การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากปลาดุกร้า

Screening of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Dry Fermented Catfish (pla-duk-ra)

ศิรินาถ ศรีอ่อนนวล[1]* และ นพรัตน์ มะเห [2]

Sirinat Srionnual[1]* and Nopparat Mahae [2]

บทคัดย่อ

การศึกษาแบคทีเรียแลกติกในปลาดุกร้าจำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่าปลาดุกร้ามีแบคทีเรียแลกติกในช่วง 10^5- 10^8 CFU/g เมื่อนำแบคทีเรียแลกติก จำนวน 270 ไอโซเลต ที่แยกได้จากปลาดุกร้ามาคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จำนวน 17 สายพันธุ์ โดยวิธีการ agar well diffusion พบว่ามีเชื้อจำนวน 186 ไอโซเลตที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ ทำการคัดเลือกเชื้อ *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายชนิด และมีวงใสในการยับยั้งกว้างไปศึกษาสมบัติของสารยับยั้ง พบว่าสารยับยั้งที่ได้จะสูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จะลดลงเล็กน้อยโดยเอนไซม์คะตาเลส แสดงว่าสารยับยั้งเป็นสารโปรตีน และน่าจะเป็นสารแบคเทอริโอซิน โดยเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 สามารถเติบโตและสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นสามารถทนความร้อนได้ถึง 121 องศาเซลเซียส ระยะ เวลา 15 นาที

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลกติก, ปลาดุกร้า, แบคเทอริโอซิน

---

[1] สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240

[1] Department of Biotechnology, Faculty of Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Srivijaya; Thung Yai, Nakhon Si Thammarat 80240, Thailand.

[2] สาขาอุตสาหกรรมอาหารและผลิตภัณฑ์ประมง คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการประมง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอสิเกา จังหวัดตรัง 92150

[2] Department of Food Industry and Fishery Product, Faculty of Science and Fisheries Technology, Rajamangala University of Technology Srivijaya; Sikao, Trang 92150, Thailand.

* ผู้นิพนธ์ประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): sirinat9@yahoo.com Tel: 08 2430 8651

ABSTRACT

A study on lactic acid bacteria from 27 samples of pla-duk-ra was investigated. It was revealed that the amount of lactic acid bacteria from pla-duk-ra samples were between 10^5-10^8 CFU/g. All of 270 isolated lactic acid bacteria from pla-duk-ra samples were tested for the production of the inhibitory substances against 17 strains of indicator microorganisms by the agar well diffusion method. The results showed that 186 isolates were active against bacterial indicators. Among these, *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 which demonstrated broad inhibitory spectrum and wide inhibitory zone was further selected for their potential antimicrobial activity test. The results indicated that the antimicrobial substance produced by *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 was inactivated when treated with proteolytic enzymes. In addition, the activity of the inhibitory substance slightly decreased when it was subjected to catalase. Then this inhibitory substance was protein and it may be bacteriocin. Maximum cell numbers and activity against the indicator strains of *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 was observed at 35°C. Furthermore, activity of bacteriocin from *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 remained when it was treated at 121°C for 15 minutes.

Key words: lactic acid bacteria, dry fermented catfish (pla-duk-ra), bacteriocin

บทนำ

เทคโนโลยีการหมักเป็นการแปรรูปอาหารที่เป็นที่รู้จักมานาน การหมักนอกจากทำให้อายุการเก็บรักษาของอาหารยาวนานขึ้นแล้ว การหมักยังทำให้อาหารมีความปลอดภัยทางจุลินทรีย์ และทำให้อาหารบางชนิดย่อยได้ง่ายขึ้นด้วย (Caplis and Fitzgerald, 1999) อาหารหมักประเภทปลาจัดเป็นอาหารหมักอีกประเภทหนึ่งที่นิยมบริโภคกันมาก เนื่องจากปลาเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่ดี มีคุณค่าทางโภชนาการสูง จึงทำให้ปลาเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของมนุษย์ (Arslan *et al.,* 2001) กรรมวิธีการหมักผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทปลาโดยทั่วไปจะมีการเติมเกลือลงไปในวัตถุดิบ จากนั้นเอนไซม์จากเนื้อปลาและจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในปลาจะช่วยให้เกิดกระบวนการหมักให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่ต้องการ สำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมักบางประเภทอาจมีการเติมคาร์โบไฮเดรต เช่น ข้าวสุก ข้าวคั่ว ข้าวหมาก หรือ น้ำตาลทรายลงไปด้วยทำให้ได้อาหารหมักที่มีกลิ่นรสต่างๆ ออกไป สำหรับเทคโนโลยีสมัยใหม่ในการหมักสัตว์น้ำซึ่งเรียกว่า biopreservation มีการเติมแบคทีเรียแลกติกลงไปในปลาที่ต้องการหมัก วิธีการนี้เป็นการทำให้เกิดสารยับยั้งจุลินทรีย์จากสิ่งต่างๆ เช่น แบคทีเรียแลกติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และ peptide bacteriocins นอกจากนั้นยังทำให้เกิด nisin ซึ่งมีผลต่อการเก็บรักษา (Alzamora *et al.,* 2000; Ababouch, 2005)

ปลาดุกร้ามีการผลิต และบริโภคกันมากทางภาคใต้ของประเทศไทย โดยเฉพาะในพื้นที่บริเวณลุ่มน้ำ

ทะเลสาบสงขลา ซึ่งครอบคลุมพื้นที่ 3 จังหวัด ได้แก่ สงขลา พัทลุง และนครศรีธรรมราช

(อมรรัตน์ และคณะ, 2552) ผลิตภัณฑ์ปลาดุกร้า มีรสชาติดี เนื้อปลานิ่ม ไม่เละหรือแห้งแข็งเกินไป มีสีเหลืองงาม รสหอม หวาน มัน อร่อย ปราศจากกลิ่นคาว และไม่เค็มจัด การผลิตปลาดุกร้ามีหลายวิธีแตกต่างกันไป เนื่องจากได้รับการถ่ายทอดมาจากครอบครัว ซึ่งพอสรุปขั้นตอนได้โดย นำปลาดุกที่คัดเลือกได้ขนาดแล้วมาตัดส่วนหัวทิ้ง โดยตัดให้ชิดเงี่ยงที่สุด ควักเอาเครื่องในออกทั้งหมดแล้วนำไปล้างจนสะอาด หลังจากนั้นนำเกลือมาผสมกับน้ำตาลทราย ตำเกลือและน้ำตาลให้เข้ากัน แล้วเอาเกลือและน้ำตาลที่ตำผสมกันเสร็จแล้วนี้ใส่ในพุงปลาดุก เรียงปลาดุกในภาชนะหมักเป็นชั้นๆ โรยเกลือและน้ำตาลระหว่างชั้นให้ทั่วถึง หมักไว้ 3 คืน เอาออกมาตาก แดด 3 แดด ก็จะได้ปลาดุกร้าพร้อมใส่ถุงขายได้ (วิมลพรรณ, 2550)

แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลมหรือแท่ง ไม่สร้างสปอร์ เติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำหรือไม่มีออกซิเจน ให้ผลลบต่อการทดสอบ catalase (Klein *et al*., 1998) โดยทั่วไปแล้วพบว่า แบคทีเรียแลกติกผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักคาร์โบไฮเดรต สกุลของแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก คือ *Aerococcus Carnobacterium Enterococcus Lactobacillus Lactococcus Leuconostoc Oenococcus Pediococcus Streptococcus Tetragenococcus Vagococcus* และ *Weissella* (Axelsson, 2004) และพบว่าแบคทีเรียแลกติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก (Oberman, 1985; Batdorj *et al*., 2007) ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก (Hammes *et al*., 1990; Hugas and Monfort, 1997) ผลิตภัณฑ์ผักดอง (Barrangou *et al*., 2002; Tamminen *et al*., 2004) หรือ ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Tanasupawat *et al*., 1998; Arslan *et al*., 2001) บทบาทหนึ่งที่ทำให้แบคทีเรียแลกติกมีความสำคัญในอาหารหมัก คือ แบคทีเรียชนิดนี้ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีอายุการเก็บที่ยาวนานขึ้น เมื่อเทียบกับวัตถุดิบโดยการสร้างสารหลายชนิดที่มีบทบาทในการถนอมอาหาร เช่น กรดแลกติกที่ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลง ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซติล และแบคเทอริโอซิน (Ammor *et al.,* 2006)

แบคเทอริโอซินมีการพบครั้งแรกในแบคทีเรียแกรมลบในปี ค.ศ. 1925 โดยพบว่าเชื้อ *Escherichia coli* V สามารถผลิตสารในกลุ่มโปรตีนออกมายับยั้งการเติบโตของ *Escherichia coli* และเรียกสารยับยั้งนั้นว่า colicins ต่อมามีการค้นพบสารคล้ายโคลิซิน (colicin-like) ที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก จึงเรียกสารโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ได้ว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) (De Vuyst and Vandamme, 1994) โดยพบว่าแบคเทอริโอซินเป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีนที่ผลิตจากไรโบโซม (Jack *et al.,* 1995) และมีฤทธิ์ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน (Klaenhammer, 1993) หรือสามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Coventry *et al*., 1997; Ennahar *et al*., 2000; Garneau *et al.,* 2002) หรือแบคทีเรียแกรมลบ (Ko and Ahn, 2000; Messi *et al*., 2001; Caridi, 2002) โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นไม่เป็นพิษต่อเซลล์ที่ผลิต และพบว่าในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกนั้น แบคทีเรียแลกติกจัด เป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ที่สามารถ

ผลิตสารแบคเทอริโอซินและมีการนำไปใช้ในอาหารได้ ด้วยเหตุนี้จึงมีความน่าสนใจในการสืบหาเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากผลิตภัณฑ์ปลาดุกร้า เพื่อเป็นแนวทางในการนำเชื้อแบคทีเรียแลกติก หรือแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างไปใช้ประโยชน์ในการถนอมอาหารที่มีความปลอดภัยแทนการใช้สารเคมี

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. ตัวอย่างปลาดุกร้า

ตัวอย่างปลาดุกร้าที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกได้จากการซื้อปลาดุกร้าจากจังหวัดในภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช จังหวัดพัทลุง และจังหวัดสงขลา สุ่มตัวอย่างมาจำนวน 27 ตัวอย่าง ทำการศึกษาหาปริมาณของเชื้อแบคทีเรียแลกติก และเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด วัดค่า pH และ ค่าปริมาณร้อยละของเกลือโซเดียมคลอไรด์

2. จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบมีรายชื่อดังต่อไปนี้

: *Lactobacillus sake* TISTR 912
: *Lactobacillus delbrueckii* TISTR 326
: *Lactobacillus curvatus* TISTR 938
: *Lactobacillus casei* TISTR 1500
: *Pseudomonas fluorescens* TISTR 358
: *Staphylococcus aureus* TISTR 1466
: *Escherichia coli* TISTR 780
: *Enterococcus faecium* TISTR 1283
: *Lactobacillus plantarum* TISTR 1465
: *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053
: *Streptococcus lactis* TISTR 457
: *Lactobacillus sakei* JCM 1157
: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212
: *Micrococcus luteus* ATCC 9341
: *Listeria monocytogenes* DMST 17303
: *Salmonella typhi* DMST 22842
: *Streptococcus agalactiae* DMST 17129

3. การแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมัก

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากตัวอย่างปลาดุกร้าโดยดัดแปลงวิธีการของ Chen *et al*. (2006) โดยนำอาหารหมักปริมาณ 10 กรัม มาผสมกับสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 0.85 (0.85% NaCl) ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างโดยวิธี 10 fold-serial dilution จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสมต่อการนับจำนวนเชื้อ แล้วนำไปเกลี่ยลงบนอาหาร 2 สูตรคือ MRS agar ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 1 และ MRS agar ที่เติม $CaCO_3$ ร้อยละ 1 กับ โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 (เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือ เนื่องจากตัวอย่างปลาดุกร้ามีเกลืออยู่ในส่วนผสมด้วย) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะไร้อากาศเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณเชื้อบนจานที่มีโซนใสรอบโคโลนีทั้งหมด และเลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะต่างกันได้แก่ ลักษณะของโคโลนี สี ขนาด ไป restreak บนอาหาร MRS agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ย้อมสีแกรม ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์ คะตาเลส แล้วเลือกเชื้อที่ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ตัวอย่างละ 10 ไอโซเลต มาเก็บในกลีเซอ-รอลความเข้มข้นร้อยละ 15 และเก็บรักษาที่ตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (สมบูรณ์, 2553) เพื่อทำการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

4. การทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (Indicator Microorganisms) ด้วยวิธี agar well diffusion

ทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ตามวิธีการของ Srionnual *et al*. (2007) โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงใน MRS- broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ (เพื่อให้แบคทีเรียแลกติกไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) ทำการหมุนเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกโดยใช้ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปปรับ pH ให้เป็นกลาง จากนั้นดูดส่วนใสปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงหลุมในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารกึ่งแข็ง 4 มิลลิลิตรที่ผสมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ 100 ไมโครลิตร และเททับบนอาหารแข็งปริมาตร 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เป็นเวลา 18 – 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณใส (inhibition zone) รอบ ๆ หลุม (โคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่มีโอกาสจะผลิตสารแบคเทอริโอซิน จะมี inhibition zone รอบๆ โคโลนีนั้น) คัดเลือกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายชนิด หรือยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ดีไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

5. การศึกษาสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซิน

5.1 ทดสอบการถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์คะตาเลส

การศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเอนไซม์คะตาเลสต่อความสามารถของแบคเทอริโอซินในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทำได้โดยนำส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินไปเติมด้วยสารละลายเอนไซม์ proteinase K pepsin trypsin และ catalase ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ต่างๆ เป็น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นจึงนำส่วนใสไปทำลายกิจกรรมของเอนไซม์โดยการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 นาที ก่อนนำส่วนใสไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยใช้วิธี agar well diffusion

5.2 ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและสร้างสารแบคเทอริโอซิน

ทำการถ่ายโอนเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน 100 ไมโครลิตร ที่เลี้ยงข้ามคืนลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 15 20 25 30 35 37 40 และ45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากบ่มเชื้อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และใช้ส่วนใสทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar well diffusion

5.3 ศึกษาการทนต่อความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน

ทำการถ่ายโอนเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน 100 ไมโครลิตรที่เลี้ยงข้ามคืนลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตและสร้างสารแบคเทอริโอซิน เป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ได้จากการหมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้น นำส่วน

ใสที่ผ่านการให้ความร้อนไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar well diffusion

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกและข้อมูลเบื้องต้นด้านเคมีของตัวอย่างปลาดุกร้า

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากตัวอย่างปลาดุกร้าจำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่าแบคทีเรียแลกติกในปลาดุกร้าจากแหล่งต่าง ๆ มีจำนวนตั้งแต่ 10^5 – 10^8 CFU/g มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.15 – 6.73 และปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 5.0 - 13.0 โดยพบเชื้อแบคทีเรียแลกติกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-agar ทั้งที่เติมและไม่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tanasupawat *et al*. (1998) ที่พบว่าผลิตภัณฑ์ปลาหมักชนิดต่าง ๆ ของไทยพบแบคทีเรียแลกติกได้ตั้งแต่ 10^7 – 10^{11} CFU/g ค่า pH อยู่ในช่วง 3–6 และมีค่าปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 3-24 นอกจากนั้น อมรรัตน์ และคณะ (2552) พบว่าค่า pH ของปลาดุกร้าจะลดลงอยู่ที่ 5.14 เมื่อทำการหมักปลาดุกร้าเป็นระยะเวลา 90 วัน โดยแบคทีเรียแลกติกมีบทบาทในการเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตในวัตถุดิบให้เป็นกรดแลกติก ปลาดุกร้าจึงมีค่า pH ลดลง และมีรสชาติเปรี้ยว

เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียจากระดับความเจือจางที่เหมาะสม ของแต่ละตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาดุกร้าจำนวน 10 ไอโซเลตต่อ 1 ตัวอย่าง เพื่อนำไปทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์โดยคัดเลือกโคโลนีที่ผลิตกรดที่มีโซนใสรอบโคโลนีจากการละลาย $CaCO_3$ จากอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 สูตร สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้จำนวน 270 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ข้อมูลด้านเคมีและจุลินทรีย์ของตัวอย่างปลาดุกร้าจากแหล่งต่างๆ

ชื่อตัวอย่าง	แหล่งผลิต (จังหวัด-อำเภอ-ตำบล)	ค่า pH	% NaCl	จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก (CFU/g)	
				อาหาร MRS agar เติม 1% $CaCO_3$	อาหาร MRS agar เติม 1% $CaCO_3$ และ 6% NaCl
PDN-M	นครศรีธรรมราช - เมือง	5.90	8	8.40×10^7	5.04×10^7
PDN-T	นครศรีธรรมราช - ทุ่งใหญ่	6.19	7	8.03×10^7	4.30×10^7
PDN-P	นครศรีธรรมราช - ปากพนัง	6.72	5	1.10×10^7	-
PDN-Ca	นครศรีธรรมราช - ชะอวด	6.19	8	1.25×10^7	1.90×10^7
PDN-J	นครศรีธรรมราช - ฉวาง	6.37	12	4.10×10^7	1.20×10^8
PDN-H	นครศรีธรรมราช - หัวไทร	6.73	9	3.36×10^7	3.13×10^7
PDN-R	นครศรีธรรมราช - ร่อนพิบูลย์	6.40	8	2.04×10^7	3.52×10^7
PDN-S	นครศรีธรรมราช - สิชล	5.84	10	6.40×10^6	1.83×10^7
PDN-Ch	นครศรีธรรมราช - เชียรใหญ่	5.63	5	5.43×10^6	2.97×10^5
PDN-Ta	นครศรีธรรมราช - ถ้ำพรรณรา	5.26	7	1.18×10^7	-
PDP-K-N I	พัทลุง - ควนขนุน - ทะเลน้อย	5.38	7	7.53×10^7	2.45×10^7
PDP-K-N II	พัทลุง - ควนขนุน - ทะเลน้อย	6.45	5	2.22×10^7	-

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ชื่อตัวอย่าง	แหล่งผลิต (จังหวัด-อำเภอ-ตำบล)	ค่า pH	% NaCl	จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก (CFU/g)	
				อาหาร MRS agar เติม 1% $CaCO_3$	อาหาร MRS agar เติม 1% $CaCO_3$ และ 6% NaCl
PDP-K-P	พัทลุง - ควนขนุน - พนางตุง	5.43	6	1.35×10^7	-
PDP-K-T	พัทลุง - ควนขนุน - โตนดด้วน	5.81	10	4.58×10^7	2.61×10^7
PDP-K-L	พัทลุง - ควนขนุน - แหลมโตนด	5.83	7	1.03×10^8	8.16×10^6
PDP-K-K	พัทลุง - ควนขนุน - ควนขนุน	5.41	6	9.43×10^6	3.18×10^7
PDP-M	พัทลุง - เมือง	6.21	11	1.46×10^6	4.76×10^5
PDP-Pb	พัทลุง - ป่าบอน	6.29	13	7.55×10^7	2.61×10^8
PDP-Pp	พัทลุง - ป่าพะยอม	6.15	10	8.10×10^6	2.34×10^7
PDP-T	พัทลุง - ตะโหมด	5.91	10	1.39×10^7	1.52×10^7
PDP-K	พัทลุง - เขาชัยสน	6.05	9	3.89×10^6	2.84×10^6
PDS-K	สงขลา - ควนเนียง	5.93	10	2.58×10^6	3.11×10^6
PDS-J	สงขลา - จะนะ	5.61	6	2.94×10^6	3.69×10^6
PDS-S	สงขลา - สทิงพระ	5.15	6	2.12×10^6	-
PDS-G	สงขลา - กระแสสินธุ์	6.29	11	2.36×10^6	4.38×10^6
PDS-M	สงขลา - เมือง	5.96	10	3.84×10^6	3.12×10^6
PDS-R	สงขลา - ระโนด	6.04	9	2.21×10^6	-

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียจำนวน 270 ไอโซเลต ไปทดสอบการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ จำนวน 17 สายพันธุ์ โดยเป็นเชื้อแบคทีเรียแลกติก 11 สายพันธุ์ และแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสียและทำให้เกิดโรคจำนวน 6 สายพันธุ์ ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากปลาดุกร้าจำนาน 270 ไอโซเลต มี 186 ไอโซเลตที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ (ไม่ได้แสดงข้อมูล) หลังจากนั้นทำการคัดเลือกไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งอีกครั้ง แต่เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกส่วนใหญ่ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งไม่คงตัว โดยบางไอโซเลตให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ลดลงอย่างมาก ยกเว้นเชื้อแบคทีเรีย PDN-Ta10 ซึ่งแยกได้จากตัวอย่างปลาดุกร้าจากจังหวัดนครศรีธรรมราช อำเภอถ้ำพรรณรา ที่แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายสายพันธุ์ ทั้งแบคทีเรียแลกติก และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค นอกจากนั้นยังมีวงใสในการยับยั้งกว้าง (ตารางที่ 2) ซึ่งถ้าการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เกิดจากสารแบคเทอริโอซินก็จะมีกลไกในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยทั่วไปมักทำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของกรดอะมิโนและไอออน รวมทั้ง ATP ภายในเซลล์ (Abee *et al.*, 1995) จึงคัดเลือกเชื้อ PDN-Ta10 ไปเทียบเคียงชนิดของเชื้อ และศึกษาสมบัติของสารยับยั้งต่อไป โดยใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus*

ตารางที่ 2 ผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PDN Ta10

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	ความกว้างของวงใสการยับยั้ง (mm.)
Lactobacillus sake TISTR 912	
Lactobacillus delbrueckii TISTR 326	-
Lactobacillus curvatus TISTR 938	-
Lactobacillus casei TISTR 1500	-
Lactobacillus plantarum TISTR 465	-
Lactobacillus sakei JCM 1157	-
Pseudomonas fluorescens TISTR 358	-
Staphylococcus aureus TISTR 1466	16
Escherichia coli TISTR 780	28
Enterococcus faecium TISTR 1283	-
Leuconostoc mesenteroides TISTR 053	-
Streptococcus lactis TISTR 457	28
Micrococcus luteus ATCC 9341	10
Enterococcus faecalis ATCC 29212	10
Streptococcus agalactiae DMST 17129	14
Salmonella typhi DMST 22842	-
Listeria monocytogenes DMST 17303	18

TISTR 1466 และ *Entercoccus faecalis* ATCC 29212 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เนื่องจากสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกแสดงวงใสที่ชัดเจนและกว้างในการยับยั้ง นอกจากนี้เชื้อ *Staphylococcus aureus* ยังเป็นเชื้อแบคทีเรียที่ทนกรดจึงมีความเหมาะสมที่จะนำมาเป็นเชื้อทดสอบการถูกยับยั้งโดยสารที่ไม่ใช่กรดอินทรีย์ (Bore *et al*., 2007) (สำหรับเหตุผลที่ไม่เลือกเชื้อ *Escherichia coli* TISTR780 หรือ *Streptococcus lactis* TISTR 457 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เนื่องจากวงใสการยับยั้งไม่ชัดเจน)

จากการเทียบเคียงชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PDN-Ta10 พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส มีรูปร่างกลม เมื่อนำผลวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16S rDNA แบบ full length 1500 base pair ของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PDN-Ta10 เปรียบเทียบกับลำดับเบสที่อยู่ใน nr database โดยใช้โปรแกรม BLAST พบว่า ลำดับเบสของ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PDN-Ta10 มีลำดับเหมือนกับ *Enterococcus faecium* ซึ่งมีความเหมือนเท่ากับ 99% และได้ deposit DNA ที่หาลำดับเบสใน DDBJ/EMBL/Genbank โดยแบคทีเรียแลกติก *Enterococcus faecium* PDN-Ta 10 มี accession number คือ AB819042

3. การศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารแบคเทอริโอซิน

3.1 ทดสอบผลของเอนไซม์ต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

การศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความสามารถ

ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 ในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยการนำแบคเทอริโอซินไปเติมด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ proteinase K, pepsin และ trypsin และเอนไซม์ catalase นำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar well diffusion ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ proteinase K, pepsin และ trypsin ส่วนเอนไซม์ catalase มีผลให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อลดลงเล็กน้อย เช่นเดียวกับการทดลองของ Srionnual *et al.* (2007) ที่พบว่า สารแบคเทอริโอซิน Weissellicin 110 ที่ผลิตจากเชื้อ *Weissella cibaria* 110 ที่แยกได้จากปลาส้ม ถูกทำลายความสามารถในการยับยั้งด้วยเอนไซม์ proteinase K และ trypsin ส่วนเอนไซม์ catalase ทำให้ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ลดลงเล็กน้อย การที่ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แต่ไม่ถูกทำลายโดยเอนไซม์ catalase แสดงว่าสารยับยั้งนั้นเป็นสารโปรตีน และไม่ใช่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน (Jack *et al*., 1995 ; Todorov and Dicks, 2005; Parada *et al*., 2007)

3.2 ทดสอบผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและสร้างสารแบคเทอริโอซิน

การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและสร้างสารแบคเทอริโอซินโดยการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 15 20 25 30 35 37 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นเวลาที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่สามารถเติบโตและสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ดี (Srionnual *et al*., 2007; Karthikeyan and Santosh, 2009; Taheri *et al*., 2012) หลังจากบ่มเชื้อทำการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และใช้ส่วนใสทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar well diffusion ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Enterococcus faecium* PDN-Ta 10 สามารถเติบโตและสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส โดยการศึกษาเกี่ยวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกพบว่า ส่วนมากแบคทีเรียแลกติกมีการสร้างสารแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส (Chikindas *et a*l., 1993; Juarez Tomas *et al*., 2002)

3.3 การทนต่อความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน

การศึกษาผลของการทนต่อความร้อนของสารแบคเทอริโอซินโดยนำสารแบคเทอริโอซินไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำสารแบคเทอริโอซินที่ผ่านการให้ความร้อนไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar well diffusion ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 โดยพบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 สามารถทนความร้อน 121 องศาเซลเซียส ได้นาน

15 นาที เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน ซึ่งสารแบคเทอริโอซินที่ทนความร้อนสูงได้สามารถนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในอาหารที่ผ่านการแปรรูปโดยใช้ความร้อน ทำให้ลดการใช้ความร้อนเพื่อทำลายเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร จึงช่วยรักษาคุณค่าของสารอาหาร และวิตามินในอาหารไว้ได้ (อรอนงค์, 2550)

ตารางที่ 3 สมบัติเบื้องต้นของสารแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

