การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักที่มีความเข้มข้นเกลือสูง และศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Screening of Lactic Acid Bacteria from High-Salt Fermented Foods and Study of their Antibacterial Activity

อุษณีย์ อภิบาลแบ[1*] สมพรประเสริฐส่งสกุล[2] อภิชัย บัวชูก้าน[3] และ สมรักษ์ พันธ์ผล[4]

Usanee Apibalbae[1], Somporn Prasertsongskun[2], Apichai Buachookarn[3] and Somrak Panphon[4]

1. นักศึกษาปริญญาโท สาขาชีววิทยาประยุกต์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี 2. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี 3. อาจารย์ ภาควิชาเทคโนโลยีและการอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี 4. อาจารย์ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี

Abstract

Traditional fermented foods such as fermented fish (Budu products at different fermentation periods and Pla Jing Jung) and fermented fish intestines (Taipla) were collected from production units and local markets in Pattani Province and used as sources for the isolation of lactic acid bacteria. These fermented samples had pH between 5.18 - 6.19 and NaCl between 17.3 - 27.0%. Lactic acid bacteria were isolated using MRS agar medium containing 3 and 6 % NaCl with the addition of 1% $CaCO_3$. A total of 110 isolates of lactic acid bacteria were isolated and tested for their antibacterial activity against *Staphylococcus aureus* DMST 8840 using agar spot method. It was observed that 12 isolates (10.9%) showed growth inhibition activity against bacteria tested. Twelve lactic acid bacteria isolates which showed antibacterial activity in preliminary screening were selected and tested for antibacterial activity against *S. aureus* DMST 8840 and *Listeria monocytogenes* DMST 17303 using agar well diffusion method. It was found that twelve cell- free supernatants of lactic acid bacteria had no antibacterial activity against bacterial strains tested.

Key words: *lactic acid bacteria, fermented food, antibacterial activity*

บทคัดย่อ

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านที่มีปริมาณเกลือสูง เช่น บูดู ในช่วงอายุการหมักต่างๆ ปลาจิ้งจั้ง และไตปลา ซึ่งเก็บจากพื้นที่ผลิตและตลาดในจังหวัดปัตตานี นำมาใช้เป็นแหล่งคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ตัวอย่างอาหารหมักเหล่านี้ มี pH อยู่ระหว่าง 5.18 – 6.19 ปริมาณ NaCl อยู่ระหว่าง 17.3 - 27.0% คัดแยกแบคทีรียกรดแลคติกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มี NaCl 3% และ 6% และมี $CaCO_3$ ความเข้มข้น 1% ได้แบคทีเรียกรดแลคติก

จำนวน 110 ไอโซเลท ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* DMST 8840 ด้วยวิธี agar spot พบว่ามีจำนวน 12 ไอโซเลท (10.9%) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลท ที่มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากการทดสอบในขั้นต้น มาศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* DMST 8840 และ*Listeria monocytogenes* DMST 17303 ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า สารละลายส่วนใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลทไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ได้ทดสอบ

คำสำคัญ: *แบคทีเรียกรดแลคติก ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย*

บทนำ

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria: LAB) เป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมัก พบโดยทั่วไปในธรรมชาติ และสามารถพบได้ในระบบทางเดินหายใจ และระบบทางเดินอาหารของมนุษย์และสัตว์ (Gonzalez *et al.,* 1994) สามารถเจริญได้ดีในภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) สูง ทนต่อสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ต่ำกว่า 5 และอุณหภูมิที่สูงกว่า 37 - 40 °C (Wood and Hopzapfel, 1995) มีความสำคัญในกระบวนการหมัก เนื่องจากสามารถผลิตกรด และสารที่ให้กลิ่น และรสที่ดี จึงนิยมนำมาใช้ในการถนอมอาหาร สามารถสร้างสารได้หลายชนิดได้แก่ เอทานอล กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ และไดอะซิติล (Blam *et al.,* 1991) นอกจากนี้ยังผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทโปรตีนที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินออกมาโดยออกฤทธิ์ทำให้แบคทีเรียที่ต้องการยับยั้งเกิดการตาย (bactericidal) หรืออาจมีผลในการหยุดการเจริญของเซลล์ (bacteriostatic) จึงทำให้แบคเทอริโอซินได้รับความสนใจที่จะนำมาใช้ในการถนอมอาหารเพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค (Galvez *et al*., 2007) แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถคัดแยกได้จากแหล่งอาหารชนิดต่างๆ ได้แก่ โยเกิร์ต แป้งหมัก ธัญพืช เนื้อหมัก และผักดอง เป็นต้น (Caplice and Fitzagerald,1999) รวมทั้งจากอาหารหมักที่มี NaCl ความเข้มข้นสูง เช่น หอยดองซึ่งเป็นอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 10-15% (Østergaard *et al*., 1998) หรือการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก dochi ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักถั่วดำของประเทศไต้หวัน เป็นอาหารชนิดที่มีความเข้มข้นของ NaCl 15% (Chen *et al.,* 2006) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากอาหารแหล่งนี้สามารถสร้างแบคเทอริโอซิน (Muyanja *et al*., 2002) ภาคใต้มีผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงหลายชนิด ได้แก่ ไตปลา บูดู คาดว่าน่าจะเป็นแหล่งของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ดังนั้นการวิจัยนี้จึงทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากบูดูที่มีอายุการหมักต่างๆ ผลิตภัณฑ์บูดู และผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีความเข้มข้นของ NaCl ในปริมาณสูง และประเมินฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

วิธีการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาจิ้งจั้ง ไตปลา และบูดูที่มีระยะการหมักต่างกัน จากแหล่งผลิตและจำหน่ายในเขตจังหวัดปัตตานี วัดค่า pH ของตัวอย่างด้วย pH meter และหาค่าความเข้มข้น NaClโดยวิธีแบบ rapid test (A.O.A.C., 2000)

2. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

นำตัวอย่างบูดูปลาจิ้งจั้ง ไตปลา และบูดู ปริมาณ 10 กรัม นำมาเจือจางในสารละลาย NaCl 0.9% ปริมาตร 90 mL และเตรียมการเจือจางตามลำดับจนถึง 10^{-3} ดูดสารละลายเจือจาง ปริมาตร 1 mL นำมา pour plate บนอาหารเลี้ยง MRS agar ที่เติม $CaCO_3$ 1% และ NaCl 3% และ 6% นำบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (Chen *et al.*, 2006) คัดเลือกโคโลนีที่มีวงใสรอบๆ แล้วนำมาคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak plate ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำมาย้อมสีแบบแกรม ดูลักษณะรูปร่าง ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบ ทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) (Garbutt, 1997) ทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เก็บในอาหารวุ้นเอียง MRS agar ที่มี NaCl 3% เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เพื่อนำมาใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

3. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

3.1 ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น

ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ด้วย agar spot method (Kwaadsteniet *et al.,* 2005) โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ จำนวน 1 ลูป เพาะเชื้อลงในอาหาร MRS agar ที่มีความเข้มข้น NaCl 3% หรือ 6% ขึ้นกับแต่ละไอโซเลทของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกมา บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำมาเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ซึ่งมีวุ้น 0.75% ปริมาตร 10 mL มีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* DMST 8840 เท่ากับ 10^5 CFU/mL รอให้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เททับหน้าแข็งตัวจึงนำจานเพาะเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูบริเวณใสซึ่งเกิดขึ้นรอบๆ รายงานผลเป็นประสิทธิภาพของการยับยั้ง ตามวิธีการของ หทัยรัตน์ (2551)

$$\text{ประสิทธิภาพการยับยั้ง} = \frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$$

ประสิทธิภาพของการยับยั้ง แบ่งออกเป็น 3 ระดับ 1 หมายถึงไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง 1.1-1.9 หมายถึง ประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำ 2.0-2.9 หมายถึง ประสิทธิภาพการยับยั้งปานกลาง และ≥3.0หมายถึง ประสิทธิภาพการยับยั้งสูง

3.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

3.2.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 จากการทดสอบการยับยั้งเบื้องต้น (ในหัวข้อ 3.1) จำนวน 1 ลูป เพาะลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มี NaCl 3% ปริมาตร 10 mL ในฟลาสก์ขนาด 125 mL บ่มที่อุณภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะการเลี้ยงแบบไม่เขย่า สำหรับใช้เป็นหัวเชื้อ แล้วถ่ายหัวเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 1% (w/v) ลงในอาหารลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่มี NaCl 3% ปริมาตรของอาหาร 30 mL บรรจุในฟลาสก์ขนาด 125 mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะการเลี้ยงแบบไม่เขย่า วัดค่า pH แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใส (cell-free supernatant: CFS) ปรับ pH ให้ได้เท่ากับ 6.5-7.0 ด้วย 1N NaOH เติมเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์เป็น 1 mg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำไป

ทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 และ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 โดยวิธี agar well diffusion (Ohmomo *et al.*,1998)

3.2.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

นำสารละลายส่วนใสมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ *S. aureus* DMST 8840 และ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 โดยวิธี agar well diffusion (Ohmomo *et al.*,1998) โดยการนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิด เลี้ยงในอาหาร Tryptic Soy Broth (TSB) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง นำอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียทดสอบผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy agar (TSA) ซึ่งมีวุ้น 0.75% ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียทดสอบเป็น 10^5 CFU/mL นำอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA ดังกล่าวปริมาตร 10 mL มาเททับบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ปริมาตร 20 mL ที่เตรียมไว้แล้ว ทิ้งให้อาหารแข็งแล้วเจาะหลุม (well) ให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร หยด CFS ปริมาตร 70 µL ลงไปในหลุม ชุดควบคุมจะใช้อาหารส่วนใส MRS broth ที่ปราศจากเชื้อ และ Chloramphenicol (100 µg/mL) เป็นชุดควบคุมผลลบ (negative control) และชุดควบคุมผลบวก (positive control) ตามลำดับ นำไปบ่มที่ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยสังเกตบริเวณใสที่เกิดขึ้นรอบๆ หลุม

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

จากการนำตัวอย่างบูดูและผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ผลิตในจังหวัดปัตตานี ได้แก่ บูดู ปลาจิ้งจั้ง และไตปลา จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 80 ตัวอย่าง สำหรับใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก วัดความเข้มข้น NaCl และวัดค่า pH พบว่า บูดูมีความเข้มข้นของ NaCl อยู่ระหว่าง 17.3 -27.1 % และ มีค่า pH อยู่ในช่วง 5.26 - 6.19 ไตปลามีความเข้มข้นของ NaCl อยู่ระหว่าง 24 - 25 % pH 5.70 - 5.73 และปลาจิ้งจั้งมีความเข้มข้นของ NaCl อยู่ระหว่าง 21-22 % และ pH 5.18-5.22 (ตารางที่ 1)

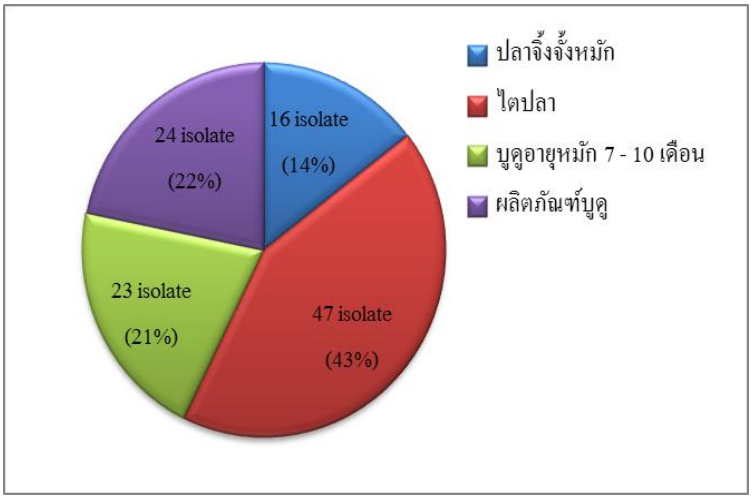
ตารางที่ 1 ตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ประเภทอาหารหมัก	จำนวนตัวอย่าง	pH	ความเข้มข้น NaCl (%)
บูดูหมักนาน 1- 3 เดือน	28	5.26 - 5.91	17.3 – 23.4
บูดูหมักนาน 4 - 6 เดือน	16	5.33 - 5.77	21.8 - 27.1
บูดูหมักนาน 7 - 10 เดือน	9	5.24 - 5.72	18.0 - 22.4
ผลิตภัณฑ์บูดู	14	5.73 - 6.19	21.2 - 26.6
ไตปลา	10	5.70 - 5.73	24.8 - 25.0
ปลาจิ้งจั้ง	2	5.18 - 5.22	21.8- 22.0

2. **การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก**

จากการศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักประกอบด้วย บูดู ปลาจิ้งจั้ง และไตปลา ที่อายุการหมักต่างๆ กัน โดยใช้อาหาร MRS agar 3% และ 6% พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแล

คติกได้ 110 ไอโซเลท โดยคัดแยกได้จากปลาจิ้งจั้ง จำนวน 16 ไอโซเลท ไตปลา จำนวน 48 ไอโซเลท บูดูหมักนาน 7-10 เดือน จำนวน 23 ไอโซเลท และผลิตภัณฑ์บูดู จำนวน 24 ไอโซเลท (ภาพที่ 1) จากจำนวนเชื้อทั้งหมดนี้ เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มี NaCl 3 % มีจำนวน 48 ไอโซเลท (43 %) และจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่มี NaCl 6 % มีจำนวน 62 ไอโซเลท (57 %)



ภาพที่ 1 จำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักชนิดต่างๆ ที่มีปริมาณเกลือ (NaCl) สูง

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักที่มีเกลือสูง ส่วนใหญ่จะใช้อาหาร MRS ที่มีส่วนผสมของ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันไป เช่น การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทนเค็มจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักตั้งแต่อายุ 1, 3, 5, 7, 9 และ 12 เดือนจากโรงงานผลิตในจังหวัดระยอง ใช้อาหาร MRS agar ที่มี NaCl 5% และ 10% ร่วมด้วย $CaCO_3$ ความเข้มข้น 0.5% (Natteewan *et al.,* 2010, Thongsanit *et al.,* 2002) หรือ การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากซอสถั่วเหลือง โดยใช้ตัวอย่างจากโรงผลิตในจังหวัด สมุทรสาคร และสมุทรปราการ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มี NaCl 5% (Tanasupawat *et al.*, 2002) การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก dochi ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักถั่วดำของประเทศไต้หวัน เป็นอาหารชนิดที่มีความเข้มข้นของ NaCl 15% คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มี NaCl 6% และ15% (Chen *et al.,* 2006) แบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้มาจากอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl ในปริมาณสูงส่วนใหญ่เป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ชอบเค็ม (halophilic lactic acid bacteria) ที่พบมาก ได้แก่ *Tetragenococcus* และ *Pediococcus* ซึ่งสามารถพบในอาหารที่มีความเค็มสูง มีรายงานว่า *Tetragenococcus* สามารถพบได้ในแหล่งที่มี NaCl 18% แยกได้จากซอสถั่วเหลือง (Tanasupawat *et al.,* 2003) และการศึกษาของ Kobayashi *et al.* (2004) พบว่า *Tetragenococcus muriaticus* และ *T. halophilus* สามารถจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl 3 - 15% โดย *T. muriaticus* สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหาร MRS broth ที่มี NaCl 7% ในขณะที่ *T. halophilus* สามารถเจริญได้สูงสุดในอาหาร MRS broth ที่มี NaCl 3 และ 7%

3. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

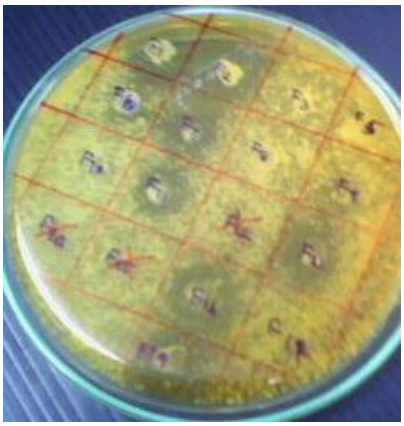
3.1 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียเบื้องต้น

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ 110 ไอโซเลท ทดสอบการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 ในขั้นต้นโดย agar spot method พบว่า มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 12 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 ให้รหัสไอโซเลทเป็น LB1 - LB12 ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 2 เมื่อพิจารณาประสิทธิภาพการยับยั้ง ซึ่งแบ่งออกเป็น 3 ระดับ คือ 1 หมายถึงไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง 1.1-1.9 หมายถึง ประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำ 2.0-2.9 หมายถึง ประสิทธิภาพการยับยั้งปานกลาง และค่าที่เท่ากับหรือมากว่า 3.0 หมายถึง ประสิทธิภาพการยับยั้งสูง พบว่า จากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 12 ไอโซเลท มี 9 ไอโอซเลท มีประสิทธิภาพการยับยั้งต่ำ 2 ไอโอซเลท มีประสิทธิภาพการยับยั้งปานกลาง และมี 1 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพการยับยั้งสูง คือ ไอโซเลท LB5 การทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 แสดงในภาพที่ 2

ตารางที่ 2 การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ โดย agar spot method

รหัสไอโซเลท	แหล่งที่มา	ลักษณะของเชื้อ	อาหารที่ใช้คัดแยก	ประสิทธิภาพการยับยั้ง* *S. aureus* DMST 8840
LB1	ผลิตภัณฑ์บูดู	Cocci	MRS + NaCl 3%	2.0
LB2	ผลิตภัณฑ์บูดู	Cocci	MRS + NaCl 3%	2.0
LB3	ผลิตภัณฑ์บูดู	Cocci	MRS + NaCl 3%	1.8
LB4	ผลิตภัณฑ์บูดู	Short rod	MRS + NaCl 3%	1.4
LB5	ผลิตภัณฑ์บูดู	Cocci	MRS + NaCl 3%	3.0
LB6	ผลิตภัณฑ์บูดู	Cocci	MRS + NaCl 3%	1.4
LB7	ผลิตภัณฑ์บูดู	Cocci	MRS + NaCl 3%	1.4
LB8	ผลิตภัณฑ์บูดู	Cocci	MRS + NaCl 3%	1.5
LB9	ผลิตภัณฑ์บูดู	Short rod	MRS + NaCl 3%	1.4
LB10	ผลิตภัณฑ์บูดู	Cocci	MRS + NaCl 3%	1.6
LB11	ไตปลาช่อน	Cocci	MRS + NaCl 3%	1.4
LB12	ไตปลาช่อน	Short rod	MRS + NaCl 3%	1.4

* ประสิทธิภาพการยับยั้ง = $\frac{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนี}}{\text{ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี}}$



ภาพที่ 2 การยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเบื้องต้น *S. aureus* โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ด้วยวิธี agar spot

3.2 การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 12 ไอโซเลท ที่ยับยั้ง *S. aureus* DMST 8840 ได้ มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ผสมด้วย NaCl ความเข้มข้น 3% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำสารละลายส่วนใสมาปรับ pH ให้เป็นกลาง และกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยเอนไซม์คะตะเลส แล้วมาทดสอบการยับยั้ง เชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 และ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/mL ด้วยวิธี agar well diffusion พบว่าสารลายส่วนใสที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลท ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบทั้ง 2 ชนิด ทั้งที่จากผลการทดสอบด้วย agar spot method ให้ผลการทดสอบเป็นบวก แสดงให้เห็นว่าการยับยั้งที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจาก กรดอินทรีย์ หรือสารอื่นๆ ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารชนิดต่างๆ ได้แก่ เอทานอล กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ และไดอะซิติล และแบคเทอริโอซิน (Blam *et al.,* 1991) นอกจากนี้ องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH และ ความเข้มข้น NaCl ส่งผลต่อการเจริญและการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลคติกอีกด้วย มีการศึกษาพบว่า ปัจจัยในการผลิตกรดแลคติกของ *T. muriaticus* และ *T. halophilus* สูงสุดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี NaCl 15% pH 6.5 – 7.5 (Kobayashi *et al.*,2004)

สรุปผล

แบคทีเรียกรดแลคติก 110 ไอโซเลท ที่คัดแยกจากอาหารหมักพื้นบ้านที่คามเข้มข้นเกลือสูง มีจำนวน 12 ไอโซเลท (10.9 %) ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *Staphylococcus aureus* DMST 8840 โดย agar spot method และสารละลายส่วนใสของแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลท ที่ผ่านการปรับ pH ให้เป็นกลาง และกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ด้วยเอนไซม์คะตะเลสนั้นไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 และ *L. monocytogenes* DMST 17303

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่สนับสนุนและให้ทุนสนับสนุนการวิจัยเพื่อวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. 2551 การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม. วิทยานิพนธ์ มหาบัณฑิตเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

A.O.A.C. 2000. The Associattion of Official Analytical Chemists 17th ed. Veginia Arlington, USA: The Association of Official Analytical Chemists, Inc.

Blom H. and Mortvedt C. 1991. Anti-microbial substances produced by food associated microorganisms. Biochemical Society Transactions, 19: 694-698.

Caplice, E. and Fitzgerald, F.G. 1999. Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. International Journal of Food Microbiology, 50: 131-149.

Chen, Y.S., Yanagida, F. and Hsu, J.S. 2006. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from dochi (fermented black beans), a traditional fermented food in Taiwan. Letters in Applied Microbiology, 43: 229-235.

Garbutt, J. 1997. Essentials of Food Microbiology. Arnold, London, England.

Hanagata, H., Shida, O. and Takagi, H. 2003. Taxonomic homogeneity of a salt-tolerant lactic acid bacteria isolated from shoyu mash. Journal of Genetic Applied Microbiology. 49: 95-100.

Kobayashi, T., Kajiwra, M., Wahyuni, M., Kitakdo, T., Hamada-sato, N., Imada, C. and Watanabe, E. 2003. Isolation and characterization of halophilic lactic acid bacteria isolated from "terasi" shrimp paste: A traditional fermented seafood product in Indonesia. Journal of Applied Microbiology, 49: 279-286.

Kwaadsteniet, M. De., Todorov, S.D., Knoetze, H., Dicks L.M.T. 2005. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by Enterococcus mundtii ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. International Journal of Food Microbiology. 105, 433– 444

Muyanja, C.M.B.K., J.A. Narvhus. J. Treimo and T. Langsrud. 2002. Isolation, characterization and identification Of lactic acid bacteria from busherra: a Ugandan traditional fermented beverage. Int. J. of Food microbiol. 2469.

Ohmomo, S., Kobayashi, M., Yajima, M., Budka, P., Suyanandana, P. and Somchai, P. 1998. Screening of thermophilic lactic acid bacteria producing bacteriocins in the Tropics. Japan Agricultural Research Quarterly, 33: 125-131.

Østergaard, A., Embarek, P.K.B, Wedell-Neergaard, C, Huss, H.H and Gram, L. 1998. Characterization of antilisterial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. Food Microbiology, 15: 223-233.

Tanasupawat, S., Thingsanit, J., Okada, S. and Komakata, K. 2002. Lactic acid bacteria isolated form soy sauce mash in Thailand. Journal of Genetic Applied Microbiology, 48: 201-209.