, Jeeninga RE, Kok J and Venema G (1991) Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl Environ Microbiol* 57, 492-498.
- Vas K (1964) Nisin in the food industry. *Dt Lebensmitt Rundsch* 60, 63-67.
- Vaughan EE, Daly C and Fitzgerald GF (1992) Identification and characterization of helveticin V-1829, a bacteriocin produce by *Lactobacillus helveticus* 1829. *J Appl Bacteriol* 73, 299-308.
- Walsh PM and McKay LL (1981) Recombinant plasmid associated cell aggregation and high-frequency conjugation of *Streptococcus lactis* ML3. *J Bacteriol* 146, 937-944.
- Woodruff WA, Novak J and Caufield PW (1998) Sequence analysis of mutA and mutM gene involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene* 206, 37-43.
- Winkowski K and Montville TJ (1992) Use of a meat isolate, *Lactobacillus bavaricus* MN, to inhibit *Listeria monocytogenes* growth in a model meat gravy system. *J Food Safety* 13, 19-31.
- Yang R, Monty C, Johnson C and Bibek R (1992) Novel method to extract large amounts of bacteriocins from lactic acid bacteria. *Appl Environ Microbiol* 58, 3355-3359.
- Yildirim Z and Johnson MG (1998a) Detection and characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* R isolated from radish. *Let Appl Microbiol* 26, 297-304.
- Yildirim Z and Johnson MG (1998b) Characterisation and antimicrobial spectrum of bifidocin B, a bacteriocin produced by *Bifidobacterium bifidum* NCFB 1454. *J Food Protection* 61, 47-51.

Yousef AE, Luchansky JB, Degnan AJ and Doyle MP (1991) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in Weiner exudates in the presence of *Pediococcus acidilactici* or pediocin AcH during storage at 4 or 25°C. Appl Environ Microbiol 57, 1461-1467.