สภาวะ	ค่า OD_{660} ของเชื้อ *Enterococcus faecium* PDN-Ta10	ความกว้างของวงใสการยับยั้ง (mm.)	
		S. aureus TISTR 1466	*Ent. faecalis* ATCC 29212
Growth temperature (°C)			
15	0.457	-	-
20	0.782	10	10
25	1.738	12	14
30	2.204	12	14
35	2.373	14	16
37	2.272	12	16
40	2.055	12	12
45	1.114	-	-
Treatment with enzymes			
Control		14	12
Proteinase K		-	-
Pepsin		-	-
Trypsin		-	-
Catalase		12	9
Heat			
Control		18	18
80°C, 30 min.		12	18
90°C, 30 min.		12	18
100°C, 30 min.		12	18
110°C, 15 min.		12	18
121°C, 15 min.		12	18

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์ปลาดุกร้าจำนวน 27 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกในช่วง 10^5 – 10^8 CFU/g โดยผลิตภัณฑ์ปลาดุกร้ามีค่า pH 5.15 – 6.73 และปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์มีค่าตั้งแต่ ร้อยละ 5.0 – 13.0 เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 270 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่ยับยั้งเชื้อทดสอบจำนวน 186 ไอโซเลต คัดเลือกเชื้อ *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายชนิดและมีวงใสการยับยั้งกว้างไปศึกษาสมบัติของสารยับยั้ง พบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Staphylococcus aureus* TISTR 1466 และ *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 ของสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 ถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน proteinase K pepsin และ trypsin ส่วนเอนไซม์ catalase มีผลให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อลดลง แสดงว่าสารยับยั้งนั้นเป็นสารโปรตีน และไม่ใช่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเติบโตและสร้างสารแบคเทอริโอซิน พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติก *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 สามารถเติบโตและสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ส่วนการศึกษาผลของการทนต่อความร้อนของสารแบคเทอริโอซิน พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Enterococcus faecium* PDN-Ta10 สามารถทนความร้อน 121 องศาเซลเซียส ได้นาน 15 นาที ดังนั้นแบคเทอริโอซินที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค และสามารถทนความร้อนสูงได้ จึงมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในอาหารที่ผ่านการแปรรูปโดยใช้ความร้อนได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย ในการให้ทุนสนับสนุนการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

วิมลพรรณ กุลัตถ์นาม. 2550. ปลาดุกร้า: สินค้าคุณภาพจากบ้านลุงช่วง. แหล่งที่มา: http://www.gotoknow.org/ posts/149165, 2 เมษายน 2556.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. 2553. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์.** สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

อมรรัตน์ ถนนแก้ว, ถาวร จันทโชติ, วราภรณ์ เรืองรัตน์ และ อารีรัตน์ อักษรเนียม. 2552. องค์ประกอบทางเคมีและอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาดุกร้าในจังหวัดพัทลุง, น. 54-58. *ใน* **รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยขอนแก่น "การพัฒนาชนบทที่ยั่งยืน"** มหาวิทยาลัยขอนแก่น, ขอนแก่น.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. 2550. แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติก. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว.** 23(2): 145-160.

Ababouch, L. 2005. Preservation techniques. FAO Fisheries Technical paper No 160. FIIM/T160. FAO. Rome.

Abee, T., Krockel, L. and Hill, C. 1995. Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. **International Journal of Food Microbiology** 28: 169 -185.

Alzamora, S.M., Tapia, M.S. and Lopez-Malo, A. 2000. Minimally Processed Fruits and Vegetables: Fundamental aspects and applications. gaithersburg, Md.: Aspen.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1 – screening and characterization of the antibacterial compounds. **Food Control** 17: 454-461.

Arslan, A., Dincoglu, A.H. and Gonulalan, Z. 2001. Fermented *Cyprinus carpio* L. sausage. **Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences** 25: 667-673.

Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, pp. 1-66. *In* Salminen, S., von Wright,

and Ouwehand, A., eds. **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Functional Aspects**. Marcel Dekker, Inc. New York.

Barrangou, R., Yoon, S. –S., Breidt, F.Jr., Fleming, H.P. and Klaenhammer, T.R. 2002. Identification and characterization of *Leuconostoc fallax* strains isolated from an industrial sauerkraut fermentation. **Applied and Environmental Microbiology** 68: 2877-2884.

Batdorj, B., Trinetta1, V., Dalgalarrondo1, M., Pre´vost, H., Dousset, X., Ivanova, I., Haertle´, T. and Chobert, J. -M. 2007. Isolation, taxonomic identification and hydrogen peroxide production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* T31, isolated from Mongolian yoghurt: inhibitory activity on food-borne pathogens. **Journal of Applied Microbiology** 103: 584-593.

Bore, E., Langsrud, S., Langsrud, O., Rode, T. M. and Holck, A. 2007. Acid-shock response in *Staphylococcus aureus* investigated by global gene expression analysis. **Microbiology** 153(7): 2289-2308.

Caridi, A. 2002. Selection of *Escherichia coli* – inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology** 29: 303–308.

Caplis, E., and Fitzgerald, G. F. 1999. Food fermentations : role of microorganisms in food production and preservation. **International Journal of Food Microbiology** 50: 131-149.

Chen, Y.–S., Yanagida, F. and Hsu, J.–S. 2006. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from *doch*i (fermented black beans), a traditional fermented food in Taiwan. **Letters in Applied Microbiology** 43: 229 - 235.

Chikindas, M.L., Garcia-Garcera, M.J. Driessen, A.J.M., Ledeboer, A.M., Nissen-Meyer, J., Nes, I.F., Abee, T., Konings, W.N. and Venema, G. 1993. **Applied and Environmental Microbiology** 59: 3577 -3584.

Coventry, M.J., Gordon, J.B., Wilcock, A., Harmark, K., Davidson, B.E., Hickey, M.

W., Hillier, A. J. and Wan J. 1997. Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from food and comparison with pediocin and nisin. **Journal of Applied Microbiology** 83: 248–258.

De Vuyst, L., and Vandamme, A.J. 1994. Lactic acid bacteria and bacteriocins : Their practical importance, pp. 1-11. *In* De Vuyst, L. and Vandamme, E.J., eds**. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.** Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 2000. Class IIa bacteriocins: biosynthesis, structure and activity. **FEMS Microbiology Reviews** 24: 85–106.

Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas, J.C. 2002. Two - peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **Biochimie** 84: 577–592.

Hammes, W.P., Bantleon, A. and Min, S. 1990. Lactic acid bacteria in meat fermentation. **FEMS Microbiology Letters** 87: 165 – 173.

Hugas, M. and Monfort, J.M. 1997. Bacterial starter cultures for meat fermentation. **Food Chemistry** 59: 547-554.

Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B. 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. **Microbiological Reviews** 59: 171-200.

Juarez Tomás, M.S., Bru, E., Wiese, B., De Ruiz Holgado, A.A.P., Nader-Macías, M.E. 2002. Influence of pH, temperature and culture media on the growth and bacteriocin production by vaginal *Lactobacillus salivarius* CRL 1328. **Journal of Applied Microbiology** 93: 714-724.

Karthikeyan, V. and Santosh, S.W. 2009. Study of bacteriocin as a food preservative and the *L. acidophilus* strain as probiotic. **Pakistan Journal of Nutrition** 8: 335-340.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews** 12: 39–85.

Klein, G., Pack, A., Bonaparte, C. and Reuter, G. 1998. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology** 41: 103-125.

Ko, S -H., and Ahn, C. 2000. Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA 2386 isolated from white kimchi. **Food Science and Biotechnology** 9: 263–269.

Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R. and Manicardi, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. **International Journal of Food Microbiology** 64: 193–198.

Oberman, H. 1985. Fermented milks. pp. 167-196. *In* Wood, B.J.B., eds. **Microbiology of Fermented Foods, Vol 1**. Elsevier Applied Science Publishers, London and New York.

Parada, J.L., Caron, C.R., Mediros, A.B., Soccol, C.R. 2007. Bacteriocins from lactic acid bacteria: purification, properties and use as biopreservatives. **Brazilian Archives of Biology and Technology** 50: 521-542.

Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L.H., Hsiao, K.N. and Chen, Y. 2007. Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from Plaa-Som, a fermented fish product from Thailand. **Applied and Environmental Microbiology** 73: 2247-2250.

Taheri, P., Samadi, N., Ehsani, M.R., Khoshayand, M.R. and Jamalifar, H. 2012. An evaluation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ST1 isolated from goat milk. **Brazilian Journal of Microbiology** 43: 1452-1462.

Tamminen, M., Joutsjoki, T., Sjoblom. M., Joutsen, M., Palva, A., Ryhanen, E.L. and Joutsjoki, V. 2004. Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA. **Letters in Applied Microbiology** 39: 439-444.

Tanasupawat, S., Okada, S. and Komagata, K. 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. **Journal of General and Applied Microbiology** 44: 193-200.

Todorov, S.D. and Dicks, L.M. T. 2005. Effect of growth medium on bacteriocin production by *Lactobacillus plantarum* ST194BZ, a strain isolated from boza. **Food Technology and Biotechnology** 43: 165-173.