ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินจากไส้กรอกอีสานเพื่อยับยั้ง *Staphylococcus aureus Bacilus cereus* และ *Escherichia coli*

Selection of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Thai Sausages for Inhibition of *Staphylococcus aureus, Bacilus cereus* and *Escherichia coli*

สุดสายชล หอมทอง*
Sudsaichon Homthong
ศศิวิมล ภูขันซ้าย**
Sasiwimol Pukhunsai

Received : May 3, 2023
Revised : September 5, 2023
Accepted : October 6, 2023

บทคัดย่อ

วัตถุประสงคของงานวิจัยนี้เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารแบคทีริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในอาหารที่คัดเลือกไดจากไส้กรอกอีสาน โดยสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก 24 ไอโซเลท ได้จากไส้กรอกอีสานจานวน 10 ตัวอย่าง บริเวณรอบมหาวิทยาลัยบูรพา เมื่อนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบคือ *Escherichia coli* ATCC 25992 , *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Bacillus cereus* ATCC 255922 โดยวิธี Agar well diffusion พบว่ามี 8 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบโดย 7 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *B. cereus* และอีก 1 ไอโซเลท สามารถยับยั้ง *B. cereus* ได้ การทดสอบส่วนใสปราศจากเซลล์ที่ได้จาก 8 ไอโซเลท กับเอนไซม์ Proteinase พบว่าส่วนใสปราศจากเซลล์ถูกยับยั้งแสดงว่าสารยับยั้งคือโปรตีนและอาจจะเป็นแบคเทอริโอซิน โดยพบว่าแบคเทอริโอซินที่ได้จากไอโซเลท SV10-I21 และ SV10-I24 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส 10 นาที

คำสำคัญ : ไส้กรอกอีสาน / แบคทีเรียกรดแลคติก / แบคเทอริโอซิน/ *Staphylococcus aureus* / *Bacillus cereus* / *Escherichia coli*

*อาจารย์ประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Lecturer in Department of Microbiology Faculty of Science Burapha University(Corresponding Author)
e-mail: sudsaich@buu.ac.th
**นักศึกษาประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
Student of the Department of Microbiology Faculty of Science Burapha University

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

ABSTRACT

The objective of this research was to screen lactic acid bacteria that could produce bacteriocins with the ability to inhibit pathogenic bacteria in food obtained from Thai sausages. Twenty four lactic acid bacteria were isolated from 10 samples of Thai sausages nearby Burapha University, Chonburi Province and these isolates were screened for inhibition of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923*, Bacillus cereus* ATCC 255922 and *Escherichia coli* ATCC 25992 by agar well diffusion assay test. Eight isolates displayed antimicrobial activity (7 isolates) inhibited growth of *S. aureus* and *B. cereus*, whereas 1 isolate inhibited growth of *B. cereus*. Antimicrobial substance produced by 8 isolates were inactivated when treated with proteolytic enzymes. Then this inhibition substance was protein and it may be bacteriocin. Bacteriocin produced by SV10-I21 and SV10-I24 isolates were found to be heat resistant at 95 ^{O}C for 10 minutes

Keywords : Thai Sausage / Lactic Acid Bacteria / Bacteriocin / *Staphylococcus aureus* / *Bacillus cereus* / *Escherichia coli*

บทนำ

อุตสาหกรรมอาหารได้นำวัตถุกันเสียมาใช้เพื่อลดปัญหาและยืดอายุอาหาร (ดวงจันทร์, 2551) และจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารที่นอกจากจะเป็นสาเหตุให้อาหารเน่าเสียบางชนิดยังสามารถก่อโรคทางเดินอาหารได้อีกด้วยยกตัวอย่างเช่น *Staphylococcus aureus* ซึ่งสร้างสารพิษเอนเทอโรทอกซินปนเปื้อนในอาหาร สารพิษนี้มีคุณสมบัติพิเศษ คือ ทนต่อความร้อนได้ดีมาก การให้ความร้อนถึงแม้จะทำลายตัวเชื้อ แต่จะไม่สามารถทำลายสารพิษของเชื้อนี้ได้ การกำจัดสารพิษของเชื้อนี้ให้หมดไปต้องใช้ความร้อนที่สูงมากและเป็นเวลานาน (ศนิ, 2560) และยังมีรายงานว่าพบผู้ป่วยติดเชื้อ *Escherichia coli* O104:H4 ในทวีปยุโรป รวมทั้งสิ้น 2,763 ราย (ธีรพัฒน์, 2554) ในการผลิตเนื้อสัตว์แปรรูปผู้ผลิตนิยมใส่ กรดเบนโซอิกและกรดเบนโซเอต ที่มีความเป็นพิษระดับปานกลาง ถ้าได้รับในปริมาณที่สูงมากอาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย อาการเลือดตกใน อัมพาตทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของตับและไตลดลงหรืออาจส่งผลถึงขั้นพิการได้และถ้าได้รับเกิน 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัมอาจเสียชีวิตได้ (สุวีณา, 2557)

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ตระหนักถึงอันตรายจากสารกันเสียและต้องการอาหารที่ปราศจากสารเคมีเจือปนส่งผลให้ผู้ผลิตหรือโรงงานอุตสาหกรรมหันมาสนใจวิธีการทางธรรมชาติคือการใช้จุลินทรีย์เช่นการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกและการใช้แบคเทอริโอซินที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก (Ananou, 2007) แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เป็นพวก microaerophilic หรือ facultatively anaerobe และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ทนกรด และต้องการสารอาหารซับซ้อนเพื่อใช้ในการเจริญ สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักอาหารอย่างแพร่หลายเนื่องจากจัดเป็นแบคทีเรียที่ยอมรับว่าปลอดภัย (Generally Recognized as Safe : GRAS) และสามารถผลิต

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

สารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น แบคเทอริโอซิน กรดแลคติกไดอะเซทิล และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น (Schillinger, et al, 1996) แบคเทอริโอซินคือเปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซมและมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัส (Carlos, et al., 2021) แบคทีริโอซินแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ คือแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน (อรอนงค์, 2550) แบคเทอริโอซินมีบทบาทในทางควบคุมความปลอดภัยในอาหารคือการใช้แบคเทอริโอซินบริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนใช้เติมเป็นส่วนหนึ่งในส่วนประกอบอาหาร (Deegan, et al., 2006) แบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่เพิ่งประสงค์หลายชนิด เช่น *Bacillus, Enterococcus, Listeria, Clostridium* และ methicillin-resistant *S. aureus* (Klaenhammer, 1993; Yaacob, et al., 2022) ในงานศึกษาก่อนหน้านี้ได้มีการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจากอาหารหมักได้ 464 สายพันธุ์และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกรหัส L459 สามารถยังยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคได้ดีที่สุดและแบคทีเรียกรดแลคติกรหัส L.13 สามารถยับยั้งการเน่าเสียในขนมจีนเส้นสดได้ (คณิณ, 2561)

งานวิจัยที่เกี่ยวกับการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักมีผู้รายงานไว้มากมายพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากอาหารหมักมีสายพันธุ์แตกต่างกันและสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารได้ ดังรายงานของ ผุศดี และคนอื่นๆ (2559) ที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่น แหนม และไส้กอรกอีสาน ได้ถึงจำนวน 26 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคอาหาร เป็นพิษทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. monocytogenes*, *S.* Typhimurium, *S. aureus* และ *E. coli* นอกจากนี้ยังพบว่า แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ได้เป็นจำนวน 42 และ 36 ไอโซเลท ตามลำดับ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจเลือกไส้กรอกอีสานซึ่งเป็นอาหารพื้นบ้านไทย ทางภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทยซึ่งหาได้ง่ายในทุกภูมิภาคมาทำการศึกษา ซึ่งไส้กรอกอีสานผลิตจากเนื้อหมูบด มันหมู และข้าวเจ้าหุงสุก ปรุงรสด้วยเกลือ เครื่องเทศสมุนไพร ผสมให้เข้ากันบรรจุใส่ไส้หมูแล้วมัดด้วยเชือกเป็นข้อ ปล่อยไว้ให้เกิดการหมักซึ่งจะเกิดแบคทีเรียกรดแลคติกขึ้นขณะหมักหลายชนิด ในโครงงานวิจัยนี้จึงทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้าง แบคเทอริโอซินที่คัดแยกได้จากไส้กรอกอีสาน จากนั้นทำการศึกษาความสามารถของแบคทีริโอซินในการยับยั้ง *S. aureus, B. cereus* และ *E. coli* เพื่อนำไปประยุกต์เป็นหัวเชื้อในการหมักอาหารและใช้ในการยืดอายุอาหารสำหรับควบคุมการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินจากไส้กรอกอีสาน

1.1 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสานจากร้านขายแผงรอยบริเวณรอบมหาวิทยาลัยบูรพา จำนวน 10 ตัวอย่าง โดยทำการเก็บใส่ถุงปราศจากเชื้อ จากนั้นนำมายังห้องปฏิบัติการและดำเนินการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากไส้กรอกอีสาน (ดัดแปลงจาก ศิรินาถ, 2556)

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

นำไส้กรอกอีสานจากร้านขายแผงรอยบริเวณรอบมหาวิทยาลัยบูรพาจำนวน 10 ตัวอย่าง โดยทำการชั่งตัวอย่าง ตัวอย่างละ 25 กรัมจากนั้นเติมอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth ปริมาตร 225 มิลลิลิตรตีบดตัวอย่างให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีบดอาหารด้วยความเร็วเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำการเจือจางให้ได้ความเจือจางที่ 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ด้วย 0.85% NaCl หลังจากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางแล้วมา 0.1 มิลลิตร Spread บน MRS agar ที่เติม 0.5% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่คาดว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกทำการขีดบนอาหาร MRS agar บ่มที่อุณภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาะวะไร้ออกซิเจน จากนั้นเลือกโคโลนีที่มีความแตกต่างกันนำไปขีดลงบนอาหาร MRS agar 1-2 ครั้งเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์พร้อมจดรหัสไอโซเลทของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

2. ศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ

2.1 ตรวจลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

โดยการนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยว นำไปย้อม สีแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สังเกตการติดสี รูปร่างเซลล์ การสร้างสปอร์ การจัดเรียงตัวเรียงตัวของเซลล์ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกติดสีย้อมสีม่วงคริสตัลไวโอเลตมีลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เซลล์มีรูปร่างแท่งและกลม ไม่สร้างสปอร์

2.2 การทดสอบปฏิกิริยาคะตาเลส (Catalase test)

ทดสอบโดยใช้ 3% H_2O_2 ลงบนแผ่นสไลด์ที่ฆ่าเชื้อแล้ว จากนั้นนำไม้แหลมที่ฆ่าแล้วแตะเชื้อจากโคโลนีมาเล็กน้อยผสมเข้ากับหยด 3% H_2O_2 แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงทันที โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะให้ผลเป็นลบไม่เกิดฟองก๊าซ

เก็บรักษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติมสารละลาย 20% glycerol ที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 ^{O}C

3. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน (ดัดแปลงจาก Pringsulaka, et al., 2011)

3.1 การเตรียมสารสกัดส่วนใสปราศจากเซลล์ (Cell free supernatant)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลทที่คัดแยกได้มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง 8,000 rpm ที่ 4 °C 10 นาที เพื่อแยกเซลล์ออกจากนั้นนำส่วนใสปราศจากเซลล์ปรับ pH เป็น pH 6.5 ด้วย HCl หรือ 5 M NaOH จากนั้นนำมากรองโดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร

3.2 การเตรียมแบคทีเรียทดสอบ

S. aureus, *B. cereus* และ *E. coli* จากภาควิชาจุลชีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา เลี้ยงในอาหาร Trypticase soy broth (TSB) 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35° C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี Agar well diffusion นำเชื้อ *S. aureus*, *E. coli* และ *B. cereus* จากข้อ 3.2 ทำการป้ายเชื้อลงในจานอาหาร Trypticase

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

Soft soy agar (TSA) โดยเจือจางให้ได้แบคทีเรียความเข้มข้น 10^8 CFU/ml 1 ชนิดต่อ 1 จาน จากนั้นใช้แท่งเหล็กที่มีรูปราศจากเชื้อ (Cork-borers) เจาะรูเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร และ ปิเปตส่วนใสปราศจากเซลล์จากข้อ 3.1 มา 50 ไมโครลิตรถ่ายลงหลุมที่เจาะแล้วนำไปบ่มที่ 37 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ สังเกตการเกิดบริเวณใสรอบๆ หลุมและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)

4. การทดสอบยืนยันว่าสารยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นโปรตีน (นภดล และคนอื่นๆ, 2554)

นำส่วนใสปราศจากเซลล์จากข้อ 3.1 มา 10 มิลลิลิตร ทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน Proteinase K ความเข้มข้น 1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่ 37 ^{O}C เป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นนำไปทดสอบ antibacterial activity ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยนำเชื้อ *S. aureus*, *B. cereus* และ *E. coli* จากข้อ 3.2 ทำการ swab ลงบนอาหาร TSA โดยเจือจางให้ได้แบคทีเรียความเข้มข้น 10^8 CFU/ml 1 ชนิดต่อ 1 จาน จากนั้นใช้ Cork-borers ปราศจากเชื้อเจาะรูเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิตรเมตร และนำส่วนใสปราศเซลล์ที่ผ่านการบ่ม 2 ชั่วโมง มา 50 ไมโครลิตรถ่ายลงหลุมที่เจาะแล้วนำไปบ่มที่ 37 ^{O}C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณใสรอบๆหลุม และเปรียบเทียบกับส่วนใสปราศจากเซลล์ที่ไม่ใส่เอนไซม์ Proteinase K ซึ่งเป็นชุดควบคุม โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

5. การทดสอบการทนความร้อนของแบคเทอริโอซิน (สมใจ และคนอื่นๆ, 2550)

