

บทที่ 4

สรุปผลการทดลอง

เมื่อนำอาหารหมักของไทย 23 ชนิด ได้แก่ บูด ปลาแป้งแดง จิ้งจิง ไตปลา ปลาร้า กุ้งส้ม หนาง น้ำเคย ไข่กรอกเปรี้ยว ปลาต้มพริก แหนม ผักกาดคอง ผักเสี้ยนคอง สะตอคอง ขนมหิน หัวไชโป๊ หน่อไม้คอง กระเทียมคอง บัวหิมะ และข้าวหมาก มาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกโดยวิธี plate count technique พบว่า อาหารหมักจากสัตว์ และอาหารหมักจากพืชมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง $9.5 \times 10^5 - 4 \times 10^9$ CFU/g และ $5.5 \times 10^6 - 6.5 \times 10^9$ CFU/g ตามลำดับ จำนวนอาหารหมัก 180 ตัวอย่างสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ทั้งหมด 88 ตัวอย่าง และจำนวนเชื้อที่แยกได้มี 328 สายพันธุ์

เมื่อทำการย้อมสีแกรม พบว่า ดิคลีสแกรมบวก มีรูปร่างกลมและแท่ง การเรียงตัวเป็นแบบโซ่ กระจาย คู่ และเรียงตัวแบบสี่เหลี่ยมติดกัน ทดสอบการสร้างเอนไซม์อะคาเลส ให้ผลลบ

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 328 สายพันธุ์มาศึกษาสมบัติซึ่งทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการว่าเหมาะสมสำหรับใช้เป็นโพรไบโอติกตามลำดับ พบว่า แบคทีเรียแลกติกสามารถทนต่อเกลือน้ำเค็มที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.15 หรือ 0.30 (291 สายพันธุ์) ทนต่อความเป็นกรดที่ระดับ pH 1, 2, 3, 4 และ 5 (290 สายพันธุ์) สามารถย่อยโปรตีนหรือไขมันหรือแป้ง (165 สายพันธุ์) สามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (83 สายพันธุ์) สามารถเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี12 (67 สายพันธุ์) ไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicilin (10 μ g), cephalothin (30 μ g), cefoperazone (75 μ g), tetracycline (30 μ g) และ chloramphenicol (30 μ g) (67 สายพันธุ์) และคือต่อยาปฏิชีวนะ vancomycin (30 μ g), kanamycin (30 μ g), streptomycin (10 μ g), norfloxacin (10 μ g) และ polymyxin B (300 μ g) (67 สายพันธุ์) จากการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 5 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 สามารถยับยั้งแบคทีเรีย

อินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 13 สายพันธุ์คือ *B. cereus*, *S. aureus* ATCC 25923, *S. typhimurium*, *S. typhi*, *E. coli* ATCC 25922, *S. sonnei*, *E. coli* O157 : H7, *V. parahemolyticus*, *P. rettgeri*, *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris* และ *S. flexneri* และ inhibition zone ที่เกิดจากการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ทดสอบในสภาวะที่ไม่จำกัดการสร้างกรดแลคติก และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีขนาดใหญ่กว่าการยับยั้งที่ทดสอบในสภาพที่จำกัดกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เกิดจากสารยับยั้ง เช่น กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์ มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 13 สายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่า สายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 สามารถสร้างสารยับยั้ง *B. cereus*, *V. parahemolyticus*, *P. rettgeri*, *E. aerogenes*, *P. vulgaris* และ *S. flexneri* ได้อย่างสมบูรณ์ คือ ร้อยละ 100 สำหรับแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สายพันธุ์อื่นๆถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติกโดยมีร้อยละการยับยั้งอยู่ระหว่าง 80-99.6 ทดสอบความสามารถอยู่รอดที่ระดับ pH 2, 3 และ 4 พบว่าแบคทีเรียแลคติก 5 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 สามารถอยู่รอดที่ระดับ pH4 > pH3 > pH2 และทดสอบการเจริญในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์ พบว่า ค่าการดูดกลืนแสง (O.D.66 nm) ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 36 ชม. ของแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SPY2 (25g/l soy peptone, 25 g/l yeast extract และ 25g/l glucose monohydrate) และในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงว่าแบคทีเรียแลคติก 5 สายพันธุ์ สามารถเจริญได้ทั้งในอาหารเลี้ยงเชื้อ SPY2 และ MRS สำหรับการศึกษากการเจริญโดยการนับจำนวนแบคทีเรียแลคติก (\log_{10} CFU/ml) ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 36 ชม. ก็ให้ผลการเจริญสอดคล้องกับการวัดค่าการดูดกลืนแสง คือ 5 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ใน MRS broth และ SPY2 โดยค่าการเจริญไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

นำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์ มาศึกษาการเจริญใน MRS broth พบว่า เชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ มี lag phase เท่ากัน คือ ประมาณ 3 ชม. จะเจริญเข้าสู่ log phase จน

ถึงชม.ที่ 18 และเจริญเข้าสู่ stationary phase ชม.ที่ 21-28 จะเห็นได้ว่า สายพันธุ์ LA71 สามารถเจริญได้ดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ

นำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์ มาศึกษาลักษณะต่างๆเพื่อเทียบเคียงชนิดพบว่า ประกอบด้วย *Pediococcus pentosaceus* (LA6), *Lactobacillus casei* (LA13), *L. plantarum* (LA71), *L. plantarum* (LA102) และ *L. delbrueckii* (LA198) ส่วนแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาด (LA1) ใช้เป็นตัวแทนเปรียบเทียบ คือ *L. casei*

แบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 สายพันธุ์ ได้แก่ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 มีสมบัติดีกว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาด (LA1) ดังนี้ คือ สามารถทนต่อกรดที่ระดับ pH 1, 2, 3, 4 และ 5 สามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 13 สายพันธุ์ โดยวิธี agar spot สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 13 สายพันธุ์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันซึ่งมีร้อยละการยับยั้งอยู่ระหว่าง 80-100 สามารถในการอยู่รอดที่ระดับ pH 2, 3 และ 4 และสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์ และสายพันธุ์ LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 มีสมบัติใกล้เคียงกับแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากนมเปรี้ยวที่จำหน่ายตามท้องตลาด (LA1) ดังนี้ คือ สามารถทนต่อเกลือน้ำเค็มที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 0.30 สามารถในการย่อยโปรตีน หรือไขมัน หรือแป้ง สามารถในการเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน สามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 คือและไวต่อยาปฏิชีวนะ จะเห็นได้ว่า LA71 มีสมบัติการเป็นโปรไบโอติกดีกว่าสายพันธุ์อื่นๆ อย่างไรก็ตามเชื่อทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มีสมบัติที่ทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการว่าเหมาะสมสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติก