รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากอาหารหมักทางภาคใต้ของไทยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร

Screening and characterization of lactic acid bacteria isolated from southern Thai fermented foods for their inhibition efficacy against food-borne bacteria

จัดทำโดย

ดร.อภิชาติ อู๊ไพจิตร

ผศ.ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพอุตสาหกรรม คณะอุตสาหกรรมเกษตร

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ประจำปีงบประมาณ 2550-2551

บทคัดย่อ

การแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักพื้นบ้านจำนวน 52 ตัวอย่าง โดยวิธี Sandwich test สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*Staphylococcus aureus*) ได้ทั้งหมดจำนวน 230 สายพันธุ์ เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Broth microdilution assay พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 55 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งได้สูง (50 AU ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. และ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 8 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งได้สูงคือมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 25 AU ต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ในช่วงกว้าง เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสภาวะที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และลดอิทธิพลของกรดอินทรีย์ พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้เพียง 1 สายพันธุ์ ที่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบและให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งได้สูงที่สุด (20 AU ต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวคือ *Lactobacillus plantarum* JR21 เมื่อศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นและความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JR21 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 และระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-6 เชื้อมีการเจริญและให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งได้สูง (20 AU ต่อมิลลิลิตร) โดยสารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนได้สูงสุดถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีความคงตัวต่อค่าพีเอชในช่วง 2.0-10.0 ได้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ภายหลังการทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน อาทิ proteinase K, α-chymotrypsin, trypsin และ pronase E จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus plantarum* JR21 พบว่าภายหลังการทดสอบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เชื้อสามารถรอดชีวิตได้ดีที่ค่าพีเอช 3.0 (6.47 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (8.59 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และร้อยละ 0.3 (7.32 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. และ *Escherichia coli* ได้อย่างสมบูรณ์ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ABSTRACT

A total of 52 samples of various traditional fermented foods were screened for lactic acid bacteria with antagonistic activity against *Staphylococcus aureus* using the "Sandwich" test method. Two hundred and thirty of nonmotile, Gram-positive and catalase-negative colonies were scored positive as they produced clear zones of inhibition against indicator strain on agar media. When broth microdilution assay was performed to screen for antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, a total of 55 lactic acid bacteria exhibited high level of growth inhibition (50 AU/ml) were selected. Eight strains showed a broad inhibitory spectrum against pathogens including *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Escherichia coli, Salmonella* sp. and *Vibrio parahaemolyticus* with the growth inhibition of 25 AU/ml. However, the strain JR21 was the only isolate that displayed the highest level of growth inhibition (20 AU/ml) under the condition that eliminated hydrogen peroxide and decreased the effects of organic acids. According to the biochemical reaction together with the nucleotide sequence analysis of 16S rDNA, the strain JR21 was identified as *Lactobacillus plantarum* JR21. The effects of initial pH and concentration of NaCl in MRS broth on growth and antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* JR21 were investigated. MRS broth with initial pH 6.5 containing of 0-6 % NaCl showed the best results in bacterial growth and antibacterial activity. The antibacterial substances were stable to heat at 121 °C for 15 min and were stable to pH range of 2.0-10.0 for 2 h. However, the antibacterial activity of the supernatant was not affected by proteolytic enzymes including proteinase K, α-chymotrypsin, trypsin and pronase E. The probiotic potential including acid and bile salt tolerance were also investigated. *Lactobacillus plantarum* JR21 was able to survive at pH 3.0 (6.47 log CFU/ml) as well as 0.15% (8.59 log CFU/ml) and 0.30% (7.32 log CFU/ml) bile salt for 4 h. When coculture study was conducted to investigate the antagonistic activity against *Staphylococcus aureus, Salmonella* sp. and *Escherichia coli* in the presence of *Lactobacillus plantarum* JR21, the complete inhibitions against all pathogens tested were observed at 24 h.

บทสรุปสำหรับผู้บริหาร

ปัจจุบันผู้บริโภคอาหารได้ให้ความสนใจในเรื่องการดูแลสุขภาพของตนเองมากขึ้น ทั้งนี้เพราะในปัจจุบันมีการใช้วัตถุกันเสียซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น อาหารที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคและสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร จึงได้มีความพยายามหาทางในการแก้ไขปัญหาเชื้อก่อโรคและหาสารกันเสียธรรมชาติมาทดแทน ซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่าสารกันเสียที่มาจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคหากได้รับในปริมาณมากติดต่อกันเป็นเวลานาน ทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางคือ การใช้สารต้านจุลชีพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกซึ่งใช้ในการผลิตอาหารหมักดอง

แบคทีเรียแลกติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบมากในอาหารประเภทอาหารหมัก เช่น แหนม ผักดอง ผลไม้ดอง ไส้กรอกเปรี้ยว เนยแข็ง และนมเปรี้ยว อีกทั้งยังสามารถพบได้ในร่างกายคนและสัตว์ เช่น ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) ไม่เคลื่อนที่ (Wood and Holzapfel, 1997) ให้ผลผลิตหลักจากการหมักย่อยน้ำตาลคือกรดแลกติก การที่แบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการยับยั้งทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เนื่องจากกรดแลกติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้น ทำให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัว เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิติล (diacetyl) ซึ่งจะไปมีผลต่อคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์อาหาร ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมลงไปในอาหาร ซึ่งจะมีผลต่อ กลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของอาหาร (Lasen *et al.*, 1993; Brink *et al.*, 1994) นอกจากนี้กลุ่มของแบคทีเรียแลกติก อาทิ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ยังมีคุณสมบัติในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี ทำให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารอันเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของการเป็นโปรไบโอติก ซึ่งโปรไบโอติกหมายถึงจุลินทรีย์มีชีวิตที่สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการคงไว้หรือปรับสภาพสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดความต้านทานต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Saarela *et al.*, 2000)

ดังนั้นการเลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีชีวิต มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก และสามารถผลิตสารยับยั้งกับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและสุขภาพที่ดีของผู้บริโภค จึงเป็น

อีกแนวทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักพื้นบ้านจำนวน 52 ตัวอย่าง โดยวิธี Sandwich test สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*Staphylococcus aureus*) ได้ทั้งหมดจำนวน 230 สายพันธุ์ เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* โดยวิธี Broth microdilution assay พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 55 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งได้สูง (50 AU ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. และ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 8 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งได้สูงคือมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 25 AU ต่อมิลลิลิตร และสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ในช่วงกว้าง เมื่อทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในสภาวะที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และลดอิทธิพลของกรดอินทรีย์ พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้เพียง 1 สายพันธุ์ ที่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบและให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งได้สูงที่สุด (20 AU ต่อมิลลิลิตร) เมื่อทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวคือ *Lactobacillus plantarum* JR21 เมื่อศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นและความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JR21 พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 และระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-6 เชื้อมีการเจริญและให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งได้สูง (20 AU ต่อมิลลิลิตร) โดยสารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนได้สูงสุดถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที มีความคงตัวต่อค่าพีเอชในช่วง 2.0-10.0 ได้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ภายหลังการทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน อาทิ proteinase K, α-chymotrypsin, trypsin และ pronase E จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus plantarum* JR21 พบว่าภายหลังการทดสอบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เชื้อสามารถรอดชีวิตได้ดีที่ค่าพีเอช 3.0 (6.47 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 (8.59 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และร้อยละ 0.3 (7.32 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และเมื่อทำการเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella* sp. และ *Escherichia coli* ได้อย่างสมบูรณ์ที่เวลา 24 ชั่วโมง

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติและมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ให้ทุนอุดหนุนในการทำงานวิจัยภายใต้สัญญาเลขที่ AGR5011990073S และขอขอบคุณคณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ และเครื่องมือในการดำเนินงานวิจัย ตลอดจนขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในคณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านสำหรับความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยครั้งนี้

อภิชาติ อู่ไพจิตร

ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	i
Abstract	ii
บทสรุปสำหรับผู้บริหาร	iii
กิตติกรรมประกาศ	v
สารบัญ	vi
รายการตาราง	vii
รายการภาพ	viii
บทนำ	1
บทตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	31
ขอบเขตการวิจัย	31
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	31
วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง	32
ผลการทดลองและวิจารณ์	46
สรุปผลการทดลอง	79
ข้อเสนอแนะ	81
เอกสารอ้างอิง	82
ภาคผนวก	93
Output	101

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้ง	23
2. แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากตัวอย่างอาหารหมัก	49
3. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมัก	50
4. กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยก	53
5. กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*Salmonella* sp., *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus*) โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก	54
6. ผลของการปรับค่าพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกต่อการยับยั้ง *S. aureus*, *Salmonella* sp., *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus*	57
7. คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21	59
8. ผลของอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* JR21	70
9. ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S. aureus*, *E. coli* และ *Salmonella* sp. โดย *Lb. plantarum* JR21 เมื่อเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	76
10. คุณลักษณะที่แตกต่างของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก	100

รายการภาพ

ภาพที่	หน้า
1. วิถีการใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม homofermentative	7
2. วิถีการใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม heterofermentative	8
3. ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*S. aureus*) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS	48
4. การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*S. aureus*) ของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเมื่อทดสอบโดยวิธี Broth microdilution assay	48
5. การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 (Query) และ *Lb. plantarum* AF1 (Subject)	60
6. ไฟโลจินิกทรีของ *Lb. plantarum* JR21	61
7. การเจริญ ค่ากิจกรรมการยับยั้ง และค่าพีเอชของส่วนใสเมื่อเลี้ยง *Lb. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เวลาต่างๆ	62
8. ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ของ *Lb. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เวลา 24 ชั่วโมง	63
9. ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ของ *Lb. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เวลา 24 ชั่วโมง	64
10. การรอดชีวิตของ *Lb. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเกลือน้ำดี หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง	72
11. การรอดชีวิตของ *Lb. plantarum* JR21 ในสภาวะความเป็นกรดที่ระดับค่าพีเอช 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง	74
12. ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S. aureus* (A), *E. coli* (B) และ *Salmonella* sp. (C) โดย *Lb. plantarum* JR21 เมื่อเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง	78

บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคอาหารได้ให้ความสนใจในเรื่องการดูแลสุขภาพของตนเองมากขึ้น ทั้งนี้เพราะในปัจจุบันมีการใช้วัตถุกันเสียซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค อีกทั้งการบริโภคอาหารที่ไม่ถูกสุขลักษณะ เช่น อาหารที่มีการปนเปื้อนจุลินทรีย์ก่อโรคทำให้เกิดอาหารเป็นพิษ ดังนั้นเพื่อความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ก่อโรคและสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร จึงได้มีความพยายามหาทางในการแก้ไขปัญหาเชื้อก่อโรคและหาสารกันเสียธรรมชาติมาทดแทน ซึ่งมีความปลอดภัยมากกว่าสารกันเสียที่มาจากการสังเคราะห์ด้วยวิธีทางเคมีที่อาจก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคหากได้รับในปริมาณมากติดต่อกันเป็นเวลานาน ทางเลือกหนึ่งที่ได้รับความสนใจและมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางคือ การใช้สารต้านจุลชีพที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกซึ่งใช้ในการผลิตอาหารหมักดอง

แบคทีเรียแลกติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่พบมากในอาหารประเภทอาหารหมัก เช่น แหนม ผักดอง ผลไม้ดอง ไส้กรอกเปรี้ยว เนยแข็ง และนมเปรี้ยว อีกทั้งยังสามารถพบได้ในร่างกายคนและสัตว์ เช่น ในระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) ไม่เคลื่อนที่ (Wood and Holzapfel, 1997) ให้ผลผลิตหลักจากการหมักย่อยน้ำตาลคือกรดแลกติก การที่แบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการยับยั้งทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เนื่องจากกรดแลกติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นทำให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัว เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิติล (diacetyl) ซึ่งจะไปมีผลต่อคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์อาหาร ในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมลงไปในอาหาร ซึ่งจะมีผลต่อกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของอาหาร (Lasen *et al.*, 1993; Brink *et al.*, 1994) นอกจากนี้กลุ่มของแบคทีเรียแลกติก อาทิ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ยังมีคุณสมบัติในการทนต่อกรดและเกลือน้ำดี ทำให้สามารถมีชีวิตอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารอันเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของการเป็นโปรไบโอติก ซึ่งโปรไบโอติกหมายถึงจุลินทรีย์มีชีวิตที่สามารถก่อให้เกิดประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการคงไว้หรือปรับสภาพสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร ทำให้เกิดความต้านทานต่อจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้มีประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค (Saarela *et al.*, 2000)

ดังนั้นการเลือกใช้จุลินทรีย์ที่มีชีวิต มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก และสามารถผลิตสารยับยั้งกับผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและสุขภาพที่ดีของผู้บริโภค จึงเป็นอีก

แนวทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ การศึกษาครั้งนี้ต้องการที่จะคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านต่างๆทางภาคใต้ของไทยทั้งที่ทำจากเนื้อสัตว์และพืชผัก เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหาร และศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ผลิตได้ รวมทั้งการประเมินคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกด้วยวิธีการต่างๆในห้องปฏิบัติการ ทั้งนี้เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดต่างๆ

บทตรวจเอกสาร

1. อาหารหมัก (Fermented food)

กระบวนการหมักเป็นวิธีหนึ่งที่ยอมรับในการถนอมอาหาร เป็นกระบวนการที่ทำให้สารประกอบของอาหารเปลี่ยนแปลงไปคือ เปลี่ยนทั้งสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ทำให้คุณค่าทางอาหารเสียไป รวมทั้งรสชาติ และลักษณะผลิตภัณฑ์ โดยสารประกอบที่มีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหารคือ กรดแลกติก ปกติแบคทีเรียแลกติกพบได้ทั่วไปในผัก ผลไม้ หรือเนื้อสัตว์ แบคทีเรียแลกติกจะใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในผัก ผลไม้ หรือเนื้อสัตว์เปลี่ยนเป็นกรดแลกติก ทำให้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้

อาหารหมักหากแบ่งตามวัตถุดิบที่ใช้สามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. อาหารหมักจากพืช เช่น กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง สะตอดอง เหรียงดอง เต้าเจี้ยว ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง หัวไชโป้ ข้าวหมาก กระเทียมดอง และขิงดอง เป็นต้น

2. อาหารหมักจากสัตว์ เช่น ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ปลาร้า ไตปลา น้ำปลา ปลาแป้งแดง กุ้งส้ม ปลาส้ม ปลาจ่อม หอยดอง และน้ำบูดู เป็นต้น

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้แก่

1. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช

กะหล่ำปลีดอง เป็นการหมักกะหล่ำปลีด้วยแบคทีเรียแลกติกโดยธรรมชาติ ซึ่งมีการเติมเกลือเพื่อให้สภาวะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า *Enterobacter coacae* และ *Erwinia herbicola* มีบทบาทในระยะแรกของการหมักทำให้เกิดกลิ่นและรสที่ดี ในระยะกลางของการหมัก *Leuconostoc mesenteroides* จะเพิ่มจำนวนขึ้นมาแทนที่แบคทีเรียอื่นๆ ผลิตกรดแลกติก 0.7-1.0 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก เอธานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และแมนนิทอล (ซึ่งมีรสขม) ระยะสุดท้ายของการหมักอาศัย *Lactobacillus plantarum* ซึ่งสามารถใช้แมนนิทอลได้ทำให้รสขมของกะหล่ำปลีดองหมดไป (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

แตงกวาดอง เป็นการนำแตงกวามาหมักด้วยเกลือหรือน้ำเกลือ ในระยะแรกของการหมักพบจุลินทรีย์พวก *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Bacillus*, รา และยีสต์ ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้เป็นพวกที่ไม่ต้องการ ขณะที่แบคทีเรียแลกติกที่ต้องการจะพบจำนวนน้อยกว่า หลังจากการหมัก 7 วัน แบคทีเรียแลกติกจะเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ส่วนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการจะลดจำนวนลงและอาจจะหายไปเมื่อปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ค่าพีเอชลดลง โดยแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus plantarum* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ผักกาดดอง เป็นการนำผักกาดเขียวมาหมักด้วยน้ำเกลือ แบคทีเรียที่พบในการหมักระยะแรกส่วนใหญ่เป็นชนิด heterofermentative rod ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Lactobacillus brevis* การหมักในระยะต่อมาแบคทีเรียพวก heterofermentative cocci จะเด่นขึ้นมา ได้แก่ *Pediococcus cerevisiae* ส่วนช่วงหลังของการหมักจะพบแบคทีเรียพวก heterofermentative rod ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

หน่อไม้ดอง มีหลักการเดียวกับการทำกะหล่ำปลีดองของประเทศตะวันตก โดย *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum* จะผลิตกรดแลกติกในระยะเริ่มแรกของกระบวนการหมัก ส่วนในระยะสุดท้ายของกระบวนการหมักจะพบ *Lactobacillus buchneri, Lactobacillus fermenti* และ *Lactobacillus mesenteriodes* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

ผักเสี้ยนดอง วิธีการดองทำโดยนำผักเสี้ยนมาหั่นเป็นท่อนขนาดพอคำ นำไปตากแห้งพอหมาดๆ เพื่อขจัดกลิ่นเหม็นเขียว เสร็จแล้วผสมข้าวเย็น 1 กำมือต่อผักเสี้ยน 5 ถ้วยแกง ขยำกับเกลือให้มีรสเค็มเล็กน้อย แล้วใส่น้ำ 5 ถ้วยแกง น้ำตาลโตนด 5 ช้อนแกง คลุกเคล้าปิดฝาภาชนะตั้งไว้ในที่ร่ม 3-4 คืน ผักเสี้ยนจะมีรสเปรี้ยวพร้อมรับประทาน ส่วนแบคทีเรียแลกติกที่พบในผักเสี้ยนดองมีทั้ง heterofermentative และ homofermentative ส่วนใหญ่ก็เป็นแบคทีเรียที่พบในหน่อไม้ดอง (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

2. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์

แหนม เป็นอาหารหมักประเภทเนื้อเกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลกติก โดยในระยะแรก *Lactobacillus* จะเจริญอย่างช้าๆ จึงมีจำนวนน้อย หลังจากหมักเป็นเวลา 3 วัน *Pediococcus* ซึ่งทนกรดได้น้อยจะเจริญช้าลงและหยุดการเจริญในที่สุด ในขณะที่ *Lactobacillus* สามารถเจริญและสร้างกรดต่อไปได้ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

บูดู เป็นอาหารหมักที่ทำมาจากปลาทะเลขนาดเล็ก ระยะแรกของการหมักพบแบคทีเรียพวก *Bacillus* sp., *Staphylococcus* sp. และ coryneform bacteria ซึ่งเชื่อว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นเรื่อยๆตามระยะเวลาการหมัก และเมื่อสิ้นสุดการหมักจะพบแบคทีเรียชนิดนี้สูงถึงร้อยละ 90 และมีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นในบูดู (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ไส้กรอกเปรี้ยว เป็นอาหารหมักที่มีต้นกำเนิดจากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ บางครั้งจึงเรียกไส้กรอกอีสาน จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักไส้กรอกเปรี้ยว ได้แก่ แบคทีเรียแลกติกที่พบมากที่สุดคือ *Pediococcus cerevisiae* และ *Lactobacillus plantarum* นอกจากนี้ยังพบ *Pediococcus halophilus* และ *Lactobacillus brevis* (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ปลาส้ม เป็นอาหารหมักประเภทปลามีลักษณะคล้ายคลึงกับปลาเจ่าแต่ในการทำใช้ข้าวสุกแทนข้าวหมาก ในระยะแรกของการหมักพบแบคทีเรียพวก *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Bacillus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนในเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียที่พบในปริมาณมากและพบตลอดระยะเวลาในการหมักคือ *Pediococcus cerevisiae* รองลงมาคือ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus brevis* โดยแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นในปลาส้ม (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

ปลาร้า เป็นอาหารพื้นเมืองที่นิยมบริโภคกันมากในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางซึ่งได้จากการหมักปลา ผลิตภัณฑ์มีน้ำเล็กน้อยและเนื้อปลามีลักษณะนิ่มยุ่ย มีสีเหลืองเข้มจนถึงน้ำตาลดำ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536) แบคทีเรียแลกติกที่พบในการหมักปลาร้าได้แก่ *Pediococcus* sp. และ *Pediococcus halophilus* ซึ่งจะมีผลต่อกลิ่นรสของปลาร้า นอกจากนี้ยังพบ *Staphylococcus* sp. และ *Staphylococcus epidermidis* โดยมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนและมีผลต่อกลิ่นรสบ้างเล็กน้อยเช่นเดียวกับ *Micrococcus* sp., *Bacillus subtilis* และ *Bacillus licheniformis* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524)

น้ำปลา กะปิ ปลาเจ่า ตลอดจนอาหารหมักที่ใช้ปลาเป็นวัตถุดิบอีกหลายชนิดพบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้อง คือ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus halophilus* และ *Micrococcus sarcina* (ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์, 2524 และวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

2. แบคทีเรียแลกติก

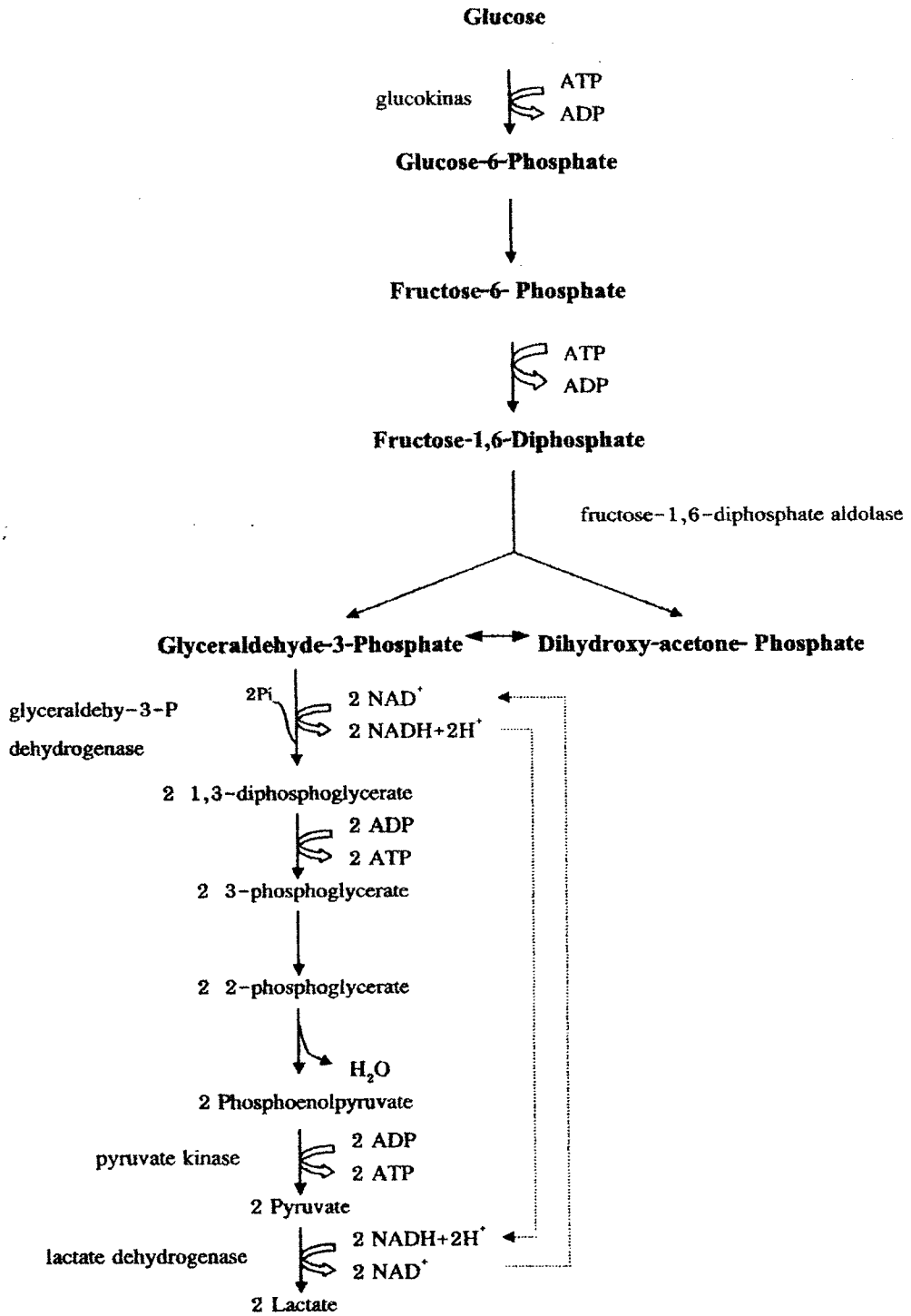
แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobe) ให้ผลผลิตหลักจากการหมักย่อยน้ำตาลคือกรดแลกติก แบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ ทั้งนี้เนื่องจากกรดแลกติกที่แบคทีเรียผลิตขึ้นทำให้ค่าพีเอชไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคหรือจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมาในอาหาร อีกทั้งยังพบว่าแบคทีเรียแลกติกสร้างสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัว เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และไดอะซิติล (diacetyl) (Lasen *et al.*, 1993; Brink *et al.*, 1994) มีผลทำให้เกิดคุณลักษณะเฉพาะของผลิตภัณฑ์อาหาร สำหรับในระดับอุตสาหกรรมมีการใช้แบคทีเรียแลกติกเป็นหัวเชื้อตั้งต้นเพื่อเติมลงไปในอาหาร มีผลต่อกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของอาหาร และสารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่งซึ่งผลิตจากแบคทีเรียแลกติกคือแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็นสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นได้อย่างจำเพาะ

การจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกสกุลต่างๆขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะ รูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ การใช้ซิเตรท การใช้อาร์จินิน การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตกรดแลกติก การเจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูงและการทนเกลือหรือด่าง ในปัจจุบันมีการจัดกลุ่มแบคทีเรียแลกติกออกเป็น 17 สกุล (genus) คือ *Aerococcus, Bifidobacterium, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Leuconostoc, Melissococcus, Microbacterium, Oenococcus, Pediococcus, Propionibacterium, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissella* (Axelsson, 2004)

หากจัดแบ่งแบคทีเรียแลกติกตามการใช้อาหารและการสร้างสาร (Axelsson, 1993; Kandler and Weiss, 1986) สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

