การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

SCREENING OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA FOR INHIBITING PATHOGENIC BACTERIA

นางสาวเทพอัปสร แสนสุข

นางสาววรนุช ภักดีเดชาเกียรติ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา

มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

พ.ศ. 2555

เลขที่สัญญา 58/2555

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลติกโพรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

SCREENING OF PROBIOTIC LACTIC ACID BACTERIA FOR INHIBITING PATHOGENIC BACTERIA

นางสาวเทพอัปสร แสนสุข

นางสาววรนุช ภักดีเดชาเกียรติ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากสถาบันวิจัยและพัฒนา
มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์
พ.ศ. 2555

สันปก

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

เทพอัปสร แสนสุข และ วร นุช ภักดีเดชาเกียรติ 2555 เลขที่สัญญา 58/2555

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัย และรายงานการวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ดีด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่ได้สนับสนุนให้สามารถดำเนินการศึกษาวิจัยได้อย่างสะดวกอย่างดี ขอขอบคุณนางสาวพิชญ์ชญษพัฐ หลีกเลี่ยง และนางสาวสุภาพร พันธุ์ศิริ ผู้ช่วยนักวิจัย ที่ให้ความเอาใจใส่และดำเนินการทั้งการเก็บตัวอย่าง และปฏิบัติการในห้องปฏิบัติการ ทำให้งานวิจัยได้ผลสำเร็จเป็นอย่างดี ขอขอบคุณอาจารย์ ดร.สุขสรรค์ ชูบุญ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ที่ได้กรุณาให้ความชี้แนะการเขียนบทคัดย่อ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา และศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่อำนวยความสะดวกทั้งสถานที่การดำเนินงานวิจัย เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมีบางชนิด ทำให้สามารถดำเนินการวิจัยได้อย่างสะดวก และมีผลสำเร็จในการวิจัยได้

ขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดา อาจารย์และครอบครัวของผู้วิจัย ที่ให้ความสนับสนุนในการศึกษามาโดยตลอด และขอขอบคุณรุ่นพี่ รุ่นน้อง และเพื่อนๆ ทุกท่านที่ได้มีส่วนให้การดำเนินงานสำเร็จลุล่วงได้ ประโยชน์อันใดที่เกิดจากงานวิจัยนี้ เนื่องด้วยทุกท่านที่ให้ความกรุณาและช่วยเหลือ ผู้วิจัยมีความซาบซึ้งอย่างยิ่งและขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

เทพอัปสร แสนสุขและ
วรนุช ภักดีเดชาเกียรติ
ตุลาคม 2556

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	(1)
บทคัดย่อ	(2)
Abstract	(4)
สารบัญ	(6)
สารบัญตาราง	(8)
สารบัญภาพ	(9)
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญที่มาของปัญหา	1
1.2 โจทย์วิจัย/ปัญหาวิจัย	2
1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	2
1.5 ขอบเขตการวิจัย	2
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 คุณสมบัติทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติก	4
2.2 การใช้ประโยชน์แบคทีเรียกรดแลคติก และกรดแลคติก	7
2.3 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก	9
2.4 แบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติก (Probiotic Lactic acid bacteria)	12
บทที่ 3 วิธีวิจัย	19
3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี	19
3.2 วิธีดำเนินการวิจัย	19
บทที่ 4 ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง	24
4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก	24
4.2 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร	28
4.3 การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในกรดไฮโดรคลอริก สารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี	34
4.4 การบ่งชี้สกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	37

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ	52
5.1 สรุปผลการทดลอง	52
5.2 ข้อเสนอแนะ	55
เอกสารอ้างอิง	56
ภาคผนวก	61

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	จำนวนไอโซเลทแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองแต่ละชนิด	24
4.2	การทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร	32
4.3	เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในสภาวะที่มีกรดไฮโดรคลอริก สารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี	36
4.4	การทดสอบทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และการบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	39
ภาคผนวกที่ 1	หมายเลขไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งคัดแยกแต่ละชนิด และลักษณะโคโลนี	72
ภาคผนวกที่ 2	การทดสอบคุณสมบัติการสร้างคะตะเลส (Catalase test) และออกซิเดส (Oxidase test)	76

สารบัญภาพ

ภาพ		หน้า
ภาคผนวกที่ 1	แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้บนอาหาร MRS agar ที่เติม 0.004% Bromocresol purple เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใส รอบโคโลนี	80
ภาคผนวกที่ 2	โซนใส (Clear zone) ในการยับยั้งการเจริญเติบโต	80
ภาคผนวกที่ 3	การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 37 (ก) องศาเซลเซียส	81
ภาคผนวกที่ 4	การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในอาหาร MRS ที่มีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์	81
ภาคผนวกที่ 5	การสร้างกรดและก๊าซ (Acid and gas) ของแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อหมักกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร MRS broth ที่เติม Phenol red เป็นตัวบ่งชี้ หากมีการสร้างกรด อาหารจะเปลี่ยนจากสีแดง เป็นสีเหลือง **(ก)** และหากมีการสร้างกรดและก๊าซ จะพบว่าอาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และมีฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ **(ข)**	82

หัวข้อวิจัย การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติกในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร

ผู้ดำเนินการวิจัย เทพอัปสร แสนสุข และวรนุช ภักดีเดชาเกียรติ

หน่วยงาน สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ปีการศึกษา 2555 **เลขที่สัญญา** 58/2555

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสำคัญในแง่การรักษา และแปรรูปอาหาร สารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกมีหลายชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียของอาหารได้ การวิจัยนี้มีการนำตัวอย่างอาหารหมักดองที่มีวัตถุดิบจากพืช ได้แก่ ผักหอมดอง ผักเสี้ยนดอง ผักแป้นดอง ผักกุ่มดอง ผักกาดดอง กระท้อนดอง และแหนมเห็ด มาคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 34 ไอโซเลท ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการศึกษาจึงได้กำหนดหมายเลขดังนี้ O3B, O7A และ O10A ได้จากผักหอมดอง S3A, S7A, S7B และ S9B จากผักเสี้ยนดอง G2B, G7A, G7B และ G8B จากผักแป้นดอง V2A, V5A, V6A, V7C, V9A และ V10A จากผักกุ่มดอง C1B, C3B, C5A และ C6A จากผักกาดดอง R2A, R2B, R7A และ R8A ได้จากกระท้อนดอง และ M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A, M8A และ M8B ได้จากแหนมเห็ด โดยมีเพียง 25 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้ และทุกไอโซเลทสามารถอยู่รอดได้ในสารละลายทดสอบในทางเดินอาหาร ได้มากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ จากการศึกษาลักษณะเซลล์ใต้กล้องจุลทรรศน์ และการทดสอบทางชีวเคมี สามารถจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้เป็น 7 กลุ่ม ได้แก่ *Lactococcus lactis* (S3A S9B G2B G7B M7A และ C5A) *Lactobacillus fermentum* (V5A) *Weisella soli* (M8A) *Pediococcus* sp. (O10A C1B C3B C6A M1A M6A M6B และ M8A) *Lactobacillus* sp. (V2A V6A V5A R2A R7A R8A V7C และ R2B) *Weisella* sp. (V10A และ M5A) และ *Streptococcus* sp. (O3B O7A และ S7A) โดยไอโซเลท S9B และ M6A (จำแนกเป็น *Lactococcus lactis* และ *Pediococcus* sp. ตามลำดับ) สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ส่วนไอโซเลท V2A R2B และ R8A (จำแนกอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp.) สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้ และไอโซเลท R2A (จำแนกอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp.) สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ทั้ง 3 ชนิด คือ *E. coli*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้นี้ สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้ ตั้งแต่ 2 ชนิด แบคทีเรียกรดแลคติก

เหล่านี้ยังสามารถอยู่รอดในสารละลายทดสอบของระบบทางเดินอาหาร ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของโปรไบโอติคประการหนึ่งในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร และยังสามารถอยู่รอดในสารละลายของระบบทางเดินอาหารได้ด้วย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการผลิตสารกันเสียในอาหารที่ได้จากธรรมชาติ และการประยุกต์ใช้กรดแลคติกในด้านอื่นๆ ต่อไป

คำสำคัญ : การคัดแยก แบคทีเรียกรดแลคติก เชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร การยับยั้ง

Research title Screening of Probiotic Lactic Acid Bacteria for Inhibiting Pathogenic Bacteria
Researcher Tepupsorn Sansuk and Woranud Pakdeedachakiat
Organization Department of Biology Faculty of Science Buriram Rajabhat University
Academic year 2555

Abstract

Lactic acid bacteria (LAB) play an important role in preserved and proceeded food products. Several agents produced by LAB can inhibit the development of food contaminated bacteria that have been recognized as caution factor of spoiled food. In this study, 8 types of plant fermented food were introduced for LAB isolation. It was found that, total of 34 isolates were screened by revealing as follows; 3 isolates; O3B, O7A and O10A from onion, 4 isolates; S3A, S7A, S7B and S9B from *Cleome viscosa* Linn., 4 isolates; G2B, G7A, G7B and G8B from *Allium tuberosum* Rottl., 6 isoates; V2A, V5A, V6A, V7C, V9A and V10A from *Crateva adansonii* DC., 4 isolates; C1B, C3B, C5A and C6A from *Lactuca sativa*, 4 isolates; R2A, R2B, R7A and R8A from *Sandoricum koetjape* and 9 isolates; M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A, M8A and M8B from fermented mushroom. From these, there are 25 isolates that expressed inhibiting activities on the gastrointestinal pathogenic bacteria and viabilities of all isolates after tested with gastric solution were over 50 %. In accordance with microscopic and biochemical examination, 7 groups of LAB were classified; *Lactococcus lactis* (S3A, S9B, G2B, G7B, M7A, and C5A) *Lactobacillus fermentum* (V5A) *Weisella soli* (M8A) *Pediococcus* sp. (O10A, C1B, C3B, C6A, M1A, M6A, M6B, and M8A) *Lactobacillus* sp. (V2A, V6A, V5A, R2A, R7A, R8A, V7C, and R2B) *Weisella* sp. (V10A and M5A) และ *Streptococcus* sp. (O3B, O7A, and S7A), respectively. For investigation of inhibiting activities, 3 gastrointestinal pathogenic bacteria; *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Stephylococcus aureus* were introduced. LAB isolated in this study could inhibit at least 2 pathogenic bacterial species such as S9B and M6A isolates could inhibit both *E. coli* and *S. aureus*, while V2A, R2B, and R8A isolates could inhibit *E. coli* and *S. typhimurium*. Moreover, R2A isolate showed interesting activities by can inhibit all 3 tested pathogenic bacteria. In addition, these LAB can survived after

tested with gastric solution by revealing more than 70% viabilities which can demonstrate the appropriate probiotic activities also. This study provides valuable information that useful for food preservative production by using natural substances and utilization of LAB in further aspects is included.

Keywords : Isolation, Lactic acid bacteria, Food borne pathogen, and Inhibition

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติกที่ยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร
(Isolation of Lactic Acid Bacteria Probiotic for Inhibiting Food Borne Food Pathogen)

เทพอัปสร แสนสุข[1] และ วรนุช ภักดีเดชาเกียรติ[2]

บทคัดย่อ

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 34 ไอโซเลท ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการศึกษาจึงได้กำหนดหมายเลขเชื้อ โดยมีเพียง 25 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้ และทุกไอโซเลทสามารถอยู่รอดในสารละลายทดสอบในทางเดินอาหารมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท S9B และ M6A จำแนกเป็น *Lactococcus lactis* และ *Pediococcus* sp. ตามลำดับ ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ส่วนไอโซเลท V2A R2B และ R8A จำแนกเป็น *Lactobacillus* sp. ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้ และไอโซเลท R2A จำแนกเป็น *Lactobacillus* sp. ยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคทั้ง 3 ชนิดได้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้นี้ สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้ ตั้งแต่ 2 ชนิด แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ยังสามารถอยู่รอดในสารละลายทดสอบของระบบทางเดินอาหาร ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของโปรไบโอติกประการหนึ่งในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหาร และยังสามารถอยู่รอดในสารละลายของระบบทางเดินอาหารได้ด้วย ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการผลิตสารกันเสียในอาหารที่ได้จากธรรมชาติ

คำสำคัญ แบคทีเรียกรดแลคติก โปรไบโอติก ยับยั้งเชื้อก่อโรค

บทนำ

จุลินทรีย์สำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอาหารหมักดองคือแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะไร้อากาศ หรือออกซิเจนต่ำ ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างกรดแลคติก ออกมาเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (Ratanachaikunosopon and Phumkhachorn, 2010) มีผลต่อพีเอชอาหารให้ลดลง ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นในอาหารไม่สามารถเจริญในอาหารได้ มีเพียงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยังสามารถเจริญได้ นอกจากกรดแลคติกแล้ว แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถผลิตสารยับยั้งบางชนิด เช่น

[1, 2] อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) Diacetyl และแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ที่ยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็นประโยชนต่อระบบทางเดินอาหารในสัตว์ ทำให้เกิดสมดุลในทางเดินอาหาร การพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารในแง่โปรไบโอติก ในระดับอุตสาหกรรมการพัฒนาผลิตภัณฑ์เป็นความสำคัญในการสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจ ในการวิจัยนี้จึงเป็นประโยชน์ต่อแนวทางการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง และการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาพัฒนาต่อเพื่อนำมาใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดในการลดการใช้สารเคมีถนอมอาหารได้ ทำให้เกิดความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในอนาคต

วิธีดำเนินการทดลอง

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ชั่งตัวอย่างอาหารหมักดอง 10 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างแหล่งคัดแยกที่เป็นของเหลวมา 1 ลูป (Loop) แล้วขีดลาก (Simple streak) บนอาหาร MRS ที่เติม Bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในสภาพไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเกิดโซนใส (Clear zone) รอบโคโลนี แล้วนำโคโลนีที่มีโซนใสมาขีดไขว้ (Cross streak) บนอาหาร MRS ที่มี Bromocresol purple นำไปบ่มในสภาพไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนี ทำซ้ำเช่นนี้เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวมากขึ้น และแยกให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคอย่างชัดเจนขึ้น

การทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ด้วยวิธี Direct agar spot method (Fleming และคณะ, 1985)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ย้ายลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วนำมา 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ได้แก่ *Strephylococcuss aureus* TISTR 1466 *Salmonella typhimurium* TISTR292 และ *Escherichia coli* TISTR 780 จากฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว) โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคที่ต้องการทดสอบ มาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง การทดสอบด้วยวิธี Direct agar spot โดยนำแบคทีเรียก่อโรคที่เตรียมไว้มา 1 มิลลิลิตร ผสมลงใน 0.5

เปอร์เซ็นต์ Soft agar ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เททับบนอาหารที่มีแบคทีเรียกรดแลคติกแล้ว รอให้แห้ง คว่ำจานเพาะเลี้ยง บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโซนใสรอบรอยหยดแบคทีเรียกรดแลคติก และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส

การทดสอบการอยู่รอดในสภาวะที่มีกรด สารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี (ดัดแปลงวิธีจากมงคล และเพ็ญรัตน์, 2554 และ Corcaran *et. al.*, 2005)

เตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกตามวิธีทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค แล้วปรับความขุ่นให้ได้ 0.7 นำมา 1 มิลลิลิตร ใส่ใน 9 มิลลิลิตร ของสารละลายทดสอบ โดยการทดสอบในสภาวะที่มีกรดของสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร ที่มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ที่ปรับพีเอชให้เป็น 2.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 5 นอร์มอล สำหรับการทดสอบในใส่ในสารละลายจำลองของกระเพาะอาหาร (ประกอบด้วย NaCl 2.05 กรัม KH_2PO_4 0.60 กรัม $CaCl_2$ 0.11 กรัม KCl 0.37 กรัม Glucose 3.5 กรัม แล้วปรับ pH ให้เป็น 2.0 ด้วย 1 โมลาร์ HCl ในสารละลาย 1 ลิตร) นำไปนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเติมเพปซิน (Pepsin ของ Sigma) 13.3 มิลลิกรัม และสำหรับทดสอบการอยู่รอดในเกลือน้ำดี ด้วย MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี (Bile salt) 0.3 เปอร์เซ็นต์

เมื่อผสมแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมไว้ รวมกับสารละลายทดสอบแล้ว นำมาเกลี่ยบน MRS agar แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 0 และนำส่วนที่เหลือจากชั่วโมงที่ 0 นำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบในกรด และ 24 ชั่วโมง สำหรับการทดสอบในสารละลายกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี แล้วนำมาเกลี่ยและบ่มที่สภาวะเดียวกับชั่วโมงเริ่มต้น จากนั้นนำมานับจำนวนเพื่อหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

การบ่งชี้สกุลแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

ทดสอบบ่งชี้สกุลด้วยการศึกษาทางสัณฐาน และชีวเคมี ได้แก่การย้อมสีแกรม การสร้างคะตะเลส (Catalase test) ออกซิเดส (Oxidase test) การเจริญในเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 10 และ 18 เปอร์เซ็นต์ การเจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส การสร้างกรดและก๊าซจากการหมักกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ การหมักน้ำตาลแลคโตส (Lactose) ราฟิโนส (Raffinose) และเมลิไบโอส (Melibiose) โดยมีฟีนอลเรด (Phenol red) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) และทดสอบการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีน

ผลและวิจารณ์ผลการดำเนินงาน

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

อาหารหมักดองจำพวกพืช ได้แก่หอมดอง เสี้ยนดอง ผักแป้นดอง ผักกุ่มดอง ผักกาดดอง กระท้อนดอง และแหนมเห็ด สามารถคัดแยกได้แบคทีเรียได้ 107 ไอโซเลท โดยเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก 34 ไอโซเลท ด้วยทดสอบกิจกรรมคะตะเลส คะตะเลสเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมาเพื่อการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) (Harvey *et. al*., 2007) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไปไม่พบกิจกรรมคะตะเลส กล่าวคือให้ผลการทดสอบคะตะเลสเป็นลบ (Negative test) และแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่มีกิจกรรมไซโตโครม ซี ออกซิเดส (Cytochrom C oxidase) ด้วย ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการศึกษาได้กำหนดรหัสไอโซเลท ได้แก่ O3B, O7A, O10A, S3A, S7A, S7B, S9B, G2B, G7A, G7B, G8B, V2A, V5A, V6A, V7C, V9A, V10A, C1B, C3B, C5A, C6A, R2A, R2B, R7A, R8A, M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A, M8A และ M8B

การยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญ *Escherichai coli* ได้ โดย O7A, S9B, V2A, V6A, S10A, C1B, C3B, C6A, R2A, R2B, R7A, R8A, M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A, M8A และ M8B สามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะ *E. coli* แสดงการเกิดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสใกล้เคียงกัน ในช่วง 6.1 ถึง 7.5 เซนติเมตร ซึ่ง M6B แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสได้ 7.5 เซนติเมตร มากที่สุดเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ แต่ R2B แสดงการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยที่สุด (2.3 เซนติเมตร) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญ *E. coli* และ *S. aureus* ได้ ได้แก่ S9B มีการเกิดโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.8 และ 1.4 เซนติเมตร ตามลำดับ และ M6A เกิดโซนใส เส้นผ่านศูนย์กลาง 6.7 และ 2.2 เซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญ *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้แก่ V2A เกิดโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.1 และ 2.8 เซนติเมตร ตามลำดับ R2B เกิดโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.3 และ 2.0 เซนติเมตร ตามลำดับ และ R8A เกิดโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.7 และ 2.6 เซนติเมตร ตามลำดับ มีเพียงแบคทีเรียกรดแลคติก R2A ที่สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบได้ โดยการเกิดโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลาง 6.9 2.7 และ 2.1 เซนติเมตร กับจุลินทรีย์ทดสอบ *E. coli*, *S. aureus* และ *S. typhimurium* ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในที่นี้ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารที่แบคทีเรียกรดแลคติก

สร้างขึ้น ได้แก่ กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ (Remiger *et. al.*, 1999)

การอยู่รอดในสารละลายในสภาวะกรด สารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี

ไอโซเลทของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่คัดแยกได้นั้น สามารถอยู่รอดได้ในสารละลายกรด สารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี โดย ทางเดินอาหาร มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ โดยกลุ่มที่สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคตั้งแต่ 2 ชนิด ได้แก่ S9B M6A V2A R2B R8A และ R2A สามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีกรดไฮโดรคลอริก 77 69 69 87 99 และ 76 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ มีการอยู่รอดในสารละลายในกระเพาะอาหาร 69 86 72 95 81 และ 81 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ยังสามารถอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี โดยมีการอยู่รอด 89 88 73 96 92 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารเป็นคุณสมบัติสำคัญประการหนึ่งในการเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารได้ด้วย (Michail, 2003)

การบ่งชี้สกุลแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

จากการบ่งชี้สกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารได้ตั้งแต่ 2 ชนิด ขึ้นไป พบว่า S9B มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactococcus* ทั้งนี้จากการทดสอบการเจริญใน 45 องศาเซลเซียส การหมักน้ำตาลกลูโคส แลคโตส ราฟิโนส และเมลิไบโอส พบว่า S9B มีความใกล้เคียงกับ *Lactococcus lactis* M6A คุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Pediococcus* sp. V2A R2A R2B และ R8A มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

จากผลการคัดแยกและทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติก R2A ที่มีคุณสมบัติในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิดได้ ในทำนองเดียวกับ Yang *et. al.* (2012) พบว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus sakei* รวมถึงสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายสารแบคเทริโอซิน สามารถยับยั้งการเจริญ *Listeria innocua* ที่เป็นชื้อก่อโรคได้ ซึ่งจากรายงานผลของ Guetarni (2012) พบว่า *Lactobacillus* มีการสร้างกรดแลคติก ทำให้จุลินทรีย์ก่อโรคอย่าง *Helicobacter pylori* ถูกยับยั้งการเจริญได้ และนอกจากนี้ *Lactobacillus* บางชนิดอย่างเช่น *L. reuterin* ยังสามารถสร้างรูเทรินที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ได้ด้วย (Cleusix *et. al.* 2007)

ตารางที่ 1 การบ่งชี้สกุลแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

Iso	S9B	M6A	V2A	R2A	R2B	R8A
GM/Mor	+C	+C	+R	+R	+R	+R
CAT	-	-	-	-	-	-
OXI	-	-	-	-	-	-
GLU	A	A	A	A/G	A	A
LAC	A	A	A	A	A	A
MEL	A	A	A	A	A	A
RAF	A	A	A	A	A	A
O/F	F	F	F	F	F	F
45 °C	+	+	-	-	-	+
NaCl						
4	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+
10	-	+	-	+	+	+
NH_4-Arg	+	+	+	+	+	+
Org Iden	*Lactococcus lactis*	*Pediococcus* sp.		*Lactobacillus* sp.		

คำย่อ และสัญลักษณ์ : Iso (Isolate); GM (Gram stain)/ Mor (Morphology) สัญลักษณ์ + ติดสีแกรมบวก – ติดสีแกรมลบ R (Rod) รูปร่างแท่ง Coc (Cocci) รูปร่างกลม; CAT (Catalase test); OXI (Oxidase test) สัญลักษณ์ + สร้างออกซิเดส – ไม่พบการสร้างออกซิเดส; Glu (Glucose fermentation) สัญลักษณ์ A/G (Acid and gas production) จากการหมักกลูโคส A มีการสร้างกรด G มีการสร้างก๊าซ; Lac (Lactose utilization); Mel (Melibiose utilization); Raf (Rafinose utilization) สัญลักษณ์ A มีการสร้างกรด; O/F (Oxidative fermentation test) สัญลักษณ์ O = Oxidation F = Fermentation; 45 °C; NaCl สัญลักษณ์ + เจริญได้ – ไม่พบการเจริญ; NH_4-Arg (Ammonia from arginine) สัญลักษณ์ + สร้างแอมโมเนีย – ไม่พบการสร้างแอมโมเนีย

สรุปผลการทดลอง

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถคัดแยกได้จากอาหารหมักดองพวกพืชและเห็ด สามารถคัดแยกได้ 34 ไอโซเลท เมื่อทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารพบว่า O7A, S9B, V2A, V6A, S10A, C1B, C3B, C6A, R2A, R2B, R7A, R8A, M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A M8A และ M8B แบคทีเรียกรดแลคติก S9B และ M6A สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* จำแนกเป็น *Lactococcus lactis* และ *Pediococcus* sp. ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก V2A R2B และ R8A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. typhimurium* พบการจำแนกได้ว่าอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ส่วน R2A ที่สามารถยับยั้ง *E. coli S. typhimurium* และ *S. aureus* จำแนกได้ว่าอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. เช่นกัน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้นี้ สามารถยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้ ตั้งแต่ 2 ชนิด ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ยังสามารถอยู่รอดในสารละลายทดสอบของระบบทางเดินอาหาร ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของโปรไบโอติกประการหนึ่งในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้ และยังสามารถอยู่รอดได้ในสารละลายของระบบทางเดินอาหารด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสาขาวิชาชีววิทยา และศูนย์วิทยาศาสตร์และวิทยาศาสตร์ประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สารเคมี อุปกรณ์ และเครื่องมือในการศึกษาวิจัยได้สำเร็จ ลุล่วงอย่างดี และคณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยาที่ให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาในด้านต่างๆ รวมถึงแหล่งข้อมูลที่นำมาอ้างอิงไว้ที่นี้ด้วย

อ้างอิง

มงคล ถิรบุญยานนท์ และเพ็ญรัตน์ หงส์วิทยากร. ***การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลทารกที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้***. 2554. มหาวิทยาลัยแม่โจ้

Cleusix V., Lacroix C., Vollenweider S., Duboux M., and Blay L.G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuterin* against intestinal bacteria. ***BMC Microbiology***. 2007; 7: 101.

Corcaran M.B., Stanton C., Fitzgerald F.G., and Ross P.R. Survival of probiotic Lactobacii in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. ***Applied and Environment Microbiology***. 2005; 71(6): 3060-3067.

Guetarni H., Bensaid A., and Bensoltane A. Analysis of lactic acid responsible for inhibition in-*vitro* of Helicobacter pylori by high performance chromatrography. ***Journal of biotechnology letters***. 2012; 3(1): 34-36.

Harvey R.A., Champe P.C., and Fisher B.D. ***Microbiology***. 2 nd ed. United State of America. Lippincott Williams & Wilkins. 2007.

Michail S, Abernathy F. (2003). Lactobacillus plantarum inhibits the intestinal transepithelial migration of neutrophils induced by enteropathogenic *Escherichia coli*. ***Journal of Pediatric Gastroenterology Nutrition***. 36: 385-391.

Rattanachaikunsopon P. and Phumkhachorn P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. ***Scholars Research Library Annals of Biological Research***. 2010; 1(4): 218-228.

Remiger A., Eijsink M.A. Ehrmann, Sletten K., Nes I.F., and Vogel R.F. Purification and partial amino acid and sequence of plantaricin 1.25 and 1.25, two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. ***Journal of Applied Microbiology.*** 1999, 86: 1053-1058.

Yang E., Fan L., Jiang Y., Doucette C., and Filmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. ***AMB express a Springer Open journal***. 2012; 2(48).

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหาที่ทำวิจัย

อาหารหมักดองเป็นรูปแบบหนึ่งของการเก็บถนอมอาหารให้อยู่นาน แล้วรสชาติยังถูกเปลี่ยนแปลงไป จากความรู้พื้นฐานดังกล่าวอาหารหมักดองยังมีประโยชน์ต่อสุขภาพผู้บริโภค กระบวนการเปลี่ยนแปลงของอาหารเกิดจากการทำงานภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ เมื่อจุลินทรีย์มีการปลดปล่อยสารออกมา จึงทำให้อาหารเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยจุลินทรีย์สำคัญที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในอาหารหมักดองคือแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) การใช้น้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติกในสภาวะไร้อากาศ หรือออกซิเจนต่ำ ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างกรดแลคติกออกมาเป็นผลิตภัณฑ์หลัก (Ratanachaikunosopon and Phumkhachorn, 2010) มีผลต่อพีเอชอาหารให้ลดลง ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นในอาหารไม่สามารถเจริญในอาหารได้ มีเพียงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยังสามารถเจริญได้ นอกจากกรดแลคติกที่ถูกผลิตออกมา แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ โดยสารที่คุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Antimicrobial activity) เช่น กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) Diacetyl และแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นต้น โดยสารจากแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นแบคเทอริโอซิน ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับตัวเอง (สิรินดา และกาญจนา, 2554) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดเท่านั้นที่มีคุณสมบัติเป็นประโยชนต่อระบบทางเดินอาหารในสัตว์ ทำให้เกิดสมดุลในทางเดินอาหาร สารบางชนิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางอาหารได้ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อการเป็นโปรไบโอติกในทางเดินอาหาร และการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารได้ด้วยสามารถอยู่ในสภาวะระบบทางเดินอาหาร และเป็นโปรไบโอติกได้ การหมักดองอาหารปัจจุบันทำในระดับอุตสาหกรรมเป็นส่วนสำคัญหนึ่งในผลิตภัณฑ์สร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจ การศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียกรดแลคติกดังกล่าวเป็นประโยชน์ต่อแนวทางการพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง และการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาพัฒนาต่อเพื่อนำมาใช้ร่วมกับผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดในการลดการใช้สารเคมีถนอมอาหารได้ ทำให้เกิดความปลอดภัยและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคในอนาคต

1.2 โจทย์วิจัย/ปัญหาวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดในอาหารหมักดองสามารถผลิตสารที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหาร และสามารถมีชีวิตได้ในทางเดินอาหารของคน

1.3 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.3.1 เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดอง

1.3.2เพื่อศึกษาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดในระบบทางเดินอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

1.3.3 ทดสอบการอยู่รอดได้ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในสารละลายทดสอบในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ ไฮโดรคลอริก สารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี

1.3.4 เพื่อบ่งชี้สายพันธุ์โปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้ มีการนำแบคทีเรียกลุ่มแลคติกมาใช้ในการถนอมอาหาร ในการหมักดองอาหาร ทำให้พีเอชของอาหารลดลง แต่มีแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดเท่านั้นที่สามารถเป็นโปรไบโอติกได้ โดยโปรไบโอติกต้องสามารถอยู่รอดได้จากสภาวะในระบบทางเดินอาหาร เช่น สภาวะที่ความเป็นกรด และเกลือของน้ำดี ซึ่งคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพมีหลายประการ เช่นสามารถสร้างสารเมือก เกาะยึดที่ลำไส้ รวมถึงคุณสมบัติสำคัญประการหนึ่งคือการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นที่เป็นโทษได้

1.5 ขอบเขตการวิจัย

1.5.1 เก็บตัวอย่างอาหารหมักดองเพื่อเป็นแหล่งคัดแยก ได้แก่ผักดอง ผลไม้ดอง แหนม

1.5.2 เตรียมตัวอย่างที่เก็บมา ด้วยการตีบดผสมตัวอย่างที่เก็บมาให้เป็นเนื้อเดียว แล้วนำมาขีดลาก (Simple streak) บนอาหาร MRS ที่มี Bromocresol purple เป็นตัวบ่งชี้ และบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติก

1.5.3 ศึกษาคุณสมบัติแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichai coli*, *Staphylococcus aereus* และ *Samonella typhimurum* โดยวิธี Direct agar spot method (ดัดแปลงจาก Fleming และคณะ, 1985) ซึ่งเป็น

การนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ มาจุด (Spot) บนอาหาร MRS agar จากนั้นนำจุลินทรีย์ทดสอบมาเททับ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตการเกิดโซนใส

1.5.4 ทดสอบการอยู่รอดในสภาวะสารละลายทางเดินอาหาร ได้แก่สภาวะที่มีกรดไฮโดรคลอริก พีเอช 2.5 สารละลายในกระเพาะอาหาร (ที่มีทั้งกรดไฮโดรคลอริก และเพปซิน) และในเกลือน้ำดี (Bile salt)

1.5.5 บ่งชี้สายพันธุ์ และเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

แบคทีเรียกรดแลคติกจากการคัดแยกในอาหารหมักดอง ซึ่งสามารถนำมาพัฒนาเป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตกรดแลคติก แล้วสามารถนำกรดแลคติกมาใช้ประโยชน์ในด้านต่างๆ ได้ด้วย โปรไบโอติก แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะที่มีความเป็นกรด และเกลือน้ำดี (Bile salt) ซึ่งจะสามารถนำมาพัฒนาเป็นโปรไบโอติกได้ แบคทีเรียกรดโปรไบโอติกแลคติกที่มีคุณสมบัติผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารได้ ซึ่งจะสามารถนำมาพัฒนาในการผลิตสารเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์อื่นได้ต่อไป

บทที่ 2
เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 คุณสมบัติทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) สามารถหมักสารตั้งต้นแล้วให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติก (Lactic acid) โดยสารตั้งต้นของการหมักมักจะเป็นน้ำตาล ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ซึ่งลักษณะพื้นฐานที่ยอมรับทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีเอนไซม์คะตะเลส (Catalase) ไม่มีไซโตโครม (Cytochrome) ทนต่อสภาวะมีอากาศ (Aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเติบโต และผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาล แต่แบคทีเรียกลุ่มนี้บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียม (Pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่มพอร์ไฟริน (Porphyrin group) แบคทีเรียกรดแลคติกมีหลายชนิด ซึ่งมีการจำแนกออกเป็นกลุ่มต่างๆ 12 สกุล ดังนี้

(1) *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 – 1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายสปีชีส์เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์ และบางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้เจริญที่อุณหภูมิ 20 - 41 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มี mol % G + C ระหว่าง 34 -46 % (Hardie และ Whiley, 1995)

(2) *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งเคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ*Vagococcus fluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน *Streptococci* กลุ่ม N และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles และ Holzapfel, 1997)

(3) *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นกล้าเชื้อ (Starter) ในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส พบในแหล่งต่างๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *L. Lactis* ssp. *Lactic, L. Lactis* ssp. *cremoris, L. lactis* ssp. *hordniae, L. Garvieae, L. plantarum, L. raffinolactis* และ *L. piscium* มี mol % G + C ระหว่าง 34 – 43 % (Teuber, 1995)

(4) *Enterococcus* เซลล์มีรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้นๆ ผลิตกรดแลคติก ชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญที่ 10 หรือ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ และบางสปีชีส์ทำ

ให้เกิดโรค ปัจจุบันประกอบด้วย 5 กลุ่มสปีชีส์ ได้แก่ กลุ่ม *Enterococcus faecalis*, กลุ่ม *E. avium*, กลุ่ม *E. Gallinarum* และกลุ่ม *E. cecorum* มี mol % G + C ระหว่าง 37–40 % (Devriese และ Pot, 1995)

(5) *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36–1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (Tetrad formation) ในสภาวะไม่มีอากาศ ผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส บางสปีชีส์ทำให้เบียร์และไวน์เสีย ปัจจุบันประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. damonosus*, *P. dextrinicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus*, *P. pentosaceus* (Stiles และ Hozapfel, 1997) มี mol % G + C ระหว่าง 34 – 44 % (Simpson และ Taguchi, 1995)

(6) *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิม เป็นสปีชีส์ *P. halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 % และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม

(7) Aerococcus มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinae–equi* ตามลำดับ โดย *A. viridians* ทำให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน (Stiles และ Holzapfel, 1997)

(8) *Leuconostoc* เซลล์มีสัณฐานขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารซึ่งมีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (Heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์ *Leuconostoc mesenteroides*, *L. lactis*, *L. Gelidum*, *L. carnosum*, *L. pseudomesenteroides*, *L. citreum*, *L. argentinum* และ *L. Fallax* (Stiles and Holzapfel, 1997) มี mol % G + C ระหว่าง 37-40 % (Dellaglio *et al.*, 1995)

(9) *Oenococcus* ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเป็นกลุ่มที่มาจาก *Leuconostoc oenos* ด้วยสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งการใช้ข้อมูลพันธุกรรมจาก ดีเอ็นเอ: ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น และลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio *et al.*, 1995)

(10) *Weissella* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งลักษณะคล้ายกับ *Leuconostoc* (Leuconostoc – like bacteria) รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม มีสปีชีส์ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Leuconosto paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*) *Lactobacillus confusus* (*W. confusus*) *Lactobacillus halotolerans* (*W. halotoleran*) *Lactobacillus kandleri* (*W. kandleri*) *Lactobacillus minor* (*W. minor*) *Lactobacillus viridescens* (*W. viridescen*) และสปีชีส์ใหม่ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles และ Holzapfel, 1997)

(11) *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด ซึ่งมีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์สมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของ mol % G + C ภายในสกุลสูงคือระหว่าง 32- 53 % (Axelsson, 1998) พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์และสัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บางสปีชีส์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ (Adum, 1999) เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือทรงรี (*Coccobacilli*) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles และ Holzapfel, 1997) คือกลุ่ม Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแลคโทส (มากกว่า 85 %) เป็นกรดแลคติก โดยวิถี Embden– Meyerhof–Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate – aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ Phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทส และน้ำตาลกลูโคเนทไม่ได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตทั้ง Aldolase และ Phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้ ส่วนกลุ่ม Obilgately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส ผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทเป็นแลคเตท เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 19 สปีชีส์

(12) *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลาง หรือเป็นท่อนเรียว (Slender rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 0.7 ไมครอน และยาว 1.1 – 3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ มีการผลิตกรดแลคติก ชนิด L (+) คาร์บอนไดออกไซด์ อะซีเตท และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ คือ *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola*, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C. alterfunditum* มี mol % G+C ระหว่าง 31.6 - 37.2 % (Schillinger และ Holzapfel, 1995)

2.2 การใช้ประโยชน์แบคทีเรียกรดแลคติก และกรดแลคติก

2.2.1 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็น Probiotic

โปรไบโอติก (Probiotic) เป็นคำที่ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell ในปี พ.ศ. 2508 เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมา และช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด ปีพ.ศ. 2517 Parker ได้ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติก คือสิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ คำจำกัดความล่าสุด ซึ่งเสนอโดย Fuller ในปี พ.ศ. 2532 อธิบายคำว่า โปรไบโอติก คืออาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่จุลินทรีย์โปรไบโอติกอาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย

2.2.2 การใช้แบคทีเรียกรดแลกติกในอุตสาหกรรมอาหาร

สมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติก โดยผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดที่ได้จากการหมักกรดแลคติก เช่น นมเปรี้ยว ผัก ผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อและอาหารทะเลหมัก สามารถเก็บไว้ได้นานและปลอดภัยเมื่อนำไปบริโภค เพราะแบคทีเรียแลคติกมีสมบัติยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนี้ ทำให้ pH ของอาหารลดลง เกิดกรดอินทรีย์ เกิดแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดเอทานอล โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้แบคทีเรียกรดแลกติก

2.2.3 การใช้กรดแคติกในอาหารและเครื่องดื่ม

มีการนำกรดแลคติกมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่าร้อยละ 50 ของปริมาณกรดแลคติกทั้งหมด ส่วนใหญ่จะใช้กรดแลคติกเป็นส่วนประกอบในอาหารโดยตรง (Food ingredient) ใช้ปรับสภาพความเป็นกรดเพื่อให้เกิดรสเปรี้ยวตามต้องการและมีการใช้กรดแลคติกร่วมกับกรดซิตริก (Citric acid) และกรดโพรพาโนอิก (Propanoic acid) หรือกรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) เพื่อทำให้เกิดรสเปรี้ยวในอาหารแต่อาจมีความจำเป็นต้องใช้กรดแลคติกเพียงชนิดเดียวสำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการกลิ่นและรสชาติที่จำเพาะ กรดแลคติกที่อยู่ในรูปของ Stearoyl-2 lactylate (SSL) โดยที่ CSL (Corn steep liquor) ใช้เป็น

ตัวปรับสภาวะแป้งหมัก (Dough conditioner) ซึ่งรวมตัวกับกลูเตนในแป้งหมักทำให้สามารถทนต่อสภาวะการกวนและสภาวะต่างๆ ในระหว่างกรรมวิธีการผลิตขนมอบได้ดีขึ้น ปกติใช้ CSL เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ส่วน SSL มีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (Emulsifier) ได้ดีและสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ขนมอบได้ กรดแลคติกยังใช้เป็นส่วนประกอบในเนยแข็งชนิดต่างๆ ในผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น Salami ก็มีกรดแลคติก เป็นองค์ประกอบ นอกจากนั้นมีการนำกรดแลคติกไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแทนกรดซิตริก ฟอสฟอริก และกรดอื่นๆ สำหรับอุตสาหกรรมเบียร์และการผลิตขนมหวานก็มีการใช้กรดแลคติกในการปรับความเป็นกรด–ด่างของน้ำที่ใช้ในการผลิต

2.2.4 ด้านการเกษตร

เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ย

2.2.5 ด้านบรรจุภัณฑ์

เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษ

2.2.6 ด้านเส้นใย และแผ่นผ้าแบบ non-woven

เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน

2.2.7 ด้านการแพทย์

เนื่องจาก PLA เป็นพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Biodegradable) ที่สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อ (Biocompatible) และสามารถถูกดูดซึม (Bioresorbable) ได้โดยระบบชีวภาพ (Biological system) ในร่างกาย จึงทำให้ PLA เป็นวัสดุที่มีศักยภาพสูงสำหรับงานทางการแพทย์ และถูกนำมาใช้ทางด้านนี้มานานกว่า 2 ทศวรรษ เช่น ไหมเย็บแผล (Sutures) ตัวเย็บแผล (Staples) วัสดุปิดแผล (Wound dressing) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (Surgical implants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (Orthopedic fixation devices) วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยตัวยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.2.8 ด้านอื่นๆ

เช่น การนำกรดแลคติกไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพอลิแลกเทต ซึ่งนำมาใช้เป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่อใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

2.3 สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก (Antimicrobial substance)

ในระบบการหมักอาหาร มีความเกี่ยวข้องต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์ในระบบที่เจริญก่อนมักมีคุณสมบัติในการสลายวัตถุดิบ ให้เกิดน้ำตาลที่ใช้การเมทาบอลิซึมให้เกิดพลังงานได้ แบคทีเรียกรดแลคติกมักจะเจริญต่อมาในระบบการหมัก มีผลให้ความเป็นกรดมากขึ้น (พีเอชลดลง) ซึ่งมีผลให้จุลินทรีย์อื่นๆ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถผลิตสารประกอบที่ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ด้วย สารประกอบที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซิตัลดีไฮด์ ไอโซเมอร์ของกรดอะมิโน รูเทริน และแบคเทอริโอซิน ดังนั้น ในปัจจุบันมีการแบ่งสารประกอบที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ออกเป็น 6 ชนิด ดังนี้

2.3.1 กรดอินทรีย์ (Organic acid)

กรดแลคติก และกรดอะซิตริกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดที่สำคัญที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งชนิดและปริมาณของกรดที่ผลิตในระหว่างการหมักมีอิทธิพลต่อกิจกรรมจุลินทรีย์ Suskovic *et al.* (2010) เช่น กรดอะซิตริกมีผลต่อการต่อต้านยีสต์ได้มากกว่ากรดแลคติก ยีสต์ที่เจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Oxidative yeast) สามารถใช้กรดอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ความเป็นกรดของอาหารจึงลดลง เป็นผลให้แบคทีเรียสามารถเจริญได้ และอาหารเกิดการเน่าเสียในที่สุด โดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบจากพืช (Daechel *et al.*, 1987) ค่าพีเอชของอาหารที่ลดลง หรือสภาวะที่เป็นกรด จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบและแกรมบวกได้ ปัจจัยของกรดอินทรีย์ที่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์จะขึ้นอยู่กับค่า pH pKa และความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ ผลจากกรดอินทรีย์ในการยับยั้งการเจริญมีสาเหตุหลักจากโมเลกุลกรดที่ไม่แตกตัว เกิดการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ไปยังบริเวณไซโทซอล (Cytosol) ที่มีความเป็นเบสมากกว่า ทำให้เกิดการแตกตัวให้ไฮโดรเจนอิออน (H^+) แล้วไปรบกวนการทำงานของการเมทาบอลิกสารที่สำคัญต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น Translocation และ Oxidative phosphorylation เป็นต้น นอกจากนี้ผลจากกรดแลคติกยังลดค่าพีเอชภายนอกเซลล์ และมีผลต่อความต่างศักย์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (Kashket, 1987) แต่มีจุลินทรีย์บางชนิดที่สามารถทนต่อกรดอินทรีย์ได้ เช่น ยีสต์ รา และแบคทีเรียบางชนิดที่สร้างกรด (Acid producing bacteria)

2.3.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogenperoxide; H_2O_2)

การยับยั้งการเจริญด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เนื่องจากการเป็นตัวออกซิไดซ์ (Oxidizing agent) อย่างแรง มีผลต่อเซลล์ของแบคทีเรีย และทำลายโครงสร้างโมเลกุลโปรตีนพื้นฐานของเซลล์ โดยหมู่ซัลไฮดริล (Sulhydryl group; SH^-) ภายในโมเลกุลโปรตีนของเซลล์และในชั้นไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกออกซิไดซ์ (Reducing agent) ได้ จึงทำให้โครงสร้างของโปรตีนในเซลล์เปลี่ยนไปจนไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ (Lindgren และ Dobrogosz, 1990) ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ยังถูกกระตุ้นได้ด้วยแลคโตเปอร์ออกซิเดส (Lactoperoxidase) ในการเกิดปฏิกิริยากับไธโอไซยาเนท (Thiocyanate) เกิดเป็นสารไฮโปไธโอไซยาเนต (Hypothiocyanate) (ดังสมการด้านล่าง) ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์อื่นได้ (Banks *et al*., 1986) โดยมีผลกับโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียให้ถูกทำลายหรือเปลี่ยนแปลงได้เมื่อทำปฏิกิริยากับไฮโปไธโอไซยาเนต (Hypothiocyanate; $OSCN^-$) (Kamau *et al*., 1990)

$$SCN^- + H_2O_2 \xrightarrow{\text{Lactoperoxidase}} OSCN^- + H_2O$$

2.3.3 ไดอะซิติล (Diacetyl) อะซิตัลดีไฮด์ (Acetaldehyde) และอะซิโตอิน (Acetoin)

Suskovic *et al.* (2010)

การเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มเฮเทโรเฟอเมนเททีฟ (Heterofermentative) มีการผลิตอะซิตัลดีไฮด์โดยปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิลเลชัน (Decarboxylation) ของไพรูเวท ผลิตภัณฑ์ถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ α-acetolactate synthase ให้ได้เป็นไดอะซิติล ผลิตภัณฑ์จากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิลเลชัน α-acetolactate และปฏิกิริยารีดักชันไดอะซิติล คืออะซิโตอิน ซึ่งไดอะซิติล (2,3-butanedione) เป็นสารที่ให้อะโรมาในอาหารอย่างเช่น เนย ผลิตภัณฑ์หมักจากนม แต่คุณสมบัตินี้ต้องใช้ที่ความเข้มข้นสูงในการใช้ถนอมอาหารได้ ซึ่งต้องมีการจำกัดปริมาณการใช้ในด้านเป็นสารกันเสียในอาหาร และในทำนองเดียวกัน อะซิตัลดีไฮด์ ซึ่งปกติจะเกิดขึ้นได้ในผลิตภัณฑ์หมักจากนม แต่มีความเข้มข้นน้อยกว่าที่จะใช้ในการยับยั้งเชื้อได้ ซึ่งมีการทำงานที่สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อปนเปื้อน จะต้องเกิดร่วมกับสารเมทาบอไลท์ชนิดอื่นจากแบคทีเรียกรดแลคติก (Vanderbergh, 1993)

2.3.4 รูเทริน (Reuterin)

รูเทริน (Reuterin) เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ละลายน้ำไม่ใช่สารประกอบพวกโปรตีน เนื่องจากไม่ถูกทำลายจาก Proteolytic enzyme รูเทรินอยู่ในรูป β- hydroxyproionaldehyde ซึ่งอาจเป็น Monomer หรือ Dimer โดยเกิดขึ้นในกระบวนการออกซิไดซ์ของ Glycerol ในสภาพที่มีอากาศ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น แบคทีเรียแกรมบวก แบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ รา

2.3.5 แบคเทอริโอซิน (Bacteriocins)

แบคเทอริโอซินเป็นโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรียมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นได้ปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินที่ตนเองสร้างออกมา ดังนั้นจึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งจากแบคเทอริโอซินของตนเอง การสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียเกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดในสภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกันทำให้เชื้อที่สร้างแบคเทอริโอซินสามารถแย่งอาหารและพื้นที่เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินก็จะตายลงในที่สุด

มีการใช้แบคเทอริโอซินร่วมกับ Hurdle technology โดย Hurdle technology หมายถึงการใช้ปัจจัยร่วมทั้งภายในและภายนอก (Intrinsic and extrinsic) ในการป้องกันการปนเปื้อนแบคทีเรีย หรือควบคุมการเจริญและการรอดชีวิตของเชื้อในอาหาร การใช้การถนอมอาหารหลายวิธีร่วมกันจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อมากกว่าการใช้เพียงวิธีเดียว รวมทั้งช่วยเพิ่มความปลอดภัยและคุณภาพของอาหาร โดยแบคเทอริโอซินสามารถใช้ร่วมกับวิธีอื่นเช่นกัน การใช้แบคเทอริโอซินเพียงอย่างเดียวก็อาจพบว่าอาหารปนเปื้อนแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค ซึ่งแบคทีเรียแกรมลบสามารถป้องกันการเข้าทำลายได้จากการมีชั้นของผนังเซลล์ด้านนอก (Outer membrane) แต่เมื่อใช้ร่วมกับ Chelating agent ที่ยอมรับให้ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น Food-grade ethylene diamine tetraacetate (EDTA) ซึ่งจะไปจับกับแมกนีเซียมไอออนในชั้นลิโพพอลิแซคคาไรด์ (Lipopolysaccharide) ที่ผนังเซลล์ด้านนอก และทำให้เชื้อเหล่านี้ไวต่อการเข้าทำลายของแบคเทอริโอซิน

แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) หมายถึงเพปไทด์ (Peptide) หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม (Ribosome) และมีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรีย แบคทีเรียแตกต่างจากสารปฏิชีวนะ (Antibiotic) โดยแบคเทอริโอซินมีฤทธิ์ในการยังยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ช่วงแคบ และเป็นมีผลต่อแบคทีเรียที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน แบคทีเรียแกรมลบและแกรมบวกสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ โดยแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกได้ถูกนำมาศึกษามากที่สุด ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่ามีความปลอดภัย ทั้งนี้เนื่องจากมักพบในอาหารหมักดองตามธรรมชาติได้ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน สามารถคัดแยกได้จากอาหารหมักดอง ดังนั้นมีความปลอดภัยต่อการนำมา

ประยุกต์ใช้กับอุตสาหกรรมอาหาร ปัจจุบันมีการผลิตแบคเทอริโอซินในเชิงการค้า ซึ่งผลิตในรูปผงแห้ง เช่น ไนซิน (Nisin) ที่ได้จาก *Lactococcus lactis* และเพดิโอซิน (Pediosin) จาก *Pediococcus acidilactici* เป็นต้น

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีคุณสมบัติที่เหมาะในการนำมาใช้เป็นสารกันเสียในอาหาร เนื่องจากเหตุผลหลายประการ ได้แก่

1) เป็นที่ยอมรับในความปลอดภัย

2) ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต

3) สามารถถูกยับยั้งได้ด้วยเอนไซม์โพติเอส (Protease) จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร

4) มักจะทนต่อพีเอช และความร้อน

5) แบคเทอริโอซินบางชนิดออกฤทธิ์ในการยับยั้งอย่างกว้าง สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารได้ เช่น *Listeria monocytogenes* และ *Clostridium botulinum* เป็นต้น

6) มักถูกควบคุมโดยพลาสมิดจึงง่ายต่อการทำพันธุวิศวกรรม (Genetic engineering)

7) ช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารมีคุณภาพดีขึ้น เช่นเพิ่มรสชาติในอาหาร เป็นต้น

8) มีกิจกรรมจำเพาะ (Specific activity) สูง

2.4 แบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติก (Probiotic lactic acid bacteria)

ปี 1974 Parker ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติก (Probiotic) คือสิ่งมีชีวิต หรือสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลจุลินทรีย์ในลำไส้ ต่อมาปี 1989 Fuller ได้ให้คำจำกัดความของโปรไบโอติก คืออาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต สามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่ โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย ในปัจจุบันมีการให้ความหมายว่า โปรไบโอติก หมายถึง เชื้อเริ่มต้นของจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อเป็นโดยไม่ว่าจะเป็นสายพันธุ์เดี่ยวหรือผสม ซึ่งเมื่อสัตว์ได้รับเข้าไปแล้วจะปรับสมดุลและเป็นประโยชน์ต่อสัตว์เพิ่มมากขึ้น โปรไบโอติกจะช่วยทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อโทษและช่วยเพิ่มปริมาณจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ โดยคุณสมบัติพื้นฐานในการเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพ ได้แก่

- ความสามารถการอาศัยอยู่ในลำไส้
- ความสามารถการมีชีวิตรอด ความทนต่อพีเอชที่เป็นกรด
- ความสามารถการยึดเกาะ (Adhere) กับผนังลำไส้
- ไม่ก่อให้เกิดโรคและไม่สร้างสารพิษ
- สร้างสารที่เป็นประโยชน์ต่อโฮสท์
- เป็นสิ่งมีชีวิตจำเพาะต่อมนุษย์

- ความคงตัวในสภาวะที่จัดเก็บ (Michail, 2005)

ดังนั้น จากที่กล่าวมาโปรไบโอติก (Probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตและยังมีประโยชน์ต่อผู้ถูกอาศัย (Host; โฮสท์ ซึ่งคุณสมบัติการเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกได้จะต้องมีความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะระบบย่อยของระบบทางเดินอาหาร เช่นในกระเพาะอาหารที่สภาวะความเป็นกรด ทนได้ในสภาวะเกลือน้ำดี และเมื่ออยู่รอดได้จึงจะสามารถทำงานในการเป็นโปรไบโอติกตามคุณสมบัติต่างๆ ที่กล่าวมาแล้ว

2.4.1 บทบาทของโปรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่สามารถเป็นโปไบโอติกจะช่วยให้ร่างกายมีความสมดุล ระบบต่างๆ ทำงานได้อย่างปกติ เมื่อสัตว์ได้รับจุลินทรีย์โปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกาย โปรไบโอติกจะมีบทบาท ดังนี้

1. โปรไบโอติกจะเข้าทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ โดยการแย่งพื้นที่เข้าเกาะ หรือแย่งอาหาร หรือทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

2. ผลิตสารที่ต่อต้านการเจริญเติบโตหรือการตั้งถิ่นฐานของจุลินทรีย์ที่เป็นพิษ

3. ผลิตเอนไซม์ที่ทำลายสารพิษในอาหาร หรือสารพิษที่จุลินทรีย์ที่เป็นโทษสร้างขึ้น

4. ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยอาหารที่สัตว์กินเข้าไป

โปรไบโอติกมีความคล้ายยาปฏิชีวนะในแง่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น หรือจุลินทรีย์ ที่ก่อให้เกิดโทษ แต่จากบทบาทต่างๆ ของโปรไบโอติก จะเห็นว่าโปรไบโอติกจะมีความแตกต่างจากยาปฏิชีวนะ เนื่องจากโปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ ไม่สร้างสารที่ก่อให้เกิดความดื้อยาต่อจุลินทรีย์ก่อโรค และไม่สร้างสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์

2.4.2 กลไกการทำงานของโปรไบโอติก

กลไกการทำงานของโปรไบโอติกมีหลายกระบวนการร่วมกัน ได้แก่

1. การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (Antimicrobial activity) โดยโปรไบโอติกจะช่วยยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคในทางเดินอาหาร มีกระบวนการต่างๆ เช่น ลดพีเอชในท่อทางเดินอาหาร ปล่อยสารพวกเพปไทด์ยับยั้งการเจริญเติบโต ยับยั้งการแพร่ของแบคทีเรีย ขัดขวางการยึดเกาะของแบคทีเรียที่เซลล์บุผิว (Epithelial cells)

2. การเพิ่มสิ่งขัดขวาง (Barrier function) โดยการสร้างสิ่งขัดขวางการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะช่วยลดปริมาณจุลินทรียที่เป็นโทษ โดยอาศัยกระบวนการ เช่น เพิ่มการผลิตน้ำเมือก (Mucus) ทางเดินอาหาร

3. Immunomodulation เป็นการสร้างภูมิคุ้มกัน โดยมีกระบวนการต่างๆ เช่นระบบภูมิคุ้มกันบริเวณเซลล์บุผิวที่ชั้นเยื่อบุผิวในลำไส้ ให้มีความแข็งแรงป้องกันการติดเชื้อหรือการอักเสบ การมีอิทธิพลต่อการสร้างภูมิต้านทาน ทั้งเม็ดเลือดขาวชนิด Monocytes หรือ Macrophage และยังมีอิทธิพลต่อการสร้างภูมิต้านทาน เม็ดเลือดขาวชนิด Lymphocytes ได้แก่ B- lymphocytes, NK cells, T cells และ T cell redistribution (Ng *et al.* 2009)

แบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกมีหลายชนิด โดยแต่ละชนิดมีการแสดงกิจกรรมในรูปแบบต่างๆ กัน กลไกการทำงานของแบคทีเรียโปรไบโอติก ทั้งการลดปริมาณจุลินทรีย์อื่น การเพิ่มสิ่งขัดขวางจุลินทรีย์อื่นและช่วยระบบภูมิคุ้มกัน โดยในกลไกเหล่านี้ประกอบด้วยกระบวนการต่างๆ ที่มีการทำงานร่วมกัน จึงช่วยทำให้การทำงานในระบบลำไส้ หรือทางเดินอาหารดีมากขึ้น ซึ่งสามารถทำงานได้อย่างปกติมีสมดุล

4. การยับยั้งจุลินทรีย์ (Antimicrobial effect) การทำงานของโปรไบโอติก เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์อื่น โดยกระบวนการสร้างสารที่เป็นปัจจัยต่อการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น เช่นการสร้างกรดแลคติก กรดไขมันสายสั้นๆ ทำให้มีความเป็นกรดมากขึ้นในท่อทางเดินอาหาร ทำให้ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น แบคทีเรียโปรไบโอติกยังผลิต Antimicrobial รวมถึงแบคทีเรียโปรไบโอติกยังสามารถแข่งขันแย่งพื้นที่เกาะยึดในผนังลำไส้กับเชื้อก่อโรคด้วย กระบวนการยับยั้งจุลินทรีย์มีดังนี้

4.1 การผลิตสารปัจจัยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Production of Antimicrobial Factors) โปรไบโอติดสามารถผลิตกรดไขมันสายสั้นๆ (Fatty acid) ทำให้ลดค่าพีเอช ลดการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค (Vandenbergh *et al.*, 1993) แบคเทริโอซิน (Bacteriocin) เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น โดยออกฤทธิ์อย่างจำเพาะต่อแบคทีเรียแกรมลบ (Rossland *et al.*, 2005) *Lactobacilli* สามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการทำงานของไวรัส *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 และ *L. fermentum* RC-14 สามารถผลิตสารยับยั้ง Adenovirus และ Vesicular stomatitis virus (Cadieux *et al.*, 2002)

4.2 การแข่งขันในการยึดเกาะ (Competition of Adhesion) เป็นการเข้ายึดเพิ่มจำนวนของโปรไบโอติกด้วยการแข่งขันพวกจุลินทรีย์ก่อโรคในการแย่งยึดเกาะ *Lactobacillus* GG และ *Lactobacillus plantarum* 299V มีการแข่งขัน ยับยั้งการเกาะติดผนังลำไส้ของ *Escherichia coli* 0157H7 ต่อ HT-29 cells (Mack *et al.*, 1999) และ *Lactobacilli* ยังขัดขวางตำแหน่งเข้าจับเชื้อโรคได้ด้วย

นอกจากที่กล่าวมา การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ยังมีกระบวนการอื่นอีกด้วย เช่นการแข่งขันแย่งอาหาร (Competition for Nutrient) โดยโปรไบโอติกจะเข้าแย่งสารอาหารจากเชื้อก่อโรค ตัวอย่างเช่น โปรไบโอติกมีการใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Monosaccharide) ทำให้ลดการเจริญของ *Clostridium difficile* ได้ (Wilson และ Perini, 1988) โปรไบโอติกยังสามารถต่อต้านความเป็นพิษ (Antitoxin Effect) ที่จุลินทรีย์อื่นผลิตขึ้นได้ด้วย โดยคาดว่าโปรไบโอติกอาจจะสามารถปรับเปลี่ยนบริเวณที่เป็นหน่วยรับสารพิษ เช่น *Saccharomyces boulardi* มีอิทธิพลต่อ Toxin A receptor ของ *Clostridium difficile* (Pothoulakis *et al.*, 1993) จึงคาดว่าในโฮสท์ที่มีโปรไบโอติกลำไส้ จะช่วยเพิ่มความต้านทานเชื้อก่อโรคที่สร้างสารพิษ อย่างเช่น *Salmonella enteritidis* ได้

จะเห็นว่า การสร้างสภาวะยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ คุณสมบัตินี้จะสามารถนำมาพัฒนาในการผลิตสารที่ฤทธิ์ต่อต้าน หรือยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ต่อไปได้ เช่นสารสร้างแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งอุตสาหกรรมการผลิตอาหาร อาหารเพื่อสุขภาพ และด้านการแพทย์

2.4.3 บทบาทของโปรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่สามารถเป็นโปไบโอติกจะช่วยให้ร่างกายมีความสมดุล ระบบต่างๆ ทำงานได้อย่างปกติ เมื่อสัตว์ได้รับจุลินทรีย์โปรไบโอติกเข้าสู่ร่างกาย โปรไบโอติกจะมีบทบาท ดังนี้

1) โปรไบโอติกจะเข้าทำลายจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโทษ โดยการแย่งพื้นที่เข้าเกาะ หรือแย่งอาหาร หรือทำให้สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม

2) ผลิตสารที่ต่อต้านการเจริญเติบโตหรือการตั้งถิ่นฐานของจุลินทรีย์ที่เป็นพิษ

3) ผลิตเอนไซม์ที่ทำลายสารพิษในอาหาร หรือสารพิษที่จุลินทรีย์ที่เป็นโทษสร้างขึ้น

4) ผลิตเอนไซม์ที่ช่วยย่อยอาหารที่สัตว์กินเข้าไป

โปรไบโอติกมีความคล้ายยาปฏิชีวนะในแง่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น หรือจุลินทรีย์ ที่ก่อให้เกิดโทษ แต่จากบทบาทต่างๆ ของโปรไบโอติก จะเห็นว่าโปรไบโอติกจะมีความแตกต่างจากยาปฏิชีวนะ เนื่องจากโปรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีอยู่แล้วในธรรมชาติ ไม่สร้างสารที่ก่อให้เกิดความดื้อยาต่อจุลินทรีย์ก่อโรค และไม่สร้างสารพิษตกค้างในผลิตภัณฑ์จากสัตว์ ข้อควรคำนึงการใช้โปรไบโอติกได้แก่

1. ปริมาณของจุลินทรีย์ขั้นต่ำต้องมีความเหมาะสม เพื่อให้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เหล่านั้นสามารถอาศัยอยู่ในลำได้อย่างถาวร หรือสามารถตั้งถิ่นฐานในทางเดินอาหารหรือลำไส้ได้อย่างถาวร (Permanent colonization หรือ Establishment) หน่วยของปริมาณจุลินทรีย์ เช่น CFU/g หรือ CFU/ml

2. เชื้อเริ่มต้นต้องสามารถปรับตัวให้ทำงานได้ตามอุณหภูมิร่างกาย

3. เชื้อเริ่มต้นต้องสามารถกระตุ้นให้ร่างกายมีการตอบสนองอย่างเหมาะสมต่อปริมาณเชื้อที่ได้รับ โดยร่างกายเมื่อได้รับจุลินทรีย์โปรไบโอติกในปริมาณที่เหมาะสม ร่างกายควรมีการตอบสนองได้อย่างพอเหมาะ หรือปรับสมดุลให้ดีขึ้นได้นั่นเอง

แนวความคิดการใช้โปรไบโอติกในทางเดินอาหารสัตว์ อย่างเช่นลำไส้เล็ก ลำไส้ใหญ่ มีจุลินทรีย์อาศัยอยู่หลายชนิด หรือเชื้อประจำถิ่น (Normal flora) ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่อยู่ในลำไส้ส่วนใหญ่อยู่ในแฟมมิลี (Family) Enterobacteriaceae เช่น *Escherichia coli* จุลินทรีย์เหล่านี้จะมีกิจกรรมต่างๆ และเพิ่มจำนวนได้ โดยจุลินทรีย์ยังสามารถมีกิจกรรมในการเจริญเติบโต เพิ่มปริมาณ และสามารถผลิตสารออกมาอย่างมีความจำเพาะ

2.4.4 ประโยชน์ของโปรไบโอติก

จากที่กล่าวมาโปรไบโอติกมีคุณสมบัติทั่วไปในแง่การปรับสมดุลระบบการทำงานของทางเดินอาหารให้ดีขึ้น โปรไบโอติกจึงมีประโยชน์ดังนี้

1. ช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิด โดยกรดแลคติก (Lactic acid) ที่แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ผลิตออกมาจะมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคทางเดินอาหารบางชนิด อย่างเช่นพวกเชื้อก่อโรคในกระเพาะและลำไส้ (Gastroenteric pathogens) เช่น *Clostridium difficile*, *Campylobacter jejuni*, *Helicobacter pylori* และ rotavirus (Ljungh และ Wadstrom, 2005)

2. ช่วยในระบบขับถ่าย ให้ทำงานได้ปกติขึ้น การทำงานของระบบขับถ่ายที่ดี จะช่วยลดการสะสมสารพิษในร่างกาย จึงช่วยลดอัตราการเกิดโรค หรือการแสดงอาการผิดปกติเนื่องจากร่างกายไม่ขับถ่าย

3. โปรไบโอติกบางชนิดมีการผลิตวิตามินบี จึงช่วยเสริมภูมิต้านทาน ทำให้เซลล์มีภูมิต้านทานที่ดีขึ้น รวมถึงช่วยในการสร้างเม็ดเลือดแดงด้วย เช่น *Lactobacilus plantalum* สามารถผลิตวิตามิน B12 ได้ เชื้อดังกล่าวแยกได้จาก Kanjika เป็นอาหารหมักพื้นบ้านในอินเดีย (Madhu *et al.*, 2010)

4. ช่วยลดอัตราการเกิดโรคต่างๆ เช่น Probiotic lactic acid bacteria สามารถควบคุมกิจกรรมของเซลล์มะเร็งในลำไส้ได้ (Rafter, 2004) ช่วยลดการเกิดโรค Eczema ซึ่งทำให้ผิวหนังมีผื่นแดง คัน อักเสบ และตกสะเก็ด (Boyle, 2008) ช่วยยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งและการเจริญของเซลล์มะเร็ง ตัวอย่างเช่นโปรไบโอติกที่อยู่ในผลิตภัณฑ์จากนมสามารถลดความเสี่ยงของสาเหตุการเกิดมะเร็งตับที่เกิดจากพิษของเชื้อราในอาหาร ที่เป็นสาเหตุการเกิดโรคในประเทศที่มีประชากรหนาแน่น (Daniells, 2006)

5. ช่วยลดระดับน้ำตาลและคอเลสเทอรอล (Cholesterol) ในร่างกายเนื่องจากกรดแลคติกที่แบคทีเรียมีการผลิตขึ้น เช่น *Lactobacillus casei* ASCC 292 สามารถช่วยลดระดับคอเลสเทอรอลได้ (Liong และ Shah, 2004)

6. ช่วยการย่อยน้ำนม โดยเอนไซม์แลคเตส (Lactase) ที่ผลิตขึ้นมาจากแบคทีเรียจะช่วยย่อยน้ำนมที่ดื่มเข้าไป ดังนั้นจึงลดอาการท้องอืดที่เกิดจากการไม่ย่อยด้วย

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ทั่วไปในอาหารหมักดองที่ใช้เชื้อเป็นเป็นเชื้อตั้งต้นในการหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดมีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในแง่การผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคบางชนิดได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกโปรไบโอติก (Probiotic lactic acid bacteria; PLAB) ยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในช่องปากได้ด้วย การใช้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ในการหมักอาหารจะช่วยให้อาหารเป็นผลิตภัณฑ์ที่ช่วยส่งเสริมสุขภาพที่ดีต่อผู้บริโภค และยังเป็นแนวทางหนึ่งในการนำ PLAB มาผลิตสารหรือผลิตภัณฑ์ยับยั้งการเจริญที่จะช่วยลดการใช้ สารสังเคราะห์ทางเคมี อย่างเช่นสารกันเสียที่เป็นสารเคมี ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งด้านการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง อาหารเพื่อสุขภาพ รวมถึงทางการแพทย์ได้ด้วย

2.4.5 จุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติก

จุลินทรีย์มีหลายชนิด และมีคุณสมบัติแตกต่างกัน โดยแบคทีเรียบางชนิดมีประโยชน์ในระบบร่างกายของมนุษย์และสัตว์ ที่ช่วยให้ระบบร่างกายมีการปรับให้เกิดความสมดุลสามารถทำงานได้อย่างปกติ ซึ่งเรียกว่า โปรไบโอติก โดยโปรไบโอติกต้องมีความสามารถในการปรับตัว ในการมีชีวิตผ่านระบบทางเดินอาหารเพื่ออยู่ในท่อทางเดินอาหารได้ เช่นสามารถทนต่อความเป็นกรด น้ำดี และคุณสมบัติในการเกาะยึดกับผนังในลำไส้ เป็นต้น จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ส่วนใหญ่เป็นกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกได้ ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกที่เป็นโปรไบโอติก (Probiotic Lactic acid bacteria) เช่น *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus* ที่พบได้ในนมเปรี้ยว (Boyle, 2008) *Lactobacillus plantarum* แยกได้จาก Kanjika ซึ่งเป็นอาหารหมักของอินเดีย (Madhu, 2010) แบคทีเรียกรดแลกติกรหัส H12 ในกลุ่ม *Enterococcus* sp. ที่คัดแยกได้จากแหนมเห็ด แบคทีเรียสายพันธุ์ดังกล่าวยังสามารถผลิตโฟเลตได้ด้วย (เกศินี, 2550) *Lactobacilus fermentum* เป็นโปรไบโอติกที่มีคุณสมบัติในการเกาะยึดได้ดี ซึ่งคัดแยกได้จากเนื้อหมูหมัก (Klayraung *et al.*, 2008)

ปี 1999 Jacobsen และคณะ รายงานว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่เป็นโปรไบโอติกได้จากอาหารที่หมักด้วยข้าวโพดในกานา (Ghanaian fermented maize) ซึ่งได้แบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* spp. 47 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติทนต่อสภาวะที่มีพีเอช 2.5 และสภาวะน้ำดี (ใช้ Oxgall) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.3 ได้ สามารถยึดเกาะกับ Caco-2 cells ซึ่งเป็นเซลล์ทดสอบได้ และยังสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ก่อโรคกลุ่มEnteric pathogen

ปี 2006 Guo และคณะ รายงานว่าในการคัดแยกแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ ได้แก่ลำไส้ไก่ หมู อาหารหมักดอง ดิน และสมุนไพรจีน พบว่าได้แบคทีเรียมากกว่า 750 สายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเป็นพวกต้องการอากาศ (Aerobic) สร้างสปอร์ (Spore-forming) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดได้ เช่น *Escherichia coli* K88, *Salmonella typhimurium* และ *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ *Bacillus subtilis* MA139 สามารถทนต่อสภาวะที่มีพีเอช 2 และเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้น ร้อยละ 0.3 ได้ด้วย

ปี 2010 Grimoud และคณะ รายงานผลการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดที่คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกได้แก่การทนต่อสภาวะในระบบย่อยอาหาร การยับยั้งการเจริญของของเชื้อก่อโรค ซึ่ง *Bifidobacterium* เป็นสกุลที่สามารถทนต่อสภาวะต่างๆ ได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับ *Lactobacillus farciminis* นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารพวก Glucooligosaccharides ที่เป็นแหล่งสนับสนุนแล้วสามารถพัฒนาการเป็น Synbiotic ต่อไปได้

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 วัสดุ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.1.1 แหล่งคัดแยก

แหล่งคัดแยก ได้แก่ อาหารหมักดองประเภทผัก ผลไม้ และแหนมเห็ด

3.1.2 แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

แบคทีเรียที่นำมาใช้ทดสอบนี้ สามารถพบการปนเปื้อนในอาหารทั่วไปได้ มี 3 สายพันธุ์ ที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR 780 *Salmonella typhimurium* TISTR292 และ *Strephylococcuss aureus* TISTR 1466 จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว)

3.1.3 อาหารเพาะเลี้ยง และสารเคมี

1) MRS broth

2) Nutrient broth (NB)

3) สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ปรับพีเอชด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (ภาคผนวก)

4) สารละลายจำลองในกระเพาะอาหาร (ภาคผนวก)

5) เกลือน้ำดี

6) สารทดสอบทางชีวเคมีในการบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก (ภาคผนวก)

7) Bromocresol purple

3.2 วิธีดำเนินการวิจัย

3.2.1 การเก็บแหล่งคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในที่นี้ ได้นำตัวอย่างอาหารหมักดองจำพวกผัก ผลไม้ เห็ด เป็นแหล่งคัดแยก ได้แก่ ผักกาดเขียวปลีดอง หอมดอง ผักแป้นดอง หน่อไม้ดอง ผักเสี้ยนดอง มะม่วงดอง มะยมดอง กระท้อนดอง และแหนมเห็ด โดยผักกาดเขียวปลีดองนำมาจากตลาดกลาง อำเภอนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์ ส่วนผักหอมดอง ผักแป้นดอง ผักกุ่มดอง ผักเสี้ยนดอง และกระท้อนดอง นำมาจากชาวบ้าน

ที่ชาวบ้านหมักดองไว้ขาย และรับประทานเองในอำเภอเกษตรวิสัย จังหวัดร้อยเอ็ด และแหนมเห็ด จากอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์

3.2.2 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ชั่งตัวอย่างแหล่งคัดแยกที่เป็นอาหารหมักดอง 10 กรัม เติมลงในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 30 นาที นำตัวอย่างแหล่งคัดแยกที่เป็นของเหลว 1 ลูป (Loop) มาขีดลาก (Simple streak) บนอาหาร MRS ที่เติม Bromocresol purple 1 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในสภาพไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเกิดโซนใส (Clear zone) รอบโคโลนี ซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก

นำโคโลนีที่มีโซนใสรอบๆ มาขีดไขว้ (Cross streak) บนอาหาร MRS ที่มี Bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์ นำไปบ่มในสภาพไม่มีอากาศ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่มีโซนใสรอบโคโลนี ทำซ้ำเช่นนี้เพื่อแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวมากขึ้น และแยกให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์ที่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกอย่างชัดเจนขึ้น

3.2.3 การทดสอบสารที่มีคุณสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ด้วยวิธี Direct agar spot method (Fleming และคณะ, 1985)

3.2.3.1 การเตรียมแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

แบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Strephylococcuss aureus* TISTR 1466 *Salmonella typhimurium* TISTR292 และ *Escherichia coli* TISTR 780 จากฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว) โดยนำตัวอย่างแบคทีเรียที่เป็นลักษณะผงแห้งมาเลี้ยงในอาหาร NB (Nutrient broth) ปริมาตร 7 มิลลิลิตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาขีดไขว้บนอาหาร NA (Nutrient agar) แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตความบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย แล้วเก็บใน Agar slant เพื่อเป็นสต๊อก (Stock) เพาะเลี้ยงแบคทีเรียก่อโรคที่ต้องการทดสอบ มาเลี้ยงในอาหาร NB ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.3.2 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ย้ายลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แล้วนำมา 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร MRS agar 4 จุด นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

3.2.3.3 การทดสอบสารทดสอบที่มีคุณสมบัติคล้ายแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร

การทดสอบด้วยวิธี Direct agar spot โดยนำแบคทีเรียก่อโรคที่ต้องการทดสอบ ที่เตรียมในข้อ 3.2.3.1 มา 1 มิลลิลิตร ผสมลงใน 0.5 เปอร์เซ็นต์ Soft agar ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เททับบนอาหารที่หยดแบคทีเรียกรดแลคติก (ที่เตรียมในข้อ 3.2.3.2) รอให้แห้ง แล้วคว่ำจานเพาะเลี้ยง แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง จากนั้นสังเกตการเกิดโซนใส (Clear zone) รอบรอยหยดแบคทีเรียกรดแลคติก และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารชนิดที่ทดสอบได้

3.2.4 ทดสอบการอยู่รอดในสภาวะที่มีกรด สารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี

3.2.4.1 ทดสอบการอยู่รอดในสภาวะที่มีกรดไฮโดรคลอริก (ดัดแปลงวิธีจากมงคล และเพ็ญรัตน์, 2554)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาปรับความขุ่น (OD) ให้ได้ 0.7 แล้วนำมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 9 มิลลิลิตร ซึ่งสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์มีความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ ปรับพีเอชให้เป็น 2.5 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) 5 นอร์มอล เมื่อผสมแบคทีเรียกรดแลคติกเข้ากับสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์แล้ว นำมาเกลี่ย (Spread plate) บน MRS agar แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เป็นปริมาณเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 0 ส่วนสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ผสมแบคทีเรียกรดแลคติกแล้ว ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือ ไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเกลี่ยและบ่มที่สภาวะเดียวกับชั่วโมงเริ่มต้น จากนั้นนำมานับจำนวน และคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

3.2.4.2 ทดสอบการอยู่รอดในสารละลายในกระเพาะอาหาร (ดัดแปลงวิธีจากมงคล และเพ็ญรัตน์, 2554)

เตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบตามวิธีในข้อ 3.2.4.1 เมื่อปรับความขุ่นได้ 0.7 แล้ว นำมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในสารละลายสมมติในกระเพาะ (ภาคผนวก) 9 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำมาเกลี่ยบน MRS agar แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 0 และนำสารละลายในกระเพาะอาหารที่ผสมแบคทีเรียกรดแลคติกแล้ว (ซึ่งเป็นส่วนที่เหลือ) นำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเกลี่ยและบ่มที่สภาวะเดียวกับชั่วโมงเริ่มต้น จากนั้นนำมานับจำนวน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

3.2.4.3 ทดสอบการอยู่รอดในเกลือน้ำดี (ดัดแปลงวิธีจากมงคล และเพ็ญรัตน์, 2554)

เตรียมแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบตามวิธีในข้อ 3.2.4.1 เมื่อปรับความขุ่นได้ 0.7 แล้ว นำมา 1 มิลลิลิตร ใส่ใน 9 มิลลิลิตร ของอาหาร MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี (Bile salt) 0.3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก) ผสมให้เข้ากัน นำมาเกลี่ยบน MRS agar แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เป็นปริมาณเชื้อเริ่มต้นที่ชั่วโมงที่ 0 และนำอาหาร MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี ซึ่งผสมแบคทีเรียกรดแลคติกแล้ว (เป็นส่วนที่เหลือจากชั่วโมงที่ 0) นำไปบ่มต่อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเกลี่ยและบ่มที่สภาวะเดียวกับชั่วโมงเริ่มต้น จากนั้นนำมานับจำนวน และคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด

วิธีคำนวณ % การอยู่รอดในสภาวะทดสอบ

$$\% \text{ การอยู่รอด} = \frac{\text{ปริมาณเซลล์ทดสอบเริ่มต้น (CFU/ml)}}{\text{ปริมาณเซลล์หลังจากอยู่ในสภาวะทดสอบ (CFU/ml)}} \times 100$$

3.2.5 การบ่งชี้สกุลแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

การศึกษาทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี (Morphology and biochemical test) โดยในแต่ละขั้นตอนการทดสอบ มีการถ่ายแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ลงในอาหาร MRS แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะไม่มีอากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาทดสอบ เพื่อการบ่งชี้สกุลแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ โดยมีการทดสอบดังนี้

3.2.5.1 รูปร่างเซลล์ และการย้อมติดสีแกรม

นำตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกมาย้อมสีแกรม และศึกษาผ่านกล้องจุลทรรศน์ โดยถ้าผนังเซลล์แบคทีเรียย้อมติดสีม่วงของสารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) จัดในกลุ่มแกรมบวก และถ้าผนังเซลล์แบคทีเรียย้อมติดสีแดงของสารละลายซาฟรานิน โอ (Safranin O) จัดในกลุ่มแกรมลบ ทดสอบการติดสีแกรม ร่วมกับศึกษารูปร่างเซลล์

3.2.5.2 ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

ทดสอบการสร้างคะตะเลส โดยเขี่ยโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญบนอาหารแข็ง มาเกลี่ย (Smear) บนสไลด์ (Slide) จากนั้นหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ใช้เข็มเขี่ยปราศจากเชื้อผสมให้เข้ากัน สังเกตการเกิดฟองก๊าซ โดยถ้าเกิดฟองก๊าซ แสดงว่ามีการสร้างคะตะเลสให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test; +) ถ้าไม่มีฟองก๊าซแสดงว่าไม่มีการสร้างคะตะเลส ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test; -)

3.2.5.3 ทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

นำโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกมาขีดไขว้บน MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หยดสารละลายทดสอบการสร้างออกซิเดส (Oxidase reagent) ลงบนโคโลนีที่ต้องการทดสอบ สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโคโลนี โดยถ้าที่โคโลนีเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที แสดงว่ามีการสร้างออกซิเดส ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test; +) และถ้าโคโลนีไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าไม่มีการสร้างออกซิเดส ให้ผลการทอสอบเป็นลบ (Negative test; -)

3.2.5.4 ทดสอบการเจริญได้ในเกลือ (Sodium chloride; NaCl)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกมาเพาะเลี้ยงใน MRS broth ที่มีโซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride; NaCl) แต่ละความเข้มข้น ได้แก่ 4 10 และ 18 แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญได้จากความขุ่น โดยถ้าสามารถเจริญได้ อาหารขุ่นมากขึ้น ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test; +) และถ้าไม่สามารถเจริญได้อาหารไม่มีความขุ่น ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test; -)

3.2.5.5 ทดสอบการเจริญได้ในอุณหภูมิต่างๆ

นำแบคทีเรียกรดแลคติกมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth แล้วบ่มที่อุณหภูมิต่างๆ คือ 37 และ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญได้จากความขุ่น โดยถ้าสามารถเจริญได้อาหารขุ่นมากขึ้น ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test; +) และถ้าไม่สามารถเจริญได้อาหารไม่มีความขุ่น ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test; -)

3.2.5.6 ทดสอบการสร้างกรดและก๊าซจากการหมักกลูโคส

นำแบคทีเรียกรดแลคติกมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS กลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ และมีฟีนอลเรด (Phenol red) ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ และการเปลี่ยนสีของการอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง โดยถ้ามีฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซแสดงว่ามีการสร้างก๊าซ ถ้าอาหารเปลี่ยนสีจากสีแดงเป็นสีเหลืองแสดงว่ามีการสร้างกรด และถ้าไม่มีก๊าซ และ/หรือสีอาหารไม่เปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่มีการสร้างก๊าซ และ/หรือไม่มีการสร้างกรด และทดสอบการหมักน้ำตาลแลคโตส ราฟิโนส (Raffinose) และเมลิไบโอส (Melibiose) ด้วย

จากการทดสอบต่างๆ นำมาเปรียบเทียบคุณสมบัติตามสกุล เพื่อบ่งชี้สกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ และเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ต่อไป โดยใช้วิธีการเก็บรักษาในอาหาร MRS slant เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-8 องศาเซลเซียส ได้ประมาณ 3 สัปดาห์ แล้วจึงเปลี่ยนถ่ายอาหารใหม่

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

4.1.1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหล่งคัดแยกอาหารหมักดอง

อาหารหมักดองที่ใช้เป็นแหล่งคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ ผักหอมดอง ผักเสี้ยนดอง ผักแป้นดอง ผักกุ่มดอง ผักกาดดอง และกระท้อนดอง ในเขตอำเภอนางรอง จังหวัดบุรีรัมย์ อำเภอเกษตรวิสัย จังหวัดร้อยเอ็ด และ แหนมเห็ด ที่ชาวบ้านหมักเองในเขตอำเภอเมือง จังหวัดบุรีรัมย์ เมื่อนำอาหารหมักดองมาคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS ที่มี Bromocresol purple ความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ เป็นตัวบ่งชี้ โดยสังเกตการเกิดโซนใสรอบโคโลนี พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ได้ 107 ไอโซเลท โดยจากแต่ละแหล่งคัดแยกสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ ดังนี้ ผักหอมดอง 9 ไอโซเลท ผักเสี้ยนดอง 17 ไอโซเลท ผักแป้นดอง 10 ไอโซเลท ผักกุ่มดอง 21 ไอโซเลท ผักกาดดอง 23 ไอโซเลท กระท้อนดอง 18 ไอโซเลท และแหนมเห็ด 9 ไอโซเลท แสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนไอโซเลทแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองแต่ละชนิด

แหล่งคัดแยก	ไอโซเลทแบคทีเรียกรดแลคติก
ผักหอมดอง	9
ผักเสี้ยนดอง	17
ผักแป้นดอง	10
ผักกุ่มดอง	21
ผักกาดดอง	23
กระท้อนดอง	18
แหนมเห็ด	9
รวมไอโซเลท	**107**

เพื่อความสะดวกในการศึกษาต่อไป จึงกำหนดหมายเลขไอโซเลทของแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทที่คัดแยกได้จากแหล่งคัดแยกอาหารหมักดองชนิดต่างๆ ดังนี้ แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักหอมดองมี 9 ไอโซเลท กำหนดหมายเลขเป็น O3A, O3B, O3C, O4A, O5A, O5B, O7A, O10A และ O10B

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักเสี้ยนดองมี 17 ไอโซเลท กำหนดหมายเลขเป็น S1A, S2A, S3A, S4B, S5A, S6A, S6B, S6C, S6D, S7A,S7B, S7C, S8A, S9A, S9B, S9C และ S10A

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักแป้นดองมี 10 ไอโซเลท กำหนดหมายเลขเป็น G1A, G2A, G2B, G7A, G7B, G8A, G8B, G9A, G10A และ G10B

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักกุ่มดองมี 21 ไอโซเลท กำหนดหมายเลขเป็น V1A, V2A, V2B, V4A, V4B, V5A, V5B, V6A, V7A, V7B, V7C, V8A, V8B, V8C, V8D, V9A, V9B, V9C, V10A, V10B และ V10C

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักกาดดองมี 23 ไอโซเลท กำหนดหมายเลขเป็น C1A, C1B, C3A, C3B, C4A, C4B, C4C, C5A, C5B, C5C, C5D, C5E, C6A, C6B, C7A, C7B, C7C, C7D, C7E, C8A, C9A, C9B และ C10A

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระท้อนดองมี 18 ไอโซเลท กำหนดหมายเลขเป็น R1A, R1B, R2A, R2B, R3A, R3B, R4A, R4B, R5A, R5B, R6A, R6B, R7A, R7B, R8A, R8B, R9A และ R9B

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหนมเห็ดมี 9 ไอโซเลท กำหนดหมายเลขเป็น M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A, M8A และ M8B แสดงในตารางภาคผนวกที่ 1

แบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้นมีลักษณะโคโลนีที่ต่างๆ กัน ดังนี้ แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักหอมดองมี 9 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนี ดังนี้ O3A กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส O3B กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก O3C กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร O4A กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร O5A กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก O5B กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร O7A กลมใสมันวาว O10A กลมขนาดเล็ก และ O10B กลมสีเหลืองขุ่น

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักเสี้ยนดองมี 17 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนี ดังนี้ S1A กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก S2A กลมสีเหลืองขุ่นขนาด 2-4 มิลลิเมตร S3A กลมสีขาวขุ่น S3B กลมใสขนาด 5 มิลลิเมตร S5A กลมมันวาว ตรงกลางขุ่นรอบนอกใส S6A กลมสีเหลืองขุ่น ขนาด 2-3 มิลลิเมตร S6B กลมสีขาวขุ่น ขอบนอกใส S6C กลมใส ขนาด 2-5 มิลลิเมตร S6D กลมสีขาวขุ่น S7A กลมมันวาว ตรงกลางขุ่นรอบนอกใส S7B กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก S7C กลมสีขาวขุ่นขนาดเล็ก S8A กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร S9A กลมสีขาวขุ่น มีโซนใส S9B กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส S9C กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก และ S10A กลมใส ขนาดเล็ก

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักแป้นดองมี 10 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนี ดังนี้ G1A กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก G2A กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก 2-4 มิลลิเมตร G2B กลมสีขาวขุ่น G7A กลมใสขนาด 5 มิลลิเมตร G7B กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส G8A กลมสีเหลืองขุ่น ขนาด 2-3 มิลลิเมตร G8B กลมสีขาวขุ่น ขอบนอกใส G9A กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร G10A กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก และ G10B กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักกุ่มดองมี 21 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนี ดังนี้ V1A กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส V2A กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก V2B กลมสีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร V4A กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร V4B กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก V5A กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร รอบนอกใส V5B กลมใส มันวาว V6A กลมมีขนาดเล็ก V7A กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส V7B กลมสีเหลืองขุ่น V7C กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร V8A กลม สีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก V8B กลมสีเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร V8C กลม สีขาวขุ่น V8D กลมใส ขนาด 5 มิลลิเมตร V9A กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร V9B กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร V9C กลม สีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก V10A กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร รอบนอกใส V10B กลมใสมันวาว และ V10C กลม สีเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักกาดดองมี 23 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนี ดังนี้ C1A กลมมันวาว ตรงกลางขุ่นรอบนอกใส C1B กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก C3A กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก C3B กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร C4A กลมสีขาวขุ่น C4B กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส C4C กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก C5A กลมใส ขนาดเล็ก C5B กลม ขนาดเล็ก C5C กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส C5D กลม สีเหลืองขุ่น C5E กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร C6A กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก C6B กลม สีเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร C7A กลม สีขาวขุ่น C7B กลมใส ขนาด 5 มิลลิเมตร C7C กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส C7D กลม สีขาวขุ่น C7E กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร C8A กลม ขนาด 2-4 มิลลิเมตร C9A กลมใส ขนาด 2-4 มิลลิเมตร C9B กลม สีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก และ C10A กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากกระท้อนดองมี 18 ไอโซเลท ลักษณะโคโลนี ดังนี้ R1A กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร R1B กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร R2A กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก R2B กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร รอบนอกใส R3A กลมใส มันวาว R3B กลมีเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร R4A กลม มันวาว ตรกลางขุ่น รอบนอกใส R4B กลม สีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก R5A กลม สีขาวขุ่น ขนาดเล็ก R5B กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร R6A กลม สีขาวขุ่น R6B กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส R7A กลม สีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก R7B กลมใส ขนาดเล็ก R8A กลม ขนาดเล็ก R8B กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส R9A กลม สีเหลืองขุ่น และ R9B กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร

แบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหนมเห็ดมี 9 ไอโซเลท มีลักษณะโคโลนี ดังนี้ M1A กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส M2A กลม มีขนาดเล็ก M4A กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส M5A กลม สีเหลืองขุ่น M6A กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร M6B กลม สีเหลืองชุ่น ชนาดเล็ก M7A กลม สีเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร M8A กลม สีขาวขุ่น และ M8B กลม ใส ขนาด 5 มิลลิเมตร

4.1.2 การบ่งชี้แบคทีเรียกรดแลคติกเบื้องต้น

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถคัดแยกได้ ทั้งหมด 107 ไอโซเลท จากตัวอย่างอาหารทั้งหมด 8 ชนิด โดยใช้ Bromocresol purple เป็นตัวบ่งชี้การสร้างกรดของแบคทีเรียที่นำมาขีดลากบนอาหาร MRS จากการคัดแยกเบื้องต้นนี้ จากนั้นทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) และออกซิเดส (Oxidase test) เพื่อการทดสอบให้แน่ชัดว่า แบคทีเรียที่คัดแยกได้นั้น มีคุณสมบัติการเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งคะตะเลสเป็นเอนไซม์ที่สร้างขึ้นมาเพื่อการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide; H_2O_2) (Harvey *et. al*., 2007) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไปไม่พบกิจกรรมคะตะเลส กล่าวคือให้ผลการทดสอบคะตะเลสเป็นลบ (Negative test) และแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่มีกิจกรรมไซโตโครม ซี ออกซิเดส (Cytochrom C oxidase) ด้วย ซึ่งหากการทดสอบเป็นผลลบแสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้น ไม่สามารถใช้ออกซิเจนในการสร้างพลังงาน ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงการถ่ายทอดอิเลคตรอน (Electron transport chain) หรืออาจใช้ไซโตโครมชนิดอื่นในการถ่ายทอดอิเลคตรอน ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่จะให้ผลการทดสอบคะตะเลส และออกซิเดสเป็นลบ

จากผลการทดสอบพบว่า จากตัวอย่างแบคทีเรียที่คัดแยกจากอาหาร ทั้งหมด 107 ไอโซเลท มีเพียง 34 ไอโซเลท ที่ไม่พบกิจกรรมคะตะเลส และออกซิเดส ได้แก่ O3B, O7A, O10A, S3A, S7A, S7B, S9B, G2B, G7A, G7B, G8B, V2A, V5A, V6A, V7C, V9A, V10A, C1B, C3B, C5A, C6A, R2A, R2B, R7A, R8A, M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A, M8A และ M8B ดังตารางภาคผนวกที่ 2

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยพิจารณาเพียงการเกิดโซนใสอาจไม่พอสำหรับการบ่งชี้ได้อย่างแน่ชัดว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้นอีกขั้นตอนเพื่อความแน่ชัดว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียกรดแลคติก โดยการทดสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และออกซิเดส

4.2 คุณสมบัติแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร

จุลินทรีย์ที่ก่อโรคในระบบทางเดินอาหารที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR780, *Salmonella typhimurium* TISTR292 และ *Strephylococcuss aureus* TISTR1466 โดยจากการทดสอบคุณสมบัติแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทั้ง *E. coli*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* ได้ ด้วยการแสดงการเกิดโซนใส (Clear zone) เส้นผ่าศูนย์กลางขนาดต่างกัน (ตารางที่ 4.2) และจะเห็นว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกS3A S7A G7A G7B G8B V5A V7C V9A และ C5A ที่ไม่พบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก O3B, O7A และ O10A ที่คัดแยกได้จากผักหอมดอง ในการยับยั้งการเจริญเติบโต *E. coli* พบว่า มีเพียง O7A ที่ยับยั้งการเจริญ *E. coli* ได้ แสดงการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.2 เซนติเมตร ส่วนความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* พบว่า O3B และ O10A แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส 2.3 และ 2.6 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่การยับยั้งการเจริญของ *S. typhimurium* พบว่าไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักหอมดองในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก S3A, S7A, S7B และ S9B ที่คัดแยกได้จากผักเสี้ยนดอง ในการยับยั้งการเจริญเติบโต *E. coli* พบว่า มีเพียง S9B ที่แสดงความสามารถในการยับยั้งด้วยการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.8 เซนติเมตร ส่วนการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* พบว่า S7B และ S9B สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญได้ โดยแสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส 2.1 และ 1.4 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักเสี้ยนดองในที่นี้ ไม่พบความการยับยั้งการเจริญของ *S. typhimurium*

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก G2B, G7A, G7B และ G9B ที่คัดแยกได้จากผักแป้นดอง ในการยับยั้งการเจริญเติบโต *E. coli* พบว่า ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักแป้นดอง ที่สามารถยับยั้งการเจริญ *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้ และมีเพียง G2B ที่สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ โดยแสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส 2.7 เซนติเมตร

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก V2A, V5A, V6A, V7C, V9A และ V10A ที่คัดแยกได้จากผักกุ่มดอง ในการยับยั้งการเจริญเติบโต *E. coli* พบว่า V2A, V6A และ S10A สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญ ด้วยการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.1 7.0 และ 7.0 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. typhimurium* พบว่า V2A สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญได้ด้วย

การแสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส 2.8 เซนติเมตร แต่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกุ่มดองในที่นี้ ไม่พบความการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก C1B, C3B, C5A และ C6A ที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง ในการยับยั้งการเจริญเติบโต *E. coli* พบว่า C1B, C3B และ C6A สามารถแสดงความสามารถในการยับยั้ง ด้วยการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 7.1 6.6 และ 6.2 เซนติเมตร ตามลำดับ แต่ไม่พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกาดดองที่แสดงการยับยั้งการเจริญของ *S. typhimurium* และ *S. aureus* ได้

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก R2A, R2B, R7A และ R8A ที่คัดแยกได้จากกระท้อนดอง ในการยับยั้งการเจริญเติบโต *E. coli* พบว่า R2A, R2B, R7A และ R8A สามารถแสดงความสามารถในการยับยั้ง ด้วยการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.9 2.3 6.4 และ 6.7 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* พบว่า R2A, R2B และ R8A สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญได้ ด้วยการแสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส 2.7 2.0 และ 2.6 เซนติเมตร ตามลำดับ และการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. typhimurium* พบว่า มีเพียง R2A ที่แสดงการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.1 เซนติเมตร

การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A และ M8A ที่คัดแยกได้จากแหนมเห็ด ในการยับยั้งการเจริญเติบโต *E. coli* พบว่า M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A และ M8A สามารถแสดงความสามารถในการยับยั้ง ด้วยการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.4 6.3 6.7 7.1 6.7 7.5 6.9 และ 7.0 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* พบว่า มีเพียง M6A สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญได้ ด้วยการแสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส 2.2 เซนติเมตร แต่ไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแหนมเห็ด ที่แสดงการยับยั้งการเจริญของ *S. typhimurium* ได้

จากผลการทดลองจะเห็นว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก O7A, S9B, V2A, V6A, S10A, C1B, C3B, C6A, R2A, R2B, R7A, R8A, M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A, M8A และ M8B สามารถยับยั้งการเจริญ *E. coli* ได้ โดยแสดงการเกิดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสใกล้เคียงกัน ในช่วง 6.1 ถึง 7.5 เซนติเมตร มีเพียง R2B ที่แสดงการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยที่สุด (2.3 เซนติเมตร) ในการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* จะเห็นว่า แบคทีเรียกรดแลคติก O3B, O10A, S7B, S9B, G2B, R2A และ M6A ที่สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญได้ โดยแสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสในช่วง 2.1 ถึง 2.7 เซนติเมตร แต่ S9B แสดงการเกิดโซนใสน้อยที่สุด (1.4 เซนติเมตร) และสำหรับการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *S. typhimurium* พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก V2G, R2A, R2B และ R8A เพียง 4 ไอโซเลท

ที่สามารถยับยั้งการเจริญได้ โดยแสดงการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2.0 ถึง 2.8 เซนติเมตร จากการผลการทดสอบจะเห็นว่า M6B แสดงการเกิดโซนใสในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ได้สูงสุดคือ 7.5 เซนติเมตร แต่ไม่แสดงการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคอีก 2 ชนิด ขณะที่ G2B มีการเกิดโซนใสยับยั้งการเจริญ *S. aureus* สูงสุดคือ 2.7 เซนติเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคอีก 2 ชนิดได้ ส่วน V2B มีการเกิดโซนใสกับ *S. typhimurium* ได้สูงสุดคือ 2.8 เซนติเมตร แต่ไม่สามารถยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคที่นำมาทดสอบอีก 2 ชนิดได้

นอกจากนี้มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ได้แก่ S9B โดยมีการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.8 และ 1.4 เซนติเมตร ตามลำดับ และ M6A เกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.7 และ 2.2 เซนติเมตร ตามลำดับ ขณะที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญ *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้แก่ V2A เกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.1 และ 2.8 เซนติเมตร ตามลำดับ R2A มีการเกิดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส 6.9 และ 2.7 เซนติเมตร ตามลำดับ R2B เกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.3 และ 2.0 เซนติเมตร ตามลำดับ และ R8A เกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.7 และ 2.6 เซนติเมตร ตามลำดับ

มีเพียงแบคทีเรียกรดแลคติก R2A ที่สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 3 ชนิดที่ทดสอบได้ โดยการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.9 2.7 และ 2.1 เซนติเมตร กับจุลินทรีย์ทดสอบ *E. coli*, *S. aureus* และ *S. typhimurium* ตามลำดับ

จากผลการศึกษาสุพรรณิการ์ (2555) โดยใช้วิธี Well diffusion พบว่าสารที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ผักหอมดอง มะยมดอง มะม่วงดอง หน่อไม้ดอง กระท้อนดอง สามารถ สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญเติบโต *S. aureus* ได้มากที่สุด แบคทีเรียกรดแลคติก D1 และ D2 ซึ่งคัดแยกได้จากผักหอมดอง โดยแสดงการเกิดโซนใส 2.1 และ 2.2 เซนติเมตร ตามลำดับ และสารที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก F1 ซึ่งคัดแยกได้จากมะม่วงดอง สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญเติบโต *E. coli* ได้มากที่สุด โดยแสดงการเกิดโซนใส 2 เซนติเมตร โดยจากผลการศึกษาพบว่าสารที่ผลิตได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถยับยั้งการเจริญ *S. aureus* ได้มากกว่า *E. coli*

ซึ่งจะเห็นว่าถึงแม้สารที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดเดียวกัน แต่การยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียก่อโรคได้ต่างชนิดกัน เช่นเดียวกับการทดสอบและรายงานผลของ Mallesha *et. al.* (2010) พบว่าสารที่ผลิตจาก *Lactobacillus fermentum* สามารถยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบได้ โดยมีแบคทีเรียทดสอบแกรมบวกได้แก่ *Bacillus cereus*, *Strephylococcus aureus* และ *Streptococcus* sp. ซึ่งพบการเกิดโซนยับยั้ง 15 13 และ 13 มิลลิเมตร ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียทดสอบแกรมลบที่

ทดสอบได้แก่ *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumonia* และ *Pseudomonas aeruginosa* ซึ่งพบการเกิดโซนยับยั้ง 13 11 และ 10 มิลลิเมตร ตามลำดับ จะเห็นว่าการยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียก่อโรคได้ต่างชนิดกัน โดยส่วนใหญ่สารที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ อาจเนื่องจากโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์แบคทีเรียแกรมลบมีชั้นไขมันห่อหุ้มชั้นเพปทิโดไกลแคล (Peptidoglycan) (Mallesha *et. al*.,2010)

สารที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นอาจมีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียที่อยู่ในกลุ่มจีนัสเดียวกันได้หรืออาจมีผลต่ออย่างเช่น รายงานผลการศึกษาของ Mourad *et. al*. (2004) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากการหมักมะกอกเขียว (Green olive) ได้แก่ *Lactococcus lactis* 14 ไอโซเลท *Lactobacillus plantarum* 11 ไอโซเลท *Enterococcus* sp. 7 ไอโซเลท โดย 18 ไอโซเลท ที่คัดแยกได้ สามารถยับยั้งการเจริญเชื้ออื่น และสารละลาย (Supernatant free cell) ที่ได้จาก *Lactobacillus plantarum* สามารถต่อต้านพวกแบคทีเรียแกรมบวก ได้แก่ *Lactobacillus*, *Enterococcus* และ *Propionibacterium* และยังต่อต้านแบคทีเรียแกรมลบ *Erwinia* ที่เป็นสาเหตุการเน่าเสียได้ด้วย

จากการศึกษาและรายงานของ ภักดี (2548) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์บางชนิดได้ และเมื่อทดสอบกับจุลินทรีย์บางชนิดไม่พบการยับยั้งการเจริญเติบโต โดยพบการยับยั้งการเจริญเติบโต *Listeria monocytogenes* ด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกมา 15 โคโลนี จากจุลินทรีย์ที่เจริญบนอาหารทั้งหมด 1020 โคโลนี คิดเป็น 1.47 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่ไม่พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกมานั้น สามารถยับยั้งการเจริญเติบโต *Salmonella typhimurium*, *E. coli, P. aeroginosa* และ *B. cereus*

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในที่นี้ สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น ได้แก่ กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และแบคเทอริโอซิน ซึ่งสารเหล่านี้ล้วนสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ (Remiger *et. al*., 1999)

ตารางที่ 4.2 การทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร

แบคทีเรียกรดแลคติก	เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร) ของการยับยั้งจุลินทรีย์		
	Escherichia coli	*Salmonella typhimurium*	*Strephylococcus aureus*
O3B	-	-	2.3
O7A	3.1	-	-
O10A	-	-	2.6
S3A	-	-	-
S7A	-	-	-
S7B	-	-	2.1
S9B	3.4	-	1.4
G2B	-	-	2.7
G7A	-	-	-
G7B	-	-	-
G8B	-	-	-
V2A	3.05	2.8	-
V5A	-	-	-
V6A	3.5	-	-
V7C	-	-	-
V9A	-	-	-
V10A	3.5	-	-
C1B	3.5	-	-
C3B	3.3	-	-
C5A	-	-	-
C6A	3.1	-	-
R2A	3.4	2.7	2.1
R2B	1.2	2.0	-
R7A	3.2	-	-
R8A	3.3	2.6	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ – หมายถึงไม่พบการเกิดโซนใสในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบนั้นๆ

ตารางที่ 4.2 การทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติก	เส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส (เซนติเมตร) ในการยับยั้งจุลินทรีย์ทดสอบ		
	Escherichia coli	*Salmonella typhimurium*	*Strephylococcus aureus*
M1A	3.2	-	-
M2A	3.1	-	-
M4A	3.3	-	-
M5A	3.5	-	-
M6A	3.3	-	2.2
M6B	3.7	-	-
M7A	3.4	-	-
M8A	3.5	-	-
M8B	3.7	-	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ – หมายถึงไม่พบการเกิดโซนใสในการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคที่ทดสอบนั้นๆ

ผลการทดสอบที่แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองนั้น สามารถยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคได้ต่างกัน เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด (O7A, S9B, V2A, V6A, S10A, C1B, C3B, C6A, R2A, R2B, R7A, R8A, M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A และ M8A) ยับยั้งได้เพียง *E. coli* แต่ไม่แสดงผลต่อแบคทีเรียก่อโรคที่ทดสอบอีก 2 ชนิด แต่แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ได้ และจากผลการทดสอบยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก R2A เพียงชนิดเดียวจาก 34 ไอโซเลท ที่สามารถแสดงการยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารทั้ง 3 ชนิดได้ ทั้งนี้อาจเนื่องจากสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตออกมามีคุณสมบัติต่างกันและคุณสมบัติของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ในสิ่งแวดล้อมนั้น ต่อการรับผลกระทบจากสารได้ต่างกัน

4.3 การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ในสภาวะกรดไฮโดรคลอริก สารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี

คุณสมบัติสำคัญของโปรไบโอติก จำเป็นต้องอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารที่ประกอบด้วยสารละลาย และเอนไซม์ที่มีผลต่อการทำลายจุลินทรีย์ได้ โดยสารละลายในระบบทางเดินอาหารที่สำคัญได้แก่ สภาวะที่มีกรดไฮโดรคลอริก น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร เกลือน้ำดี โดยการทดสอบการอยู่รอดในสภาวะสมมติสารในระบบทางเดินอาหารพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้ สามารถอยู่รอดได้ดี (ตารางที่ 4.3)

จากการทดสอบในสภาวะที่มีกรดไฮโดรคลอริก พีเอช 2.5 พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก O3B, O7A และ O10A ที่คัดแยกได้จากผักหอมดอง มีการอยู่รอด 89 99 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก S3A, S7A, S7B และ S9B ที่คัดแยกได้จากผักเสี้ยนดอง มีการอยู่รอด 87 74 92 และ 77 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก G2B, G7A, G7B และ G9B ที่คัดแยกได้จากผักแป้นดอง มีการอยู่รอด 77 91 89 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก V2A, V5A, V6A, V7C, V9A และ V10A ที่คัดแยกได้จากผักกุ่มดอง มีการอยู่รอด 69 87 88 68 67 และ 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก C1B, C3B, C5A และ C6A ที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง มีการอยู่รอด 60 89 87 และ 60 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก R2A, R2B, R7A และ R8A ที่คัดแยกได้จากกระท้อนดอง มีการอยู่รอด 76 87 98 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแบคทีเรียกรดแลคติก M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A และ M8A มีการอยู่รอด 99 63 88 67 65 72 64 42 และ 65 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบการอยู่รอดในสารละลายในกระเพาะอาหาร พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก O3B, O7A และ O10A ที่คัดแยกได้จากผักหอมดอง มีการอยู่รอด 89 99 และ 90 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก S3A, S7A, S7B และ S9B ที่คัดแยกได้จากผักเสี้ยนดอง มีการอยู่รอด 84 82 72 และ 69 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก G2B, G7A, G7B และ G9B ที่คัดแยกได้จากผักแป้นดอง มีการอยู่รอด 88 88 96 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก V2A, V5A, V6A, V7C, V9A และ V10A ที่คัดแยกได้จากผักกุ่มดอง มีการอยู่รอด 73 92 72 80 85 และ 71 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก C1B, C3B, C5A และ C6A ที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง มีการอยู่รอด 62 96 80 และ 97 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก R2A, R2B, R7A และ R8A ที่คัดแยกได้จากกระท้อนดอง มีการอยู่รอด 81 95 94 และ 91 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแบคทีเรียกรดแลคติก M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A และ M8A มีการอยู่รอด 80 81 78 78 86 84 89 83 และ 59 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

สำหรับการทดสอบการอยู่รอดในเกลือน้ำดี (Bile salt) โดยการบ่มแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS broth ที่มีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก O3B, O7A และ O10A ที่คัดแยกได้จากผักหอมดอง มีการอยู่รอด 65 66 และ 73 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก S3A, S7A, S7B และ S9B ที่คัดแยกได้จากผักเสี้ยนดอง มีการอยู่รอด 92 87 77 และ 89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก G2B, G7A, G7B และ G9B ที่คัดแยกได้จากผักแป้นดอง มีการอยู่รอด 93 83 96 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก V2A, V5A, V6A, V7C, V9A และ V10A ที่คัดแยกได้จากผักกุ่มดอง มีการอยู่รอด 73 95 89 95 86 และ 87 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก C1B, C3B, C5A และ C6A ที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง มีการอยู่รอด 99 96 95และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตาสำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก R2A, R2B, R7A และ R8A ที่คัดแยกได้จากกระท้อนดอง มีการอยู่รอด 99 98 96 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และแบคทีเรียกรดแลคติก M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A และ M8A มีการอยู่รอด 95 89 96 98 88 99 85 97 และ 94 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

จากผลการทดสอบจะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถอยู่รอดได้ในสภาวะทดสอบ รวมถึงแบคทีเรียกรดแลคติก R2A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารทั้ง 3 ชนิด มีความสามารถอยู่รอดได้ดีในสภาวะทดสอบด้วยเช่นกัน

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในสภาวะที่มีกรดไฮโดรคลอริก สารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การอยู่รอด (%)		
	กรดไฮโดรคลอริก	สารละลายในกระเพาะอาหาร	เกลือน้ำดี
O3B	89	83	65
O7A	99	74	66
O10A	90	73	73
S3A	87	84	92
S7A	74	82	87
S7B	92	72	77
S9B	77	69	89
G2B	77	88	93
G7A	91	88	83
G7B	89	96	96
G8B	73	82	86
V2A	69	73	73
V5A	87	92	95
V6A	88	72	89
V7C	68	80	95
V9A	67	85	86
V10A	87	71	87
C1B	60	62	99
C3B	89	96	96
C5A	87	80	95
C6A	60	97	92
R2A	76	81	99
R2B	87	95	96
R7A	98	94	98
R8A	99	81	92

ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในสภาวะที่มีกรดไฮโดรคลอริก น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี (ต่อ)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้	การอยู่รอด (%)		
	กรดไฮโดรคลอริก	น้ำย่อยกระเพาะอาหาร	เกลือน้ำดี
M1A	99	80	95
M2A	63	81	89
M4A	88	78	96
M5A	67	78	98
M6A	65	86	88
M6B	72	84	99
M7A	64	89	85
M8A	42	83	97
M8B	65	59	94

จากผลการศึกษาพบว่า ไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกได้มานั้น สามารถอยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติกที่อยู่รอดได้ในระบบทางเดินอาหารน่าจะมีคุณสมบัติในการอยู่รอดและเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกในระบบทางเดินอาหารได้ด้วย

4.4 การบ่งชี้สกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

การบ่งชี้สกุล (Genus) ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยการทดสอบทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมี (Morphological and biochemical test) ได้แก่ ศึกษารูปร่างเซลล์ ใช้การย้อมติดสีแกรมของเซลล์ ศึกษารูปร่างเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การทดสอบทางชีวเคมี ได้แก่การสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test) เอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test) การเจริญได้ในสภาวะมีเกลือความเข้มข้น 4 6 และ 18 เปอร์เซ็นต์ การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส และการหมักกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ โดยการสังเกตการเกิดฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ และสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารจากแดงเป็นเหลือง ซึ่งแสดงถึงการสร้างกรด โดยทั่วไปการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก ใช้การทดสอบทางสัณฐาน การหมักกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ โครงสร้างกรดแลคติกที่สร้างได้ การเจริญได้ในเกลือความเข้มข้นต่างๆ และความทนต่อสภาวะด่าง หรือกรด (Phumkhachorn *et. al.*, 2010)

การทดสอบทางสัณฐาน และทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละตัวอย่างพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแหนมเห็ด A1 A2 และ A3 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* spp. *Lactobacillus* และ *Lueconostoc* แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง B1 และ B3 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus* และ B2 เป็นแบคทีเรียสกุล *Lactobacilus* แบคทีเรียกรดแลคติก C1 และ C2 ที่คัดแยกได้จากผักเสี้ยนดองเป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากผักหอมดอง D1 D2 และ D3 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus*, *Lactococcus* และ *Lueconostoc* ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากมะยมดอง E1 E2 และ E3 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lueconostoc*, *Streptococcus* และ *Lactococcus* ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากมะม่วงดอง F1 F2 และ F3 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactococcus*, *Lueconostoc* และ *Streptococcus* ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากหน่อไม้ดอง G1 G2 และ G3 เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุล *Lactobacillus*, *Lactococcus* และ *Lueconostoc* ตามลำดับ และแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากกระท้อนดอง H1 และ H2 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus* และ *Streptococcus* ตามลำดับ (ตารางที่ 4.4)

ตารางที่ 4.4 การทดสอบทางสัณฐาน ชีวเคมี และการบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

Iso	GM/ Mor	CAT	OXI	Glu	Lac	Mel	Raf	O/F	Temp (°C)		NaCl (%)			NH_4 -Arg	Organism Identified
									37	45	4	8	10		
O3B	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	-	+	*Streptococcus* sp.
O7A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	-	+	*Streptococcus* sp.
O10A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Pediococcus* sp.
S3A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactococcus lactis*
S7A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	-	+	*Streptococcus* sp.
S7B	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	-	+	*Streptococcus* sp.
S9B	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactococcus lactis*
G2B	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactococcus lactis*
G7A	+R	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactobacillus* sp.
G7B	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactococcus lactis*
G8B	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	+	+	*Streptococcus* sp.
V2A	+R	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	-	+	*Lactobacillus* sp.

คำย่อ และสัญลักษณ์ : Iso (Isolate); GM (Gram stain)/ Mor (Morphology) สัญลักษณ์ + ติดสีแกรมบวก – ติดสีแกรมลบ R (Rod) รูปร่างแท่ง C (Cocci) รูปร่างกลม; CAT (Catalase test) สัญลักษณ์ + สร้างคะตะเลส – ไม่พบการสร้างคะตะเลส; OXI (Oxidase test) สัญลักษณ์ + สร้างออกซิเดส – ไม่พบการสร้างออกซิเดส; Glu (Glucose fermentation) สัญลักษณ์ A/G (Acid and gas production) จากการหมักกลูโคส A มีการสร้างกรด G มีการสร้างก๊าซ; Lac (Lactose utilization); Mel (Mellibiose utilization); Raf (Raffinose utilization) สัญลักษณ์ A มีการสร้างกรด; O/F (Oxidative fermentation test) สัญลักษณ์ O = Oxidation F = Fermentation; Temp (การเจริญที่อุณหภูมิ); NaCl (การเจริญในเกลือ) สัญลักษณ์ + เจริญได้ – ไม่พบการเจริญ; NH_4-Arg (Ammonia from arginine) สัญลักษณ์ + สร้างแอมโมเนีย – ไม่พบการสร้างแอมโมเนีย

ตารางที่ 4.4 การทดสอบทางสัณฐาน ชีวเคมี และการบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

Iso	GM/Mor	CAT	OXI	Glu	Lac	Mel	Raf	O/F	Temp (°C)		NaCl (%)			NH_4-Arg	Organism Identified
									37	45	4	8	10		
V5A	+R	-	-	A/G	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactobacillus fermentum*
V6A	+R	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	-	+	*Lactobacillus* sp.
V7C	+R	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	+	+	*Lactobacillus* sp.
V9A	+R	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactobacillus* sp.
V10A	+C	-	-	A/G	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Weissella* sp.
C1B	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Pediococcus* sp.
C3B	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Pediococcus* sp.
C5A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	-	+	*Lactococcus lactis*
C6A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Pediococcus* sp.
R2A	+R	-	-	A/G	A	A	A	F	+	-	+	+	+	+	*Lactobacillus* sp.
R2B	+R	-	-	A	A	A	A	F	+	-	+	+	+	+	*Lactobacillus* sp.

คำย่อ และสัญลักษณ์ : Iso (Isolate); GM (Gram stain)/ Mor (Morphology) สัญลักษณ์ + ติดสีแกรมบวก – ติดสีแกรมลบ R (Rod) รูปร่างแท่ง Coc (Cocci) รูปร่างกลม; CAT (Catalase test) สัญลักษณ์ + สร้างคะตะเลส – ไม่พบการสร้างคะตะเลส; OXI (Oxidase test) สัญลักษณ์ + สร้างออกซิเดส – ไม่พบการสร้างออกซิเดส; Glu (Glucose fermentation) สัญลักษณ์ A/G (Acid and gas production) จากการหมักกลูโคส A มีการสร้างกรด G มีการสร้างก๊าซ; Lac (Lactose utilization); Mel (Mellibiose utilization); Raf (Raffinose utilization) สัญลักษณ์ A มีการสร้างกรด; O/F (Oxidative fermentation test) สัญลักษณ์ O = Oxidation F = Fermentation; Temp (การเจริญที่อุณหภูมิ); NaCl (การเจริญในเกลือ) สัญลักษณ์ + เจริญได้ – ไม่พบการเจริญ; NH_4-Arg (Ammonia from arginine) สัญลักษณ์ + สร้างแอมโมเนีย – ไม่พบการสร้างแอมโมเนีย

ตารางที่ 4.4 การทดสอบทางสัณฐาน ชีวเคมี และการบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

Iso	GM/Mor	CAT	OXI	Glu	Lac	Mel	Raf	O/F	Temp (°C)		NaCl (%)			NH_4-Arg	Organism Identified
									37	45	4	8	10		
R7A	+R	-	-	A/G	A	A	A	F	+	-	+	+	+	+	*Lactobacillus* sp.
R8A	+R	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Lactobacillus* sp.
M1A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Pediococcus* sp.
M2A	+R	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactobacillus* sp.
M4A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactococcus lactis*
M5A	+C	-	-	A/G	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Weissella* sp.
M6A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Pediococcus* sp.
M6B	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Pediococcus* sp.
M7A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	-	+	*Lactococcus lactis*
M8A	+C	-	-	A	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Pediococcus* sp.
M8B	+C	-	-	A/G	A	A	A	F	+	+	+	+	+	+	*Weissela soli*

คำย่อ และสัญลักษณ์ : Iso (Isolate); GM (Gram stain)/ Mor (Morphology) สัญลักษณ์ + ติดสีแกรมบวก – ติดสีแกรมลบ R (Rod) รูปร่างแท่ง Coc (Cocci) รูปร่างกลม; CAT (Catalase test) สัญลักษณ์ + สร้างคะตะเลส – ไม่พบการสร้างคะตะเลส; OXI (Oxidase test) สัญลักษณ์ + สร้างออกซิเดส – ไม่พบการสร้างออกซิเดส; Glu (Glucose fermentation) สัญลักษณ์ A/G (Acid and gas production) จากการหมักกลูโคส A มีการสร้างกรด G มีการสร้างก๊าซ; Lac (Lactose utilization); Mel (Mellibiose utilization); Raf (Raffinose utilization) สัญลักษณ์ A มีการสร้างกรด; O/F (Oxidative fermentation test) สัญลักษณ์ O = Oxidation F = Fermentation; Temp (การเจริญที่อุณหภูมิ); NaCl (การเจริญในเกลือ) สัญลักษณ์ + เจริญได้ – ไม่พบการเจริญ; NH_4-Arg (Ammonia from arginine) สัญลักษณ์ + สร้างแอมโมเนีย – ไม่พบการสร้างแอมโมเนีย

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทุกชนิดไม่สร้างคะตะเลส และออกซิเดส จากผลการทดสอบทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีกับแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกาดดองได้แก่ O3A และ O7A จัดว่าเป็น *Streptococcus* sp. ส่วน O10A จัดว่าเป็น *Pediococcus* sp. โดย O3A และ O7A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 ไม่เจริญใน 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญในที่มีเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ และหมักกลูโคส พบการสร้างกรด ส่วนการหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส พบว่ามีการหมักน้ำตาลทั้งสามชนิดนี้แล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศและไร้ออกซิเจน และมีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ เป็นคุณสมบัติที่ใกล้เคียงกับ *Streptococcus* sp.

ส่วน O10A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส แล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media มีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน และมีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Pediococcus* sp.

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักเสี้ยนดอง ได้แก่ S3A S7A S7B และS9B พบว่า S3A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส แล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน และมีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactococcus lactis*

S7A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการหมักกลูโคสแล้วสร้างกรด สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน และมีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Streptococcus* sp.

S7B มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการหมักกลูโคสแล้วสร้างกรด สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดเช่นกัน การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Streptococcus* sp.

S9B มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการหมักกลูโคสแล้วมีการสร้างกรด สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดเช่นกัน การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactococcus lactis*

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักแป้นดอง ได้แก่ G2B G7A G7B และ G8B โดยพบว่า G2B และ G7B มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ พบการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วมีการสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน และมีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactococcus lactis*

G7A มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน และมีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

G8B เซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่เจริญใน 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 เปอร์เซ็นต์ และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการหมักกลูโคสแล้วสร้างกรด สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน การทดสอบแอมโมเนียจากอาร์จินีน พบว่ามีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Streptococcus* sp.

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกุ่มดอง V2A V5A V6A V7C V9A และ V10A โดยพบว่า V2A มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่เจริญใน 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการหมักกลูโคสแล้วสร้างกรด สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน และมีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

V5A มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการหมักกลูโคสแล้วสร้างกรดและก๊าซ สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน และมีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus fermentum*

V6A มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่พบการเจริญใน 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีหมักกลูโคส พบการสร้างกรด สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

V7C มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่พบการเจริญใน 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส มีการหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน สร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

V9A มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมลบ เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

V10A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดและก๊าซ จากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Weissella* sp.

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง C1B C3B C5A และC6A โดยพบว่า C1B และ C3B มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส มีการหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Pediococcus* sp.

C5A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่พบการเจริญใน 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่าการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactococcus lactis*

C6A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Pediococcus* sp.

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากกระท้อนดอง R2A R2B R7A และ R8A โดยพบว่า R2A มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส แล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacilus* sp.

R2B มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วมีการสร้างกรด การทดสอบด้วย O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

R7A มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดและก๊าซจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

R8A มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ หมักกลูโคส มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วมีการสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแหนมเห็ด M1A M2A M4A M5A M6A M6B M7A M8A และ M8B โดยพบว่า M1A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส แล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Pediococcus* sp.

M2A มีเซลล์แท่ง ติดสีแกรมลบ เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส แล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus* sp.

M4A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมลบ เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส แล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactobacillus lactis*

M5A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดและก๊าซจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส แล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีน ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Weissella* sp.

M6A M6B และ M8A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ สร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Pediococcus* sp.

M7A มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 แต่ไม่เจริญที่ 10 เปอร์เซ็นต์ มีการสร้างกรดจากการหมักกลูโคส สามารถหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส แล้วสร้างกรดได้ การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน มีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Lactococcus lactis*

M8B มีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก เจริญได้ที่ 37 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาวะมีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 และ 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ หมักกลูโคส พบการสร้างกรด และก๊าซ ส่วนการหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนส พบว่าสามารถหมักน้ำตาลทั้งสามชนิด แล้วสร้างกรด การทดสอบใน O/F media พบว่ามีการหมักกลูโคสได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ และไร้ออกซิเจน การทดสอบแอมโมเนียจากอาร์จินีน พบว่ามีการสร้างแอมโมเนียจากอาร์จินีนได้ ซึ่งมีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *Weissella soli*

จากผลการทดลอง จะเห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักดองจากผัก และผลไม้ สามารถพบแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิด โดยแต่ละไอโซเลทถูกจำแนกเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ ดังนี้ S3A G2B G7B M7A เป็น *Lactococcus lactis* โดยทั้ง 4 ไอโซเลท มีลักษณะเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างคะตะเลส หมักกลูโคสแล้วสร้างกรด (Homofermentative) มีการหมักแลคโตส

เมลโลไบโอส และราฟิโนส แล้วสร้างกรดได้ ใช้อาร์จินีนได้ เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ *Lc. lactis* จากการศึกษาของ Chahrour และคณะ (2013)

C5A มีคุณสมบัติเป็น *Lactococcus lactis* ซึ่งมีลักษณะเซลล์กลมติดสีแกรมบวก ไม่พบกิจกรรมคะตะเลส หมักกลูโคสแล้วสร้างกรด (Homofermentative) มีการหมักเมลโลไบโอสแล้วสร้างกรดได้ ใช้อาร์จินีนได้ ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส และเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับรายงานผลของ Kunene และคณะ (2000) พบ *Lc. Lactis* ในการคัดแยกจาก Weaning food อย่างไรก็ตาม *Lc. Lactis* ไม่สร้างกรดจากการหมักแลคโตส แต่หมักเมลิไบโอสได้

V5A เป็น *Lactobacillus fermentum* มีลักษณะเซลล์เป็นแท่ง ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างคะตะเลส หมักกลูโคสแล้วสร้างกรดและก๊าซ (Heterofermentative) เมื่อหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ ใช้อาจินีนได้ เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส ไม่เจริญในเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ *Lb. fermentum* จากการศึกษาของ Patil และคณะ (2010)

M8A เป็น *Weissella soli* มีลักษณะเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างคะตะเลส หมักกลูโคสแล้วสร้างกรดและก๊าซ (Heterofermentative) เมื่อหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ ใช้อาจินีนได้ เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส และเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีคุณสมบัติเช่นเดียวกับ *W. soli* จากการศึกษาของ Chahrour และคณะ (2013)

O10A C1B C3B C6A M1A M6A M6B และ M8A มีลักษณะเซลล์กลมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างคะตะเลส หมักกลูโคสแล้วสร้างกรด (Homofermentative) เมื่อหมักน้ำตาลแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ ใช้อาจินีนได้ เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติบางประการที่พบได้ใน *Pediococcus* sp. จากรายงานผลการศึกษาของ Patral และคณะ (2011) ในการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกพบ *Pediococcus pentosaceus* เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลมติดสีแกรมบวก เจริญได้ใน 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในเกลือ 8 เปอร์เซ็นต์ เป็น Homofermentative lactic acid bacteria มีการสร้างกรดจากการหมักแลคโตสได้ และสามารถหมักราฟิโนส และเมลิไบโอสได้โดยเกิดปฏิกิริยาเล็กน้อย ซึ่งสอดคล้องกับรายงานผลการศึกษาของ Savic และคณะ (2006) ในการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากหัวเชื้อแป้งขนมปัง และการหมักแป้งข้าวสาลี สามารถคัดแยกได้ *Pediococcus pentosaceus*

V2A V6A V5A R2A R7A V7C และ R2B มีลักษณะเซลล์แท่ง ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างคะตะเลส ใช้อาร์จินีนได้ พบการสร้างกรดจากแลคโตส เมลิไบโอส และราฟิโนส ทั้งนี้ V2A V6A ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ V7C และ R2B ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส แต่เจริญในเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยทั้ง 4 ไอโซเลท มีคุณสมบัติเป็น Homofermentative lactic acid bacteria ส่วน R2A

และ R7A ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญในเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ และ V5A เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส ไม่เจริญในเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ทั้ง 3 ไอโซเลท มีคุณสมบัติเป็น Heterofermentative lactic acid bacteria โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างแท่งมักจะอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ซึ่งอาจเป็น Homofermentative หรือ Heterofermentative lactic acid bacteria ก็ได้ โดยกลุ่ม *Lactobacillus* ที่หมักกลูโคสแล้วสร้างเฉพาะกรดแลคติก สามารถใช้อาร์จินีนในการสร้างพลังงาน และมีการสร้างแอมโมเนีย ที่พบในอาหารหมักดองจากพืช เช่น จากรายงานผลการศึกษาของ Chahrour และคณะ (2013) พบ *Lb. manihotivorans* ซึ่งเจริญได้ใน 45 องศาเซลเซียส เกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถสร้างกรดจากการหมักราฟิโนสได้ ส่วน *Lb. pentosus* พบการหมักกลูโคส แล้วสร้างทั้งกรดและก๊าซ ใช้อาร์จินีนได้ เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส และเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่สามารถสร้างกรดจากการหมักราฟิโนสได้

V10A และ M5A เป็น *Weissella* sp. มีลักษณะเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างคะตะเลส หมักกลูโคสแล้วสร้างกรดและก๊าซ (Heterofermentative) เมื่อหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ ใช้อาจินีนได้ เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญในเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ โดยจากรายงานผลการศึกษาของ Patral และคณะ (2011) สามารถคัดแยก *Weissella* sp. จากโยเกิร์ตพื้นเมืองของอินเดีย (ดาฮี; Dahi) ซึ่งมีลักษณะเซลล์กลม สามารถสร้างกรดและก๊าซจากการหมักกลูโคส ใช้อาร์จินีนได้ ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่เกลือ 8 เปอร์เซ็นต์

O3B O7A และ S7A มีลักษณะเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างคะตะเลส หมักกลูโคสแล้วสร้างกรด (Homofermentative) เมื่อหมักแลคโตส เมลโลไบโอส และราฟิโนสแล้วสร้างกรดได้ ใช้อาจินีนได้ เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส และเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีคุณสมบัติกลุ่ม *Streptococcus* sp. จากรายงานการศึกษาของ Patral และคณะ (2011) สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากดาฮี (Dahi) พบ *Streptococcus brevis* ซึ่งมีเซลล์กลม ติดสีแกรมบวก ใช้อาร์จินีนได้แล็กน้อย เจริญได้ที่ 45 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญในเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ หมักกลูโคสแล้วสร้างกรดเท่านั้น และสามารถสร้างกรดจากการหมักแลคโตสได้

แบคทีเรียสกุล *Streptococcus* มีเซลล์รูปกลม ติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่เมื่อหมักกลูโคสจะสร้างกรด และก๊าซ จัดอยู่ในกลุ่ม Heterofermentative lactic acid bacteria แต่ *Streptococcus* บางชนิดสามารถหมักกลูโคสแล้วมีเพียงการสร้างกรดเป็นผลิตภัณฑ์หลัก ไม่พบการสร้างก๊าซ และผลิตภัณฑ์อื่น จัดอยู่ในกลุ่ม Homofermantative lactic acid bacteria (Phumkhachorn *et. al.*, 2010)

ดังนั้นจากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักดองจากผัก ผลไม้ และแหนมเห็ด สามารถคัดแยกและจำแนกเป็นแบคทีเรียกกรดแลคติก ดังนี้ *Lactococcus lactis*, *Pediococcus* sp., *Lactobacillus fermentum, Weisella* sp., *Lactobacillus* sp., *Weisella soli* และ *Streptococcus* sp.

จากรายงานผลการศึกษาของ Chahrour และคณะ (2013) ในการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากข้าวฟ่างอาหารสัตว์ (Sorghum silage) ในฝั่งตะวันตกของประเทศอัลจิเรีย สามารถคัดแยกได้แบคทีเรียกรดแลคติก 27 ไอโซเลท เป็น *Lactobacillus* 44 เปอร์เซ็นต์ *Lactococcus* 14.81 เปอร์เซ็นต์ *Weisswlla* 29.62 เปอร์เซ็นต์ และ *Leuconostoc* 11.11 เปอร์เซ็นต์ โดยจากการจำแนกทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ได้แก่ *Lactobacillus brevis*, *L. pentosus*, *L. manihotivorans*, *L. fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Weissella cibaria*, *W. minor W. soli W. viridescense* และ *Leuconostoc mesenteroides*

Patil และคณะ (2010) รายงานผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากเคิร์ด (Curd) และแตงกวา (*Cucumis sativus*) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์อื่นได้ และจากการศึกษาทางสัณฐานวิทยา และชีวเคมีพบว่า เป็น *Pediococcus acidilactici*, *P. petosaceous*, *Weissella cibaria*, *W. cibaria*, *Lactobacillus fermentum*, *L. plantarum*

จากการศึกษาและรายงานของ Azadnia และ Nazer (2009) พบว่า การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากนมเปรี้ยว 18 ตัวอย่าง ใน 5 จังหวัด ประเทศอิหร่าน พบแบคทีเรียกรดแลคติก 673 ตัวอย่าง แบคทีเรียกรดแลคติก โดยมี 52 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติก (44.44 เปอร์เซ็นต์) เป็น *Lactococcus lactis* 65 ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติก (55.56 เปอร์เซ็นต์) เป็น *Leuconostoc mesenteroides*

รายงานผลการศึกษาของ Mourad *et. al*. (2004) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากการหมักมะกอกเขียว (Green olive) ได้แก่ *Lactococcus lactis* 14 ไอโซเลท *Lactobacillus plantarum* 11 ไอโซเลท *Enterococcus* sp. 7 ไอโซเลท โดย18 ไอโซเลท

จากรายงานผลการทดลองของ Kazemipoor M. (2012) พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก MF6 ที่คัดแยกจากอาหารหมักดองพวกพืช มีคุณสมบัติในการผลิตสารยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อก่อโรคได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติกอื่นๆ ที่คัดแยกได้ โดยพบการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *E. coli* และ *Yersiria enterocolitica* ได้มากที่สุด ซึ่ง MF6 นี้ มีคุณสมบัติย้อมติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน เรียงตัวสายยาว ไม่เจริญที่ 15 และ 45 องศาเซลเซียส หมักกลูโคสแล้วพบการสร้างกรดเท่านั้นไม่สร้างก๊าซ ซึ่งจำแนกเป็น *Lactobacillus animalis*

จากผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในที่นี้สามารถคัดแยกได้ไอโซเลทหมายเลข R2A ที่พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารที่ทดสอบ (*E. coli*, *S. typhimurium* และ *S. aureus*) ได้ โดยจากการจำแนกสายพันธุ์พบว่า R2A มีคุณสมบัติในกลุ่ม *Lactobacillus*

จากการศึกษาของ Guetarni (2012) พบว่า *Lactobacillus* ซึ่งมีการสร้างกรดแลคติก มีผลให้จุลินทรีย์ก่อโรคอย่าง *Helicobacter pylori* ถูกยับยั้งการเจริญได้ *Lactobacillus* บางชนิดอย่างเช่น *L. reuterin* ยังสามารถสร้างรูเทรินที่มีผลต่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในลำไส้ได้ด้วย (Cleusix *et. al.* 2007) ในทำนองเดียวกับรายงานผลการศึกษาของ Yang *et. al.* (2012) พบว่า แบคเทอริโอซินที่ผลิตโดย *Lactobacillus sakei* รวมถึงสารประกอบที่มีคุณสมบัติคล้ายแบคเทริโอซิน สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคได้ *Listeria innocua* รวมถึงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากการคัดแยก 138 ไอโซเลท มี 28 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งการเจริญ *L. innocua* ซึ่งจากการบ่งชี้สายพันธุ์พบว่า 28 สายพันธุ์นี้ ได้แก่ *Enterococcus faecium*, *Streptococcus thermophiles*, *Lactobacillus casei* และ *Lactobacillus sakei* subsp. *sakei* ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติก R2A (*Lactobacillus* sp.) ที่ได้จากการคัดแยกในการศึกษานี้น่าจะสามารถผลิตสารประกอบบางชนิดที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารได้

นอกจากนี้ R2A ยังสามารถอยู่รอดได้ในสภาวะสารละลายในระบบทางเดินอาหารทั้งในสภาวะกรดไฮโดรคลอริก น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี และจากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมียังพบว่ามีความสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ 10 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูง จะเป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ในด้านอาหารหมักดองที่ต้องใช้เกลือในการหมักต่อไป

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

5.1.1 อาหารหมักดองที่ใช้เป็นแหล่งคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ ผักหอมดอง ผักเสี้ยนดอง ผักแป้นดอง ผักกุ่มดอง ผักกาดดอง กระท้อนดอง และแหนมเห็ด โดยคัดแยกมาทั้งหมด 107 ไอโซเลท และเมื่อทดสอบทางชีวเคมีเบื้องต้น โดยทดสอบการสร้างคะตะเลส และออกซิเดส สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 34 ไอโซเลท

5.1.2 ในการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มาศึกษาต่อไป เพื่อให้เกิดความสะดวกจึงกำหนดหมายเลขตัวอย่างแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ จากแหล่งคัดแยกต่างๆ ได้แก่ O3B, O7A และ O10A เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกคัดแยกได้จากผักหอมดอง S3A, S7A, S7B และ S9B เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกคัดแยกได้จากผักเสี้ยนดอง G2B, G7A, G7B และ G8B เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักแป้นดอง V2A, V5A, V6A, V7C, V9A และ V10A เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกุ่มดอง C1B, C3B, C5A และ C6A เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักกาดดอง R2A, R2B, R7A และ R8A เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากกระท้อนดอง และ M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A, M8A และ M8B เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแหนมเห็ด

5.1.3 การทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร ได้แก่ *Escherichia coli* TISTR780, *Salmonella typhimurium* TISTR292 และ *Strephylococcuss aureus* TISTR1466 พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ มียับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค

5.1.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญได้เฉพาะ *E. coli* ได้แก่ O7A, S9B, V2A, V6A, S10A, C1B, C3B, C6A, R2A, R2B, R7A, R8A, M1A, M2A, M4A, M5A, M6A, M6B, M7A M8A และ M8B แสดงการเกิดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสใกล้เคียงกัน ในช่วง 6.1 ถึง 7.5 เซนติเมตร ซึ่ง M6B แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสได้ 7.5 เซนติเมตร มากที่สุดเมื่อเทียบกับจุลินทรีย์อื่นๆ แต่ R2B แสดงการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยที่สุด (2.3 เซนติเมตร)

5.1.3.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญได้เฉพาะ *S. aureus* ได้แก่ O3B, O10A, S7B, S9B, G2B, R2A และ M6A แสดงเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใสในช่วง 2.1 ถึง 2.7 เซนติเมตร โดย G2B มีการเกิดโซนใสเส้นผ่านศูนย์กลาง 2.7 เซนติเมตร ซึ่งมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น และ S9B แสดงการเกิดโซนใสน้อยที่สุด (1.4 เซนติเมตร)

5.1.3.3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญได้เฉพาะ *S. typhimurium* ได้แก่ V2G, R2B และ R8A เกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2.0 ถึง 2.8 เซนติเมตร โดย V2B มีการเกิดโซนใสกับ ได้สูงสุดคือ 2.8 เซนติเมตร

5.1.3.4 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ได้แก่ S9B โดยมีการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.8 และ 1.4 เซนติเมตร ตามลำดับ และ M6A มีการเกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.7 และ 2.2 เซนติเมตร ตามลำดับ

5.1.3.5 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญทั้ง *E. coli* และ *S. typhimurium* ได้แก่ V2A เกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.1 และ 2.8 เซนติเมตร ตามลำดับ R2A มีการเกิดเส้นผ่าศูนย์กลางโซนใส 6.9 และ 2.7 เซนติเมตร ตามลำดับ R2B เกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 2.3 และ 2.0 เซนติเมตร ตามลำดับ และ R8A เกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.7 และ 2.6 เซนติเมตร ตามลำดับ

5.1.3.6 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญได้ทั้ง *E. coli*, *S. typhimurium* และ *S. aureus* ได้แก่ R2A เกิดโซนใสเส้นผ่าศูนย์กลาง 6.9 2.7 และ 2.1 เซนติเมตร

5.1.4 ในการทดสอบการอยู่รอดในสภาวะสารละลายในทางเดินอาหาร ได้แก่ กรดไฮโดรคลอริกสารละลายในกระเพาะอาหาร และเกลือน้ำดี พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่า 50 เปอร์เซ็นต์

5.1.4.1 การทดสอบการอยู่รอดในกรดไฮโดรคลอริก พบว่ามีไอโซเลท O7A O10A S7B G7A R7A R8A M1A มีการอยู่รอดตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป S9B และ M6A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* อยู่รอดได้ 77 และ 72 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ V2A R2B และ R8A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. typhimurium* มีการอยู่รอดได้ 69 87 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน R2A ที่สามารถยับยั้ง *E. coli S. typhimurium* และ *S. aureus* สามารถอยู่รอดได้ 76 เปอร์เซ็นต์

5.1.4.2 การอยู่รอดในสารละลายกระเพาะอาหาร พบว่าไอโซเลท G7B V5A C3B C6A R2B R7A มีการอยู่รอดตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป S9B และ M6A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* อยู่รอดได้ 69 และ 86 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ V2A R2B และ R8A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. typhimurium* อยู่รอดได้ 73 87 และ 99 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน R2A ที่สามารถยับยั้ง *E. coli S. typhimurium* และ *S. aureus* สามารถอยู่รอดได้ 76 เปอร์เซ็นต์

5.1.4.3 การอยู่รอดในเกลือ น้ำดี พบว่าไอโซเลท S3A G2B G7B V5A V7C C1B C3B C5A C6A R2A R2B R7A R8A M1A M4A M5A M6B M8A M8B มีการอยู่รอด ตั้งแต่ 90 เปอร์เซ็นต์ขึ้นไป ขณะที่ S9B และ M6A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* อยู่รอดได้ 89 และ 88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ V2A R2B และ R8A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. typhimurium* อยู่รอดได้ 73 99 และ 92 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วน R2A ที่สามารถยับยั้ง *E. coli S. typhimurium* และ *S. aureus* สามารถอยู่รอดได้ 99 เปอร์เซ็นต์

5.1.5 การทดสอบทางสัณฐาน และชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ มี 7 กลุ่ม/สกุล ได้แก่

5.1.5.1 S3A S9B G2B G7B M7A และ C5A มีคุณสมบัติเป็น *Lactococcus lactis*

5.1.5.2 V5A มีคุณสมบัติเป็น *Lactobacillus fermentum*

5.1.5.3 M8A มีคุณสมบัติเป็น *Weisella soli*

5.1.5.4 O10A C1B C3B C6A M1A M6A M6B และ M8A มีคุณสมบัติเป็น *Pediococcus* sp.

5.1.5.5 V2A V6A V5A R2A R7A R8A V7C และ R2B มีคุณสมบัติเป็น *Lactobacillus* sp.

5.1.5.6 V10A และ M5A มีคุณสมบัติเป็น *Weisella* sp.

5.1.5.7 O3B O7A และ S7A มีคุณสมบัติเป็น *Streptococcus* sp.

5.1.6 แบคทีเรียกรดแลคติก S9B และ M6A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* จำแนกเป็น *Lactococcus lactis* และ *Pediococcus* sp. ตามลำดับ แบคทีเรียกรดแลคติก V2A R2B และ R8A ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. typhimurium* พบการจำแนกได้ว่าอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ส่วน R2A ที่สามารถยับยั้ง *E. coli S. typhimurium* และ *S. aureus* จำแนกได้ว่าอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* sp. เช่นกัน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้นี้ สามรถยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้ ตั้งแต่ 2 ชนิด ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ยังสามารถอยู่รอดในสารละลายทดสอบของระบบทางเดินอาหาร ได้มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นคุณสมบัติของโปรไบโอติกประการหนึ่งในการยับยั้งเชื้อก่อโรคในทางเดินอาหารได้ และยังสามารถอยู่รอดได้ในสารละลายของระบบทางเดินอาหารด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ถ้าหากมีการเพิ่มชนิดแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบ อย่างเช่น *Clostridium* และ *Vibrio* จะเป็นประโยชน์ต่อแนวทางในการประยุกต์ใช้ในด้านอื่นๆ ต่อไป อย่างเช่น การผลิตสารยับยั้งการเจริญจุลินทรีย์ก่อโรคจากแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งมีประโยชน์ในด้านการพัฒนาทางสารกันเสียในอาหาร ซึ่งมีอยู่ในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อคุณภาพของอาหารที่ปลอดภัยจากสารสังเคราะห์ และเพิ่มความเชื่อมั่น ต่อผลิตภัณฑ์อาหารของผู้บริโภคในอนาคต

5.2.2 การทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ อาจเพิ่มชนิดสารละลายทดสอบ อย่างเช่นกรดน้ำดี หรือเพิ่มระยะเวลาในการบ่มทดสอบในสารละลายทดสอบ เพื่อนำมาใช้ทดสอบร่วมกับประโยชน์ในแง่การเป็นโปรไบโอติกต่อไป

5.2.3 ในการบ่งชี้สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ หากมีการทดสอบการเจริญได้ในเกลือความเข้มข้นอื่นๆ เช่น 6.5 และ 15 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบการหมักน้ำตาลชนิดอื่นๆ เช่น น้ำตาลอะราบิโนส จะช่วยให้การบ่งชี้ในระดับชนิด (Species) มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น และควรทดสอบระดับพันธุกรรม (Molecular) เพื่อความถูกต้อง ในการบ่งชี้สายพันธุ์ด้วย

5.2.4 สามารถนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้นี้ มาทดสอบการผลิตสารยับยั้งการเจริญเชื้อก่อโรคได้ อย่างเช่น กรดแลคติก รูเทริน และแบคเทอริโอซิน เพื่อการนำมาเป็นประโยชน์ร่วมกับผลิตภัณฑ์อาหาร นอกจากนี้ ยังสามารถนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ มาทดสอบการผลิตกรดแลคติก เพื่อประโยชน์ในแง่การใช้ประโยชน์จากกรดแลคติกต่อไปได้ด้วย

ภาคผนวก

1. อาหารคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

อาหาร MRS agar (% (w/v) ประกอบด้วย

เพปโตน (Peptone)	1.0
Meat extract	0.8
Yeast extract	0.4
Glucose	2.0
Sodium acetate trihydrate	0.5
Polysorbate 80 (หรือTween 80)	0.1
Dipotassium hydrogen phosphate	0.2
Triammonium citrate	0.2
Magnesium sulfate heptahydrate	0.02
Manganese sulfate tetrahydrate	0.005
วุ้น (Agar)	1.0
Bromocresal purple	0.004

เมื่อผสมแต่ละส่วนประกอบในน้ำกลั่นแล้ว นึ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

กรณี MRS (Himedia) ชั่งมา 67.15 กรัม ในน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตร ละลายส่วนประกอบ แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่สภาวะเดียวกัน

Bromocresal purple เป็นสารทำหน้าที่บ่งชี้ (Indicator) แบคทีเรียกรดแลคติก แต่อาหาร MRS ที่ไม่ได้ใช้ในการคัดแยก ไม่จำเป็นต้องเติม

2. อาหาร NB (Nutrient broth)

Peptone	5	กรัม
Meat extract	1	กรัม
Yeast extract	2	กรัม
NaCl	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ในกรณีต้องการเตรียมเป็นอาหาร NA (Nutrient agar) ให้เติมผงวุ้น (Agar) 15 กรัม (1.5 เปอร์เซ็นต์) นำไปนึ่งความดันไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. วิธีเตรียมแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นผง

ตัวอย่างแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบ ได้แก่ *Strephylococcuss aureus* TISTR 1466 *Salmonella typhimurium* TISTR292 และ *Escherichia coli* TISTR 780 จากฝ่ายวิทยาศาสตร์ชีวภาพ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว) ซึ่งให้บริการในรูปแบบผงแห้ง โดยก่อนนำมาใช้มีวิธีการเตรียมดังนี้

1. ใช้สำลีสะอาดชุบแอลกอฮอล์พอหมาด ไม่ชุ่ม เกินไป เช็ดรอบหลอด

2. นำตะไบตัดแก้วเลื่อยส่วนที่ต้องการแยกออก หรือสามารถใช้สำลีที่จุ่มแอลกอฮอล์แล้ว หักออกได้ แต่ต้องระวังไม่ให้ปลายแตกบาดนิ้ว

3. ถ่ายผงตัวอย่างจุลินทรีย์ที่ได้ลงในหลอดอาหารที่ต้องการใช้เพาะเลี้ยง ตามวิธีการที่ฝ่ายเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์แนบมาให้ เช่น NB TYP เป็นต้น ปิดปลายหลอดตัวอย่างจุลินทรีย์ผงด้วยสำลี หรือปลอกปิดป้องกันการปนเปื้อน และเก็บรักษาในอุณหภูมิประมาณ 4 องศาเซลเซียส

4. นำหลอดอาหารที่มีจุลินทรีย์ไปเพาะเลี้ยงตามสภาวะที่เอกสารจุลินทรีย์แนบมา โดยทั่วไปที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

5. เมื่อครบเวลา มีการเจริญดี ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากหลอดอาหารเหลว เขี่ยลงบนอาหารแข็ง แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อเก็บไว้ใช้ในการศึกษาอื่นๆ ต่อ

4. สารละลายทดสอบการอยู่รอดในกรดไฮโดรคลอริก (ดัดแปลวิธีจากมงคล และเพ็ญรัตน์, 2554)

การเตรียมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.1 โมลาร์ pH 5.8

1. เตรียมสารละลายA 1 M K_2HPO_4 ; ชั่ง K_2HPO_4 มา 87.09 กรัม

2. เตรียมสารละลายB 1 M KH_2PO_4 ; ชั่ง KH_2PO_4 มา 68.045 กรัม

3. ผสมสารละลาย A และ B ตามปริมาตร

pH	Volume of 1 M K_2HPO_4	Volume of 1 M KH_2PO_4
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	92
8.0	94	6

4. ปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายฟอสเฟตความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ พีเอช 5.8

การเตรียมสารละลายทดสอบการอยู่รอดในสภาวะกรดไฮโดรคลอริก

นำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่เตรียมไว้ ค่อยๆ หยดสารละลายกรดไฮโดรคลอริก 5 N ลงใน โดยปรับให้ได้พีเอชเป็น 2.5 เมื่อผสมเรียบร้อยแล้ว เก็บไว้ในขวดแก้วสีชา

5. สารละลายสมมติในกระเพาะอาหาร (Stimulated gastric juice) (ดัดแปลงวิธีจาก Corcaran *et. al.*, 2005)

การเตรียมสารละลายสมมติในกระเพาะอาหาร

NaCl	2.05	กรัม
KH_2PO_4	0.60	กรัม
$CaCl_2$	0.11	กรัม
KCl	0.37	กรัม
Glucose	3.5	กรัม

ปรับ pH ด้วย 1 M HCl ให้ได้ 2.0

ปริมาตรรวมสารละลาย 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

รอให้สารละลายข้างต้นอุณหภูมิลดลง แล้วก่อนใช้ทดสอบเติมเพปซิน (Pepsin ของ Sigma) 13.3 มิลลิกรัม ต่อสารละลาย 1 ลิตร

หรืออาจเตรียม Stock pepsin (100 X)

การเตรียม Stock pepsin (100 X)

ชั่ง Pepsin มา 1.33 กรัม ละลายในน้ำ 1 ลิตร (น้ำต้องนึ่งฆ่าเชื้อก่อน)

ก่อนทดสอบ นำสารละลายที่เตรียมข้างต้น มา 495 มิลลิลิตร ผสมกับ Stock pepsin 5 ml

6. สารละลายทดสอบการอยู่รอดในเกลือน้ำดี (ดัดแปลวิธีจากมงคล และเพ็ญรัตน์, 2554)

การเตรียมสารละลายทดสอบการอยู่รอดในน้ำดี

เตรียมอาหาร MRS broth นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที ก่อนใช้ทดสอบรอให้สารละลายข้างต้นอุณหภูมิลดลง แล้วก่อนใช้ทดสอบเติมเกลือน้ำดี (Bile salt ของ Sigma) 3 กรัม ต่อ MRS broth 1 ลิตร (ความเข้มข้น 0.3 เปอร์เซ็นต์)

7. ทดสอบการติดสีแกรมผนังเซลล์แบคทีเรีย (Gram staining)

หลักการ

การเตรียมสีย้อม

การเตรียม 1% Crystal violet solution

สารละลาย A

Crystal violet (85% dye)	10	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20	กรัม

ละลายสีในแอลกอฮอล์จนละลายหมด

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.80	กรัม
น้ำกลั่น	80	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B คนให้เข้ากัน ถ้ามีตะกอนให้กรองก่อนนำไปใช้ และถ้าสีเข้มเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1:10 ก่อนนำมาผสมกับสารละลาย B

การเตรียม Gram Safranine

Safranine	2.50	กรัม
Ethyl alcohol 95%	10	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ผสม Safanine ลงไปใน Ethyl alcohol 95% แล้วเติมน้ำกลั่นลงไปคนให้เข้ากันกรองด้วยกระดาษกรองเก็บในขวดสีชา

การเตรียม Gram iodine solution

Iodine (Crystal)	1	กรัม
Potassium iodine (KI)	2	กรัม
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

บด Iodine และ Potassium iodine ผสมให้เข้ากันในโกร่ง (Motar) จนผงละเอียดแล้วเติมน้ำประมาณ 200 มิลลิลิตร ล้างเอาส่วนผสมของ Iodine และ Potassium iodine ใส่ใน Volumetric flask แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ 300 มิลลิลิตร

การเตรียม Methylene blue

Methylene blue	5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	30	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	300	มิลลิลิตร

ชั่งสาร Methylene blue ร้อยละ 3 ปริมาณ 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ ตวง Ethyl alcohol ความเข้มข้นร้อยละ 95 ปริมาณ 30 มิลลิลิตร ใส่ใน Methylene blue ลงใน Ethyl alcohol คนให้ละลายเข้ากันกรองด้วยกระดาษกรองเก็บใส่ในขวดสีชา

การย้อมสีแกรม

การย้อมสีแกรม (Gram strain) เพื่อให้ทราบถึงชนิดของจุลินทรีย์ว่าเป็นแกรมบวกหรือแกรมลบ มีขั้นตอนการย้อมดังนี้

1. ทำความสะอาดแผ่นสไลด์แล้วเช็ดให้แห้ง
2. ใช้ Loop เขี่ยเชื้อมาสเมียร์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน
3. หยด Crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
4. ล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยดสารละลาย Gram iodine ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
5. ล้างสไลด์ด้วย Ethyl alcohol 95% ไม่เกิน 15 วินาทีแล้วล้างออกทันที
6. หยดสี Safranine O ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที
7. ล้างด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้สไลด์แห้ง
8. นำไปตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์
9. การตรวจผลสอบ

    Gram positive (+) ติดสีม่วง

    Gram negative (-) ติดสีแดง

8. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (Catalase test)

หลักการ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นผลพลอยได้ (By-product) จากการหายใจระดับเซลล์ และเป็นพิษเมื่อสะสมในเซลล์ เอนไซม์คะตะเลสทำลาย H_2O_2 ก่อนที่สารนี้จะทำอันตรายต่อเซลล์ ด้วยแยก H_2O_2 เป็นออกซิเจนอิสระ ซึ่งเกิดเป็นฟอง และน้ำ การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสจึงใช้สารละลาย H_2O_2 ทดสอบ ดังนั้น ถ้าเป็นแบคทีเรียที่สร้างคะตะเลสจึงแสดงการสลาย H_2O_2 ได้ และสังเกตเห็นมีฟองก๊าซเกิดขึ้น ซึ่งโดยทั่วไปปฏิกิริยาจะเกิดเร็วมาก และจะมีฟองปรากฏให้เห็น

สารละลายทดสอบ

3% ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

วิธีการทดสอบ

นำเชื้อที่ต้องการทดสอบป้ายลงบนสไลด์ที่สะอาด หยด 3% H_2O_2 ลงบนเชื้อที่ป้ายไว้ก่อน อ่านผลทันที

Positive catalase test คือ เกิดฟองก๊าซทันที และเห็นได้ชัด

Negative catalase test คือ ไม่เกิดฟองก๊าซขึ้น

ข้อควรระวัง

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เสื่อมสลายได้ง่ายควรเก็บไว้ในตู้เย็นเมื่อใช้เสร็จ เขี่ยเชื้อลงในแผ่น ตรวจสอบเอนไซม์คะตะเลสโดยใช้ปิเปตสารละลาย 3% H_2O_2 หยดลงแผ่นสไลด์ที่มีเชื้อ ให้ดูฟองก๊าซเกิดขึ้นทันที

9. การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Oxidase test)

หลักการ Aerobic bacteria มีกระบวนการ Oxidative phosphorylation ในการหายใจระดับเซลล์เพื่อสร้างพลังงาน โดยระหว่างการเกิดขบวนการนี้ จะมีการถ่ายเทอิเล็กตรอนให้กับออกซิเจนโดยผ่านวิถีของการขนส่งอิเล็คตรอน ซึ่งจะอาศัยการทำงานของ Cytochrome ต่างๆ ซึ่งการทดสอบออกซิเดสนี้เป็นการทดสอบหา Cytochrome C oxidase ของแบคทีเรีย ซึ่งจะไป oxidize สารเคมีทำให้เกิดสารประกอบสีม่วง

สารละลายทดสอบ (Oxidase regent)

Kovac' s oxidase reagent (1% tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochroride)

วิธีทดสอบ

วิธีที่ 1 Indirect paper procedure

1. วางกระดาษกรองลงในเพลต
2. หยด Kovac' s oxidase reagent ลงบนกระดาษให้พอชื้น
3. ใช้ลูปเขี่ยเชื้อ แล้วป้ายลงในกระดาษกรอง ยาวประมาณ 3 เซนติเมตร
4. สังเกตการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้ายลงในกระดาษกรอง
5. อ่านผล

Oxidase positive คือ มีการเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

Oxidase negative คือ เชื้อที่ป้ายลงไปแล้วไม่มีการเปลี่ยนสี

วิธีที่ 2 Direct plate procedure

1. Streak เชื้อทดสอบลงบน agar plate ให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ
2. หยด Kovac' s oxidase reagent 2-3 หยด ลงบนโคโลนีที่ต้องการทดสอบ
3. สังเกตการเปลี่ยนแปลงของโคโลนี
4. การอ่านผล

Oxidase positive : โคโลนีเปลี่ยนสีเป็นสีน้ำเงินเข้มภายใน 1 นาที

Oxidase negative : โคโลนีไม่เปลี่ยนสี

10. การทดสอบการสร้างกรด และก๊าซในกลูโคส 1 เปอร์เซ็นต์ (Acid and gas production from 1% glucose)

หลักการ ระหว่างการหมัก สารอินทรีย์ถูกใช้เป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้าย ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักเป็นกรด หรือ เป็นกรดและก๊าซ ปฏิกิริยาการหมักถูกตรวจสอบด้วยการเปลี่ยนสีของตัวบ่งชี้พีเอช (pH indicator) โดยทั่วไปมีการใช้ฟีนอลเรด (Phenol red) เป็นตัวบ่งชี้การหมักคาร์โบไฮเดรต เนื่องจากผลิตภัณฑ์จากการหมักคาร์โบไฮเดรตเป็นกรดอินทรีย์ แต่มีตัวบ่งชี้พีเอชอื่นๆ ด้วย ที่สามารถใช้ได้ เช่น Bromocresol purple (หรือ Bromcresol purple) และ Bromothymol blue (หรือ Bomthymol blue)

การเตรียมอาหารทดสอบ

อาหาร MRS broth	100	มิลลิลิตร
Glucose	1	กรัม
Phenol red	0.02	กรัม

ถ่ายอาหารลงในหลอดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักก๊าซ (Inverted fermentation tube หรือ Durham tube) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที อาหารมีสีแดงของฟีนอลเรด พีเอชประมาณ 7.4 ± 0.2

วิธีทดสอบ

เขี่ยแบคทีเรียกรดแลคติก ใส่ในหลอดอาหารที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาตรวจผล เทียบกับหลอดควบคุม (ไม่มีแบคทีเรียทดสอบ) ดังนี้

ผลเป็นลบ (Negative test) อาหารไม่เปลี่ยนสี

หมักกลูโคสได้กรด (Acid production) อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

หมักกลูโคสได้กรดและก๊าซ (Acid and gas production) อาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และฟองก๊าซที่ด้านบนหลอดดักก๊าซ

การทดสอบการสร้างกรดในน้ำตาล 1 เปอร์เซ็นต์ ใช้วิธีเดียวกับการทดสอบการหมักกลูโคสที่กล่าวในข้างต้น แต่เปลี่ยนชนิดน้ำตาลจากกลูโคสเป็นน้ำตาลชนิดอื่น

11. การทดสอบ Oxidative fermentative medium (O/F medium หรือ O/F test)

หลักการ ถ้าเป็นแบคทีเรียท่อนแกรมลบสามารถใช้กลูโคสด้วยการหมัก (Anaerobic Fermentation) หรือสามารถใช้ได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน (Aerobic respiration; Oxidative) การหมักในสภาวะไม่มีออกซิเจน ไพรูเวตถูกเปลี่ยนเป็นกรดชนิดต่างๆ ระหว่างการหมัก ปริมาณกรดที่มีขึ้นทำให้สีของตัวบ่งชี้อย่างเช่นบรอมไธมอลบลู เปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ส่วนแบคทีเรียแกรมลบที่ไม่มีการหมัก (Nonfermenting gram-negative bacteria) มีการเมทาบอไลท์กลูโคสผ่านการหายใจระดับเซลล์แบบใช้ออกซิเจน (Aerobic respiration) ซึ่งมีการผลิตกรดเล็กน้อยในวไกลโคไลซิส (Glycolysis) และวัฏจักรเครปส์ (Krebs cycle) การเพิ่มกลูโคสในอาหารเพาะเลี้ยงช่วยให้มีการเพิ่มการสร้างกรดให้มากขึ้น และตรวจสอบกรดได้จากการเปลี่ยนสีของบรอมไธมอลบลู

การเตรียมอาหารทดสอบ Hugh and Leifson's OF basal medium

Peptone (Tryptone)	2.0	กรัม
Sodium chloride	5.0	กรัม
Glucose (หรือ Carbohydrate ชนิดอื่น)	10.0	กรัม
Bromthymol blue	0.03	กรัม
Agar	3.0	กรัม
Dipotassium phosphate	0.30	กรัม
น้ำกลั่น	1	ลิตร

ถ่ายอาหารลงในหลอดปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่หลอดดักก๊าซ (Inverted fermentation tube หรือ Durham tube) นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที อาหารมีสีเขียว

วิธีทดสอบ

ใช้เข็มเขี่ย (Needle) เขี่ยแบคทีเรียกรดแลคติก แทง (Stab) ลงในหลอดอาหารที่เตรียมไว้ประมาณครึ่งทางจากก้นหลอด หรือประมาณ ¼ จากก้นหลอด ทำเช่นนี้ 2 หลอด อีกหลอดเททับด้านบนด้วย Mineral oil หรือกลีเซอรีน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร หรือสูงจากผิวอาหารประมาณ 1 เซนติเมตร เพื่อไม่ให้ออกซิเจนเข้าไปในอาหาร นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมาตรวจผล เทียบกับหลอดควบคุม (ไม่มีแบคทีเรียทดสอบ) ดังนี้

ผลเป็นลบ (Negative OFtest) อาหารไม่เปลี่ยนสี

หมักกลูโคสได้กรด (Fermentative result) อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลือง ทั้งในหลอดปิด (มีน้ำมันบนผิว) และหลอดเปิด (ไม่มีน้ำมันบนผิว)

ออกซิเดชั่นกลูโคส (Oxidative result) เฉพาะหลอดเปิด (ไม่มีน้ำมันบนผิว) อาหารเปลี่ยนจากสีเขียวเป็นสีเหลืองที่ด้านบนของหลอด แต่หลอดปิด สีอาหารไม่เปลี่ยนแปลง

12. ทดสอบการเกิดแอมโมเนียจากอาร์จินีน

หลักการ การเมทาบอไลท์อาร์จินีนด้วยเอนไซม์ Arginine deiminase ทำให้เกิดแอมโมเนีย (NH_3) และตรวจสอบแอมโมเนียได้ด้วยสารละลาย Nessler's reagent

การเตรียมอาหารทดสอบ

อาหาร MRS broth	1000	มิลลิลิตร
Arginine	3	กรัม
Sodium citrate	2	กรัม

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอ ที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที อาหารมีสีเขียว

การเตรียม Nessler's reagent

ละลาย HgI_2 (Mercury (II) iodide) 100 กรัม และ KI (Potassium iodide) 70 กรัม ในน้ำเล็กน้อย เติมสารละลายที่ผสมแล้ว อย่างช้าๆ ลงในสารละลาย NaOH (Sodium hydroxide) 160 กรัม ที่ละลายในน้ำ 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร เก็บในขวดยาง หรือพลาสติก ไม่ให้โดนแสง ควรใช้หมดใน 1 ปี ข้อระวัง HgI_2 มีความเป็นพิษ

ตรวจดูคุณภาพสารละลาย Nessler's reagent ด้วย NH3-N/L 0.1 มิลลิกรัม ใน 10 นาที หลังจากเติมลงไป และไม่มีการสร้างแอมโมเนียใน 2 ชั่วโมง

วิธีทดสอบ

ถ่ายแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบลงในอาหาร ที่เตรียมไว้ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง หยด Nessler's reagent 3-4 หยด สังเกตผล

ผลลบ (Negative test) สีอาหารไม่เปลี่ยน แบคทีเรียไม่สร้างแอมโมเนีย

ผลบวก (Positive test) สีอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองถึงน้ำตาล แบคทีเรียสร้างแอมโมเนีย

ตารางภาคผนวกที่ 1 หมายเลขไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งคัดแยกแต่ละชนิด และลักษณะโคโลนี

แหล่งคัดแยก	หมายเลขไอโซเลทแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนี
ผักหอมดอง	O3A	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส
	O3B	กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	O3C	กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร
	O4A	กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	O5A	กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก
	O5B	กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร
	O7A	กลมใสมันวาว
	O10A	กลมขนาดเล็ก
	O10B	กลมสีเหลืองขุ่น
ผักเสี้ยนดอง	S1A	กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก
	S2A	กลมสีเหลืองขุ่นขนาด 2-4 มิลลิเมตร
	S3A	กลมสีขาวขุ่น
	S3B	กลมใสขนาด 5 มิลลิเมตร
	S5A	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่นรอบนอกใส
	S6A	กลมสีเหลืองขุ่น ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	S6B	กลมสีขาวขุ่น ขอบนอกใส
	S6C	กลมใส ขนาด 2-5 มิลลิเมตร
	S6D	กลมสีขาวขุ่น
	S7A	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่นรอบนอกใส
	S7B	กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก กลมสีขาวขุ่น
	S7C	ขนาดเล็ก
	S8A	กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	S9A	กลมสีขาวขุ่น มีโซนใส
	S9B	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส
	S9C	กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก
	S10A	กลมใส ขนาดเล็ก

ตารางภาคผนวกที่ 1 หมายเลขไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งคัดแยกแต่ละชนิด และลักษณะโคโลนี (ต่อ)

แหล่งคัดแยก	หมายเลขไอโซเลทแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนี
ผักแป้นดอง	G1A	กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	G2A	กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก 2-4 มิลลิเมตร
	G2B	กลมสีขาวขุ่น
	G7A	กลมใสขนาด 5 มิลลิเมตร
	G7B	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส
	G8A	กลมสีเหลืองขุ่น ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	G8B	กลมสีขาวขุ่น ขอบนอกใส
	G9A	กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	G10A	กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก
	G10B	กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร
ผักกุ่มดอง	V1A	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส
	V2A	กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	V2B	กลมสีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร
	V4A	กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	V4B	กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก
	V5A	กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร รอบนอกใส
	V5B	กลมใส มันวาว
	V6A	กลมมีขนาดเล็ก
	V7A	กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส
	V7B	กลมสีเหลืองขุ่น
	V7C	กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร
	V8A	กลม สีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก
	V8B	กลมสีเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร
	V8C	กลม สีขาวขุ่น
	V8D	กลมใส ขนาด 5 มิลลิเมตร
	V9A	กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร
	V9B	กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	V9C	กลม สีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	V10A	กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร รอบนอกใส

ตารางภาคผนวกที่ 1 หมายเลขไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งคัดแยกแต่ละชนิด และลักษณะโคโลนี (ต่อ)

แหล่งคัดแยก	หมายเลขไอโซเลทแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนี
ผักกุ่มดอง	V10B	กลมใสมันวาว
	V10C	กลม สีเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร
ผักกาดดอง	C1A	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่นรอบนอกใส
	C1B	กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก
	C3A	กลมสีขาวขุ่น ขนาดเล็ก
	C3B	กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	C4A	กลมสีขาวขุ่น
	C4B	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส
	C4C	กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	C5A	กลมใส ขนาดเล็ก
	C5B	กลม ขนาดเล็ก
	C5C	กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส
	C5D	กลม สีเหลืองขุ่น
	C5E	กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร
	C6A	กลมสีเหลืองขุ่นขนาดเล็ก
	C6B	กลม สีเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร
	C7A	กลม สีขาวขุ่น
	C7B	กลมใส ขนาด 5 มิลลิเมตร
	C7C	กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส
	C7D	กลมสีขาวขุ่น
	C7E	กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร
	C8A	กลม ขนาด 2-4 มิลลิเมตร
	C9A	กลมใส ขนาด 2-4 มิลลิเมตร
	C9B	กลม สีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	C10A	กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส

ตารางภาคผนวกที่ 1 หมายเลขไอโซเลทของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากแหล่งคัดแยกแต่ละชนิด และลักษณะโคโลนี (ต่อ)

แหล่งคัดแยก	หมายเลขไอโซเลทแบคทีเรีย	ลักษณะโคโลนี
กระท้อนดอง	R1A	กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร
	R1B	กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	R2A	กลมสีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	R2B	กลม สีขาวขุ่น ขนาด 5 มิลลิเมตร รอบนอกใส
	R3A	กลมใส มันวาว
	R3B	กลมเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร
	R4A	กลม มันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส
	R4B	กลม สีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	R5A	กลม สีขาวขุ่น ขนาดเล็ก
	R5B	กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	R6A	กลม สีขาวขุ่น
	R6B	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส
	R7A	กลม สีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	R7B	กลมใส ขนาดเล็ก
	R8A	กลม ขนาดเล็ก
	R8B	กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส
	R9A	กลม สีเหลืองขุ่น
	R9B	กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร
แหนมเห็ด	M1A	กลมมันวาว ตรงกลางขุ่น รอบนอกใส
	M2A	กลม มีขนาดเล็ก
	M4A	กลมสีขาวขุ่น รอบนอกใส กลมใส ขนาด 2-3 มิลลิเมตร
	M5A	กลม สีเหลืองขุ่น
	M6A	กลม ขนาด 3 มิลลิเมตร
	M6B	กลม สีเหลืองขุ่น ขนาดเล็ก
	M7A	กลม สีเหลืองขุ่น ขนาด 2-4 มิลลิเมตร
	M8A	กลม สีขาวขุ่น
	M8B	กลม ใส ขนาด 5 มิลลิเมตร

ตารางภาคผนวกที่ 2 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างคะตะเลส (Catalase test) และออกซิเดส (Oxidase test)

หมายเลขไอโซเลทแบคทีเรีย	คุณสมบัติ	
	การสร้างคะตะเลส	การสร้างออกซิเดส
O3A	+	+
O3B	-	-
O3C	+	+
O4A	+	+
O5A	+	+
O5B	+	+
O7A	-	-
O10A	-	-
O10B	+	+
S1A	-	-
S2A	-	-
S3A	+	+
S3B	+	+
S5A	+	+
S6A	+	+
S6B	+	+
S6C	+	+
S6D	-	-
S7A	-	-
S7B	+	+
S7C	+	+
S8A	+	+
S9A	+	+
S9B	-	-
S9C	+	+
S10A	+	+

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึงมีการสร้างเอนไซม์ชนิดนั้น ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test)
สัญลักษณ์ - หมายถึงไม่พบการสร้างเอนไซม์ชนิดนั้น ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test)

ตารางภาคผนวกที่ 2 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างคะตะเลส (Catalase test) และออกซิเดส (Oxidase test) (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลทแบคทีเรีย	คุณสมบัติ	
	การสร้างคะตะเลส	การสร้างออกซิเดส
G1A	+	+
G2A	+	+
G2B	-	-
G7A	-	-
G7B	-	-
G8A	+	+
G8B	-	-
G9A	+	+
G10A	+	+
G10B	+	+
V1A	+	+
V2A	-	-
V2B	+	+
V4A	+	+
V4B	+	+
V5A	-	-
V5B	+	+
V6A	-	-
V7A	+	+
V7B	+	+
V7C	-	-
V8A	+	+
V8B	+	+
V8C	+	+
V8D	+	+
V9A	-	-

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึงมีการสร้างเอนไซม์ชนิดนั้น ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test)
สัญลักษณ์ - หมายถึงไม่พบการสร้างเอนไซม์ชนิดนั้น ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test)

ตารางที่ 4.2 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างคะตะเลส (Catalase test) และออกซิเดส (Oxidase test) (ต่อ)

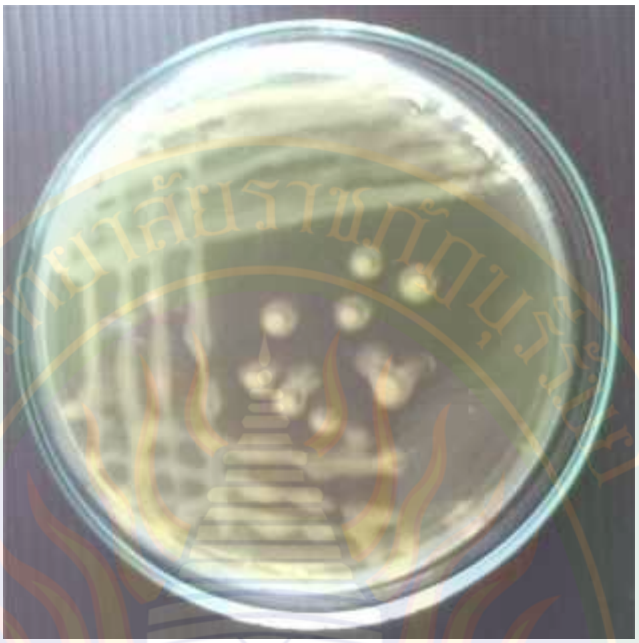
หมายเลขไอโซเลทแบคทีเรีย	คุณสมบัติ	
	การสร้างคะตะเลส	การสร้างออกซิเดส
V9B	+	+
V9C	+	+
V10A	-	-
C1A	+	+
C1B	-	-
C3A	+	+
C3B	-	-
C4A	+	+
C4B	+	+
C4C	+	+
C5A	-	-
C5B	+	+
C5C	+	+
C5D	+	+
C5E	+	+
C6A	-	-
C6B	+	+
C7A	+	+
C7B	+	+
C7C	+	+
C7D	+	+
C7E	+	+
C8A	+	+
C9A	+	+
C9B	+	+
C10A	+	+

หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึงมีการสร้างเอนไซม์ชนิดนั้น ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test)
สัญลักษณ์ - หมายถึงไม่พบการสร้างเอนไซม์ชนิดนั้น ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test)

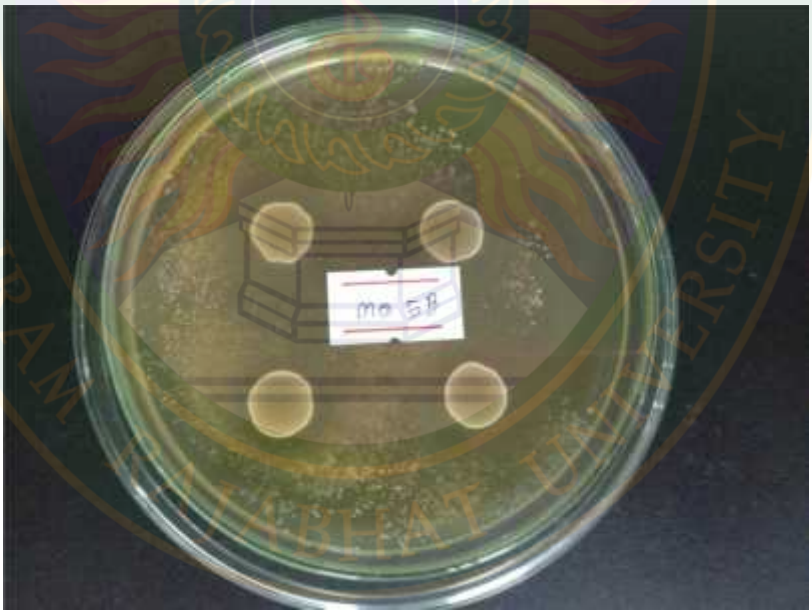
ตารางที่ 4.2 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างคะตะเลส (Catalase test) และออกซิเดส (Oxidase test) (ต่อ)

หมายเลขไอโซเลทแบคทีเรีย	คุณสมบัติ	
	การสร้างคะตะเลส	การสร้างออกซิเดส
R1A	+	+
R1B	+	+
R2A	-	-
R2B	-	-
R3A	+	+
R3B	+	+
R4A	+	+
R4B	+	+
R5A	+	+
R5B	+	+
R6A	+	+
R6B	+	+
R7A	-	-
R7B	+	+
R8A	-	-
R8B	+	+
R9A	+	+
R9B	+	+
M1A	-	-
M2A	-	-
M4A	-	-
M5A	-	-
M6A	-	-
M6B	-	-
M7A	-	-
M8A	-	-
M8B	-	-

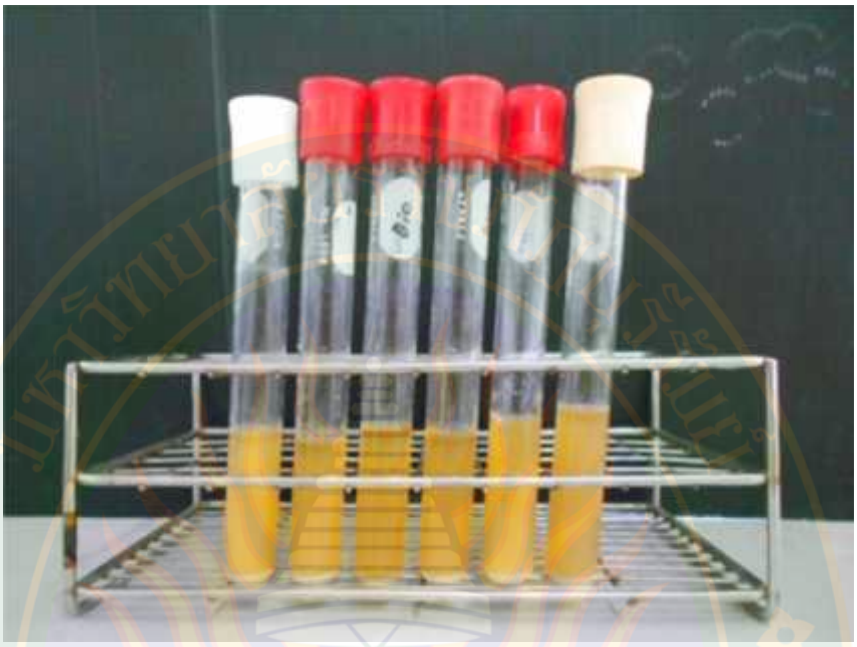
หมายเหตุ : สัญลักษณ์ + หมายถึงมีการสร้างเอนไซม์ชนิดนั้น ให้ผลการทดสอบเป็นบวก (Positive test)
สัญลักษณ์ - หมายถึงไม่พบการสร้างเอนไซม์ชนิดนั้น ให้ผลการทดสอบเป็นลบ (Negative test)



ภาพภาคผนวกที่ 1 การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร MRS agar ที่มี 0.004% Bromocresol purple เป็นตัวบ่งชี้ (Indicator) สังเกตได้จากการเกิดโซนใสรอบโคโลนี

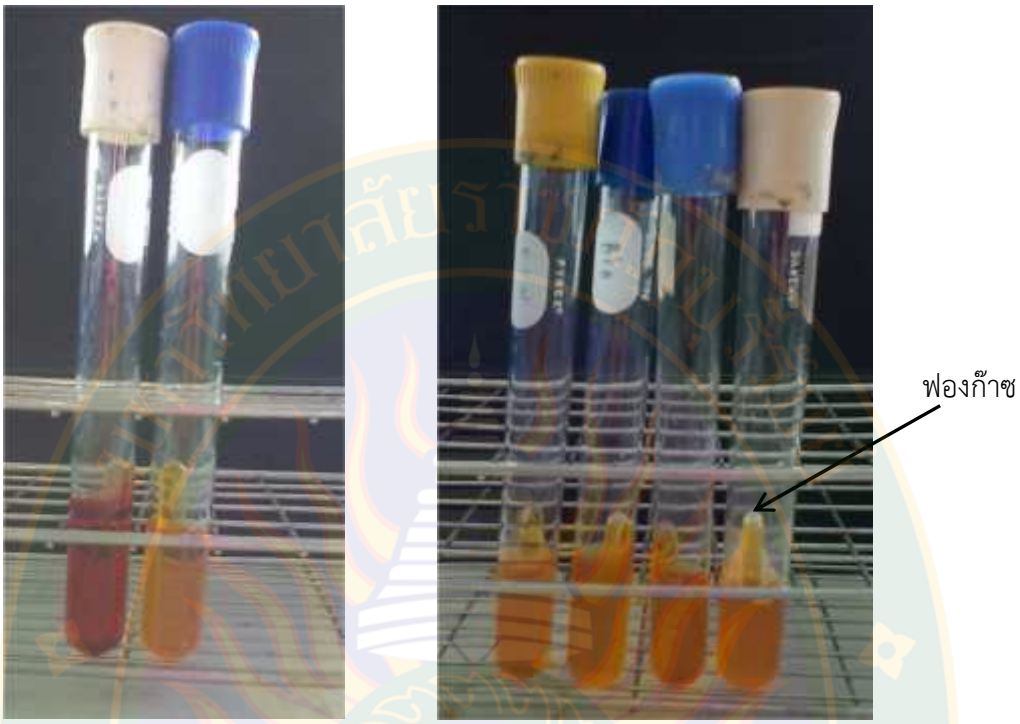


ภาพภาคผนวกที่ 2 โซนใส (Clear zone) ในการยับยั้งการเจริญเติบโต



ภาพภาคผนวกที่ 3 การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิต่างๆ ได้แก่ 37 (ก) องศาเซลเซียส

ภาพภาคผนวกที่ 4 การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ ในอาหาร MRS ที่มีเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์



ก **ข**

ภาพภาคผนวกที่ 5 การสร้างกรดและก๊าซ (Acid and gas) ของแบคทีเรียกรดแลคติก เมื่อหมักกลูโคสความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ในอาหาร MRS broth ที่เติม Phenol red เป็นตัวบ่งชี้ หากมีการสร้างกรดอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดง เป็นสีเหลือง **(ก)** และหากมีการสร้างกรดและก๊าซ จะพบว่าอาหารเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง และมีฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ **(ข)**

เอกสารอ้างอิง

เกศินี จันทรโสภณ. ***การคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อพัฒนาการผลิตแหนมสมุนไพรเพื่อสุขภาพจากพืชและเห็ด***. 2005. มหาวิทยาลัยราชภัฏอุบลราชธานี.

มงคล ถิรบุญยานนท์ และเพ็ญรัตน์ หงส์วิทยากร. ***การคัดเลือกและศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียกรดแลคติกจากมูลทารกที่มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งลำไส้***. 2554. มหาวิทยาลัยแม่โจ้

สิรินดา ยุ่นฉลาด และกาญจนา นนทะเสน. แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) จากแบคทีเรียกรดแลคติค (Lactic acid bacteria) ที่สามารถใช้แทนสารกันบูดในผลิตภัณฑ์อาหาร. ***วารสารศูนย์บริการวิชาการ มหาวิทยาลัยขอนแก่น***. 2554. ปีที่ 19 ฉบับที่ 1-2 มกราคม – มิถุนายน.

สุพรรณิการ์ ดาวเรรัมย์. ***การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคจากอาหารหมักดองจากพืช***. การวิจัยทางชีววิทยาประยุกต์. สาขาวิชาชีววิทยาประยุกต์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยราชภัฏบุรีรัมย์. 2555.

Azadnia P., anndd Khan Nazer A.H. Identification of lactic acid bacteria isolated from traditional drinking yoghurt in tribes of Fars province. ***Iranian Journal of Veterinary Research***. Shiraz university. 2009; 10(3): 235-240.

Banks J.G., Broad R.G., and Sparks N.H.C. Natural antimicrobial systems and their potential in food preservation of the future. ***Biotechnology and applied biochemistry***. 1986; 8: 103-147.

Boyle J.R. (2008). Are biotic useful for treating or preventing eczema? Department of Paediatrics, Imperial College London United Kingdom.

Cadieux P., Burton J., Gardiner G., Braunstein I., Bruce A.W., Kang C.Y., and Reid G. *Lactobacillus* strains and vaginal ecology. ***Journal of the American Medical Association***. 2002; 287:1940-1941.

Chahrour W., Merzouk Y., Henni J.E., Haddaji M., and Kihal M. Screening and identification of lactoc acid bacteria isolated from sorghum silage processes in west Algeria. ***African journal of biotechnology***. 2013; 12(14): 1703-1709.

Cleusix V., Lacroix C., Vollenweider S., Duboux M., and Blay L.G. Inhibitory activity spectrum of reuterin produced by *Lactobacillus reuterin* against intestinal bacteria. ***BMC Microbiology***. 2007; 7: 101.

Corcaran M.B., Stanton C., Fitzgerald F.G., and Ross P.R. Survival of probiotic Lactobacii in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. ***Applied and Environment Microbiology***. 2005; 71(6): 3060-3067.

Daechel M.A., Andersson R.E., Fleming H.P., Microbial ecology of fermenting plant Materials. ***FEMS Microbiology***. 1987; Rev.46: 357–367.

Daniells S. Probiotics could target cause of liver cancer. Available online on http://www.nutraingredients.com. 30-May-2006.

Guetarni H., Bensaid A., and Bensoltane A. Analysis of lactic acid responsible for inhibition in-*vitro* of Helicobacter pylori by high performance chromatrography. ***Journal of biotechnology letters***. 2012; 3(1): 34-36.

Grimoud J., Durand H., Courtin C., Monsan P., Ouarné F., Theodorou V. and Roques C. In vitro screening of probiotic lactic acid bacteria and prebiotic glucooligosaccharides to select effective synbiotics. ***Anaerobes***. 2010; 16(5): 493-500

Guo X., Li D., Lu W., Piao X. and Chen X. Screening of Bacillus strains as potential probiotics and subsequent confirmation of the in vivo effectiveness of *Bacillus subtilis* MA139 in pigs. ***Antoine Van Leuwenhoek Journal***. 2006; 90: 139-146.

Harvey R.A., Champe P.C., and Fisher B.D. **Microbiology**. 2 nd ed. United State of America. Lippincott Williams & Wilkins. 2007.

Jacobsen C.N., Rosenfeldt V.N., Hayford A.E., Moller P.L., Michaelsen K.F., Paerregaard A., and Strom B., Tvede M. and Jakobsen. Screening of Probiotic activities of forty-seven strains of Lactobacillus spp. By in vitro techniques and evaluation of the colonization ability of five selected strains in humans. ***Applied and***

Environmental Microbiology. 1999; 65(11): 4949-4956.

Kamau D.N., Doores S., and Pruitt K.M. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenase* and *Salmonella typhimurium* in the presence of starter culture in a laboratory medium and during meat fermentation. ***Journal of food protection***. 1990; 62(9): 975-979.

Kashket E.R. Bioenergetics of lactic acid bacteria: Cytoplasmic pH and osmotolerance, ***FEMS Microbiology***. 1987; Rev.46: 233–244.

Kazemipoor M., Jasimah C.W., Radzi W.M., Begum K., and Yaze I. Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables against food borne pathogens. ***Archives Sciences***. 2012; 65(6).

Klayraung S., Viermstein H., Sirithunyalug J., and Okonogi S. Probiotic properties of *Lactobacilli* isolated from Thai traditional food. ***Sci Pharm.*** 2008; 76: 485-503.

Liong M.T. and Shah N.P. Optimization of cholesterol removal by probiotic in the presence of probiotic by using a response surface method. ***Applied and Environmental Microbiology***. 2005; 71(4): 1745-1753.

Ljungh A. and Wadstrom T. Lactic acid bacteria as probiotics. ***Current Issues in Intestinal Microbiology.*** 2005; 7: 73-90.

Lindgren S.E., and W.J. Dobrogosz. Antagonisic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. ***FEMS Microbiology***. 1990; Rev.87: 149-163.

Mack D.R., Michail S., Wei S., Macdougal L., and Hollingsworth M.A. Probiotics inhibit enteropathogenic *E. coli* adherence in vitro by inducing intestinal mucin gene expression. ***American Journal of Physiology-cell Physiology***. 1999; 39:G941-G950.

Madhu A.N., Giribhattanavar P., Narayan M.S.,and Prapulla S.G. Probiotic lactic acid bacterium from kanjika as a potential source of vitamin B12: evidence from LC-MS immunological and microbiological. ***Biotechnology Letters***. 2010; 32: 503-506.

Mallesha, Shylaja R., Selvakumar D., and Jagannath J.H. Isolation and identification of lactic acid bacteria from raw and fermented products and their antibacterial activity. ***Recent Research in Science and Technology.*** 2010; 2(6): 42-46.

Michail S. **The mechanism of action of probiotics. Practical gastroenterology**. Wright State University. School of Medicine, The children's Medical Center, Dayton, Ohio. 2005.

Mourad K., Halima K.Z., and Nour-Eddine K. Isolation of lactic acid bacteria for its possible use in the fermention of green Algerian olives. ***Grasas y Aceites***. 2004; 55(4): 385-393.

Ng S.C., Hart A.L., Kamm M.A., Stagg A.J., and Knight S.C., Mechanisms of Action of Probiotics: Recent Advances. ***BASIC SCIENCE REVIEW; Inflamm Bowel Dis***. 2008; 15(2): 300-310.

Patil M.M., Pal A., Anand T., and Ramana V.K. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from curd and cucumber. ***Indian journal of biotechnology***. 2010; 9: 166-172.

Patral A., Sill J., and Das K.B. Isolation and characterization of dominant lactic acid bacteria from Dahi st Medinipur and evauation of their antibacterial activity. ***Internet journal of food safety***. 2011; 13: 157-163.

Pothoulakis C., Kelly C.P., and Joshi M.A., *et al*. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. G***astroenterology***. 1993; 104: 1108-1115.

Rafter J. The effects of probiotics on colon cancer development. ***Nutrition Research Reviews***. 2004; 17: 277-284.

Rattanachaikunsopon P. and Phumkhachorn P. Lactic acid bacteria: their antimicrobial compounds and their uses in food production. ***Scholars Research Library Annals of Biological Research***. 2010; 1(4): 218-228.

Remiger A., Eijsink M.A. Ehrmann, Sletten K., Nes I.F., and Vogel R.F. Purification and partial amino acid and sequence of plantaricin 1.25 and 1.25, two bacteriocins produced by Lactobacillus plantarum TMW 1.25. ***Journal of Applied Microbiology.*** 1999, 86: 1053-1058.

Rossland E., Langsrud T., Granum P.E., and Sorhaug T. Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. ***International Journal of Food Science and Technology*** 2005; 1;98(2): 193-200.

Savić D., Savić T., Škrinjar M., and Joković N. Profile of lactic acid bacteria from rye flour and sourdough. ***Journal of culture collection***. 2006; 5(1): 38-45.

Suskovic J., Kos B., Beganovic J., Pavunc L.A., Habjanic K., and Matosic S. Antimicrobial activity-the most important property of probiotic and starter lactic acid bacteria. ***Food technology and biotechnology***. 2010; 48(3): 296-307.

Vandenbergh P.A. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. ***FEMS Microbiology Reviews***. 1993; 12: 221-238.

Wilson KH and Perini I. Role of competition for nutrients in suppression *of Clostridium difficile* by the colonic microflora. ***Infection and Immunity***, 1988; 56:2610-2614.

Yang E., Fan L., Jiang Y., Doucette C., and Filmore S. Antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactic acid bacteria isolated from cheeses and yogurts. ***AMB express a SpringerOpen journal***. 2012; 2(48).