

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการแยกเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จากอาหารหมักดองพื้นเมืองและทำเชื้อที่ได้ให้บริสุทธิ์

1.1 การรวบรวมเชื้อบริสุทธิ์

เชื้อที่รวบรวมมาทำการศึกษาในครั้งนี้มีทั้งหมด 326 เชื้อ แบ่งออกเป็น 2 จำพวก คือ พวกที่ 1 เชื้อบริสุทธิ์ที่ได้รับมาจาก รศ.ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 177 เชื้อ ดังแสดงชื่อตัวอย่าง รหัสเชื้อ และแหล่งที่มา ไว้ในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงเชื้อ รหัสเชื้อ และแหล่งที่มา ของเชื้อที่ได้รับมาจาก รศ.ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

เชื้อ	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>L.plantarum</i>	KM4-2	แทนมหนู
	F3-9	ส้มผัก
	KM20	ไส้กรอกเปรี้ยว
	KM1-1	ข้าวหมาก
	KM1-2	ข้าวหมาก
	KM-10	ผักกุ่มดอง
	P30-1	ผักกุ่มดอง
	862	ถั่วงอกดอง
	F10-1	ถั่วงอกดอง
	F2-1	หอมดอง

เชื้อ	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>L.pentosus</i>	F33-1	มัม
	FP38-2	มัม
	FP48-1	มัม
	FN4sr	มัม
	FP33-2	มัม
	FP38-1	มัม
	F35-1	ส้มฟัก
	FP40-2	แทนมหนู
	A27-2	แทนมหนู
	FN1-3	แทนมหนู
	FN3s	แทนมหนู
	FN8	แทนมหนู
	F28-1	ปลาส้ม
	847	ปลาส้ม
	852	ปลาส้ม
	A83	ปลาส้ม
	F36-1	ปลาส้ม
	F36-2	ปลาส้ม
	F37-1	ปลาส้ม
	F37-2	ปลาส้ม
	SM01	ส้มฟัก
	A35	ไส้กรอกเปรี้ยว
	865	หอมดอง
F20	หอมดอง	
870	sour durian	
872	ใบเมี่ยงหมัก	
882	ใบเมี่ยงหมัก	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อ	รหัสชื่อ	แหล่งที่มา
<i>L. pentosus</i>	940	ใบเมี่ยงหมัก
	941	ใบเมี่ยงหมัก
	FP2-1	ใบเมี่ยงหมัก
	FP11-1	ใบเมี่ยงหมัก
	FP37-4	ใบเมี่ยงหมัก
	415	ผักเสี้ยนดอง
	F11-1	ผักเสี้ยนดอง
	F11-2	ผักเสี้ยนดอง
	F18-1	ผักเสี้ยนดอง
	F18-2	ผักเสี้ยนดอง
	F19-1	ผักเสี้ยนดอง
	F21-1	หน่อไม้ดอง
	F32-1	หน่อไม้ดอง
	F32-2	หน่อไม้ดอง
	P305	หน่อไม้ดอง
	P305-1	หน่อไม้ดอง
	P332-1	หน่อไม้ดอง
P7-1	ผักกาดดอง	
<i>Lactobacillus</i> sp.	891	ແໜ່ມທູ
	P323	ແໜ່ມທູ
	RS38	ແໜ່ມທູ
	RS44	ແໜ່ມທູ
	RS48	ແໜ່ມທູ
	RS56	ແໜ່ມທູ
	RS74	ແໜ່ມທູ
	RS75	ແໜ່ມທູ

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อ	รหัสชื่อ	แหล่งที่มา
<i>Lactobacillus</i> sp.	RS77	ແຫນມທູ
	RS93	ແຫນມທູ
	RS94	ແຫນມທູ
	RS95	ແຫນມທູ
	RS96	ແຫນມທູ
	RS97	ແຫນມທູ
	RS98	ແຫນມທູ
	RS42	ປລາສັມ
	RS47	ປລາສັມ
	RS47	ປລາສັມ
	RS54	ປລາສັມ
	RS100	ປລາຈ່ອມ
	RS101	ປລາຈ່ອມ
	RS104	ປລາຈ່ອມ
	RS103	ປລາຈ່ອມ
	RS105	ປລາຈ່ອມ
	FP38-2	ມັ້ມ
	A323	ຝັກເສັ້ນດອງ
	A85-2	ກາກນ້ຳຕາລ
	W-1	ກາກນ້ຳຕາລ
	W-SG	ກາກນ້ຳຕາລ
	W-NS	ກາກນ້ຳຕາລ
FP17-2	ໂບເມັຢງຫມັກ	
M1-1	ໂບເມັຢງຫມັກ	
M2-1	ໂບເມັຢງຫມັກ	
FP51-1	ຝັກກຸ່ມດອງ	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อ	รหัสชื่อ	แหล่งที่มา
<i>L.fermentum</i>	879	ผักกาดดอง
	937	ปลาต้ม
	945	ขนมจีน
	947	ขนมจีน
	948	ขนมจีน
	950	ขนมจีน
	F10-2	ถั่วงอกดอง
	946	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
<i>L.sake</i>	890	แหนมหมู
	911	แหนมหมู
	912	แหนมหมู
<i>L.brevis</i>	A314	ไข่ปลาดอง
	P28-3	หน่อไม้ดอง
	P46-1	ผักเสี้ยนดอง
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	420	แหนมหมู
	AP-1	แหนมหมู
	AP-2	แหนมหมู
	AP-3	แหนมหมู
	AP-4	แหนมหมู
	BP-1	แหนมหมู
	N01	แหนมป้ายัน
	N12	แหนมเนื้อทิพย์
	N20	แหนมเนื้อทิพย์
N23	แหนมทิพย์เส้น	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อ	รหัสชื่อ	แหล่งที่มา
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N26	แหนมเหรียญทอง
	N38	แหนมลับแล
	N42	แหนมลับแล
	N58	แหนมวิภา
	N63	แหนมป่าขุ่น
	N78	แหนมบัวผัด
	N148	แหนมวิภา
	N153	แหนมวิภา
	N173	แหนมเทพรส
	N178	แหนม
	N186	แหนมวิภา
	N190	แหนมวิภา
	N233	แหนมเทพรส
	N283	แหนมหมู
	N302	แหนมเทพรส
	N101	ไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ
	N105	ไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ
	N232	ไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ
	N265	ไส้กรอกเปรี้ยวเนื้อ
	N106	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N110	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N111	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N121	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N124	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N128	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N140	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
N142	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อ	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	N163	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N168	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N213	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N220	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N221	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N225	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N248	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N260	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N278	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N279	ไส้กรอกเปรี้ยวหมู
	N31	ปลาต้ม
	N158	ปลาต้ม
	N202	ปลาต้ม
	N203	ปลาต้ม
	N209	ปลาต้ม
	N240	ปลาต้ม
	N243	ปลาต้ม
	N270	ปลาต้ม
	N274	ปลาต้ม
	N303	ปลาต้ม
	N287	ส้มฝัก
	N295	ส้มฝัก
	N48	เรดต้มไก่
	N73	อีโสภาพักสไก่
	N35	ผักเสี้ยนดอง
	N37	ผักเสี้ยนดอง
	N116	ผักเสี้ยนดอง
N91	ผักกาดเขียวปลีดอง	

ตารางที่ 3 (ต่อ)

ชื่อ	รหัสชื่อ	แหล่งที่มา
<i>P. acidilactici</i>	424	แหนมหมู
	N53	แหนมวิภา
<i>Pediococcus</i> sp.	C-1	ข้าวหมาก
	C-2	ข้าวหมาก
	RS03	ส้มผัก
	RS90	แหนมหมู
	RS91	แหนมหมู
	RS92	แหนมหมู
	RS109	ปลาจ่อม

พวกที่ 2 เชื้อบริสุทธิ์ที่แยกใหม่

ทำการแยกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักดองประเภทเนื้อสัตว์ ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาร้า ปลาสาม ส้มผัก หอยดอง กุ้งจ่อม และประเภทพืช ได้แก่ ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง และข้าวหมาก บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS โดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ดูลักษณะโคโลนีที่ขึ้นพบว่าสามารถแยกเชื้อจากอาหารต่างๆ ได้ทั้งหมด 149 isolates ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ชนิดของตัวอย่าง แหล่งที่มา และรหัสชื่อที่แยกด้วยตนเอง

ชนิด	แหล่งที่มา	รหัสชื่อ	วันเดือนปีที่แยก
ปลาร้า	ลพบุรี	FS4-1-FS4-2	4 ตค 38
ปลาร้า	กรุงเทพฯ	FS7-1-FS7-3	,,
กุ้งจ่อม	สุรินทร์	FS9-1-FS9-3	10 ตค 38
กุ้งจ่อม	กรุงเทพฯ	FS31-1-FS31-4	25 ตค 38
กุ้งจ่อม	กรุงเทพฯ	FS40-1-FS40-3	30 ตค 38
ไส้กรอกเปรี้ยวหมู	กรุงเทพฯ	1101	4 ตค 38
ไส้กรอกเปรี้ยวหมู	ขอนแก่น	KS28-1	26 ตค 38
ไส้กรอกเปรี้ยวหมู	กรุงเทพฯ	KS39-1-KS39-3	2 พย 38
หอยดอง	นนทบุรี	FS5-1-FS5-4	4 ตค 38
หอยดอง	กรุงเทพฯ	FS24-1-FS24-4	25 ตค 38
หอยดอง	กรุงเทพฯ	FS34-1-FS34-3	26 ตค 38
ส้มผัก	นนทบุรี	KS8-1-KS8-3	4 ตค 38
ส้มผัก	นนทบุรี	FS8-1-FS8-2	,,
ส้มผัก	ลพบุรี	KS35-1-KS35-4	2 พย 38
ปลาส้มผัก	ลพบุรี	KS19-1-KS19-5	20 ตค 38
ปลาส้มผัก	ลพบุรี	KS20-2, KS20-4	,,
ปลาส้ม	กรุงเทพฯ	KS15-1-KS15-4	19 ตค 38
ปลาส้มแผ่น	กรุงเทพฯ	KS26-1-KS26-6	26 ตค 38
ปลาส้มแผ่น	กรุงเทพฯ	KS27-1-KS27-2	,,
ปลาส้มแผ่น	กรุงเทพฯ	KS27-4-KS27-5	,,
แหนมหมู	เชียงใหม่	1003-1005	4 ตค 38
แหนมหมู	กรุงเทพฯ	1006-4009	,,
แหนมคัม	ขอนแก่น	KS13-1-KS13-4	19 ตค 38
แหนมคัม	ขอนแก่น	KS14-1-KS14-5	,,
แหนมดอนเมือง	กรุงเทพฯ	KS18-1-KS18-6	20 ตค 38
แหนมหมู	กรุงเทพฯ	KS37-1-KS37-2	2 พย 38
แหนมหมู	กรุงเทพฯ	KS48-1-KS48-2	,,
หอมดอง	กรุงเทพฯ	KS36-1-KS36-4	,,

ตารางที่ 4 (ต่อ)

ชนิด	แหล่งที่มา	รหัสเชื้อ	วันเดือนปีที่แยก
ผักกาดดอง	กรุงเทพฯ	KS10-1-KS10-5	17 ตค 38
ผักกาดดอง	กรุงเทพฯ	KS23-1-KS23-5	25 ตค 38
หน่อไม้ดอง	อ.บำเหน็จณรงค์	KS21-1-KS21-2	„
หน่อไม้ดอง	อ.บำเหน็จณรงค์	KS21-5	„
หน่อไม้ดอง	กรุงเทพฯ	KS22-1-KS22-6	„
หน่อไม้ดอง	กรุงเทพฯ	KS38-1-KS38-2	2 พย 38
ข้าวหมากธนาธิป	กรุงเทพฯ	KS11-1-KS11-5	19 ตค 38
ข้าวหมาก	เพชรบุรี	KS12-1-KS12-5	„
ข้าวหมากอนุรักษ	กรุงเทพฯ	KS16-1-KS16-5	20 ตค 38
ข้าวหมากไอยรา	กรุงเทพฯ	KS17-1	„
ข้าวหมากไอยรา	กรุงเทพฯ	KS17-3-KS17-6	„
ข้าวหมากเพชรเสวย	เพชรบุรี	KS25-1-KS25-6	25 ตค 38
ข้าวหมาก	เพชรบุรี	KS30-1-KS30-6	26 ตค 38

2. ผลการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ที่ได้ ทางอนุกรมวิธาน

2.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย ทั้ง 326 สายพันธุ์ ที่ได้รับจาก รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และจากที่แยกได้ใหม่ตามขั้นตอนการดำเนินการวิจัยข้อ 1 เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า เมื่อย้อมแกรมและตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นเซลล์ติดสีน้ำเงินของแกรมบวก เป็น แบคทีเรียรูปแท่ง (rod) 202 Isolates และแบคทีเรียรูปร่างกลม (cocci) 124 Isolates ผลแสดงในตารางที่ 5

2.2 ผลการศึกษาลักษณะการเจริญ

สังเกตลักษณะการเจริญ ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 326 สายพันธุ์ ที่ได้รับจาก รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และจากที่แยกได้ใหม่ตามขั้นตอนการดำเนินการวิจัยข้อ 1 พบว่าลักษณะ

โคโลนิบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS จะมีทั้งโคโลนีขาวขุ่น ขนาดเล็ก ขนาดกลาง และลักษณะโคโลนีเยิ้มขุ่น ขอบโคโลนีเรียบ ไม่สร้างรงควัตถุ (pigment) เมื่อดูความสามารถในการเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4 และ 8 เปอร์เซ็นต์ ผลแสดงในตารางที่ 5 พบว่าเชื้อทั้งหมด 326 สายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์ โดยสังเกตจากความขุ่นของเชื้อที่เกิดขึ้น และ พบว่าเชื้อรูปร่าง rod 11 isolates และ cocci 9 isolates สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ 8 เปอร์เซ็นต์

ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 15, 30 และ 50 องศาเซลเซียส ผลแสดงในตารางที่ 5 พบว่า เชื้อทั้งหมดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แต่มีเชื้อในบางกลุ่มที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 และ 50 องศาเซลเซียส เมื่อพิจารณาลักษณะสำคัญ (key characteristic) ที่อ้างอิงจาก The Prokaryote (Hammers และคณะ, 1992) และ Tanasupawat และคณะ (1992) พบว่า เชื้อที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เป็นพวก *L. sake* และเชื้อที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่วนใหญ่เป็นพวก *P. acidilactici* ดังนั้นจึงสามารถใช้อุณหภูมิดังกล่าวในการจำแนกเชื้อ *L. sake* และ *P. acidilactici* ออกจากสายพันธุ์อื่นได้ แต่ต้องมีการทดสอบทางชีวเคมีอื่นๆ เพิ่มเติมอีก

ความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีความเป็นกรดต่าง 4, 6 และ 9 ผลแสดงในตารางที่ 5 พบว่า เชื้อทั้ง 326 สายพันธุ์สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มตามความสามารถในการเจริญในความเป็นกรดต่างๆ โดยในกลุ่มที่ 1 สามารถเจริญในอาหารที่มีความเป็นกรดต่าง 6 และ 9 และในกลุ่มที่ 2 สามารถเจริญในอาหารที่มีความเป็นกรดต่าง 4 และ 6

เมื่อพิจารณาความสามารถในการเคลื่อนที่ของเชื้อทั้ง 326 สายพันธุ์ โดยวิธี stab เชื้อในอาหาร GYP กึ่งเหลว พบว่าเชื่อดังกล่าวทั้งหมดไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ เพราะ ไม่พบเชื้อแผ่เจริญแผ่ขยายออกนอกรอยที่ stab ไว้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 สรุปจำนวนเชื้อจากการจำแนกโดยศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และทางชีวเคมี

เชื้อ	จำนวน เชื้อ ทั้งหมด	Cell Arrange ment	Gram	จำนวนเชื้อ ที่ให้ผลบวก									
				การสลาย Esculin	Catalase test	การเจริญที่อุณหภูมิ (° C)			การเจริญที่พีเอช			การเจริญใน NaCl	
						15	30	50	4	6	9	4 %	8 %
rod	202	chain	+	188	202	196	202	-	117	202	188	202	11
cocci	124	tetrad	+	124	124	-	124	8	124	124	53	124	9

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3 ผลการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

การทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอน ชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อพื้นฐานที่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แหล่งคาร์บอนที่ใช้ทดสอบ คือ กลูโคส มอลโตส แลคโตส ไชโลส ซูโครส โรโบส อะราบีโนส ฟรุคโตส เมลิซิโทส เมลิไบโอส ราฟฟิโนส กลีเซอรอล แมนนิทอล และซอร์บิทอล ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 6 ซึ่งแสดงผลการทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ พบว่าเชื้อแต่ละเชื้อมีความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ ได้แตกต่างกัน ทำให้สามารถจำแนกเชื้อออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆ ได้ แต่พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลกลูโคส โรโบส และแมนนิทอลได้ เมื่อพิจารณาลักษณะสำคัญ (key characteristic) ที่อ้างอิงจาก The Prokaryote (Hammers และคณะ 1992) , Tanasupawat และคณะ (1992) และ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Kandler และคณะ , 1986) พบว่าเชื้อ *L. plantarum* และ *L. pentosus* มีความใกล้เคียงกันมากโดยสามารถใช้น้ำตาลได้เหมือนๆ กัน ยกเว้น กลีเซอรอล และ ไชโลส โดยรายงานของ Tanasupawat และคณะ (1992) พบว่า *L. pentosus* สามารถใช้กลีเซอรอล และ ไชโลสได้ ในขณะที่ *L. plantarum* ไม่สามารถใช้สาร 2 ตัวนี้ได้ และเชื้อในจีนัส *Pediococcus* นอกจากจะแตกต่างจากเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* โดยดูจากรูปร่างแล้ว พบว่าเชื้อ *P. pentosaceus* สามารถใช้มอลโตส และไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ส่วน *P. acidilactici* นั้นไม่สามารถใช้มอลโตสได้ แต่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสได้ จึงสามารถแยกจากแยกเชื้อทั้ง 2 ออกจากกันได้ ส่วน *L. sake* สามารถใช้น้ำตาลได้เพียง 6 ชนิด คือ อะราบีโนส เมลิไบโอส กลูโคส มอลโตส โรโบส และแมนนิทอล ในเชื้อ *L. fermentum* พบว่าไม่สามารถใช้ กลีเซอรอล แมนนิทอล และซอร์บิทอลได้ และ *L. brevis* ไม่สามารถใช้เมลิซิโทส กลีเซอรอล แมนนิทอล และซอร์บิทอลได้

ตารางที่ 6 สรุปจำนวนเชื้อที่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ

เชื้อ	จำนวนเชื้อทั้งหมด	จำนวนเชื้อที่ใช้แหล่งคาร์บอนนั้นได้														
		glu	mal	iac	xy	su	ara	fru	mez	meb	raf	gly	rib	mn	man	sor
rod	202	202	201	188	152	123	101	180	105	105	95	121	202	202	100	117
cocci	124	124	102	100	44	76	84	124	109	112	72	-	124	124	11	13

หมายเหตุ

glu = glucose mal = maltose lac = lactose xy = xylose
 su = sucrose ara = arabinose fru = fructose mez = melizitose
 meb = melibiose raf = raffinose gly = glycerol rib = ribose
 mn = mannose man = mannitol sor = sorbitol

เมื่อพิจารณาผลการใช้แหล่งคาร์บอน ลักษณะสัณฐานวิทยา ลักษณะการเจริญ
สรีระวิทยา และทางชีวเคมีอื่นๆ ประกอบดังตาราง พบว่าสามารถจำแนกเชื้อทั้งหมดออกได้
เป็น 7 กลุ่ม ความน่าจะเป็นของเชื้อที่แยกได้แสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 เชื้อ และจำนวนเชื้อที่จำแนกได้โดยวิธีการทางชีวเคมี

เชื้อ	จำนวนเชื้อที่จำแนกได้ทางชีวเคมี (isolates)
<i>L.plantarum</i>	96
<i>L.pentosus</i>	92
<i>L.fermentum</i>	8
<i>L.sake</i>	3
<i>L.brevis</i>	3
<i>P.pentosaceus</i>	115
<i>P.acidlactici</i>	9

2.4 ผลการศึกษา protein profile

นำโปรตีนของเชื้อที่จะนำมาศึกษา และโปรตีนของเชื้อ type strain มาแยก
ตามน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) โดยการทำอิเล็กโตรโฟรีซิสบนโซเดียมโดเด
ซิลซัลเฟต โพลีอะคริลาไมด์เจลแบบแผ่น (SDS-PAGE) ในรูปที่ 5 เป็น protein profile
ของเชื้อ type strain ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 5 สปีชีส์ คือ *Lactobacillus*
plantarum DSM 20174^T, *L. pentosus* DSM 20314^T, *Pediococcus pentosaceus* DSM
20336^T, *P. acidilactici* DSM 20284^T และ *L. sake* ATCC 15521^T ซึ่งใช้เป็น negative
control ของการทดลองนี้ พบว่า รูปแบบของแถบโปรตีนของเชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ จะมีรูปแบบที่
ไม่เหมือนกัน เมื่อนำมาคำนวณเป็นค่าน้ำหนักโมเลกุลโดยเทียบจาก molecular weight marker
จะได้ผลดังตารางที่ 8 พบว่าเชื้อในแต่ละสายพันธุ์จะมีโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลแตกต่างกันไป
พบว่า type strain *L. plantarum* DSM 20174^T และ *L. pentosus* DSM 20314^T จะมีแถบ
ของโปรตีนที่เหมือนกัน 2 แถบ ซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลที่ 66000 + 345 และ 35000 + 248
และใน type strain *P. pentosaceus* DSM 20336^T และ *P. acidilactici* DSM 20284^T จะพบ
แถบของโปรตีนที่เหมือนกัน 2 แถบ มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 44500 + 212 และ 32200 + 316

ส่วน type strain *L. sake* ATCC 15521^T จะไม่มีแถบของโปรตีนแถบใดเลยที่เหมือนกับเชื้อทั้ง 4 ตัวที่กล่าวมา เมื่อดูความแตกต่างของแถบของโปรตีนระหว่าง type strain ทั้ง 5 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 8 พบว่า ในเชื้อ *L. plantarum* DSM 20174^T จะมีแถบของโปรตีนที่ 1, 3 และ 5 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 77000 + 160 , 48900 + 179 และ 28000 + 110 แตกต่างไปจากเชื้ออื่น ใน *L. pentosus* DSM 20314^T จะมีแถบของโปรตีนที่ 1 และ 7 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 74200 + 176 และ 29500 + 248 แตกต่างไปจากเชื้ออื่น *P. pentosaceus* DSM 20336^T จะมีแถบที่ 1 และ 5 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 54700 + 134 และ 16500 + 151 แตกต่างไปจากเชื้ออื่น และ *P. acidilactici* DSM 20284^T จะมีแถบที่ 1, 2 และ 5 ที่มีน้ำหนักโมเลกุล 58100 + 100 , 49500 + 288 และ 30000 + 288 แตกต่างไปจากเชื้ออื่น

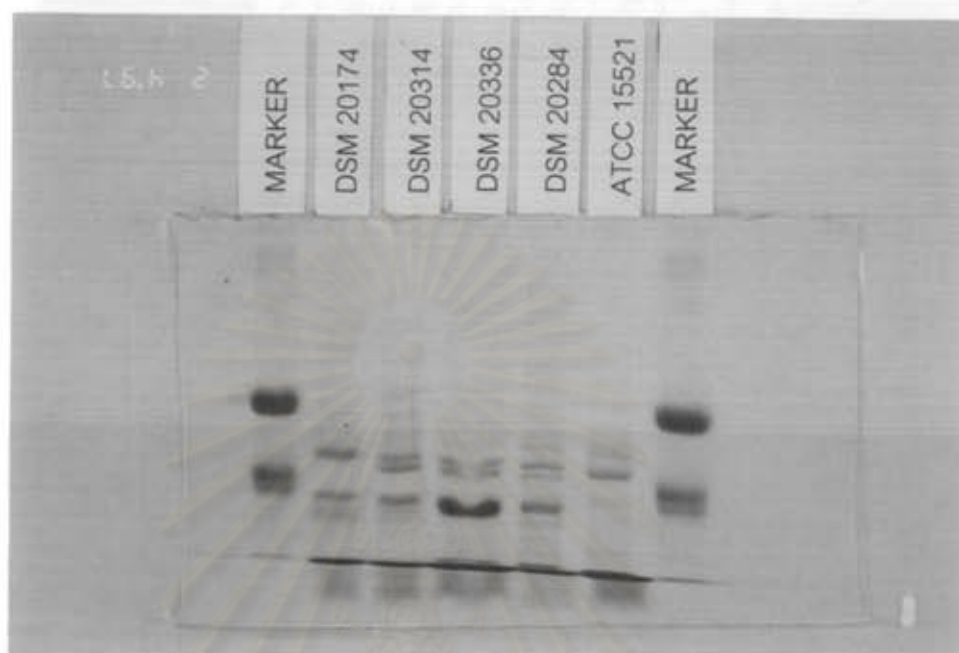
รูปที่ 6, 7, 8 และ 9 เป็นการเทียบเคียงเชื้อที่จำแนกได้โดยวิธีการทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. plantarum* จำนวน 17 สปีชีส์ กับ type strain ของ *L. plantarum* DSM 20174^T โดยการดูรูปแบบของโปรตีนของเชื้อ ในรูปที่ 6 ในแถบที่ 1 และ 8 จะเป็น molecular weight marker แถบที่ 2 เป็น type strain *L. plantarum* DSM 20174^T แถบที่ 3 เป็น type strain *L. pentosus* DSM 20314^T แถบที่ 4 เป็น type strain *L. sake* ATCC 15521^T และ แถบที่ 5, 6 และ 7 เป็นเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกโดยวิธีทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. plantarum* ส่วนในเจลที่ 7, 8 และ 9 ในแถบที่ 3, 4, 5, 6 และ 7 เป็นเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกโดยวิธีทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. plantarum* ผลการทดลองพบว่าเชื้อในกลุ่ม *L. plantarum* ที่ทดสอบทางชีวเคมี จะมีรูปแบบของโปรตีน และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ type strain จากผลเจล และตารางที่ 9 สามารถแบ่ง *L. plantarum* เป็น 3 กลุ่ม คือ ในกลุ่มที่ 1 จะมีแถบโปรตีนหลักครบทั้ง 5 เหมือนกับ type strain และมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนใกล้เคียงกับ type strain ได้แก่เชื้อที่มีรหัส F3-9, KM4-2, RS 55, 862 , RS 46, RS 74, F35-1, KM20 และ P46-1 กลุ่มที่ 2 จะไม่พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 77000 + 160 ได้แก่เชื้อที่มีรหัส RS 54, KM1-1 และ RS 56 และกลุ่มที่ 3 จะไม่พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลที่ 28000 + 110 ได้แก่เชื้อที่มีรหัส F33-1, FP 15-1, KM10, F2-1 และ FP48-1 จากการตรวจสอบดังกล่าวสรุปได้ว่าเชื้อ *L. plantarum* 17 สปีชีส์ที่ทำการตรวจสอบนี้ พบว่าแถบโปรตีนหลักที่ปรากฏใน *L. plantarum* ทุกตัว คือ แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66000 + 345 , 48900 + 179 และ 35000 + 248

ในเชื้อ *L. pentosus* จะนำเชื้อที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. pentosus* ทั้งสิ้น 22 สปีชีส์ มาเทียบเคียงกับเชื้อ Type Strain ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 10, 11, 12, 13 และ 14 และตารางที่ 10 พบว่า เชื้อในกลุ่ม *L. pentosus* ที่ทดสอบทางชีวเคมี จะมีรูปแบบของโปรตีน และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ type strain และจากผลเจล สามารถแบ่งเชื้อในกลุ่มนี้ได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 จะมีแถบโปรตีนหลักครบ เหมือนกับ type strain และมีน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีนใกล้เคียงกับ type strain ได้แก่เชื้อที่มีรหัส F18-1, P 305-1, F37-1, FP38-1, FN3s, P30-1, 941, F11-1, F32-1, 870, 865, 847, 940, FN4Sr, A83, A27-2, F18-2, F20, SM01, P305 และ 882 และในกลุ่มที่ 2 จะไม่พบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 74200 + 176 ได้แก่เชื้อที่มีรหัส 872 จากการตรวจสอบดังกล่าวอาจสรุปได้ว่าเชื้อ *L. pentosus* 22 สปีชีส์ ที่ทำการตรวจสอบนี้ พบว่าแถบโปรตีนหลักที่ปรากฏใน *L. pentosus* ทุกตัว คือ แถบโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุล 66500 + 204, 51500 + 194, 48000 + 196, 35500 + 328, 31800 + 156 และ 29500 + 248

ในเชื้อ *P. pentosaceus* จะนำเชื้อที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *P. pentosaceus* ทั้งสิ้น 23 สปีชีส์ มาเทียบเคียงกับเชื้อ Type Strain ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 15, 16, 17, 18 และ 19 และตารางที่ 11 พบว่า เชื้อในกลุ่ม *P. pentosaceus* ที่ทดสอบทางชีวเคมี จะมีรูปแบบของโปรตีน และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ type strain ทุกเชื้อ

ในเชื้อ *P. acidilactici* จะนำเชื้อที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *P. acidilactici* ทั้งสิ้น 2 สปีชีส์ มาเทียบเคียงกับเชื้อ type strain ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 20 และตารางที่ 12 พบว่า เชื้อในกลุ่ม *P. acidilactici* ที่ทดสอบทางชีวเคมี จะมีรูปแบบของโปรตีน และน้ำหนักโมเลกุลใกล้เคียงกับ type strain ทุกเชื้อ

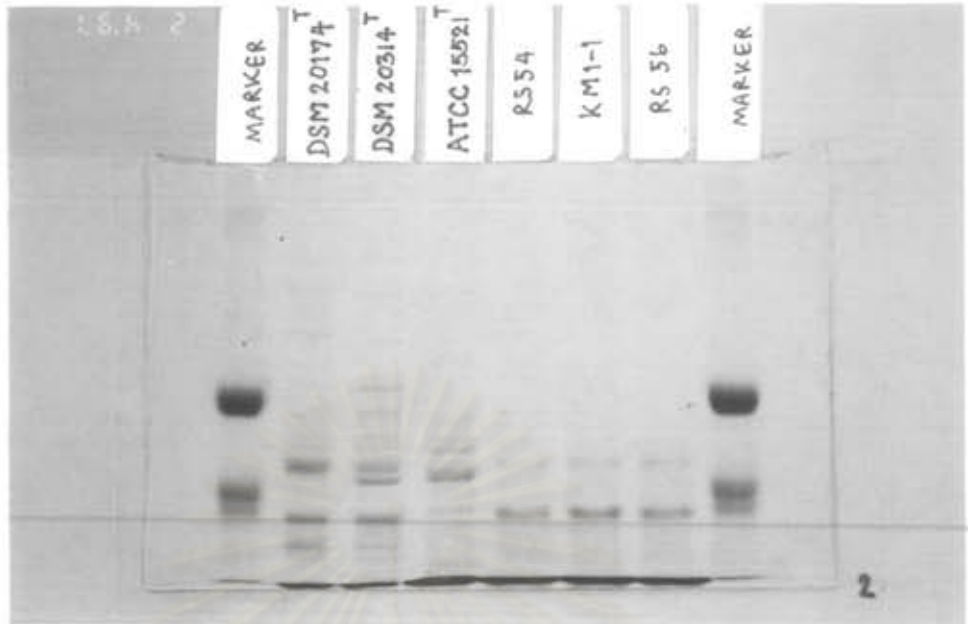
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



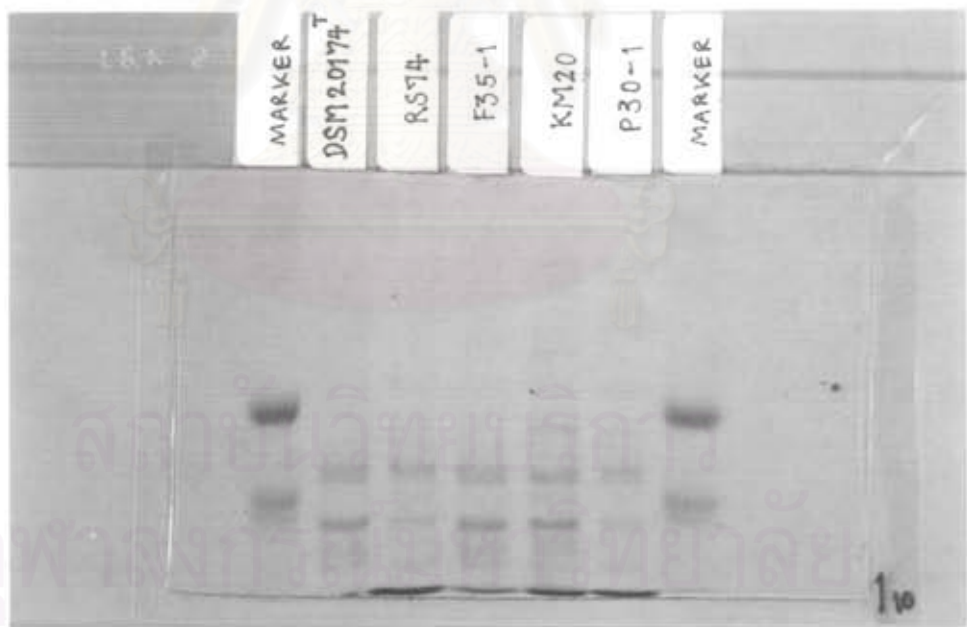
รูปที่ 5 แสดง protein profile ของเชื้อ type strain ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 5 สปีชีส์

ตารางที่ 8 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนของ type strain ของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย 5 สปีชีส์

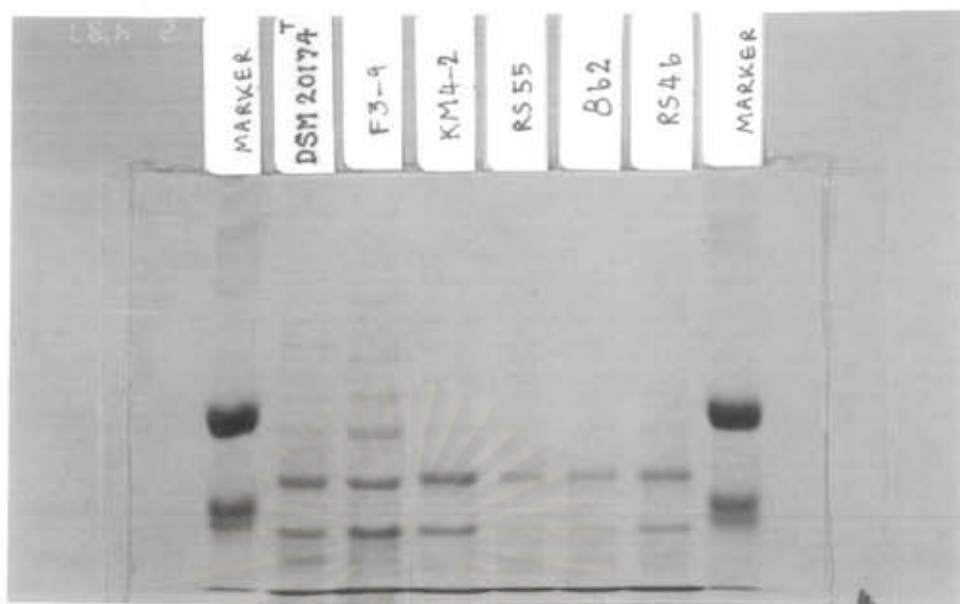
Band	MW. marker	<i>L. plantarum</i> DSM20174 ^T	<i>L. pentosus</i> DSM 20314 ^T	<i>P. pentosaceus</i> DSM 20336 ^T	<i>P. acilactici</i> DSM 20284 ^T	<i>L. sake</i> ATCC15521 ^T
1	66000	77000 + 160	74200 + 176	54700 + 134	58100 + 100	63300 + 200
2	45000	66000 + 345	66500 + 204	48000 + 319	49500 + 288	55000 + 60
3	36000	48900 + 179	51500 + 194	44500 + 212	44800 + 152	47850 + 133
4		35000 + 248	48000 + 196	32200 + 316	32200 + 378	37600 + 321
5		28000 + 110	35500 + 328	16500 + 151	30000 + 288	
6			31800 + 156			
7			29500 + 248			



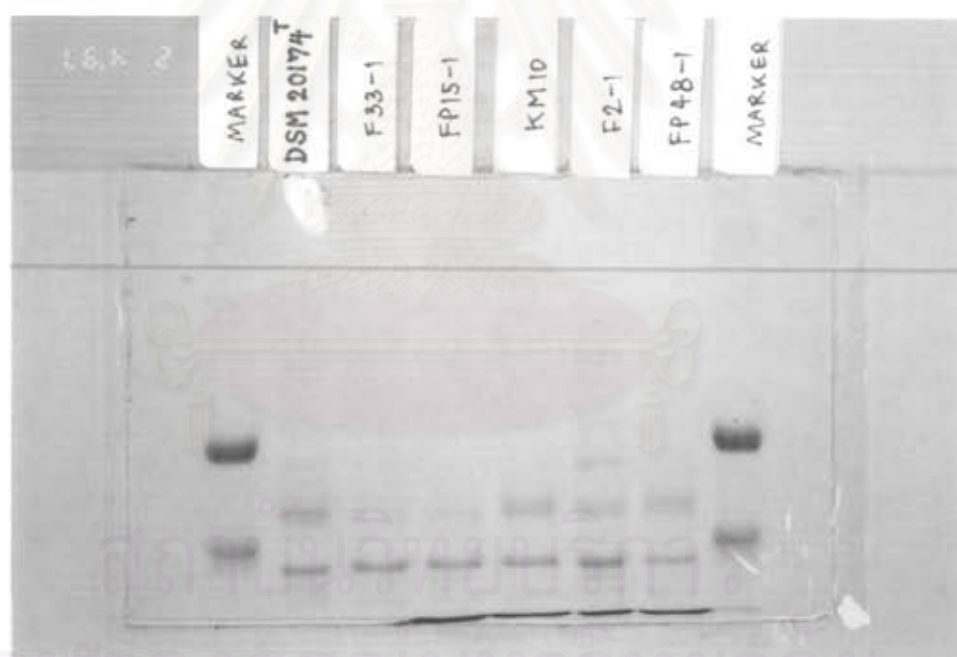
รูปที่ 6 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. plantarum* เทียบเคียงกับ type strain ของ *L. plantarum*



รูปที่ 7 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. plantarum* เทียบเคียงกับ type strain ของ *L. plantarum*



รูปที่ 8 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. plantarum* เทียบเคียงกับ type strain ของ *L. plantarum*



รูปที่ 9 แสดง Protein Profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. plantarum* เทียบเคียงกับ Type Strain ของ *L. plantarum*

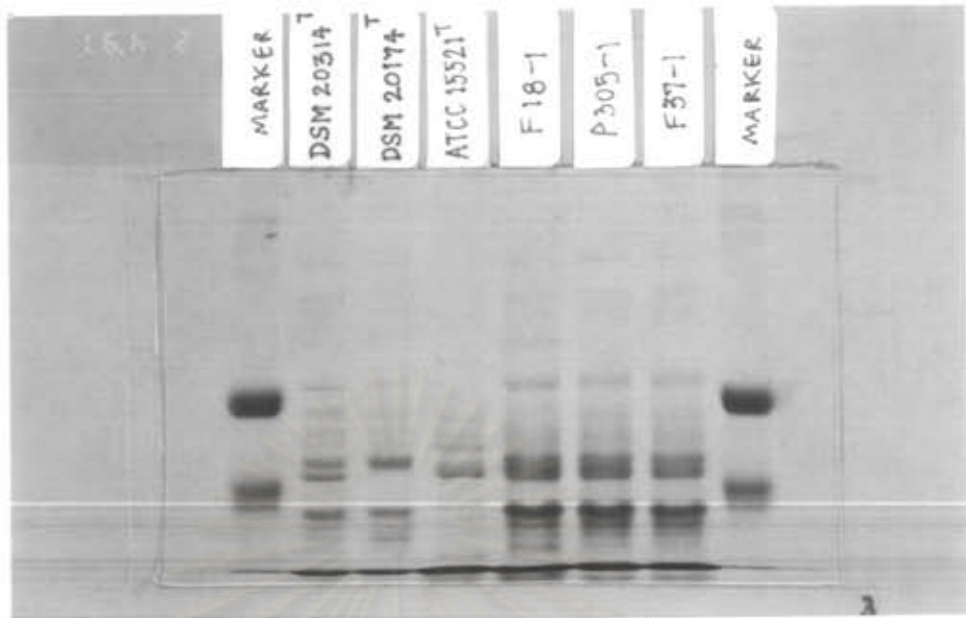
ตารางที่ 9 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่า เป็น *L. plantarum* และ type strain ของ *L. plantarum*

band	<i>L. plantarum</i>									
	DSM 20174 ^T	F35-1	862	F3-9	KM4-2	P46-1	KM20	RS 46	RS 55	RS74
1	77000 + 160	76800	77200	76800	76800	77000	77000	76900	76900	76900
2	66000 + 345	65900	66000	65900	65800	66100	66000	66000	65600	66100
3	48900 + 179	48700	49300	49000	49100	49000	48900	49300	49100	48900
4	35000 + 248	34700	34700	34700	34700	35400	35400	34700	34700	34700
5	28000 + 110	27800	27600	28300	27600	27700	27700	27600	27600	27600

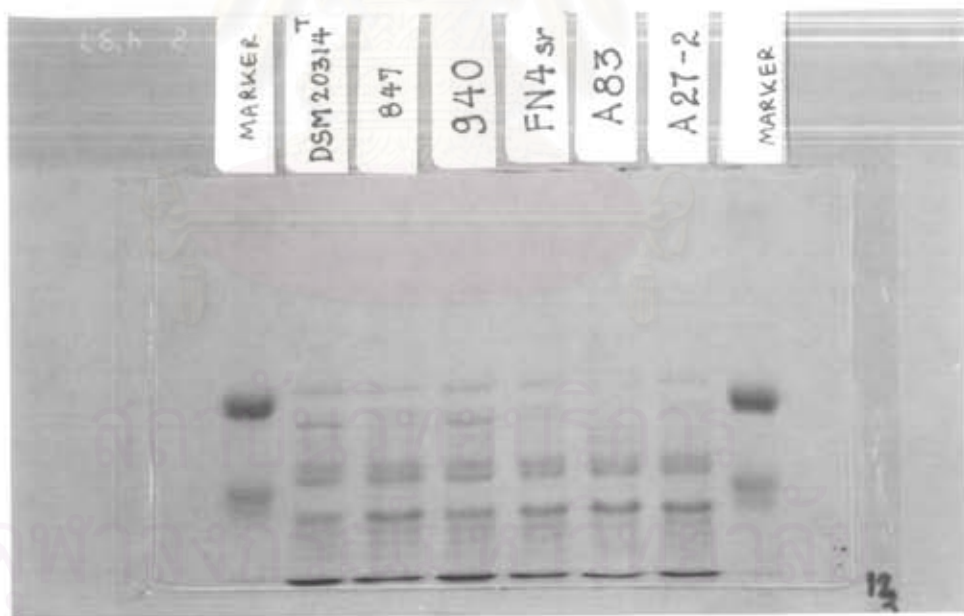
ตารางที่ 9 (ต่อ)

band	<i>L. plantarum</i>								
	DSM 20174 ^T	KM1-1	RS 54	RS 56	FP48-1	F2-1	KM10	F33-1	FP 15-1
1	77000 + 160				77400	76700	77000	77200	77000
2	66000 + 345	66300	65700	66000	66000	65700	65700	65700	66000
3	48900 + 179	49200	49100	49250	48900	48900	49100	49000	48700
4	35000 + 248	35400	35000	35140	35300	35000	35300	34500	35100
5	28000 + 110	28000	28200	27800					

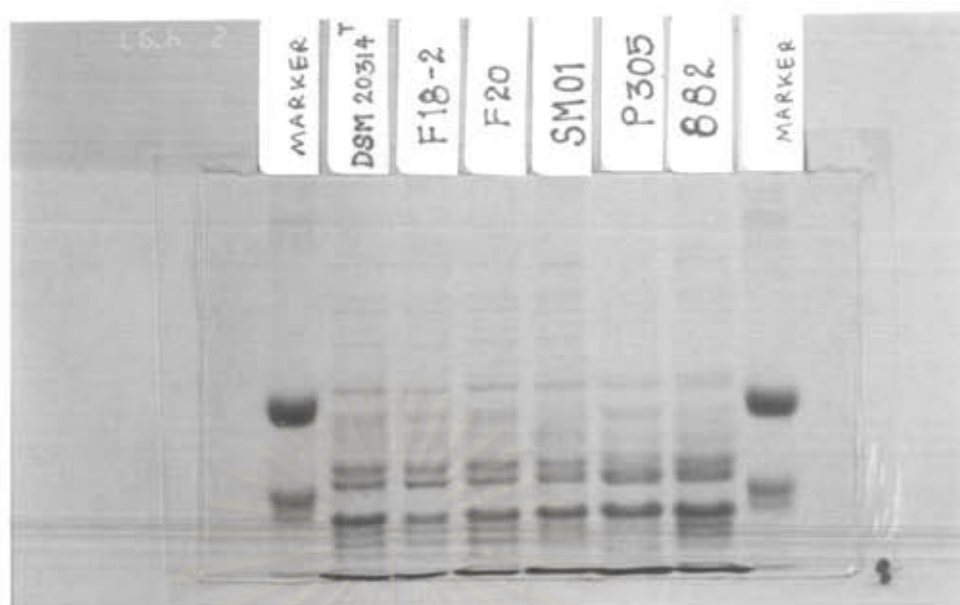
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



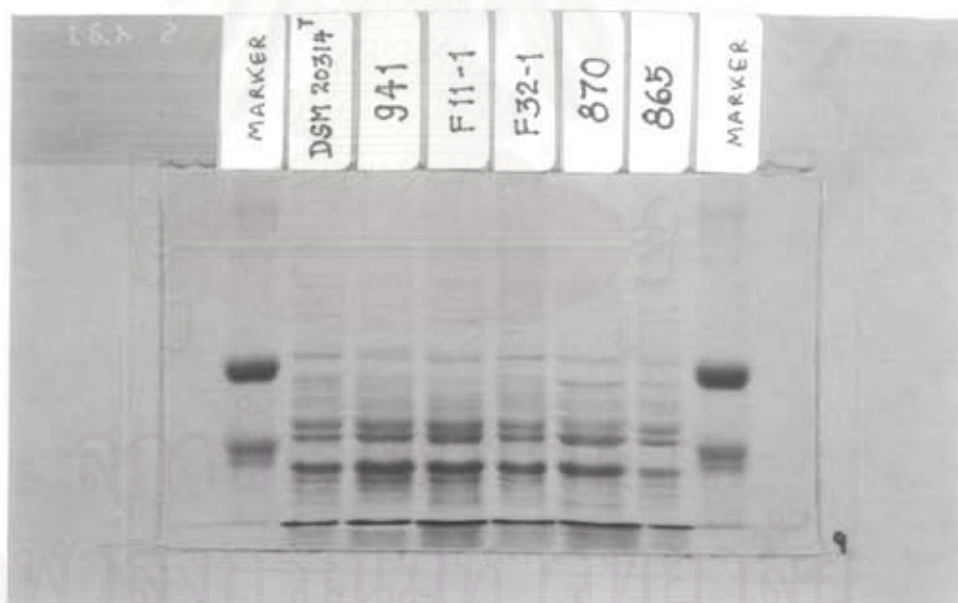
รูปที่ 10 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่า เป็น *L. pentosus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *L. pentosus*



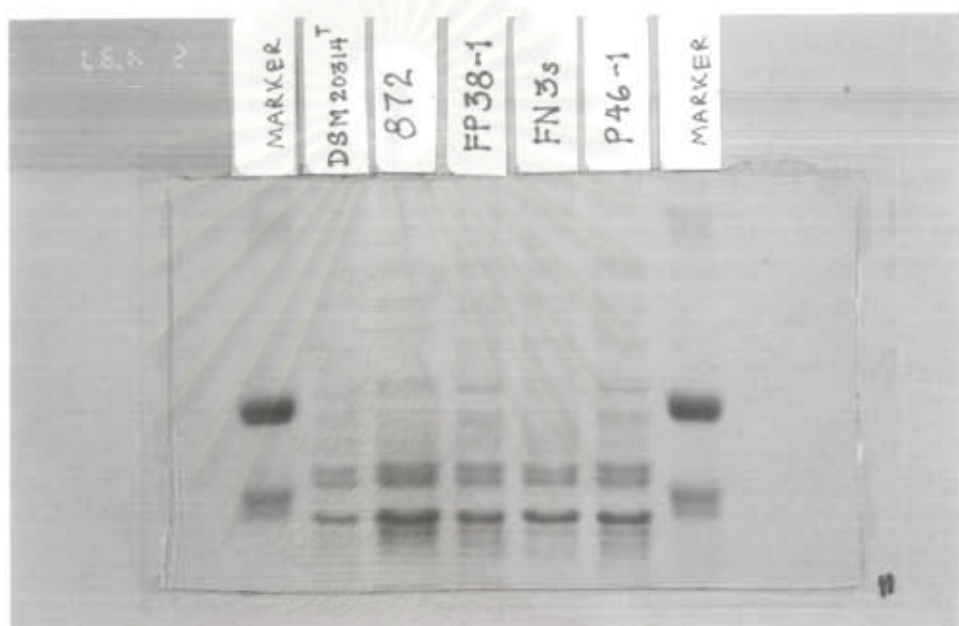
รูปที่ 11 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. pentosus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *L. pentosus*



รูปที่ 12 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่า เป็น *L. pentosus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *L. pentosus*



รูปที่ 13 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. pentosus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *L. pentosus*



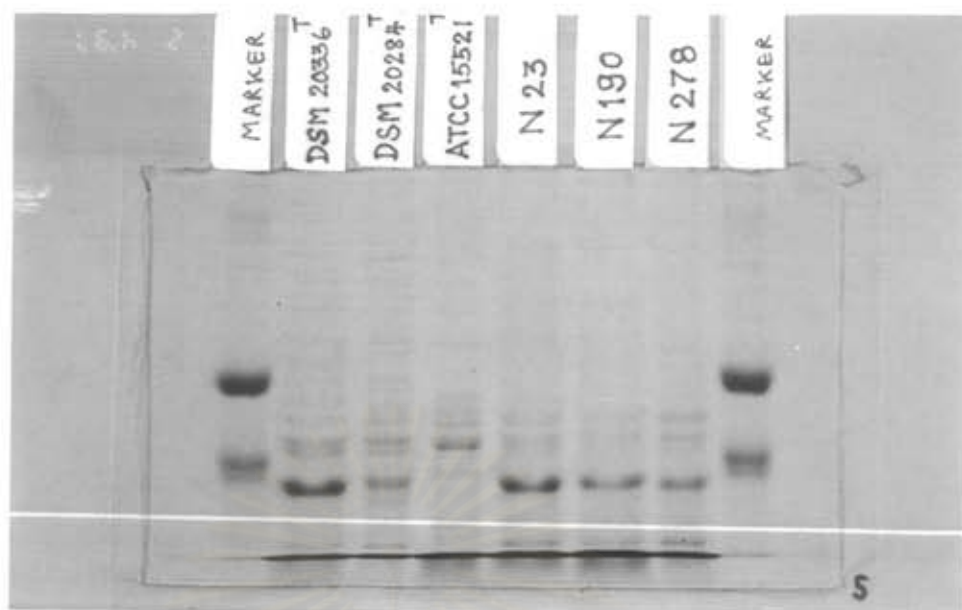
รูปที่ 14 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *L. pentosus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *L. pentosus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

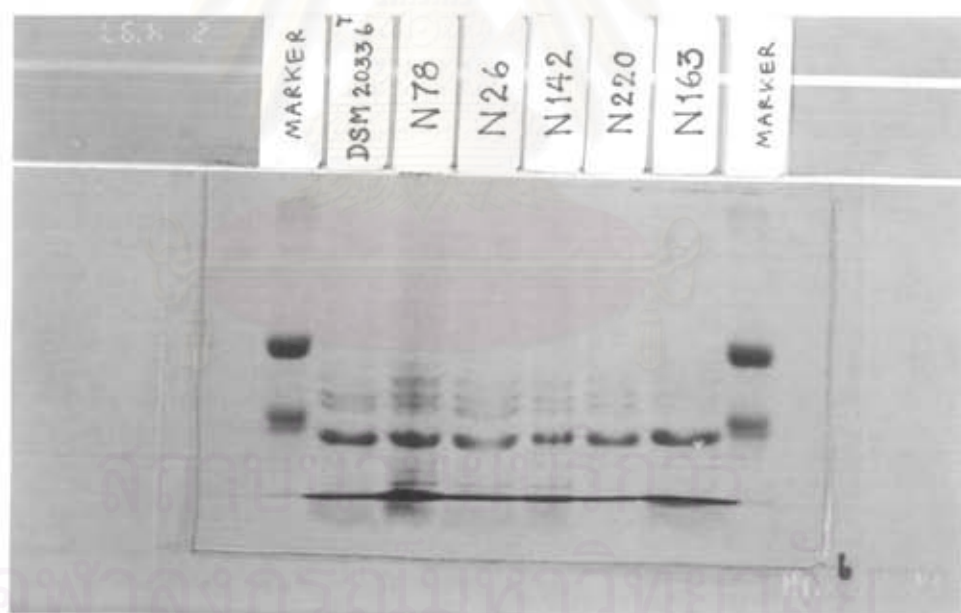
ตารางที่ 10 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่า เป็น *L. pentosus* และ type strain ของ *L. pentosus*

band	<i>L. pentosus</i>											
	DSM 20314 ^T	872	847	FN3s	P305	F18-2	A27-2	940	SM01	F11-1	A83	FN4Sr
1	74200 + 176		74400	74500	74000	74500	73900	74000	74200	74500	73900	73800
2	66500 + 345	66400	66500	66600	66500	66500	66600	66400	66600	66300	66700	66900
3	51500 + 194	51500	51350	51600	51400	51450	51450	51200	51500	51200	51700	51200
4	48000 + 196	48100	47600	48000	47900	47600	48000	47700	47800	48000	48200	47800
5	35500 + 328	35900	35700	35900	35000	35600	35400	35500	35500	35500	35500	35500
6	31800 + 156	31800	32000	32100	32000	32000	32000	32200	32000	31800	32000	32000
7	29500 + 248	30000	29600	30100	29500	29600	29800	29800	29800	30000	29600	29800

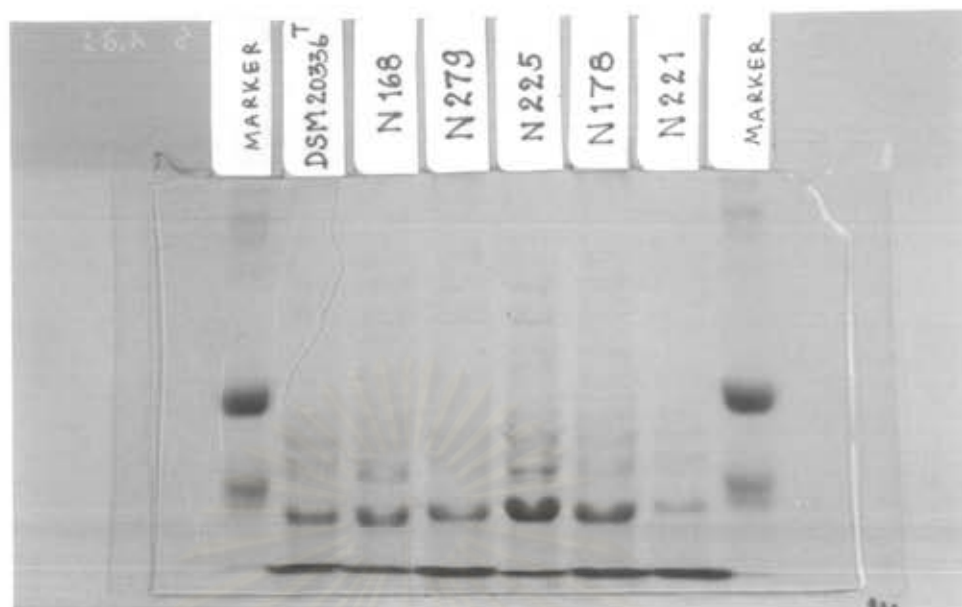
<i>L. pentosus</i>												band		
74300	73800	74200	941	865	P 305-1	74300	74300	74300	F32-1	F18-1	870	DSM 20314 ^T	74200 + 176	1
66500	66700	66200				66500	66100	66500	F37-1	F32-1			66500 + 345	2
51600	51600	51200				51800	51500	51800					51500 + 194	3
47900	48000	48200				47900	47600	47900					48000 + 196	4
36000	35500	35500				35500	35500	35500					35500 + 328	5
32000	31800	31800				32100	32000	32000					31800 + 156	6
29700	29600	30200				29800	30000	29700					29500 + 248	7



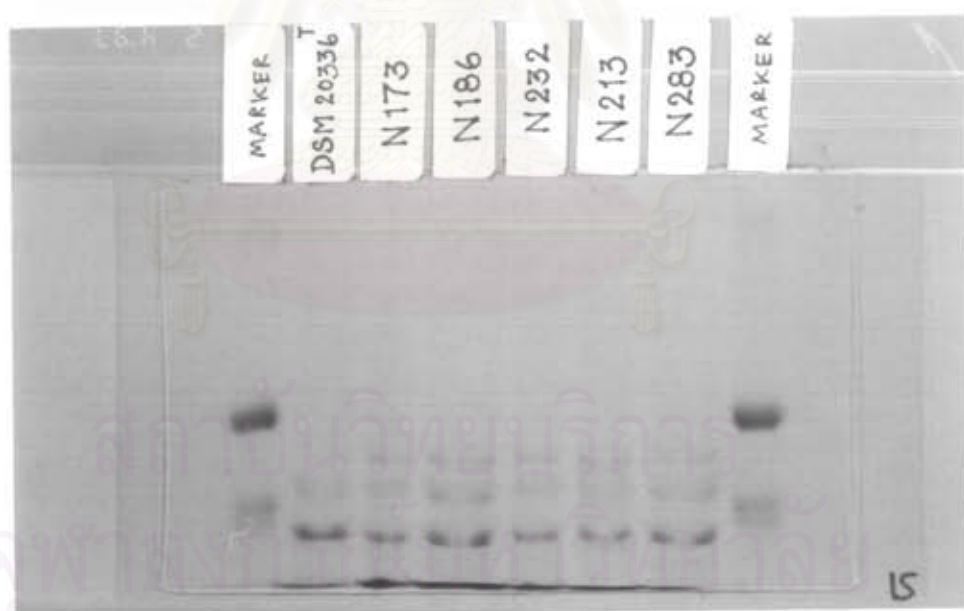
รูปที่ 15 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *P. pentosaceus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *P. pentosaceus*



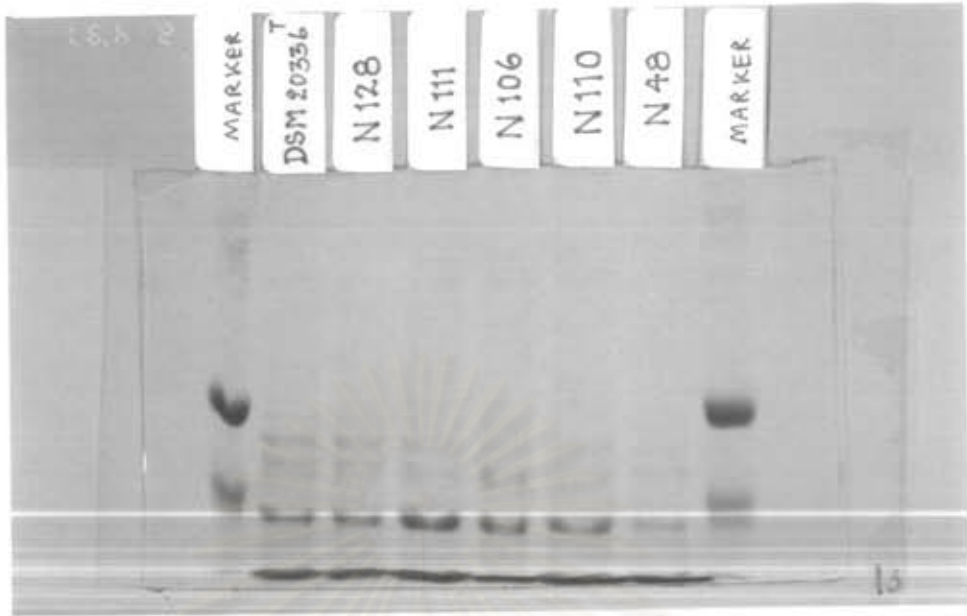
รูปที่ 16 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *P. pentosaceus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *P. pentosaceus*



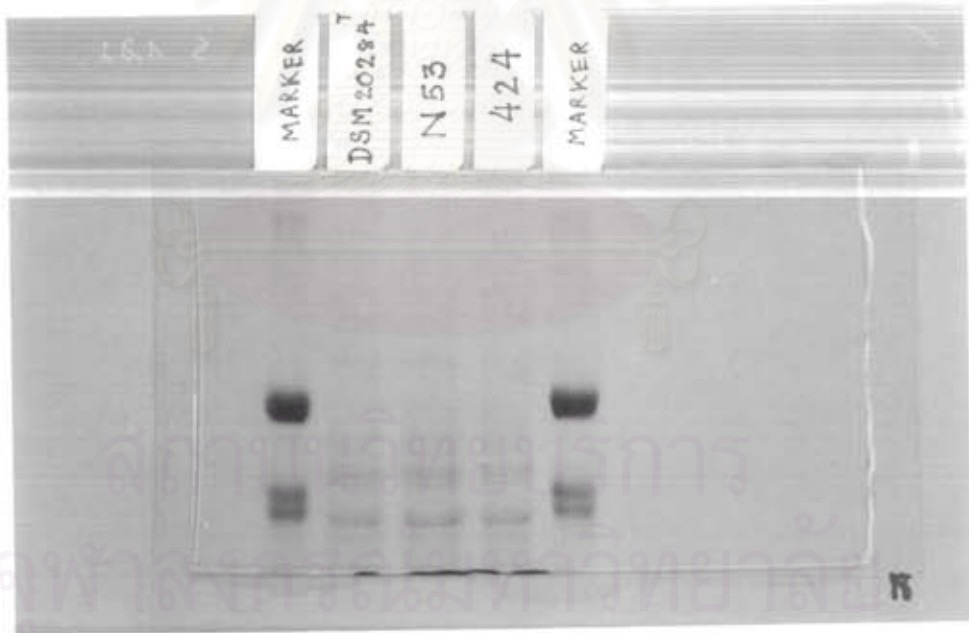
รูปที่ 17 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *P. pentosaceus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *P. pentosaceus*



รูปที่ 18 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *P. pentosaceus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *P. pentosaceus*



รูปที่ 19 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *P. pentosaceus* เทียบเคียงกับ type strain ของ *P. pentosaceus*



รูปที่ 20 แสดง protein profile ของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *P. acidilactici* เทียบเคียงกับ type strain ของ *P. acidilactici*

ตารางที่ 11 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่า เป็น *P. pentosaceus* และ type strain ของ *P. pentosaceus*

band	<i>P. pentosaceus</i>												
	DSM 20336 ^T	N106	N78	N278	N23	N26	N48	N142	N110	N168	N173	N279	N186
1	54700 + 134	54600	54700	54900	54400	54200	54900	54700	55000	54700	54400	54000	54600
2	48000 + 319	48000	48400	47600	47600	48400	48200	47900	48300	47900	48300	48000	48500
3	44500 + 212	44500	44300	44200	44000	44800	44300	44500	44200	44200	45000	44200	45150
4	32200 + 316	32100	31800	32500	32500	32000	32000	31800	32100	32000	32200	32000	32150
5	16500 + 151	16500	16100	16300	16500	16600	16800	16600	16800	16800	16800	16700	16400

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 (ต่อ)

band	<i>P. pentosaceus</i>											
	DSM 20336 ^T	N190	N213	N220	N221	N225	N232	N128	N163	N111	N283	N 178
1	54700 + 134	54700	55000	54140	54820	55000	55000	54400	54600	55000	55000	55000
2	48000 + 319	47600	48500	48000	48500	47600	48300	47900	48500	48300	48300	47900
3	44500 + 212	44200	44200	44700	44200	44200	44300	44500	44650	44900	44100	44200
4	32200 + 316	32300	32500	32200	32300	31900	32000	32000	32150	32500	31900	32300
5	16500 + 151	16000	16850	16700	16500	16700	16500	16750	16900	16600	16800	16500

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงน้ำหนักโมเลกุลของแถบโปรตีนของเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่จำแนกทางชีวเคมีแล้วว่าเป็น *P. acidilactici* และ type strain ของ *P. acidilactici*

Band	<i>P. acidilactici</i>		
	DSM 20284 ^T	N53	424
1	58100 + 100	57900	58100
2	49500 + 288	49900	49800
3	44800 + 152	45100	44700
4	32200 + 278	33800	33500
5	30000 + 288	30000	30000

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่แยกจากอาหารหมักพื้นเมือง

3.1 ผลการคัดเลือกปฐมภูมิ (Primary Screening)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ที่มี *E. coli* เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง, *B. subtilis* เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง และ *S. aureus* เป็นตัวแทนของแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม โดยดูความกว้างของบริเวณใส (Clear zone) ที่เกิดขึ้น จากการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารยับยั้งจากแลคติกแอซิดแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS โดยวิธี Agar Diffusion โดยนำส่วนใสที่ได้จากการเลี้ยงแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมักต้องทำตามวิธีการทดลองข้อ 3.1 พบว่าส่วนน้ำใสของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ที่แยกจากอาหารหมักทุกสายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด ได้แตกต่างกัน พบว่าสามารถยับยั้ง *E. coli* ได้ มี 3 เชื้อ ยับยั้ง *B. subtilis* ได้ มี 19 เชื้อ และยับยั้ง *S. aureus* ได้ มี 30 เชื้อ ยับยั้งทั้ง *E. coli* และ *B. subtilis* ได้ มี 4 เชื้อ ยับยั้งทั้ง *E. coli* และ *S. aureus* ได้ มี 8 เชื้อ ยับยั้งทั้ง *B. subtilis* และ *S. aureus* ได้ มี 11 เชื้อ และยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 ได้ มี 1 เชื้อ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ 3 สายพันธุ์ คือ *E. coli* ATCC 25922 ,
B. subtilis ATCC 6633 และ *S. aureus* ATCC 25923

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone(mm.)		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i>	A85-2	+	-	-
	RS74	+	-	-
	KS25-4	+	-	-
	KS25-6	+	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	N38	+	-	-
	N287	+	-	-
<i>L. plantarum</i>	KM1-2	-	+	-
	KM4-2	-	+	-
	RS100	-	+	-
	FS8-2	-	+	-
	KS22-2	-	+	-
	KS26-2	-	+	-
	KS48-2	-	+	-
<i>L. pentosus</i>	KS20-2	-	+	-
<i>L. fermentum</i>	945	-	+	-
	950	-	+	-
<i>P. pentosaceus</i>	N101	-	+	-
	N142	-	+	-
	N213	-	+	-
	N221	-	+	-
	N225	-	+	-
	N265	-	+	-
	KS23-1	-	+	-
<i>P. acidilactici</i>	KS30-5	-	+	-
	FS34-3	-	+	-

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i>	KM1-1	-	-	+
	862	-	-	+
	FP38-2	-	-	+
	891	-	-	+
	KS18-2	-	-	+
	KS22-5	-	-	+
	KS26-3	-	-	+
	KS26-5	-	-	+
	KS35-3	-	-	+
	KS36-2	-	-	+
	KS39-1	-	-	+
	KS39-3	-	-	+
	<i>L. pentosus</i>	415	-	-
FN3s		-	-	+
P305-1		-	-	+
FP17-2		-	-	+
RS105		-	-	+
FS31-2		-	-	+
KS19-1		-	-	+
KS36-2		-	-	+
<i>L. brevis</i>	P28-3	-	-	+
<i>P. pentosaceus</i>	N78	-	-	+
	N178	-	-	+
	N190	-	-	+
	N209	-	-	+
	KS16-4	-	-	+
	KS30-1	-	-	+

ตารางที่ 13 (ต่อ)

ชื่อ LAB	รหัสชื่อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. pentosaceus</i>	KS30-2	-	-	+
	KS30-3	-	-	+
	KS30-6	-	-	+
<i>P. acidilactici</i>	424	-	-	+
<i>P. pentosaceus</i>	N38	+	+	-
	N186	+	+	-
	N270	+	+	-
	FS9-3	+	+	-
<i>L. pentosus</i>	865	+	-	+
	940	+	-	+
	P305	+	-	+
	W-NS	+	-	+
<i>P. pentosaceus</i>	N111	+	-	+
	N124	+	-	+
	N158	+	-	+
<i>P. acidilactici</i>	RS03	+	-	+
<i>L. plantarum</i>	RS44	-	+	+
	FS8-1	-	+	+
	F19-1	-	+	+
	FN1-3	-	+	+
	RS48	-	+	+
	KS19-3	-	+	+
<i>P. pentosaceus</i>	BP-1	-	+	+
	N23	-	+	+
	N26	-	+	+
	N168	-	+	+
	N173	-	+	+
<i>P. pentosaceus</i>	N279	+	+	+

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i>	KM-10	-	-	-
	KM-20	-	-	-
	F2-1	-	-	-
	F3-9	-	-	-
	F10-1	-	-	-
	F33-1	-	-	-
	F35-1	-	-	-
	P30-1	-	-	-
	FP40-2	-	-	-
	FP48-1	-	-	-
	RS54	-	-	-
	RS56	-	-	-
	RS94	-	-	-
	RS95	-	-	-
	RS96	-	-	-
	RS97	-	-	-
	RS98	-	-	-
	RS101	-	-	-
	RS103	-	-	-
	W-1	-	-	-
	1009	-	-	-
	FS5-1	-	-	-
	FS5-2	-	-	-
	FS5-3	-	-	-
	FS5-4	-	-	-
	FS8-1	-	-	-
	FS8-2	-	-	-

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i>	FS24-1	-	-	-
	FS24-2	-	-	-
	FS24-3	-	-	-
	FS24-4	-	-	-
	FS40-1	-	-	-
	FS40-2	-	-	-
	FS40-3	-	-	-
	KS10-1	-	-	-
	KS10-2	-	-	-
	KS10-3	-	-	-
	KS10-4	-	-	-
	KS10-5	-	-	-
	KS11-1	-	-	-
	KS11-2	-	-	-
	KS11-3	-	-	-
	KS11-4	-	-	-
	KS11-5	-	-	-
	KS15-1	-	-	-
	KS15-2	-	-	-
	KS15-3	-	-	-
	KS15-4	-	-	-
	KS18-1	-	-	-
	KS18-2	-	-	-
	KS18-3	-	-	-
	KS18-5	-	-	-
	KS18-6	-	-	-
KS22-1	-	-	-	

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i>	KS22-2	-	-	-
	KS22-3	-	-	-
	KS22-4	-	-	-
	KS22-5	-	-	-
	KS22-6	-	-	-
	KS24-1	-	-	-
	KS24-2	-	-	-
	KS24-3	-	-	-
	KS24-4	-	-	-
	KS25-2	-	-	-
	KS25-3	-	-	-
	KS25-4	-	-	-
	KS25-5	-	-	-
	KS25-6	-	-	-
	KS26-1	-	-	-
	KS26-2	-	-	-
	KS26-3	-	-	-
	KS26-4	-	-	-
	KS35-1	-	-	-
	KS35-2	-	-	-
	KS35-3	-	-	-
	KS35-4	-	-	-
	KS37-1	-	-	-
	KS37-2	-	-	-
	KS38-2	-	-	-
	KS39-1	-	-	-
	KS39-2	-	-	-

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. plantarum</i>	KS39-3	-	-	-
	KS48-1	-	-	-
	KS48-2	-	-	-
<i>L. pentosus</i>	847	-	-	-
	852	-	-	-
	870	-	-	-
	872	-	-	-
	882	-	-	-
	941	-	-	-
	A35	-	-	-
	A27-2	-	-	-
	A83	-	-	-
	F11-1	-	-	-
	F11-2	-	-	-
	F18-1	-	-	-
	F18-2	-	-	-
	F20	-	-	-
	F21-1	-	-	-
	F28-1	-	-	-
	F32-1	-	-	-
	F32-2	-	-	-
	F36-1	-	-	-
	F36-2	-	-	-
F37-1	-	-	-	
F37-2	-	-	-	
FN4Sr	-	-	-	
FN8	-	-	-	

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. pentosus</i>	FP2-1	-	-	-
	FP11-1	-	-	-
	FP33-2	-	-	-
	FP37-4	-	-	-
	FP38-1	-	-	-
	SM01	-	-	-
	FP51-1	-	-	-
	M1-1	-	-	-
	M2-1	-	-	-
	P323	-	-	-
	RS38	-	-	-
	RS42	-	-	-
	RS47	-	-	-
	RS75	-	-	-
	RS77	-	-	-
	RS93	-	-	-
	W-SG	-	-	-
	1001	-	-	-
	1002	-	-	-
	1003	-	-	-
	1007	-	-	-
	1008	-	-	-
	1101	-	-	-
	FS9-1	-	-	-
	FS31-1	-	-	-
	FS31-2	-	-	-
FS31-4	-	-	-	

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. pentosus</i>	KS13-1	-	-	-
	KS13-2	-	-	-
	KS13-3	-	-	-
	KS13-4	-	-	-
	KS19-1	-	-	-
	KS19-2	-	-	-
	KS19-3	-	-	-
	KS19-4	-	-	-
	KS19-5	-	-	-
	KS20-2	-	-	-
	KS20-4	-	-	-
	KS21-1	-	-	-
	KS21-2	-	-	-
	KS21-5	-	-	-
	KS25-1	-	-	-
	KS26-5	-	-	-
	KS26-6	-	-	-
	KS27-1	-	-	-
	KS27-2	-	-	-
	KS27-4	-	-	-
	KS27-5	-	-	-
	KS28-1	-	-	-
	KS36-1	-	-	-
KS36-2	-	-	-	
KS36-3	-	-	-	
KS36-4	-	-	-	
<i>L. fermentum</i>	879	-	-	-

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>L. fermentum</i>	937	-	-	-
	946	-	-	-
	947	-	-	-
	948	-	-	-
	F10-2	-	-	-
<i>L. sake</i>	890	-	-	-
	911	-	-	-
	912	-	-	-
<i>L. brevis</i>	A314	-	-	-
	P46-1	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	420	-	-	-
	AP-1	-	-	-
	AP-2	-	-	-
	AP-3	-	-	-
	AP-4	-	-	-
	N01	-	-	-
	N12	-	-	-
	N20	-	-	-
	N31	-	-	-
	N35	-	-	-
	N37	-	-	-
	N42	-	-	-
	N48	-	-	-
	N58	-	-	-
N63	-	-	-	
N73	-	-	-	
N91	-	-	-	

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. pentosaceus</i>	N105	-	-	-
	N106	-	-	-
	N110	-	-	-
	N116	-	-	-
	N121	-	-	-
	N128	-	-	-
	N140	-	-	-
	N147	-	-	-
	N148	-	-	-
	N153	-	-	-
	N163	-	-	-
	N202	-	-	-
	N203	-	-	-
	N220	-	-	-
	N232	-	-	-
	N233	-	-	-
	N240	-	-	-
	N248	-	-	-
	N260	-	-	-
	N274	-	-	-
	N278	-	-	-
	N283	-	-	-
	N286	-	-	-
N295	-	-	-	
N302	-	-	-	
N303	-	-	-	
C-1	-	-	-	

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. pentosaceus</i>	C-2	-	-	-
	RS90	-	-	-
	RS91	-	-	-
	RS92	-	-	-
	RS104	-	-	-
	RS109	-	-	-
	1004	-	-	-
	1005	-	-	-
	FS4-1	-	-	-
	FS4-2	-	-	-
	FS9-2	-	-	-
	FS9-3	-	-	-
	KS8-1	-	-	-
	KS8-2	-	-	-
	KS8-3	-	-	-
	KS12-1	-	-	-
	KS12-2	-	-	-
	KS12-3	-	-	-
	KS12-4	-	-	-
	KS12-5	-	-	-
	KS14-1	-	-	-
	KS14-2	-	-	-
	KS14-3	-	-	-
	KS14-4	-	-	-
	KS14-5	-	-	-
	KS16-1	-	-	-
KS16-2	-	-	-	

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. pentosaceus</i>	KS16-3	-	-	-
	KS16-4	-	-	-
	KS16-5	-	-	-
	KS17-1	-	-	-
	KS17-2	-	-	-
	KS17-3	-	-	-
	KS17-4	-	-	-
	KS17-5	-	-	-
	KS18-4	-	-	-
	KS23-1	-	-	-
	KS23-2	-	-	-
	KS23-3	-	-	-
	KS23-4	-	-	-
	KS23-5	-	-	-
	KS30-1	-	-	-
	KS30-2	-	-	-
	KS30-3	-	-	-
	KS30-4	-	-	-
	KS30-5	-	-	-
	KS30-6	-	-	-
KS38-1	-	-	-	
<i>P. acidilactici</i>	N53	-	-	-
	1006	-	-	-
	FS7-1	-	-	-
	FS7-2	-	-	-
	FS7-3	-	-	-
	FS34-1	-	-	-

ตารางที่ 13 (ต่อ)

เชื้อ LAB	รหัสเชื้อ	Inhibition Zone		
		Indicator Strains		
		<i>E. coli</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>P. acidilactici</i>	FS34-2	-	-	-
	FS34-3	-	-	-
	KS17-6	-	-	-

หมายเหตุ + คือ inhibition zone มีขนาดมากกว่า 1 มม.
 - คือ inhibition zone มีขนาดต่ำกว่า 1 มม.

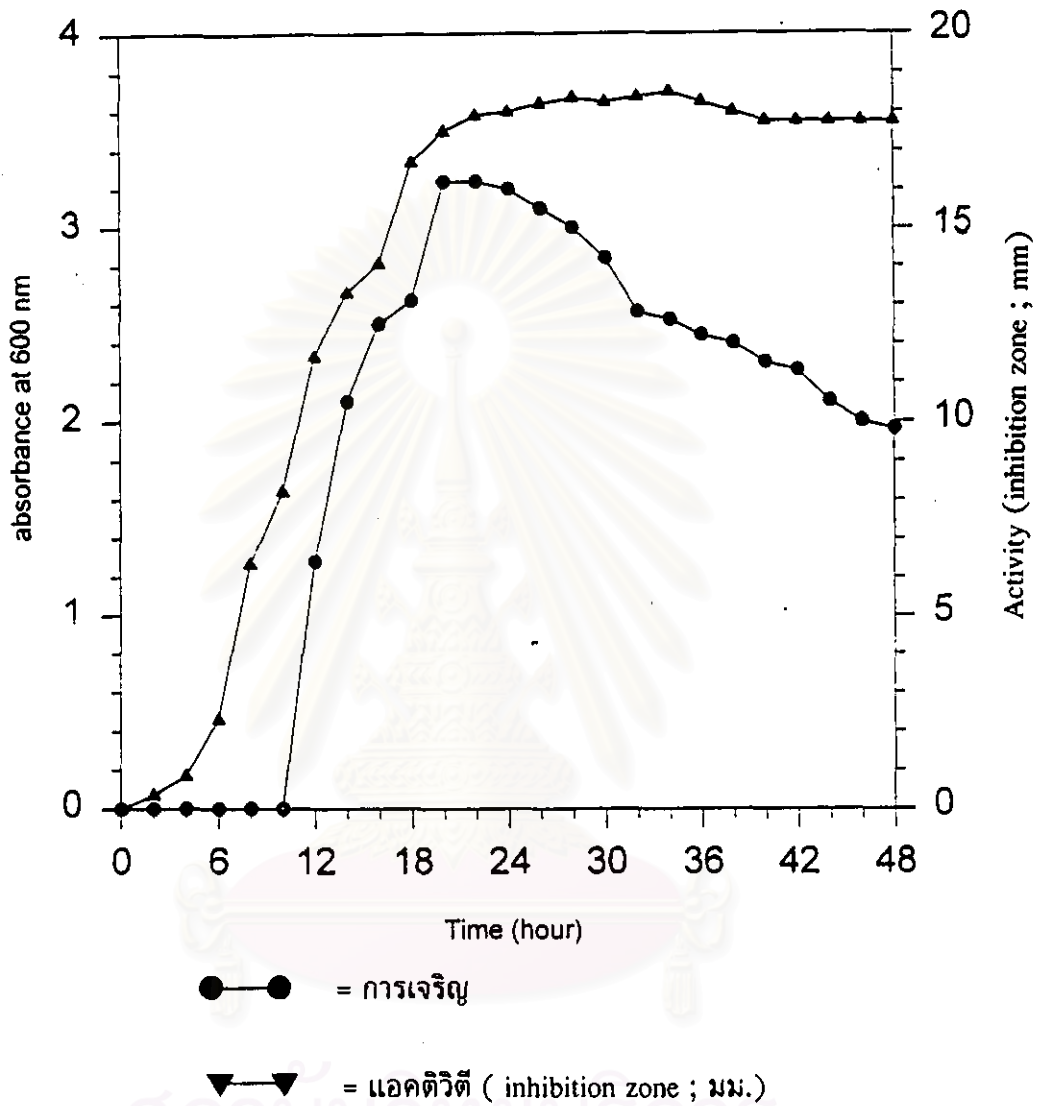
สถาบันวิทยบริการ
 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 ผลการศึกษาลักษณะการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ และการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์

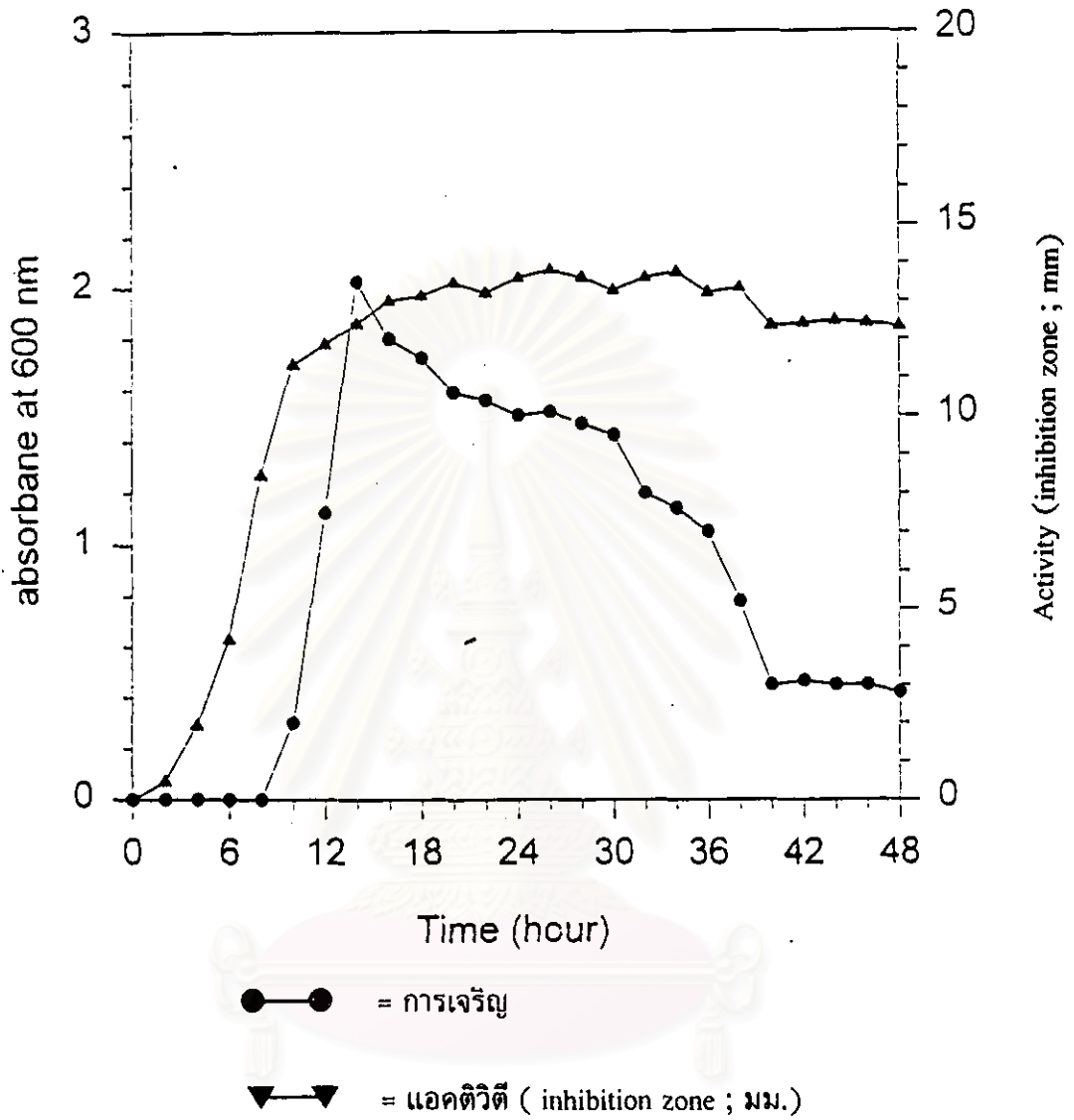
ได้ติดตามการเจริญของตัวแทนของแลคติกแอซิดแบคทีเรียในจีนัส *Lactobacillus pentosus* รหัส 940 และ *Pediococcus pentosaceus* รหัส N 111 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด (Broad Spectrum) ตรวจสอบรูปแบบการเจริญ โดยดูจากค่าความขุ่น (Optical Density) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ของเชื้อทุก ๆ 2 ชั่วโมง ของการเลี้ยงเชื้อ ได้รูปแบบการเจริญแสดงในกราฟรูปที่ 21 และ 22 จากกราฟรูปที่ 21 เป็นรูปแบบการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์ 940 มีระยะ lag phase ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 4 ของการเลี้ยงเชื้อ ระยะ log phase ที่ชั่วโมง 4-20 ระยะ stationary phase ที่ชั่วโมง 20-36 หลังจากชั่วโมงที่ 36 ไปแล้วเป็นระยะการลดจำนวนเซลล์ (death phase) กราฟรูปที่ 22 เป็นรูปแบบการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส N 111 มีระยะ lag phase ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 2 ของการเลี้ยงเชื้อ ระยะ log phase ที่ชั่วโมง 2-14 ระยะ stationary phase ที่ชั่วโมง 14-36 หลังจากชั่วโมงที่ 36 ไปแล้วเป็นระยะการลดจำนวนเซลล์ (death phase)

และทุกช่วงของการเก็บตัวอย่างเชื้อเพื่อดูรูปแบบการเจริญ จะมีการทดสอบแอกติวิตีของสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ได้ด้วย โดยทำตามขั้นตอนการดำเนินการวิจัยข้อ 2.2 เพื่อหาระยะเวลาของการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ จากการทดลองพบว่า เชื้อ *Lactobacillus pentosus* รหัส 940 จะเริ่มผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ ในชั่วโมงที่ 10 และมีแอกติวิตีสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 20 และเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส N 111 จะเริ่มผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ ในชั่วโมงที่ 10 และมีแอกติวิตีสูงที่สุดที่ชั่วโมงที่ 14

จากรูปแบบการเจริญ และระยะเวลาการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีแอกติวิตีสูงที่สุด จะนำเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ที่เลี้ยงในภาวะดังกล่าวมาข้างต้นที่มีอายุในช่วง ซึ่งอยู่ในช่วงปลายการเจริญแบบเพิ่มจำนวน (late log phase) วัดค่าความขุ่นที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ได้ประมาณ 0.7-0.8 โดยใช้ปริมาณเชื้อเริ่มต้น 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตรต่อปริมาตร) เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป



รูปที่ 21 กราฟแสดงรูปแบบการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* รหัส 940 และ แอกติวิตีของสารยับยั้งจุลินทรีย์ จากการเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส



รูปที่ 22 กราฟแสดงรูปแบบการเจริญของเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* รหัส N 111 และแอคติวิตีของสารยับยั้งจุลินทรีย์ จากการเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

3.3 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ

จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียในกลุ่มแกรมลบรูปแท่ง พบว่า เชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ จึงทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อที่จะดูว่า สารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบแกรมลบอื่นๆ ได้หรือไม่ เชื้อทดสอบแบคทีเรียแกรมลบที่ใช้คือ *Salmonella derby*, *S. choleraesuis*, *S. enteritidis*, *S. typhimurium* และ *Shigella flexneri* type 2a จากการทดลองพบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ ได้ แตกต่างกัน ผลแสดงในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 แสดงผลการยับยั้งเชื้อ *Salmonella* sp. และ *Shigella* sp. โดยสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เชื้อ LAB	Inhibition Zone (mm)				
	Indicator Strains				
	<i>Salmonella derby</i>	<i>Salmonella choleraesuis</i>	<i>Salmonella enteritidis</i>	<i>Salmonella typhimurium</i>	<i>Shigella flexneri</i> type 2a
A85-2	-	-	4.2	-	4.8
W-NS	-	-	8.5	-	5.6
N111	-	5.7	-	9.2	6.0
N279	-	6.9	-	10.8	8.2
N186	6.1	-	-	-	7.2
N270	3.1	-	-	-	2.3
940	3.8	6.9	-	8.5	-
RS03	-	6.6	-	-	8.2
RS74	4.5	4.8	-	-	-
W-NS	-	-	8.5	-	5.6
N38	5.5	-	8.3	-	3.6
N124	-	-	-	-	-
N158	-	5.3	-	6.3	-
FS9-3	-	-	-	5.9	8.8

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่เกิด inhibition zone

3.4 ผลการคัดเลือกทุติยภูมิ (Secondary Screening)

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบมากชนิดขึ้น เพื่อที่จะดูว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้เป็น Broad Spectrum หรือไม่ โดยใช้ *L. pentosus* ATCC 8041 และ *P. pentosaceus* ATCC33316 เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ และ *Micrococcus varians* ATCC 15306 เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม และ *Candida albicans* ATCC 6633 เป็นตัวแทนในกลุ่มของยีสต์ ทำการทดสอบโดยนำเชื้อ แลคติกแอซิดแบคทีเรียที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ จากการทดลองในข้อ 3.1 มาทำการทดลองตามวิธีการทดลองข้อ 3.1.1 และ 3.1.2 โดยวิธี agar diffusion ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 15



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 แสดง Inhibition Zone ของเชื้อทดสอบสายพันธุ์ต่างๆ

เชื้อ	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm.)						
		indicator Strains						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>L. pentosus</i>	FN3s	2.9	-	-	-	-	-	-
”	FP17-2	5.1	-	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	N190	3.1	-	-	-	-	-	-
”	KS30-1	3.7	-	-	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	KM1-2	-	2.2	-	-	-	-	-
”	862	-	2.5	-	-	-	-	-
”	FP38-2	-	4.8	-	-	-	-	-
”	RS44	-	6.2	-	-	-	-	-
<i>P. acidilactici</i>	FS34-3	-	5.0	-	-	-	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	N124	-	-	3.3	-	-	-	-
”	N158	-	-	3.5	-	-	-	-
<i>L. plantarum</i>	KS18-2	-	-	-	-	3.5	-	-
”	KS35-1	-	-	-	-	10.6	-	-
<i>L. pentosus</i>	RS105	-	-	-	-	4.5	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	N142	-	-	-	-	4.7	-	-
<i>P. acidilactici</i>	RS03	-	-	-	-	2.5	-	-
<i>L. plantarum</i>	FS8-1	-	-	-	-	-	6.8	-
”	KS48-2	-	-	-	-	-	2.6	-
<i>L. pentosus</i>	F19-1	-	-	-	-	-	1.4	-
”	FN1-3	-	-	-	-	-	11.7	-
<i>P. pentosaceus</i>	N101	-	-	-	-	-	6.7	-
”	N225	-	-	-	-	-	4.5	-
”	KS30-5	-	-	-	-	-	5.4	-
<i>L. pentosus</i>	940	-	-	-	-	-	-	3.5
”	RS48	-	-	-	-	-	-	3.2
”	KS19-1	-	-	-	-	-	-	4.1
”	KS26-5	-	-	-	-	-	-	1.3

ตารางที่ 15 (ต่อ)

เชื้อ	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm.)						
		indicator Strains						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>P. pentosaceus</i>	N78	-	-	-	-	-	-	4.7
„	N213	-	-	-	-	-	-	4.7
„	N270	-	-	-	-	-	-	4.8
<i>P. acidilactici</i>	424	-	-	-	-	-	-	8.6
<i>L. pentosus</i>	W-NS	3.5	-	-	-	3.1	-	-
„	KS19-3	6.2	-	-	-	5.5	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	N178	4.4	-	-	-	6.2	-	-
„	FS9-3	5.5	-	-	-	6.6	-	-
<i>L. plantarum</i>	FS8-2	2.4	-	-	-	-	8.3	-
<i>L. pentosus</i>	KS20-2	6.4	-	-	-	-	5.1	-
<i>L. plantarum</i>	RS74	4.3	-	-	-	-	-	8.2
„	KS35-3	5.1	-	-	-	-	-	5.2
„	KS39-1	11.1	-	-	-	-	-	7.2
„	KS39-3	1.5	-	-	-	-	-	9.7
<i>L. brevis</i>	P28-3	2.8	-	-	-	-	-	5.3
<i>P. pentosaceus</i>	KS30-2	3.8	-	-	-	-	-	4.2
<i>L. plantarum</i>	KS26-2	-	5.3	-	-	3.5	-	-
<i>P. pentosaceus</i>	BP-1	5.4	-	-	-	5.7	-	-
„	N26	4.5	-	-	-	5.1	-	-
<i>L. plantarum</i>	RS100	-	3.2	-	-	-	8.1	-
<i>L. plantarum</i>	KS26-3	-	3.9	-	-	-	-	1.8
<i>L. fermentum</i>	945	-	4.3	-	-	-	-	7.5
<i>P. pentosaceus</i>	N265	-	6.6	-	-	-	-	7.1
„	N287	-	4.1	-	-	-	-	7.4
<i>L. pentosus</i>	P305	-	-	5.1	-	5.8	-	-
<i>L. plantarum</i>	KS25-6	-	-	3.3	-	-	-	4.8
<i>P. pentosaceus</i>	N173	-	-	6.1	-	-	-	7.5

ตารางที่ 15 (ต่อ)

เชื้อ	รหัสเชื้อ	inhibition zone (mm.)						
		indicator Strains						
		1	2	3	4	5	6	7
<i>P. pentosaceus</i>	N186	-	-	5.4	-	-	-	6.1
<i>L. pentosus</i>	415	-	-	-	-	6.6	-	8.1
„	P305-1	-	-	-	-	7.5	-	6.4
<i>L. pentosus</i>	865	-	-	-	-	-	5.1	7.2
„	FS31-2	-	-	-	-	-	5.0	7.0
<i>P. pentosaceus</i>	N23	-	-	-	-	-	5.8	2.9
„	N209	-	-	-	-	-	6.6	5.0
„	KS30-3	-	-	-	-	-	6.6	7.0
„	KS30-6	-	-	-	-	-	5.0	6.6
<i>P. pentosaceus</i>	N168	5.8	-	4.5	-	-	-	4.5
<i>L. fermentum</i>	950	2.0	-	-	-	5.7	6.4	-
<i>L. plantarum</i>	KS25-4	6.2	-	-	-	-	5.4	4.3
<i>P. pentosaceus</i>	N38	5.1	-	-	-	-	6.2	4.1
<i>L. plantarum</i>	A85-2	-	5.5	-	-	-	3.2	5.8
<i>P. pentosaceus</i>	N111	-	5.0	-	-	-	9.7	7.0
<i>L. plantarum</i>	KM1-1	-	-	-	-	5.3	8.1	5.3
„	891	-	-	-	-	4.3	2.6	3.5
<i>P. pentosaceus</i>	N279	3.9	3.6	-	-	-	4.3	6.8

- หมายเหตุ
- | | |
|----------------------------------|------------------------------------|
| 1 = <i>Staphylococcus aureus</i> | 5 = <i>Micrococcus varians</i> |
| 2 = <i>Bacillus subtilis</i> | 6 = <i>Lactobacillus pentosus</i> |
| 3 = <i>Escherichia coli</i> | 7 = <i>Pediococcus pentosaceus</i> |
| 4 = <i>Candida albicans</i> | |
| - = ไม่เกิด inhibition zone | |

ผลการทดลองในขั้นตอนการคัดเลือกทุติยภูมิ พบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก แลคติกแอซิดแบคทีเรีย สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 7 สปีชีส์ ได้แตกต่างกัน สามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 16

ตารางที่ 16 สรุปจำนวนเชื้อทดสอบที่ถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแลคติกแอซิดแบคทีเรีย

เชื้อทดสอบ	จำนวนสารยับยั้งจาก แลคติกแอซิดแบคทีเรีย
<i>S. aureus</i>	4
<i>B. subtilis</i>	5
<i>E. coli</i>	2
<i>C. albicans</i>	-
<i>M. varians</i>	5
<i>L. pentosus</i>	7
<i>P. pentosaceus</i>	8
<i>S. aureus</i> + <i>M. varians</i>	4
<i>S. aureus</i> + <i>L. pentosus</i>	2
<i>S. aureus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	6
<i>B. subtilis</i> + <i>M. varians</i>	1
<i>B. subtilis</i> + <i>L. pentosus</i>	1
<i>B. subtilis</i> + <i>P. pentosaceus</i>	4
<i>E. coli</i> + <i>M. varians</i>	1
<i>E. coli</i> + <i>P. pentosaceus</i>	3
<i>M. varians</i> + <i>P. pentosaceus</i>	2
<i>L. pentosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	6
<i>S. aureus</i> + <i>E. coli</i> + <i>P. pentosaceus</i>	1
<i>S. aureus</i> + <i>M. varians</i> + <i>L. pentosus</i>	1
<i>S. aureus</i> + <i>L. pentosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	2
<i>B. subtilis</i> + <i>L. pentosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	2
<i>M. varians</i> + <i>L. pentosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	2
<i>S. aureus</i> + <i>B. subtilis</i> + <i>L. pentosus</i> + <i>P. pentosaceus</i>	1

3.4 ผลการศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041

เนื่องจากเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 และ *P. pentosaceus* ATCC 33316 เป็นเชื้อที่มีความใกล้เคียงกับแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่นำมาศึกษาในงานวิจัยนี้ จึงได้ตรวจสอบดูว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ 2 สปีชีส์นี้ ในขั้นตอนการคัดเลือกทุติยภูมิ (secondary screening) ได้นั้นสามารถที่จะฆ่าเชื้อทดสอบในสภาพ resting cell ได้หรือไม่ และเนื่องจากผลการทดสอบโดยวิธี agar diffusion ไม่ชัดเจน จึงทำการทดสอบการรอดชีวิตในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.0 + 0.1 ภายหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ในนาที่ที่ 30 ผลแสดงในตารางที่ 17 เชื้อทดสอบที่ใช้คือ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ผลการทดลองพบว่า สารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ N279, N111, N38 และ 940 ที่เติมลงไปภายหลังจากนาที่ที่ 30 พบว่า สามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้ออื่นๆ และเมื่อนำมาเขียนกราฟระหว่างปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ที่รอดชีวิตกับเวลาเป็นนาที่ ภายหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ N279, N111, N38 และ 940 จะได้กราฟดังรูปที่ 23 , 24 ,25 และ 26

ในตารางที่ 18 เชื้อทดสอบที่ใช้คือ *L. pentosus* ATCC 8041 ผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ N279 ที่เติมลงไปภายหลังจากนาที่ที่ 30 สามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 ลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้ออื่นๆ และเมื่อนำมาเขียนกราฟ ระหว่างปริมาณเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 ที่รอดชีวิตกับเวลาเป็นนาที่ ภายหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ N279 จะได้กราฟดังรูปที่ 27 และเมื่อนำมาหาเปอร์เซ็นต์เชื้อที่ตาย (% cell death) ของเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041 พบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ N279, N111, N38 และ 940 สามารถฆ่าเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ได้ 53.55, 46.19, 42.89 และ 37 เปอร์เซ็นต์ ผลแสดงในตารางที่ 19 และสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อทดสอบ N 279 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 ได้ 41.76 เปอร์เซ็นต์ ผลแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 17 แสดงปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ที่รอดชีวิตที่เวลาต่าง ๆ กันหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์

เชื้อ	รหัสเชื้อ	ปริมาณเชื้อ (1×10^4 cfu/ml)				
		เวลา (นาที)				
		0	30	90	150	210
<i>L. brevis</i>	P28-3	3.95	3.94	3.80	3.71	3.39
<i>L. plantarum</i>	891	3.87	3.59	2.69	2.79	3.04
	A85-2	3.95	3.64	3.48	2.85	2.80
	KS22-2	3.94	3.64	3.53	3.29	3.32
	KS22-5	3.87	3.82	3.56	3.48	3.78
	KS25-6	3.85	3.78	3.56	3.54	3.84
	KM1-1	3.91	3.87	3.64	3.74	3.63
	KS35-3	3.91	3.87	3.64	3.74	3.63
	KS39-1	3.92	3.91	3.82	3.54	3.31
	KS25-4	3.87	3.78	3.82	3.43	3.57
	KS26-3	3.87	3.85	3.82	3.67	3.41
	RS74	3.94	3.85	+++	+++	+++
	KS39-3	3.87	3.90	+++	+++	+++
	<i>L. pentosus</i>	940	3.91	3.65	2.25	2.16
FS31-2		3.93	3.97	3.54	3.87	3.56
P305-1		3.87	3.87	3.54	3.48	3.30
KS26-5		3.83	3.85	3.78	3.54	3.30
415		3.93	3.94	3.74	3.45	3.56
865		3.92	3.89	3.74	3.32	3.56
RS48		3.78	3.80	+++	+++	+++
<i>P. pentosaceus</i>	KS19-1	3.92	3.90	+++	+++	+++
	N279	3.81	3.85	1.83	1.95	1.86
	N111	3.84	3.80	2.12	2.0	1.78
	N38	3.79	3.72	2.48	2.15	2.03
	KS30-2	3.95	3.93	2.99	2.89	2.76
	N173	3.84	3.81	2.96	2.86	2.74

ตารางที่ 17 (ต่อ)

เชื้อ	รหัสเชื้อ	ปริมาณเชื้อ (1×10^4 cfu/ml)				
		เวลา (นาที)				
		0	30	90	150	210
<i>P. pentosaceus</i>	KS30-6	3.84	3.78	3.41	3.44	3.17
	N270	3.87	3.82	3.45	3.24	3.06
	N168	4.01	3.97	3.68	3.70	3.37
	N213	3.92	3.84	3.74	3.62	3.56
	N78	3.84	3.91	3.78	3.78	3.76
	N209	3.94	3.92	3.92	3.32	3.52
	KS23-1	3.84	3.80	3.78	3.79	3.40
	KS30-3	3.91	3.87	3.85	3.74	3.75
	N23	3.96	3.94	+++	+++	+++
	N186	3.89	3.91	+++	+++	+++
	N265	3.89	3.87	+++	+++	+++
	N287	3.87	3.79	+++	+++	+++
<i>P. acidilactici</i>	424	3.90	3.86	3.02	2.23	2.23
control		3.84	3.84	3.85	3.81	3.81

หมายเหตุ +++ คือ มีปริมาณเชื้อทดสอบเพิ่มมากขึ้นหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ลงไปหลัง
นาทีที่ 30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 แสดงปริมาณเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 ที่รอดชีวิตที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์

เชื้อ	รหัสเชื้อ	ปริมาณเชื้อ (1×10^4 cfu/ml)				
		เวลา (นาที)				
		0	30	90	150	210
<i>L. plantarum</i>	FS8-2	3.55	3.52	3.22	3.14	1.78
	RS100	3.50	3.48	3.25	2.99	2.96
	KS25-4	3.49	3.45	3.24	3.14	3.18
	891	3.52	3.50	3.57	3.45	3.31
	FS8-1	3.46	3.45	3.35	3.21	3.12
	A85-2	3.50	3.46	3.47	3.54	3.42
	KS48-2	3.48	3.56	+++	+++	+++
<i>L. pentosus</i>	FN1-3	3.52	3.50	2.85	2.93	2.74
	KS20-2	3.54	3.50	2.98	2.83	2.89
	FS31-2	3.49	3.46	3.13	3.02	3.12
	F19-1	3.46	3.47	3.42	3.41	3.26
<i>L. fermentum</i>	950	3.56	3.48	+++	+++	+++
<i>P. pentosaceus</i>	N279	3.45	3.22	2.35	2.07	1.78
	N23	3.45	3.51	2.99	3.05	2.84
	N209	3.48	3.52	3.00	2.95	2.87
	N38	3.49	3.48	3.01	3.18	3.15
	N111	3.42	3.45	3.18	3.05	3.0
	KS23-1	3.48	3.45	3.18	3.02	3.0
	KS30-5	3.5	3.45	3.23	3.14	3.05
	KS30-3	3.56	3.45	3.36	3.18	2.92
	N225	3.54	3.53	3.49	3.42	3.12
	N101	3.50	3.53	+++	+++	+++
KS30-6	3.52	3.50	+++	+++	+++	
control		3.5	3.48	3.52	3.4	3.32

หมายเหตุ +++ คือ มีปริมาณเชื้อทดสอบเพิ่มมากขึ้นหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ลงไปหลังจาก
นาทีที่ 30

ตารางที่ 19 แสดง % cell death ของเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 หลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์

เชื้อ	รหัสเชื้อ	% cell death
<i>L. brevis</i>	P28-3	3.79
<i>L. plantarum</i>	891	30.49
	A85-2	10.94
	KS22-2	10.50
	KS22-5	8.01
	KS25-6	7.53
	KM1-1	6.90
	KS35-3	6.90
	KS39-1	2.55
	KS25-4	1.29
	KS26-3	1.29
	RS74	-
	KS39-3	-
<i>L. pentosus</i>	940	37.00
	FS31-2	9.92
	P305-1	8.53
	KS26-5	1.30
	415	3.80
	865	0.76
	RS48	-
<i>P. pentosaceus</i>	KS19-1	-
	N279	52.55
	N111	46.19
	N38	42.89
	KS30-2	24.30
<i>P. pentosaceus</i>	N173	22.92
	KS30-6	22.56
	N270	10.59

ตารางที่ 19 (ต่อ)

เชื้อ	รหัสเชื้อ	% cell death
<i>P. pentosaceus</i>	N168	8.22
	N213	4.59
	N78	1.56
	N209	1.56
	KS23-1	1.56
	KS30-3	1.53
	N23	-
	N186	-
	N265	-
	N287	-
<i>P. acidilactici</i>	424	10.70

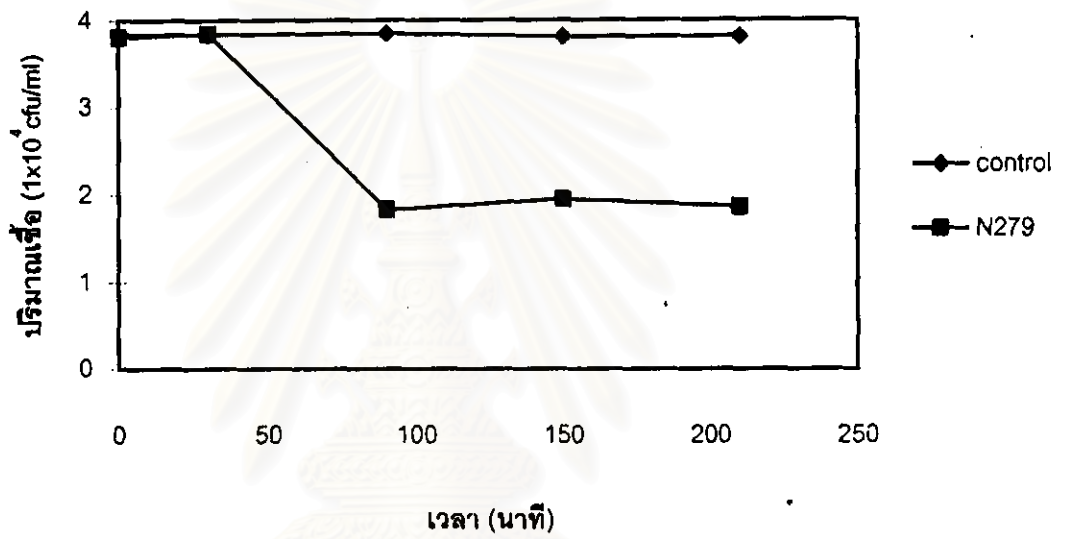
หมายเหตุ - คือ มีปริมาณเชื้อทดสอบเพิ่มมากขึ้นหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ลงไป หลังนาที่ที่ 30

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

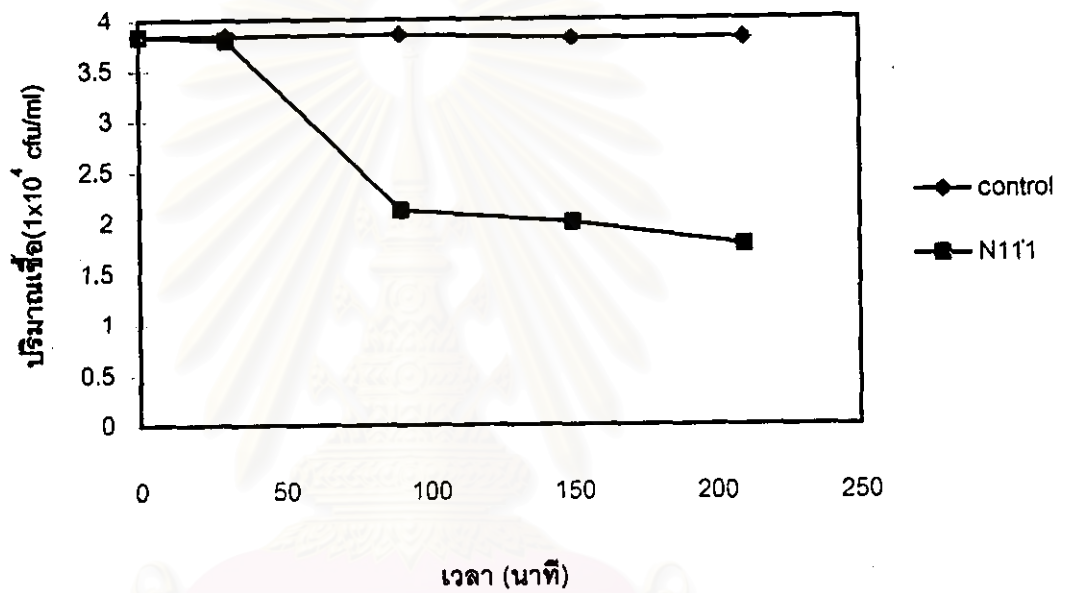
ตารางที่ 20 แสดง % cell death ของเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 หลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์

เชื้อ	รหัสเชื้อ	% cell death
<i>L. plantarum</i>	FS8-2	8.60
	RS100	6.60
	KS25-4	6.00
	891	2.85
	FS8-1	2.80
	A85-2	0
	KS48-2	-
<i>L. pentosus</i>	FN1-3	18.60
	KS20-2	14.90
	FS31-2	9.50
	F19-1	1.44
<i>L. fermentum</i>	950	-
<i>P. pentosaceus</i>	N279	41.76
	N23	15.00
	N209	15.00
	N38	13.50
	N111	7.80
	KS23-1	7.80
	KS30-5	6.30
	KS30-3	4.00
	N225	1.13
N101	-	
	KS30-6	-

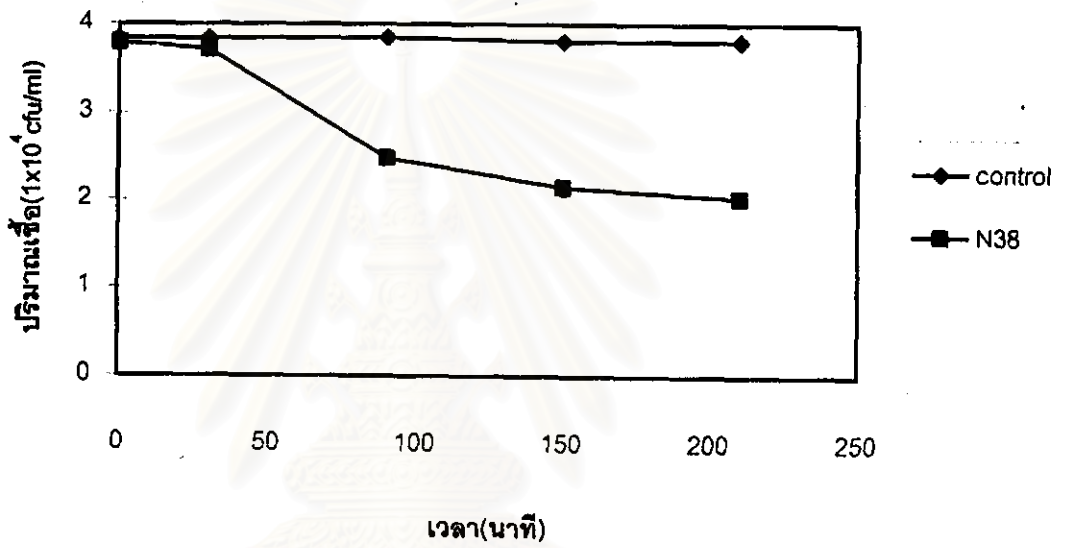
หมายเหตุ - คือ มีปริมาณเชื้อทดสอบเพิ่มมากขึ้นหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ลงไป หลังนาที่ที่ 30



รูปที่ 23 แสดงปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ที่รอดชีวิตที่เวลาต่างๆ กันหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก เชื้อ N279

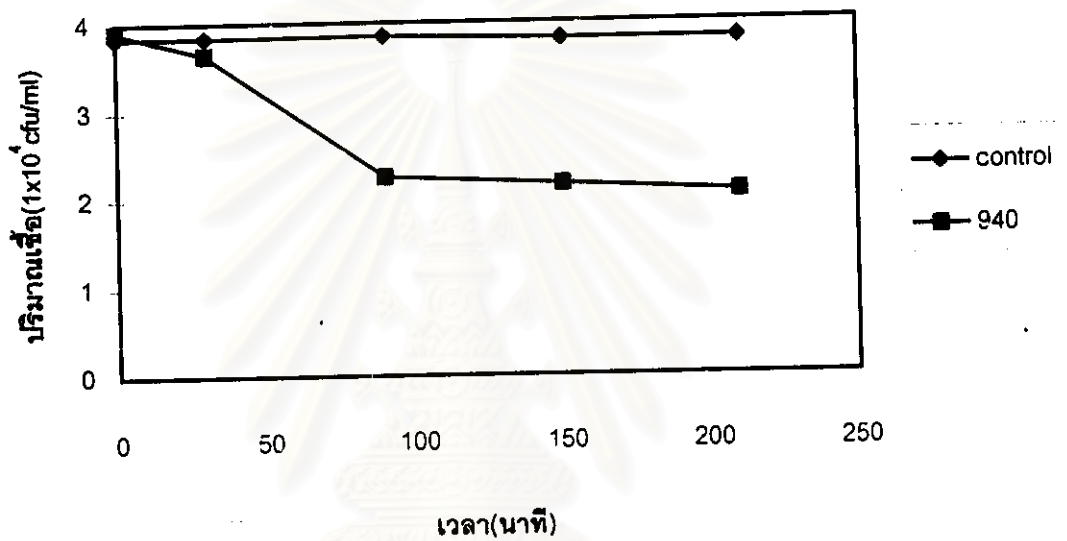


รูปที่ 24 แสดงปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ที่รอดชีวิตที่เวลาต่างๆ กันหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก เชื้อ N111



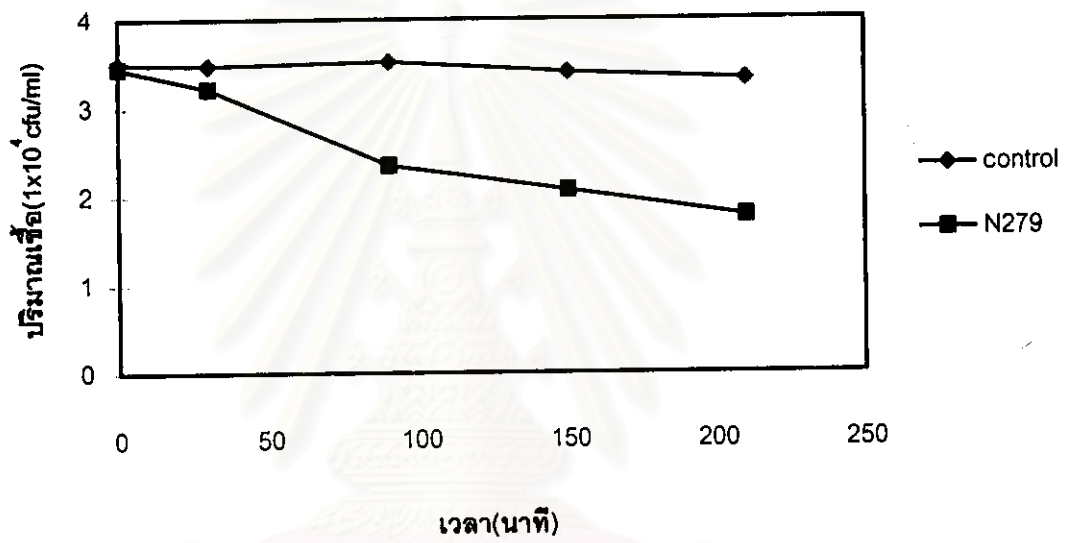
รูปที่ 25 แสดงปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ที่รอดชีวิตที่เวลาต่างๆ กันหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก เชื้อ N38

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 26 แสดงปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ที่รอดชีวิตที่เวลาต่างๆ กันหลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก เชื้อ 940

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 27 แสดงปริมาณเชื้อทดสอบ *L. pentosus* ATCC 8041 ที่รอดชีวิตที่เวลาต่างๆ กัน หลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก เชื้อ N279

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. ผลการศึกษาคุณสมบัติของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้

จากผลการทดลองในขั้นตอนการคัดเลือกปฐมภูมิ การคัดเลือกทุติยภูมิ 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 ซึ่งสามารถสรุปผลได้ดังตารางที่ 21



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 21 สรุปผลการยับยั้งเชื้อทดสอบสายพันธุ์ต่าง ๆ โดยสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ N279, N111, N38 และ 940

สารยับยั้ง จากเชื้อ	เชื้อทดสอบ							% cell death	
	S. aureus	E. coli	B. subtilis	C. albicans	M. varians	L. pentosus	P. pentosaceus	L. pentosus	P. pentosaceus
N 279	+	-	+	-	-	+	+	41.76	52.55
N111	-	-	+	-	-	+	+	-	46.19
N38	+	-	-	-	-	+	+	-	42.89
940	-	-	-	-	+	+	+	-	37.00

+ = ยับยั้งเชื้อทดสอบได้

- = ไม่ยับยั้งเชื้อทดสอบ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ดังนั้นจึงนำสารยับยั้งจุลินทรีย์จาก *P. pentosaceus* รหัส N279, N111, N38 และ *L. pentosus* รหัส 940 มาใช้ในการทดลองต่อไป

4.1 ผลการให้ทำสารยับยั้งจุลินทรีย์กึ่งบริสุทธิ์

นำสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ N279, N111, N38 และ 940 ที่สามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041 ลงได้อย่างชัดเจน มาทำให้กึ่งบริสุทธิ์ โดยเลี้ยงเชื้อ N279, N111, N38 และ 940 ในอาหารเหลว MRS นำส่วนใสมาปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 กรอง และนำไปโดอะไลซ์ โดยใช้ถุงโดอะไลซ์ที่มี molecular weight cut off 1,000 และ 10,000 ใน 10 มิลลิโมลาร์ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเป็นกรดต่าง 7.0 ± 0.1 นำส่วนน้ำใสในถุงโดอะไลซ์มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 โดยวิธี agar diffusion วัด inhibition zone ที่เกิดขึ้น ผลการทดลองพบว่าสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ N279, N111, N38 และ 940 ที่ผ่านการโดอะไลซ์ด้วยถุงโดอะไลซ์ที่มี molecular weight cut off 1,000 และ 10,000 จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 ได้ โดยสังเกตจากไม่มี inhibition zone เกิดขึ้น หลังจากบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส

4.2 ผลการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรตีนของสารที่ได้

นำสารยับยั้งจุลินทรีย์จากเชื้อ N279, N111, N38 และ 940 ที่สามารถลดปริมาณเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 และ *L. pentosus* ATCC 8041 ลงได้อย่างชัดเจน มาทดสอบดูว่าเป็นสารประเภทโปรตีนหรือไม่ โดยเลี้ยงเชื้อ N279, N111, N38 และ 940 ในอาหารเหลว MRS นำส่วนใสมาปรับความเป็นกรดต่างเท่ากับ 7.0 กรอง ใส่เอนไซม์โปรติเนส เค ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ลงไปในส่วนน้ำใสที่ได้ ตัวควบคุมจะไม่มีเอนไซม์ลงไป หลังจากนั้นทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 โดยวิธี agar diffusion วัด inhibition zone ที่เกิดขึ้น ผลแสดงในตารางที่ 22 พบว่า inhibition zone ที่เกิดขึ้นนั้นไม่มีความแตกต่างกันระหว่างการเติมและไม่เติมเอนไซม์โปรติเนส เค แสดงว่าเอนไซม์โปรติเนส เค ไม่สามารถทำลายสารยับยั้งจุลินทรีย์ทั้ง 4 ได้

ตารางที่ 22 แสดง inhibition zone ของเชื้อทดสอบ *P. pentosaceus* ATCC 33316 หลังจากเติมสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่เติม และไม่เติมเอนไซม์โปรตีนเอส เค

สารยับยั้งจากเชื้อ	Inhibition Zone (mm)	
	ไม่เติมเอนไซม์	เติมเอนไซม์
N279	5.3	5.2
N111	6.2	6.0
N38	4.5	4.25
940	3.8	3.9
control	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย