

# การศึกษาค่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากมะขามแช่อิ่ม

## Study of Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Pickled Tamarind

ศิริทิพย์ ยะกับ<sup>1</sup> อัมรา ชำนาญ<sup>1</sup> สมเพียร พักทอง<sup>2</sup> และ กานต์ แยมพงษ์<sup>1\*</sup>

Sirintip Yakub<sup>1</sup> Ummara Chamnan<sup>1</sup> Sompian Fakthong<sup>2</sup> and Karn Yaempongsa<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ ประเทศไทย 67000

<sup>2</sup>ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ เพชรบูรณ์ ประเทศไทย 67000

<sup>1</sup>Program of Biology, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun Province, Thailand 67000

<sup>2</sup>Science Center, Faculty of Science and Technology, Phetchabun Rajabhat University, Phetchabun Province, Thailand 67000

\*Corresponding author: yaempongsa\_karn@hotmail.com

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากมะขามแช่อิ่มและศึกษาค่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อของสารละลายส่วนใส (Crude filtrate supernatant fluid; CFSF) เพื่อนำไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากมะขามแช่อิ่ม ลงบนอาหาร Modified MRS Agar ที่เติม CaCO<sub>3</sub> ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 25 ไอโซเลท จากนั้นนำไปเลี้ยงในอาหาร MRS broth เพื่อทำการเก็บ CFSF โดยนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที มาทดสอบ ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค 4 ชนิด ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* พบว่ามี 5 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทั้ง 4 ชนิด โดยไอโซเลท LT11 มีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสูงสุด เมื่อนำ CFSF ของไอโซเลท LT11 มาทดสอบ ความคงตัวระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกต่อ *S. aureus* และ *E. coli* พบว่า LT11 มีค่ากิจกรรมสูงสุดที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* เท่ากับ 50 หน่วยต่อมิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดย CFSF สามารถทนอุณหภูมิสูงที่สุดที่ 60 องศาเซลเซียส ได้นาน 60 นาที ต่อเชื้อทดสอบทั้งสองชนิด โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 25 หน่วยต่อมิลลิเมตร

**คำสำคัญ:** มะขามแช่อิ่ม แบคทีเรียแลคติก ค่ากิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ จุลินทรีย์ก่อโรค

### Abstract

The objectives of this study were to separate lactic acid bacteria from pickled tamarind and to study the inhibition activity of crude filtrate supernatant fluid (CFSF) to inhibited pathogenic microorganisms growth. Lactic acid bacteria were separated from pickled tamarind with modified MRS agar (0.5% w/v of CaCO<sub>3</sub> added). 25 isolates of lactic acid bacteria were obtained then collected CFSF by centrifuge at 10,000 rpm at 4 °C for 10 mins. Preliminary inhibition was tested by using 4 species of pathogenic bacteria included *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. 5 isolates can inhibited all of test microorganism. The result showed CFSF of LT11 was the most effective to inhibit the test pathogenic bacteria. The CFSF of LT11 have been studied for antimicrobial activity and the stability against *S. aureus* and *E. coli* and showed the best inhibitory activity against *S. aureus* and *E. coli* was 50 AU/ml at 37 °C 30 mins. The CFSF of LT11 was able to withstand the highest temperature at 60 °C for 60 minutes with inhibition activity for both of test microorganisms was 25 AU/ml.

**Keywords:** Pickled tamarind Lactic acid bacteria Antimicrobial activity Pathogenic microorganism

## บทนำ

อาหารเป็นสิ่งที่มนุษย์ต้องบริโภคเพื่อเป็นแหล่งพลังงาน ในปัจจุบันมีอาหารหลากหลายรูปแบบทั้งที่เป็นวัตถุดิบเพื่อนำไปปรุงอาหารเอง อาหารที่วางขายในตลาดของท้องถิ่นหรืออาหารที่พร้อมรับประทานที่อยู่ในรูปแบบอาหารแช่แข็งทำให้มีทางเลือกมากมายในการบริโภคอาหารมากขึ้นและสิ่งสำคัญที่ผู้บริโภคให้ความสำคัญเป็นอย่างมาก คือ ความปลอดภัย หากอาหารที่ผู้บริโภคนำมาบริโภคนั้นมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียที่ก่อโรคมักจะส่งผลเสียต่อสุขภาพซึ่งบางรายอาจจะมีอาการหนักถึงขั้นเสียชีวิตได้ และอาหารบางประเภทที่ผู้ผลิตทำขึ้นมีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสียเป็นเหตุให้รักษาได้ไม่นาน โดยจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* นอกจากนั้นยังอาจปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเสื่อมเสีย เช่น *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นต้น ซึ่งจุลินทรีย์เหล่านี้มักจะพบได้ง่ายในอาหาร ดังนั้นผู้ผลิตจึงเริ่มมีการนำวัตถุดิบเสียมาช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารโดยวัตถุดิบเสียที่นิยมนำมาใช้ส่วนใหญ่จะเป็นวัตถุดิบเสียเชิงเค็ม หากผู้บริโภคได้รับในปริมาณมากเกินไปก็จะส่งผลเสียแก่ผู้บริโภคซึ่งอาจทำให้ประสิทธิภาพของตับและไตในการกำจัดสารเคมีเหล่านี้ลดลงและทำให้เกิดผลเสียต่อดับและไตได้ เพื่อเป็นการแก้ไขปัญหาการเสื่อมเสียทางด้านสุขภาพร่างกายแก่ผู้บริโภคและลดปัญหาการใช้วัตถุดิบเสียเพื่อใช้ในการถนอมอาหาร จึงได้คิดหาวิธีโดยการใช้สารสกัดจากธรรมชาติที่ปลอดภัยแก่ผู้บริโภค ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแลคติกมีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหาร ทำให้ถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหารเพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว

จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัยสามารถนำไปใช้ในอาหารได้ [1] และมีบทบาทที่สำคัญ คือ มีส่วนในการแปรรูปอาหาร สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค เช่น กรดแลคติกที่ทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารลดลง ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ถูกสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อและมีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ [2] และแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย [3] งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจที่จะศึกษาการคัดเลือกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคจากมะขามแช่อิ่มซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากจังหวัดเพชรบูรณ์และเพื่อเป็นแนวทางในการนำมาประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค

## วิธีดำเนินงานวิจัย

### 1. จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์

### 2. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหารหมักดอง

การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างมะขามแช่อิ่มปริมาณ 25 กรัม นำมาตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher (Seward, United Kingdom) ด้วยความเร็ว 250 รอบต่อนาที ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลาย NaCl ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ หลังจากนั้นทำการเจือจางตัวอย่างที่ผ่านการตีปั่นแล้วไปที่ระดับความเจือจาง  $10^{-4}$  นำตัวอย่างทุกความเจือจางมาเกลี่ย (Spread) ลงบนผิวหน้าอาหาร Modified MRS agar ที่เติม  $\text{CaCO}_3$  ความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) [1] โดยปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการคัดแยกเชื้อโคโลนีเดี่ยวที่พบโซนใส (Clear zone) จากนั้นนำเชื้อที่คัดแยกได้มา cross streak เพื่อให้ได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

### 3. การทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี Agar well diffusion

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใส (Crude filtrate supernatant fluid; CFSF) จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

เบื้องต้นด้วยวิธี Agar well diffusion โดยนำเชื้อทดสอบ มาปรับความขุ่นเท่ากับสารละลาย McFarland standards เบอร์ 0.5 ใช้ไม้พันสำลีจุ่มเชื้อแบคทีเรียก่อโรคที่ปรับความขุ่นแล้ว นำไปป้ายลงบนอาหาร Nutrient agar (NA) จากนั้นเจาะอาหารที่ผ่านการป้ายเชื้อด้วย cork borer (6.00 มิลลิเมตร) ปิเปต CFSF ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงหลุมนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดโซนใสยับยั้งรอบ ๆ หลุม

#### 4. การทดสอบลักษณะและความสามารถเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ไปตรวจสอบด้วยเทคนิคการย้อมสีแบบแกรม สังเกตลักษณะรูปร่างของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ หลังจากนั้นนำไปทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงในอาหาร MRS agar ที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 37 ชั่วโมง จากนั้นใช้ลูปที่ผ่านการฆ่าเชื้อเช็ดแบคทีเรียแลคติกลงบนแผ่นสไลด์ที่หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ( $H_2O_2$ ) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ตรวจสอบผลการทดลองโดยการสังเกตฟองอากาศที่เกิดขึ้น

#### 5. การทดสอบความคงตัวระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติกต่อ *S. aureus* และ *E. coli*

นำเชื้อแบคทีเรียโอไซเลทที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดมาเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยก CFSF เพื่อทดสอบค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อทดสอบ (*S. aureus* และ *E. coli*) โดยทำการเจือจาง CFSF ด้วยน้ำกลั่น ที่ระดับความเจือจาง 1:2 1:4 1:8 1:16 1:32 1:64 และ 1:128 (ปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้นนำไปทดสอบความคงตัวของอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้ง โดยการแช่ CFSF ในอุณหภูมิและระยะเวลาที่แตกต่างกัน (อุณหภูมิ 37 60 และ 90 องศาเซลเซียส และเวลาในการแช่ 30 60 และ 90 นาที) จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion ทำการคำนวณหาค่ากิจกรรมการยับยั้งจากค่าเจือจางสูงสุดที่สามารถยับยั้งได้ตัวอย่างจากสูตร [4]

$$\text{ค่ากิจกรรมที่ยับยั้งได้ (AU/ml)} = \frac{\text{ระดับความเจือจางสูงสุดที่ยับยั้งได้} \times 1,000}{\text{ปริมาตรของสารทดสอบ}}$$

### ผลการวิจัย

#### 1. การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างอาหารหมักดอง

จากการแยกแบคทีเรียแลคติกจากมะขามแช่อิ่ม โดยใช้อาหาร MRS agar พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต ได้แก่ LT1 LT2 LT3 LT4 LT5 LT6 LT7 LT8 LT9 LT10 LT11 LT12 LT13 LT14 LT15 LT16 LT17 LT18 LT19 LT20 LT22 LT23 LT24 และ LT25 ซึ่งพบว่าแบคทีเรียทั้งหมดนี้มีการสร้างวงใส เมื่อเจริญในอาหาร Modified MRS agar (Figure 1)



Figure 1 Clear zone characteristics of Lactic acid bacteria on Modified MRS agar

## 2. การทดสอบความสามารถการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค ด้วยวิธี Agar well diffusion

เมื่อนำ CFSF ของเชื้อทั้ง 25 ไอโซเลท มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion พบว่ามี 10 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ (LT3 LT4 LT6 LT8 LT11 LT14 LT15 LT18 LT20 และ LT21) โดยไอโซเลทที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด คือ LT11 และ LT3 โดยมีขนาดความกว้างของวงใสอยู่ที่  $15.92 \pm 0.11$  และ  $15.68 \pm 0.39$  มิลลิเมตร ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p > 0.05$ ) 11 ไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ (LT1 LT6 LT11 LT13 LT14 LT15 LT18 LT19 LT21 LT23 และ LT24) โดยไอโซเลทที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด คือ LT24 โดยมีขนาดความกว้างของวงใสอยู่ที่  $15.33 \pm 0.57$  มิลลิเมตร โดยมีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากไอโซเลทอื่น ๆ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ( $p < 0.05$ ) 9 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ (LT1 LT3 LT6 LT11 LT14 LT15 LT18 LT20 และ LT21) ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด คือ LT21 และ LT1 มีขนาดความกว้างของวงใสอยู่ที่  $14.31 \pm 0.20$  และ  $13.92 \pm 0.43$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ( $p > 0.05$ ) และ 9 ไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ (LT1 LT3 LT4 LT6 LT11 LT14 LT15 LT18 และ T20) ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งได้ดีที่สุด คือ LT6 โดยมีขนาดความกว้างของวงใสอยู่ที่  $13.95 \pm 0.33$  มิลลิเมตร ( $p > 0.05$ ) จากการศึกษาความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้งหมดพบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลท (24 เปอร์เซ็นต์) สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 4 ชนิด คือ LT6 LT11 LT14 LT15 และ LT18 (Table 1) เมื่อพิจารณาความแตกต่างทางสถิติของความสามารถในการยับยั้งเชื้อแต่ละชนิดพบว่า LT11 สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุด คือ LT14 สำหรับ *B. subtilis* พบ 4 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อที่ประสิทธิภาพสูงสุดโดยไม่มีมีความแตกต่างกัน ( $p > 0.05$ ) คือ LT6 LT11 LT14 และ LT18 และไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด คือ LT6 เมื่อพิจารณาจากผลการทดลองโดยรวมจากประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อทั้ง 4 ชนิดพบว่า LT11 สามารถยับยั้งเชื้อโดยรวมได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่น ๆ จึงทำการเลือกไอโซเลท LT11 เพื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

**Table 1** Antimicrobial activity of selected isolates against different bacteria

| Lactic bacteria<br>(Code) | Inhibition zone (mm)     |                          |                         |                         |
|---------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|
|                           | <i>S. aureus</i>         | <i>E. coli</i>           | <i>B. subtilis</i>      | <i>P. aeruginosa</i>    |
| LT1                       | -                        | $10.30 \pm 0.48^{EF,b}$  | $13.92 \pm 0.43^{A,a}$  | $9.81 \pm 0.19^{D,b}$   |
| LT3                       | $15.68 \pm 0.39^{A,a}$   | -                        | $11.18 \pm 0.40^{C,b}$  | $10.7 \pm 90.73^{CD,b}$ |
| LT4                       | $11.05 \pm 0.13^{CD,a}$  | -                        | -                       | $11.67 \pm 0.49^{BC,a}$ |
| LT6                       | $13.04 \pm 0.35^{B,b}$   | $9.46 \pm 0.30^{F,c}$    | $12.59 \pm 0.33^{B,b}$  | $13.95 \pm 0.33^{A,a}$  |
| LT8                       | $11.62 \pm 0.88^{BC,a}$  | -                        | -                       | -                       |
| LT11                      | $15.92 \pm 0.11^{A,a}$   | $11.28 \pm 0.47^{DE,c}$  | $12.87 \pm 0.78^{B,b}$  | $10.79 \pm 0.92^{CD,c}$ |
| LT13                      | -                        | $11.52 \pm 0.11^{CD,a}$  | -                       | -                       |
| LT14                      | $10.21 \pm 0.21^{E,b}$   | $13.38 \pm 0.14^{B,a}$   | $12.59 \pm 0.56^{B,a}$  | $10.70 \pm 0.75^{CD,b}$ |
| LT15                      | $10.20 \pm 0.20^{E,b}$   | $10.52 \pm 0.45^{DEF,b}$ | $10.18 \pm 0.40^{D,b}$  | $12.15 \pm 1.03^{B,a}$  |
| LT18                      | $13.64 \pm 0.32^{B,a}$   | $12.35 \pm 0.22^{BC,b}$  | $12.62 \pm 0.34^{B,ab}$ | $10.37 \pm 1.20^{B,c}$  |
| LT19                      | -                        | $12.50 \pm 0.27^{CD,a}$  | -                       | -                       |
| LT20                      | $11.13 \pm 0.48^{CD,ab}$ | -                        | $11.60 \pm 0.53^{C,a}$  | $10.12 \pm 0.76^{BC,b}$ |
| LT21                      | $10.78 \pm 0.68^{DE,b}$  | $10.23 \pm 0.52^{EF,b}$  | $14.31 \pm 0.20^{A,a}$  | -                       |
| LT23                      | -                        | $10.97 \pm 0.84^{DE,a}$  | -                       | -                       |
| LT24                      | -                        | $15.33 \pm 0.57^{A,a}$   | -                       | -                       |

- = No inhibition zone

Values are expressed mean  $\pm$  standard deviation

Mean in the same column with letter (A-F) represent statistically significant difference ( $p < 0.05$ )

Mean in the same row with letter (a-c) represent statistically significant difference ( $p < 0.05$ )

### 3. การทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบเชื้อเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก

เมื่อทำการทดสอบการย้อมแกรมเพื่อตรวจสอบลักษณะและทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ติดสีม่วง-น้ำเงินของ crystal violet ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีลักษณะเป็นรูปท่อน (Figure 2) และไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส

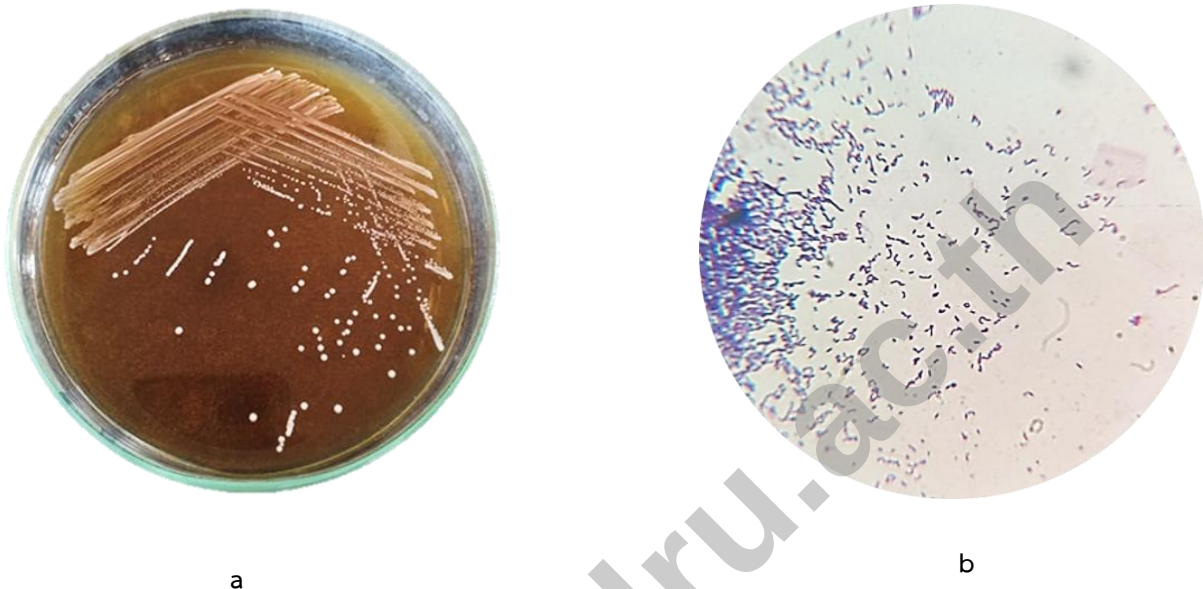


Figure 2 a, Colonies characteristics of LT11 on MRS agar; b, Characteristics of LT11 under a microscope (1,000x)

### 4. การทดสอบความคงตัวระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติก

จากการศึกษาความคงตัวระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้ง *S. aureus* และ *E. coli* ของแบคทีเรียแลคติก โดยทำการเจือจาง CFSF ที่ระดับความเจือจาง 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64 และ 1:128 จากนั้นนำไปแช่ที่อุณหภูมิ 37, 60 และ 90 องศาเซลเซียส โดยมีระยะเวลาการแช่ที่แตกต่างกัน คือ 30, 60 และ 90 นาที ทดสอบความสามารถการยับยั้งด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า CFSF ของไอโซเลท LT11 สามารถทนความร้อนสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยพบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งของ CFSF มีค่าสูงสุดเท่ากับ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที โดยขนาดความกว้างของวงใสในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* อยู่ที่  $10.47 \pm 0.61$  มิลลิเมตร ขนาดความกว้างของวงใสในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* อยู่ที่  $10.08 \pm 0.07$  มิลลิเมตร ตามลำดับ เมื่อพิจารณาว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งแยกไปตามอุณหภูมิและระยะเวลาพบว่าค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อทั้ง 2 เชื้อมีค่าสูงสุดที่ 50 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที สำหรับอุณหภูมิและเวลาอื่น ๆ มีค่ากิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 25 ยูนิตต่อมิลลิลิตร (ที่ 37 องศาเซลเซียส เวลา 60 และ 90 นาที และ 60 องศาเซลเซียส เวลา 30 และ 60 นาที) สำหรับอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ไม่พบค่ากิจกรรมการยับยั้ง (Table 2)

Table 2 Stability of temperature and inhibition activity of *S. aureus* and *E. coli*

| Microorganism    | Temp.<br>(°C) | CFSF<br>ratio | 1:2           |                    | 1:4                 |                    | 1:8                 |                    |
|------------------|---------------|---------------|---------------|--------------------|---------------------|--------------------|---------------------|--------------------|
|                  |               |               | Time<br>(min) | clear zone<br>(mm) | activity<br>(AU/ml) | clear zone<br>(mm) | activity<br>(AU/ml) | clear zone<br>(mm) |
| <i>S. aureus</i> | 37            | 30            | 12.01±0.12    | 25                 | 10.47±0.61          | 50                 | -                   | -                  |
|                  |               | 60            | 11.94±0.64    | 25                 | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 90            | 11.08±0.89    | 25                 | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  | 60            | 30            | 11.84±0.85    | 25                 | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 60            | 11.20±0.18    | 25                 | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 90            | -             | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  | 90            | 30            | -             | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 60            | -             | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 90            | -             | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  |
| <i>E. coli</i>   | 37            | 30            | 10.56±0.73    | 25                 | 10.08±0.07          | 50                 | -                   | -                  |
|                  |               | 60            | 9.77±0.49     | 25                 | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 90            | 9.50±0.71     | 25                 | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  | 60            | 30            | 9.83±0.47     | 25                 | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 60            | 9.63±0.60     | 25                 | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 90            | -             | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  | 90            | 30            | -             | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 60            | -             | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  |
|                  |               | 90            | -             | -                  | -                   | -                  | -                   | -                  |

Remark;

- = No inhibition zone

Values are expressed mean ± standard deviation

### วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพนำไปใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค โดยทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากมะขามแขก โดยใช้อาหาร Modified MRS agar พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลต ซึ่งทั้งหมดเป็นแบคทีเรียแลคติกเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกจะสร้างกรดขึ้นเมื่อทำปฏิกิริยากับ  $\text{CaCO}_3$  ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์เชิงซ้อน  $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3)_2$  น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น ซึ่งสารเชิงซ้อน  $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_3)_2$  ที่ทำให้เกิดวงใสบนอาหารแข็ง [5] เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการทดสอบการติดสีแกรมและการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ย้อมติดสีม่วง-น้ำเงินของ Crystal violet จัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่มีลักษณะเป็นท่อน และจากการทดสอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส แสดงให้เห็นถึงคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งตามปกติแล้วแบคทีเรียแลคติกจะไม่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ [6] ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธนากร บำรุงภักดี และบวรศักดิ์ สีนานนท์ [7] ที่ทำการศึกษาคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากหน่อไม้แดงเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมัก จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากหน่อไม้แดงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Modified MRS agar ที่เติม  $\text{CaCO}_3$  ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) นำมาย้อมแกรมเพื่อตรวจสอบการติดสีและการจัดเรียงตัวของเซลล์ พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลตติดสีม่วง-น้ำเงินของ Crystal violet และพบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแบบท่อนสั้น (Rods) ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลส

เมื่อนำ CFSF ที่ได้จากเชื้อทั้ง 25 ไอโซเลท มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค ทั้ง 4 ชนิด ด้วยวิธี Agar well diffusion พบว่าไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ดีที่สุด คือ ไอโซเลท LT11 และ LT3 โดยมีขนาดความกว้างของวงใส อยู่ที่  $15.92 \pm 0.11$  และ  $15.68 \pm 0.39$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ( $p > 0.05$ ) ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้ดีที่สุดคือ LT24 มีขนาดความกว้างของวงใส อยู่ที่  $15.33 \pm 0.57$  มิลลิเมตร ( $p < 0.05$ ) ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ดีที่สุด คือ LT21 และ LT1 มีขนาดความกว้างของวงใส อยู่ที่  $14.31 \pm 0.20$  และ  $13.92 \pm 0.43$  มิลลิเมตร ตามลำดับ ( $p > 0.05$ ) และไอโซเลทที่สามารถยับยั้งเชื้อ *P. aeruginosa* ได้ดีที่สุด คือ LT6 โดยมีขนาดความกว้างของวงใส อยู่ที่  $13.95 \pm 0.33$  มิลลิเมตร ( $p > 0.05$ ) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ นุรฮัยนี หะยียูโซะ และคณะ [8] ที่ทำการศึกษาปริมาณและชนิดของแบคทีเรียแลคติกในผัก ผลไม้ต้องท้องถิ่น เพื่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 19 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *E. Coli*, *S. aureus* และ *Bacillus* sp. พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ทั้งหมด 4 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ทั้งหมด 9 ไอโซเลท และไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *Bacillus* sp. เมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรค พบว่า ไอโซเลท LT11 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้ง 4 ชนิด และมีการยับยั้งมากกว่าไอโซเลทอื่น ๆ โดยมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

จากการศึกษาความคงตัวระดับอุณหภูมิต่อกิจกรรมการยับยั้งของ CFSF พบว่า CFSF ของไอโซเลท LT11 สามารถทนความร้อนสูงสุดที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ได้นาน 60 นาที โดยมีค่ากิจกรรมการยับยั้งอยู่ที่ 25 ยูนิตต่อมิลลิเมตร และสำหรับค่ากิจกรรมการยับยั้งสูงสุดอยู่ที่ 50 ยูนิตต่อมิลลิเมตร โดยพบที่ระดับความเจือจาง 1:4 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ส่วนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส ไม่พบค่ากิจกรรมการยับยั้ง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสารโมเลกุลของแบคทีเรียอาจถูกย่อยสลายไป [9] ผลการทดลองสอดคล้องกับงานวิจัยของ วีรนนท์ ไชยมณี และคณะ [10] ที่ทำการคัดเลือกแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในโคนม โดยนำไปทดสอบความคงตัวที่ระดับอุณหภูมิต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียโอซินทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถทนต่อความร้อนได้ดีที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ในระยะเวลา 60 นาที โดยมีกิจกรรมการยับยั้งเท่ากับ 40, 40 และ 20 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ และจากรายงานจากผลการทดลองของธิดิมา คำจันทิก และศิริกัญญา จันทรหอม [11] พบว่าแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 25, 37 และ 60 องศาเซลเซียส ซึ่งจะสูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น อย่างไรก็ตามจากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ โดยพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ได้ดีกว่า *E. coli* ที่เป็นแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ฐาปนี จิตภักดี และศิริกานต์ กันทาใจ [12] ที่ได้ทำการศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค พบว่าแบคทีเรียแลคติกนั้นสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นนอกสุดของเยื่อหุ้มเซลล์ (Outer membrane layer) ทำให้สารยับยั้งเข้าสู่เซลล์ได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ทั้งนี้แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้นี้สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคได้ อาจเนื่องมาจากสารที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น ได้แก่ กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอทานอลและแบคทีริโอซิน (Bacteriocin) ซึ่งสารเหล่านี้มีความสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ [3] ซึ่งโดยทั่วไปแบคทีเรียแลคติกทุกตัวสามารถสร้างกรดได้ บางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ซึ่งเป็นโปรตีน หรือเพปไทด์ที่ถูกสร้างขึ้นจากไรโบโซมที่ช่วยส่งเสริมการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคและอาหารเน่าเสียและมีฤทธิ์ยับยั้งคล้ายกับยาปฏิชีวนะ [13] โดยการไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย [14]

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่า เมื่อพิจารณาค่าแสดงความแตกต่างทางสถิติ (a,b,c) ของเชื้อไอโซเลท LT11 ต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้ผลดังนี้ ไอโซเลท LT11 ยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด รองลงมาคือ *B. subtilis* และยับยั้ง *E. coli* และ *P. aeruginosa* ได้เท่ากัน

## สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากมะขามแขก พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 25 ไอโซเลท เมื่อพิจารณาความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย 4 ชนิด (*S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* และ *P. aeruginosa*) พบว่ามี 5 ไอโซเลท (24 เปอร์เซ็นต์) ที่สามารถยับยั้งเชื้อทั้ง 4 ชนิด โดย CFSF ไอโซเลท LT11 มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการ

ยับยั้งเชื้อทั้ง 4 ชนิด และ CFSF ของ LT11 มีค่ากิจกรรมการยับยั้งต่อเชื้อ *S. aureus* และ *E. coli* สูงสุดเท่ากันโดยมีค่าเท่ากับ 50 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 นาที รองลงมาคือ 25 ยูนิตต่อมิลลิเมตร (อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 60 และ 90 นาที และอุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 30 และ 60 นาที) ดังนั้นแบคทีเรียแลคติกที่นำมาศึกษานี้จึงอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่สามารถนำไปใช้เป็นก้ำเชื้อ หรือนำไปพัฒนาและประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัย

### กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ หลักสูตรสาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ และศูนย์วิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเพชรบูรณ์ ที่ให้ความอนุเคราะห์เจ้าหน้าที่ สถานที่ และเครื่องมือเพื่อสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้

### เอกสารอ้างอิง

- [1] นวัณน์ เกตุสวัสดิวงศ์ และธีระชัย ธนาคันต์. 2559. การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก. *Thai Journal of Science and Technology*, 5(1): 68-76.
- [2] Remiger, A., Eijssink, V.G., Ehrmann M.A., Sletten K., Nes, I.F. and Vogel, R.F. 1999. Purification and partial amino acid and sequence of plantaricin 1.25 and 1.25, two bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* TMW 1.25. *Journal of Applied Microbiology*, 86(6): 1053-1058.
- [3] Klaenhammer, T.R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3): 337-349.
- [4] ชูลีพร ชำนาญคำ จิราวรรณ เมืองนาค และสิรินาฏ เนติศรี. 2017. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นจากหมักในจังหวัดสกลนคร. *วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน*, 10(2): 1-12.
- [5] Moorehead, A.W. and Shumway, W.W., 2008. Methods and compositions relating to the control of the rates of acid-generating compounds in acidizing operations. *Patent Application Publication*, 1-24.
- [6] คณางค์ รัตนนิคม นนทยา สุวรรณปัญญา อนุสรณ์ วิเศษสิงห์ และยุภาพร ชันนาเลา. 2558. โครงการการศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้ง การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเต้านมอักเสบในโคนม มหาวิทยาลัยกาฬสินธุ์: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตกาฬสินธุ์.
- [7] ธนากร บำรุงภักดีและบรรศักดิ์ สีนานนท์. 2554. การแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากหน่อไม้ดองเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมัก จากการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากหน่อไม้ดอง. *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยขอนแก่น*.
- [8] นุรฮัยนี หะยียูโซะ คอสิยาห์ สะลิอับดุลลาห์ โดลาร์ ดาลี ชูไบตะ หะยีวาเงาะ และพูกอนนี สาและ. 2559. ปริมาณและชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในผัก ผลไม้ดองท้องถิ่น เพื่อการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค. ยะลา: มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา.
- [9] Osmanagaoglu, O., Beyatli, Y., and Gunduz, U., 2001. Isolation and characterization of pediocin producing *Pediococcus pentosaceus* Peep 1 from vacuum-packed sausages. *Turkish Journal of Biology*, 25: 133-143.
- [10] วีรพันธ์ ไชยมณี ปิยะนุช เนียมทรัพย์ และปราโมช ศีตะโกเศศ. 2551. การคัดเลือกแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสาเหตุโรคเต้านมอักเสบในโคนม. *วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยแม่โจ้*.
- [11] ธิติมา คำจันทิก และศิริกัญญา จันทร์หอม. 2547. การศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่แยกได้จากหญ้าหมัก. *วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี*.



## เอกสารอ้างอิง (ต่อ)

- [12] ฐาปนี จิตภักดี และศิริกานต์ กันทาใจ. 2543. การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรีย. วิทยานิพนธ์ปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- [13] อรอนงค์ พริ้งสุลก. 2550. แบคทีเรียโอซินที่สร้างจาก แบคทีเรียแลคติก, วารสารวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 23(2): 145 - 160.
- [14] Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B., 1995. Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiology Reviews*, 59(2): 171-200.

www.ncst.lru.ac.th