บทที่ 5

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ มาจาก 2 แหล่ง คือ เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้รับมาจาก รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกใหม่ โดยทำการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักดองหลายประเภท เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาร้า หอยดอง ส้มฟัก กุ้งจ่อม ผักกาดดอง ข้าวหมาก หน่อไม้ดอง ปลาส้ม จากตลาดสดต่าง ๆ ในกรุงเทพมหานคร และจังหวัดอื่น ๆ โดยใช้อาหารที่เหมาะสมต่อพวกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย คืออาหารเลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิไลเอ็มอาร์เอส คัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหาร และดูลักษณะโคโลนีที่ขึ้น จากการแยกเชื้อจากอาหารต่างๆ ได้จำนวนเชื้อทั้งหมด 149 เชื้อ นำไป streak บนอาหารแข็ง จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อจากทั้ง 2 แหล่ง มาทำการตรวจสอบลักษณะทางสันฐานวิทยา โดยการย้อมสีแกรม เพื่อดูรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซล สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อที่มีรูปร่างแท่ง (rod) มีการจัดเรียงตัวเป็นลูกโซ่ (chain) ติดสีแกรมบวก จำนวน 202 เชื้อ และกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลม (cocci) มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบคู่หรือ เป็น 4 เซล(tetrad) จำนวน 124 เชื้อ หลังจากการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยาแล้ว ได้นำเชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมดมาทำการตรวจสอบลักษณะการเจริญ สรีระวิทยา และทางชีวเคมี เพื่อจัดจำแนกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ตามแนวทางการจัดจำแนกของ Bergeys ' Manual of Systematic Bacteriology (Kandler และคณะ , 1986) และ The Prokaryote (Hammes, 1992) พบว่าเชื้อแต่ละตัวมีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ได้แตกต่างกัน แต่พบว่าเชื้อที่นำมาทดสอบทุกตัวสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส ไรโบส และ แมนโนสได้ เมื่อนำไปเทียบใน Bergeys ' Manual of Systematic Bacteriology และ The Prokaryote พบว่า เชื้อในกลุ่ม แลคติกแอซิดแบคทีเรีย สามารถใช้น้ำตาล 3 ชนิดนี้ได้ทั้งหมด เป็นผลยืนยันส่วนหนึ่งว่าเชื้อที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้เป็นเชื้อที่อยู่ในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย เชื้อในจีนัส *Pediococcus* จะมีรูปร่างแตกต่างจากเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* โดยดูจากรูปร่าง โดย เชื้อในจีนัส *Pediococcus* มีรูปร่างกลม ส่วนเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* มีรูปร่างแท่ง และพบว่าเชื้อ *L. plantarum* และ *L. pentosus* จะมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาสรีระวิทยา และชีวเคมีใกล้เคียงกันมาก สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ได้เหมือนๆกัน ยกเว้นกลีเซอรอล และ ไซโลส ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Tanasupawat และ คณะ (1992) พบว่าเชื้อ *L. pentosus* สามารถใช้กลีเซอรอล และไซโลสได้ ในขณะที่ *L. plantarum* ไม่สามารถใช้สาร 2 ตัวนี้ได้ และเชื้อในจีนัส *Pediococcus*

พบว่า เชื้อ *P. pentosaceus* สามารถใช้มอลโตส และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสได้ ส่วนเชื้อ *P. acidilactici* นั้น ไม่สามารถใช้มอลโตสได้ แต่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสได้ จึงใช้ความแตกต่างนี้แยกเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์ออกจากกันได้ แลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด สามารถจัดชนิดเป็น *L. plantarum* จำนวน 96 สปีชีส์, *L. pentosus* 92 สปีชีส์ , *L. fermentum* 8 สปีชีส์, *L. brevis* 3 สปีชีส์ , *L. sake* 3 สปีชีส์, *P. pentosaceus* 115 สปีชีส์ และ *P.acidilactici* 9 สปีชีส์

แต่เนื่องจากการจำแนกเชื้อโดยวิธีการทางชีวเคมีต้องทำการตรวจสอบมาก และบางครั้งให้อาจผลไม่แน่นอน และผลที่ปรากฏไม่สามารถจำแนกสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ได้อย่างชัดเจน ดังนั้นจึงต้องมีการ ทดสอบยืนยันเพิ่มเติมโดยใช้ Protein Profile ของเชื้อแต่ละสายพันธุ์มาเปรียบเทียบกัน เพื่อที่จะสามารถจำแนกเชื้อแต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้ โดยหลักการของวิธี protein profile คือแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างกัน จะให้รูปแบบของโปรตีนที่ต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกเชื้อแต่ละสายพันธุ์ออกจากกันได้ในระดับจีนัส และสปีชีส์ เช่นในงานวิจัยของ Jarris และ Wolff (1979) ได้ใช้วิธีนี้ในการจำแนกเชื้อ ในจีนัส *Lactococcus* sp. , Barreu และ Wagener (1990) ได้ใช้วิธีนี้ในการจำแนกเชื้อ ในจีนัส *Leuconostoc* sp. โดยข้อดีของวิธีนี้ คือ ทำได้ง่าย รวดเร็ว เชื่อถือได้ และสามารถ reproduce ได้หลายๆ ครั้ง และแต่ละครั้งจะให้ผลที่เหมือนกันในทุกๆ ครั้ง เชื้อที่ใช้ในการทดสอบเพื่อยืนยันผลทางชีวเคมีนี้จะใช้ *L. plantarum* 17 สปีชีส์, *L. pentosus* 22 สปีชีส์, *P. pentosaceus* 23 สปีชีส์ และ *P. acidilactici* 2 สปีชีส์ พบว่า รูปแบบของโปรตีนของเชื้อ 5 สายพันธุ์ มีรูปแบบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกัน ทำให้แยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ได้ โดยการดูแถบโปรตีนหลัก หรือ major protein band ในการทดลองนี้ *L. sake* ใช้เป็น negative control อีกทั้งยังมีรูปแบบโปรตีนต่างไปจากเชื้อ type strain อื่น อย่างชัดเจน จากน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนของเชื้อทั้ง 5 สปีชีส์ เราสามารถแยกความแตกต่างในระดับสปีชีส์ และระดับ ซับสปีชีส์ (subspeces) ในบางเชื้อ ในการแยกความแตกต่างระหว่างจีนัส พบว่าเชื้อ *L. plantarum* และ *L. pentosus* มีแถบของโปรตีนที่เหมือนกัน 2 แถบซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุล 66000 + 345 และ 35000 + 248 ซึ่งไม่พบใน *P. pentosaceus* และ *P. acidilactici* ซึ่งเชื้อทั้ง 2 สปีชีส์นี้มีแถบของโปรตีนที่เหมือนกัน 2 แถบมีน้ำหนักโมเลกุล 44500 + 212 และ 32200 + 316 ซึ่งไม่พบในจีนัส *Lactobacillus* ในการจำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ จากน้ำหนักโมเลกุลของเชื้อทั้ง 5 สปีชีส์ พบว่ารูปแบบโปรตีนของเชื้อในกลุ่ม *L. plantarum* พบแถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 48900 + 179 ซึ่งไม่ปรากฏในสปีชีส์อื่น แถบโปรตีนดังกล่าวนี้ อาจเป็นเอกลักษณ์ของเชื้อ *L. plantarum* ในทำนองเดียวกันแถบโปรตีนซึ่งอาจเป็นเอกลักษณ์ของเชื้อในกลุ่ม *L. pentosus* คือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 74200 + 176, 51500 + 194 และ

29500 ± 248 ในจีนัส *Pediococcus* แถบโปรตีนซึ่งอาจเป็นเอกลักษณ์ของเชื้อในกลุ่ม *P. pentosaceus* คือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 54700 ± 134 และ 16500 ± 151 และ แถบโปรตีนซึ่งอาจเป็นเอกลักษณ์ของเชื้อในกลุ่ม *P. acidilactici* คือโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 58100 ± 100 และ 30000 ± 288 จากการจำแนกเชื้อโดยการเปรียบเทียบ protein profile ของเชื้อในงานวิจัยนี้ พบว่าให้ผลสอดคล้องกับการจำแนกเชื้อโดยวิธีการทางชีวเคมีทุกเชื้อ

ในประเทศไทย มีอาหารหมักดองพื้นบ้านอยู่ทั่วทุกภาคของประเทศไทย เช่น แหนม ปลาร้า ปลาส้ม ผักกาดดอง และแบคทีเรียที่สำคัญในการหมักคือแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งสามารถผลิตกรด และสารอื่นๆ ที่มีผลต่อจุลินทรีย์อื่น ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งแยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักดองที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการถนอมอาหาร และลดการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร จากการทดลองพบว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักดองที่นำมาศึกษาสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ทดสอบได้แตกต่างกันขึ้นอยู่กับความไว (sensitivity) ของเชื้อทดสอบ โดยเชื้อทดสอบที่ใช้ คือ *E. coli, B. subtilis* และ *S. aureus* ทำการทดสอบโดยวิธี agar diffusion ในขั้นตอนนี้จะใช้เชื้อทดสอบเพียง 3 สายพันธุ์ เนื่องจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาศึกษามีเป็นจำนวนมาก จึงใช้เชื้อทดสอบเพียง 3 ตัว เพื่อเป็นการจำกัดเวลาและเพื่อที่จะลดปริมาณเชื้อลงไปได้จำนวนหนึ่ง โดยเชื้อ *E. coli* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง *B. subtilis* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง และ *S. aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม ในการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ จะทำการเลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS ในสภาพไม่มีอากาศ โดยเลี้ยงใน anaerobic jar เพื่อไม่ให้มีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ขึ้นระหว่างการเลี้ยงเชื้อ โดย Daeschel , 1986 ได้กล่าวว่า แลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ระหว่างการเจริญเติบโตได้ โดยเฉพาะเมื่อเลี้ยงเชลในสภาพที่มีอากาศโดยใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน แต่จากการทดลองพบว่าในการควบคุมภาวะการบ่ม อาจจะไม่เป็นไปแบบไร้อากาศอย่างสมบูรณ์ จึงเกิดภาวะ aerobic หรือ microaerophillic ได้ ประกอบกับเชื้อแลคติกแอซิดบางสายพันธุ์ไม่สามารถผลิตเอนไซม์คะตาเลสได้ จึงยังคงมีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ นอกจากนี้เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียยังคงผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ ๆ อื่น อีก คือ กรดอินทรีย์ และสารอื่น ๆ นอกเหนือไปจากสารประเภทแบคเทอริโอซิน ทำให้ผลการทดลองในขั้นตอนนี้ มีผล positive มาก คือเกิดการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 สายพันธุ์มาก ในการทดลองถัดมาได้ทำการปรับความเป็นกรดด่างให้เป็น 7.0 เพื่อกำจัดอิทธิพลของสภาวะที่มีความเป็นกรด-ด่างต่ำ ซึ่งเกิดจากกรดอินทรีย์ที่แลคติก

แอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้น ทำการทดสอบการยับยั้งโดยวิธีการดูดซึมของสารผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (agar diffusion) พบว่าเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar diffusion เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ จะเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบ ๆ หลุมทดสอบ ซึ่งทำให้เราทราบว่าบริเวณใสที่เกิดขึ้นนั้นเกิดจากสารที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้น ซึ่งอาจเป็นสารปฏิชีวนะ หรือแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ฆ่าหรือยับยั้งสารจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ (Kleanhammer, 1988) อย่างไรก็ตามวิธี agar diffusion นี้มีข้อจำกัด คือความสามารถในการแพร่ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ผ่านเนื้อวุ้น ซึ่งเกี่ยวข้องกับเปอร์เซ็นต์วุ้น ปริมาณความชื้นในเนื้อวุ้น น้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งจุลินทรีย์เอง หรืออาจเกิดจากความไม่เที่ยงในการเทวุ้น

การติดตามการเจริญของเชื้อ 940 ซึ่งเป็นตัวแทนของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในสปีชีส์ *Lactobacillus pentosus* พบว่า มีระยะ lag phase ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ระยะ log phase ที่ชั่วโมง 4-20 ระยะ stationary phase ที่ชั่วโมง 20-36 หลังจากชั่วโมงที่ 36 ไปแล้วเป็นระยะการลดจำนวนเซล (death phase) และศึกษาการเจริญของเชื้อ N 111 ซึ่งเป็นตัวแทนของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* พบว่า มีระยะ lag phase ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ ระยะ log phase ที่ชั่วโมง 2-14 ระยะ stationary phase ที่ชั่วโมง 14-36 หลังจากชั่วโมงที่ 36 ไปแล้วเป็นระยะการลดจำนวนเซล (death phase) เมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ กับการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์พบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จะถูกสร้างขึ้นเมื่อเชื้อเข้าสู่ระยะปลายของการเจริญแบบเพิ่มจำนวน (late log phase) และมากขึ้นเมื่อเริ่มเข้าสู่ระยะพัก (stationary Phase) ผลการทดลองสอดคล้องกับ Silva; Jacobs และ Eorbach (1987) ซึ่งกล่าวว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่แลคติกแอซิดแบคทีเรียสร้างขึ้นจัดเป็นสารที่สร้างขึ้นโดยไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญ เป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่มสารเมตาบอไรท์ทุติยภูมิ (Secondary metabolites) (Florey และคณะ, 1949)

