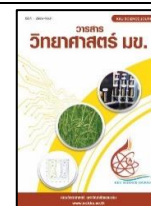




KKU SCIENCE JOURNAL

Journal Home Page : <https://ph01.tci-thaijo.org/index.php/KKUSciJ>

Published by the Faculty of Science, Khon Kaen University, Thailand



การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร จากผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักพื้นบ้านภาคใต้

Screening of Lactic Acid Bacteria from Southern Thailand Traditional Fermented Aquatic Food Products for Growth Inhibition of Foodborne Pathogens

ศิรินาถ ศรีอ่อนนวล^{1*} น้อมจิตต์ แก้วไทย อันเดร¹ เสาวณีย์ ชัยเพชร¹ และ ธนิกันต์ ธรสินธุ์¹Sirinat Srionnual^{1*}, Nomchit Kaewthai Andre¹, Saowanee Chaipetch¹ and Tanikarn Torasin¹¹สาขาวิชาการจัดการอาหารและบริการ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240¹Department of Food and Service Management, Faculty of Agro-Industry, Rajamangala University of Technology Srivijaya, Nakhon Si Thammarat, 80240 Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลินทรีย์และเคมี ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักพื้นบ้านภาคใต้ คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร และศึกษาสมบัติของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ โดยพบว่า ในผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักจำนวน 78 ตัวอย่าง มีค่า pH อยู่ในช่วง 3.64 - 7.89 กรดแลคติก 0 - 3.82% และ ปริมาณ NaCl 11.2 - 47.0% มีเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทนเกลือ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแลคติกที่ทนเกลือ อยู่ในช่วง $<1.0 \times 10^1$ - 1.92×10^7 $<1.0 \times 10^1$ - 1.14×10^8 $<1.0 \times 10^1$ - 5.5×10^7 และ $<1.0 \times 10^1$ - 1.04×10^7 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ส่วนในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักดองที่ไม่ใช่อาหารทะเล 2 ตัวอย่าง มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.47 - 4.56 กรดแลคติก 0.36 - 1.01% และปริมาณ NaCl 12.2 - 19.0% มีเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียแลคติก อยู่ในช่วง 6.70×10^6 - 9.45×10^7 และ 7.8×10^7 - 1.14×10^8 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ งานวิจัยนี้สามารถแยกเชื้อได้ทั้งหมด 484 ไอโซเลท โดยมีเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีและนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารจำนวน 368 ไอโซเลท โดยเชื้อที่คัดเลือกไปทดสอบสมบัติต่าง ๆ ของสารยับยั้งคือ สายพันธุ์ PPD90 และ PSS113 เนื่องจากสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้หลายสกุล และมีวงใสในการยับยั้งกว้าง โดยพบว่าส่วนใสที่ได้จากแบคทีเรียที่คัดเลือกยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เมื่อเติมเอนไซม์คิตาเลส และกิจกรรมการยับยั้งจะหายไปเมื่อเติมเอนไซม์ยอยโปรตีน แสดงว่าสารยับยั้งนั้นมีแนวโน้มจะเป็นสารแบคทีเรียโอซิน โดยเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกสายพันธุ์ PPD90 สามารถเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST17303 และ *Staphylococcus aureus* TISTR746 ได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และ 30 - 40 องศาเซลเซียส ตามลำดับ เชื้อสายพันธุ์ PSS113 สามารถเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งเชื้อ

*Corresponding Author, E-mail: sirinat.s@rmutsv.ac.th

Received: date: 28 November 2024 | Revised date: 20 January 2025 | Accepted date: 24 January 2025

doi: 10.14456/kkuscij.2025.2

L. monocytogenes DMST17303 ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 40 องศาเซลเซียส แต่สารที่ได้จะเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เมื่อใช้ความร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที เป็นต้นไป

ABSTRACT

The aim of this study was to assess the microbiological and chemical quality in southern Thailand traditional fermented food products, select the bacteriocin - producing lactic acid bacteria that can inhibit the growth of gastrointestinal pathogens and study the properties of bacteriocins produced from selected lactic acid bacteria. In 78 samples of fermented seafood products, pH values, lactic acid and NaCl concentration were in the range of 3.64 - 7.89, 0 - 3.82% and 11.2 - 47.0%, respectively. The average numbers of total viable count, halophilic bacteria, lactic acid bacteria and halophilic lactic acid bacteria were in the range from $<1.0 \times 10^1$ - 1.92×10^7 , $<1.0 \times 10^1$ - 1.14×10^8 , $<1.0 \times 10^1$ - 5.5×10^7 and $<1.0 \times 10^1$ - 1.04×10^7 cfu/g, respectively. For the two samples of fermented aquatic foods that were not seafood, pH values, lactic acid and NaCl concentration were in the range of 4.47 - 4.56, 0.36 - 1.01% and 12.2 - 19.0%, respectively. The average numbers of total viable count and lactic acid bacteria were in the range of 6.70×10^6 - 9.45×10^7 and 7.8×10^7 - 1.14×10^8 cfu/g, respectively. A total of 484 isolates of bacteria were isolated from various food samples. Among these 368 isolates which can growth well were selected for their production of antagonistic activity against pathogenic bacteria. The isolates named PPD90 and PSS113 which demonstrated comparatively broad inhibitory spectrum and wider inhibitory zone were further selected to test their characteristics for their potential antimicrobial activity. The results showed that the antimicrobial substances developed by 2 strains were inactivated when treated with proteolytic enzymes, but the activity of these substances was remained when they were subjected to catalase, so these indicates that the inhibitor is likely a bacteriocin. Additionally, maximal cell numbers and activity against *Listeria monocytogenes* DMST17303 and *Staphylococcus aureus* TISTR746 of PPD90 were observed at 30°C and 30 - 40°C, respectively, while maximal cell numbers and activity against *L. monocytogenes* DMST17303 of PSS113 were observed at 25 - 40°C. These bacteriocin completely lost their activity after 30 minutes at 80°C.

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก แบคทีเรียโอซิน ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักพื้นบ้าน

Keywords: Lactic Acid Bacteria, Bacteriocin, Traditional Fermented Aquatic Food Products

บทนำ

แบคทีเรียก่อโรคในอาหาร เป็นกลุ่มของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรคในคนซึ่งติดต่อมาสู่คนผ่านทางอาหารเป็นหลัก โดยมีอาการส่วนใหญ่ คือ ท้องเสีย คลื่นไส้ อาเจียน มีไข้ เป็นต้น ในระยะตั้งแต่ปลายคริสต์ศตวรรษที่ 20 วงการแพทย์และสาธารณสุขได้ตระหนักถึงความสำคัญของโรคที่เกิดจากทางเดินอาหาร ซึ่งถือเป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญ โดยเฉพาะในประเทศไทยที่กำลังพัฒนาเนื่องจากมีผู้เสียชีวิตจากโรคที่เกิดจากอาหารเป็นจำนวนมาก ในประเทศที่พัฒนาแล้วโรคที่เกิดจากอาหารมีผลกระทบต่อเศรษฐกิจที่สำคัญ เนื่องจากการสูญเสียเวลาปฏิบัติงานของผู้ป่วย (อรุณและคณะ, 2563) เพื่อให้อาหารมีความปลอดภัยมากขึ้น จึงมีการใช้วัตถุกันเสียชนิดต่าง ๆ เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อโรค แต่อย่างไรก็ตามปัจจุบันผู้บริโภคต่างตระหนักถึงผลข้างเคียงที่เกิดจากการบริโภควัตถุกันเสียสังเคราะห์ ดังนั้นจึงมีความพยายามในการค้นหาสารจาก

ธรรมชาติมาใช้ทดแทนสารเคมีเพื่อลดความเสี่ยงของผู้บริโภคในเรื่องผลข้างเคียงของสารเคมีต่อสุขภาพ ทำให้การค้นหารายการออกฤทธิ์ที่มีความจำเพาะต่อเชื้อก่อโรค ในขณะเดียวกันก็มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ซึ่งพบว่าสารที่น่าสนใจ คือ แบคทีเรียโอสติน เนื่องจากเป็นสารที่เป็นที่ยอมรับว่าปลอดภัย ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ยูคาริโอต และสามารถถูกยับยั้งได้ด้วยเอนไซม์โปรตีเอสที่อยู่ในกระเพาะอาหาร เช่น ไคโมทริปซิน (chymotrypsin) หรือ ทริปซิน (trypsin) เป็นต้น จึงมีผลน้อยมากกับแบคทีเรียประจำถิ่นที่อยู่ในระบบทางเดินอาหารของผู้บริโภค (Darbandi *et al.*, 2021) สำหรับการออกฤทธิ์ของแบคทีเรียโอสตินนั้น พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอสติน (Klaenhammer, 1993) หรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก (Coventry *et al.*, 1997; Ennahar *et al.*, 2000; Garneau *et al.*, 2002) หรือแบคทีเรียแกรมลบ (Ko and Ahn, 2000; Messi *et al.*, 2001; Caridi, 2002) แบคทีเรียโอสตินจากแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอสตินนั้น แต่ก็มีรายงานว่าแบคทีเรียโอสตินจากแบคทีเรียแลคติกบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ เช่น *Bacillus cereus* (Xinran *et al.*, 2018) *Clostridium botulinum* (Okereke and Montville, 1991) *Listeria monocytogenes* (Sarika *et al.*, 2018) และ *Staphylococcus aureus* (Jiang *et al.*, 2017) ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมุ่งเน้นไปที่การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตสารแบคทีเรียโอสตินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหารจากผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักพื้นบ้านภาคใต้ ได้แก่ หอยแมลงภู่ดอง หอยเสียบดอง ปลาแปงแดง บูด เป็นต้น ซึ่งอาหารบางอย่างยังไม่มีรายงานเกี่ยวกับการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอสตินมาก่อน เพื่อจะได้เชื้อแบคทีเรียแลคติก หรือนำสารแบคทีเรียโอสตินที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในรูปแบบต่าง ๆ ต่อไป

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมัก

เก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักทั้งหมด 78 ตัวอย่าง ได้แก่ กุ้งส้ม 11 ตัวอย่าง ไตปลา 13 ตัวอย่าง หอยเสียบดอง 10 ตัวอย่าง กะปิน้ำ 1 ตัวอย่าง หอยแมลงภู่ดอง 10 ตัวอย่าง บูด 2 ตัวอย่าง ปลาอินทรีเค็ม 1 ตัวอย่าง ปลาแปงแดง 12 ตัวอย่าง ปลาทุเค็ม 5 ตัวอย่าง กะปิปลา 8 ตัวอย่าง ปลาจิ้งจั้ง 4 ตัวอย่าง และ น้ำบูดู 1 ตัวอย่าง จากตลาดท้องถิ่นจังหวัดนครศรีธรรมราช พัทลุง สงขลา และผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักที่ไม่ใช่อาหารทะเล 2 ตัวอย่าง คือ ปลาส้ม 1 ตัวอย่าง และปลาไหลสุก 1 ตัวอย่าง จากตลาดท้องถิ่นจังหวัดนครศรีธรรมราช โดยใช้เทคนิคปราศจากเชื้อในการเก็บ (aseptic technique) โดยเก็บตัวอย่างละประมาณ 100 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ และเก็บตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเริ่มทำการทดลอง

2. การวิเคราะห์คุณภาพด้านเคมีและจุลินทรีย์ในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก

2.1 การวิเคราะห์คุณภาพด้านเคมี

วิเคราะห์ค่าความเป็นกรด - ด่าง (pH) โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักทั้งหมด 10 กรัม ผสมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน วัดค่า pH ของผลิตภัณฑ์ด้วยเครื่องวัด pH หาปริมาณกรดแลคติก โดยชั่งตัวอย่างซึ่งปั่นละเอียดหนัก 5 กรัม ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน หยดฟีนอล์ฟทาลีนที่ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ 2 - 3 หยด ลงในขวดรูปชมพู่ เขย่าให้เข้ากัน ไตเตรตด้วย 0.1 N NaOH สังเกตจนสีเปลี่ยนแปลงจากเดิมเป็นสีชมพูอ่อน จากนั้นนำปริมาตรของ 0.1 N NaOH ที่ใช้ไปมาคำนวณหาปริมาณกรดแลคติก (AOAC, 1990) หาปริมาณเกลือ (% NaCl) โดยใช้เครื่องมือ Refractometer for sodium chloride measurements (ยี่ห้อ Hanna รุ่น HI96821)

2.2 การวิเคราะห์คุณภาพด้านจุลินทรีย์

การตรวจหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทนเกลือ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแลคติกที่ทนเกลือ โดยชั่งตัวอย่างผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมัก 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกสำหรับตีป่นอาหาร (stomacher bag) เติมน้ำละลาย 0.85% NaCl ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ลงในถุง นำไปตีป่นในเครื่อง stomacher แล้วเจือจาง 10 เท่าใน 0.85% NaCl (จนการเจือจางเท่ากับ 10^{-4} - 10^{-6}) จากนั้นกระจายเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA) เพื่อหาจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA ผสม 6% NaCl เพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทนเกลือ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man Rogosa Sharpe (MRS) agar ที่เติม 1% calcium carbonate เพื่อหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติก และบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ผสม 6% NaCl ที่เติม 1% calcium carbonate เพื่อหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ทนเกลือ (สำหรับ % NaCl ที่เติมในอาหาร PCA และ MRS agar ในครั้งแรกกำหนดให้ใช้ % เท่ากับที่พบในตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาทดสอบ แต่พบว่าในบางตัวอย่างมีปริมาณเกลือสูงมากเกินไป 10% ทำให้ไม่มีเชื้อขึ้น จึงเปลี่ยนมาเติม NaCl ในปริมาณ 6%) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง ตรวจดูผลทุกวัน คัดเลือกเชื้อที่สร้างวงใสรอบโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม 1% calcium carbonate และ MRS agar ผสม 6% NaCl ที่เติม 1% calcium carbonate ทำเชื้อให้บริสุทธิ์ ทำการย้อมสีแกรม และทดสอบคเคตาเลส แล้วเก็บเฉพาะเชื้อที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ให้ผลการทดสอบคเคตาเลสเป็นลบ ไว้ที่อุณหภูมิ - 20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาต่อไป (ดัดแปลงจาก Hwanhlem *et al.*, 2011)

3. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร (ดัดแปลงจาก Srionnual *et al.*, 2007)

3.1 การเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (indicator microorganisms)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Bacillus cereus* TISTR1449 *Escherichia coli* TISTR073 *Listeria monocytogenes* DMST17303 *Salmonella* Typhimurium TISTR1472 *Staphylococcus aureus* TISTR746 และ *Vibrio parahaemolyticus* TISTR1596 จำนวน 10 ไมโครลิตร จาก glycerol stock ลงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหาร Nutrient broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient soft agar (โดยอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็น soft agar จะใช้ในส่วนผสม 0.7%)

3.2 การทดสอบความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี agar well diffusion

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ไปเลี้ยงใน MRS - broth บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีอากาศโดยใช้โถบ่มไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) ที่มีการใส่ซอง GasPak เพื่อสร้างสภาพแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจน (เพื่อให้แบคทีเรียแลคติกไม่สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์) เซนตริฟิวส์แยกเซลล์ออกโดยใช้ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที นำส่วนใสไปปรับ pH ให้เป็นกลาง จากนั้นดูดส่วนใสปริมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงหลุมในงานเพาะเชื้อที่มีอาหาร soft agar 4 มิลลิลิตร ผสมเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรค 6 สายพันธุ์ จากข้อ 3.1 ประมาณ 10^6 - 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เทบนอาหารแข็งปริมาณ 30 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เป็นเวลา 18 - 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณใส (inhibition zone) รอบ ๆ หลุม (แบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ จะมี inhibition zone รอบ ๆ หลุม)

4. ศึกษาสมบัติของสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ (ดัดแปลงจาก Srionnual *et al.*, 2007)

4.1 ทดสอบว่าสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เป็นสารแบคเทอริโอซินที่เป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีน และไม่ใช่สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การทดสอบว่าสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เป็นสารแบคทีเรียโอซินที่เป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีน และไม่ใช้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ทำได้โดยนำส่วนผสมที่ได้จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือก (เตรียมส่วนผสมในข้อ 3.2) มาทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ proteinase K trypsin pepsin และเอนไซม์คัสตาเลส โดยใช้เอนไซม์ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับส่วนผสมของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกปริมาตร 80 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นสุดท้ายของเอนไซม์ต้องมีอย่างน้อย 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเขย่าในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เพื่อกำจัดเอนไซม์ย่อยโปรตีน จึงนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ โดยวิธี agar well diffusion

4.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 10 มิลลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 500 มิลลิตร (2% inoculums; v/v) โดยเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 25 30 35 37 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำไปศึกษาความหนาแน่นของเซลล์ โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร และหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย อินดิเคเตอร์ โดยทำการเก็บตัวอย่างเชื้อไปเตรียมส่วนผสมปราศจากเซลล์แล้วนำส่วนผสมไปเจือจางครั้งละ 2 เท่า จากนั้นนำไปทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยวิธี agar well diffusion รายงานผลการยับยั้งในหน่วย Arbitrary Unit/ml (AU/ml) โดยนำค่าความเจือจางสูงสุดที่ตรวจพบวงใสการยับยั้งคูณกับ 1,000 ไมโครลิตร หาดด้วยปริมาตรส่วนในที่ยืด (Srionnual *et al.*, 2007)

4.3 ศึกษาการทนต่อความร้อนของสารแบคทีเรียโอซิน

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินในอาหาร MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิตร บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน (จากผลการทดลองข้อ 4.2) เป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อ 10 มิลลิตร ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 500 มิลลิตร (2% inoculums; v/v) บ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน (จากผลการทดลองข้อ 4.2) จากนั้นทำการเหวี่ยงแยกเซลล์ออกโดยใช้เครื่องเหวี่ยงตกตะกอนที่ความเร็ว 6,000 rpm เป็นเวลา 15 นาที และนำ cell-free supernatant ที่ได้ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที (เพื่อเป็นตัวแทนของการให้ความร้อนแบบพาสเจอร์ไรซ์) อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (เพื่อเป็นตัวแทนของการให้ความร้อนแบบสเตอริไลซ์) จากนั้นจึงหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี agar well diffusion

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. ข้อมูลด้านเคมีและจุลินทรีย์ของตัวอย่างอาหารทะเลหมักดอง

จากการศึกษาคุณภาพด้านเคมีของตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักดองในจังหวัดนครศรีธรรมราช สงขลา และพัทลุง จำนวนทั้งหมด 78 ตัวอย่าง ได้แก่ กุ้งส้ม 11 ตัวอย่าง ไตปลา 13 ตัวอย่าง หอยเสียบดอง 10 ตัวอย่าง กะปิ น้ำ 1 ตัวอย่าง หอยแมลงภู่ดอง 10 ตัวอย่าง ปูเค็ม 2 ตัวอย่าง ปลาอินทรีเค็ม 1 ตัวอย่าง ปลาแป้งแดง 12 ตัวอย่าง ปลาทุเค็ม 5 ตัวอย่าง กะปิปลา 8 ตัวอย่าง ปลาจิ้งจั้ง 4 ตัวอย่าง และ น้ำบูดู 1 ตัวอย่าง พบว่าผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักดองมีค่า pH อยู่ในช่วง 3.64 - 7.89 กรดแลคติก 0 - 3.82% และ ปริมาณ NaCl 11.2 - 47.0% และทำการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทนเกลือ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแลคติกที่ทนเกลือ โดยการหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทนเกลือ และแบคทีเรียแลคติกที่ทนเกลือในครั้งแรกจะใช้ปริมาณเกลือ NaCl เท่ากับ % NaCl ที่พบในตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาทดสอบ ซึ่งทำให้ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเลย จึงได้เปลี่ยนมาเติม 6% NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และ MRS เพื่อหาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทนเกลือ และแบคทีเรียแลคติกที่ทนเกลือ ผลการทดลองพบว่า ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่

นำมาทำการทดลองมีเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทนเกลือ แบคทีเรียแลคติก และแบคทีเรียแลคติกที่ทนเกลือ อยู่ในช่วง $<1.0 \times 10^1 - 1.92 \times 10^7$ $<1.0 \times 10^1 - 1.14 \times 10^8$ $<1.0 \times 10^1 - 5.5 \times 10^7$ และ $<1.0 \times 10^1 - 1.04 \times 10^7$ โคโลนีต่อกรัม ซึ่งการที่จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมีน้อยกว่าเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทนเกลือเป็นไปได้ว่าในตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักต้องมีปริมาณเกลืออยู่ค่อนข้างสูง เมื่อทำการตรวจหาจุลินทรีย์ทั้งหมดที่ทนเกลือซึ่งได้มีการเติมเกลือลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงทำให้สภาวะในการเลี้ยงเชื้อใกล้เคียงกับตัวอย่างอาหารที่นำมาทำการแยกเชื้อจึงทำให้เชื้อเจริญได้ดีกว่าในอาหารเลี้ยงเชื้อปกติ และงานวิจัยนี้ได้มีการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักที่ไม่ใช่อาหารทะเลมาด้วย 2 ตัวอย่าง คือ ปลา ส้ม 1 ตัวอย่าง และปลาไหลสุก 1 ตัวอย่าง จากจังหวัดนครศรีธรรมราช พบว่า มีค่า pH อยู่ในช่วง 4.47 - 4.56 กรดแลคติก 0.36 - 1.01% และปริมาณ NaCl 12.2 - 19.0% มีเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วง $6.70 \times 10^6 - 9.45 \times 10^7$ และ $7.8 \times 10^7 - 1.14 \times 10^8$ โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ (ตารางที่ 1) จะเห็นได้ว่าในผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักที่ต้องที่ไม่ใช่อาหารทะเล จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมดมีน้อยกว่าแบคทีเรียแลคติก เนื่องจากตัวอย่างอาหารที่นำมาตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์เป็นตัวอย่างที่มีการหมักเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์แล้ว ดังนั้นจุลินทรีย์ที่พบมากในตัวอย่างอาหารจึงเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก

การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักที่ไม่ใช่อาหารทะเล จะทำได้ง่ายกว่าการแยกเชื้อจากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมัก และจะเห็นได้จากงานวิจัยต่าง ๆ ที่มีการตีพิมพ์เผยแพร่พบว่ามีงานวิจัยจำนวนมากที่ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์ประมงน้ำจืด เช่น ส้มปลัก ปลาส้ม ปลาร้า ปลาจ่อม (Paludan-Muller *et al.*, 1999; Tanasupawat *et al.*, 2000; Paludan-Muller *et al.*, 2002; Srionnual *et al.*, 2007; Noonpakdee *et al.*, 2009; Hwanhlem *et al.*, 2011) แต่งานวิจัยที่ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเลหมักยังมีจำนวนน้อย ซึ่งในงานวิจัยนี้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารทะเลหมักได้ และสามารถนำเชื้อที่ได้ไปใช้ประโยชน์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคในรูปแบบต่าง ๆ ต่อไป

นอกจากนี้การเก็บตัวอย่างในช่วงแรกจะเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักที่เป็นสินค้าหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ (One Tambon One Product: OTOP) ด้วย และจากการสอบถามถึงการผลิตสินค้า OTOP มีการควบคุมคุณภาพสินค้าโดยการฆ่าเชื้อแบบพาสเจอร์ไรซ์ทำให้ตรวจไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นการเลือกตัวอย่างผลิตภัณฑ์ในช่วงหลังจะเลือกเป็นผลิตภัณฑ์ที่บรรจุถุงพลาสติก ส่วนตัวอย่างอื่น ๆ ที่ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อเลย พบว่าตัวอย่างอาหารส่วนมากจะมีปริมาณเกลือค่อนข้างสูง ($>20\%$) และมีค่า pH 5.5 - 7 และมีรายงานว่าในอาหารที่มีเกลือมากจะมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ (Railton, 2018) โดยเชื้อจุลินทรีย์จะถูกยับยั้งการเจริญได้มากในอาหารที่มีเกลือสูงกว่า 5% ยกเว้นเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ชอบเกลือจะทนต่อเกลือที่ความเข้มข้นสูงถึง 30% ได้ (Yang *et al.*, 2023)

ตารางที่ 1 ชนิดของตัวอย่างผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักดอง คุณภาพทางเคมี และคุณภาพทางจุลินทรีย์

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก	คุณภาพทางเคมี			คุณภาพทางจุลินทรีย์ (โคโลนีต่อกรัม)			
	pH	กรดแลคติก (%)	NaCl (%)	เชื้อจุลินทรีย์ ทั้งหมด	เชื้อจุลินทรีย์ ทั้งหมดที่ทนเกลือ	แบคทีเรีย แลคติก	แบคทีเรีย แลคติกที่ ทนเกลือ
ผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักดอง : กุ้งส้ม ไตปลา หอยเสียบดอง กะปิ น้ำ ปูเค็ม หอยแมลงภู่ดอง ปลาอินทรีเค็ม ปลาแป้งแดง ปลาทุเค็ม กะปิปลา ปลาจิ้งจั้ง และ น้ำบูดู	3.64-7.89	0-3.82	11.2-47.0	$<1.0 \times 10^1 - 1.92 \times 10^7$	$<1.0 \times 10^1 - 1.14 \times 10^8$	$<1.0 \times 10^1 - 5.5 \times 10^7$	$<1.0 \times 10^1 - 1.04 \times 10^7$
ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักดองที่ไม่ใช่อาหารทะเล : ปลาส้ม และปลาไหลสุก	4.47-4.56	0.36-1.01	12.2-19.0	$6.70 \times 10^6 - 9.45 \times 10^7$	nd	$7.8 \times 10^7 - 1.14 \times 10^8$	nd

nd: not done ไม่ได้ทำการตรวจสอบ

2. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

การทดลองนี้สามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 484 ไอโซเลท โดยมีเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากอาหารทะเลหมักจำนวน 78 ตัวอย่าง จากการสร้างวงไฮรอบอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ MRS + 6% NaCl จำนวน 444 ไอโซเลท คิดเป็นอัตราส่วนจำนวนตัวอย่าง : จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกได้ เป็น 1:5.69 และมีเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักที่ไม่ใช่อาหารทะเล 2 ตัวอย่าง ได้จำนวนเชื้อที่แยกได้ 40 ไอโซเลท คิดเป็นอัตราส่วนจำนวนตัวอย่าง : จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เป็น 1:20 แต่จากการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่า มีบางไอโซเลทที่เชื้อไม่สามารถเจริญได้ โดยเชื้อที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักจำนวนทั้งหมด 444 ไอโซเลท มีเชื้อที่สามารถเจริญต่อได้จำนวน 350 ไอโซเลท และเชื้อที่ไม่สามารถเจริญต่อได้ 94 ไอโซเลท สำหรับเชื้อที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ปลาน้ำจืดหมักทั้งหมด 40 ไอโซเลท มีเชื้อที่สามารถเจริญต่อได้ จำนวน 18 ไอโซเลท และเชื้อที่ไม่สามารถเจริญต่อได้ 22 ไอโซเลท และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้และสามารถเจริญได้ทั้ง 368 ไอโซเลท ไปย้อมสีแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์คิตาเลส พบว่ามีเชื้อที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนทั้งหมด 57 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลมทั้งหมด 300 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมลบทั้งหมด 11 ไอโซเลท จากนั้นทำการทดสอบการผลิตเอนไซม์คิตาเลสเพื่อทดสอบการเป็นแบคทีเรียแลกดิกโดยแบคทีเรียแลกดิกจะไม่ผลิตเอนไซม์คิตาเลส ซึ่งพบว่ามีแบคทีเรียที่ไม่ผลิตเอนไซม์คิตาเลส 160 ไอโซเลท และผลิตเอนไซม์คิตาเลส 208 ไอโซเลท จากนั้นจึงนำเชื้อแบคทีเรียที่ไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ซึ่งเป็นเชื้อก่อโรคจำนวน 6 สายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus* TISTR1449 *E. coli* TISTR073 *L. monocytogenes* DMST17303 *S. Typhimurium* TISTR1472 *S. aureus* TISTR746 และ *V. parahaemolyticus* TISTR1596 ผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักจำนวน 350 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 98 ไอโซเลท คิดเป็น 28% ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจืดหมักจำนวน 18 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 17 ไอโซเลท คิดเป็น 94.44% (ตารางที่ 2) เห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์ของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารทะเลหมักดองมีการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้น้อยกว่า เมื่อเทียบกับเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำจืดหมัก โดยพบว่าเชื้อที่แยกได้จากปลาแปงแดง (PPD) อำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช หมายเลข 90 ตั้งชื่อเชื้อเป็นรหัส คือ PPD90 และปลาใส่สุก (PSS) อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช หมายเลข 113 ตั้งชื่อเชื้อเป็นรหัส คือ PSS113 เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก ไม่ผลิตเอนไซม์คิตาเลส สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด และมีวงใสในการยับยั้งกว้าง จึงคัดเลือกเชื่อดังกล่าว ไปทดสอบสมบัติต่าง ๆ ของสารยับยั้งต่อไป

ตารางที่ 2 จำนวนและลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

ตัวอย่าง ผลิตภัณฑ์ อาหารหมัก	เชื้อที่ คัดเลือกได้ (ไอโซเลท)	เชื้อที่เจริญได้ดี (ไอโซเลท)	ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้				เชื้อที่ยับยั้งการ เจริญของเชื้อ แบคทีเรีย อินดิเคเตอร์ (ไอโซเลท)	เชื้อที่คัดเลือก (ไอโซเลท)
			Gram stain		Catalase test			
			Gram +	Gram -	Catalase +	Catalase -		
ผลิตภัณฑ์ อาหารทะเล หมักดอง	444	350	339	11	207	143	98	PPD90
ผลิตภัณฑ์ สัตว์น้ำหมัก ดองที่ไม่ใช่ อาหารทะเล	40	18	18	-	1	17	17	PSS113

3. การศึกษาสมบัติของสารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

3.1 สารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้เป็นสารแบคทีเรียโอซินที่เป็นสารเปปไทด์หรือโปรตีน และไม่ใช้สารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

การทดสอบสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียที่คัดเลือกกว่าเป็นสารแบคทีเรียโอซิน โดยการนำส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรียโอซิน PPD90 และ PSS113 มาทดสอบโดยใช้เอนไซม์คิตาเลส และเอนไซม์ย่อยโปรตีน ซึ่งการเติมเอนไซม์คิตาเลสเพื่อกำจัดกิจกรรมการยับยั้งจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนเพื่อทดสอบว่าการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นกิจกรรมจากสารแบคทีเรียโอซินหรือไม่ โดยถ้าเติมเอนไซม์คิตาเลสแล้วยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งและเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีนแล้วกิจกรรมการยับยั้งหายไปแสดงว่ากิจกรรมการยับยั้งเกิดจากแบคทีเรียโอซิน (Kormin *et al.*, 2001) จากการทดลองพบว่าเชื้อโอซิน PPD90 แสดงกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินเมื่อใช้เชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 และ *S. aureus* TISTR746 เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ เชื้อโอซิน PSS113 แสดงกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินเมื่อใช้เชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์ โดยพบว่าสารยับยั้งที่เป็นสารแบคทีเรียโอซินสร้างจากแบคทีเรียที่คัดเลือกทั้ง 2 โอซิน ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ trypsin (ตารางที่ 3) ซึ่งการที่แบคทีเรียโอซินจากเชื้อต่างชนิดกันถูกทำลายด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนได้แตกต่างกัน อาจเกิดจากสารยับยั้งต่อเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละสายพันธุ์มีกรดอะมิโนบริเวณ active site ที่จำเพาะต่อการย่อยของเอนไซม์แต่ละชนิดแตกต่างกัน จะเห็นได้จากงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโอซินจากเชื้อต่าง ๆ จะถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่แตกต่างกัน เช่น แบคทีเรียโอซินจาก *Lactobacillus murinus* AU06 ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ proteinase K chymotrypsin trypsin และ pepsin (Elayaraja *et al.*, 2014) แบคทีเรียโอซินจาก *La. bulgaricus* ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ proteinase K trypsin และ pepsin เมื่อใช้ *S. aureus* ATCC6538 เป็นแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ แต่เมื่อใช้ *Streptococcus agalactiae* ATCC14364 เป็นเชื้ออินดิเคเตอร์พบว่าสารแบคทีเรียโอซินถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ proteinase K และ pepsin แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วยเอนไซม์ trypsin (Kim *et al.*, 2004) แบคทีเรียโอซินจาก *Enterococcus* sp. GHB26 ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ trypsin และ pronase E แต่ไม่ถูกยับยั้งกิจกรรมด้วยเอนไซม์ pepsin (Kout *et al.*, 2016)

ตารางที่ 3 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์หลังจากใช้เอนไซม์

แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือก	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	วงใสการยับยั้ง (mm)					
		<i>B. cereus</i> TISTR1449	<i>E. coli</i> TISTR073	<i>L. monocytogenes</i> DMST17303	<i>S. Typhimurium</i> TISTR1472	<i>S. aureus</i> TISTR746	<i>V. parahaemolyticus</i> TISTR1596
เอนไซม์							
PPD90 ปลาแป้งแดง	Control	12	12	13	12	12	13
	Catalase	10	12	12	13	12	13
	Proteinase K	10	12	11	12	12	12
	Pepsin	12	12	12	13	13	12
	Trypsin	12	13	-	13	-	12
PSS113 ปลาไหลสุก	Control	13	13	13	12	13	14
	Catalase	12	12	11	12	13	13
	Proteinase K	12	11	11	12	12	12
	Pepsin	12	12	12	13	11	13
	Trypsin	12	13	-	12	11	11

3.2 ศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน

การศึกษาค้นคว้าของอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการสร้างสารแบคทีเรียโอซินโดยเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติก PPD90 และ PSS113 ที่อุณหภูมิ 25 30 35 37 40 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 ชั่วโมง นำไปศึกษาความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร ซึ่งถ้าเชื้อมีค่าดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร สูงแสดงว่าเชื้อมีการเจริญได้ดี และหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อโดยใช้เชื้อแบคทีเรียที่ทำให้เกิดโรคที่แสดงกิจกรรมการยับยั้งของสารแบคทีเรียโอซินเป็นเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี agar well diffusion และรายงานผลการยับยั้งในหน่วย Arbitrary Unit/ml (AU/ml) ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เมื่อบ่มเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เชื้อแบคทีเรีย แลคติกที่คัดเลือก	อุณหภูมิ (°C)	OD 660 nm	<i>L. monocytogenes</i> DMST17303		<i>S. aureus</i> TISTR746	
			วงใสการยับยั้ง	ประสิทธิภาพ	วงใสการยับยั้ง	ประสิทธิภาพ
			(mm)	การยับยั้ง (AU/ml)	(mm)	การยับยั้ง (AU/ml)
PPD90	25	6.93	10	0	12	0
	30	7.26	12	20	15	20
	35	7.62	13	0	15	20
	37	7.65	13	0	15	20
	40	7.33	12	0	15	20
	45	3.43	10	0	0	0
PSS113	25	7.61	13	20	nd	nd
	30	7.07	12	20	nd	nd
	35	7.51	14	20	nd	nd
	37	7.73	13	20	nd	nd
	40	7.43	14	20	nd	nd
	45	3.42	11	0	nd	nd

nd: not done

โดยพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกสายพันธุ์ PPD90 สามารถเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 ได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งเชื้อ *S. aureus* TISTR746 ได้ดีที่อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส เชื้อสายพันธุ์ PSS113 สามารถเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* DMST17303 ได้ดีที่อุณหภูมิ 25 - 40 องศาเซลเซียส สอดคล้องกับงานวิจัยที่ศึกษาเกี่ยวกับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินโดยมีช่วงอุณหภูมิที่ศึกษาตั้งแต่ 25 - 42 องศาเซลเซียส และผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่เจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่อุณหภูมิ 35 - 37 องศาเซลเซียส เช่น เชื้อแบคทีเรียแลคติก *La. murinus* AU06 (Elayaraja *et al.*, 2014) *La. acidophilus* KS400 (Gaspar *et al.*, 2018) *St. bovis* RMM902 (Wongkattiya *et al.*, 2017) แบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ M8 (Danial *et al.*, 2016) ที่แยกได้จากเนื้อสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 37 37 และ 35 องศาเซลเซียสตามลำดับ

3.3 ศึกษาการทนต่อความร้อนของสารแบคทีเรียโอซิน

ศึกษาการทนต่อความร้อนของสารแบคทีเรียโอซิน โดยนำ cell-free supernatant ไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 80, 90 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นจึงหาประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี agar well diffusion ผลการทดลองดังแสดงในตารางที่ 5 โดยพบว่าสารแบคทีเรียโอซินจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกมาไม่สามารถทนต่อความร้อนได้โดยจะเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เมื่อใช้ความร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที เป็นต้นไป ซึ่งเป็นข้อจำกัดของการนำสารแบคทีเรียโอซินไปใช้ประโยชน์ โดยแบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่ทนต่อความร้อนได้ดีเนื่องจากแบคทีเรียโอซินในกลุ่มนี้เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กและมีโครงสร้างที่ไม่ซับซ้อน ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ทนต่อความร้อนได้ดี เช่น weissellicin 110 จากเชื้อ *Weissella cibaria* 110 (Srionnual et al., 2007) lactococcin 036019 จากเชื้อ *La. lactis* NCU036019 (Peng et al., 2023) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียโอซินบางชนิดไม่สามารถทนต่อความร้อนได้ ซึ่งแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ส่วนมากมีขนาดใหญ่ และมีโครงสร้างที่ซับซ้อน ตัวอย่างของแบคทีเรียโอซินที่ไม่ทนต่อความร้อน เช่น helveticin51 จากเชื้อ *La. helveticus* G51 (Bonade et al., 2001) dysgalactacin จากเชื้อ *St. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (Swe et al., 2009)

ตารางที่ 5 การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ระดับความร้อนและเวลาต่าง ๆ

ระดับความร้อนและเวลา	วงใสการยับยั้ง (mm)		
	PPD90		PS113
	<i>L. monocytogenes</i> DMST17303	<i>S. aureus</i> TISTR746	<i>L. monocytogenes</i> DMST17303
แบคทีเรียอินดิเคเตอร์			
Control	10	14	13
80°C 30 min	0	0	0
90°C 30 min	0	0	0
100°C 30 min	0	0	0
110°C 15 min	0	0	0
121°C 15 min	0	0	0

สรุปผลการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำหมักพื้นบ้านภาคใต้จำนวน 80 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ 484 ไอโซเลท โดยมีเชื้อที่สามารถเจริญได้ดีและนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหารจำนวน 368 ไอโซเลท และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ PPD90 และ PSS113 ไปทดสอบสมบัติต่าง ๆ ของสารยับยั้งพบว่าส่วนใสที่ได้จากแบคทีเรียที่คัดเลือกยังคงมีกิจกรรมการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เมื่อเติมเอนไซม์คัสตาเลส และกิจกรรมการยับยั้งจะหายไปเมื่อเติมเอนไซม์ย่อยโปรตีน แสดงว่าสารยับยั้งนั้นน่าจะเป็นสารแบคทีเรียโอซิน

เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้สายพันธุ์ PPD90 สามารถเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ที่อุณหภูมิ 30 - 40 องศาเซลเซียส สายพันธุ์ PSS113 สามารถเจริญและสร้างสารแบคทีเรียโอซิน ได้ที่อุณหภูมิ 25 - 40 องศาเซลเซียส สารแบคทีเรียโอซินที่ได้จะเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เมื่อใช้ความร้อนอุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เวลา 30 นาที เป็นต้นไป จึงมีความเป็นไปได้ที่จะนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินจากงานวิจัยนี้ไปประยุกต์ใช้เพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารที่ไม่ต้องผ่านการแปรรูปด้วยความร้อน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2561 ต่อเนื่อง 2562

เอกสารอ้างอิง

- อรุณ ชามุขชัยเชาว์วัฒน์, สติชัย พันวิไล, จริญญา ประจันบาล และสมเกียรติ พรพิสุทธิมาศ. (2563). จุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหารที่สำคัญ. วารสารหน่วยวิจัยวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยี และสิ่งแวดล้อมเพื่อการเรียนรู้ 11(1): 188 - 206.
- AOAC. (1990). Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist 15th Ed. The Association of Official Analytical Chemists: Virginia.
- Bonade, A., Murelli, F., Vescovo, M. and Scolari, G. (2001). Partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus*. Letters in Applied Microbiology 33(2): 153 - 158.
- Caridi, A. (2002). Selection of *Escherichia coli* – inhibiting strains of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology 29: 303 - 308.
- Coventry, M.J., Gordon, J.B., Wilcock, A. Harmark, K., Davidson, B.E., Hickey, M.W., Hillier, A.J. and Wan J. (1997). Detection of bacteriocins of lactic acid bacteria isolated from food and comparison with pediocin and nisin. Journal of Applied Microbiology 83: 248 – 258.
- Danial, E.N., Al-Zahrani, S.H.M. and Al-Mahmoudi, Z.A-H.M. (2016). Enhancement of novel extracellular bacteriocin production by media optimization using LAB isolate from meat. Journal of Applied Pharmaceutical Science 6(12): 020 - 027.
- Darbandi , A., Asadi, A., Ari, M.M., Ohadi, E., Talebi, M., Zadeh, M.H., Emamie, A.D., Ghanavati, R. and Kakanl, M. (2021). Bacteriocins: properties and potential use as antimicrobials. Journal of Clinical Laboratory Analysis 36(1): 1 - 40. doi: 10.1002/jcla.24093.
- Elayaraja, S., Annamalai, N., Mayavu, P. and Balasubramanian, T. (2014). Production, purification and characterization of bacteriocin from *Lactobacillus murinus* AU06 and its broad antibacterial spectrum. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine 4 (Suppl. I): 305 - 311.
- Ennahar, S., Sashihara, T., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. (2000). Class IIa bacteriocins : biosynthesis, structure and activity. FEMS Microbiology Reviews 24: 85 – 106.
- Garneau, S., Martin, N. I. and Vederas, J. C. (2002). Two – peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. Biochimie 8: 577 – 592.
- Gaspar, C., Donders, G.G., Palmeira-de-Oliveira, R., Queiroz, J.A., Tomaz, C., Martinez-de-Oliveira, J. and Palmeira-de-Oliveira, A. (2018). Bacteriocin production of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* KS400. AMB Express 8: 153. doi: 10.1186/s13568-018-0679-z.
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. and Maneerat, S. (2011). Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (*Plasom*) and production of *Plasom* from selected strains. Food Control 22(3-4): 401 - 407.

- Jiang, H., Zou, J., Cheng, H., Fang, J. and Huang, G. (2017). Purification, characterization and mode of action Of pentocin JL-1, a novel bacteriocin isolated from *Lactobacillus pentosus*, against Drug-Resistant *Staphylococcus aureus*. Biomed Research International 1 - 11 doi: 10.1155/2017/7657190.
- Kim, H.J., Kim, J.H., Son, J.H., Seo, H.J., Park, S.J., Paek, N.S. and Kim, S.K. (2004). Characterization of bacteriocin produced by *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Microbiology and Biotechnology 14(3): 503 – 508.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS Microbiology Reviews 12: 39 – 85.
- Ko, S.H. and Ahn, C. (2000). Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from white kimchi. Food Science and Biotechnology 9: 263 – 269.
- Kormin, S., Rusul, G., Radu, S. and Ling, F.H. (2001). Bacteriocin - producing lactic acid bacteria isolated From traditional fermented food. The Malaysian Journal of Medical Sciences 8(1): 63 - 68.
- Kout, A., Dalache, F., Zadi-Karam, H. and Karam, N.E. (2016). Characterization and purification of bacteriocin produced by *Enterococcus* sp. GHB26 isolated from Algerian paste of dates "Ghars". African Journal of Microbiology Research 10(25): 930 - 937.
- Messi, P., Bondi, M., Sabia, C., Battini, R. and Manicardi, G. (2001). Detection and preliminary characterization of a bacteriocin (plantaricin 35d) produced by a *Lactobacillus plantarum* strain. International Journal of Food Microbiology 64: 193 – 198.
- Noonpakdee, W., Jumriangrit, P., Wittayakom, K., Zendo, J., Nakayama, J., Sonomoto, K. and Panyim, S. (2009). Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product. Asia-Pacific Journal of Molecular Biology and Biotechnology 17(1): 19 - 25.
- Okereke, A. and Montville, T.J. (1991). Bacteriocin-mediated inhibition of *Clostridium botulinum* spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures. Applied and Environmental Microbiology 57(12): 3423 - 3428.
- Paludan-Muller, C., Madsen, M., Sophanodora, P., Gram, L. and Møller, P.L. (2002). Fermentation and microflora of *plaa-som*, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. International Journal of Food Microbiology 73: 61 - 70.
- Paludan-Muller, C., Huss, H.H. and Gram, L. (1999). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substitute for fermentation. International Journal of Food Microbiology 46: 219 - 229.
- Peng, Z., Xu, X., Fan, P., Qiao, B., Xie, M., Huang, T. and Xiong, T. (2023). Identification and characterization of a novel pH and heat stable bacteriocin-like substance lactococcin036019 with food preserving potential. Food Control 148: 1 - 9. doi: 10.1016/j.foodcont.2023.109682.
- Railton, D. (2018). High-salt diet may kill off 'good' gut bacteria. Medical News Today. Source: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/322076.php>. Retrieved from 27 February 2019.

- Sarika, A.R., Lipton, A.P., Aishwarya, M.S. and Rachana, R.S. (2018). Lactic acid bacteria from marine fish: antimicrobial resistance and production of bacteriocin effective against *L. monocytogenes* in situ. *Journal of Food: Microbiology, Safety and Hygiene* 3(1): 128. doi: 10.4172/2476-2059.1000128.
- Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L.H., Hsiao, K.N. and Chen, Y.S. (2007). Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from *plaa-som*, a fermented fish product from Thailand. *Applied and Environmental Microbiology* 73(7): 2247 - 2250.
- Swe, P.M., Cook, G.M., Tagg, J.R. and Jack, R.W. (2009). Mode of action of dysgalacticin: a large heat - labile bacteriocin. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 63(4): 679 - 686.
- Tanasupawat, S., Shida, O, Okada, S. and Komagata, K. (2000). *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 4(4): 1479 - 1485.
- Wongkattiya, N., Fraser, I.H., Niamsup, P., Sanguansermsri, P. and Sanguansermsri, D. (2017). Production and characterization of bacteriocin-producing bacteria capable of inhibition of *Streptococcus dysgalactiae*. *Chiangmai Journal of Science* 44(2): 366 - 374.
- Xinran, L.V., Luhuan, M., Huanhuan, M., Fengling, B., Yang, L., Mengtong, S. and Jianrong, L. (2018). Purification, characterization and action mechanism of plantaricin JY22, a novel bacteriocin against *Bacillus cereus* produced by *Lactobacillus plantarum* JY22 from golden carp intestine. *Food Science and Biotechnology* 27(3): 695 – 703.
- Yang, S., Wang, M., Gao, J., Liu, J., Jin, R. Lin, R., Weng, W. and Aweya, J.J. (2023). Sodium chloride augments the antibacterial activity of a novel penaeid shrimp-derived peptide (GPCR10) against halotolerant *Staphylococcus aureus*. *LWT - Food Science and Technology* 184: 2 - 10. doi: 10.1016/j.lwt. 2023.115096.