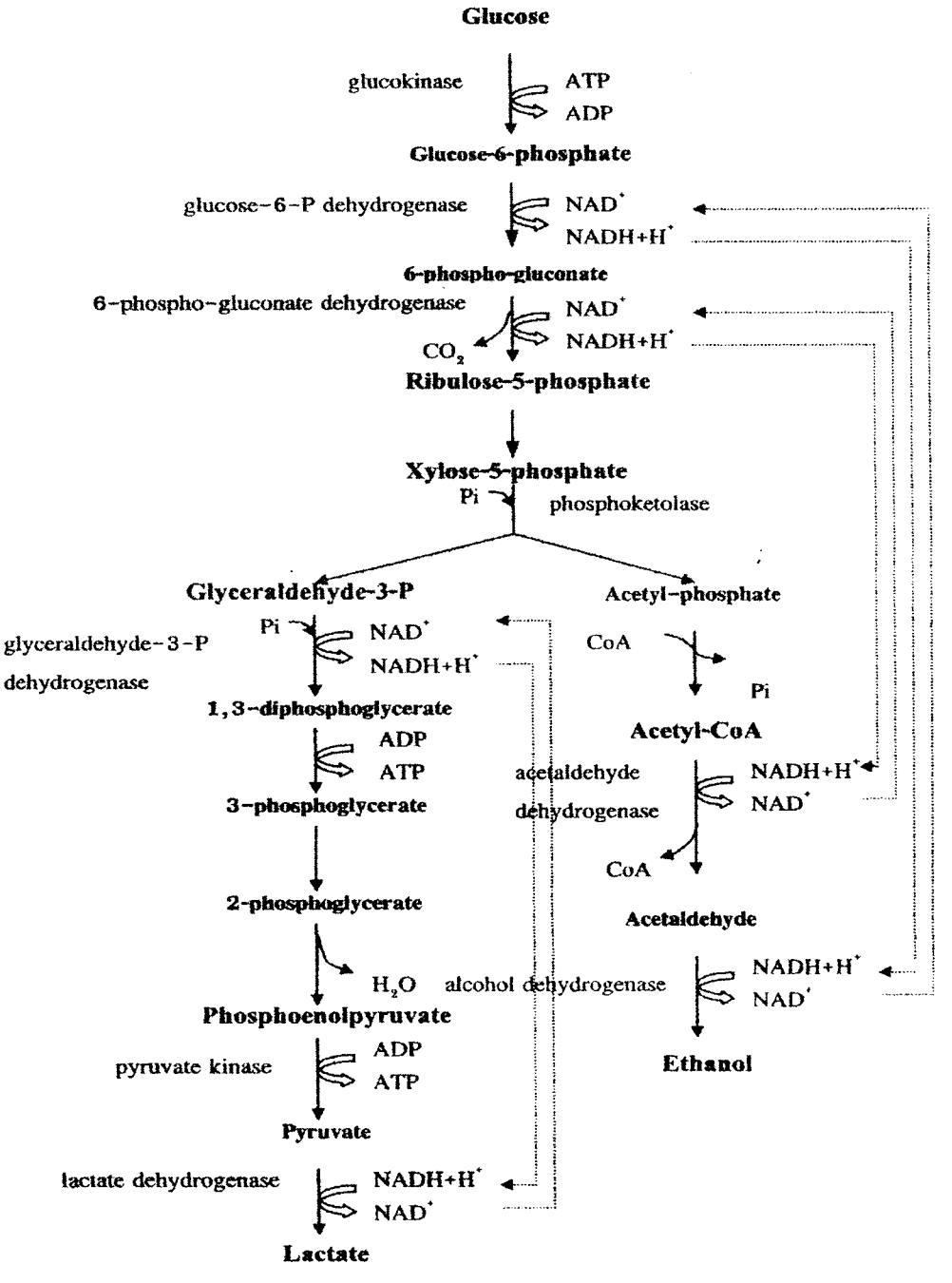
1. Homofermentative lactic acid bacteria หมายถึง แบคทีเรียแลกติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวตโดยอาศัยเอนไซม์ aldolase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วให้กรดแลกติกประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรตโดยผ่าน glycolysis pathway (Embden-Meyerhof-Parnas pathway) ดังแสดงในภาพที่ 1 แบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้ไม่ต้องการ thiamine ในการเจริญ ได้แก่ แบคทีเรียแลกติกในสกุล *Pediococcus, Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด

2. Heterofermentative lactic acid bacteria หมายถึง แบคทีเรียแลกติกที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้กรดแลกติกร้อยละ 50 คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 20-25 กรดอะซิติก และเอธานอลร้อยละ 20-25 โดยผ่าน phosphogluconate pathway หรือ phosphoketolase pathway ดังแสดงในภาพที่ 2 แบคทีเรียแลกติกกลุ่มนี้ต้องการ thiamine ในการเจริญ สร้างเอนไซม์ phosphoketolase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ aldolase ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด



ภาพที่ 1 วิถีการใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม homofermentative

ที่มา : Axelsson (1993)



ภาพที่ 2 วิถีการใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม heterofermentative

ที่มา : Axelsson (1993)

3. โปรไบโอติก

จุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารที่มีประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน (host) มีคุณสมบัติในการทนต่อสภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหารและทนต่อเกลือน้ำดีในลำไส้ สามารถผลิตกรดแลกติกและสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ภายในลำไส้และช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของอาหารหรือกระตุ้นคุณค่าทางโภชนาการให้สูงขึ้น (นวลจันทร์ พารักษา, 2533 และ Marteau *et al.*, 2001)

3.1 คุณสมบัติของโปรไบโอติก

1. สามารถสร้างกรดแลกติก ทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้นจึงเกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆได้ดีขึ้น (กิจการ ศุภมาตย์, 2544) ช่วยปรับสภาพของระบบทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่แบคทีเรียโคลิฟอร์มเจริญได้ยาก (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

2. สามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula *et al.*, 1998) เช่น *Lactobacillus acidophilus* (ADH) สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นๆ (Conway *et al.*, 1987) *Lactobacillus gasseri* สามารถรอดชีวิตได้สูงที่พีเอช 3.0, 2.0 และ 1.5 ตามลำดับ (Arihara *et al.*, 1998) *Lactobacillus* สายพันธุ์ BFE 1058 และ 1061 มีความสามารถในการทนต่อพีเอชต่ำได้ดีกว่าสายพันธุ์ BFE 1059 (Toit *et al.*, 1998) *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถมีชีวิตรอดได้สูงสุดที่พีเอช 3.0 (Erkkila and Petaja, 2000)

3. สามารถทนต่อเกลือน้ำดี โดยแบคทีเรียในกลุ่ม lactobacilli ซึ่งอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีคุณสมบัติในการทนต่อเกลือน้ำดี และมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตสารซึ่งจะช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ รวมถึงรักษาโรคที่เกิดกับลำไส้ Erkkila และ Petaja (2000) พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) มีความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.30

4. สามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ก่อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ โดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะลูกคลื่น(peristalsis) ซึ่งการเกาะเคลือบของโปรไบโอติกที่ผนังทางเดินอาหารนี้จะทำให้การย่อยอาหารและการดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller, 1993)

5. ไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

6. ไม่หลงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อ (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

7. สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, β-galactosidase, amylase, protease, lactase และ cellulase มีผลทำให้การย่อยและการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่างๆดีขึ้น (อุทัย คันโธ, 2535)

8. สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น hydrogen peroxide และ bacteriocin (Fuller, 1993)

9. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ซึ่งสามารถพบได้ใน *Lactobacillus* sp. ที่สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin และ gamma interferon ส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ในการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller, 1993) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Klila และคณะ (1992) ที่มีการนำ *Lactobacillus* sp. จากผลิตภัณฑ์นมหรือโยเกิร์ตให้ผู้ป่วยโรคท้องร่วงรับประทาน พบว่าทำให้ร่างกายผู้ป่วยสามารถสร้างภูมิคุ้มกันได้ดียิ่งขึ้นถึงร้อยละ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับประทาน *Lactobacillus* sp. ที่มีการสร้างภูมิคุ้มกันเพียงร้อยละ 46

10. ลดการสังเคราะห์ amine ที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร และเพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารต่างๆในร่างกาย (อุทัย คันโธ, 2535)

11. ลดการเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่

12. แย่งอาหารของเชื้อก่อโรค (Fuller, 1993)

13. การออกฤทธิ์ของสารยับยั้งไม่เปลี่ยนแปลง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

14. สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

15. เพิ่มจำนวนได้อย่างรวดเร็วและสามารถยังชีพอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง (นวลจันทร์ พารักษา, 2533)

16. ไม่สามารถสร้างสารพิษ (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

17. ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือดื้อยา (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

18. สามารถเจริญในช่วงอุณหภูมิกว้างคือ 20–60 องศาเซลเซียส (กิจการ ศุภมาตย์, 2544)

19. สร้างสารอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น folate ช่วยสร้างเม็ดเลือดแดงและวิตามินบี 2 ที่ช่วยบำรุงเส้นผมและเล็บ (Fuller, 1993)

4. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียในอาหารนอกจากจะใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะแล้ว การนำจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้ถูกนำมาใช้กันอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น อาหารหมักพื้นเมือง นมเปรี้ยว และนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม เป็นต้น เกศินี เมธาวัชรวงศ์ (2532) พบว่าการหมักเนื้อปลาโดยการเติมแบคทีเรียแลกติกจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและแบคทีเรียก่อโรคในเนื้อปลาได้ ได้แก่ *Bacillus* sp., *Achromobacter* sp., *Clostridium botulinum* type E, *Clostridium perfringens*,

Escherichia coli, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Shigella* sp., *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio cholerae*

ตามธรรมชาติของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ อาจมีผลมาจากผลิตภัณฑ์หลายชนิดที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น เช่น กรดที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นทำให้ค่าพีเอชลดลง ส่งผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นๆได้ โดยจากการศึกษาของทองคำ คิมหะมานนท์ (2538) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟักได้แก่ *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus casei*, *Pediococcus urinaeequi*, *Pediococcus dextrinicus*, *Pediococcus halophilus* และ *Pediococcus penyosaceus* พบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร 4 ชนิด คือ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. และ *Vibrio parahaemolyicus*

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ (2539) ได้ศึกษา *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากนมเปรี้ยวคือ *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delbrurckii* subsp. *bulgaricus* พบว่าสามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ได้ร้อยละ 61.1-75.5, *Salmonella typhimurium* ร้อยละ 40.5-62.1 และ *Escherichia coli* ร้อยละ 47.9-53.0

Schillinger และ Lucke (1989) ได้ศึกษาถึงกิจกรรมของ *Lactobacillus sake* ที่แยกได้จากเนื้อสัตว์จำนวน 19 สายพันธุ์ ในการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ แบคทีเรียแกรมบวกที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์คือ *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus devergens* และ *Listeria monocytogenes* ผลการศึกษาพบว่าน้ำหมักของ *Lactobacillus sake* มีกิจกรรมการยับยั้งต่อแบคทีเรียแกรมบวกเป็นส่วนใหญ่แต่ไม่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ โดยการศึกษานี้มีข้อสรุปว่าเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์เป็นแหล่งของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ เพราะว่าสามารถปรับตัวได้ดีในสภาวะของกระบวนการผลิต และยังมีความสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกที่มาจากแหล่งอื่น

Vignolo และคณะ (1993) ได้ศึกษาถึงกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากไส้กรอกหมักโดยใช้วิธี Agar well diffusion assay ซึ่งแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ประกอบด้วย *Lactobacillus casei* จำนวน 52 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus plantarum* จำนวน 48 สายพันธุ์ ผลการศึกษาพบว่าน้ำหมักที่ได้มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกสายพันธุ์ *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Leuconostoc lactis*, *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ยังมีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบบาง

สายพันธุ์โดยสายพันธุ์ที่ถูกยับยั้งได้แก่ *Escherichia coli, Proteus vulgaris* และ *Serratia marcescens*

Messi และคณะ (2001) ได้ศึกษาถึงการผลิตแบคเทอริโอซินและกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคต่างๆของ *Lactobacillus plantarum* 35d ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากไส้กรอกอิตาเลียน ผลการศึกษาพบว่าเชื้อชนิดนี้ผลิตแบคเทอริโอซินได้สูง โดยแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตขึ้นจะไปมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแลกติกในจีนัสเดียวกันได้มากที่สุด

Belgacem และคณะ (2008) ได้ศึกษาถึงการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจำนวน 48 สายพันธุ์จาก Gueddid ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักพื้นบ้านของประเทศตูนิเซีย พบว่าแบคทีเรียแลกติกจำนวน 4 สายพันธุ์ คือ MMZ04, 09, 13 และ 17 มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ เมื่อทำการจัดจำแนกพบว่าทั้ง 4 สายพันธุ์ จัดเป็น *Enterococcus feacium* โดยสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกเหล่านี้ผลิตขึ้นมีคุณสมบัติเป็นแบคเทอริโอซิน แต่มีเพียง enterocin MMZ17 เท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็น bactericidal และจัดอยู่ในกลุ่มของแบคเทอริโอซิน classIIa

5. สารยับยั้งแบคทีเรียที่ได้จากแบคทีเรียแลกติก

1. กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลกติกและกรดอะซิติกซึ่งมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ โดยกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากแบคทีเรียแลกติกชนิด homofermentative สังเคราะห์ขึ้นโดยวิถี Embden-Meyerhof Parnas pathway (EMP) ส่วนในกลุ่ม heterofermentative พบว่ามีการสังเคราะห์กรดแลกติก กรดอะซิติก และกรดฟอร์มิกรวมอยู่ด้วยโดยสังเคราะห์ผ่านวิถีฟอสโฟคีโตเลส การสะสมของกรดส่งผลให้พีเอชลดลงซึ่งจะมีผลต่อจุลินทรีย์ไม่ทนกรด เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Ostling and Lindgren, 1993) แต่ทั้งนี้ก็ยังขึ้นอยู่กับชนิดของกรดและชนิดของจุลินทรีย์อีกด้วย เช่น กรดอะซิติกความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์ทำลาย *Staphylococcus aureus* ได้ภายในระยะเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 20 องสาเซลเซียส ในขณะที่กรดแลกติกความเข้มข้นเพียง 0.75 เปอร์เซ็นต์ สามารถทำลายแบคทีเรียดังกล่าวในสภาพเดียวกัน

Niemand และคณะ (1983) พบว่าการเติมกรดแลกติกลงในเนื้อบดเพื่อให้มีค่าพีเอชเป็น 5.0 จะมีผลในการลดจำนวนของเชื้อในกลุ่มของ Enterobacteriaceae, Pseudomonads และ Brochospacta แต่จะไม่มีผลต่อ *Leuconostoc* และ *Pediococcus* เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตกรดได้ทำให้ตัวมันเองปรับสภาพในการทนกรด

Ziauddin และคณะ (1993) แสดงให้เห็นว่ากรดแลกติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค โดยพบว่ากรดแลกติกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และร้อยละ 2.5 จะสามารถ

ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ ได้แก่ *Bacillus*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ได้อย่างสมบูรณ์

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ (2536) รายงานว่า มีการนำกรดอะซิติกมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองต่างๆ เช่น ไส้กรอกเปรี้ยว โดยกรดอะซิติกมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อนำมาใช้ในการถนอมอาหารต้องใช้ที่ความเข้มข้นไม่ต่ำกว่าร้อยละ 3.6 แต่ Dickson (1992) พบว่าเมื่อใช้เนื้อวัวที่มีการเติม *Salmonella typhimurium* มาทดสอบกับกรดอะซิติกร้อยละ 2 จะมีผลในการลดจำนวนของแบคทีเรียดังกล่าวได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jay (1996) ที่ได้ศึกษาผลของกรดอะซิติกร้อยละ 2 ในการทำลาย *Salmonella enteritidis* และ *Salmonella typhimurium* ในน้ำสลัด โดยเติมเชื้อดังกล่าวลงในน้ำสลัดจำนวน $5.0X10^6$ เซลล์ พบว่าหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จะไม่พบเชื้ออยู่เลย

นอกจากการนำกรดแลกติกและกรดอะซิติกมาใช้เพียงเดี่ยวๆแล้ว ยังมีการใช้กรดแลกติกและกรดอะซิติกร่วมกัน ตัวอย่างเช่น Kotula and Thelappurate (1994) ได้ใช้กรดแลกติกและกรดอะซิติกกับเนื้อวัวพบว่าจะช่วยลดแบคทีเรียทั้งหมดและ *Escherichia coli* เป็นจำนวน 1 log CFU ต่อมิลลิลิตร หากเพิ่มเวลาในการทดสอบให้นานขึ้นผลการยับยั้งจากกรดทั้งสองชนิดนี้ก็จะเพิ่มขึ้น โดยสามารถลดจำนวนเชื้อที่ใช้ทดสอบลง 2 log CFU ต่อมิลลิลิตร

Ziauddin และคณะ (1996) ทำการศึกษาถึงผลของกรดอินทรีย์และเครื่องเทศในการยืดอายุการเก็บรักษาของเนื้อ โดยการฉีดพ่นกรดอะซิติก กรดแลกติก สารสกัดขิง สารสกัดกระเทียม และสารสกัดหอมลงบนชิ้นเนื้อ ทั้งในรูปแบบของการฉีดพ่นเพียงเดี่ยวๆและฉีดพ่นร่วมกันกับโซเดียมคลอไรด์ พบว่าสามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของเนื้อได้ ส่วนการสังเกตสี กลิ่น รส และการทดสอบทางประสาทสัมผัสอื่นๆของเนื้อที่มีการทดสอบพบว่าเป็นที่ยอมรับของผู้ทดลอบชิมและเมื่อพิจารณาคุณภาพทางประสาทสัมผัสจะดีกว่าเนื้อที่ไม่ได้ผ่านการทดสอบ แสดงว่ากรดอินทรีย์และเครื่องเทศที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ ช่วยควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เนื้อเน่าเสีย และพบว่าสามารถเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องได้

Conner และคณะ (1997) ทำการศึกษาถึงผลของกรดอินทรีย์ที่มีต่อ *Escherichia coli* 0157:H7 และ *Listeria monocytogenes* โดยเลือกใช้กรดอะซิติกและกรดแลกติกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 และ 4 ฉีดพ่นลงบนชิ้นเนื้อ แล้วนำชิ้นเนื้อดังกล่าวมาบดก่อนตรวจนับจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต พบว่าสามารถลดจำนวน *Escherichia coli* 0157:H7 ลงได้ 0.1 log CFU ต่อมิลลิลิตร ทั้ง 2 ระดับความเข้มข้น และสามารถลดจำนวน *Listeria monocytogenes* ลง 0.36 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 0.40 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ แสดงว่ากรดอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพในการยับยั้งทั้ง *Escherichia coli* 0157:H7 และ *Listeria monocytogenes*

Magnusson และคณะ (2003) ทำการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* 21B ในอาหารเหลวพบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถผลิต phenyllactic acid และ 4-hydroxy-phenyllactic acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเส้นใยหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Penicillium commune, Fusarium sporotrichioides* โดย phenyllactic acid มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 7.5-10.5 mg/ml

Hwanhlem และคณะ (2011) คัดแยกแบคทีเรียแลกติกจำนวน 133 สายพันธุ์จาก "ปลาส้ม" ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นบ้านของไทย พบว่ามีเพียง 14 สายพันธุ์ที่มีกิจกรรมการยับยั้ง *Salmonella* sp. ได้เป็นอย่างดี แต่เมื่อทดสอบต่อด้วย *Staphylococcus aureus* มีเพียง 7 สายพันธุ์เท่านั้นที่ยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งได้ดี โดยทั้ง 7 สายพันธุ์มีกิจกรรมการยับยั้ง *Escherichia coli* ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตามมีเพียง 4 สายพันธุ์ (LPS04, LPS17, LPS18, LD219) เท่านั้นที่มีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิดที่นำมาทดสอบได้สูงที่สุด โดยพบว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 4 สายพันธุ์ดังกล่าวเกิดจากอิทธิพลของกรดอินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้นมาในระหว่างกระบวนการหมัก

2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารที่ได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมในระหว่างการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในจีนัส *Lactobacillus* และจะสะสมเพิ่มขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจาก *Lactobacillus* ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสที่จะไปเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

Anders และคณะ (1970) ได้รายงานว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.2 mmol/ml สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactococcus* ได้ร้อยละ 50 และหากความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นเป็น 1.5 mmol/ml จะทำให้เซลล์ตายได้

Gilliland และ Speck (1977) พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างจาก *Lactobacillus acidophilus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้

3. ไดอะซิติล (Diacetyl) เป็นผลจากการย่อยสารอาหารของแบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์เป็นสารให้กลิ่น butter aroma ในผลิตภัณฑ์นมหมักและยังมีคุณสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์แต่ต้องใช้ปริมาณมาก (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

4. Reuterin (3-hydroxy-propanal) พบว่า *Lactobacillus reuteri* บางสายพันธุ์สามารถสร้างสาร Reuterin ซึ่งเป็นสารโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีน สามารถละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (Vogel *et al.*, 2002) ยีสต์และรา (Schnurer and Magnusson, 2005) รวมทั้งโปรโตซัว (Daseche and Klaenhammer, 1989) จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

Ganzle และคณะ (2003) ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากขนมปัง พบเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus reuteri* LTH2584 ที่สามารถผลิตสาร reutericyclin ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 349 ดาลตัน โดยสารตัวนี้แสดงการยับยั้งได้ในช่วงกว้างโดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกรวมถึงแบคทีเรียก่อโรคที่สร้างสปอร์ ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* และ *Bacillus cereus* ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5. Microgard สามารถต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา แต่ไม่ต่อต้านแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย กรดโพรพิโอนิก ไดอะซิติล กรดอะซิติก และกรดแลกติก (Dasechel and Klaenhammer, 1989)

6. Bacteriocin แบคเทอริโอซินถูกใช้ครั้งแรกโดย Jacob และคณะในปี ค.ศ.1953 เพื่อใช้เรียกสารประกอบประเภทโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียและมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยจุลินทรีย์ดังกล่าวมักเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน เช่น มีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิต แบคเทอริโอซิน หรือมีถิ่นที่อยู่ในบริเวณเดียวกันกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน คือ สารเปปไทด์ (Yang and Ray, 1994) หรือสารประกอบโปรตีน (Brink *et al.*,1994; Klaenhammer, 1988; Parente and Hill, 1992 and Pilet *et al.*, 1994) ที่สร้างจากแบคทีเรียซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน หรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่มีความไวต่อแบคเทอริโอซิน (Barefoot and Klaenhammer, 1983; Kawai *et al.*, 1994 and Nettles and Barefoot, 1993)

6.1 คุณสมบัติโดยทั่วไปของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียต่างชนิดกันมักมีคุณสมบัติทางเคมีและทางชีวภาพที่แตกต่างกัน เช่น มีน้ำหนักโมเลกุลที่แตกต่างกัน มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน และมีกลไกการทำลายจุลินทรีย์เป้าหมายที่แตกต่างกัน เป็นต้น โดยที่ Tagg และคณะ (1976) เป็นผู้เริ่มต้นในการกำหนดคุณลักษณะของแบคเทอริโอซินซึ่งมีคุณสมบัติหลักๆดังต่อไปนี้

6.1.1 ต้องเป็นโปรตีน

ด้วยเหตุที่แบคเทอริโอซินต้องเป็นโปรตีน ดังนั้นการทดสอบว่าสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจเป็นแบคเทอริโอซินหรือไม่ จึงมักทำการทดสอบโดยการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ในการทำลายสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจ ซึ่งถ้าเอนไซม์ย่อยโปรตีนสามารถทำลายสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจได้แสดงว่าสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่สนใจเป็นโปรตีน ดังนั้นสารดังกล่าวจึงน่าที่จะเป็นแบคเทอริโอซินซึ่งแบคเทอริโอซิน

หลายชนิดสามารถถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เช่น pepsin, trypsin และ pronase เป็นต้น ตัวอย่างเช่นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* ถูกลดกิจกรรมการยับยั้งด้วยเอนไซม์ proteinase K, papain, trypsin, α-chymotrypsin, pronase, pepsin และ protease (Todorov and Dicks, 2005)

6.1.2 ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการทำลายจุลินทรีย์ (bacteriocidal) หรือโดยการหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ (bacteriostatic)

แบคเทอริโอซินบางชนิดจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการทำลายจุลินทรีย์ เช่น Plantaricin KW 30 ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* KW 30 (Kelly *et al.*, 1996) และ Acidocin J 1229 ซึ่งผลิตโดย *Lactobacillus adcidophilus* JCM 1229 (Tahara and Kanatani, 1996) เป็นต้น ในขณะที่แบคเทอริโอซินบางชนิดจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยการหยุดการเจริญของจุลินทรีย์แต่ไม่ทำลายจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus sake* 148 (Sobrino *et al.*, 1991) เป็นต้น

6.1.3 สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ

คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่จำเพาะของแบคเทอริโอซินทำให้แบคเทอริโอซินแตกต่างจากสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิดที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติก เช่น กรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นต้น ซึ่งสารเหล่านี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์แบบไม่จำเพาะ การที่แบคเทอริโอซินสามารถไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะเนื่องจากก่อนที่แบคเทอริโอซินจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน (sensitive strain) ได้ แบคเทอริโอซินต้องไปจับกับตำแหน่งจับที่จำเพาะ (specific binding site หรือ specific receptor) ซึ่งมักอยู่ที่ผนังเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน เช่น จากการศึกษา Pediocin AcH ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Pediococcus acidilactici* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้หลายสายพันธุ์ เช่น *Pediococcus*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Propionibacterium*, *Listeria*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Brochothix*, *Clostridium botulinum* E เป็นต้น โดยการที่ Pediocin AcH มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกได้นั้น เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีโมเลกุลของกรด lipoteichoic ซึ่งเป็น receptor ของ Pediocin AcH ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกเกิดขึ้น ในขณะที่ในแบคทีเรียแกรมลบจะไม่มีโมเลกุลของกรด lipoteichoic จึงทำไม่สามารถดูดซับ Pediocin AcH ได้ จึงไม่เกิดการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ (Ray, 1992 and Bhunia *et al.*, 1991)

6.1.4 ต้องถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรม

เนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนดังนั้นในการสังเคราะห์แบคเทอริโอซินต้องผ่านกระบวนการ transcription และ translation เพื่อถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin gene) โดยยีนสำหรับแบคเทอริโอซินอาจเป็นยีนที่อยู่ใน plasmid หรือ chromosome ก็ได้ ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่ใน plasmid เช่น Coagulin ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Bacillus coagulans* I_4 (Hyronimus *et al.*, 1998) เป็นต้น และตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสทางพันธุกรรมจากยีนสำหรับแบคเทอริโอซินที่อยู่ใน chromosome ได้แก่ Plantaricin D ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* BFE 905 (Franz *et al.*, 1998) และ Plantaricin KW 30 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarm* KW 30 (Kelly *et al.*, 1996) เป็นต้น

6.2 การจำแนกแบคเทอริโอซิน

การจำแนกแบคเทอริโอซินสามารถทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับเกณฑ์ที่ใช้ในการจำแนก เช่น สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน มวลโมเลกุลของแบคเทอริโอซิน โครงสร้างทางเคมีของแบคเทอริโอซิน และกลไกการทำงานของแบคเทอริโอซิน เป็นต้น

Klaenhammer (1988) แบ่งแบคเทอริโอซินตามความสามารถในการยับยั้งเป็น 2 ชนิด คือ

1. แบคเทอริโอซินที่มีผลการยับยั้งในช่วงแคบ (narrow inhibitory spectrum) เป็นแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียในจีนัส (genus) เดียวกัน เช่น Diplococcin จาก *Lactococcus lactis* ssp. *cremolis* 346 ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม lactococci หรือยับยั้งแบคทีเรียในกลุ่มอื่นได้เล็กน้อย เช่น Lactacin F ยับยั้ง lactobacilli และ *Enterococcus faealis*

2. แบคเทอริโอซินที่มีผลในการยับยั้งในช่วงกว้าง (broad inhibitory spectrum) จัดเป็นแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น Nisin จาก *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก นอกจากนี้ Pediocin AcH จาก *Pediococcus acidilactici* ยับยั้ง pediococci, lactobacilli, *Leuconostoc*, bacilli, enterococci, staphylococci, listeriae และ *Clostridium*

Klaenhammer (1993) แบ่งแบคเทอริโอซินตามลักษณะโครงสร้างมวลโมเลกุลและความคงตัวต่อความร้อนได้เป็น 4 ชนิด

1. lantibiotic เป็นแบคเทอริโอซินที่มีขนาดเล็กและมีกรดอะมิโนเป็นองค์ประกอบประมาณ 19–37 โมเลกุล ซึ่งเป็นกรดอะมิโนชนิด α, β-unsaturated ประกอบด้วย dehydroalanine และ dehydrobutyrine และกรดอะมิโนชนิด thioether ซึ่งประกอบด้วย lanthionine และ

β-methyllanthionine โดยไม่มีกรดอะมิโนชนิดวงแหวนเป็นองค์ประกอบ มีพันธะ thioether 5 พันธะทำให้มีความแตกต่างจากแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆแบ่งได้เป็น 2 ชนิดย่อยๆ คือ

1.1 lantibiotic ชนิด A ซึ่งมีลักษณะโครงร่างเป็น screw-shaped มีมวลโมเลกุลประมาณ 2,164–3,488 ดาลตัน เช่น Nisin จาก *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* และ Lactacin F จาก *Lactobacillus sake* L45

1.2 lantibiotic ชนิด B ซึ่งมีลักษณะโครงร่างเป็น globular-shaped มีมวลโมเลกุลประมาณ 1,959-2,014 ดาลตัน เช่น Ancovonin จาก *Streptomyces* sp.