เชื้อทดสอบ *E. coli* ATCC 25922 ซึ่งเป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่งที่ใช้ในการทดลองนี้ พบว่าเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ จึงได้ทำการทดสอบเพิ่มเติมโดยเพิ่มเชื้อทดสอบแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Salmonella derby, S. chloleraesuis , S. enteritidis , S. typhimurium* และ *Shigella flexneri* type 2a เพื่อที่จะดูว่าสารยับยั้งจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ จะสามารถยับยั้งจุลินทรีย์แกรมลบอื่น ๆ ได้หรือไม่ พบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้นั้น สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบอื่นได้แตกต่างกันไป และพบว่าแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากเชื้อในสปีชีส์ *Lactobacillus pentosus* รหัส 940 และ

Pediococcus pentosaceus รหัส N 111, N 38 และ N 279 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบในจีนัส *Salmonella* และ *Shigella* ได้มากกว่าสายพันธุ์อื่น และเกิด inhibition zone กว้างกว่าสารยับยั้งจากสายพันธุ์อื่น และเชื้อทดสอบสายพันธุ์ *Shigella flexneri* type 2a มีความไวต่อสารยับยั้งจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้มากกว่าเชื้อทดสอบตัวอื่น ๆ โดยสารยับยั้งจากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียเกือบทุกตัว สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *Shigella flexneri* type 2a นี้ได้ ซึ่งมีประโยน์ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเชื้อ *Shigella flexneri* type 2a นี้ เป็นแบคทีเรียก่อโรค (pathogenic microorganism) ที่พบมากในประเทศไทย และก่อให้เกิดโรคทางเดินอาหารซึ่งเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้

งานวิจัยนี้สนใจที่จะศึกษาดูว่า สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้ เป็นสารประเภทแบคเทอริโอซินหรือไม่ โดย Kleanhammer, 1988 ได้ให้คำจำกัดความของแบคเทอริโอซินว่า เป็นสารประเภทโปรตีน หรือสารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบร่วมอยู่ด้วย สามารถทำลายจุลินทรีย์ได้กว้างขวาง (broad spectrum) และส่วนใหญ่จะฆ่าเชื้อที่อยู่ในสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน (related microorganisms) จึงทำการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบมากชนิดขึ้น เพื่อที่จะดูว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้ เป็น broad spectrum หรือไม่ โดยใช้เชื้อทดสอบรวมทั้งหมด 7 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* ATCC 25923, *L. pentosus* ATCC 8041 , *P. pentosaceus* ATCC 33316, *Micrococcus varrians* ATCC 15306 และ *Candida albicans* ATCC 10231 จากผลการทดลองในตารางที่ 15 และ 16 พบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกได้ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 7 สปีชีส์ได้แตกต่างกัน แลคติกแอซิดแบคทีเรียจะสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบ ซึ่งส่วนใหญ่จะยับยั้งเชื้อทดสอบได้แค่ 2 สปีชีส์ และพบว่ามีแลคติกแอซิดเพียงสปีชีส์เดียวที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ถึง 4 สปีชีส์ คือ *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. pentosus* , *P. pentosaceus* ได้แก่สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ *P. pentosaceus* รหัส N 279 นอกจากนั้นยังพบว่าสารยับยั้งจุลิทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *L.pentosus* และ *P.pentosaceus* ได้มากกว่าเชื้อทดสอบชนิดอื่น คือสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียทั้งหมด 75 สปีชีส์ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ได้ 24 สปีชีส์ และยับยั้งเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ได้ 37 สปีชีส์ ซึ่งตรงกับที่ Kleanhammer, 1976 ได้กล่าวเอาไว้ และไม่พบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียสายพันธุ์ใดเลย ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้งหมดทุกตัว และพบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *Candida albicans* ซึ่งเป็นยีสต์ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Brink และคณะ, 1990 พบว่าสารยับยั้งจุนลิทรีย์จากเชื้อ

L.acidophilus M 46 สามารถยับยั้งเชื้อ *Clostridium* sp., *Listeria* sp., *Lactobacillus* sp. และ *Lactococcus* sp. ได้ดี แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อยีสต์ได้

เนื่องจากเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 และ *P. pentosaceus* ATCC 33316 เป็นเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ จึงได้ตรวจสอบดูว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 2 ตัวนี้ ในขั้นตอน secondary screening ได้นั้นสามารถที่จะฆ่าเชื้อในสภาพ resting cell ได้หรือไม่ และเนื่องจากผลการทดสอบโดยวิธี agar diffusion ไม่ชัดเจน และมีข้อจำกัดดังที่กล่าวมาข้างต้น จึงทำการทดสอบในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ ที่มีความเป็นกรดด่าง 7.0 และใช้เชื้อทดสอบในสภาพที่เป็น resting cell เพื่อลดอัตราการแพร่ของสารต่าง ๆ ผ่านเข้าออกจากเซลเชื้อทดสอบ และป้องกันไม่ให้เชื้อทดสอบนั้นเจริญเติบโตต่อไปได้อีก โดยดูการรอดชีวิตของเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 และ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ภายหลังจากที่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ในนาทีที่ 30 และทำ viable cell count เพื่อดูเชื้อที่อยู่รอด พบว่า สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ *P. pentosaceus* N 279, N 111 , N 38 และ *L. pentosus* 940 สามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ลงได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสารยับยั้งจากเชื้อตัวอื่น ๆ และ สารยับยั้งจากเชื้อ *P. pentosaceus* N 279 สามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 ลงได้อย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสารยับยั้งจากเชื้อตัวอื่น ๆ เมื่อนำมา plot graph จะเห็นได้ว่า สารยับยั้งจากเชื้อทั้ง 4 สามารถลดปริมาณเชื้อลงได้ชัดเจนเมื่อเทียบกับ control ที่ไม่มีการเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ แต่พบว่าประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อดังกล่าวนั้นค่อนข้างต่ำ เนื่องจากในขั้นตอนการทดลองได้นำสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทั้ง 4 ไปทำ freeze drying ทำให้มีความเข้มข้นขึ้น 10 เท่า แต่สามารถฆ่าเซลของเชื้อทดสอบได้ไม่มากนัก คือ ในการฆ่าเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 พบว่า สารยับยั้งจากเชื้อ *P. pentosaceus* N 279 สามารถฆ่าเชื้อทดสอบได้ 52.55 %, จากเชื้อ *P. pentosaceus* N 111 ฆ่าได้ 46.19 % , จากเชื้อ *P. pentosaceus* N 38 ฆ่าได้ 42.89 % และ จากเชื้อ *L. pentosus* 940 สามารถฆ่าได้ 37 % ของเชื้อที่ใส่ลงไปทั้งหมด ส่วนในการฆ่าเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 พบว่า สารยับยั้งจากเชื้อ *P. pentosaceus* N 279 สามารถฆ่าได้ 41.76 % ของเชื้อที่ใส่ลงไปทั้งหมด ผลดังกล่าวอาจมีผลมาจากปัจจัยต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องต่อการสร้างสารได้แก่ อาหารเลี้ยงเชื้อ ความเป็นกรดด่างของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ ซึ่งปัจจัยที่สำคัญคือแหล่งคาร์บอนของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในจำนวนแหล่งคาร์บอนที่ใช้ในการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ หรือสารปฏิชีวนะต่าง ๆ พบว่ากลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอนที่มีผลกระทบต่อการสร้างสารดังกล่าวมากที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากการใช้กลูโคสจะทำให้เกิดปรากฏการณ์ที่เรียกว่า คาตาบอไลท์รีเพรสชั่น (catabolite repression) และกลูโคสยังไปมีผลต่อเอนไซม์จำเพาะที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสร้างสารยับยั้ง

จุลินทรีย์ (Martin และ Demain, 1980) นอกจากนี้กระบวนการย่อยสลายกลูโคสโดยจุลินทรีย์จะเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดอินทรีย์ เช่น กรดอะซิติก กรดไพรูวิก ทำให้ความเป็นกรดต่างในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนไป ทำให้มีผลต่อผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นได้ (Haavik, 1974)

จากผลการทดลองในขั้นตอนการคัดเลือกปฐมภูมิ การคัดเลือกทุติยภูมิ การทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *Salmonella* sp. และ *Shigella* sp. และการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041 จะพบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ คือ *P. pentosaceus* รหัส N279, N111, N38 และ *L. pentosus* รหัส 940 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบต่างๆ ได้กว้าง (broad spectrum) และสามารถฆ่าเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ใกล้เคียงกันได้มาก เมื่อเทียบกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียในสปีชีส์อื่นๆ ดังผลที่แสดงในตารางที่ 21 ดังนั้นจึงนำสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทั้ง 4 คือ *P. pentosaceus* N 279, N 111 , N 38 และ *L. pentosus* 940 มาใช้ในการศึกษาต่อไป

ได้นำสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ *P. pentosaceus* N 279, N 111 , N 38 และ *L. pentosus* 940 ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มาก มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรตีน จากนิยามของ Klaenhammer , 1988 ที่กล่าวไว้ข้างต้นว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ประเภทแบคเทอริโอซินจะต้องเป็นสารประเภทโปรตีน จึงทำการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรตีนของสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทั้ง 4 โดยขั้นแรกจะเป็นการทำให้สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทั้ง 4 มีความบริสุทธิ์มากขึ้น โดยนำสารยับยั้งจุลินทรีย์มาทำการไดอะไลซ์ ในถุงไดอะไลซ์ที่มีขนาด molecular weight cut off ที่ 1,000 และ 10,000 ที่เลือกใช้ค่าในช่วงนี้ เพราะคาดว่าน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งจุลินทรีย์จะมีค่าอยู่ในช่วง 1,000 ถึง 10,000 ดาลตัน ทำการไดอะไลซ์เอาสารอื่นๆ ออกไปบางส่วน และเหลือสารที่เราต้องการอยู่ภายใน นำสารในถุงไดอะไลซ์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 โดยวิธี agar diffusion พบว่าไม่เกิด inhibition zone ให้เห็น แสดงว่าสารยับยั้งจากเชื้อทั้ง 4 ไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ จึงคาดว่าน้ำหนักโมเลกุลของสารยับยั้งจากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์มีแนวโน้มน้อยกว่า 1,000 ดาลตัน ซึ่งถือว่าเป็นน้ำหนักโมเลกุลที่ต่ำมาก เมื่อเทียบกับน้ำหนักของโปรตีนโดยทั่วไป จึงไม่อาจสรุปได้ว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้เป็นสารประเภทโปรตีน หรือสารประเภทใด จึงทำการทดสอบความเป็นโปรตีนของสารยับยั้งจากเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ โดยใช้เอนไซม์ที่สามารถย่อยโปรตีน คือ เอนไซม์โปรติเนส เค มาย่อยพันธะภายในสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 4 สายพันธุ์ โดยเอนไซม์โปรติเนส เคนี้จะตัดพันธะภายในสายเปปไทด์ของโปรตีนแบบสุ่ม (random) จากนั้นนำ

สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เติมเอนไซม์โปรติเนส เค และบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 โดยวิธี agar diffusion พบว่ายังคงเกิดเกิด inhibition zone ขึ้น ทั้งที่เติม และไม่เติมสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทั้ง 4 สปีชีส์ แสดงว่าไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ จึงอาจสรุปได้ว่าเอนไซม์โปรติเอส เค ไปทำลายสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทั้ง 4 ไม่ได้ จึงอาจสรุปได้ว่า สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทั้ง 4 ไม่น่าเป็นจะสารประเภทโปรตีน

จากผลการทดสอบความเป็นโปรตีนของสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทั้ง 4 พบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ มีแนวโน้มว่ามีน้ำหนักโมเลกุลต่ำกว่า 1,000 ดาลตัน และคาดว่าสารดังกล่าวไม่น่าจะเป็นสารประเภทโปรตีน แต่เป็นสารใดยังไม่ทราบแน่ชัด อาจจัดอยู่ในกลุ่มของสารจำพวก non-identified antimicrobial substances ซึ่งสารในกลุ่มนี้ส่วนใหญ่เป็นสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ และไม่เป็นสารประเภทโปรตีน (Branen, 1975 ; Reddy และ Ranganathan, 1993a, 1993b ; Hamdan และ Mikolajik ,1974 และ Silva และคณะ, 1987) สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากการทดลองนี้ควรจะนำไปศึกษาให้ทราบว่าเป็นสารประเภทใด ศึกษาในระดับโครงสร้างโมเลกุล กลไกการออกฤทธิ์ ซึ่งอาจจะเป็นประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารต่อไป เช่น นำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก โดยอาจใช้ในรูปของสารบริสุทธิ์ หรือในรูปของเชื้อที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์นั้นได้ แทนการใช้สารเคมีที่ใช้กันอยู่มากในปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย