วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1.อาหารหมักที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแลกติก

อาหารหมักจากพืช เช่น ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก ซีเซ็กฉ่าย สะตอดอง ขนมจีน หัวไชโป้ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง และตั้งฉ่าย ตัวอย่างเหล่านี้เก็บจากตลาดสดหรือตลาดนัดในอำเภอ หาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และผักดองชนิดต่างๆที่หมักเองในห้องปฏิบัติการ เช่น หน่อไม้ดอง ผักเสี้ยนดอง กระหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง เพื่อเก็บตัวอย่างทุกวันของอายุการหมัก เพราะแบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทในการหมักแต่ละระยะจะแตกต่างกัน จำนวนรวม 152 ตัวอย่าง

2.การแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างอาหารหมัก streak บนอาหาร MRS agar (De Man Rogosa and Sharpe agar (Difco))ที่เติม bromocresol purple 0.04% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม เก็บโคโลนีเชื้อที่รอบโคโลนีเป็นสีเหลือง และมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน มาทำให้บริสุทธิ์ โดยวิธีการ streak บนอาหาร MRS agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. นำมาย้อมสีแกรม ดูการติดสี รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลกติกติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน MRS agar slant ในตู้เย็น ถ่ายเชื้อทุก 2 สัปดาห์

3.การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ไปทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ดังนี้

3.1 การทนต่อเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากข้อ 2 มา streak ลงบน MRS agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (bile salt) 0.30 % แล้วนำเชื้อมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร

3.2 การทนต่อกรด

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 ถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 6 มล ที่มีการปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ 3 และ 4 นำเชื้อมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร

3.3 การเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ถ่ายลงใน MRS broth เชื้อละ 4 หลอด แบ่งเชื้อเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 คลายฝาเกลียว เก็บใน anaerobic jar แล้วนำไปบ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 24

ชม. ชุดที่ 2 นำไปบ่มที่ 35 °C ภายใต้สภาวะที่มีอากาศเป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญทั้ง 2 สภาวะ

3.4 การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน B12

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 ถ่ายลงในหลอดอาหาร vitamin B12 assay medium (Difco) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร โดยใช้ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* เป็นเชื้อเปรียบเทียบ

3.5 ความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ทดสอบด้วยวิธี การยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot method) (Spelhaug and Harlander, 1989) โดย ใช้แบคทีเรียแลกติก ที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18 ชม. นำมาปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland (จำนวนประมาณ 10^8 CFU/มล.) จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^7 CFU/มล.หยดลงบนอาหาร MRS agar เชื้อละ 5 ไมโครลิตร แต่ละเชื้อห่างกัน 3 ซม. จานละ 4 เชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง บ่มเชื้อที่ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำมาเททับด้วย BHI soft agar มีวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 7 มล ซึ่งมีแบคทีเรียก่อโรคจำนวนประมาณ 10^6 CFU/มล (แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ได้แก่ *Salmonella typhimurium, S. typhi S. enteritidis, S. paratyphi* ., *E. coli* O157 : H7 4 สายพันธุ์) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจผลการยับยั้ง คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีคือมีวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) จากขอบแบคทีเรียแลกติกจนสุดขอบวงใสมากกว่า 10 มม. ไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.6 ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง (Michael and Pelezar, 1995)

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Milk agar Casein agar Tributyrin agar และStarch agar นำ ไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48-72 ชม. ตรวจผลการย่อยโปรตีน โดยวัดวงใสรอบๆโคโลนีของเชื้อบนอาหาร Milk และ Casein agar การย่อยไขมัน โดยวัดวงใสรอบๆโคโลนีของเชื้อบนอาหาร Tributyrin agar ทดสอบการย่อยแป้งโดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหารStarch agar ถ้ามีการย่อยแป้งเกิดวงใสรอบๆโคโลนี คำนวณหา degree of hydrolysis

3.7. การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ(ดัดแปลงจาก Charteris *et al.*, 1998)

ใช้ cotton swab ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ที่เลี้ยงใน MRS broth อายุประมาณ 18-24 ชั่วโมง ปรับให้มีความขุ่น 0.5 Mc Farland (จำนวนประมาณ 10^8 CFU/มล) นำไปป้าย (swab)ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร MRS agar แล้วปล่อยให้แห้ง 3-5 นาที จากนั้นวาง antibiotic discs ได้แก่ penicillin G (10μg), ampicillin (10μg), cephalothin (30μg), ceftazidime (30μg), cefoperazone (75μg), vancomycin (30μg), bacitracin (10μg), gentamicin (10μg), kanamycin (30μg), streptomycin (10μg), tetracycline (30μg), chloramphenicol (30μg), erythromycin (15μg),

norfloxacin (10μg) และ polymyxin B (30μg) วางลงบนบริเวณที่ป้ายเชื้อไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. รายงานผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใส (inhibition zone) แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อดูว่าเชื้อดังกล่าว ไว (sensitive) หรือ ต้านทาน (resistant) ต่อยาปฏิชีวนะนั้นๆ

4. ความสามารถในการเติบโตในอาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารจากสัตว์

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีจำนวนประมาณ 10^4 CFU/มล. ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth และอาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารจากสัตว์ได้แก่ soy peptone yeast extract agar (SPY2) (ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย soy peptone, yeast extract และน้ำตาลกลูโคส อย่างละ 25 กรัม) (Heenan *et al.*, 2002) อาหารน้ำมะพร้าว (ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย yeast extract 5 กรัม Sodium acetate 5 กรัม Amonium citrate 2 กรัม Tween 80 1 มล. น้ำมะพร้าวแก่ 1 ลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. นับจำนวนเชื้อโดยวิธี pour plate ด้วย MRS agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชม. และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญใน MRS broth SPY2 และ อาหารน้ำมะพร้าว คัดเลือกเชื้อที่สามารถเติบโตได้ดีในอาหาร SPY2 และ อาหารน้ำมะพร้าวไว้ศึกษาต่อไป

5. การบ่งชี้ชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยใช้ API 50 CHL ของบริษัท Biomerieux

6. การหมักและความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในอาหารหมักจากพืช

6.1 การหมักน้ำแครอท

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ที่มีอายุ 24 ชม. จำนวน 0.1 ml ถ่ายลงใน อาหารเหลวน้ำมะพร้าว ปริมาตร 10 ml นำไปบ่ม ที่มีอุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 24 ชม. นำมาปรับให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นมากกว่า10^6 CFU/มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25x200มม. ที่บรรจุน้ำแครอทที่ไม่มีการเติมส่วนประกอบอื่นที่ปราศจากเชื้อ 15 มล. หมักไว้ที่ 35 °C ตรวจนับจำนวนเชื้อ วัดพีเอช ปริมาณกรดแลกติก หลังการหมักที่ 0 24 48 และ72 ชั่วโมง นำน้ำแครอทหมักที่ได้มาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยใช้น้ำแครอทหมักปริมาตร 100 μl หยดในcupที่วางบนอาหาร BHI agar ที่มี *E. coli* O157: H7 และ *S. typhi* บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจผลการยับยั้ง โดยวัดจากวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone)

6.2 ศึกษาความสามารถในการอยู่รอดในน้ำแครอทหมัก

ศึกษาผลการเก็บรักษาน้ำแครอทหมักไว้ที่อุณหภมิ 4 °C ต่อการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยเก็บน้ำแครอทหมักหลัง 72 ชั่วโมงที่ได้จากข้อ 6.1 ไ ว้ที่ อุณหภมิ

4 °C โดยนำมาตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่เหลือรอดโดยวิธี pour plate ทุก 3 วันเป็นเวลา 15 วัน

ผลการทดลอง และวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างอาหารหมักจากพืช ได้แก่ ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง สะตอดอง หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง ซีเซ็กฉ่าย ขนมจีน หัวไชโป๊ ตั้งฉ่าย ข้าวหมาก และขนมจีน จำนวนรวม 152 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 225 สายพันธุ์ (Table 1) เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ ไปทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่การอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารโดยการทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.30 % และทนต่อกรดในกระเพาะอาหารซึ่งที่ระดับพีเอช 3 (Erkkila and Petaja, 2000) พบว่าแบคทีเรียแลกติกสามารถทนต่อเกลือน้ำดี 0.3 % ได้จำนวน 156 สายพันธุ์ สามารถทนต่อกรดพีเอช 3 ได้ 69 สายพันธุ์ และเมื่อนำมาทดสอบการเจริญทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน เพื่อความสะดวกในการผลิตเชื้อจำนวนมากรวมถึงการเก็บรักษาเชื้อ และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อความจำเป็นในการนำไปใช้ในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในระบบทางเดินอาหารไม่ต้องการออกซิเจน (Salminen and Wright,1993) พบว่า เชื้อจำนวน 40 สายพันธุ์สามารถเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน. และเชื้อทั้ง 40 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารที่ขาดวิตามิน บี 12 (Table 2)

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 40 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นข้อกำหนดในเกณฑ์คุณภาพของอาหารหมักจากพืชของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์คือ *E. coli* และ *Salmonella* พบว่าเมื่อทดสอบโดยวิธี agar spot มีแบคทีเรียแลกติก 16 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium, S. typhi S. enteritidis, S. paratyphi* ., *E. coli* O157 : H7 4 สายพันธุ์โดยมี วงใสการยับยั้งจากขอบเชื้อจนสุดวงใส มากกว่า 10 มม. (Table 3) การยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียแลกติกสร้างกรด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน หรือสร้างสารยับยั้งตัวอื่นๆ (วิลาวัฒย์, 2543) ทั้งนี้แม้โปรไบโอติกหลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ แต่แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น ดังนั้นสารยับยั้งพวกกรดอินทรีย์ เช่นกรดแลกติก ที่โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นจึงมีความสำคัญมากกว่าเนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งได้กว้างกว่าโดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค (Ogawa *et. al.*, 2001 ; Saarela *et al.*,2000) และการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคดังกล่าวเป็นสมบัติที่สำคัญอย่างหนึ่งของโปรไบโอติก (Saarela *et al.*, 2000)

นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 16 สายพันธุ์ มาทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และ แป้ง พบว่าเชื้อทั้ง 16 สายพันธุ์ ไม่สามารถย่อยไขมัน และแป้งได้ แต่สามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยโปรตีนได้จำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ LL13 LN18 LP11 LS 35 และLT02 (Figure 1) การที่เชื้อมีความสามารถ

ในการย่อยสลายโปรตีน จะช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหาร ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้เร็วขึ้น (Austin *et al.*, 1995) นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ 13 ชนิด โดย disc diffusion พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์มีแบบแผนการต้านต่อยาแตกต่างกัน โดยเชื้อ LP11 ต้านต่อยามากที่สุดคือ 7 ชนิด เชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin vancomycin kanamycin tetracycline chloramphenicol และerythromycin และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ceptazidime และnorfloxacin (Table 4) ซึ่งสำหรับแบคทีเรียแลกติกพวกแลกโตแบซิลัสแม้มีการดื้อยาโดยธรรมชาติอย่างกว้างขวางแต่การดื้อยาส่วนใหญ่ของแลกโตแบซิลัสไม่ใช่ลักษณะที่ถ่ายทอดได้ นอกจากนี้พลาสมิดที่เกี่ยวกับการดื้อยาก็พบได้ยากในแลกโตแบซิลัส จึงปลอดภัยต่อการใช้เป็นโปรไบโอติก (Saarela *et al.*, 2000) สำหรับรูปแบบการดื้อยาของแลกโตแบซิลัสแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันมาก ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะของโปรไบโอติกแต่ละสายพันธุ์เพื่อนำผลที่ได้ไปใช้ประโยชน์ร่วมกับยาปฏิชีวนะในการรักษาโรคเช่น โรคท้องร่วง โรคติดเชื้อกับระบบสืบพันธุ์ของเพศหญิง และโรคเยื่อหุ้มหัวใจอักเสบ (Charteris *et al.*, 1998)

การผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมังสะวิรัติ ต้องปราศจากส่วนประกอบที่มาจากเนื้อสัตว์ รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์โปรไบโอติกด้วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหาร SPY2 ซึ่งเป็นอาหารที่ มีส่วนประกอบ คือ soy peptone, yeast extract และ น้ำตาลกลูโคส อย่างละ 25 กรัม/ลิตร (Heenan *et al.*, 2002) และอาหารน้ำมะพร้าวซึ่งในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย yeast extract 5 กรัม Sodium acetate 5 กรัม Amonium citrate 2 กรัม Tween 80 1 มล. น้ำมะพร้าวแก่ 1 ลิตร โดยเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหารMRS broth พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถเจริญในอาหารน้ำมะพร้าวได้ใกล้เคียงกับ MRS broth ในขณะที่สามารถเจริญในอาหาร SPY2 ได้น้อยกว่า (Figure 2) อาหารน้ำมะพร้าวจึงเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก สำหรับผู้บริโภคอาหารมังสวิรัติได้

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ไปบ่งชี้ชนิด โดยใช้ API 50 CHL ของบริษัท Biomerieux พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ LL13 LN18 LP11 LS 35 และ *Pediococcus pentosaceus* LT02 1 สายพันธุ์ (Table 5) ในขณะที่โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่ใช้กันในทางการค้าในปัจจุบันส่วนใหญ่ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus L. casei L .rhamnosus* และ *Bifidobacterium* spp. (Saarela *et al.*, 2000; Kaur *et al.*, 2001 and Ouwehand *et al.*, 2001) โดยผลิตจำหน่ายในรูปของแคปซูล เม็ด หรือเสริมในอาหารประเภทนมหมัก (Kaur *et al.*, 2001) แต่ก็มีการศึกษาที่พบว่า *Lactobacillus plantarum* มีสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นโปรไบโอติกเช่นกัน (Ccbeci. and Gurakan, 2003) เห็นได้ว่าถ้ามีการนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสาย

พันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปทดลองใช้ในการผลิตอาหารประเภทอื่นที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์นมเพื่อเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง จึงได้นำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ ไปทดลองใช้ในการหมักน้ำแครอท ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถเจริญและหมักน้ำแครอทที่ไม่มีการเติมส่วนประกอบอื่นใดได้ โดย *L. plantarum* LS 35 มีการเจริญดีที่สุดโดยมีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ส่วนอีก 4 สายพันธุ์มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^7 CFU/ml หลังการหมักที่35 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อไม่มากนัก (Figure 3) แต่อย่างไรก็ตามเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถหมักและทำให้พีเอชเริ่มต้นของน้ำแครอทที่ 6.3 ลดลงต่ำกว่า 4.0 คือจะลดลงเป็น 3.78-3.83 หลังจากการหมักไปแล้ว 24 ชั่วโมง ในขณะที่เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.45-.058 และเมื่อหมักต่อไปถึง 72ชั่วโมง เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกเพิ่มขึ้นเป็น 0.83-0.88 (Figure 3) และเมื่อนำน้ำแครอทที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์เป็นเวลา 72 ชั่วโมงมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 2 สายพันธุ์ พบว่าน้ำแครอทที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *E. coli* O157 : H7 ได้ดีกว่า *S. typhi* (Figure 4) คือมีวงใสการยับยั้งเป็น 13.6 -15.7 และ 12.2-13.5 มม. ตามลำดับ ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้ส่วนหนึ่งมาจากกรดที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นนั้นเอง เนื่องจาก *E. coli* O157 และ *S. typhi* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ไม่สามารถทนกรดได้ ในขณะที่น้ำแครอทที่ไม่ผ่านการหมักไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 2 สายพันธุ์

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ สามารถอยู่รอดในน้ำแครอทหมักได้ในระดับหนึ่ง คือจากการเก็บรักษาน้ำแครอทที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 4 °C พบว่าจำนวน แบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ในน้ำแครอทหมักจะลดลงตามระยะเวลาในการเก็บ โดยจำนวนเชื้อจะลดลงไปประมาณ 1- 2 log หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 15 วัน (Figure 5) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Yoon และคณะ(2005) ที่พบว่าในน้ำบีทหมักเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จำนวนของ *L. casei* และ *L acidophilus* ลดลงประมาณ 1 และ 2 log ตามลำดับ และ ในน้ำกะหล่ำปลีหมัก จำนวนของ *L. plantarum* และ *L. delbrueckii* ลดลงประมาณ 1 log เช่นกัน แต่สำหรับ *L. casei* ไม่สามารถอยู่รอดได้เลย เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (Yoon et, al.., 2006) สำหรับจำนวนเชื้อของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่ต่ำที่สุดในผลิตภัณฑ์ที่จะก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้บริโภคสูงสุด ควรเป็น 10^6 CFU/ml (Shah,2001) ดังนั้นการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษาจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมาก ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโปรไบติกเหล่านี้ได้แก่ การขาดแคลนอาหาร การมีสารยับยั้งเช่นกรดในผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บ (Shah,2001) ดังนั้นเพื่อประโยชน์สูงสุดของผู้บริโภคจะได้นำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปทดลองพัฒนาการหมักผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆเพื่อให้มีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดในระหว่างการเก็บรักษาให้สูงขึ้นและสามารถเก็บรักษาได้นานขึ้นต่อไป