2. non-lantibiotic ขนาดเล็ก เป็นแบคเทอริโอซินที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 15,000 ดาลตัน มีความคงตัวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส มากกว่า 30 นาที เช่น Lactacin B จาก *Lactobacillus acidophilus* N2 และ *Lactobacillus lactis* ssp. *cremolis* 346 หรือที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที เช่น Lactacin F จาก *Lactobacillus acidophilus* 11088

3. non-lantibiotic ขนาดใหญ่ เป็นแบคเทอริโอซินที่มวลโมเลกุลมากกว่า 15,000 ดาลตัน ไวต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 60–100 องศาเซลเซียส 10–15 นาที เช่น Caseicin 80 จาก *Lactobacillus casie* B80

4. complex bacteriocin เป็นแบคเทอริโอซิที่มีโครงสร้างเปปไทด์ที่มีไขมันหรือคาร์โบไฮเดรตเกาะอยู่เช่น Lactacin 27 จาก *Lactobacillus helveticus* LP27 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินชนิดไกลโคโปรตีน

อย่างไรก็ตามแม้จะมีแบคเทอริโอซินจำนวนมากที่สามารถนำมาใช้เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ในอาหาร แต่ Nisin เป็นตัวเดียวเท่านั้นที่ถูกนำไปทำการผลิตในระดับอุตสาหกรรม และได้รับอนุญาตให้นำไปใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารซึ่งจะต้องทำให้อยู่ในรูปที่บริสุทธิ์เสียก่อน

6.3 กลไกการทำปฏิกิริยา

Hoover และคณะ (1993) ได้รายงานว่าการทำลายแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดย Nisin เกิดขึ้นได้โดยมีการดูดซับ (adsorption) Nisin ไปยัง cell envelope ซึ่งเป็นขั้นตอนแรกในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) ตามด้วยการทำลายกิจกรรม (inactivation) ของ sulfhydryl groups และจากการรายงานของ Murina (1996) พบว่าโมเลกุลของแบคเทอริโอซินซึ่งมีโครงสร้างแบบ α-helical หรือ β-sheet จะไปเกิด poration complexes ในเยื่อหุ้มเซลล์ เกิดการฉีกขาดและเซลล์สูญเสียความสามารถในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารต่างๆ มีผลให้เซลล์แบคทีเรียที่ไวต่อแบคเทอริโอซินถูกทำลายได้ โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกเป็น antimicrobial peptides ที่สังเคราะห์จากไรโบโซม ซึ่งการยับยั้งจะจำเพาะโดยตรงต่อแบคทีเรียแกรมบวกแต่จะไม่มีผลในการยับยั้งเซลล์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน (Bruno and Montville, 1993)

6.4 ความแตกต่างระหว่างแบคเทอริโอซินกับสารปฏิชีวนะ (antibiotic)

ถึงแม้แบคเทอริโอซินและสารปฏิชีวนะจะมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ แต่สารทั้งสองชนิดนี้ก็มีความแตกต่างกันหลายประการดังนี้

- แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนซึ่งถูกสังเคราะห์โดยการถอดรหัสสารพันธุกรรมจากยีน ในขณะที่สารปฏิชีวนะเป็นสารที่มีโครงสร้างทางเคมีได้หลายรูปแบบ และมักถูกสังเคราะห์โดยการเปลี่ยนแปลง primary metabolite ไปเป็น secondary metabolite ก่อนที่จะถูกหลั่งออกสู่ภายนอกเซลล์

- แบคเทอริโอซินจะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ และโดยส่วนใหญ่แล้วจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยแบคเทอโอซินมักเป็นจุลินทรีย์ที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ในขณะที่สารปฏิชีวนะบางชนิดเท่านั้นที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้อย่างจำเพาะ

6.5 รายงานการวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซิน

Brink และคณะ (1994) แยก *Lactobacillus* จากแตงกวาดอง เนยแข็ง ไส้กรอกหมัก หญ้าหมัก ช่องปาก และทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ 1,000 ไอโซเลต พบว่ามีเพียง 8 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น และได้คัดแยก *Lactobacillus salivarisin* M7 ที่สร้าง Salivarisin B ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Listeria monocytogenes, Bacillus cereus, Brochotrix thermosphacta, Enterococcus faecalis* และ *Lactobacillus* อีกหลายสายพันธุ์ ส่วน *Lactobacillus acidophilus* M46 สร้าง Acidocin B ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *Clostridium sporogines* และมีความไวต่อเอนไซม์ทริปซิน รวมทั้งสามารถทนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 20 นาที

Samelis และคณะ (1994) ได้ทำการคัดเลือก *Lactobacillus sake* 251 จากไส้กรอกหมัก พบว่า *Lactobacillus sake* 251 สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน Sakacin B เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS โดยเชื้อจะสร้างประกอบโปรตีนชนิดนี้มากที่สุดในช่วงปลายของระยะ exponential phase โดย Sakacin B มีความเสถียรในช่วงพีเอช 2.0-9.0 และมีความคงทนต่อความร้อน

Ivanova และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Streptococcus thermophilus* 81 พบว่าแบคเทอริโอซินที่เชื้อผลิตขึ้นสามารถยับยั้ง *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Escherichia coli*, *Yersinia pseudotuberculosis* และ *Yersinia enterocolitica* โดยกิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่พีเอชระหว่าง 3.0-10.0 และเมื่อเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 เดือน ก็ไม่เกิดผลกระทบต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซินดังกล่าวแต่อย่างใด

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Ogunbanwo และคณะ (2003) ศึกษาสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีผลต่อการเลี้ยง *Lactobacillus brevis* OG1 ที่ผลิตแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียในอาหาร โดยยับยั้ง *Escherichia coli* NCTC 10418 และ *Enterococcus faecalis* นอกจากนี้ยังพบว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ร่วมกับ yeast extracts (3.0%), NaCl (1.0-2.0%), glucose (1.0 %) และ Tween 80 (0.5%) ที่พีเอชเริ่มต้น 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จะมีผลทำให้ *Lactobacillus brevis* OG1 เพิ่มการผลิตแบคเทอริโอซิน

Savadogo และคณะ (2004) ทำการคัดแยกเชื้อ 8 สายพันธุ์ ของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากนมหมัก เมื่อทำการเทียบเคียงพบว่าเป็น *Lactobacillus fermentum*, *Pediococcus* spp., *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesneteroides* และ *Lactococcus* จากนั้นเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 16 ชั่วโมง แบคเทอริโอซินที่คัดแยกได้สามารถยับยั้ง *Enterococcus faecalis* 103907 CIP เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar drop diffusion test โดยกิจกรรมของแบคเทอริโอซินจะไวต่อเอนไซม์ α-chymotrypsin, trypsin และ pepsin แต่ทนต่อเอนไซม์ lipase และ catalase ในขณะที่เอนไซม์ amylase ไม่มีผลต่อกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน

Aslim และคณะ (2005) ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากผลิตภัณฑ์นมในประเทศตุรกี ได้แก่ *Lactobacillus bulgaricus* (6 สายพันธุ์), *Lactobacillus casei* (4 สายพันธุ์), *Lactobacillus plantarum* (2 สายพันธุ์), *Lactobacillus acidophilus* (2 สายพันธุ์), *Lactobacillus brevis* (2 สายพันธุ์), *Lactobacillus fermentum* (1 สายพันธุ์), *Lactobacillus lactis* (1 สายพันธุ์) และ *Lactobacillus helveticus* (1 สายพันธุ์) เมื่อทำการทดสอบการยับยั้ง *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* และ *Yersinia enterocolitica* พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ดังกล่าว โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตขึ้นจะไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนและยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

Todorov และคณะ (2007) ทำการคัดแยก *Lactobacillus plantarum* AMA-K ที่มีคุณสมบัติในการผลิตแบคเทอริโอซิน AMA-K จากนมหมักพื้นเมืองในประเทศซิมบับเว แบคเทอริโอซินดังกล่าวมีกิจกรรมการยับยั้ง *Listeria innocua* และ *Enterococcus faecalis* กิจกรรมการยับยั้งของแบคเทอริโอซินถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนและ Triton X-114 แบคเทอริโอซิน AMA-K มีคุณสมบัติของ bacteriolytic mode of action มีความทนต่อความร้อนที่อุณหภูมิ 100 °C และพีเอชในช่วงกว้าง

Hata และคณะ (2010) ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จาก "Tortilla" ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ขนมปังข้าวโพดพื้นเมืองของประเทศเม็กซิโก พบว่าสามารถคัดเลือก *Lactobacillus plantarum* A-1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*Lactobacillus plantarum* JCM1057) สูงที่สุด โดยเชื้อผลิตแบคเทอริโอซิน Plantaricin ASM1 ที่ถูกย่อยได้ด้วยเอนไซม์ trypsin มีความคงตัวต่อความร้อนและพีเอชในช่วงกว้างซึ่งแสดงให้เห็นถึงศักยภาพของการนำ Plantaricin ASM1 ไปประยุกต์ใช้ในการถนอมอาหาร

ศิรินาถ หนูเอก (2540) แยก *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN11) จากอาหารหมักประเภทส้มฟัก พบว่าแบคทีเรีย SN11 สามารถสร้างแบคเทอริโอซินที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus, Lactobacillus sake, Carnobacterium* sp. M11-25, *Escherichia coil, Escherichia coli* 0157:H7, *Listeria monocytogenes* 018 และ *Lactobacillus plantarum* โดยมีการเจริญและสร้างสารยับยั้งได้ดีเมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 5.5 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียส แบคเทอริโอซินที่ผลิตได้ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน จึงยังคงมีกิจกรรมที่อุณหภูมิสูง 90 องศาเซลเซียส เวลา 45 นาที มีความคงตัวที่ pH ระหว่าง 5.0-7.0 แต่ให้ค่ากิจกรรมสูงสุดที่ pH 4.0 และมีความไวต่อเอนไซม์ trypsin, α-chymotrypsin, pronase E และ pronase K แต่ทนต่อเอนไซม์ catalase

อัจฉรา หนูเพชร และคณะ (2547) ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักได้แบคทีเรียแลกติก 327 สายพันธุ์ พร้อมทั้งทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ ความสามารถทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15 ทนกรดที่ระดับพีเอช 2.0, 3.0 และ 4.0 ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง การเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ตลอดจนการเจริญได้ในสภาวะที่ปราศจากวิตามินบี 12 สามารถคัดเชื้อที่มีคุณสมบัติดังกล่าวได้ 67 สายพันธุ์ และเมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยวิธี Agar spot พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ทดสอบได้ทั้ง 13 สายพันธุ์ โดยมีขอบวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปทดสอบการยับยั้งโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งร้อยละ 80-100 เมื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอดที่ระดับพีเอช 2.0, 3.0 และ 4.0 ในเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถอยู่รอดที่ระดับพีเอช 4.0 ได้เกือบร้อยละ 100 ส่วนที่พีเอช 2.0 และ 3.0 มีจำนวนลดลง 1 log cycle โดยสายพันธุ์ LA71 (*Lactobacillus plantarum*) สามารถอยู่รอดได้ดีที่สุด

7. Low-molecular-mass (LMM) สารกลุ่มนี้สามารถต่อต้านได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดย Niku-Paavola และคณะในปี ค.ศ. 1999 รายงานว่า สารประกอบกลุ่ม LMM จะเป็นกลุ่มสารพวก small hydrophobic heterocyclic หรือ aromatic structured ซึ่งจะมีความคล้ายกับ

benzoic acid (pKa = 4.19) สามารถทำงานได้ดีที่พีเอชต่ำและมีความคงตัวต่อความร้อน (Brul and Coote, 1999)

Bello และคณะ 2007 ทำการศึกษาปรับปรุงคุณภาพและยืดอายุการเก็บของขนมปังโดยการใช้สารยับยั้งที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* FST 1.7 เมื่อทดสอบการยับยั้งกับเชื้อรา พบว่าสามารถคัดเลือกสารที่จุลินทรีย์ชนิดนี้ผลิตคือ กรดแลกติก, phenyllactic acid และ cyclic dipeptides คือ cyclo(L-Leu-L-Pro) และ cyclo(L-Phe-L-Pro) ซึ่งแสดงการยับยั้งได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถผลิตสารยับยั้งที่มีโมเลกุลขนาดเล็กแต่ยังไม่สามารถจำแนกชนิดได้ เช่น *Lactobacillus delbrueckii* supsp. *bulgaricus* 7994 ผลิตสารยับยั้งที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 700 ดาลตัน และสามารถยับยั้ง *Pseudomonas fragi* และ *Staphylococcus aureus* (Abdel-Bar, 1987 อ้างโดย ชุตินันท์ รัตนไพบูลย์สวัสดิ์, 2547) *Lactobacillus casei* GG ผลิตสารยับยั้งที่มีโมเลกุลเล็กกว่า 1,000 ดาลตัน ทนความร้อน ไม่มีสมบัติเป็นโปรตีน แสดงกิจกรรมยับยั้งในสภาวะที่เป็นกรดมีค่าพีเอชในช่วง 3-5 สามารถยับยั้ง *Escherichia coli*, *Streptococcus* spp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp. และ *Bacillus* sp. (Elo and Salminen, 1994 อ้างโดย ชุตินันท์ รัตนไพบูลย์สวัสดิ์, 2547) และ *Lactobacillus acidophilus* ผลิตสารยับยั้งโมเลกุลเล็กกว่า 200 ดาลตัน โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ได้ (Hamdan and Mikolajik, 1994 อ้างโดย ชุตินันท์ รัตนไพบูลย์สวัสดิ์, 2547)

8. กรดไขมัน (Fatty acids) จากการแยกสารที่ได้จากการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* MiLAB 14 ในอาหารเหลว พบว่ามี fatty acid คือ 3-hydroxylated fatty acid ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ โดยฤทธิ์ต้านเชื้อราจะเพิ่มขึ้นตามความยาวของ chain ที่เพิ่มขึ้น โดยพบว่า caprylic acid (C_8) และสายที่ยาวกว่านี้จะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้สูงสุด มีรายงานการทดสอบฤทธิ์ของ fatty acid และ monoglyceride ต่อการเจริญของ *Candida albicans* พบว่าที่ความเข้มข้น 10 mM ของ fatty acid มีเพียง capric acid (C_{10}) และ lauric acid (C_{12}) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ชนิดนี้ได้ นอกจากนี้ยังพบว่า fatty acid จะมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของยีสต์ได้ดีกว่าเชื้อรา โดยค่า minimum inhibitory concentration (MIC) ของ hydroxylated fatty acid ต่อเชื้อราและยีสต์จะอยู่ในช่วง 10-100 กรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งถ้าเปรียบเทียบกับ Amphotericin B ซึ่งมีค่า MIC อยู่ในช่วง 10-100 กรัมต่อมิลลิลิตร เช่นกัน (Schnurer and Magnusson, 2005)

Nieman (1954 อ้างโดย James and Nicoholas, 1980) พบว่าโดยทั่วไปแล้วแบคทีเรียแกรมบวกจะมีความไวต่อสารในกลุ่มของ long chain fatty acids มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสารพวก long chain fatty acids (C_{12}, C_{14}, C_{16}, $C_{18:1}$) นี้สามารถแสดงผลการยับยั้งได้ในสภาวะเป็นกรด นอกจากนี้ Kondo และ Kanai (1972 อ้างโดย James and Nicoholas, 1980) ยังพบว่า long chain fatty

acids (C_{14}, $C_{18:1}$, $C_{19:2}$) สามารถแสดงผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ในการทดสอบได้อย่างมีประสิทธิภาพ

จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพบว่าสารพวก long chain fatty acids มีฤทธิ์ยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรีย รา และยีสต์ โดย fatty acid ที่เป็นสายตรง (C_{12}), monosaturated fatty acid ($C_{16:1}$) และ polysaturated fatty acid ($C_{18:2}$) สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีที่สุดของสารแต่ละกลุ่ม โครงสร้างของ fatty acid ที่เป็น cis แสดงการยับยั้งได้มากกว่าโครงสร้างที่เป็น trans นอกจากนี้ สารพวก short chain lengths (C_{10}-C_{12}) สามารถยับยั้งยีสต์ได้ในขณะที่แบคทีเรียแกรมลบจะมีความไวต่อ very-short-chain fatty acids จากการศึกษาของ Kabara (1955 อ้างโดย James and Nicoholas, 1980) ยังพบอีกว่าสารในกลุ่ม acetylenic fatty acids มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราได้ดีกว่าสารในกลุ่ม ethylenic fatty acids

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถสร้างสารยับยั้งต่างๆที่มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้ยาวนานมากยิ่งขึ้น สารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกจัดเป็นสารกันเสียชีวภาพ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้ง

แบคทีเรียแลกติก	ผลิตภัณฑ์
Lactobacillus plantarum	low-molecular-mass compounds (benzoic acid, cyclo(glycyl-L-leucyl), mevalonolactone, methyl hydantoin)
Lactococcus spp.	Diacetyl
Lactobacillus reuteri	Reuterin
Lactobacillus acidophilus N2	Lactacin B
Lactobacillus helveticus	Helveticin B
Lactobacillus plantarum	Plantacin A
Lactobacillus lactis ssp. *lactis*	Nisin
Pediococcus acidilactici	Pediocin AcH
Lactobacillus acidophilus M46	Acidocin N
Enterococcus feacium	Enterocin EL1
Lactobacillus casei B80	Caseicin 80

ตารางที่ 1 (ต่อ)

แบคทีเรียแลกติก	ผลิตภัณฑ์
Lactobacillus cremoris 346	Diplococcin
Lactobacillus lactis CNRZ481	Lactacin 481
Lactobacillus sake	Sakacin K
Pediococcus acidilactici	Pediocin AcH/PA-1/SJ-1
Pediococcus parvulus	Pediocin AcH/PA-1/SJ-1
Lactobacillus plantarum	Pediocin AcH/PA-1/SJ-1
Leuconostoc gelidium	Leucosin A/B-Talla
Leuconostoc carnosum	Leucosin A/B-Talla
Leuconostoc mesenteroides	Mesentericin Y105
Enterococcus faecium	Enterocin A
Enterococcus faecium	Enterocin P
Enterococcus faecium	Enterocin B

ที่มา: ดัดแปลงจาก Schillinger (1990); Brink และคณะ (1994); Lyon และคณะ (1995); Hoover และ Tyopponena และคณะ (2003)

6. แบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร

6.1 *Staphylococcus aureus* (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Staphylococcus เป็นแบคทีเรียใน family Micrococcaceae มีรูปร่างกลม ไม่เคลื่อนที่ มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8-1.0 μm ติดสีแกรมบวก เรียงตัวเป็นรูปคล้ายพวงองุ่น เมื่อย้อมแกรมจะเห็นว่าอยู่เป็นเดี่ยวๆ เป็นคู่ และอยู่กันเป็นกลุ่มต่อกันเป็นสายโซสั้นๆ มีน้อยชนิดที่สร้างแคปซูลซึ่งไปเพิ่มความรุนแรงทำให้เกิดโรค

Staphylococcus เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) แต่ส่วนใหญ่เจริญได้ดีในที่ที่มีอากาศ บางสายพันธุ์ต้องใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในการเจริญด้วย สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 6.5-46 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 30-37 องศาเซลเซียส pH ที่เหมาะสมคือ 7.0-7.5 แต่สามารถเจริญได้ที่พีเอช 4.2-9.3 ต้องการ growth factor

2 ชนิด คือ adenine และ thiamine แต่เมื่อเจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศจะต้องการ uracil และ pyruvate สามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป เช่น nutrient agar

ใน agar plate โคโลนีของ *Staphylococcus* มีลักษณะกลมเรียบ นูนเล็กน้อย มีขนาดตั้งแต่ 1-4 มิลลิเมตร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยง โคโลนีจะขุ่นและทึบแสงมากกว่า *Streptococcus* และ *Pneumococcus* โคโลนีของสายพันธุ์ *Staphylococcus aureus* จะมีสีเหลืองทอง สีเกิดขึ้นเนื่องจากรงควัตถุพวก carotenoid บางครั้งพบว่าโคโลนีมีสีตั้งแต่สีส้มจัดจนถึงสีเหลืองอ่อนทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพการเลี้ยง

การทำให้เกิดโรค

Staphylococcus aureus มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนในอาหารหลายชนิด โดยเชื้อปนเปื้อนในอาหารเหล่านี้ทางแผล ฝี หนอง ที่ผิวหนังของผู้ปรุงอาหาร เช่น อาหารพวกคัสตาร์ด สลัด อาหารพวกเนื้อและผลิตภัณฑ์นม (dairy product) อาหารที่ปนเปื้อน *Staphylococcus aureus* จะมีกลิ่นรสปกติ

อาการจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนเอนเทอโรทอกซิน (enterotoxin) A, B, C1, C2, D และ E ภายในเวลา 1-6 ชั่วโมง ยิ่งบริโภค enterotoxin มากอาการยิ่งเกิดขึ้นรวดเร็วและรุนแรง enterotoxin ที่พบบ่อยคือ A และ D ทำให้เกิดอาการอักเสบของเซลล์บุทางเดินอาหารและถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วกลับมาทำให้เกิดอาการอาหารเป็นพิษ โดยมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องร่วง แต่มักไม่มีไข้และมักหายเองภายใน 24 ชั่วโมง แต่อาจเกิดอาการรุนแรงได้ในทารก คนชรา หรือผู้ที่มีร่างกายอ่อนแอ

6.2 *Bacillus cereus* (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Bacillus เป็นแบคทีเรียใน family Bacillaceae รูปแท่ง ขนาด 1.0-1.2 x 3.0-10 ไมโคเมตร มักจะเรียงตัวเป็นสายมีสปอร์เป็นรูปไข่อยู่ตรงกลาง สปอร์ไม่ใหญ่กว่าตัวเซลล์ ติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้และไม่มีแคปซูล

การทำให้เกิดโรค

พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในอากาศ น้ำ ดิน และพืชผักต่างๆ เจริญได้ในที่มีอากาศและมีสปอร์ที่ทนความร้อน ถ้าสปอร์อยู่ในอาหารที่ปรุงเรียบร้อยแล้วและตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 30-50 องศาเซลเซียส สปอร์จะงอกเพิ่มจำนวนและสร้าง toxin เมื่อทานอาหารที่ปนเปื้อนเข้าไปทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษซึ่งมีลักษณะอาการ 2 แบบ คือ

1. ถ้าบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินที่ทำให้ท้องเสีย (diarrheal toxin) จะมีระยะฟักตัวนานประมาณ 8-17 ชั่วโมง จึงเกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย บางรายมีอาการ

อาเจียน อาการจะเป็นนานเฉลี่ย 12-24 ชั่วโมง อาหารที่มักจะเป็นต้นเหตุได้แก่ อาหารพวกเนื้อ น้ำซุป และน้ำซอส

2. ถ้าบริโภคอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินที่ทำให้อาเจียน (vomiting หรือ emiting toxin) toxin นี้ทนต่อความร้อน จะทำให้เกิดอาการขึ้นหลังจากรับประทาน 1-5 ชั่วโมง มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง 1 ใน 3 ของผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย อาการจะเป็นนาน 6-24 ชั่วโมง อาหารที่มักจะเป็นต้นเหตุ ได้แก่ ข้าวผัด

6.3 *Listeria monocytogenes* (สุมาลี เหลืองสกุล, 2535)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ท่อนสั้น มักเรียงตัวเป็นสายต่อกัน 3-5 เซลล์ หรือมากกว่านั้น เซลล์มีอายุ 18-24 ชั่วโมง ไม่สร้างสปอร์หรือแคปซูล อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตคือ 37 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำถึง 2.5 องศาเซลเซียส สามารถอยู่รอดในที่ที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 20 นาน 8 สัปดาห์ และสามารถทนความร้อนได้ดี *Listeria monocytogenes* สามารถพบได้ทั่วไปในน้ำ น้ำเสีย อุจจาระคนและสัตว์ สำหรับในอาหารที่มักพบแบคทีเรียชนิดนี้ ได้แก่ นม เนื้อ ไก่ และอาหารทะเล เป็นต้น

การทำให้เกิดโรค

Listeria monocytogenes เป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค Listeriosis ซึ่งมีอาการโลหิตเป็นพิษและเยื่อหุ้มสมองอักเสบมักพบในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันอ่อนแอหรือทารกที่เกิดจากมารดาที่ได้รับเชื้อขณะตั้งครรภ์

6.4 *Escherichia coli* (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Escherichia coli เป็นแบคทีเรียแกรมลบ เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ขึ้นได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ MacConkey จะให้โคโลนีสีชมพูหรือสีแดงเนื่องจากการสลายแลกโตส บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB (Eosin methylene blue) จะให้โคโลนีมีลักษณะสะท้อนแสงแววววาวที่เรียกว่า metallic sheen

การทำให้เกิดโรค

Escherichia coli มีถิ่นอาศัยอยู่ในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น ปกติจะไม่ก่อโรค (normal microbiota) แต่มีบางสายพันธุ์ก่อโรคในเนื้อเยื่อและอวัยวะบางอย่างได้ โดยมากจะเป็นกับระบบทางเดินปัสสาวะ นอกจากนี้ยังก่อโรคท้องร่วงได้ กลุ่มของ *Escherichia coli* ที่ทำให้เกิดโรคท้องร่วงแบ่งเป็น

Enterotoxicgenic *Escherichia coli* (ETEC)

ทำให้เกิดการท้องร่วงอย่างอ่อนจนถึงขั้นรุนแรง ETEC สร้าง enterotoxin 2 ชนิด คือ

1. heat-labile toxin (LC) เป็น toxin ที่ถูกทำลายด้วยความร้อน ออกฤทธิ์เช่นเดียวกับ cholera toxin (CT) ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ adenyl cyclase ในลำไส้เป็นผลให้เอนไซม์นี้มีปริมาณมากขึ้น ทำให้ adenosine triphosphate (ATP) เปลี่ยนเป็น cyclic adenosine monophosphate (C-AMP) และเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์โดยมีการขับน้ำและเกลือแร่ต่างๆ ออกมาสู่ทางเดินอาหารเป็นจำนวนมาก ทำให้เกิดอาการท้องร่วงคล้ายอหิวาตกโรค

2. heat-stable toxin (ST) เป็น toxin ที่ทนต่อความร้อน ทำให้เกิดท้องร่วงในเด็กทารก มักระบาดในสถานเลี้ยงเด็ก ซึ่งเป็นสาเหตุของการตายของทารกในประเทศที่กำลังพัฒนา ส่วนในผู้ใหญ่ทำให้เกิด traveller's diarrhea คือ เกิดการท้องร่วงกับนักท่องเที่ยวที่เดินทางเข้าไปในประเทศที่กำลังพัฒนา

Enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC)

เป็น *Escherichia coli* ที่สามารถบุกรุกเซลล์เยื่อบุของลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดอาการคล้ายโรคบิด คือ มีไข้ เป็นตะคริว ท้องร่วง ถ่ายเป็นมูกเลือด

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC)

เป็นสาเหตุของการเกิดโรคท้องร่วงเนื่องจากจะเข้าไปทำให้เกิดการติดเชื้อที่ epithelial cell ในชั้น mucosa ของลำไส้ เมื่อเข้าไปแล้วจะเพิ่มจำนวนอย่างมากมายและปล่อยสารพิษออกมาทำให้เกิดอาการท้องร่วง มักจะระบาดในทารกแรกคลอดในสถานรับเลี้ยงเด็ก

Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC)

ทำให้เกิด hemorrhagic colitis คือ ถ่ายเป็นเลือดอย่างมากแต่ไม่มีไข้

Enteroautoagglutinate *Escherichia coli* (EAggEC)

ทำให้เกิดอาการท้องร่วงในเด็กที่อายุต่ำกว่า 6 เดือน

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

สิ่งที่ส่งตรวจเป็นอุจจาระหรือปัสสาวะ ในกรณีที่เกิดโรคติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะนำมาขีดบน blood agar และ MacConkey agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง สายพันธุ์ที่ก่อโรคจะเจริญบน MacConkey agar โดยจะให้สีชมพู ทำการทดสอบทางชีวเคมี ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่ก่อโรคจะไม่เจริญบน MacConkey agar และ blood agar

โดยสรุปสิ่งส่งตรวจเป็นอุจจาระควรลงใน blood agar, MacConkey agar และ SS agar เพื่อป้องกันความผิดพลาด สำหรับ *Escherichia coli* เมื่อโคโลนีขึ้นมาแล้ว ทดสอบ TSI agar ให้ผล acid slant acid butt และสร้างก๊าซ ไม่ให้ H_2S ทดสอบ IMViC test ให้ผล ++-- จะบอกได้ว่าเป็น

Escherichia coli แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าเป็น pathogenic *Escherichia coli* หรือไม่ ต้องคัดเลือกโคโลนีไปทำทาง serology

6.5 *Vibrio parahaemolyticus* (อรษา สุตเธียรกุล, 2541)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปแท่งขนาด 0.5-0.8 x 1.4-2.6 μm สามารถเจริญได้ในที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) จัดเป็นพวก mesophile คือเจริญได้ที่อุณหภูมิระหว่าง 15-42 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญคือ 30-35 องศาเซลเซียส ช่วง pH ที่เหมาะสมที่สุดในการเจริญ คือ 7.6-8.6 ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญ (halophile) โดยเจริญได้ในเกลือโซเดียมคลอไรด์มีความเข้มข้นอยู่ระหว่างร้อยละ 0.5-8.0 แต่ความเข้นข้นที่เหมาะสมที่สุดคือร้อยละ 2-3

แหล่งของโรค

Vibrio parahaemolyticus พบได้ในน้ำทะเลทั่วโลก บริเวณชายฝั่งทะเล ตะกอนโคลน (sediment) อนุภาคแขวนลอย (suspened particles) แพลงค์ตอน ปลา ปู กุ้ง และหอย การกระจายตัวของเชื้อในสิ่งแวดล้อมขึ้นอยู่กับความแตกต่างของฤดูกาล ในช่วงฤดูร้อนจะพบเชื้อมากกว่าฤดูหนาว จะพบเชื้อได้น้อยในน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 13-15 องศาเซลเซียส ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส เชื้อจะไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้ยังสามารถพบเชื้อได้ใน zooplankton และเพิ่มจำนวนมากขึ้นในทะเล สำหรับประเทศไทยอุณหภูมิทั้งปีไม่แตกต่างกันมากนักดังนั้นการระบาดของเชื้อจึงพบได้ทุกเดือนตลอดทั้งปี บริเวณอ่าวไทยตอนบนซึ่งมีประชากรอยู่หนาแน่นจะมีการปนเปื้อนและแพร่กระจายของ *Vibrio parahaemolyticus* มากกว่าบริเวณชายฝั่งทะเลอันดามัน

การทำให้เกิดโรค

Virulence factor ที่สำคัญแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

1. Thermostable direct hemolysin (tdh)

Vibrio parahaemolyticus จะพบอยู่ทั่วไปในน้ำทะเลและปนเปื้อนในอาหารทะเลต่างๆ แต่ไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ที่ทำให้เกิด gastroenteritis พบว่าสายพันธุ์ที่ทำให้เกิดโรคจะสามารถสร้าง hemolysin ซึ่งทำให้เม็ดเลือดแดงของคนหรือสัตว์แตกแบบสมบูรณ์ (β-hemolysis) ดังนั้น hemolysin นี้จึงเป็นปัจจัยสำคัญที่ก่อให้เกิดโรค (virulence factor) ซึ่งต่อมาเรียกว่า thermostable direct hemolysin (tdh) เนื่องจากไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที จากการศึกษาในเวลาต่อมา tdh เป็น spore-forming toxin คือออกฤทธิ์โดยตรงกับเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดรูและเซลล์แตกในเวลาต่อมา

2. Thermostable direct hemolysin-related hemolysin (trh)

พบครั้งแรกในปีพ.ศ. 2528 ที่เกาะ Maldives มีรายงานผู้ป่วยท้องร่วงจากการรับประทานอาหารทะเล 51 ราย พบ *Vibrio parahaemolyticus* สามารถสร้าง hemolysin ชนิดใหม่ คือ trh ซึ่งเป็นโปรตีนประกอบด้วยกรดอะมิโน 189 ตัว มีฤทธิ์คล้ายคลึงกับ tdh คือทำให้เม็ดเลือดแดงของสัตว์บางชนิดแตกทำให้เกิดการสะสมน้ำในลำไส้ เพิ่มการซึมผ่านของของเหลวออกจากหลอดเลือดที่ผิวหนัง และมีผลต่อกล้ามเนื้อหัวใจ

Vibrio parahaemolyticus ก่อให้เกิด gastroenteritis เมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อเข้าไปประมาณ 106-109 เซลล์ ระยะฟักตัวประมาณ 4-9 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อและภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย อาการที่แสดงออกที่สำคัญคืออุจจาระร่วง ปวดท้อง (abdominal cramps) คลื่นไส้ อาเจียน อาจมีไข้ ผู้ป่วยบางรายอุจจาระอาจมีมูกเลือดปน ระยะเวลาในการป่วยประมาณ 2-3 วัน ในรายที่รุนแรงอาจนานกว่า 1-2 สัปดาห์ โดยปกติมักหายเอง

6.6 *Salmonella* (พิไลพรรณ พงษ์พูล, 2531)

ลักษณะรูปร่างและสรีรวิทยา

Salmonella มีเซลล์ลักษณะเป็นท่อนสั้นๆ เคลื่อนที่ได้รวดเร็ว ไม่สร้างสปอร์ ติดสีแกรมลบ เป็น aerobic gram negative rod ไม่สามารถ ferment lactose ก่อโรคในลำไส้สัตว์เลือดอุ่นได้หลายชนิดรวมทั้งมนุษย์ด้วย บางสายพันธุ์ที่แยกเชื้อได้ใหม่ๆจะมีแคปซูลทำให้โคโลนีมีลักษณะมูก

Antigenic structure พบว่า *Salmonella* มี antigen อยู่ 3 ชนิด คือ

1. Somatic antigen (O) เป็นส่วนของผนังเซลล์ มีคุณสมบัติเหมือน O-antigen ของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ คือ ทนความร้อน ทนกรด และแอลกอฮอล์

2. Flagella antigen (H) เป็นส่วนของ flagella เตรียมได้โดยเติมฟอร์มาลินลงในเชื้อสายพันธุ์ที่ไม่เคลื่อนที่ ทำลาย H-antigen ได้โดยใช้ความร้อนอุณหภูมิที่สูงกว่า 60 องศาเซลเซียส หรือโดยใช้แอลกอฮอล์หรือกรด

3. Capsular antigen (Vi) จะไปรบกวนปฏิกิริยาตกตะกอน O-antigen ของสายพันธุ์ที่แยกได้ ทำลายได้โดยใช้ความร้อนที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง หรือโดยการใช้กรดหรือฟีนอล

การทำให้เกิดโรค

Salmonella สร้างสารพิษชนิด endotoxin ซึ่งจะปล่อยสารพิษนี้ออกมาในอาหารเลี้ยงเชื้อหรือ host ได้ก็ต่อเมื่อเซลล์ตายหรือถูกทำลาย โดยปกติแล้วจะเข้าสู่ร่างกาย host ได้ทางปากจากการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่ม

Salmonella มีทั้งหมดประมาณ 1,930 serotype ชนิดที่เป็นสาเหตุของโรค Salmonellosis มี 3 สปีชีส์ คือ *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis* และ *Salmonella enteritidis* โดย *Salmonella* ทำให้เกิดโรคได้ทั้งคนและสัตว์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 ก่อให้เกิดโรคเฉพาะในคนคือ *Salmonella* ซึ่งพบตามธรรมชาติ ก่อให้เกิดโรคเฉพาะในคนและคนเหล่านี้ที่จะเป็นพาหะของเชื้อ

- กลุ่มที่ 2 ก่อให้เกิดโรคได้ทั้งคนและสัตว์ซึ่งพบเป็นส่วนใหญ่ของ *Salmonella* ทั้งหมด สัตว์ต่างๆที่เป็นโรค อาทิ หมู หนู เป็ด และไก่ เป็นต้น หรือที่พบบ่อยคือ *Salmonella typhimurium* และ *Salmonella anatum* เป็นต้น

การติดเชื้อส่วนใหญ่จะพบลักษณะอาการใน 3 รูปแบบนี้ผสมผสานกัน

1. Enteric fever หมายถึง ไข้ typhoid และ paratyphoid เชื้อจะเข้าสู่ร่างกายทางปาก โดยติดมากับอาหารหรือน้ำดื่ม ผ่านกระเพาะอาหารเข้าไปถึงลำไส้เล็ก เข้าสู่ท่อน้ำเหลือง และเข้าสู่กระแสเลือดไปสิ้นสุดที่อวัยวะต่างๆรวมทั้งลำไส้ด้วย เชื้อจะแบ่งตัวในลำไส้แล้วจะขับออกไปทางอุจจาระ

2. Gastroenteritis หรือ *Salmonella* food poisoning หมายถึง อาหารเป็นพิษ (food poisoning) เนื่องจาก *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* หรือ *Salmonella derby* เชื้อจะไม่เข้าสู่กระแสเลือด และไม่เกิดการติดเชื้อที่อวัยวะภายในหลังจากการรับประทานอาหารที่มีเชื้อปนเปื้อนอยู่ แต่เชื้อจะไปทำให้เกิดการอักเสบของลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ระยะฟักตัวอยู่ในช่วงระหว่าง 8-48 ชั่วโมง ผู้ป่วยจะมีอาการไข้ หนาวสั่น คลื่นไส้ อุจจาระร่วง ในรายที่ไม่รุนแรงอาจหายได้เองภายในเวลา 2-4 วัน

3. Septicemia การติด *Salmonella choleraesuis* โดยเชื้อจะเข้าสู่ร่างกายทางปากแต่จะไม่เกิดอาการทางลำไส้ เชื้อจะเข้าไปทางกระแสโลหิตทำให้เกิดการอักเสบเป็นหนอง ฝี ตามอวัยวะภายใน เช่น ทำให้เกิดเยื่อหุ้มสมองอักเสบ กระดูกพรุน อักเสบ ปวดบวม เยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในผู้ป่วยที่มีสุขภาพไม่แข็งแรงและความต้านทานต่ำ

การวินิจฉัยทางห้องปฏิบัติการ

1. Enrichment culture ใส่สิ่งตรวจซึ่งเป็นอุจจาระลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ selenite F หรือ tetrathionate broth อาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิดนี้จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นในลำไส้ แต่จะเร่งการเจริญของ *Salmonella* บ่มเชื้อไว้ 1-2 วัน นำลงไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็งต่อไป

2. Selective medium cultures นำสิ่งตรวจไปป้ายบน SS (Salmonella-Shigella) agar หรือ deoxycholate-citrate agar ซึ่งจะไปเร่งการเจริญของ *Salmonella* และ *Shigella* ให้เจริญได้ดีกว่าพวก coliform

3. Differential medium cultures ได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ Eosin-methylene blue, MacConkey หรือ Deoxycholate อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้จะแยกออกได้ว่า โคโลนีที่ขึ้นมานั้นเป็นชนิดย่อยสลายแลกโตส แบคทีเรียพวกแกรมบวกจะถูกยับยั้งการเจริญ Bismuth sulfite เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่บ่งชี้ *Salmonella typhi* ได้รวดเร็วมาก เพราะให้โคโลนีสีดำเนื่องจากสร้างก๊าซ H_2S

4. Final identification นำโคโลนีที่สงสัยว่าเป็น *Salmonella* ไปทดสอบทางชีวเคมี จากนั้นนำไปทดสอบทาง serology

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทำการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

2. เพื่อประเมินประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

3. เพื่อศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

4. เพื่อศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

ขอบเขตการวิจัย

ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้านจากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ทั้งอาหารหมักจากสัตว์และอาหารหมักจากพืช จากนั้นนำมาคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ทำการประเมินความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ทดสอบ ศึกษาคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก รวมทั้งศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในระดับห้องปฏิบัติการ อาทิ การทนต่อเกลือน้ำดี และการทนต่อกรด

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้เชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

2. ทราบถึงประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

3. ทราบถึงคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

4. ทราบว่าแบคที่เรียแลกติกที่คัดเลือกมีคุณสมบัติของการเป็นโปรไบโอติกหรือไม่ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ต่อไปในอนาคต

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

วัสดุ

1. วัตถุดิบที่ใช้

1.1 อาหารหมักจากสัตว์ ได้แก่ ปลาส้ม กุ้งส้ม ไตปลา ปลาร้า หนาง แหนม กะปิ หอยดอง และน้ำเคย

1.2 อาหารหมักจากพืช ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก สะตอดอง หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง และกิมจิ

2. จุลินทรีย์ที่ใช้

2.1 แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้คัดเลือกและทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	ที่มา
Bacillus cereus	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Escherichia coli	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Listeria monocytogenes	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Salmonella sp.	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Staphylococcus aureus	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่
Vibrio parahaemolyticus	ห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่

2.2 แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ทดสอบ

แบคทีเรียแลกติก	ที่มา
JH1	กุ้งส้ม
JH4	กุ้งส้ม
JHa4	กุ้งส้ม
JOa1	สะตอดอง
JO6	สะตอดอง
JO16	สะตอดอง
JR21 (*Lactobacillus plantarum* JR21)	กะปิ
JB10	แหนม

3. สารเคมี อาหารเลี้ยงเชื้อ และเอนไซม์

Chemical media and enzyme	Company/Grade/Country
1. De Man Rogosa Sharpe (MRS)	Himedia/Analytical/India
2. NaCl	Labscan/Analytical/Thailand
3. HCl	Labscan/Analytical/Thailand
4. NaOH	Merck/Analytical/Germany
5. yeast extract	Ajex Finechem/Analytical/Australia
6. nitrogen gas	Ajex Finechem/Analytical/Australia
7. peptone water	Ajex Finechem/Analytical/Australia
8. tween 80	Ajex Finechem/Analytical/Australia
9. bile salt (Oxgall)	Himedia/Analytical/India
10. cysteine-HCL	Himedia/Analytical/India
11. $NaHCO_3$	Fluka/Germany
12. $MgHO_4.7H_2O$	Ajex Finechem/Analytical/Australia
13. $CaCl_2.6H_2O$	Ajex Finechem/Analytical/Australia
14. KH_2PO_4	Ajex Finechem/Analytical/Australia
15. K_2HPO_4	Ajex Finechem /Analytical/Australia
16. beef extract	Himedia/Analytical/India
17. peptone	Himedia/Analytical/India
18. soytone	Merck/Analytical/Germany
19. tryptone	Himedia/Analytical/India
20. agar	Himedia/Analytical/India
21. proteinase K	Singma/Germany
22. α-chymotrypsin	Singma/Germany
23. pronase E	Singma/Germany
24. trypsin	Singma/Germany
25. catalase	Singma/Germany

4. อุปกรณ์และเครื่องมือ

อุปกรณ์/เครื่องมือ	บริษัท/ประเทศผู้ผลิต
1. ตู้ถ่ายเชื้อ (biological safety cabinet ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527042, 41, 62, 61 class II type A)	Hotpack/USA
2. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325	Tomy Seiko/Japan
3. ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร)	Labmate/Poland
4. ไมโครปิเปต (ขนาด 1,000 ไมโครลิตร)	Gilson/UK
5. เครื่องวัดค่าความเป็นกรดด่าง (pH meter) รุ่น Metter Toledo 320	Mettier Toledo/USA
6. multichanels pipet (ขนาด 20-200 ไมโครลิตร)	Transferpette/USA
7. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ ยี่ห้อ Memmert รุ่น WB 14	Memmert/Germany
8. กระดาษกรอง (membrane filter) ขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร	Scheicher&Schuell/Germany
9. ถาด 96 หลุม (Microtiter plate 96 flat bottom WI)	NUNC™/Denmark
10. microplate reader รุ่น Powerwave X	Biotek/UK
11. vortex mixer	Scientific industries/USA
12. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น SPS402F	Scout™ Pro/USA
13. เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น A210P	Satorius/USA
14. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ยี่ห้อ Technical cooperation รุ่น U-2000	Thermo electron cooperation/USA
15. stomacher รุ่น 400CIR	Seward/England
16. เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น 5415R	Eppendorf/Germany
17. ตู้อบ (hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Mov212	Sanyo electric/Japan
18. หัวกรองเชื้อ (millipore filter)	Millipore coorperation/USA

วิธีการทดลอง

1. การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งจากตัวอย่างอาหารหมัก

1.1 การเก็บตัวอย่าง

ทำการเก็บตัวอย่างอาหารหมักที่บรรจุอยู่ในถุงพลาสติกมัดด้วยยาง สุ่มเก็บตัวอย่างโดยสอบถามจากแม่ค้าว่าอาหารหมักเหล่านั้นจะต้องมีอายุการหมักไม่เกิน 7 วัน และอาหารหมักจะต้องไม่มีลักษณะผิดปกติ เช่น มีราขึ้น มีกลิ่นเหม็น ในระหว่างการนำตัวอย่างอาหารหมักมาอวิเคราะห์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียแลกติกในห้องปฏิบัติการ จะเก็บตัวอย่างอาหารหมักไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยจะเก็บไว้ไม่เกิน 3 วัน

สุ่มเก็บตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้านจากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดสุราษฎร์ธานี ประกอบด้วย

1.1.1 อาหารหมักพื้นบ้านที่ทำจากสัตว์ได้แก่ ปลาส้ม ไตปลา ปลาร้า กุ้งส้ม หนาง แหนม กะปิ หอยดอง และน้ำเคย

1.1.2 อาหารหมักพื้นบ้านที่ทำจากพืชได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง สะตอดอง หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง และข้าวหมาก

1.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *Staphylococcus aureus*

ทำการแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักไปพร้อมกับการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีกิจกรรมยับยั้ง *S. aureus* ดังต่อไปนี้

1.2.1 การเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ทำการเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ *S. aureus* โดยเขี่ยเชื้อจากอาหารวุ้นแข็งเอียงที่เก็บใน stock มา 1 loop ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB จำนวน 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่บ่มไว้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB จำนวน 9 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่ได้มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB เพื่อให้ได้เชื้อประมาณ 6.2×10^{6} CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายเชื้อที่ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ soft nutrient agar (NA) ซึ่งมีวุ้นร้อยละ 0.75 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จำนวน 9 มิลลิลิตร เพื่อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 6.2×10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร แล้วนำมาทดสอบฤทธิ์การยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป

1.2.2 การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก

คัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งโดยวิธีการ Sandwich test (ดัดแปลงจาก Bromberg *et al.*, 2004) โดยทำการชั่งตัวอย่างอาหารหมักมา 25 กรัม ใส่ใน stomacher bag จากนั้น

จึงเท normal saline solution หรือสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (น้ำหนักต่อปริมาตร) 225 มิลลิลิตร ลงไปแล้วนำไปตีป่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที (ตัวอย่างถูกเจือจาง 10^{-1}) ทำการเจือจางส่วนผสมดังกล่าวด้วยสารละลายเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จนได้ระดับความเจือจางที่เหมาะสม แล้วนำเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวปริมาตร 1 มิลลิลิตร ของแต่ละความเจือจางมาทำการ pour plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ หลังจากนั้นทำการเทอาหาร soft nutrient agar ทับโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS โดยในอาหาร soft nutrient agar ดังกล่าวมีแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ (แบคทีเรียอินดิเคเตอร์) คือ *S. aureus* ที่มีปริมาณเชื้อ 6.2×10^{5} CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเตรียมจากข้อ 1.2.1 จากนั้นนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เททับด้วย *S. aureus* ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการตรวจสอบว่าโคโลนีใดของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้ สังเกตจากการที่ *S. aureus* ไม่สามารถเจริญรอบโคโลนีนั้นๆ คือ เกิดวงใสของการยับยั้งรอบโคโลนี หลังจากนั้นทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกให้บริสุทธิ์และทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นแบคทีเรียแลกติก โดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram stain) เพื่อตรวจดูการติดสี รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลกติกจะติดสีแกรมบวก เซลล์ไม่มีการเคลื่อนที่ และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เก็บเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ไว้ในสารละลายกลีเซอรอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 30 (ปริมาตรต่อปริมาตร) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

2.1 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Broth microdilution assay (ดัดแปลงจาก Khouiti and Simon, 1997; Kang and Lee, 2005) โดยนำน้ำหมักจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกที่ยังมีชีวิต นำส่วนใสที่ไม่เจือจางและเจือจางครั้งละ 1 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS มาวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อมิลลิลิตรของส่วนใสในถาดหลุมแบบ 96 หลุม ด้วยวิธี Broth microdilution assay โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แล้ว

เจือจางให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.2×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB นำส่วนใสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมแบบ 96 หลุม ที่มีปริมาณจุลินทรีย์ที่จะทดสอบ (6.2×10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร) จำนวน 100 ไมโครลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งมีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร แต่เติมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB ลงไปแทน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความขุ่นของการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ทำการหาค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ 24 ชั่วโมง โดยรายงานในหน่วย Arbitary Unit ต่อมิลลิลิตร (AU ต่อมิลลิลิตร) ซึ่งคำนวณจากการนำค่าความเจือจางสูงสุดที่มองไม่เห็นความขุ่นของการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (Dilution factor) คูณกับ 1,000 ไมโครลิตร หารด้วยปริมาตรส่วนใสที่เติมลงไปทดสอบ (ดัดแปลงจาก Pilasombut *et al.*, 2006)

$$\text{กิจกรรมการยับยั้ง (AU ต่อมิลลิลิตร)} = \frac{\text{1,000 ไมโครลิตร x Dilution factor}}{\text{ปริมาตรส่วนใส (ไมโครลิตร)}}$$

2.2 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูง

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งได้สูงด้วยวิธี Broth microdilution assay โดยนำน้ำหมักจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้มาปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 หยดเอนไซม์คะตะเลส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนจะปรับค่าพีเอชของส่วนใสให้มีค่าเท่ากับ 5.0 ด้วย 5 N HCl กรองส่วนใสผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ในสภาวะปลอดเชื้อ หลังจากนั้นนำส่วนใสที่ไม่เจือจางและเจือจางครั้งละ 1 เท่า ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS มาวัดค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อมิลลิลิตรของส่วนใสในถาดหลุมแบบ 96 หลุม ด้วยวิธี Broth microdilution assay ทำการเลี้ยงแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Salmonella* sp., *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* ในอาหาร Tryptic Soy Broth, *Escherichia coli* ในอาหาร Luria-Bertani Broth และ *Vibrio parahaemolyticus* ในอาหาร Tryptic Soy Broth (3% NaCl น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเจือจางให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารที่เหมาะสมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละสายพันธุ์ แล้วนำส่วนใสแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของถาดหลุมแบบ 96 หลุม ที่มีปริมาณจุลินทรีย์ที่จะทดสอบปริมาตร 100 ไมโครลิตร โดย

ให้มีปริมาณแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในปริมาตรสุดท้าย (200 ไมโครลิตร) เท่ากับประมาณ 10^5 CFU ต่อมิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แทนการใช้ส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติก นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ทำการหาค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ 24 ชั่วโมง รายงานในหน่วย Arbitary Unit ต่อมิลลิลิตร (AU ต่อมิลลิลิตร)

3. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

3.1 การทดสอบทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแบบแกรม การตรวจดูรูปร่างและการเรียงตัวของเซลล์

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวๆมา smear ลงในหยดน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อบนแผ่นสไลด์ ใช้ loop เขี่ยเชื้อให้แผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางๆโดยวนไปในทิศทางเดียวกัน ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำไปผ่านเปลวไฟ 4-5 ครั้ง ตั้งไว้ให้เย็นก่อนนำมาย้อมสีแบบแกรมโดยหยด crystal violet ให้ท่วมรอย smear ทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำและเทน้ำออกให้หมด หยด Gram iodine ทิ้งไว้ 1 นาที ก่อนล้างน้ำและหยดด้วย alcohol ความเข้มข้นร้อยละ 95 โดยเอียงสไลด์ไปมาประมาณ 5-10 วินาที ล้างน้ำและหยด safranin ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้งก่อนตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2 การทดสอบทางชีวเคมีตามวิธีการของ Bergey's manual determinative bacteriology volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และ Lactic acid bacteria (Salminen and Wright, 1993) ซึ่งเป็นการเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติกในระดับจีนัส

3.2.1 ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

3.2.2 ทดสอบการเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 และ 18 (น้ำหนัก

ต่อปริมาตร) และมีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 (น้ำหนักต่อปริมาตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

3.2.3 ทดสอบการเจริญที่พีเอช 4.4 และ 9.6

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 4.4 และ 9.6 ด้วย 5 N NaOH หรือ 5 N HCl และมีการเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียแลกติกได้จากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

3.2.4 ตรวจสอบการจัดเรียงตัวของเซลล์ (tetrad formation)

สังเกตการเรียงตัวของแบคทีเรียแลกติกจากข้อ 2.2 ที่มี 4 เซลล์เรียงติดกันโดยการย้อมสีแบบแกรม

3.2.5 ทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล hexose และ pentose

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคส และอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีน้ำตาลไรโบส เป็นส่วนประกอบในอัตราร้อยละ 2.0 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และเติม bromocresol purple ร้อยละ 0.2 โดยภายในหลอดทดลองบรรจุหลอด Durham tube เพื่อดักเก็บก๊าซ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตความสามารถในการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียแลกติกโดยดูจากการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple จากสีม่วงเป็นสีเหลืองและการเกิดฟองก๊าซ บันทึกผลโดยการแบ่งแบคทีเรียแลกติกออกเป็น 3 กลุ่มหลัก คือ

ก. Obligately homofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose ได้ แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาล pentose แต่ไม่เกิดก๊าซ

ข. Facultative heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose ได้ แต่ไม่เกิดก๊าซ

ค. Obligately heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถหมักได้ทั้งน้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose และเกิดก๊าซ

3.3 การทดสอบทางชีววิทยาโมเลกุล

3.3.1 สกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียแลกติก (วิธี Boiling method ดัดแปลงจาก Yamada *et al.*, 2002)

เขี่ยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งเก็บรักษาในหลอดอาหารเอียง ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปิเปตเชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ปิเปตส่วนใสออก ล้างเซลล์ด้วย TE buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง ละลายกลับด้วย TE buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร นำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที สลับกับการแช่น้ำแข็ง 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง นำไปวิเคราะห์ด้วย Agarose gel electrophoresis จากนั้นทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR)

3.3.2 ทำ PCR เพื่อเพิ่มจำนวน 16S rDNA (ดัดแปลงจากวิธีการของ Lee *et al.*, 2003)

primer ที่นำมาใช้ในขั้นตอนนี้ได้แก่ UFUL (5'-GCCTAACACATGCAAGTCGA-3') และ URUL (5'-CGTATTACCGCGGCTGCTGG-3') (Nilsson *et al.*, 2003) เติมสารสำหรับทำ PCR ดังนี้ 10xPCR buffer 5 ไมโครลิตร สารประกอบ dNTPs ความเข้มข้นชนิดละ 0.2 มิลลิโมลาร์ primer ทั้งสองชนิดๆละ 2 ไมโครโมลาร์ ตัวอย่างดีเอ็นเอที่แยกสกัดได้ 20 นาโนกรัม เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 2.5 Units และน้ำปราศจากอิออนที่ฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ทำการ denaturation ครั้งแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นทำ PCR 25 รอบ (อุณหภูมิที่ใช้ต่อรอบ: 94 องศาเซลเซียส 1 นาที, 50 องศาเซลเซียส 45 วินาที, 72 องศาเซลเซียส 2 นาที) ตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ได้ไปวิเคราะห์โดย Agarose gel electrophoresis เพื่อวิเคราะห์หาขนาดของ16S rDNA โดยเปรียบเทียบกับ DNA marker

3.3.3 วิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA

นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เพิ่มจำนวนแล้วมาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit (QIAGEN) ก่อนส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง DNA sequencer ตามด้วยการเทียบเคียงข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank (BLAST search ที่ http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

4. การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่

ระยะเวลาต่างๆ คือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียแลกติกโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร (Ogunbanwo *et al.*, 2003) พร้อมทั้งวัดค่าพีเอช และคำนวณหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของน้ำหมักที่มีต่อ *S. aureus* ตามวิธีการในข้อ 2.2

5. การเจริญและการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในสภาวะต่างๆ

5.1 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้น

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชต่างๆ คือ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และคำนวณหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของน้ำหมักที่มีต่อ *S. aureus* ตามวิธีการในข้อ 2.2

5.2 ผลของความเข้มข้นเกลือ

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชที่เหมาะสมตามการทดลองข้อที่ 5.1 เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้มีระดับค่าความเข้มข้นที่ร้อยละ 0-7 (น้ำหนักต่อปริมาตร) จากนั้นบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาการเจริญโดยวัดความขุ่นของเซลล์จากค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*S. aureus*) โดยวิธี Broth microdilution assay ตามวิธีการในข้อ 2.2 เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้มีระดับค่าความเข้มข้นร้อยละ 0-7 แทนการใช้ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติก

6. สมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

6.1 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์และปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมตามการทดลองข้อที่ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว

10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ความร้อนส่วนใสที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำส่วนใสมาปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 เพื่อหยดเอนไซม์คะตะเลส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนจะปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 กรองส่วนใสผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ในสภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นบ่มส่วนใสที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*S. aureus*) โดยวิธี Broth microdilution assay ตามวิธีในข้อ 2.2 เปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ใช้ส่วนใสซึ่งไม่ผ่านการให้ความร้อน

6.2 ผลของค่าพีเอชต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์และปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมตามการทดลองข้อที่ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ความร้อนส่วนใสที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการปรับค่าพีเอชของส่วนใสที่ได้เป็น 2.0-10.0 ด้วย 5 N NaOH หรือ 5 N HCl บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปรับค่าพีเอชในทุกตัวอย่างเป็น 6.5 เพื่อหยดเอนไซม์คะตะเลส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนจะปรับค่าพีเอชมาอยู่ที่ 5.0 กรองส่วนใสผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ในสภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยใช้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Broth microdilution assay ตามวิธีการในข้อ 2.2 และเปรียบเทียบกับการทดลองชุดควบคุมที่ใช้ส่วนใสซึ่งผ่านการปรับค่าพีเอชเป็น 5.0

6.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 ซึ่งได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์และปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมตามการทดลองข้อที่ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เหวี่ยงแยกเซลล์ออกด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ให้ความร้อนส่วนใสที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำส่วนใสมาปรับค่าพีเอชที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ละชนิดที่นำมาทดสอบ นำส่วนใสมาบ่มกับเอนไซม์ proteinase K (pH 7.0), α-chymotrypsin (pH 7.0), pronase E (pH 7.0) และ trypsin (pH 7.0) กำหนดให้มีค่าความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ละชนิดเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และทำให้เอนไซม์ที่ใช้ทดสอบสูญเสียสภาพโดยบ่มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วนำส่วนใสหลังการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนมาปรับค่าพีเอชเป็น 6.5 เพื่อหยดเอนไซม์คะตะเลส (100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร) ก่อนจะปรับค่าพีเอชเป็น 5.0 กรองส่วนใสผ่านเมมเบรนขนาด 0.2 ไมครอน ในสภาวะปลอดเชื้อ จากนั้นทดสอบกิจกรรมการยับยั้งโดยใช้ *S. aureus* เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Broth microdilution assay ตามวิธีการในข้อ 2.2 และเปรียบเทียบกับชุดควบคุมคือส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่ผ่านการบ่มด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่นำมาทดสอบและปรับค่าพีเอชเป็น 5.0

7. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก

7.1 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบคุณสมบัติการทนต่อเกลือน้ำดี โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตรไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง แบบปลอดเชื้อด้วย normal saline solution ก่อนนำไปทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ละลายตะกอนเซลล์ ตามลำดับ และถ่ายเซลล์แขวนลอย (cell suspension) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 ปริมาตร 9.0 มิลลิลิตร เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ไม่มีการเติมเกลือน้ำดี จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อ (log CFU ต่อมิลลิลิตร) โดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ดัดแปลงจาก Erkkila and Petaja., 2000)

7.2 การทดสอบการทนต่อกรด

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรด โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำน้ำหมักที่ได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำการล้างตะกอนเซลล์ 2 ครั้ง แบบปลอดเชื้อด้วย normal saline solution ก่อนนำไปทดสอบการทนต่อกรดโดยละลายตะกอนเซลล์ด้วยสารละลาย phosphate-buffer saline ที่มีค่าพีเอช 2.0, 3.0, 4.0 และ 5.0 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยเปรียบเทียบกับชุดการทดลอง

ควบคุมที่ใช้สารละลาย phosphate-buffer saline พีเอช 6.0 ทำการเก็บตัวอย่างที่เวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง ตรวจดูการเจริญของเชื้อ (log CFU ต่อมิลลิลิตร) โดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธีการเลี้ยงร่วมกัน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.2 มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS และนำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ประกอบด้วย *S. aureus, E. coli* และ *Salmonella* sp. มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว NB, LB และ TSB ตามลำดับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้นโดยการปรับความเข้มข้นของเซลล์ที่มีชีวิต (CFU ต่อมิลลิลิตร) ทั้งของแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหาร minimal medium (Fooks *et al.*, 2003) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีอากาศ เก็บตัวอย่างที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48 และ 72 ชั่วโมง ตรวจดูปริมาณแบคทีเรียแต่ละชนิดโดยวิธีการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS สำหรับแบคทีเรียแลกติกและอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA สำหรับ *S. aureus*, *E. coli* และ *Salmonella* sp. ทำการนับเชื้อแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่รอดชีวิต (log CFU ต่อมิลลิลิตร) (ดัดแปลงจาก Drago *et al.*, 1997; Gonzalez *et al.*, 1993; Xanthopoulos *et al.*, 2000) เปรียบเทียบกับชุดการทดลองควบคุมที่ไม่ได้มีการเพาะเลี้ยงร่วมกันระหว่างแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละสายพันธุ์ คำนวณหาค่าร้อยละของการยับยั้ง (% Inhibition) โดยใช้สูตรดังแสดง

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{CFU/ml in control}) - (\text{CFU/ml in associate cultures}) \times 100}{(\text{CFU/ml in control})}$$

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งจากตัวอย่างอาหารหมัก

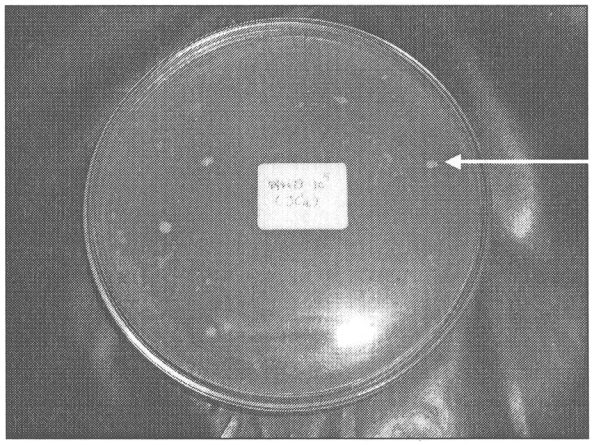
ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่นำมาทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีทั้งหมด 17 ชนิด แบ่งออกเป็นอาหารหมักจากสัตว์ได้แก่ ปลาส้ม กุ้งส้ม ไตปลา ปลาร้า หนาง แหนม กะปิ หอยดอง และน้ำเคย อาหารหมักจากพืชได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก สะตอดอง หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง และกระเทียมดอง โดยทำการเก็บตัวอย่างอาหารหมักจากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดสุราษฎร์ธานี รวมทั้งตัวอย่างกิมจิจาก ผศ.ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรคีรี คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จากตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาแยกแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 52 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกด้วยวิธี Sandwich test จำนวน 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.9 และจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีทั้งหมด 230 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) โดยการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งจะอาศัยหลักการที่ว่า โคโลนีใดของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจะมีลักษณะวงใสของการยับยั้งเกิดขึ้นรอบโคโลนีนั้น โดยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งคือ *Staphylococcus aureus* (ภาพที่ 3) สำหรับตัวอย่างอาหารหมักที่สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารยับยั้ง *S. aureus* ได้แก่ ปลาส้ม ไตปลา ปลาร้า กุ้งส้ม หนาง แหนม กะปิ น้ำเคย ผักเสี้ยนดอง สะตอดอง หน่อไม้ดอง และกิมจิ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างอาหารหมักบางชนิด อาทิ ผักกาดดอง ข้าวหมาก หัวไชโป๊ และหอยดอง ไม่สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้เลย ทั้งนี้อาจเป็นเพราะตัวอย่างผลิตภัณฑ์มีอายุการหมักนาน ทำให้อาหารหมักเหล่านี้พบแต่ยีสต์แทนโดยเฉพาะข้าวหมากตรวจพบยีสต์ในปริมาณมาก ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีแป้งในส่วนผสมอีกทั้งในกระบวนการทำข้าวหมากจำเป็นต้องใช้ยีสต์เป็นหัวเชื้อเริ่มต้น ในขณะที่ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักบางตัวอย่างมีค่าพีเอชต่ำประมาณ 3.0 และปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์มีค่าสูงประมาณร้อยละ 13 ซึ่งมีผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคต่างๆในอาหารรวมถึงแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ทนเกลือ สำหรับตัวอย่างอาหารหมักที่ตรวจพบแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 3.72-5.07 และมีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์อยู่ระหว่างร้อยละ 1.5-3.8 เท่านั้น (ศิรินาถ หนูเอก, 2540) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเติมปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 1.5 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มสภาวะที่เหมาะสมในการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ดียิ่งขึ้น โดยปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักเมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างอาหารหมักจากสัตว์และตัวอย่างอาหารหมักจาก

พืช พบว่าอาหารหมักจากสัตว์สามารถพบปริมาณแบคทีเรียแลกติกได้สูงกว่าอาหารหมักจากพืช เนื่องจากอาหารหมักจากสัตว์มีคุณสมบัติที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ โดยมีส่วนประกอบของธาตุอาหารต่างๆ ได้แก่ โปรตีน กรดอะมิโน และสารประกอบเปปไทด์ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียจึงทำให้แบคทีเรียแลกติกในอาหารหมักเจริญได้ดี (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) สำหรับจำนวนแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างอาหารหมักของไทยเมื่อทำการนับโดยวิธีการ plate count ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS พบว่าอาหารหมักจากสัตว์มีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง <10–5.2x10^9 CFU ต่อกรัม ส่วนอาหารหมักจากพืชมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง <10–2.9x10^8 CFU ต่อกรัม (ตารางที่ 2) โดยจากปริมาณเชื้อในอาหารหมักบางชนิดที่มีปริมาณแบคทีเรียแลกติก <10 CFU ต่อกรัม นอกจากมีปัจจัยของปริมาณเกลือ ค่าพีเอช และอายุการเก็บของอาหารหมักแล้วยังพบว่ามีปัจจัยอย่างอื่นอีกที่สำคัญคือการใช้สารกันบูดหรือสารกันเสียในผลิตภัณฑ์อาหารหมักต่างๆ เช่น กรดเบนโซอิก เกลือเบนโซเอท กรดซอร์บิก เกลือซอร์เบท สารบอแรกซ์ สารไนเตรต และ ไนไตรท์ เป็นต้น (ศิวาพร ศิวเวช, 2535) โดยสารกันบูดเหล่านี้จะมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ต่างๆในอาหารรวมทั้งแบคทีเรียแลกติกด้วยเช่นกัน

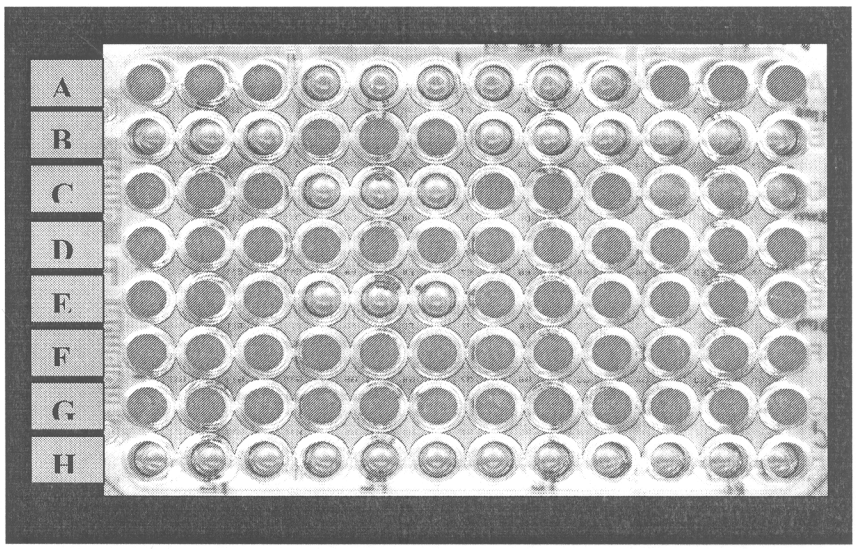
การแยกแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆที่มีลักษณะแตกต่างกันเช่น โคโลนีใหญ่ ขอบเรียบ นูน รอบโคโลนีเป็นสีเหลืองอ่อน และโคโลนีเล็ก ขอบเรียบ นูน รอบโคโลนีเป็นสีเหลืองอ่อน เป็นต้น จากนั้นทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสซึ่งจะให้ผลเป็นลบ และเมื่อทำการย้อมสีแบบแกรมจะติดสีแกรมบวก โดยจะมีลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวหลายรูปแบบ เช่น เซลล์ มีรูปร่างแท่ง (rod) อาจเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว เรียงตัวเป็นโซ่ โดยจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ในลักษณะดังกล่าวมีจำนวนทั้งสิ้น 165 สายพันธุ์ ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกซึ่งเซลล์มีรูปร่างกลม (coccus) เรียงตัวอยู่เป็นคู่หรือแบบกระจาย มีเชื้อที่แยกได้ในลักษณะดังกล่าวจำนวนทั้งสิ้น 65 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3)

2. การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 230 สายพันธุ์ มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้สูงโดยวิธี Broth microdilution assay (ดัดแปลงจาก Khouiti and Simon, 1997; Kang and Lee, 2005) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้จำนวน 55 สายพันธุ์ ซึ่งมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 50 AU ต่อมิลลิลิตร โดยพบในปลาส้ม 1 สายพันธุ์ (2JA5) แหนม



ภาพที่ 3 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*S. aureus)* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (ลูกศรชี้)



A – F = samples (cell free supernatant + culture)

G = negative control (MRS broth + culture)

H = positive control (MRS broth + NB broth)

ภาพที่ 4 การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*S. aureus*) ของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งเมื่อทดสอบโดยวิธี Broth microdilution assay

ตารางที่ 2 แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากตัวอย่างอาหารหมัก

Fermented foods	**pH**	**No. of collected samples**	**No. of detected samples**	**Percent detected samples**	**No. of lactic acid bacteria (CFU/g)**	**No. of isolates**
Fermented fish (Pla-som)	4.15	3	3	100	$4.8x10^8$	18
Fermented fish (Pla-ra)	4.71	3	2	66.7	$2.0x10^4$	20
Fermented fish (Tai-Pla)	5.49	4	2	50	$4.3x10^4$	24
Fermented fish (Num-koei)	5.25	3	2	66.7	$3.9x10^4$	3
Fermented green mussel (Nhoy-dong)	4.95	3	0	0	<10	0
Fermented shrimp (Kung-som)	3.90	2	2	100	$4.2x10^6$	12
Fermented shrimp (Ka-pi)	7.44	5	3	60	$3.2x10^4$	12
Fermented pork (Nhang)	3.98	3	2	66.7	$3.0x10^8$	19
Fermented pork (Nham)	4.68	4	3	75	$5.2x10^9$	44
Fermented vegetable (Naw-mai-dong)	3.58	5	4	80	$4.8x10^7$	45
Fermented vegetable (Kra-tium-dong)	4.90	4	0	0	<10	0
Fermented vegetable (Hua-chai-po)	3.92	4	0	0	<10	0
Fermented vegetable (Khao-mark)	4.52	1	0	0	<10	0
Fermented vegetable (Kimchi)	4.22	1	1	100	$4.0x10^7$	7
Fermented vegetable (Pak-grad-dong)	3.68	3	0	0	<10	0
Fermented vegetable (Pak-sian-dong)	3.95	2	1	50	$2.9x10^8$	3
Fermented vegetable (Sa-taw-dong)	3.75	2	2	100	$6.3x10^7$	23
Total		52	27	51.9		230

ตารางที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมัก

Fermented foods	Gram stain reaction	Cell morphology	Catalase activity	No. of isolates	Percent detected LAB
Nhang, Pla-som, Kung-som, Ka-pi, Pla-ra, Tai-Pla, Nham, Naw-mai-dong, Pak-sian-dong, Sa-taw-dong, Kimchi	Gram-positive	rods	-	165	71.7
Nham, Naw-mai-dong, Num-koei, Nhang, Pla-som	Gram-positive	cocci	-	65	28.3
Total				230	100

10 สายพันธุ์ (JB4, JB7, JB10, JB11, JBa7, JBa9, JBa16, JBa17, 3JB2 และ 3JB4) หนาง 2 สายพันธุ์ (JCa1 และ JCa4) ปลาร้า 1 สายพันธุ์ (JE1) กะปิ 2 สายพันธุ์ (JG2 และ JR21) หน่อไม้ดอง 16 สายพันธุ์ (JN2, JN5, JN6, JN8, JN9, JN11, JN12, JN14, JN15, JN16, JN19, JN23, JN24, JN29, 4JN8 และ 4JN13) กิมจิ 7 สายพันธุ์ (JS1, JS2, JS3, JSa1, JSa2, JSa3 และ JSa4) สะตอดอง 13 สายพันธุ์ (JO1, JO2, JO5, JO6, JO8, JO9, JO10, JO11, JO12, JO13, JO15, JO16 และ JOa1) กุ้งส้ม 3 สายพันธุ์ (JH1, JH4 และ JHa4) (ตารางที่ 4) จากนั้นดำเนินการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกในขั้นตอนต่อไปโดยจะเพิ่มชนิดของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ซึ่งประกอบด้วย *Salmonella* sp., *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยการทดสอบยังคงใช้วิธี Broth microdilution assay (ภาพที่ 4) พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ดังกล่าวจำนวน 23 สายพันธุ์, 55 สายพันธุ์, 29 สายพันธุ์, 26

สายพันธุ์ และ 8 สายพันธุ์ ตามลำดับ รวมแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจำนวนทั้งสิ้น 55 สายพันธุ์ (คิดเป็นร้อยละ 41.8, 100, 52.7, 47.2 และ 14.5 ตามลำดับ)

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารได้ในช่วงกว้าง กล่าวคือสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายชนิด โดยสามารถยับยั้งได้ทั้งในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Spelhaug และ Harlender (1989) ที่พบว่า *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* 11454, *Pediococcus pentosaceus* FBB61 และ *Pediococcus pentosaceus* FBB63-DG2 ซึ่งคัดแยกจากไส้กรอกหมักสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli* 0157:H7, *Staphylococcus aureus* และ *Vibrio cholerae* 851 นอกจากนี้ Gupta และคณะ (1996) พบว่า *Lactobacillus acidophilus* -301 ซึ่งคัดแยกจากนมหมักสามารถออกฤทธิ์ยับยั้ง *Salmonella enterica* serovar. Typhi, *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ทั้งนี้เนื่องจากการทดสอบการยับยั้งในขั้นตอนนี้เอื้ออำนวยต่อการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งได้หลายประเภท อาทิ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อะซิทัลดีไฮด์ ไดอะซิทิล คาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (Barefoot and Klaenhammer, 1983; De Vuyst and Vandamme, 1994) โดยเฉพาะกลุ่มของกรดอินทรีย์ซึ่งได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซิติก เป็นต้น การตรวจสอบการผลิตกรดอินทรีย์ของแบคทีเรียแลกติกสามารถดูได้จากค่าพีเอชของอาหารที่ลดต่ำลง สำหรับในการทดลองครั้งนี้พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดต่ำลงเมื่อทำการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.0-4.5 ทำให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารบางชนิดได้ ซึ่งผลงานวิจัยชี้ให้เห็นว่าเราสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการวิจัยหลายฉบับ อาทิ จากการรายงานผลการวิจัยของ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2542) ถึงสารที่มีฤทธิ์ต้านทานแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารโดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ พบว่าเมื่อทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด คือ *B. cereus* ATCC11778, *S. aureus* ATCC25923, *E. coli* ATCC25922 และ *Sal. typhimurium* 3230 โดยวิธี Agar spot บนอาหารแข็ง MRS ในสภาพที่มีออกซิเจนพบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 193 ไอโซเลต สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด ดังกล่าวได้ และจากการรายงานของ อรัญญา สังขศรี (2542) ที่ได้รายงานไว้เกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทยทั้งหมด 88 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบถึงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานอีก 12 สายพันธุ์ โดยวิธี Agar spot

พบว่า *Lactobacillus* spp. ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานได้ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการรายงานถึงการนำแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ต่างๆ มาใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้หลายสายพันธุ์โดยวิธี Agar spot เห็นได้จากการทดลองของ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์ (2540) ที่มีการใช้แบคทีเรียแลกติกซึ่งแยกจากอาหารหมักของไทยคือ *Lactobacillus plantarum* 16 สายพันธุ์ *Lactobacillus bavaricus* 3 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus brevis* 1 สายพันธุ์ นำมายับยั้ง *Sal. typhimurium*, *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus* พบว่ามีส่วนใสที่ยับยั้งได้โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางวงใส (clear zone) ของการยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตร ต่อจำนวนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบอย่างน้อย 3 ชนิด และจากการทดลองของวลัยกาญจน์ ไกรวรรณ์ (2542) ซึ่งได้ทำการแยกแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์พบว่าสายพันธุ์ K14 และ L4 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารคือ *E. coli* 0157H:7 และ *Lis. monocytogenes* ได้สูงสุด นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมและผลิตภัณฑ์นมคือสายพันธุ์ L30 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารคือ *E. coli* 0157H:7, *Lis. monocytogenes*, *B. cereus* ATCC 10707, *S. aureus* ATCC29213 และ *Sal. typhimurium* ได้ดีที่สุด (มลิวรรณ ส่งเสริม, 2542; สุมนา หนูเอียด, 2542)

สำหรับแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากการทดลองในครั้งนี้พบว่ามีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 25 AU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ซึ่งประกอบด้วย *Salmonella* sp., *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี Broth microdilution assay สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 5) โดยสามารถคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารในช่วงกว้างได้จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ JH1, JH4, JHa4 แยกได้จากกุ้งส้ม JOa1, JO6, JO16 แยกได้จากสะตอดอง JR21 แยกได้จากกะปิ และ JB10 แยกได้จากแหนม โดยทั้ง 8 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ดังต่อไปนี้คือ *Sal.* sp., *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus* สำหรับการยับยั้งที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการที่แบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 2 เป็นกรดแลกติกในปริมาณมากพอทำให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (มลิวรรณ ส่งเสริม, 2542) การทดลองต่อมาจึงนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 สายพันธุ์ ไปทดสอบความสามารถในการ

ตารางที่ 4 กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยก

Fermented foods	No. of LAB strains	No. of effective LAB strains	Percent detected of effective LAB strains
Pla-som	18	1 (2JA5)	5.6
Pla-ra	20	1 (JE1)	5.0
Tai-Pla	24	0	0.0
Num-koei	3	0	0.0
Kung-som	12	3 (JH1, JH4, JHa4)	25.0
Ka-pi	12	2 (JG1, JR21)	16.7
Nhang	19	2 (JCa1, JCa4)	10.5
Nham	44	10 (JB4, JB7, JB10, JB11, JBa7, JBa9, JBa16, JBa17, 3JB2, 3JB4)	22.7
Naw-mai-dong	45	16 (JN2, JN5, JN6, JN8, JN9, JN11, JN12, JN14, JN15, JN16, JN19, JN23, JN24, JN29, 4JN8, 4JN13)	35.6
Kimchi	7	7 (JS1, JS2, JS3, JSa1, JSa2 JSa3, JSa4)	100.0
Pak-sian-dong	3	0	0.0
Sa-taw-dong	23	13 (JO1, JO2, JO5, JO6, JO8, JO9, JO10, JO11, JO12, JO13, JO15, JO16, JOa1)	56.5
Total	230	55	23.9

ตารางที่ 5 กิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*Salmonella* sp., *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus*) โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

Fermented foods	Strains	Selected food-borne pathogens				
		Bacillus cereus	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Salmonella* sp.	*Escherichia coli*
Nham	JB4	-	-	-	-	+
	JB7	-	-	-	-	+
	JB10	+	+	+	+	+
	JB11	-	+	-	-	+
	JBa7	-	-	-	-	+
	JBa9	-	+	-	-	+
	JBa16	+	+	-	+	+
	JBa17	+	-	-	+	+
	3JB2	-	-	-	-	+
	3JB4	+	+	-	+	+
Nhang	JCa1	+	-	-	-	+
	JCa4	+	+	-	+	+
Pla-ra	JE1	+	-	-	+	+
Ka-pi	JG2	-	+	-	+	+
	JR21	+	+	+	+	+
Kung-som	JH1	+	+	+	+	+
	JH4	+	+	+	+	+
	JHa4	+	+	+	+	+
Naw-mai-dong	JN2	+	+	-	+	+
	JN5	-	-	-	-	+
	JN6	-	-	-	-	+
	JN8	+	-	-	-	+
	JN9	-	-	-	-	+

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Fermented foods	Strains	Selected food-borne pathogens				
		Bacillus cereus	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Salmonella* sp.	*Escherichia coli*
Naw-mai-dong	JN11	-	-	-	-	+
	JN12	-	-	-	-	+
	JN14	-	-	-	-	+
	JN15	+	-	-	+	+
	JN16	+	-	-	-	+
	JN19	-	-	-	-	+
	JN23	+	+	-	+	+
	JN24	+	+	-	-	+
	JN29	-	+	-	-	+
	4JN8	+	+	-	+	+
	4JN13	+	-	-	-	+
Sa-taw-dong	JO1	+	+	-	+	+
	JO2	-	+	-	+	+
	JO5	+	-	-	+	+
	JO6	+	+	+	+	+
	JO8	+	+	_	+	+
	JO9	+	+	_	+	+
	JO10	-	+	-	+	+
	JO11	-	-	-	-	+
	JO12	-	-	-	-	+
	JO13	+	+	-	+	+
	JO15	-	-	-	-	+
	JO16	+	+	+	+	+
	JOa1	+	+	+	+	+
Pla-som	2JA5	+	-	-	-	+

ตารางที่ 5 (ต่อ)

Fermented foods	Strains	Selected food-borne pathogens				
		Bacillus cereus	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Salmonella* sp.	*Escherichia coli*
Kimchi	JS1	+	-	-	-	+
	JS2	-	-	-	-	+
	JS3	-	-	-	-	+
	JSa1	-	-	-	-	+
	JSa2	-	-	-	-	+
	JSa3	-	-	-	-	+
	JSa4	-	-	-	-	+

Symbols: + = inhibition

\- = non inhibition

ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ซึ่งประกอบด้วย *S. aureus*, *Salmonella* sp., *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus* โดยทำการทดสอบในสภาพที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และลดอิทธิพลของกรดอินทรีย์ด้วยวิธี Broth microdilution assay โดยการทดลองครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งปรับค่าพีเอชให้เท่ากับส่วนใสที่นำมาทดสอบ (พีเอช 5.0) ด้วย 5 N HCl เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม พบว่ามีบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ชุดดังกล่าวได้นั่นคือสายพันธุ์ JH1, JHa4 และ JOa1 แต่พบว่าสายพันธุ์ JB10 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์คือ *S. aureus* และ *Lis. monocytogenes* โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 10 AU ต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ JO6 สามารถยับยั้ง *S. aureus, Lis. monocytogenes* และ *E. coli* โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร และ 10 AU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สายพันธุ์ JO16 สามารถยับยั้ง *S. aureus, Lis. monocytogenes*, *Salmonella* sp., *B. cereus* และ *E. coli* ให้กิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร, 20 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร และ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สายพันธุ์ JH4 มีความสามารถยับยั้ง *S. aureus, Lis. monocytogenes*, *V. parahaemolyticus, Salmonella* sp., *B. cereus*, และ *E. coli* มีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร, 20 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร และ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสายพันธุ์ที่มีความสามารถใน

การยับยั้งได้ดีที่สุดคือ สายพันธุ์ JR21 โดยมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทุกสายพันธุ์ และแสดงกิจกรรมการยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6) ดังนั้นจึงทำการเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 6 ผลของการปรับค่าพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกต่อการยับยั้ง *S. aureus, Salmonella* sp., *E. coli, B. cereus, Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus*

Strains	Inhibitory activity of selected LAB against selected food-borne pathogens (AU/ml)					
	Staphylococcus aureus	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Salmonella* sp.	*Bacillus cereus*	*Escherichia coli*
JH1	<10	<10	<10	<10	<10	<10
JH4	20	20	10	10	10	20
JHa4	<10	<10	<10	<10	<10	<10
JOa1	<10	<10	<10	<10	<10	<10
JO6	20	10	<10	<10	<10	10
JO16	20	20	<10	10	10	20
JR21	20	20	20	20	20	20
JB10	10	10	<10	<10	<10	<10

3. การเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

ทำการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกจากข้อ 2 ตามวิธีการของ Bergey's manual determinative bacteriology volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และ Lactic acid bacteria (Salminen and Wright, 1993) พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 7 จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าสายพันธุ์ JR21 มีเซลล์รูปแท่งสั้น ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สร้างสปอร์ มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสและไรโบสแต่ไม่สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 18 และไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น เท่ากับ 9.6 ทำให้ทราบว่าสายพันธุ์ JR21 จัดอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* และจากการใช้ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลกติกตามวิธีการที่ดัดแปลงจาก Yamada และคณะ (2002) พบว่าเมื่อวิเคราะห์และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 กับฐานข้อมูลที่ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov) เมื่อวันที่ 14 มกราคม 2554 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 มีลำดับเหมือนกับ *Lactobacillus plantarum* AF1 (GenBank accession number FJ386491) โดยมีร้อยละของความเหมือนเท่ากับ 100 (677/677) (ภาพที่ 5) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA มาทำการเทียบเคียงโดยใช้โปรแกรม Treeview จะได้ไฟโลจินิกทรีดังแสดงในภาพที่ 6 จากภาพแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 มีความเหมือนกับ *Lactobacillus plantarum* AF1 มากที่สุด จึงสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 เป็น *Lactobacillus plantarum* JR21

4. การศึกษารูปแบบการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

ทำการถ่าย *Lactobacillus plantarum* JR21 ซึ่งมีอายุ 24 ชั่วโมง (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลาต่างๆคือ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียแลกติกโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร พร้อมทั้งวัดค่าพีเอชและคำนวณหาค่ากิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสที่มีต่อ *S. aureus* ดังแสดงในภาพที่ 7

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21

Characteristics	**Results**
Cell morphology	Short rods
Gram stain reaction	Gram-positive
Spores formation	-
Catalase activity	-
Glucose, ribose fermentation	+
CO_2 production	-
Growth at temperature	
- 10 ^{O}C	-
- 45 ^{O}C	+
Growth in a medium with NaCl (%)	
- 6.5%	+
- 18%	-
Growth at pH	
- pH 9.6	-
- pH 4.5	+

Symbols: + = positive

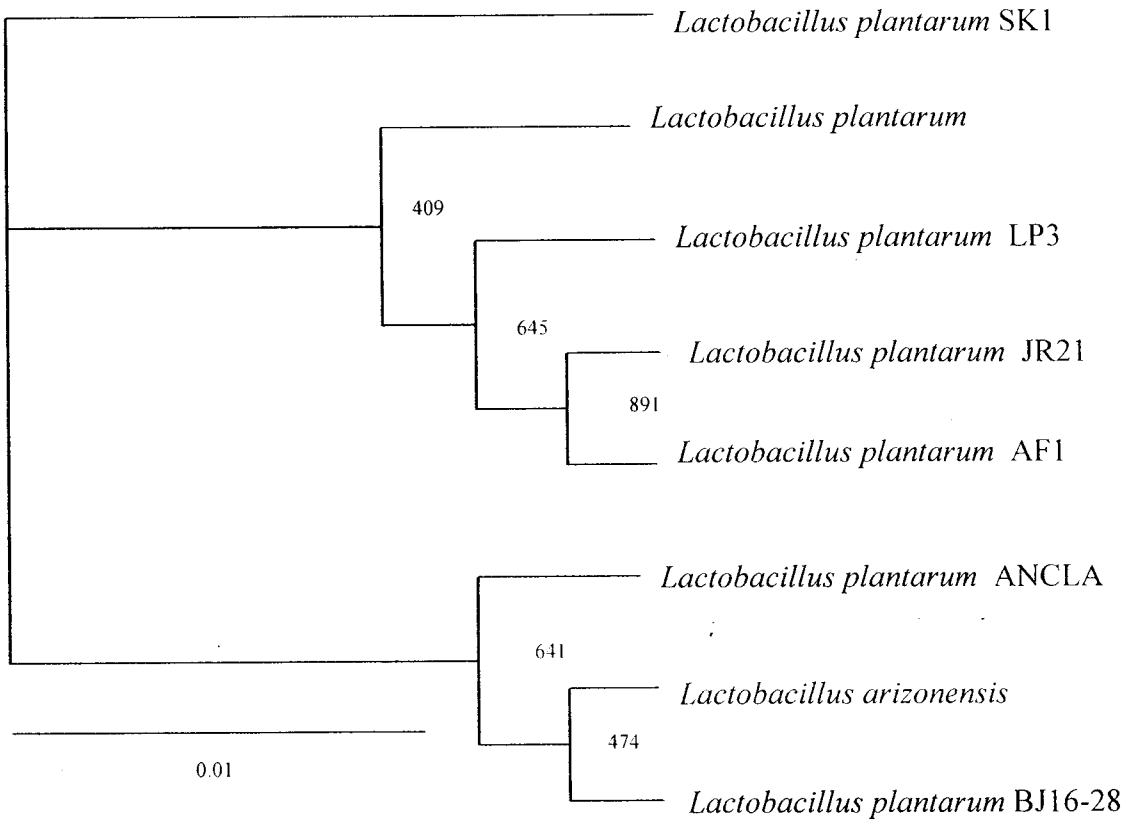
\- = negative

Score = 1342 bits (677), Expect = 0.0

Identities = 677/677 (100%), Gaps = 0/677 (0%) Strand = Plus/Plus

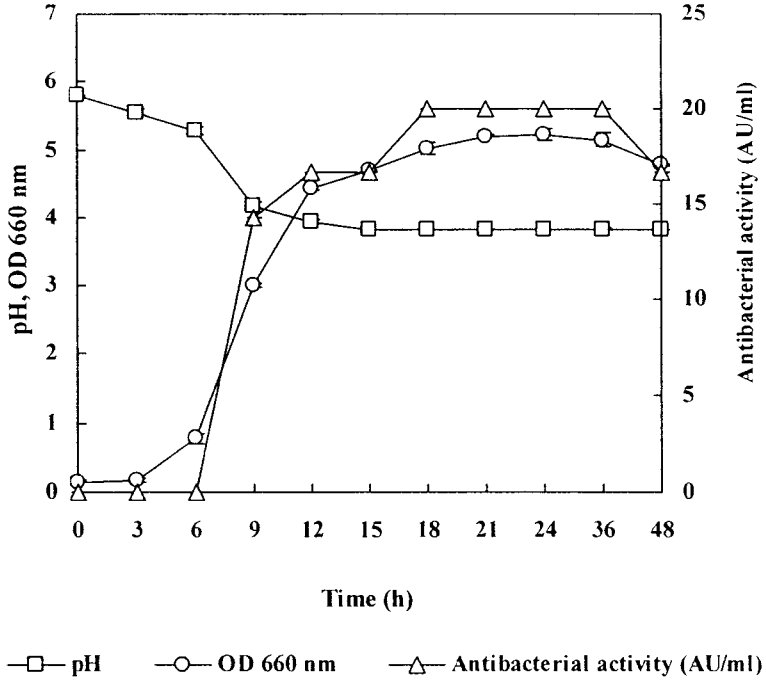
```
Query  4    TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGAT  63
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  17   TCAGGACGAACGCTGGCGGCGTGCCTAATACATGCAAGTCGAACGAACTCTGGTATTGAT  76

Query  64   TGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGA  123
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  77   TGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGA  136

Query  124  AACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTT  183
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  137  AACCTGCCCAGAAGCGGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACTT  196

Query  184  GGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGG  243
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  197  GGACCGCATGGTCCGAGCTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGG  256

Query  244  CGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAG  303
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  257  CGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTCACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAG  316

Query  304  AGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  363
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  317  AGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTA  376

Query  364  GGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGT  423
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  377  GGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGT  436

Query  424  TTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTAT  483
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  437  TTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAACTGTTCAGGTAT  496

Query  484  TGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  543
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  497  TGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTA  556

Query  544  GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTC  603
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  557  GGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTC  616

Query  604  TGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGC  663
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  617  TGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGC  676

Query  664  AGAAGAGGACAGTGGAA  680
            |||||||||||||||||
Sbjct  677  AGAAGAGGACAGTGGAA  693
```

ภาพที่ 5 การเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จากแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 (Query) และ *Lb. plantarum* AF1 (Subject)



ภาพที่ 6 ไฟโลจินิกทรีของ *Lb. plantarum* JR21

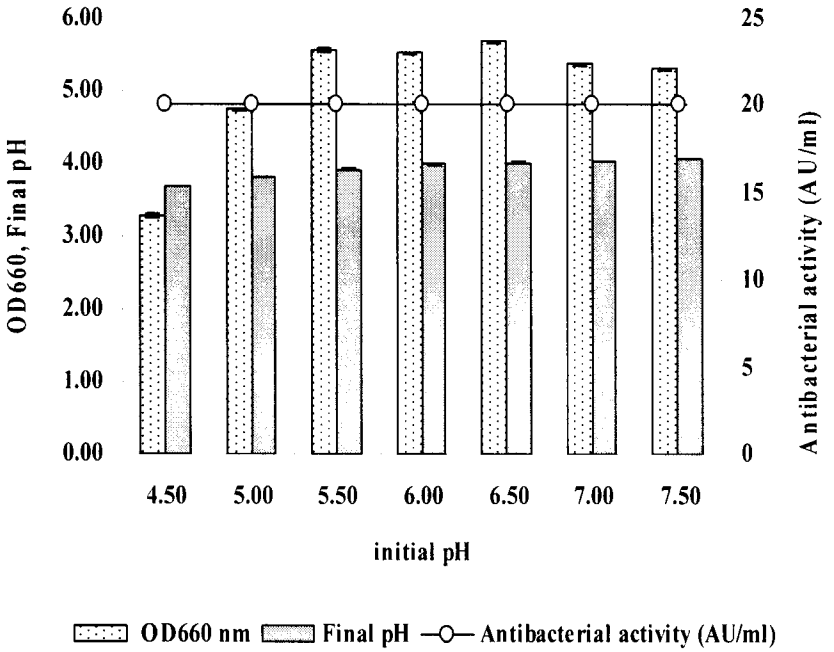
พบว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 มีช่วง lag phase ประมาณ 3 ชั่วโมง จึงเจริญเข้าสู่ช่วง log phase จนถึงชั่วโมงที่18 โดยมีช่วง stationary phase อยู่ที่ชั่วโมง 18 ถึง 36 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไปเซลล์จะเข้าสู่ช่วง death phase จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 และเมื่อทำการทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งพบว่าส่วนใสที่ได้เริ่มมีกิจกรรมการยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงโดยกิจกรรมการยับยั้งมีค่าเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเก็บตัวอย่างส่วนใสในชั่วโมงที่ 9 พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 14.66 AU ต่อมิลลิลิตร ค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 16.67 AU ต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมง 12 และ 15 จากนั้นจะให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดชั่วโมงที่ 18 ถึง 36 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมการยับยั้งจะมีค่าลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 จะมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 16.67 AU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 7



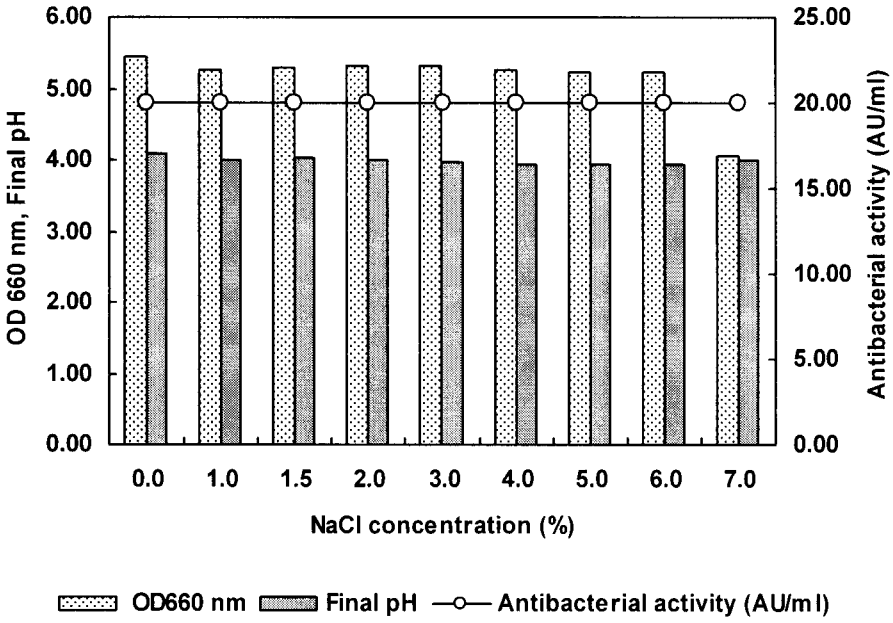
ภาพที่ 7 การเจริญ ค่ากิจกรรมการยับยั้ง และค่าพีเอชของส่วนใสเมื่อเลี้ยง *Lb. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เวลาต่างๆ

5. การเจริญและการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในสภาวะต่างๆ

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก *Lactobacillus plantarum* JR21 มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก โดยศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นและผลของความเข้มข้นเกลือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยในการศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นได้ทำการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชต่างๆกันคือ 4.5, 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้ง *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ทดลองทุกระดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 8 โดยจากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถเจริญได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ด้วยวิธี Broth microdilution assay โดยปรับค่าพีเอชของส่วนใสที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* JR21 ให้มีค่าเท่ากับ 5.0 เพื่อเป็นการลดอิทธิพลของกรดอินทรีย์และหยดเอนไซม์คะตะเลส 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อกำจัด



ภาพที่ 8 ผลของค่าพีเอชเริ่มต้นต่อการเจริญและกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ของ *Lb. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 9 ผลของความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ต่อการเจริญและกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ของ *Lb. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เวลา 24 ชั่วโมง

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่ายังคงมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 เป็นชุดการทดลองควบคุม ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เท่ากับ 6.5 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปคือการศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยทำการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* JR21 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 และมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้มีระดับค่าความเข้มข้นที่ร้อยละ 0-7 โดยจากผลการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีระดับค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-6 *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ไม่แตกต่างกัน กล่าวคือมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร แต่พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 มีผลทำให้การเจริญของเชื้อลดลง ดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งผลการทดลองมีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ พงศ์เทพ วิไลพันธ์ (2546) ที่ได้ทำการศึกษาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M 17 broth ที่เหมาะสมต่อ *Enterococcus faecium* NKR-5-3 ซึ่งคัดแยกมาจากปลาร้า พบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญสูงสุดในอาหารที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0 และ 1 โดยจะไม่พบการเจริญเมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอัตราร้อยละ 9 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ

ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แม้ว่าเชื้อดังกล่าวข้างต้นจะคัดแยกมาจากปลาร้าที่มีปริมาณเกลือสูงถึงร้อยละ 13.4 สอดคล้องกับผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้ที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ที่คัดแยกจากกะปี ซึ่งจากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของกะปีพบว่าส่วนใหญ่กะปีจะมีปริมาณเกลือสูงถึงร้อยละ 18.81-33.93 (มณฑกานต์ ทองสม, 2544)

6. สมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

เมื่อนำส่วนใสจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* JR21 มาศึกษาความคงตัวของกิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสที่ได้ต่อความร้อน พีเอช และเอนไซม์ย่อยโปรตีน ให้ผลดังนี้

6.1 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

เมื่อนำส่วนใสจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* JR21 มาศึกษาผลของความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5, 10, 15, 30 และ 60 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* โดยนำส่วนใสที่ผ่านการให้ความร้อนมาปรับพีเอชเป็น 5.0 หลังจากนั้นนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* โดยวิธี Broth microdilution assay เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ส่วนใสที่ไม่ผ่านการให้ความร้อนในการทดสอบ พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสที่ผ่านการให้ความร้อนและชุดควบคุม มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากันที่ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นมีคุณสมบัติในการคงตัวต่อความร้อนที่ทดสอบ โดยสามารถทนความร้อนได้สูงสุดถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Niku-Paavola และคณะ (1999) ที่พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* VTTE 78076 สามารถผลิตสารยับยั้งที่มีความคงตัวต่อความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และจากการศึกษาของ ศิรินาถ หนูเอก (2540) พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก คือ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* (SN11) สร้างสารยับยั้งที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อนโดยยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งภายหลังการบ่มที่อุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 45 นาที นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งกลุ่มแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ Plantaricin 149, Plantaricin S, Plantaricin T, Plantaricin LC74 และ Plantaricin UG1 มีคุณสมบัติในการทนความร้อนได้สูงถึง 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที (Kato *et al.*, 1994; Jimenez-Diaz *et al.*, 1993; Rekhif *et al.*, 1994; Enan *et al.*, 1996) ในขณะที่แบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถทนความร้อนสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เช่น Plantaricin C ที่ผลิตจาก *Lactobacillus plantarum* L441 ซึ่งคัด

แยกมาจากนม (Gonzalez *et al.*, 1994) ในขณะที่ Lactocin A ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus amylovorus* สามารถทนความร้อนได้ถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที (Contreras *et al.*, 1997) นอกจากนี้ Makras และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาถึงคุณสมบัติของสารยับยั้งที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* ACA-DC 287 เมื่อนำสารยับยั้งไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที พบว่าสารดังกล่าวยังคงแสดงกิจกรรมการยับยั้ง *Salmonella typhimurium* SL1344 โดยเชื้อดังกล่าวที่นำมาศึกษาสามารถผลิตกรดแลกติกได้แต่ผลการยับยั้งมิได้มาจากกรดแลกติกเพียงอย่างเดียว เมื่อทำการเปรียบเทียบกับการใช้กรดแลกติกที่ความเข้มข้น 125 mM กับส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อที่ค่าพีเอชต่ำกว่า 4.5 พบว่าการใช้ส่วนใสสามารถยับยั้ง *Salmonella typhimurium* SL1344 ได้สูงกว่า

6.2 ผลของค่าพีเอชต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

เมื่อนำส่วนใสจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* JR21 มาศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยทำการปรับค่าพีเอชของส่วนใสที่ได้เป็น 2.0-10.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปรับพีเอชของส่วนใสใหม่เป็น 5.0 และทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* โดยวิธี Broth microdilution assay พบว่ากิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับค่าพีเอชมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นมีคุณสมบัติในการคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้างคือ มีความคงตัวทั้งในช่วงความเป็นกรดและความเป็นด่างได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Teixeira de Carvalho และคณะ (2006) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PD69 จากไส้กรอกอิตาเลียนซึ่งสามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* เมื่อนำสารยับยั้งที่แบคทีเรียผลิตได้มาทำการศึกษาถึงความคงตัวต่อพีเอช พบว่าสารยับยั้งที่ผลิตได้มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้างคือตั้งแต่พีเอช 2.0-10.0 เช่นเดียวกับ Lactococcin MMT24 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus lactis* MMT24 ที่ยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งภายหลังการบ่มที่พีเอช 3.0-10.0 (Ghrairi *et al.*, 2005)

6.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

เมื่อนำส่วนใสจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* JR21 มาศึกษาผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้แก่ proteinase K (pH 7.0), α-chymotrypsin (pH 7.0), trypsin (pH7.0) และ pronase E (pH 7.0) ที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมซึ่งใช้ส่วนใสพีเอช 5.0 ที่ไม่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่ากิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ของส่วนใสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และชุด

ควบคุมมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากันที่ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นมีความคงตัวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่นำมาทดสอบคือไม่ถูกทำให้เกิดการเสียสภาพโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เนื่องจากกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นยังคงเท่ากับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นไม่ได้เป็นสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น แบคเทอริโอซิน เช่นเดียวกับ Niku-Paavola และคณะ (1999) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* VTTE 78076 แล้วพบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวไม่ได้ผลิตสารแบคเทอริโอซินในกลุ่ม Plantaricin แต่กลับผลิตสาร antibacterial compounds ในกลุ่มของ low-molecular-mass (LMM) ได้แก่ benzoic acid, cyclo(glycyl-L-leucyl), mevalonolactone และ methyl hydantoin ซึ่งหลังจากทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ได้แก่ α-chymotrypsin, pronase E, protease XIII และ trypsin พบว่าสารยับยั้งดังกล่าวยังคงมีกิจกรรมการยับยั้ง และจากผลการทดสอบถึงการยับยั้งร่วมกับกรดแลกติกพบว่าสารกลุ่มดังกล่าวสามารถยับยั้ง *Pantoe agglomerans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรวมทั้งสามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium avenaceum* ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการวิจัยอีกหลายชิ้นที่บ่งบอกว่าสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกไม่สูญเสียคุณสมบัติแม้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ อาทิ การทดลองของ Makras และคณะ (2006) ซึ่งทำการศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งที่ผลิตโดย *Lactobacillus johnsonii* La1 และ *Lactobacillus plantarum* ACA-DC 287 เมื่อนำสารยับยั้งที่ได้ไปทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน พบว่าสารยับยั้งดังกล่าวยังคงมีกิจกรรมการยับยั้ง *Salmonella typhimurium* SL1344 รวมไปถึงสารยับยั้งที่ผลิตโดย *Enterococcus faecium* TM39 ยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งภายหลังการทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้แก่ α-chymotrypsin, trypsin, pepsin และ proteinase K (Tsai *et al.*, 2004)

จากผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นมีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนได้สูงสุดถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และพบว่าสารยับยั้งดังกล่าวนี้มีความคงตัวที่พีเอช 2.0-10.0 โดยที่ค่ากิจกรรมการยับยั้งไม่ลดลงเลย เมื่อนำสารยับยั้งดังกล่าวไปทดสอบผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนเพื่อทดสอบว่าสารยับยั้งดังกล่าวเป็นสารยับยั้งในกลุ่มแบคเทอริโอซินหรือไม่ โดยทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆดังนี้ proteinase K, α-chymotrypsin, trypsin และ pronase E พบว่าสารยับยั้งดังกล่าวยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับส่วนใสของชุดควบคุมที่ไม่ได้ผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน แสดงว่าสารยับยั้งดังกล่าวไม่ใช่สารยับยั้งในกลุ่มของแบคเทอริโอซิน ประกอบกับจากผลการทดลองในข้อ 2.2 ที่ทำการปรับค่าพีเอชของส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อเป็น 5.0 และเติมเอนไซม์คะตะเลสในส่วนใส พบว่าสารยับยั้งดังกล่าวยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบกับชุดการ

ทดลองควบคุมที่มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 5.0 ด้วย 5 N HCl พบว่าไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบได้ สารยับยั้งที่ *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นอาจจะเป็นสารยับยั้งชนิดอื่นๆที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นนอกเหนือจากแบคเทอริโอซินและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทั้งนี้อาจเกิดจากสารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารหลายชนิด และจากผลการทดสอบทางชีวเคมีแล้วไม่พบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้สามารถจัดจำแนก *Lactobacillus plantarum* JR21 อยู่ในกลุ่มของ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แล้วให้กรดแลกติกได้ถึงร้อยละ 85 หรือมากกว่า ประกอบกับจากผลการทดลองถึงความคงตัวของกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 3.5 ด้วยกรดแลกติก พบว่าเมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ตรวจพบเมื่อใช้ชุดการทดลองควบคุมที่มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 3.5 ด้วยกรดแลกติกแต่ไม่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ จึงมีความเป็นไปได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสที่ได้มาจากการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีสาเหตุหนึ่งมาจากอิทธิพลของกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดแลกติกและอาจมีกรดอินทรีย์ตัวอื่นๆอีก ได้แก่ acetic acid, propionic acid และ benzoic acid เป็นต้น (Ostling and Lindgren, 1993; Niku-Paavola *et al.*, 1999; Strom *et al.*, 2005) รวมไปถึงสารยับยั้งในกลุ่มอื่น อาทิ สารในกลุ่มของ low-molecular-mass (LMM) ได้แก่ cyclo(glycyl-L-leucyl), mevalonolactone และ methyl hydantoin เป็นต้น ซึ่งเป็นกลุ่มของสารยับยั้งที่มีรายงานว่าผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* VTT E-78076 (Niku-Paavola *et al.*, 1999) โดยการยับยั้งที่เกิดจากการสะสมของกรดอินทรีย์ส่งผลให้ค่าพีเอชลดลงซึ่งมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด เช่น *Escherichia coli*, *Bacillus* sp. และ *Pseudomonas* sp. (Ostling and Lindgren, 1993) สำหรับการยับยั้งที่เกิดขึ้นเนื่องจากการลดลงของค่าพีเอชและเกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ โดยปกติแล้วเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์มีหน้าที่เป็นเยื่อเลือกผ่าน กรดอินทรีย์ในรูปที่ไม่แตกตัวจะสามารถผ่านเยื่อหุ้มเซลล์โดยวิธีแพร่ผ่าน เมื่อเข้าสู่ภายในเซลล์กรดอินทรีย์จะเกิดการแตกตัวและปลดปล่อยโปรตอนเข้าสู่ภายในไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดการสะสมของกรดภายในเซลล์ และทำลายสมดุลความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ ส่งผลให้แรงขับเคลื่อนโปรตอนถูกทำลายซึ่งจะขัดขวางกระบวนการเมตาบอลิซึมที่สำคัญภายในเซลล์ ยับยั้งกลไกการขนส่งอาหารและกระบวนการสร้างพลังงาน ทำให้เซลล์ไม่สามารถเจริญเติบโตและอยู่รอด (Cherrington, 1990) เช่น Niemand และคณะ (1983) พบว่าการเติมกรดแลกติกลงในเนื้อบดเพื่อให้มีค่าพีเอชเป็น 5.0 จะมีผลในการลดจำนวนของเชื้อใน

กลุ่มของ Enterobacteriaceae, Pseudomonads และ Brochospacta แต่จะไม่มีผลต่อ *Leuconostoc* และ *Pediococcus* เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตกรดได้ทำให้ตัวมันเองปรับสภาพในการทนกรด นอกจากนี้เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ (2536) ยังรายงานว่าสามารถใช้กรดอะซิติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองต่างๆ เช่น ไส้กรอกเปรี้ยว โดยกรดอะซิติกมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย Dickson (1992) พบว่าเมื่อนำเนื้อวัวที่มีการเติม *Salmonella typhimurium* มาทดสอบกับกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2 จะมีผลในการลดจำนวนของแบคทีเรียดังกล่าวได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Jay (1996) ที่ได้ศึกษาผลของกรดอะซิติกความเข้มข้นร้อยละ 2 ในการทำลาย *Salmonella enteritidis* และ *Salmonella typhimurium* ในน้ำสลัด โดยเติมเชื้อดังกล่าวลงในน้ำสลัดจำนวน 5.0×10^{6} เซลล์ พบว่าหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จะไม่พบเชื้อเหลืออยู่เลย Huttunen และคณะ (1995) พบว่า *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum* และ *Streptococcus bovis* สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Pseudomonas putida* และ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลกติกสร้างคือ 2-pyrrolidone-5-carboxylic acid นอกจากนี้จากการรายงานของ Corsetti และคณะ (1998) พบว่า *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 สามารถผลิตกรด caproic ซึ่งออกฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา Magnusson และคณะ (2003) พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* 21B สามารถผลิต phenyllactic acid และ 4-hydroxy-phenyllactic acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเส้นใยหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Penicillium commune, Fusarium sporotrichioide* โดย phenyllactic acid มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 7.5-10.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

7. การทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก

7.1 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus plantarum* JR21 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง สำหรับชุดควบคุมจะไม่มีการเติมเกลือน้ำดี พบว่าภายหลังการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ได้เป็นอย่างดี โดยเชื้อดังกล่าวยังคงมีชีวิตรอดอยู่ที่ 8.59 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 7.32 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากจำนวนแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นที่ 8.60 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 8.54 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ คิดเป็นร้อยละของการรอดชีวิตของแบคทีเรียเท่ากับร้อยละ 99.8 และ 85.7 ตามลำดับ

เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีแบคทีเรียแลกติก 8.86 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากจำนวนแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นที่ 8.66 log CFU ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 100 (ภาพที่ 10)

ตารางที่ 8 ผลของอุณหภูมิ พีเอช และเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *Lb. plantarum* JR21

Treatments	Inhibitory activity of *Lb. plantarum* JR21 against *S. aureus* (AU/ml)
Control	20
Enzyme stability	
proteinase K	20
α-chymotrypsin	20
trypsin	20
pronase E	20
Heat stability	
100 ^{o}C for 5 min	20
100 ^{o}C for 10 min	20
100 ^{o}C for 15 min	20
100 ^{o}C for 30 min	20
100 ^{o}C for 60 min	20
121 ^{o}C for 15 min	20
pH stability	
pH 2.0-10.0 for 2 h	20

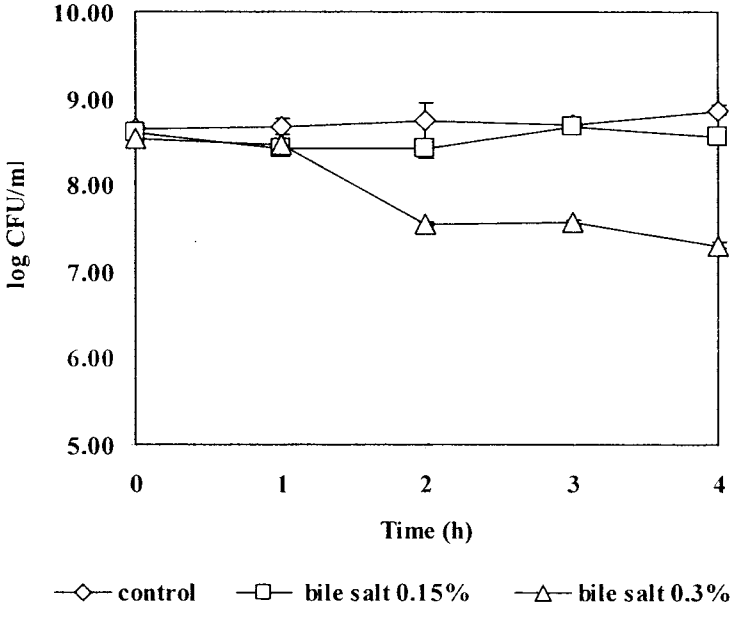
จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อ *Lactobacillus plantarum* JR21 สัมผัสกับสภาวะที่มีเกลือน้ำดีเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดของ *Lactobacillus plantarum* JR21 จะมีจำนวนคงที่และลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อสัมผัสกับสภาวะที่มีเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ได้ ซึ่งในร่างกายของมนุษย์มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีอยู่ในช่วงร้อยละ 0.15-0.30 โดยที่เกลือน้ำดีจะถูกหลั่งจากตับอ่อนภายในทางเดินอาหาร

ส่วนต้นบริเวณลำไส้เล็กซึ่งจะช่วยในการย่อยอาหารจำพวกไขมัน ดังนั้นคุณสมบัติของแบคทีเรียโปรไบโอติกต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีในระดับความเข้มข้นนี้ได้ (Erkkila and Petaja, 2000; Brashears *et al.*, 2003) โดยผลการทดลองที่ได้มีความสอดคล้องกับการทดลองของ Kimoto และคณะ (2004) ที่ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกของเชื้อสายพันธุ์ *Lactococcus* ซึ่งเชื้อดังกล่าวคัดแยกมาจากหญ้าหมัก โดยทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.30 พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวมีความสามารถทนเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.30 สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Pennacchia และคณะ (2004) ที่ศึกษาผลของเกลือน้ำดีต่อการเจริญของ *Lactobacillus* พบว่าสามารถเจริญบนอาหาร MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.30 ได้ และในการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus* 47 สายพันธุ์ โดยทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 พบว่าแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อเกลือน้ำดีทั้ง 2 ระดับความเข้มข้นได้ (Jacobsen *et al.*, 1999) และจากรายงานของ Erkkila และ Petaja (2000) ที่ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีโดยทำการทดลองในสภาวะที่คล้ายคลึงกับระบบทางเดินอาหารภายในสภาวะลำไส้เล็ก โดยเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอช 4.0-7.0 และมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) มีความสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.30 พีเอช 6.0 เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้าง bile salt hydrolase enzyme (BSH) จากการทดลองของ Brennan และคณะ (1993) พบว่า *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียแลกติกที่พบอาศัยอยู่ภายในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีคุณสมบัติทนต่อเกลือน้ำดี โดยมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *Lactobacillus acidophilus* จึงมีส่วนช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ และช่วยรักษาโรคที่เกิดจากลำไส้ด้วย

7.2 การทดสอบการทนต่อกรด

จากการนำ *Lactobacillus plantarum* JR21 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 พบว่าเมื่อเชื้อสัมผัสกับสภาวะเป็นกรดที่ระดับพีเอช 2.0 และ 3.0 เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 11 สำหรับชุดการทดลองพีเอช 2.0 ที่เวลา 1 ชั่วโมง มีจำนวนของ *Lactobacillus plantarum* JR21 ที่เหลือรอด เท่ากับ 4.82 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 8.56 log CFU ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 56.3 และไม่มีจำนวนเหลือรอดที่ 2 ชั่วโมง แต่เมื่อทดสอบการทนกรดที่ระดับพีเอช 3.0 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่า *Lactobacillus plantarum*

JR21 มีจำนวนเหลือรอด 6.47 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 8.61 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 75.1 สำหรับที่ระดับพีเอช 4.0 และ 5.0 พบว่ามีจำนวนของแบคทีเรียแลกติกเท่ากับ 8 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตลอดทั้ง 4 ชั่วโมง ของการศึกษา ซึ่งมีปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่าพีเอช 6.0



ภาพที่ 10 การรอดชีวิตของ *Lb. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเกลือน้ำดี หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 ได้ถึง 4 ชั่วโมง โดยมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 75.1 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Goldir และคณะ (1992) ที่ได้รายงานว่าสายพันธุ์ *Lactobacillus rhamnosus* GG ซึ่งมีคุณสมบัติทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก Mishra และ Prasad (2005) ทำการศึกษาคุณสมบัติการทนต่อกรดของ *Lactobacillus casei* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการรายงานว่ามีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกพบว่าสามารถทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 และจากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกของ *Lactobacillus* จำนวน 29 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์นมหมักพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง

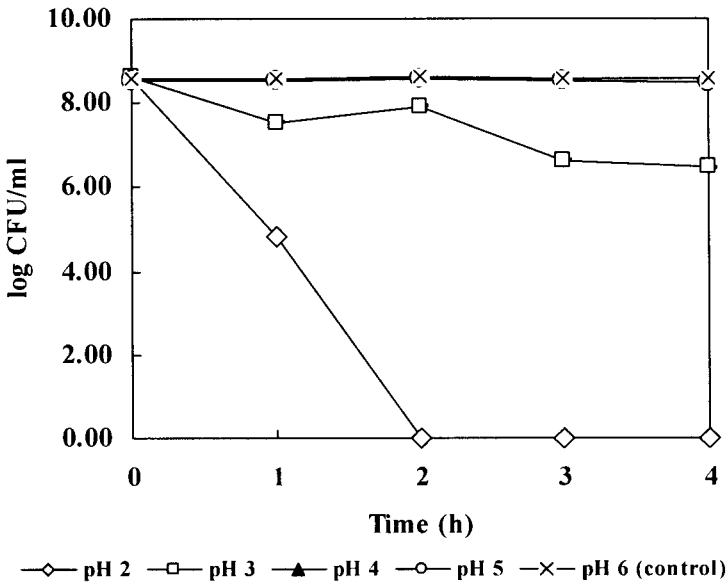
สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จำนวน 16 สายพันธุ์ และทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 1.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Maragkoudakis *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Jacobsen และคณะ (1999) พบว่าจากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจำนวน 44 สายพันธุ์ พบว่ามีจำนวน 29 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกและสามารถทนกรดที่พีเอช 2.5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง สำหรับการทนต่อกรดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกนั้นยังพบว่าสายพันธุ์ของเชื้อก็มีผลกล่าวคือ *Lactobacillus fermenttum* LF33 มีความสามารถในการทนต่อกรดได้มากกว่า *Lactobacillus acidophilus* LAP5 (Tsai *et al.*, 2005) *Lactobacillus acidophilus* ADH สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นๆที่ได้มีการรายงานไว้ว่าเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก (Conway *et al.*, 1986)

อย่างไรก็ตามแม้ว่าภายในกระเพาะอาหารจะมีค่าพีเอชที่เป็นกรด (2.0) ซึ่งเป็นค่าพีเอชที่ต่ำมากและสามารถทำลายแบคทีเรียแลกติกได้ แต่เมื่อมนุษย์รับประทานอาหารเข้าไปค่าพีเอชก็จะเพิ่มเป็น 3.0-4.0 การรับประทานอาหารเข้าไปจะช่วยป้องกันแบคทีเรียแลกติกจากกรดและเอนไซม์ต่างๆในระบบทางเดินอาหาร ทำให้แบคทีเรียแลกติกมีชีวิตรอดได้ภายหลังจากการย่อยของอาหารภายในกระเพาะอาหารเป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง จากนั้นกระเพาะอาหารก็จะว่างพร้อมที่จะรองรับอาหารซึ่งรับประทานเข้ามาใหม่ (Mishra and Prasad, 2005) จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 2.0 ได้นาน 1 ชั่วโมง และสามารถทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 ได้ถึง 4 ชั่วโมง ทำให้แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์นี้สามารถทนต่อสภาวะที่รุนแรงในกระเพาะอาหารได้ ทั้งนี้ก็เพื่อที่จะมีชีวิตเหลือรอดไปยังลำไส้ใหญ่ได้ (Park *et al.*, 2002)

7.3 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกด้วยวิธีการเลี้ยงร่วมกัน

จากการศึกษาการเจริญของ *Lactobacillus plantarum* JR21 ร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ประกอบด้วย *S. aureus, E. coli* และ *Salmonella* sp. ในอาหาร minimal medium เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยปรับความเข้มข้นของแบคทีเรียแลกติกและแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 6 log CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 เริ่มมีผลการยับยั้งภายหลังการเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อทำการเลี้ยงร่วมกันครบ 18 ชั่วโมง พบว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, E. coli* และ *Salmonella* sp. ได้เพิ่มมากขึ้นโดยมีจำนวนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ลดลงเหลือ 3.44, 3.57 และ 3.57 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ในเวลาเดียวกันชุดควบคุมที่ไม่มีการเลี้ยงร่วมกับ *Lactobacillus plantarum* JR21 มีจำนวนของ *S. aureus, E. coli* และ *Salmonella* sp. ถึง 8.92, 8.57 และ 8.92 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความสามารถของ *Lactobacillus plantarum* JR21 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้

ถึงร้อยละ 61.43, 58.34 และ 59.98 ตามลำดับ โดยการยับยั้งเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์เมื่อทำการเลี้ยงร่วมกันครบ 24 ชั่วโมง ดังแสดงผลในตารางที่ 9 และภาพที่ 12 ในขณะที่จำนวนของ *Lactobacillus plantarum* JR21 ไม่ลดลงในทุกชุดการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์



ภาพที่ 11 การรอดชีวิตของ *Lb. plantarum* JR21 ในสภาวะความเป็นกรดที่ระดับค่าพีเอช 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบได้ดีพอกันทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ (2539) ที่พบว่าแบคทีเรียแลกติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารได้ดีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยทำการศึกษาแบคทีเรียแลกติกในจีนัส *Lactobacillus* สายพันธุ์ที่คัดแยกมาจากนมเปรี้ยว 5 ยี่ห้อ จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus casei* 2 สายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* 2 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* 1 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* โดยมีค่าร้อยละของการยับยั้งเท่ากับร้อยละ 61.1 และ 75.3 ตามลำดับ และจากการทดลองของ อรัญญา สังขศรี (2541) ที่ได้ทำการแยก *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมือง

ของไทย พบว่า *Lactobacillus plantarum* A49a แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Salmonella typhi* 3299 ได้ร้อยละ 100 ส่วน *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 และ *Escherichia coli* 1189 ถูกยับยั้งได้ใกล้เคียงกันคือร้อยละ 98.78 และ 97.13 ตามลำดับ สำหรับการทดลองการเลี้ยงร่วมกันครั้งนี้ยังไม่ทราบแน่ชัดว่ากิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลจากสารยับยั้งชนิดใดหรืออาจเป็นการทำงานร่วมกันระหว่างสารยับยั้งหลายชนิด เนื่องจากการทดลองข้างต้นในข้อ 2.2 ที่พบว่ากิจกรรมการยับยั้งที่เกิดจาก *Lactobacillus plantarum* JR21 เป็นผลของสารยับยั้งชนิดอื่นนอกเหนือจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารยับยั้งในกลุ่มของแบคเทอริโอซิน ที่สำคัญจากการทดลองที่ผ่านมาในการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกในระดับจีนัส พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวนี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสและไรโบสแต่ไม่สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นจึงสามารถจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มของ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มนี้มีความสามารถในการกรดผลิตแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักได้ถึงประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่า จึงมีความเป็นไปได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* JR21 เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เกิดขึ้นนั้นอาจเนื่องมาจากในกระบวนการเจริญของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวจะมีการผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นมาเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยเฉพาะกรดแลกติกที่ได้มาจากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ทำให้ค่าพีเอชในระหว่างการเจริญลดต่ำลงส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค และทำให้แบคทีเรียก่อโรคถูกทำลายหรือไม่สามารถเจริญได้ในที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยร่วมกันคือ ปริมาณกรดอินทรีย์ต่างๆ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารยับยั้งอื่นๆ รวมทั้ง antibiotic like substances ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น (Gilliand and Spect, 1997; Gonzalez *et al.*, 1993) และมีรายงานว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus acidophilus* L1 สามารถอาศัยอยู่ภายในลำไส้ของมนุษย์และผลิตสารยับยั้งในกลุ่มของ non-bacteriocin antibacterial substances ขึ้นมาเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารต่างๆได้ (Camard *et al.*, 1997)

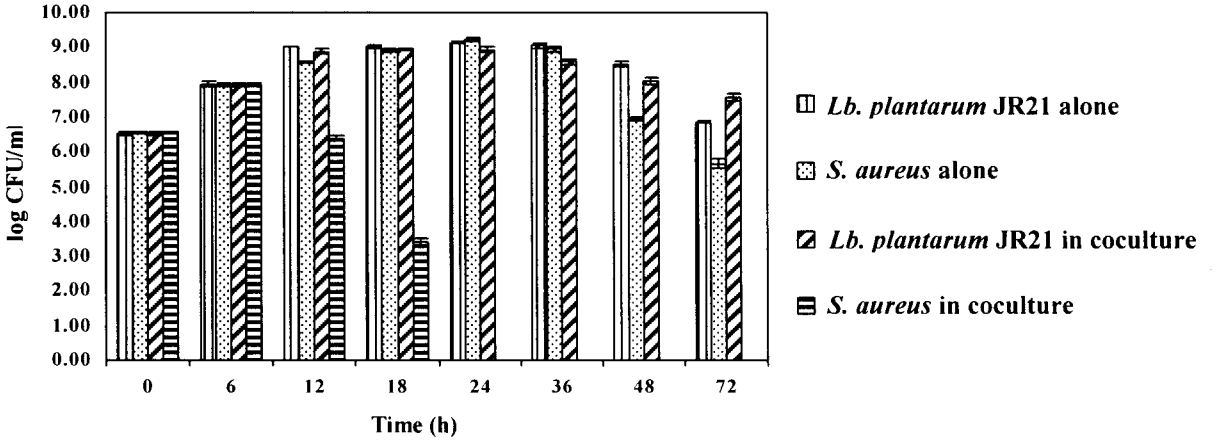
ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S. aureus, E. coli* และ *Salmonella* sp. โดย *Lb. plantarum* JR21 เมื่อเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Time (h)	Inhibition against indicator bacteria (%)		
	Staphylococcus aureus	*Escherichia coli*	*Salmonella* sp.
0	0.00	0.00	0.00
6	0.00	0.00	0.00
12	25.32	24.15	27.46
18	61.43	58.34	59.98
24	100.00	100.00	100.00
36	100.00	100.00	100.00
48	100.00	100.00	100.00
72	100.00	100.00	100.00

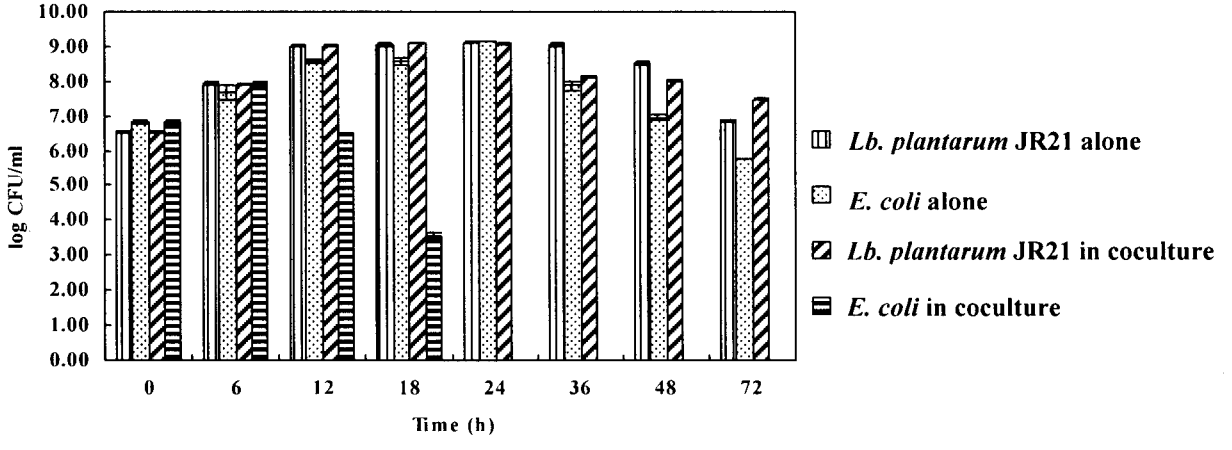
จากผลการทดลองจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำ *Lactobacillus plantarum* JR21 ไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก เนื่องจากเชื้อดังกล่าวแสดงคุณสมบัติพื้นฐานของการเป็นโปรไบโอติก กล่าวคือสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15-0.30 มีชีวิตรอดที่พีเอช 3.0 ภายหลังการทดสอบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (โดยมีปริมาณเชื้อมากกว่า 6.47 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารโดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, E. coli* และ *Salmonella* sp. ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธีการเลี้ยงร่วมกัน ซึ่งคุณสมบัติที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นคุณสมบัติขั้นพื้นฐานของการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก กล่าวคือคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ เนื่องจากในทางเดินอาหารส่วนต้นโดยเฉพาะบริเวณลำไส้เล็กจะมีเกลือน้ำดีที่หลั่งจากตับอ่อนเข้ามาช่วยในการย่อยอาหารจำพวกไขมัน ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณร้อยละ 0.15-0.30 (Erkkila และ Petaja, 2000) อีกทั้งแบคทีเรียในกลุ่มโปรไบโอติกจะต้องมีคุณสมบัติในการทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี เนื่องจากในกระเพาะอาหารจะมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 1.0-3.0 ซึ่งเกิดจากการที่ร่างกายมีการหลั่งของกรดไฮโดรคลอริกเพื่อช่วยในการย่อยอาหาร ทำให้ค่าพีเอชในกระเพาะอาหารค่อนข้างต่ำ ดังนั้นจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่ดีจึงต้องมีความสามารถในการทนต่อพีเอชในช่วงนี้ และ

ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีของเชื้อจะทำให้โปรไบโอติกสามารถผ่านและเจริญในลำไส้ใหญ่ได้ โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกช่วยป้องกันการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดอาการท้องเสียและท้องร่วง โดยโปรไบโอติกจะไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร เนื่องจากสามารถสร้างสารขึ้นมายับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค อาทิ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน (Fuller, 1993) และ low-molecular-mass (LMM) (Niku-Paavola, 1999) เป็นต้น

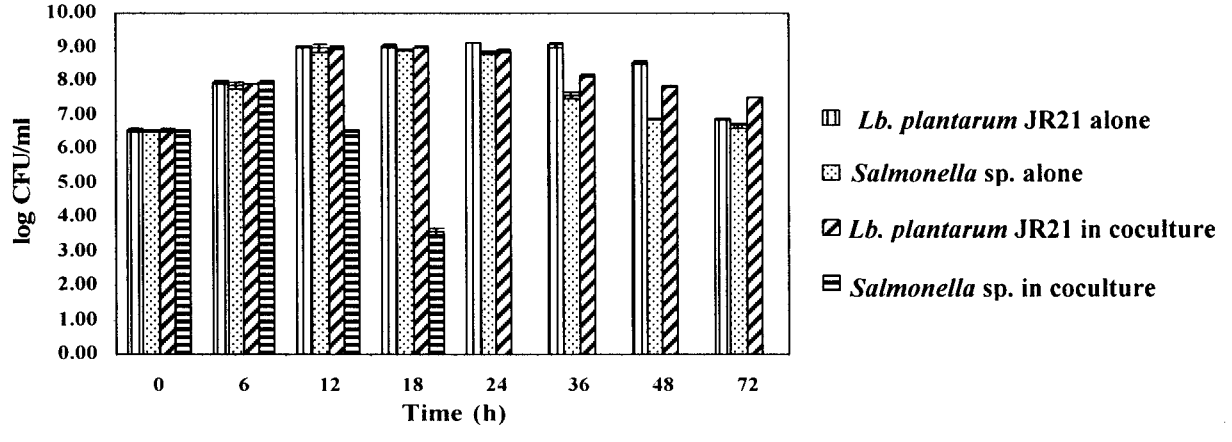
A.



B.



C.



ภาพที่ 12 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S. aureus* (A), *E. coli* (B) และ *Salmonella* sp. (C) โดย *Lb. plantarum* JR21 เมื่อเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

สรุปผลการทดลอง

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่นำมาทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีทั้งหมด 17 ชนิด แบ่งออกเป็นอาหารหมักจากสัตว์ ได้แก่ ปลาส้ม ไตปลา ปลาร้า หนาง แหนม กุ้งส้ม กะปิ หอยดอง และน้ำเคย อาหารหมักจากพืชได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก สะตอดอง หัวไชโป้ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง และกิมจิ จากตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาคัดแยกเชื้อทั้งหมดจำนวน 52 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างอาหารหมักที่สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.9 และมีจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ 230 สายพันธุ์ สำหรับอาหารหมักที่สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ได้แก่ ปลาส้ม ไตปลา ปลาร้า กุ้งส้ม หนาง แหนม กะปิ น้ำเคย ผักเสี้ยนดอง สะตอดอง หน่อไม้ดอง และกิมจิ

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกทั้ง 230 สายพันธุ์ ด้วยวิธี Broth microdilution assay พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 55 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในยับยั้งได้สูง โดยที่มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 50 AU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. และ *Vibrio parahaemolyticus* พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 8 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทุกสายพันธุ์ โดยแสดงให้เห็นว่ามีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ในช่วงกว้าง ซึ่งผลของกิจกรรมการยับยั้งมีค่าเท่ากับ 25 AU ต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และลดอิทธิพลการยับยั้งโดยกรดอินทรีย์ พบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้เพียง 1 สายพันธุ์ ที่แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทุกสายพันธุ์ที่ใช้ทดสอบและกิจกรรมการยับยั้งมีค่าเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการจัดจำแนกสายพันธุ์ที่คัดเลือกโดยการศึกษาทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการเทียบเคียงลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวคือ *Lactobacillus plantarum* JR21 โดยมีร้อยละความเหมือนเท่ากับ 100 (677/677) (GenBank accession number FJ386491) เมื่อเทียบเคียงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA จาก *Lactobacillus plantarum* AF1

สำหรับการศึกษาการเจริญของ *Lactobacillus 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 *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 และเมื่อทำการทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งพบว่าส่วนใสที่ได้เริ่มมีกิจกรรมการยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงโดยกิจกรรมการยับยั้งมีค่าเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเก็บตัวอย่างส่วนใสในชั่วโมงที่ 9 พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 14.66 AU ต่อมิลลิลิตร ค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 16.67 AU ต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมง 12 และ 15 จากนั้นจะให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18 ถึง 36 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมการยับยั้งจะมีค่าลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 จะมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 16.67 AU ต่อมิลลิลิตร

เมื่อศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นและผลของระดับความเข้มข้นเกลือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่เหมาะสม พบว่าการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 6.5 และระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-6 มีความเหมาะสมต่อการเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งได้สูง โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 มีผลทำให้การเจริญเติบโตของเชื้อเริ่มลดลง

จากการนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* JR21 มาศึกษาผลของปัจจัยแวดล้อมต่างๆที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* พบว่าสารยับยั้งที่ *Lactobacillus 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 *Lactobacillus plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นไม่ได้เป็นสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น แบคเทอริโอซิน โดยพบกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร

เมื่อศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของ *Lactobacillus plantarum* JR21 พบว่าเชื้อสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.15-0.30 โดยยังคงมีชีวิตรอดอยู่ที่ 8.59 log CFU ต่อมิลลิลิตร และ 7.32 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 99.8 และ 85.7 ตามลำดับ *Lactobacillus plantarum* JR21 สามารถทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 3.0 ได้นานถึง 4 ชั่วโมง โดยมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 75.1 เมื่อศึกษาถึงการเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สายพันธุ์ต่างๆ พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus, E. coli* และ *Salmonella* sp. 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 เพื่อเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย

3. ศึกษาโครงสร้างเบื้องต้นของสารยับยั้งที่ได้จากการเลี้ยง *Lactobacillus plantarum* JR21 โดยอาจใช้วิธีการทำบริสุทธิ์สารยับยั้งดังกล่าว ทั้งนี้เพื่อจำแนกสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือก

เอกสารอ้างอิง

กิจการ ศุภมาตย์. 2544. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องจุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ. ศูนย์วิจัยคุณภาพสัตว์น้ำ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 51.

เกศินี เมธาวัชรวงศ์. 2532. การเน่าเสียของปลา. ว. อาหารและอุตสาหกรรมเกษตร. 1: 55-60.

ชุตินันท์ รัตนไพบูลย์สวัสดิ์. 2547. การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลกติกที่ผลิตสารยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

นวลจันทร์ พารักษา. 2533. สาระน่ารู้เกี่ยวกับโปรไบโอติก. สุกรสาส์น. 16: 6-13.

ทองคำ คิมหะมานนท์. 2538. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตปลาหมัก (ส้มฟัก). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พงศ์เทพ วิไลพันธ์. 2546. แบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลกติกที่พบในปลาร้า.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

พิไลพรรณ พงษ์พูล. 2531. แพ็ธโธเจนนิคแบคทีริออลโลจิ. กรุงเทพฯ: ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ บางแสน. หน้า 3-140.

มณฑกานต์ ทองสม. 2544. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแลกติกชอบเค็มจากกะปิ. ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 1-2.

มลิวรรณ ส่งเสริม. 2542. การยับยั้ง *Escherichia coli* 0157 H:7 และ *Listeria monocytogenes* ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมและผลิตภัณฑ์นม. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 1-23.

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536. การถนอมรักษาเนื้อสัตว์. *ใน* เนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. หน้า 47-56. กรุงเทพฯ: สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ลูกจันทร์ ภัครัชพันธุ์. 2524. อาหารหมัก. *ใน* อุตสาหกรรมอาหารหมักดอง. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 70-155.

วลัยกาญจน์ ไกรวรรณ์. 2542. การยับยั้ง *Listeria monocytogenes* และ *Escherichia coli* 0157 H:7 ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารประเภทเนื้อสัตว์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 1-42.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. โปรซีดดิงส์แลกติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย. ครั้งที่ 1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. อาหารพื้นเมือง. *ใน* ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 37-52.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, เมตตา องค์สกุล และ ผกาพรรณ สิงห์ชัย. 2539. ผลการยับยั้งของ *Lactobacillus* จากนมเปรี้ยวพร้อมดื่มที่มีต่อ *Staphylococcus aureus, Salmonella typhimurium* และ *Escherichia coli* และเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน. สงขลานครินทร์ วทท. 18: 302-305.

สุมนา หนูเอียด. 2542. การทดสอบคุณสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากนมและผลิตภัณฑ์นม. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 27.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2535. การติดเชื้อและการเป็นพิษของอาหารที่มีแบคทีเรียเป็นสาเหตุ. *ใน* จุลชีววิทยาอาหาร. แสงจันทร์การพิมพ์. กรุงเทพฯ หน้า 220-227.

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิวาพร ศิวเวช. 2535. วัตถุเจือปนอาหารในผลิตภัณฑ์อาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม: ศูนย์ส่งเสริมและอบรมการเกษตรแห่งชาติ. หน้า 13-17, 301-306.

อรษา สุตเธียรกุล. 2541. โรคติดเชื้อ. พิมพ์ครั้งที่ 2 กรุงเทพฯ: โฮลิสติก พับลิชชิ่ง จำกัด. หน้า 275-281

อัจฉรา หนูเพชร, ดวงพร คันธโชติ และ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2547. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสำหรับมนุษย์จากอาหารหมักของไทย. ว. สงขลานครินทร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 26: 659-670.

อุทัย คันโธ. 2535. หลักการโปรไบโอติกเชิงอาหารสัตว์. ว. สุกรสาสน์ 18: 11-16.

Anders, R.F., Hogg, D.M. and Jago, G.R. 1970. Formation of hydrogen peroxside by Group N Streptococci and it effect on their growth and metabolism of *Lactobacillus plantarum*. Int. J. Food Microbiol. 52: 149-160.

Arihara, K., Ota, H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanha, H., Akimoto, M., Kanai, S. and MiKi, T. 1998. *Lactobacillus acidophilus*. Group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. J. Food Sci. 63: 544-547.

Aslim, B., Yuksekdag, Z.N., Sarikaya, E. and Beyatli, Y. 2005. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. LWT. 38: 691–694.

Axelsson, L.J. 1993. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. *In* Lactic Acid Bacteria. (Salminen, S. and Wright, A. V., eds). p. 1-64. Marcel Dekker. New York.

Axelsson, L. 2004. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. In Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects, editor, S. Salminen, A. von Wright and A. Ouwehand, Marcel Dekker, New York, USA. pp. 1-66.

Barefoot, S.F. and Klaenhammer, T.R. 1983. Detection and activity of Lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1808-1815.

Belgacem, Z.B., Ferchichi, M., Prevost, H., Dousset, X. and Manai, M. 2008. Screening for antilisterial bacteriocin-producing lactic acid bacteria from "Gueddid" a traditionally Tunisian fermented meat. Meat Sci. 78: 513-521.

Bello, F.D., Clarke, C.I., Ryan, L.A.M., Ulmer, H., Schober, T.J., Stom, K., Sjogren, J., Sinderen, D.V., Schnurer, J. and Arendt, E.K. 2007. Improvement of the quality and shelf life of wheat bread by fermentation with the antifungal strain *Lactobacillus plantarum* FST 1.7. J. Cereal Sci. 45: 309-318.

Bhunia, A.K., Johnson, M.C., Ray, B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of action of Pediocin AcH from *Pediococcus acidilactici* H on sensitive bacteria strains. J. Appl. Bacteriol. 70: 25-33.

Brashears, M.M., Jaroni, D. and Trimble, J. 2003. Isolation, selection and characterization of lactic acid bacteria for a competitive exclusion product to reduce shedding of *Escherichia coli* O157:H7 in cattle. J. Food Prot. 66: 355–363.

Brennan, M., Wanismail, B. and Ray, B. 1993. Prevalence of viable *Lactobacillus acidophilus* in dried commercial products. J. Food Prot. 46: 887-892.

Brink, B.T., Minekus, M., Vossen, J.M., Leer, R.J. and Veld, J.H.I. 1994. Antimicrobial activity of lactobacilli: preliminary characterization and optimization of Acidocin B, a novel bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* M46. J. Appl. Bacteriol. 77: 140-148.

Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.L., Delboni, R.R. and Oliveira, J.D. 2004. Isolation of bacteriocin-producing of lactic acid bacteria from meat and meat products and its spectrum of inhibitory activity. J. Res. Brazil. 35: 137-144.

Brul, S. and Coote, P. 1999. Preservative agents in foods. mode of action and microbial resistance mechanisms. Int. J. Food Microbiol. 50: 1–17.

Bruno, M.E.C., Kaiser, A. and Montville, T.J. 1992. Detection of proton motive force by Nisin in *Listeria monocytogenes* cell. Appl. Environ. Microbiol. 58: 2255-2259.

Camard, M.F.B., Lievin, V., Brassart, D., Neeser, J.R., Servin, A.L. and Hudault, S. 1997. The human *Lactobacillus acidophilus* strain LA1 secretes a nonbacteriocin antibacterial substances active *in vitro* and *in vivo*. Appl. Environ. Microbiol. 63: 2747–2753.

Carvalhoa, A.A.T., Paulaa, R.A., Mantovania, H.C. and Moraesa, C.A. 2006. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami. J. Food Microbiol. 23: 213-219.

Cherrington, C.A., Hinton, M. and Chopra, I. 1990. Effect of short chain organic acids on macromolecular synthesis in *Escherichia coli*. J. Appl. Bacteriol. 68: 69-74.

Conner, D.E., Kotrola, J.S., Mikel, W.B. and Tamblyn, K.C. 1997. Effect of acetic-lactic acid treatments applied to beef trim on populations of *Escherichia coli* 0157:H7 and *Listeria monocytogenes* in ground beef. J. Food Prot. 60: 1560-1563.

Conway, P.L., Corback, S.L. and Goldin, B.R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cell. J. Dairy Sci. 70: 1-12.

Corsetti, A., Gobboetti, M., Rossi, J. and Damiani, P. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 253-256.

Dasechel, M.A. and Klaenhammer, T.R. 1989. Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. Appl. Environ. Microbiol. 50: 1538 – 1541.

De Angelis, M., Siragusa, S., Berloco, M., Caputo, L., Settanni, L., Alfonsi, G., Amerio, M., Grandi, A., Ragni, A. and Gobbetti, M. 2006. Selection of potential probiotic lactobacilli from pig feces to be used as additives in pelleted feeding. Res. Microbiol. 157: 792–801.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Lactic Acid Bacteria and Bacteriocin: Antimicrobial Potential of Lactic Acid Bacteria. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications (De Vuyst, L. and Vandamme, E. J., eds.) pp. 91-142. New York: Chapman & Hall.

Dickson, J.S. 1992. Acetic acid action on beef tissue surfaces contaminated with *Salmonella typhimirium*. J. Food Sci. 57: 297-301.

Drago, L., Gismondo, R.M., Lombardi, A., Haen, D.C. and Gozzini, L. 1997. Inhibition of *in vitro* growth of enteropathogens by new *Lactobacillus* isolates of human intestinal origin. FEMS Microbiol. 153: 455-463.

Edward, G.F. 1980. Acetic acid. *In* Antimicrobial Food Additives. pp. 167-174. New York: Springer-Verlag Berlin Heidelberg.

Eekkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salt for potential probiotic use. J. Meat Sci. 55: 297-300.

Ennahar, S., Cai, Y. and Yasuhito, S. 2003. Phylogenic diversity of lactic acid bacteria associated with paddy rice silage as determined by 16S ribosomal DNA analysis. Appl. Environ. Microbiol. 69: 444-451.

Fooks, L. and Gibson, G.R. 2003. *In vitro* investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. FEMS Microbiol. Ecol. 39: 67-75.

Franz, C.M.A.P., Toil, D.M., Olasupo, N.A., Schillinger, U. and Holzapfel, W.H. 1998. Plataricin D, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BFE 905 from read-to-eat salad. Lett. Appl. Microbiol. 26: 231-235.

Fuller, R. 1993. Probiotic food current use and future developmenteds. IFI. NA. 3: 23-26.

Ganzle, M.G. and Vogel, R.F. 2003. Contribution of reutericyclin to the stable persistence of *Lactobacillus reuteri* in an industrial sourdough fermentation. Int. J. Food Microbiol. 80: 31–45.

Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J.M. and Manai, M. 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from *rigouta* cheese. Int. J. Food Microbiol.105: 389–398.

Gilliland, S.E. and Speck, M.L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and foodborne pathogens in associative culture. J. Food Prot. 40: 820-823.

Gonzalez, S.N., Apella, M.C., and Olive, G. 1993. Inhibition of enteropathogen by lactobacilli strains used in fermented milk. J. Food Prot. 56: 773-775.

Hata, T., Tanaka, R. and Ohmomo, S. 2010. Isolation and characterization of plantaricin ASM1: A new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. Int. J. Food Microbiol. 137: 94-99.

Helander, I.M., Wrigth, A.V. and Sandholm, T.M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobial against gram-negative bacteria. Trends Food Sci. Technol. 8: 146-150.

Hoover, D.G. and Harlander. S.K. 1993. Antimicrobial Proteins : Classification, Nomenclature, Diversity and Relationship to Bacteriocin. (ed. Hoover D. G. and Steeson L. R.) pp. 1-10. California: Academic Press.

Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. and Maneerat, S. 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (*Plasom*) and production of *Plasom* from selected strains. Food Contr. 22: 401-407.

Huttunen, E., Noro, K. and Yang, Z. 1995. Purification and identification of antimicrobial substances produced by *Lactobacillus casei* strains. Int. Dairy J. 5: 503-513.

Hyronimus, B., Marrec, C.L., Sassi, A.H. and Deschamps, A. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 61: 193-197.

Ivanova, I., Miteva, V., Stefanova, T.S., Pantev, A., Budakov, I., Danova, S., Moncheva, P., Nikolova, I., Dousset, X. and Boyava, P. 1998. Characterization of a bacteriocin produced by *Streptococcus thermophilus* 81. J. Food Microbiol. 42: 147–158.

Jacobsen, C.N., Nielsen, V.R., Hayford, A.E., Moller, P.L., Michaelsen, K.F., Perregaard, A., Sandstroem, B., Tvede, M. and Jakobsen, M. 1999. Screening of probiotic activities of forty-seven strains of *Lactobacillus* spp. by *in vitro* techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. Appl. Environ. Microbiol. 65: 4949-4956.

James, L.S. and Nicoholas, D.P. 1980. New Preservatives and Future Treads. *In* Developments in Food Preservatives-1. pp. 137-161. Applied Science Publishers. England.

Jay, J.M. 1996. Intrinsic and Extrinsic Parameters of Food that Effect Microbial Growth. *In* Modern Food Microbiology. pp. 273-297. Chapman and Hall. USA

Kaila, M., Isolauri, E., Virtanen, E., Laine, S. and Arivilommi, H. 1992. Enhancement of the circulating antibody secreting cell response in human diarrhea by a human *Lactobacillus* strain. J. Int. Pediatr. Res. Found. 32: 141-144.

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, nosporing Gram-positive rod Bergey's Manual Determinative Bacteriology. pp. 1208-1234. Baltimore: William & Wilkins.

Kang, J.H. and Lee, M.S. 2005. Characteriztion of a bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* GM-1 isolated from an infant. J. Appl. Microbiol. 98: 1169-1176.

Kawai, Y., Saito, T., Samant, S.K. and Itoh, T. 1994. Isolation and characterization of a highly hydrophobic new bacteriocin (Gassericin A) from *Lactobacillus gasseri* LA39. J. Biosci. Biotech. Bichem. 58: 1218-1221.

Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Huang, C.M. 1996. Characterization of plantaricin KW30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 81: 657-662.

Khouiti, Z. and Simon, J.P. 1997. Detection and partial characterization of a bacteriocin produced by *Carnobacterium pisciocia* 213. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 49: 606-612.

Kimoto, H., Nomura, M., Kobayashi, T. and Ohmomo, S. 2004. Identification and probiotic characteristics of *Lactococcus* strains from plant materials. (Online). Available http://www.jircas.affrc.go.jp (17 November 2006).

Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocin of lactic acid bacteria. J. Biochemie. 70: 337-349.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 12: 39-86.

Kontula, P., Jaskali, J., Nollet, L., Smet, I.D., Wright, A.V., Poutanan, K. and Sandholm, T.M. 1998. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain fed on ermented oat bran product effect on gastrointestinal microbiota. Appl. Microbiol. Biotechnol. 50: 246-252.

Kotula, K.L. and Thelappurate, R. 1994. Microbiological and sensory attributes of retail cuts of beef treated with acetic and lactic acid solutions. J. Food Prot. 57: 665-670.

Lasen, A.G., Vogensen, F.K. and Josephen, J. 1993. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from sour doughs: purification and characterization of Bavaricin A, a bacteriocin produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401. J. Appl. Bacteriol. 75: 113-122.

Lee, Y.K., Kim, H.W., Lui, C.L. and Lee, H.K. 2003. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. J. Method. Microbiol. 52: 245-250.

Lyon, W.J., Olson, D.G. and Murano, E.A. 1995. Isolation and purification of enteriocin EL1, a bacteriocin produced by a strain of *Enterococcus faecium*. J. Food Prot. 58: 890-898.

Magnusson, J., Strom, K., Roos, S., Sjogren, J. and Schnurer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity amoung environmental isolates of lactic acid bacteria. FEMS Microbiol. Lett. 219: 129-135.

Makras, L., Triantafyllou, V., Messaoudi, D.F., Adriany, T., Zoumpopoulou, G., Tsakalidou, E., Servin, A. and De Vuyst, L. 2006. Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic lactobacilli towards *Salmonella typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds. Res. Microbiol. 157: 241–247.

Maragkoudakis, P.A., Zoumpopoulou, G., Miaris, C., Kalantzopoulos, G., Pot, B. and Tsakalidou, E. 2006. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. Int. Dairy J. 16: 189-199.

Marteau, P.R., Vrese, M.D., Cellier, C.J. and Schrezenmeir, J. 2001. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. American J. Clinic. Nutri. 73: 430–436.

Messi, P., Bondi M., Sabia, C., Battini, R. and Manicardi, G. 2001. Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (Plantacin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. Int. J. Food Microbiol. 64: 193-198.

Mishra, V. and Prasad, D.N. 2005. Application of *in vitro* methods for selection of *Lactobacillus casei* strains as potential probiotics. Int. J. Food Microbiol. 103: 109–115.

Murina, P.M. 1996. Bacteriocin for control of *Listeria* spp. in food. J. Food Prot. 59: 54-63.

Nettles, C.G. and Barefoot, S.F. 1993. Biochemical and genetic characteristic of bacteriocin of food associated lactic acid bacteria. J. Food Prot. 56: 335-356.

Niemand, J.G., Van Der Linde, H.J. and Holzapfel, W.H. 1983. Shilf-life extension of minced beef through combined treatments involving radurization. J. Food Prot. 46: 791-796.

Niku-Paavola, M.L., Laitla, A., Sandholm, T.M. and Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Microbiol. 86: 29-35.

Nilsson, W.B., Paranjype, R.N., De-Paola, A. and Strom, M.S. 2003. Sequence polymorphism of the 16S rRNA gene of *Vibrio vulnificus* is a possible indicator of strain virulence. J. Clinical Microbiol. 43: 442–446.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. J. Biotechnol. 2: 179–184.

Ostling, C.E. and Lindgren S.E. 1993. Inhibition of *enterobacteria* and *Listeria* growth by lactic, acetic and formic acids. J. Appl. Bacteriol. 75: 18-24.

Parente, E. and Hill, C. 1992. Characterization of Enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitory to *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 55: 197-502.

Pennacchia, C., Ercolini, D., Blaiotta, G., Pepe, O., Mauriello, F. and Villani, F. 2004. Selection of *Lactobacillus* strains from fermented sausages for their potential use as probiotics. J. Meat Sci. 67: 309-317.

Pilasombut, K., Sakpuarum, T., Wajjwalku, W., Nitisinprasert, N., Swetwiwathana, A., Zendo, T., Fujita, K., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2006. Purification and amino acid sequence of a bacteriocins produced by *Lactobacillus salivarius* K7 isolated from chicken intestine. Songklanakarin J. Sci. Technol. 28: 121-131.

Pilet, M.F., Dousset, X., Maree, R., Novel, G., Desmazeaud, M. and Paird, J.R. 1994. Evidence for two bacteriocins produced by *Carnobacterium piscicola* and *Carnobacterium divergens* isolated from fish and active against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 58: 256-262.

Ray, B. 1992. Bacteriocins of starter culture bacteria as food preservatives. *In* Food Biopreservation of Microbial Origin. pp. 177-205. (Ray, B. and Daeschel, M. eds.) CRC Press. USA.

Saarela, M., Mogensen, G., Fonden, R., Matto, J. and Sandholm, T.M. 2000. Probiotic bacteria : safety, functional and technological properties. J. Biotechnol. 84: 197-215.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. Lactic Acid Bacteria. In : Fennema, O.R., Karel, M., Sanderson, G.W., Tannenbaum, S.R., Walstra, P. and Whitaker, J.R. (Eds.) pp. 442. NewYork: Marcel Dekker Inc.

Samelis, J., Roller, S. and Metaxopoulos, J. 1994. Sakacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus skae* isolated from Greek dry fermented sausages. J. Appl. Bacteriol. 76: 475-486.

Savadogo, A., Ouattara, A.T.C., Bassole, H.N.I. and Traore, S.A. 2004. Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina Faso fermented milk. Pakistan. J. Nutri. 3: 174-179.

Schillinger, U. and Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55: 1091-1096.

Schillinger, U. 1990. Bacteriocin of Lactic acid Bacteria. *In* Biotechnology and Food Safety. (ed. D.D. Bills, S. Kung, D. Westhoff, B. Quebedeaus, E. Stevens, K.A. Sheldon, B.W. Klapes, N.A. and Klaenhammer, T.R. 1992. Effect of treatment conditions on nisin inactivation of gram negative bacteria. J. Food Prot. 55: 763-766.

Schnurer, J. and Magnusson, J. 2005. Antifungal lactic acid bacteria as biopreservatives. Trens Food Sci. Technol. 16: 70–78.

Sobrino, O.J., Rodriguez, J.M., Moreira, W.L., Sanz, B. and Hernandez, P.E. 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. J. Food Microbiol. 13: 1-10.

Spelhaug, S.R. and Harlender, S.K. 1989. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. J. Food Prot. 52: 856–862.

Strom, K., Schnurer, J. and Melin, P. 2005. Co-cultivation of antifungal *Lactobacillus plantarum* MiLAB 393 and *Aspergillus nidulans*, evaluation of effects on fungal growth and protein expression. FEMS Microbiol. Lett. 246: 119-124.

Syed Ziauddin, K., Subba Rao, H. and Nadeem, F. 1996. Effect of organic acid and spices on quality and shelf life of meat at ambient temperature. J. Food Sci. Technol. 33: 255-258.

Tagg, J.R., Dijini, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. Bacteriocin of Gram-positive bacteria. Bacteriol. Rev. 40: 722-756.

Tahara, T. and Kanatani, K. 1996. Isolation, partial charecterization and mode of action of acidocin J 1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. J. Appl. Microbiol. 81: 669-677.

Todorov, S.D. and Dicks, L.M.T. 2005. *Lactobacillus plantarum* isolated from molasses produces bacteriocins active against Gram-negative bacteria. Enz. Microbiol. Technol. 36: 318-326.

Todorov, S.D., Nyati, H., Meincken, M. and Dicks, L.M.T. 2005. Partial characterization of bacteriocin AMA-K, produced by *Lactobacillus plantarum* AMA-K isolated from naturally fermented milk from Zimbabwe. Food Contr. 18: 656-664.

Tsai, C.C., Fang, H.L., Chen, L.C. and Yang, T.H. 2004. Antagonistic activity against *Helicobacter pylori* infection *in vitro* by a strain of *Enterococcus faecium* TM39. Int. J. Food Microbiol. 96: 1–12.

Toit, M., Franz, C.M.A., Dick, L.M.T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F. and Holzapel, W.H. 1998. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels faeces pH and faeces moisture content. J. Food Microbiol. 40: 93-104.

Tyopponena, S., Petaja, E. and Mattila-Sandholmb, T. 2003. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. Int. J. Food Microbiol. 83: 233–244.

Vignolo, M.G., Suriani, F., Pesce De Ruiz, H.A. and Oliver, G. 1993. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strain isolated from dry fermented sausage. J. Appl. Bacteriol. 75: 344-349.

Vogel, R.F., Ehrmann, M.A. and Ganzle, M.G. 2002. Development and potential of starter lactobacilli resulting from exploration of the sourdough ecosystem. Antonie van Leeuwenhoek. 81: 631–638.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1997. The Lactic Bacteria: the Genera of Lactic Acid Bacteria. pp. 7-15. Blackie Academic & Professional, New York.

Xanthopoulos, V. Tzanetaki, V.E.L. and Tzanetakis, N. 2000. Characterization of *Lactobacillus* isolates from infant faeces as dietary adjuncts. J. Food Microbiol. 17: 205-215.

Yamada, Y., Makimura, K., Mirhendi, H., Ueda, K., Nishiyama, Y., Yamaguchi, H. and Osumi, M. 2002. Comparison of difference methods for extraction mitochondrial DNA from human pathogenic yeast. JPN. J. Infect. Dis. 55: 122-125.

Yang, R. and Ray, B. 1994. Factors influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. Food Microbiol. 1: 281-291.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man Rogosa Sharpe (MRS) ประกอบด้วย

Proteose peptone	10.0	กรัม
Beef extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium phosphate	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดี เติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. Nutrient Agar (NA) ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

3. Nutrient Soft Agar ประกอบด้วย

Peptone	5.0	กรัม
Beef extract	3.0	กรัม
Agar	7.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. Nutrient Broth

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 2 แต่ไม่เติมผงวุ้น

5. Tryptic Soy Agar ประกอบด้วย

Tryptone	5.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Sodium chloride	15.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

6. Tryptic Soy Broth

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 5 แต่ไม่เติมวุ้น

7. Tryptic Soy Agar (ร้อยละ 3.0 NaCl) ประกอบด้วย

Tryptone	5.0	กรัม
Soytone	5.0	กรัม
Sodium chloride	30.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

8. Tryptic Soy Broth (ร้อยละ 3.0 NaCl)

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 7 แต่ไม่เติมผงวุ้น

9. Luria-Bertani Agar ประกอบด้วย

Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Sodium chloride	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดีเติมน้ำกลั่นเพื่อปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1 ลิตร ก่อนนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

10. Luria-Bertani Broth

สูตรและวิธีการเตรียมเช่นเดียวกับข้อ 9 แต่ไม่เติมผงวุ้น

11. Minimal Medium

Peptone water	2.0	กรัม
Yeast extract	2.0	กรัม
NaCl	0.1	กรัม
K_2HPO_4	0.04	กรัม
KH_2PO_4	0.04	กรัม
$CaCl_2.6H_2O$	0.01	กรัม
$NaHCO_3$	2.0	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.01	กรัม
Bile salts (Oxgall)	0.5	กรัม
Tween 80	2.0	มิลลิลิตร
Hemin	0.05	กรัม
Cysteine-HCl	0.5	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

วิธีเตรียม

ชั่งสารเคมีตามอัตราส่วนที่ระบุไว้ข้างต้นละลายในน้ำกลั่นแล้วต้มให้เดือด หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นแล้วจึงเติม Cysteine-HCl 0.5 กรัมต่อลิตร ปรับค่าพีเอชให้ได้ 6.9 ดูดอาหารใส่ขวด นำไปพ่นด้วยก๊าซไนโตรเจนและปิดด้วย septum และนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการเตรียมสารเคมี

1. น้ำยาทดสอบเอนไซม์คะตะเลส (ร้อยละ 3 H_2O_2)

H_2O_2 (ร้อยละ 35)	8.6	มิลลิลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

เมื่อเตรียมเสร็จให้นำไปใส่ไว้ในขวดสีชาแล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

2. สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีแบบแกรม

2.1 Crystal violet

- สารละลาย A: ละลาย crystal violet 2.0 กรัม ใน ethyl alcohol ความเข้มข้น ร้อยละ 95 ปริมาตร 20 มิลลิลิตร

- สารละลาย B: ละลาย ammonium oxalate 0.8 กรัม ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกันตั้งทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรอง ได้เป็น Crystal violet staining reagent

2.2 Ethyl alcohol ร้อยละ 95

2.3 สารละลายไอโอดีน

Iodine	1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร
Potassium iodide	20	กรัม

ใช้น้ำเพียงเล็กน้อยละลายไอโอดีนและ potassium iodide จนหมดจึงเติมน้ำที่เหลือลงไปแล้วละลายให้เข้ากันดี

2.4 Safranin (counterstain)

- counterstain : ละลาย safranin O ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ใน ethyl alcohol ความเข้มข้น ร้อยละ 95 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นให้มีปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 100 มิลลิลิตร

2.5 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียม phosphate buffer saline (PBS)

NaCl	9.0	กรัม
$Na_2HPO_4.2H_2O$	9.0	กรัม
KH_2PO_4	1.5	กรัม

Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนประกอบข้างต้นในน้ำกลั่นให้เข้ากันดี คนให้ส่วนผสมทั้งหมดเข้ากันด้วย magnetic stirrer จากนั้นปรับค่าพีเอชเป็น 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 ด้วย 5 M HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ค

ตารางที่ 10 คุณลักษณะที่แตกต่างของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก

Character	Rods				Cocci					
	Carnob.	*Lactob.*	*Aeroc.*	*Enteroc.*	*Lactoc. Vagoc.*	*Leucon.*	*Pedioc.*	*Streptoc.*	*Tetrageno.*	*Weissella*[a]
Tetrad formation	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
CO_2 from glucose[b]	-	±	-	-	-	+	-	-	-	+
Growth at 10 ^{O}C	+	±	+	+	+	+	±	-	+	+
Growth at 45 ^{O}C	-	±	-	+	-	-	±	±	-	-
Growth in 6.5% NaCl	ND[d]	±	+	+	-	±	±	-	+	±
Growth in 18% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Growth at pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	+	-	-	±
Growth at pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
Lactic acid[e]	L	D, L, DL[f]	L	L	L	D	L, DL[f]	L	L	L, DL[f]

+, positive; -, negative; ±, response varies beween species; ND, not determined.

[a] *Weissella* strains may also be rod-shaped

[b] Test for homo- or heterofermentation of glucose; negative and positive denotes homofermentative and heterofermentative, respectively.

[c] Small amount of CO_2 can be produced, depending on media.

[d] No growth in 8% NaCl has been reported.

[e] Configuration of lactic acid produced from glucose.

[f] Production of D-, L-, or DL- lactic acid varies between species.

ที่มา : Salminen and Wright (1993)

Output

Original Article

Upaichit, A. 2011. Screening and identification of lactic acid bacteria isolated from southern Thai fermented foods for their inhibition efficacy against food-borne bacteria. Hatyai J. 9: 1-16.

มีนักศึกษาระดับปริญญาโทจบการศึกษาจากโครงการนี้จำนวน 1 คน คือ นางสาวจุไรรัตน์ ร่วมพันธ์ โดยมีหัวข้อวิทยานิพนธ์คือ การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกจากอาหารหมักพื้นบ้าน