บทที่ 3

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งจากตัวอย่างอาหารหมัก

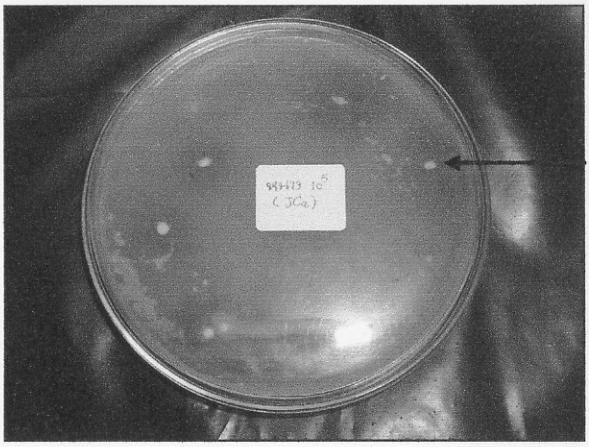
ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่นำมาทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีทั้งหมด 17 ชนิด แบ่งออกเป็นอาหารหมักจากสัตว์ได้แก่ ปลาส้ม กุ้งส้ม ไตปลา ปลาร้า หนาง แหนม กะปิ หอยดอง และน้ำเคย อาหารหมักจากพืชได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก สะตอดอง หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง และกระเทียมดอง โดยทำการเก็บตัวอย่างอาหารหมักจากตลาดสดและตลาดนัดในจังหวัดสุราษฎร์ธานี รวมทั้งตัวอย่างกิมจิจาก ผศ.ดร.ทิพรัตน์ หงภัทรดีรี คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จากตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 52 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกด้วยวิธี Sandwich test จำนวน 27 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.9 และจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีทั้งหมด 230 สายพันธุ์ (ตารางที่ 2) โดยการคัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารยับยั้งจะอาศัยหลักการที่ว่า โคโลนีใดของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจะมีลักษณะวงใสของการยับยั้งเกิดขึ้นรอบโคโลนีนั้น โดยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งคือ *Staphylococcus aureus* (ภาพที่ 3) สำหรับตัวอย่างอาหารหมักที่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตสารยับยั้ง *S. aureus* ได้แก่ ปลาส้ม ไตปลา ปลาร้า กุ้งส้ม หนาง แหนม กะปิ น้ำเคย ผักเสี้ยนดอง สะตอดอง หน่อไม้ดอง และกิมจิ จะเห็นได้ว่าตัวอย่างอาหารหมักบางชนิด อาทิ ผักกาดดอง ข้าวหมาก หัวไชโป๊ และหอยดอง ไม่สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติตามที่ต้องการได้เลย 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 ทั้งนี้เพื่อเป็นการเพิ่มสภาวะที่เหมาะสมใน

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

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีการ streak plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกให้เป็นโคโลนีเดี่ยวๆที่มีลักษณะแตกต่างกันเช่นโคโลนีใหญ่ ขอบเรียบ นูน รอบโคโลนีเป็นสีเหลืองอ่อน และโคโลนีเล็ก ขอบเรียบ นูน รอบโคโลนีเป็นสีเหลืองอ่อน เป็นต้น จากนั้นทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสซึ่งจะให้ผลเป็นลบ และเมื่อทำการย้อมสีแบบแกรมจะติดสีแกรมบวก โดยจะมีลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวหลายรูปแบบเช่น เซลล์มีรูปร่างแท่ง (rod) อาจเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว เรียงตัวเป็นโซ่ โดยจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ในลักษณะดังกล่าวมีจำนวนทั้งสิ้น 165 สายพันธุ์ ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกซึ่งเซลล์มีรูปร่างกลม (coccus) เรียงตัวอยู่เป็นคู่หรือแบบกระจาย มีเชื้อที่แยกได้ในลักษณะดังกล่าวจำนวนทั้งสิ้น 65 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3)

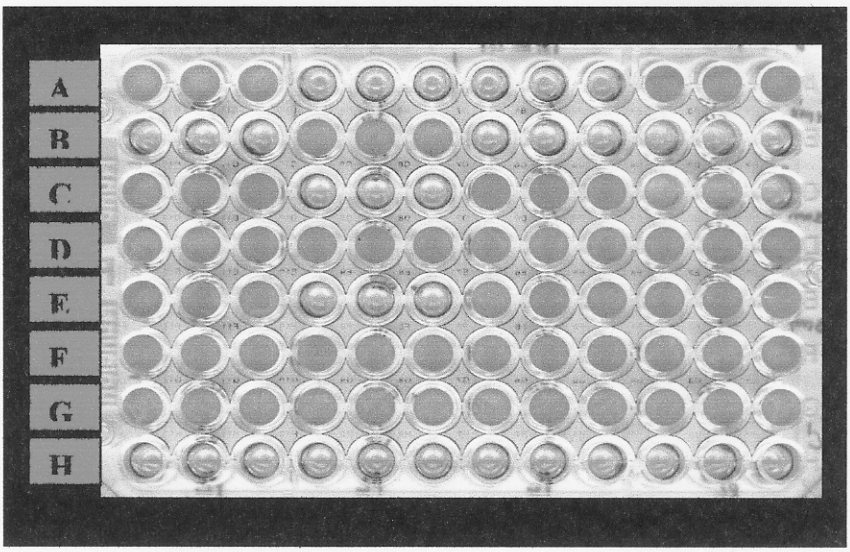
2. เปรียบเทียบประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ทั้งหมดจำนวน 230 สายพันธุ์ มาคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้สูงโดยวิธี Broth microdilution assay (ดัดแปลงจาก Khouiti and Simon, 1997; Kang and Lee, 2005) สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้จำนวน 55 สายพันธุ์ ซึ่งมีค่า MIC (minimum inhibitory concentration) เท่ากับ 50 AU ต่อมิลลิลิตร โดยพบในปลาส้ม



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

Figure 3. Inhibition zones of lactic acid bacteria with antibacterial activity observed on MRS agar plate when *S. aureus* was used as indicator microorganism.



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

Figure 4. The antagonistic activity of isolated lactic acid bacteria toward *S. aureus* observed on microtitre plate when the broth microdilution assay was used.

ตารางที่ 2 แบคทีเรียแลกติกที่แยกจากตัวอย่างอาหารหมัก

Table 2. Results of the initial screening for antagonistic activity of lactic acid bacteria from fermented foods.

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 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมัก

Table 3. Physiology of lactic acid bacteria isolated from fermented foods.

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

1 สายพันธุ์ (2JA5) แหนม 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) จากนั้นดำเนินการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกในขั้นตอนต่อไปโดยจะเพิ่มชนิดของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ซึ่งประกอบด้วย *Salmonella enterica* serovar Typhi, *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)

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่ผ่านการคัดเลือกมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารได้ในช่วงกว้าง 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 สำหรับในการทดลองครั้งนี้พบว่าค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดต่ำลงเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกเป็นเวลา 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) ที่ได้รายงานไว้เกี่ยวกับฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียโรคก่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่

แยกได้จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทยทั้งหมด 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 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารคือ *E. coli* 0157H:7, *Lis. monocytogenes*, *B. cereus* ATCC 10707, *S. aureus* ATCC29213 และ *Sal. typhimurium* ได้ดีที่สุด (มลิวรรณ ส่งเสริม, 2542; สุมนา หนูเอียด, 2542)

สำหรับเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากการทดลองในครั้งนี้พบว่ามีค่า MIC เท่ากับ 25 AU ต่อมิลลิลิตร และเมื่อทดสอบกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ซึ่งประกอบด้วย *Sal. enterica* ser. Typhi, *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus* ด้วยวิธี Broth microdilution assay สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายชนิดอย่างมีประสิทธิภาพ (ตารางที่ 5) โดยสามารถคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารในช่วงกว้างได้จำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ JH1, JH4, JHa4 แยกได้จากกุ้งส้ม JOa1, JO6, JO16 แยกได้จากสะตอดอง JR21 แยกได้จากกะปี และ JB10 แยกได้จากแหนม โดยทั้ง 8 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ดังต่อไปนี้คือ *Sal. enterica* ser. Typhi, *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus* สำหรับการยับยั้งที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการที่แบคทีเรียแลกติกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งมีปริมาณสูงถึงร้อยละ 2 เป็นกรดแลกติกในปริมาณมากพอทำให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ (มลิวรรณ ส่งเสริม, 2542) การทดลองต่อมาจึงนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 8 สายพันธุ์ ไป

ตารางที่ 4 กิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยก

Table 4. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the isolated strains of lactic acid bacteria.

Fermented foods	No. of LAB strains	No. of LAB strains with MIC of 50 AU/ml	Percent detected LAB strains with MIC of 50 AU/ml
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 (*Sal. enterica* ser. Typhi, *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus*) โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

Table 5. Inhibition of various indicator bacteria (*Sal. enterica* ser. Typhi, *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus*) by the selected strains of lactic acid bacteria.

Fermented foods	Strains	MIC of LAB strains exhibited inhibitory activity at 25 AU/ml				
		Bacillus cereus	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Salmonella enterica* serovar Typhi	*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)

Table 5. (cont.)

Fermented foods	Strains	MIC of LAB strains exhibited inhibitory activity at 25 AU/ml				
		Bacillus cereus	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Salmonella enterica* serovar Typhi	*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)

Table 5. (cont.)

Fermented foods	Strains	MIC of LAB strains exhibited inhibitory activity at 25 AU/ml				
		Bacillus cereus	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Salmonella enterica* serovar Typhi	*Escherichia coli*
Kimchi	JS1	+	-	-	-	+
	JS2	-	-	-	-	+
	JS3	-	-	-	-	+
	JSa1	-	-	-	-	+
	JSa2	-	-	-	-	+
	JSa3	-	-	-	-	+
	JSa4	-	-	-	-	+

Symbols: + = inhibition

- = non inhibition

ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ซึ่งประกอบด้วย *S. aureus*, *Sal. enterica* ser. Typhi, *E. coli*, *B. cereus*, *Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus* โดยทำการทดสอบในสภาพที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และลดอิทธิพลของกรดอินทรีย์ด้วยวิธี Broth microdilution assay โดยการทดลองครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ซึ่งปรับค่าพีเอชให้เท่ากับส่วนใสที่นำมาทดสอบ (พีเอช 5.0) ด้วย 5N HCl เพื่อใช้เป็นชุดควบคุม พบว่า มีบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ชุดดังกล่าวได้นั่นคือ สายพันธุ์ JH1, JHa4 และ JOa1 แต่พบว่าสายพันธุ์ JB10 มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์คือ *S. aureus* และ *Lis. monocytogenes* โดยมีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 10 AU ต่อมิลลิลิตร สายพันธุ์ JO6 สามารถยับยั้ง *S. aureus*, *Lis. monocytogenes* และ *E. coli* โดยมีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร และ 10 AU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ สายพันธุ์ JO16 สามารถยับยั้ง *S. aureus*, *Lis. monocytogenes*, *Sal. enterica* ser. Typhi, *B. cereus* และ *E. coli* ให้กิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 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, Sal. enterica ser. Typhi, *B. cereus*, และ *E. coli* มีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร, 20 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร, 10 AU ต่อมิลลิลิตร และ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งได้ดีที่สุดคือ สายพันธุ์ JR21 โดยมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทุกสายพันธุ์ และแสดงกิจกรรมการยับยั้งสูงที่สุดที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร (ตารางที่ 6) ดังนั้นจึงทำการเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 6 ผลของการปรับค่าพีเอชและเติมเอนไซม์คะตะเลสในส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกต่อการยับยั้ง *S. aureus, Sal. enterica* ser. Typhi, *E. coli, B. cereus, Lis. monocytogenes* และ *V. parahaemolyticus*

Table 6. Minimum inhibitory concentration of catalase-treated and neutralized cell-free culture supernatant from LAB strains exhibited inhibitory activity against *S. aureus, Sal. enterica* ser. Typhi, *E. coli, B. cereus, Lis. monocytogenes* and *V. parahaemolyticus.*

Strains	MIC of LAB strains exhibited inhibitory activity against various indicator bacteria (AU/ml)					
	Staphylococcus aureus	*Listeria monocytogenes*	*Vibrio parahaemolyticus*	*Salmonella enterica* serovar. Typhi	*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. เทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

ทำการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกจากข้อ 2 ตามวิธีการของ Bergey's manual determinative bacteriology volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และ Lactic acid bacteria (Salminen and Wright, 1993) พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีดังแสดงในตารางที่ 7 จากผลการทดลองดังกล่าวพบว่าเชื้อสายพันธุ์ JR21 มีเซลล์รูปแท่งสั้น ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สร้างสปอร์ มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสและไรโบสแต่ไม่สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นเท่ากับ 4.5 แต่ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 18 และไม่เจริญในอาหารเลี้ยงเหลว 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 มีนาคม 2550 พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 มีลำดับเหมือนกับ *Lactobacillus plantarum* L5 (GenBank accession number DQ 239698.1)โดยมีร้อยละของความเหมือนเท่ากับ 100 (677/677) (ภาพที่ 5) และเมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA มาทำการเทียบเคียงโดยใช้โปรแกรม Treeview จะได้ไฟโลจินิกทรีดังแสดงในภาพที่ 6 จากภาพแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 มีความเหมือนกับ *L. plantarum* L5 มากที่สุด จึงสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21 เป็นเชื้อ *Lactobacillus plantarum* JR21

4. การศึกษารูปแบบการเจริญของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

ถ่ายเชื้อ *L. 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 พบว่า

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ JR21

Table 7. Morphological, physiological and biochemical characteristics of the strain 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 °C	-
- 45 °C	+
Growth in a medium with NaCl (%)	
- 6.5%	+
- 18%	-
Growth at pH	
- pH 9.6	-
- pH 4.5	+

Symbols: + = positive

\- = negative

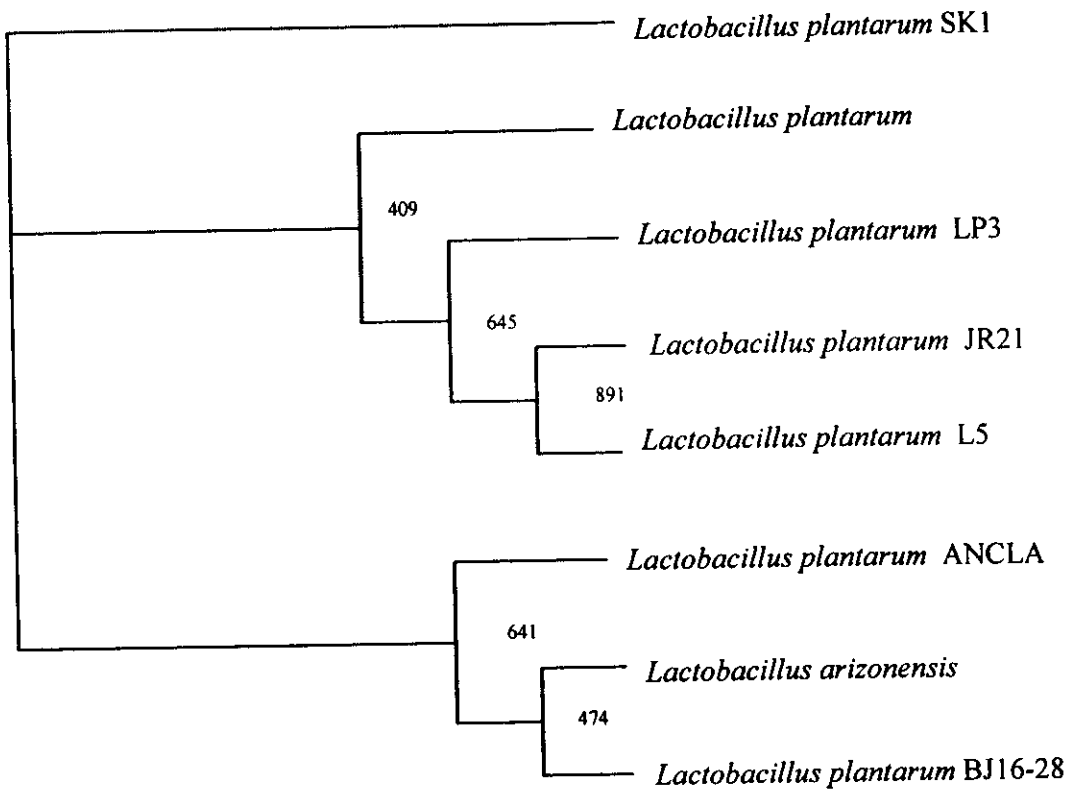
Score = 1342 bits (677), Expect = 0.0

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 *Lactobacillus plantarum* L5 (Subject)

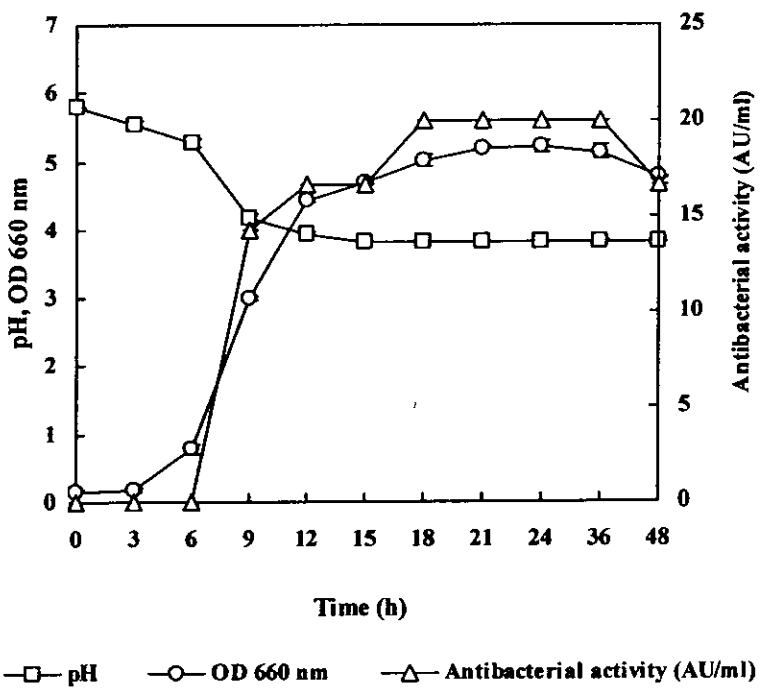
Figure 5. Nucleotide sequences alignment of 16s rDNA from strain JR21 (Query) and *Lactobacillus plantarum* L5 (Subject).



ภาพที่ 6 ไฟโลจินิกทรีของ *Lactobacillus plantarum* JR21

Figure 6. Phylogenetic tree of *Lactobacillus plantarum* JR21.

L. plantarum JR21 มีช่วง lag phase ประมาณ 3 ชั่วโมง จึงเจริญเข้าสู่ช่วง log phase จนถึงชั่วโมงที่ 18 โดยมีช่วง stationary phase อยู่ที่ชั่วโมง 18 ถึง 36 และตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 เป็นต้นไปเซลล์จะเข้าสู่ช่วง death phase จากผลการทดลองที่ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญได้ดีที่สุดที่ชั่วโมงที่ 24 และเมื่อทำการทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้ง พบว่า ส่วนใสที่ได้เริ่มมีกิจกรรมการยับยั้งหลังจากชั่วโมงที่ 6 ของการเพาะเลี้ยงโดยกิจกรรมการยับยั้งมีค่าเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อเก็บตัวอย่างส่วนใสในชั่วโมงที่ 9 พบว่ามีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 14.66 AU ต่อมิลลิลิตร ค่ากิจกรรมการยับยั้งเพิ่มขึ้นเป็น 16.67 AU ต่อมิลลิลิตร ที่ชั่วโมง 12 และ 15 จากนั้นจะให้ค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดชั่วโมงที่ 18 ถึง 36 โดยมีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร และกิจกรรมการยับยั้งจะมีค่าลดลงหลังจากชั่วโมงที่ 36 ของการเพาะเลี้ยง โดยเมื่อถึงชั่วโมงที่ 48 จะมีค่า MIC เท่ากับ 16.67 AU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในภาพที่ 7

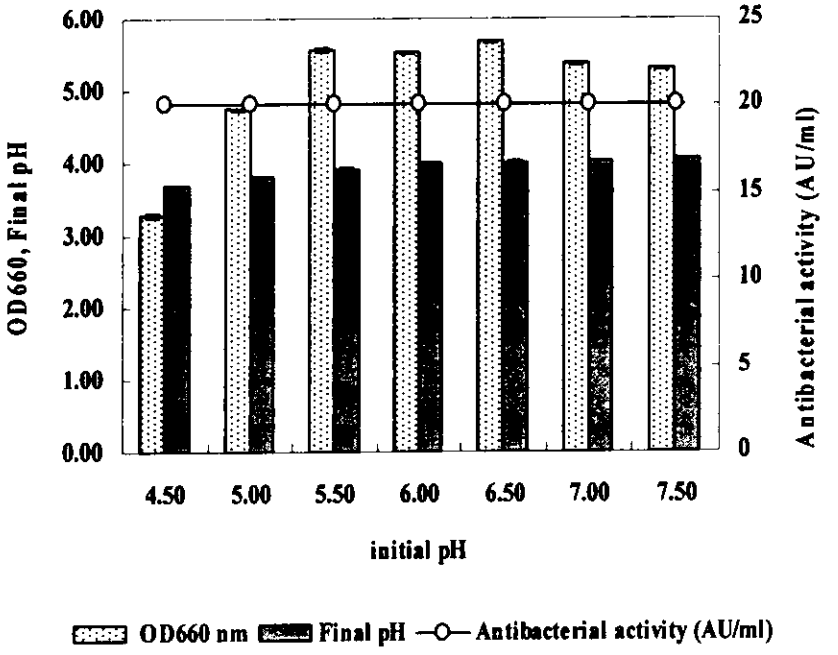


ภาพที่ 7 การเจริญ ค่ากิจกรรมการยับยั้ง และค่าพีเอชของส่วนใสเมื่อเลี้ยง *L. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่เวลาต่างๆ

Figure 7. Cell growth, antibacterial activity and pH of culture broth when *L. plantarum* JR21 was cultivated in MRS broth; □ (pH); ○ (OD 660 nm); Δ (AU/ml).

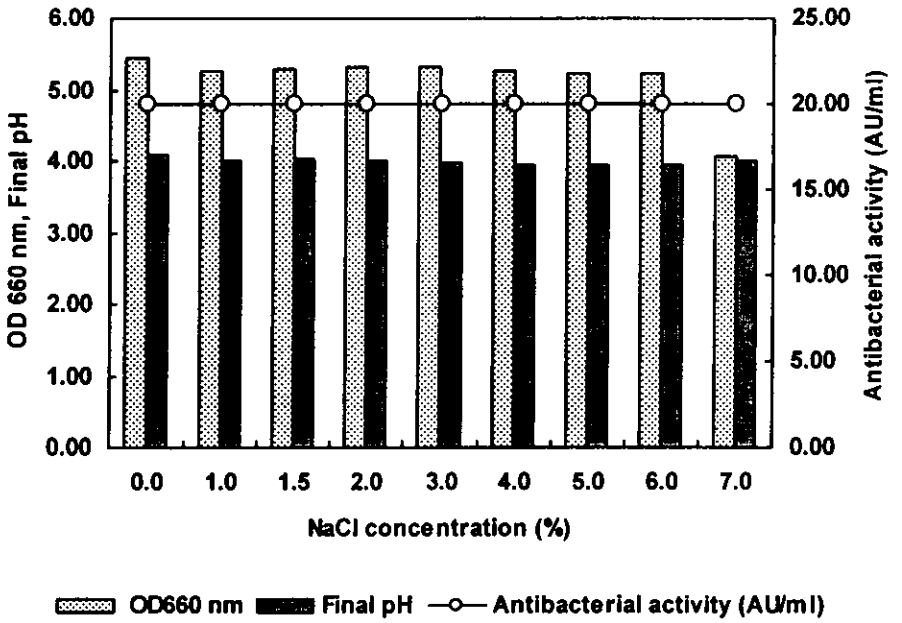
5. การเจริญและการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกในสภาวะต่างๆ

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก *L. plantarum* JR21 มาทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญและการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก โดยศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นและผลของความเข้มข้นเกลือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยในการศึกษาผลของค่าพีเอชเริ่มต้นได้ทำการเลี้ยงเชื้อ *L. 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 *L. plantarum* JR21 สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้ง *S. aureus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอชเริ่มต้นที่ทดลองทุกระดับ ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 8 โดยจากการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 เชื้อ *L. plantarum* JR21 สามารถเจริญได้ดีที่สุด เมื่อทำการทดสอบหาค่ากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ด้วยวิธี Broth microdilution assay โดยปรับค่าพีเอชของส่วนใสที่ผลิตจาก *L. plantarum* JR21 ให้มีค่าเท่ากับ 5.0 เพื่อเป็นการลดอิทธิพลของกรดอินทรีย์และหยดเอนไซม์คะตะเลส 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เพื่อกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า ยังคงมีค่ากิจกรรมการ



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

Figure 8. Effect of initial pH on growth and antibacterial activity against *S. aureus* of *L. plantarum* JR21 cultivated in MRS broth at 24 h.



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

Figure 9. Effect of NaCl concentration on growth and antibacterial activity against *S. aureus* of *L. plantarum* JR21 cultivated in MRS broth at 24 h.

ยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชเท่ากับ 5.0 เป็นชุดการทดลองควบคุม ดังนั้นจึงเลือกค่าพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS เท่ากับ 6.5 เพื่อใช้ในการทดลองต่อไปคือการศึกษาผลของความเข้มข้นเกลือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง โดยทำการเลี้ยง *L. plantarum* JR21 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 และมีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ให้มีระดับค่าความเข้มข้นที่ร้อยละ 0-7 โดยจากผลการทดลองพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อมีระดับค่าความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-6 เชื้อ *L. plantarum* JR21 สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ไม่แตกต่างกัน กล่าวคือมีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร แต่พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 7 มีผลทำให้การเจริญของเชื้อลดลง ดังแสดงในภาพที่ 9 ซึ่งผลการทดลองมีความใกล้เคียงกับการศึกษาของ พงศ์เทพ วิไลพันธ์ (2546) ที่ได้ทำการศึกษาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ M 17 broth ที่เหมาะสมต่อเชื้อ *Enterococcus faecium* NKR-5-3 ซึ่งคัดแยกมาจากปลาร้า พบว่า เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถเจริญสูงสุดในอาหารที่มีปริมาณเกลือ

โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0 และ 1 โดยจะไม่พบการเจริญเมื่อเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ในอัตราร้อยละ 9 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แม้ว่าเชื้อดังกล่าวข้างต้นจะคัดแยกมาจากปลาร้าที่มีปริมาณเกลือสูงถึงร้อยละ 13.4 สอดคล้องกับผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้ที่เชื้อ *L. plantarum* JR21 ที่คัดแยกจากกะปิ ซึ่งจากการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของกะปิพบว่าส่วนใหญ่กะปิจะมีปริมาณเกลือสูงถึงร้อยละ 18.81-33.93 (มณฑกานต์ ทองสม, 2544)

6. สมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือก

เมื่อนำส่วนใสจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* JR21 มาศึกษาความคงตัวของกิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสที่ได้ต่อความร้อน พีเอช และเอนไซม์ย่อยโปรตีน ให้ผลดังนี้

6.1 ผลของอุณหภูมิต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

เมื่อนำส่วนใสจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. 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 พบว่า กิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสที่ผ่านการให้ความร้อนและชุดควบคุม มีค่า MIC เท่ากันที่ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ *L. plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นมีคุณสมบัติในการคงตัวต่อความร้อนที่ทดสอบ โดยสามารถทนความร้อนได้สูงสุดถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สอดคล้องกับรายงานการวิจัยของ Niku-Paavola และคณะ (1999) ที่พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. 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 *L. 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 *L. plantarum* L441

ซึ่งแยกมาจากนม (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 *L. 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 *L. plantarum* JR21 มาศึกษาผลของพีเอชที่มีต่อกิจกรรมการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยทำการปรับค่าพีเอชของส่วนใสที่ได้เป็น 2.0-10.0 บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการปรับพีเอชของส่วนใสใหม่เป็น 5.0 และทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* โดยวิธี Broth microdilution assay พบว่า กิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการปรับค่าพีเอชมีค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ *L. plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นมีคุณสมบัติในการคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้าง คือ มีความคงตัวทั้งในช่วงความเป็นกรดและความเป็นด่างได้ดี ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Teixeira de Carvalho และคณะ (2006) ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PD69 จากไส้กรอกอิตาเลียนซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* เมื่อนำสารยับยั้งที่แบคทีเรียผลิตได้มาทำการศึกษาถึงความคงตัวต่อพีเอช พบว่า สารยับยั้งที่ผลิตได้มีความคงตัวต่อพีเอชในช่วงกว้างคือตั้งแต่พีเอช 2.0-10.0 เช่นเดียวกับ Lactococcin MMT24 ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus lactis* MMT24 ที่ยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งภายหลังการบ่มที่พีเอช 3.0-10.0 (Ghrairi *et al.*, 2005)

6.3 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารยับยั้ง

เมื่อนำส่วนใสจากการเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. 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 พบว่า กิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ของ

ส่วนใสที่ผ่านการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนเป็นเวลา 2 ชั่วโมง และชุดควบคุมมีค่า MIC เท่ากันที่ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ดังแสดงในตารางที่ 8 จากผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งที่ *L. plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นมีความคงตัวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่นำมาทดสอบคือไม่ถูกทำให้เกิดการเสียสภาพโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน เนื่องจากกิจกรรมการยับยั้งที่เกิดขึ้นยังคงเท่ากับชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่ *L. plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นไม่ได้เป็นสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น แบคเทอริโอซิน เช่นเดียวกับ Niku-Paavola และคณะ (1999) ที่ทำการเพาะเลี้ยง *L. plantarum* VTTE 78076 แล้วพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวไม่ได้ผลิตสารแบคเทอริโอซินในกลุ่ม Plantaricin แต่กลับผลิตสาร antibacterial ในกลุ่มของ low-molecular-mass (LMM) ได้แก่ benzoic acid, cyclo(glycyl-L-leucyl), mevalonolactone และ methyl hydantoin ซึ่งหลังจากทดสอบการย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆได้แก่ α-chymotrypsin, pronase E, protease XIII และ trypsin พบว่าสารยับยั้งดังกล่าวยังคงมีกิจกรรมการยับยั้ง และจากผลการทดสอบถึงการยับยั้งร่วมกับกรดแลกติก พบว่า สารกลุ่มดังกล่าวสามารถยับยั้ง *Pantoe agglomerans* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรวมทั้งสามารถยับยั้งเชื้อรา *Fusarium avenaceum* ได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานผลการวิจัยอีกหลายชิ้นที่บ่งบอกว่าสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกไม่สูญเสียคุณสมบัติแม้ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ อาทิ การทดลองของ Makras และคณะ (2006) ซึ่งทำการศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งที่ผลิตโดย *Lactobacillus johnsonii* La1 และ *L. 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 *L. 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 พบว่าสารยับยั้งดังกล่าวยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งที่ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการเปรียบเทียบ

กับชุดการทดลองควบคุมที่มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 5.0 ด้วย 5N HCl พบว่า ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบได้ สารยับยั้งที่ *L. plantarum* JR21 ผลิตขึ้นมานั้นอาจจะเป็นสารยับยั้งชนิดอื่นๆที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นนอกเหนือจากแบคเทอริโอซินและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทั้งนี้อาจเกิดจากสารชนิดใดชนิดหนึ่งหรือเกิดจากการทำงานร่วมกันของสารหลายชนิด และจากผลการทดสอบทางชีวเคมีแล้วไม่พบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้สามารถจัดจำแนก *L. plantarum* JR21 อยู่ในกลุ่มของ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS แล้วให้กรดแลกติกได้ถึงร้อยละ 85 หรือมากกว่า ประกอบกับจากผลการทดลองถึงความคงตัวของกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 3.5 ด้วยกรดแลกติก พบว่า เมื่อทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* ให้ค่า MIC เท่ากับ 20 AU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับค่ากิจกรรมการยับยั้งที่ตรวจพบเมื่อใช้ชุดการทดลองควบคุมที่มีการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีการปรับค่าพีเอชเป็น 3.5 ด้วยกรดแลกติกแต่ไม่ผ่านการให้ความร้อนที่อุณหภูมิที่ใช้ทดสอบ จึงมีความเป็นไปได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งของส่วนใสที่ได้มาจากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* JR21 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่มีต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์มีสาเหตุหนึ่งมาจากอิทธิพลของกรดอินทรีย์โดยเฉพาะกรดแลกติกและอาจมีกรดอินทรีย์ตัวอื่นๆอีกได้แก่ 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 ซึ่งเป็นกลุ่มของสารยับยั้งที่มีรายงานว่าผลิตโดยเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* VTT E-78076 (Niku-Paavola *et al.*, 1999) โดยการยับยั้งที่เกิดจากการสะสมของกรดอินทรีย์ส่งผลให้ค่า พีเอชลดลงซึ่งมีผลต่อจุลินทรีย์ที่ไม่ทนกรด 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 จะมีผลในการลดจำนวนของเชื้อ Enterobacteriaceae, Pseudomonads และ

Brochospacta แต่จะไม่มีผลต่อเชื้อ *Leuconostoc* และ *Pediococcus* เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตกรดได้ทำให้ตัวมันเองปรับสภาพในการทนกรด นอกจากนี้ เยาวลักษณ์ 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*, *L. 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) พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* 21B สามารถผลิต phenyllactic acid และ 4-hydroxy-phenyllactic acid ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อราเส้นใยหลายสายพันธุ์ได้แก่ *Aspergillus fumigatus, Aspergillus nidulans, Penicillium commune, Fusarium sporotrichioide* โดย phenyllactic acid มีค่า minimum inhibitory concentration (MIC) อยู่ในช่วง 7.5-10.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

7. ทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก

7.1 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียแลกติก *L. plantarum* JR21 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง สำหรับชุดควบคุมจะไม่มีการเติมเกลือน้ำดี พบว่าภายหลังการบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง *L. 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

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

Table 8. Effects of heat treatments, pH and proteases on antibacterial activity of *L. plantarum* JR21 against *S. aureus*.

Treatments	MIC of *Lactobacillus plantarum* JR21 against *Staphylococcus aureus* (AU/ml)
Control	20
Enzyme stability	
proteinase K	20
α-chymotrypsin	20
trypsin	20
pronase E	20
Heat stability	
100°C for 5 min	20
100°C for 10 min	20
100°C for 15 min	20
100°C for 30 min	20
100°C for 60 min	20
121°C for 15 min	20
pH stability	
pH 2.0-10.0 for 2 h	20

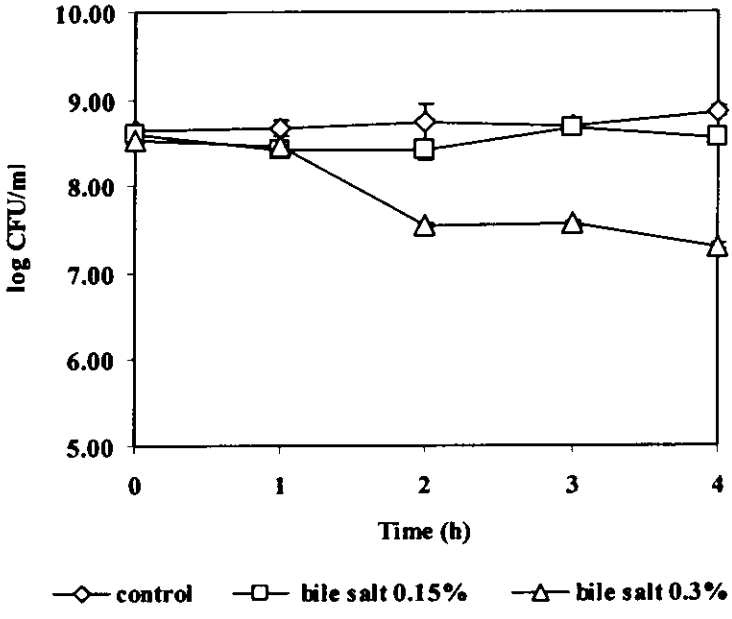
ต่อมิลลิลิตร คิดเป็นร้อยละของการรอดชีวิตเท่ากับ 100 (ภาพที่ 10) จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าเมื่อเชื้อ *L. plantarum* JR21 สัมผัสกับสภาวะที่มีเกลือน้ำดีเป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดของ *L. plantarum* JR21 จะมีจำนวนคงที่และลดลงเพียงเล็กน้อยเมื่อสัมผัสกับสภาวะที่มีเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* JR21 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 ได้ ซึ่งในร่างกายของมนุษย์มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีอยู่ในช่วงร้อยละ 0.15-0.30 โดยที่เกลือน้ำดีจะถูกหลั่งจากตับอ่อนภายในทางเดินอาหารส่วนต้นบริเวณลำไส้เล็ก ซึ่งจะช่วยในการย่อยอาหารจำพวกไขมัน

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) ที่ศึกษาผลของเกลือน้ำดีต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* พบว่าสามารถเจริญบนอาหาร MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.30 ได้ และในการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของเชื้อ *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 เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถสร้าง bile salt hydrolase enzyme (BSH) จากการทดลองของ Brennan และคณะ (1993) พบว่า *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียแลกติกที่พบอาศัยอยู่ภายในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์มีคุณสมบัติทนต่อเกลือน้ำดี โดยมีความสำคัญต่อระบบสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ อาหารเสริมที่มีเซลล์ของ *L. acidophilus* จึงมีส่วนช่วยปรับปรุงและรักษาสมดุลจุลินทรีย์ภายในลำไส้ และช่วยรักษาโรคที่เกิดจากลำไส้ด้วย

7.2 ทดสอบการทนต่อกรด

จากการนำ *L. plantarum* JR21 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 และ 6.0 พบว่า เมื่อเชื้อสัมผัสกับสภาวะเป็นกรดที่ระดับพีเอช 2.0 และ 3.0 เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง จำนวนแบคทีเรียที่เหลือรอดมีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 11 สำหรับชุดการทดลองพีเอช 2.0 ที่เวลา 1 ชั่วโมง มีจำนวนของ *L. 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 *L. plantarum* JR21 มีจำนวนเหลือ

รอด 6.47 log CFU ต่อมิลลิลิตร จากจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น 8.61 log CFU ต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 75.1 สำหรับที่ระดับพีเอช 4.0 และ 5.0 พบว่ามีจำนวนของแบคทีเรียแลกติก เท่ากับ 8 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตลอดทั้ง 4 ชั่วโมง ของการศึกษา ซึ่งมีปริมาณเซลล์ไม่แตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่มีค่าพีเอช 6.0



ภาพที่ 10 การรอดชีวิตของ *L. plantarum* JR21 ใน MRS broth ที่มีระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15 และ 0.30 หลังจากการบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1, 2, 3 และ 4 ชั่วโมง

Figure 10. Survival of *L. plantarum* JR21 after incubation in MRS broth containing 0.15% and 0.30% of bile salts at 37°C for 1, 2, 3 and 4 h.

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นได้ว่า *L. plantarum* JR21 สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 ได้ถึง 4 ชั่วโมง โดยมีร้อยละการรอดชีวิตเท่ากับ 75.1 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Goldir และคณะ (1992) ที่ได้รายงานว่าเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus rhamnosus* GG ซึ่งมีคุณสมบัติทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก Mishra และ Prasad (2005) ทำการศึกษาคุณสมบัติการทนต่อกรดของ *Lactobacillus casei* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีการรายงานว่ามีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกพบว่าสามารถทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 และจากการศึกษาคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus* จำนวน

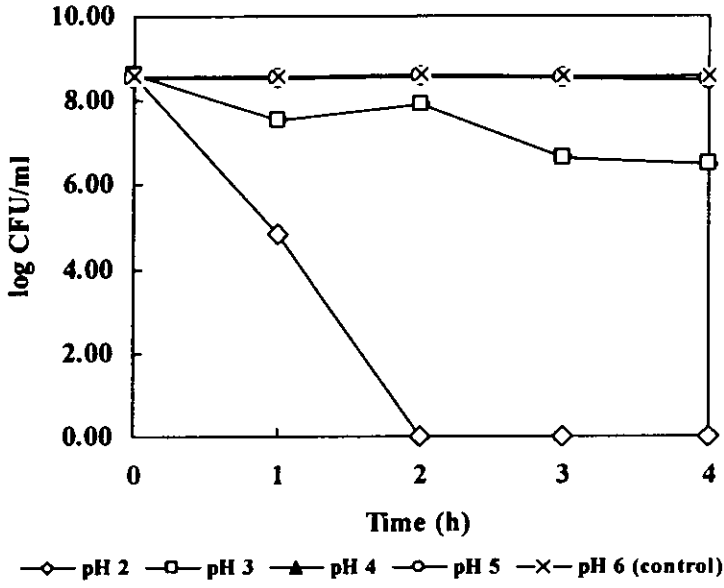
29 สายพันธุ์ ที่แยกจากผลิตภัณฑ์นมหมัก พบว่า ทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 3.0 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 2.0 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จำนวน 16 สายพันธุ์ และทุกสายพันธุ์สามารถทนต่อกรดที่พีเอช 1.0 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (Maragkoudakis *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Jacobsen และคณะ (1999) พบว่าจากการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจำนวน 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)

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

7.3 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกด้วยวิธีการเลี้ยงร่วมกัน

จากการศึกษาการเจริญของ *L. plantarum* JR21 ร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ประกอบด้วย *S. aureus, E. coli* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ในอาหาร minimal medium เตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยปรับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรียแลกติก และเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ให้มีจำนวนเชื้อเท่ากับ 6 log CFU ต่อมิลลิลิตร พบว่า *L. plantarum* JR21 เริ่มมีผลการยับยั้งภายหลังการเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 12 ชั่วโมง และเมื่อทำการเลี้ยงร่วมกันครบ 18 ชั่วโมง พบว่า *L. plantarum* JR21 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, E. coli* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ได้เพิ่มมากขึ้นโดยมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ลดลงเหลือ 3.44, 3.57 และ 3.57 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่ในเวลาเดียวกันชุดควบคุมที่ไม่มีการเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* JR21 มีจำนวนของ *S. aureus, E. coli* และ

Sal. enterica ser. Typhi ถึง 8.92, 8.57 และ 8.92 log CFU ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งแสดงถึงความสามารถของ *L. plantarum* JR21 ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ถึงร้อยละ 61.43, 58.34 และ 59.98 ตามลำดับ โดยการยับยั้งเกิดขึ้นได้อย่างสมบูรณ์เมื่อทำการเลี้ยงร่วมกันครบ 24 ชั่วโมง ดังแสดงผลในตารางที่ 9 และ ภาพที่ 12 ในขณะที่จำนวนของ *L. plantarum* JR21 ไม่ลดลงในทุกชุดการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์



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

Figure11. Survival of *L. plantarum* JR21 under acidic conditions at pH 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 and 6.0 after cell cultivation at 37°C for 1, 2, 3 and 4 h.

จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า *L. plantarum* JR21 สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบได้ดีพอกันทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ วิลาวัณย์ 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) ที่ได้ทำการแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย พบว่าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* A49a แสดงคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *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 *L. plantarum* JR21 เป็นผลของสารยับยั้งชนิดอื่นนอกเหนือจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารยับยั้งในกลุ่มของแบคเทอริโอซิน ที่สำคัญจากการทดลองที่ผ่านมาในการเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกในระดับจีนัส พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวนี้มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสและไรโบสแต่ไม่สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังนั้นจึงสามารถจัดจำแนกอยู่ในกลุ่มของ homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งแบคทีเรียแลกติกในกลุ่มนี้มีความสามารถในการกรดผลิตแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักได้ถึงประมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าจึงมีความเป็นไปได้ว่ากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *L. plantarum* JR21 เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เกิดขึ้นนั้น อาจเนื่องมาจากในกระบวนการเจริญของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ดังกล่าวจะมีการผลิตกรดอินทรีย์ขึ้นมาเป็นผลิตภัณฑ์หลัก โดยเฉพาะกรดแลกติกที่ได้มาจากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ทำให้ค่าพีเอชในระหว่างการเจริญลดต่ำลงส่งผลให้เกิดสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและทำให้แบคทีเรียก่อโรคถูกทำลายหรือไม่สามารถเจริญได้ในที่สุด นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติกยังขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยร่วมกัน คือ ปริมาณกรดอินทรีย์ต่างๆ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารยับยั้งอื่นๆรวมทั้ง antibiotic like substances ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้น (Gilliand and Spect, 1997; Gonzalez *et al.*, 1993) และมีรายงานว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก *L. acidophilus* L1 สามารถอาศัยอยู่ภายในลำไส้ของมนุษย์และผลิตสารยับยั้งในกลุ่มของ non-bacteriocin antibacterial substances ขึ้นมาเพื่อยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหารต่างๆได้ (Camard *et al.*, 1997)

ตารางที่ 9 ประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อ *S. aureus, E. coli* และ *Sal. enterica* ser. Typhi โดย *L. plantarum* JR21 เมื่อเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

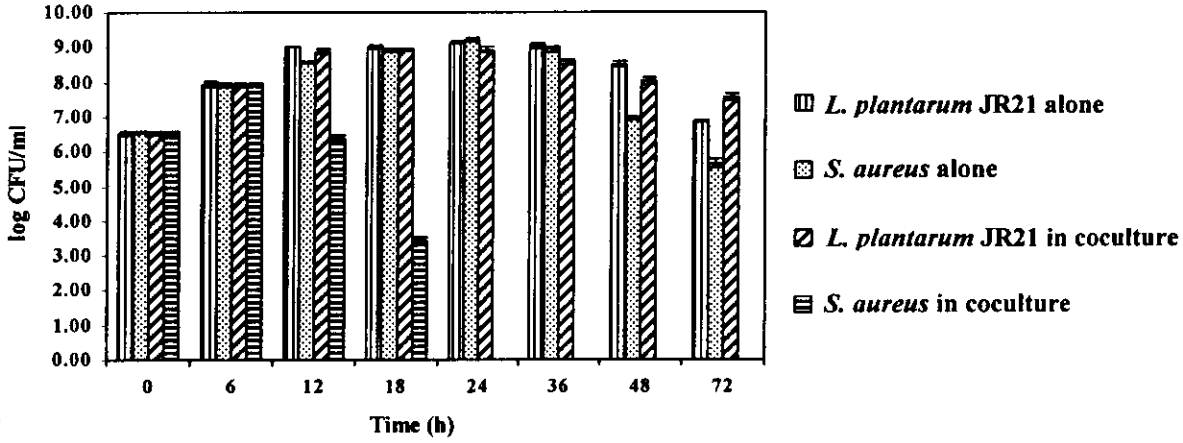
Table 9, Inhibitory effect of *L. plantarum* JR21 against *S. aureus, E. coli* and *Sal. enterica* ser. Typhi in mixed culture system at 72 h incubation.

Time (h)	Inhibition against indicator bacteria (%)		
	Staphylococcus aureus	*Escherichia coli*	*Salmonella enterica* serovar Typhi
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

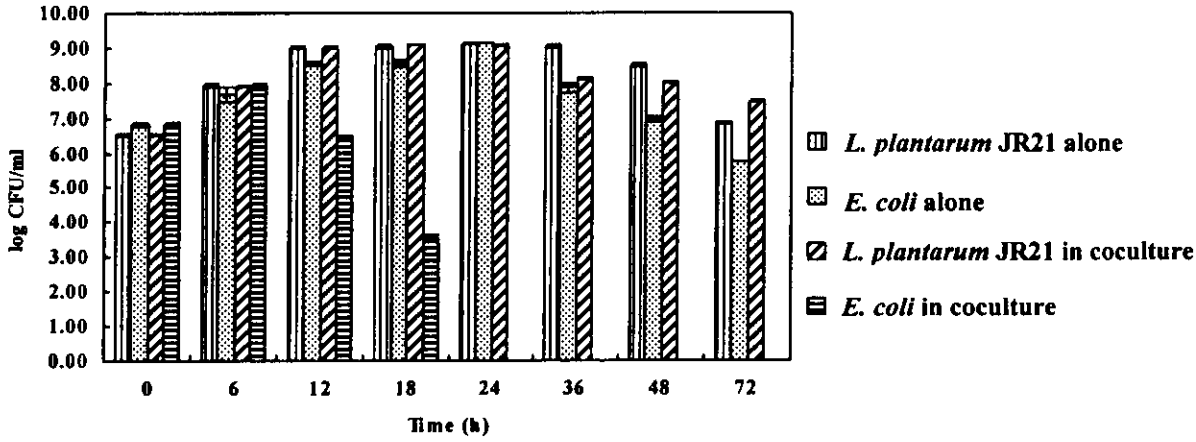
จากผลการทดลองจึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำ *L. plantarum* JR21 ไปประยุกต์ใช้เป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก เนื่องจากเชื้อดังกล่าวแสดงคุณสมบัติพื้นฐานของการเป็นโปรไบโอติก กล่าวคือสามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15-0.30 มีชีวิตรอดที่พีเอช 3.0 ภายหลังการทดสอบเป็นเวลา 4 ชั่วโมง (โดยมีปริมาณเชื้อมากกว่า 6.47 log CFU ต่อมิลลิลิตร) และสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหาร โดยสามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus, E. coli* และ *Sal. enterica* ser. Typhi ได้อย่างสมบูรณ์ภายใน 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบโดยวิธีการเลี้ยงร่วมกัน ซึ่งคุณสมบัติที่กล่าวมาทั้งหมดนี้เป็นคุณสมบัติขั้นพื้นฐานของการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก กล่าวคือคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีนั้นจะต้องสามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ เนื่องจากในทางเดินอาหารส่วนต้นโดยเฉพาะบริเวณลำไส้เล็กจะมีเกลือน้ำดีที่หลั่งจากตับอ่อนเข้ามาช่วยในการย่อยอาหารจำพวกไขมัน ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีประมาณร้อยละ 0.15-0.30 (Erkkila และ Petaja, 2000) อีกทั้งแบคทีเรียในกลุ่มโปรไบโอติกจะต้องมีคุณสมบัติในการทนต่อกรดในกระเพาะอาหารได้ดี เนื่องจากในกระเพาะอาหารจะมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 1.0-3.0 ซึ่งเกิดจากการที่ร่างกายมีการหลั่งของกรดไฮโดรคลอริกเพื่อช่วยในการย่อยอาหาร ทำให้ค่าพีเอชใน

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

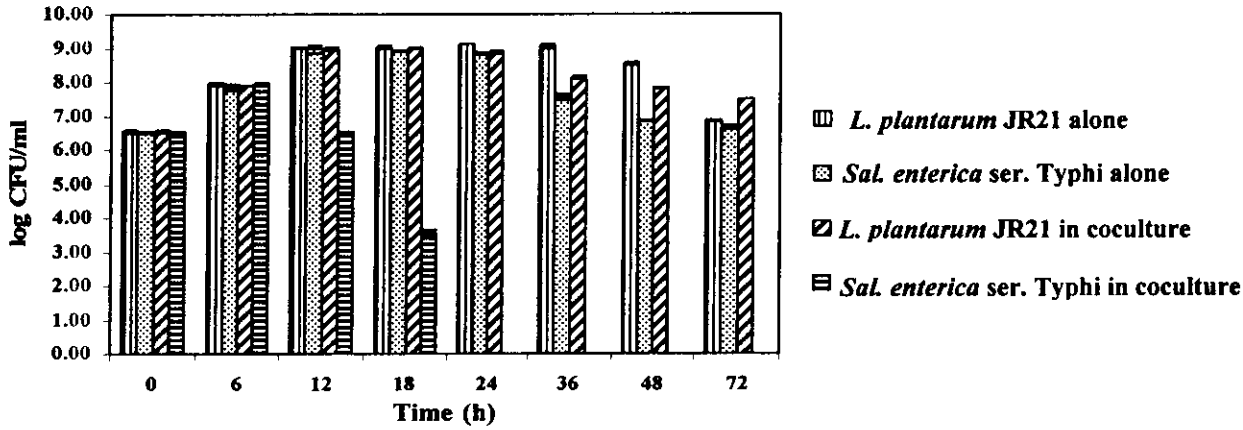
A.



B.



C.



ภาพที่ 12 ประสิทธิภาพการยับยั้ง *S. aureus* (A), *E. coli* (B) และ *Sal. enterica* ser. Typhi (C) โดย *L. plantarum* JR21 เมื่อเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

Figure 12. Inhibitory effect of *L. plantarum* JR21 against *S. aureus* (A), *E. coli* (B) and *Sal. enterica* ser. Typhi (C) in mixed culture system at 72 h incubation.