บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

ได้ทำการแยกแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ล.อ.บ.) จากอาหารหมักหลายประเภทเช่น ผักดอง ผลไม้ดอง แหนม และไส้กรอกอีสาน จากตลาดสดต่างๆ ทั้งในกรุงเทพมหานครและจังหวัดใกล้เคียง โดยใช้อาหารจำเพาะต่อพวก ล.อ.บ. เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิไล เอ็มอาร์เอส อาหารเลี้ยงเชื้อน้ำมะเขือเทศ และอาหารเลี้ยงเชื้อเอพีที ที่มี แคลเซียมคาร์บอเนต และบรอมคลีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ เลือกโคโลนีที่สามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง และเกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนี เนื่องจาก ล.อ.บ. สามารถสร้างกรดอินทรีย์เช่นกรดแลคติค กรดอะซิติค จึงมีผลทำให้บริเวณรอบๆโคโลนีมีความเป็นกรด สามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง (บรอมคลีซอลเพอเพิลมีช่วงการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ที่ pH 5.2-6.8) นอกจากนี้กรดยังทำให้ตะกอนของแคลเซียมคาร์บอเนตเปลี่ยนเป็นแคลเซียมอิออนที่ทำให้เกิดบริเวณใสรอบๆโคโลนี เมื่อขีด (Streak) จนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อแต่ละชนิดมาทดสอบเบื้องต้นตามหลักของ Bergey `s Mannual of Systematic Bacteriology ปรากฏว่า สามารถแยก ล.อ.บ.ได้ทั้งสิ้น 50 สายพันธุ์ เมื่อตรวจสอบลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และชีวเคมี พบว่า ล.อ.บ. ที่แยกได้สามารถจัดชนิดเป็น *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus pentosus* และ *Lactobacillus animalis* ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Tanasupawat และคณะ,1992. โดยส่วนใหญ่ ล.อ.บ.ที่แยกได้เป็นพวก Homofermentative Lactic Acid ซึ่งมีความน่าจะเป็นไปได้ในการนำ ล.อ.บ. ที่แยกได้จากอาหารหมักดองในประเทศไทยมาทำเป็นหัวเชื้อ ล.อ.บ.ในอุตสาหกรรมอาหารหมัก แทนการสั่งซื้อหัวเชื้อจากต่างประเทศที่ใช้กันอยู่ในปัจจุบัน

อุตสาหกรรมในประเทศไทย ปัจจุบันมีการลงทุนสูงในการสั่งซื้อหัวเชื้อ ล.อ.บ. จากต่างประเทศ คือ อุตสาหกรรมนม (บรรษัทเงินทุนอุตสาหกรรม, 2535) ในงานวิจัยนี้จึงมุ่งคัดเลือก ล.อ.บ.ที่สามารถหมักน้ำนมพร่องมันเนยให้เป็นตะกอนก้อนลิ่มในช่วงเวลาสั้นเพื่อคาดหวัง

ว่าใช้ ล.อ.บ. ที่ผลิตทั้งสารต่อต้านจุลชีพและตกตะกอนก้อนลิ่มในช่วงเวลาสั้นเป็นหัวเชื้อทดแทนการสั่งซื้อจากต่างประเทศ ในการทดลองนี้พบว่าในระยะแรกของการเลี้ยง ล.อ.บ. ที่แยกได้จากอาหารหมักจะใช้เวลานานในการตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนย แต่เมื่อมีการถ่ายเชื้อบ่อยครั้งขึ้นพบว่า ระยะเวลาในการตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนยจะสั้นลงคาดว่าเนื่องมาจาก ล.อ.บ. ใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ (เดิมอยู่ในอาหารหมักดองและเปลี่ยนมาเลี้ยงในน้ำนมพร่องมันเนย) โดยทั่วไป ล.อ.บ.จะมีการแสดงออกของยีน Lac Operon (Lawrence และ Terence, 1979) มีผลจาก Catabolite Repression ซึ่งจะต้องมีน้ำตาลแลคโตสเป็น Inducer ในการทำงานของ Lac Operon เพื่อสร้างเอนไซม์ β-galactosidase ที่สามารถย่อยน้ำตาลแลคโตสให้เป็นน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคส ซึ่ง ล.อ.บ. ใช้เป็นสารตั้งต้นใน Embden-Meyerhof-Parnas Pathway และสร้างกรดแลคติค (Somkuti and Steinberg, 1979) กรดที่เกิดขึ้นจะตกตะกอนโปรตีนเคซีนอิน (Casein) ในน้ำนม ส่วนใหญ่ในอาหารหมักดองไม่มีน้ำตาลแลคโตสจึงเป็นไปได้ที่ ล.อ.บ. ในสภาพอาหารดังกล่าวไม่มีการแสดงออกของยีน Lac Operon ชั่วคราวแต่สามารถถูกชักนำด้วยแลคโตสและปรับตัวในสภาพใหม่ จากการศึกษานี้ ล.อ.บ. ที่แยกได้ถูกนำมาปรับสภาพเพื่อตรวจดูความสามารถของสายพันธุ์ที่ผลิตสารต่อต้านจุลชีพและตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนย

การทดสอบความสามารถของ ล.อ.บ. ในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยการนำส่วนน้ำใสของล.อ.บ. อายุ 36 ชม. มีค่าความเป็นกรดด่างประมาณ 3.5-4.0 ซึ่งส่วนน้ำใสจะมีสภาวะเป็นกรดที่เกิดจากการสร้างโดย ล.อ.บ. มาทดสอบกับเชื้อทดสอบ *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Staphylococcus aureus* ทั้งโดยวิธีการดูดซึมของสารผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง (Agar Diffusion) และวิธี Tube Test โดยการวัดค่าความขุ่นของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 nm พบว่าเมื่อทดสอบโดยวิธี Agar Diffusion จะเกิดบริเวณใส (Clear Zone) รอบๆ หลุม และทำให้สีของอินดิเคเตอร์บรอมครีซอลเพอร์เพิลเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งทำให้เราทราบว่าบริเวณใสที่เกิดขึ้นมาจากกรดอินทรีย์ที่ ล.อ.บ.สร้างขึ้นเช่น กรดแลคติค กรดอะซิติค เป็นต้น นอกจากนี้เมื่อทดสอบโดยวิธี Tube Test พบว่าผลของกรดยังสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิดได้ ผลการทดลอง

ที่ได้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Tramer, 1966. ซึ่งพบว่า กรดอินทรีย์ที่สร้างโดย ล.อ.บ. จะมีผลต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ

การทดสอบความสามารถของ ล.อ.บ. ที่แยกจากอาหารหมักดองในการสร้างสารต่อต้านจุลชีพโดยการนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. อายุ 36 ชม. ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 เพื่อกำจัดอิทธิพลของกรดอินทรีย์ที่ ล.อ.บ. สร้างขึ้น พบว่ามีเฉพาะสายพันธุ์ BL เท่านั้นที่สามารถให้บริเวณใสรอบๆ หลุมทดสอบต่อเชื้อทดสอบ *B. subtilis* เมื่อทำการทดสอบโดยวิธี Agar Diffusion และเมื่อนำมาทดสอบโดยวิธี Tube Test พบว่า ล.อ.บ. สายพันธุ์ BL สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้มากที่สุด งานวิจัยนี้จึงนำสายพันธุ์ BL ไปศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต่อต้านจุลชีพในลำดับต่อไป เมื่อเปรียบเทียบการทดสอบโดยวิธีการดูดซึมบนอาหารเลี้ยงเชื้อกับวิธีการทดสอบโดย Tube Test พบว่าจะตรวจพบการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ในวิธี Tube Test แต่ไม่พบในวิธี Agar Diffusion ทั้งนี้เนื่องจากวิธี Agar Diffusion จะมีข้อจำกัดอย่างมากในการทดสอบ (Alfred และ Davision, 1990) เช่น ความสามารถในการแพร่ของสารต่อต้านจุลชีพผ่านเนื้อวุ้น ซึ่งเกี่ยวข้องกับเปอร์เซนต์วุ้น ปริมาณความชื้นในเนื้อวุ้น น้ำหนักโมเลกุลของสารต่อต้านจุลชีพเอง อาจเกิดจากความไม่เที่ยงในการเทวุ้น ในวิธี Tube Test ตรวจดูการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยตรวจวัดเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของเชื้อทดสอบเปรียบเทียบเมื่อมีและไม่มีสารต่อต้านจุลชีพ จากในการศึกษานี้ได้ผลดีที่สามารถจะแปรผลให้ชัดเจนดังรูปที่ 3.8-3.13 ดังนั้นต่อไปในที่นี้จึงเลือกวิธีการทดสอบโดย Tube Test

รูปที่ 3.8-3.13 เมื่อเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงของส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 3.3-4.0 และ 6.5 กับจุลชีพทดสอบ พบว่าส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ.ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 3.3-4.0 ซึ่งมีค่าความเป็นกรดเมื่อรวมกับจุลชีพทดสอบจะทำให้เกิดตะกอนขึ้น (Mocquot and Hurel, 1970) ซึ่งอาจเกิดมาจากกรดอินทรีย์ที่ ล.อ.บ. สร้างขึ้นทำให้เกิดการตกตะกอนของโปรตีน จึงมีผลทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าเมื่อนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ.ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 รวมกับจุลชีพทดสอบที่สภาวะเดียวกัน

การติดตามการเจริญของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL พบว่าจะมีเวลาเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (Doubling Time) เท่ากับ 5.63 ชม. เมื่อศึกษาหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจริญของ ล.อ.บ. สายพันธุ์ BL กับ การสร้างสารต่อต้านจุลชีพ ตารางที่ 3.7 และ รูปที่ 3.16 พบว่าสารต่อต้านจุลชีพจะสร้างขึ้นเมื่อเข้าสู่ระยะหลังของการเจริญแบบสเตชั่นเนอรี่ของจุลินทรีย์ (Late Stationary Phase) ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 36 ชม. ผลการทดลองสอดคล้องกับ Silva, Jacobus และ Eorbach (1987) ซึ่งกล่าวว่า สารต่อต้านจุลชีพที่ ล.อ.บ. สร้างขึ้นจัดเป็นสารที่สร้างขึ้นโดยไม่เกี่ยวข้องกับการเจริญเป็นสารที่จัดอยู่ในกลุ่ม (Secondary Matabolit)(Florey และคณะ, 1949) ส่วนน้ำใส pH 6.5 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 12 และ 24 ชม. จะให้ผลการเจริญของจุลชีพทดสอบดีกว่าตัวควบคุมคาดว่าน่าจะเกิดจากในช่วงระยะเวลาที่ 12 และ 24 ชม. เป็นช่วงการเจริญของ ล.อ.บ. จึงสร้างสารต่างๆเช่นวิตามิน ซึ่งจะมีผลในการเร่งการเจริญของจุลชีพทดสอบได้ดีกว่าตัวควบคุมที่มีเชื้อทดสอบเลี้ยงกับอาหารเลี้ยงเชื้อแลคโตบาซิไล เอ็มอาร์เอส ส่วนในตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.17 *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ AE เมื่อนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ 12, 24 และ 36 ชม. มาทดสอบการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบ พบว่าจะให้ผลในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบไม่แตกต่างกัน เหตุผลอธิบายได้คือ อาจจะเป็นผลเนื่องจาก *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ AE มีระยะเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าไม่เท่ากับสายพันธุ์ BL จึงทำให้ระยะระยะเวลาการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ

การนำสารต่อต้านจุลชีพผ่านกระบวนการ ไดอะไลซิส หรือการทำแห้งในภาวะเยือกแข็ง จะทำให้สารต่อต้านจุลชีพเข้มขึ้นเมื่อนำมาทดสอบกับเชื้อทดสอบพบว่า สารต่อต้านจุลชีพจะมีผลต่อ *B. subtilis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง มากกว่า *S. aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม และ *E. coli* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง ผลการทดลองสอดคล้องกับ Georges, Helen และ Raymond (1979) ซึ่งกล่าวว่า สารต่อต้านจุลชีพที่สร้างจาก ล.อ.บ. พวก *Lactobacillus* sp. มักมีผลต่อ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์อื่นหรือพวกแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่งอื่นๆ

ในการสกัดแยกสารต่อต้านจุลชีพออกจากน้ำเลี้ยง *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ทำโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตที่ความเข้มข้นอิ่มตัว 40,70 และ 90 % พบว่าสารต่อต้านจุลชีพจะพบในช่วงตกตะกอนที่ 70 % แอมโมเนียมซัลเฟต ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยของ Wanda และ Glatz, 1991; Vaughan และคณะ, 1992 จากนั้นนำไปผ่านคอลัมน์ดีอีเออีเซฟาเดกซ์ เอ-50 และทำการชะคอลัมน์ด้วยเกรเดียนท์เส้นตรงของ เกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าโปรตีนที่มีความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวเชื้อทดสอบจะออกมาที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 200-300 มิลลิโมลาร์ แสดงว่าสารต่อต้านจุลชีพมีประจุเป็นลบที่ไม่สูงมาก เนื่องจากสามารถถูกชะออกจากคอลัมน์ในช่วงความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ไม่สูงมาก

เมื่อรวมสารละลายในลำดับส่วนที่ชะผ่านกระบวนการของคอลัมน์ ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ แล้วนำมาทำให้บริสุทธิ์ยิ่งขึ้นโดยอาศัยหลักการแยกตามขนาดน้ำหนักโมเลกุลในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 ซึ่งเซฟาเดกซ์ จี-75 จะสามารถแยกสารได้ดีในช่วงน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 3,000-70,000 ดาลตัน (Pharmacia Fine Chemicals, 1983) การศึกษาครั้งนี้พบว่าสารต่อต้านจุลชีพจะออกมาในลำดับส่วนต้นๆ ซึ่งไม่ห่างจากปริมาณในช่องว่างของคอลัมน์ ดังนั้นพอจะคาดได้ว่าสารต่อต้านจุลชีพที่นำมาศึกษามีน้ำหนักโมเลกุลค่อนข้างใหญ่ สารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์พบว่า สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *B. subtilis* ซึ่งจัดเป็นพวกแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง จากนิยามของแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin)(Klaenhammer, 1988) ที่สร้างโดย ล.อ.บ. ที่กล่าวว่าเป็นสารต่อต้านจุลชีพที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ในกลุ่มที่มีลักษณะใกล้เคียงกัน เช่น แลคติคแอสิดแบคทีเรียและแบคทีเรียแกรมบวกบางชนิด จึงอาจจัดว่าสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างโดย *Lb. plantarum* สายพันธุ์ BL เป็นแบคเทอริโอซินชนิดหนึ่งการทดลองนี้ยังไม่ได้ทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของ ล.อ.บ. สายพันธุ์ใกล้เคียงกัน แต่มุ่งเน้นศึกษาการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบที่เป็นจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหารเช่น *E. coli*, *S. aureus* และ *B. subtilis* เพื่อที่จะสามารถนำ มาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักและเป็นประโยชน์ต่อผู้บริโภคมากที่สุด

เมื่อนำสารต่อต้านจุลชีพมาทำการหาน้ำหนักโมเลกุลของสารต่อต้านจุลชีพ โดยวิธีอิเลคโตโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล พบว่าได้แถบโปรตีนที่ติดสีอย่างเด่นชัด 2 แถบและมีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 และ 43,000 ดาลตัน และหลังจากนำมาย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส ไลเปส และ โปรติเอส พบว่าแถบโปรตีนจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส จึงคาดว่าสารต่อต้านจุลชีพน่าจะเป็นสารประเภทไลโพโปรตีน ผลการทดลองที่ได้แตกต่างจากการทดลองของ West และ Wanner, 1988 ซึ่งพบว่า *Lb. plantarum* strain NCDO 1193 สามารถสร้าง platacin B ซึ่งเป็นสารต่อต้านจุลชีพประเภทโปรตีนที่มีทั้งไขมัน และคาร์โบไฮเดรทเป็นส่วนประกอบ แต่โดยส่วนมากน้ำหนักโมเลกุลของสารต่อต้านจุลชีพที่สร้างโดย ล.อ.บ.จะมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (Low Molecular Weight) (Catherine และ Barefoot, 1993) แต่สารต่อต้านจุลชีพที่สร้างโดย *Lb. plantarum* สายพันธุ์ BL จากรูปที่ 3.30 ก.(ช่องที่ 3) มีน้ำหนักโมเลกุลสูง 33,000 และ 43,000 ดาลตัน และเมื่อนำสารต่อต้านจุลชีพมาย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปสและโปรติเอส รูปที่ 3.30 ก.(ช่องที่ 6) และรูปที่ 3.30 ข. (ช่องที่ 1 และ 4) จะไม่พบแถบโปรตีนของสารต่อต้านจุลชีพที่ถูกย่อยและแถบของเอนไซม์บน เจลอิเลคโตโฟรีซิสเลย ซึ่งเป็นไปได้ที่เนื่องมาจากสารต่อต้านเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์แล้วจะมีขนาดเล็กลงมา เมื่อผ่านลงเจลจึงหลุดออกจากเจลก่อนสีอินดิเคเตอร์ ทำให้ไม่สามารถตรวจพบแถบของสารต่อต้านจุลชีพที่เหลืออยู่หลังการย่อย

ล.อ.บ. *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพ และตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนย ถูกนำมาทดสอบเป็นหัวเชื้อในการเตรียมผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต จากการทดสอบด้วยประสาทสัมผัสของโยเกิร์ตเปรียบเทียบระหว่างโยเกิร์ตจำหน่ายในท้องตลาดกับ โยเกิร์ตที่เตรียมในห้องปฏิบัติการโดยการใช้ ล.อ.บ. ที่ทำโยเกิร์ตจากประเทศเกาหลี (BA), *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL และ โยเกิร์ตตัวควบคุมที่เตรียมโดยกรรมวิธีในห้องปฏิบัติการ พบว่า การยอมรับรวมของโยเกิร์ตที่เตรียมในห้องปฏิบัติการทุกๆ ตัวอย่างมีค่าใกล้เคียงกัน โดยที่โยเกิร์ตที่เตรียมได้จาก *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ก็สามารถนำมาทำโยเกิร์ตได้ แต่ขั้นตอนในการทำโยเกิร์ตในห้องปฏิบัติการอาจจะมีส่วนผสมและวิธีการไม่เหมือนกับโยเกิร์ตที่จำหน่ายในท้องตลาด จึงทำให้ค่าการยอมรับรวมน้อยกว่าโยเกิร์ตที่จำหน่าย

ในท้องตลาด แต่ถ้ามีการเตรียมโยเกิร์ตโดยใช้ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ก็คาดว่าจะมีรสชาติไม่แตกต่างจากโยเกิร์ตที่จำหน่าย ดังนั้นอาจกล่าวได้ว่าถ้ามีการนำ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL มาเป็นหัวเชื้อในอุตสาหกรรมการหมัก จะมีประโยชน์ต่อผู้บริโภคอย่างมาก กล่าวคือสามารถใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักยังให้สารต่อต้านจุลชีพ ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งหรือหน่วงเหนี่ยวการเจริญของจุลชีพก่อโรคในระบบทางเดินอาหาร ทำให้ผู้บริโภคไม่เป็นโรคในระบบทางเดินอาหารมีสุขภาพสมบูรณ์ (Khem และ Ayebo, 1980) และเป็นตัวถนอมเก็บอาหารได้นาน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย