รายงานการวิจัย

เรื่อง

การแยกและคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย

(Isolation and Screening of Antibacterial Substances of Lactic Acid Bacteria)

โดย

อาจารย์อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม

การแยกและคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย

(Isolation and Screening of Antibacterial Substances of Lactic Acid Bacteria)

โดย

อาจารย์อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสยาม

คำนำ

งานวิจัยฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งในภารกิจหลักของอาจารย์ ในการทำงานวิจัยเพื่อพัฒนาตนเอง โดยมีการดำเนินงานในช่วงปีการศึกษา 2549-2550 ซึ่งงานวิจัยนี้เกี่ยวข้องกับการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียจากอาหารหมักดอง โดยแบ่งเป็นส่วนของที่มาและความสำคัญของปัญหา การตรวจเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง วิธีดำเนินการวิจัย ผลการวิจัย สรุปและอภิปรายผลการวิจัย ตลอดจนข้อเสนอแนะของงานวิจัย

ทางผู้วิจัย หวังเป็นอย่างยิ่งว่ารายงานวิจัยฉบับนี้ จะเป็นประโยชน์ในการทำงานวิจัย หรือใช้เป็นข้อมูลอ้างอิง เพื่อนำไปสู่การพัฒนางานวิจัยในหัวข้อที่เกี่ยวข้องให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์

2551

ชื่อโครงการ การแยกและคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย

ผู้วิจัย อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ วท.ม. (จุลชีววิทยาประยุกต์)

ปีการศึกษา 2551

บทคัดย่อ

ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียแลคติก จากอาหารหมักต่างๆ ได้แก่ หอยดอง แหนม ปลาส้ม และไส้กรอกอีสาน ได้เชื้อทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ 3 ชนิดได้แก่ *Escherichia coli* (TISTR 073), *Bacillus subtilis* (TISTR 001) และ *Staphylococcus aureus* (TISTR 517) พบว่ามีเพียง 6 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติในการสารยับยั้งเชื้อทดสอบ คือ N_1, M_2, P_1, P_2, S_1 and S_2 โดยเชื้อสายพันธุ์ M_2, S_1 and S_2 ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด สายพันธุ์ N_1 ยับยั้งเชื้อ *E. coli* (TISTR 073) และ *S. aureus* (TISTR 517) และสายพันธุ์ P_1 และ P_2 ยับยั้ง *B. subtilis* (TISTR 001) เชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และให้ผลการทดสอบแคตาเลสเป็นลบ โดยที่เชื้อ M_2, P_1, S_1 and S_2 มีรูปร่างท่อน ส่วนเชื้อ N_1 และ P_2 มีรูปร่างกลม และเมื่อทำการทดสอบปัจจัยในการเลี้ยงเชื้อ ด้านอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่มีผลต่อการทำงานของเชื้อ พบว่าเชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีสุดในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของเชื้อสายพันธุ์ S_1 , S_2 และสารไนซิน จะลดลงหรือถูกยับยั้งโดยความร้อนและเอนไซม์โปรติโอไลติก (โปรติเนส เค และ ทริปซิน)

คำสำคัญ แบคทีเรียแลคติก หอยดอง แหนม ปลาส้ม และไส้กรอกอีสาน ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli Bacillus subtilis Staphylococcus aureus* โปรติเนส เค ทริปซิน

Research title: Isolation and Screening of Antibacterial Substances of Lactic Acid Bacteria

Researcher: Ampun Chaikulsareewath ; **Degree:** M.Sc. (Applied Microbiology)

Academic year: 2008

ABSTRACT

Ten strains of lactic acid bacteria were isolated from fermented shell, fermented meat, fermented fish and Thai fermented sausage. The antibacterial activities of the ten strains against indicator microorganisms were investigated. Indicator strains used as indicator microorganisms for antibacterial activities screening were *Escherichia coli* (TISTR 073), *Bacillus subtilis* (TISTR 001) and *Staphylococcus aureus* (TISTR 517). It was found that six strains (N_1, M_2, P_1, P_2, S_1 and S_2) exhibited good antibacterial activities against indicator microorganisms. The strains that produced antibacterial activities against indicator microorganisms were : M_2, S_1 and S_2 strains against all indicator microorganisms; strain N_1 against *E. coli* (TISTR 073) and *S. aureus* (TISTR 517); and strains P_1 and P_2 against *B. subtilis* (TISTR 001). All the six strains were found to be Gram-positive and catalase-negative while morphologically M_2, P_1, S_1 and S_2 were bacilli and N_1 and P_2 were cocci. The effect of temperature and pH of cultivation on antibacterial activity were studied. The result was found that all six strains had high antibacterial activity when they were incubated at 37 °C and pH 7. The activities of the antibacterial substance produced by S_1, S_2 strains and nisin were reduced and inhibited by heating and protease treatments (proteinase K and trypsin).

Key words: lactic acid bacteria, fermented shell, fermented meat, fermented fish and Thai fermented sausage, antibacterial activities, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, proteinase K, trypsin.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบพระคุณ ดร. สมหมาย จันทร์เรือง และ ดร.จิระศักดิ์ เกษร์สุวรรณ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำต่างๆ ตลอดจนตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องทำให้งานวิจัยฉบับนี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ดร.จิระศักดิ์ เกษร์สุวรรณ ผู้อำนวยการสำนักส่งเสริมและพัฒนางานวิจัยและ คณาจารย์ทุกท่านของภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือ และให้คำแนะนำต่างๆ ในการทำงานวิจัย

ขอขอบคุณนางสาววรรัฏฐ์ เอื้อนโอด ผู้ช่วยวิจัยที่ช่วยในการทำงานวิจัยได้เป็นอย่างดี ทำให้งานลุล่วงตามเป้าหมาย และเป็นกำลังใจที่ดีมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ข้าพเจ้าใคร่ ขอขอบพระคุณ มหาวิทยาลัยสยาม ที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ตลอดจนเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ในการทำงานวิจัยครั้งนี้เป็นอย่างสูง

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ก

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... ข

กิตติกรรมประกาศ ..... ค

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

บทที่ 1 บทนำ 1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1

วัตถุประสงค์การวิจัย 2

สมมติฐานการวิจัย 2

ขอบเขตของการวิจัย 2

นิยามศัพท์เฉพาะ 3

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย 3

บทที่ 2 วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 4

แบคทีเรียแลคติก 4

ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติก 5

สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก 8

การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ 9

ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติก 11

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 12

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย 14

อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในการทดลอง 14

วิธีการทดลอง 17

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล 22

ศึกษาการแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักและการทำเชื้อที่ได้ให้บริสุทธิ์ 22

ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ 24

ศึกษาการหาความเข้มข้นของกรดแลคติกที่เชื้อผลิตได้ 25

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

ศึกษาการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ
โดยกรดแลคติกบริสุทธิ์ 26
ศึกษาความสามารถในการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติก 27
ศึกษาความไวของสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติก 30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ 33
สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล 33
ข้อเสนอแนะ 36
บรรณานุกรม 37
ภาคผนวก 41
ก การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา 42
ข การวิเคราะห์ทางเคมี 45
ประวัติผู้วิจัย 48

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก 8
ตารางที่ 2 แสดงแหล่งอาหารหมัก ลักษณะโคโลนี รูปร่างของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ และผลการทดสอบแคตาเลส 22
ตารางที่ 3 ความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติก (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร) 25
ตารางที่ 4 ความสามารถในการผลิตกรดของแบคทีเรียแลคติก 6 สายพันธุ์เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง 26
ตารางที่ 5 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร) 26
ตารางที่ 6 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร) 27
ตารางที่ 7 แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร) 29
ตารางที่ 8 ผลของความร้อนที่มีต่อความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติกตามระยะเวลาให้ความร้อน (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร) 30
ตารางที่ 9 ผลของเอนไซม์โปรติโอไลติกที่มีต่อความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติก (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร) 31

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 การเกิดโซนยับยั้งในเชื้อทดสอบ 24

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้บริโภคได้ให้ความสนใจอาหารที่ผลิตจากธรรมชาติและผลิตภัณฑ์ที่ปราศจากสารเคมีที่เติมลงไปในอาหารเพื่อใช้ถนอมอาหารหรือเพื่อปรับปรุงรสชาติ กลิ่น สี ของผลิตภัณฑ์ให้ดีขึ้น ทำให้เกิดความสนใจที่จะคิดค้นหาสารกันเสียจากธรรมชาติแทนการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร การใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตสารซึ่งมีคุณสมบัติในการถนอมอาหารไม่ให้เน่าเสียกำลังเป็นที่นิยมเพราะนอกจากจะลดอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับผู้บริโภคแล้ว ยังรักษาคุณภาพทางโภชนาการได้อย่างครบถ้วนอีกด้วย

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่พบทั่วไปในธรรมชาติและพบมากในน้ำนม เนื้อสด ส่วนในผักในพืชพบบ้างเล็กน้อย แบคทีเรียแลคติกนอกจากจะมีบทบาทในการแปรรูปอาหารหมักดองแล้ว ยังมีผลในการยับยั้งการเจริญและทำลายจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียรวมทั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรค แบคทีเรียแลคติกมีความสำคัญต่อทั้งความสามารถในการหมัก สุขภาพ และเพิ่มคุณค่าทางอาหาร แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตสารได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไดอะซิทัล ไฮโดรเจน เปอร์ออกไซด์ และ แบคเทอริโอซิน หรือสารต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น แบคทีเรียพวกนี้มีความสามารถมากในการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่นทั้งที่ทำให้อาหารเน่าเสียหรือก่อให้เกิดโรค การคิดค้นการผลิตอาหารชนิดใหม่ ซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับผู้บริโภคในการผลิตอาหารสุขภาพ ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักพวกผลิตภัณฑ์นมหมักที่ใช้หัวเชื้อพวกแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ ชีต (cheese) บัตเตอร์มิลล์ (buttermilk) และ โยเกิร์ต (yogurt) เป็นต้น (Salminen and Wright, 1993)

การใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียแลคติกได้มุ่งเน้นการคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริ โอซิน ชนิดใหม่ๆ เพื่อใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร แบคเทอริโอซินเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่จำพวกโปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น โดยเฉพาะสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียผู้สร้าง ซึ่งพบว่าส่วนใหญ่จะเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Bacillus cereus, Clostridium perfringens, C. botulinum* เป็นต้น ตัวอย่างของแบคเทอริโอซินที่ได้มีการศึกษาถึงคุณสมบัติเป็นอย่างดีแล้วมีหลายชนิด อย่างไรก็ตามแบคเทอริโอซินที่ได้รับอนุญาตให้ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหารในปัจจุบันมีเพียงชนิดเดียว คือ ไนซิน (nisin) ซึ่งสร้างโดย *Lactococcus lactis* ซึ่งมี

คุณสมบัติเป็น แอนติบอทูลินอล (antibotulinal) ที่มีประสิทธิภาพ โดยสามารถยับยั้งการงอกของสปอร์ของเชื้อ *Clostridium botulinum* และป้องกันการสร้างสารพิษบอทูลินอล (botulinal toxin) ได้

อย่างไรก็ตามเนื่องด้วยข้อจำกัดทางด้านกฎหมายอาหาร รวมถึงข้อจำกัดในแง่ของคุณสมบัติที่ไม่เหมาะสมของแบคเทอริโอซินบางประการ เช่น การดูดซับกับโปรตีนในอาหาร และการย่อยสลายของแบคเทอริโอซินในอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการแปรรูปด้วยความร้อนที่อาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของแบคเทอริโอซิน ทำให้การใช้แบคเทอริโอซินชนิดใหม่ๆ เพื่อเป็นวัตถุกันเสียในอาหารยังไม่สามารถทำได้ ดังนั้นจึงได้มีการนำเสนอการใช้แบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ เพื่อเป็นควบคุมการเจริญของเชื้อ ในการเพิ่มความปลอดภัยและยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารประเภทอื่นนอกเหนือไปจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักได้ (ศศิวิมล และอดิศร, 2548)

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหารหมัก

1.2.2 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ

1.2.3 เพื่อทดสอบหาประสิทธิภาพของเชื้อที่คัดเลือกได้ซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอื่น

1.3 สมมติฐานการวิจัย

สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น และหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารยับยั้งได้

1.4 ขอบเขตของการวิจัย

1.4.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหาร และการทำเชื้อให้บริสุทธิ์

1.4.2 การตรวจหาแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ

1.4.3 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยกรดแลคติกบริสุทธิ์

1.4.4 การหาความเข้มข้นของกรดแลคติกที่เชื้อผลิตได้

1.4.5 ศึกษาความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซิน

1.4.6 ศึกษาความไวของสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติก

1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ

แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) หมายถึง กลุ่มของจุลินทรีย์แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ที่สามารถผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาล ได้แก่ จุลินทรีย์กลุ่มแลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) เพดิโอคอคคัส (*Pediococcus*) และ เสตร็บโตคอคคัส (*Streptococcus*) เป็นต้น

สารต้านจุลชีพ (antimicrobial agents) หมายถึง กลุ่มของสารหรือยาที่แยกได้จากเชื้อจุลชีพหรือกึ่งสังเคราะห์เหมือนสารที่แยกได้จากเชื้อจุลชีพ และที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี โดยตรงมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตหรือทำลายเชื้อจุลชีพ

แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) หมายถึง สายเปปไทด์ขนาดเล็กซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดที่ก่อให้เกิดโรคและทำให้อาหารเสื่อมเสีย เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* แบคเทอริโอซินจัดเป็นสารชีวภาพที่มีความแตกต่างจากยาปฏิชีวนะ (antibiotic) โดยแบคเทอริโอซินจะทำให้เกิดรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ส่งผลให้เกิดการเสียสมดุลขององค์ประกอบต่างๆ ภายในเซลล์แบคทีเรียเป้าหมาย แบคเทอริโอซินถูกสร้างจากแบคทีเรียหลายชนิดแต่ที่ได้รับการศึกษากันมากคือในแบคทีเรียกรดแลคติก

1.6 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

สามารถแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหารที่จะมีประโยชน์ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักได้ ซึ่งสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคได้

บทที่ 2
วรรณกรรมและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส (catalase negative) ไม่สร้างสปอร์ (non-spore forming) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลม การจัดเรียงกลุ่มแบคทีเรียแลคติกในสกุลต่างๆ ขึ้นอยู่กับรูปร่างลักษณะรูปแบบของการหมักน้ำตาลกลูโคส การใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ และการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ การผลิตเกลือแลคติกเชื้อเจริญในที่มีเกลือความเข้มข้นสูง และการทนต่อกรดหรือด่าง (Wood and Holzapfel, 1997) แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ พบในอาหารหลายชนิด โดยเฉพาะในนม ผัก และผลไม้ ส่วนมากแบคทีเรียนี้เป็นแบคทีเรียที่เจริญในสภาวะที่ไม่มีอากาศ แต่ในสภาวะที่มีอากาศก็ไม่ตาย แบคทีเรียแลคติกขาดสารไซโตโครม (cytochromes) และฟอร์ไฟลิน (porphyrins) จึงไม่ให้เอนไซม์แคตาเลสและออกซิเดส (สุมณฑา, 2545)

แบคทีเรียแลคติกสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เกิดกรดแลคติกจากปฏิกิริยา 2 ทาง คือ วิถีทางที่ได้แลตเตทเพียงอย่างเดียว เรียกว่า โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) และวิถีทางที่ได้แลคเตทร่วมกับสารอื่นในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า เฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) (สมใจ, 2537)

1) โฮโมเฟอร์เมนเตทีฟแบคทีเรีย เป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ในปริมาณร้อยละ 85 หรือมากกว่าจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ซึ่งพวกนี้จะหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมล เป็นกรดแลคติก 1.8 โมล และได้กรดอะซิติก เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย

2) เฮทเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ เป็นแบคทีเรียที่หมักคาร์โบไฮเดรต เช่น น้ำตาลกลูโคส ให้กรดแลคติก ประมาณ ร้อยละ 50 นอกนั้นให้ กรดอะซิติก แอลกอฮอล์ คาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมล แล้วสร้างกรดแลคติกได้น้อยกว่า 1.8 โมล

ในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคโตบาซิลไลออกเป็นกลุ่มย่อย 3 กลุ่ม ดังนี้ (สุมณฑา, 2545)

1) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟเพียงอย่างเดียว (obligate homofermenter) สปีชีที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus, L. delbruckii* และ *L. helveticus*

2) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักได้ทั้งสองแบบ (facultative heterofermenter) สปีชีที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *L. plantarum, L. casei* และ *L. sake*

3) กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟเพียงอย่างเดียว (obligate heterofermenters) สปีชีที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *L. bervis, L. fermentum* และ *L. kefir*

สำหรับแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ ที่มิใช่แลคโตแบซิลไล (สุมณฑา, 2545) ประกอบด้วย

1) จีนัส ลิวโคนอสตอค (*Leuconostoc*) เป็นแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญ ที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวกแลคโตแบซิลไลได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติก เพราะเกิดเมือก

2) จีนัส เพดิโอคอกคัส (*Pediococcus*) เป็นแบคทีเรียแลคติกที่นิยมนำมาใช้หมักกรดแลคติกมากกว่า เช่น *P. pentosaceus* ส่วน *P. halophilus* ในปัจจุบันถูกจัดไว้ในสปีชีใหม่ในชื่อว่า *Tetragenococcus halophilus*

3) จีนัส เสตรปโตคอกคัส (Streptococcus) เป็นแบคทีเรียแลคติกอีกสปีชีหนึ่ง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในกลุ่มเสตรปโตคอกไคมีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกได้เป็น 3 กลุ่ม (จีนัส) คือ *Enterococci, Lactococcus* และ *Streptococcus*

2.2 ผลิตภัณฑ์ที่ผลิตได้จากแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในการผลิตอาหารหมักจากผลิตผลทางการเกษตรหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต ผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้ดอง เช่น กิมจิ ผักกาดดอง ใช้ในผลิตภัณฑ์ปลา เช่น ปลาร้า ปลาส้ม ปลาจ่อม ใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว นอกจากนั้นในการผลิตอาหารสัตว์บางชนิดยังมีการใช้แบคทีเรียแลคติก เช่น การทำหญ้าหมัก ซึ่งเชื่อว่าได้หญ้าหมักที่มีคุณภาพดี มีคุณค่าทางอาหารสูง เหมาะกับการเลี้ยงสัตว์ ตัวอย่างของการใช้แบคทีเรียแลคติกในอาหารหมักดองบางชนิดมีรายละเอียดพอสังเขปดังต่อไปนี้ (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546-2547)

2.2.1 ผลิตภัณฑ์นม (dairy products)

ผลิตภัณฑ์นมหมักเตรียมได้จากนมหลายชนิด (อาจเป็นนมสด นมขาดมันเนย นมข้นหรือนม คืนรูปจากนมผงที่ขาดหรือพร่องมันเนย) นำมาผ่านการโฮโมจีไนซ์เพื่อให้อนุภาคของไขมันเล็กลงหรือไม่ก็ได้ นำมาฆ่าเชื้อด้วยการสเตอริไลซ์แล้วหมักต่อด้วยจุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกแล้ว ซึ่งอาจจะเป็นแบคทีเรียหรือยีสต์ หรือทั้งสองชนิดร่วมกัน หลักการของแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์นมหมัก คือ การสร้างกรดแลคติกของกล้าเชื้อ คือ การสร้างกรดแลคติกของกล้าเชื้อในระหว่างการหมักทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของผลิตภัณฑ์ลดลง และเกิดการจับตัวของโปรตีนในนม เกิดเป็นเคิร์ด (curd) รสชาติของผลิตภัณฑ์มีรสเปรี้ยว ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์นมที่ใช้แบคทีเรียแลคติก ได้แก่ นมเปรี้ยว โยเกิร์ต และชีส เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการผลิตโยเกิร์ต ได้แก่ *Streptococcus salivarius* subsp. thermophilus และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*

2.2.2 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ (meat products)

ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ที่ใช้แบคทีเรียแลคติกในการผลิตส่วนใหญ่เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่น แหนม รวมทั้งไส้กรอกแห้ง และไส้กรอกกึ่งแห้ง เช่น ซาลามิ เปปเปอโรมิ เป็นต้น

แหนมจัดเป็นผลิตภัณฑ์เนื้อหมักของไทยที่มีความแตกต่างจากผลิตภัณฑ์ในแถบยุโรป เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีปริมาณไขมันต่ำ ใช้ระยะเวลาในการหมักค่อนข้างสั้น ไม่มีการทำให้แห้ง ผลิตจากเนื้อหมูบดละเอียด หนังหมู ข้าวสุก กระเทียม และส่วนผสมอื่นๆ คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาบรรจุลงในถุงพลาสติก อาจมีการห่อทับด้วยใบตอง ปัจจุบันนิยมบรรจุลงในหลอดพลาสติก เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำ ระหว่างการหมักมีการสร้างกรดแลคติกเกิดขึ้น ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของส่วนผสมลดลงจาก 6.5-6.6 เป็น 5.0-4.5 ซึ่งการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง จะมีผลต่อรสชาติของแหนม ตามรายงานของ Adam and Moss (1995) นอกจากนั้นยังทำให้การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนรวมถึงจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคลดลงด้วย ซึ่งผลการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์เกิดขึ้นจากสารที่ผลิตจากกล้าเชื้อหรือจากแบคทีเรียที่พบในแหนม เช่น สารในกลุ่มแบคเทอริโอซิน ตามรายงานของ Swetwiwathana et al. (2003) โดยจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นหัวเชื้อนี้ช่วยให้แหนมมีความปลอดภัยต่อการบริโภคและเก็บไว้ได้นานขึ้น แบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการหมักแหนมที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. และ *Pediococcus* sp. ซึ่งทั้งสองสายพันธุ์ใช้เป็นกล้าเชื้อในทางการค้าของผลิตภัณฑ์เนื้อหมักในต่างประเทศ นอกนั้นบางผลิตภัณฑ์ยังใช้ *Micrococcus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่รีดิวซ์ไนเทรตเป็นไนไทรต์ มีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์มีความคงทนยิ่งขึ้น

2.2.3 ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (fermented fish products)

ผลิตภัณฑ์ปลาหมักหลายชนิดในแถบเอเชีย และเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ ปลาร้า ปลาเจ่า ปลาส้ม และส้มฟัก โดยที่ผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้จัดอยู่ในชนิดผลิตภัณฑ์หมักจากปลา/เกลือ/คาร์โบไฮเดรต และยังมีผลิตภัณฑ์ชนิดฟิช ซอส (fish sauce) เช่น น้ำปลา และเพซท (paste) ซึ่งส่วนผสมหลักในการผลิตประกอบด้วยปลา เกลือ ตัวอย่างเช่น การผลิตน้ำปลา จะใช้เวลาหมักเป็นเวลาประมาณ 18 เดือน ซึ่งในระหว่างการหมักปลา จะมีการสลายตัวเองโดยกิจกรรมของเอนไซม์ในตัวปลา ได้ผลผลิตเป็นของเหลวสีน้ำตาลออกมา ซึ่งของเหลวนี้ประกอบด้วยกรดอะมิโน โปรตีนที่ละลายและนิวคลีโอไทด์ ทำให้น้ำปลามีคุณค่าทางโภชนาการมากขึ้น และนิยมใช้เป็นเครื่องปรุงในการประกอบอาหารหลายประเภท แบคทีเรียแลคติกที่พบในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก ได้แก่ *Lactobacillus farciminis, L. pentosu, L. plantarum, Lactobacillus* sp. *และ Leuconostoc* sp. ตามรายงานของ Tanasupawat et al. (1998)

2.2.4 ผลิตภัณฑ์ผักดองเปรี้ยว (fermented vegetable products)

การทำผักดอง เป็นการแปรรูปผักอีกวิธีหนึ่งที่นำผักสดที่มากเกินการบริโภคมาแปรรูป ทำให้ เก็บไว้บริโภคได้นาน และยังรวมไปถึงการผลิตผลไม้ดองด้วย การดองส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติก ผักที่นิยมนำมาดอง ได้แก่ กะหล่ำปลี หอม แตงกวา หน่อไม้ ส่วนผลไม้ที่นิยมนำมาดอง ได้แก่ มะขาม มะม่วง มะกอก เป็นต้น ในประเทศไทยผักดองในลักษณะนี้ซึ่งเป็นที่รู้จักกันทั่วไป ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง หอมดอง ผักกาดดอง ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่พบในการดองผักเสี้ยน *ได้แก่ Leuconostoc mesenteroides, L. plantarum, L. brevis, L. buchineri, L. fermentum และ Pediococcus cerevisiae* ตามรายงานของ Steinkraus (1996)

2.2.5 ผลิตภัณฑ์จากถั่วและธัญพืช (Legume and cereal products)

ผลิตภัณฑ์จากพืชที่นอกเหนือจากผักและผลไม้แล้ว ถั่วและธัญพืชนับเป็นอาหารอีกกลุ่มหนึ่งที่มีการศึกษา โดยเป็นการหมักที่ใช้ถั่วและธัญพืชเป็นสับสเตรท เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องมีหลายกลุ่มด้วยกัน ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรียตัวอย่างได้แก่ ซีอิ๊ว ซึ่งสับสเตรทในการหมักส่วนใหญ่ประกอบด้วยถั่วเหลืองและข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมัก ได้แก่ *Aspergillus oryzae, P. halophillus* และ *L. delbrueckii* อาหารหมักชนิดนี้ใช้เป็นเครื่องปรุงรสในอาหารหมักกลุ่มของถั่วหมัก (fermented bean) เช่น ทามานะโตะ (hamanatto) ทู-ชิน (tou-shin) และ เตา-ชิ (tao-si) ซึ่งเป็นอาหารหมักของญี่ปุ่น ใช้ถั่วเหลืองทั้งเมล็ดและแป้งข้าวสาลี เชื้อจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Aspergillus, Streptococcus* และ *Pediococcus*

2.3 สภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก (ดวงรัตน์ และนันทพล, 2539)

2.3.1 อุณหภูมิ

การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ใดๆ ก็ตามเพื่อให้ได้ปริมาณมาก จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ สำหรับแบคทีเรียแลคติก อุณหภูมิที่เหมาะสมจะแตกต่างกันไปในแต่ละสกุล ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

สกุล	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)
Lactobacillus spp.	
thermobacterium	37 – 45
streptobacterium	28 – 32
betabacterium	28 – 40
Pediococcus spp.	25 – 33
Streptococcus spp.	30 – 37
Leuconostoc spp.	20 - 25

2.3.2 ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง

ถึงแม้แบคทีเรียแลคติกจะเจริญได้ที่ระดับค่าความเป็นกรด-ด่าง ในช่วงค่อนข้างกว้าง (4-7.5) แต่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมโดยทั่วๆ ไปจะอยู่ในช่วงประมาณ 6-6.5 และเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเมแทบอไลซ์น้ำตาลเป็นกรดแลคติก ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว จึงจำเป็นต้องคอยปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ให้สูงขึ้น การเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่เป็นกรดนั้น นอกจากการเจริญจะช้าลงแล้ว ยังมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อในขณะเก็บ เมื่ออยู่ในสภาวะที่มีกรดมากๆ เซลล์บางส่วนจะบาดเจ็บ และไม่สามารถดำเนินกิจกรรมการหมักได้ทันที

2.3.3 ออกซิเจน

แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่เรียกว่าไมโครแอโรไฟล์ (microaerophile) ซึ่งเมแทโบไลซ์สารอาหารด้วยกระบวนการเฟอร์เมนเตชันในสภาวะที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงจึงไม่ต้องพ่นอากาศ แต่เพื่อให้อาหารเป็นเนื้อเดียวกันตลอดระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ

จึงจำเป็นต้องมีการกวน ซึ่งมีผลให้อากาศลงไปในอาหารได้ และทำให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในสภาวะเช่นนี้เชื้อจะเจริญช้าลง ซึ่งการแก้ปัญหาอาจทำได้โดยการเติมเอนไซม์แคตาเลสหรือสารรีดิวส์อื่นๆ เช่น ไพรูเวตหรือเฟอรัส-ซัลเฟต นอกจากการเติมสารต่างๆ ดังได้กล่าวแล้ว การพ่นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ลงในถังเลี้ยงเชื้อ เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ขจัดปัญหาการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้

2.4 การสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมัก พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนเก็บรักษาได้นานขึ้น โดยปัจจัยที่เกี่ยวข้อง (สุมณฑา, 2545) ได้แก่

2.4.1 การลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง และการเกิดกรดอินทรีย์

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติก จะให้กรดอินทรีย์ คือ กรดแลคติกและกรดอะซิติก เป็นสารเมตาบอไลท์ทุติยภูมิ ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของซับสเตรตต่ำลง ความเป็นกรดสูงและค่าความเป็นกรด-ด่าง ต่ำ จึงมีผลยับยั้งจุลินทรีย์

2.4.2 การเกิดแบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

แบคเทอริโอซินเป็นสารประเภทเปปไทด์หรือโปรตีนที่สามารถฆ่าแบคทีเรียซึ่งมีลักษณะนิสัยคล้ายกับแบคทีเรียที่ให้กรดแลคติกได้ เนื่องจากแบคเทอริโอซินเป็นสารที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ จึงมีความปลอดภัยมากกว่าสารเคมีสังเคราะห์ที่นำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตาม แบคเทอริโอซินที่ยอมรับและอนุญาตให้นำมาใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารได้ในขณะนี้มีเพียงไนซินอย่างเดียว ไนซินผลิตมาจากแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* บางสายพันธุ์ในประเทศอังกฤษและประเทศอื่นบางประเทศได้ใช้ไนซินเป็นวัตถุกันเสียในอาหารมาตั้งแต่ต้นทศวรรษที่ 1950 ในขณะที่องค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (The United States Food and Drug Administration) ผ่านกฎหมายยอมรับไนซินเป็นวัตถุเจือปน (กันเสีย) เมื่อปี ค.ศ. 1988 ลักษณะการทำลายแบคทีเรียของไนซินเป็นแบบทำลายแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป และสามารถทำลายเยื่อหุ้มภายนอกเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบบางชนิด มีลักษณะคล้ายกับถูกบำบัดด้วยสารคีเลทติ้ง (chelating agent) เช่น กรดเอธิลลีนไดเอมีนเตตระอะซิติก (Ethylenediaminetetraacetic acid, EDTA) สปอร์ของแบคทีเรียไวต่อไนซิน แรกทีเดียวการนำไนซินมาใช้ในอาหารก็เพื่อวัตถุประสงค์ที่จะหยุดการเจริญของสปอร์แบซิลลัสในผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิดเท่านั้น เช่น เนยแข็ง และอาหารกระป๋อง แต่เมื่อใช้ไนซินกับเซลล์ของแบคทีเรียจะมีผล

ทำให้เกิดรูพรุนขึ้นกับเยื่อหุ้มพลาสมา ทำให้เกิดการรั่วซึมและการรั่วไหลขององค์ประกอบภายในเซลล์ เป็นผลให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการทำหน้าที่ไป

2.4.3 การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สารนี้ทำหน้าที่เป็นตัวรับออกซิเจน เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีเอนไซม์ฟลาโวโปรตีนออกซิเดส แต่ขาดเอนไซม์คะตาเลส แบคทีเรียแลคติกจะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ในสภาวะที่มีออกซิเจนเท่านั้น เหตุที่แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียแลคติกจึงทนสารนี้ได้มากกว่าแบคทีเรียอื่นๆ จากการสังเกตพบว่าในอาหารหมักบางชนิด เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สะสม แม้ว่าปริมาณที่เกิดขึ้นจะไม่มากนักก็ตาม เนื่องจากการหมักกรดแลคติกเกิดขึ้นในสภาวะไร้อากาศ ซึ่งเป็นสภาวะที่ไม่เอื้อต่อการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปริมาณไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นในการหมักกรดแลคติกขึ้นกับปริมาณของออกซิเจนที่ละลายอยู่ในซับสเตรตในตอนเริ่มต้นของการหมักเท่านั้น แต่ข้อจำกัดนี้กลับเป็นผลดี เพราะหลังจากการหมักดำเนินไปแล้ว จะไม่เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ขึ้นมาอีก การเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มากเกินไปอาจจะไปยับยั้งแบคทีเรียแลคติกที่เป็นตัวการหมักได้

2.4.4 การเกิดเอธานอล

การหมักเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟในสภาวะที่ไม่มีอากาศทำให้เกิดเอธานอลขึ้น เอธานอลเป็นสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง ทำให้แบคทีเรียแลคติกได้เปรียบในการแข่งขันเหนือแบคทีเรียอื่นๆ ในการเจริญเติบโต แม้ว่าเอธานอลที่เกิดขึ้นไม่มากนักก็ตาม นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ อีก แต่มีความสำคัญน้อยกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณกรดแลคติกที่แบคทีเรียผลิต (อาจถึง 100 มิลลิโมลาร์) จนมีผลทำให้ ความเป็นกรด-ด่าง ของซับสเตรตลดลงมาอยู่ระหว่าง 3.5-4.5 แลคติกเป็นกรดที่มีราคาแพงและสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมผลิตอาหารและยา

2.4.5 การเกิดไดอะเซทิล (diacetyl หรือ 2,3-butanediol)

เป็นผลจากการย่อยสารอาหารจากแบคทีเรียแลคติกบางสปีชีส์ มีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมการทำเนย เพราะเป็นสารให้กลิ่นในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก และทำให้มีกลิ่นรบกวนจึงทำให้สามารถใช้ในอาหารได้เพียงบางชนิด

ไดอะเซทิล ได้รับการยอมรับว่าสามารถบริโภคได้อย่างปลอดภัย (GRAS (Generally Recognized as Safe)) ว่าปลอดภัย สามารถใช้เป็นสารกันบูดในอาหารแต่มีข้อจำกัด

เนื่องจากต้องใช้จำนวนมาก จึงจะมีผลต่อการถนอมอาหาร อย่างไรก็ตามไดอะเซทิลอาจใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะ เครื่องมือ เครื่องใช้ที่สัมผัสอาหารได้ เพราะระเหยง่าย (http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/LAB.html)

2.4.6 ริวทีริน (Reuterin)

เป็นสารที่มีโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช่โปรตีน น้ำหนักโมเลกุลต่ำ และสามารถละลายน้ำได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เป็นกลาง สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ ยีสต์ รา รวมทั้ง โปรโตซัว จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อลดจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย(http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/LAB.html)

2.5 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกที่มีต่ออาหารหมัก มีประโยชน์ (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546-2547) ดังนี้

2.5.1 ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ จากการศึกษาในกลุ่มของธัญพืชพบว่าคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์เพิ่มมากขึ้นจากกิจกรรมการหมักที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต เช่น ในเทมเป้จากข้าวสาลี เพราะมีจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในอาหารที่ผ่านการหมักสูงกว่าอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก

2.5.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ บทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารหมักพบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนเก็บรักษาได้นาน

2.5.3 แบคทีเรียกรดแลคติกมีกิจกรรมในการลดปริมาณคอเลสเทอรอลในกระแสเลือด

2.5.4 กิจกรรมในการป้องกันมะเร็ง โดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่

2.5.5 ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน

2.6 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

มีงานวิจัยหลายฉบับที่ทำการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียแลคติก และศึกษาการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ได้มาจากแบคทีเรียแลคติก ดังนี้

Kojic, M. et al. (1991) ได้ศึกษาแบคเทอริโอซินซึ่งผลิตได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *diacitilactis* S50 โดยเรียกว่าแบคเทอริโอซิน เอส 50 (bacteriocin S50) ซึ่งสารนี้จะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น และกิจกรรมของแบคเทอริโอซิน เอส 50 จะไวต่อเอนไซม์โปรติเอส สารนี้จะยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์หลังจากที่ให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 60 นาที และในช่วง pH 2 ถึง 11

Sarkar, P.K. and Banerjee, S. (1996) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากหลายๆ แหล่ง ได้เชื้อ 171 ไอโซเลต ซึ่งอยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus* (106 สายพันธุ์) *Lactococcus* (53 สายพันธุ์) *Leuconostoc* (6 สายพันธุ์) และ *Pediococcus* (6 สายพันธุ์) จุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ทั้งหมดนี้ จะมี 24 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติก 19 สายพันธุ์ ซึ่งทดสอบด้วยวิธีอาการ์สปอทเทสต์ (agar spot test) และเวลล์ ดิฟฟิวชันแอสเซย์ (well diffusion assay) และภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดอิทธิพลของกรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอฟาส (bacteriophages) *Lactobacillus* 7 ไอโซเลต จะแสดงความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียได้ เนื่องจากเชื้อพวกนี้ผลิตสารที่คล้ายกับแบคเทอริโอซิน

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. (2000) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารพื้นบ้าน ที่มีคุณสมบัติในการผลิตแบคเทอริโอซิน ภายใต้สภาวะที่มีการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์ สารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตขึ้นได้จากแบคทีเรีย 1 สายพันธุ์ ซึ่งก็คือ *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งเชื้อนี้ผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งไวต่อเอนไซม์โปรติโอไลติก (proteolytic enzymes) ทนความร้อน และมีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียที่จำเพาะ โดยแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จาก *L. lactis* subsp. *lactis* มีคุณสมบัติในการฆ่าเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* (TISTR 473) โดยไม่ต้องทำลายเซลล์ แบคเทอริโอซินจะถูกตรวจสอบได้เป็นครั้งแรกในช่วงล๊อก เฟส (log phase) และจะมีความสามารถในการฆ่าเชื้อได้สูงสุดในช่วงสเตชั่นนารี่ เฟส (stationary phase)

Bromberg, R. et al (2004) ได้คัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคเทอริโอซินด้วยวิธีแซนวิช (sandwich test) จากตัวอย่างเนื้อ และผลิตภัณฑ์จากเนื้อทั้งหมด 285 ตัวอย่าง พบว่า ใน 174 ตัวอย่าง จะสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ 813 สายพันธุ์ เชื้อที่แยกได้จะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* CTC33 และ/หรือ *Listeria innocua* Lin 11 เมื่อมีการ

ทดสอบด้วยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์ (well-diffusion assay) พบว่าเชื้อ 128 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่เป็นดัชนีได้ เชื้อที่คัดแยกได้นี้จะสามารถยับยั้งเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแกรมลบ *S. aureus* จะไวต่อการทดสอบมากสุด ขณะที่ *Enterococcus faecalis* และ *Lactobacillus plantarum* จะทนได้มากสุด สารประกอบทั้งหมดที่ผลิตขึ้นจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกจะถูกยับยั้งการทำงานบางส่วนหรือทั้งหมดด้วยเอนไซม์โปรติโอไลติกบางชนิด

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และวัสดุที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 เครื่องแก้ว

1) หลอดทดลอง (Test tube) ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

2) หลอดทดลองฝาเกลียว (Screwcap tube) ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

3) บีกเกอร์ (Beaker) ขนาด 50 100 250 500 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

4) จานอาหารเลี้ยงเชื้อ (Petri dish or Plate) ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

5) ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) ขนาด 250 และ 500 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

6) ขวดวัดปริมาตร (Volumetric flask) ขนาด 100 และ 1000 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

7) ปิเปต (Pipette) ขนาด 1 2 5 10 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

8) บิวเรต (Buret) และขาตั้งบิวเรต

9) กรวยแก้ว (funnel)

10) กระบอกตวง (Graduate cylinder) ขนาด 10 100 250 มิลลิลิตร ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

11) ขวดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

12) แท่งแก้ว (Stirring rod) ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

13) หลอดหยดสาร (Dropper) ยี่ห้อ Pyrex บริษัท Bibby ประเทศอังกฤษ

3.1.2 อุปกรณ์

1) ห่วงเขี่ยเชื้อ (Loop)

2) ตะแกรงใส่หลอดทดลอง (Test tube rack)

3) ปากคีบ (Forcept)

4) ช้อนตักสาร (Spatular)

5) หลอดไมโคร (Micro tube)

6) เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) รุ่น Testr 10 บริษัท Oakton ประเทศอังกฤษ

7) กระดาษฟอยล์ (Foil paper)

8) พาราฟิล์ม (Para film)

9) สำลี

10) ตะเกียงแอลกฮอล์

11) เครื่องชั่งละเอียด (ทศนิยม 4 ตำแหน่ง) รุ่น AE - 200 บริษัท Mettler ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

12) กล้องจุลทรรศน์ (microscope compound)

13) ตู้อบลมร้อน (Hot air oven)

14) ตู้เขี่ยเชื้อ (Laminar flow)

15) ตู้บ่มเชื้อ (Incubator)

16) ตู้เย็น (Refrigerator)

17) หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น LS-2D บริษัท Rexell Industries ประเทศไต้หวัน

18) กระบอกใส่ปิเปต (Pipette container)

19) กล่องใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ

20) ขวดน้ำกลั่น

21) แปรงล้างขวดและน้ำยาล้างจาน

22) เครื่องสแปคโตโฟโตมิเตอร์ (Spectophotometer) รุ่น Spectronic 21 บริษัท Milton Rok Company ประเทศสหรัฐอเมริกา

23) เครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูง พีเค 131อาร์ (centrifuge PK 131 R) ประเทศฝรั่งเศส

24) ค๊อคบอเลอร์ (Cork borer)

25) ไมโครปิเปต (Micro pipette) ยี่ห้อ Eppendorf ประเทศเยอรมัน

3.1.3 สารเคมี และน้ำยาทดสอบ

1) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) บริษัทวิทยาศรม จำกัด ประเทศไทย

2) โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) บริษัทวิทยาศรม จำกัด ประเทศไทย

3) ไฮโดรคลอริก (HCl) บริษัทวิทยาศรม จำกัด ประเทศไทย

4) คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) บริษัท Fluka Chemie ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

5) ไอโอดีน (Iodine) บริษัท APS Ajex Finechem ประเทศออสเตรเลีย

6) แอลกอฮอล์เข้มข้น (Alcohol) 95 เปอร์เซนต์ โรงกลั่นอยุธยา

7) ซาฟรานิน โอ (Safranin O) บริษัท Fluka Chemie ประเทศสวิสเซอร์แลนด์

8) น้ำมันอิมเมอชั่น (Immersion oil) บริษัท Carlo erba

9) กลีเซอรอล (Glycerol) บริษัท APS Ajex Finechem ประเทศออสเตรเลีย

10) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ บริษัท Carlo erba

3.1.4 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดดีแมนโรโกซาเชฟ (เอ็มอาร์เอส) อาการ์ (de Mann Rogosa Sharpe (MRS) agar) บริษัท Hi Media Laboratories ประเทศอินเดีย

2) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวดีแมนโรโกซาเชฟ (เอ็มอาร์เอส) บรอท (de Mann Rogosa Sharpe (MRS) broth) บริษัท Hi Media Laboratories ประเทศอินเดีย

3) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนิวเทรียน (เอ็นเอ) อาการ์ (Nutrient agar (NA)) บริษัท Hi Media Laboratories ประเทศอินเดีย

4) อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนิวเทรียน (เอ็นบี) บรอท (Nutrient broth (NB)) Hi Media Laboratories ประเทศอินเดีย

3.1.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ

1) *Escherichia coli* TISTR 073

2) *Bacillus subtilis* TISTR 001

3) *Staphylococcus aureus* TISTR 517

3.1.6 ตัวอย่างที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแลคติก

1) หอยดอง มาจากในห้างสรรพสินค้า ฟิวเจอร์ปาร์คบางแค

2) แหนม มาจากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้า เดอะ มอลล์ บางแค

3) แหนม ยี่ห้อ ห้วยแก้ว

4) ปลาส้ม ยี่ห้อ คุณยายทองวัน

5) ไส้กรอกอีสาน มาจากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้า เดอะ มอลล์ บางแค

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหาร และการทำเชื้อให้บริสุทธิ์

3.2.1.1 นำตัวอย่างอาหาร 25 กรัมหรือมิลลิลิตร ใส่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ เข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์ (0.85% NaCl) ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จะได้ความเจือจางที่ 10^{-1}

3.2.1.2 ทำการเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่เหมาะสมด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 เปอร์เซนต์

3.2.1.3 ทำการโพเพลท (pour plate) ในอาหารเอ็มอาร์เอสอาการ์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.2.1.4 รีสตีท (restreak) อีกครั้งหนึ่ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.2.1.5 นำไปตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Bell et al., 2005)

3.2.2 การเก็บรักษาแบคทีเรียแลคติกโดยการแช่แข็ง

3.2.2.1 เลือกเชื้อโคโลนีเดี่ยวๆ เลี้ยงไว้บนอาหารเอ็มอาร์เอสอาการ์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เก็บไว้ที่ 4-10 องศาเซลเซียส ในห้องเย็น หรือตู้เย็น

3.2.2.2 เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ใส่ในกลีเซอรอล ความเข้มข้น 30 เปอร์เซนต์ ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ เก็บไว้ที่ –20 องศาเซลเซียส

3.2.3 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

เตรียมเชื้อโดยการเลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอสอาการ์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยว (single colony) มาตรวจสอบการติดสีแกรม (Bell et al., 2005) สังเกตรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.2.4 ศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์แคตาเลส

นำลูป (loop) เขี่ยโคโลนีที่เจริญบนอาหารเอ็มอาร์เอสอาการ์ บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ลงบนสไลด์ที่สะอาด หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ ลงบนโคโลนีของเชื้อทดสอบ

ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น ให้ผลเป็นบวก แสดงว่าเชื้อสามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส

ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น ให้ผลเป็นลบ แสดงว่าเชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์แคตาเลส

3.2.5 การตรวจหาแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 3.2.1 นำมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ โดยทดสอบด้วยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Tagg and McGiven (1971)

3.2.5.1 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เชื้อที่ใช้ทดสอบได้แก่ *Escherichia coli, Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus*

3.2.5.1.1 เลี้ยงเชื้อทดสอบในอาหารนิวเทรียนบรอท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.2.5.1.2 เจือจางเชื้อให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีค่าความขุ่น (optical density (O.D.)) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เท่ากับ 0.3 แล้วนำเชื้อทดสอบที่เจือจางแล้วปริมาตร 1 มิลลิลิตร ไปทำการโพเพลท บนอาหารนิวเทรียนอาการ์ และนำมาบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.2.5.2 การเตรียมสารยับยั้งจากแบคทีเรียแลคติก

3.2.5.2.1 นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากข้อ 3.2.1 เลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอสบรอท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.2.5.2.2 นำเชื้อจุลินทรีย์ที่เลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอสบรอท จากข้อ 3.2.5.2.1 วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วยอาหารเอ็มอาร์เอสบรอท จนได้ค่าความขุ่น เท่ากับ 0.3

3.2.5.2.3 ปิเปตสารละลายเชื้อ 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์จุลินทรีย์ออกไปด้วยความเร็ว 9,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปทำการทดสอบต่อไป

3.2.5.3 การทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์ ดัดแปลงมาจากวิธีของ Tagg and McGiven (1971)

3.2.5.3.1 ในการทดสอบจะใช้คือคบอเลอร์เจาะวุ้นจากจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการสเพรดเพลด (spread plate) เชื้อทดสอบ (มีเส้นผ่านศูนย์กลาง เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร) แล้วใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายเชื้อ (ในข้อ 4.5.2.3) ใส่ลงในหลุม 50 ไมโครลิตร ปล่อยให้สารละลายส่วนใสซึมเข้าไปในวุ้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.2.5.3.2 ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (Inhibition zone)

3.2.6 การหาความเข้มข้นของกรดแลคติกที่เชื้อผลิตได้

3.2.6.1 นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2.5 เลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วย เอ็มอาร์เอส บรอท จนได้ค่าความขุ่น เท่ากับ 0.3

3.2.6.2 ปิเปตสารละลายเชื้อจากข้อ 3.2.6.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเอ็มอาร์เอสบรอท ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์ จุลินทรีย์ออกไปด้วยความเร็ว 9,000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสไปทำการทดสอบต่อไป

3.2.6.3 นำส่วนใสในข้อ 3.2.6.2 นำไปไตเตรทด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 นอร์มอล (AOAC., 1990) โดยใช้ฟีนอลทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์

คำนวณหาเปอร์เซนต์กรด

เปอร์เซนต์กรดแลคติก = (น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก x ปริมาตรสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่ใช้ x ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ x 100)/(1,000 x ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้)

3.2.7 ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยกรดแลคติกบริสุทธิ์

เตรียมกรดแลคติกบริสุทธิ์ความเข้มข้นตามที่เชื้อบริสุทธิผลิตได้ ทำการทดสอบคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยทำการทดลองเช่นเดียวกับในข้อ 3.2.5 โดยใช้กรดแลคติกบริสุทธิ์แทนสารละลายเชื้อแบคทีเรียแลคติก

3.2.8 ศึกษาความสามารถในการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติก

3.2.8.1 อุณหภูมิ

ดัดแปลงตามวิธีของ Nowroozi, J et al (2004)

3.2.8.1.1 นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2.5 เลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วยอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท จนได้ค่าความขุ่น เท่ากับ 0.3

3.2.8.1.2 นำสารละลายเชื้อจากข้อ 3.2.8.1.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอสบรอท 100 มิลลิลิตร

3.2.8.1.3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.8.1.4 วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และ ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติก โดยทดสอบด้วยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์

3.2.8.2 ค่าความเป็นกรด-ด่าง

ดัดแปลงตามวิธีของ Nowroozi, J et al (2004)

3.2.8.2.1 นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2.5 เลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่น ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วย เอ็มอาร์เอสบรอท จนได้ค่าความขุ่น เท่ากับ 0.3

3.2.8.2.2 นำสารละลายเชื้อจากข้อ 3.2.8.2.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอสบรอท 100 มิลลิลิตร ซึ่งปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3, 5, 7, 9, 11 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริค เข้มข้น 0.1 นอร์มอล และสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 นอร์มอล

3.2.8.2.3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2.8.2.4 วัดค่าความขุ่น ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และ ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติก โดยทดสอบด้วยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์

3.2.9 ศึกษาความไวของสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติก

การทดสอบความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติกต่อความร้อนและเอนไซม์โปรติโอไลติกเปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินทางการค้า

3.2.9.1 ความร้อน

ดัดแปลงตามวิธีของ Rattanachaikunsopon, P. et al (2000)

3.2.9.1.1 นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2.5 เลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วยอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท จนได้ค่าความขุ่น เท่ากับ 0.3

3.2.9.1.2 ปิเปตสารละลายเชื้อจากข้อ 3.2.9.1.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์จุลินทรีย์ออกไป นำส่วนใสไปทำการทดสอบต่อไป

3.2.9.1.3 นำส่วนใส และแบคเทอรีโอซินทางการค้า คือ ไนซินที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ 30 นาที

3.2.9.1.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติก และแบคเทอริโอซินทางการค้า โดยทดสอบด้วยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์

3.2.9.2 เอนไซม์โปรติโอไลติก

ดัดแปลงตามวิธีของ Kojic, M. et al (1991) และRattanachaikunsopon, P. et al (2000)

3.2.9.2.1 นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากวิธีการทดลองในข้อ 3.2.5 เลี้ยงในอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร เจือจางด้วยอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท จนได้ค่าความขุ่น เท่ากับ 0.3

3.2.9.2.2 ปิเปตสารละลายเชื้อจากข้อ 3.2.9.2.1 ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงในอาหารเอ็มอาร์เอส บรอท ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์จุลินทรีย์ออกไป นำส่วนใสไปทำการทดสอบต่อไป

3.2.9.2.3 นำส่วนใส และแบคเทอริโอซินทางการค้า คือ ไนซินที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร เติมด้วยเอนไซม์โปรติโอไลติก (ทริปซิน และ โปรติเนส เค) จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร บ่มส่วนผสมที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.9.2.4 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติก และแบคเทอริโอซินทางการค้า โดยทดสอบด้วยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์

บทที่ 4
ผลการวิจัยและวิเคราะห์ข้อมูล

4.1 ศึกษาการแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักและการทำเชื้อที่ได้ให้บริสุทธิ์

ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก 5 ชนิด คือ หอยดอง มาจากในห้างสรรพสินค้าฟิวเจอร์ปาร์คบางแค แหนม มาจากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้าเดอะ มอลล์ บางแค แหนม ยี่ห้อห้วยแก้ว ปลาส้ม ยี่ห้อคุณยายทองวัน และไส้กรอกอีสาน มาจากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้า เดอะ มอลล์ บางแค โดยทำการคัดเลือกเชื้อบนอาหารเอ็มอาร์เอส บรอทที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนตลงไป และสังเกตลักษณะบริเวณยับยั้งที่เกิดบนอาหารเอ็มอาร์เอสอาการ์ จากการคัดเลือกพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้งหมดมีจำนวน 10 สายพันธุ์ ซึ่งทุกสายพันธุ์จะเจริญบนอาหารเอ็มอาร์เอสอาการ์ และทำให้เกิดบริเวณยับยั้งรอบๆ โคโลนีของเชื้อ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 2 จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อด้วยวิธีย้อมแกรม และทดสอบการผลิตเอนไซม์แคตาเลส ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงแหล่งอาหารหมัก ลักษณะโคโลนี รูปร่างของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ และผลการทดสอบแคตาเลส

แหล่งที่มา	จำนวน (สายพันธุ์)	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การย้อมแกรม	การทดสอบแคตาเลส
หอยดอง จากในห้างสรรพสินค้าฟิวเจอร์ ปาร์ค บางแค	2	H_1	กลมนูน สีขาวขุ่น	รูปร่างท่อน แกรมบวก	ลบ
		H_2	กลมแบน สีเหลือง	รูปร่างท่อน แกรมบวก	ลบ
แหนม จากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้าเดอะมอลล์ บางแค	2	N_1	กลมนูน สีเหลือง	รูปร่างกลม แกรมบวก	ลบ
		N_2	กลมนูน สีขาวขุ่น	รูปร่างท่อน แกรมบวก	ลบ

ตารางที่ 2 (ต่อ)

แหล่งที่มา	จำนวน (สายพันธุ์)	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การย้อมแกรม	การทดสอบแคตาเลส
แหนม ยี่ห้อห้วยแก้ว	2	M_1	กลมนูน สีเหลืองขุ่น	รูปร่างท่อน แกรมบวก	ลบ
		M_2	กลมนูน สีขาวขุ่น	รูปร่างท่อน แกรมบวก	ลบ
ปลาส้ม ยี่ห้อคุณยายทองวัน	2	P_1	กลมนูน สีขาวขุ่น	รูปร่างท่อน แกรมบวก	ลบ
		P_2	กลมนูน สีเหลืองขุ่น	รูปร่างกลม แกรมบวก	ลบ
ไส้กรอกอีสาน จากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้า เดอะ มอลล์ บางแค	2	S_1	กลมนูน สีขาวขุ่น	รูปร่างท่อน แกรมบวก	ลบ
		S_2	กลมนูน สีเหลืองขุ่น	รูปร่างท่อน แกรมบวก	ลบ

จากตารางที่ 2 พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทำการคัดแยกมาทั้ง 10 สายพันธุ์ มีลักษณะกลมนูน สีขาวขุ่น 5 สายพันธุ์ มีลักษณะกลมนูน สีเหลือง 1 สายพันธุ์ กลมแบน สีเหลือง 1 สายพันธุ์ มีลักษณะกลมนูน สีเหลืองขุ่น 3 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทำการตรวจดูรูปร่างและการติดสีของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จะได้แบคทีเรียแกรมบวกหมด และมีรูปร่างท่อน 8 สายพันธุ์ รูปร่างกลม 2 สายพันธุ์ ส่วนผลการทดสอบการผลิตเอนไซม์แคตาเลส ได้ผลเป็นลบทั้งหมด

4.2 ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ

จากแบคทีเรียแลคติกทั้ง 10 สายพันธุ์ที่แยกได้นำมาคัดเลือกหาสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*) โดยนำส่วนน้ำใสที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์ มาทำการทดสอบกับเชื้อทดสอบ เมื่อแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบจะเกิดเป็นโซนยับยั้งขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังแสดงตัวอย่างในภาพที่ 1

ภาพที่ 1 การเกิดโซนยับยั้งในเชื้อทดสอบ

จากผลการทดสอบพบว่า แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ มีความสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อที่แตกต่างกัน โดยเชื้อสายพันธุ์ใดที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้ก็จะเกิดบริเวณยับยั้งรอบๆหลุมที่ใส่สารละลายเชื้อที่คัดแยกได้ ซึ่งเชื้อแต่ละสายพันธุ์จะให้ผลบริเวณยับยั้งที่แตกต่างกัน ดังแสดงในตารางที่ 3

จากตารางที่ 3 แสดงผลการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยพบว่าเมื่อทำการทดสอบแบคทีเรียแลคติก 10 สายพันธุ์ มี 4 สายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้แก่ สายพันธุ์ $N_1 M_2 S_1 S_2$ และมี 5 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้แก่ สายพันธุ์ $M_2 P_1 P_2 S_1 S_2$ และมี 4 สายพันธุ์ ที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้แก่ สายพันธุ์ $N_1 M_2 S_1 S_2$ เพราะฉะนั้นจะพบว่ามี 6 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้จากทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ที่คัดแยกได้

ตารางที่ 3 ความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติก (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร)

รหัสเชื้อที่คัดแยกได้	เชื้อทดสอบ		
	E. coli	***B. subtilis***	***S. aureus***
H_1	-	-	-
H_2	-	-	-
N_1	2.4	-	2.6
N_2	-	-	-
M_1	-	-	-
M_2	2.2	2.0	2.4
P_1	-	2.0	-
P_2	-	2.2	-
S_1	2.6	2.0	2.8
S_2	2.6	1.6	3.2

หมายเหตุ - แสดงว่า ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

4.3 ศึกษาการหาความเข้มข้นของกรดแลคติกที่เชื้อผลิตได้

จากการศึกษาหาความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบพบว่ามีแบคทีเรียแลคติก 6 สายพันธุ์ จาก 10 สายพันธุ์ ที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ในการทดสอบครั้งนี้จึงได้ทำการทดสอบการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์ ว่ามีปริมาณเท่าใด โดยหมักเชื้อในอาหารเอ็มอาร์เอสอาการ์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปไตเตรทกับโซเดียมไฮดรอกไซด์ เข้มข้น 0.1 นอร์มอล ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 4

จากตารางที่ 4 พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์ ผลิตกรดได้อยู่ในช่วง 0.56 – 2.46 เปอร์เซนต์ โดย P_1 ผลิตได้ต่ำสุด 0.56 เปอร์เซนต์ และ P_2 ผลิตกรดได้สูงสุดเท่ากับ 2.46 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4 ความสามารถในการผลิตกรดของแบคทีเรียแลคติก 6 สายพันธุ์เมื่อบ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

รหัสเชื้อที่คัดแยกได้	กรดแลคติกที่คำนวณได้ (เปอร์เซนต์)
N_1	1.26
M_2	2.20
P_1	0.56
P_2	2.46
S_1	2.11
S_2	2.28

4.4 ศึกษาการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบโดยกรดแลคติกบริสุทธิ์

จากการศึกษาการใช้เปอร์เซนต์กรดแลคติกบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 0.5 0.56 1.26 2.11 2.20 2.28 2.46 2.50 และ 50 เปอร์เซนต์ (ช่วงความเข้มข้นที่แบคทีเรียแลคติกผลิตได้) ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่ากรดแลคติกบริสุทธิ์สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดังแสดงผลการทดสอบในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร)

เชื้อทดสอบ	กรดแลคติกบริสุทธิ์ที่ใช้ (เปอร์เซนต์)								
	0.5	**0.56**	**1.26**	**2.11**	**2.20**	**2.28**	**2.46**	**2.5**	**50**
E . coli	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B . subtilis	-	-	-	-	-	-	-	1.63	2.33
S . aureus	-	-	-	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ - แสดงว่า ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

จากตารางที่ 5 พบว่ากรดแลคติกบริสุทธิ์ที่ความเข้มข้น 0.5 ถึง 2.46 เปอร์เซนต์ ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ จึงเป็นไปได้ว่า แบคทีเรียแลคติกอาจผลิตสารบางชนิดที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยที่ไม่ใช่ผลของกรดที่แบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้น

4.5 ศึกษาความสามารถในการผลิตสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติก

4.5.1 อุณหภูมิ

เมื่อเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีการแปรอุณหภูมิเป็น 30 37 และ45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสมาทดสอบกับเชื้อทดสอบ จะได้ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร)

รหัสเชื้อที่คัดแยกได้	**ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่อุณหภูมิต่างๆ**								
	E. coli			***B. subtilis***			***S. aureus***		
	30 °C	**37 °C**	**45 °C**	**30 °C**	**37 °C**	**45 °C**	**30 °C**	**37 °C**	**45 °C**
N_1	1.14	2.40	-	-	-	-	-	2.60	-
M_2	2.00	2.20	-	1.20	2.00	-	2.14	2.40	-
P_1	1.74	-	-	1.60	2.00	1.80	-	-	-
P_2	2.00	-	-	-	2.20	1.20	-	-	-
S_1	2.00	2.60	1.34	1.54	2.00	1.40	1.74	2.80	-
S_2	2.26	2.60	1.34	1.54	1.60	1.40	1.74	3.20	-

หมายเหตุ - แสดงว่า ไม่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ

จากตารางที่ 6 พบว่า เชื้อ N_1 มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ได้ดีเท่ากับ 2.40 เมื่อบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด เมื่อบ่มเชื้อ N_1 ที่ 37 องศาเซลเซียส เท่ากับ 2.60 แต่เชื้อ N_1 ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* ได้เลย ทั้ง 3 อุณหภูมิ

ในส่วนของ M_2 จะพบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อ M_2 มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ได้ดี เท่ากับ 2.20 คือ 37 องศาเซลเซียส ส่วน *B. subtilis* จะถูกยับยั้งได้ดี เท่ากับ 2.00 เมื่อบ่มเชื้อ M_2 ที่ 37 องศาเซลเซียส ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดเท่ากับ 2.40 เมื่อบ่มเชื้อ M_2 ที่ 37 องศาเซลเซียส

P_1 พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อมีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ได้ดี เท่ากับ 1.74 คือ 30 องศาเซลเซียส ส่วน *B. subtilis* ถูกยับยั้งได้ดี เท่ากับ 2.00 เมื่อบ่มเชื้อ P_1 ที่ 37 องศาเซลเซียส และ เชื้อ P_1 ไม่สามรถยับยั้ง *S. aureus* ได้เลยทุกอุณหภูมิที่บ่มเชื้อ

P_2 พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อ P_2 มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ได้ดี เท่ากับ 2.00 คือ 30 องศาเซลเซียส ส่วน *B. subtilis* ถูกยับยั้งได้ดีเมื่อบ่มเชื้อ P_2 ได้ดี เท่ากับ 2.20 เมื่อบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส แต่ทุกอุณหภูมิของการบ่ม P_2 ไม่มีความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ได้เลย

S_1 พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อ S_1 มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ได้ดี เท่ากับ 2.60 คือ 37 องศาเซลเซียส ส่วน *B. subtilis* จะถูกยับยั้งได้ดี เท่ากับ 2.00 ที่ 37 องศาเซลเซียส และที่ 37 องศาเซลเซียสของการบ่มเชื้อ S_1 จะยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดเท่ากับ 2.80

S_2 พบว่าอุณหภูมิที่ทำให้เชื้อ S_2 มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli* ได้ดี เท่ากับ 2.60 คือ 37 องศาเซลเซียส ส่วน *B. subtilis* จะถูกยับยั้งได้ดี เท่ากับ 1.60 เมื่อบ่มเชื้อ S_2 ที่ 37 องศาเซลเซียส และเชื้อ S_2 ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดเท่ากับ 3.20 เมื่อบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส

จากผลการทดสอบ พบได้ว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมสุดที่มีผลต่อการผลิตและการทำงานของสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียแลคติก เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส หากช่วงของอุณหภูมิไม่เหมาะสมก็อาจส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของสารยับยั้งได้

4.5.2 ค่าความเป็นกรด – ด่าง

ทำการศึกษาปัจจัยทางด้านของค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่ส่งผลต่อประสิทธิภาพการทำงานของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติก โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 5 7 9 และ 11 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำส่วนใสมาทดสอบกับเชื้อทดสอบ ได้ผลการทดสอบดังตารางที่ 7

จากตารางที่ 7 จะพบว่าเมื่อเลี้ยงเชื้อ S_1 ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3-11 จะไม่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อ *E . coli* ได้เลย โดยมีความสามารถในการยับยั้ง *B. subtilis* ได้ดีที่สุดที่ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 ซึ่งมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 1.46 ยับยั้ง

S. aureus ได้ดีที่สุดที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ซึ่งมีค่าการยับยั้งเท่ากับ 1.52 และไม่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อได้เลย เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 11

ส่วนเชื้อ S_2 จะไม่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้เลย ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3-11 แต่สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 เท่ากับ 1.40 ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 ได้ค่าเท่ากับ 2.54 และไม่สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อได้เลยเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 11

ส่วนเชื้อที่เหลือ คือ N_1, M_2, P_1 และ P_2 ไม่สามารถสร้างสารมายับยั้งเชื้อทดสอบได้เลย เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3-11

ตารางที่ 7 แสดงความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร)

รหัสเชื้อที่คัดแยกได้	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่ค่าความเป็นกรด-ด่างต่างๆ														
	3			5			7			9			11		
	E	B	S	E	B	S	E	B	S	E	B	S	E	B	S
N_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
M_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
P_2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
S_1	-	1.34	-	-	1.46	-	-	1.34	1.52	-	1.26	-	-	-	-
S_2	-	1.40	-	-	-	-	-	1.34	2.54	-	1.26	-	-	-	-

หมายเหตุ กำหนดให้ E แทน *E. coli*

B แทน *B. subtilis*

S แทน *S. aureus*

และ - แสดงว่าไม่เกิดบริเวณยับยั้ง

4.6 ศึกษาความไวของสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติก

การทดสอบความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติกต่อความร้อนและเอนไซม์โปรติโอไลติก เปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินทางการค้า

4.6.1 ความร้อน

นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มาทดสอบความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียต่อความร้อนเปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินทางการค้า โดยนำไปให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20 และ30 นาที จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์ ได้ผลการทดลองดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลของความร้อนที่มีต่อความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติก ตามระยะเวลาให้ความร้อน (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร)

เชื้อทดสอบ	เชื้อ S_1			เชื้อ S_2			สารไนซิน		
	10 นาที	20 นาที	30 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที
E. coli	1.2	-	-	1.2	1.2	-	1.4	-	-
B. subtilis	1.6	-	-	1.34	1.2	1.2	1.2	1.2	-
S. aureus	-	-	-	1.34	-	-	1.2	1.2	-

จากตารางที่ 8 พบว่า การให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที มีผลเพียงเล็กน้อยในการทำลายความสามารถของสารยับยั้งที่ผลิตขึ้นจากเชื้อรหัส S_1 S_2 และสารไนซิน ในการทำลายเชื้อ *E. coli* *B. subtilis* ความร้อนและเวลาระดับนี้มีผลในการทำลายความสามารถของสารยับยั้งที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ S_1 ในการทำลายเชื้อ *S. aureus*

การให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที มีผลในการทำลายความสามารถของสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ S_1 ในการทำลายเชื้อ *E. coli* *B. subtilis* และ *S. aureus* ระดับความร้อน และเวลาดังกล่าวมีผลในการทำลายความสามารถของสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ S_2 ในการทำลายเชื้อ *S. aureus* แต่มีผลเล็กน้อยในการทำลายเชื้อ *E. coli* *B. subtilis* ส่วนสารไนซินจะ

ถูกทำลายความสามารถ ในการทำลายเชื้อ *E. coli* แต่มีผลเล็กน้อยในการทำลายเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus*

การให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที มีผลในการทำลายความสามารถของสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ S_1 และสารไนซิน ในการทำลายเชื้อ *E. coli* *B. subtilis* และ *S. aureus* ทั้งหมด ระดับความร้อน และเวลาดังกล่าวมีผลในการทำลายความสามารถของสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ S_2 ในการทำลายเชื้อ *S. aureus* แต่มีผลเล็กน้อยในการทำลายเชื้อ *B. subtilis*

4.6.2 เอนไซม์โปรติโอไลติก

นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มาทดสอบความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียต่อเอนไซม์โปรติโอไลติกเปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินทางการค้า โดยนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อและแบคเทอริโอซินทางการค้ามาเติมด้วยเอนไซม์โปรติโอไลติก เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ด้วยวิธีเวลล์ดิฟฟิวชันแอสเซย์ โดยได้ผลการทดลองดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 ผลของเอนไซม์โปรติโอไลติกที่มีต่อความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติก (เส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง : เซนติเมตร)

เชื้อทดสอบ	**เชื้อ S_1**		**เชื้อ S_2**		**สารไนซิน**	
	ทริปซิน	**โปรติเนส เค**	**ทริปซิน**	**โปรติเนส เค**	**ทริปซิน**	**โปรติเนส เค**
E. coli	-	1.74	1.46	-	2	1.4
B. subtilis	1.46	1.4	-	1.26	-	-
S. aureus	-	1.4	-	-	-	-

จากการทดลองในตารางที่ 9 พบว่าเอนไซม์ทริปซินมีผลต่อการทำงานของสารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตจากเชื้อ S_1 โดยมีผลยับยั้งการทำลายเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* มีผลยับยั้งความสามารถของสารยับยั้งที่ผลิตจากเชื้อ S_2 โดยมีผลยับยั้งการทำลายเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* และมีผลยับยั้งการทำงานของสารไนซินที่มีต่อเชื้อ *B. subtilis* และ *S. aureus* เอนไซม์ทริปซินมีผลเพียงเล็กน้อยในการทำลายความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเชื้อ S_1 ในการทำลายเชื้อ *B. subtilis* มีผลเล็กน้อยในการยับยั้งความสามารถในการยับยั้งการทำงานของเชื้อ S_2 ใน

การทำลายเชื้อ *E. coli* และ มีผลเล็กน้อยในการยับยั้งความสามารถในการยับยั้งการทำงานของสารไนซิน ในการทำลายเชื้อ *E. coli*

เอนไซม์โปรติเนส เค มีผลต่อการทำงานของสารยับยั้งแบคทีเรียที่ผลิตจากเชื้อ S_2 โดยมีผลยับยั้งการทำลายเชื้อ *E. coli* และ *S. aureus* และมีผลยับยั้งการทำงานของสารไนซิน ที่มีต่อเชื้อ *B. subtilis* *S. aureus* เอนไซม์นี้มีผลเล็กน้อยในการยับยั้งการทำงานของสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ S_1 ในการทำลายเชื้อ *E. coli* *B. subtilis* และ *S. aureus* มีผลเล็กน้อยในการยับยั้งการทำงานของสารไนซิน ในการทำลายเชื้อ *E. coli*

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล

คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักต่างๆ 5 ชนิด คือ หอยดอง มาจากในห้างสรรพสินค้า ฟิวเจอร์ปาร์คบางแค , แหนม มาจากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้า เดอะ มอลล์ บางแค, แหนม ยี่ห้อ ห้วยแก้ว, ปลาส้ม ยี่ห้อ คุณยายทองวัน และ ไส้กรอกอีสาน มาจากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้า เดอะ มอลล์ บางแค ได้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสอาการ์ จากนั้นทำการทดสอบลักษณะต่างๆของแบคทีเรียเพื่อยืนยันลักษณะของแบคทีเรีย พบว่าเชื้อที่แยกได้มีรูปร่างกลมและท่อน แกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส จัดเป็นแบคทีเรียแลคติก (ปิ่นมณี, 2546-2547)

จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบโดยเชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก โดยใช้เกณฑ์การตัดสินจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนอาหารนิวเทรียนอาการ์ที่ผสมเชื้อทดสอบนั่นเอง จากการทดลองสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 6 สายพันธุ์ คือ N_1 M_2 P_1 P_2 S_1 และ S_2 โดยเชื้อ S_1 และ S_2 มีประสิทธิภาพยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด เท่ากับ 2.6 และ P_2 มีประสิทธิภาพยับยั้ง *B . subtilis* ได้ดีที่สุด เท่ากับ 2.2 ส่วนเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ S_2 เท่ากับ 3.2 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติกพบว่า แบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของฐาปนี และ ศิริกานต์ (2543) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นนอกสุดของเยื่อหุ้มเซลล์ (outer membrane layer) ทำให้สารยับยั้งเข้าสู่เซลล์ได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้สามารถสร้างสารที่มีผลยับยั้งการเจริญในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า การยับยั้งนั้นเกิดจากสารใด เพราะแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารหลายชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ เช่น กรดแลคติก กรดแอซิติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Daeschel, M.A., 1989 และ Jay, J.M., 1982)

เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่า P_1 มีการผลิตกรดน้อยที่สุดเท่ากับ 0.56 เปอร์เซนต์ และ P_2 มีการผลิตกรดมากที่สุดเท่ากับ 2.46 เปอร์เซนต์ การผลิตกรดแลคติกเป็นการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอนได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก (ปิ่นมณี, 2546-2547) จากนั้นทำการศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่เปอร์เซนต์ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่เชื้อผลิตจริง (0.5-2.46 เปอร์เซนต์) และมากกว่าที่เชื้อผลิตจริง (2.5 และ 50 เปอร์เซนต์) พบว่า มีเฉพาะเชื้อ *B . subtilis* เท่านั้นที่ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยใช้กรดแลคติกบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2.5 และ 50 เปอร์เซนต์ โดยความสามารถในการยับยั้งของกรดเท่ากับ 1.63 และ 2.33 ตามลำดับ แต่ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบชนิดอื่นได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติกเป็นผลมาจากสารชนิดอื่นซึ่งไม่ใช่ผลจากกรดแลคติกที่เชื้อผลิตได้ในปริมาณดังกล่าว

จากนั้นทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลในการผลิตและทำให้สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทำงานได้ดี คือ อุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิที่ทดสอบ (30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส) เชื้อทุกสายพันธุ์จะผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด โดยมีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็น 30 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ยกเว้นที่ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S . aureus* ได้ เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ซึ่งจากรายงานของ Tomas et al., 2003 พบว่าแบคทีเรียจะเจริญได้ดี ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งภายใต้สภาวะเช่นนี้ จะทำให้ได้เซลล์มีปริมาณมากสุด มีอัตราการเจริญสูงสุด และมีช่วง lag phase สั้นสุด และในรายงานยังพบอีกว่าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะเกิดขึ้นในช่วงลอกอะลิทึมเฟส (logarithmic phase) และเออลีสเตชั่นนารี่เฟส (early stationary phase) ส่วนด้านของค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่า เชื้อ S_1 และ S_2 จะผลิตสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 5 7 และ 9 โดยจะยับยั้งเชื้อ *B . subtilis* ได้ ยกเว้น S_2 เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 จะไม่สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ส่วน *S . aureus* ถูก S_1 และ S_2 ยับยั้งที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เท่านั้น แต่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 11 เชื้อทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เลย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 มีผลต่อการทำงานของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกมากที่สุด ในการยับยั้งเชื้อ *E . coli B. subtilis* และ *S .aureus* เนื่องจากช่วงอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ดังกล่าว มีผลทำให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีที่สุดและส่งผลให้ผลิตสารยับยั้งได้มากตามไปด้วย แต่ในบาง

ช่วงของอุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเชื้อบางชนิดจะไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ เนื่องจากสภาวะดังกล่าวอาจไม่เหมาะต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งก็ได้ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ความสัมพันธ์กับค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tomás, M.S.J. et al (2003) ที่รายงานว่า เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าวจะส่งผลให้เชื้อสามารถเจริญได้สูงสุด และมีช่วงแลคเฟสสั้น โดยเชื้อจะสามารถผลิตสารมายับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดีในช่วงลอกอะลิทึมเฟส และเออลีสเตชั่นนาริ่เฟส

นอกจากนี้สารบางชนิดที่ผลิตออกมา อาจไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของธิติมา และ ศิริกัญญา (2548) ที่พบว่า สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 25 37 และ 60 องศาเซลเซียส โดยจะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6-8

จากการทดสอบความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติกต่อความร้อนเปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินทางการค้า พบว่าสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ S_1 ไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนที่ระดับ 20 และ 30 นาทีมากสุด สารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ S_2 และสารไนซิน ไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนที่ระดับ 30 นาทีมากสุด ซึ่งสารที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้แต่ละสายพันธุ์จะทนความร้อนได้เป็นเวลานานแตกต่างกัน โดยสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อที่คัดแยกได้สามารถทนความร้อนได้น้อยลงเมื่อใช้เวลาเพิ่มขึ้น

จากการทดสอบความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติกต่อเอนไซม์โปรติโอไลติก เปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินทางการค้า พบว่าสารที่ผลิตจากเชื้อ S_1 ไวต่อการถูกทำลายด้วยทริปซินมากสุด สารที่ผลิตจากเชื้อ S_2 ไวต่อการถูกทำลายด้วยทริปซินมากสุด ในการทำลาย *B. subtilis* และ *S. aureus* ไวต่อการถูกทำลายด้วยโปรติเนส เค มากสุด ในการทำลาย *E. coli* และ *S. aureus* ส่วนสารไนซินพบว่า ไวต่อการถูกทำลายด้วยทริปซินมากสุด ในการทำลาย *B. subtilis* และ *S. aureus* และไวต่อการถูกทำลายด้วยโปรติเนส เค มากสุด ในการทำลาย *B. subtilis* และ *S. aureus*

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการทดลองพบว่าเชื้อ S_1 และ S_2 น่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ดีเหมาะที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่ดีทำให้อาหารหมักมีคุณภาพดี เนื่องจากเชื้อสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสียได้ในช่วงอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่กว้าง

บรรณานุกรม

บรรณานุกรม

ฐาปนี จิตภักดี และ ศิริกานต์ กันทาใจ. **การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย.** ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 2543.

ธิติมา คำจันทึก และ ศิริกัญญา จันทร์หอม. **การศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากหญ้าหมัก.** ปริญญานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี. 2547.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. แบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง. **วารสารครุศาสตร์อุตสาหกรรม**. 2547. 3 (1) : 62-69 .

ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหม็ด และอดิสร เสวตวัฒน์. การใช้ประโยชน์และการตรวจหาแบคทีเรียแลคติกในอาหาร. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า**. 2548. 23(1):88-100.

สมใจ ศิริโภค. **เทคโนโลยีการหมัก**. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพ. 2537.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. กรุงเทพฯ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 2545.

สุมาลี เหลืองสกุล. **จุลชีววิทยาทางอาหาร**. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒประสานมิตร. 2539.

AOAC. **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 15 th edition. Washington, D.C. : Association of Official Analytical Chemists Inc. 1990.

Bell, C., Neaves, P., and Williams, A.P. **Food Microbiology and Laboratory Practice**. UK : Blackwell Science Ltd. 2005.

Bromberg, R., Moreno, I., Zaganini, C.L., Delboni, R.R. and De Oliverira, J. Isolation of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Meat and Meat Products and Its Spectrum of Inhibitory Activity. **Brazilian Journal of Microbiology**. 2004. 35:137-144.

Daeschel, M.A. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. **Food Technology**. 1989. 43: 164-166.

Jay, J.M. Antimicrobial properties of diacetyl. **Applied and Environmental Microbiology**. 1982. 44: 525-532.

Kojic, M., Svircevic, J., Banina, A. and Topisirovic, L. Bacteriocin-Producing Strain of *Lactococcus lactic* subsp. *Diacitilactis* S50. **Applied and Environmental Microbiology**. 1991. 57:1835-1837.

Nowroozi, J., Mirzaii, M. and Norouzi, M. Study of *Lactobacillus* as Probiotic Bacteria. **Iranian. Journal of Public Health**. 2004. 33(2) : 1-7.

Rattanachaikunsopon, P. and Phumkhachorn, P. A. Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* Isolated from Thai Fermented Foods. **ScienceAsia.** 2000. 26:195-200.

Salminen, S. and Wright, A.V. Lactic Acid Bacteria. New York : Marcel dekker, INC. 1993.

Sarkar, P.K. and Banerjee, S. Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacterial Isolates Obtained from Natural Habitats. **Journal of Food Science and Technology.** 1996. 33(3) : 231-233.

Tagg, J.R. and McGIVEN, A.R. Assay System for Bacteriocins. **Applied Microbiology**. 1971. 21(5) : 943.

Tomás, M.S.J., Ocaña, V.S., Wiese, B. and Nader-Macías, M.E., Growth and Lactic Acid Production by Vaginal *Lactobacillus acidophilus* CRL 1259, and Inhibition of Uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Medical Microbiology** 2003. 52: 1117-1124.

http://www.gpo.or.th/rdi/htmls/LAB.html

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

ภาคผนวก ก

1. การย้อมสีแกรม (ดวงพร, 2537)

1.1 สารเคมี

1.1.1 แอมโมเนียม ออกซาเลต คริสตัล ไวโอเลต (ammonium oxalate crystal violate)

สารละลาย A คริสตัล ไวโอเลต (crystal violet) 2 กรัม

เอทิล แอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 20 มิลลิลิตร

สารละลาย B แอมโมเนียม ออกซาเลต (ammonium oxalate) 0.8 กรัม

น้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

หลังจากนั้นผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน

1.1.2 สารละลายลูกัล ไอโอดีน (lugol 's iodine solution)

ไอโอดีน (iodine) 1 กรัม

โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI) 2 กรัม

น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร

1.1.3 สารละลายซาฟรานิน-โอ (safranin-O solution)

ซาฟรานิน-โอ (safranin-O) 10 มิลลิลิตร

(2.5 เปอร์เซนต์ ของสารละลายซึ่งละลายในเอทิลแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์)

น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

1.2 วิธีการย้อมแกรม

1.2.1 ทำการเกลี่ยเชื้อ (smear) ที่ต้องการย้อมสีบนสไลด์ให้กระจายเป็นฟิล์มบางๆไม่ให้หนาแน่นมากเกินไป และปล่อยให้แห้งในอากาศ (air dry)

1.2.2 ตรึงเชื้อ (fix) ให้ติดแน่นกับสไลด์ โดยการผ่านสไลด์ที่เกลี่ยเชื้อไว้แล้วไปบนเปลวไฟอย่างรวดเร็ว 2-3 ครั้ง เพื่อไม่ให้เชื้อหลุดออกขณะย้อมสี

1.2.3 หยดสีคริสตัล ไวโอเลต บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง

1.2.4 หยดสารละลายลูกัล ไอโอดีนบนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง

1.2.5 หยดเอทิลแอลกฮอล์ ความเข้มข้น 95 เปอร์เซนต์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 วินาที ล้างน้ำสะอาด จากนั้นทำการหยดสีซาฟรานิน-โอ บนรอยเกลี่ยของเชื้อให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที แล้วเทสีทิ้ง ล้างน้ำสะอาด และซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2. การทดสอบคะตาเลส (ดวงพร, 2537)

2.1 สารเคมี

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มีส่วนประกอบดังนี้

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide)	3	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

2.2 การทดสอบคะตาเลส

2.2.1 เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบที่เลี้ยงบนอาหารแข็งอายุระหว่าง 18-24 ชั่วโมง ด้วย loop ที่ลนไฟแล้ว เกลี่ยเชื้อลงบนแผ่นสไลด์

2.2.2 หยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อ สังเกตฟองก๊าซที่เกิดขึ้น

สังเกตผล ถ้าหากเกิดฟองก๊าซขึ้น แสดงว่าได้ผลบวก
(จุลินทรีย์ผลิตเอนไซม์แคตาเลส)
ถ้าหากเกิดไม่ฟองก๊าซขึ้น แสดงว่าได้ผลลบ
(จุลินทรีย์ไม่ผลิตเอนไซม์แคตาเลส)

ข้อควรระวัง อย่าให้ลูปโลหะสัมผัสกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ อาจทำให้เกิดผลบวกเท็จ

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์ทางเคมี

ภาคผนวก ข

1. สารละลายนอร์มอลซาไลน์ ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซนต์

สารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.85 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และนำสารละลายไปทำการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

2. สารเคมีสำหรับปรับความเป็นกรด-ด่าง

2.1 สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มอล

สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 40 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร แล้วปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่นโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

2.2 สารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 1 นอร์มอล

นำสารละลายไฮโดรคลอริก 87.28 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น

3. การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก (AOAC, 1990)

3.1 การเตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

3.1.1 ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เทลงในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

3.1.2 ชั่งโพแทสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต (potassium hydrogen phathalate (KHP)) 2.0423 กรัม ละลายในน้ำกลั่น เทลงในขวดปรับปริมาตร ปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร จะได้สารละลายมาตรฐาน KHP ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล

3.1.3 ปิเปตสารละลายมาตรฐาน KHP ความเข้มข้น 0.1 นอร์มอล มา 25.00 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร นำมาไตเตรทกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ที่เตรียมไว้ โดยใช้ฟีนอลทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ คำนวณหาค่า normality ของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์

ความเข้มข้นมาตรฐานของ NaOH (N_1) = $\frac{N_2 \times V_2}{V_1}$

กำหนดให้ N_1 = ความเข้มข้นมาตรฐานของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (N)

V_1 = ปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรต

N_2 = ความเข้มข้นสารละลายมาตรฐานของ KHP (N)

V_2 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน KHP ที่ใช้ในการไตเตรต

3.2 การวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก

3.2.1 นำตัวอย่างส่วนใสที่ทำการปั่นเหวี่ยงเอาเซลล์จุลินทรีย์ออกไปแล้ว มา 2 มิลลิลิตร

3.2.2 เจือจางส่วนใสด้วยน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

3.2.3 หยดฟีนอลทาลีน 2 หยด จากนั้นไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล

3.2.4 คำนวณหาเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก

<u>วิธีคำนวณ</u>

เปอร์เซ็นต์กรดแลคติก เท่ากับ

$$\frac{\text{น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก} \times \text{ปริมาตร NaOH ที่ใช้} \times \text{ความเข้มข้นของ NaOH} \times 100}{1{,}000 \times \text{ปริมาตรของตัวอย่างที่ใช้}}$$

หมายเหตุ น้ำหนักโมเลกุลของกรดแลคติก ($C_3H_6O_3$) = 90.8

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์

วัน เดือน ปีเกิด วันที่ 11 สิงหาคม พ.ศ.2519

สถานที่เกิด เขตธนบุรี กรุงเทพมหานคร

ประวัติการศึกษา

ระดับการศึกษา	วุฒิ/สาขา	สถาบัน	ปีที่สำเร็จ
ปริญญาตรี	วท.บ. (จุลชีววิทยา)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	2541
ปริญญาโท	วท.ม. (จุลชีววิทยาประยุกต์)	มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี	2544

สถานที่ทำงาน 235 ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม อาคาร 14 ชั้น 1 ถ. เพชรเกษม บางหว้า ภาษีเจริญ กรุงเทพฯ

ตำแหน่ง อาจารย์ประจำ

ผลงานวิจัยที่ผ่านมา

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์ และ ลินดาร์ บิลเหล็ม. 2551. การผลิตนมเปรี้ยวพร้อมดื่มเสริมลูกตาล. รวมบทความวิจัยโครงการประชุมทางวิชาการ “การประชุมเสนอผลงานวิจัยของเครือข่ายบริหารการวิจัย ภาคกลางตอนล่าง ประจำปี พ.ศ.2551”. วันพุธที่ 22 ตุลาคม 2551. มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม. 52-59.

Chaikulsareewath, A. and Wongprayoon, P. 2008. Production of Brown Rice Drinking Yoghurt. Journal of Food Technology. Siam University. 1: 34-41.

Chaikulsareewath, A. and Uanote, W. 2007. Isolation of Antibacterial Activity Producing Lactic Acid Bacteria from Thai Fermented Food. 33rd Congress on Science and Technology of Thailand, October 18-20. Walailak University, Nakhon Si Thammarat. Thailand. page 264.

Chaikulsareewath, A. and Amsem, P. 2007. Production of *Wolffia globosa* Hartog & Plas Yoghurt. Journal of Food Technology. Siam University. 1: 30-36.

Chaikulsareewath, A. and Leehokseng, S. 2006. Study on Shelf-life Extension of Antimicrobial Agents-Incorporated Mung Bean Protein Film. 32nd Congress on Science and Technology of Thailand. October 10-12. Queen Sirikit National Convention Center. Bangkok. Thailand. page 264.

Chaikulsareewath, A. and Wongprayoon, P. 2005. Research and Development of Mango Wine. Journal of Food Technology. Siam University. 1: 28-35.

Chaikulsareewath, A. and Jaitan, P. 2005. Drinking Yoghurt from Roselle Juice. 1st International Conference on Fermentation Technology for Value Added Agricultural Products. March 22nd-25th. Khon Kaen. Thailand.

Chaikulsareewath, A. and Mahakachitnon, B. 2004. Studies on Tomato Wine Production. The Proceedings of 42st Kasetsart University Annual Conference. page 513-520.

การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากอาหารหมักของไทย

ISOLATION OF ANTIBACTERIAL ACTIVITY PRODUCING LACTIC ACID BACTERIA FROM THAI FERMENTED FOOD

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์[1] และวรรัฎฐ์ เอื้อนโอด

Ampun Chaikulsareewath[1] and Worrarut Uanote

[1]Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok 10160, Thailand. Email: chai_ampun@hotmail.com

บทคัดย่อ: ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียแลคติก จากอาหารหมักต่างๆ ได้แก่ หอยดอง แหนม ปลาส้ม และไส้กรอกอีสาน ได้เชื้อทั้งหมด 10 สายพันธุ์ ศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* (TISTR 073), *Bacillus subtilis* (TISTR 001) และ *Staphylococcus aureus* (TISTR 517) พบว่ามีเพียง 6 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติในการสารยับยั้งเชื้อทดสอบ คือ N_1, M_2, P_1, P_2, S_1 and S_2 โดยเชื้อสายพันธุ์ M_2, S_1 and S_2 ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด สายพันธุ์ N_1 ยับยั้งเชื้อ *E. coli* (TISTR 073) และ *S. aureus* (TISTR 517) และสายพันธุ์ P_1 และ P_2 ยับยั้ง *B. subtilis* (TISTR 001) เชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์ จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และให้ผลการทดสอบแคตาเลสเป็นลบ โดยที่เชื้อ M_2, P_1, S_1 and S_2 มีรูปร่างท่อน ส่วนเชื้อ N_1 และ P_2 มีรูปร่างกลม และเมื่อทำการทดสอบปัจจัยด้านอุณหภูมิที่มีผลต่อการทำงานของเชื้อ พบว่าเชื้อสามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีสุดในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยเชื้อสายพันธุ์ S_1 และ S_2 สามารถสร้างสารยับยั้งได้ดีสุด เมื่อเลี้ยงในสภาวะที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Abstract: Ten strains of lactic acid bacteria were isolated from fermented shell, fermented meat, fermented fish and Thai fermented sausage. The antibacterial activity of the ten strains against indicator microorganism were investigated. Indicator strains used as indicator microorganisms for antibacterial activity screening were *Escherichia coli* (TISTR 073), *Bacillus subtilis* (TISTR 001) and *Staphylococcus aureus* (TISTR 517). It was found that six strains (N_1, M_2, P_1, P_2, S_1 and S_2) exhibited good antibacterial activity against indicator microorganisms. The strains that produced antibacterial activity against indicator microorganisms were : M_2, S_1 and S_2 strains against all indicator microorganisms; strain N_1 against *E. coli* (TISTR 073) and *S. aureus* (TISTR 517); and strains P_1 and P_2 against *B. subtilis* (TISTR 001). All the six strains were found to be Gram-positive and catalase-negative while morphologically M_2, P_1, S_1 and S_2 were bacilli and N_1 and P_2 were cocci. The effect of temperature on antibacterial activity were studied. The result was found that all six strains had high antibacterial activity when they were incubate at 37 °C. The S_1 and S_2 strains had highest antibacterial activity among these isolated strains when incubated at 37 °C.

Introduction: Lactic acid bacteria (LAB) are widely distributed in the nature. In this group are included representatives of the genus *Lactobacillus, Lactococcus, Pediococcus and Leuconostoc* [1]. This certainly holds true for lactic acid bacteria, which are used throughout the world for manufacture of a wide variety of traditional fermented foods. Since they are involved in numerous food fermentations, known to man for millennia, it is assumed that

most representatives of this group do not pose any health risk to man, and are designated as GRAS (Generally Recognized as Safe) organisms. The LAB, generally considered as "food grade" organisms, show special promise for selection and implementation as protective cultures. There are many potential applications of protective cultures in various food systems [2]. During lactic acid fermentation these bacteria not only have their effect on food and flavour but they are also known to produce and excrete compounds with antimicrobial activity, such as organic acids, hydrogen peroxide and bacteriocins [3]. The objective of this study were the screening of lactic acid bacterias which have antibacterial activity from Thai fermented foods (fermented shell, fermented meat, fermented fish and Thai fermented sausage) and effect of temperature on antibacterial activity were determined.

Methodology: LAB were isolated from Thai fermented foods by appropriate dilutions with saline, plated on MRS (de Mann Rogosa Sharpe) medium containing 0.5% $CaCO_3$. Five samples of a variety of Thai fermented foods obtained from Bangkae, Thailand were analysed. They included fermented shell, 2 fermented meats, fermented fish and Thai fermented sausage. Briefly, a 25 g sample of each Thai fermented food was mixed and homogenized in 225 ml of sterile 0.85% NaCl. One milliliter was added to 9 ml of 0.85% NaCl and was diluted 10-fold by using 0.85% NaCl. One milliliter of the diluted culture was inoculated on MRS agar plate containing 0.5% $CaCO_3$ by using pour plate method. Plates were incubated at 37 °C for 24 h to allow the colonies to develop. The isolated colonies were picked up based on the formation of a clear zone around the colonies and transferred to MRS broth. They were propagated twice and streaked on MRS agar plate containing 0.5% $CaCO_3$ to check the purity of the isolates and then stored in 30% glycerol at -20 ^{o}C. These isolated strains were tested for their antibacterial activities by well diffusion assay against indicator microorganisms: *Escherichia coli* (TISTR 073), *Bacillus subtilis* (TISTR 001) and *Staphylococcus aureus* (TISTR 517). A well diffusion assay was a modification of that described by Tagg and Mc Given (1971) [4]. Pour plates were prepared from NA (nutrient agar), inoculated with overnight indicator microorganisms (OD_{660} of 0.3). Wells of 0.5 cm dia cut into the pour plates with sterile coke borer were filled with 50 µl of cell free supernatants. The plates were incubated at 37 °C and the antimicrobial activity of supernatant was detected and quantitated after 24 h by measuring the width of the clear zones around the wells. The isolated strains were examined by Gram-staining and catalase test [5]. The effect of temperature on antibacterial activity was performed. A 24 h of isolated strains were inoculated into 100 ml MRS broth. They were incubated at 30, 37 and 45 °C, respectively, for 24 h. Antibacterial activity was determined as described before.

Results, Discussion and Conclusion: According to the results, the ten lactic acid bacteria strains, which had a clear zone around the colonies, were isolated from fermented shell, 2 fermented meats, fermented fish and Thai fermented sausage. The antibacterial activity of the ten strains were investigated by using well dilution assay. It was found that six strains (N_1, M_2, P_1, P_2, S_1 and S_2) exhibited good antibacterial activity (inhibition zone) against indicator microorganisms. The strains that produced inhibition zones against indicator microorganisms were: M_2, S_1 and S_2 strains against all indicator microorganisms; strain N_1 against *E. coli* and *S. aureus*; and strains P_1 and P_2 against *B. subtilis* (Table 1). Similar results were obtained by Erdogrul and Erbilir (2006) [6], they reported that *L. casei* and *L. bulgaricus* isolates showed antibacterial activity against *E. coli, S. aureus, P. aeroginosa, B. subtilis, K. pneumonia, S. typhimurium, and E. cloacae*. All the six isolated strains were found to be Gram-positive and catalase-negative while morphologically M_2, P_1, S_1 and S_2

were bacilli and N_1 and P_2 were cocci. These results indicated us that LAB strains were capable of synthesizing inhibitive substances of pathogenic bacteria, also these inhibitive substances produced by our LAB strains act differently on the pathogenic reference indicator strains. The antimicrobial effect exerted by LAB was the production of lactic acid and reduction of pH, and acetic acid, diacetyl, hydrogen peroxide, fatty acids, aldehydes and other compounds [7, 8]. However the importance of the inhibition effected varies according to serotypes. The Gram-positive pathogenic bacteria are the most sensitive to the bacteriocin produced by LAB. The resistance of Gram-negative bacteria is attributed to the particular nature of their cellular envelope, the mechanisms of action described for bacteriocin bringing in a phenomenon of adsorption [9]. Earlier reports had shown that some bacteriocins produced by Gram-positive bacteria had a broad spectrum of activity [10, 11, 12, 13]. These variations of sensibility were due to the characteristics of indicators strains (presence or absence of receiving sites of immunoprotein) and thus in level of hurts caused by the inhibitive factor.

Table 1 Antimicrobial activity of isolated strains against *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* (diameter of inhibition zone: mm)

Isolated strains	*E. coli*	*B. subtilis*	*S. aureus*
N_1	12	-	13
M_2	11	10	12
P_1	-	10	-
P_2	-	11	-
S_1	13	10	14
S_2	13	8	16

The effect of temperature on antibacterial activity was performed. Six strains showed high antibacterial activity when they were incubated at 37°C which were optimal temperature of all strains (Table 2). The antibacterial activity related to the optimal temperature for growth of LAB. Tomás et al., 2003 [14] reported that the optimal temperature for the growth of *L. acidophilus* was at 37 °C. Under this condition, the highest biomass and growth rates, together with shorter lag phases, were obtained. The bacterial action of antibacterial substances against indicator bacterias were on logarithmic phase and early stationary phase [15]. The result showed that S_1 and S_2 strains had highest antibacterial activity among these isolated strains when incubated at 37 °C. So that, the probable application of the S_1 and S_2 strains in food fermentation would help improve flavour and produce compounds with antimicrobial activity to food spoilage organisms and pathogens.

Table 2 Effect of temperature on antimicrobial activity of isolated strains against *Escherichia coli, Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus* (diameter of inhibition zone: mm)

Isolated strains	*E. coli*			*B. subtilis*			*S. aureus*		
	30 °C	37 °C	45 °C	30 °C	37 °C	45 °C	30 °C	37 °C	45 °C
N_1	5.7	12	-	-	-	-	-	13	-
M_2	10	11	-	6	10	-	10.7	12	-
P_1	8.7	-	-	8	10	9	-	-	-
P_2	10	-	-	-	11	6	-	-	-
S_1	10	13	6.7	7.7	10	7	8.7	14	-
S_2	11.3	13	6.7	7.7	8	7	8.7	16	-

References:

1. B. Lee, Bacteria-based processes and products. In: Fundamentals of Food Biotechnology VEH, B. Lee(Ed), New York, 1996, 219-290.
2. W.H. Holzapfel, R. Geizen and U. Schillinger, *Int. J. Food Microbiol.*, 1995, **24**,343-362.
3. J. Cleveland, T. J. Montville, I. F. Nes and M. L. Chikindas, *Int. J. of Food Microbiol.*, 2001, **71**, 1-20.
4. J. R. Tagg and R. Mc Given, *Appl. Microbiol.*, 1971, **21**, 943.
5. H. J. Benson, Microbiological applications laboratory manual in general microbiology. 7th ed the McGraw-Hill, Inc. USA., 1998, 468.
6. O. Erdogrul and F. Erbilir, *Turk. J. of Biol.*, 2006, **30**, 39-44.
7. M. A. Daeschel, *Food Tech.*, 1989, **43**, 164-166.
8. J. M. Jay, *Appl. and Environ. Microbiol.*,1982. **44**, 525-532.
9. A. Savadogo, C. A. T. Ouattara, I. H. N. Bassole and A. S. Traore, *Pak. J. Nutr.*, 2004, **3**, 174-179.
10. J. R. Tagg, A. S. Dajani and L.W. Wannamaker, *Bacteriol. Rev.*, 1976, **40**, 722-756.
11. M. A. Daeschel and T. R. Klaenhamner, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1985, **50**, 1538-1541.
12. P. M. Muriana and T. R. Klaenhamner, *Appl. Environ. Microbiol.*,1991, **57**, 114-121.
13. A. I. Sanni, A. A. Onilude, S. T. Ogunbanwo and S. I. Smith, *J. Basic Microbiol.*, 1999, **39**, 189-195.
14. M. S. J. Tomás, V. S. Ocaña, B. Wiese and M. E. Nader-Macías, *J. Med Microbiol.*, 2003, **52**, 1117-1124.
15. F. H. Gao, T. Abee and W. M. Konings, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1991. **57**, 2164-2170.

Key words: lactic acid bacteria, fermented shell, fermented meat, fermented fish and Thai fermented sausage, antibacterial activity, *Escherichia coli, Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus*

Acknowledgements: We gratefully acknowledge Siam University for funding this research.