การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย

Inhibition of Foodborne Bacterial Pathogens by *Lactobacillus* spp. Isolated from Thai Traditional Fermented Foods

อรัญญา สังขศรี

Aranya Sangkhasri

Order Key 20411
BIB Key 161186

เลขหมู่ QR201.R3A 1046 2542 ก.2
เลขทะเบียน
ธ.ค. 2542

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Microbiology

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย

ผู้เขียน นางสาวอรัญญา สังขศรี

สาขาวิชา จุลชีววิทยา

คณะกรรมการที่ปรึกษา

ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

กรรมการ
(ดร.เมตตา องค์สกุล)

คณะกรรมการสอบ

ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

กรรมการ
(ดร.เมตตา องค์สกุล)

กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ)

กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วันทนา เหรียญมงคล)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา

(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์	การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารโดย *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย
ผู้เขียน	นางสาว อรัญญา สังขศรี
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2541

บทคัดย่อ

จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทยทั้งหมด 81 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ได้ 53 ตัวอย่าง, และจำนวนเชื้อที่แยกได้ 88 สายพันธุ์ เมื่อนำแบคทีเรียเหล่านี้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli* 1188, *E. coli* 1189, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* R43, *Salmonella anatum* E1, *S. enteritidis* 3259, *S. enteritidis* 3294, *S. typhi* 3299, *S. typhimurium* 3292, และ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 โดยวิธี agar spot สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูงได้ 16 สายพันธุ์ นำเชื้อทั้ง 16 สายพันธุ์มาเทียบเคียงชนิด พบว่าประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* 6 สายพันธุ์, *Lactobacillus* sp. 4 สายพันธุ์, *L. amylovorus* 1 สายพันธุ์, *L.bavaricus* 1 สายพันธุ์, *L. brevis* 1 สายพันธุ์,*L. casei* subsp. *casei* 1 สายพันธุ์ , *L. fermentum* 1 สายพันธุ์ และ *L. johnsonii* 1 สายพันธุ์

ผลการศึกษาเวลา อุณหภูมิในการบ่มเชื้อ และอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* ทั้ง 16 สายพันธุ์ พบว่าการสร้างสารยับยั้งจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มเชื้อยาวนานขึ้น โดยเมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ 15 สายพันธุ์ สร้างสารยับยั้งสูงกว่าที่ 12 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) *Lactobacillus* ทั้ง 16 สายพันธุ์สร้างสารยับยั้งได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (de Man

Rogosa and Sharp) และCJA (Coconut Juice Agar) ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัย-สำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ATP (All Purpose Tween), BHI (Brain Heart Infusion) และ TJA (Tomato Juice Agar) สำหรับ *Lactobacillus* 15 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิ30° ซ และ35° ซ

การศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างโดย *Lactobacillus* ทั้ง 16 สายพันธุ์ โดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารบนอาหารแข็ง ในสภาวะที่มีการจำกัดผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ พบว่า *Lactobacillus sp.* A30b, *L. plantarum* (A49a, A56c, A61a) และ *L. bavaricus* A53b สามารถสร้างสารยับยั้งอื่นนอกเหนือจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อนำทั้ง 5 สายพันธุ์ มาศึกษาการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว โดยวัดการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารพบว่า *L. plantarum* A49a สามารถสร้างสารยับยั้งอื่นมายับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารได้ดี สารยับยั้งที่สร้างขึ้นจาก *L. plantarum* A49a จะมีสมบัติในการทนต่อความร้อนได้สูงสุดถึง 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที และมีความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ α-chymotrypsin, pepsin, protease และ trypsin ส่วนเอนไซม์ catalase มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งเล็กน้อย ในขณะที่เอนไซม์ α-amylase จะไม่มีผลใดๆแสดงว่านอกเหนือจากกรดอินทรีย์แล้ว อาจมีการสร้างสารยับยั้งพวกโปรตีนที่เรียกว่าแบคเทอ-ริโอซินและสารพวกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วย

นำ *L. plantarum* A49a มาเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร พบว่าเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *B. cereus*, *S. enteritidis* และ*S. typhi* 3299 ได้ดี โดยคิดเป็นร้อยละ 100 ส่วน *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* 1189 ถูกยับยั้งได้ร้อยละ 98.78 และ 97.13 ตามลำดับ ในขณะที่ *E. coli* O157 : H7 จะถูกยับยั้งได้ต่ำสุดคือคิดเป็นร้อยละ 88.57

Thesis Title Inhibition of Foodborne Bacterial Pathogens by *Lactobacillus* spp. Isolated from Thai Traditional Fermented Foods

Author Miss Aranya Sangkhasri

Major Program Microbiology

Academic Year 1998

Abstract

Eighty - eight strains of *Lactobacillus* spp. were isolated from 81 different Thai traditional fermented foods. These strains were tested for inhibitory activity against foodborne bacterial pathogens and standard strains such as *Bacillus cereus*, *Escherichai coli* 1188, *E. coli* 1189, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* R43, *Salmonella anatum* E1, *S. enteritidis* 3259, *S. enteritidis* 3294,*S. typhi* 3299, *S. typhimurium* 3292 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 by agar spot method. Sixteen strains exhibited high inhibitory activity were chosen for further identification. Six strains of *Lactobacillus plantarum*, four strains of *Lactobacillus* sp., *L. amylovorus*, *L. bavaricus*, *L. brevis*, *L. casei* subsp. *casei*, *L. fermentum* and *L. johnsonii* were resulted.

The factors of incubation time, incubation temperature and kind of culture media may play role in inhibitory activity of *Lactobacillus* spp. It was found that inhibition activity continued to increase with longer incubation time. Fifteen strains produced high inhibitory activity when incubated for 24 hours and showed statistically significant difference from the inhibition activity

of 12 hours incubation ($p < 0.05$). On MRS (de Man Rogosa and Sharp) and CJA (Coconut Juice Agar), all strains could produce high inhibitory activity and differed from what produced on APT (All Purpose Tween), BHI (Brain Heart Infusion), TJA (Tomato Juice Agar) ($p < 0.05$). At 30°C and 35°C, fifteen strains produced high inhibitory activity.

The properties of inhibitory substances of *Lactobacillus* spp. were tested for inhibitory activity against foodborne bacterial pathogens on solid media under condition that limited the production of hydrogenperoxide and organic acid. Five isolated strains i.e., *Lactobacillus sp.* A30b, *L. plantarum* (A49a, A56c, A61a) and *L. bavaricus* A53b could produce another inhibitory substances. The cultured supernatant of all five strains was mixed with foodborne bacterial pathogens and the growth of foodborne bacterial pathogens was determined. It was shown that *L. plantarum* A49a was capable producing another inhibitory substances which are heat stable at 121°C, 15 minutes and susceptible to proteolytic enzymes (α-chymotrypsin, pepsin, protease, trypsin) and catalase, but resistant to α-amylase. It can be concluded that this strain can produce bacteriocin and hydrogenperoxide, other than organic acids.

The percent inhibition of *B. cereus*, *S. enteritidis*, *S. typhi* 3299 were 100 and *S. aureus* ATCC 29213, *E. coli* 1189 and *E. coli* O157 : H7 were 98.78, 97.13 and 88.57 respectively in association culture with *L. plantarum* A49a.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ประธานคณะกรรมการที่ปรึกษาและดร. เมตตา องค์สกุล กรรมการที่ปรึกษาร่วม ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ ผศ.ดร. เยาวลักษณ์ ดิสระ กรรมการผู้แทนจากภาควิชาจุลชีววิทยา และผศ.ดร. วันทนา เหรียญมงคล กรรมการผู้แทนจากบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทาน แก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้อง ที่ให้การอุปการะในด้านทุนการศึกษาและคอยเป็นกำลังใจตลอดมา

ขอขอบพระคุณ ครู - อาจารย์ และผู้ให้ความรู้ทุกท่านที่กรุณาอบรมสั่งสอนเป็นห่วงเป็นใยตลอดมา

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยที่ให้ทุนสนับสนุนในการทำวิจัย

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่คอยช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทำวิจัย และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบคุณพี่ๆจากศูนย์คอมพิวเตอร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ที่ช่วยเหลือและให้คำปรึกษาเกี่ยวกับการใช้คอมพิวเตอร์

ขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ จากคณะอุตสาหกรรมเกษตรที่ช่วยเหลือในการทำสไลด์ ช่วยให้ความรู้ด้านสถิติ การวิเคราะห์ผล และคอยเป็นกำลังใจ รวมทั้งทุกท่านที่มิได้กล่าวนามไว้ ณ ที่นี้ด้วย ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

อรัญญา สังขศรี

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการประกอบภาพ	(11)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	2
วัตถุประสงค์	31
ขอบเขตของการวิจัย	31
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	32
2. วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	33
วัสดุ	33
อุปกรณ์	36
วิธีการ	37
3. ผลและวิจารณ์	47
4. สรุป	87
ข้อเสนอแนะ	89
บรรณานุกรม	90
ภาคผนวก	103
ประวัติผู้เขียน	115

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1. อาหารหมักดองซึ่งมีแบคทีเรียแลกติกเข้ามาเกี่ยวข้องที่พบทั่วทุกภาคของไทย	4
2. แบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักประเภทต่างๆ	5
3. หน้าที่ต่างๆของกรดแลกติกในอาหารแต่ละชนิด	16
4. ผลการยับยั้งแบคทีเรียโดยกรดอะซิติก	18
5. คุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก Lactobacilli	24
6. อุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสมของเชื้อ *Lactobacillus* ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ	29
7. แบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารยับยั้ง	33
8. ผลการแยก *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย	51
9. การจัดกลุ่มอาหารหมักประเภทเนื้อและพืชรวมทั้งจำนวน *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักแต่ละประเภท	52
10. *Lactobacillus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง ซึ่งคัดเลือกมาจากสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย	55
11. ความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารที่นำมาทดสอบ	56
12. ลักษณะของ *Lactobacillus* spp.ที่คัดเลือกได้ทั้ง 16 สายพันธุ์	58
13. การเทียบเคียงชนิดของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้	59
14. ผลของเวลาในการบ่มเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ต่อการสร้างสารยับยั้ง *E. coli* 1189	62

รายการตาราง (ต่อ)

ตาราง	หน้า
15. ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดต่อเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ในการสร้างสารยับยั้ง *E. coli* 1189	65
16. ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ต่อการสร้างสารยับยั้ง *E. coli* 1189	68
17. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้บนอาหารแข็งในสภาวะที่มีการจำกัดผลการยับยั้งจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์	71
18. ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเหลว	75
19. ผลการศึกษาสมบัติของสารยับยั้งจาก *L. plantarum* A49a ในการทนต่อความร้อน	77
20. ผลของเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารยับยั้งที่สร้างขึ้นโดย *L. plantarum* A49a	80

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. กระบวนการเมตาบอลิซึมแบบเฟอร์เมนเตทีฟของ *Lactobacillus*	7
2. ลักษณะโครงสร้างของ Nisin A และ Nisin Z	23
3. การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้ด้วยวิธี agar spot	39
4. ลักษณะโคโลนีแบบต่างๆของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS	49
5. ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อ *Lactobacillus* spp.	50
6. ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย โดยวิธี agar spot	54
7. ผลการยับยั้ง *B. cereus* เมื่อทดสอบกับส่วนใสของเชื้อ *Lactobacillus* spp.	72
8. ผลการยับยั้ง *E. colli* 1189 เมื่อทดสอบกับส่วนใสของเชื้อ *Lactobacillus* spp.	73
9. ผลการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29213 เมื่อทดสอบกับส่วนใสของเชื้อ *Lactobacillus* spp.	74
10. การทดสอบการทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างจาก *L. plantarum* A49a โดยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *E. coli* 1189 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	78
11. การนับจำนวนโคโลนีของ *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA - polymyxin B หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a	82

รายการภาพ ประกอบ(ต่อ)

ภาพประกอบ	หน้า
12. การนับจำนวนโคโลนีของ *E. coli* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a	83
13. การนับจำนวนโคโลนีของ *S. aureus* ATCC 29213 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MSA หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a	84
14. การนับจำนวนโคโลนีของ *S. typhi* 3299 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a	85
15. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *L. plantarum* A49a เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน	86

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

อาหารหมักพื้นเมืองของไทย เป็นอาหารที่คนไทยนิยมรับประทานมานานแล้วเกือบทุกภาค โดยเฉพาะภาคใต้ของไทยมีอาหารหมักมากที่สุดเมื่อเทียบกับภาคอื่น คือ 21 ชนิด (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) อาหารหมักที่เกิดขึ้นจะอาศัยกระบวนการหมัก โดยการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารประกอบอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งผลิตขึ้นมาจากจุลินทรีย์ (วรวุฒิ ครูส่ง, 2538) สำหรับอาหารหมักของไทยส่วนใหญ่ ยังคงเป็นอาหารหมักที่อาศัยการหมักตามธรรมชาติ จึงอาจมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ทำให้มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางด้านเนื้อสัมผัส คุณสมบัติของสารอินทรีย์ในอาหารหมัก คุณค่าของอาหารด้อยคุณภาพไป และมีแบคทีเรียก่อโรคปนเปื้อนอยู่ในอาหารเป็นจำนวนมาก (De Vuyst and Vandamme, 1994a) ซึ่งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคดังกล่าว ได้แก่ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.* และ *Vibrio parahaemolyticus* เป็นต้น (สุมาลี เหลืองสกุล, 2535ก) ในปัจจุบันผู้บริโภคอาหารได้ให้ความสำคัญและหันมาสนใจเกี่ยวกับความปลอดภัยในการบริโภคอาหารกันอย่างมาก ทั้งความปลอดภัยจากเชื้อก่อโรค รวมถึงสารเคมีที่ใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร ซึ่งแนวทางหนึ่งที่ได้รับความสนใจ และเริ่มมีการศึกษากันคือ การนำแบคทีเรียแลกติกมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตอาหารหมัก ซึ่งเชื้อดังกล่าวสามารถสร้างสารต่างๆได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อะซิทัลดีไฮด์ ไดอะซิทิลและแบคเทอริโอซิน (Jimenez - Diaz, *et al.*, 1993 ; De Vuyst and Vandamme, 1994b) มีผลทำให้เนื้อสัมผัส กลิ่น รสชาติอาหารดีขึ้น เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เพิ่มวิตามิน กรดอะมิโน

เพิ่มประสิทธิภาพในการย่อยอาหารในลำไส้ ทำลายจุลินทรีย์ที่สร้างสารพิษและก่อโรคในอาหาร เพิ่มความปลอดภัยในการบริโภคอาหารและการเก็บรักษาอาหาร (Smith and Palumbo, 1983) นอกจากนี้ในปัจจุบันแบคทีเรียกลุ่มนี้จะนิยมนำมาใช้ในการเพิ่มมูลค่าของอาหาร โดยทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่ขึ้นมาอีกมากมาย โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์นม ได้แก่ นมเปรี้ยว นมเปรี้ยวพร้อมดื่ม โยเกิร์ต เป็นต้น

ดังนั้นแนวทางที่จะพัฒนาอาหารหมักพื้นเมืองของไทย ซึ่งส่วนใหญ่ยังคงเป็นอาหารหมักที่อาศัยการหมักตามธรรมชาติ ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณค่าไม่สม่ำเสมอ และผลิตภัณฑ์บางอย่างผู้บริโภคนิยมรับประทานโดยไม่ได้ผ่านความร้อน ทำให้เกิดปัญหาจากแบคทีเรียก่อโรคที่ปนเปื้อนมาในอาหารดังกล่าว จึงจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องมีการศึกษา เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นเชื้อก่อโรค การทดลองครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกสกุล *Lactobacillus* จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทยที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารเพื่อเป็นแนวทางในการนำแบคทีเรียดังกล่าวไปใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการพัฒนาอาหารหมักพื้นเมืองของไทยต่อไปในอนาคต ให้มีความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคมากขึ้น

บทตรวจเอกสาร

1. อาหารหมักพื้นเมืองของไทย

สำหรับอาหารหมักพื้นเมืองของไทยเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก และการย่อยสลายที่คนไทยรู้จักมานานเป็นร้อยปีมาแล้ว (สุมาลี เหลืองสกุล, 2535ก) ซึ่งคนทั่วไปยังไม่ทราบว่าการหมักเกี่ยวข้องกับกระบวนการอะไรบ้างและเกิดขึ้นได้อย่างไร มัทนา แสงจินดาวงศ์ (2538ก) ได้กล่าวไว้ว่า มีคำศัพท์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก คือ เฟอร์เมนเตชั่น และไฮโดรไลซีส ซึ่งเมื่อนำมาดูความหมายจากพจนานุกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม, 2525, อ้างถึงใน มัทนา แสงจินดาวงศ์, 2538) ได้ให้ความหมายไว้ดังนี้คือ "ไฮโดรไลซีส" หมายถึงปฏิกิริยา

การรวมของน้ำกับเกลือเพื่อทำให้เกิดกรดและด่าง หรือหมายถึงการแตกตัวของสารประกอบโดยการเติมน้ำ ส่วนการเฟอร์เมนเตชั่นหรือการหมัก หมายถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางเคมีในสารประกอบอินทรีย์เชิงซ้อนโดยฤทธิ์ของเอนไซม์ และเป็นกระบวนการที่ให้พลังงาน ผลจากการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าวได้เป็นสารชนิดต่างๆ แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาการหมักนั้น ในขณะเดียวกัน วรวุฒิ ครูส่ง (2538) ได้ให้ความหมายของคำว่าการหมักไว้ว่า หมายถึงกระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของสารประกอบอินทรีย์ โดยเฉพาะที่เกิดขึ้นจากกิจกรรมของเอนไซม์ซึ่งผลิตจากจุลินทรีย์ ดังนั้นถ้าเรานำอาหารซึ่งอาจมีส่วนประกอบของโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน เป็นต้น มาทำการเปลี่ยนแปลงโดยอาศัยกระบวนการหมัก จะได้ผลิตภัณฑ์ที่เรียกว่าอาหารหมัก นั่นคือหน้าที่หลัก 2 ประการของการหมัก ได้แก่ เพื่อผลิตหรือปรับปรุงรสชาติและลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์ตามที่ต้องการ ซึ่งทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่แตกต่างจากเดิม และช่วยในการถนอมอาหาร

สำหรับอาหารหมักพื้นเมืองของไทยถือได้ว่าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากกระบวนการหมัก และการย่อยสลายที่คนไทยรู้จักมาเป็นเวลาร้อยปีแล้ว (สุมาลี เหลืองสกุล, 2535ก) จากการสำรวจประเทศไทยทั่วทุกภาค พบว่าแต่ละภาคจะมีอาหารหมักแตกต่างกันออกไป ซึ่งอาหารหมักส่วนใหญ่จะอาศัยจุลินทรีย์เข้ามาช่วยในการหมักโดยกลุ่มของจุลินทรีย์ที่เข้ามามีบทบาทมากที่สุดคือ แบคทีเรียแลกติก ในภาคใต้ถือได้ว่ามีอาหารหมักดองจากแบคทีเรียแลกติกมากที่สุด ประมาณ 21 ชนิด และภาคเหนือน้อยที่สุด 9 ชนิด (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) (ตาราง1) สำหรับแบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้อง หรือมีบทบาทในอาหารหมักดองแต่ละประเภทอาจแตกต่างกันไป ซึ่งได้รวบรวมเอาไว้ดังแสดงในตาราง 2

ตาราง1 อาหารหมักดองซึ่งจะมีแบคทีเรียแลกติกเข้ามาเกี่ยวข้องที่พบทั่วทุกภาคของไทย

ภาค	อาหารหมักดอง	
	พืช	สัตว์
เหนือ	ขนมจีน ใบเมี่ยง ผักดองและผลไม้ดอง	แหนม ปลาร้า ปลาจ่อม - ปลาส้ม ปลาเจ่า น้ำปลา
ใต้	ขนมจีน ก๊งฉ่าย เกี๋ยมฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว ผักและผลไม้ดอง หัวไชโป๊	หอยดอง น้ำบูดู น้ำเคย น้ำปลา กุ้งส้ม ปลาแป้งแดง หมูอวน กุ้งจ่อม - กุ้งส้ม ปลาจ่อม - ปลาส้ม ปลาแป้งข้าวหมาก ปลาหมัม ไตปลา
ตะวันออก	ขนมจีน ก๊งฉ่าย เกี๋ยมฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ผักและผลไม้ดอง	หอยดอง ปลาจ่อม - ปลาส้ม น้ำปลา
อีสาน	ขนมจีน ผักและผลไม้ดอง	ส้มฟัก กุ้งจ่อม - กุ้งส้ม ปลาจ่อม - ปลาส้ม ปลาร้า แหนม ปลาเจ่า ไส้กรอกเปรี้ยว และน้ำปลา
กลาง	ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว ขนมจีน ก๊งฉ่าย ผักเกี้ยมฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ผักและผลไม้ดอง	กุ้งเจ่า กุ้งจ่อม - กุ้งส้ม นมเปรี้ยว ปลาเจ่า ปลาส้ม ปลาร้า หอย-ดอง น้ำปลา โยเกิร์ต เนยแข็ง

ที่มา : วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534)

ตาราง2 แบคทีเรียแลกติกที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักประเภทต่างๆ

อาหารหมัก	แบคทีเรียที่เกี่ยวข้อง	เอกสารอ้างอิง
	อาหารหมักประเภทพืช	
ผักเสี้ยนดอง	*Lactobacillus plantarum, L. brevis*	วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2536ก)
หน่อไม้ดอง	*Pediococcus cereviceae, L. brevis, L. plantarum, L. buchneri, L. fermenti, Leuconostoc mesenteriodes*	อรพิน ภูมิภมร (2526ก)
ผักกาดดอง	*L. plantarum, L. brevis, Lactobacillus* spp., *P. cereviceae*	อรพิน ภูมิภมร (2526ก)
กระเทียมดอง และหอมดอง	*L. plantarum, L. brevis*	วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534)
สะตอดอง	*L. plantarum*	วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2536ก)
กระหล่ำปลีดอง	*L. plantarum*	วรวุฒิ ครูส่ง (2538)
	อาหารหมักประเภทสัตว์	
ไตปลา	*P. halophilus, L. mesenteroides*	อรพิน ภูมิภมร (2526ข)
บูดู	*P. halophilus*	วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2536ก)
กะปิ	*P. halophilus*	สุมาลี เหลืองสกุล (2535ก)
ส้มฟัก	*Pediococcus, Lactobacillus*	ทองคำ คิมหะมานนท์ (2538)
ปลาแป้งแดง	*L. plantarum, Leuconostoc spp.*	วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534)
ปลาร้า	*P. halophilus*	วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2536ข)
ปลาส้ม	*L. plantarum, L. brevis*	อรพิน ภูมิภมร (2526ข)
ไส้กรอกเปรี้ยว	*L. plantarum, L. brevis, L. mesenteroides* ssp. *dextranicum, P. pentosaceus*	พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์ (2538)
แหนม	*L. plantarum, L. brevis*	วิชาญ อันประยูร (2537)

2. ลักษณะทั่วไปและความสำคัญของ *Lactobacillus*

ลักษณะทั่วไป

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว (Hammes and Vogel , 1995) โดยทั่วไปไม่เคลื่อนที่แต่ถ้ามีการเคลื่อนที่จะใช้แฟลกเจลลารอบตัว ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เป็นพวกต้องการอาหารที่มีความซับซ้อนในการเติบโต (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539) มีเมตาบอลิซึมแบบเฟอร์เมนเตทีฟ โดยการสร้างกรดแลกติกออกมาเป็นผลิตผลพลอยได้ (วรวุฒิ ครูส่ง, 2538)

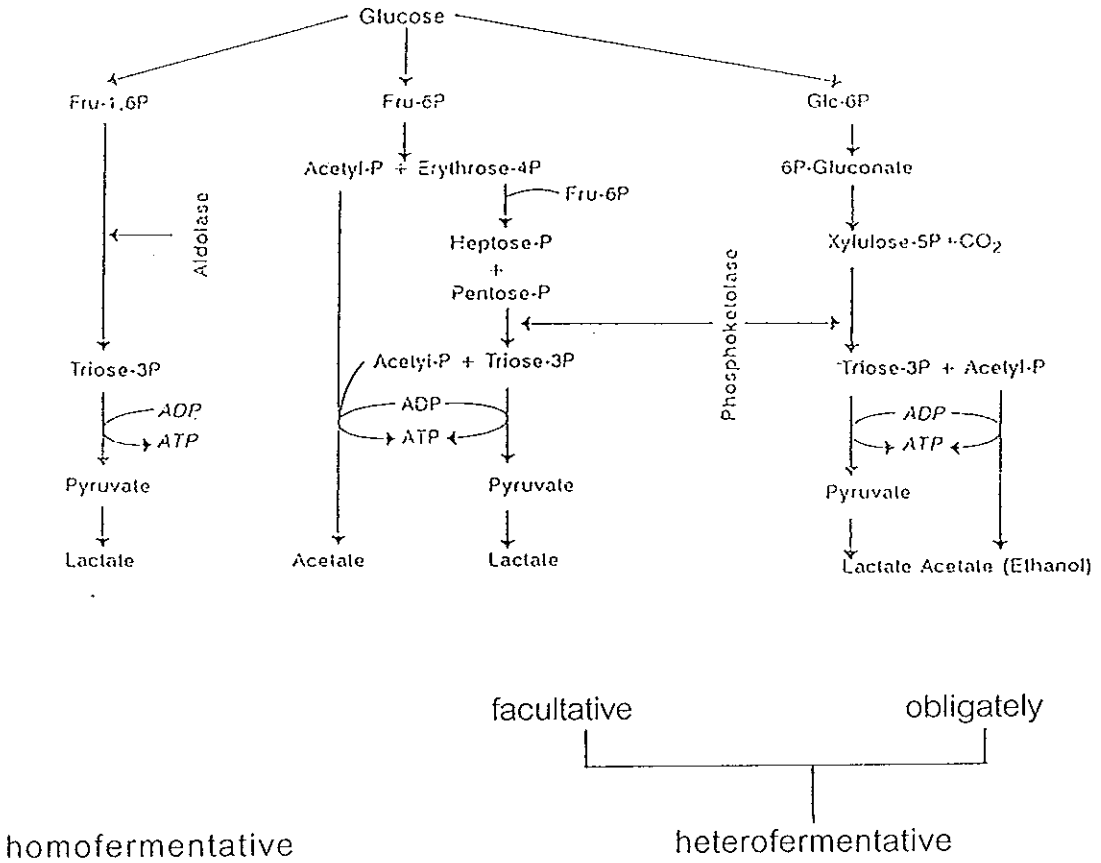
De Vuyst and Vandamme (1994c) ได้แบ่ง *Lactobacillus* ตามลักษณะการใช้อาหารและการสร้างสารออกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. Obligately homofermentative lactobacilli เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกได้ประมาณร้อยละ 90 จากกลูโคส แต่จะไม่เกิดแก๊ส การใช้น้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกลุ่มนี้จะใช้โดยผ่าน Embden - Meyerhof - Parnas (EMP) pathway มีเอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ fructose -1,6,- biphosphate - aldolase แต่จะไม่มีเอนไซม์ phosphoketolase และไม่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคเนตและเพนโตสได้ (ภาพประกอบ1) (Hammes and Vogel , 1995) ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbruekii*, *L. helveticus*, *L. jensenii*, *L. amylovorus* และ *L. ruminis*

2. Facultatively heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเฟอร์เมนต์ทั้งน้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโตสได้ผลผลิตเป็นกรดแลกติกและกรดอะซิติก มีเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ aldolaseและphosphoketolase (ภาพประกอบ1) ได้แก่ *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. casei*, *L. sake* และ *L. rhamnosus*

3. Obligately heterofermentative lactobacilli สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลเฮกโซสได้โดยใช้ phosphogluconate pathway ส่วนน้ำตาลเพนโตสจะเข้าสู่ pathway นี้เช่นเดียวกัน (ภาพประกอบ1) ผลผลิตที่ได้คือ กรดแลกติก กรดอะซิติก แอลกอฮอล์และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Hammes and Vogel, 1995) ได้แก่

แบคทีเรีย *L. brevis*, *L. buchneri*, *L . bifermentans*, *L . cinfusus* และ *L. hilgardii* เป็นต้น



ภาพประกอบ1 กระบวนการเมตาบอลิซึมแบบเฟอร์เมนเตทีฟของ *Lactobacillus*

(ที่มา : Holzapfel and Wood , 1995)

ความสำคัญของ *Lactobacillus*

Lactobacillus จะพบได้ในมนุษย์และสัตว์ (ในระบบทางเดินอาหาร ช่องคลอด) ในนม ผลิตภัณฑ์นม ในอาหารหมักอื่นๆ และในเครื่องดื่ม นอกจากนี้อาจพบในพืช ซึ่งเชื้อนี้โดยส่วนใหญ่จะไม่ทำให้เกิดโรค (Singloton and Sainsbury, 1987) ถ้าพิจารณาความสำคัญของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ De Vuyst and Vandamme (1994c) ได้สรุปไว้ดังนี้

1. แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะช่วยในการปรับปรุงคุณภาพของอาหาร ในปัจจุบันเชื้อกลุ่มLactobacilliจำนวนมาก มีบทบาทสำคัญต่ออุตสาหกรรมอาหาร โดยเฉพาะในการผลิตอาหารหมัก จะมีการใช้เชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อเริ่มต้นซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ สุมาลี เหลืองสกุล (2535ก) ; วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล(2539) กล่าวว่าลักษณะที่ทำให้ *Lactobacillus* มีความสำคัญในอาหาร ได้แก่

ก.ความสามารถในการใช้น้ำตาลแล้วให้กรดแลกติกปริมาณพอสมควร ทำให้เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในการหมักพืช และน้ำนมได้ผลผลิตออกมาหรือนำไปผลิตกรดแลกติกออกมาโดยเฉพาะเพื่อนำกรดแลกติกไปใช้กับผลิตภัณฑ์บางชนิด

ข.ความสามารถในการให้ก๊าซและสารระเหยบางอย่างเช่น *L. fermentum* ที่เจริญในเนยแข็งสวิส และ *L. hilgardii, L. trichodes* ในไวน์

ค.ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินเกือบทุกชนิดที่เซลล์ต้องการ ดังนั้นจึงไม่สามารถเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินได้ เรานำมาใช้ประโยชน์ในการวิเคราะห์ปริมาณของวิตามินในอาหารได้

ง. มีคุณสมบัติทนความร้อนได้ดีทำให้มีชีวิตรอดหลังการพลาสเจอร์ไรซ์ได้ จึงทำให้เกิดการตกตะกอนโปรตีน (curd) ในกระบวนการผลิตเนยแข็ง

จากลักษณะดังกล่าวข้างต้นทำให้มีการนำ *Lactobacillus* มาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารต่างๆ เช่นในอุตสาหกรรมอาหารหมักประเภทนมและผลิตภัณฑ์จากนม อาหารหมักพื้นเมือง อาหารหมักประเภทเครื่องดื่มแอลกอฮอล์ (ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต, 2536)

2. รักษาสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้รวมถึงแบคทีเรียก่อโรค

ต่างๆ เช่น *S. aureus*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., และ Enteropathogenic

3. ป้องกันการติดเชื้อของลำไส้และท่อปัสสาวะ โดยการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์และกระตุ้นระบบการทำงานของแลกโตเปอร์ออกซิเดส ซึ่งระบบดังกล่าวเกิดขึ้นในนมวัว การทำงานจะเกี่ยวข้องกับส่วนประกอบ 3 องค์ประกอบคือ แลกโตเปอร์-ออกซิเดส ไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ซึ่งในนมดิบพบว่า ไธโอไซยาเนตและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะกระตุ้นการทำงานของระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส ทำให้สามารถยืดอายุการเก็บได้ยาวนานขึ้น แสดงว่าระบบแลกโตเปอร์ออกซิเดส จะมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (Jay, 1996a)

4. ลดระดับของคลอเรสเตอรอลในเลือด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาโดย Mann, (1974 quoted in Jay, 1996) ใช้ผู้ทดสอบทั้งหมด 26 คน โดยการให้รับประทานโยเกิร์ต พบว่า ระดับคลอเรสเตอรอลในเลือดจะต่ำกว่า และได้มีการเสนอแนะว่า โยเกิร์ตประกอบด้วยปัจจัยที่มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์คลอเรสเตอ-รอลจากอะซิเตต

5. ลดความเสี่ยงของมะเร็งลำไส้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Goldin and Gorbarch, (1984 quoted in Gillinland, 1989) โดยใช้ผู้ทดสอบ 21 คน เพื่อศึกษาผลของ *Lactobacillus acidophilus* ต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียในอุจจาระ ซึ่งเอนไซม์ดังกล่าว ได้แก่ β - glucoronidase, nitroreductase และ azoreductase เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้ทำให้มีการแสดงออกของสารก่อโรคมะเร็ง ทดลองโดยให้ผู้ทดสอบดื่มนมจืดที่มีการเติมเชื้อ*L. acidophilus* จำนวน 2×10^{6} เซลล์/มิลลิลิตร ติดต่อกันเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าเมื่อทดสอบกิจกรรมของเอนไซม์ทั้ง 3 ตัวปรากฏว่าจะลดลง 2 ถึง 4 เท่า แสดงว่าเชื้อกลุ่มนี้จะต่อต้านการเกิดโรคมะเร็ง

6. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเพื่อให้มีการผลิต macrophage ซึ่งจะมีบทบาทในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง โดย Perdigon, *et al.* (1986 quoted in Gilliland, 1989) ได้รายงานว่า นมที่มี *L. casei* เป็นส่วนประกอบจะช่วยกระตุ้นการทำงานของ macrophage ในหนูได้โดยการทดสอบจะให้หนูดื่มนมที่มีเชื้อ *L. casei* เป็นส่วนประกอบ หลังจาก 8 วันนำหนูมาฆ่าและตรวจหากิจกรรมของ

เอนไซม์ที่มาจาก macrophage (ในการทดลองนี้จะวัดกิจกรรมของ lactic dehydrogenase (LDH)) พบว่าการบริโภคนมที่มีส่วนประกอบของ *L. casei* จะมีผลในการเพิ่มระดับกิจกรรมของ LDH ทำให้ลดการเพิ่มเซลล์มะเร็งในร่างกายได้

3. แบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร

ความผิดปกติของระบบทางเดินอาหารอาจมีสาเหตุได้หลายทางด้วยกัน เช่น การบริโภคอาหารมากเกินไป การแพ้อาหาร การขาดอาหาร การเป็นพิษของอาหารเนื่องจากสารพิษของพืช สัตว์ แบคทีเรีย ปรสิต และการติดเชื้อจุลินทรีย์ในอาหาร แต่สำหรับในที่นี้จะขอกล่าวถึงโรคจากการบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียเป็นสาเหตุ แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม (สุมาลี เหลืองสกุล, 2535ข) คือ

ก. โรคที่เกิดจากการกินอาหาร (foodborne disease) หมายถึง การเจ็บป่วยที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียเข้าไปในร่างกาย

ข. โรคอาหารเป็นพิษ (food poisoning) หมายถึง การเจ็บป่วยที่เกิดจากการได้รับสารพิษของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร

แบคทีเรียที่เป็นสาเหตุก่อให้เกิดโรคต่างๆ ดังกล่าวพอจะสรุปได้ดังนี้

3.1 *Bacillus cereus* (พรรณี พึ่งรัศมี, 2538)

ลักษณะ มีรูปร่างเป็นแท่งขนาด 1 - 1.2 × 3 - 10 ไมโครเมตร มักอยู่เรียงกันเป็นสายมีสปอร์เป็นรูปไข่อยู่ตรงกลาง สปอร์ไม่ใหญ่กว่าตัวเซลล์ ติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ได้และไม่มีแคปซูล เป็นพวกแอโรบ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ37° ซ

อาการของโรค ซึ่งมีอาการ 2 แบบคือ

ก. ถ้ากินอาหารที่ปนเปื้อนด้วยสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินทำให้ท้องเสีย มีระยะฟักตัวนานประมาณ 8 - 17 ชั่วโมง จึงเกิดอาการปวดท้อง ท้องเสีย บางรายอาจมีอาการอาเจียน โรคนี้เป็นนานเฉลี่ย 12 - 24 ชั่วโมง อาหารที่มักเป็นต้นเหตุ ได้แก่ อาหารพวกเนื้อ น้ำซุป และซอส

ข. ถ้ากินอาหารที่ปนเปื้อนสายพันธุ์ที่สร้างทอกซินที่ทำให้อาเจียนเข้าไปจะเกิดอาการหลังจากกินอาหารไปเป็นเวลา 1 - 5 ชั่วโมง มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน

ปวดท้อง 1 ใน 3 ของผู้ป่วยจะมีอาการท้องเสีย อาการจะเป็นนาน 6 - 24 ชั่วโมง อาหารที่เป็นต้นเหตุได้แก่ ข้าวผัด นมดิบ ผัก และเนื้อปรุงสุก

3.2 *Staphylococcus aureus* (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538ข)

ลักษณะ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เจริญที่อุณหภูมิ 6 – 46° ซ เจริญได้ดีในอาหารที่มี pH ตั้งแต่ 4.2 - 9.3 พบได้ทั่วไปตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย เช่น จมูก ผิวหนัง แผลและสิว เป็นต้น ถ้าคนงานมีสุขลักษณะไม่ดีเชื้อจะปนเปื้อนเข้าไปในผลิตภัณฑ์มาก โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์แช่แข็งพร้อมบริโภค

อาการของโรค เนื่องจากเชื้อนี้สามารถสร้างสารพิษชนิด A, B, C, D และ E เมื่อบริโภคสารพิษดังกล่าวเข้าไปทำให้มีอาการปวดท้อง คลื่นไส้ อาเจียน และท้องเดิน อาการนี้จะหายไปเองภายหลังจากถ่ายเอาเชื้อออกหมดแล้ว แต่ในรายที่เป็นเด็กหรือผู้ที่อ่อนแอพิษอาจรุนแรง และถึงแก่ชีวิตได้

3.3 *Salmonella* (สุมาลี เหลืองสกุล, 2535ข ;Singloton and Sainsbury,1987)

ลักษณะ มีรูปร่างเป็นแท่ง ย้อมติดสีแกรมลบ ไม่สร้างสปอร์ สามารถย่อยสลายกลูโคสได้กรดกับก๊าซ แต่จะไม่ย่อยแลกโตสหรือซูโครส พบในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ สัตว์ปีกและผลิตภัณฑ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งถ้าทิ้งไว้ในอุณหภูมิห้องเป็น เวลานาน

อาการของโรค โรคที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มี *Salmonella* เข้าไปในร่างกายที่พบได้บ่อยที่สุดคือ โรคซาลโมเนลโลซิส นอกจากนี้ยังมีอีก 2 โรค ได้แก่ ไทฟอยด์และพาราไทฟอยด์

ซาลโมเนลโลซิส มีระยะฟักตัว 12-36 ชั่วโมง จะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้อง ท้องเสีย หนาวสั่น อุจจาระเป็นน้ำมีสีเขียว อ่อนเพลีย มีไข้ปานกลาง

ไทฟอยด์ จะมีระยะฟักตัว 7 - 15 วัน มีอาการวิงเวียน ปวดหัว มีอาการไข้เพิ่มขึ้นตามลำดับ ปวดท้อง ท้องผูก หรือท้องเสีย การอักเสบของเนื้อเยื่อในต่อมน้ำเหลืองบริเวณลำไส้เล็ก ทำให้เกิดการเน่าเปื่อยหรือเกิดการตกเลือดบริเวณดังกล่าว ซึ่งอาจทำให้ถึงแก่ชีวิตได้

พาราไทฟอยด์ จะมีอาการคล้ายกับโรคไทฟอยด์มากแต่มีความรุนแรงน้อยกว่า นอกจากนี้มี *S. enteritidis*, *S. anatum* ที่ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการท้องเสียเช่นเดียวกัน

3.4 *Escherichia coli*

ลักษณะ รูปท่อนตรง เรียงตัวเดี่ยวๆหรือเป็นคู่เคลื่อนที่โดยใช้แฟลกเจลลา หรือไม่เคลื่อนที่ พบในนม ผักและเนื้อ เป็นต้น กลุ่มที่ทำให้อาหารเป็นพิษเรียกว่า EEC (Enteropathogenic *E. coli*) ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือ

กลุ่มที่1 เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซิน 2 แบบคือ ทนความร้อนและไม่ทนความร้อน จะเกิดอาการหลังจากกินอาหารเป็นเวลา 8 - 44 ชั่วโมง โดยเฉลี่ย 26 ชั่วโมง ทำให้เกิดอาการท้องร่วง อุจจาระเป็นน้ำซาวข้าว อาเจียน คล้ายอหิวาตกโรค

กลุ่มที่2 เป็นสายพันธุ์ที่สร้างไซโตทอกซิน อาการจะเกิดขึ้นหลังจากรับประทานอาหารที่มีแบคทีเรียเหล่านี้ 8 - 24 ชั่วโมง โดยเฉลี่ย 11 ชั่วโมง พวกนี้เจริญในลำไส้ใหญ่รุกรานหรือแทรกไปในเซลล์บุผิวลำไส้ใหญ่ ทำให้เกิดอาการของโรค คือ มีไข้ หนาวสั่น ปวดศีรษะ ปวดท้อง ท้องร่วง ถ่ายอุจจาระเป็นน้ำ อาการคล้ายโรคบิด (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

นอกจากนี้เชื้อในกลุ่ม EHEC (Enterohaemorhagic *E. coli*)เป็นเชื้อที่ก่อโรคในอาหารเช่นเดียวกัน ได้แก่พวก *E. coli* O157 : H7 ซึ่งพบในพวกเนื้อ นม สัตว์ปีก และอาหารทะเล

อาการของโรค ทำให้ท้องเสีย มีเลือดปนมาด้วย เกิดความบกพร่องของระบบขับถ่าย มีการตกเลือดบริเวณลำไส้ โลหิตจางและไตล้มเหลว (Jay, 1996b)

3.5 *Vibrio parahaemolyticus* (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538ข)

ลักษณะ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่ง เคลื่อนที่ได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 10 – 44° ซ pH 4.5 - 9.6 ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือต่ำๆ ทั้งในที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน มักพบในอาหารทะเลและผลิตภัณฑ์อาหารทะเล

อาการของโรค ปวดท้องอย่างรุนแรงภายในเวลา 2 - 48 ชั่วโมง มีไข้ คลื่นไส้ อาเจียนและท้องเสีย ถ้าเป็นพิษรุนแรงจะทำให้ถ่ายออกมาเป็นมูกเลือดคล้าย อาการของโรคบิด หรือโรคอาหารเป็นพิษอันเนื่องจากเชื้อ *Salmonella*

3.6 *V. cholerae* (Singloton and Sainsbury, 1987)

ลักษณะ เป็นแบคทีเรียแกรมลบ รูปร่างเป็นแท่งโค้ง ไม่เคลื่อนที่ ไม่เจริญในสภาวะที่มีเกลือ

อาการของโรค ทำให้เกิดโรคอหิวาตกโรค จะมีอาการปวดท้อง ท้องเดินอย่างรุนแรง ถ่ายอุจจาระเป็นของเหลวและสีเหมือนน้ำซาวข้าว ผู้ป่วยอาจตายเพราะเสียเกลือแร่ในร่างกายมาก

นอกจากเชื้อแบคทีเรียดังที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ยังมีแบคทีเรียอีกหลายชนิด ได้แก่ *Clostridium botulinum, C. perfringens, Listeria monocytogenes* และ *Shigella* เป็นต้น เป็นแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารเช่นเดียวกัน

4. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียของ *Lactobacillus*

การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร นอกจากจะใช้สารเคมีหรือยาปฏิชีวนะแล้ว การนำเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้มีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น อาหารหมักพื้นเมือง นมเปรี้ยว และนมเปรี้ยวพร้อมดื่ม เป็นต้น เกศินี เมธาวัชรวงศ์ (2532) พบว่า การหมักเนื้อปลาโดยการเติมแบคทีเรียแลกติกจะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียและก่อโรคในเนื้อปลาได้ ได้แก่ *Bacillus* sp., *Achromobacter* sp., *C. botulinum* type E, *C. perfringens*, *E. coli*, *Flavobacterium* sp., *Pseudomonas* sp., *Salmonella* sp., *Staphylococcus* sp., *Shigella* sp., *V. cholerae* และ *V. parahaemolyticus*

ทองคำ คิมหะมานนท์ (2538) ได้ทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักส้มฟัก ได้แก่ *Lactobacillus sake, L. maltaromicus, L. casei , Pediococcus urinaeequi, P. dextrinicus, P. halophilus* และ

P. pentosaceus พบว่าจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหาร 4 ชนิดคือ *S. aureus*, *V. parahaemolyticus*, *Salmonella sp.* และ *E. coli*

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และคณะ (2539) ได้ศึกษา *Lactobacillus spp.* ที่แยกจากนมเปรี้ยว คือ *L. casei*, *L. acidophillus* และ *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* สามารถยับยั้ง*S. aureus* ได้ร้อยละ 61.1 -75.5, *S. typhimurium* ร้อยละ 40.5 - 62.1 และ *E. coli* ร้อยละ 47.9 - 53.0

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์ (2540) แยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย และนำมาทดสอบผลการยับยั้งต่อแบคทีเรีย 5 ชนิด คือ *E. coli*, *V. parahaemolyticus*, *S. typhimurium*, *B. cereus* และ *S. aureus* โดยวิธี agar spot สามารถคัดแบคทีเรียแลกติกที่มีขอบใสมากกว่า 10 มิลลิเมตร และสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบอย่างน้อย 3 ชนิด ได้ 20 สายพันธุ์ เมื่อนำไปเทียบเคียงชนิดพบว่าเป็น *L. plantarum* 16 สายพันธุ์, *L. bavaricus* 3 สายพันธุ์ และ *L. brevis* 1 สายพันธุ์ ในขณะที่ ศิรินาถ หนูเอก (2540) ได้แยกแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักจำนวน 14 ชนิด พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด 86 ไอโซเลต พบว่ามี 5 ไอโซเลต ที่มีความสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (*S. aureus*, *E. coli*, *E. coli* 0157:H7, *Lactobacillus sake*, *L. plantarum*, *L. monocytogenes* 018 และ *Carnobacterium sp.* M114 - 25) ได้สูง

Abdel - Bar and Harris (1984) ได้ทำการศึกษาเพื่อหาการยับยั้งการเจริญของ *L. bulgaricus* ต่อแบคทีเรียประจำถิ่นในปลาทูน่าแช่แข็ง สลัดมันฝรั่ง และเนื้อวัว พบว่า เมื่อใช้ *L. bulgaricus* จำนวน 1.4×10^6 - 5.7×10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตรจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียประจำถิ่นในอาหารที่ทดสอบได้ดี มีการเสนอแนะว่าการยับยั้งดังกล่าวเกิดขึ้นจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การศึกษาแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซิน โดยทำการแยกมาจากเนื้อตัด พบว่าทั้ง 10 สายพันธุ์ที่แยกมาได้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่

ชอบอุณหภูมิต่ำได้แก่ *L. monocytogenes* (4 สายพันธุ์), *Aeromonas hydrophilla* (2 สายพันธุ์), *S. aureus* (2 สายพันธุ์) (Lewus, *et al.*,1991)

จากการศึกษา พบว่า *Lactobacillus* spp. ทั้ง12 สายพันธุ์ ที่แยกมาจากลำไส้ของไก่ สามารถยับยั้ง *Salmonella* 5 สายพันธุ์ (*S. enteritidis* 935/75, *S. enteritidis* 94/448, *S. pullorum*, *S. typhimurium* และ *S. blockley*) และ *E. coli* 3 สายพันธุ์ (*E. coli* O1:K1, O2:K1 และ O78 : k80) โดยการยับยั้งเจริญของ *Salmonella sp.* มากกว่า *E. coli* ซึ่งการยับยั้งดังกล่าวอาจจะเกิดเนื่องจากการสร้างกรดอินทรีย์ (Jin, *et al.*, 1996)

เมื่อแยกแบคทีเรียแลกติกจากผักสลัด 22 ตัวอย่าง พบว่าแบคทีเรียที่แยกมาได้คือ *L. casei*, *L. plantarum* และ *Pediococcus* spp. โดยสายพันธุ์ที่มีผลในการยับยั้งมากที่สุดคือ *L. casei* ซึ่งสามารถลดจำนวนแบคทีเรียกลุ่มมีโซไฟล์ ได้แก่ *A. hydrophilla, S. typhimurium, S. aureus* และ *L. monocytogenes* ได้ (Vescovo, *et al.*,1996)

Gupta, *et al.* (1996) พบว่า *L. acidophilus* 301 จะออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. typhi, E. coli, Proteus vulgaris, Yersinia enterocolitica* และ *S. aureus* เมื่อ เจริญร่วมกันในนม ซึ่งการยับยั้งเชื้อก่อโรคดังกล่าวไม่ได้เกิดจากพวกกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียว แต่อาจจะเกิดจากสารยับยั้งที่มีลักษณะคล้ายยาปฏิชีวนะอีกด้วยต่อมา Gupta, *et al.* (1997) ได้ผลิตโยเกิร์ตโดยใช้เชื้อดังกล่าวพบว่ามีการสร้างสารยับยั้งต่อเชื้อก่อโรคในลำไส้ได้

5. การสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus*

จากที่กล่าวมาแล้วข้างต้นว่า *Lactobacillus* สามารถสร้างสารยับยั้งต่างๆมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค และแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในอาหาร ทำให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้ยาวนานมากยิ่งขึ้น ซึ่งสารยับยั้งดังกล่าวประกอบด้วย

5.1 กรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลกติก และกรดอะซิติก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการใช้สารอาหารของเชื้อ Lactobacilli ซึ่งกรดทั้ง 2 ตัวนี้ใช้อย่างกว้างขวางในการช่วยเก็บรักษาอาหาร (Jay, 1996a)

กรดแลกติก

กรดแลกติกที่เกิดจากกระบวนการหมักอาจจะอยู่ในรูปแอลหรือดี เป็นกรดที่นิยมนำมาใช้ในอาหารโดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองประเภทต่างๆ เพื่อเป็นสารให้กลิ่นรส ควบคุม pH ของอาหาร และช่วยในการถนอมอาหาร (ตาราง3) ได้มี รายงานว่าในผลิตภัณฑ์พวกไส้กรอกใช้โซเดียมแลกเตทร้อยละ1.0 จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาได้ ส่วนเมื่อใช้ในเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์จะสามารถลดจำนวนจุลินทรีย์พวก *Salmonella* ได้เป็นอย่างดี (เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์, 2536 ; ปทุมพร ฉิมเอนก, 2536)

ตาราง 3 หน้าที่ต่างๆของกรดแลกติกในอาหารแต่ละชนิด

อาหาร	เพิ่มรสชาติ	ช่วยในการเก็บรักษา	ควบคุมระดับ pH
Rye Bread	+	+	+
Beer	—	+	+
Confectionery	+	—	+
Dairy	+	+	+
Margarine	+	+	+
Pickles	+	+	—
Beverage	+	+	—
sauces	+	+	—

ที่มา : ปทุมพร ฉิมเอนก(2536)

Niemand, *et al.* (1983) พบว่าการเติมกรดแลกติกลงในเนื้อบดเพื่อให้ pH เป็น 5.0 จะมีผลในการลดจำนวนของเชื้อ *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonads* และ *Brochospacta* แต่จะไม่มีผลต่อเชื้อ *Leuconostoc* และ *Pediococcus* เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตกรดได้ ทำให้ตัวมันเองปรับสภาพในการทนต่อกรด Ziauddin, *et al.* (1993) แสดงให้เห็นว่ากรดแลกติกมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญต่อแบคทีเรียก่อโรคพบว่ากรดแลกติกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 1.5 และร้อยละ 2.5 จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียต่างๆ ได้แก่ *Bacillus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus* และ *Streptococcus* ได้อย่างสมบูรณ์

Torriani, *et al.* (1997) ทำการทดสอบกรดแลกติกที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ในผักสลัด พบว่าถ้าเติมกรดแลกติกร้อยละ1 ลงไปจะมีผลในการทำลายแบคทีเรียเกือบทุกกลุ่มที่ใช้ทดสอบ แต่ยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมดและฟีคอลโคลิฟอร์มได้เพียงบางส่วนและเมื่อเติมกรดแลกติกร้อยละ 0.5 ลงไป จะไม่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ประจำถิ่นในผัก

กรดอะซิติก

กรดอะซิติกเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียพวก heterofermentative lactobacilli ซึ่งกรดดังกล่าวมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์ (2536) รายงานว่า กรดอะซิติกใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองต่างๆ เช่นไส้กรอกเปรี้ยว โดยกรดอะซิติกมีคุณสมบัติเป็นสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ดังนั้นเมื่อนำมาใช้ในการถนอมอาหารต้องใช้ที่ความเข้มข้นอย่างต่ำร้อยละ 3.6

Edward (1980) พบว่ากรดอะซิติกมีผลในการยับยั้งแบคทีเรีย โดยจะทำให้ pH ลดต่ำลง ดังนั้นแบคทีเรียที่สามารถเจริญที่ pH เป็นกลางจะไม่สามารถเจริญได้ (ตาราง4) นอกจากนี้กรดอะซิติกยังสามารถยับยั้งยีสต์และราได้ด้วย แต่ความสามารถในการยับยั้งจะต่ำกว่าแบคทีเรีย

ตาราง4 ผลการยับยั้งแบคทีเรียโดยกรดอะซิติก

จุลินทรีย์	ค่า pH ที่มีผลในการยับยั้ง	ความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอะซิติกที่มีผลต่อการยับยั้ง(%)
Salmonella aertryke	4.9	0.04
S. aureus	5.0	0.03
Phytomonas phaseoli	5.2	0.02
B. cereus	4.9	0.04
B. mesentericus	4.9	0.04
Saccharomyces cerevisiae	3.9	0.59
Aspergillus niger	4.1	0.27

ที่มา : Edward (1980)

Dickson (1992) ได้ใช้เนื้อวัวที่มีการเติม *S. typhimurium* มาทดสอบกับ กรดอะซิติกที่มีความเข้มข้นร้อยละ 2 พบว่าจะมีผลในการลดจำนวนของแบคทีเรียดังกล่าวได้ Jay (1996a) ศึกษาผลของกรดอะซิติกในการทำลาย *S. enteritidis* และ *S. typhimurium* ในน้ำสลัดโดยเติมเชื้อดังกล่าวลงในน้ำสลัดจำนวน 5×10^6 เซลล์ พบว่าหลังจากทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จะไม่พบเชื้ออยู่เลย

นอกจากการนำกรดแลกติกและกรดอะซิติกมาใช้เพียงเดี่ยวๆแล้ว ยังมีการใช้กรดแลกติกและกรดอะซิติกร่วมกันหรือใช้ร่วมกับกรดอินทรีย์อื่นๆอีกหลายชนิด ตัวอย่างเช่น Kotula and Thelappurate (1994) ได้ใช้กรดแลกติกและกรดอะซิติกกับเนื้อวัวที่ขายปลีกทั่วไป จะช่วยลดแบคทีเรียทั้งหมดและ*E. coli* เป็นจำนวน 1 log แต่ถ้าเพิ่มเวลาในการทดสอบให้นานขึ้น การยับยั้งเนื่องจากกรดทั้ง 2 จะเพิ่มขึ้น โดยสามารถลดจำนวนของเชื้อลง 2 log

Ziauddin, *et al.* (1996) ทำการฉีดพ่นกรดอะซิติก กรดแลกติก สารสกัดขิง สารสกัดกระเทียม และสารสกัดหอมลงไปในเนื้อ โดยการฉีดเพียงเดี่ยวๆ หรือรวม

กับโซเดียมคลอไรด์ จะช่วยยืดอายุการเก็บ ส่วนการสังเกต สี กลิ่น และการทดสอบทางประสาทสัมผัสอื่นๆของเนื้อที่มีการทดสอบจะเป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบชิม โดยพบว่าเมื่อพิจารณาคุณภาพทางประสาทสัมผัสจะดีกว่าเนื้อที่ไม่ได้ผ่านการทดสอบ แสดงว่า กรดอินทรีย์และเครื่องเทศที่นำมาทดสอบมีคุณสมบัติเป็นสารต้านจุลินทรีย์ ควบคุมจุลินทรีย์ที่ทำให้เนื้อเน่าเสีย และสามารถใช้เก็บรักษาเนื้อที่อุณหภูมิห้องได้

ผลการศึกษากรดอินทรีย์ต่อเชื้อ*E.coli* O157:H7และ*L. monocytogenes* โดยใช้กรดอะซิติกและกรดแลกติกความเข้มข้นร้อยละ 2 และ4 ฉีดพ่นลงไปในชิ้นเนื้อแล้วนำชิ้นเนื้อดังกล่าวมาบด นำไปนับจำนวนเชื้อรอดชีวิต พบว่า เมื่อฉีดกรดลงไป ร้อยละ 2 และ 4 จะลดจำนวนเชื้อ *E. coli* O157 : H7 ลง 0.1 log และจะลดเชื้อ *L. monocytogenes* ลง 0.36 log และ0.04 log ตามลำดับ แสดงว่า กรดอินทรีย์ทั้ง 2 ชนิดนี้ มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli* O157 :H7 และ *L. monocytogenes* (Conner, *et al.*, 1997)

จากรายงานของ Tamblyn and Conner (1997) พบว่าการใช้กรดอินทรีย์ (กรดอะซิติก ซิตริก แลกติก มาลิก แมนเดลิก โพรพิโอนิกและทาร์ทาริก) ความเข้มข้นร้อยละ 4 หรือมากกว่า จะฆ่าเชื้อ *S. typhimurium* ในไก่อบได้

5.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

เนื่องจาก Lactobacilli จะไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (ที่จะไปเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นน้ำได้) ทำให้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นถูกสะสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (Daeschel, 1989) แต่สำหรับ Lactobacilli จะต้านทานต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Steinkraus, 1992) ซึ่งวิธีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีแตกต่างกันหลายแบบดังนี้

$$\text{pyruvate} + O_2 + PO_4^{-3} \xrightarrow[\text{pyruvate oxidase}]{} \text{acetyl phosphate} + CO_2 + H_2O_2$$

$$\text{lactate} + O_2 \xrightarrow[\text{L - lactate oxidase}]{} \text{pyruvate} + H_2O_2$$

CENTRAL LIBRARY
PRINCE OF SONGKLA UNIVERSITY

$$\text{lactate} + O_2 \xrightarrow[\text{NAD- independent D - lactate dehydrogenase}]{} \text{pyruvate} + H_2O_2$$

$$NADH + H + O_2 \xrightarrow[\text{NADH oxidase}]{} NAD + H_2O_2$$

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นสารอีกชนิดหนึ่งที่นิยมใช้ในการถนอมอาหาร (วรวุฒิ ครูส่ง, 2538) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.02 - 0.05 ที่เติมลงในนมดิบจะฆ่าแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้ (Edward, 1980) และมีการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.04 - 0.08 ร่วมกับความร้อนที่อุณหภูมิ 52 – 53° ซ เป็นเวลา 30 นาที ในการพลาสเจอไรซ์น้ำนมดิบ ผลปรากฏว่าสามารถลดจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดและพวกโคลิฟอร์มแบคทีเรียที่พบในนมได้ เช่นเดียวกับการผลิตน้ำตาล มักใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร่วมกับความร้อนในการทำลายแบคทีเรียพวกเทอร์โมไฟล์ (สุมาลี เหลืองสกุล, 2535ก ; Chapman and Sharpe, 1990)

5.3 อะซิทัลดีไฮด์ (Acetyldehyde)

เป็นผลผลิตที่เกิดจากกระบวนการย่อยสลายของสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปจะมีจำนวนเพียงเล็กน้อยซึ่งจะมีผลต่อรสชาติ กลิ่นและเนื้อสัมผัสของอาหารเป็นสำคัญ (Desmazeaud, 1996) และยังมีผลยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ด้วย ซึ่งจากรายงานของ Kulshrestha and Marth (1970 quoted in De Vuyst and Vandamme,1994)กล่าวว่าอะซิทัลดีไฮด์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกเมื่อมีความเข้มข้น 10-100ส่วนในล้านส่วน สามารถยับยั้งเชื้อ*E. coli*, *S. aureus* และ*S. typhimurium* ได้

5.4 ไดอะซิทิล (Diacetyl)

แบคทีเรียที่สามารถผลิตไดอะซิทิล ส่วนใหญ่เป็นพวกแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ซิเตรตเป็นสารตั้งต้น เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียเหล่านี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีนมหรือหางนมซึ่งมีซิเตรตเป็นองค์ประกอบ ซิเตรตจะถูกนำเข้าไปใช้ในเซลล์โดยเอนไซม์ซิเตรต-เปอร์มีเอส (citrate permease) และเกิดปฏิกิริยาอีกหลายขั้นตอนจนได้สารไดอะซิทิล ซึ่งสารตัวนี้เป็นส่วนประกอบสำคัญที่ให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด และ

เครื่องดื่มต่างๆ นอกจากนี้สารไดอะซิทิลยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ด้วย (สุกานดา วนิชวัฒนะ, 2538 ; De Vuyst and Vandamme, 1994a) โดยพบว่า การใช้ไดอะซิทิลความเข้มข้นมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อลิตร สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ (Pinheiri, *et al.*, 1968)

Spillmann, *et al.* (1978 quoted in De Vuyst and Vandamme, 1994) พบว่าการใช้สารไดอะซิทิลเพียงเล็กน้อยจะสามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ ในขณะที่ Matlagh, *et al.* (1991)ใช้ไดอะซิทิลปริมาณ 344 µg/l ยับยั้งการเจริญของ *Listeria* sp., *Salmonella* sp., *Yersinia* sp., *E. coli* และ *A. hydrophila* ได้

3.5 คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมักน้ำตาล hexose โดย heterofermentative lactobacilli (De Vuyst and Vandamme, 1994c) ซึ่งจะมีบทบาทสำคัญในการหมักโดยจะมีผลต่อรสชาติ กลิ่น และเนื้อสัมผัสของอาหารหมัก ส่วนการยับยั้งจุลินทรีย์จะออกฤทธิ์ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยการเข้าแทนที่โมเลกุลของออกซิเจนเป็นผลให้ pH ลดลง ทำให้เกิดการทำลายผนังเซลล์ นอกจากนี้ยังช่วยป้องกันพวกเชื้อราได้ (Desmazeaud, 1996)

5.6 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน เป็นสารยับยั้งอีกชนิดหนึ่งที่สร้างขึ้นมาจาก Lactobacilli นอกเหนือจากสารยับยั้งต่างๆที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ซึ่ง Tagg, *et al.* (1976) เป็นผู้เริ่มต้นในการกำหนดลักษณะของแบคเทอริโอซินไว้ 6 ข้อด้วยกัน คือ

1. แบคเทอริโอซินเป็นสารพวกโปรตีน ซึ่งจะถูกทำลายได้โดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน

2. แบคเทอริโอซินจะออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญและทำลายแบคทีเรียได้

3. แบคเทอริโอซินจะมีบริเวณจำเพาะในการจับกับแบคทีเรียก่อโรคต่างๆ

4.ยีนส์ที่ควบคุมการสร้างแบคเทอริโอซินโดยส่วนใหญ่จะพบว่าอยู่บริเวณพลาสมิด

5.แบคทีเรียที่ผลิตแบคเทอริโอซินเมื่อหลั่งแบคเทอริโอซินออกมานอกเซลล์ จะทำให้เซลล์ตาย แต่มีแบคทีเรียบางชนิดสามารถผลิตแบคเทอริโอซินในระยะ log ดังนั้นจึงไม่มีการตายของเซลล์

6.แบคเทอริโอซินออกฤทธิ์ต้านแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น

จนกระทั่งปัจจุบันการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินได้ก้าวหน้าขึ้นเรื่อยทำให้ทราบรายละเอียดของแบคเทอริโอซินเพิ่มขึ้น Jack, *et al.* (1995) ได้กล่าวไว้ว่าแบคเทอริโอซินอาจจะไม่ได้ประกอบด้วยสารพวกโปรตีนเพียงอย่างเดียว อาจจะมีสารพวกไขมันและคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบอีกด้วย ในขณะที่ Klaenhammer (1993) ได้แบ่งแบคเทอริโอซินออกเป็น 4 กลุ่มคือ

กลุ่มที่1 Lantibiotic ซึ่งเป็นสายเปปไทด์ที่มีมวลโมเลกุลน้อยกว่า 5 กิโล-ดาลตัน แตกต่างจากแบคเทอริโอซินอื่นๆ คือประกอบด้วย didehydroamino acids และ thioether amino acid สามารถแยกออกได้เป็นกลุ่มย่อยจากลักษณะโครงสร้างที่เป็นรูปวงแหวน ดังนี้

ก. จะมีรูปร่างเป็นเกลียว มีมวลโมเลกุล 2164 - 3488 ดาลตัน และมีประจุบวก 2 - 7 ประจุ

ข. ลักษณะรูปร่างเป็นก้อนกลม มีมวลโมเลกุล 1954 - 2041 ดาลตัน อาจมีประจุเป็นลบ ได้แก่ nisin และ lactocin 481

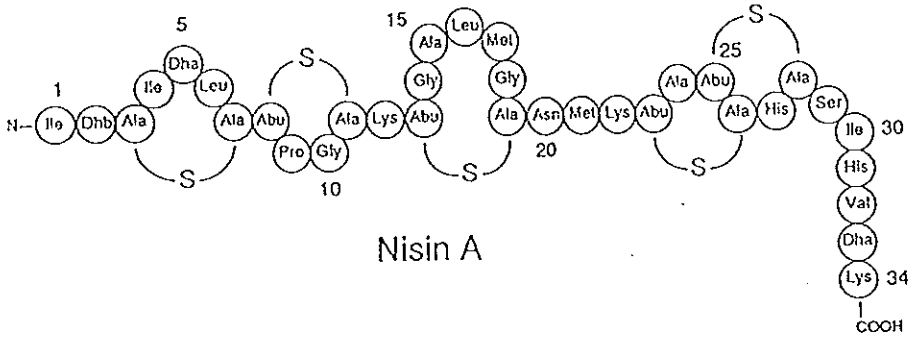
กลุ่มที่ 2 ขนาดมวลโมเลกุลน้อยกว่า 10 กิโลดาลตัน แบคเทอริโอซินกลุ่มนี้สายเปปไทด์จะไม่มีกลุ่ม lantibiotic ได้แก่ diplococcin, lactococcin A และ lactococcin F

กลุ่มที่ 3 แบคเทอริโอซินที่มีขนาดใหญ่ ขนาดมวลโมเลกุลมากกว่า 30 กิโลดาลตัน เป็นโปรตีนที่ทนความร้อน ตัวอย่าง ได้แก่ helveticin J และ caseicin 80

กลุ่มที่4 เป็นแบคเทอริโอซินที่มีความซับซ้อน ประกอบด้วยสารพวกโปรตีน ไขมัน และคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ plantaricin S และ lactocin 27

สำหรับแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อกลุ่มLactobacilli ส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มที่2 (Bogovic - Matijasic, *et al.*, 1998)

nisin เป็นแบคเทอริโอซินตัวแรกที่ผลิตจากกลุ่มแบคทีเรียแลกติก อาจจะอยู่ในรูปของ nisin A หรือ nisin Z ซึ่ง nisin A มีมวลโมเลกุลขนาด 3354 ดาลตัน ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่เชื่อมต่อกันเป็นสายเปปไทด์ทั้งหมด 34 ตัว ในจำนวนนี้มีกรดอะมิโนพิเศษที่ไม่พบในสายเปปไทด์โดยทั่วไปอยู่ด้วย ได้แก่ lanthionine 1 ตัว, β - methyllanthionine 4 ตัว, 2 - dehydroalanine 1 ตัว ส่วน nisin Z จะมีกรดอะมิโนต่างจาก nisin A เพียงตัวเดียว นั่นคือมี asparagine แทน histidine ในตำแหน่งที่ 27 (ภาพประกอบ 2) (Desmazeaud, M., 1996 ; De Vuyst and Vandamme, 1994b)



ภาพประกอบ 2 ลักษณะโครงสร้างของ Nisin A และ Nisin Z
(ที่มา : De Vuyst and Vandamme, 1994b)

ต่อมาการศึกษาเกี่ยวกับแบคเทอริโอซินได้พัฒนาขึ้นเรื่อยๆ สามารถพบแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากกลุ่มแบคทีเรียแลกติกจำนวนมาก โดยเฉพาะพวก Lactobacilli

Klaenhammer (1993) ได้รายงานแบคเทอริโอซิน ที่ผลิตโดย *Lactobacillus* sp. มีดังนี้ คือ lactocin B, acidophilocin A, acidocin 8912, gassericin A, lactaricin A, lactocin S, plantaricin B, plantaricin C, plantaricin T, reutericin 6, sakacin A และsakacin P และมีรายงานเพิ่มเติมอีกมากมาย ส่วนใหญ่แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus* spp.จะมีคุณสมบัติบางประการคล้ายกับแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากกลุ่มแบคทีเรียแลกติกโดยส่วนใหญ่ เป็นสารพวกโปรตีน ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่างๆ และ ทนความร้อน (ตาราง5)

ตาราง 5 คุณสมบัติบางประการของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก Lactobacilli

ชื่อแบคเทอริโอซิน	คุณสมบัติ	เอกสารอ้างอิง
lactocin B	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ100° ซ เป็นเวลา 20 นาที	Barefoot and Klaenhammer(1983)
sakacin A	เป็นสารพวกโปรตีน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100° ซ เป็นเวลา 20 นาที	Schillinger and Lucke (1989)
plantaricin 149	เป็นสารพวกโปรตีน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100° ซ เป็นเวลา 60นาที	Kato, *et al.* (1994)
plantaricin S	เป็นสารพวก glycolipoprotien ทนความร้อนที่อุณหภูมิ100° ซ เป็นเวลา 60 นาที	Jimenez - Diaz, *et al.* (1993)
plantaricin LC 74	เป็นสารพวกโปรตีน	Rekhif,*et al.* (1994)
plantaricin UG1	เป็นสารพวกโปรตีน ทนความร้อนสูง	Enan, *et al.* (1996)
pediocin AcH	เป็นสารพวกโปรตีน ทนความร้อน	Ennahar,*et al.* (1996)
sakacin P	เป็นสารพวกโปรตีน	Eijsink,*et al.* (1996)
lactocin A	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน	Contreras,*et al.* (1997)
fermencin B	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน, ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100° ซ เป็นเวลา 30 นาที	Yan and Lee (1997)
acidocin A , acidocin B	ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100° ซ เป็นเวลา 5 นาที	Bogovic - Matijasic, *et al.* (1998)

ที่มา : ดัดแปลงมาจาก De Vuyst and Vandamme (1994b)

สำหรับกลไกการออกฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *Lactobacillus* โดยส่วนใหญ่จะออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรีย ตัวอย่างแบคเทอริโอซินดังกล่าว ได้แก่ plantaricin 149 (Kato, *et al.*, 1994), plantaricin C (Gonzalez, *et al.*, 1994), plantaricin UG1 (Enan, *et al.*, 1996), acidocin A และ acidocin B (Bogovic - Matijasic, *et al.*, 1998) แต่อย่างไรก็ตามยังมีแบคเทอริโอซินส่วนน้อยที่ออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้แก่ plantaricin LC74 (Rekhif, *et al.*, 1994) ซึ่งการออกฤทธิ์จะจำเพาะในกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแกรมบวกประกอบด้วยชั้นของผนังเซลล์ (cell wall) ซึ่งมีเปปติโดไกล-แคน (peptidoglycan) เป็นส่วนประกอบหลักเชื่อมต่อกันด้วยพันธะเปปไทด์ลักษณะเป็นร่างแห ทำให้แบคเทอริโอซินเข้าไปสู่ชั้นเซลล์เมมเบรน (cytoplasmic membrane) ได้ง่าย ซึ่งในชั้นนี้จะประกอบด้วยสารพวกฟอสโฟไลปิด (phospholipid) ซึ่งฟอสโฟ-ไลปิด แบ่งออกเป็น 2 ส่วนคือ กรดไขมันและหมู่ฟอสเฟต โดยเฉพาะหมู่ฟอสเฟตจะส่งผล ให้บริเวณเมมเบรนมีประจุลบ ในขณะที่แบคเทอริโอซินโดยส่วนใหญ่พบว่ามีประจุเป็นบวก เมื่อเกิดการจับกันของประจุลบและประจุบวกโดย electrostatic attractions ทำให้ชั้นเมมเบรนเกิดการฉีกขาด ของเหลวต่างๆที่เป็นส่วนประกอบภายในเซลล์เมมเบรนจะไหลออกมาภายนอกเซลล์ ทำให้เซลล์ตาย (Delves - Broughton, 1990 ; Jack, *et al.*, 1995 ; Muriana, 1996)

จากการศึกษาการสร้างสารยับยั้งภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ Barefoot and Klaenhammer (1983) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* ภายใต้สภาวะที่มีการจำกัดผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ จะทำให้มีการผลิตสารยับยั้งบางชนิดขึ้นมา เรียกว่า lactocin B ซึ่งจะมีผลในการยับยั้ง *L. leichmannii*, *L. lactis*, *L. bulgaricus* และ *L. helveticus* สำหรับ Shillinger and Lucke (1989) ได้แยก *Lactobacillus* spp. จากเนื้อได้ทั้งหมด 221 สายพันธุ์นำมาทดสอบการยับยั้งภายใต้สภาวะดังกล่าวข้างต้น พบเชื้อทั้งหมด 22 สายพันธุ์ คือ *L. sake* 19 สายพันธุ์, *L. plantarum* 3 สายพันธุ์ และ *L. curvatus* 1 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ Lactobacilli กลุ่มอื่นๆได้

แต่เมื่อนำส่วนใส มาทำการทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar well diffusion assay ปรากฏว่ามีเชื้อ *L. sake* เพียง 6 สายพันธุ์ที่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรีย หลังจาก นั้นนำ *L. sake* เพียง 1 สายพันธุ์มาศึกษาการออกฤทธิ์ พบว่าสารที่หลั่งออกมาจะออกฤทธิ์ต่อต้านแบคทีเรียแลกติกและ *L. monocytogenes* ซึ่งสารดังกล่าวเป็นสารพวกโปรตีนมีขอบเขตการยับยั้งแคบและออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียให้ชื่อว่า sakacin A

Lewus and Montville (1992) ได้รายงานว่า plantaricin BN, bavaricin MN และ pediocin ที่ผลิตโดย *L. plantarum* BN, *L. bavaricus* MN และ *P. pentosaceus* 43200 ตามลำดับ เป็นแบคเทอริโอซินที่ออกฤทธิ์ทำลายแบคทีเรียได้แก่ *C. botulinum* และ *L. monocytogenes*

Jimenez - Diaz, *et al.* (1993) ได้ทำการแยก *L. plantarum* LPCO10 จากการหมักมะกอกเขียว พบว่าจะผลิตแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า plantaricin S ออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก

ในปี คศ. 1994 ได้มีการศึกษา พบว่า plantaricin LC74 ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LC74 จะมีขอบเขตการยับยั้งพวกมีโซไฟลิกแลกโตแบซิลไล ได้แก่ *L. plantarum*, *L. brevis* และ *L. buchneri* ในปีเดียวกันมีรายงานว่า *L. plantarum* LL441 สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่มีศักยภาพในการยับยั้งได้ดี ซึ่งประกอบด้วยสายเปปไทด์ขนาด 3.5 กิโลดาลตัน สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ เรียกชื่อแบคเทอริโอซินนี้ว่า plantaricin C (Rekhif, *et al.*, 1994 ; Gonzalez, *et al.*,1994).

Ennahar, *et al.* (1996) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียจาก munter cheese ได้ทั้งหมด 1920 สายพันธุ์ ซึ่งในจำนวนนี้มี *L. plantarum* WHE 92 ที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า pediocin AcH มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Lactobacillus, Enterococcus, Streptococcus* และ *Bacillus* ส่วน Thompson, *et al.* (1996) พบว่า *L. heveticus* สายพันธุ์ CNRZ 450 จะผลิตแบคเทอริโอซินที่คล้ายกับ helveticin J ซึ่งผลิตจาก *L. heveticus* NCFB 481 โดยแบคเทอริโอซินดังกล่าวจะออกฤทธิ์ยับยั้งพวก homofermentative lactobacilli

Yan and Lee (1997) รายงานว่า *L. fermentum* สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่เรียกว่า fermencinB ซึ่งจะออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. pentosus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus* และ *M. luteus*

Bogovic - Matijasic, *et al.* (1998) พบว่า *L. acidophilus* LF 221 จผลิตแบคเทอริโอซินอย่างน้อย 2 ชนิด ได้แก่ acidocin A และ acidocin B ซึ่งจะออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเน่าเสียได้แก่ *B. cereus*, *Clostridium sp.*, *Listeria innocua*, *S. aureus* และ *Streptococcus sp.*

6. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ Lactobacilli

ในการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ Lactobacilli ต้องอาศัยปัจจัยหลายๆอย่างที่แตกต่างกันออกไป แต่โดยส่วนใหญ่ที่มีการศึกษาพอจะสรุปได้ดังนี้คือ

6.1 pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

6.1.1 pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

Lewus and Montville (1992) รายงานว่า *L. plantarum* BN ผลิต plantaricin BN และ *L. bavaricus* จะผลิต bavaricin MN เมื่อ pH เริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.9และ6.5 ตามลำดับ ส่วน *L. plantarum* UG1 จะผลิต plantaricin UG1 ได้สูงสุดที่ pH 6.5 เช่นเดียวกับ bavaricin MN

6.1.2 pH สุดท้ายของอาหารเลี้ยงเชื้อ

รายงานส่วนใหญ่จะพบว่าการผลิตแบคเทอริโอซิน จะมีปริมาณสูงเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีสภาพเป็นกรด เช่นเดียวกับ Kelly, *et al.* (1996) กล่าวว่า plantaricin KW 30 จะผลิตได้สูงภายใต้สภาวะที่มีความเป็นกรดและมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียสูงสุดที่ระดับ pH 5 ถือได้ว่าเหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซินหลายชนิดได้แก่ acidocin J1229, lactocinS และ plantaricin 149 (Tahara and Kanatoni,1996, Mortvedt - Abildgaard, *et al.*,1995 and Kato, *et al.*,1994) แต่อย่างไรก็ตาม มีแบคทีเรียแลกติกจำนวนมากที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงในอาหารที่มีระดับ pH กว้าง เช่น plantaricin S และ T, pediocin AcH และ fermencin

B จะถูกผลิตได้สูงที่ระดับ pH ในช่วง 3 - 7, 4 - 6 และ3 - 8 ตามลำดับ (Jimenez - Diaz, *et al.*, 1993, Ennahar, *et al.*, 1996 and Yan and Lee, 1997)

6.2 ชนิดและส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการทดสอบชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิดได้แก่ M17 - glu, BHI (Brian Heart Infusion) และ MRS(de Man Rogosa and Sharp) มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *L. lactis*, *P. pentosaceus* พบว่าการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งได้สูงสุด (Spelhaug and Harlender, 1989) เช่นเดียวกับการทดลองของ Bogovic - Matijasic (1998) รายงานว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง MRS จะมีการผลิตแบคเทอริโอซินและกรดแลกติกได้สูงกว่าในอาหารแข็ง M17 อย่างไรก็ตามนอกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Yang and Ray (1994) ได้ทำการศึกษาอาหารชนิดอื่นๆที่มีส่วนประกอบอาหารที่ไม่ซับซ้อนในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก ทำให้ค้นพบว่า TGE (Trypticase Glucose Yeast Extract) เป็นอาหารที่ทำให้เชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงเช่นกัน

6.3 อุณหภูมิในการบ่มเชื้อ สำหรับการสร้างสารยับยั้งพวกแบคเทอริโอซิน พบว่าแบคทีเรียแต่ละตัวจะเจริญ และผลิตแบคเทอริโอซินที่อุณหภูมิในการบ่มที่แตกต่างกัน (ตาราง 6)

ตาราง 6 อุณหภูมิในการบ่มที่เหมาะสมของเชื้อ *Lactobacillus* ต่อการผลิตแบค-เทอริโอซินชนิดต่างๆ

ชนิดของแบคเทอริโอซิน	อุณหภูมิ(ซ)	เอกสารอ้างอิง
brevicin 286	20	Conventry, *et al.* (1996)
plantaricin UG1	25 - 30	Enan, *et al.* (1996)
plantaricin BN	15	Lewus and Montville (1992)
bravaricin	30	Lewus and Montville (1992)
lactocin S	30	Mortvedt - Abildgaard, *et al.* (1995)

ที่มา : ดัดแปลงจาก Klaenhammer, *et al.* (1993)

ทองคำ คิมหะมานนท์ (2538) พบจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักส้มฟักสามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารได้แก่ *L. maltaromicus*, *L. sake*, *L. alimentareus*, , *P. urinaceequi*, *P. dextrinicus*, *P. halophilus* และ *P. pentosaceus* ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้จะผลิตสารยับยั้งที่มีประสิทธิภาพดีเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37° ซ

6.4 ระยะการเจริญของเชื้อ

การผลิตสารยับยั้งจะสัมพันธ์กับการเจริญของเชื้อ (Yang and Ray, 1994) นั่นคือถ้าเชื้อมีการเจริญเพิ่มมากขึ้น การผลิตสารยับยั้งจะเพิ่มขึ้นด้วย จากการศึกษาของ Desai and Sheth (1997) เกี่ยวกับอัตราการผลิตกรดของเชื้อ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactococcus lactis* BM - 12, *P. pentocaceus* BM-13, *Lactobacillus brevis* BP -14, *L. plantarum* BM -15, *Leuconostoc mesenteroides* BM - 16 และ *L. mesenteroides* BM -17 โดยทำการเติมเชื้อลงไปในระหว่างขั้นตอนการทำผักดองร่วมกับโซเดียมคลอไรด์ ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 4 แคลเซียมคลอไรด์ความเข้นข้นร้อยละ 1 และน้ำตาลความเข้มข้นร้อยละ 1 พบว่าการผลิตกรดจะสูงสุดเมื่อบ่ม

ไว้ที่อุณหภูมิ 28 - 30° ซ เป็นเวลา 4 - 5 ชั่วโมง ส่วน Biswas, *et al.* (1991) พบว่า *Pediococcus acidilactici* H จะเจริญและเริ่มผลิตกรดได้ในอัตราสูงสุดเมื่อบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37° ซ ระหว่างเวลา 4 - 8 ชั่วโมง ส่วนpediocin AcH จะผลิตในช่วงเวลา 8 - 16 ชั่วโมง จะเห็นว่าการสร้างกรดจะเกิดขึ้นในช่วงต้นของการเจริญ แต่สร้างแบค-เทอริโอซินขึ้นมาหลังจากที่มีการผลิตกรดแล้ว จึงถือว่าเป็น secondary metabolite จากการศึกษาพบว่า Lactobacilli จะมีการผลิตแบคเทอริโอซินได้สูงสุดในระยะต่างกัน คือระยะ log ได้แก่ plantaricin S, plantaricin 149, brevicin 286 และ fermencin B (Jimenez - Diaz, *et al.*, 1993, Kato, *et al.*, 1994, Conventry, 1996, Yan and Lee, 1997), ระยะ late log จนถึง early stationary ได้แก่ plantaricin UG1 (Enan, *et al.*,1996), ระยะ stationary ได้แก่ plantaricin KW 30, plantaricin T (Kelly, *et al.*, 1996, Jimenez - Diaz, *et al.*, 1993)

7. การนำไปใช้ในอาหาร

มีการนำLactobacilliมาใช้ในอาหารเป็นเวลานานแล้ว โดยส่วนใหญ่ ถือได้ว่าเป็น biopreservatives ในอาหารซึ่งอาจจะนำมาใช้ในลักษณะเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารหมักต่างๆ (Degnan,*et al.*,1996) ตัวอย่างการใช้ *L. casei*, *L. plantarum* และ *Pediococcus* spp. มาใช้ในการทำผักสลัด เชื้อเหล่านี้จะมีผลในการยับยั้งเชื้อปนเปื้อนในผักสลัดได้ (Vescovo, *et al.*,1996)

การนำแบคทีเรียแลกติก 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. lactis* BM-12, *L. brevis* BM -14, *L. plantarum* BM -15, *P. pentocaceus* BM - 13, *L. mesenteroides* BM -16 และ *L. mesenteroides* BM -17 มาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการทำผักดอง พบว่าใช้เวลาในการหมัก 4 วัน และถ้าเติมกรดซอร์บิกลงไปร้อยละ 0.1 จะสามารถเก็บผักดองที่อุณหภูมิ 28 - 30° ซ เป็นเวลาถึง 2 เดือน (Desai and Sheth, 1997)

นอกจากจะใช้แบคทีเรียแลกติกในอาหารแล้ว ปัจจุบันมีความพยายามที่จะนำแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์มาใช้ในอาหารเพื่อทดแทนยาปฏิชีวนะต่างๆแต่ที่ได้รับการยอมรับและมีการนำมาใช้กันอย่างกว้างขวาง คือ nisin (Muriana, 1996) ซึ่งพบว่า nisin ไม่เหมือนยาปฏิชีวนะคือ เมื่อรับประทานเข้าไปในปริมาณมากจะไม่ทำให้เชื้อ

ดื้อยา และได้รับการยืนยันว่าปลอดภัยไม่เป็นพิษ (ไปรมา ยงมานิตชัย, 2531) สำหรับในอุตสาหกรรมอาหารจะมีการนำมาใช้ในพวกอาหารกระป๋อง เครื่องดื่ม นม แอลกอฮอล์ และการเก็บรักษาเนื้อ เป็นต้น (Delves - Broughton, 1990)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยก *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทยให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

2.ทดสอบการความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง

3. เทียบเคียงชนิดของ *Lactobacillus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง

4. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้

5.ศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้

6.ศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารโดย *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อจากอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกมาจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย โดยจะทำการคัดเลือกและเทียบเคียงชนิดของ *Lactobacillus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง นำมาหาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ ทดสอบคุณสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lactobacillus* spp. รวมทั้งศึกษาการยับยั้งการ

เจริญของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อจากอาหารโดย *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะ เลี้ยงร่วมกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. คัดเลือกสายพันธุ์ของ *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย ซึ่งอาศัยการหมักโดยเชื้อจากธรรมชาติ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารได้

2. เป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ในการผลิตอาหารหมักพื้นเมืองซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการป้องกันการติดเชื้อแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารแก่ผู้บริโภคได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วัสดุ

1. ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้แก่ กะปิ(กุ้ง) กะปิ(ปลา) กระเทียมดอง กุ้งส้ม ขนมจีน ไตปลา เต้าเจี้ยว บูดู ปลาจิ้งจั้งดอง ปลาแป้งแดง ปลาร้า ปลาส้ม ปูเค็ม ผักเสี้ยนดอง ส้มฟัก ไส้กรอกเปรี้ยว หนาง(เนื้อหมู) หนาง(เนื้อวัว) แหนม หน่อไม้ดอง และหอยดอง นำมาจากตลาดสด ร้านค้าทั่วไป และซุปเปอร์มาเก็ต ของอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา รวมทั้งจังหวัดใกล้เคียง จำนวน 81 ตัวอย่าง

2. แบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lactobacillus* จำนวน 15 สายพันธุ์ (ตาราง 7)

ตาราง 7 แบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งของสารยับยั้ง

ชื่อแบคทีเรีย	แหล่งที่มา
Bacillus cereus	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
Escherichia coli 1188	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
E. coli 1189	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์

ตาราง 7 (ต่อ)

ชื่อแบคทีเรีย	แหล่งที่มา
E. coli ATCC 25922	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
E. coli O157: H7	รศ.ดร. วราภรณ์ วุฒฑะกุลและคณะ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
E. coli R43	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
Salmonella anatum E1	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
S. enteritidis	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
S. enteritidis 3259	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
S. enteritidis 3294	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
S. typhi 3299	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
S. typhimurium 3292	หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
Staphylococcus aureus ATCC 25923	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์
S. aureus ATCC 29213	ศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์ จังหวัด สงขลา
Vibrio parahaemolyticus 166	ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์

3.อาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา(ดูรายละเอียดในภาคผนวก ก)

APT Agar (All Purpose Tween) บริษัท Difco

BHI medium (Brain Heart Infusion) บริษัท Difco

CJA (Coconut Juice Agar) เตรียมโดยอ้างอิงจากสูตรของสายชลและนภา(2517)

EMB Agar (Eosin Methylene Blue Agar) บริษัท Difco

MRS medium (de Man Rogosa and Sharp) บริษัท Difco

MSA (Mannitol Salt Agar) บริษัท Difco

NA (Nutrient Agar) บริษัท Difco

SS Agar (Salmonella-Shigella Agar) บริษัท Difco

TJA (Tomato Juice Agar) บริษัท Difco

TSA - Polymyxin B (Trypticase Soy - Polymyxin B Agar) บริษัท Difco

4. สารเคมี

4.1 สีย้อมแกรม ประกอบด้วย crystal violet, gram iodine, 95 % alcohol และ safranin

4.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 3

4.3 สารคาร์โบไฮเดรต ได้แก่ amygdalin, arabinose, cellobiose, Esculin, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannitol, mannose, raffinose, Rhamnose, ribose, salicin, sorbitol, sucrose และ trehalose

4.4 โซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

4.5 กรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1 นอร์มัล

4.6 โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์

5. เอนไซม์

5.1 α-amylase จากบริษัท Sigma

5.2 catalase จากบริษัท Sigma

5.3 ∝- chymotrypsin จากบริษัท Sigma

5.4 pepsin จากบริษัท Sigma

5.5 protease จากบริษัท Sigma

5.6 trypsin จากบริษัท Sigma

อุปกรณ์

1. กระดาษกรอง (Membrane Filter) ขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร
2. กระบอกฉีดยา (Syringe)
3. กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus
4. เข็มและห่วงเขี่ยเชื้อ (Needles and Loops)
5. เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา
6. เครื่องกรองเชื้อ (Millipore Filter), Millipore Coorperation,U.S.A.
7. เครื่องเขย่า (Vortex Mixer), Scientific Industries, Inc. Bohemia, N.Y., 11716, U.S.A.
8. เครื่องชั่ง(Electronic Balance), Sartorius, Germany
9. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer)
10. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV -1201 V, Shimadzu, Japan
11. เครื่องหมุนเหวี่ยง(Centrifuge), Hermle Z200 A, S.V. Medico co.,LTD.
12. เครื่องหมุนเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิ, Sarvall RC 5C
13. ตู้บ่มเชื้อ (Incubators),Heraeus GmbH, Germany
14. ตู้ปลอดเชื้อ (Larminar Air Flow Carbinet), International Scientific Supply Co., Ltd, Thailand
15. ตู้เย็น ยี่ห้อ Sanyo,Thailand
16. ตู้อบอากาศร้อน (Hot Air Oven),Heraeus GmbH, Germany

17. เตาแม่เหล็ก (Hot Plate),Thermolyne Barnstead Thermolyn Cooperation, U.S.A.

18. ปากคีบ (Forceps)

19. ไมโครปิเปต ขนาด 1-10, 10-100และ100-1000

20. หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ(Autoclave), Tomy Seiko Co. Ltd, Japan

21. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water Bath), Eyela Tokla Rikakikai Co. Ltd, Japan

22. Cork borer, Trade Mark, Japan

23. Vernier caliper

วิธีการ

ประกอบด้วย 6 ขั้นตอนหลัก คือ

1. การแยก *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทยให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์
2. ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร และคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง
3. เทียบเคียงชนิดของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้
4. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้
5. ศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้
6. ศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารโดย*Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน

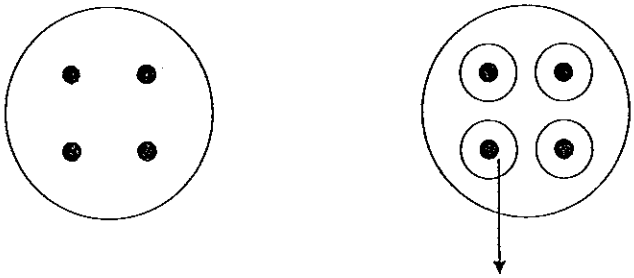
1. การแยก *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย

เก็บตัวอย่างอาหารหมักดองของไทย ได้แก่ กะปิ (กุ้ง) กะปิ (ปลา) กระเทียมดอง กุ้งส้ม ขนมจีน ไตปลา เต้าเจี้ยว บูดู ปลาจิ้งจั้งดอง ปลาแป้งแดง ปลาร้า ปลาส้ม ปูเค็ม ผักเสี้ยนดอง ส้มฟัก ไส้กรอกเปรี้ยว หนาง(เนื้อหมู) หนาง (เนื้อวัว) แหนม หน่อไม้ดองและหอยดอง จากตลาดสด ร้านค้าทั่วไป และ ซุปเปอร์มาเก็ต ของอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา รวมทั้งจังหวัดใกล้เคียง จำนวน 81 ตัวอย่าง นำตัวอย่างมาแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. โดยวิธีการ streak บน อาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แยกโคโลนี เดี่ยวๆ streak ใหม่อีกครั้งในอาหารแข็ง MRS บ่มในสภาวะเดียวกัน นำโคโลนี เดี่ยวๆที่ได้มาย้อมสีแกรม เชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่บริสุทธิ์จะติดสีแกรมบวกรูป ร่างเป็นแท่ง เมื่อทดสอบคะตะเลสจะให้ผลเป็นลบ นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่บริสุทธิ์เก็บในหลอดอาหารแข็ง MRS โดยวิธีการ stab เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ4 ซ ถ่ายเชื้อทุกๆ สัปดาห์

2. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร และคัดเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง

นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นเมืองทั้งหมด มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารด้วยวิธี agar spot (ดัดแปลงจาก Spelhaug and Harlender,1989) โดยนำ *Lactobacillus* spp. มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็น เวลา 24 ชั่วโมง ดูดเชื้อมา 5 ไมโครลิตร (มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) หยดลงบนอาหารแข็ง MRS โดยในแต่ละ plate หยด 4 เชื้อ แต่ละเชื้อให้ห่างกันประมาณ 3 เซนติเมตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็น เวลา 24 ชั่วโมง นำอาหารกึ่งแข็งBHI ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ผสมกับแบคทีเรียก่อโรค ติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานทั้งหมด 12 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* 1188, *E. coli* 1189, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* R43, *S.*

anatum E1, *S. enteritidis* 3294, *S. enteritidis* 3259, *S. typhi* 3299, *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium* 3292 และ *V. parahaemolyticus* 166 (มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^5 -10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ผสมให้เข้ากันดีเท ทับผิวหน้าให้กระจายทั่ว plate ทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง อ่านผลการยับยั้งโดยวัดขนาดของขอบวงใส (annular zone) ด้วย vernier caliper (ภาพประกอบ 3) คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งสูงไว้ศึกษาต่อไป



ลักษณะของขอบวงใส (annular zone)

ภาพประกอบ 3 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้ด้วยวิธี agar spot

3. เทียบเคียงชนิดของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้

นำ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้มาศึกษาลักษณะต่างๆ เพื่อเทียบเคียงชนิดตาม Klandler and Weiss,1986 ดังนี้คือ

3.1ลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแกรม เพื่อดูการติดสีแกรมและรูปร่าง

ก. นำเชื้อจากอาหารหมักที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆบนอาหารแข็ง MRS มา smear ลงบนแผ่นสไลด์ที่หยดน้ำเกลือลงไป 1 หยด ใช้ loop เขี่ยเชื้อให้แผ่เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ โดยวนไปในทางเดียวกัน ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ นำไปผ่านเปลวไฟ 4 - 5 ครั้ง ตั้งไว้ให้เย็น

ข. นำมาย้อมสีแกรมโดยหยด crystal violet ให้ท่วมรอย smear 30 วินาที แล้วล้างน้ำ เทน้ำออกให้หมด หยด gram iodine 30 วินาที ล้างน้ำ หยด 95%

alcohol โดยเอียงสไลด์ไปมาประมาณ 5 - 10 วินาที ล้างน้ำ หยดsafranin 15 นาที ล้างน้ำ ซับให้แห้งก่อนดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

3.2.1 ศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 ลงบนสไลด์ 1 หยด แล้วเขี่ยเชื้อ จากอาหารหมักที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวๆบนอาหารแข็ง MRS ลงไป 1 loop อ่านผลทันที ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลคะตะเลสเป็นบวก และไม่มีฟองอากาศจะให้ผลคะตะเลสเป็นลบ

3.2.2 ทดสอบการเจริญของแบคทีเรียแลกติกโดยแบ่งเป็น 3 กลุ่มตามความสามารถในการเฟอร์เมนต์น้ำตาล hexose และ pentose (Klandler and Weiss, 1986) เริ่มจากการเขี่ยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่ผ่านการ subculture 2 ครั้งลงในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสและอาหารเหลวMRS ที่มีน้ำตาลไรโบสเป็นส่วนประกอบ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ35° ซ เป็นเวลา24 ชั่วโมง สังเกตการเฟอร์เมนต์น้ำตาลโดยดูจากการเปลี่ยนสีของ bromcresol purple blue จากสีม่วงเป็นสีเหลืองและการเกิดฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ นำไปบันทึกผลโดยการแบ่งเชื้อ *Lactobacillus* spp. ออกเป็น 3 กลุ่มหลักคือ

ก. Obligately homofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาล hexose ได้แต่ไม่เฟอร์เมนต์น้ำตาล pentose ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ข. Facultative heterofermentative lactobacilli เชื้อในกลุ่มนี้สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose ได้ ไม่เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

ค. Obligately heterofermentative lactobacilli เชื้อในกลุ่มนี้สามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาล hexose และน้ำตาล pentose ได้ เกิดก๊าซในหลอดดักก๊าซ

3.2.3 การเติบโตที่อุณหภูมิ15° ซ และ45° ซโดยนำเชื้อ *Lactobacillus* spp. มา subculture 2 ครั้ง ก่อนที่จะนำมาเขี่ยลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม

bromcresol purple blue นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 ซและ45° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของ bromcresol purple blue จากสีม่วงเป็นสีเหลือง

3.2.4 ทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต

โดยคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ทั้งหมด 16 ชนิดได้แก่ amygdalin, arabinose, cellobiose, esculin, fructose, galactose, glucose, lactose, maltose, mannitol, mannose, raffinose, rhamnose, ribose, salicin, sorbitol, sucrose และ trehalose นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่ทำการ subculture 2 ครั้ง เติมลงไปในอาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตดังกล่าวข้างต้นจำนวน 1 loop บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการใช้คาร์โบไฮเดรตโดยการเปลี่ยนสีของ bromcresol purple blue ในอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

4. ศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้

4.1 ระยะเวลาที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้มา subculture 2 ครั้งในอาหารเหลว MRS ทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar spot (ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 2)โดยนำ *Lactobacillus* spp. มาหยดลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็น เวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง เททับผิวหน้าด้วยอาหารกึ่งแข็ง BHI ที่ผสมกับแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร ได้แก่ *E. coli* 1189 (ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบการยับยั้งโดยสังเกตจากขนาดของขอบวงใสที่เกิดขึ้น ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ประกอบด้วยชุดการทดลอง 4 ชุดการทดลอง ทดสอบการยับยั้งโดยการวัดขนาดของขอบวงใสที่ระยะเวลาต่างๆ จำนวน 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยใช้ LSD (Least Significant Difference) (อภิญญา วงศ์กิดาการ, 2531)

4.2 ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

โดยใช้อาหารแข็ง 5 ชนิดคือ APT BHI CJA MRS และ TJA นำมาทดสอบด้วยวิธี agar spot (ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 2) สำหรับแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารที่ใช้ ได้แก่ *E. coli* 1189 (ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบการยับยั้งจากขนาดของขอบวงใสที่เกิดขึ้น ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ประกอบด้วยชุดการทดลอง 5 ชุดการทดลอง ทดสอบการยับยั้งโดยการวัดขนาดของขอบวงใสในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจำนวน 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA)และเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยใช้ LSD (Least Significant Difference) (อภิญญา วงศ์กิดาการ, 2531)

4.3 อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ

ทดสอบตามวิธี agar spot (ดังรายละเอียดที่กล่าวไว้ในข้อ 2)โดยเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. บนอาหารแข็ง MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 30 35 40° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เททับผิวหน้าด้วยอาหารกึ่งแข็ง BHI ที่เติมแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร ได้แก่ *E. coli* 1189 (ความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) เปรียบเทียบการยับยั้งจากขนาดของขอบวงใสที่เกิดขึ้น ทำการวิเคราะห์ทางสถิติโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design,CRD) ประกอบด้วยชุดการทดลอง 4 ชุดการทดลอง ทดสอบการยับยั้งโดยการวัดขนาดของขอบวงใสที่อุณหภูมิต่างๆ จำนวน 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยใช้ LSD (Least Significant Difference) (อภิญญา วงศ์กิดาการ, 2531)

5. ศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างจาก*Lactobacillus* spp.ที่คัดเลือกได้

5.1 ทดสอบการสร้างสารยับยั้งบนอาหารแข็งในสภาพจำกัดผลจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ไซด์

ใช้วิธี agar spot ตามวิธีของ Fleming, *et al.* (1985 quoted in Shillinger and Lucke,1989) โดยการนำเชื้อ *Lactobacillus* spp.มาหยดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีการลดน้ำตาลกลูโคสจากเดิม ร้อยละ 2 เหลือร้อยละ 0.2 เพื่อลดการสร้างกรดอินทรีย์ บ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงในสภาวะไร้ออกซิเจนเพื่อจำกัดการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เททับผิวหน้าด้วยอาหารกึ่งแข็ง BHI ปริมาตร 7 มิลลิลิตร ที่เติมแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* 1189 และ *S. enteritidis* (มีความเข้มข้นสุดท้ายประมาณ 10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร) ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ในสภาวะไร้ 0_2 เช่นเดียวกัน อ่านผลการยับยั้งโดยวัดขนาดของขอบวงใส คัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งสูงสำหรับทดสอบในขั้นตอนต่อไป

5.2 ทดสอบการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว

นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดได้จากข้อ 1 มาทดสอบการยับยั้งอีกครั้งโดยการวัดการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารซึ่งดัดแปลงจากวิธีของ Ibrahim and Berkorovainy (1992) โดยการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* spp. ในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนำมาปั่นแยกที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) ปรับ pH กับ 1 N NaOH ให้ได้ pH 6.5 แล้วกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งโดยใช้อาหารเหลว MRS เป็นชุดควบคุม สำหรับชุดทดสอบ จะใช้ส่วนใสรวมกับอาหารเหลว MRS ในอัตราส่วน 1:1 แล้วเติมแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* 1189 และ *S. aureus* ATCC 29213 (มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^5เซลล์ต่อมิลลิลิตร) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร โดยการวัด

ค่าความสามารถ ในการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 610 นาโนเมตร ถ้าได้ค่า OD มากกว่า 0.5 ต้องมีการเจือจางก่อนนำมาวัด เพื่อดูความสามารถในการยับยั้งต่อแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร นำค่าที่ได้มาหาร้อยละของการยับยั้งจากสูตร

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(OD_{(610nm)} \text{ in control}) - (OD_{(610nm)} \text{ in test}) \times 100}{OD_{(610nm)} \text{ in control}}$$

5.3 ความไวต่อความร้อน

นำเชื้อที่คัดเลือกได้จากขั้นตอนที่ 5 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาปั่นแยกที่ความเร็ว 5000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เอาเฉพาะส่วนใสมาระเหยน้ำออกโดยใช้เครื่อง lyophilize ทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า แล้วกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสดังกล่าวมาทดลองโดยให้ส่วนใสที่ไม่ได้ให้ความร้อนเป็นชุดควบคุม ส่วนชุดทดสอบจะนำส่วนใสมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63° ซ เป็นเวลา 30 นาที, 100° ซ เป็นเวลา 10 20 30 นาที และ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที ทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar well diffusion assay (ดัดแปลงจากวิธีของ Sarkar and Banerjee, 1996) ซึ่งมีวิธีการดังนี้ นำแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร ได้แก่ *E. coli* 1189 และ *S. aureus* ATCC 29213 เติมลงในอาหารกึ่งแข็ง BHI แล้วเททับบนผิวหน้าอาหาร MRS ตั้งทิ้งไว้ให้แข็ง ทำการเจาะหลุมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 4 มิลลิลิตร หยดส่วนใสที่ต้องการทดสอบลงไปปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 4 - 6 ชั่วโมง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา18 - 24 ชั่วโมง วัดขนาดของขอบวงใสเพื่อดูความสามารถในการยับยั้ง เปรียบเทียบผลระหว่างการทดสอบที่ระดับความร้อนต่างๆกันกับชุดควบคุม การวิเคราะห์ทางสถิติโดยการวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design, CRD) ประกอบด้วยชุดการทดลอง 6 ชุดการทดลอง ทดสอบการยับยั้งโดยการวัดขนาดของขอบวง

ใสที่ระดับความร้อนต่างๆ จำนวน 3 ซ้ำ ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบชุดการทดลองโดยใช้ LSD (Least Significant Difference) (อภิญญา วงศ์กิดาการ, 2531)

5.4 ความไวต่อเอนไซม์

นำส่วนใสของ *Lactobacillus* spp. (เตรียมเช่นเดียวกับที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 5.3) เติมเอนไซม์ต่างๆได้แก่ catalase, α - chymotrypsin, pepsin, protease และtrypsin ที่มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (โดยทำการละลายในโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ ปรับ pH ให้ได้ 7.0 สารละลายเอนไซม์ดังกล่าวจะกรองผ่านแผ่นกรองขนาดรู 0.45 ไมโครเมตร แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) (Carminati, *et al.*,1988) นำมาทดสอบการยับยั้งโดยมีชุดควบคุม 2 ชุดคือ โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์และส่วนใสที่ไม่ได้ทดสอบกับเอนไซม์ และชุดทดสอบ คือส่วนใสที่ผ่านการทดสอบกับเอนไซม์มาแล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* 1189 โดยวิธี agar well diffusion assay (ดังรายละเอียดในหัวข้อ5.3) วัดขนาดของขอบวงใสเพื่อดูความสามารถในการยับยั้ง เปรียบเทียบกันระหว่างการทดสอบกับเอนไซม์ชนิดต่างๆกับชุดควบคุม

6. ศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน (Gonzalez, *et al.*,1993)

นำเชื้อ *Lactobacillus* spp. และแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* 1189, *E. coli* 0157:H7, *S. enteritidis* 3294, *S typhi* 3299 และ*S. aureus* ATCC 29213 ที่มีการ subculture 2 ครั้งในอาหารเหลว MRS จากนั้นเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยปรับความเข้มข้นของ *Lactobacillus* spp.ให้มีจำนวนเชื้อ 10^7 CFUต่อมิลลิลิตร และแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร มีจำนวน 10^4 CFUต่อมิลลิลิตร ด้วยอาหารเหลว MRS นำเชื้อทั้ง 2 กลุ่มๆละ 2 มิลลิลิตรมาเลี้ยงร่วมกัน ส่วนชุดควบคุมเติมเฉพาะแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร นำไปบ่มใน

water bath ที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร ด้วยวิธี spread plate ความเจือจางละ 2 ซ้ำ โดยใช้อาหารที่มีความจำเพาะต่อเชื้อแต่ละชนิด ดังนี้ *S. aureus* ATCC 29213 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MSA, *E. coli* 1189 กับ *E. coli* 0157:H7 ใช้ EMB, *S. enteritidis* 3294 กับ *S. typhi* 3299 ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ SS agar และ *B. cereus* ใช้ TSA - Polymyxin B นำมาหาร้อยละของการยับยั้งโดยใช้สูตร

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

บทที่ 3

ผลและวิจารณ์

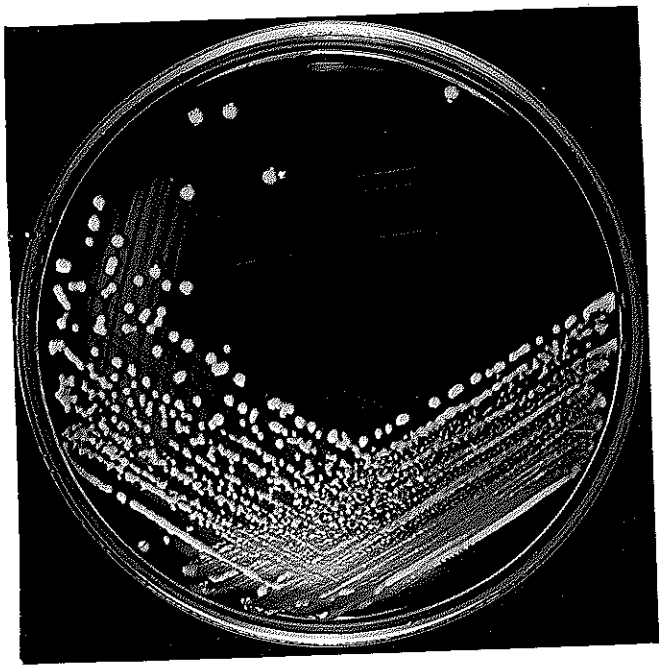
1. การแยก *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย

จากการนำอาหารหมักพื้นเมืองของไทย ได้แก่ กะปิ(กุ้ง) กะปิ(ปลา) กระเทียมดอง กุ้งส้ม ขนมจีน ไตปลา เต้าเจี้ยว บูดู ปลาจิ้งจั้งดอง ปลาแป้งแดง ปลาร้า ปลาส้ม ปูเค็ม ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ส้มฟัก ไส้กรอกเปรี้ยว หนาง (เนื้อหมู) หนาง(เนื้อวัว) แหนม หน่อไม้ดองและหอยดอง จากตลาดสด ร้านค้าทั่วไป และซุปเปอร์มาเก็ต ของอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลารวมทั้งจังหวัดใกล้เคียง มาทำการแยก *Lactobacillus* spp. โดยการ streak อาหารหมักลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS พบว่าสามารถแยกโคโลนีเดี่ยวๆได้แตกต่างกัน เช่นโคโลนีใหญ่ สีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ (ภาพประกอบ 4A) โคโลนีเล็ก สีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ (ภาพประกอบ 4B) โคโลนีเล็ก สีเทา ขอบเรียบ (ภาพประกอบ 4C) และโคโลนีเล็ก สีเทา ขอบหยัก (ภาพประกอบ 4D) เมื่อย้อมสีแกรมจะติดสีแกรมบวกลักษณะรูปร่างเป็นแท่ง อาจเป็นแท่งสั้นหรือแท่งยาว เรียงตัวแบบเซลล์เดี่ยวๆหรือต่อกันเป็นโซ่ (ภาพประกอบ5) ทดสอบคะตะเลสจะให้ผลเป็นลบ

จากตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาแยกทั้งหมด 81 ตัวอย่าง พบว่ามีตัวอย่างที่สามารถแยก *Lactobacillus* spp. ได้ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 65.43 และจำนวนเชื้อที่แยกได้ 88 สายพันธุ์ สำหรับอาหารหมักที่สามารถแยก *Lactobacillus* spp.ได้ ได้แก่ กระเทียมดอง กุ้งส้ม ขนมจีน ไตปลา เต้าเจี้ยว บูดู ปลาจิ้งจั้งดอง ปลาแป้งแดง ปลาส้ม ปลาร้า ปูเค็ม ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ส้มฟัก ไส้กรอกเปรี้ยว หนาง(เนื้อหมู) หนาง(เนื้อวัว) แหนม และหน่อไม้ดอง อย่างไรก็ตามมีอาหารหมักบางชนิดไม่พบเชื้อ *Lactobacillus* spp. ได้แก่ กะปิ(กุ้ง) กะปิ(ปลา) และหอยดอง (ตาราง8) จากการสำรวจกะปิที่ผลิตในประเทศไทยของ สิริพร สุธนเสาวภาคย์ (2535) ได้ทำการวิเคราะห์คุณค่าทางอาหารของกะปิ จากกะปิทั้งหมด 31 ตัวอย่าง พบว่า

ส่วนใหญ่กะปิจะมีปริมาณเกลือโดยเฉลี่ยร้อยละ 21.5 ในขณะที่ Desai and Sheth (1997) กล่าวไว้ว่า *L. plantarum* จะเจริญได้เมื่อความเข้มข้นของเกลือสูงสุดเป็นร้อยละ 6 เช่นเดียวกับการศึกษาหาร้อยละของเกลือในอาหารหมักของไทย ส่วนใหญ่พบว่าอยู่ในช่วง 1.5 - 4.1 สามารถแยกเชื้อ Lactobacilli ได้ (ศิรินาถ หนูเอก, 2540) แสดงว่าในกะปิมีความเข้มข้นของเกลือสูง จึงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Lactobacilli ทำให้ไม่สามารถตรวจพบเชื้อดังกล่าวได้ ส่วนในหอยดอง มีความเข้มข้นของเกลือสูงไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ Lactobacilli เช่นเดียวกัน (ข้อมูลไม่ได้ตีพิมพ์)

เมื่อนำอาหารหมักทั้งหมดมาจัดกลุ่มตามรูปแบบการจัดกลุ่มของ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) สามารถแยกออกได้เป็น 2 กลุ่มคือ อาหารหมักประเภทเนื้อและอาหารหมักประเภทพืช (ตาราง9) โดยสามารถแยกเป็นอาหารหมักประเภทเนื้อได้ 62 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ได้ 42 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 67.74 ของอาหารหมักประเภทเนื้อทั้งหมด จำนวนเชื้อที่แยกได้ 69 สายพันธุ์ ส่วนอาหารหมักประเภทพืชมีทั้งหมด 19 ตัวอย่าง มีตัวอย่างที่สามารถแยก *Lactobacillus* spp. ได้ 11 ตัวอย่างคิดเป็นร้อยละ 57.89 ของอาหารหมักประเภทพืชทั้งหมดจำนวนเชื้อที่แยกได้19สายพันธุ์ ถ้าเปรียบเทียบระหว่างอาหารหมักประเภทเนื้อและพืช พบว่าอาหารหมักประเภทเนื้อจะสามารถพบ*Lactobacillus* spp.ได้สูงกว่า ซึ่งศิรินาถ หนูเอก (2540) ได้แยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมัก 14 ชนิดพบเชื้อทั้งหมด 86 สายพันธุ์แยกมาจากอาหารหมักประเภทพืช 14 สายพันธุ์ และอาหารหมักประเภทเนื้อ 72 สายพันธุ์ ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากในอาหารหมักประเภทเนื้อมีสารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *Lactobacillus* มากกว่าในอาหารหมักประเภทพืช วิเชียร ลีลาวัชรมาศ (2534) กล่าวว่าเนื้อมีคุณสมบัติทางอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ เช่น มี pH และส่วนประกอบของ ธาตุอาหารต่างๆทำให้ *Lactobacillus* สามารถเจริญได้ดี



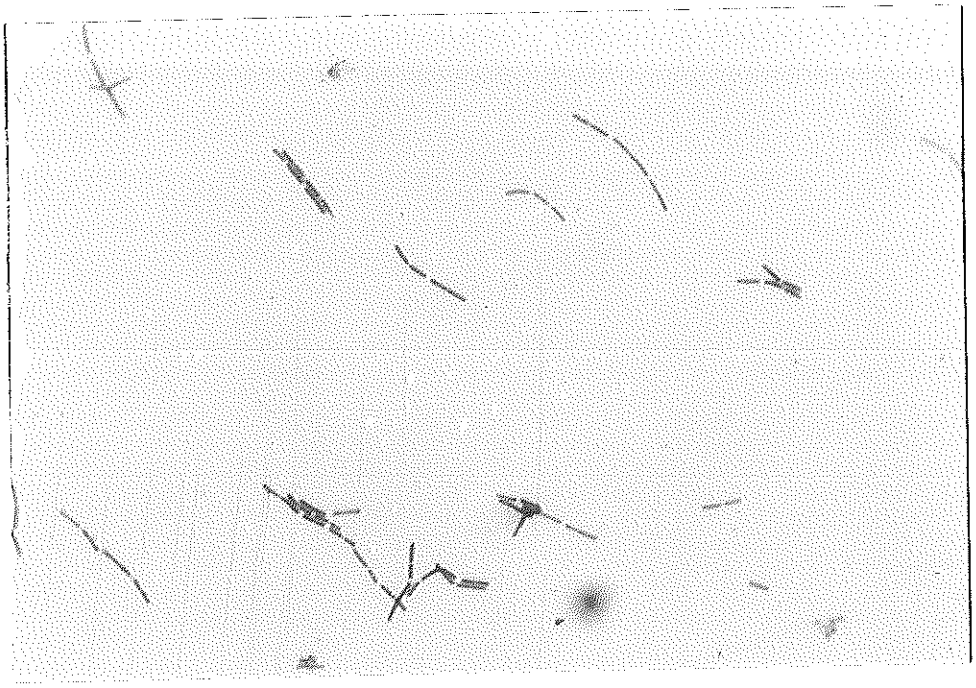
A โคโลนีใหญ่ สีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ

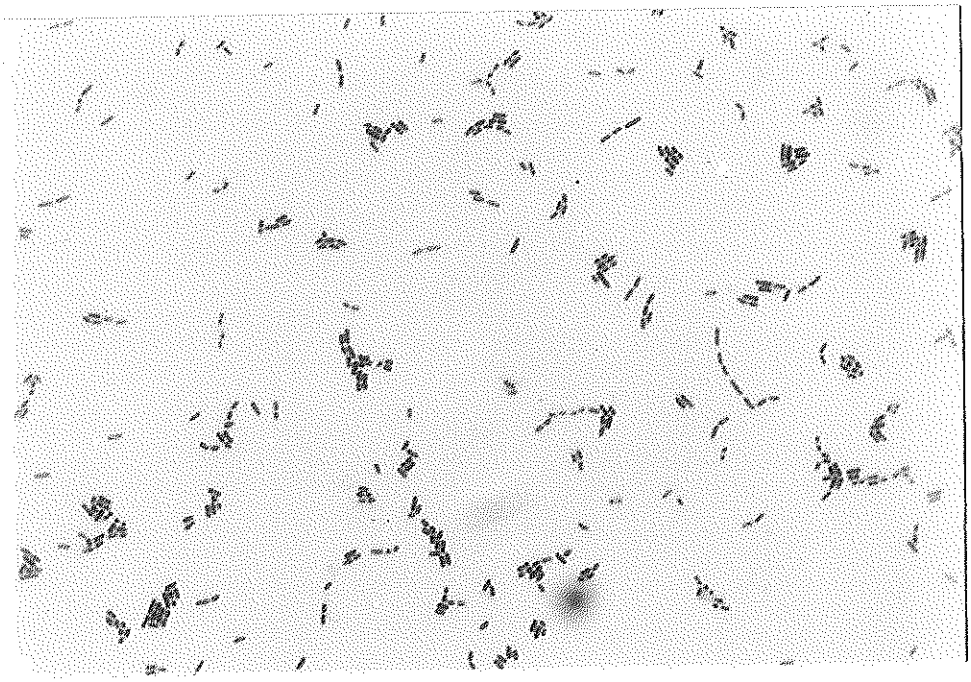
B โคโลนีเล็ก สีเหลืองอ่อน ขอบเรียบ

C โคโลนีเล็ก สีเทา ขอบเรียบ

D โคโลนีเล็ก สีเทา ขอบหยัก

ภาพประกอบ4 ลักษณะโคโลนีแบบต่างๆของ *Lactobacillus* spp.ที่แยกได้จากอาหารหมักบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS





ภาพประกอบ5 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อ *Lactobacillus* spp.

ตาราง8 ผลการแยก *Lactobacillus* spp. จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย

ชื่ออาหารหมัก	จำนวนตัวอย่างที่ใช้ในการแยกเชื้อ	ตัวอย่างที่พบเชื้อ	ร้อยละของตัวอย่างที่พบเชื้อ	จำนวนสายพันธุ์ที่พบทั้งหมด
กะปิ(กุ้ง)	2	0	0	0
กะปิ(ปลา)	1	0	0	0
กระเทียมดอง	6	2	33.33	2
กุ้งส้ม	5	4	80	4
ขนมจีน	1	1	100	3
ไตปลา	9	3	33.33	4
เต้าเจี้ยว	1	1	100	2
บูดู	2	1	50	1
ปลาจิ้งจั้งดอง	7	6	85.71	11
ปลาแป้งแดง	5	2	40	3
ปลาส้ม	1	1	100	1
ปลาร้า	6	4	66.66	6
ปูเค็ม	3	1	33.33	1
ผักกาดดอง	4	2	50	2
ผักเสี้ยนดอง	4	4	100	9
ส้มฟัก	2	2	100	3
ไส้กรอกเปรี้ยว	2	2	100	3
หนาง(เนื้อหมู)	1	1	100	2
หนาง(เนื้อวัว)	1	1	100	2
แหนม	14	14	100	28
หน่อไม้ดอง	3	1	33.33	1
หอยดอง	1	0	0	0
รวม	81	53	65.43	88

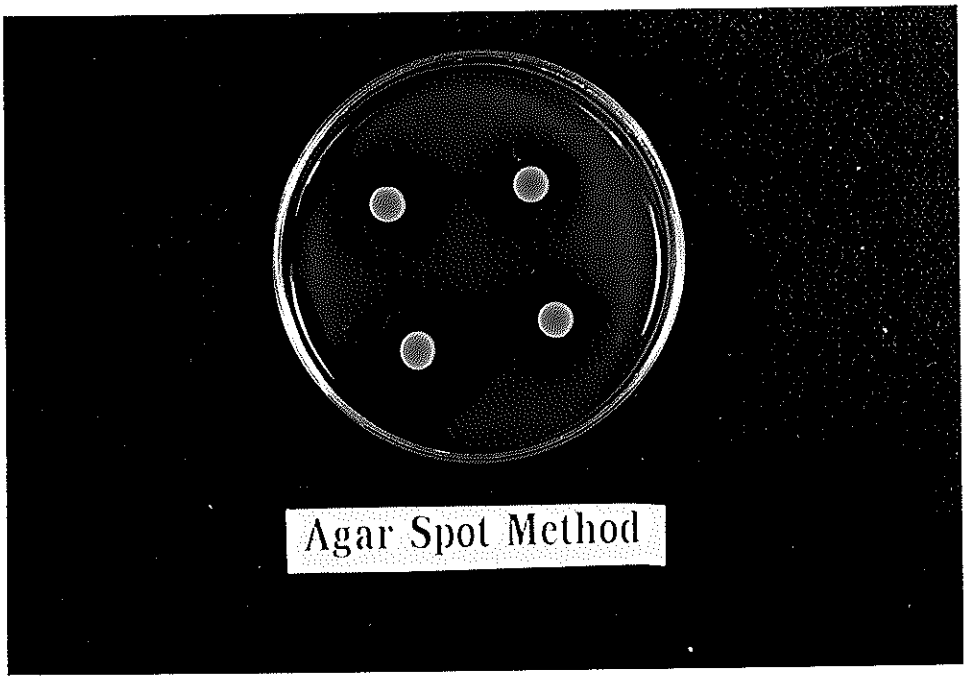
ตาราง9 การจัดกลุ่มอาหารหมักประเภทเนื้อและพืชรวมทั้งจำนวน *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักแต่ละประเภท

ประเภทอาหารหมัก	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่างที่แยกเชื้อได้	จำนวนสายพันธุ์ที่แยกได้ทั้งหมด
อาหารหมักประเภทเนื้อ			
กะปิ(กุ้ง) กะปิ(ปลา) กุ้งส้ม ไตปลา บูดู ปลาจิ้งจั้งดอง ปลาแป้งแดง ปลาร้า ปลาส้ม ปูเค็ม ส้มฟัก ไส้กรอกเปรี้ยว หนาง(เนื้อ-หมู) หนาง(เนื้อวัว) แหนม หอยดอง	62	42	69
อาหารหมักประเภทพืช			
กระเทียมดอง ขนมจีน เต้าเจี้ยว ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง	19	11	19

2. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร และคัดเลือกเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง

Lactobacillus spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักทั้งหมด 88 สายพันธุ์ นำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งต่อแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน12 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* 1188, *E. coli* 1189, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* R43, *S. anatum* E1,*S. enteritidis* 3259, *S. enteritidis* 3294, *S. typhi* 3299,*S. typhimurium* 3292, *S. aureus* ATCC 25923 และ *V. parahaemolyticus* 166 โดยใช้วิธี agar spot (ภาพประกอบ6) พบว่า *Lactobacillus* spp. ทุกๆสายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานได้ แต่ผู้วิจัยคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูงโดยพิจารณาจากสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานตั้งแต่ 7 ชนิดขึ้นไป และมีขนาดของขอบวงใสมากกว่าหรือเท่ากับ 15 มิลลิเมตร ได้ 16 สายพันธุ์ ซึ่งจะพบในอาหารหมักพวกแหนม 9 สายพันธุ์ (A25b, A27a, A27b, A29a, A30b, A55, A56c, A60c, A61a) ปลาจิ้งจั้งดอง 5 สายพันธุ์ (A44, A52b, A52c, A53a, A53b) ไส้กรอกเปรี้ยว 1 สายพันธุ์ (A49a) และไตปลา 1 สายพันธุ์ (A59) (ตาราง10) โดยสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานได้มากที่สุดคือ A44 แยกได้จากปลาจิ้งจั้งดอง สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานโดยมีขนาดของขอบวงใสมากกว่าหรือเท่ากับ 15 มิลลิเมตร ได้ 11 สายพันธุ์ (ตาราง11) นอกจากนี้เชื้อ *Lactobacillus* spp. สายพันธุ์อื่นๆก็เช่นเดียวกันจะมีขอบเขตในการยับยั้งกว้างโดยสามารถยับยั้งได้ทั้งในกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบได้ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของ Spelhaug and Harlender (1989) ที่พบว่า *L. lactis* subsp. *lactis*11454, *P. pentosaceus* FBB61 และ *P. pentosaceus* FBB63 - DG2 สามารถยับยั้ง แบคทีเรียก่อโรคติดต่อจากอาหารทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น *B. cereus*, *C. perfringens*, *E. coli* O157:H7, *S. aureus* และ *V. cholerae* 851 เป็นต้น และ Gupta, *et al.* (1996)

ซึ่งพบว่า *L. acidophilus* -301 จะ ออกฤทธิ์ยับยั้ง *S. typhi*, *E. coli*, *P. vulgaris*, *Y. enterocolitica* และ *S. aureus* ทั้งนี้เนื่องจากการทดสอบการยับยั้งในขั้นตอนนี้เอื้ออำนวยต่อการสร้างสารยับยั้งทุกประเภทเช่น กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อะซิทัลดีไฮด์ ไดอะซิทิล คาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (Barefoot and Klaenhammer, 1983 ; De Vuyst and Vandamme, 1994b) โดยเฉพาะพวกกรดอินทรีย์ ซึ่งสามารถตรวจสอบการผลิตกรดอินทรีย์ได้จาก pH ของอาหารที่ลดต่ำลง สำหรับในการทดลองครั้งนี้ พบว่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะต่ำลงเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง คืออยู่ในช่วง 3.0 - 4.5 ทำให้สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารได้



ภาพประกอบ6 ผลการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย โดยวิธี agar spot

ตาราง10 *Lactobacillus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูงซึ่งคัดเลือกมาจากสายพันธุ์ทั้งหมดที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย

สายพันธุ์	แยกจากอาหารหมัก
A25b	แหนม
A27a	แหนม
A27b	แหนม
A29a	แหนม
A30b	แหนม
A44	ปลาจิ้งจั้งดอง
A49a	ไส้กรอกเปรี้ยว
A52b	ปลาจิ้งจั้งดอง
A52c	ปลาจิ้งจั้งดอง
A53a	ปลาจิ้งจั้งดอง
A53b	ปลาจิ้งจั้งดอง
A55	แหนม
A56c	แหนม
A59	ไตปลา
A60c	แหนม
A61a	แหนม

ตาราง 11 ความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารที่นำมาทดสอบ

รหัสของ *Lactobacillus* spp.	*E. coli* R43	*E. coli* 1188	*E. coli* 1189	*E. coli* ATCC 25922	*S. enteritidis* 3294	*S. enteritidis*	*S. typhi* 3259	*S. typhimurium* 3292	*S. anatum* E1	*B. cereus*	*V. parahaemolyticus* 166	*S. aureus* ATCC 25923
A25b	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+++	++	+	+++
A27a	+++	+++	+++	+	+++	++	+++	++	+++	+++	+	+++
A27b	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
A29a	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+	++
A30b	+++	+	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
A44	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
A49a	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	++	+++	+	+++
A52b	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
A52c	+++	+++	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+	+++
A53a	+++	+++	+++	++	++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++
A53b	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+++
A55	+++	++	+++	++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+	++
A56c	+++	+++	+++	+	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	++
A59	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+	+++
A60c	+++	++	+++	+	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	++
A61a	+++	+++	+++	++	++	+++	++	+++	+++	+++	+	+++

+++ ขนาดของขอบวงใสมากกว่าหรือเท่ากับ 15 มิลลิเมตร

++ ขนาดของขอบวงใสน้อยกว่า15มิลลิเมตร แต่มากกว่าหรือเท่ากับ10 มิลลิเมตร

+ ขนาดของขอบวงใสน้อยกว่า 10 มิลลิเมตร

3. การเทียบเคียงชนิดของ *Lactobacillus* spp.ที่คัดเลือกได้

นำ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ทั้ง 16 สายพันธุ์ มาทำการศึกษาลักษณะต่างๆ เพื่อเทียบเคียงชนิดตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Klandler and Weiss, 1986) และการจำแนกจีนัส *Lactobacillus* ที่รวบรวมโดย Hammes and Vogel (1995) พบว่าเชื้อทั้ง 16 สายพันธุ์ ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งสูง มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี (ตาราง12) ประกอบด้วยสายพันธุ์ต่างๆดังนี้ (ตาราง 13)

1. Obligately homofermentative lactobacilli มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. amylovorus* A27a, *L. johnsonii* A55, และ *Lactobacillus* sp. A59

2. Facultatively heterofermentative lactobacilli มี 9 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. casei* subsp. *casei* A27b, *Lactobacillus* sp. A30b, *L. plantarum* (A49a, A52b, A52c, A56c, A60cและ A61a) และ *L. bavaricus* A53b (ตาราง13)

3. Obligately heterofermentative lactobacilli มี 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. fermentum* A25b, *L. brevis* A29a, *Lactobacillus* sp. (A44และA53a)

จะเห็นว่าอาหารหมักพื้นเมืองของไทยที่นำมาคัดเลือกเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง จะพบเชื้อในกลุ่ม facultatively heterofermentative lactobacilli ถึง 9 สายพันธุ์ โดยเฉพาะ *L. plantarum* พบมากที่สุดคือ 6 สายพันธุ์ ซึ่งเข้ามามีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักและการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารได้ดี จากการศึกษาของ อรพิน ภูมิภมร (2526ข) ; วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2536ข) ; วิชาญ อันประยูร (2537) ; พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์ (2538) พบว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักในอาหารหมักพื้นเมืองของไทยส่วนใหญ่จะมี *L. plantarum* เข้ามามีบทบาทสำคัญเกือบทุกชนิด ตัวอย่างเช่น ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง สะตอดอง แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว เป็นต้น เช่นเดียวกับการทดลองของวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์ (2540) ได้แยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักทั้งหมด 80 สายพันธุ์ พบว่าสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารได้สูงมี 20 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum* 16 สายพันธุ์, *L. brevis* 1 สายพันธุ์ และ *L. bavaricus* 3 สายพันธุ์

ตาราง 12 ลักษณะของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ทั้ง 16 สายพันธุ์

ลักษณะที่ศึกษา	ชื่อสายพันธุ์															
	A25b	A27a	A27b	A29a	A30b	A44	A49a	A52b	A52c	A53a	A53b	A55	A56c	A59	A60c	A61a
รูปร่าง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง	แท่ง
สีแกรม	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ทดสอบคะตะเลสต์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
เจริญที่ 15°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
เจริญที่ 45°C	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
การสร้างแก๊สจากกลูโคส	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
การหมักคาร์โบไฮเดรต																
Amygdlin	-	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Arabinose	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+
Cellobiose	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
Esculin	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Galactose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Raffinose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
Ribose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+
Salicin	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Sorbital	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+

ตาราง13 การเทียบเคียงชนิดของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้

รหัสเชื้อ	ชนิดของ *Lactobacillus*	แยกจากอาหารหมัก
A25b	*L. fermentum*	แหนม
A27a	*L. amylovorus*	แหนม
A27b	*L. casei* subsp.*casei*	แหนม
A29a	*L. brevis*	แหนม
A30b	*Lactobacillus* sp.	แหนม
A44	*Lactobacillus* sp.	ปลาจิ้งจั้งดอง
A49a	*L. plantarum*	ไส้กรอกเปรี้ยว
A52b	*L. plantarum*	ปลาจิ้งจั้งดอง
A52c	*L. plantarum*	ปลาจิ้งจั้งดอง
A53a	*Lactobacillus* sp.	ปลาจิ้งจั้งดอง
A53b	*L. bavaricus*	ปลาจิ้งจั้งดอง
A55	*L. johnsonii*	แหนม
A56c	*L. plantarum*	แหนม
A59	*Lactobacillus* sp.	ไตปลา
A60c	*L. plantarum*	แหนม
A61a	*L. plantarum*	แหนม

4. ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้

4.1 ผลของเวลาในการบ่มเชื้อต่อการสร้างสารยับยั้ง

เมื่อทำการบ่มเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้เป็นระยะเวลา 12 24 36 และ 48 ชั่วโมง แล้วนำมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งโดยวิธี agar spot พบว่าการสร้างสารยับยั้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นโดย *Lactobacillus* spp. สร้างสารยับยั้งได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในช่วงเวลาของการบ่มเชื้อต่างๆกันดังนี้ มี 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. brevis* A29a, *L. plantarum* (A52b, A52c, A56c, A61a), *L. bavaricus* A53b และ*Lactobacillus* sp. A59 สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีที่เวลาในการบ่มเชื้อเป็น 36และ48 ชั่วโมง มี 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. amylovorus* A27a, *L. casei* subsp.*casei* A27b, *Lactobacillus* sp. (A30b, A44) และ*L. plantarum* (A49a, A60c) สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีที่เวลาในการบ่มเชื้อที่ 24 36 และ48 ชั่วโมง สำหรับ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. fermentum* A25b และ *L. johnsonii* A55 สร้างสารยับยั้งได้ดีที่เวลา 48 ชั่วโมง ส่วน 1 สายพันธุ์ ของ *Lactobacillus* sp. A53a สร้างสารยับยั้งได้ดีที่เวลา 36 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการสร้างสารยับยั้งกับที่เวลาอื่นใดจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากการพิจารณาที่เวลาในการบ่มเชื้อเป็น 12 ชั่วโมง เชื้อส่วนใหญ่จะสร้างสารยับยั้งได้ต่ำสุด (ตาราง 14) เช่นเดียวกับการทดลองของ Spelhaug and Harlender (1989) ซึ่งได้ทำการทดสอบการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *L. lactis* และ *P. pentosaceus* พบว่าการสร้างสารยับยั้งจะเพิ่มมากขึ้นตามระยะเวลาในการบ่ม โดยระยะเวลาบ่มเชื้อเป็น 12 ชั่วโมง จะเห็นผลการยับยั้งต่างกับ 24 ชั่วโมง อย่างชัดเจน สอดคล้องกับการทดลองของ ศิรินาถ หนูเอก (2540) ที่กล่าวว่าในการหมักส้มฟักที่มีการเติมเชื้อ *L. casei* subsp.*rhamnosus* SN11 สามารถชะลอการเพิ่มปริมาณของเชื้อ *S. aureus* ได้ และค่าร้อยละของการยับยั้งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น โดยที่เวลาในการหมัก 24 และ48 ชั่วโมง สามารถยับยั้งได้ใกล้เคียงกันคือ ร้อยละ 92.66 และ 95.17 ตามลำดับ ในขณะที่เวลา 12 ชั่วโมง จะยับยั้งได้แค่ร้อยละ 18.60 พิจารณาเปรียบเทียบระหว่างเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่ามีเชื้อ 1 สายพันธุ์ คือ *L. johnsonii* A55 ที่มีการสร้างสารยับยั้งได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง

สถิติ ($p > 0.05$) ในขณะที่เวลา 24และ36 ชั่วโมง มีเชื้อถึง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. amylovorus* A27a, *L. casei* subsp.*casei* A27b, *Lactobacillus* sp. (A30b, A44) และ *L. plantarum* (A49a, A56c, A60c) ที่ สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) และเมื่อเปรียบเทียบที่เวลา 24 ชั่วโมงกับที่เวลา 36 และ48 ชั่วโมง มี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. amylovorus* A27a, *L. casei* subsp.*casei* A27b, *Lactobacillus* sp. A44 และ *L. plantarum* (A49a, A60c) ที่สามารถสร้างสาร ยับยั้งได้ดีไม่แตกต่าง กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังนั้นในแง่การนำมาใช้เพื่อการประหยัดเวลาและค่าใช้จ่ายต่างๆ ผู้วิจัยจึงได้เลือกเวลาในการบ่มที่ 24 ชั่วโมง มาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตาราง14 ผลของเวลาในการบ่มเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ต่อการสร้างสารยับยั้ง *E. coli* 1189

ชนิดของเชื้อ	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มิลลิเมตร)			
	12 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	36 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
L. fermentum A25b	9^{a}	14^{b}	18^{c}	22^{d}
L. amylovorus A27a	11^{a}	20^{b}	18^{b}	20^{b}
L. casei subsp.*casei* A27b	10.5^{a}	19^{b}	20.5^{b}	20.5^{b}
L. brevis A29a	8.5^{a}	14.5^{b}	20.5^{c}	20.5^{c}
Lactobacillus sp. A30b	10.5^{a}	20.5^{c}	20^{bc}	17.5^{b}
Lactobacillus sp. A44	12.5^{a}	17^{b}	19^{b}	19^{b}
L. plantarum A49a	8.5^{a}	19^{b}	21^{b}	20^{b}
L. plantarum A52b	8.5^{a}	14.5^{b}	18.5^{c}	20^{c}
L. plantarum A52c	10.5^{a}	14^{b}	19^{c}	21.5^{c}
Lactobacillus sp. A53a	10^{a}	16^{b}	21^{c}	18^{b}
L. bavaricus A53b	10^{a}	16^{b}	19.5^{c}	21^{c}
L. johnsonii A55	10^{a}	11^{a}	15^{b}	22.5^{c}
L. plantarum A56c	10^{a}	17^{b}	19.5^{bc}	20.5^{c}
Lactobacillus sp. A59	10^{a}	16.5^{b}	21^{c}	20^{c}
L. plantarum A60c	8^{a}	20^{b}	21.5^{b}	21^{b}
L. plantarum A61a	8^{a}	16.5^{b}	21^{c}	22^{c}

ตัวอักษรในแนวนอนที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.2 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่อการสร้างสารยับยั้ง

อาหารเลี้ยงเชื้อที่นำมาทดสอบทั้งหมด 5 ชนิด คืออาหารแข็ง APT, BHI, CJA, MRS และ TJA เมื่อทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งโดยใช้วิธี agar spot พบว่าเชื้อส่วนใหญ่ (13 สายพันธุ์ ยกเว้น *L. plantarum* (A49a และ A52b) และ *Lactobacillus* sp. A59) จะสร้างสารยับยั้งได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ CJA และ MRS แต่เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT , BHI และ TJA การสร้างสารยับยั้งจะต่ำมาก ซึ่งแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ CJA และ MRS (ตาราง 5) จากผลดังกล่าวน่าจะเกิดขึ้นจากส่วนประกอบต่างๆในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด (รายละเอียดในภาคผนวก ก) โดยองค์ประกอบที่มีบทบาทหลักคือน้ำตาล ซึ่งจะเป็นแหล่งคาร์บอนสำคัญที่แบคทีเรียแลกติกสามารถเฟอร์เมนต์น้ำตาลได้ผลผลิต คือ กรดอินทรีย์และคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้จะมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียอื่น (Jimenez - Diaz, 1993 ; De Vuyst and Vandamme, 1994c) สำหรับน้ำตาลที่นิยมนำมาใช้เป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับจุลินทรีย์ คือ ซูโครส กลูโคส แลกโตส เป็นต้น (Acton, *et al.* ,1977, อ้างถึงโดย พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์, 2538) จากรายงานผลของปริมาณกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการเจริญของ *Pediococus* sp. และ *Lactobacillus* sp. พบว่าเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมีปริมาณกลูโคสเพิ่มขึ้นอัตราการเจริญของเชื้อทั้ง 2 ชนิดจะเพิ่มขึ้น สอดคล้องกับการผลิตกรดแลกติก โดยในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสร้อยละ 1 เชื้อทั้ง 2 ชนิดจะผลิตกรดได้ใกล้เคียงกันคือประมาณร้อยละ 1 ซึ่งมีผลทำให้ค่าความเป็นกรด - ด่างลดลงเป็น 4.4 (อรนุช อุตรภิชาติ, 2530) สำหรับในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRSและCJA จะสามารถสร้างสารยับยั้งได้ดี เนื่องจากในอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้มีองค์ประกอบของน้ำตาลในปริมาณสูง นั่นคือ อาหาร MRS มีน้ำตาลเดกโตรสร้อยละ 2 และในอาหารเลี้ยงเชื้อ CJA จะใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำกลั่น ซึ่งในน้ำมะพร้าวจะมีน้ำตาลซูโครสเป็นส่วนประกอบหลักร้อยละ 1.28 นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และสารจำพวกเร่งการเจริญของเชื้ออีกด้วย (วิทิต วัณนา-วิบูล, 2529 ; Child, 1974) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT, BHI และ TJA จะมีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบในปริมาณต่ำ โดย APT จะมีน้ำตาลเดกโตรสเป็นส่วนประกอบร้อยละ

1 ส่วนใน TJA ซึ่งมีส่วนผสมของน้ำมะเขือเทศ มีส่วนประกอบของน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตสประมาณร้อยละ 1 เช่นเดียวกัน และ BHI มีน้ำตาลเดกโตรสเป็นส่วนประกอบประมาณร้อยละ 0.2 จึงทำให้การสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ต่ำสุด นอกจากนี้ส่วนประกอบในอาหารที่เข้ามามีบทบาทอีกชนิดหนึ่งคือ Tween 80 พบเฉพาะในอาหาร CJA และ MRSปริมาณร้อยละ 0.2 ซึ่ง Biswas, *et al.* (1991) ได้กล่าวไว้ว่า การเติม Tween 80 ปริมาณร้อยละ 0.2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE จะทำให้เชื้อเจริญได้ดี และสร้างแบคเทอริโอซินได้สูง ดังนั้นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งของเชื้อเหล่านี้คือ CJA และ MRS ไม่ว่าจะเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อตัวใดก็ให้ผลไม่แตกต่างกัน สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มีการนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย รวมทั้งเป็นที่ยอมรับของผู้วิจัยโดยทั่วไป(Kelly, *et al.*,1996; Bogovic - Matijasic,1998) ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ CJA ยังไม่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลายแต่อาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งสำหรับนักวิจัยที่จะทำการศึกษาต่อไป เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวจะมีราคาต่ำกว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS มาก

ตาราง15 ผลของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดต่อเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ในการสร้างสารยับยั้ง *E. coli* 1189

ชนิดของเชื้อ	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มิลลิเมตร)				
	APT	BHI	CJA	MRS	TJA
L. fermentum A25b	2.00[a]	–	14[b]	13[b]	1.78[a]
L. amylovorus A27a	2.32[a]	2.87[a]	13.75[b]	12[b]	1.71[a]
L. casei subsp.*casei* A27b	2.25[a]	2.2[a]	14.37[b]	14.5[b]	1.43[a]
L. brevis A29a	2.15[a]	–	14.97[b]	12.5[b]	2.40[a]
Lactobacillus sp. A30b	2.75[a]	–	12.61[b]	11.75[b]	0.50[a]
Lactobacillus sp. A44	2.26[a]	–	12.56[b]	13[b]	3.20[a]
L. plantarum A49a	3.81[a]	2.75[a]	12.42[b]	16[c]	2.91[a]
L. plantarum A52b	1.93[a]	–	14.25[b]	10.25[c]	3.25[a]
L. plantarum A52c	1.56[a]	1.00[a]	12.7[b]	12.25[b]	1.76[a]
Lactobacillus sp. A53a	1.98[a]	–	13.6[b]	12.75[b]	3.15[a]
L. bavaricus A53b	3.37[a]	2.35[a]	10.75[b]	10.5[b]	3.29[a]
L. johnsonii A55	2.51[a]	2.87[a]	11.25[b]	11.75[b]	1.05[a]
L. plantarum A56c	3.25[a]	1.00[a]	11.8[b]	10[b]	1.91[a]
Lactobacillus sp. A59	4.12[a]	1.20[a]	15[b]	12[c]	1.71[a]
L. plantarum A60c	2.96[a]	–	11.57[b]	10.25[b]	5.30[a]
L. plantarum A61a	3.15[a]	2.30[a]	10.62[b]	10[b]	2.01[a]

– ไม่เกิดการยับยั้ง

ตัวอักษรในแนวนอนที่แตกต่างกัน มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ ความเชื่อมั่นร้อยละ 95

