3. ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกโตแบซิลลัส *Lactobacillus* ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านไทย ในสภาวะต่างๆ

1.1 เปรียบเทียบการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิต่างๆ

จากการทดลองนำเชื้อ *Lactobacillus* ทั้ง 4 สายพันธุ์มาเลี้ยงที่อุณหภูมิต่างๆ และนำ culture broth ที่ได้มาทำให้เข้มข้น 10 เท่าแล้วทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar well diffusion assay ได้ผลการทดลองดัง ตารางที่ 5 พบว่า *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 สร้างสารยับยั้งดีที่สุดเมื่อเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 °ซ รองลงมาคือที่อุณหภูมิ 35 °ซ ส่วนที่ 25 °ซ และ 40 °ซ เชื้อสร้างสารยับยั้งได้ต่ำสุด เชื้อ *Lactobacillus* sp.A2 สร้างสารยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 35 °ซ รองลงมาคือ 30 °ซ ส่วนที่อุณหภูมิ 25 และ 40 °ซ นั้นผลิตสารยับยั้งได้ต่ำสุดเช่นกัน การที่เชื้อเหล่านี้สามารถเติบโตและผลิตสารยับยั้งได้ดีที่อุณหภูมิ 30-35 °ซ นั้น อาจเนื่องจากเชื้อเหล่านี้จัดเป็นแบคทีเรียพวก mesophilic lactic bacteria ที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิช่วง 30-40 °ซ (Suskovic, *et al.,* 2001)

Biswas และคณะ (1991) ทำการเลี้ยงเชื้อ *P. acidilactici* H ที่ อุณหภูมิต่างๆ ระหว่าง 30-40 °ซ พบว่าเชื้อสามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดที่อุณหภูมิ 37 °ซ และผลิตแบคเทอริโอซิน pediocin AcH ได้มากที่สุดทั้งที่ อุณหภูมิ 30 และ 37 °ซ

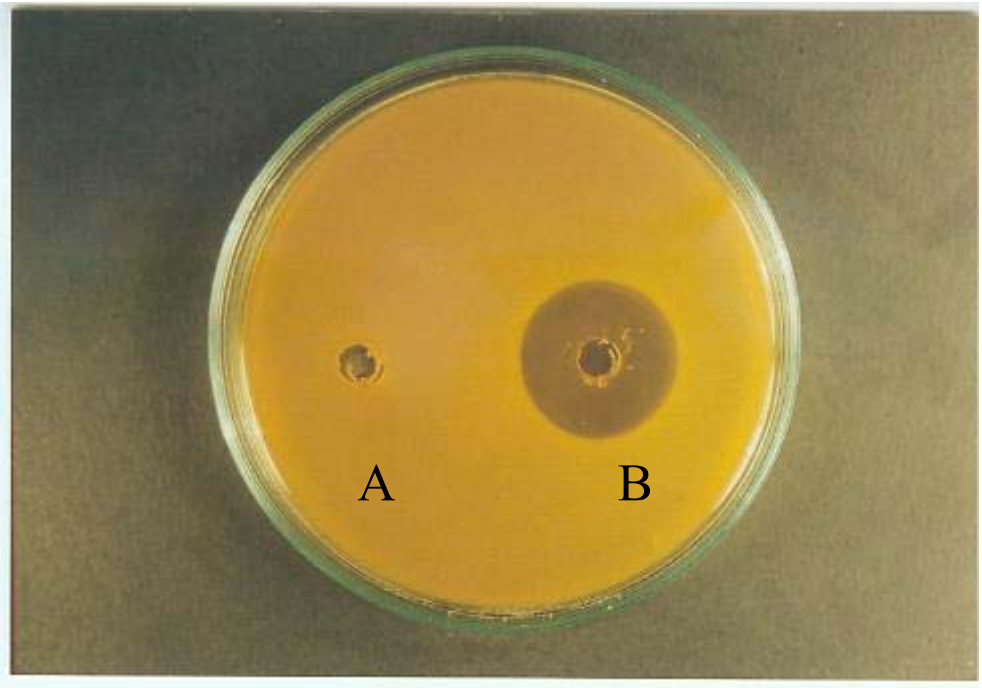
Ogunbanwo และคณะ (2003a) ทำการเลี้ยงเชื้อ *L. brevis* OG1 ที่อุณหภูมิ 25, 30, 37, 45 และ 55 °ซ พบว่าเชื้อสามารถผลิตสารยับยั้งได้ดีที่สุดที่ 30 °ซ แต่ Coventry และคณะ (1996) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. brevis* VB286 ที่ อุณหภูมิ 20 °ซ เชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้มากกว่าการเลี้ยงที่ อุณหภูมิ 10, 25, 32 และ 37 °ซ Leroy และ De Vuyst (1999) พบว่าเชื้อ *L. sake* CTC494 สามารถเติบโตและผลิตแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดระหว่างอุณหภูมิ 20-25 °ซ ส่วนที่ 35 °ซ นั้น จำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 61 %และไม่พบกิจกรรมของแบคเทอริโอซินเลย การที่กิจกรรมของแบคเทอริโอซินลดลงอย่างรวดเร็วเมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้น อาจเกิดจากเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นเอนไซม์ย่อยโปรตีนทำงานได้

ดีขึ้น ย่อยแบคเทอริโอซินได้หมด หรือทำให้การดูดซึมแบคเทอริโอซินติดกับตัวเซลล์ได้มากขึ้น ส่วน Ko และ Ahn (2000) พบว่า อุณหภูมิไม่มีผลต่อการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อ *L. lactis* KCA2368 แต่ที่อุณหภูมิ 37 °ซ เชื้อสามารถเติบโตได้ดีกว่า 25 °ซ

ส่วนการที่ต้องมีการนำ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดมาทำให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าก่อนนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งนั้นเนื่องจากได้มีการนำ culture broth ที่ไม่ได้ผ่านการทำให้เข้มข้นมาทดสอบการยับยั้งต่อเชื้ออินดิเคเตอร์ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคและ *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐาน ปรากฏว่าไม่มี culture broth จากเชื้อใดที่มีความสามารถในการยับยั้งเลย แต่เมื่อนำ culture broth ที่ได้มาทำการระเหยเอาน้ำออกให้มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเป็น 10 เท่าก็พบว่ามีขอบวงใสการยับยั้งเกิดขึ้นชัดเจน (รูปที่ 2) ดังนั้นในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งครั้งต่อไปจึงทำให้ culture broth มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่าก่อนนำไปทดสอบ

ตารางที่ 5 ผลของอุณหภูมิในการบ่มเชื้อ *Lactobacillus* ต่อการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay จาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า

ชนิดของเชื้อ	ขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)			
	25 °ซ	30 °ซ	35 °ซ	40 °ซ
Lactobacillus sp. A2	3.43	4.66	7.08	3.43
L. plantarum A49a	3.50	11.06	6.75	3.62
L. plantarum A61a	3.37	11.50	9.69	4.00
Lactobacillus sp. P5	3.43	8.96	6.64	3.55



รูปที่ 2 ความสามารถในการยับยั้งของ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

A : Culture broth ที่ไม่ผ่านการทำให้เข้มข้น

B : Culture broth ที่ผ่านการทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า

1.2 ผลการเปรียบเทียบการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยมีการเขย่าและไม่มีการเขย่า

จากการศึกษาผลของการเขย่าต่อการผลิตสารยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus* ผลดังตารางที่ 6 พบว่า เชื้อ *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ผลิตสารยับยั้งในการเลี้ยงแบบไม่เขย่าได้ดีกว่าเมื่อมีการเขย่า โดยเมื่อทำการเลี้ยงแบบมีการเขย่าพบว่าค่าเฉลี่ยของขอบวงใสการยับยั้งลดลง 64.8, 66.9 และ 33.4 % ตามลำดับ

ส่วนเชื้อ *Lactobacillus* sp. A2 นั้นการเขย่าทำให้เชื้อผลิตสารยับยั้งได้มากกว่าไม่เขย่า โดยมีค่าเฉลี่ยขนาดขอบวงใสการยับยั้งเพิ่มขึ้น 26.9 % เมื่อเปรียบเทียบกับการเลี้ยงแบบไม่เขย่า

สำหรับการศึกษาที่ผ่านมานั้นการผลิตสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียแลกติกมีทั้งการเลี้ยงเชื้อโดยมีและไม่มีการเขย่า โดยการเลี้ยงที่ไม่มีการเขย่านั้น Kelly และคณะ (1996) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* KW30 สามารถผลิต แบคเทอริโอซินได้มากที่สุด 6,400 ยูนิต/มิลลิลิตร Zhu และคณะ (2000) ทำการผลิตแบคเทอริโอซิน gassericin KT7 จากเชื้อ *L. gasseri* KT7 โดยไม่มีการเขย่าพบว่าเชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ตั้งแต่ระยะ log phase

ส่วน Guerra และ Castro (2003) พบว่าสภาวะในการผลิต nisin ของเชื้อ *L. lactis* subsp. *Lactis* CECT539 และ pediocin จากเชื้อ *P. acidilactici* NRRL B-5627 ในฟลาสก์นั้นต้องมีการเขย่า 200 rpm

Daba และคณะ (1993) ทำการศึกษาผลของการเขย่าต่อการผลิตแบคเทอริโอซิน mesterocin 5 จากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mescenteroides* UL5 โดยเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่าและมีการเขย่าความเร็ว 100 - 200 rpm พบว่าเชื้อผลิตแบคเทอริโอซินได้ไม่แตกต่างกัน

ตารางที่ 6 การสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus* ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีและไม่มีการเขย่า ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า

ชนิดของเชื้อ	ขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)	
	ไม่เขย่า	เขย่า 150 rpm
Lactobacillus sp. A2*	7.13	9.75
L. plantarum A49a**	12.78	4.50
L. plantarum A61a**	12.44	4.12
Lactobacillus sp. P5**	9.65	6.37

* : บ่มที่ อุณหภูมิ 35 °ซ

** : บ่มที่ อุณหภูมิ 30 °ซ

1.3 ผลการเปรียบเทียบการสร้างสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารชนิดต่างๆ

จากการทดสอบผลของอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆต่อการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ในอาหารแข็งโดยวิธี agar spot assay ได้ผลดัง ตารางที่ **7** พบว่าในอาหารแข็ง เชื้อ *L. plantarum* A49a และ *L. plantarum* A61a มีการสร้างสารยับยั้งบนอาหาร CJ ได้มากกว่าในอาหาร MRS อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ส่วนเชื้อ *Lactobacillus* sp. A2 และ *Lactobacillus* sp. P5 นั้นการสร้างสารยับยั้งบนอาหาร MRS และ อาหาร CJ ได้ไม่แตกต่างกัน

ส่วนการทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay ที่ใช้ culture broth ที่มีความเข้มข้น 10 เท่าจากการเลี้ยงเชื้อ ได้ผลดังตารางที่ 8 พบว่า culture broth จากเชื้อทุกชนิดที่ได้จากการเลี้ยงในอาหาร MRS broth และอาหาร CJ broth สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29213 ได้ไม่แตกต่างกัน ยกเว้นเชื้อ *Lactobacillus* sp. P5 ที่พบว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth แล้วการสร้างสารยับยั้งเกิดขึ้นน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหาร CJ broth อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนอาหาร TGE นั้นทุกเชื้อมีการสร้างสารยับยั้งได้ในระดับปานกลาง แต่ในอาหาร APT และ TJ พบว่าขนาดขอบวงใสการยับยั้งของเชื้อทุกชนิดเกิดขึ้นน้อยมากซึ่งผลดังกล่าวน่าจะเกิดขึ้นจากส่วนประกอบต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่นำมาใช้ (รายละเอียดของอาหารเลี้ยงเชื้อในภาคผนวก ก) โดยองค์ประกอบที่มีบทบาทหลัก คือ น้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนสำคัญที่แบคทีเรียแลกติกสามารถหมักน้ำตาลได้เป็น กรดอินทรีย์ และ คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งสารเหล่านี้มีผลในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ (Jimenes – Diaz, 1993; De Vuyst and Vandamme, 1994b) การที่เชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีในอาหาร MRS และ CJ เนื่องจากอาหารทั้ง 2 ชนิดนี้มีองค์ประกอบเป็นน้ำตาลในปริมาณสูง โดยในอาหาร MRS มีน้ำตาลกลูโคส 2 % และในอาหาร CJ ซึ่งใช้น้ำมะพร้าวแทนน้ำกลั่นซึ่งมีน้ำตาลซูโครสเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 1.28 % นอกจากนี้ยังมีน้ำตาลกลูโคส ฟรุกโตส และสารจำพวกเร่งการเติบโตของเชื้ออีกด้วย (วิทิต, 2529; Child, 1974) ส่วนในอาหารเลี้ยงเชื้อ APT, TJ และ TGE มีน้ำตาลเป็นส่วนประกอบในปริมาณต่ำ โดยอาหาร APT จะมีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนประกอบ 1 % ส่วนในอาหาร TJ ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำมะเขือเทศจะมีน้ำตาลกลูโคส

และฟรุกโตสประมาณ 1 % เช่นเดียวกัน การสร้างสารยับยั้งจึงเกิดขึ้นน้อยกว่าเมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ CJ

Kelly และคณะ (1996) ทำการเลี้ยงเชื้อ *L. lactis* DPC3147 ในอาหารต่างๆ ได้แก่ MRS, BHI, TYP, reconstituted skim milk และ whole milk พบว่าเชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน lacticin 3147 ได้มากที่สุดในอาหาร MRS รองลงมาคือ reconstituted skim milk และ whole milk ตามลำดับ

นอกจากนี้ส่วนประกอบในอาหารที่มีบทบาทอีกชนิดหนึ่งคือ Tween 80 ที่มีอยู่ในอาหาร MRS และ CJ อย่างละ 0.1 % และมีอยู่ในอาหาร TGE 0.2 % ที่อาจมีผลให้อาหาร TGE ที่แม้จะมีส่วนประกอบของน้ำตาลต่ำแต่สามารถให้การผลิตสารยับยั้งได้ในระดับปานกลางซึ่งมากกว่าอาหาร APT และ TJ อย่างเห็นได้ชัด ซึ่ง Biswas และคณะ (1991) พบว่า การเติม Tween 80 ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ TGE ปริมาณ 0.2 % ทำให้เชื้อเติบโตได้ดีและมีการสร้างแบคเทอริโอซินได้เพิ่มขึ้น ส่วน Garver และ Muriana (1994) รายงานว่าได้ทำการทดลองผลิตแบคเทอริโอซิน curvaticin FS47 จากเชื้อ *L. curvatus* FS47 โดยใช้อาหาร MRS ที่ไม่มี Tween 80 พบว่าเชื้อมีการเติบโตดีมากแต่ไม่มีการผลิตแบคเทอริโอซิน แต่เมื่อใช้อาหาร MRS ที่มี Tween 80 เชื้อกลับมีการผลิตแบคเทอริโอซินได้ ซึ่ง อาจเกิดจากสาร nonionic detergents เช่น Tween 80 สามารถกระตุ้นให้ จุลินทรีย์มีการหลั่งสารที่เป็นโปรตีนได้ โดยไปมีผลทำให้เซลล์เมมเบรนมีการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการยอมให้สารผ่านได้มากขึ้น

Kelly และคณะ (1996) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* KW30 ในอาหาร Elliker broth และ TYT30 เชื้อเติบโตได้ดีแต่ผลิตแบคเทอริโอซินได้น้อยกว่าในอาหาร MRS และเมื่อมีการเติม Tween 80 ลงไป 1 % เชื้อจะมีการผลิตแบคเทอริโอซินได้เพิ่มขึ้น

Fiorentini และคณะ (2001) ได้ทดลองใช้ sugar cane molasses broth ซึ่งได้มาจากวัตถุดิบราคาถูกมาเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* MN แทนอาหาร MRS ในถังหมักที่ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณมาก พบว่าเชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้เช่นเดียวกันดังนั้นจากการทดลองพบว่า อาหารที่เหมาะสมต่อการสร้างสารยับยั้งของเชื้อเหล่านี้ทั้ง 4 ชนิด ทั้งบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว คือ อาหาร CJ และ MRS ซึ่งให้ผลในการผลิตสารยับยั้งไม่แตกต่างกัน อาหาร MRS เป็นอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

แลกติกกันอย่างแพร่หลาย แต่อย่างไรก็ตามอาหาร MRS ก็ยังมีราคาค่อนข้างสูงไม่เหมาะสำหรับนำมาใช้เลี้ยงเชื้อในปริมาณมากๆ ส่วนอาหารเลี้ยงเชื้อ CJ ที่มีส่วนประกอบของน้ำมะพร้าวนั้นแม้จะยังไม่รู้จักและนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายแต่ก็น่าจะเป็นทางเลือกใหม่สำหรับนำไปประยุกต์ใช้เลี้ยงเชื้อนี้เนื่องจากทำให้เชื้อมีการสร้างสารยับยั้งไม่ต่างจากอาหาร MRS แต่ราคาถูกกว่า

ตารางที่ 7 การสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus* ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 บนอาหารแข็งแต่ละชนิด ทดสอบด้วยวิธี agar spot assay

ชนิดของเชื้อ	ขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)				
	APT	CJ	MRS	TGE	TJ
Lactobacillus sp. A2 *	3.34 [c]	12.53 [a]	12.56 [a]	9.26 [b]	3.06 [c]
L. plantarum A49a **	3.52 [d]	15.56 [a]	13.65 [b]	10.15 [c]	3.87 [d]
L. plantarum A61a **	3.20 [d]	15.28 [a]	13.15 [b]	10.04 [c]	3.24 [d]
Lactobacillus sp. P5 **	2.85 [d]	12.04 [a]	11.51 [a]	8.07 [c]	2.85 [d]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

* : บ่มที่ อุณหภูมิ 35 °ซ, เขย่า 150 rpm

** : บ่มที่ อุณหภูมิ 30 °ซ, ไม่เขย่า

ตารางที่ 8 การสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus* ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ในอาหารเหลวแต่ละชนิด ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้ culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า

ชนิดของเชื้อ	ขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)				
	APT	CJ	MRS	TGE	TJ
Lactobacillus sp. A2 *	2.65 [c]	10.36 [a]	10.56 [a]	8.25 [b]	2.85 [c]
L. plantarum A49a **	3.23 [c]	12.86 [a]	12.15 [a]	9.36 [b]	3.02 [c]
L. plantarum A61a **	3.05 [c]	12.28 [a]	11.95 [a]	8.83 [b]	3.11 [c]
Lactobacillus sp. P5 **	2.59 [d]	11.04 [a]	9.51 [b]	6.42 [c]	2.22 [d]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

* : บ่มที่ อุณหภูมิ 35 °ซ, เขย่า 150 rpm

** : บ่มที่ อุณหภูมิ 30 °ซ, ไม่เขย่า

2. ผลการศึกษาลักษณะสารยับยั้งที่สร้างโดย *Lactobacillus* บนอาหารแข็ง

2.1 ผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งบนอาหาร MRS ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 2 % ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a, *Lactobacillus* sp. A2 และ *Lactobacillus* sp. P5 ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC29213 โดยวิธี agar spot assay เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 % แล้วบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนซึ่งเอื้อต่อการสร้างสารยับยั้งทุกชนิด ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล อะซิทัลดีไฮด์ และ แบคเทอริโอซิน ได้ผลดังตารางที่ 9 พบว่าเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29213 ได้สูงสุดคือ *L. plantarum* A49a ซึ่งให้ขนาดขอบวงใสการยับยั้งเท่ากับ 13.87 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *L. plantarum* A61a เท่ากับ 13.70 มิลลิเมตร *Lactobacillus* sp. A2 เท่ากับ 12.44 มิลลิเมตรและ *Lactobacillus* sp. P5 มีขนาดขอบวงใสการยับยั้งน้อยที่สุดคือ 11.93 มิลลิเมตร ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลร่วมกันของสารยับยั้งทั้งหมดที่ *Lactobacillus* แต่ละสายพันธุ์ผลิตออกมา

ส่วนการบ่มเชื้อโดยใช้อาหารเดียวกันในสภาวะที่ไม่มีออกเจนเพื่อจำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่สร้างสารยับยั้งอื่นๆ ได้ พบว่าขนาดของวงใสของการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC29213 โดยวิธี agar spot assay ที่เกิดขึ้นกว้างกว่าการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีออกซิเจนอย่างเห็นได้ชัด โดยเชื้อ *L. plantarum* A49a ให้ขนาดขอบวงใสมากที่สุด เท่ากับ15.36 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *Lactobacillus* sp. A2 เท่ากับ 14.87 มิลลิเมตร *L. plantarum* A61a เท่ากับ 14.25 มิลลิเมตร *Lactobacillus* sp. P5 (ตารางที่ 9) อาจเนื่องจากเชื้อ *S. aureus* ATCC29213 ซึ่งเป็นเชื้ออินดิเคเตอร์เติบโตในสภาวะไม่มีออกซิเจนได้น้อยกว่าสภาวะที่มีออกซิเจนและเชื้อ *Lactobacillus* สามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศได้มากกว่าสภาวะที่มีอากาศทำให้ขอบวงใสการยับยั้งกว้างกว่าการบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน

2.2 ผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งบนอาหาร MRS ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 0.2 % ในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

จากผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a, *Lactobacillus* sp. A2 และ *Lactobacillus* sp. P5 ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC29213 โดยวิธี agar spot assay เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ที่ลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อจาก 2 % เหลือ 0.2 % เพื่อจำกัดการผลิตกรดอินทรีย์ของเชื้อ พบว่าขนาดขอบวงใสของการยับยั้งที่เกิดขึ้นน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 % ประมาณ 3-4 เท่า ซึ่งขนาดขอบวงใสการยับยั้งที่เกิดขึ้นมีขนาดระหว่าง 2.05-4.43 มิลลิเมตร โดยเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29213 ได้สูงที่สุด คือ *L. plantarum* A49a รองลงมาคือ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ตามลำดับ (ตารางที่ 9)

ส่วนผลการทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus* เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่จำกัดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และจำกัดการผลิตกรดอินทรีย์ของเชื้อ (ตารางที่ 9) พบว่าเชื้อที่มีความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29213 ได้สูงที่สุด คือ *L. plantarum* A49a รองลงมาคือ *Lactobacillus* sp. A2, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. P5 ตามลำดับ

จากผลการทดลองที่ 2.1 และ 2.2 จะเห็นได้ว่าการยับยั้งส่วนใหญ่เกิดจากผลของกรดอินทรีย์ เนื่องจากเมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่กำจัดการผลิตกรดอินทรีย์นั้นขนาดของขอบวงใสการยับยั้งที่เกิดขึ้นน้อยลงกว่าเมื่อไม่มีการจำกัดการผลิตกรดอินทรีย์อย่างเห็นได้ชัด ส่วนผลการยับยั้งของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีน้อยกว่า เนื่องจากเมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีการจำกัดทั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ พบว่าความสามารถในการยับยั้งลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการจำกัดการผลิตกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียว การที่เชื้อ *Lactobacillus* ยังมีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งอยู่แม้ว่าจะเลี้ยงในสภาวะที่จำกัดทั้งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์นั้นแสดงว่า เชื้ออาจมีการผลิตสารอื่นที่มีความสามารถในการยับยั้งนอกเหนือจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ สอดคล้องกับการทดลองที่ผ่านมาของ อรัญญา (2542) ที่พบว่า เชื้อ *Lactobacillus* sp. A30b และ *L. plantarum* (A 49a, A56c, A61a) และ *L. bavaricus* A53b ที่เลี้ยงในสภาวะ

ที่จำกัดการผลิตกรดอินทรีย์โดยใช้อาหาร MRS agar ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.2 % และจำกัดผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยการบ่มเชื้อในสภาวะไร้ออกซิเจน มีขอบวงใสการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคน้อยกว่าการยับยั้งที่ทดสอบในสภาพไม่จำกัดกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มาก แสดงว่าการยับยั้งส่วนใหญ่เกิดขึ้นจากผลของกรดอินทรีย์ ซึ่งเชื้อเหล่านี้จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative lactobacilli ที่ผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

Delgado และคณะ (2001) ทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* LB17.2b ในอาหาร MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคส 0.2 % โดยเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจนพบว่าเชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งได้ทั้งที่เป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์สายพันธุ์ใกล้เคียงกันได้ แต่ในสภาวะที่เป็นกรดโปรตีนนี้สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วยซึ่งอาจเป็นผลร่วมกันระหว่างแบคเทอริโอซินกับกรด

De Martinis และคณะ (2001) ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งโดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS ในภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อจำกัดผลจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ได้และสารนั้นคือกรดอินทรีย์และแบคเทอริโอซินเนื่องจากเมื่อเปลี่ยนอาหารจาก MRS เป็น Tryticase soy agar yeast extract (TSAYE) ซึ่งเป็นอาหารที่ไม่มีน้ำตาลกลูโคสเพื่อจำกัดผลจากกรดอินทรีย์ปรากฏว่าเชื้อส่วนใหญ่ยังคงมีความสามารถในการยับยั้งและสารยับยั้งนั้นคือแบคเทอริโอซินเพราะทดสอบแล้วพบว่าไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน

Oyetayo (2004) ทำการศึกษาการสร้างสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากที่ต่างๆ กันนำมาเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อจำกัดผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และปรับ pH ของ culture broth ให้เป็นกลางเพื่อจำกัดผลจากกรดอินทรีย์พบว่าเชื้อยังคงมีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบได้

ตารางที่ 9 เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อ *Lactobacillus* ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC29213 เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่แตกต่างกัน ทดสอบด้วยวิธี agar spot assay

ชนิดของเชื้อ	ขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)			
	มีสารยับยั้งทุกชนิด[1]	จำกัดการสร้าง H_2O_2 [2]	จำกัดการสร้างกรดอินทรีย์[3]	จำกัด H_2O_2 และกรดอินทรีย์[4]
Lactobacillus sp. A2*	12.44	14.87	4.54	3.29
L. plantarum A49a**	13.87	15.36	4.73	3.72
L. plantarum A61a**	13.70	14.25	3.43	2.06
Lactobacillus sp. P5**	11.93	13.41	2.05	1.02

1 : เลี้ยงในอาหาร MRS กลูโคส 2 % มีออกซิเจน

2 : เลี้ยงในอาหาร MRS กลูโคส 2 % ไม่มีออกซิเจน

3 : เลี้ยงในอาหาร MRS กลูโคส 0.2 % มีออกซิเจน

4 : เลี้ยงในอาหาร MRS กลูโคส 0.2 % ไม่มีออกซิเจน

* : บ่มที่ อุณหภูมิ 35 ^{o}ซ, เขย่า 150 rpm

** : บ่มที่ อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ, ไม่เขย่า

3. ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆ

3.1 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรีย *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐานบนอาหารแข็ง

จากการทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a, *Lactobacillus* sp. A2 และ *Lactobacillus* sp. P5 โดยใช้อาหาร MRS แล้วนำมาศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐานซึ่งเป็นเชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียง โดยวิธี agar spot assay (ตารางที่ 10) พบว่าเชื้อทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) โดยขนาดขอบวงใสการยับยั้งที่เกิดขึ้นอยู่ระหว่าง 12.96-14.25 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *M. luteus* ที่มีขนาดขอบวงใสน้อยกว่าเล็กน้อย ส่วนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงนั้น เชื้อ *L. fermentum* TISTR 879 ถูกยับยั้งมากที่สุด โดยมีขนาดขอบวงใสการยับยั้งเท่ากับ 5.44-7.35 มิลลิเมตร รองลงมาคือ *L. curvarus* TISTR 938, *L. fermentum* TISTR 914 และเชื้อที่ถูกยับยั้งได้น้อยที่สุด คือ *L. plantarum* TISTR 877 โดยมีขนาดขอบวงใสการยับยั้งอยู่ระหว่าง 1.65-3.77 มิลลิเมตร นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งที่เชื้อทั้ง 4 ชนิดสร้างขึ้นยังสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบคือ *E. coli* 1189 และ *S. typhi* 3299 ได้อีกด้วย ซึ่งการยับยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้เป็นผลร่วมกันของสารยับยั้งทั้งหมดที่เชื้อ *Lactobacillus* ทั้ง 4 ชนิดสร้างและหลั่งออกมา

อรัญญา (2542) นำ *Lactobacillus* ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทยมาทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธ์มาตรฐาน 12 สายพันธุ์ โดยวิธี agar spot พบว่า *Lactobacillus* ทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ โดย *Lactobacillus* sp. A44 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานได้มากที่สุด นอกจากนี้พบว่า *Lactobacillus* เหล่านี้ ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ

ส่วน Widerdyke และคณะ (2004) พบว่าเมื่อทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็งของเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ต่างๆ ที่แยกได้จากต้นกล้าของถั่วอัลฟาฟาสามารถยับยั้ง

แบคทีเรียก่อโรคคือ *E. coli* O157:H7, *S. enteritica* และ *L. monocytogenes* ได้โดยเชื้อ *L. lactis* subsp.*lactis* L7 มีความสามารถในการยับยั้งสูงสุด

ตารางที่ 10 การยับยั้ง *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐานและแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ *Lactobacillus* บนอาหารแข็ง ทดสอบด้วยวิธี agar spot assay

เชื้ออินดิเคเตอร์	ขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)			
	Lactobacillus			
	Lactobacillus sp. A2	*L. plantarum* A49a	*L. plantarum* A61a	*Lactobacillus* sp. P5
L. plantarum TISTR 877*	3.54^{g}	3.77^{e}	3.34^{f}	1.65^{g}
L. fermentum TISTR 879*	6.72^{d}	7.18^{c}	7.35^{c}	5.44^{d}
L. fermentum TISTR 914**	4.20^{f}	4.28^{e}	4.89^{e}	2.63^{f}
L. curvarus TISTR 938**	5.60^{e}	5.64^{d}	6.00^{d}	4.21^{e}
S. aureus ATCC 29213**	13.72^{a}	14.25^{a}	13.46^{a}	12.96^{a}
*M. luteus***	13.13^{b}	13.73^{a}	12.90^{ab}	12.27^{b}
E. coli 1189**	10.75^{c}	13.02^{b}	12.27^{b}	12.12^{bc}
Salmonella typhi 3299**	13.05^{b}	13.44^{ab}	12.85^{ab}	11.66^{c}

ตัวอักษรในแนวตั้งที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

* : บ่มที่ อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ

** : บ่มที่ อุณหภูมิ 35 ^{o}ซ

3.2 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารและแบคทีเรีย *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐานเมื่อใช้ส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว

จากการทดสอบโดยการนำ culture broth ความเข้มข้น 10 เท่าที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus* ในฟลาสก์โดยใช้อาหาร MRS broth มาศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐาน โดยวิธี agar well diffusion assay พบว่าเชื้อทุกชนิดสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ได้มากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) เช่นเดียวกับการทดสอบโดยวิธี agar spot assay (ตารางที่ 11) โดยขนาดขอบวงใสการยับยั้งที่เกิดขึ้นอยู่ระหว่าง 9.41-11.20 มิลลิเมตร ส่วนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ชนิดอื่นถูกยับยั้งได้แตกต่างกัน โดยแบคทีเรียที่ถูกยับยั้งได้น้อยที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ *L. plantarum* TISTR 877 โดยมีขนาดขอบวงใสการยับยั้งอยู่ระหว่าง 1.82-3.82 มิลลิเมตร

จากการทดลองที่ 3.1 และ 3.2 พบว่าได้ผลการทดลองไปในทางเดียวกันคือไม่ว่าจะทดสอบโดยการยับยั้งเชื้อบนอาหารแข็งหรือทดสอบความสามารถในการยับยั้งโดยใช้ culture broth นั้นเชื้อ *Lactobacillus* ทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ได้มากกว่าเชื้ออินดิเคเตอร์ชนิดอื่น และยับยั้งเชื้อก่อโรคทุกชนิดได้มากกว่าเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 4 สายพันธุ์ ซึ่งการทดลองที่ผ่านมาพบว่าการยับยั้งส่วนใหญ่ของ *Lactobacillus* ทั้ง 4 สายพันธุ์ เกิดขึ้นเนื่องจากกรดอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ดังนั้นการที่เชื้อสายพันธุ์ใกล้เคียงซึ่งสามารถผลิตกรดได้จึงมีความทนต่อการถูกยับยั้งได้มากกว่าแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบ สอดคล้องกับการรายงานของ Niemand และคณะ (1983) พบว่ากรดแลกติกสามารถทำลายเชื้อ *Enterobacteriaceae, Pseudomonass* และ *Brochospacta* แต่จะไม่มีผลต่อเชื้อ *Leuconostoc* และ *Pediococcus* เนื่องจากแบคทีเรียสองประเภทหลังนี้เป็นแบคทีเรียแลกติกซึ่งสามารถผลิตกรดได้ทำให้สามารถปรับสภาพในการทนต่อกรดได้

นอกจากนี้ Goncalves และคณะ (1997) กล่าวว่าการที่แบคทีเรีย *Lactobacillus* มีความสามารถในการทนต่อความเป็นกรดได้มากกว่าแบคทีเรียแลกติกอื่น เช่น

Streptococcus และ *Leuconostoc* เนื่องจากที่บริเวณ cytoplasmic membrane ของ *Lactobacillus* มีความเป็นด่างสูงกว่าจึงสามารถปรับตัวให้ทนต่อกรดได้มากกว่า

Ivanova และคณะ (2000) ทำการทดสอบความสามารถของเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* L14 ที่แยกได้จากธัญพืชในการยับยั้งเชื้อต่างๆ ทั้งในอาหารแข็งและใช้ culture broth ในการทดสอบพบว่าสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ใกล้เคียงกันและสายพันธุ์ก่อโรคบางชนิดรวมทั้ง *E. coli*

ส่วนการศึกษาของ De Martinis และคณะ (2001) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในผลิตแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแลกติกด้วยกันคือ *L. sake* ATCC 15521 ได้ดีกว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรค และไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ คือ *E. coli* ATCC 29522 Delgado และคณะ (2001) ทดสอบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* LB17.2b พบว่าสารที่เชื้อสร้างขึ้นเป็นสารโปรตีนที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่เป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกันได้มากกว่าเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและไม่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบ แต่เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรดพบว่าเชื้อนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบได้ด้วย ซึ่งการยับยั้งน่าจะมาจากผลของสารยับยั้งหลายๆ ชนิดร่วมกันโดยเฉพาะกรดอินทรีย์

นอกจากสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรัมบวกได้แล้วยังพบว่าจากการทดลองนี้สารยับยั้งที่ *Lactobacillus* ผลิตออกมายังสามารถยับยั้งการเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรัมลบที่ใช้ทดสอบ คือ เชื้อ *E. coli* 1189 และ *S. typhi* 3299 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Caridi (2003) ที่พบว่าเชื้อ *Lactobacillus* ซึ่งแยกได้จากเนยแข็งสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เช่นเดียวกัน Widerdyke (2004) ทำการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากต้นกล้าของถั่วอัลฟาฟา พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. enterica*, *E. coli* O157:H7 และ *L. monocytogenes* ได้ทั้งการทดสอบในอาหารแข็งและอาหารเหลว MRS

จากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าเชื้อ *Lactobacillus* sp. P5 มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งน้อยกว่าเชื้ออื่นอีก 3 สายพันธุ์ที่นำมาทดสอบ ในการศึกษาต่อไปจึงไม่นำเชื้อนี้มาทดสอบอีก

ตารางที่ 11 การยับยั้ง *Lactobacillus* สายพันธุ์มาตรฐานและแบคทีเรียก่อโรคของเชื้อ *Lactobacillus* โดยใช้ culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า จากอาหาร MRS ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

เชื้อ อินดิเคเตอร์	ขนาดขอบวงใสสารยับยั้ง (มม.)			
	Lactobacillus			
	Lactobacillus sp. A2	*L. plantarum* A49a	*L. plantarum* A61a	*Lactobacillus* sp. P5
L. plantarum TISTR 877*	2.31^{f}	3.82^{f}	3.63^{e}	1.82^{f}
L. fermentum TISTR 879*	5.89^{d}	8.35^{c}	6.95^{d}	5.60^{d}
L. fermentum TISTR 914**	4.65^{e}	6.60^{e}	7.18^{cd}	4.42^{e}
L. curvarus TISTR 938**	5.83^{d}	8.02^{cd}	9.03^{b}	5.90^{cd}
S. aureus ATCC 29213**	9.41^{a}	11.20^{a}	10.71^{a}	8.80^{a}
*M. luteus***	8.52^{b}	9.30^{b}	8.59^{b}	7.91^{b}
E. coli 1189**	5.40^{d}	6.33^{e}	6.70^{d}	4.87^{e}
S. typhi 3299**	7.14^{c}	7.54^{d}	7.70^{c}	6.20^{c}

ตัวอักษรในแนวตั้งที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

* : บ่มที่ อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ

** : บ่มที่ อุณหภูมิ 35 ^{o}ซ

4. ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของ *Lactobacillus*

4.1 ผลการศึกษาการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus*

จากการทดสอบโดยการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a, *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. A2 ในฟลาสก์โดยใช้อาหาร MRS แล้วศึกษาการเติบโตและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อพบว่าเชื้อ *L. plantarum* A61a และ *Lactobacillus* sp. A2 มีรูปแบบการเติบโตใกล้เคียงกันโดยเริ่มเข้าสู่ระยะ log ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 8 และมีระยะ log ประมาณ 8 ชั่วโมง และเชื้อเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary ประมาณชั่วโมงที่ 16 ซึ่งเชื้อ *Lactobacillus* sp. A2 เติบโตได้น้อยกว่า คือมีค่า OD สูงสุด เท่ากับ 8.9 ที่เวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *L. plantarum* A61a มีการเติบโตดีกว่า คือ มีค่า OD สูงสุด เท่ากับ 11 ที่เวลา 16 ชั่วโมง และเชื้อ *L. plantarum* A49a เติบโตดีที่สุด คือมีค่า OD สูงสุด เท่ากับ 12.9 ที่เวลา 36 ชั่วโมง และมีระยะ log นานที่สุด (รูปที่ 3ก)

ส่วนการสร้างสารยับยั้งพบว่าในช่วง 8 ชั่วโมง ก่อนเข้าสู่ระยะ log เชื้อ *L. plantarum* A49 และ *Lactobacillus* sp. A2 สร้างสารยับยั้งได้น้อยมาก โดยขอบวงใสการยับยั้งน้อยกว่า 2 มิลลิเมตร ส่วนเชื้อ *L. plantarum* A61a ไม่สร้างสารยับยั้งเลย จากนั้นเมื่อเข้าสู่ระยะ log เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สร้างสารยับยั้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยเชื้อ *L. plantarum* A49 และ *L. plantarum* A61a สร้างสารยับยั้งโดยรวมได้ใกล้เคียงกัน โดยมีขนาดขอบวงใสการยับยั้งสูงสุด เท่ากับ 13.5 มิลลิเมตร ที่เวลา 36 ชั่วโมง และ 12.6 มิลลิเมตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Lactobacillus* sp. A2 สร้างสารยับยั้งได้น้อยที่สุด คือมีขนาดขอบวงใสการยับยั้งเท่ากับ 8.6 มิลลิเมตร ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งยังพบว่าสารยับยั้งที่เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สร้างขึ้นจะคงอยู่ได้นานกว่า 24 ชั่วโมง หลังตรวจพบการสร้างสารยับยั้ง (รูปที่ 3ข) ซึ่งจากการทดลองพบว่าการเติบโตและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีความสัมพันธ์กัน และพบว่าเชื้อ *L. plantarum* A49 สามารถเติบโตและสร้างสารยับยั้งได้ดีที่สุดจึงเลือกเชื้อนี้ในการทดลองต่อไป

สำหรับความสัมพันธ์ระหว่างการเติบโตและการผลิตสารยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียแลกติก ได้มีผู้ทำการศึกษามาแล้วดังนี้ Daba และคณะ (1993) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. mesenteroides* subp. *mesenteroides* ในถังหมักโดยใช้อาหาร MRS broth พบ

ว่าเชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน mesenterocin 5 ได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 9 ชั่วโมง และการผลิตยังคงสูงอยู่จนกระทั่งหลัง 24 ชั่วโมง

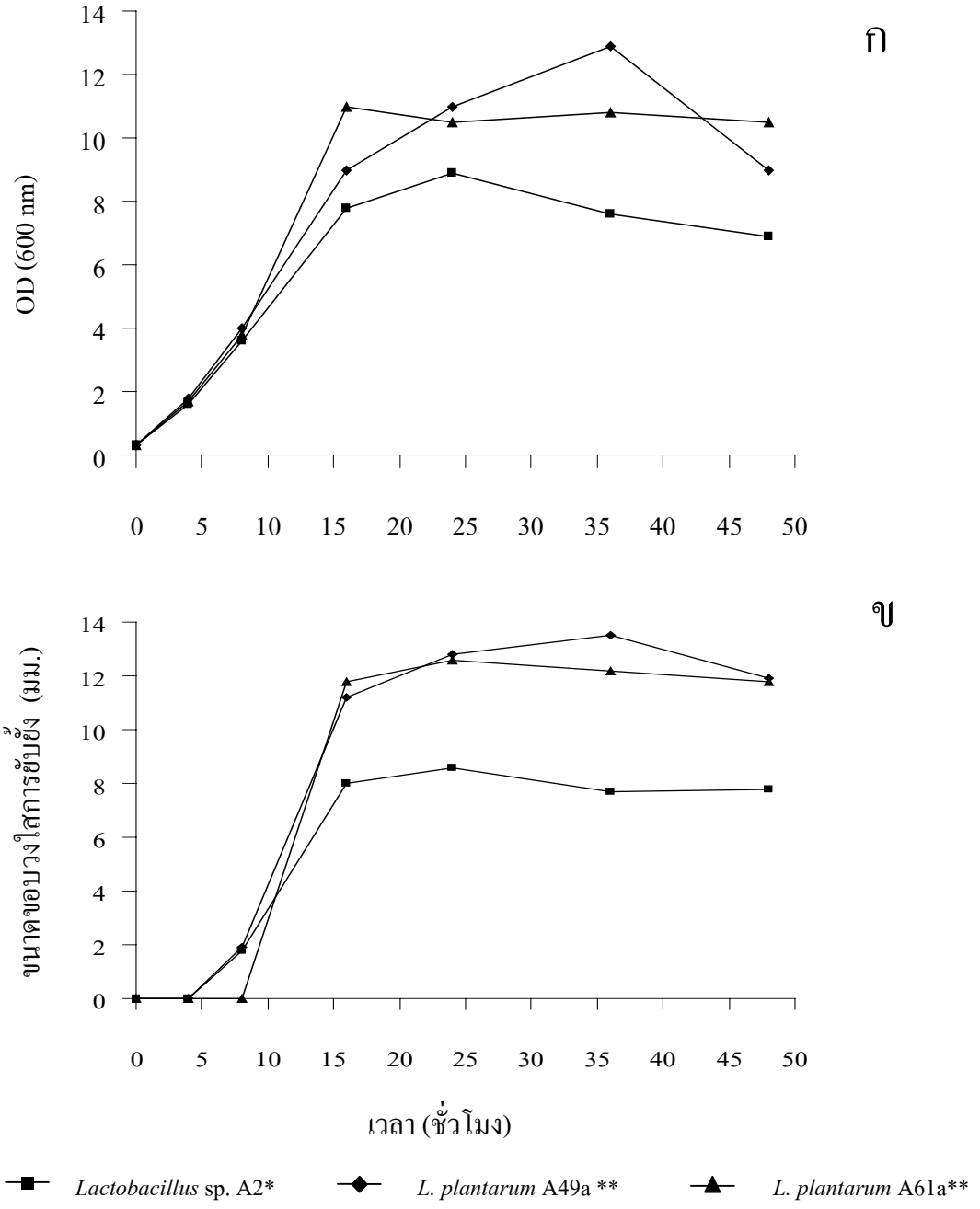
Yang และ Ray (1994) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเติบโตและการผลิตแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติก 4 ชนิดคือ *P. acidilaciti* LB 42-923 สำหรับผลิต Pediocin AcH *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 11454 สำหรับผลิต nisin เชื้อ *L.carnosum* Lem 1 สำหรับการผลิต leuconocin Lem 1 และเชื้อ *L. sake* LB 706 สำหรับผลิต sakasin A พบว่าการเจริญและการผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อมีความสัมพันธ์กัน คือเมื่อเชื้อมีจำนวนมาก ปริมาณการผลิตแบคเทอริโอซินก็มากตามไปด้วยและจะสร้างมากในช่วงปลาย log และระยะ early stationary หลังจากนั้นการผลิตก็จะมีปริมาณคงที่

ส่วน Kimura และคณะ (1997) ทำการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Pediococcus* sp. ISK-1 ที่แยกได้จาก *Nukadoko* พบว่าสามารถผลิตสารยับยั้งได้ตั้งแต่เชื้อเติบโตเข้าสู่ระยะ late log และสร้างมากที่สุดเมื่อสิ้นสุดระยะ stationary

Ko และ Ahn (2000) รายงานว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. lactis* KCA2386 ที่แยกได้จากผักดองสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ตั้งแต่เริ่มเข้าสู่ระยะ log และสร้างมากที่สุดในระยะ stationary

Moretro และคณะ (2000) ทำการเลี้ยงเชื้อ *L. sakei* CCUG 42687 ในอาหาร completely defined medium พบว่าเชื้อเติบโตและสร้างแบคเทอริโอซิน sakasin P ได้ตั้งแต่ระยะ log การสร้างสารยับยั้งจะเพิ่มตามการเพิ่มของจำนวนเซลล์เมื่อเข้าสู่ระยะหลังของการเลี้ยงพบว่าจำนวนเซลล์ลดลงและการสร้างแบคเทอริโอซินก็ลดลงด้วย

Dick และคณะ (2004) ทำการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* 423 และ *L. curvatus* DF 126 ในอาหาร MRS เพื่อผลิตสารยับยั้งที่เป็นแบคเทอริโอซิน plantaricin 423 และ curvaticin DF126 ตามลำดับ พบว่า การผลิตแบคเทอริโอซินของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สัมพันธ์กับการเพิ่มจำนวนของเชื้อ โดย *L. plantarum* 423 ผลิต plantaricin 423 ได้ตั้งแต่เวลา 5 ชั่วโมง ผลิตมากที่สุดที่เวลา 15 ชั่วโมง และหลังจากนั้นการผลิตก็ลดลงเรื่อยๆ แต่เชื้อ *L. curvatus* DF 126 สามารถผลิต curvaticin DF 126 ได้ในระดับที่คงที่ตลอดระยะเวลาการหมัก



รูปที่ 3 การเจริญเติบโต (ก) และการสร้างสารยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 จาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay (ข) ของเชื้อ *Lactobacillus* เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์โดยใช้อาหาร MRS broth

* : บ่มที่ อุณหภูมิ 35 °ซ, เขย่า 150 rpm

** : บ่มที่ อุณหภูมิ 30 °ซ, ไม่เขย่า

4.2 ผลการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth และอาหาร CJ broth

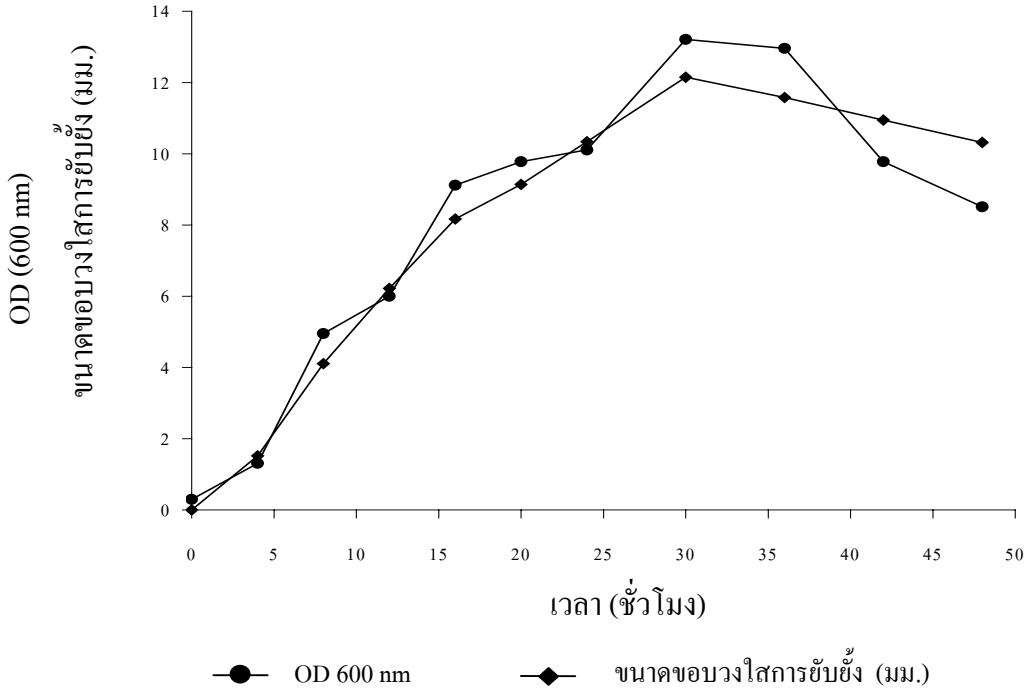
จากการทดลองในข้อ 1.3 พบว่าอาหารสูตรน้ำมะพร้าวส่งเสริมการเจริญและการสร้างสารยับยั้งโดยรวมได้ใกล้เคียงกับอาหาร MRS จึงนำเชื้อ *L. plantarum* A49a ซึ่งเป็นเชื้อที่มีการเจริญและมีความสามารถในการยับยั้งสูงสุดในอาหาร MRS จากการทดลองที่ผ่านมา มาเลี้ยงในฟลาสก์โดยใช้อาหาร MRS broth เปรียบเทียบกับอาหารสูตรน้ำมะพร้าว CJ broth แล้วนำตัวอย่างเชื้อที่เวลาต่างๆ มาวัดการเติบโตโดยวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร และนำ culture broth ที่เวลาเดียวกันมาทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า เพื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์คือ *S. aureus* ATCC 29213 พบว่า เชื้อมีรูปแบบการเติบโตและการสร้างสารยับยั้งในอาหารทั้ง 2 ชนิด เหมือนกันคือ การสร้างสารยับยั้งจะเพิ่มขึ้นตามการเติบโตของเชื้อ โดยในอาหาร CJ broth เชื้อจะเจริญและสร้างสารยับยั้งตั้งแต่ช่วงเวลาแรกที่นำมาทดสอบคือ ชั่วโมงที่ 4 จากนั้นเชื้อเจริญและสร้างสารยับยั้งเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีค่า OD สูงสุดเท่ากับ 13.21 และ ขนาดขอบวงใสการยับยั้งสูงสุด 12.15 มิลลิเมตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้ออยู่ในระยะ late log จากนั้นการเติบโตและการสร้างสารยับยั้งก็เริ่มลดลงที่เวลา 36 ชั่วโมง เป็นต้นไป (รูปที่4) เช่นเดียวกับในอาหาร MRS broth เชื้อเจริญและตรวจพบการสร้างสารยับยั้งตั้งแต่เวลาแรกที่นำมาทดสอบคือ 4 ชั่วโมง จากนั้นการเจริญและการสร้างสารยับยั้งมีรูปแบบและปริมาณใกล้เคียงกับในอาหาร CJ broth กล่าวคือ เชื้อเจริญมีค่า OD สูงสุด เท่ากับ13.04 และมีขนาดขอบวงใสการยับยั้ง เท่ากับ 12.07 มิลลิเมตร ที่เวลา 30 ชั่วโมง แล้วจากนั้น การเติบโตและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อก็เริ่มลดลงที่เวลา 36 ชั่วโมงเป็นต้นไป เช่นเดียวกัน (รูปที่ 5) เมื่อพิจารณา pH ของการเลี้ยงเชื้อในอาหารทั้ง 2 ชนิด พบว่า pH ที่เวลา 30 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อสร้างสารยับยั้งได้สูงสุดนั้น ในอาหาร MRS broth มี pH เท่ากับ 3.95 ส่วนในอาหาร CJ Broth มี pH เท่ากับ 3.86 ดังนั้นความสามารถในการยับยั้งที่เป็นผลจากกรดจึงมากกว่าในอาหาร MRS broth เล็กน้อย

เมื่อการทดลองพบว่าอาหารเหลวสูตร CJ broth ให้ผลการเจริญและสร้างสารยับยั้งของเชื้อที่นำมาทดสอบได้ไม่แตกต่างจากอาหารมาตรฐาน MRS broth ซึ่งนิยมใช้

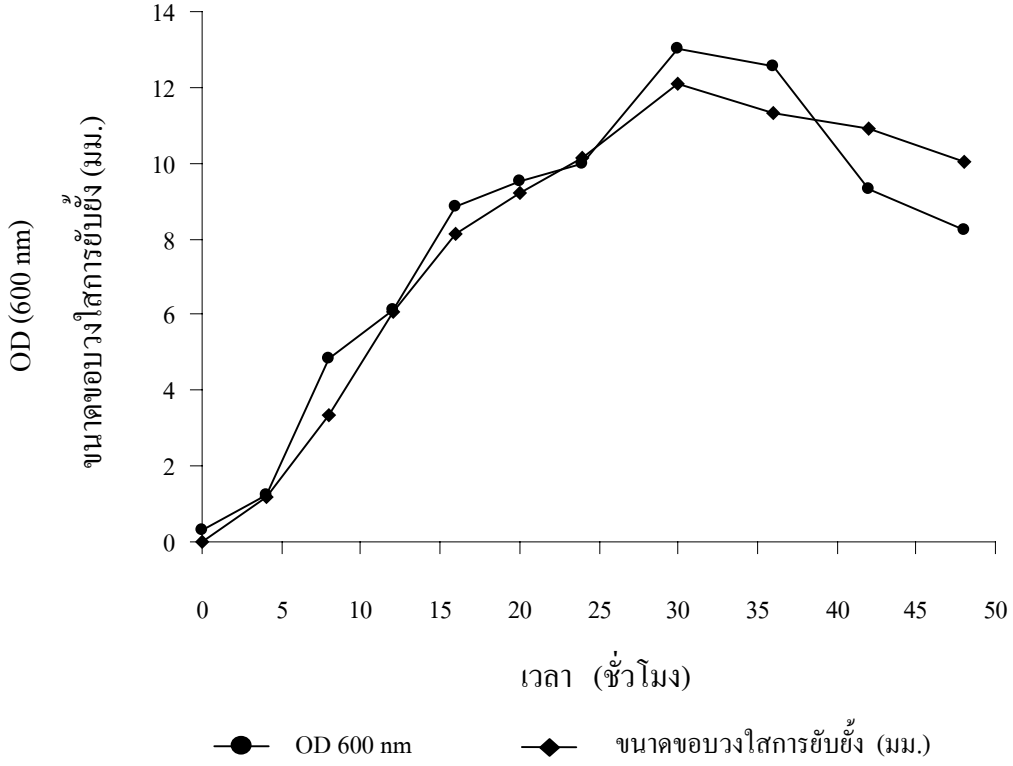
ในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก ดังนั้นในการทดลองที่ต้องเลี้ยงเชื้อปริมาณมาก อาหาร CJ broth จึงน่าจะเป็นอาหารที่นำมาใช้แทน MRS broth ได้

เนื่องจากโดยทั่วไปการใช้อาหารสังเคราะห์หรืออาหารที่มีราคาสูงมาเลี้ยงเชื้อในปริมาณมากเพื่อให้ได้สารที่ต้องการในปริมาณมากพอ มักไม่คุ้มค่า จึงมีผู้ศึกษาหาวิธีลดต้นทุนด้านอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกขึ้นโดยการใช้สิ่งที่หาได้ง่ายตามธรรมชาติหรือเป็นสิ่งที่เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมหรือการเกษตร เช่น ภัทรพล (2543) ได้ใช้ซูโครส 1% เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้น้ำนึ่งปลาทูน่าที่ผ่านการแยกไขมันและตกตะกอนโปรตีนมาแทนแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MRS พบว่าเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus*. (SN.11) มีการเจริญและผลิตแบคเทอริโอซินได้ในปริมาณเท่ากับอาหาร MRS สูตรปกติ

Flores และ Alegre (2001) ทำการผลิต nisin จากเชื้อ *Lactococoous lactis* ATCC 7962 โดยใช้ whey permeate ที่ได้จากอุตสาหกรรมเนยแข็ง นำมาเติมสารต่างๆ เพื่อใช้แทนอาหาร MRS พบว่าอาหารสูตร 1 ที่มีการเติมกรดอะมิโนลงไปด้วยสามารถทำให้เชื้อผลิต nisin ได้มากกว่าอาหารสูตร 2 ที่มีแลกโตสมากเกินไปทำให้มีกรดแลกติกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ



รูปที่ 4 การเติบโตและการสร้างสารยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ของเชื้อ *L. plantarum* A49a จาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ฟลาสก์โดยใช้อาหาร CJ broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ไม่เขย่า



รูปที่ 5 การเติบโตและการสร้างสารยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ของเชื้อ *L. plantarum* A49a จาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า ทดสอบโดยวิธี agar well diffusion assay เมื่อเลี้ยงเชื้อใน ฟลาสก์โดยใช้อาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 30 °ซ ไม่เขย่า

4.3 ผลการศึกษาความสามารถในการยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อใช้ culture broth ที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการทดสอบโดยการนำสารละลายตะกอนโปรตีนที่ได้จากการตกตะกอน culture broth ที่มีความเข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่า ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในอาหาร MRS broth และอาหาร CJ broth ด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟต ที่ระดับความเข้มข้น 0-30, 30-50, 50-70 และ 70-90 % แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าตะกอนที่ได้จากทุกระดับความเข้มข้นมีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ โดยตะกอนที่ระดับความเข้มข้น 50-70 % ให้ผลการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์สูงที่สุด รองลงมาคือระดับความเข้มข้น 70-90 %, 30-50 % และ 0-30 % ตามลำดับ แต่เมื่อนำตะกอนที่ได้มาผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ trypsin พบว่า ตะกอนที่ได้จากระดับความเข้มข้น 50-70 % เท่านั้นที่มีขอบวงใสของการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ลดลง (ตารางที่ 12) แสดงว่าตะกอนจากทุกระดับความเข้มข้นที่นำมาทดสอบมีสารยับยั้งอย่างอื่นอยู่ด้วยแต่ไม่ใช่โปรตีนเนื่องจากไม่ไวต่อเอนไซม์ trypsin ซึ่งสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนมีอยู่เฉพาะในตะกอนที่ได้จากระดับความเข้มข้น 50-70 % เท่านั้นเพราะเมื่อผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ trypsin พบว่ากิจกรรมการยับยั้งส่วนหนึ่งสูญเสียไป

นอกจากนี้ตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร CJ broth ให้ขอบวงใสของการยับยั้งกว้างกว่าตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth เล็กน้อย และที่ระดับความเข้มข้น 50-70 % ที่ผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนนั้นตะกอนที่ได้จากอาหาร CJ broth มีขนาดขอบวงใสของการยับยั้งลดลงมากกว่าตะกอนที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS broth ด้วย โดยในอาหาร CJ broth นั้นเมื่อผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ trypsin พบว่าขนาดขอบวงใสที่ลดลงเฉลี่ย 0.5 มิลลิเมตร ส่วนอาหาร MRS broth ขนาดขอบวงใสลดลงเฉลี่ย 0.32 มิลลิเมตร

เมื่อนำ culture broth ที่ได้จากอาหารทั้ง 2 ชนิด ที่เหลือจากการตะกอนด้วยเกลือแอมโมเนียมซัลเฟตความเข้มข้นสุดท้าย มาทดสอบการยับยั้งพบว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 แต่ไม่ไวต่อเอนไซม์ trypsin แสดงว่าใน culture broth ที่เหลือจากการตกตะกอนนี้ ยังมีสารยับยั้งอื่นๆ ที่อาจเป็นกรดอินทรีย์

หรือไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ไม่ใช่โปรตีนเนื่องจากสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนได้ตกตะกอนออกไปหมดแล้วตั้งแต่ระดับความอิ่มตัว 50-70 %

ตารางที่ 12 ความสามารถในการยับยั้งของตะกอนที่ได้จาก culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า ของเชื้อ *L. plantarum* A49a ที่ระดับความอิ่มตัวต่างๆ ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

ชุดการทดลอง	ขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)									
	ระดับความอิ่มตัวของการตกตะกอน (%)								culture broth ที่เหลือจากการตกตะกอน	
	0-30		30 - 50		50 - 70		70-90			
	CJ	MRS	CJ	MRS	CJ	MRS	CJ	MRS	CJ	MRS
ชุดควบคุม 1	2.35	2.20	4.92	4.78	5.88	5.76	4.77	4.57	9.86	9.44
ชุดควบคุม 2	1.51[a]	1.22[a]	1.93[a]	1.37[a]	3.01[a]	2.61[a]	2.31[a]	2.07[a]	3.97[a]	3.68[a]
ชุดทดสอบ	1.48[a]	1.25[a]	1.89[a]	1.33[a]	2.51[b]	2.29[b]	2.34[a]	2.03[a]	3.92[a]	3.60[a]

ตัวอักษรในแนวตั้งที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ชุดควบคุม 1 : การยับยั้งที่เกิดจากสารละลายตะกอนที่ได้จากส่วนใสความเข้มข้น 10 เท่า

ชุดควบคุม 2 : การยับยั้งที่เกิดจากสารละลายตะกอนที่ได้จากส่วนใสความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์

ชุดทดสอบ : การยับยั้งที่เกิดจากสารละลายตะกอนที่ได้จากส่วนใสความเข้มข้น 10 เท่า + เอนไซม์ trypsin + บัฟเฟอร์

5. ผลการศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่สร้างจากเชื้อ *L. plantarum* A49a

5.1 ผลการศึกษาความไวต่อเอนไซม์ต่างๆ เมื่อเลี้ยงเชื้อที่เวลาต่างๆ ในอาหาร MRS broth

จากการนำ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในอาหาร MRS ในการทดลอง 4.2 ที่เวลา 16, 20, 24 และ 30 ชั่วโมง มาทำให้มีความเข้มข้น 10 เท่า แล้วทดสอบความสามารถในการยับยั้งหลังจากผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ catalase เพื่อทดสอบการผลิตสารยับยั้งที่เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์ย่อยโปรตีนได้แก่ pepsin, trypsin, α-chymotrypsin, protease และ proteinase-K เพื่อทดสอบการผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน และเอนไซม์ amylase เพื่อทดสอบการผลิตสารยับยั้งที่เป็นคาร์โบไฮเดรตได้ผลดังตารางที่ 13 พบว่า ชุดควบคุม 1 คือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ในในการเตรียมสารละลายเอนไซม์ไม่มีผลใดๆ ต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ

การทดสอบด้วยเอนไซม์ catalase พบว่าส่วนใสมีการยับยั้งลดลงทุกเวลาที่นำมาทดสอบ แสดงว่าเชื้อมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทุกช่วงเวลาที่นำมาทดสอบ โดยผลิตได้มากที่สุดในช่วงชั่วโมงที่ 24 โดยขนาดขอบวงใสการยับยั้งลดลง 3.2 มิลลิเมตร เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม 2 ที่ไม่ผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ catalase หลังจากนั้นในชั่วโมงที่ 30 พบว่าการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลดลง

ส่วนการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนนั้นพบว่าที่เวลา 16, 20 และ 24 ชั่วโมง culture broth ที่นำมาทดสอบไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนทุกชนิด เนื่องจากการยับยั้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงว่ามีการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนตั้งแต่เชื้อเติบโตอยู่ในระยะ log โดยในชั่วโมงที่ 20 มีการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนมากกว่าชั่วโมงที่ 16 และ 24 โดยชั่วโมง ที่ 20 ขอบวงใสการยับยั้งลดลง เฉลี่ย 1.4 มิลลิลิตร ชั่วโมงที่ 16 และ 24 ขนาดขอบวงใสการยับยั้งลดลงเฉลี่ย 1.0 และ1.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ แต่ชั่วโมงที่ 30 ไม่พบสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนเนื่องจากขอบวงใสการยับยั้งไม่ลดลงเมื่อผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนทุกชนิด ซึ่งอาจเกิดจากการที่มีเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzymes) หลั่งออกมาจากเซลล์ของเชื้อ *L. plantarum* A49a เองที่ตายและ lysis เนื่องจากในการทดลอง 4.2 พบว่าช่วยปลายระยะ stationary เชื้อมีค่าการดูดกลืนแสงลดลง เนื่อง

จากเคยมีการศึกษาพบว่าการผลิตแบคเทอริโอซินหลายชนิดลดลงเมื่อเชื้อเข้าสู่ช่วงปลายระยะ stationary อาจเกิดได้จากทั้งการดูดซับของแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้กับผิวเซลล์ของเชื้อทั้งที่มีและไม่มีชีวิตและโปรตีนในอาหาร หรือเกิดจากการย่อยสลาย แบคเทอริโอซินโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Yang *et al*., 1992; Leroy and De Vuyst, 1999; Uguen *et al*., 1999) และพบว่าอาจเกิดจากการที่แบคเทอริโอซินบางส่วนถูกจับกับ immunity peptides หรือแบคเทอริโอซินซึ่งเป็นสารโปรตีนเกาะกลุ่มกันเอง (Bogovic-Matijasic and Rogelj, 2000) สาเหตุเหล่านี้ทำให้ตรวจพบปริมาณและกิจกรรมของแบคเทอริโอซินในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงได้

นอกจากนี้พบว่าเชื้อ *L. plantarum* A49a สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากกว่าสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนเนื่องจากขอบวงใสหลังผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ catalase ลดลงมากกว่าการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนทั้งหมด ในทุกช่วงเวลาที่นำมาทดสอบ เช่นในชั่วโมงที่ 16 การยับยั้งที่ลดลงหลังผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ catalase เท่ากับ 2.19 มิลลิเมตร ขณะที่หลังผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนมีการยับยั้งโดยเฉลี่ยลดลงประมาณ 1 มิลลิเมตร โดยเวลาที่เชื้อผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากที่สุดไม่ตรงกับเวลาที่เชื้อผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนได้มากที่สุดด้วย

ส่วนการทดสอบด้วยเอนไซม์ α-amylase พบว่าขนาดของขอบวงใสการยับยั้งไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แสดงว่าเชื้อไม่ผลิตสารยับยั้งที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบ

สำหรับความไวต่อเอนไซม์ของสารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีผู้ศึกษาพบว่าจะเป็นไปในทำนองเดียวกันคือ ส่วนใหญ่จะไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่างๆ ตัวอย่าง เช่น Plantaricin C ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. plantarum* LL441 ที่ไวต่อเอนไซม์ pronase, trypsin และ α-chymotrypsin (Gonzalez *et al*., 1994) pediocin AcH ที่ผลิตโดย *L. plantarum* WHE92 ไวต่อเอนไซม์ pepsin, trypsin, α-chymotrypsin, pronase และ ficin แต่ไม่ไวต่อเอนไซม์ catalase, α-amylase และ lipase (Ennahar *et al*., 1996) แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยเชื้อ *L. helveticus* CNR450 ไวต่อเอนไซม์ pronase, subtilopeptidase A, pronase E, proteinase K, trypsin และ α-chymotrypsin แต่ไม่ไวต่อเอนไซม์ pepsin (Thompson *et al*., 1996) Lactocin A ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก

เชื้อ *L. amylovorus* LMGP-13139 ไวต่อเอนไซม์ proteinase-K, trypsin และ α-chymotrypsin แต่ไม่ไวต่อ catalase, α-amylase, lysozyme และ lipase (Contreras *et al*., 1997) Plantaricin KW30 ที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* ไวต่อเอนไซม์ α-chymotrypsin, proteinase type XIV, trypsin, thermolysin และ proteinase-K แต่ไม่ไวต่อเอนไซม์ α-amylase, lipase และ lysozyme (Jimenez-Diaz *et al*., 1993) แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *L. lactis* KCA2386 ไวต่อเอนไซม์ pronase แต่ไม่ไวต่อ lysozyme, amylase และ RNase (Ko and Ahn, 2000) และแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. plantarum* F1 และ *L.brevis* OG1 ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนแต่ไม่ไวต่อ lipase, catalase, phospholipase C, lysozyme, α-amylase และ dextranase เช่นเดียวกัน (Ogunbanwo *et al*., 2003b) สารยับยั้งนี้เป็นพวกโปรตีน โดยไม่มีส่วนประกอบที่เป็นคาร์โบไฮเดรตหรือไขมัน ต่างกับ Plantaricin S ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก *L. plantarum* LPCO10 ซึ่งไวต่อเอนไซม์ α-chymotrypsin, trypsin, ficin, pronase E, protinase-K , thermolysin, subilopeptidase, α-amylase, dextraase, lipase A และ phospholipase C แสดงให้เห็นว่า Plantarcin S เป็นแบคเทอริโอซินที่มีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมัน หรือเรียกว่า glycolipoprotein และต้องใช้ส่วนประกอบทั้งหมดนี้ ในการออกฤทธิ์ร่วมกันทำลายแบคทีเรียอื่นๆ ด้วย (Jimenez-Diaz *et al*., 1993) แต่ Niku-Paavola และคณะ (1999) ค้นพบสารยับยั้งที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* ซึ่งมีคุณสมบัติไม่ไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไม่ไวต่อเอนไซม์ catalase และมีขนาดโมเลกุลเล็กกว่ากรดแลกติก มันจึงเป็นสารยับยั้งอื่นที่ไม่ใช่แบคเทอริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือกรดแลกติก

ตารางที่ 13 ผลของเอนไซม์ต่อสารยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่าของเชื้อ *L. plantarum* A49a ต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS ใน flask ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

อาหาร/ เวลา	เอนไซม์	ขนาดขอบวงใสจากสารยับยั้ง (มม.)		
		ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
MRS (16 ชม.)	catalase	-	5.47[a]	3.28[c]
	pepsin	-	5.47[a]	4.73[b]
	trypsin	-	5.47[a]	4.45[b]
	α-chymotrypsin	-	5.47[a]	4.36[b]
	protease	-	5.42[a]	4.48[b]
	proteinase-K	-	5.42[a]	4.62[b]
	α-amylase	-	5.45[a]	5.43[a]
MRS (20 ชม.)	catalase	-	6.50[a]	3.69[c]
	pepsin	-	6.50[a]	5.65[b]
	trypsin	-	6.53[a]	5.09[b]
	α-chymotrypsin	-	6.53[a]	5.10[b]
	protease	-	6.50[a]	5.17[b]
	proteinase-K	-	6.50[a]	5.11[a]
	α-amylase	-	6.50[a]	6.49[a]
MRS (24 ชม.)	catalase	-	6.90[a]	3.69[c]
	Pepsin	-	6.90[a]	5.73[b]
	trypsin	-	6.94[a]	5.56[b]
	α-chymotrypsin	-	6.94[a]	5.67[b]
	protease	-	6.90[a]	5.63[b]
	proteinase-K	-	6.90[a]	5.59[b]
	α-amylase	-	6.93[a]	6.91[a]

ตารางที่ 13 (ต่อ)

อาหาร/ เวลา	เอนไซม์	ขนาดขอบวงใสจากสารยับยั้ง (มม.)		
		ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
MRS (30 ชม.)	catalase	-	6.96[a]	4.55[b]
	pepsin	-	6.96[a]	6.92[a]
	trypsin	-	6.92[a]	6.91[a]
	α-chymotrypsin	-	6.92[a]	6.90[a]
	protease	-	7.05[a]	7.04[a]
	proteinase-K	-	7.05[a]	7.03[a]
	α-amylase	-	6.97[a]	6.97[a]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ชุดควบคุม 1 : บัฟเฟอร์

ชุดควบคุม 2 : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์

ชุดทดสอบ : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์ + เอนไซม์

- : ไม่เกิดการยับยั้ง

5.2 ผลการศึกษาความไวต่อความร้อนของสารยับยั้งใน culture broth

จากการนำ culture broth จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 30 °ซ เวลา 20 ชั่วโมง มาทำให้มีความเข้มข้น 10 เท่า แล้วไปทดสอบโดยให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 63 °ซ เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที และอุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เป็นชุดทดสอบ โดยมีชุดควบคุม คือ culture broth ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ เมื่อเปรียบเทียบขนาดของขอบวงใสการยับยั้งระหว่างชุดทดสอบที่อุณหภูมิ ต่างๆ พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งนี้ยังคงออกฤทธิ์ได้ไม่ว่าจะทำการทดสอบที่อุณหภูมิใด (ตารางที่ 14) ดังนั้นสารยับยั้งนี้จึงมีสมบัติทนความร้อนโดยสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที คล้ายกับการทดลองของอรัญญา (2542) ที่ทำการทดสอบการทนต่อความร้อนของสารยับยั้งที่เชื้อ *L. plantarum* A49a ผลิตออกมาแล้วทำให้เข้มข้นเพิ่มขึ้น 10 เท่าโดยผ่านการ lyophilized พบว่าสามารถทนต่อความร้อนได้สูงถึง 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เช่นเดียวกัน ส่วน ศิรินาถ (2540) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ได้แก่ *L. casei* subsp. *rhamnosus* SN11, *Streptococcus* sp. (SN61) และ *S. lactis* (SN33, SN48 และ SN62) สามารถสร้างสารยับยั้งที่ทนความร้อนได้ 90 °ซ เป็นเวลา 45 นาที Niku-Paavola และคณะ (1999) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* VTTE78076 ผลิตสารยับยั้งที่ทนความร้อนได้ถึง 120 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

ตารางที่ 14 การทนความร้อนของสารยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่าของเชื้อ *L. plantarum* A49a ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

ชุดทดลอง	ขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)
ชุดควบคุม (ไม่ผ่านความร้อน)	10.57 [a]
ผ่านความร้อน 63 °ซ, 30 นาที	10.43 [a]
ผ่านความร้อน 100 °ซ, 10 นาที	10.55 [a]
ผ่านความร้อน 100 °ซ, 20 นาที	10.45 [a]
ผ่านความร้อน 100 °ซ, 30 นาที	10.51 [a]
ผ่านความร้อน 121 °ซ, 15 นาที	10.48 [a]

ตัวอักษรในแนวตั้งที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5.3 ผลการศึกษาความไวต่อความร้อนของสารยับยั้งที่ผ่านการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

จากการนำสารละลายตะกอนที่ได้จาก culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า ของเชื้อ *L. plantarum* A49a ที่ระดับความอิ่มตัว 50-70 % ซึ่งได้จากการทดลองที่ 4.3 ซึ่งเป็นระดับที่ให้ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ได้มากที่สุดและมีสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนอยู่ด้วย ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 63 °ซ เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 100 °ซ เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที และ อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที โดยมีชุดควบคุม คือ culture broth ที่ไม่ผ่านการให้ความร้อน จากนั้นนำมาทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ เมื่อเปรียบเทียบขนาดของขอบวงใสการยับยั้งระหว่างชุดทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ กับชุดควบคุม พบว่า ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งนี้ยังคงออกฤทธิ์ที่อุณหภูมิและเวลาที่ทำการทดสอบ (ตารางที่ 15) ซึ่งสารยับยั้งนี้มีสมบัติทนความร้อนโดยสามารถทนความร้อนได้สูงถึง 121 °ซ เป็นเวลา 15 นาที เช่นเดียวกับการทดลองที่ 5.2 แต่การยับยั้งของการทดลองที่ 5.2 มีมากกว่าเนื่องจากเป็นการทดสอบกับสารยับยั้งโดยรวมทั้งหมดของเชื้อ มีผู้ศึกษาพบว่าสารยับยั้งพวกแบคเทอริโอซิน ได้แก่ Plantaricin S, Plantaricin T, Plantaricin LC74 และ Plantaricin UG1 มีสมบัติทนความร้อนได้ 100 °ซ เป็นเวลา 6 นาที (Jimenez – Diaz *et al.,* 1993; Rekhif *et al*., 1994; Enan *et al*., 1996) Plantaricin 149 สามารถทนต่อความร้อนที่ 115 °ซ ได้นาน 10 นาที แต่เมื่อให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 120 °ซ เป็นเวลา 20 นาที พบว่าฤทธิ์ในการยับยั้งลดลง 4 เท่า (Kato *et al*., 1994) ส่วน *L. plantarum* LL441 ที่แยกได้จากนมสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน Plantaricin C ซึ่งทนความร้อนได้ 121 °ซ เป็นเวลา 10 นาที (Gonzalez *et al*., 1994) และ *L. amylovorus* ผลิตแบคเทอริโอซิน Lactocin A ที่สามารถทนต่อความร้อน121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที เช่นเดียวกัน (Contreras *et al*., 1997) ส่วนแบคเทอริโอซิน Bazacin 14 ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* L14 เป็นแบคเทอริโอซินที่ไม่ทนความร้อนโดยที่อุณหภูมิ 80 °ซ จะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งส่วนหนึ่งไป และที่ 100 °ซ จะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งทั้งหมด (Ivanova *et al*., 2000) Ogunbanwo และคณะ (2003b) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* F1 และ *L. brevis* OG1 สามารถ

ผลิตแบคเทอริโอซินที่ทนความร้อนได้ถึง 121 °ซ นาน 60 นาทีและ 121 °ซ นาน 10 นาที ตามลำดับ

ตารางที่ 15 การทนต่อความร้อนของตะกอนที่ระดับความอิ่มตัว 50-70 % ที่ได้จาก culture broth ความเข้มข้น 10 เท่าของเชื้อ *L. plantarum* A49a ต่อการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

ชุดทดลอง	ขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)
ชุดควบคุม (ไม่ผ่านความร้อน)	3.07 [a]
ผ่านความร้อน 63 °ซ, 30 นาที	3.03 [a]
ผ่านความร้อน 100 °ซ, 10 นาที	2.98 [a]
ผ่านความร้อน 100 °ซ, 20 นาที	3.06 [a]
ผ่านความร้อน 100 °ซ, 30 นาที	2.98 [a]
ผ่านความร้อน 121 °ซ, 15 นาที	2.95 [a]

ตัวอักษรในแนวตั้งที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

5.4 ผลการศึกษาการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a

จากผลการทดลองโดยการเลี้ยงเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 จำนวน 1 x 10^8 cells ร่วมกับ culture broth ความเข้มข้น 10 เท่าที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ได้ผลดังตารางที่ 16

ชุดควบคุม 1 ซึ่งมีเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เลี้ยงร่วมกับสารยับยั้งรวมทุกชนิดที่เชื้อผลิตได้ พบว่าเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ถูกทำลายได้หมดภายในเวลา 2 ชั่วโมง เนื่องจากเมื่อนำมานับจำนวนด้วยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งพบว่าไม่มีเชื้อรอดชีวิต

ชุดควบคุม 2 ซึ่งมีเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เลี้ยงร่วมกับ culture broth ที่มีความเข้มข้นเท่ากับชุดทดสอบ พบว่าหลังจากบ่มไว้ 2 ชั่วโมงเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ลดลง 95 % แต่เมื่อบ่มต่อจนครบ 4 ชั่วโมงพบว่าเชื้อตายหมด

ชุดทดสอบ 1 ซึ่งมีเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เลี้ยงร่วมกับ culture broth ที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยการเติมเอนไซม์ catalaseให้มีเฉพาะกรดอินทรีย์และสารโปรตีน พบว่า ในชั่วโมงที่ 2 สามารถทำลายเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ได้ 94.8 % เมื่อบ่มต่อจนถึงชั่วโมงที่ 4 เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ลดลง 99.5 % แต่เมื่อบ่มครบ 6 ชั่วโมงพบว่าเชื้อตายหมด

ชุดทดสอบ 2 ซึ่งมีเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 เลี้ยงร่วมกับ culture broth ที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเติมเอนไซม์ trypsin เพื่อทำลายสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน ให้เหลือเฉพาะกรดอินทรีย์ พบว่า เชื้อมีการรอดชีวิตมากกว่าชุดทดสอบ 1 เล็กน้อย โดยเมื่อบ่มเชื้อครบ 2 ชั่วโมงในชุดทดสอบ 2 มีเชื้อรอดชีวิตมากกว่าชุดทดสอบ 1 ประมาณ 1 X10^5 CFU/มิลลิลิตร เมื่อบ่มครบ 4 ชั่วโมงมีเชื้อรอดชีวิตมากกว่าชุดทดสอบ 1 ประมาณ 1 X10^4 CFU/มิลลิลิตร และเมื่อบ่มครบ 6 ชั่วโมงพบว่าไม่มีเชื้อรอดชีวิตเลยทุกชุดการทดลอง จึงน่าจะเป็นการยืนยันได้ว่าผลการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์ของสารยับยั้งจากเชื้อ *L. plantarum* A49a นั้นส่วนหนึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนด้วย แต่อาจมีอยู่เพียงเล็กน้อย ดังนั้นการยับยั้งที่เกิดขึ้นส่วนใหญ่จึงเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์

การศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ อรัญญา (2542) ที่ศึกษาการยับยั้งการเจริญของ

แบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 10 ชั่วโมง พบว่า สามารถยับยั้ง เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ได้ 97.13 % ยับยั้ง *E. coli* 1189 ได้ 98.78 % และยับยั้ง *B. cereus*, *S. enteritidis* และ *S. typhi* 3299 ได้ 100 % **โดยพบว่าผลการยับยั้งดังกล่าวเกิดจากการยับยั้งร่วมกันของสารยับยั้งทั้งหมดที่เชื้อ** *L. plantarum* A49a **สร้างขึ้น**

สำหรับการศึกษาการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ร่วมกับสารยับยั้งนั้น Motlagh และคณะ (1991) พบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียก่อโรคร่วมกับแบคเทอริโอซินชนิดต่างๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้น pediocin AcH, nisin กับ Nisalin และ sakacin A สามารถลดจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ได้เฉลี่ย 2.9, 2.1 และ 0.6 log cycle ตามลำดับ

Gonzalez และคณะ (1994) ทำการบ่มแบคเทอริโอซิน Plantaricin C ร่วมกับเชื้ออินดิเคเตอร์ชนิดต่างๆ พบว่า สามารถลดจำนวนเชื้อ *L. Sake* CECT906 ได้ 30 % ภายในเวลา 5 นาที และที่เวลา 60 นาที สามารถทำลายเชื้อได้ 50 % โดยไม่ทำให้เซลล์แตก และเมื่อใช้เชื้อ *L. fermentum* LMB13554 เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ พบว่าภายใน 5 นาที Plantaricin C สามารถทำลายเชื้อจนเหลือเพียง 0.6 %

Kato และคณะ (1994) ทำการศึกษาโดยการบ่มแบคเทอริโอซิน Plantaricin NRIC149 400 ยูนิต/มิลลิลิตร ร่วมกับเชื้อ *P. acidilactici* ATCC 8042 ซึ่งอยู่ในระยะ log ที่อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสามารถลดจำนวนเชื้ออย่างรวดเร็วภายในเวลา 1 ชั่วโมงแรก และเมื่อครบ 2 ชั่วโมงสามารถลดจำนวนเชื้อได้ทั้งหมดประมาณ 3 log cycle หลังจากนั้นจำนวนเชื้อคงที่จนครบ 3 ชั่วโมง

Stoffels และคณะ (1994) พบว่าการเติมแบคเทอริโอซิน Carnocin UI49 ความเข้มข้นต่างๆ ลงในบัฟเฟอร์ที่มีเชื้ออินดิเคเตอร์ *L. lactis* ISK-83 จำนวน 10^{7} เซลล์/มิลลิลิตร พบว่าที่ความเข้มข้น 1,000 ยูนิต/มิลลิลิตร แบคเทอริโอซินสามารถทำลายเชื้ออินดิเคเตอร์ได้หมดภายในเวลา 4 ชั่วโมง

Ryan และคณะ (1998) พบว่าแบคเทอริโอซิน lacticin 3147 ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* DPC3174 สามารถทำลายเชื้อ *Streptococcus dysgalactiae* M และ *S. aureus* ที่มีจำนวนเริ่มต้น 10^7 CFU/มิลลิลิตร ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้มากกว่า 99.99 % ในเวลา 2 ชั่วโมงเมื่อบ่มร่วมกัน

Callewaert และคณะ (1999) พบว่าการบ่มแบคเทอริโอซิน Amylovorin L471 ปริมาตร 3.5 มิลลิลิตร ความเข้มข้น 12,800 ยูนิต/มิลลิลิตร ร่วมกับเชื้อ *L. delbrueckii* subp. *bulgaricus* LMG6901 พบว่าสามารถทำลายเชื้อนี้ได้หมดในเวลาเพียง 1 นาที

ตารางที่ 16 ผลการการยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่าของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อบ่มร่วมกับเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ที่เวลาต่างๆ ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay

	จำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 (CFU/ml)			
เวลา (ชม.)	ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ 1	ชุดทดสอบ 2
0	1×10^8	1×10^8	1×10^8	1×10^8
2	-	5×10^6	5.2×10^6	5.3×10^6
4	-	-	4.4×10^5	4.5×10^5
6	-	-	-	-

ชุดควบคุม 1 : *S. aureus* ATCC 29213 + culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า

ชุดควบคุม 2 : *S. aureus* ATCC 29213 + culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + buffer เพื่อเจือจางเท่าชุดทดสอบ

ชุดทดสอบ 1 : *S. aureus* ATCC 29213 + culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + เอนไซม์ catalase

ชุดทดสอบ 2 : *S. aureus* ATCC 29213 + เอนไซม์ catalase + เอนไซม์ trypsin

- : ไม่มีการเจริญของ *S. aureus* ATCC 29213

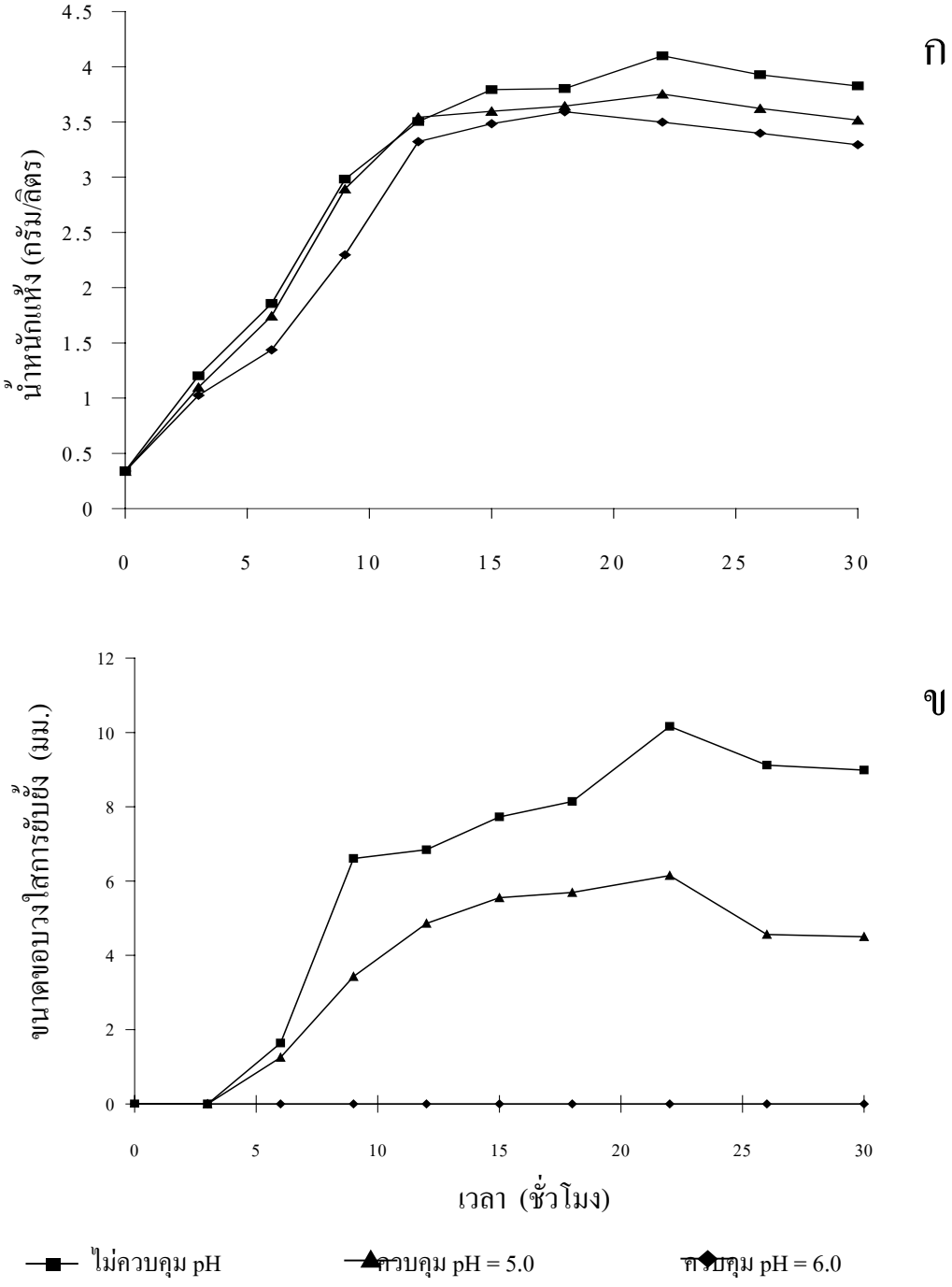
6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักระดับห้องปฏิบัติการ

ผลจากการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* A49a โดยการทดลองเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณเพิ่มมากขึ้นในถังหมัก โดยใช้ถังหมักขนาด 5 ลิตร มีปริมาตรอาหารในการหมัก 3.5 ลิตร ใช้อาหาร CJ broth ซึ่งเป็นอาหารราคาถูกแต่ช่วยให้เชื้อสร้างสารยับยั้งได้ดี เติมเชื้อเริ่มต้น 3 % ที่อุณหภูมิ 30 °ซ และผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งของเชื้อในถังหมักดังนี้

6.1 ผลของ pH ต่อการเติบโตและการสร้างสารยับยั้ง

จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในถังหมักโดยให้อากาศ 0.5 vvm มีการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 30 °ซ ควบคุม pH ให้ได้ 5.0 และ 6.0 ด้วย NaOH ความเข้มข้น 5 โมลลาร์ และไม่ควบคุม pH พบว่า เชื้อมีการเจริญเติบโตมากที่สุดเมื่อเลี้ยงแบบไม่มีการควบคุม pH โดยชั่วโมงที่ 22 มีน้ำหนักแห้ง 4.0 กรัม/ลิตร รองลงมาคือ การเลี้ยงโดยควบคุม pH เท่ากับ 5.0 ที่ชั่วโมง 22 มีน้ำหนักแห้ง 3.75 กรัม/ลิตร และเมื่อควบคุม pH เท่ากับ 6.0 เชื้อมีการเติบโตได้น้อยที่สุดโดยที่ชั่วโมง 18 มีน้ำหนักแห้ง 3.59 กรัม/ลิตร (รูปที่ 6ก) ส่วนการสร้างสารยับยั้งพบว่าสร้างมากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อโดยไม่มีการควบคุม pH เช่นกัน โดยมีขนาดขอบวงใสการยับยั้งเท่ากับ 10.16 มิลลิเมตรที่เวลา 22 ชั่วโมง รองลงมาคือ เมื่อเลี้ยงโดยควบคุม pH เท่ากับ 5.0 โดยมีขนาดขอบวงใสการยับยั้งเท่ากับ 6.15 มิลลิเมตรที่เวลา 22 ชั่วโมงส่วนที่ pH 6.0 นั้นพบว่าไม่มีขอบวงใสการยับยั้งเกิดขึ้นเลยทุกเวลาที่นำมาทดสอบ (รูปที่ 6ข)

pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่ไม่มีการควบคุม pH นั้นพบว่า pH ลดลงเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตมากขึ้น โดย pH ลดลงจาก 6.52 จนต่ำสุดเท่ากับ 3.65 ที่ชั่วโมงที่ 22 ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ stationary และเป็นเวลาที่เชื้อมีปริมาณมากที่สุด มีการสร้างสารยับยั้งมากที่สุด จากนั้น pH เพิ่มขึ้นเล็กน้อยจนคงที่ที่ pH 3.74 จนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง แสดงให้เห็นว่า *L. plantarum* A49a สามารถเติบโตได้ในช่วง pH ตั้งแต่ประมาณ 3.5-6.5 การที่เชื้อนี้สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีสภาพเป็นกรดจะมีข้อดีคือ ป้องกันการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถเจริญในสภาพเป็นกรดระหว่างการเลี้ยงได้



รูปที่ 6 ผลของ pH ต่อการเติบโต (ก) และการสร้างสารยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า (ข) ของเชื้อ *L. plantarum* A49a ในถังหมักโดยใช้อาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ให้อากาศ 0.5 vvm อัตราการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งของ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สภาวะหลังผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ต่างๆ พบว่า ชุดควบคุม 1 ที่เป็นฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่นำมาใช้ในการเตรียมเอนไซม์ไม่มีผลต่อการออกฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ในการทดสอบ

Culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยไม่ควบคุม pH หลังจากเติมเอนไซม์ catalase พบว่าความสามารถในการยับยั้งลดลงทุกช่วงเวลาที่ทำการศึกษา (ตารางที่ 17) แสดงว่าเชื้อมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทุกช่วงเวลาที่นำมาทดสอบ ส่วนการใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนคือ trypsin และ α-chymotrypsin พบว่าที่เวลา 12 ชั่วโมง เชื้อยังไม่มีการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน เนื่องจากขนาดขอบวงใสการยับยั้งไม่ลดลง แต่ที่เวลา 15 18 และ 22 ชั่วโมง พบว่าการยับยั้งของ culture broth ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หลังจากนั้นทุกเวลาที่นำมาทดสอบพบว่าขอบวงใสการยับยั้งไม่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นแสดงว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อนี้ในถังหมัก เชื้อจะผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนตั้งแต่เจริญอยู่ในระยะ early stationary คือเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ประมาณ 15 ชั่วโมง

การทดสอบด้วยเอนไซม์ α-amylase พบว่าไม่มีผลใดๆ ต่อการออกฤทธิ์ของสารยับยั้ง แสดงว่าเชื้อไม่ผลิตสารยับยั้งที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ

จากการเปรียบเทียบการเจริญและการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a ระหว่างการเลี้ยงในฟลาสก์ที่ไม่ควบคุม pH ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ดังการทดลองที่ 4.2 และในถังหมักซึ่งไม่มีการควบคุม pH เหมือนกัน แต่ในถังหมักมีการให้อากาศ 0.5 vvm มีการกวน 150 rpm พบว่าเชื้อมีรูปแบบการเจริญและการสร้างสารยับยั้งคล้ายกัน คือการสร้างสารยับยั้งเพิ่มขึ้นตามการการเจริญของเชื้อ แต่ในถังหมักเชื้อมีการเจริญเติบโตได้เร็วกว่าในฟลาสก์โดยเข้าสู่ระยะ log ได้เร็วกว่า แต่การสร้างสารยับยั้งโดยรวมน้อยกว่า คือที่ 22 ชั่วโมง มีขนาดขอบวงใสมากที่สุดเท่ากับ 10.6 มิลลิเมตร ในขณะที่เมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ มีขนาดขอบวงใสมากที่สุด เท่ากับ 12.15 มิลลิเมตร แต่ใช้เวลา 30 ชั่วโมง (รูปที่ 4) แต่ pH ของ culture broth ในฟลาสก์สูงกว่าในถังหมักแสดงว่าการยับยั้งที่เกิดขึ้นไม่ได้เกิดจากกรดอินทรีย์เพียงอย่างเดียวน่าจะมีสารอื่นร่วมด้วย

ตารางที่ 17 ผลของเอนไซม์ต่อสารยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า ของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ให้อากาศ 0.5 vvm อัตราการกวน 150 rpm ไม่มีการควบคุม pH อุณหภูมิ 30 °ซ ทดสอบโดยใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29313 ด้วยวิธี agar well diffusion assay

เวลา (ชม.)	เอนไซม์	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มม.)		
		ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
12	catalase	-	3.95[a]	3.06[b]
	trypsin	-	3.95[a]	3.93[a]
	α-chymotrypsin	-	3.97[a]	3.94[a]
	α-amylase	-	3.97[a]	3.95[a]
15	catalase	-	4.67[a]	3.11[c]
	trypsin	-	4.67[a]	4.07[b]
	α-chymotrypsin	-	4.72[a]	4.23[b]
	α-amylase	-	4.72[a]	4.70[a]
18	catalase	-	5.12[a]	2.32[c]
	trypsin	-	5.12[a]	2.87[b]
	α-chymotrypsin	-	5.36[a]	3.19[b]
	α-amylase	-	5.36[a]	5.29[a]
22	catalase	-	5.36[a]	4.00[b]
	trypsin	-	5.36[a]	3.68[b]
	α-chymotrypsin	-	5.32[a]	3.85[b]
	α-amylase	-	5.32[a]	5.31[a]

ตารางที่ 17 (ต่อ)

เวลา (ชม.)	เอนไซม์	ค่าเฉลี่ยขนาดขอบวงใสการยับยั้ง (มม.)		
		ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
26	catalase	-	4.00[a]	3.41[b]
	trypsin	-	4.00[a]	3.94[a]
	α-chymotrypsin	-	3.97[a]	3.96[a]
	α-amylase	-	3.97[a]	3.96[a]
30	catalase	-	3.41[a]	3.06[b]
	trypsin	-	3.41[a]	3.39[a]
	α-chymotrypsin	-	3.38[a]	3.35[a]
	α-amylase	-	3.38[a]	3.37[a]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ชุดควบคุม 1 : บัฟเฟอร์

ชุดควบคุม 2 : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์

ชุดทดสอบ : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์ + เอนไซม์

- : ไม่เกิดการยับยั้ง

เมื่อพิจารณาถึงการสร้างสารยับยั้งอื่นพบว่าการเลี้ยงในถังหมักมีการผลิตสารยับยั้งที่เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และสารโปรตีนมากกว่าเนื่องจากเมื่อผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ catalase และเอนไซม์ย่อยโปรตีนแล้วพบว่า culture broth มีความสามารถในการยับยั้งลดลงมากกว่าเมื่อเลี้ยงในฟลาสก์ (ตารางที่ 13) อาจเนื่องจากในถังหมักมีการกวนและการให้อากาศอยู่ตลอดเวลาทำให้เชื้อได้สัมผัสกับออกซิเจนได้มากจึงผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Villegas และ Gilliland (1998) ที่เลี้ยงเชื้อ *L. delbrueckii* subsp. *lactis* I ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีน้ำตาลกลูโคส 55.5 มิลลิโมลาร์ ที่อุณหภูมิ 5 °ซ พบว่าสภาวะนี้เชื้อจะไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์แต่มีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยผลิตมากที่สุดที่เวลา 18 ชั่วโมงและหลังจากชั่วโมงที่ 20 การผลิตจะค่อยๆ ลดลง และเมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหาร MRS แบบมีและไม่มีการกวนพบว่าการกวนไม่มีผลต่อปริมาณเซลล์โดยรวมแต่ทำให้ระยะ lag ของเชื้อนานขึ้นและการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สูงกว่าไม่กวนเนื่องจากเชื้อสามารถสัมผัสกับอากาศได้มากขึ้นทำให้การผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพิ่มขึ้นด้วย ส่วน Ocana และคณะ (1999) พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *L. crispatus* F117 ในอาหาร LAPTg broth ที่มีการกวนจะมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากกว่าไม่มีการกวน และเมื่อเลี้ยงโดยไม่กวนและไม่ให้ออกซิเจนพบว่าเชื้อไม่มีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

สำหรับการเปรียบเทียบการผลิตแบคเทอริโอซินระหว่างการเลี้ยงในฟลาสก์และในถังหมักนั้น Yang และ Ray (1994) พบว่าแบคเทอริโอซินสี่ชนิด คือ pediocin AcH, nisin, leuconocin Lcm I และ sakacin A จะเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มจำนวนของเชื้อและเกิดขึ้นมากที่สุดเมื่อเชื้ออยู่ในระยะ stationary ทั้งสองสภาวะคือใน ฟลาสก์ที่ไม่มีการควบคุม pH และในถังหมักซึ่งมีการควบคุม pH แต่ในถังหมักมีมวลเซลล์และการผลิตแบคเทอริโอซินสูงกว่าการเลี้ยงในฟลาสก์

ส่วนการเลี้ยงเชื้อโดยมีการควบคุม pH เท่ากับ 5.0 พบว่าหลังจากทดสอบด้วยเอนไซม์ catalase นั้น culture broth มีความสามารถในการยับยั้งลดลงทุกเวลา แสดงว่าที่ pH 5.0 เชื้อมีการผลิตไฮโดรเจนทุกช่วงเวลาที่นำมาทดสอบเช่นกัน (ตารางที่ 18)

ตารางที่ 18 ผลของเอนไซม์ต่อสารยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่าของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ให้อากาศ 0.5 vvm อัตราการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 30 °ซ ควบคุม pH เท่ากับ 5.0 ทดสอบโดยใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29313 ด้วยวิธี agar well diffusion assay

เวลา (ชม.)	เอนไซม์	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มม.)		
		ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
12	catalase	-	3.95 [a]	0.75 [b]
	trypsin	-	3.95 [a]	3.87 [a]
15	catalase	-	4.48 [a]	0.95 [b]
	trypsin	-	4.48 [a]	3.51 [b]
18	catalase	-	4.65 [a]	1.03 [b]
	trypsin	-	4.65 [a]	3.63 [b]
22	catalase	-	4.85 [a]	0.90 [b]
	trypsin	-	4.85 [a]	3.90 [b]
26	catalase	-	4.50 [a]	-
	trypsin	-	4.50 [a]	4.47 [a]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ชุดควบคุม 1 : บัฟเฟอร์

ชุดควบคุม 2 : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์

ชุดทดสอบ : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์ + เอนไซม์

- : ไม่เกิดการยับยั้ง

การทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนพบว่าที่เวลา 12 และ 26 ชั่วโมง เชื้อไม่มีการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน เนื่องจากขนาดขอบวงใสการยับยั้งไม่ลดลง แต่ในชั่วโมงที่ 15, 18 และ 22 เชื้อมีการผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนเพราะขนาดขอบวงใสการยับยั้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 18) โดยในชั่วโมงที่ 18 เชื้อมีการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนมากกว่าชั่วโมงที่ 15 และชั่วโมงที่ 22 ส่วนชั่วโมงที่ 26 นั้นการยับยั้งที่เกิดขึ้นมาจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้งหมดเนื่องจากเมื่อผ่านการทดสอบกับเอนไซม์ catalase แล้ว culture broth ไม่มีความสามารถในการยับยั้งคงเหลือเลย

ดังนั้นจากการทดสอบการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนพบว่า เมื่อเลี้ยงเชื้อโดยไม่มีการควบคุม pH และมีการควบคุม pH เท่ากับ 5.0 นั้น ขนาดขอบวงใสการยับยั้งหลังการทดสอบด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนลดลงมากที่สุดคือ ที่เวลา 18 ชั่วโมงเท่ากัน แต่ขนาดขอบวงใสของการเลี้ยงแบบไม่ควบคุม pH ลดลงมากกว่า คือ ลดลงเฉลี่ย 2.25 มิลลิเมตร ขณะที่การเลี้ยงโดยควบคุม pH เท่ากับ 5.0 ขนาดขอบวงใสลดลงเฉลี่ย 1.02 มิลลิลิตร

ส่วนการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a โดยควบคุม pH เท่ากับ 6.0 แล้วพบว่า culture broth ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเลยนั้น อาจเกิดเนื่องจากสารยับยั้งส่วนใหญ่เป็นกรดอินทรีย์เมื่อ pH เป็นกลางจึงไม่มีฤทธิ์ยับยั้ง และที่ pH 6.0 อาจไม่เหมาะต่อเชื้อ *L. plantarum* A49a ในการผลิตสารยับยั้งอื่นด้วยจึงไม่เกิดขอบวงใสการยับยั้งขึ้นเลย

สำหรับการศึกษาที่ผ่านมานั้น Ivanova และคณะ (2000) พบว่าการผลิตแบคเทอริโอซิน Bozacin 14 จากเชื้อ *L. lactis* subsp. *lactis* L14 ทั้งการไม่ควบคุมและควบคุม pH เท่ากับ 5.5 เชื้อมีรูปแบบการผลิตสารยับยั้งแบบเดียวกันทั้ง 2 สภาวะคือ มีฤทธิ์การยับยั้งสูงสุดเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 6 ชั่วโมง คงอยู่ 2-3 ชั่วโมง หลังจากนั้นการยับยั้งลดลงเมื่อเข้าสู่หลังชั่วโมงที่ 22

การควบคุม pH ขณะเลี้ยงนั้น Moevedt-Abildgaard และคณะ(1995) รายงานว่าเชื้อ *L. sake* L45 สามารถผลิต Lactocin S ได้ 2,000-3,000 ยูนิต/มิลลิลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่ควบคุม pH ตลอดการหมักเท่ากับ 5.0 แต่ที่ pH 6.0 ทำให้การออกฤทธิ์ลดลง 10 % และถ้า pH เพิ่มขึ้นมากกว่า 6.0 จะไม่มีฤทธิ์ในการทำลายแบคทีเรียอื่นๆ

Barcena และคณะ (1998) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* LL441 สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน plantaricin C ได้มากที่สุดเมื่อควบคุม pH ตลอดการหมักเท่ากับ 5.0 เช่นกัน

Leroy และ De vuyst (1999) รายงานว่าเมื่อทำการเลี้ยงเชื้อ *L. sake* CTC 494 ในถังหมักโดยใช้อาหาร MRS เชื้อเติบโตได้มากที่สุดเมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อมี pH ระหว่าง 5.5 และ 6.0 ส่วนการผลิต แบคเทอริโอซิน Sakacin K สูงสุดที่ pH 5.5 แต่ที่ pH สูงกว่านี้ การผลิตจะลดลง และเมื่อ pH ลดลงเท่ากับ 4.5 ตรวจไม่พบแบคเทอริโอซินเลย นอกจากนี้เมื่อ pH เพิ่มขึ้นทำให้ฤทธิ์ของแบคเทอริโอซินชนิดนี้ลดลง เนื่องจากแบคเทอริโอซินมีการเข้าไปเกาะติดอยู่กับผนังเซลล์ของเชื้อมากขึ้น ส่วนเวลาในการผลิตพบว่า เชื้อผลิต Sakacin K ได้มากที่สุดเมื่อมีอายุ 20 ชั่วโมงซึ่งอยู่ในระยะ log จากนั้นการผลิตจะลดลงเมื่อเชื้อเจริญเข้าสู่ระยะ late log และระยะ stationary ส่วนการผลิตกรด แลกติกของเชื้อนี้ พบว่าเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มจำนวนเซลล์แต่เมื่อจำนวนเซลล์คงที่การผลิตกรดก็เริ่มคงที่ด้วย โดยเวลาที่ปริมาณกรดมากที่สุดคือเวลาที่เชื้อใช้น้ำตาลกลูโคสในอาหารหมดพอดี

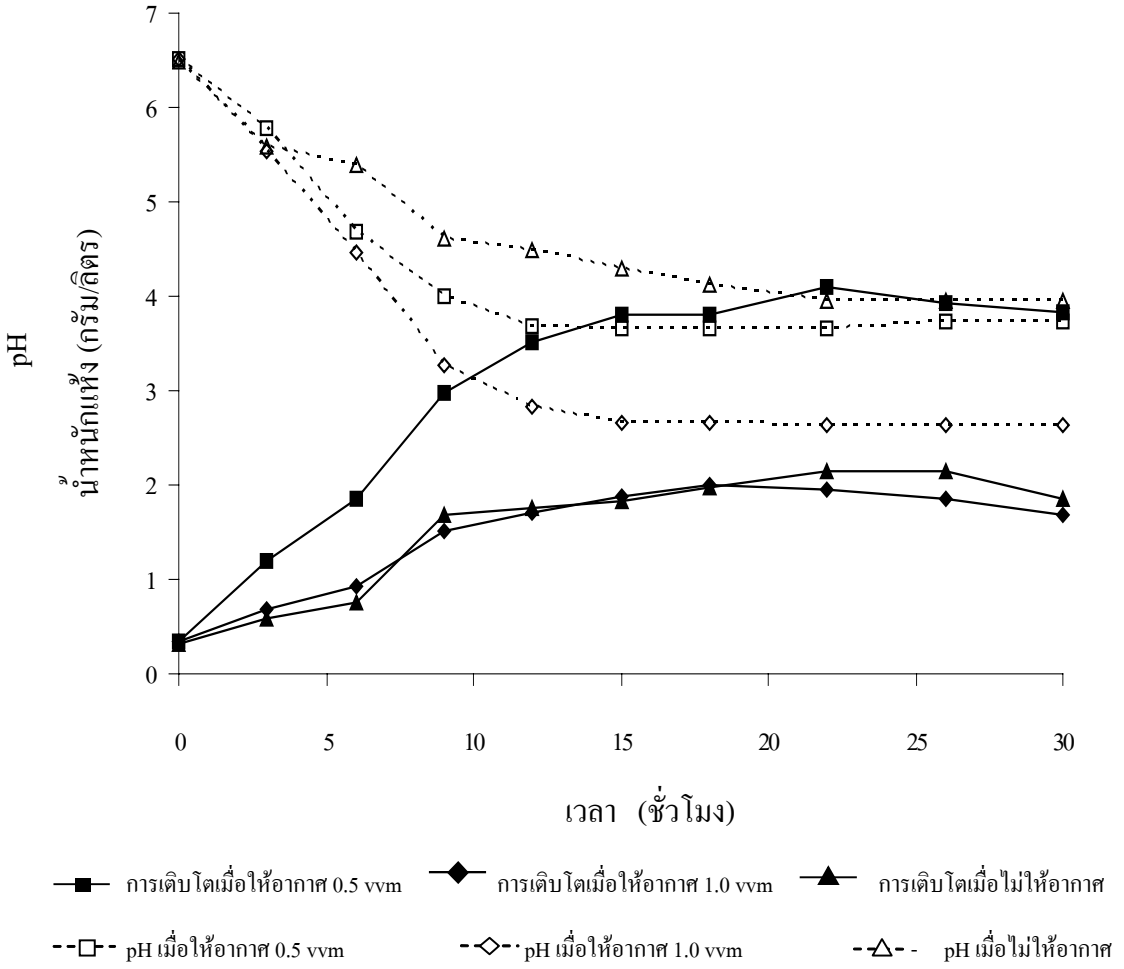
ดังนั้นจึงพอสรุปได้ว่าความสามารถในการยับยั้งของเชื้อ *L. plantarum* A49a ทั้งที่เลี้ยงในอาหารแข็ง อาหารเหลวในฟลาสก์ และในถังหมักโดยไม่มีการควบคุม pH นั้นความสามารถส่วนใหญ่มาจากผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และมีสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนรวมอยู่ด้วยเป็นส่วนน้อย

6.2 ผลของการให้อากาศ

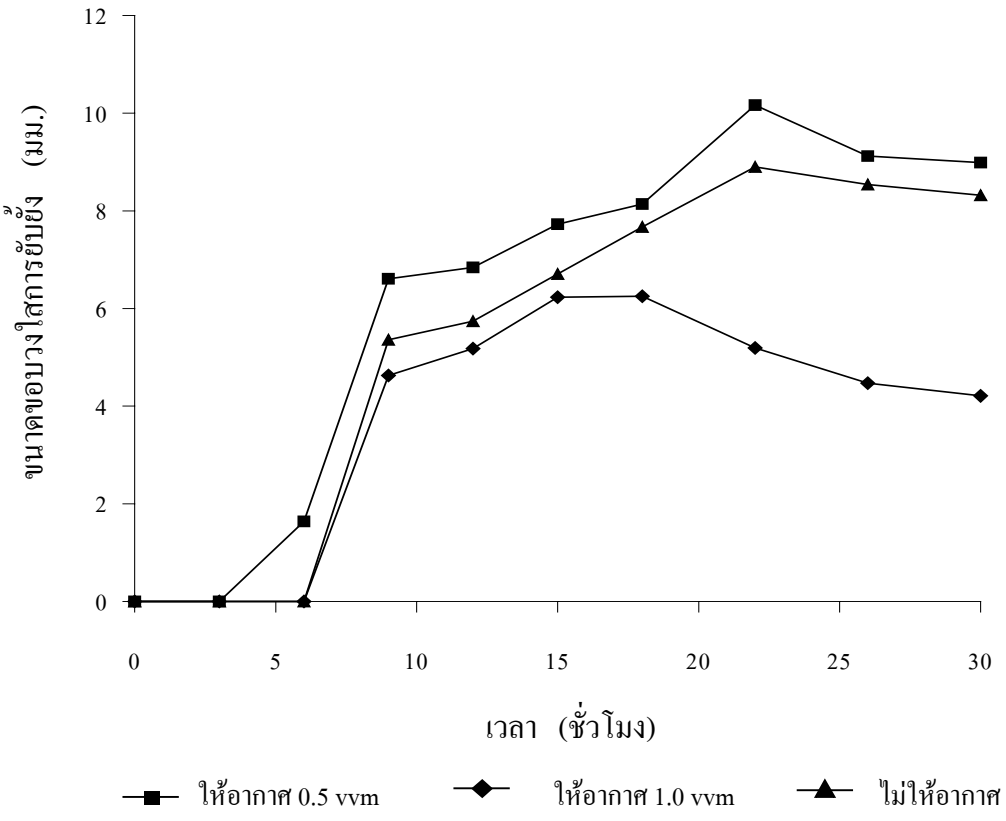
จากการศึกษาผลของการให้อากาศเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในถังหมักที่มีอัตราการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 30 °ซ ไม่มีการควบคุม pH ตลอดการทดลอง เปรียบเทียบระหว่างไม่ให้อากาศกับการให้อากาศ 0.5 และ 1.0 vvm เป็นเวลา 30 ชั่วโมง ได้ผลการเจริญของเชื้อดัง รูปที่ 7 ซึ่งพบว่าเมื่อให้อากาศ 0.5 vvm เชื้อ *L. plantarum* A49a มีการเจริญสูงสุดโดยมีเซลล์แห้ง 4.09 กรัม/ลิตร (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 11.73) ที่เวลา 22 ชั่วโมง รองลงมากคือ การเลี้ยงที่ไม่มีการให้อากาศซึ่งมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 2.15 กรัม/ลิตร ที่เวลา 22 ชั่วโมงเช่นกัน ส่วนการให้อากาศ 1.0 vvm เชื้อมีการเจริญต่ำสุดคือมีน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 1.98 กรัม/ลิตร ที่เวลา 18 ชั่วโมง

ส่วนผลการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ได้ผลดังรูปที่ 8 โดยพบว่า culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ที่มีการให้อากาศ 0.5 vvm ให้ขนาดวงใสการยับยั้งสูงสุดคือ 10.16 มิลลิเมตร ที่เวลา 22 ชั่วโมง รองลงมาคือ การเลี้ยงเชื้อโดยไม่มีการให้อากาศซึ่งมีขนาดขอบวงใสการยับยั้ง 8.90 มิลลิเมตรที่เวลา 22 ชั่วโมง เช่นเดียวกัน ส่วนการเลี้ยงโดยให้อากาศ 1.0 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที พบว่าขนาดขอบวงใสการยับยั้งสูงสุดที่เกิดขึ้นเท่ากับ 6.25 มิลลิเมตรที่เวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งการยับยั้งจะน้อยกว่าสองสภาวะแรก และพบว่าทั้งสามสภาวะนี้ช่วงเวลาที่ culture broth มีการยับยั้งโดยรวมสูงสุดเป็นช่วงเดียวกับเวลาที่เชื้อมีจำนวนมากที่สุด

จากผลการศึกษาการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน ที่เวลา 12, 15, 18 และ 22 ชั่วโมง ของการเลี้ยงโดยให้อากาศ 0.5 vvm (ตารางที่ 17) และการเลี้ยงเชื้อโดยไม่อากาศ (ตารางที่ 19) พบว่า culture broth ที่เวลา 15, 18 และ 22 ชั่วโมง มีขนาดของขอบวงใสการยับยั้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม โดยการเลี้ยงที่ให้อากาศ 0.5 vvm มีการผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนมากกว่าการเลี้ยงที่ไม่ให้อากาศ เนื่องจากขนาดของวงใสการยับยั้งลดลงมากกว่า และทั้งสองสภาวะนี้เชื้อเริ่มมีการผลิตสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนในชั่วโมงที่ 15 และผลิตมากที่สุดในชั่วโมงที่ 18 คงอยู่จนชั่วโมงที่ 22 ส่วนชั่วโมงที่ 26 ไม่พบฤทธิ์การยับยั้งที่เกิดจากสารโปรตีนเช่นเดียวกับการเลี้ยงในถังหมักที่ผ่านมา



รูปที่ 7 ผลของการให้อากาศต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของ pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ไม่ควบคุม pH มีอัตราการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ



รูปที่ 8 ผลของการให้อากาศต่อการสร้างสารยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ของเชื้อ *L. plantarum* A49a จาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay เมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ไม่ควบคุม pH มีอัตราการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ

ส่วนการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนเมื่อให้อากาศ 1.0 vvm พบว่าขอบวงใสลดลงกว่าชุดควบคุมเล็กน้อยและ แสดงว่ามีการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนน้อยมากจนไม่แตกต่างทางนัยสำคัญ (ตารางที่ 20) ทั้งนี้อาจเป็นไปได้ว่าอากาศจัดเป็น stress factor ต่อเชื้อนี้ทำให้การเจริญเติบโตและการผลิตสารยับยั้งของเชื้อได้ไม่ดี แม้ว่าสำหรับเชื้อแบคทีเรียแลกติกบางชนิดเช่น De Vuyst และคณะ (1996) พบว่าเชื้อ *L. amylovorus* L471 สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน Amylovorin Ll471 ได้เพิ่มขึ้นมากกว่าเดิมเมื่อมีการให้ออกซิเจนเพิ่มขึ้น หรือ Morvedt-Abildgaard และคณะ (1995) ที่พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *L. sake* ในสภาวะที่มีอากาศทำให้เชื้อผลิตแบคเทอริโอซิน Lactocin S ลดลง นอกจากนี้ Parente และ Ricciardi (1999) กล่าวว่าการให้อากาศ 10-40 มิลลิลิตร/นาที ในการเลี้ยงเชื้อ *L. lactis* สายพันธุ์ IO-1 ทำให้การผลิต nisin Z ลดลงอย่างนัยสำคัญด้วยเช่นกัน สันนิษฐานว่าออกซิเจนทำให้มีการเกิด chemical degradation ขึ้น ซึ่งจะไปกดการแสดงออกของยีนที่ควบคุมการผลิตแบคเทอริโอซิน ทำให้เชื้อมีการผลิตแบคเทอริโอซินลดลงได้

ส่วนการทดสอบการสร้างสารยับยั้งที่เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่เวลา 12 15 18 22 และ 26 ชั่วโมง พบว่าการให้อากาศ 1.0 vvm มีขนาดขอบวงใสการยับยั้งลดลงกว่าชุดควบคุมอย่างเห็นได้ชัด (ตารางที่ 20) แสดงว่าเชื้อมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทุกช่วงเวลาที่นำมาทดสอบ และมากกว่าการเลี้ยงในสภาวะอื่นๆ ที่ผ่านมาด้วย เนื่องจากเป็นชุดการทดลองที่มีการให้ออกซิเจนแก่เชื้อมากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าในสภาวะนี้ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจะลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 7) จาก 6.52 เหลือ 2.83 ในชั่วโมงที่ 12 แล้วค่อยลดลงอย่างช้าๆ จนเท่ากับ 2.63 เมื่อเวลา 30 ชั่วโมง แสดงว่าการยับยั้งในสภาวะนี้เกิดขึ้นเนื่องจากผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นส่วนใหญ่ มีสารที่เป็นโปรตีนน้อยมาก สำหรับ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อโดยให้อากาศ 0.5 vvm พบว่า มีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทุกเวลาเช่นเดียวกัน แต่น้อยกว่าเมื่อมีการให้อากาศ 1.0 vvm และการเลี้ยงโดยไม่มีการให้อากาศพบว่า culture broth หลังผ่านการทดสอบด้วยเอนไซม์ catalase มีขอบวงใสลดลงเล็กน้อย อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 19) แสดงว่าเชื้อมีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เพียงเล็กน้อยเท่านั้น ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Ocana และคณะ (1999) ที่พบว่า

การเลี้ยงเชื้อ *L. crispatus* F117 ในอาหาร LAPTg broth โดยไม่มีการกวนและไม่ให้ออกซิเจนพบว่าเชื้อไม่มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

จากการทดลองนี้จะเห็นได้ว่าเชื้อ *L. plantarum* A49a สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีการให้อากาศ 0.5 vvm อาจเนื่องจากการที่เชื้อนี้เป็นสายพันธุ์ที่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตเพียงเล็กน้อย (micro aerophilic bacteria) ดังนั้น อากาศ 0.5 vvm จึงเพียงพอต่อการผลิตมวลเซลล์และการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ ส่วนการไม่ให้อากาศเลยก็ทำให้เชื้อเจริญและสร้างสารยับยั้งได้น้อยเนื่องจากปริมาณออกซิเจนที่เซลล์จะนำไปใช้มีอยู่ในปริมาณจำกัด

สำหรับการศึกษาอื่นๆ ที่ผ่านมาเกี่ยวกับการให้อากาศขณะทำการเลี้ยงเชื้อเพื่อผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกนั้นมีทั้งผลการการทดลองที่สนับสนุนและขัดแย้งกัน กล่าวคือ Gonzalez และคณะ (1994) พบว่าการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* LL441 ในถังหมักที่มีการให้อากาศและมีการกวนเบาๆ นั้นเชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซิน Plantaricin C ได้มากที่สุด ส่วน Fiorentini และคณะ (2001) พบว่า *L. plantarum* BN สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ดีในถังหมักที่มีการให้อากาศ 0.7 vvm

Kimura และคณะ (1997) พบว่าการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *Pediococcus* sp. ISK-1 ในถังหมักเชื้อสามารถผลิตสารยับยั้งได้มากที่สุด เมื่อมีอัตราการกวน 440 rpm และไม่ให้ออกซิเจน

ตารางที่ 19 ผลของเอนไซม์ต่อสารยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่าของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ไม่มีการให้อากาศ มีอัตราการกวน 150 rpm อุณหภูมิ 30 °ซ ทดสอบโดยใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29313 ด้วยวิธี agar well diffusion assay

เวลา (ชม.)	เอนไซม์	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มม.)		
		ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
12	catalase	-	3.87 [a]	3.77 [a]
	trypsin	-	3.87 [a]	3.89 [a]
15	catalase	-	4.59 [a]	4.45 [a]
	trypsin	-	4.59 [a]	4.22 [b]
18	catalase	-	5.21 [a]	5.12 [a]
	trypsin	-	5.21 [a]	4.24 [b]
22	catalase	-	5.17 [a]	5.06 [a]
	trypsin	-	5.17 [a]	4.45 [b]
26	catalase	-	4.05 [a]	3.92 [a]
	trypsin	-	4.05 [a]	4.02 [a]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ชุดควบคุม 1 : บัฟเฟอร์

ชุดควบคุม 2 : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์

ชุดทดสอบ : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์ + เอนไซม์

- : ไม่เกิดการยับยั้ง

ตารางที่ 20 ผลของเอนไซม์ต่อสารยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่าของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร อัตราการกวน 150 rpm ให้อากาศ 1 vvm อุณหภูมิ 30 °ซ ทดสอบโดยใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ด้วยวิธี agar well diffusion assay

เวลา (ชม.)	เอนไซม์	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มม.)		
		ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
12	catalase	-	3.85 [a]	2.77 [b]
	trypsin	-	3.85 [a]	3.78 [a]
15	catalase	-	4.54 [a]	1.01 [b]
	trypsin	-	4.54 [a]	4.46 [a]
18	catalase	-	5.26 [a]	1.36 [b]
	trypsin	-	5.26 [a]	5.18 [a]
22	catalase	-	5.22 [a]	2.36 [b]
	trypsin	-	5.22 [a]	5.20 [a]
26	catalase	-	4.61 [a]	2.10 [b]
	trypsin	-	4.61 [a]	4.58 [a]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ชุดควบคุม 1 : บัฟเฟอร์

ชุดควบคุม 2 : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์

ชุดทดสอบ : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์ + เอนไซม์

- : ไม่เกิดการยับยั้ง

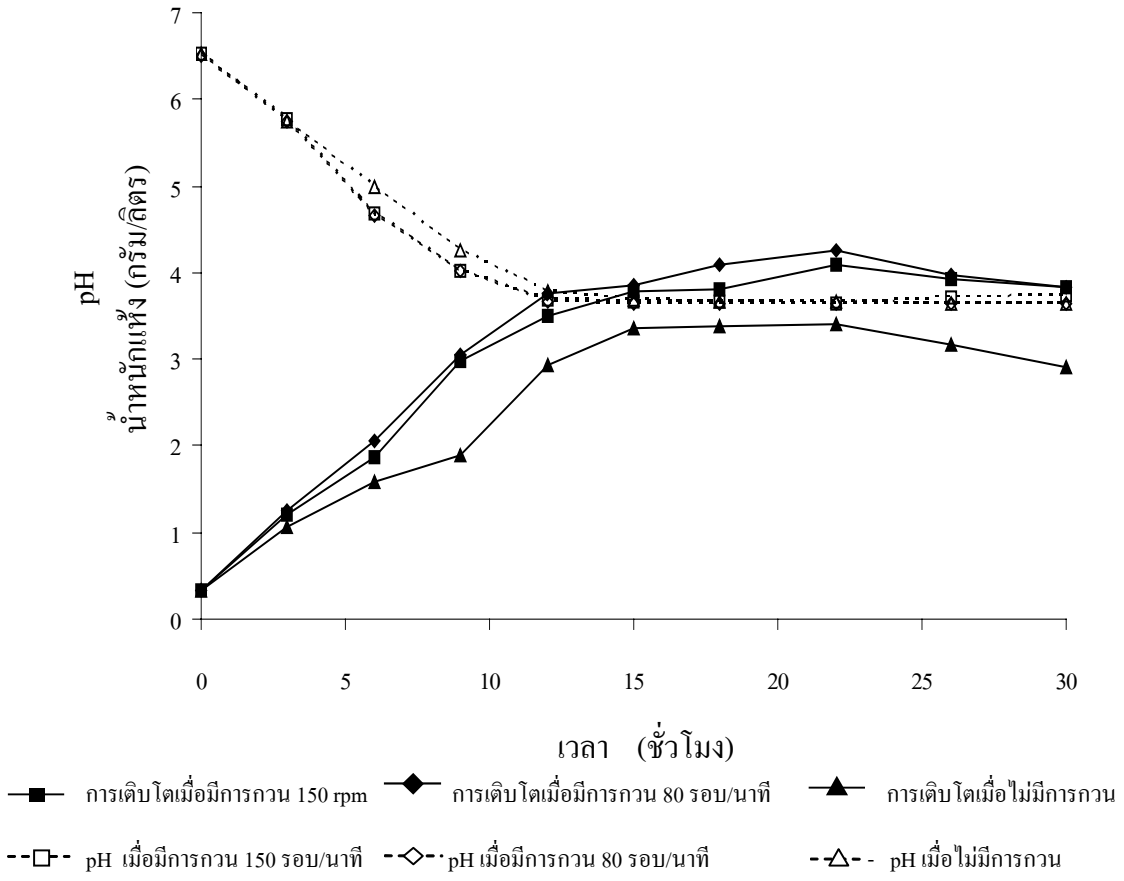
6.3 ผลของการกวน

จากการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในถังหมักที่มีการให้อากาศ 0.5 vvm ปรับระดับความเร็วรอบของการกวนให้เป็น 80 rpm และไม่มีการกวน อุณหภูมิ 30 °ซ และไม่ควบคุม pH เป็นเวลา 30 ชั่วโมง พบว่ามีผลให้เชื้อ *L. plantarum* A49a เติบโตได้มากที่สุด เมื่อมีอัตราการกวน 80 รอบ/นาที (รูปที่ 9) โดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง 4.26 กรัม/ลิตร (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 11.95) ที่เวลา 22 ชั่วโมง ซึ่งมากกว่าการทดลองที่ผ่านมา ที่มีอัตราการกวน 150 rpm และมากกว่าการเลี้ยงที่ไม่มีการกวนซึ่งให้น้ำหนักเซลล์แห้งมากที่สุดที่เวลา 22 ชั่วโมง เท่ากับ 3.4 กรัม/ลิตร (ค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร เท่ากับ 9.01)

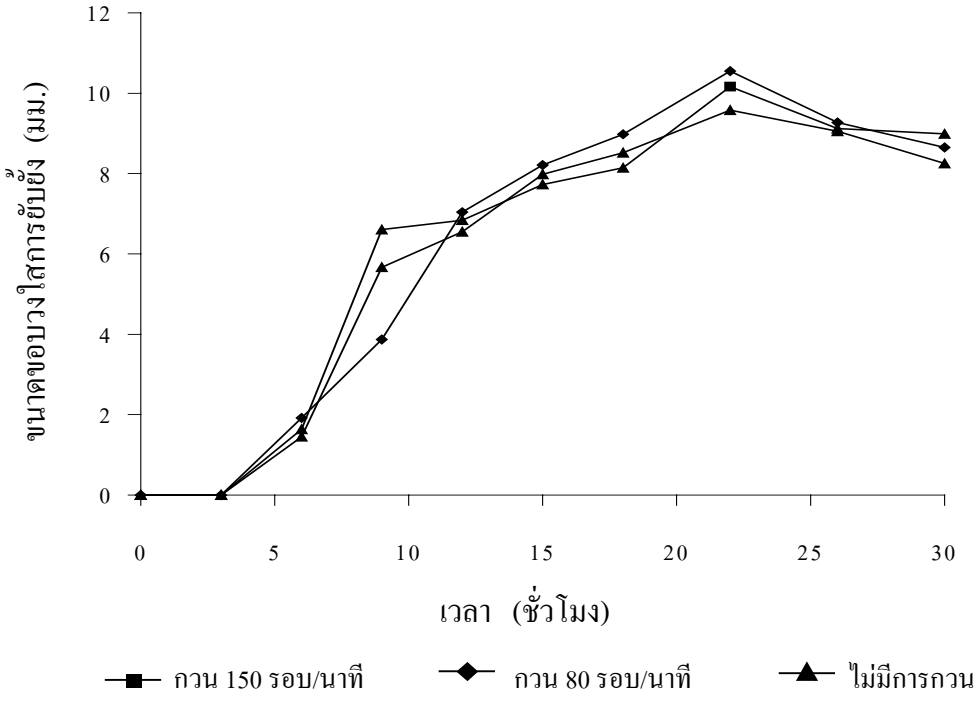
ส่วนการสร้างสารยับยั้ง ต่อ *S. aureus* ATCC 29213 พบว่าทุกสภาวะของการกวนให้ขนาดขอบวงใสการยับยั้งมากที่สุดที่เวลา 22 ชั่วโมงเท่ากัน (รูปที่ 10) ซึ่งตรงกับเวลาที่เชื้อมีปริมาณมากที่สุด โดยการเลี้ยงเชื้อที่มีอัตราการกวน 80 และ 150 rpm ให้ปริมาณสารยับยั้งสูงสุดใกล้เคียงกันทำให้เกิดขนาดขอบวงใสการยับยั้ง 11.95 และ 11.73 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนการเลี้ยงโดยไม่มีการกวนพบว่าการยับยั้งเกิดขึ้นน้อยที่สุดคือ 9.58 มิลลิเมตร

เมื่อนำ culture broth มาทดสอบด้วยเอนไซม์ trypsin พบว่าที่เวลา 15, 18 และ 22 ชั่วโมงเชื้อมีการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนทั้ง 3 สภาวะ (ตารางที่ 17, ตารางที่ 21 และตารางที่ 22) โดยเริ่มสร้างเมื่อเลี้ยงเชื้อได้ 15 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่เข้าสู่ระยะ stationary จากนั้นสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนนี้จะคงอยู่จนชั่วโมงที่ 22 ในชั่วโมงที่ 26 ทดสอบไม่พบความสามารถในการยับยั้ง นอกจากนี้ยังพบว่าในชั่วโมงที่ 18 culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงโดยมีอัตราการกวน 80 rpm และ 150 rpm มีขอบวงใสการยับยั้งหลังจากการเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนลดลงเท่ากัน คือ 2.25 มิลลิเมตร ในขณะที่เมื่อเลี้ยงโดยไม่มีการกวนนั้นขนาดขอบวงใสการยับยั้งหลังจากเติม trypsin ลดลง 1.33 มิลลิเมตร

การทดสอบการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทั้ง 3 สภาวะ ที่เวลา 12, 15, 18, 22 และ 26 ชั่วโมง พบว่า ขนาดขอบวงใสการยับยั้งลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน (ตารางที่ 17, ตารางที่ 21 และตารางที่ 22) แสดงว่าเชื้อ *L. plantarum* A49a มีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทุกช่วงเวลาที่นำมาทดสอบ



รูปที่ 9 ผลของการกวนต่อการเติบโตและการเปลี่ยนแปลงของ pH เมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ไม่ควบคุม pH ให้อากาศ 0.5 vvm อุณหภูมิ 30 °ซ



รูปที่ 10 ผลของการกวนต่อการสร้างสารยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ของเชื้อ *L. plantarum* A49a จาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่า ทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ให้อากาศ 0.5 vvm อุณหภูมิ 30 ^{o}ซ

ตารางที่ 21 ผลของเอนไซม์ต่อสารยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่าของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ให้อากาศ 0.5 vvm ไม่มีการกวน อุณหภูมิ 30 ^{o}C ทดสอบโดยใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ด้วยวิธี agar well diffusion assay

เวลา (ชม.)	เอนไซม์	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มม.)		
		ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
12	catalase	-	3.92 [a]	3.02 [b]
	trypsin	-	3.92 [a]	3.94 [a]
15	catalase	-	4.51 [a]	3.54 [b]
	trypsin	-	4.51 [a]	4.22 [b]
18	catalase	-	5.18 [a]	3.46 [b]
	trypsin	-	5.18 [a]	3.85 [b]
22	catalase	-	5.25 [a]	3.88 [b]
	trypsin	-	5.25 [a]	4.45 [b]
26	catalase	-	4.98 [a]	3.75 [b]
	trypsin	-	4.98 [a]	4.86 [a]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ชุดควบคุม 1 : บัฟเฟอร์

ชุดควบคุม 2 : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์

ชุดทดสอบ : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์ + เอนไซม์

- : ไม่เกิดการยับยั้ง

ตารางที่ 22 ผลของเอนไซม์ต่อสารยับยั้งจาก culture broth ที่เข้มข้น 10 เท่าของเชื้อ *L. plantarum* A49a เมื่อเลี้ยงในถังหมักที่มีอาหาร CJ broth ปริมาตร 3.5 ลิตร ให้อากาศ 0.5 vvm มีอัตราการกวน 80 ครั้งต่อนาที อุณหภูมิ 30 °ซ ทดสอบโดยใช้เชื้อ *S. aureus* ATCC 29213 ด้วยวิธี agar well diffusion assay

เวลา (ชม.)	เอนไซม์	ค่าเฉลี่ยขนาดของขอบวงใส (มม.)		
		ชุดควบคุม 1	ชุดควบคุม 2	ชุดทดสอบ
12	catalase	-	3.88 [a]	3.02 [b]
	trypsin	-	3.88 [a]	3.82 [a]
15	catalase	-	4.75 [a]	3.67 [b]
	trypsin	-	4.75 [a]	3.63 [b]
18	catalase	-	5.28 [a]	3.13 [b]
	trypsin	-	5.28 [a]	3.03 [b]
22	catalase	-	5.54 [a]	3.67 [b]
	trypsin	-	5.54 [a]	4.06 [b]
26	catalase	-	4.22 [a]	2.68 [b]
	trypsin	-	4.22 [a]	4.10 [a]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ชุดควบคุม 1 : บัฟเฟอร์

ชุดควบคุม 2 : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์

ชุดทดสอบ : culture broth ความเข้มข้น 10 เท่า + บัฟเฟอร์ + เอนไซม์

- : ไม่เกิดการยับยั้ง

จะเห็นได้ว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ในถังหมักโดยไม่ควบคุม pH นั้น จำนวนรอบการกวนระหว่าง 80 และ 150 rpm มีการผลิตสารยับยั้งโดยรวมไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อไม่มีการกวนพบว่าการผลิตสารยับยั้งลดลงอย่างเห็นได้ชัด ทั้งนี้อาจเกิดเนื่องจากระดับการกวนที่ใช้ทำให้ออกซิเจนละลายในอาหารได้ในสัดส่วนที่พอเหมาะและเชื้อสามารถคลุกเคล้ากับอาหารได้ดีทั่วถังหมัก เป็นผลให้เชื้อเจริญเติบโตและสร้างสารยับยั้งได้ดีกว่าเมื่อไม่มีการกวน แม้ว่าจากการทดลองเลี้ยงเชื้อในฟลาสก์ที่ผ่านมาจะพบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเจริญและสร้างสารยับยั้งในสภาวะที่ไม่มีการเขย่ามากกว่ามีการเขย่าก็ตาม แต่การเลี้ยงในถังหมักเป็นการเลี้ยงที่มีปริมาตรของอาหารมาก ต้องอาศัยการกวนเพื่อทำให้เชื้อได้รับอากาศและคลุกเคล้ากับอาหารได้ดีขึ้น ในแง่ของการประหยัดจึงควรใช้อัตราการกวน 80 rpm ในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งที่ผ่านมามีผู้ทำการเลี้ยงเชื้อในถังหมักโดยมีอัตราการกวนจำนวนรอบน้อยๆ 50-80 รอบต่อนาทีเพื่อให้เชื้อสัมผัสอาหารได้ดีได้แก่ การผลิตแบคเทอริโอซิน amylovorin 471 จากเชื้อ *L. amylovorus* DCE471 (Callewaert, *et al*., 1999) sakacin K จากเชื้อ *L. sake* CTC494 (Leroy and De vuyst, 1999) Plantaricin S และPlantaricin T จากเชื้อ *L. plantarum* (Jimenez-Diaz *et al*.,1993) แบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. plantarum* LL441 (Gonzalez *et al*.,1994)

Barefoot และคณะ (1994) เลี้ยงเชื้อ *L. acidophilus* ในถังหมักขนาด 1 ลิตร เพื่อผลิตแบคเทอริโอซิน Lactacin B ในอาหาร MRS broth โดยใช้จำนวนรอบของการกวน 150 rpm Coventry และคณะ (1996) เปรียบเทียบการเลี้ยงเชื้อ *L. brevis* VB 286 โดยมีอัตราการกวน 200 rpm และไม่มีการกวน พบว่าเมื่อมีการกวนเชื้อสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดที่เวลา 30 ชั่วโมง ถ้าไม่มีการกวนจะผลิตได้มากที่สุดที่เวลา 32-36 ชั่วโมง Barcena และคณะ (1998) รายงานว่าเชื้อ *L. plantarum* LL441 สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน plantaricin C ได้มากที่สุดเมื่อเลี้ยงเชื้อในถังหมักโดยใช้อาหาร MRS และมีอัตราการกวน 150 rpm Fiorentini และคณะ (2001) รายงานว่าสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตแบคเทอริโอซินจากเชื้อ *L. plantarum* BN ในถังหมักต้องมีอัตราการกวน 100 rpm

จากการทดลองจะเห็นได้ว่าการเลี้ยงเชื้อ *L. plantarum* A49a ทั้งในฟลาสก์และในถังหมักโดยใช้อาหาร CJ broth เหมือนกันพบว่า ช่วงเวลาที่เชื้อมีการเพิ่มจำนวนมากที่สุดหรือมีค่าการดูดกลืนแสงมากที่สุดเป็นเวลาที่ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงต่ำสุดหรือเกือบจะต่ำสุด และเป็นเวลาที่ขนาดวงใสการยับยั้งที่เป็นผลจากสารยับยั้งทั้งหมดเกิดขึ้นมากที่สุดด้วย แต่เมื่อนำมาทดสอบหาสารยับยั้งที่เป็นโปรตีน พบว่า เวลาที่ขอบวงใสลดลงมากที่สุดคือ ช่วงเวลาก่อนที่เชื้อจะมีขอบวงใสการยับยั้งรวมสูงสุด การเลี้ยงในฟลาสก์ culture broth มีการยับยั้งรวมมากที่สุดที่เวลา 30 ชั่วโมง แต่มีการสร้างสารที่เป็นโปรตีนมากที่สุดที่เวลา 22 ชั่วโมง ส่วนการเลี้ยงในถังหมัก culture broth มีการยับยั้งรวมมากที่สุดคือที่เวลา 22 ชั่วโมง แต่สร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนมากที่สุดที่เวลา 18 ชั่วโมง

ส่วนการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่ามีการสร้างทุกช่วงเวลาที่นำมาทดสอบ ดังนั้นแสดงว่าการที่ culture broth มีขนาดขอบวงใสการยับยั้งสูงสุดนั้นเป็นผลมาจากสารยับยั้งทั้งหมดที่เชื้อสร้างขึ้น และเวลาที่เชื้อมีการสร้างสารยับยั้งที่เป็นโปรตีนมากที่สุดนั้นก็ไม่จำเป็นจะต้องเป็นเวลาเดียวกับที่เชื้อมีมวลเซลล์สูงสุด เนื่องจากมีการศึกษาพบว่า สารยับยังที่เป็นโปรตีนหรือแบคเทอริโอซินนั้นแม้ว่าการผลิตจะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเจริญเติบโตของเชื้อ แต่ไม่จำเป็นว่าเวลาที่มีการเติบโตมากที่สุดจะทำให้มีการผลิตแบคเทอริโอซินได้มากที่สุดตามไปด้วยเพราะมีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้องกับการผลิตแบคเทอริโอซิน เพราะในการหมักเพื่อผลิตแบคเทอริโอซินบางชนิดเช่น nisin (Meghrous *et al*.,1992) หรือ Plantaricin C ช่วงที่มีอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อเพิ่มขึ้นแต่อัตราการผลิตแบคเทอริโอซินกลับลดลง (Barcena *et al*., 1998)

นอกจากนี้การที่ culture broth มีขนาดขอบวงใสการยับยั้งโดยรวมสูงสุดเมื่อเชื้อเจริญอยู่ในระยะหลังของการเลี้ยงเชื้อหรือเมื่อเชื้ออยู่ในระยะ stationary และเป็นช่วงที่ pH ลดต่ำลงอย่างมากแสดงว่าผลการยับยั้งส่วนใหญ่ของช่วงเวลานี้เกิดขึ้นเนื่องจากกรดอินทรีย์ที่เชื้อสร้างขึ้นมาเป็นส่วนใหญ่ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Goncalves และคณะ (1997) ที่พบว่า เชื้อ *L. rhamnosus* ผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดในช่วงหลังของการเลี้ยงซึ่งเป็นช่วงที่อัตราการเจริญจำเพาะและ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงแล้ว ส่วนช่วง

แรกของการเลี้ยงเชื้อที่ pH ยังไม่ลดลงมากนั้นพบว่าเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดแต่การผลิตกรดแลกติกกลับเกิดขึ้นต่ำกว่า

ส่วนสารยับยั้งที่คาดว่าเป็นโปรตีนจากเชื้อ *L. plantarum* A49a ในถังหมักนั้นเริ่มมีการผลิตตั้งแต่เลี้ยงเชื้อได้ 15 ชั่วโมงผลิตมากที่สุดที่เวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงที่เชื้อกำลังอยู่ในระยะ late log ซึ่งแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ ที่ผลิตขึ้นมาเมื่อเชื้ออยู่ในระยะ log ได้แก่ Plantaricin S ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. plantarum* ที่แยกได้จากการหมักผลมะกอก (Jimenez-Diaz *et al*., 1993) Brevicin 286 ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. brevis* VB 286 (Coventry *et al*., 1996) Fermencin B ที่ผลิตโดยเชื้อ *L. fermentum* Beijerinck 14018 (Yan and Lee, 1997)