นุจรี สอนสะอาด : แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (BACTERIOCINS FROM LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED FISH PRODUCTS) อาจารย์ที่ปรึกษา : รองศาสตราจารย์ ดร. จิรวัฒน์ ยงสวัสดิกุล, 164 หน้า.

แบคเทอริโอซินเป็นสารเพปไทด์ที่สังเคราะห์จากไรโบโซม มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ซึ่งผลิตได้ทั้งแบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวก วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้คือ เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินจากอาหารปลาหมักพื้นบ้านไทยได้แก่ ปลาส้ม ส้มไข่ปลา ปลาร้า และกุ้งจ่อม เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับผลิตแบคเทอริโอซิน ทำบริสุทธิ์และศึกษาคุณลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ได้ ศึกษากลไกการออกฤทธิ์ จากจำนวนทั้งหมด 285 ไอโซเลท ที่คัดเลือกได้ เมื่อคัดกรองจากการสร้างแบคเทอริโอซินพบว่า 4 ไอโซเลทแสดงการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* เป็นอย่างมาก เมื่อวิเคราะห์ด้วยเทคนิคการแพร่ของสารในเนื้อวุ้น(ซึมผ่านบนอาหารแข็ง) ได้แก่ ไอโซเลท CN-25, GY-20, MSKC-13 และ MSK-3-18 โดยทั้ง 4 ไอโซเลทนี้ถูกระบุชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene เป็น *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่งเป็นครั้งแรกที่พบ *Enterococcus faecium* ที่แยกจากส้มไข่ปลา และผลิตแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* นอกจากนี้ตรวจพบยีนที่การควบคุมการสร้างสารเอนเทอโรซินเอและเอนเทอโรซินบีใน *E. faecium* CN-25 ซึ่งมีความเหมือนร้อยละ 100 กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนที่ควบคุมการสร้างสารเอนเทอโรซินเอ ของ *E. faecium* CRL1385 และสารเอนเทอโรซินบีของ *E. faecium* T136 การผลิตแบคเทอริโอซินเกิดขึ้นสูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีรำข้าวร้อยละ 0.5 น้ำตาลกลูโคลสร้อยละ 0.2 สารสกัดของยีสต์ ร้อยละ 0.5 ไตรแอมโมเนียมซิเตรทร้อยละ 0.2 โซเดียมอะซิเตทร้อยละ 2.0 ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.2 แมกนีเซียมซัลเฟตร้อยละ 0.02 แมงกานีสซัลเฟตร้อยละ 0.05 และ โพลีซอเบท (Tween 80) 0.1 มิลลิลิตร การผลิตแบคเทอริโอซินมีผลผลิตสูงสุดที่ 1828.15 AU ต่อมิลลิลิตร ที่กล้าเชื้อเริ่มต้นร้อยละ 0.5 และอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ก่อนการเข้าสู่ระยะที่เซลล์มีการเจริญคงที่ (stationary phase) โดยมีจำนวนเซลล์ 9.4 log CFU ต่อมิลลิลิตร แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้มีความคงตัวที่ช่วงพีเอช 2-11 และมีความเสถียรต่อความร้อนช่วงกว้าง แต่กิจกรรมลดลงเมื่อบ่มที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เกิดการสูญเสียกิจกรรมด้วยโปรติเนส เมื่อทำบริสุทธิ์เพปไทด์โดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตและการแยกโดยการแลกเปลี่ยนแบบประจุลบ พบว่าเพปไทด์ที่ได้มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเฉพาะเพิ่มขึ้น มีความบริสุทธิ์เพิ่มขึ้น 8.1 เท่า โดยมีค่าความเข้มข้นต่ำสุดที่ยับยั้งการเจริญได้ของ *L. monocytogenes* ได้สมบูรณ์ (MIC) เท่ากับ 2.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ศึกษากลไกการยับยั้งของสารเพปไทด์ CN-25 ต่อการทำลาย

เซลล์ของ *L. monocytogenes* โดยการตรวจวัดการเหนี่ยวนำให้เกิดการไหลออกของสารอะดีโนซินไตรฟอสเฟต (ATP) ออกมานอกเซลล์และการเปลี่ยนแปลงของแรงขับเคลื่อนโปรตรอน (proton motive force) ในเซลล์ พบว่าเพปไทด์ CN-25 สามารถลดค่าพลังงานทั้งหมดของเซลล์ *L. monocytogenes* แต่ไม่พบการไหลออกของสารให้พลังงานออกนอกเซลล์ และพบการลดลงของแรงที่เกิดจากความต่างศักย์เยื่อหุ้มชั้นใน ($\Delta\Psi$) แต่ไม่มีผลต่อการลดลงของแรงที่เกิดจากความแตกต่างของความเข้มข้นของโปรตอนด้านในและด้านนอกของเยื่อหุ้มเซลล์ (ΔpH) เมื่อเติมเพปไทด์ CN-25 ปริมาณ 914.2 AU ต่อมิลลิลิตรลงในน้ำนม ที่ผ่านการพาสเจอไรซ์ พบว่า *L. monocytogenes* ในนมพลาสเจอไรซ์ลดจำนวนจาก 4.1 log CFU ต่อมิลลิลิตร เหลือ 3.7 log CFU ต่อมิลลิลิตร ($p<0.05$) ในระยะเวลา 5 วัน ของการเก็บรักษา ดังนั้นเพปไทด์ที่ผลิตโดย *E. faecium* CN-25 สามารถใช้เป็นสารต่อต้านจุลชีพในนม เพื่อควบคุมการเจริญของ *L. monocytogenes*

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร
ปีการศึกษา 2556

ลายมือชื่อนักศึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม _____

NOOTJAREE SONSA-ARD : BACTERIOCINS FROM LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM FERMENTED FISH PRODUCTS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. JIRAWAT YONGSAWATDIGUL, Ph.D., 164 PP.

BACTERIOCIN/LACTIC ACID BACTERIA/FERMENTED FOOD

Bacteriocins are ribosomally-synthesized peptides with antimicrobial activity, produced by both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The objectives of this study were to isolate bacteriocin-produced by lactic acid bacteria from traditional Thai fermented fish products, namely pla-som, somkai-pla, pla-ra and kong-jom, and to optimize the bacteriocin production of selected isolates. In addition, the objectives were to purify and elucidate their stability and modes of action of bacteriocins produced by the selected isolate. A total of 285 isolates were obtained and screened for bacteriocin production. Four isolates which produced remarkably wide zones of inhibition based on the agar well diffusion technique against *Listeria monocytogenes* were CN-25, GY-20, MSKC-13 and MSK-3-18. These isolates were identified on the basis of 16S rRNA gene sequence as *Enterococcus faecium*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. This is the first report of *E. faecium* isolated from somkai-pla, which produced bacteriocins and showed *L. monocytogenes* inhibition as compared to other isolates. Therefore, this strain was selected for the production and characterization of the antibacterial compounds. *E. faecium* CN-25 was found to harbour genes encoding for enterocin A and enterocin B with a similar sequence (100%) homology to gene encoding enterocin A of *E. faecium* CRL1385 and enterocin B of *E. faecium* T136. *E. faecium* CN-25 showed the maximum bacteriocin production in

a modified broth containing 0.5% rice bran, 0.2% glucose, 0.5% yeast extract, 0.2% tri-ammonium citrate, 2% sodium acetate, 0.2% di-potassium hydrogen phosphate, 0.02% magnesium sulfate, 0.05% manganese sulfate and 0.1 ml polysorbate (Tween 80). The optimal bacteriocin production for *E. faecium* CN-25 was at 0.5% inoculum and 25 °C. Maximum production of bacteriocin of 1828.15 AU/ml was reached at the beginning of the stationary phase and the cell growth was determined to be 9.4 log CFU/ml. The bacteriocin CN-25 had stable activity with a wide pH range of 2-11.The activity was largely stable to heating, however, it decreased when treated at 121^{o}C for 15 min. It was found that the antibacterial activity was sensitive to various proteinases. Purification of CN-25 peptide by ammonium sulfate precipitation and anion exchange chromatography increased specific activity by 8.1 folds. The lowest concentration at which bacteriocin completely inhibited *L. monocytogenes* (MIC) was 2.38 µg/ml. The mode of action of CN-25 peptide on *L. monocytogenes* was investigated based on the efflux of intracellular ATP and the change of the proton motive force (PMF) in cell membranes. The CN-25 peptide decreased the total ATP of *L. monocytogenes*, but had no significant effect on the efflux of intracellular ATP. In addition, it depleted the cellular $\Delta\Psi$ (transmembrane electrical potential) but had no effect on the ΔpH (pH gradient). The CN-25 peptide at 914.2 AU/ml reduced *L.monocytogenes* in inoculated pasteurized milk from 4.1 to 3.7 log CFU/ml ($p<0.05$) during 5 day storage. The peptide produced by *E. faecium* CN-25 could be used in milk as an antimicrobial agent for controlling *L. monocytogenes*.

School of Food Technology — Student's Signature _____

Academic Year 2013 — Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____