นิพนธ์ต้นฉบับ

การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

ลัญจกร จันทร์อุดม[1] สุกัญญา จันทะชุม[2] และ อรัญ หันพงศ์กิตติกูล[3]

Abstract

Chan-udom, L.[1], Chanthachum, S.[2] and H-Kittikul, A.[1]

Development of medium for bacteriocin production from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

Songklanakarin J. Sci. Technol., Dec. 2005, 27(Suppl. 3) : 817-824

Coconut water and tuna condensate were used to produce bacteriocin from *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 by comparing with commercial medium, MRS. Bacteriocin activity was determined by using *Staphylococcus aureus* as indicator. When *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 was grown in MRS medium the highest bacteriocin was observed at 18-24 hour with inhibitory activity of 20 AU/ml. While growing in modified media CW 1 (tuna condensate : coconut water = 1 : 1) the organism had inhibitory activity of bacteriocin of 20 AU/ml at 20 hour. In modified medium CW 2 (1 : 2), CW 3 (1 : 3), and CW 4 (1 : 4) had inhibitory activity of bacteriocin of 10 AU/ml at 16 hour. The bacteriocin activity was also found when *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 grown in Tuna 2 (tuna condensate : coconut water = 2 : 1) and Tuna 3 (3 : 1) but no activity was observed in Tuna 4 (4 : 1).

Key words : bacteriocin, *Lactobacillus casei* ssp. rhamnosus SN 11

[1]Department of Industrial Biotechnology [2]Department of Food Technology, Faculty of Agro-Industry, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]นักศึกษาหลักสูตร วท.ม. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ [2]Ph.D.(Food Science) ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร [3]Ph.D.(Biotechnology) ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: sugunya.c@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 29 สิงหาคม 2548 รับลงพิมพ์ 20 ธันวาคม 2548

บทคัดย่อ

ลัญจกร จันทร์อุดม สุกัญญา จันทะชุม และ อรัญ หันพงศ์กิตติกูล

การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11

ว. สงขลานครินทร์ วทท. ธ.ค. 2548 27(ฉบับพิเศษ 3) : 817-824

การใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN11 พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ในอาหารทุกสูตร แต่เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS โดยให้กิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็น 20 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ถึง 24 ซึ่งเป็นช่วง late log phase ถึงระยะ early stationary phase ในขณะที่สูตรอาหารดัดแปลง CW 1 (สัดส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่า : น้ำมะพร้าว เป็น 1 : 1) ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเป็น 20 AU/ml ในชั่วโมงที่ 20 และสูตรอาหารดัดแปลง CW 2 (1 : 2), CW 3 (1 : 3) และ CW 4 (1 : 4) มีกิจกรรมการยับยั้งเป็น 10 AU/ml ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 16 ตลอดจนสิ้นสุดการทดลอง และพบกิจกรรมการยับยั้งเกิดขึ้นเพียงเล็กน้อยในสูตรอาหาร Tuna 2 (สัดส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่า : น้ำมะพร้าว เป็น 2 : 1) และ Tuna 3 (3 : 1) และไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใด ๆ ในสูตรอาหาร Tuna 4 (4 : 1)

แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียต่าง ๆ ได้ สามารถผลิตได้จากแลกติกแอสิดแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ จากศักยภาพต่าง ๆ ของแบคเทอริโอซิน จึงมีผู้สนใจนำแบคเทอริโอซินมาใช้เป็นสารป้องกันการเสื่อมเสียในผลิตภัณฑ์อาหารมากมาย โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้ส่วนใหญ่จะเป็นสารปฐมภูมิ (primary metabolite) (De Vuyst และ Vandamme, 1993 และ Kaiser และ Montville, 1996) และจะพบกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเมื่อการเจริญเติบโตของเชื้ออยู่ในช่วงปลายของ log phase

ในการผลิตแบคเทอริโอซินมีปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิต เช่น องค์ประกอบและพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิ และปริมาณอากาศของสภาวะในการเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น โดยการผลิตแบคเทอริโอซินจะมีความสัมพันธ์กับการเจริญเติบโตของเชื้อ (Yang และ Ray, 1994) ดังนั้นเพื่อเพิ่มปริมาณแบคเทอริโอซินจึงนิยมใช้อาหารที่มีสารอาหารครบถ้วนเพื่อให้เหมาะสมแก่การเจริญของเชื้อ ซึ่งมีผลต่อราคาต้นทุนการผลิตที่เพิ่มมากขึ้น จึงมีการศึกษาหาวิธีการที่จะลดต้นทุนการผลิตโดยการใช้วัสดุเศษเหลือจากการเกษตรมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตโดยวัสดุเศษเหลือที่มีการนำมาใช้ในการผลิตแบคเทอริโอซิน ได้แก่ cotton seed meal (De Vuyst และ Vandamme, 1995) skim milk (Chii-Cherng *et al.*, 1993) beet molasses และ corn steep liquor (Hsieh *et al.*, 1996) และภัทรพล (2543) ใช้กากน้ำตาลและน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ผ่านการแยกไขมันและตะกอนโปรตีนออก (ปริมาณของแข็งทั้งหมด 68,450 มก./ลิตร, โปรตีน 4%, แมงกานีส 63.66 มก./ลิตร และฟอสฟอรัส 45.01 มก./ลิตร) ในการเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ส้มฟัก (ศิรินาถ, 2540) เพื่อลดต้นทุนการผลิตแบคเทอริโอซินเช่นกัน

จากการศึกษาของภัทรพล (2543) พบว่า การใช้กากน้ำตาลแทนแหล่งคาร์บอนในอาหารไม่สามารถเพิ่มการผลิตแบคเทอริโอซินได้ จึงทำการทดลองแทนที่กลูโคสและไนโตรเจนในอาหารเหลว MRS ด้วยซูโครส 1% และน้ำนึ่งปลาทูน่าที่ผ่านการแยกไขมันและตกตะกอนโปรตีนเจือจางในอัตราส่วน 1/1 (medium I) โดยยังมีการเติมสารประกอบบัฟเฟอร์ และ tween 80 แต่ไม่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟตและแมกนีเซียมซัลเฟต พบว่า เชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 มีการเจริญและผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 24 โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 3.08 กรัม/ลิตร และมีกิจกรรมการยับยั้ง 30 AU/ml ในชั่วโมงที่ 24 เท่ากับในอาหาร MRS สูตรปกติ จากข้อมูลการศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินข้างต้น พบว่ามีการใช้ซูโครสในปริมาณที่สูงซึ่งยังคงส่งผลต่อราคาต้นทุนการผลิต และจากรายงานของ Child (1974) พบว่าในส่วนที่เป็น

น้ำมะพร้าวแก่มีองค์ประกอบที่เป็นน้ำตาลรีดิวซ์ 4.4% และน้ำตาลซูโครสในปริมาณสูง นอกจากนี้ยังประกอบด้วยปริมาณของแข็งทั้งหมด 6.5% โพแทสเซียม 290 มก./100 มล. โซเดียม 42 มก./100 มล. และแคลเซียม 44 มก./100 มล. จึงก่อให้เกิดแนวคิดในการศึกษาการใช้น้ำตาลในน้ำมะพร้าวแทนที่ซูโครสในอาหาร MRS เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว ดังนั้นการศึกษาการผลิตแบคเทอริโอซินโดยใช้น้ำมะพร้าวเป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงเป็นอีกแนวทางหนึ่งที่น่าสนใจ เพื่อเป็นการลดต้นทุนในด้านการผลิต ตลอดจนการใช้ประโยชน์จากเศษเหลือเพื่อประโยชน์ด้านสิ่งแวดล้อม

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

การเตรียมหัวเชื้อ

เตรียมหัวเชื้อโดยถ่ายเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 ที่แยกได้จากอาหารหมักประเภทส้มฟัก (ศิรินาถ, 2540) 1 ลูปจากหลอดเก็บเชื้อวุ้นเอียงในอาหาร MRS (De Man Rogosa and Sharpe) ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มล. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. ถ่ายเชื้อ 5% ลงในอาหารเหลวแต่ละชนิด (Table 2) ปริมาตร 200 มล. ในฟลาสก์ขนาด 250 มล. ที่มีพีเอชเริ่มต้นเป็น 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. ในตู้บ่มแบบเขย่าที่อัตราเร็ว 100 รอบ/นาที เพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น

การเตรียมวัตถุดิบ

เตรียมน้ำนึ่งปลาทูน่าโดยนำน้ำนึ่งปลาทูน่าจากโรงงานอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ มากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อกรองแยกตะกอนขนาดใหญ่ออกแล้วให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ไขมันลอยขึ้นมาบนผิวหน้าแล้วพักให้เย็นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชม. หลังจากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 12 ชม. แยกไขมันที่ผิวหน้าทิ้งไป ปรับพีเอชของน้ำนึ่งปลาทูน่าให้เท่ากับ 6.5 ด้วย 6 N NaOH และ 6 N HCl ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะแก่การเจริญของเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 หลังจากนั้นนำไปตกตะกอนโปรตีนโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลา 15 นาที กรองแยกตะกอนทิ้งแล้วบรรจุขวด เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C (ภัทรพล, 2543)

การเตรียมน้ำมะพร้าว นำน้ำมะพร้าวแก่จากตลาดสดในเขตอำเภอหาดใหญ่มากรองด้วยผ้าขาวบางเพื่อแยกตะกอนขนาดใหญ่ออก ปรับพีเอชของน้ำมะพร้าวให้เท่ากับ 6.5 และนำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อแยกโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำออก กรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 4 บรรจุขวด และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20°C

การวิเคราะห์องค์ประกอบเริ่มต้นของน้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่า

โดยทำการวัดค่าพีเอชของสารละลายโดยใช้เครื่องวัดพีเอช วิเคราะห์ปริมาณโปรตีนและปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดของน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าว ตามวิธี Kjeldahl method (A.O.A.C., 2000) วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์และปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในน้ำมะพร้าวโดยใช้วิธี Lane eynon and volumetric method (A.O.A.C., 2000) และวิเคราะห์ปริมาณเกลือในน้ำนึ่งปลาทูน่า (A.O.A.C., 2000)

การเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. rhamnosus SN 11

การเลี้ยงเชื้อ *L. casei* ssp. rhamnosus SN 11 ถ่ายหัวเชื้อ *L. casei* ssp. rhamnosus SN 11 ปริมาตร 5% ลงในอาหารทั้ง 8 สูตร ดังนี้คือ MRS และสูตรอาหาร CW 1, CW 2, CW 3, CW 4, Tuna 2, Tuna 3 และ Tuna 4 ที่มีการใช้น้ำมะพร้าวทดแทนน้ำตาล และใช้โปรตีนในน้ำนึ่งปลาทูน่าแทนแหล่งไนโตรเจน โดยมีสัดส่วนของน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวที่แตกต่างกัน (Table 2) ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารสำเร็จ MRS ควบคู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรต่างเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบ โดยนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิแบบเขย่า ใช้ความเร็ว 100 รอบ/นาที เก็บตัวอย่างครั้งละ 10 มล. วัดการเจริญของเชื้อที่ค่าดูดกลืนแสง (OD) 660 นาโนเมตร ค่าพีเอช และกิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36 และ 48 ชม. โดยทำการปรับพีเอชของน้ำหมักให้อยู่ที่ระดับ 6.5 ก่อนการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ทุกชุดการทดลองทำการทดลอง 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ และคัดเลือกสูตรอาหารที่เหมาะสม โดยพิจารณาจากกิจกรรมการยับยั้ง

ของแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อของสูตรอาหารที่ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุด

การทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน

ทำการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินโดยวิธี agar well diffusion ซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Parente และ Hill (1992) โดยนำน้ำหมักจากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 มาปรับพีเอชให้ได้เป็น 6.5 นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 4,500 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที นำส่วนใสมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 75°C นาน 10 นาที การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการทดสอบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินเตรียมโดยเทอาหาร TSA (trypticase soy agar) ที่มีวุ้น 0.75% และมีปริมาณเชื้อ *S. aureus* ประมาณ 10^5 เซลล์/มล. ทับบนอาหารแข็ง NA (nutrient agar) พักให้แห้งเป็นเวลา 1 ชม.ในตู้ปลอดเชื้อ แล้วทำการเจาะหลุมโดยใช้แกนเจาะสแตนเลสที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.6 มล. แล้ววัดค่ากิจกรรมการยับยั้ง/มล. ของส่วนใสในหน่วยของ arbitrary unit (AU/ml) โดยหยดส่วนใสที่ไม่เจือจางและที่ผ่านการเจือจางครั้งละ 2 เท่าด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (two-fold dilution) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในหลุมบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชม. สังเกตระดับความเจือจางสุดท้ายที่ทำให้เกิดวงใส (clear zone) แล้วคำนวณกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซิน ดังสูตร

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (AU/ml)} = \frac{1000\ \mu l \times A}{B\mu l}$$

A = ความเจือจางสุดท้ายที่ทำให้เกิดวงใส
B = ปริมาตรส่วนใสที่หยดลงในหลุม หรือที่หยดบนอาหาร

ผลการทดลอง

การเจริญของเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 และการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารดัดแปลง

ในการเจริญเติบโตและการผลิตแบคเทอริโอซินของแลกติกแอสิดแบคทีเรีย พบว่า องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อมีความสำคัญเป็นอย่างมาก โดยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นปัจจัยสำคัญที่ใช้ควบคุมการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซิน น้ำนึ่งปลาทูน่า และน้ำมะพร้าวเป็นวัสดุเศษเหลือจากอุตสาหกรรมและจากการเกษตรที่ยังมีโปรตีนและน้ำตาลในปริมาณสูง อีกทั้งยังมีแร่ธาตุต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญของแบคทีเรียแลกติก เมื่อทำการวิเคราะห์องค์ประกอบของน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าว (Table 1) ที่นำมาใช้แทนแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว นำมาปรับสัดส่วนเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงสูตรต่างๆ โดยแปลงสัดส่วนจากสูตรอาหารสำเร็จ MRS ที่มีสัดส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจน (C/N ratio) เป็น 0.8 (ปริมาณไนโตรเจน 2.5% และปริมาณคาร์บอน 2.0%) ในการศึกษาและติดตามการเจริญของเชื้อ การผลิตแบคเทอริโอซิน และการเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหารเลี้ยงเชื้อดัดแปลงทั้ง 7 สูตร คือ CW 1, CW 2, CW 3, CW 4, Tuna 2, Tuna 3 และ Tuna 4 เปรียบเทียบกับการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารสำเร็จ MRS เป็นเวลา 48 ชม. พบว่าเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารสำเร็จ MRS และการเปลี่ยนแปลงของพีเอชในอาหารแต่ละสูตรเมื่อพิจารณาที่ชั่วโมงที่ 24 ซึ่งเป็นช่วง late stationary phase พบว่าในอาหาร MRS, CW 1, CW 2, CW 3, CW 4, Tuna 2, Tuna 3 และ Tuna 4 มีค่าพีเอชเป็น 3.98, 4.23, 4.15, 4.17, 4.20, 4.20, 4.20 และ 4.40 ตามลำดับ (Figure 1) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดที่แบคทีเรียสร้างขึ้นโดยใช้น้ำตาล

ในขณะที่การเจริญของเชื้อในอาหารดัดแปลงสูตรต่างๆ ที่ใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นองค์ประกอบนั้นมีการเจริญแตกต่างกัน โดยในสูตรอาหาร CW 1 (Figure 1-B) พบแบคเทอริโอซินในชั่วโมงที่ 12 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งสูงสุดเท่ากับ 20 AU/ml ในชั่วโมงที่ 20 และกิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะลดลงเป็น 10 AU/ml เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชม. ซึ่งกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นในสูตรอาหาร CW1 ใกล้เคียงกับกิจกรรมการยับยั้งในสูตรอาหารสำเร็จ MRS (Figure 1-A) เพียงแต่ระยะเวลาในการคงตัวของแบคเทอริโอซินในสูตรอาหาร CW 1 จะน้อยกว่าในสูตรอาหาร MRS (กิจกรรมการยับยั้งลดลงเมื่อเวลาผ่านไป 36 ชม.) สำหรับในสูตรอาหาร CW 2, CW

Table 1. Chemical composition of coconut water and tuna condensate.

Composition	Coconut water		Tuna condensate	
	Before separated protein and macromolecule	After separated protein and macromolecule	Before separated protein and lipid	After separated protein and lipid
pH	5.50	6.52	6.2	6.5
Nitrogen (%)	0.11±0.07	0.10±0.02	5.12±0.56	4.54±1.91
Salt (%)	NA	NA	0.23±0.15	0.19±0.11
Reducing sugar (%)	0.56±0.77	0.53±0.36	NA	NA
Total sugar (%)	1.7±0.14	1.69±0.14	NA	NA

NA = Not Available

Table 2. The 8 different media for cultivated *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 were modified from the formulation of MRS medium by varing the quantity of tuna condensate and coconut water in different ratio.

The composition in media	The different media							
	MRS	CW 1	CW 2	CW 3	CW 4	Tuna 2	Tuna 3	Tuna 4
Proteose peptone, Beef extract, Yeast extract (%)	2.5	-	-	-	-	-	-	-
N source (from tuna condensate (%))	-	2.27	1.51	1.13	0.91	2.72	3.41	3.63
C source (from coconut water (%))	2.0	1.85	2.13	2.27	2.36	1.51	1.42	1.34
Tween 80 (ml)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
Ammonium citrate (g)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Sodium acetate (g)	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
Dipotassium phosphate (g)	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Magnesium sulfate (g)	0.1	-	-	-	-	-	-	-
Manganses sulfate (g)	0.05	-	-	-	-	-	-	-
Distilled water (ml)	1,000	-	-	-	-	-	-	-
Tuna condensate (ml)*	-	500	333	250	200	667	750	800
Coconut water (ml)*	-	500	667	750	800	333	250	200
C/N ratio	0.8	0.81	1.41	2.01	2.59	0.55	0.42	0.37

*** Total volumn of tuna condensate and coconut water that were used for calculate % nitrogen and % carbon in each medium.**

3 และ CW 4 (Figure 1-C-E) เชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN 11 ผลิตแบคเทอริโอซินเมื่อเข้าสู่ชั่วโมงที่ 16 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml และยังคงมีกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเกิดขึ้นจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก

นอกจากนี้ ในการทดลองเลี้ยงเชื้อในสูตรอาหาร Tuna 2 และ Tuna 3 (Figure 1-F,1-G) ยังให้ผลการผลิตแบคเทอริโอซินแตกต่างจากสูตรอาหารข้างต้น เนื่องจากในสูตรอาหารเหล่านี้มีการใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นองค์ประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณ 2, 3 และ 4 เท่า โดยมีสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลงเป็น 0.55, 0.42 และ 0.37 ตามลำดับ การผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อในสูตรอาหาร Tuna 2 และ Tuna 3 จะเกิดขึ้นตั้งแต่ช่วงแรกของการเจริญของเชื้อ โดยสามารถตรวจพบกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 โดยในสูตรอาหาร Tuna 2 จะมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU/ml จนถึงชั่วโมงที่ 16 ในขณะที่การผลิตแบคเทอริโอซินในสูตรอาหาร Tuna 3 สิ้นสุดที่ชั่วโมงที่ 12 และไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซินเกิดขึ้นในสูตรอาหาร Tuna 4 (Figure 1-H)

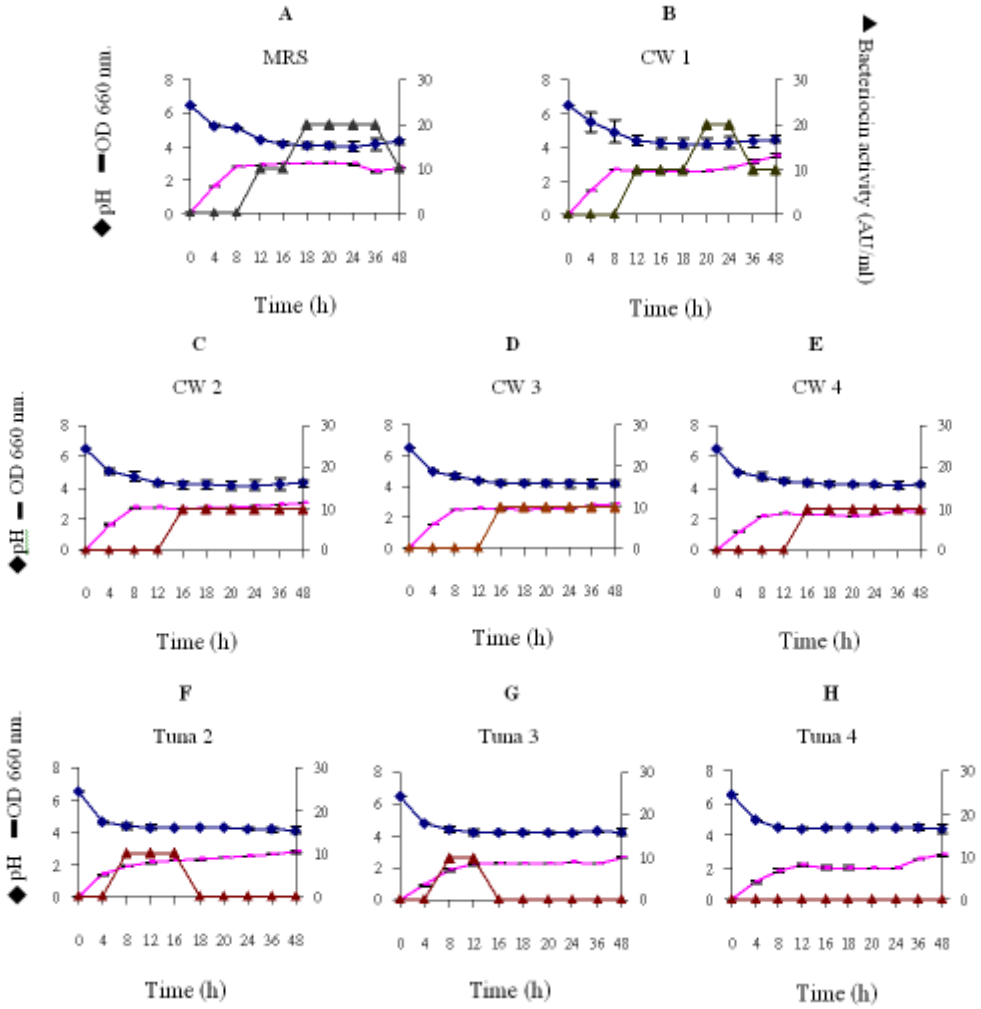

Figure 1 (A-H) Growth, bacteriocin activity and pH changes of *L. casei* ssp. rhamnosus SN11
◆ pH ▬ OD 600 nm. ▲ Bacteriocin activity (AU/ml.)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การใช้น้ำมะพร้าวและน้ำนึ่งปลาทูน่าเป็นแหล่งคาร์บอน และไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 มีปัจจัยที่สำคัญคือ ปริมาณองค์ประกอบต่างๆ ของสารในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ปริมาณน้ำตาล ปริมาณโปรตีน และปริมาณแร่ธาตุที่มีอยู่ในวัตถุดิบ โดยแบคเทอริโอซินสามารถผลิตได้ดีในสูตรอาหารสำเร็จ MRS ที่มีอัตราส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนเป็น 0.8 (ปริมาณไนโตรเจน 2.5% และปริมาณคาร์บอน 2.0%) โดยเมื่อปรับปริมาณสัดส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีสัดส่วนของคาร์บอนต่อไนโตรเจนลดลงในสูตรอาหารดัดแปลง Tuna 2 (C/N ratio เป็น 0.55), Tuna 3 (C/N ratio เป็น 0.42) และเมื่อเพิ่มปริมาณคาร์บอนต่อไนโตรเจนในสูตรอาหารดัดแปลง CW 2 (C/N ratio เป็น 1.41), CW 3 (C/N ratio เป็น 2.01) และ CW 4 (C/N ratio เป็น 2.59) พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินลดลงและไม่พบกิจกรรมการยับยั้งใดๆ ในสูตรอาหาร Tuna 4 (C/N ratio เป็น 0.37) การลดลงของแบคเทอริโอซินในสูตรอาหารต่างๆ เหล่านี้เกิดขึ้นจากความไม่สมดุลของอัตราส่วนระหว่างปริมาณคาร์บอนและปริมาณไนโตรเจน ในสูตรอาหารที่มีปริมาณ

ไนโตรเจนสูงกว่าปริมาณคาร์บอน (Tuna 2, Tuna 3 และ Tuna 4) ปริมาณโปรตีนที่เหลืออยู่หลังจากเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะคงที่ (stationary phase) อาจเป็นพิษต่อเซลล์และเร่งการเกิดการแตกตัวของเซลล์ของเชื้อ และเข้าไปมีผลต่อความคงตัวของแบคเทอริโอซิน (Jung *et al.*, 1992) สอดคล้องกับการทดลองของ Chii-Cherng และคณะ (1993) ที่ศึกษาผลของปริมาณยีสต์สกัด 0.5, 1, 2, 3 และ 4% ในอาหารน้ำเวย์ พบว่าที่ปริมาณยีสต์สกัด 2% ให้การผลิตแบคเทอริโอซินสูงสุด แต่เมื่อเพิ่มปริมาณยีสต์สกัดปริมาณการผลิตแบคเทอริโอซินจะลดลงอย่างรวดเร็วหลังจากเพิ่มถึงจุดสูงสุด และจากการทดลองของ Ogunbanwo และคณะ (2003) พบว่าการใช้น้ำตาลกลูโคสในปริมาณมากไม่ได้ช่วยให้การผลิตแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น แต่กลับทำให้กิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลงหรือไม่พบกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเลย ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองนี้สำหรับในสูตรอาหารที่มีการลดปริมาณไนโตรเจนลงและเพิ่มปริมาณคาร์บอน (CW 2, CW 3 และ CW 4)

การลดลงของกิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินหลังเซลล์เจริญเข้าสู่ระยะคงที่แล้วเกิดเนื่องมาจากการย่อยสลายแบคเทอริโอซินโดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic degradation) Avonts และคณะ (2004) กล่าวว่าในระหว่างที่เชื้อเกิดการแตกตัวของเซลล์ (cell lysis) จะปลดปล่อยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนที่ไม่มีความจำเพาะออกมา ทำให้มีกิจกรรมของเอนไซม์สลายโปรตีนเพิ่มขึ้นโดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนเหล่านี้จะเข้าไปย่อยสลายแบคเทอริโอซิน ทำให้ปริมาณแบคเทอริโอซินลดลงในช่วงปลายของการหมัก เช่นเดียวกับการทดลองของ Chen และคณะ (1996) พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรติเนสจะเพิ่มขึ้นพร้อมกับการลดลงของปริมาณ leuconosin ซึ่งผลิตจากเชื้อ *Leuconostoc paramesenteroides* นอกจากการถูกทำลายโดยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีนแล้ว การลดลงของแบคเทอริโอซินอาจเกิดจากการดูดซับของแบคเทอริโอซินกับตัวเซลล์ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยรวมถึงการดูดซับอยู่กับโปรตีนที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้ออีกด้วย (Parente *et al.*, 1994) ดังนั้นการเก็บเกี่ยวแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 ควรจะอยู่ในช่วงปลาย log phase

สำหรับสูตรอาหารดัดแปลง CW 1 ที่มีการปรับสัดส่วนน้ำนึ่งปลาทูน่า : น้ำมะพร้าว เป็น 1 : 1 มีปริมาณไนโตรเจนในสูตรอาหาร 2.27% และมีปริมาณคาร์บอนในสูตรอาหาร 1.85% (C/N ratio เป็น 0.81) ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของแบคเทอริโอซินเท่ากับ 20 AU/ml ในชั่วโมงที่ 20 ซึ่งใกล้เคียงกับสูตรอาหารสำเร็จ MRS เนื่องจากปริมาณสัดส่วนของคาร์บอนและไนโตรเจนในสูตรอาหารใกล้เคียงกัน ดังนั้นจึงสามารถนำน้ำนึ่งปลาทูน่าและน้ำมะพร้าวซึ่งเป็นวัสดุเศษเหลือทางการเกษตรมาใช้ในการพัฒนาสูตรอาหารเพื่อการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. casei* ssp. *rhamnosus* SN11 ได้

เอกสารอ้างอิง

ภัทรพล จันทราภรณ์. 2543. สภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดย *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* ที่ถูกตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

Avonts, L., Uytven, V. E. and De Vuyst, L. 2004. Cell growth and bacteriocin production of probiotic *Lactobacillus* strains in different media. Int. Dairy J. 14 : 947-955.

Chen, L., Wang, J. and Levin, R. E. 1996. Effects of benzylpenicillin on glucose utilization, macromolecule synthesis, and cell wall proteins of *Listeria monocytogenes*. Lett. Appl. Microbiol. 22 : 13-15.

Chii-Cherng, L., Ahmed, E.Y., Edward, R.R. and Grady, W.C. 1993. *Pediococcus acidilactici* PO_2 bacteriocin production in whey permeate and inhibition of *Listeria monocytogenes* in foods. J. Food Sci. 58 : 430-434.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1993. Influence of the phosphorus and nitrogen source on nisin production in *Lactococcus lactis* subsp. lactis batch fermentations using a complex medium. Appl. Microbiol. Biotech. 40: 17-22.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1995. Nutritional factors affecting nisin production by *Lactococcus*

lactis subsp. lactis NIZO 22186 in the synthetic medium. J. Appl. Bacteriol. 78 : 28-33.

Hsieh, H.Y., Paik, H.D. and Glatz, B.A. 1996. Improvement of detection and production of propionicin PLG-1, a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. J. Food Prot. 59: 734-738.

Jung, D-S., Bodyfelt, F. and Daeschel, M. 1992. Influence of fat and emulsifiers on the efficiency of nisin in inhibiting *Listeria monocytogenes* in fluid milk. J. Dairy Sci. 75: 387-393.

Kaiser, A. and Montville, T. 1996. Purification of the bacteriocin bavaricin MN and characterization of its mode of action against *Listeria monocytogenes* Scott A cells and lipid vesicles. Appl. Environ. Microbiol. 62: 4529-4535.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. African J. Bio. 2(7): 179-184.

Parente, E. and Hill, C. 1992. A comparison of factors affecting the production of two bacteriocins from lactic acid bacteria. J Appl. Bacteriol. 73: 290-298.

Parente, E., Ricciardi., A. and Addario, G. 1994. Influence of pH on growth and bacteriocin production by *Lactococcus lactis* subsp. lactis 140NWC during batch fermentation. Appl. Microbiol. Biotechnol. 41: 388-394.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Prevalence and biological control of bacteriocin producing psychrotrophic *Leuconostocs* associated with spoilage of vacuum packaged processed meats. J. Food Prot. 57: 209-217.