นำส่วนใสปราศจากเซลล์จากข้อ 3.1 มา 10 มิลลิลิตร นำมาให้ความร้อนที่ 95^{O}C เป็นเวลา 10 และ 30 นาที จากนั้นนำไปทดสอบ antibacterial activity ด้วยวิธี Agar well diffusion โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากไส้กรอกเปรี้ยว

จากการเก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสานจำนวน 10 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตกรดแลคติกซึ่งสังเกตได้จากการเห็นวงใสรอบโคโลนีโดยใช้ 0.5 % $CaCO_3$ MRS agar และนำเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดได้ไปทดสอบด้วยการย้อมแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส และออกซิเดส พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและ ออกซิเดส ทั้งหมด 24 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างท่อนสั้น 10 ไอโซเลท ท่อนยาว 3 ไอโซเลท ท่อนสั้นรูปไข่ 1 ไอโซเลท และทรงกลม 10 ไอโซเลท แสดงดังตารางที่ 1

2. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion

เมื่อนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus, B. cereus* และ *E. coli* จะพบการเกิดบริเวณใสรอบๆ หลุมและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มี inhibition zone โดยพบว่ามี 8 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ คือ SV9-I17 ยับยั้ง *B. cereus* ขณะที่ไอโซเลท SV9-I18, SV10-I19, SV10-I20, SV10-I21, SV10-I22, SV10-I23 และ SV10-I24 ยับยั้ง *S. aureus* และ *B. cereus* ดังแสดงในตารางที่ 1

3. การทดสอบยืนยันว่าสารยับยั้งที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นโปรตีน

คัดเลือกส่วนใสปราศจากเซลล์ของเชื้อไอโซเลท SV9-I17, SV9-I18, SV10-I19, SV10-I20 SV10-I21, SV10-I22S, V10-I23 และ SV10-I24 มาทำการทดสอบกับเอนไซม์ Proteinase K โดยให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 mg/ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C ก่อนนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

S. aureus, B. cereus และ *E. coli* ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าส่วนใสปราศจากเซลล์จากไอโซเลท SV9-I17, SV9-I18, SV10-I20, SV10-I21, SV10-I22, SV10-I23 และ SV10-I24 เป็นโปรตีนเนื่องจากจะไม่ยับยั้งเชื้อทดสอบ ซึ่งคาดว่าน่าจะเป็นแบคเทอริโอซิน ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 1 จำนวนไอโซเลท รูปร่าง และความสามารถในการผลิตสารยับยั้ง *S. aureus, B. cereus* และ *E. coli* เมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion

ตัวอย่างที่	จำนวนไอโซเลท	รูปร่าง	รหัสเชื้อ	Inhibition zone (mm) Mean ± SD		
				S. aureus	*B. cereus*	*E. coli*
1	-	-	-	-	-	-
2	-	-	-	-	-	-
3	9	ทรงกลม	SV3-I1	-	-	-
		ทรงกลม	SV3-I2	-	-	-
		ทรงกลม	SV3-I3	-	-	-
		ทรงกลม	SV3-I4	-	-	-
		ทรงกลม	SV3-I5	-	-	-
3		ทรงกลม	SV3-I6	-	-	-
		ทรงกลม	SV3-I7	-	-	-
		ทรงกลม	SV3-I8	-	-	-
		ทรงกลม	SV3-I9	-	-	-
4	-	-	-	-	-	-
5	2	ท่อนสั้น	SV5-I10	-	-	-
		ท่อนยาว	SV5-I11	-	-	-
6	-	-	-	-	-	-
7	2	ท่อนสั้น	SV7-I12	-	-	-
		ท่อนสั้น	SV7-I13	-	-	-
8	2	ท่อนสั้น	SV8-I14	-	-	-
		ท่อนสั้น	SV8-I15	-	-	-

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ตัวอย่างที่	จำนวนไอโซเลท	รูปร่าง	รหัสเชื้อ	Inhibition zone (mm) Mean± SD		
				S. aureus	*B. cereus*	*E. coli*
9	3	ท่อนสั้น	SV9-I16	-	-	-
		ท่อนยาว	SV9-I17	-	12.2±0.26	-
		ท่อนสั้น	SV9-I18	11.1±0.26	13.0±0.17	-
10	6	ท่อนสั้น	SV10-I19	14.3±0.3	15.1±0.26	-
		ท่อนสั้น	SV10-I20	9.1±0.1	9.2±0.1	-
		ท่อนยาว	SV10-I21	12.3±0.26	13.3±0.1	-
		ท่อนสั้นรูปไข่	SV10-I22	1.11±0.3	10.2±0.2	-
		ท่อนสั้น	SV10-I23	12.2±0.2	8.1±0.17	-
		ทรงกลม	SV10-I24	15.0±0.4	14.3±0.3	-

4. การทดสอบการทนความร้อนของแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำส่วนใสปราศจากเซลล์ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 และ 30 นาที และนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *B. cereus* โดยวิธี agar well diffusion พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิ 95 ^{O}C เป็นเวลา 10 นาที ไอโซเลท SV10-I23 มีกิจกรรมยับยั้ง *B. cereus* ATCC 255922 เพียงชนิดเดียวและ ไอโซเลท V10-I21, SV10-I24 มีกิจกรมยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* ATCC 255922 เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 ^{O}C เป็นเวลา 10 นาที ส่วนการให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 95 ^{O}C เป็นเวลา 30 นาที จะไม่พบไอโซเลทใดเลยที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ แสดงผลดังตารางที่ 3

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

ตารางที่ 2 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อแบคเทอริโอซินเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของส่วนใสปราศจากเซลล์

รหัสเชื้อ	Proteinase K		
	Inhibition zone (mm) Mean± SD		
	S. aureus	*B. cereus*	*E. coli*
SV9-I17	-	-	-
SV9-I18	-	-	-
SV10-I19	6.1±0.1	7.2±0.2	-
SV10-I20	-	-	-
SV10-I21	-	-	-
SV10-I22	-	-	-
SV10-I23	-	-	-
SV10-I24	-	-	-

ตารางที่ 3 ผลของอุณหภูมิต่อการทดสอบความสามารถในการทนร้อนของสารที่น่าจะเป็นแบคเทอริโอซินเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบของส่วนใสปราศจากเซลล์

รหัสเชื้อ	Inhibition zone (mm) Mean± SD					
	95 °C 10 นาที			95 °C 30 นาที		
เชื้อทดสอบ	*S. aureus*	*B. cereus*	*E. coli*	*S. aureus*	*B. cereus*	*E. coli*
SV9-I17	-	-	-	-	-	-
SV9-I18	-	-	-	-	-	-
SV10-I20	-	-	-	-	-	-
SV10-I21	8.2±0.26	14.3±0.3	-	-	-	-
SV10-I22	-	-	-	-	-	-
SV10-I23	-	9.1±0.1	-	-	-	-
SV10-I24	15.2±0.5	6.3±0.1	-	-	-	-

อภิปรายผล

จากการศึกษานี้ขั้นแรกทำการเก็บตัวอย่างไส้กรอกอีสาน 10 ตัวอย่างจากตลาดรอบมหาวิทยาลัยบูรพา เพื่อนำมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่คาดว่าผลิตแบคเทอริโอซิน จากการศึกษาพบว่าสามารถคัดเลือกมา 24 ไอโซเลท ซึ่งน่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก เนื่องจาก ลักษณะสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การติดสีแกรมสีม่วง เป็นแกรมบวก การทดสอบคะตาเลสที่ให้ผลลบและออกซิเดสที่ให้ผลลบซึ่ง

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

สอดคล้องกับการทดลองของ นวัฒน์ และคนอื่นๆ (2559) ได้คัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริกโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร 1% $CaCO_3$ MRS จากน้ำพริกปลาร้าและน้ำพริกหนุ่มคัดแยกได้ 16 ไอโซเลต น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกเนื่องจากมีการสร้าง วงใส (clear zone) เมื่อเจริญในอาหาร MRS agar นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวสามารถสร้างกรดได้ แล้ว บางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน ได้ซึ่งเป็นโปรตีนหรือเพปไทด์ที่ถูกสร้างขึ้นจากไรโบโซมที่ช่วยส่งเสริมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคและอาหารเน่าเสีย (อรอนงค์, 2550) สำหรับการตรวจพบแบคทีเรียกรดแลคติกในการศึกษานี้ยังสอดคล้องกับผุศดีและคนอื่นๆ (2559) ที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักเช่นแหนม และไส้กรอกอีสาน จำนวน 42 ตัวอย่าง ได้ถึง 325 ไอโซเลท

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย โดยการนำส่วนใสปราศจากเซลล์ที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกมาปรับ pH เป็น 6.5 เพื่อให้ทราบได้ว่าฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียทดสอบไม่ได้มาจากความเป็นกรดของกรดแลคติก จากนั้นนำไปทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion โดยใช้แบคทีเรียทดสอบดังนี้ *E. coli* ATCC 25992 , *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* ATCC 255922 พบว่ามี 7 ไอโซเลทคือ SV9-I18, SV10-19, SV10-I20, SV10-I21, SV10-I22S, V10-I23 และ SV10-I24 ที่มีกิจกรรมยับยั้งทั้ง *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* ATCC 255922 ส่วนไอโซเลท SV9-I17 มีกิจกรรมยับยั้งเฉพาะ *B. cereus* ATCC 255922 โดยมี inhibition zone อยู่ในช่วง 9-15 มิลลิเมตร ซึ่งการยับยั้งนี้ให้ผลสอดคล้องกับ รัชนู และคนอื่นๆ (2564) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกและเชื้อมีการยับยั้ง *B. cereus* โดยมี inhibition zone อยู่ในช่วง 13.8-21.6 มิลลิเมตร นอกจากนี้ผลของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อก่อโรคนี้ยังสอดคล้องกับการศึกษาของ วรายุทธ และคนอื่นๆ (2550) ที่พบว่าแบคเทริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท NO5 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *S. aureus* ATCC 25923 และ *B. cereus* ATCC11778 ได้การที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อาจเนื่องมาจากในระหว่างการเจริญแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินและสารคล้ายแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin-Like Molecules) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิดเช่น *L. monocytogenes* และ *S. aureus* เป็นต้น (Vuyst & Leroy, 2007) โดยแบคเทอริโอซินจะยึดเกาะผิวเซลล์ของเชื้อและสร้างรูในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลายการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เซลล์เสียสภาวะสมดุล เอนไซม์สำคัญภายในเซลล์เสียคุณสมบัติ (Bruno & Montville, 1993) แต่จากผลการทดสอบนี้ไม่พบว่ามีไอโซเลทใดเลยที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *E. coli* ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกมีชั้นของผนังเซลล์ที่ประกอบด้วยเพปทิโดไกลแคนเป็นส่วนใหญ่ ส่วนแบคทีเรียแกรมลบนั้นมีเยื่อหุ้มชั้นนอกที่ประกอบด้วยลิโปโพลีแซ็กคาไรด์หุ้มอยู่อีกชั้นทำให้สามารถป้องกันไม่ให้สารยับยั้งเข้าสู่เซลล์ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก (อมรรัตน์ และคนอื่นๆ, 2559)

หลังจากคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ พบว่ามีเพียงพบว่ามี 8 ไอโซเลทคือ SV9-I17, SV9-I18, SV10-19, SV10-I20, SV10-I21, SV10-I22S, V10-I23 และ SV10-I24 ที่มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อทดสอบดั้งนั้นจึงได้ทำการคัดเลือก 8 ไอโซเลท ไปทดสอบว่าสารยับยั้งที่มีฤทธิ์ยับยั้งเป็นแบคเทอริโอซินจริงหรือไม่ โดยการนำไปทดสอบการย่อยโปรตีนโดยการใส่ Proteinase K จากนั้นนำไป

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าส่วนใสปราศจากเซลล์จากไอโซเลท SV9-I17, SV9-I18, SV10-I20, SV10-I21, SV10-I22S, V10-I23 และ SV10-I24 ที่ไม่มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อทดสอบ สอดคล้องกับการศึกษาของศิรินาถ (2556) ที่ศึกษาผลของเอนไซม์ต่อความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคเทอริโอซิน พบว่าสารที่ผลิตโดย *Enterococcus* faecium PDN-Ta10 ที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์ proteinase K, pepsin และ trypsin นั้นไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ ส่วนเอนไซม์ catalase catalase มีผลให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อลดลงเล็กน้อย แสดงว่าสารยับยั้งนั้นเป็นสารโปรตีน และไม่ใช่ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของสารแบคเทอริโอซิน ดังนั้นจึงคัดเลือกส่วนใสปราศจากเซลล์จากไอโซเลท SV9-I17, SV9-I18, SV10-I20, SV10-I21, SV10-I22S, SV10-I23 และ SV10-I24 เนื่องจากไม่มีกิจกรรมยับยั้งเชื้อทดสอบ ไปทดสอบความสามารถในการทนร้อนของแบคเทอริโอซินหรือสารคล้ายแบคเทอริโอซินโดยนำส่วนใสปราศจากเซลล์ที่ได้ไปให้ความร้อนอุณหภูมิ 95 ^{O}C 10 และ 30 นาที จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าเมื่อใช้อุณหภูมิ 95 ^{O}C นาน 10 นาที ไอโซเลท SV10-I21, SV10-I24 มีกิจกรรมยับยั้ง *S. aureus* ATCC 25923 ส่วนไอโซเลท SV10-I21, SV10-I23, SV10-I24 มีกิจกรมยับยั้ง *B. cereus* ATCC 255922 ส่วนเมื่อใช้ความร้อนนาน 30 นาที พบว่าไม่มีไอโซเลทใดที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบเลย โดยทั่วไปกระบวนการแปรรูปอาหารด้วยความร้อนสูงอาจส่งผลต่อแบคเทอริโอซินที่ไม่ทนความร้อนได้ ดังนั้นสารคล้ายแบคเทอริโอซินที่ได้จากไอโซเลทที่ไม่ทนความร้อนถ้าจะนำไปใช้ในการถนอมอาหารกับอาหารที่ต้องผ่านความร้อนจะไม่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นไอโซเลท SV10-I21 และ SV10-I24 ผลิตสารที่คล้ายแบคเทอริโอซินซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อทดสอบและทนต่อความร้อนได้ดีกว่าไอโซเลทอื่นๆ

จากการทดลองเมื่อนำไอโซเลท SV10-I21 จำแนกระดับสกุลพบว่ามีความน่าจะเป็นแบคทีเรีย *Lactobacillus* เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีรูปร่างท่อนยาว แกรมบวก ไม่สร้างคะตาเลส และออกซิเดส สอดคล้องกับรายงานของ ผุสดี และคนอื่นๆ (2559) ที่สามารถคัดแยก *Lactobacillus* spp. จากไส้กรอกอีสานและแหนม และไอโซเลท SV10-I24 ไปจำแนกระดับสกุลพบว่ามีความน่าจะเป็นแบคทีเรีย *Pediococcus* เนื่องจากลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ มีรูปร่างกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์ แกรมบวก ไม่สร้างคะตาเลส และออกซิเดส มักพบในผลิตภัณฑ์ไส้กรอก (Raccach, 2014) ซึ่งจากผลดังกล่าวจะต้องทำการทดสอบทางชีวเคมีและทางพันธุ์กรรมต่อไปเพื่อจัดจำแนกให้ได้ในระดับสายพันธุ์ต่อไป

จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าไอโซเลท SV10-I24 และ SV10-I21 ที่คาดว่าน่าจะเป็น *Pediococcus* และ *Lactobacillus* เป็นไอโซเลทที่น่าสนใจ หากได้มีการศึกษาข้อมูลต่างๆ เพิ่มเติม ซึ่งน่าจะนำไปใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตอาหารหมักหรือนำไปใช้ในการถนอมหาร จากรายงานของ อรอนงค์ (2550) รายงานว่าแบคเทอริโอซิน subclass 2a เช่น เพดดิโอซิน PA-1/AcH ได้รับความสนใจมากขึ้น เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* โดยการนำไปใช้มักร่วมกับวิธี Modified Atmosphere Packaging (MAP) ซึ่งวิธี MAP จะใช้ในการบรรจุผลิตภัณฑ์จำพวกเนื้อภายใต้ภาวะ ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ในระดับสูง เพื่อลดการเน่าเสียอันเนื่องมาจากแบคทีเรียแกรมลบ และภาวะดังกล่าวยังช่วยให้แบคทีเรียแลคติกเพิ่มจำนวนและสร้างแบคเทอริโอซินที่ได้ ทำให้ยืดอายุการเก็บของอาหาร ที่แช่เย็น ถึงแม้ว่าฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่จะไม่สามารถทำลายผนังเซลล์

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

ของกลุ่มแกรมลบได้ แต่สามารถใช้ร่วมกับกรรมวิธีอื่นอาหารร่วมกับการถนอมอาหารโดยไม่ใช้ความร้อนคือ วิธี HHP และวิธีกระตุ้นด้วยสนามไฟฟ้าการใช้ และ PEF ร่วมกับไนซิน การใช้แลคติซิน 3147 ร่วมกับวิธี HHP การใช้สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินที่จำนวน 7 สายพันธุ์ร่วมกับวิธี HHP ที่ ความดัน 300 and 500 MPa ในชีสที่มีการปนเปื้อนเชื้อ *E. coli* O157: H7 พบว่าให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมากกว่าใช้วิธีใดวิธีหนึ่ง (Deegan, 2006) จากรายงานจะเห็นได้ว่าการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับการถนอมอาหารด้วยวิธีอื่นทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียเจริญได้ช้าลงและสามารถชะลอการเน่าเสียของอาหารได้อีกด้วย รวมทั้งจากรายงานของคณิน (2561) ที่พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่สามารถชะลอการเน่าเสียของเต้าหู้แผ่นและเส้นก๋วยเตี๋ยวเส้นใหญ่ได้อีกด้วย จากผลการวิจัยพบสารที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *B. cereus* และสารดังกล่าวอาจจะเป็นแบคเทอริโอซิน โดยพบว่าแบคเทอริโอซินหรือสารที่คล้ายแบคเทอริโอซินที่ได้จากไอโซเลท SV10-I21 และ SV10-I24 สามารถทนความร้อนที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส ได้ 10 นาที ดังนั้นจึงต้องนำไอโซเลทดังกล่าวไปจัดจำแนกสายพันธุ์ต่อไปและอาจนำไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเน่าเสียของอาหารต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาที่เอื้อเฟื้อสถานที่ อุปกรณ์และงบประมาณจากเงินรายได้ของภาควิชาในการทำวิจัยครั้งนี้

Vol.10 No.2 July - December 2023 ISSN 2985-2161 (Online)

เอกสารอ้างอิง

คณิน อิ่มทองคำ. (2561). **การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคที่ผลิตสารแบคเทอริโอซินเพื่อใช้ในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร**. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี.

ดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์. (2551). วัตถุกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารและความปลอดภัยของผู้บริโภค. **วารสารอาหาร, 38**(4), 296-300.

ธีรพัฒน์ เวชชประสิทธิ์. (2554). *Escherichia coli* 0104 : H4 เชื้อแบคทีเรีย *E. coli* ระบาด. **นิตยสาร สสวท**. **39**(173), 6-8.

นวัฒน์ เกตุสวัสดิวงศ์, ธีระชัย ธนานันต์ และนฤมล ธนานันต์. (2559). การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก. **Thai Journal of Science and Technology, 5**(1), 67-76.

นภดล เมตตาเมธา. (2554). การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินจากแหนมปลา. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว, 27**(1), 110-112.

ผุสดี ตังวัชรินทร์, จิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์ และกานต์ สุขสุแพทย์ (2559). การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้น จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า, 34**(2), 67-76.

รัชนู เมยคง, ภัทรวรรณ สุขสวัสดิ์ และศิริพร ทิพย์สิงห์. (2564). การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก. **วารสารก้าวทันโลกวิทยาศาสตร์, 21**(1), 101-118.

วรายุทธ สุระนรากุล, สัมภาษณ์ คุณสุข, ปาริชาติ พุ่มขจร และพงศ์ศักดิ์ รัตนชัยกุลโสภณ. (2550). คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่สร้างโดยแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก. **วารสารวิจัย มข, 7**(1), 17-26.

ศนิ จิระสถิตย์. (2560). จุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร. **วารสารวิทยาศาสตร์บูรพา, 22**(2), 218-232

ศิรินาถ ศรีอ่อนนวล และนพรัตน์ มะเห. (2556). การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากปลาดุกร้า. **วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, 5**(2), 1-14.

สมใจ ศิริโภค. (2550). การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติก ที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้. **วารสารวิทยาศาสตร์ มศว, 27**(1), 92-104.

สุวีณา จันทพิรักษ์. (2557). อันตราย (ไม่รู้ตัว) จากเนื้อสัตว์แปรรูป. **วารสารอาหาร, 44**(3), 24-28.

อมรรัตน์ สีสุกอง, กัลยาภรน์ จันตรี และศรีสุดา หาญภาคภูมิ. (2559). การศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัดจากวัชพืชบางชนิด. **วารสารวิจัยและพัฒนา วไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์, 11**(1), 69-82.

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

ปีที่ 10 ฉบับที่ 2 กรกฎาคม - ธันวาคม 2566 ISSN 2985-2161 (Online)

Ananou, S., Maqueda, M., Martínez-Bueno, M. & Valdivia, E. (2007). **Biopreservation, an ecological approach to improve the safety and shelf-life of foods**. Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology A. Méndez-Vilas

Bruno, M.E.C. & Montville, T.J. (1993). Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. **Applied and Environmental Microbiology, 59**(9), 3003-3010.

Carlos J., González H., Martínez-Tapia A., Lazcano-Hernández G., García-Pérez B. E. & Castrejón-Jiménez N.S. (2021) Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. A Powerful Alternative as Antimicrobials, Probiotics, and Immunomodulators in Veterinary Medicine. **Animals (Basel), 11**(4), 979.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. & Ross, P. (2006), Bacteriocins: Biological tools for biopreservation and shelf-life extension. **International Dairy Journal, 16**, 1058-1071.

Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Reviews, 12**(1-3), 39-86.

Pringsulaka O., Thongngam N., Suwannasai N. & Atthakor W. (2011). Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. **Food Control**, **23**(2), 547-551.

Raccach, M. (2014). ***Pediococcus*.** In Encyclopedia of Food Microbiology (second edition).

Schillinger, U. & Holzapfel, W. H. (1995). The genus *Carnobacterium*. In B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel (Eds.). **The Lactic Acid Bacteria : The Genera of Lactic Acid Bacteria** (pp. 307-326), U.K: Chapman & Hall.

Vuyst, L.D. & Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production,Purification, and Food Applications. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology, 13**(4), 194-199.

Yaacob, S. NS., Wahab, R.A., Misson, M., Sabullah, M.K., Huyop, F. & Zin, N.M. (2022). Lactic acid bacteria and their bacteriocins: new potential weapons in the fight against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Future Microbiology, 17**(9). https://doi.org/10.2217/fmb-2021-0256.