4.3 ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการสร้างสารยับยั้ง

จากการศึกษาเมื่อพิจารณาจากเชื้อ *Lactobacillus* spp.ทั้ง 16 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ แล้วนำมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งโดยวิธี agar spot พบว่า *L. amylovorus* A27a, *Lactobacillus* sp. (A44, A53a) และ *L. fermentum* A25b สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิ 30 35 และ 40° ซ ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากอุณหภูมิอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) นอกจากนี้มีเชื้ออีกหลายๆสายพันธุ์สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) เปรียบเทียบกับที่อุณหภูมิต่างๆกัน คือ มี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. casei* subsp. *casei* A27b, *Lactobacillus* sp. A30b และ *L. plantarum* A49a, A56c, A60c สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิ 30 และ 35° ซ มี 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. brevis* A29a, *L. johnsonii* A55 และ *L. plantarum* A61a สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิ 30 35 และ40° ซ มี 4 สายพันธุ์ *L. plantarum* A52b, A52c , *L. bavaricus* A53b และ*Lactobacillus* sp. A59 สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิ 25 30 35 และ40° ซ สำหรับการศึกษาผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการสร้างสารยับยั้งของนักวิจัยอื่นๆ พบว่าอยู่ในช่วง 20 - 37° ซ เช่น Enan, *et al.* (1996) พบว่า *L. plantarum* ที่แยกจากไส้กรอกหมัก สามารถผลิตสารยับยั้งพวกแบคเทอริโอซินได้สูง เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 25 - 30° ซ และมีเชื้อบางสายพันธุ์ คือ *L. brevis* VB286 สามารถผลิตสารยับยั้งได้สูงเมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 20° ซ หรือ 25° ซ (Lewus and Montville, 1992) สำหรับการศึกษาของ ทองคำ คิมหะมานนท์ (2538) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากการหมักส้มฟัก 8 ชนิด จะสามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในอาหารได้ดีที่อุณหภูมิ37° ซ ในขณะที่ *L. casei* subsp. *rhamnosus* SN 11 สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่อุณหภูมิ 30 และ 35° ซ (ศิรินาถ หนูเอก, 2540) เช่นเดียวกันการผลิตกรดของ *P. acidilactici* H สามารถสร้างกรดได้สูงเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE ที่มีการปรับ pH เริ่มต้นเป็น 6.5 อุณหภูมิ 35 หรือ 37° ซ (Biswas, *et al.*,1991) ส่วนการสร้างสารยับยั้งพวกแบคเทอริโอซิน lactocin S พบว่าจะสร้างได้ดีที่อุณหภูมิ 30° ซ (Mortvedt - Abildgaard, *et al.*, 1995) สำหรับการวิจัยครั้งนี้

เมื่อพิจารณาโดยรวม พบว่าที่อุณภูมิ 30 และ35° ซ เหมาะสมที่สุดต่อการสร้างสาร ยับยั้งของ *Lactobacillus* spp. เนื่องจากมีเชื้อถึง15 สายพันธุ์ (ยกเว้น*L. fermentum* A25b) ที่สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิดังกล่าว (ตาราง 16) ดังนั้นไม่ว่าจะเลือกใช้ที่อุณหภูมิ 30° ซ หรือ 35° ซ จะมีผลต่อการสร้างสารยับยั้งได้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ($p > 0.05$) สำหรับผู้วิจัยได้เลือกอุณหภูมิ 35° ซ นำมาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

ตาราง16 ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ*Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้ต่อการสร้างสารยับยั้ง *E. coli* 1189

ชนิดของเชื้อ	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มิลลิเมตร)			
	25° ซ	30° ซ	35° ซ	40° ซ
L. fermentum A25b	11.55^{a}	10.36^{a}	14.38^{b}	17.7^{c}
L. amylovorus A27a	8.28^{ab}	13.10^{c}	10.55^{b}	7.30^{a}
L. casei subsp.*casei* A27b	9.16^{b}	11.46^{bc}	13.16^{c}	5.20^{a}
L. brevis A29a	6.83^{a}	8.88^{ab}	10.48^{b}	9.61^{b}
Lactobacillus sp. A30b	8.85^{a}	12.25^{b}	10.71^{ab}	8.75^{a}
Lactobacillus sp. A44	9.68^{a}	9.03^{a}	16.41^{b}	9.72^{a}
L. plantarum A49a	7.5^{a}	10.25^{bc}	11.91^{c}	8.60^{b}
L. plantarum A52b	11.65^{a}	11.63^{a}	9.75^{a}	9.50^{a}
L. plantarum A52c	8.37^{a}	10.15^{a}	8.41^{a}	10.35^{a}
Lactobacillus sp. A53a	9.85^{a}	11.03^{a}	15.16^{c}	12.02^{ab}
L. bavaricus A53b	8.58^{a}	11.00^{a}	10.63^{a}	9.53^{a}
L. johnsonii A55	6.72^{a}	7.91^{ab}	8.66^{ab}	10.31^{b}
L. plantarum A56c	6.42^{a}	10.2^{b}	7.85^{ab}	6.16^{a}
Lactobacillus sp. A59	8.88^{a}	9.78^{a}	10.53^{a}	8.31^{a}
L. plantarum A60c	6.56^{a}	10.32^{bc}	13.16^{c}	8.60^{ab}
L. plantarum A61a	6.80^{a}	10.48^{b}	10.13^{b}	11.78^{b}

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5. ศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างจาก *Lactobacillus* spp.

5.1 ทดสอบการสร้างสารยับยั้งบนอาหารแข็งในสภาพจำกัดผลการยับยั้ง ที่เกิดจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

เมื่อทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ 16 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกได้โดยวิธี agar spot ในสภาพที่จำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือร้อยละ 0.2 และจำกัดสารยับยั้งพวกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการบ่มเชื้อในสภาพไร้ออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามี *Lactobacillus* บางสายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารที่นำมาทดสอบ (*E. coli* 1189, *B. cereus* และ *S. enteritidis*)ทุกชนิด ได้แก่ *Lactobacillus sp.* A30b และ *L. plantarum* (A49a, . A56c, A61a) และ *L. bavaricus* A53b อย่างไรก็ตามมีบางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารที่นำมาทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. fermentum* A25b, *L. plantarum* A52b, *Lactobacillus* sp. (A44, A53a, A59) และ *L. johnsonii* A55 เมื่อพิจารณา *Lactobacillus* ทั้ง 16 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้ง *S. enteritidis* ได้ดีที่สุด (ตาราง17) สำหรับขอบวงใสที่เกิดขึ้นจะมีขนาดเล็กกว่าการยับยั้งที่ทดสอบในสภาพไม่จำกัดกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์มาก คือมีขนาดไม่เกิน 5.23 มิลลิเมตร

5.2 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว

นำ *Lactobacillus* ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.1 มาทดสอบการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลวโดยการวัดการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนใสของ *Lactobacillus* ที่ไม่ปรับ pH และส่วนใสที่ปรับ pH เป็น 6.5 (เพื่อจำกัดการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์) เปรียบเทียบกับการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารในอาหารเหลว MRS ที่ไม่มีการเติมส่วนใสดังกล่าว พบว่าส่วนใสที่ไม่มีการปรับpH สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* 1189 และ*S. aureus* ATCC 29213 ได้ดี ในขณะที่ส่วนใสที่มีการปรับ pH (เพื่อจำกัดกรดอินทรีย์) จะยับยั้งได้น้อยกว่ามาก (ภาพประกอบ 7, 8 และ9) ถ้านำผลการยับยั้งที่เกิดขึ้นมาคิดเป็น

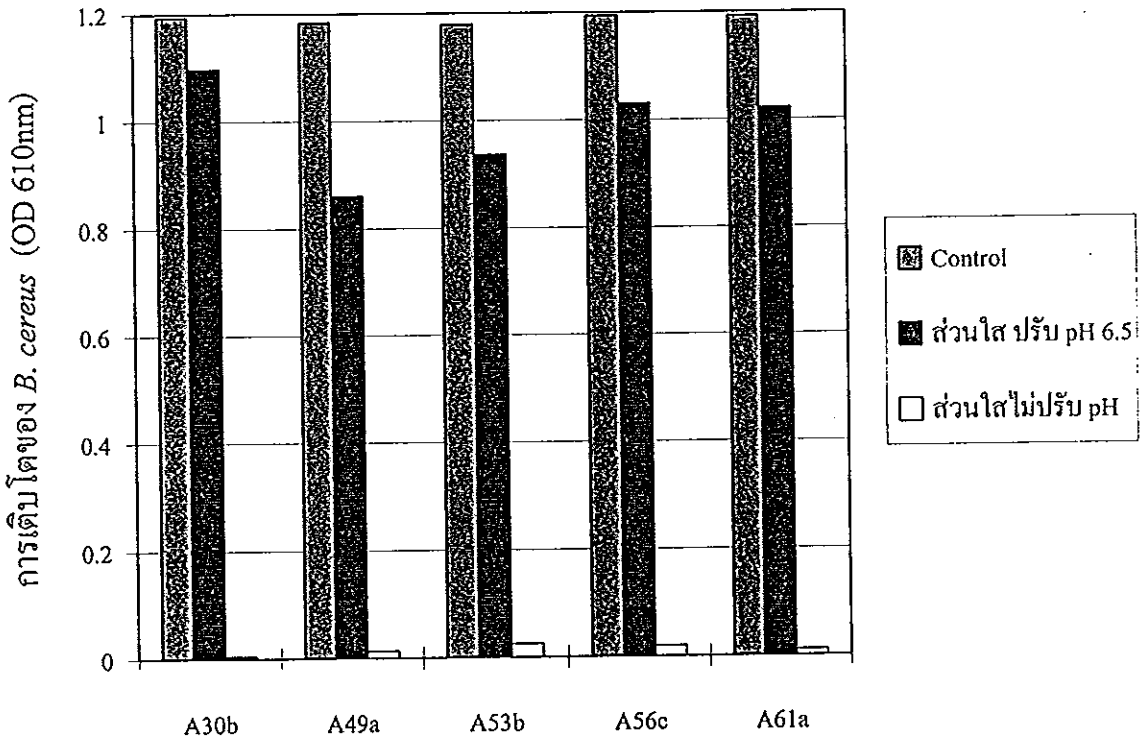
ร้อยละของการยับยั้งพบว่า*Lactobacillus* spp. ทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารทุกชนิดได้ใกล้เคียงกันมาก คืออยู่ในช่วงร้อยละ 97.85 - 99.6 สำหรับการยับยั้งที่มีสาเหตุมาจากกรดอยู่ในช่วงร้อยละ 59.75 - 96.16 และสารยับยั้งอื่นใดอยู่ในช่วงร้อยละ 5.03 - 38.82 (ตาราง 18)

จากการทดสอบการยับยั้งในข้อ 5.1 และ 5.2 แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่มีสาเหตุจากกรดอินทรีย์ โดยเฉพาะ *Lactobacillus* sp. A30b และ *L. plantarum* A61a การยับยั้งที่เกิดขึ้นจะมีสาเหตุมาจากกรดอินทรีย์คิดเป็นร้อยละ 84.65 - 96.16 (ตาราง 18) เช่นเดียวกับ Jin, *et al.* (1996) พบว่า *Lactobacillus* spp. ที่แยกจากลำไส้ของไก่สามารถยับยั้ง *Salmonella* 5 สายพันธุ์ (*S. enteritidis* 935/75, *S. enteritidis* 94/448, *S. pullorum*, *S. typhimurium* และ *S. blockley*) และ *E. coli* 3 สายพันธุ์ (*E. coli* O1:K1, O2:K1 และ O78:K80) ซึ่งการยับยั้งดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากกรดอินทรีย์ สำหรับกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นประกอบด้วยกรดแลกติกและกรดอะซิติกเนื่องจากเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ อยู่ในกลุ่ม heterofermentative lactobacilli สามารถผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกได้เป็นผลิตภัณฑ์หลัก ซึ่ง Niemand, *et al.* (1983) พบว่าการเติมกรดแลกติกลงในเนื้อบดเพื่อให้ pH เป็น 5.0 จะมีผลในการลดแบคทีเรียกลุ่ม *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas* และ *Brochospacta* ได้ Conner, *et al.* (1997) ได้ศึกษาผลของกรดอินทรีย์ (กรดแลกติกและกรดอะซิติก) ความเข้มข้นร้อยละ 2และ4 จะลดจำนวน *E. coli* O157: H7 และ *L. monocytogenes* ที่ปนเปื้อนในชิ้นเนื้อได้ นอกเหนือจากกรดอินทรีย์ พบว่าเชื้อเหล่านี้สามารถสร้างสารยับยั้งอื่นอีกด้วย ในการทดลองครั้งนี้เมื่อพิจารณาการยับยั้งต่อแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่า *L. plantarum* A49a สามารถสร้างสารยับยั้งอื่นนอกจากกรดอินทรีย์ได้ดี นั่นคือยับยั้ง *B. cereus*, *E. coli* 1189 และ *S. aureus* ATCC 29213 ได้ร้อยละ 27.28, 27.59 และ33.59 ตามลำดับ (ตาราง 18) จึงเลือกสายพันธุ์ดังกล่าวมาใช้ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

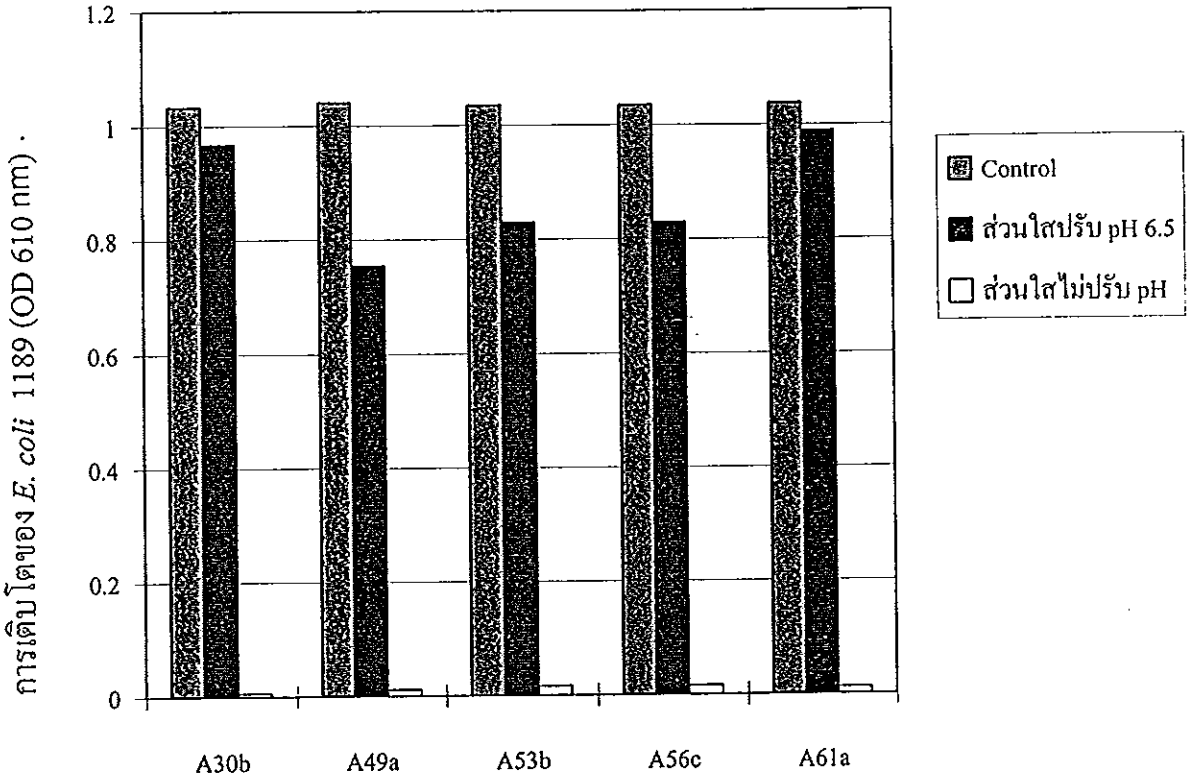
ตาราง17 การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่คัดเลือกได้บนอาหารแข็งในสภาวะที่มีการจำกัดผลการยับยั้งจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ชนิดของเชื้อ	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มิลลิเมตร)		
	E. coli 1189	*S. enteritidis*	*B. cereus*
L. fermentum A25b	–	–	–
L. amylovorus A27a	–	3.25	–
L. casei subsp.*casei* A27b	–	2.60	3.75
L. brevis A29a	1.12	–	–
Lactobacillus sp. A30b	1.11	3.15	3.25
Lactobacillus sp. A44	–	–	–
L. plantarum A49a	1.41	3.55	4.5
L. plantarum A52b	–	–	–
L. plantarum A52c	–	2.75	2.70
Lactobacillus sp. A53a	–	–	–
L. bavaricus A53b	1.35	3.6	2.75
L. johnsonii A55	–	–	–
L. plantarum A56c	1.12	3.25	3.5
Lactobacillus sp. A59	–	–	–
L. plantarum A60c	–	2.25	3.80
L. plantarum A61a	0.75	3.00	5.23

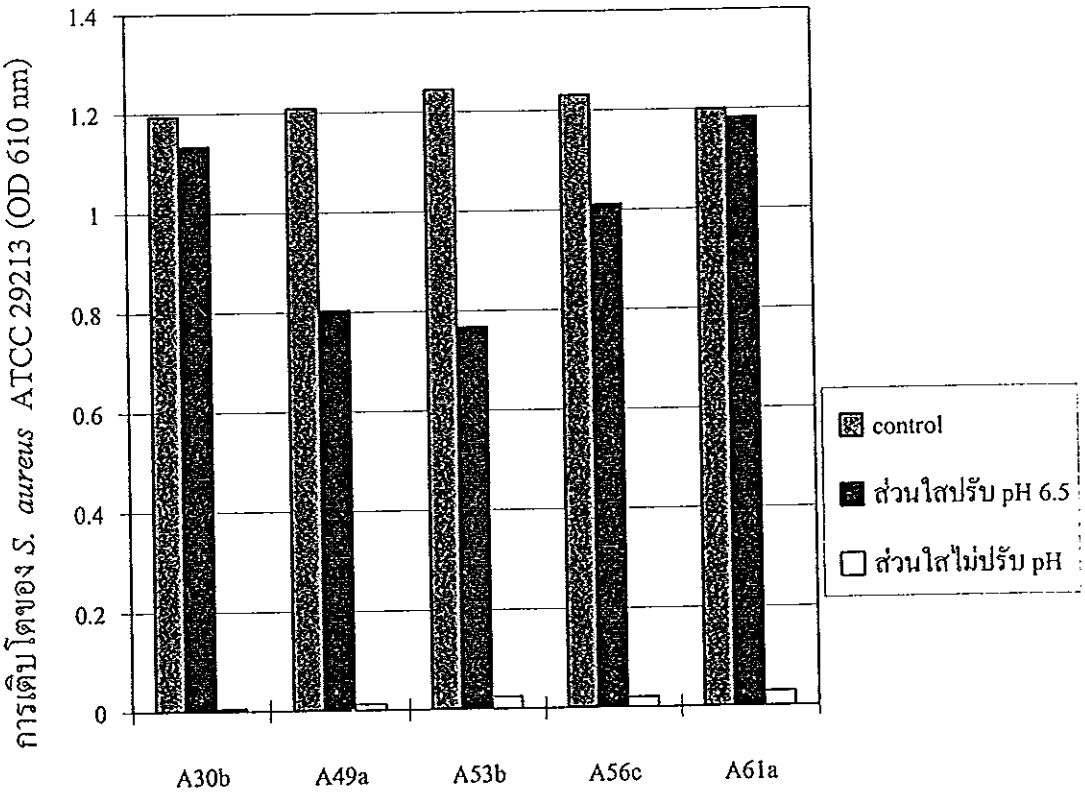
- ไม่เกิดการยับยั้ง



ภาพประกอบ 7 ผลการยับยั้ง *B. cereus* เมื่อทดสอบกับส่วนใสของเชื้อ *Lactobacillus* spp.



ภาพประกอบ 8 ผลการยับยั้ง *E. coli* 1189 เมื่อทดสอบกับส่วนใสของเชื้อ *Lactobacillus spp.*



ภาพประกอบ 9 ผลการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29213 เมื่อทดสอบกับส่วนใสของเชื้อ*Lactobacillus* spp.

ตาราง 18 ผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารเหลว

รหัสเชื้อ	ร้อยละของการยับยั้งเมื่อทดสอบกับส่วนใส*								
	B.. cereus			*E. coli* 1189			*S. aureus* ATCC 29213		
	การยับยั้งทั้งหมด	กรดอินทรีย์	สารยับยั้งอื่น	การยับยั้งทั้งหมด	กรดอินทรีย์	สารยับยั้งอื่น	การยับยั้งทั้งหมด	กรดอินทรีย์	สารยับยั้งอื่น
A30b	99.79	91.48	8.31	99.42	93.03	6.39	99.58	94.55	5.03
A49a	98.9	71.62	27.28	98.94	71.35	27.59	99.0	65.41	33.59
A53b	97.85	77.32	20.53	98.42	78.52	19.90	98.07	59.75	38.32
A56c	98.38	84.64	13.74	98.45	78.54	19.91	98.37	80.49	17.88
A61a	99.07	84.65	14.42	98.84	94.12	4.72	97.58	96.16	1.42

* ค่าเฉลี่ยร้อยละของการยับยั้งเมื่อทดสอบกับส่วนใส

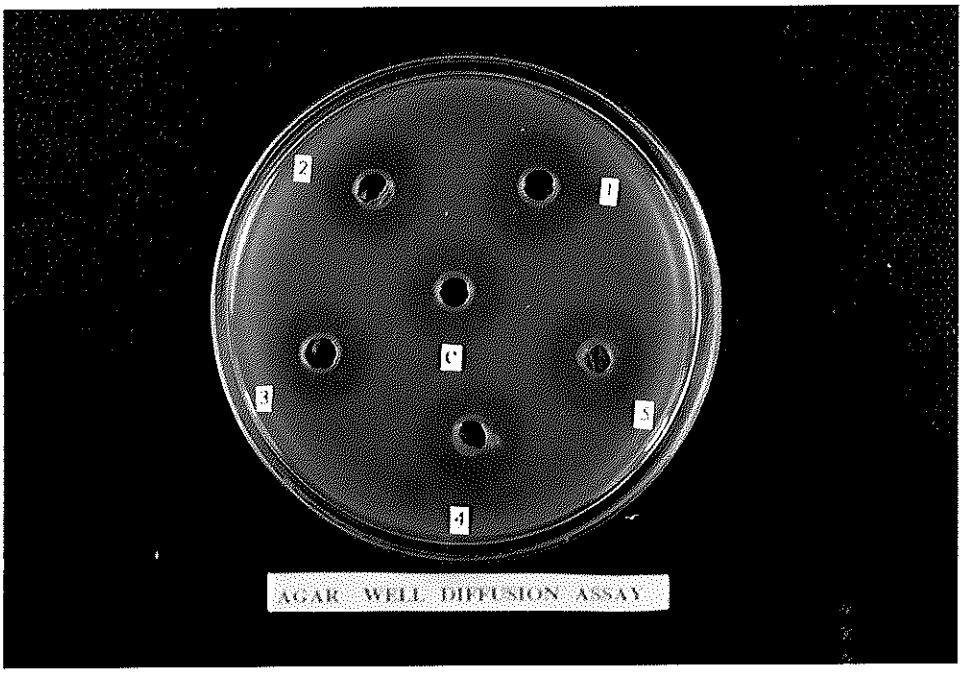
5.3 การทนต่อความร้อน

เมื่อนำส่วนใสของ *L. plantarum* A49a ไปทดสอบกับความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆแล้วศึกษาความสามารถในการยับยั้งที่เหลือโดยวิธี agar well diffusion assay (ภาพประกอบ 10) เมื่อเปรียบเทียบขนาดของขอบวงใสระหว่างชุดทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆกับส่วนใสที่ไม่ได้ผ่านความร้อน พบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p > 0.05$) ไม่ว่าจะใช้เชื้อ *E. coli* 1189 หรือ *S. aureus* ATCC 29213 ก็จะให้ผลที่เหมือนกัน (ตาราง 19) แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งที่สร้างจาก *L. plantarum* A49a ยังคงออกฤทธิ์ยับยั้งได้ดีไม่ว่าจะทำการทดสอบที่อุณหภูมิใดๆ นั่นคือสารยับยั้งนี้มีคุณสมบัติในการทนต่อความร้อนโดยสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที ซึ่งได้มีผู้ศึกษาการทนความร้อนของสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* และแบคทีเรียแลกติกอื่นๆหลายสายพันธุ์ เช่น ศิรินาถ หนูเอก (2540) พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 ไอโซเลต คือ *L. casei* subsp. *rhamnosus* SN11, *Streptococcus* sp. (SN61) และ *S. lactis* (SN33, SN48, SN62) จะสร้างสารยับยั้งที่ไม่ถูกทำลายด้วยความร้อน โดยยังคงมี กิจกรรมที่อุณหภูมิ 90° ซ นาน 45 นาที นอกจากนี้ มีผู้ทดลองโดยส่วนใหญ่ พบว่าสารยับยั้งพวกแบคเทอริโอซิน ได้แก่ plantaricin 149, plantaricin S, plantaricin T, plantaricin LC 74 และ plantaricin UG1 มีคุณสมบัติในการทนความร้อนสูง ได้ถึง 100° ซ เป็นเวลา 60 นาที (Kato, *et al.*, 1994 ; Jimenez - Diaz, *et al.*, 1993 ; Rekhif, *et al.*, 1994 ; Enan, *et al.*,1996) และมีแบคเทอริโอซินบางชนิดสามารถทนความร้อนสูงถึง 121° ซ เป็นเวลา 10 นาที คือ plantaricin C ที่ผลิตจาก *L. plantarum* LL441 ที่แยกมาจากนม (Gonzalez, *et al.*, 1994) นอกจากนี้ lactocin A ที่ผลิตจาก *L. amylovorus* จะสามารถทนความร้อนได้ถึง 121° ซ เป็นเวลา 20 นาที (Contreras, *et al.*, 1997)

ตาราง19 ผลการศึกษาสมบัติของสารยับยั้งจาก *L. plantarum* A49aในการทนต่อความร้อน

ชุดทดลอง	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มิลลิเมตร)	
	E. coli 1189	*S. aureus* ATCC 29213
ไม่ทดสอบกับความร้อน	3.75[a]	1.25[b]
63° ซ, 30 นาที	3.67[a]	1.25[b]
100° ซ, 10 นาที	3.72[a]	1.22[b]
100° ซ, 20 นาที	3.65[a]	1.27[b]
100° ซ, 30 นาที	3.77[a]	1.25[b]
121° ซ, 15 นาที	3.75[a]	1.25[b]

ตัวอักษรในแนวตั้งที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



ภาพประกอบ10 การทดสอบการทนความร้อนของสารยับยั้งที่สร้างจาก*L. plantarum* A49a โดยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ *E. coli* 1189 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

C ไม่ทดสอบกับความร้อน

1 ทดสอบกับความร้อนที่ 63° ซ เป็นเวลา 30 นาที

2 ทดสอบกับความร้อนที่ 100° ซ เป็นเวลา 10 นาที

3 ทดสอบกับความร้อนที่ 100° ซ เป็นเวลา 20 นาที

4 ทดสอบกับความร้อนที่ 100° ซ เป็นเวลา 30 นาที

5 ทดสอบกับความร้อนที่ 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที

5.4 ความไวต่อเอนไซม์

เมื่อนำส่วนใสของ *L. plantarum* A49a มาทดสอบกับเอนไซม์ต่างๆ แล้วศึกษาความสามารถในการยับยั้งที่เหลือโดยวิธี agar well diffusion assay นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ซึ่งไม่ผ่านการทดสอบกับเอนไซม์ พบว่าขนาดของขอบวงใสที่ได้จะแตกต่างกัน โดยส่วนใสที่ผ่านการทดสอบกับเอนไซม์ α - chymotrypsin, pepsin, protease และtrypsin จะทำให้ขนาดของขอบวงใสลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ในขณะที่ทดสอบกับเอนไซม์ α - amylase ขนาดของขอบวงใสจะไม่เปลี่ยนแปลงใดๆเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ส่วนเอนไซม์ catalase พบว่าขนาดของขอบวงใสจะลดลงเล็กน้อย (ตาราง 20) แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้แก่ α-chymotrypsin, protease, pepsin และtrypsin มีผลต่อการทำงานของสารยับยั้งทำให้ประสิทธิภาพการยับยั้งลดลงอย่างชัดเจนจึงถือได้ว่าสารยับยั้งดังกล่าวมีคุณสมบัติเป็นสารพวกโปรตีน เช่นเดียวกับการศึกษาที่ผ่านมา โดยส่วนใหญ่จะพบว่าสารยับยั้งที่ผลิตจาก *L. plantarum* จะไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน ตัวอย่างเช่น pediocin AcH ไวต่อ pepsin, trypsin, α-chymotrypsin, pronase และficin แต่จะไม่ไวต่อเอนไซม์ catalase, lipase และ α-amylase ส่วนplantaricin C จะไวต่อ pronase, trypsin และ α - chymotrypsin แต่ไม่มีผลใดๆเมื่อทดสอบกับ pepsin, proteinase K , α - amylase และlipase แสดงให้เห็นว่า สารพวกแบคเทอริโอซินจะมีความจำเพาะต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่แตกต่างกันด้วย (Gonzalez, *et al.*, 1994) เมื่อทดสอบกับเอนไซม์ α - amylase พบว่าไม่มีผลใดๆต่อการออกฤทธิ์ของสารยับยั้ง แสดงว่าสารยับยั้งดังกล่าวไม่มีสารพวกคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ ต่างกับ fermencin ที่ผลิตจาก *L. fermenti* ที่ไวต่อเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตและไขมันด้วย จึงจัดเป็นสารพวก lipocarbohydrate protein(De - Klerk and smit, 1967) ในขณะที่ fermencinB ที่ผลิตจาก *L. fermentum* จะไวต่อเอนไซม์ amyloglucosidase แสดงว่าแบคเทอริโอซินดังกล่าวมีสารพวกคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ (Yan and Lee, 1997) สำหรับเอนไซม์ catalase จะมีผลทำให้การออกฤทธิ์ของสารยับยั้งลดลงเช่นกันแต่น้อยมาก แสดงว่าการยับยั้งอีกส่วนหนึ่งอาจจะเกิดขึ้นจากสารพวกเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นด้วย

แต่มีผลต่อการยับยั้งเพียงเล็กน้อยเท่านั้น ส่วนโปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่นำมาใช้ในการเตรียมสารละลายเอนไซม์จะไม่มีผลใดๆต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ

ตาราง20 ผลของเอนไซม์ต่อความคงตัวของสารยับยั้งที่สร้างขึ้นโดย *L. plantarum* A49a

ชื่อเอนไซม์	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มิลลิเมตร)		
	ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
α-amylase	-	2.75	2.75
catalase	-	2.5	2.45
α - chymotrypsin	-	2.5	2.25
pepsin	-	2.85	2.60
protease	-	3.0	2.37
trypsin	-	2.3	2.05

ชุดควบคุม 1 โปแตสเซียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์

ชุดควบคุม 2 ส่วนใสที่ไม่ได้ผ่านการทดสอบกับเอนไซม์

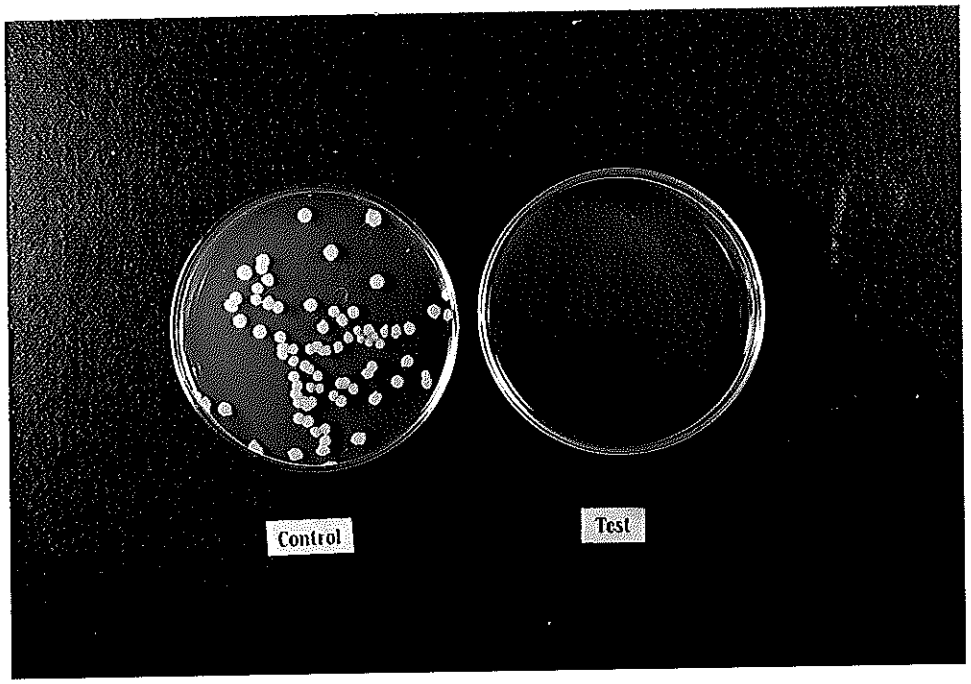
ชุดทดสอบ ส่วนใสที่ผ่านการทดสอบกับเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ

- ไม่เกิดการยับยั้ง

6. ศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารโดย *L. plantarum* A49a เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน

นำเชื้อ *L. plantarum* A49a จำนวน 10^7 CFU/มิลลิลิตร และแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* 1189, *E. coli* O157:H7, *S. enteritidis*, *S. aureus* ATCC 29213 และ *S. typhi* 3299 จำนวน 10^4 CFU/มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงร่วมกันที่อุณหภูมิ 35° ซ เป็นเวลา 10 ชั่วโมง แล้วตรวจนับจำนวนแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารที่เหลือโดยใช้อาหารที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียแต่ละชนิด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติม *L. plantarum* A49a ลงไป แล้วนำมาหาร้อยละของการยับยั้งพบว่า *L. plantarum* A49a สามารถสร้างสารยับยั้ง *B. cereus*, *S. enteritidis* และ*S. typhi* 3299 ได้อย่างสมบูรณ์ คือร้อยละ 100 (ภาพประกอบ 11,14 และ15) และ สามารถยับยั้ง*E. coli* 1189 และ*S. aureus* ATCC 29213 ได้ใกล้เคียงกันมาก คือร้อยละ 98.78 และ97.13 ตามลำดับ (ภาพประกอบ12,13และ15) สำหรับ *E. coli* O157:H7 จะถูกยับยั้งได้ต่ำสุดเพียงแค่ร้อยละ 88.78 ซึ่งใกล้เคียงกับการทดสอบในข้อ 5.2 และรายงานของ Gupta, *et al.* (1996) ที่เลี้ยง *L. acidophilus* ร่วมกับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ในนม พบว่า *S. aureus* C2 - C10 และ*S. typhi* -83 จะถูกยับยั้งได้ดีกว่า *E. coli* -6 ซึ่งผลการยับยั้งคิดเป็นร้อยละ 95.0 99.0 และ 92.0 ตามลำดับ ศิรินาถ หนูเอก (2540) ได้ศึกษาการยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกเพื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร พบว่า *L. casei* subsp. *rhamnosus* SN11 ยับยั้ง *S. aureus* ได้ร้อยละ 98.28 *S. lactis* SN48 ยับยั้ง *E. coli* และ *E. coli* O157 : H7 ได้ร้อยละ 93.85 และ89.82 ตามลำดับ แต่การศึกษาของ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูลและคณะ (2539) ได้กล่าวไว้ว่า *L. acidophilus* 2 สายพันธุ์ และ *L. delbreuckii* subsp. *bulgaricus* ที่แยกมาจากนมเปรี้ยว พบว่าสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ร้อยละ 61.1 - 75.5, *S. typhimurium* ร้อยละ 40.5 - 62.1 และ *E. coli* ร้อยละ 47.9 - 53.0 ซึ่งจากรายงานที่ผ่านมาพบว่า สารยับยั้งที่สร้างขึ้นและมีผลต่อแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารนั้นประกอบด้วยสารยับยั้งหลายชนิด ได้แก่กรดอินทรีย์ (Gonzalez, *et al.*,1994) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Jimenez- Diaz, *et al.*,1993) และแบคเท

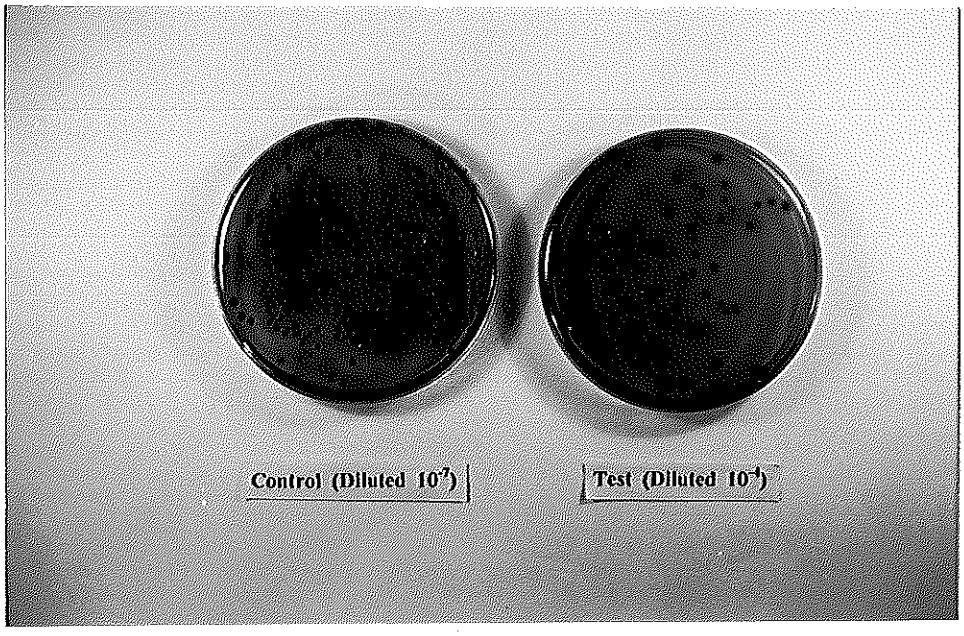
โอซิน (De Vuyst and Vandamme, 1994c) เช่นเดียวกับผลการทดลองในครั้งนี้ ซึ่งพบว่าผลการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *L. plantarum* A49a เกิดจากผลการยับยั้งร่วมกันของสารดังกล่าวเช่นกัน



ภาพประกอบ11 การนับจำนวนโคโลนี ของ *B. cereus* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA-polymyxinB หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a

Control *B. cereus* ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a

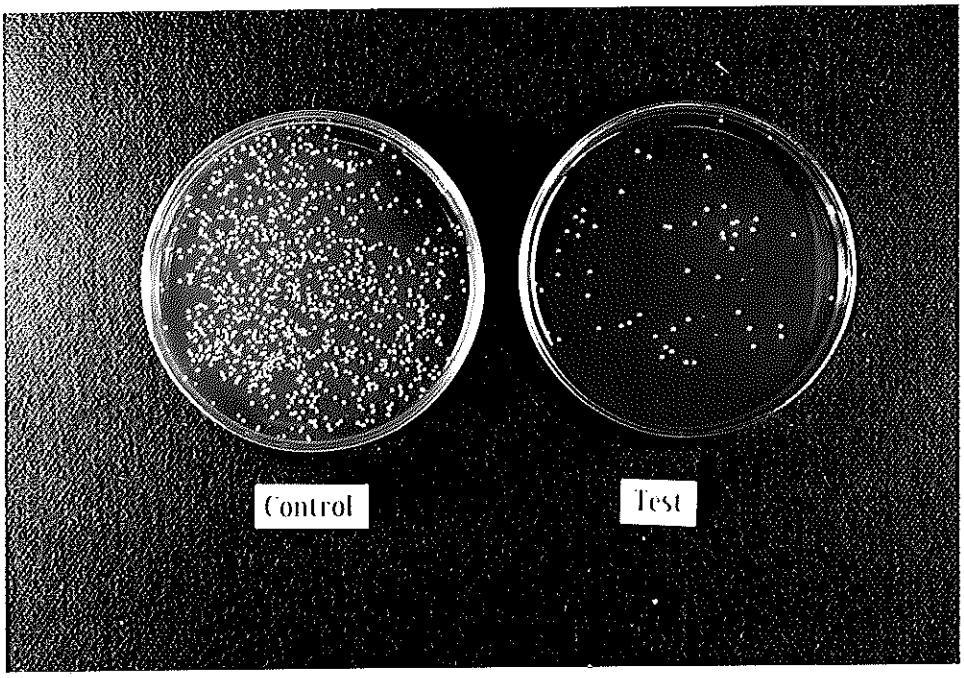
Test *B. cereus* ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a



ภาพประกอบ12 การนับจำนวนโคโลนี *E. coli* 1189 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ EMB หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a

Control *E. coli* 1189 ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a

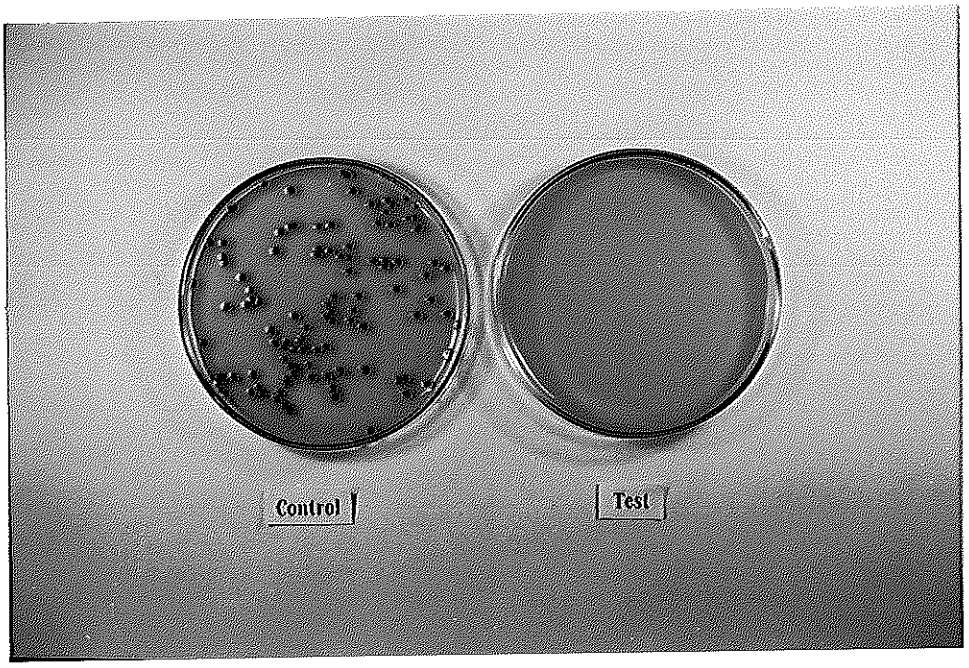
Test *E. coli* 1189 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a



ภาพประกอบ13 การนับจำนวนโคโลนี *S. aureus* ATCC 29213 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อMSA หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a

Control *S. aureus* ATCC 29213 ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a

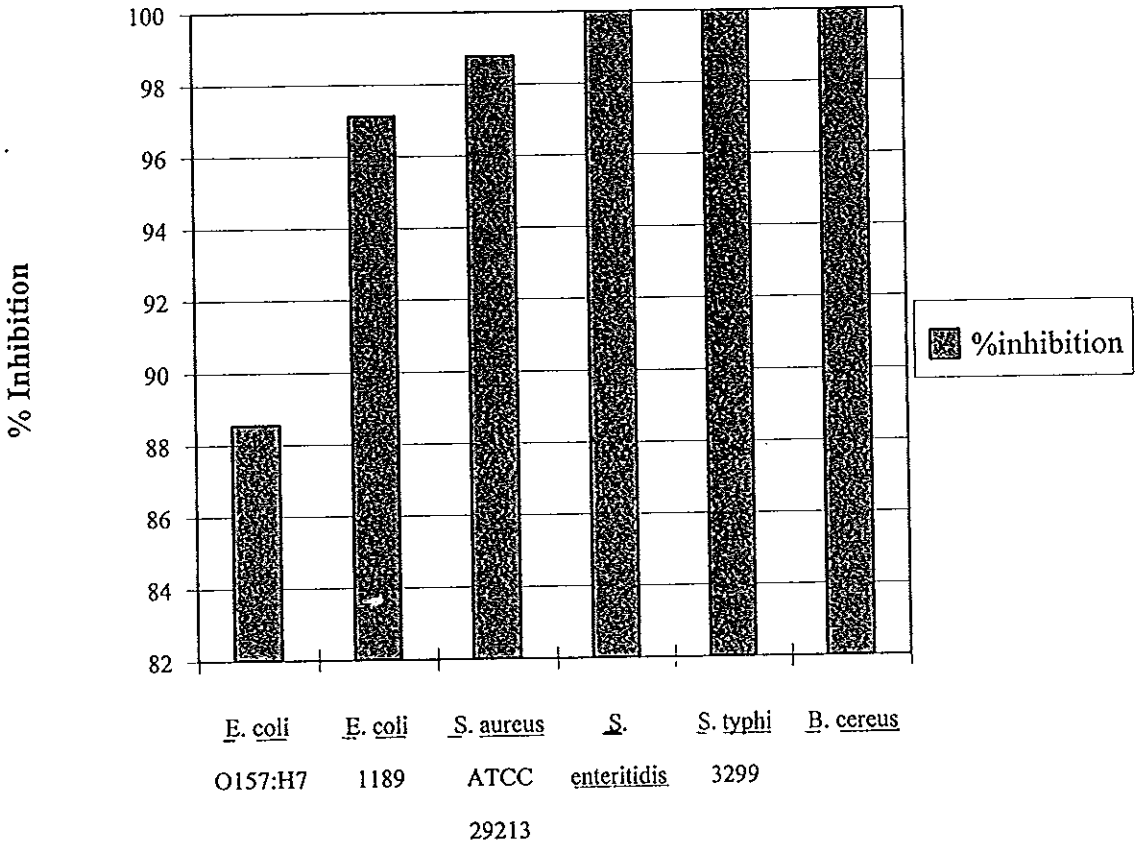
Test *S. aureus* ATCC 29213ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a



ภาพประกอบ14 การนับจำนวนโคโลนี *S. typhi* 3299 ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ SS หลังการเพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a

Control *S. typhi* 3299 ที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a

Test *S. typhi* 3299 ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *L. plantarum* A49a



ภาพประกอบ 15 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *L . plantarum* A49a เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน

บทที่4

สรุป

เมื่อนำอาหารหมักพื้นเมืองของไทยทั้งหมด 81 ตัวอย่าง มาทำการแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. พบว่ามีตัวอย่างที่สามารถแยกเชื้อดังกล่าวได้ทั้งหมด 53 ตัวอย่าง และจำนวนเชื้อที่แยกได้ 88 สายพันธุ์ สำหรับอาหารหมักที่สามารถแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp.ได้ ได้แก่ กระเทียมดอง กุ้งส้ม ขนมจีน ไตปลา เต้าเจี้ยว บูดู ปลาจิ้งจั้งดอง ปลาแป้งแดง ปลาส้ม ปลาร้า ปูเค็ม ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ส้มฟัก ไส้กรอกเปรี้ยว หนาง(เนื้อหมู) หนาง(เนื้อวัว) แหนมและหน่อไม้ดอง

Lactobacillus spp.ทั้งหมด 88 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งต่อแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูง พบว่า *Lactobacillus* ที่มีความสามารถในการยับยั้งสูงมี 16 สายพันธุ์ ได้แก่ A25b, A27a, A27b, A29a, A30b, A55, A56c, A60c และ A61a แยกได้จากแหนม A44, A52b, A52c, A53a และA53b แยกได้จากปลาจิ้งจั้งดอง A49a แยกมาจากไส้กรอกเปรี้ยว และA59 แยกมาจากไตปลา โดยสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ *B. cereus*, *E. coli* 1188, *E. coli* 1189, *E. coli* ATCC 25922, *E. coli* R43, *S. enteritidis* 3259, *S. enteritidis* 3294, *S. typhi* 3299, *S. typhimurium* 3292, *S. anatum* E1, และ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดี ยกเว้น *V. parahaemolyticus* 166 ที่เชื้อส่วนใหญ่สามารถยับยั้ง ได้น้อย

การเทียบเคียงชนิดของ *Lactobacillus* spp.ที่คัดเลือกได้ทั้ง 16 สายพันธุ์ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่าประกอบด้วย *L. plantarum* 6 สายพันธุ์, *Lactobacillus* sp.4 สายพันธุ์,*L. amylovorus* 1 สายพันธุ์, *L. bavaricus* 1 สายพันธุ์, *L. brevis* 1 สายพันธุ์, *L.casei* subsp. *casei* 1 สายพันธุ์ , *L. fermentum* 1 สายพันธุ์และ *L. johnsonii* 1 สายพันธุ์

การศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้ง ได้แก่ เวลาในการบ่มเชื้อต่อการสร้างสารยับยั้งพบว่า แนวโน้มการสร้างสารยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการบ่มเชื้อเพิ่มขึ้น โดยที่เวลา 36 และ48 ชั่วโมง เชื้อส่วนใหญ่สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ที่เวลา 12 ชั่วโมง มีการสร้างสารยับยั้งได้ต่ำสุด ($p < 0.05$) สำหรับอาหารเลี้ยงเชื้อ CJA และ MRS จะมีผลต่อการสร้างสารยับยั้งได้ดี ในขณะที่อาหารเลี้ยงเชื้อ APT, BHI และTJA จะมีผลน้อยมากต่อการสร้างสารยับยั้งและแตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ CJA และ MRS อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ปัจจัยสุดท้ายคือผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อต่อการสร้างสารยับยั้ง พบว่าที่อุณหภูมิ 30° ซ และ 35° ซ เชื้อจะสามารถสร้างสารยับยั้งได้ดี

ศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างขึ้นโดยการทดสอบความสามารถในการยับยั้งในสภาพที่มีการจำกัดผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ โดยวิธี agar spot พบว่ามีเชื้อ 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus sp.* A30b, *L. plantarum* A49a, A56c, A61a และ *L. bavaricus* A53b ยังคงสร้างสารยับยั้งอื่นนอกเหนือจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มายับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารได้ดี แต่การยับยั้งจะต่ำกว่าการทดสอบในสภาพที่ไม่มีการจำกัดกรดอินทรีย์ เมื่อนำเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ดังกล่าวมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลวโดยวัดการเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร ซึ่งจะมีการจำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์ พบว่าทั้ง 5 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้งอื่นได้โดยเฉพาะ *L. plantarum* A49a จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร คือ*B. cereus*, *E. coli* 1189 และ *S. aureus* ATCC 29213 ได้ดี คิดเป็นร้อยละของการยับยั้งเท่ากับ 27.28 27.59 และ 33.59 ตามลำดับ

นำสารยับยั้งที่สร้างจาก *L. plantarum* A49a มาศึกษาสมบัติในการทนต่อความร้อน พบว่า สารยับยั้งที่สร้างขึ้นสามารถทนความร้อนได้สูงสุดถึง 121° ซ เป็นเวลา 15 นาที และเมื่อทดสอบความไวต่อเอนไซม์ต่างๆ พบว่าเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ α - chymotrypsin, pepsin, protease และ trypsin จะมีผลต่อการทำงานของสารยับยั้ง ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งลดลง ส่วนเอนไซม์ catalase ก็มีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารยับยั้งเช่นกัน แต่น้อยมาก ในขณะที่เอนไซม์ α - amylase

จะไม่มีผลใดๆ แสดงว่าสารยับยั้งดังกล่าว นอกเหนือจากกรดอินทรีย์แล้วอาจจะเกิดจากสารพวกโปรตีน ที่เรียกว่า แบคเทอริโอซินและสารพวกไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วย

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกับ*L. plantarum* A49a พบว่า เชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวสามารถยับยั้ง *B. cereus*, *S. enteritidis* และ *S. typhi* 3299 ได้ดี โดยคิดเป็นร้อยละ 100 ส่วน *S. aureus* ATCC 29213 และ *E. coli* 1189 ถูกยับยั้งได้ร้อยละ 98.78 และ 97.13 ตามลำดับ ในขณะที่ *E. coli* O157 : H7 ถูกยับยั้งได้ต่ำสุดคือคิดเป็นร้อยละ 88.57

ข้อเสนอแนะ

จากการวิจัยในครั้งนี้ทำให้ทราบว่าในอาหารหมักพื้นเมืองของไทยมีเชื้อ *Lactobacillus* sp. เข้ามามีบทบาทในกระบวนการหมัก โดยสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารได้ รวมทั้งปัจจัยที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* sp. และสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างขึ้น ถ้ามีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับด้านนี้ต่อไป ผู้วิจัยเสนอแนะว่าควรมีการวิจัยเพิ่มเติม เกี่ยวกับการนำเชื้อที่คัดเลือกได้ดังกล่าวไปใช้ในการพัฒนาการผลิตอาหารหมักพื้นเมืองให้รวดเร็วขึ้น และเพิ่มความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภค รวมทั้งศึกษาสารยับยั้งบางชนิดที่เชื้อเหล่านี้ผลิตขึ้น ได้แก่ แบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็นที่สนใจกันมากในปัจจุบัน โดยศึกษาปัจจัยที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซิน การทำให้สารแบคเทอริโอซินบริสุทธิ์ เพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาด้านอุตสาหกรรมอาหารต่อไป

บรรณานุกรม

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

ดวงพร คันธโชติ. 2537. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียตามหนังสือเบอร์กี. ใน อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. หน้า 32 - 117. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์

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

ปทุมพร ฉิมเอนก. 2536. กรดแลกติกกับอาหารของชาวเอเชีย. อาหาร. 23 : 295 - 297.

ไปรมา ยงมานิตชัย. 2531. ไนซิน - สารกันบูดธรรมชาติ. อาหาร. 18 : 37 - 40.

พรรณี พึ่งรัศมี. 2538. โรคของสัตว์ที่ติดต่อมายังคน. ใน แบคทีเรียที่ก่อโรคบางตัว. หน้า 177 - 195. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์. 2538. การคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับผลิตไส้กรอกหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มัทนา แสงจินดาวงศ์. 2538ก. จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมงที่ผ่านกระบวนการ-หมัก. ใน จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง. หน้า 12 - 30. กรุงเทพฯ : ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มัทนา แสงจินดาวงศ์. 2538ข. คุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ประมง. ใน จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง. หน้า 86 - 133. กรุงเทพฯ : ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. 2536. จุลินทรีย์กับอุตสาหกรรม. ใน จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม จุลินทรีย์กับอุตสาหกรรม. หน้า 35 - 37. ชลบุรี : มหาวิทยาลัยบูรพา.

วรวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการแปรรูปอาหารโดยอาศัยการหมัก. ใน จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. หน้า 131 - 165. กรุงเทพฯ : ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

วิชาญ อันประยูร. 2537. วิธีการผลิตแหนมแบบดั้งเดิมและปัญหาของการผลิต. เอกสารประกอบการประชุมวิชาการ เรื่องทิศทางการผลิตแหนมยุคใหม่ ณ.โรงแรมปางสวนแก้ว จ. เชียงใหม่. 10 พฤศจิกายน 2537. หน้า 1 - 4

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. อาหารจากแลกติกแอสิดแบคทีเรียในประเทศไทย. โปรซีดดิงส์แลกติกแอสิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

วิทย์ เที่ยงบูรณธรรม. 2525. พจนานุกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, อ้างถึงใน มัทนา แสงจินดาวงศ์. 2538. จุลชีววิทยาของสัตว์น้ำที่แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก.ใน จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง. หน้า 12 - 32. กรุงเทพฯ : ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัย-เกษตรศาสตร์.

วิทิต วัฒนาวิบูล. 2529. มะพร้าวกลูโคสธรรมชาติ. อาหาร. 87: 48 - 49.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536ก. ผลิตภัณฑ์ผักดอง. ใน ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. หน้า 142 - 157. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์-มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536ข. อาหารหมักพื้นเมือง. ใน ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. หน้า 33 - 68. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. แบคทีเรียที่มีความสำคัญด้านอาหาร. ใน จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. หน้า 48 - 91. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูลและอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์. 2540. การแยกเชื้อ คัด-เชื้อ และเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย. สงขลานครินทร์ วทท. 19 : 181 - 188.

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลา-นครินทร์.

สายชล ชิวปรีชาและนภา โล่ห์ทอง. 2517. การใช้น้ำมะพร้าวเป็นอาหารเลี้ยงและเก็บเชื้อบักเตรีแลกติกเพื่อเสริมในอาหารสุกร. รายงานการประ-ชุมทางวิชาการเกษตรและชีววิทยาครั้งที่13. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

สิริพร สุธนเสาวภาคย์. 2535. กะปิ : แนวทางการพัฒนาคุณภาพเพื่อการส่งออก. อาหาร. 22 : 1 - 7.

สุกานดา วนิชวัฒนะ. 2538. การผลิตสารให้กลิ่นรสจากจุลินทรีย์. ว. วิทย มข . 23 : 60 - 71.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2535ก. อาหารและเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์. ใน จุลชีว-วิทยาทางอาหาร. หน้า 194 - 213. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2535ข. การติดเชื้อและการเป็นพิษของอาหารที่มีแบคทีเรียเป็นสาเหตุ. ใน จุลชีววิทยาทางอาหาร. หน้า 220 - 227. กรุงเทพฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร.

อภิญญา วงศ์กิดาการ. 2531. การวิเคราะห์ความแปรปรวนข้อมูลแบบจำแนกทางเดียว. ใน สถิติสำหรับชีววิทยา. หน้า 265 - 300. สงขลา : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อรนุช อุตรภิชาติ. 2530. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อซัลโมเนลลา และการผลิตกล้าเชื้อผงเพื่อใช้หมักแหนม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรพิน ภูมิภมร. 2526ก. ผลิตภัณฑ์ผักเปรี้ยว. ใน จุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอาหารหมักพื้นเมือง. หน้า 145 - 152. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

อรพิน ภูมิภมร. 2526ข. น้ำปลาและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก. ใน จุลินทรีย์ในเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์และอาหารหมักพื้นเมือง. หน้า 71 - 105. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาตร์.

Abdel - bar, N.M. and Harris, N.D. 1984. Inhibition effect of *Lactobacillus bulgaricus* on psychrotrophic bacteria in associative cultures and in refrigerated food. J. Food Prot. 47 : 61 - 64.

Acton, J. C., Dick, R. and Norris, E. L. 1977. Utilization of various carbohydrates in fermented sausage, อ้างถึงใน พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์.2538. การคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับผลิตไส้กรอกหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

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

Biswas, S.R., Ray, P., Johnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin AcH, by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 1265 - 1267.

Bogovic - Matijasic, B., Rogelj, I., Nes, F. and Holo, H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. Appl. Microbiol. Biotechnol. 49 : 606 - 612.

Carminati, D., Giraffa, G. and Bossi, M. G. 1988. Bacteriocin - like inhibitors of *Streptococcus lactis* against *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 52 : 614 - 617.

Chapman, R. and Sharpe, M.E. 1990. Microbiology of cheese. In Dairy Microbiology (the Microbiology of Milk Products). (ed. R. K. Robinson) pp. 203 - 290. New York : Elsevier Science Publishing Co Inc.

Child, R. 1974. Coconut. pp. 1 - 335. London : Longman.

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* O157 : H7 and *Listeria monocytogenes* in ground beef. J. Food Prot. 60 : 1560 - 1563.

Contreras, B.G.L., De Vuyst, D., Devreese, B., Busanyava, K.,Bosman, F., Raymaeckeras, J., Sablon, E. and Vandamme, E.J. 1997. Isolation, purification and amino acid sequence of lactobin A, one of the two bacteriocins produced by *Lactobacillus amylovorus* LMGP - 13139. Appl. Environ. Microbiol. 63 : 13 - 20.

Conventry, M. J.,Wan, J., Gordon, J. B., Mawson, R. F. and Hickey, M.W. 1996. Production of brevicin 286 by *Lactobacillus brevis* VB 286 and partial characterization. J. Appl. Bacteriol. 80: 91 - 98.

Daeschel, M.A.1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. J. Food Technol. 24 : 164 - 166.

Degnan, A.J., Piva, A. and Luchansky, J.B. 1996. Preservative of food using lactic acid bacteria and bacteriocins. Food Test. Anal. 2 :17 - 19.

De - Klerk, H. C. and Smit, J. A. 1967. Properties of a *Lactobacillus fermenti* bacteriocin. J. Gen. Microbiol. 48 : 309 - 316.

Delves - Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. J. Food Technol. 25 : 100 - 112.

Desai, P. and Sheth, T. 1997. Controlled fermentation of vegetables using mixed inoculum of lactic cultures. J. Food Sci. Technol. 34 : 155 - 158.

Desmazeaud, M. 1996. Growth inhibitors of lactic acid bacteria. In Dairy Starter Cultures. pp.131 - 153. New York :VCH Publishers, Inc.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994a. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications. pp. 91 - 142. Oxford : The Alden Press.

De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994b. Bacteriocins and bacteriocin - substances from *Lactobacillus*. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications. pp. 319 - 330. Oxford : The Alden Press.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994c. Lactic acid bacteria and bacteriocins : their practical importance. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications. pp.1 - 12. Oxford : The Alden Press.

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

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

Eijsink, V. G. H., Brurberg, M. B., Middelhoven, P. H. and Nes, I.F. 1996. Induction of bacteriocin production in *Lactobacillus sake* by a secreted peptide. J. Bacteriol. 178 : 2232 - 2237.

Enan, G., El - Essawy, A. A., Uyttendaele, M. and Debevere, J. 1996. Antibacterial activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 isolated from cheese. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 4381 - 4387.

Ennahar, S., Aoud - Werner, D., Sorokine, O., Dorsselaer, A.V., Bringel, F., Hubert, J. - C. and Hasselmann, C. 1996. Production of pedioc in AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from cheese. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 4381 - 4387.

Fleming, H.P., Etcfhells, J.L. and Costilow, R.L.1985. Microbial inhibition by an isolated of *Pediococus* from cocumber brines, quoted in Schillinger, V.S. and Lucke, F.- K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 1901 - 1906.

Goldin, B. R. and Gorbarch, S. L. 1984. The effect Of milk and *Lactobacillus* feeding on human intestinal bacterial enzyme

activity, quoted in Gillinland, S.E. 1989. Acidophilus milk products : a review of potential benefits to Consumers. J. Dairy Sci. 72 : 2483 - 2494.

Gonzalez, S.N., Apella, M.C., Romero, N.C., De Macias, M.E. and Oliver, G. 1993. Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strains used in fermented milk. J. Food Prot. 56 : 773 - 776.

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B. and Suarez, J. E. 1994. Detection, purification,and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of diary origin. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2158 - 2163.

Gupta, P. K., Mital, B. K. and Garg, S. K. 1996. Inhibitory activity of *Lactobacillus acidophilus* against different pathogens in milk. J. Food sci. Technol. 33 : 147 - 149.

Gupta, P. K., Mital, B. K. and Garg, S. K. 1997. Preparation and evaluation of acidophilus yoghurt. J. Food Sci. Technol. 34 : 168 -170.

Hammes, W. P. and Vogel, R. F. 1995. The genus *Lactobacillus*. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. (ed. B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel) pp. 19 - 49. Glasgow : Blackie Academic & Professional.

Holzapfel, W. H. and Wood, B. J. B. 1995. Lactic acid bacteria in contemporary perspective. In The Genera of Lactic Acid Bacteria. pp. 1 - 6. Glasgow : Blackie Academic & Professional.

Ibrahim, S. A. and Berkorovainy, A. 1992. Inhibition of *Escherichia coli* by *Bifidobacteria*. J. Food Prot. 56 : 713 - 715.

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

Jay, J.M. 1996a. Intrinsic and extrinsic parameters of foods that effect microbial growth. In Modern Food Microbiology. pp. 273 - 297. USA : Chapman & Hall.

Jay, J.M. 1996b. Food poisoning caused by gram - positive sporeforming bacteria. In Modern Food Microbiology. pp. 451 - 471. USA : Chapman & Hall.

Jimenez - Diaz, R., Rios-Sanchez, R.M., Desmazeaud, M., Riuz - Barba, J. L. and Piard, J. - C. 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocins produced by *Lactocillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 1416 - 1424.

Jin, L . Z., Ho, Y. W., Abdullah, N., Ali, M. A. and Jalaludin, A. 1996. Antagonistics of intestinal *Lactobacillus* isolates on pathogens of chicken. Lett. Appl. Microbiol. 23 : 67 - 71.

Kato, T., Matsuda, T., Ogawa, E., Ogawa, H., Kato, H., Doi, U. and Nakamura, R. 1994. Plantaricin - 149, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149. J. Ferment. Bioeng. 77 : 277 - 282.

Kelly, W. J., Asmundson, R. V. and Huang, C. M.1996. Characterization of plantaricin KW 30, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. J. Appl. Bacteriol. 81 : 657 - 662.

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

Klaenhammer, T.R., Fremaux, C., Ahn, C. and Milton, K. 1993. Molecular biology of bacteriocins produced by *Lactobacillus*. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. pp. 151 - 180. New York : Acacemic Press, Inc.

Klandler, O. and Weiss, N. 1986. Regular, nosporing gram - positive rod Bergey 's manual of systematic bacteriology. pp. 1208 - 1234. Baltimore : William & Wilkins.

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.

Kulshrestha, D.C. and Marth, E.H. 1970. Inhibition of lactic Streptococci and some pathogenic bacteria by certain milk - associated volatile compounds as measured by the disc assay, quoted in De vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications. pp. 91 - 142. Oxford : The Alden Press.

Lewus, C. B., Kaiser, A. and Montville, T. J. 1991. Inhibition of food - borne bacterial pathogens by bacteriocins from lactic acid bacteria isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 1683 - 1688.

Lewus, C. B. and Montville, T. J. 1992. Futher characterization of bacteriocins plantaricin BN, bavaricin MN and pediocin A. Food Biotechnol. 6 : 153 -174.

Mann, G. V. 1974. A Factor in yogurt with lower chlolesteremia in man, quoted in Jay, J.M. 1996. Fermentation and fermented dairy products. In Modern Food Microbiology. pp. 131 - 148. New York : Chapman & Hall.

Matlagh, A. M., Johnson, M. C. and Ray, B. 1991. Viability loss of food - borne pathogens by starter culture metabolites. J. Food Prot. 54 : 873 - 878.

Mortvedt - Abildgaard, C. I., Nissen - Meyer, J., Jelle, B., Grenov, B., Skaugen, M. and Nes, I. F. 1995. Production and pH - dependent bactericidal activity of lactocin S, a lantibiotic from *Lactobacillus sake* L45. Appl. Environ. Microbiol. 61 : 175 - 179.

Muriana, P.M. 1996. Bacteriocins for control of *Listeria* spp. in food. J. Food Prot. 59 (Suppl.) : 54 - 63.

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

Perdigon, G.S., Alvarez, S., DcMacias, M.E.N., Margni, R.A., Oliver, G. and DcRuiz Holgado, A.A.P.1986. Lactobacilli administered orally induce release of enzyme from peritoneal macrophages in mice, quoted in Gillinland, S.E.1989. Acidophilus milk products : a review of potential benefits to consumers. J. Dairy Sci. 72 : 2483 - 2494.

Pinheiri, A. J. R., Liska, B. J. and Parmelee, C. E. 1968. Properties of substances Intibitory of *Pseudomonas fragi* produced by *Streptococcus citrovorus* and *Streptococcus diacetilactis*. J. Dairy Sci. 57 : 183 - 187.

Rekhif, N., Atrih, A. and Lefebvre, G. 1994. Characterization and partial purification of plantaricin LC74, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LC74. Biotechnol. Lett. 16 : 771 - 776.

Sarkar, P. K. and Banerjee, S. 1996. Antibacterial activity of lactic acid bacterial isolates obtained from natural habitats. J. Food Sci. Technol. 33 : 231 - 233.

Schillinger, V. S. and Lucke, F. - K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 1901 - 1906.

Singloton, P. and Sainsbury, D. 1987. Dictionary of microbiology and molecular biology. pp. 486 - 940. Chichester : John Wiley & Sons.

Smith, J. L. and Palumbo, S.A. 1983. Use of starter culture in meats. J. Food Prot. 46 : 997 - 1006.

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.

Spillmann, H., Puhan, Z. and Banhegyi, M. 1978. Antimicrobial activity thermophile *Lactobacillus*, quoted in De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetic and Application. pp.91 - 142. Oxford : The Alden Press.

Steinkraus, K.H. 1992. Lactic acid fermentations. In Biotechnology to Traditional Fermented Foods. pp. 43 - 51. New York : National Academy Press.

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

Tahara, T. and Kanatoni, K. 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1129, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. J. Appl. Bacteriol. 81 : 669 - 677.

Tamblyn, K.C. and Conner, D.E. 1997. Bactericidal activity of organic acids against *Salmonella typhimurium* attached to broiler chicken skin. J. Food Prot. 60 : 629 - 633.

Thompson, J.K., Collins, M.A. and Mercer, W.D. 1996. Characterization of a proteinaceous antimicrobial produced by *Lactobacillus helviticus* CNRZ 450. J. Appl. Bacteriol. 80 : 338 - 348.

Torriani, S., Orsi, c. and Vescovo, M. 1997. Potential of *Lactobacillus casei*, culture permeate, and lactic acid to control microorganisms in ready - to - use vegetables. J. Food Prot. 60 : 1564 - 1567.

Vescovo, M., Torriani, S., Orsi, C., Macchiarolo, F. and Scolari, G. 1996. Application of antimicrobial - producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready - to - use vegetable. J. Appl. Bacteriol. 81: 113 - 119.

Yan, T. R. and Lee, C. S. 1997. Characterization of a partially purified bacteriocin, fermencin B, from *Lactobacillus fermentum.* Biotechnol. Lett. 19 : 741 - 744.

Yang, R. and Ray, B.1994. Factors Influencing production of bacteriocins by lactic acid bacteria. J. Food Microbiol. 11 : 281 - 291.

Ziauddin, K.S., Roa, H.S. and Amla, B.L. 1993. In vitro study on the effect of lactic acid and sodium chloride on spoilage and pathogenic bacteria of meat. J. Food Sci. Technol. 33: 255 - 258.

Ziauddin, K.S., Roa, H.S. and Fairoze, N. 1996. Effect of organic acids and spices on quality and shelf - life of meats at ambient temperature. J. Food Sci. Technol. 33: 255 - 258.

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

APT Agar

Bacto Yeast Extract	7.5	กรัม
Bacto Tryptone	12.5	กรัม
Bacto Dextrose	10	กรัม
Sodium Citrate Thiamine	5	กรัม
Hydrochloride	0.001	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Dipotassium Phosphate	5	กรัม
Manganese Chloride	0.14	กรัม
Magnesium sulfate	0.8	กรัม
Ferrous Sulfate	0.04	กรัม
Sorbitan Monooleate Complex	0.2	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

BHI

Calf Brains, Infusion from	200	กรัม
Beef Heart, infusion from	250	กรัม
Bacto Proteose Peptone	10	กรัม
Bacto Dextrose	2	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Disodium Phosphate	2.5	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

CJ Agar

Peptone	10	กรัม
Yeast Extract	5	กรัม
Sodium Acetate	5	กรัม
Ammonium Citrate	2	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
Bacto Agar	15	กรัม
น้ำมะพร้าวแก่	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.8 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

Carbohydrate Fermentation Medium

ใช้อาหาร MRS ที่ไม่มีกลูโคส และเติมคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการลงไปร้อยละ 1 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 10 นาที แช่น้ำเย็นทันทีเพื่อให้อุณหภูมิลดลงอย่างรวดเร็ว

EMB Agar

Bacto Peptone	10	กรัม
Bacto Lactose	5	กรัม
Bacto Sucrose	5	กรัม
Dipotassium Phosphate	2	กรัม
Bacto Agar	13.5	กรัม
Eosin Y	0.4	กรัม
Methylene Blue	0.065	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

MRS Agar

Bacto Proteose Peptone No.3	10	กรัม
Bacto Beef Extract	10	กรัม
Bacto Yeast Extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Sorbitan Monooleate Complex	1	กรัม
Ammonium Citrate	2	กรัม
Sodium Acetate	5	กรัม
Magnesium Sulfate	0.1	กรัม

Potassium Phosphate, Dibasic	0.05	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.5 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

MSA

Bacto Proteose Peptone No.3	10	กรัม
Bacto Beef Extract	1	กรัม
Bacto D - Mannitol	10	กรัม
Sodium Chloride	75	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม
Bacto Phenol Red	0.025	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

NA

Bacto Beef Extract	3	กรัม
Bacto Peptone	5	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.2 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

SS Agar

Bacto Beef Extract	5	กรัม
Bacto Proteose Peptone	5	กรัม
Bacto Lactose	10	กรัม
Bacto Bile Salts No.3	8.5	กรัม
Sodium Citrate	8.5	กรัม
Sodium Thiosulfate	8.5	กรัม
Ferric Citrate	1	กรัม
Bacto Agar	13.5	กรัม
Brilliant Green	0.33	มิลลิกรัม
Neutral Red	0.025	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร
pH	7.0	

นำไปต้มให้เดือดไม่เกิน 2 - 3 นาที ไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

TJ Agar

Tomato Juice (400 ml)	20	กรัม
Bacto Peptone	10	กรัม
Peptonized Milk	10	กรัม
Bacto Agar	11	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 6.7 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที

TSA - Polymyxin B

Bacto Tryptone Pancreatic Digest of Casein	15	กรัม
Bacto Soytone Pancreatic Digest of Casein	5	กรัม
Sodium Chloride	5	กรัม
Polymyxin B	1.5	กรัม
Bacto Agar	15	กรัม
Distilled water	1000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน ปรับ pH ให้เท่ากับ 7.3 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว 15 นาที ตั้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 45° ซ เติม Polymyxin B ลงไป ผสมให้เข้ากัน

ตาราง 1 การเทียบเคียงแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* spp. กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli

(Klandler and Weiss, 1986)

Species	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
1a. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*	−	−	d	−	+	−	+	−	−	d	−	+	−	−	−	−	−	−	+	+	d	−
1b. *L. delbrueckii* subsp. *lactis*	+	−	d	+	+	d	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−
1c. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	−	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
2. *L. acidophilus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	d	d	−	−	+	+	+	d	−
3. *L. amylophilus*	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−
4. *L. amylovorus*	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−
5. *L. animalis*	d	d	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	+	+	−	−
6. *L. crispatus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−
7. *L. farciminis*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−
8. *L. gasseri*	+	−	+	+	+	+	+	−	d	d	−	+	−	d	d	−	−	+	+	+	d	−
9. *L. helveticus*	−	−	−	−	d	+	+	−	+	d	−	d	−	−	−	−	−	−	+	−	d	−
10. *L. jensenii*	+	−	+	+	+	+	+	−	−	d	d	+	−	−	−	−	−	+	+	+	+	−
11. *L. ruminis*	+	−	+	+	+	+	+	−	d	+	−	+	−	+	+	d[b]	−	d[b]	+	+	+	−
12. *L. salivarius*	−	−	−	d[b]	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	−	−	+	+	−	+	−
13. *L. sharpeae*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−
14. *L. vitulinus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	d	+	d	−
15. *L. yamanashiensis*	+	−	d	+	+	d	+	−	−	−	−	+	−	−	−	d	−	+	+	+	+	−

ตาราง 2 การเทียบเคียงแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* spp. กลุ่ม Facultative heterofermentative lactobacilli

(Klandler and Weiss, 1986)

Species	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
16. *L. agilis*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	d	+	+	−
17. *L. alimentarius*	v	d	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+	−
18. *L. bavaricus*	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−	+	−	−
19a. *L. casei* subsp. *casei*	+	−	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	−	−
19b. *L. casei* subsp. *pseudoplantarum*	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
19c. *L. casei* subsp. *rhamnosus*	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−
19d. *L. casei* subsp. *tolerans*	−	−	−	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
20a. *L. coryniformis* subsp. *coryniformis*	−	−	−	d	+	+	+	+	d	+	+	+	−	d	d	+	−	d	d	+	−	−
20b. *L. coryniformis* subsp. *torquens*	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	d	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
21. *L. curvatus*	−	−	+	+	+	+	+	+	d	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
22. *L. homohiochii*	−	−	d	v	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	+	d	−	−	d	−
23. *L. maltaromicus*	+	−	+	o	+	+	+	o	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−
24. *L. murinus*	d	+	+	+	+	+	+	−	+	+	d	+	−	+	+	−	+	d	−	+	d	−
25. *L. plantarum*	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	−	+	+	+	+	+	d
26. *L. sake*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+	−

ตาราง 3 การเทียบเคียงแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* spp. กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli (Klandler and Weiss, 1986)

Species	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
27. *L. bifermentans*	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−
28. *L. brevis*	−	+	−	d	+	d	+	+	d	+	−	−	−	+	d	−	+	−	−	d	−	d
29. *L. buchneri*	−	+	−	d	+	d	+	+	d	+	−	−	−	+	d	−	+	−	−	d	−	d
30. *L. collinoides*	−	+	−	+	+	+	+	+	d	+	−	−	−	+	−	−	+	d	−	d	−	+
31. *L. confusus*	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	−	+
32. *L. divergens*	+	−	+	o	+	d	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+	+
33. *L. fermentum*	−	d	d	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+	−	−	+	d	+
34. *L. fructivorans*	−	−	−	−	+	−	+	d	−	d	−	−	−	−	−	−	+	−	−	d	−	−
35. *L. fructosus*	o	−	−	o	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
36. *L. halotolerans*	−	−	−	−	+	−	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	+
37. *L. hilgardii*	−	−	−	−	+	d	+	+	d	+	−	−	d	−	−	−	+	−	−	d	−	+
38. *L. kandleri*	−	−	−	−	+	+	+	+	−	+	+	−	−	−	−	o	+	−	−	−	−	−
39. *L. kefir*	−	d	−	−	+	−	+	+	+	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−
40. *L. minor*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	−	+	+	−
41. *L. reuteri*	o	+	−	o	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+	−	−	+	−	−
42. *L. sanfrancisco*	o	−	−	o	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
43. *L. vaccinostercus*	−	+	+	−	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+
44. *L. viridescens*	−	−	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	d	d	−

ตาราง 4 การเทียบเคียงแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* spp. กลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli (Hammes and Vogel, 1995)

Species*	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	Lactic acid isomer(s)	Growth (°C) 15/45	NH_3 from arginine	Carbohydrates fermented†											
							Amygdalin	Cellobiose	Galactose	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melibiose	Raffinose	Salicin	Sucrose	Trehalose
1 *Lb. acidophilus*	a	Lys-DAsp	34–37	DL	−/+	−	+	+	+	+	+	−	+	d	d	+	+	d
2 *Lb. amylophilus*	a	Lys-DAsp	44–46	L	+/−	ND	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−
3 *Lb. amylovorus*	a	Lys-DAsp	40–41	DL	−/+	ND	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+	+
4 *Lb. crispatus*	a	Lys-DAsp	35–38	DL	−/+	−	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	−
5a *Lb. debrueckii* subsp. *bulgaricus*	a	Lys-DAsp	49–51	D	−/+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
5b *Lb. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*	a	Lys-DAsp	49–51	D	−/+	d	−	d	−	−	d	−	+	−	−	−	+	d
5c *Lb. delbrueckii* subsp. *lactis*	a	Lys-DAsp	49–51	D	−/+	d	+	d	d	+	+	−	+	−	−	+	+	+
6 *Lb. gallinarum*	a	Lys-DAsp	36–37	DL	+/+	ND	+	+	+	d	+	−	+	+	+	+	+	−
7 *Lb. gasseri*	a	Lys-DAsp	33–35	DL	−/+	−	+	+	+	d	d	−	+	d	d	+	+	d
8 *Lb. helveticus*	a	Lys-DAsp	38–40	DL	−/+	−	−	−	+	+	d	−	d	−	−	−	−	d
9 *Lb. jensenii*	a	Lys-DAsp	35–37	D	−/+	+	+	+	+	−	d	d	+	−	−	+	+	+
10 *Lb. johnsonii*	a	Lys-DAsp	33–35	DL	+/+	ND	+	+	+	d	+	−	+	d	d	+	+	d
11 *Lb. kefirano-faciens*	a	ND	34–35	D(L)	−/−	ND	−	−	+	+	+	−	ND	+	+	−	+	−
12a *Lb. aviarius* subsp. *araffinosus*	b	Lys-DAsp	39–43	L(D)	−/ND	ND	d	d	−	−	+	−	+	−	−	d	+	+
12b *Lb. aviarius* subsp. *aviarius*	b	Lys-DAsp	39–43	DL	−/ND	ND	d	+	d	d	+	−	+	d	+	+	+	+
13 *Lb. farciminis*	b	Lys-DAsp	34–36	L(D)	+/−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	+	+
14a *Lb. salivarius* subsp. *salicinus*	b	Lys-DAsp	34–36	L	−/+	−	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+
14b *Lb. salivarius* subsp. *salivarius*	b	Lys-DAsp	34–36	L	−/+	−	−	−	+	+	+	+	−	+	+	−	+	+
15 *Lb. mali*	b	DAP	32–34	L	+/−	−	+	d	d	−	−	−	+	−	−	+	+	+
16 *Lb. ruminis*	b	DAP	44–47	L	−/d	−	+	+	+	d	+	−	+	+	+	+	+	−
17 *Lb. sharpeae*	b	DAP	53	L	+/−	−	+	+	+	+	+	−	+	−	−	+	−	−

ตาราง 5 การเทียบเคียงแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* spp. กลุ่ม Facultative heterofermentative lactobacilli (Hammes and Vogel, 1995)

	Species*	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	Lactic acid isomer(s)	Growth (°C) 15/45	Carbohydrates fermented† Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Gluconate	Mannitol	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sorbitol	Sucrose	Xylose
18	*Lb. acetotolerans*	a	Lys-DAsp	35–36.5	DL	−/−	−	−	d	+	−	d	−	−	−	d	−	−	−
19	*Lb. hamsteri*	a	Lys-DAsp	33–35	DL	−/ND	ND	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	d
20	*Lb. alimentarius*	b	Lys-DAsp	36–37	L(D)	+/−	ND	d	+	+	+	−	−	−	−	+	−	+	−
21	*Lb. bifermentans*	b	Lys-DAsp	45	DL	+/−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	+	+	−	−
22	*Lb. casei*	b	Lys-DAsp	45–47	L	+/−	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−
23a	*Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis*	b	Lys-DAsp	45	D(L)	+/−	−	−	−	d	+	+	−	d	d	−	d	+	−
23b	*Lb. coryniformis* subsp. *torquens*	b	Lys-DAsp	45	D	+/−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−	+	−
24	*Lb. curvatus*	b	Lys-DAsp	42–44	DL	+/−	−	−	+	+	+	−	−	−	−	+	−	d	−
25	*Lb. graminis*	b	Lys-DAsp	41–43	DL	+/−	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−	−	+	+
26	*Lb. homohiochii*	b	Lys-DAsp	35–38	DL	+/−	−	−	d	ND	−	d	−	−	−	d	−	−	−
27	*Lb. intestinalis*	b	Lys-DAsp	33–35	DL	−/+	−	−	d	−	ND	+	−	d	d	d	−	+	−
28	*Lb. murinus*	b	Lys-DAsp	43–44	L	−/+	d	+	+	+	−	d	−	+	+	+	−	+	−
29a	*Lb. paracasei* subsp. *paracasei*	b	Lys-DAsp	45–47	L/DL‡	+/d	+	−	+	+	+	+	+	−	−	+	d	+	−
29b	*Lb. paracasei* subsp. *tolerans*	b	Lys-DAsp	45–47	L	+/−	−	−	−	−	w	−	−	−	−	−	−	−	−
30	*Lb. rhamnosus*	b	Lys-DAsp	45–47	L	+/+	+	d	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	−
31	*Lb. sake*	b	Lys-DAsp	42–44	DL	+/−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	+	−	+	−
32	*Lb. agilis*	b	DAP	43–44	L	−/+	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+	d	+	−
33	*Lb. pentosus*	b	DAP	46–47	DL	+/−	+	+	+	ND	+	+	d	+	+	+	+	+	+
34	*Lb. plantarum*	b	DAP	44–46	DL	+/−	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d

ตาราง 6 การเทียบเคียงแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* spp. กลุ่ม Obligately heterofermentative lactobacilli

(Klandler and Weiss, 1986)

Species†	Phylogenetic grouping	Peptidoglycan type	G+C content (mol(%))	Growth (°C) 15/45	NH_3 from arginine	Carbohydrates fermented‡ Arabinose	Cellobiose	Esculin	Galactose	Maltose	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Ribose	Sucrose	Trehalose	Xylose
35 *Lb. brevis*	b	Lys-D-Asp	44–47	+/−	+	+	−	d	d	+	−	−	+	d	+	d	−	d
36 *Lb. buchneri*	b	Lys-D-Asp	44–46	+/−	+	+	−	d	d	+	−	+	+	d	+	d	−	d
37 *Lb. collinoides*§	b	Lys-D-Asp	46	+/−	+	+	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	+
38 *Lb. fermentum*	b	Orn-D-Asp	52–54	−/+	+	d	d	−	+	+	w	−	+	+	+	+	d	d
39 *Lb. fructivorans*	b	Lys-D-Asp	38–41	+/−	+	−	−	−	−	d	−	−	−	−	w	d	−	−
40 *Lb. hilgardii*	b	Lys-D-Asp	39–41	+/−	+	−	−	−	d	+	−	d	−	−	+	d	−	+
41 *Lb. kefir*	b	Lys-D-Asp	41–42	+/−	+	d	−	−	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−
42 *Lb. male-fermentans*§	b	Lys-D-Asp	41–42	+/−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−
43 *Lb. oris*	b	Lys-D-Asp	49–51	−/d	−	+	d	d	+	+	d	−	+	+	+	+	d	+
44 *Lb. parabuchneri*	b	Lys-D-Asp	44	+/ND	+	+	−	−	+	+	ND	+	+	+	+	+	−	−
45 *Lb. reuteri*	b	Lys-D-Asp	40–42	−/+	+	+	−	ND	+	+	−	−	+	+	+	+	−	−
46 *Lb. pontis*	b	Orn-D-Asp	53–55	+/+	+	−	−	−	d	+	−	−	d	d	+	+		−
47 *Lb. vaginalis*	b	Orn-D-Asp	38–41	−/+	ND	−	−	d	+	+	+	−	+	+	d	+	−	−
48 *Lb. suebicus*	b	DAP	40	+/d	ND	+	d	−	+	+	ND	−	d	−	+	d	−	+
49 *Lb. vaccinostercus*	b	DAP	36	−/−	−	+	w	−	w	+	−	−	−	−	+	−	−	+
50 *Lb. sanfrancisco*	b	Lys-Ala	36–38	+/−	−	−	−	ND	d	+	−	−	−	−	d	d	−	−
51 *Lb. confusus*	c	Lys-Ala	45–47	+/+	+	−	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+
52 *Lb. fructosus*	c	Lys-Ala	47	+/−	−	−	−	ND	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
53 *Lb. halotolerans*	c	Lys-Ala-Ser	45	+/−	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	+	−	+	−
54 *Lb. viridescens*	c	Lys-Ala-Ser	41–44	+/−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−	d	d	−
55 *Lb. kandleri*	c	Lys-Ala-Gly-Ala_2	39	+/−	+	−	−	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−
56 *Lb. minor*	c	Lys-Ser-Ala_2	44	+/−	+	−	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางสาว อรัญญา สังขศรี

วัน เดือน ปีเกิด 21 กรกฎาคม 2517

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีที่สำเร็จการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต (เทคโนโลยีการประมง)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี	2539

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน