บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่นำมาทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีทั้งหมด 17 ชนิด แบ่งออกเป็นอาหารหมักจากสัตว์ ได้แก่ ปลาส้ม ไตปลา ปลาร้า หนาง แหนม กุ้งส้ม กะปิ หอยดอง และน้ำเคย อาหารหมักจากพืชได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก สะตอดอง หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง และกิมจิ จากตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาคัดแยกเชื้อทั้งหมดจำนวน 52 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างอาหารหมักที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.9 และมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ 230 สายพันธุ์ สำหรับอาหารหมักที่สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ ปลาส้ม ไตปลา ปลาร้า กุ้งส้ม หนาง แหนม กะปิ น้ำเคย ผักเสี้ยนดอง สะตอดอง หน่อไม้ดอง และกิมจิ

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกทั้ง 230 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Broth microdilution assay พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 55 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในยับยั้งได้สูง โดยที่มีค่า MIC เท่ากับ 50 AU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar Typhi และ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่า มีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 8 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทุกสายพันธุ์ โดยแสดงให้เห็นว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ในช่วงกว้าง ซึ่งผลของกิจกรรมการยับยั้งมีค่า MIC เท่ากับ 25 AU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และลดอิทธิพลการยับยั้งโดยกรดอินทรีย์ พบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้เพียง 1 สายพันธุ์ ที่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบและกิจกรรมการยับยั้งมีค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวคือ *L. plantarum* JR21 โดยมีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 (677/677) (GenBank accession number DQ 239698.1) เมื่อเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จาก *L. plantarum* L5

สำหรับการศึกษาการเจริญของ *L. plantarum* JR21 พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์นี้มีช่วง lag phase ประมาณ 3 ชั่วโมง จึงเจริญเข้าสู่ช่วง log phase จนถึงชั่วโมงที่ 18 โดยมีช่วง

stationary phase อยู่ที่ชั่วโมง 18 ถึง 36 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไปเซลล์จะเข้าสู่ช่วง death phase จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* JR21 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 และเมื่อทำการทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งพบว่าส่วนใสที่ได้เริ่มมีกิจกรรมการยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงโดยกิจกรรมการยับยั้งมีค่าเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเก็บตัวอย่างส่วนใสในชั่วโมงที่ 9 พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 14.66 AU ต่อมิลลิลิตร ค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 16.67 AU ต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมง 12 และ 15 จากนั้นจะให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ถึง 36 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมการยับยั้งจะมีค่าลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 จะมีค่า MIC เท่ากับ 16.67 AU ต่อมิลลิลิตร

เมื่อศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นและผลของระดับความเข้มข้นเกลือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม พบว่า การเลี้ยง *L. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 และระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-6 มีความเหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งได้สูง โดยมีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 มีผลทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อเริ่มลดลง

จากการนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* JR21 มาศึกษาผลของปัจจัยแวดล้อมต่างๆที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* พบว่าสารยับยั้งที่ *L. plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติที่มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีความคงตัวต่อพีเอชตั้งแต่ 2.0 ถึง 10.0 และคงตัวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ *L. plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นไม่ได้เป็นสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น แบคเทอริโอซิน โดยพบกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร

เมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *L. plantarum* JR21 พบว่า เชื้อสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15-0.30 โดยยังคงมีชีวิตรอดอยู่ที่ 8.59 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 7.32 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 99.8 และ 85.7 ตามลำดับ *L. plantarum* JR21 สามารถทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 3.0 ได้นานถึง 4 ชั่วโมง โดยมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 75.1 เมื่อศึกษาถึงการเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus, E. coli* และ *Sal. enterica* ser. Typhi โดยเริ่มมีผลการยับยั้งตั้งแต่ที่เวลา 12 ชั่วโมง และสามารถยับยั้งได้ร้อยละ 61.43, 58.34 และ 59.98 ตามลำดับ เมื่อถึงชั่วโมงที่ 18 โดยสามารถยับยั้งได้อย่างสมบูรณ์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษาการใช้ *Lactobacillus plantarum* JR21 ในการหมักดองอาหารหรือเพิ่มคุณภาพในลักษณะของการใช้เป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก และเปรียบเทียบคุณภาพของอาหารหมักดองที่ได้กับอาหารหมักดองที่หมักโดยวิธีธรรมชาติ
2. ศึกษาการใช้สารยับยั้งจาก *Lactobacillus plantarum* JR21 ร่วมกับการใช้กรดอินทรีย์ต่างๆ เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย
3. ศึกษาโครงสร้างเบื้องต้นของสารยับยั้งที่ได้จากการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* JR21 โดยอาจใช้วิธีการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งดังกล่าว ทั้งนี้เพื่อจำแนกสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก