บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

3.1.1 การแยกแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหาร

ทำการแยกแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากตัวอย่างอาหาร ผักและผลไม้ดอง แหนม ไส้กรอกอีสาน จากตลาดสดต่างๆ ในกรุงเทพมหานครเช่น ตลาดบางซื่อ ตลาดสามย่าน ตลาดห้วยขวาง ตลาดศรีย่าน ตลาดเทเวศน์ ตลาดบางกระปิ ตลาดราชวัตร และตลาดสะพานใหม่ ดอนเมือง และจังหวัดใกล้เคียง เช่น นนทบุรี สุพรรณบุรี อุทัยธานี โดยการแยก ล.อ.บ. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งชนิดแลคโตบาซิไล เอ็มอาร์เอส, อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งน้ำมะเขือเทศ และอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอพีที ที่มี 0.004 % ของบรอมครีซอลเพอร์เพิลเป็นอินดิเคเตอร์ และ 0.8 % แคลเซียมคาร์บอเนต โดยคัดเลือกโคโลนีที่ขึ้นบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งที่สามารถเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง แล้วเกิดบริเวณใสของแคลเซียมคาร์บอเนต พบว่าสามารถแยกแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากแหล่งต่างๆ ได้ทั้งหมด 50 สายพันธุ์ ผลการทดลองได้แสดงไว้ในตารางที่ 3.1

3.1.2 การตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ที่แยกได้ทางอนุกรมวิธาน

การตรวจสอบชนิดของ *Lactobacillus* sp. ทั้ง 50 สายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารหมักตามข้อ 3.1.1 เมื่อศึกษาลักษณะการเจริญและลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าลักษณะโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งจะมีทั้งโคโลนีสีขาวขุ่นขนาดเล็ก ขนาดกลาง และลักษณะเยิ้มขุ่น ขอบโคโลนีเรียบ ไม่สร้างรงควัตถุ (Pigment) เมื่อย้อมสีแกรมและตรวจดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จะเห็นเซลล์ติดสีน้ำเงินของแกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนลักษณะต่างๆ ดังตัวอย่างในรูป

3.1-3.3 ทุกสายพันธุ์ไม่มีการสร้างสปอร์ และ เมื่อทดสอบลักษณะทางชีวเคมีเพื่อดูการสร้างเอนไซม์คะตะเลสโดยใช้ *B. subtilis* เป็นตัวเปรียบเทียบในการให้ผลเป็นบวก พบว่า ล.อ.บ. ที่แยกได้จากอาหารหมักดองจะให้ผลเป็นลบคือไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรทชนิดต่างๆ ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิไลเอ็มอาร์เอสพื้นฐาน (ไม่มีการเติมสารสกัดจากเนื้อและน้ำตาลกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ) โดยคาร์โบไฮเดรทที่ใช้ทดสอบมี 22 ชนิด ให้ผลต่างๆที่เปรียบเทียบกับ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ต่างๆ ใน Bergey 's Mannual of Systematic Bacteriology (Kandler และคณะ, 1986) ดังแสดงในตารางที่ 3.2 พบว่าความน่าจะเป็นของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย (ล.อ.บ.) ที่แยกได้จากอาหารหมัก เป็นดังนี้

หน่อไม้ดอง 12 ตัวอย่าง พบว่าน่าจะเป็น *Lactobacillus plantarum* 11 ตัวอย่างและ *L. murinus* 1 ตัวอย่าง

ผักกาดดอง 16 ตัวอย่าง พบว่าน่าจะเป็น *L. plantarum* ทั้งหมด

ผักดอง 4 ตัวอย่าง พบว่าน่าจะเป็น *L. plantarum* 3 ตัวอย่าง และ *L. pentosus* 1 ตัวอย่าง

แหนม 8 ตัวอย่าง พบว่าน่าจะเป็น *L. plantarum* 4 ตัวอย่าง และ *L. animalis* 4 ตัวอย่าง

ไส้กรอกอีสาน 7 ตัวอย่าง พบว่าน่าจะเป็น *L. plantarum* 4 ตัวอย่าง และ *L. animalis* 3 ตัวอย่าง

ถั่วงอกดอง 2 ตัวอย่าง พบว่าน่าจะเป็น *L. plantarum* ทั้งหมด

หัวเชื้อโยเกิร์ตจากเกาหลี พบว่าน่าจะเป็น *L. casei* subsp. *tolerans*

3.1.3 การตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนย

การทดสอบความสามารถในการตกตะกอนก้อนลิ่ม ในน้ำนมพร่องมันเนย (Skim Milk) ของแลคติคแอสิดแบคทีเรียทั้ง 50 สายพันธุ์ พบว่าในระยะแรกของการเลี้ยง ล.อ.บ. ที่แยกได้จากอาหารหมักดองในน้ำนมพร่องมันเนย ล.อ.บ.จะใช้เวลานานมากในการตกตะกอน

ก้อนลิ่ม คือประมาณ 2-4 สัปดาห์ (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ยกเว้นสายพันธุ์ BA ซึ่งเป็นหัวเชื้อโยเกิร์ตจากประเทศเกาหลีที่ใช้เวลา 18-24 ชั่วโมงในการตกตะกอนก้อนลิ่นในน้ำนมพร่องมันเนย แต่เมื่อมีการถ่าย ล.อ.บ. ลงในน้ำนมพร่องมันเนยบ่อยๆ พบว่า ล.อ.บ.จะสามารถตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนยได้เร็วประมาณ 1-10 วัน ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.3

จากตารางที่ 3.3 พบว่า ล.อ.บ. ที่สามารถตกตะกอนนมเป็นลิ่มได้เร็วที่สุด (1 วัน) ได้แก่สายพันธุ์ BA ที่แยกได้จากหัวเชื้อโยเกิร์ตจากเกาหลี ส่วนสายพันธุ์ BL และ AE ที่แยกได้จากหน่อไม้ดอง ตลาดห้วยขวาง และ ผักดอง ตลาดศรีย่าน ตามลำดับ สามารถตกตะกอนก้อนลิ่มในนมพร่องมันเนยได้รองลงมา (2 วัน) จะนำมาศึกษาต่อเพื่อดูความเป็นไปได้ในการเป็นหัวเชื้อในการอุตสาหกรรมนม เช่น การผลิตโยเกิร์ตแทนการสั่งซื้อหัวเชื้อจากต่างประเทศ และตรวจดูความสามารถในการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ

3.2 การคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบ

3.2.1 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่มี *E. coli* เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมลบรูปแท่ง, *B. subtilis* เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง และ S. aureus เป็นตัวแทนของกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลม โดยวิธีการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใส (Clear Zone) ที่เกิดขึ้นจากการยับยั้งเชื้อทดสอบในวุ้นเพาะเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ (Agar Diffusion) ที่มี 0.004 % บรอมคลีซอลเพอร์เพิลเป็นอินดิเคเตอร์โดยนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่แยกจากอาหารหมักดองและวัดค่าความเป็นกรดด่างพบว่าอยู่ในช่วง 3.3-4.0 ทำตามวิธีการทดลองในข้อ 2.4.1 พบว่า ส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่แยกจากอาหารหมักทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิดไม่แตกต่างกัน โดยการเกิดบริเวณใสรอบๆหลุมที่หยอดด้วยส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ซึ่งเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีบรอม

คลีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.4 และ รูปที่3.4

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยกรดแลคติค กรดไฮโดรคลอริก และกรดอะซิติค ที่ความเข้มข้น 300, 200, 100 และ 50 มิลลิโมลาร์ ต่อเชื้อทดสอบ *E. coli*, *B. subtilis* และ S. aureus พบว่า ความเข้มข้นของกรดมากขึ้นจะทำให้ความกว้างของบริเวณใสมากขึ้นด้วย ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.5 และรูปที่ 3.5-3.7 โดยปริมาณกรดที่แลคติคแอสิดแบคทีเรียสร้างขึ้นจะอยู่ในช่วง 50-300 mM ซึ่งการสร้างกรดมากหรือน้อย จะขึ้นอยู่กับแต่ละสายพันธุ์ของแลคติคแอสิดแบคทีเรีย

3.2.2 การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบในอาหารเหลว

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *E. coli*, *B. subtilis* และ S. aureus โดยวิธีการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า (Doubling Time) ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีในข้อ 2.4.2 พบว่า ส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่แยกจากอาหารหมักทุกสายพันธุ์ และมีระดับความเป็นกรดด่างในช่วง 3.3-4.0 จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.8-3.13

3.3 <u>การคัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่สร้างสารต่อต้านจุลชีพ</u>

3.3.1 การทดสอบการสร้างสารต่อต้านจุลชีพของ ล.อ.บ. บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบที่มี *E. coli*, *B. subtilis* และ S. aureus โดยวิธีการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบในวุ้นเพาะเชื้อ (Agar Diffusion) โดยนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่แยกจากอาหาร

หมักดอง ปรับให้มีความเป็นกรดด่าง 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 N มาทดสอบตามวิธีการในข้อ 2.5 พบว่ามีเฉพาะสายพันธุ์ BL เท่านั้นที่สามารถให้บริเวณใสกับเชื้อทดสอบ *B. subtilis* ขนาด 3.0 มม. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.14 ส่วน ล.อ.บ. ตัวอื่นๆไม่ให้บริเวณใสรอบๆหลุมทดสอบ

3.3.2 การทดสอบการสร้างสารต่อต้านจุลชีพของ ล.อ.บ.ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว

การทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *E. coli*, *B. subtilis* และ S. aureus โดยเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (Doubling Time) ของเชื้อทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวตามวิธีในข้อ 2.5 โดยสุ่มคัดเลือก ล.อ.บ. 10 ตัว ที่ให้ระยะเวลาในการตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนยต่างกันคือ BA (1 วัน); BL,AE (2 วัน); AK (3 วัน); M68,S1 (4 วัน); AJ (5 วัน);33* (6 วัน); A3M (7 วัน); AI (10 วัน) พบว่า ล.อ.บ. สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.6 และรูปที่ 3.8-3.13 โดยที่ ล.อ.บ. สายพันธุ์ BL สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้มากที่สุดคือ 3.92, 3.96 และ 2.70 เท่าใน *E. coli*, *B. subtilis* และ S. aureus ตามลำดับเมื่อเทียบกับตัวควบคุม

การพิจารณาค่าการดูดกลืนแสงของส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 3.3-4.0 และ 6.5 เมื่อรวมกับจุลชีพทดสอบทั้ง 3 ชนิด พบว่าเมื่อนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่มีความเป็นกรดรวมกับจุลชีพทดสอบ จะมีตะกอนขุ่นเกิดขึ้นทำให้ค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่าเมื่อนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่มีความเป็นกรดด่าง 6.5 รวมกับจุลชีพทดสอบที่สภาวะเดียวกันทุกอย่าง ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.8-3.13

การทดลองดังกล่าวจะเห็นได้ว่าการปั่นแยกเซลล์ *Lactobacillus* sp. ออกจากน้ำเลี้ยงเชื้อโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วสูงภายใต้อุณหภูมิต่ำ ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 จะให้ผลในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบ ซึ่งจะเห็นผลได้จากการทดสอบในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวโดยวิธี Tube Test ซึ่งไม่สามารถตรวจสอบการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้โดยการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการทดสอบโดย Tube Test เพื่อการศึกษาการสร้างสารต่อต้านจุลชีพโดย ล.อ.บ. ในลำดับต่อไป

3.4 การติดตามการเจริญของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL

ได้ติดตามการเจริญของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบ *E. coli*, *B. subtilis* และ S. aureus ได้มากกว่า ล.อ.บ. สายพันธุ์อื่นๆ และจะนำไปใช้ในการศึกษาการสร้างสารต่อต้านจุลชีพในลำดับต่อไป พบว่าสายพันธุ์ BL มีเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า เท่ากับ 5.63 ชม. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.15

3.5 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงแลคติคแอสิดแบคทีเรียเพื่อสร้างสารต่อต้านจุลชีพ

3.5.2 การศึกษาระยะเวลาการเลี้ยง ล.อ.บ. ที่เหมาะสมต่อการสร้างสารต่อต้านจุลชีพ

การทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวเชื้อทดสอบ *E. coli*, *B. subtilis* และ S. aureus โดยการนำส่วนน้ำใสจากการเลี้ยง *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL และ AE ที่ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อ 12, 24 และ 36 ชั่งโมง ปรับให้มีความเป็นกรดด่าง 6.5 แล้วนำมาทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธี Tube Test วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบ ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า พบว่าส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ของสายพันธุ์ BL ที่มีอายุ 36 ชม. จะสามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง *E. coli*, *B. subtilis* และ S. aureus แต่ส่วนน้ำใสที่มีอายุ 12 และ 24 ชม. พบว่านอกจากจะไม่หน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแล้ว ยังมีผลในการเร่งการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.7 และ รูปที่ 3.16 ดังนั้นเราจึงเลือกใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสารต่อต้านจุลชีพที่ 36 ชม. สำหรับการศึกษาในลำดับต่อไป

นอกจากนี้ส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. สายพันธุ์ BL ที่ไม่ได้ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 12, 24 และ 36 ชั่วโมง ก็นำมาทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธี Tube Test ด้วย พบว่าส่วนน้ำใสของสายพันธุ์ BL ที่มีระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 12 ชม. มีค่าความเป็นกรดด่าง 5.91 พบว่าจะสามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้เป็น 2.0 และ 1.14 เท่าใน *E. coli* และ *B. subtilis* ตามลำดับ แต่ไม่สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบ S. aureus ในขณะที่ส่วนน้ำใสของสายพันธุ์ BL ที่ 24 และ 36 ชม. มีค่าความเป็นกรดด่าง4.5 และ 3.5 ตามลำดับ จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.8 และ รูปที่ 3.18

เมื่อนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. สายพันธุ์ AE ที่ปรับให้มีความเป็นกรดด่าง 6.5 ที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 12, 24 และ 36 ชั่วโมง มาทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธี Tube Test พบว่า ทุกๆเวลาการเลี้ยง ล.อ.บ. จะไม่สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด แต่จะมีผลในการเร่งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วย ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.7 และ รูปที่ 3.17 สำหรับส่วนน้ำใสที่ไม่ได้ปรับค่าความเป็นกรดด่างที่ระยะเวลาการเลี้ยงเชื้อ 12, 24 และ 36 ชั่วโมง เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบ พบว่าส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. สายพันธุ์ AE ที่ 12 ชม. มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.84 จะไม่สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิด ในขณะที่ส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. สายพันธุ์AE ที่ 24 และ 36 ชม. มีค่าความเป็นกรดด่าง 4.48 และ 3.45 ตามลำดับ จะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.8 และรูปที่ 3.19

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.6 การทำสารต่อต้านจุลชีพให้เข้มข้นขึ้น

3.6.1 การทำไดอะไลซิส (Dialysis)

การนำส่วนน้ำใสของแลคติคแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ BL, BA, AE, M68 และ 1.1M ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 มาทำให้เข้มข้นขึ้นโดยวิธีไดอะไลซิส จากนั้นนำมาทำการทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธี Tube Test วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า พบว่าส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ทุกสายพันธุ์ที่ผ่านขบวนการไดอะไลซิส สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบ *B. subtilis* ได้เพิ่มมากขึ้น ส่วนการหน่วงเหนี่ยวการเจริญในเชื้อทดสอบ *E. coli* และ S. aureus จะให้ผลการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบใกล้เคียงกับส่วนน้ำใสที่ไม่ผ่านการทำไดอะไลซิส โดยที่ส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. บางสายพันธุ์ เช่นสายพันธุ์ BA สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบได้เพิ่มมากขึ้น ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.9 และรูปที่ 3.20 และ 3.21

3.6.2 การทำแห้งในภาวะเยือกแข็ง

การนำส่วนน้ำใสของแลคติคแอสิดแบคทีเรียสายพันธุ์ BL, BA, AE และ M68 ที่ มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 มาทำแห้งในภาวะเยือกแข็งเพื่อลดปริมาตรเพิ่มความเข้มข้นจากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธี Tube Test วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบ ที่ความยาวคลื่น 660 nm และหาเวลาการเพิ่มจำนวนเจริญเป็นสองเท่า พบว่าส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่ผ่านการทำให้แห้งในภาวะเยือกแข็ง สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิดได้เพิ่มมากขึ้น ตารางแสดงผลการทดลองที่ 3.10 และ รูปที่ 3.22

3.7 การทำสารต่อต้านจุลชีพกึ่งบริสุทธิ์

3.7.1 การแยกสารต่อต้านจุลชีพโดยการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

นำน้ำเลี้ยงเชลล์ ล.อ.บ. สายพันธุ์ BL มาปั่นแยกเซลล์ออกตามวิธีในข้อ 2.10.1 แล้วจึงนำส่วนน้ำใสที่ได้ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 นำไปตกตะกอนแยกสารต่อต้านจุลชีพด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตในความเข้มข้น 0-40, 40-70 และ 70-90 % ตามลำดับ หลังจากนั้นนำแต่ละลำดับส่วนไปปั่นแยกตะกอนสารต่อต้านจุลชีพตามวิธีในข้อ 2.10.2 ละลายตะกอนในแต่ละลำดับส่วนใน 50 mM ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 และนำมาทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธี Tube Test พบว่าสารต่อต้านจุลชีพที่ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วง 40-70 % จะมีฤทธิ์ในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบเป็น 2.4, 2.47 และ 2.1 เท่าของตัวควบคุมใน *E. coli*, *B. subtilis* และ S. aureus ตามลำดับ ซึ่งการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบของสารที่ตกตะกอนแอมโมเนียมซัลเฟตในช่วงอื่นจะต่ำกว่า ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.11 และ รูปที่ 3.23-3.25

3.7.2 การแยกสารต่อต้านจุลชีพโดยการทำโครมาโตรกราฟี

3.7.2.1 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50

นำส่วนของสารต่อต้านจุลชีพที่ตกตะกอนในช่วง 40-70 % แอมโมเนียมซัลเฟต ของ ล.อ.บ. สายพันธุ์ BL และผ่านการทำไดอะไลซิสเพื่อกำจัดแอมโมเนียมซัลเฟตที่เหลืออยู่ตามวิธีในข้อ 2.10.2 จากนั้นนำมาทำให้บริสุทธิ์เพิ่มขึ้นโดยวิธีโครโมโตรกราฟีดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 ซึ่งเป็นตัวกลางแลกเปลี่ยนประจุลบ (Anion Exchanger) ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นการกำจัดโปรตีนอื่นๆที่มีประจุตรงข้ามกับสารต่อต้านจุลชีพออกไป และยังมีการกำจัดโปรตีน

ที่มีประจุต่างกับสารต่อต้านจุลชีพมากๆ ออกด้วย โดยการใช้ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ต่างกัน ตามวิธีการในข้อ 2.10.3 แล้วนำลำดับส่วนที่มีโปรตีนไปทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี Tube Test วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า ผลการทดลองพบว่าสารต่อต้านจุลชีพจะถูกชะออกมาจากคอลัมน์ในลำดับที่ 65-67 ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 200-300 มิลลิโมลาร์ ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ *B. subtilis* และสามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* ได้เป็น 2.0 และ 2.57 เท่าในตัวควบคุมตามลำดับ ในขณะที่ส่วนที่ถูกชะออกจากคอลัมน์ในลำดับที่ 5-7 จะไม่สามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบเลย ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.12 และ รูปที่ 3.26-3.27

3.7.2.2 การทำให้บริสุทธิ์โดยคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75

นำส่วนของสารต่อต้านจุลชีพที่ออกจากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์เอ-50 ในลำดับส่วน 65-67 ที่ให้ผลในการยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* และสามารถหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบ *E. coli* และ *S. aureus* ซึ่งแขวนลอยอยู่ใน 0.05 M ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ลงในคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 ซึ่งขั้นตอนนี้เป็นการแยกโปรตีนที่มีขนาดต่างจากสารต่อต้านจุลชีพออกไป แล้วนำลำดับส่วนที่มีโปรตีนไป ทดสอบความสามารถในการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบโดยวิธี Tube Test วัดค่าการดูดกลืนแสงของเซลล์แขวนลอยของจุลชีพทดสอบที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และหาเวลาการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่า พบว่าสารต่อต้านจุลชีพจะออกจากคอลัมน์ในลำดับส่วนที่ 37-39 ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญของ *B. subtilis* ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.28-3.29

3.7.2.3 การหาน้ำหนักโมเลกุลของสารต่อต้านจุลชีพโดยวิธีอิเลคโตรโฟริซิส บนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล

นำสารต่อต้านจุลชีพในขั้นตอนต่างๆของการทำให้บริสุทธิ์ มาศึกษาองค์ประกอบหน่วยย่อยของโปรตีน โดยการทำอิเลคโตรโฟริซิสบนโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจล ตามวิธีในข้อ 2.10.5 ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 3.30 พบว่าสารต่อต้านจุลชีพในลำดับสุดท้ายที่ผ่านออกจากคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 จะมีจำนวนโปรตีนเพียง 2 แถบ เมื่อเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐานคาดว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 33,000 และ 43,000 ดาลตัน และเมื่อย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส ไลเปส และอะไมเลส คาดว่าสารต่อต้านจุลชีพน่าจะเป็นสารประเภทไลโพโปรตีน (Lipoprotein)

3.8 <u>การทดสอบด้วยประสาทสัมผัส</u> (Sensory Test)

ได้คัดเลือกแลคติคแอสิดแบคทีเรียจากอาหารหมักที่สามารถสร้างสารต่อต้านจุลชีพและใช้เวลาในการตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนย 2 วัน ซึ่งได้แก่ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่แยกได้จากหน่อไม้ดอง ตลาดห้วยขวาง เป็นหัวเชื้อในการเตรียมโยเกิร์ตและทดสอบโยเกิร์ตที่ได้ด้วยประสาทสัมผัส โดยใช้ผู้ทดสอบที่เคยรับประทานโยเกิร์ตจำนวน 20 คน เปรียบเทียบลักษณะของสี กลิ่น เนื้อสัมผัส รสชาติ และการยอมรับรวมของโยเกิร์ตควบคุมที่มีจำหน่ายในท้องตลาดกับโยเกิร์ตทดสอบที่ผลิตจาก ล.อ.บ. สายพันธุ์ BA, BL และหัวเชื้อโยเกิร์ตควบคุมที่ผลิตในกรรมวิธีเดียวกับในห้องปฏิบัติการ ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3.13

จากตารางแสดงให้เห็นว่า เมื่อให้โยเกิร์ตที่จำหน่ายในท้องตลาดมีคะแนนการทดสอบเต็ม 10 คะแนน เมื่อเปรียบเทียบลักษณะ สี และ เนื้อสัมผัส ของโยเกิร์ตจะพบว่า โยเกิร์ตที่ทำจาก ล.อ.บ. สายพันธุ์ BL บ่มนาน 21 ชม. จะมีการยอมรับสูงสุดเท่ากับ 7.33 และ 7.07 ตามลำดับ และเมื่อเปรียบเทียบการยอมรับรวมของโยเกิร์ตทั้งหมดพบว่า มีค่าการยอมรับที่ใกล้เคียงกันประมาณ 5.33

ตารางที่ 3.1 แสดงชนิดของตัวอย่างอาหารและสถานที่เก็บตัวอย่างของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ 50 สายพันธุ์

เชื้อที่แยกได้	คัดแยกจาก	สถานที่เก็บตัวอย่าง
M68	หน่อไม้ดอง	ตลาดบางซื่อ,กรุงเทพฯ
17*	หน่อไม้ดอง	ตลาดบางซื่อ,กรุงเทพฯ
10	หน่อไม้ดอง	ตลาดสามย่าน,กรุงเทพฯ
14	หน่อไม้ดอง	ตลาดสามย่าน,กรุงเทพฯ
69	หน่อไม้ดอง	ตลาดท่าน้ำนนทบุรี,กรุงเทพฯ
3	หน่อไม้ดอง	ตลาดท่าน้ำนนทบุรี,กรุงเทพฯ
6	หน่อไม้ดอง	ตลาดท่าน้ำนนทบุรี,กรุงเทพฯ
BL	หน่อไม้ดอง	ตลาดห้วยขวาง,กรุงเทพฯ
4	หน่อไม้ดอง	ตลาดห้วยขวาง,กรุงเทพฯ
39	หน่อไม้ดอง	ตลาดห้วยขวาง,กรุงเทพฯ
AK1	หน่อไม้ดอง	ตลาดเทเวศน์,กรุงเทพฯ
38	หน่อไม้ดอง	ตลาดเทเวศน์,กรุงเทพฯ
22	ผักกาดดอง	ตลาดสามย่าน,กรุงเทพฯ
26	ผักกาดดอง	ตลาดสามย่าน,กรุงเทพฯ
S1	ผักกาดดอง	ตลาดสามย่าน,กรุงเทพฯ
21	ผักกาดดอง	ตลาดปีนัง,กรุงเทพฯ
31	ผักกาดดอง	ตลาดปีนัง,กรุงเทพฯ
19	ผักกาดดอง	ตลาดสะพานใหม่ดอนเมือง,กรุงเทพ
27*	ผักกาดดอง	ตลาดสะพานใหม่ดอนเมือง,กรุงเทพ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

เชื้อที่แยกได้	คัดแยกจาก	สถานที่เก็บตัวอย่าง
70	ผักกาดดอง	ตลาดห้วยขวาง,กรุงเทพฯ
23	ผักกาดดอง	ตลาดห้วยขวาง,กรุงเทพฯ
29	ผักกาดดอง	ตลาดบางกระปิ,กรุงเทพฯ
31*	ผักกาดดอง	ตลาดบางกระปิ,กรุงเทพฯ
27	ผักกาดดอง	ตลาดเทเวศน์,กรุงเทพฯ
32	ผักกาดดอง	ตลาดเทเวศน์,กรุงเทพฯ
13	ผักกาดดอง	ตลาดอุทัยธานี,อุทัยธานี
71	ผักกาดดอง	ตลาดอุทัยธานี,อุทัยธานี
33*	ผักกาดดอง	ตลาดสุพรรณบุรี,สุพรรณบุรี
55	ผักดอง	ตลาดห้วยขวาง,กรุงเทพฯ
AE	ผักดอง	ตลาดศรีย่าน,กรุงเทพฯ
56	ผักดอง	ตลาดสะพานใหม่ดอนเมือง,กรุงเทพ
66	ผักดอง	ตลาดอุทัยธานี,อุทัยธานี
41	แหนมดอนเมือง	ตลาดอุทัยธานี,อุทัยธานี
A1	แหนมดอนเมือง	ตลาดศรีย่าน,กรุงเทพฯ
A3M	แหนมป้าย่น	ตลาดเชียงใหม่,เชียงใหม่
45	แหนมป้าย่น	ตลาดเชียงใหม่,เชียงใหม่
35	แหนม	ตลาดศรีย่าน,กรุงเทพฯ
B60	แหนม	ตลาดศรีย่าน,กรุงเทพฯ

ตารางที่ 3.1 (ต่อ)

เชื้อที่แยกได้	คัดแยกจาก	สถานที่เก็บตัวอย่าง
2*	แหนม	ตลาดห้วยขวาง,กรุงเทพฯ
48	แหนม	ตลาดห้วยขวาง,กรุงเทพฯ
B35	ไส้กรอกอีสาน	ตลาดห้วยขวาง,กรุงเทพฯ
43	ไส้กรอกอีสาน	ตลาดศรีย่าน,กรุงเทพฯ
65	ไส้กรอกอีสาน	ตลาดบางกระปิ,กรุงเทพฯ
65*	ไส้กรอกอีสาน	ตลาดสะพานใหม่ดอนเมือง,กรุงเทพ
1.1M	ไส้กรอกอีสาน	ตลาดราชวัตร,กรุงเทพฯ
AJ	ไส้กรอกอีสาน	ตลาดอุทัยธานี,อุทัยธานี
5	ไส้กรอกอีสาน	ตลาดสุพรรณบุรี,สุพรรณบุรี
57	ถั่วงอกดอง	ตลาดศรีย่าน,กรุงเทพฯ
AI	ถั่วงอกดอง	ตลาดบางกระปิ,กรุงเทพฯ
BA	หัวเชื้อโยเกิร์ต	ประเทศเกาหลี

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.2 แสดงผลการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรทของ *Lactobacillus* sp. ที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารต่างๆ

เชื้อที่แยกได้	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose	ความน่าจะเป็นของชนิดสายพันธุ์
14	d	+	+	+	+	+	+	-	+	+	d	+	-	+	+	-	+	d	-	+	d	-	*L. murinus*
BA	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	*L. casei* subsp. tolerance
M68,56	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	*L. pentosus*
A3M,45,2*,48,43,65,65*	d	d	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	*L. animalis*
17*,10,69,22,39,6,BL,AK1,38,4,3,22,26,S1,21,31,19,27*,70,23,29,31*,27,32,13,71,33*,55,AE,66,41,A1,35,B60,B35,5,1.1M,AJ,57,AI	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	-	+	+	+	+	+	d	*L. plantarum*

ตารางที่ 3.3 แสดงระยะเวลาในการตกตะกอนก้อนลิ่มในน้ำนมพร่องมันเนยของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมัก

ระยะเวลา (วัน)	*Lactobacillus* sp. สายพันธุ์
1	BA
2	BL, AE
3	39, AK1, 38, 19, 56, 66, 35
4	68, 6, 26, S1, 55, 65, 65*, 1.1M, 4
5	14, 3, 31, 27*, 31*, 13, 71, 41, 45, B60, 2*, AJ, 5, B35
6	23, 32, 33*
7	70, 27, A3M, 48, 43, 57
8	17*, 22, A1
10	10, 69, 21, 29, AI

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 แสดงขนาดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยน้ำส่วนน้ำใสของแลคติคแอสิดแบคทีเรียที่ไม่ได้ปรับความเป็นกรดด่าง

เชื้อที่แยกได้	ความกว้างของบริเวณใส (ซม.)		
	E.coli	*B.subtilis*	S.aureus
M68	0.60	0.70	0.45
17*	0.15	0.10	0.15
10	0.50	0.60	0.60
14	0.80	0.80	0.70
69	0.70	0.70	0.50
3	0.50	0.75	0.40
6	0.50	0.80	0.70
BL	1.05	0.90	0.70
4	0.50	0.40	0.50
39	0.20	0.60	0.25
AK1	1.00	0.90	0.55
38	0.80	0.80	0.80
22	0.50	0.70	0.25
26	0.60	0.80	0.20
S1	0.50	0.60	0.50
21	0.60	0.80	0.50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 (ต่อ)

เชื้อที่แยกได้	ความกว้างของบริเวณใส (ซม.)		
	E.coli	*B.subtilis*	S.aureus
31	0.20	0.40	0.20
19	0.72	0.65	0.20
27*	0.15	0.15	0.10
70	0.15	0.15	0.10
23	0.15	0.15	0.10
29	0.80	0.70	0.30
31*	0.15	0.15	0.10
27	0.65	0.65	0.50
32	0.30	0.30	0.20
13	0.20	0.50	0.25
71	0.40	0.60	0.30
33*	0.15	0.15	0.15
AE	0.75	0.50	0.80
56	0.45	0.75	0.70
66	0.50	0.80	0.80
41	0.35	0.65	0.40
A1	0.50	0.80	0.35
A3M	0.45	0.80	0.40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.4 (ต่อ)

เชื้อที่แยกได้	ความกว้างของบริเวณใส (ซม.)		
	E.coli	*B.subtilis*	S.aureus
45	0.70	0.70	0.35
35	0.55	0.65	0.40
B60	0.40	0.70	0.60
2*	0.45	0.80	0.70
48	0.70	0.80	0.70
B35	0.45	0.60	0.30
43	0.50	0.20	0.30
65	0.25	0.45	0.15
65*	0.45	0.50	0.30
1.1M	0.30	0.70	0.50
AJ	0.50	0.75	0.60
5	0.30	0.50	0.20
57	0.50	0.70	0.40
AI	0.60	0.75	0.45
BA	0.85	0.80	0.65

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.5 แสดงขนาดความกว้างของบริเวณใสที่เกิดจากการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยกรดแลคติค กรดไฮโดรคลอริก และกรดอะซิติค

เชื้อทดสอบ	ความกว้างของบริเวณใส (ซม.)											
	กรดแลคติค (mM)				กรดไฮโดรคลอริก (mM)				กรดอะซิติค (mM)			
	300	200	100	50	300	200	100	50	300	200	100	50
E. coli	1.00	0.75	0.40	0.10	0.90	0.80	0.30	-	1.35	1.20	0.70	0.25
B. subtilis	1.00	0.90	0.45	0.10	1.20	0.90	0.50	0.25	1.10	0.90	0.60	0.30
S. aureus	0.70	0.60	0.20	-	0.80	0.55	-	-	0.90	0.60	-	-

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.6 แสดงการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) ของเชื้อทดสอบ เมื่อใช้ส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ปรับให้มีความเป็นกรดด่าง 6.5

ล.อ.บ.	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (ชม.)		
	E. coli	*B. subtilis*	S. aureus
control	8.03	12.71	10.27
BL	31.50 (3.92)	50.40 (3.96)	27.72 (2.70)
BA	16.59 (2.06)	35.54 (2.80)	27.72 (2.70)
M68	14.58 (1.81)	45.74 (3.6)	19.25 (1.87)
AE	17.32 (2.16)	42.64 (3.36)	21.32 (2.07)
S1	14.98 (1.87)	32.22 (2.69)	15.84 (1.54)
AK	13.86 (1.97)	21.93 (1.73)	14.59 (1.42)
33*	12.89 (1.61)	19.12 (1.5)	19.38 (1.89)
AJ	11.55 (1.44)	34.65 (2.8)	19.80 (1.93)
A3M	9.24 (1.15)	26.96 (2.12)	14.59 (1.42)
AI	10.27 (1.28)	18.48 (1.45)	14.14 (1.38)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ อัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนน้ำใสของล.อ.บ. มาทดสอบต่อ ส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_d ล.อ.บ./t_d ตัวควบคุม)

ตารางที่ 3.7 แสดงการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_g) ของเชื้อทดสอบ เมื่อแปรค่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสารต่อต้านจุลชีพ และปรับส่วนน้ำใสให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5

ระยะเวลา (ชม.)	ล.อ.บ.	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_g) (ชม.)		
		E. coli	*B. subtilis*	S. aureus
	control	7.62	13.27	18.73
12	BL	4.83 (0.63)	9.19 (0.70)	11.95 (0.64)
24		4.81 (0.63)	5.68 (0.43)	11.18 (0.60)
36		23.10 (3.03)	17.76 (1.34)	23.89 (1.28)
12	AE	6.03 (0.80)	4.25 (0.32)	13.00 (0.69)
24		6.93 (0.91)	5.87 (0.44)	6.42 (0.34)
36		6.36 (0.84)	7.70 (0.58)	6.08 (0.33)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ อัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนน้ำใสของล.อ.บ. มาทดสอบต่อ ส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_g ล.อ.บ./t_g ตัวควบคุม)

ตารางที่ 3.8 แสดงการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) ของเชื้อทดสอบ เมื่อแปรค่าระยะเวลาในการเลี้ยงเชื้อเพื่อสร้างสารต่อต้านจุลชีพ

ระยะเวลา (ชม.): pH	ล.อ.บ.	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) (ชม.)		
		E. coli	*B. subtilis*	S. aureus
	control	7.62	13.27	18.73
12:5.91	BL	15.23 (2.00)	15.23 (1.14)	9.18 (0.49)
24:4.50		-	-	-
36:3.50		-	-	-
12:6.84	AE	7.48 (0.98)	6.30 (0.47)	12.55 (0.67)
24:4.48		-	-	-
36:3.45		-	-	-

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ อัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนน้ำใสของล.อ.บ. มาทดสอบต่อ ส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_d ล.อ.บ./t_d ตัวควบคุม)

ตารางที่ 3.9 แสดงการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) ของเชื้อทดสอบ เมื่อนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 มาทำไดอะไลซิส

ล.อ.บ.	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) (ชม.)					
	E. coli		*B. subtilis*		S. aureus	
	ND	D	ND	D	ND	D
control	6.03	7.70	10.73	9.90	10.41	1.87
BL	$41.50^{(6.9)}$	$57.75^{(7.6)}$	$43.31^{(4.2)}$	$69.30^{(7.0)}$	$58.24^{(5.6)}$	$7.07^{(3.8)}$
BA	$22.36^{(3.7)}$	$34.65^{(4.6)}$	$14.59^{(1.4)}$	$23.10^{(2.3)}$	$17.59^{(1.7)}$	$3.90^{(2.1)}$
AE	$53.30^{(8.8)}$	$46.20^{(6.0)}$	$36.28^{(3.4)}$	$51.33^{(5.2)}$	$32.38^{(3.1)}$	$6.60^{(3.5)}$
M68	$47.79^{(7.9)}$	$47.80^{(6.2)}$	$42.26^{(3.9)}$	$66.00^{(6.6)}$	$46.51^{(4.5)}$	$6.30^{(3.4)}$
1.1M	$8.30^{(1.4)}$	$11.95^{(1.6)}$	$12.67^{(1.2)}$	$32.23^{(3.3)}$	$18.14^{(1.7)}$	$6.03^{(3.2)}$

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ อัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนน้ำใสของล.อ.บ. มาทดสอบต่อ ส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_d ล.อ.บ./t_d ตัวควบคุม)

ND = Non Dialysis D = Dialysis

ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด 7.5-8.5 มก./มล.

ตารางที่ 3.10 แสดงการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) ของเชื้อทดสอบ เมื่อนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 มาทำแห้งในภาวะเยือกแข็ง

ล.อ.บ.	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) (ชม.)		
	E. coli	*B. subtilis*	S. aureus
control	4.28	5.82	6.35
BL	37.26 (8.71)	33.00 (5.67)	33.00 (5.20)
BA	8.61 (2.01)	12.60 (2.16)	18.24 (2.87)
AE	37.66 (8.80)	18.48 (3.17)	34.65 (5.46)
M68	26.15 (6.11)	16.31 (2.80)	23.49 (3.70)
control NB	8.01 (1.87)	16.00 (2.76)	6.63 (1.05)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ อัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนน้ำใสของล.อ.บ. มาทดสอบต่อ ส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_d ล.อ.บ./t_d ตัวควบคุม)

control คือ lyophilized MRS

ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด 8 มก./มล.

ตารางที่ 3.11 แสดงการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) ของเชื้อทดสอบ เมื่อนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 มาตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต

$(NH_4)_2SO_4$ precipitrate (%)	เชื้อทดสอบ	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) (ชม.)		
		control	BL	BL/control
0-40	*E. coli*	45.00	83.49	1.85
	B. subtilis	41.25	70.71	1.71
	S. aureus	25.86	52.90	2.04
40-70	*E. coli*	38.50	92.40	2.40
	B. subtilis	40.06	99.00	2.47
	S. aureus	25.96	54.57	2.10
70-90	*E. coli*	39.60	52.10	1.31
	B. subtilis	44.43	86.63	1.95
	S. aureus	25.02	59.74	2.39

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ อัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนน้ำใสของล.อ.บ. มาทดสอบต่อ ส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_d ล.อ.บ./t_d ตัวควบคุม)
ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด 9 มก./มล.

ตารางที่ 3.12 แสดงการเปรียบเทียบเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) ของเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนน้ำใสของ ล.อ.บ. ผ่าน Ion Exchange Chromatography (DEAE-Sephadex A-50)

Fraction No.	เวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า (t_d) (ชม.)		
	E. coli	*B. subtilis*	S. aureus
control	28.06	145.89	29.62
5-7	11.87 (0.42)	57.29 (0.39)	24.66 (0.83)
65-67	56.34 (2.00)	-	76.15 (2.57)

หมายเหตุ ตัวเลขในวงเล็บคือ อัตราส่วนของเวลาการเพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่าของเชื้อทดสอบเมื่อนำส่วนน้ำใสของล.อ.บ. มาทดสอบต่อ ส่วนน้ำใสของตัวควบคุม (t_d ล.อ.บ./t_d ตัวควบคุม)
ปริมาณโปรตีนในแต่ละหลอด 5 มก./มล.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3.13 แสดงคะแนนการทดสอบด้วยประสาทสัมผัสของโยเกิร์ตทดสอบ

การทดสอบ	โยเกิร์ตหมายเลข						
	1	2	3	4	5	6	7
สี	10	3.60	4.33	7.33	5.00	6.00	5.93
กลิ่น	10	6.21	5.93	6.13	2.83	6.13	6.80
รสชาติ	10	5.60	5.40	4.77	2.60	5.33	5.40
เนื้อสัมผัส	10	5.33	5.53	7.07	4.87	5.13	4.47
การยอมรับรวม	10	5.47	5.40	5.53	3.20	5.33	5.27

หมายเหตุ หมายเลข 1 : โยเกิร์ตที่จำหน่ายทั่วไปในท้องตลาด ให้มีคะแนนเต็ม 10

2 : โยเกิร์ตที่ทำจาก ล.อ.บ.สายพันธุ์ BA บ่มนาน 21 ชม.

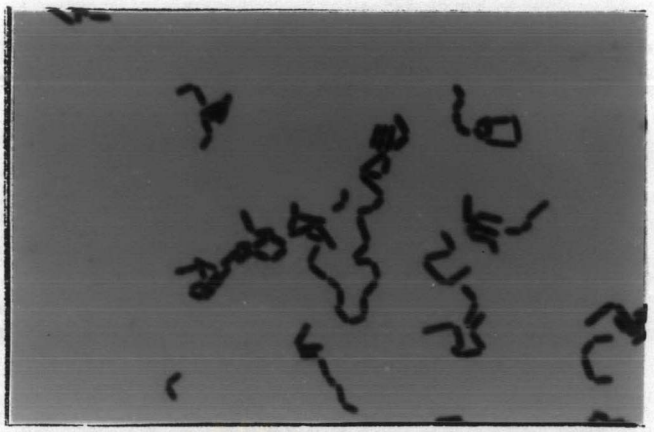
3 : โยเกิร์ตที่ทำจาก ล.อ.บ.สายพันธุ์ BA บ่มนาน 45 ชม.

4 : โยเกิร์ตที่ทำจาก ล.อ.บ.สายพันธุ์ BL บ่มนาน 21 ชม.

5 : โยเกิร์ตที่ทำจาก ล.อ.บ.สายพันธุ์ BL บ่มนาน 45 ชม.

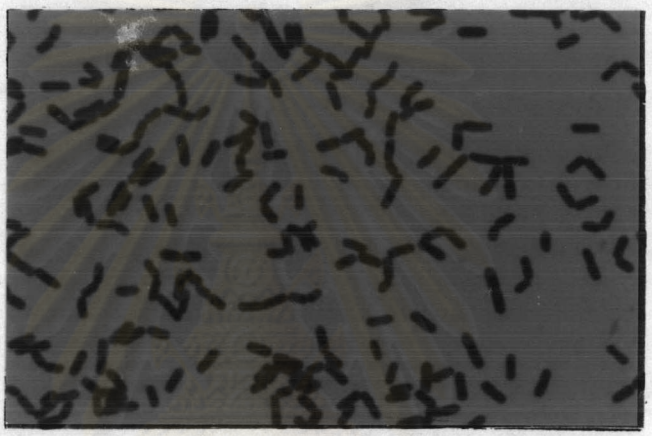
6 : โยเกิร์ตที่ทำจากโยเกริต์หมายเลข 1 ในกรรมวิธีเดียวกับในห้องปฏิบัติการ บ่มนาน 21 ชม.

7 : โยเกิร์ตที่ทำจากโยเกริต์หมายเลข 1 ในกรรมวิธีเดียวกับในห้องปฏิบัติการ บ่มนาน 45 ชม.



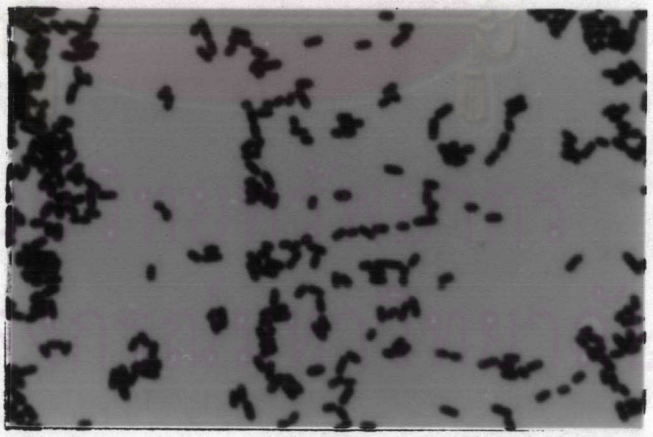
ก

5 μm.



ข

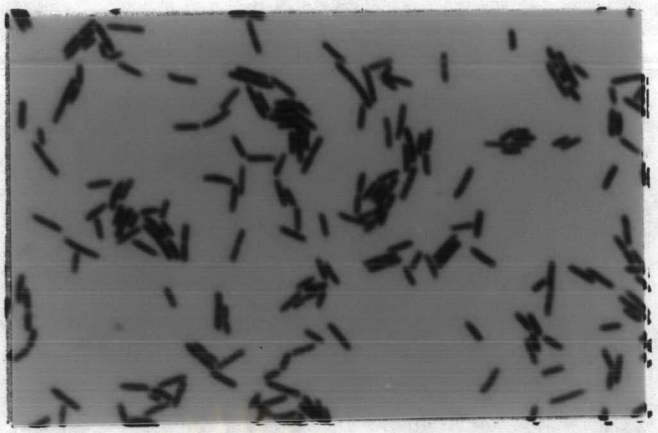
5 μm.



ค

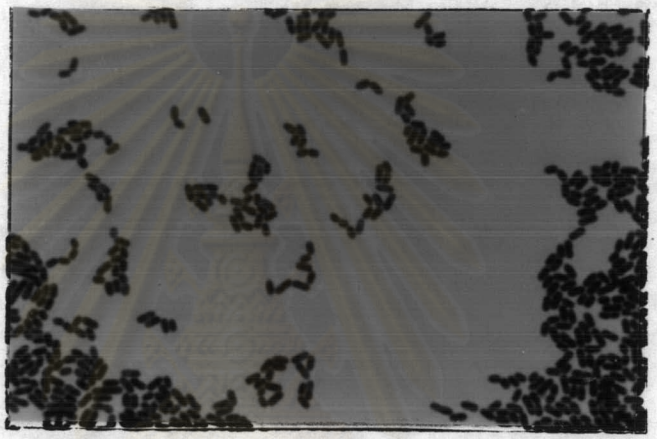
5 μm.

รูปที่ 3.1 แสดงภาพการย้อมสีแกรมของเชื้อ ก. M68 ข. BL ค. 39 ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า



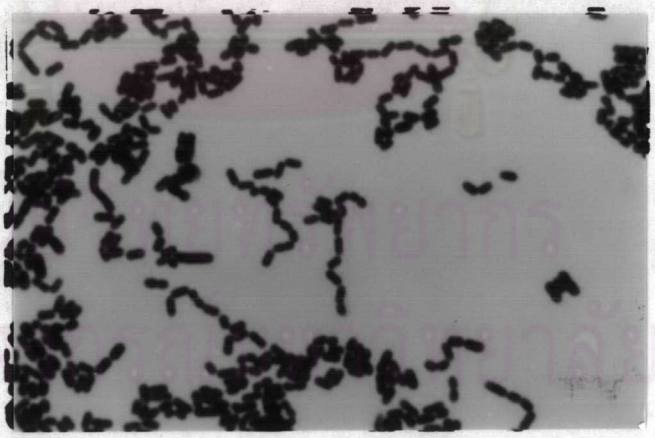
ก

5 μm.



ข

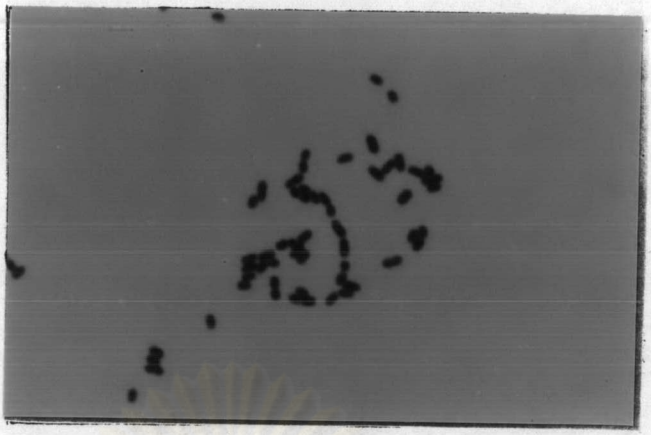
5 μm.



ค

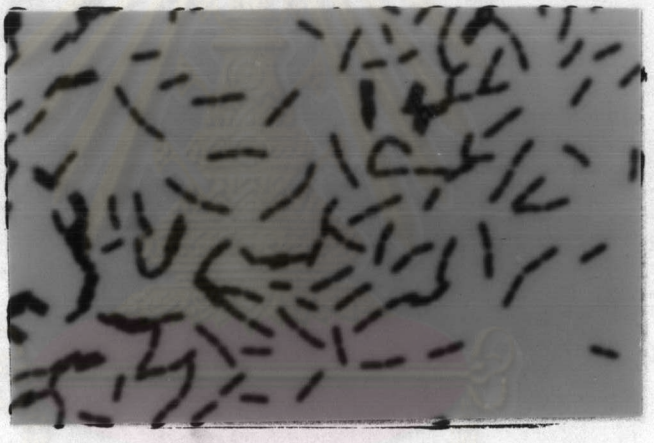
5 μm.

รูปที่ 3.2 แสดงภาพการย้อมสีแกรมของเชื้อ ก. 70 ข. A1 ค. B60 ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า



ก

5 μm.

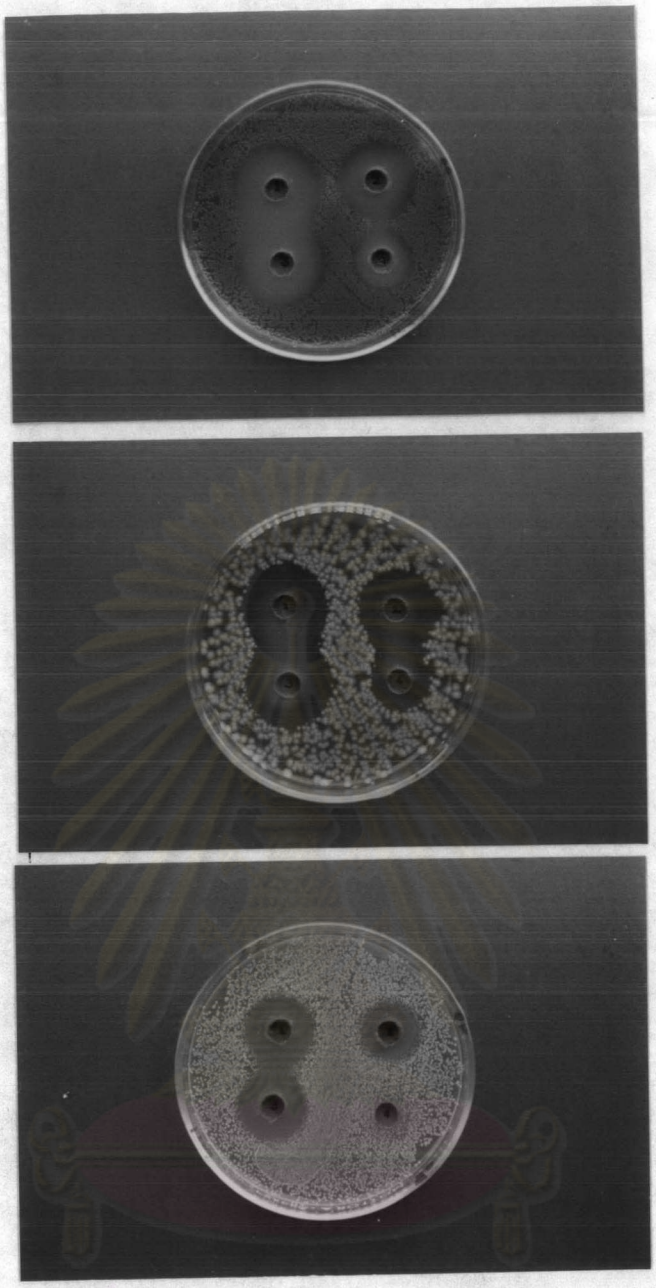


ข

5 μm.

รูปที่ 3.3 แสดงภาพการย้อมสีแกรมของเชื้อ ก. AI ข. BA ที่ถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 1000 เท่า

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก

ข

ค

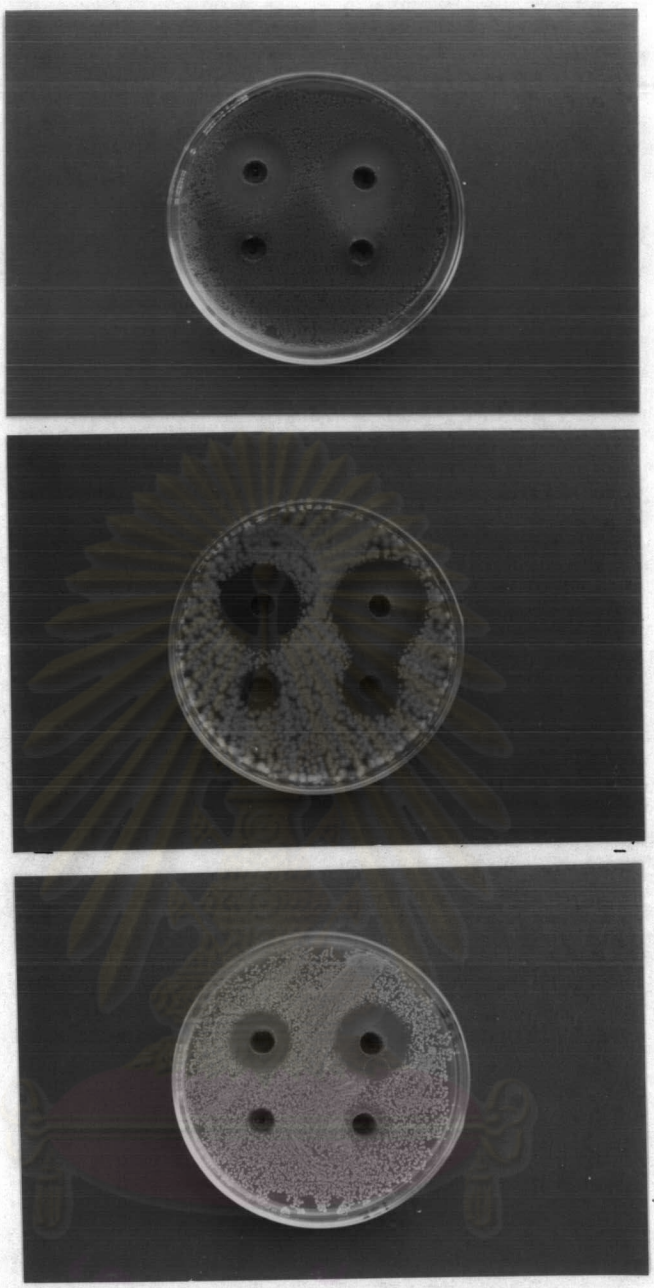
1 2

3 4

รูปที่ 3.4 แสดงการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสที่ไม่ได้ปรับความเป็นกรดด่างของเชื้อ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

1. BL 2. 66 3. AK1 4. AE ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. S. aureus บ่มที่ 37 °ซ นาน 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก

ข

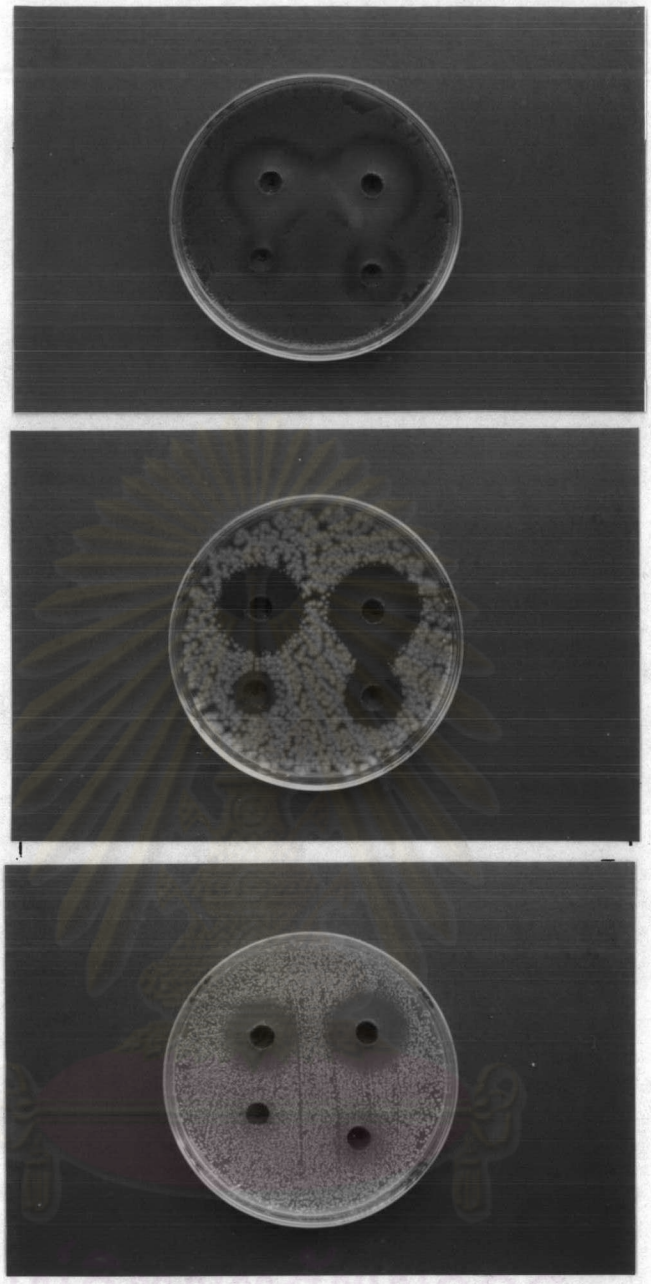
ค

2 1

4 3

รูปที่ 3.6 แสดงการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 1. 300 mM 2. 200 mM 3. 100 mM 4. 50 mM ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. *S. aureus* บ่มที่ 37 °ซ นาน 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก

ข

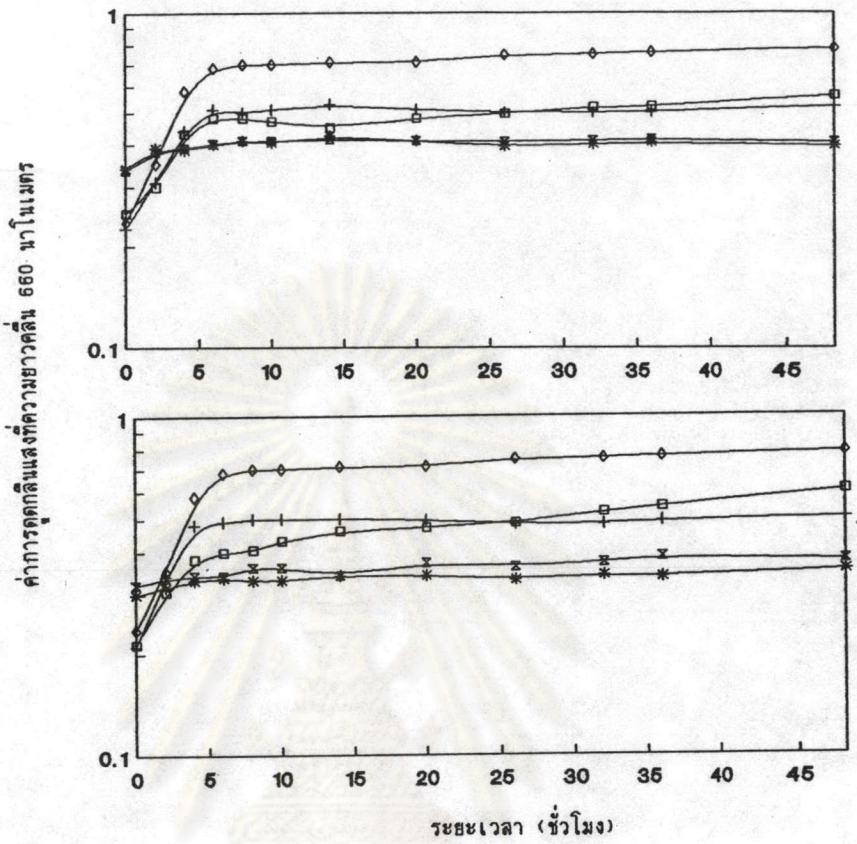
ค

2 1

4 3

รูปที่ 3.7 แสดงการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยกรดอะซิติคความเข้มข้น 1. 300 mM 2. 200 mM 3. 100 mM 4. 50 mM ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. S. aureus บ่มที่ 37 °ซ นาน 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ก

ข

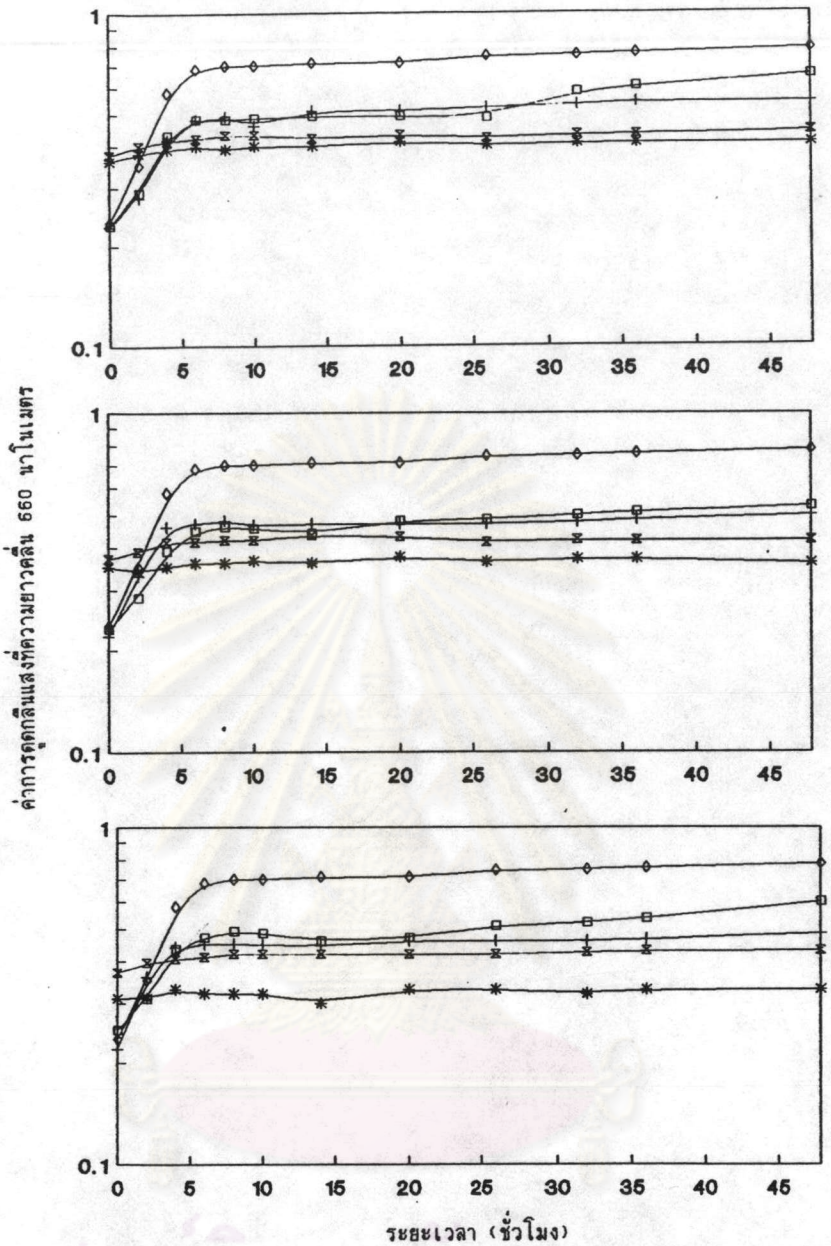
รูปที่ 3.8 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ pH ต่างๆของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

ก. 33* pH 6.5 —+— , 33* pH 3.67 —*— , AE pH 6.5 —□— และ AE pH 3.66 —⧗—

ข. AI pH 6.5 —+— , AI pH 3.78 —*— , BA pH 6.5 —□— และ BA pH 3.79 —⧗—

เมื่อใช้ *E. coli* —◇— เป็นเชื้อทดสอบ บ่มที่ 37 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



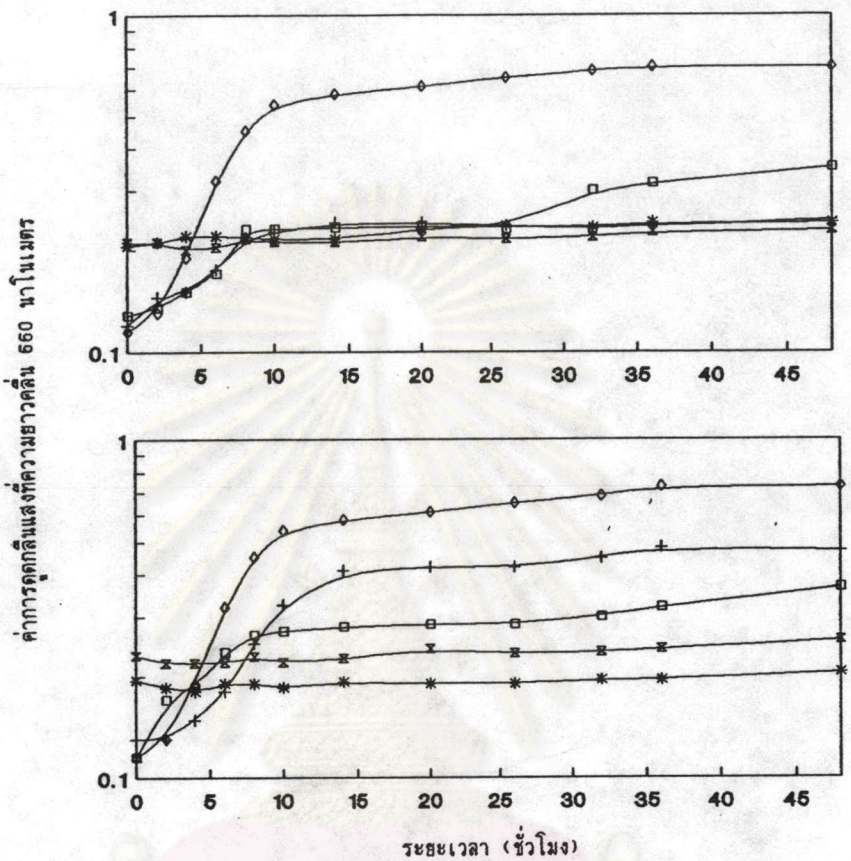
รูปที่ 3.9 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ pH ต่างๆของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

ก. M68 pH 6.5 —+— , M68 pH 3.76 —*— , AK pH 6.5 —□— และ AK pH 3.78 —⧗—

ข. AJ pH 6.5 —+— , AJ pH 3.93 —*— , BL pH 6.5 —□— และ BL pH 3.65 —⧗—

ค. A3M pH 6.5 —+— , A3M pH 3.69 —*— , S1 pH 6.5 —□— และ S1 pH 3.73 —⧗—

เมื่อใช้ *E. coli* —◇— เป็นเชื้อทดสอบ บ่มที่ 37 °ซ

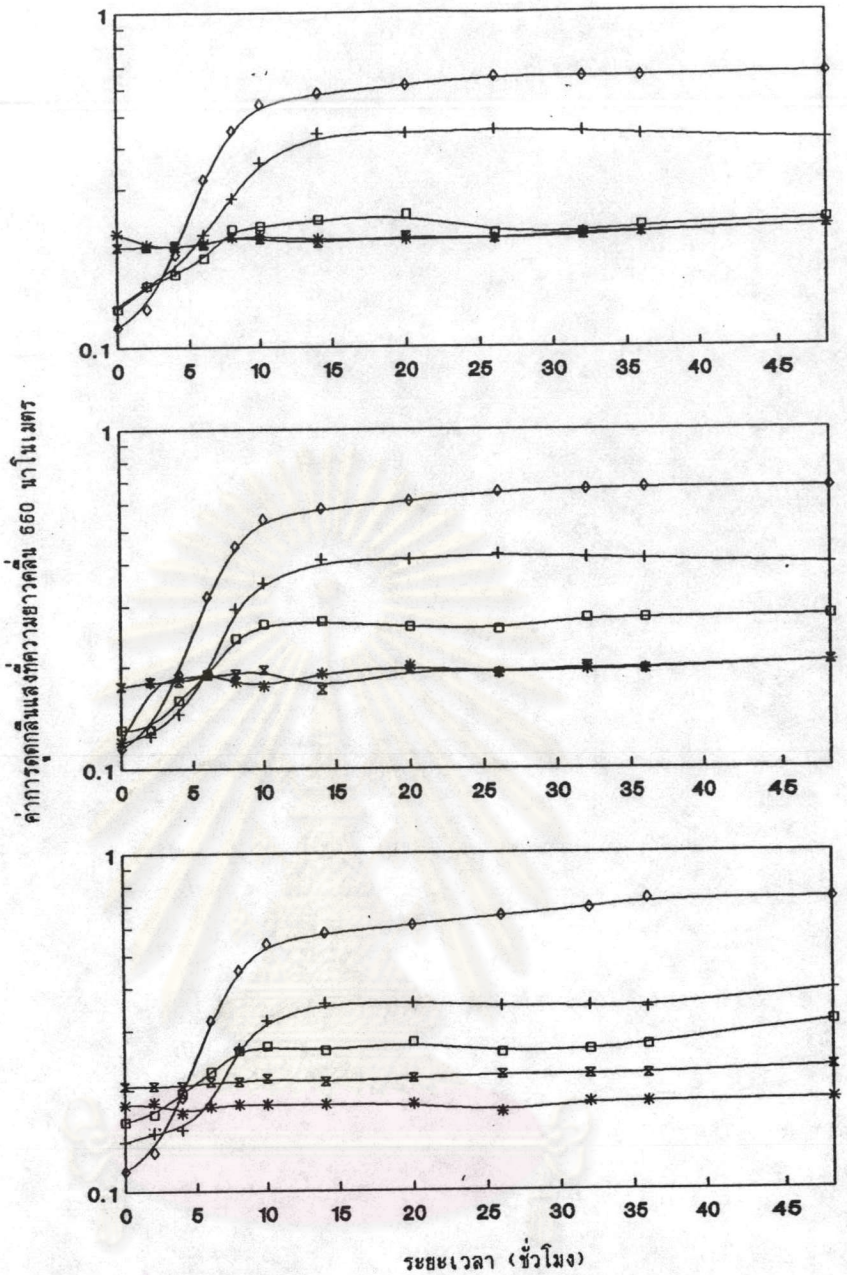


รูปที่ 3.10 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ pH ต่างๆของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

ก. AE pH 6.5 —+— , AE pH 3.66 —*— , BA pH 6.5 —□— และ BA pH 3.79 —⧗—

ข. 33* pH 6.5 —+— , 33* pH 3.67 —*— , AJ pH 6.5 —□— และ AJ pH 3.93 —⧗—

เมื่อใช้ *B. subtilis* —◇— เป็นเชื้อทดสอบ บ่มที่ 37 °ซ



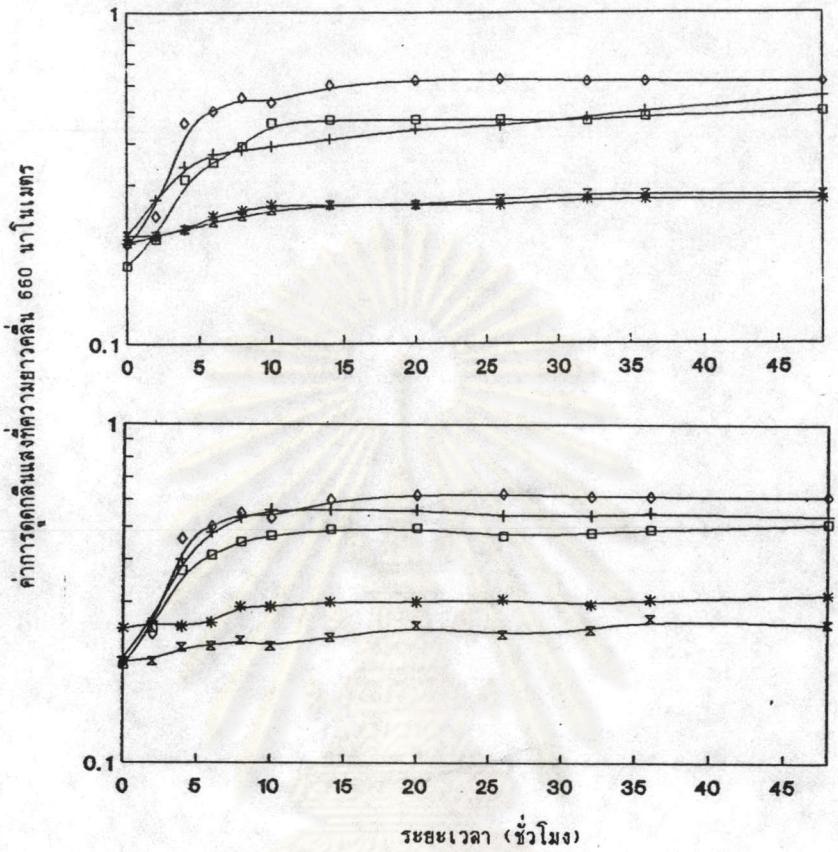
รูปที่ 3.11 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ pH ต่างๆของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

ก. AK pH 6.5 —+— , AK pH 3.78 —✳— , BL pH 6.5 —□— และ BL pH 3.65 —⧖—

ข. AI pH 6.5 —+— , AI pH 3.78 —✳— , S1 pH 6.5 —□— และ S1 pH 3.73 —⧖—

ค. A3M pH 6.5 —+— , A3M pH 3.69 —✳— , M68 pH 6.5 —□— และ M68 pH 3.76 —⧖—

เมื่อใช้ *B. subtilis* —◇— เป็นเชื้อทดสอบ บ่มที่ 37 °ซ

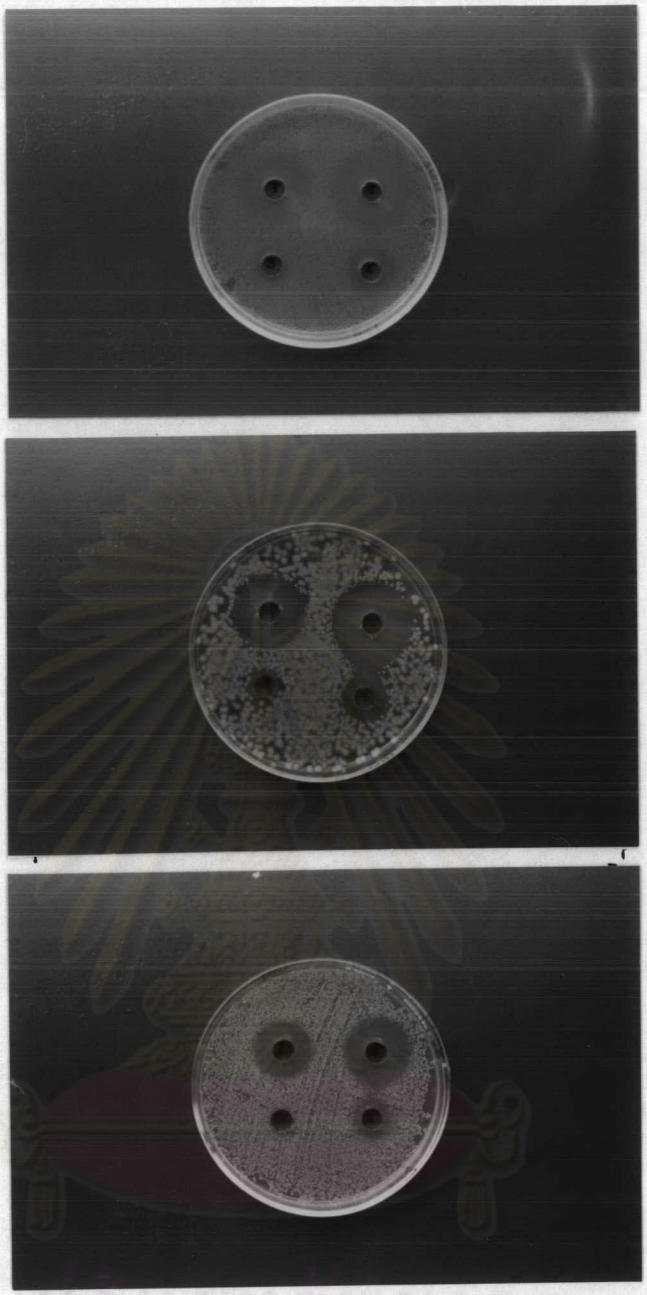


รูปที่ 3.12 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ pH ต่างๆของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

ก. AE pH 6.5 —+— , AE pH 3.66 —*— , 33* pH 6.5 —□— และ 33* pH 3.67 —⧖—

ข. AI pH 6.5 —+— , AI pH 3.78 —*— , S1 pH 6.5 —□— และ S1 pH 3.73 —⧖—

เมื่อใช้ S. aureus —◇— เป็นเชื้อทดสอบ บ่มที่ 37 °ซ



ก

ข

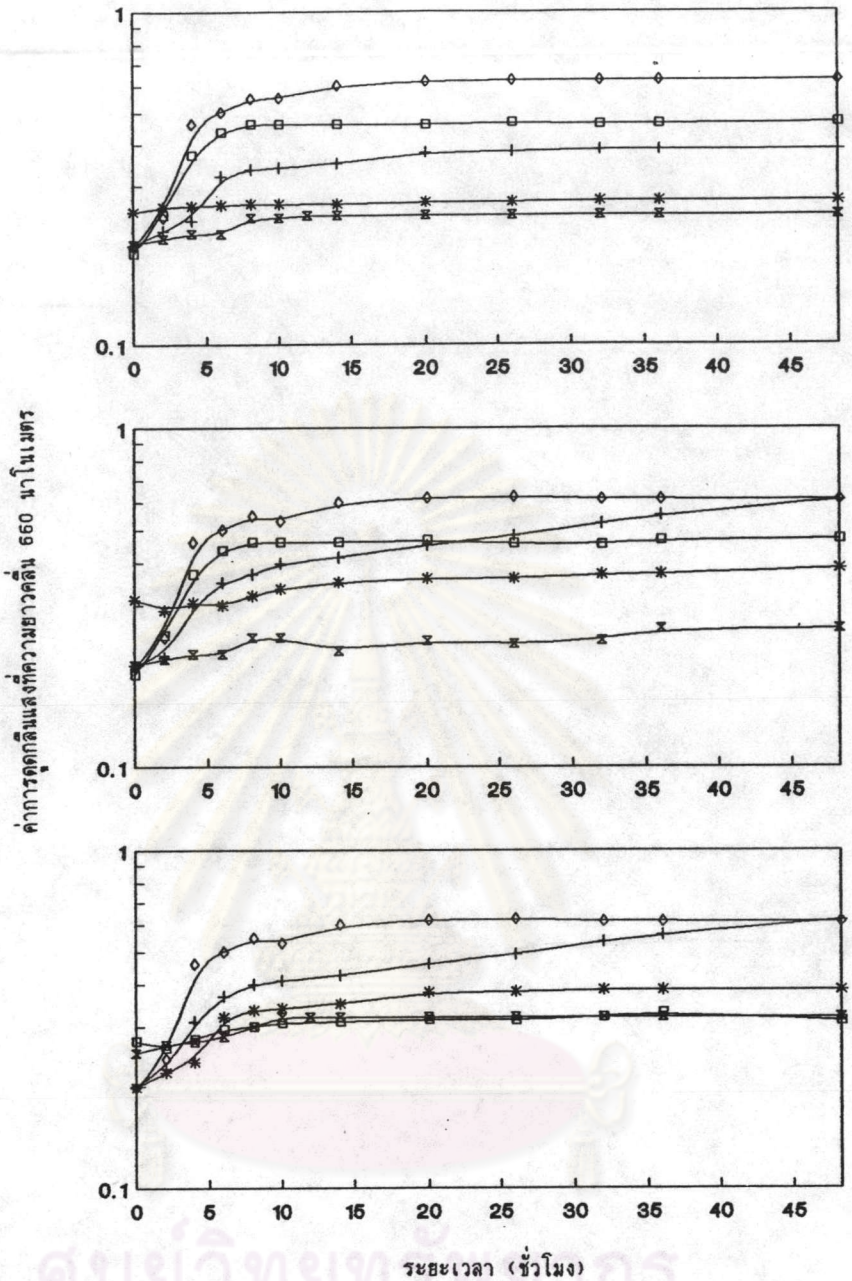
ค

2 1

4 3

รูปที่ 3.5 แสดงการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยกรดแลคติคความเข้มข้น 1. 300 mM 2. 200 mM 3. 100 mM 4. 50 mM ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. S. aureus บ่มที่ 37 °ซ นาน 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



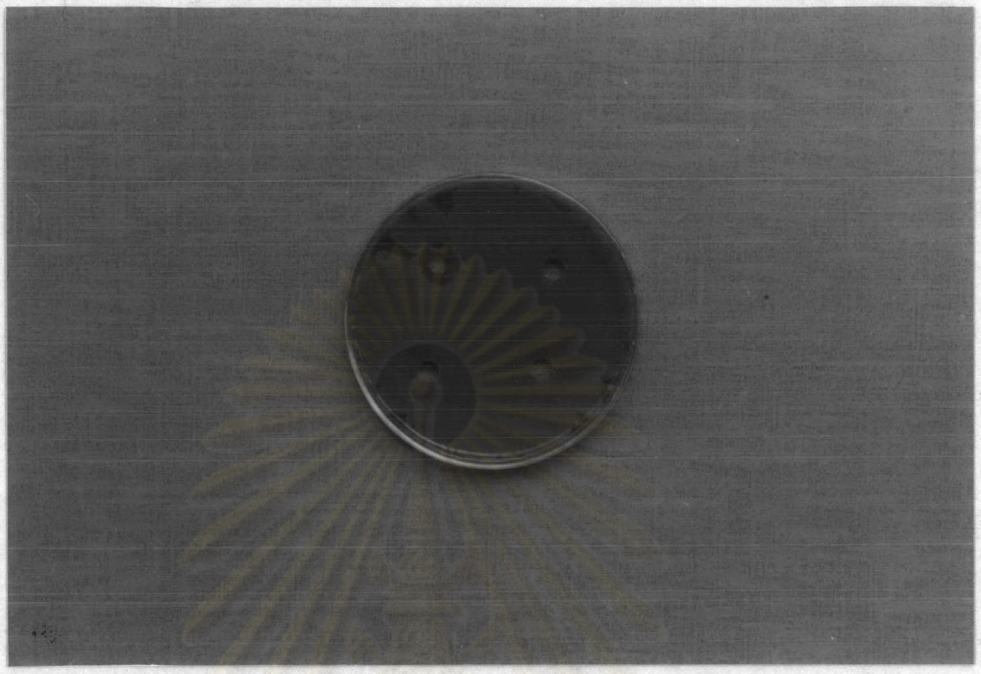
รูปที่ 3.13 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ pH ต่างๆของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

ก. BA pH 6.5 —+— , BA pH 3.79 —*— , A3M pH 6.5 —□— และ A3M pH 3.69 —⧖—

ข. AJ pH 6.5 —+— , AJ pH 3.93 —*— , AK pH 6.5 —□— และ AK pH 3.78 —⧖—

ค. M68 pH 6.5 —+— , M68 pH 3.76 —⧖— , BL pH 6.5 —*— และ BL pH 3.65 —□—

เมื่อใช้ *S. aureus* —◇— เป็นเชื้อทดสอบ บ่มที่ 37 °ซ

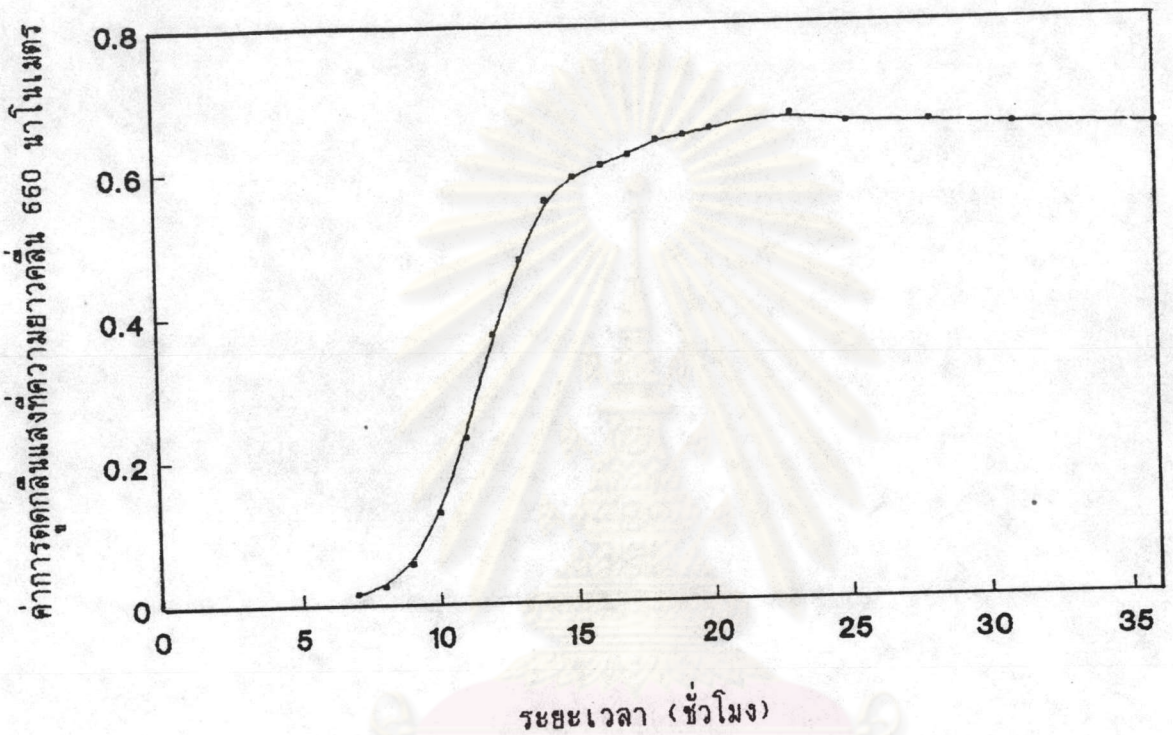


1 2

3 4

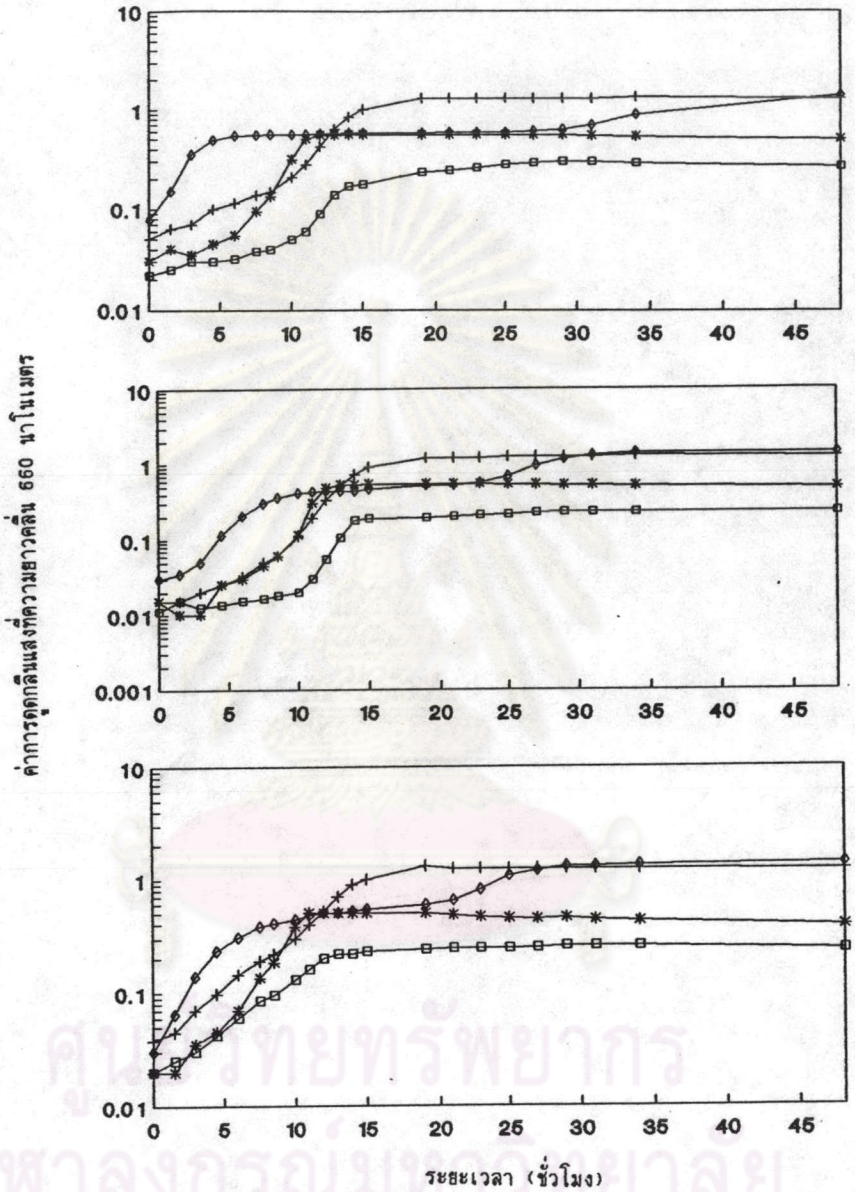
รูปที่ 3.14 แสดงการเปรียบเทียบความกว้างของบริเวณใสบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งนิวเตรียนท์ที่มีบรอมครีซอลเพอเพิลเป็นอินดิเคเตอร์ ที่เกิดจากการยับยั้งด้วยส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ของเชื้อ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ 1. BL 2. AE 3. BA 4. M68 ต่อเชื้อทดสอบ *B. subtilis* บ่มที่ 37 °ซ นาน 24 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3.15 แสดงการติดตามการเจริญของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวแลคโตบาซิไล เอ็มอาร์เอส ที่ 37 °ซ เป็นเวลา 36 ชม.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

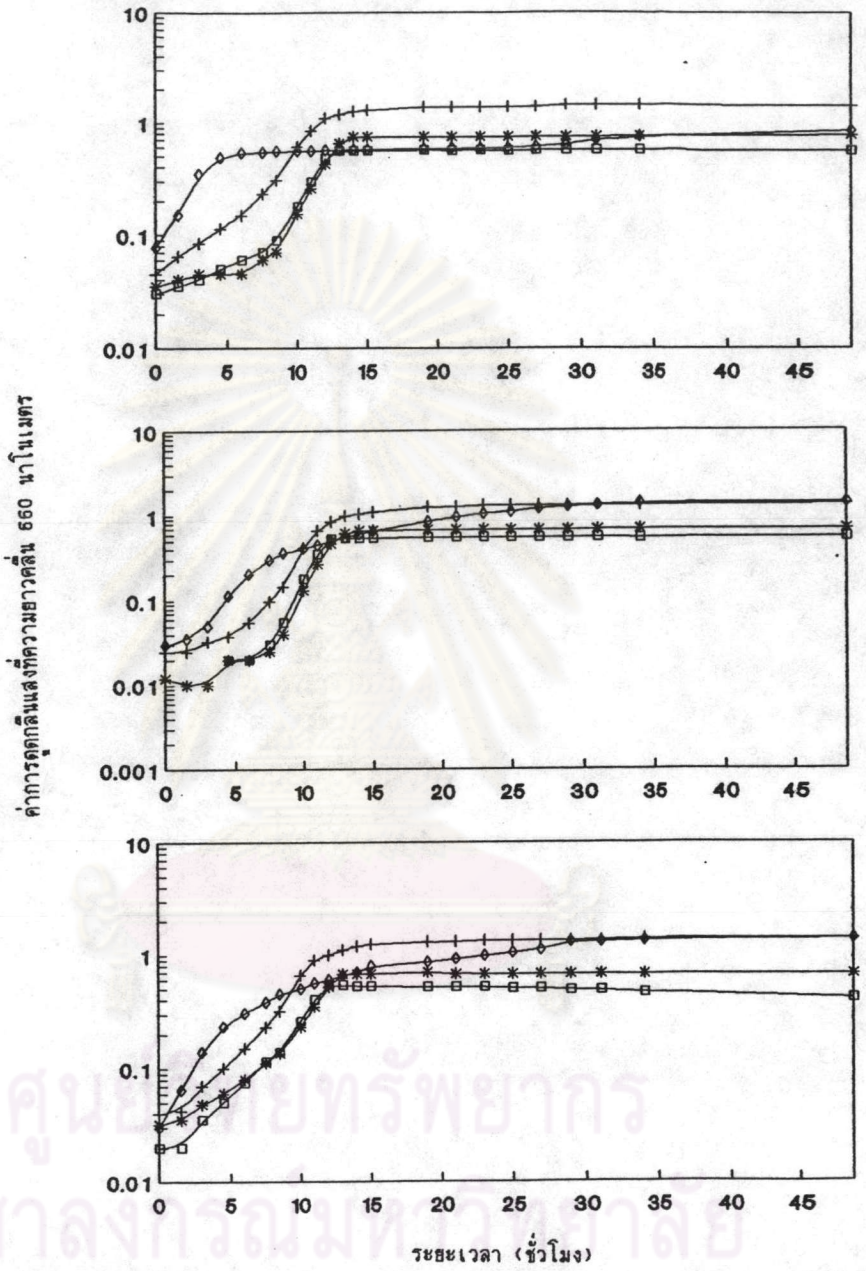


รูปที่ 3.16 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่เลี้ยงนาน

1.12 ชม. —+— 2. 24 ชม. —*— 3. 36 ชม. —□— 4. ตัวควบคุม —◇—

ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. S. *aureus* ที่ 37 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

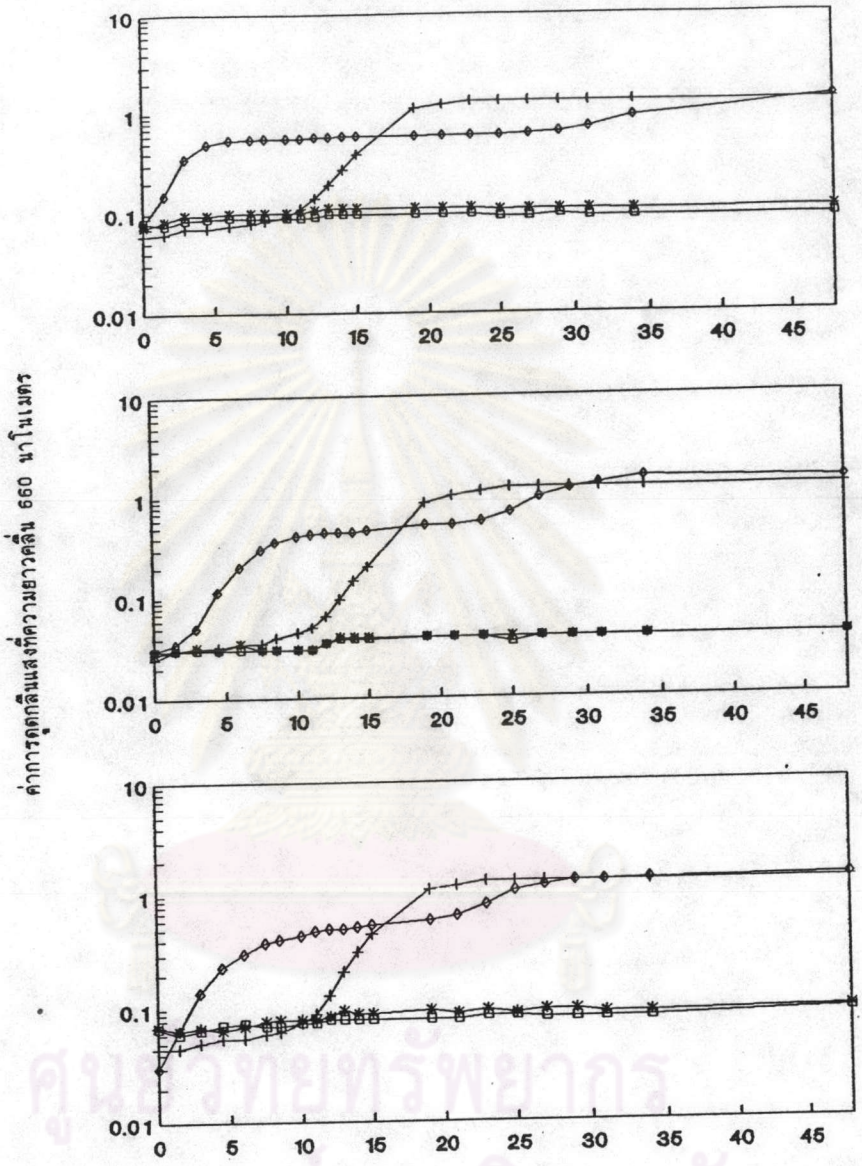


รูปที่ 3.17 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ AE ที่เลี้ยงนาน

1. 12 ชม. —+— 2. 24 ชม. —✳— 3. 36 ชม. —⊟— 4. ตัวควบคุม —◇—

ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. S. aureus ที่ 37 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



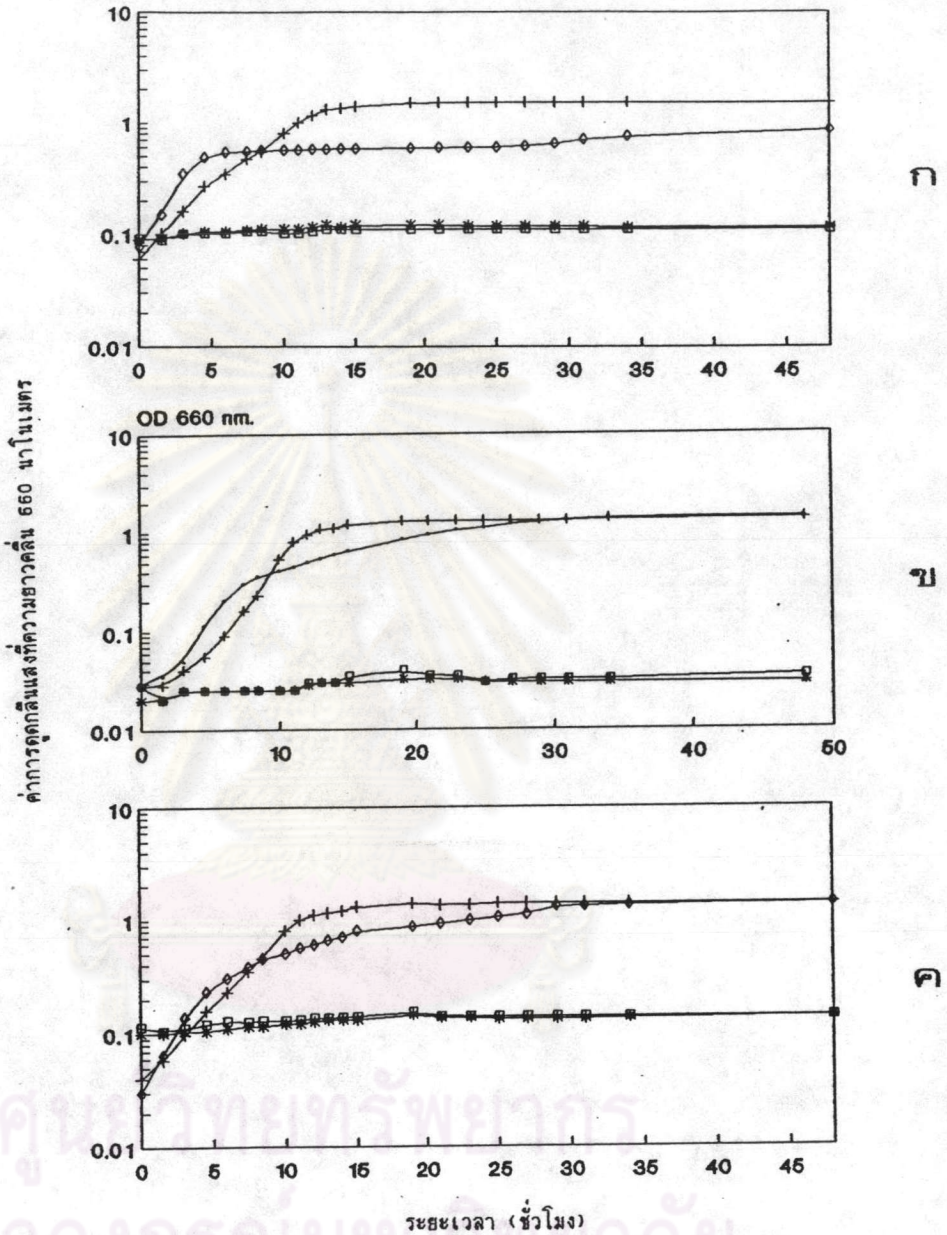
รูปที่ 3.18 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใส ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่เลี้ยงนาน

1. 12 ชม.: pH 5.91 —+— 2. 24 ชม.: pH 4.50 —*—

3. 36 ชม.: pH 3.50 —□— 4. ตัวควบคุม —◇—

ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. S. aureus ที่ 37 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



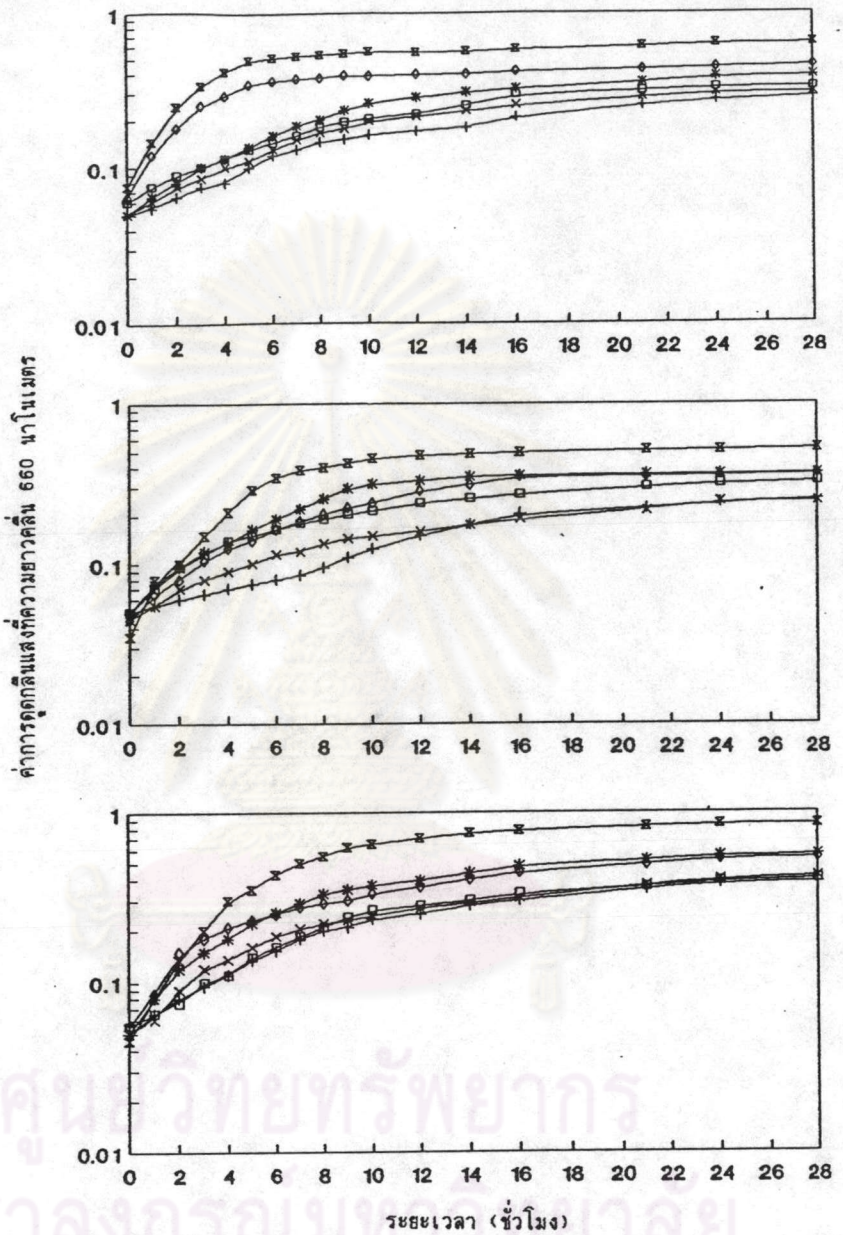
รูปที่ 3.19 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใส ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ AE ที่บ่มนาน

1. 12 ชม.: pH 6.84 —+— 2. 24 ชม.: pH 4.48 —*—

3. 36 ชม.: pH 3.45 —□— 4. ตัวควบคุม —◇—

ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. S. aureus ที่ 37 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



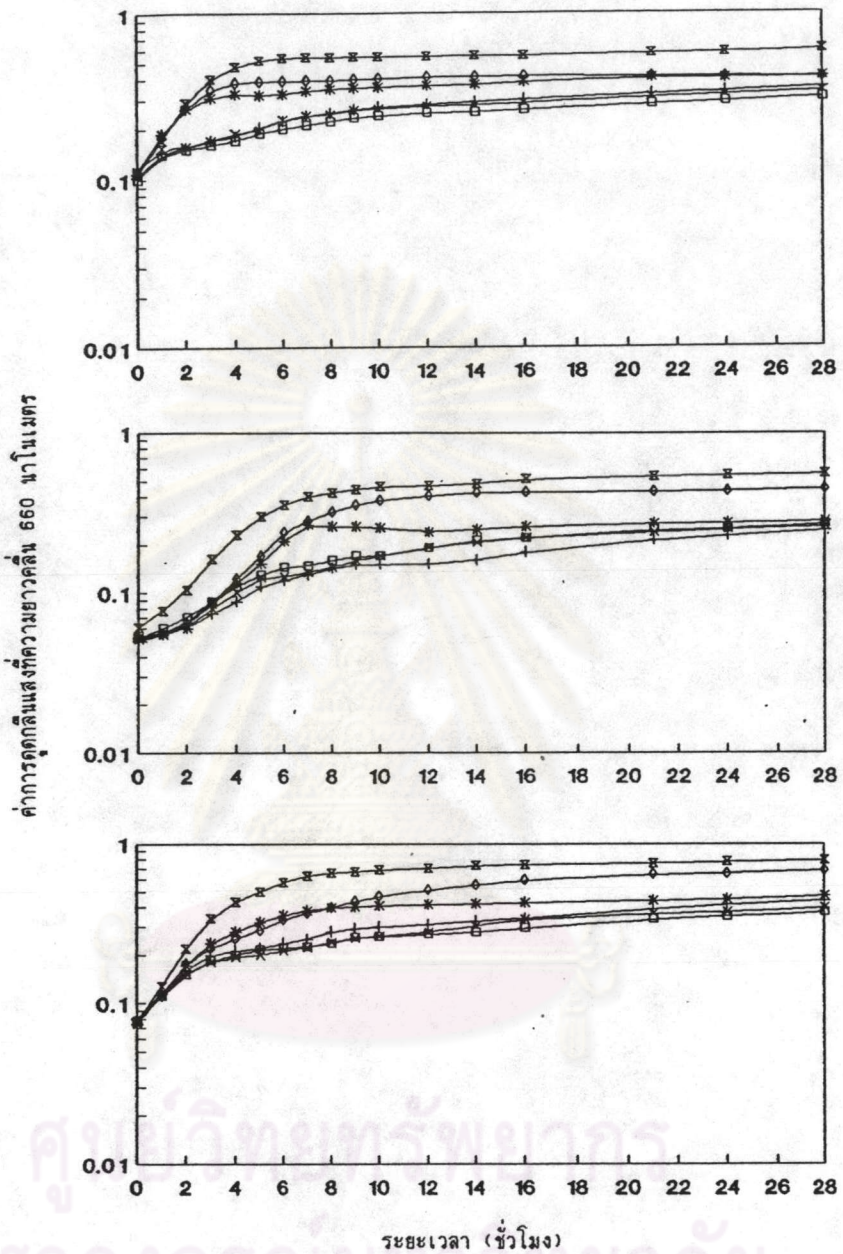
รูปที่ 3.20 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ที่ผ่านขบวนการทำไดอะไลซิสของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

1. BL —+— 2. BA —*— 3. AE —□— 4. M68 —×—

5. 1.1M —◇— 6.ตัวควบคุม —x—

ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. *S. aureus* ที่ 37 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



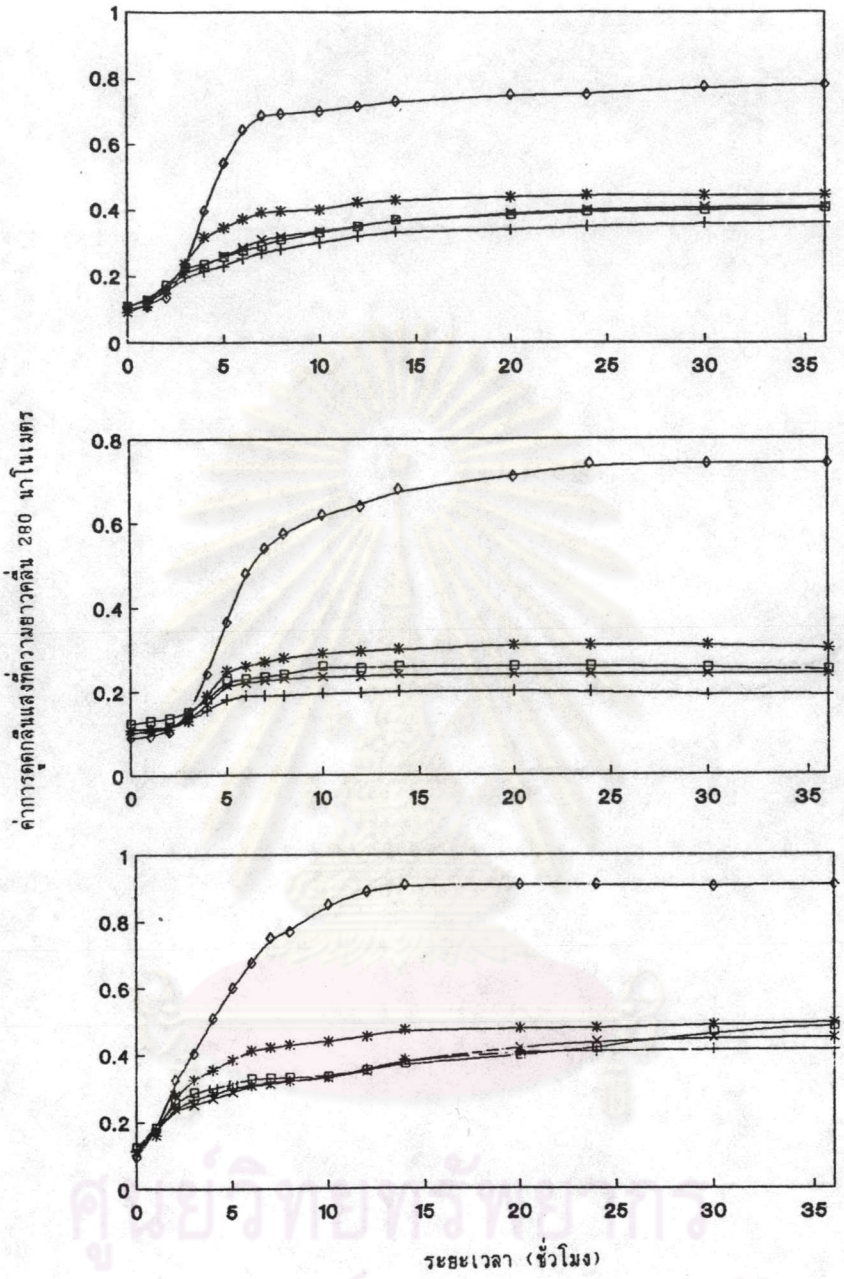
รูปที่ 3.21 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ที่ไม่ผ่านขบวนการทำไดอะไลซิสของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

1. BL —+— 2. BA —*— 3. AE —□— 4. M68 —×—

5. 1.1M —◇— 6.ตัวควบคุม —⧖—

ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. S. aureus ที่ 37 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



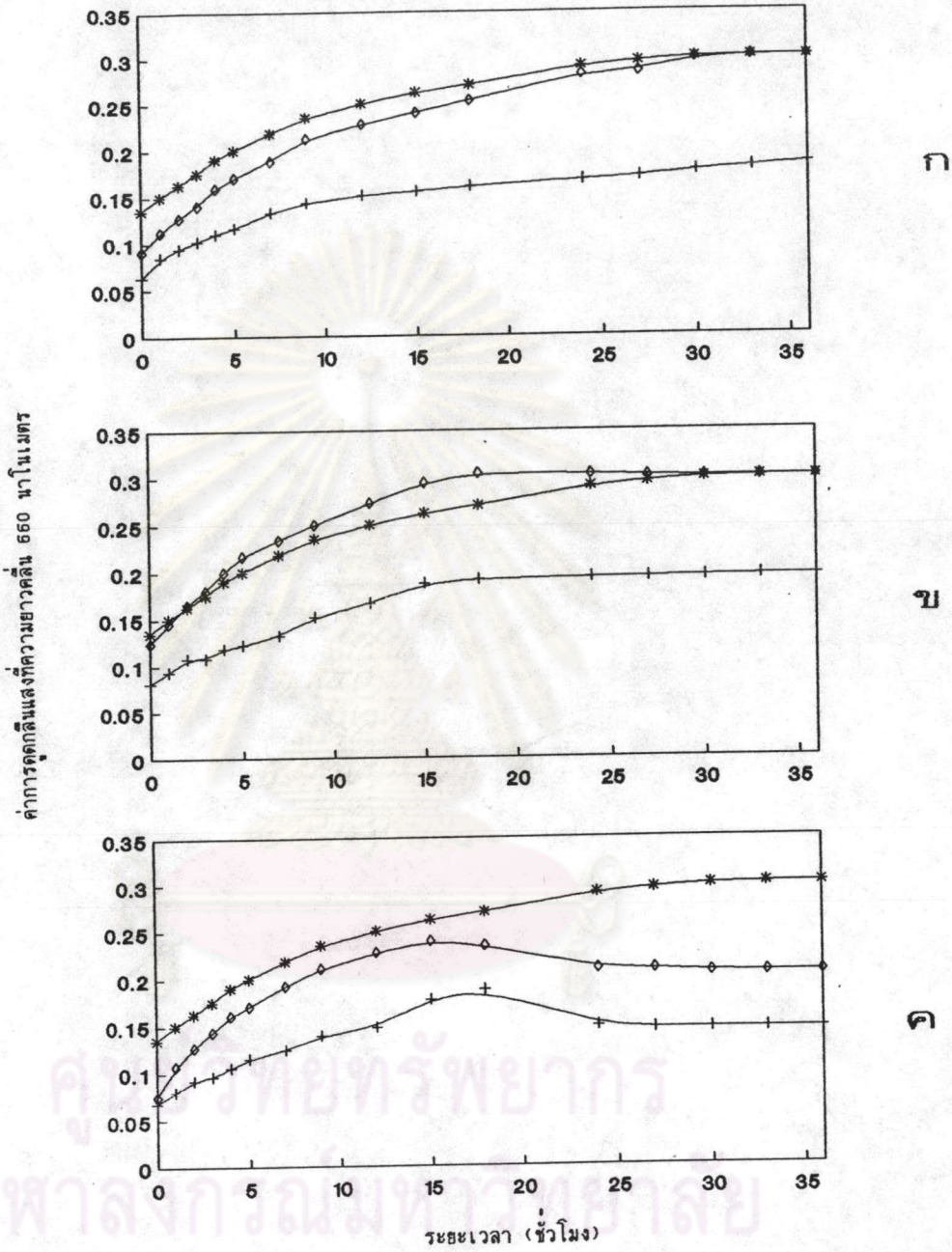
รูปที่ 3.22 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ที่ผ่านการทำแห้งในภาวะเยือกแข็งของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์

1. BL 2. BA 3. AE 4. M68

5. ตัวควบคุม

ต่อเชื้อทดสอบ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. *S. aureus* ที่ 37 °ซ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



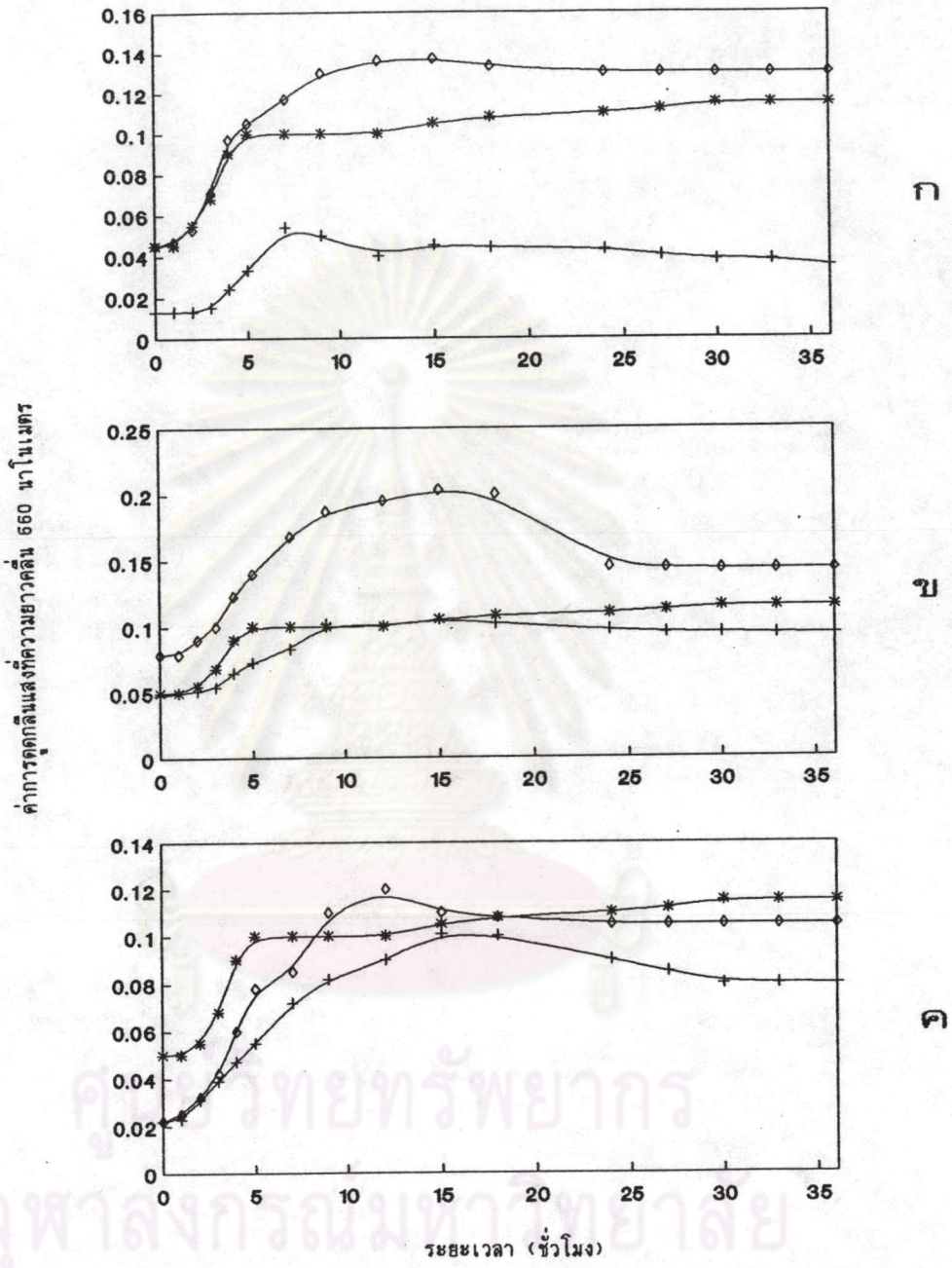
รูปที่ 3.23 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้น

ก. 0-40 % ข. 40-70 % ค. 70-90 %

: อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS —◇— , ส่วนน้ำใส BL —+—

และอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ไม่ผ่านการตกตะกอน —✱—

เมื่อใช้ *E. coli* เป็นเชื้อทดสอบ ที่ 37 °ซ



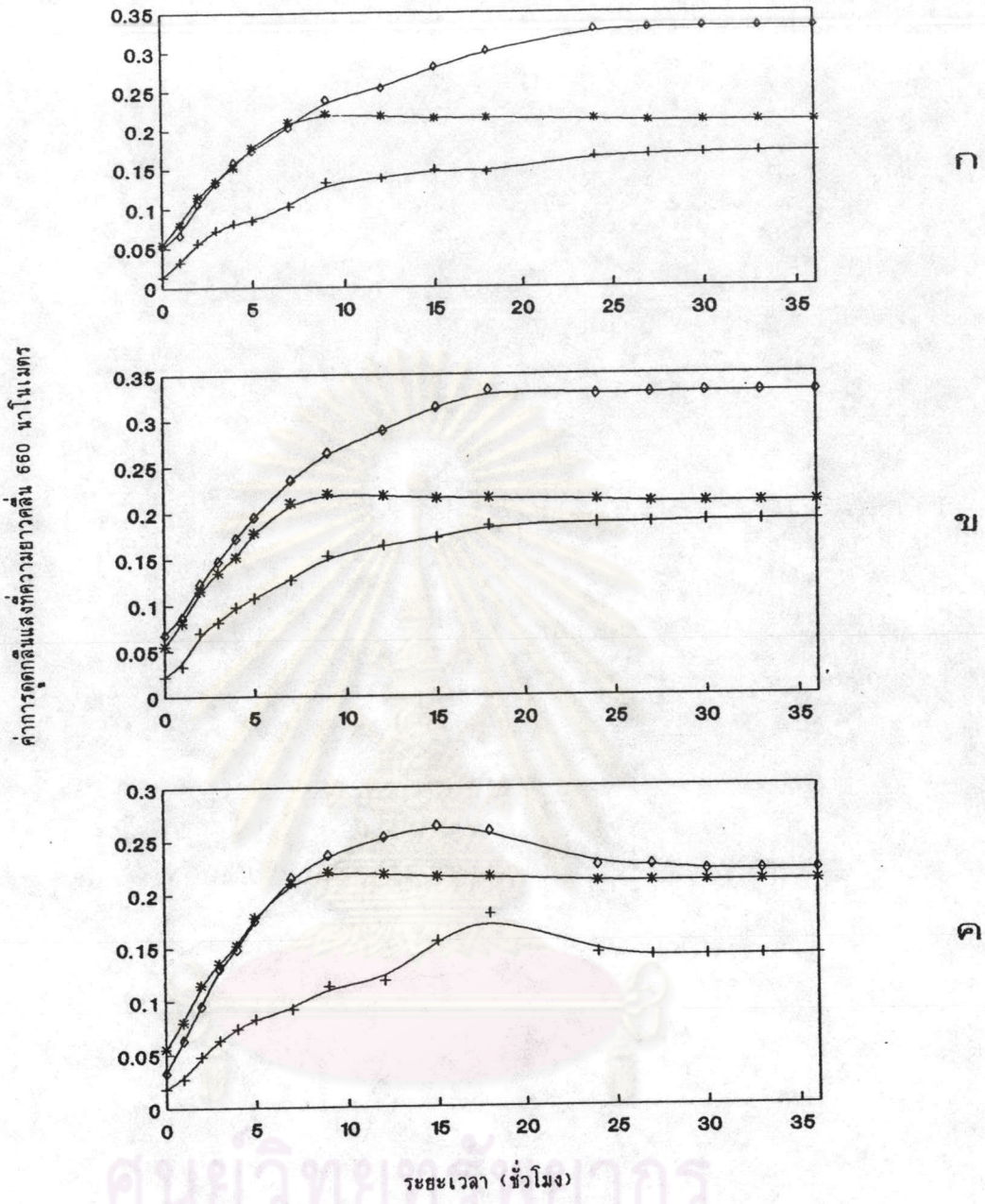
รูปที่ 3.24 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้น

ก. 0-40 % ข. 40-70 % ค. 70-90 %

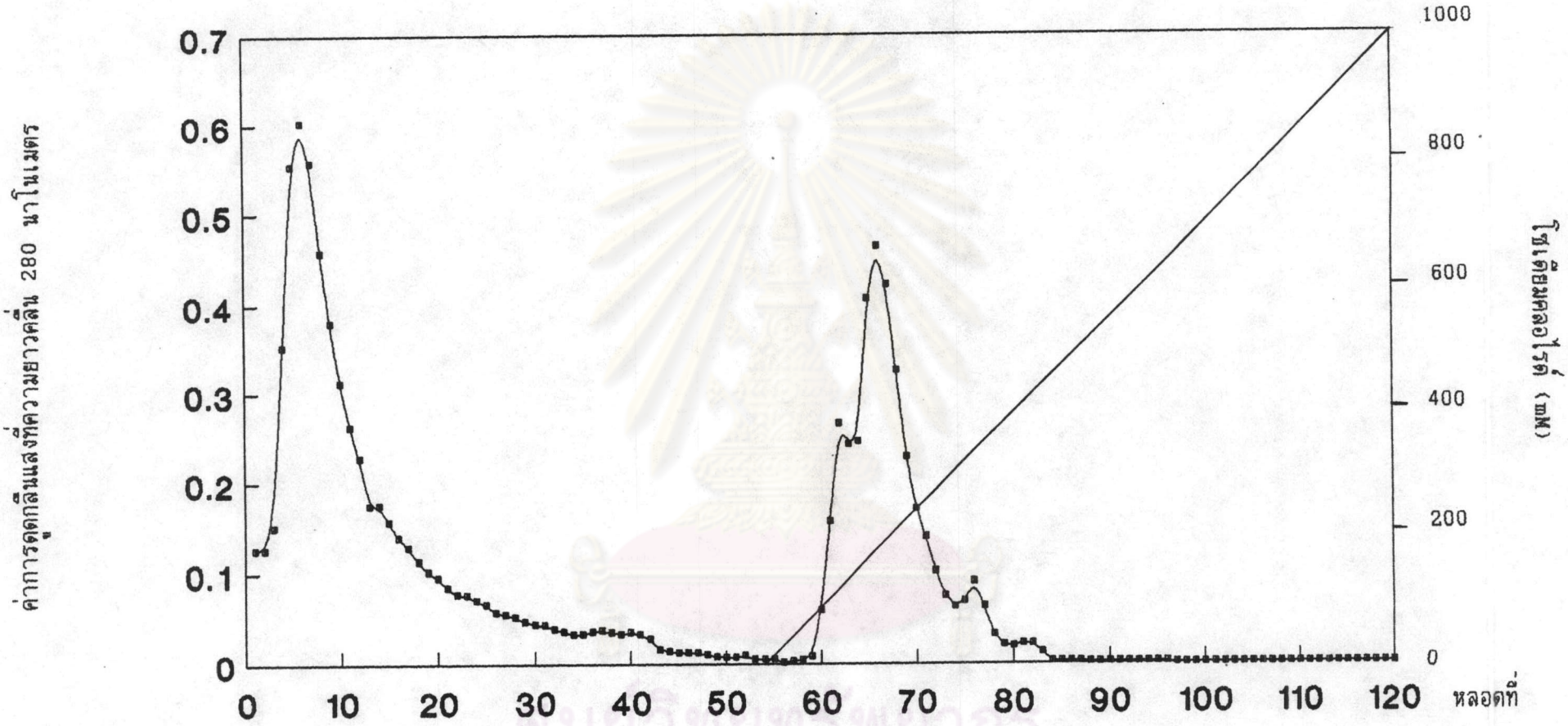
: อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS —◇— , ส่วนน้ำใส BL —+—

และอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ไม่ผ่านการตกตะกอน —*—

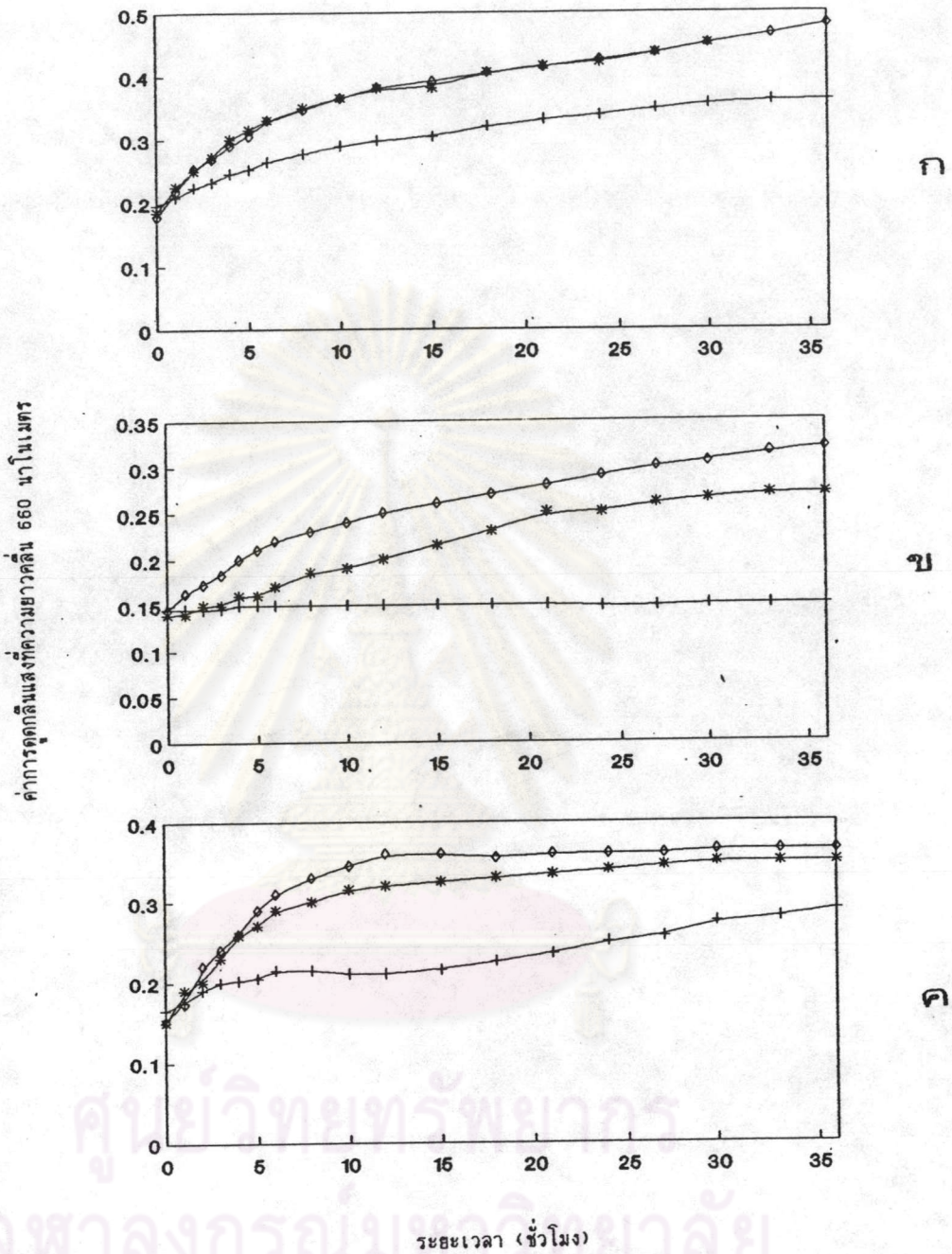
เมื่อใช้ *B. subtilis* เป็นเชื้อทดสอบ ที่ 37 °ซ



รูปที่ 3.25 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่ตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัวที่ความเข้มข้น ก. 40 % ข. 70 % ค. 90 % เมื่อใช้เชื้อทดสอบ *E. coli* : อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS —◇— : ส่วนน้ำใสของ ล.อ.ป. —+— และอาหารเลี้ยงเชื้อ NB ที่ไม่ผ่านการตกตะกอน —*— เมื่อใช้ S. aureus เป็นเชื้อทดสอบ ที่ 37 °ซ



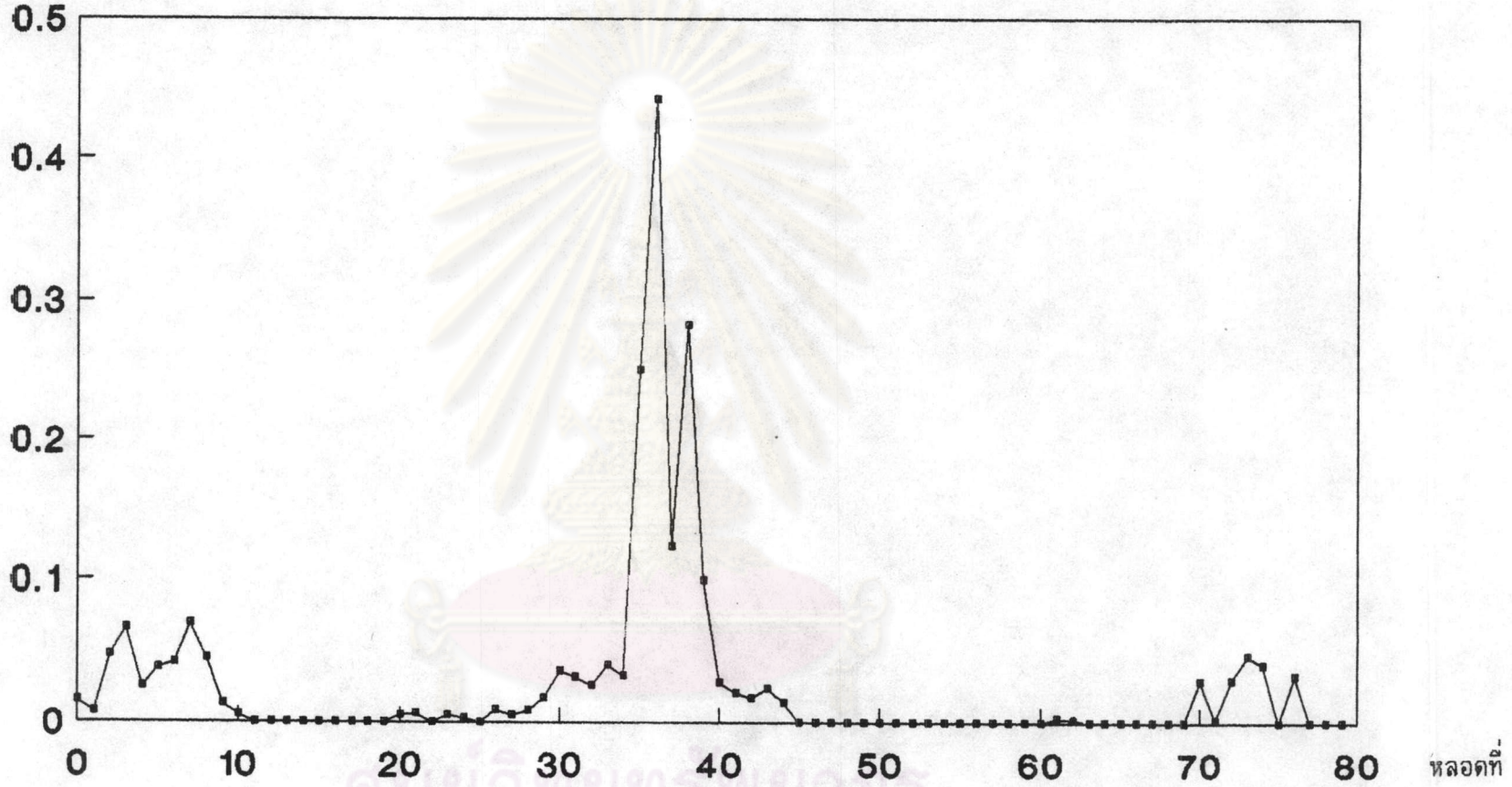
รูปที่ 3.26 แสดงการทำโครมาโตกราฟีของสารต่อต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL โดยใช้คอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 รายละเอียดการทดลองได้แสดงไว้ในหัวข้อ 2.10.3



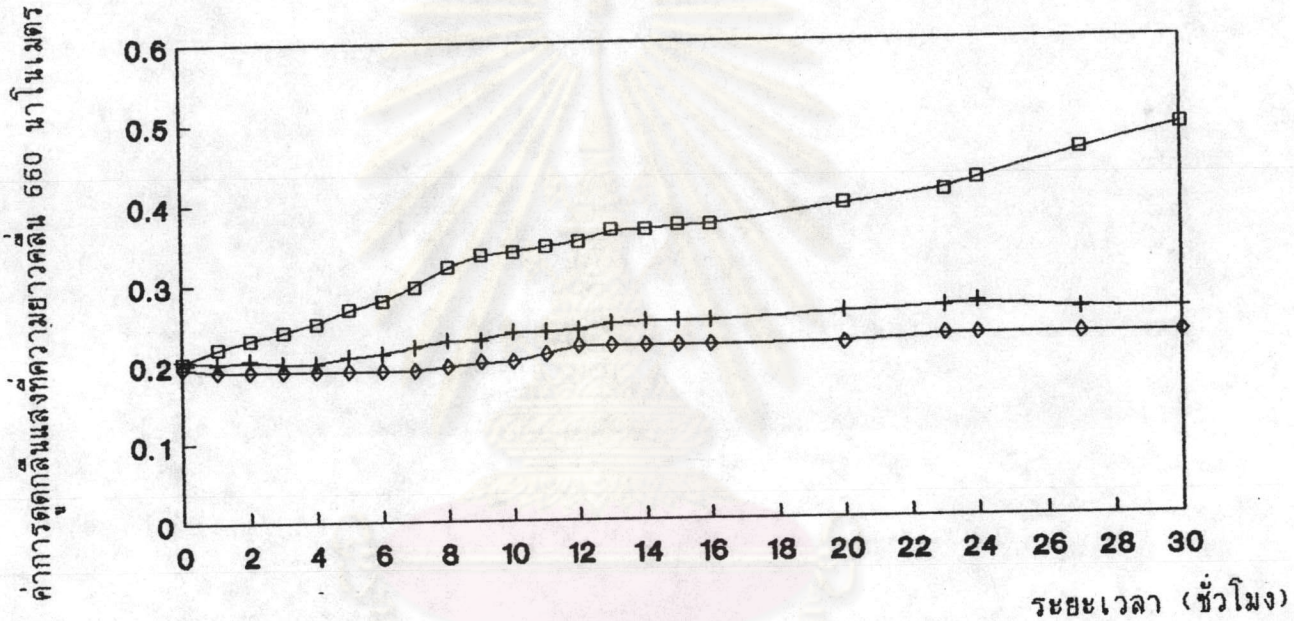
รูปที่ 3.27 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่ผ่านออกจากคอลัมน์ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50

1. ลำดับส่วนที่ 5-7 —◇— 2. ลำดับส่วนที่ 65-67 —|— 3. ตัวควบคุม —✳—

เมื่อใช้ ก. *E. coli* ข. *B. subtilis* ค. S. aureus เป็นเชื้อทดสอบ ที่ 37 °



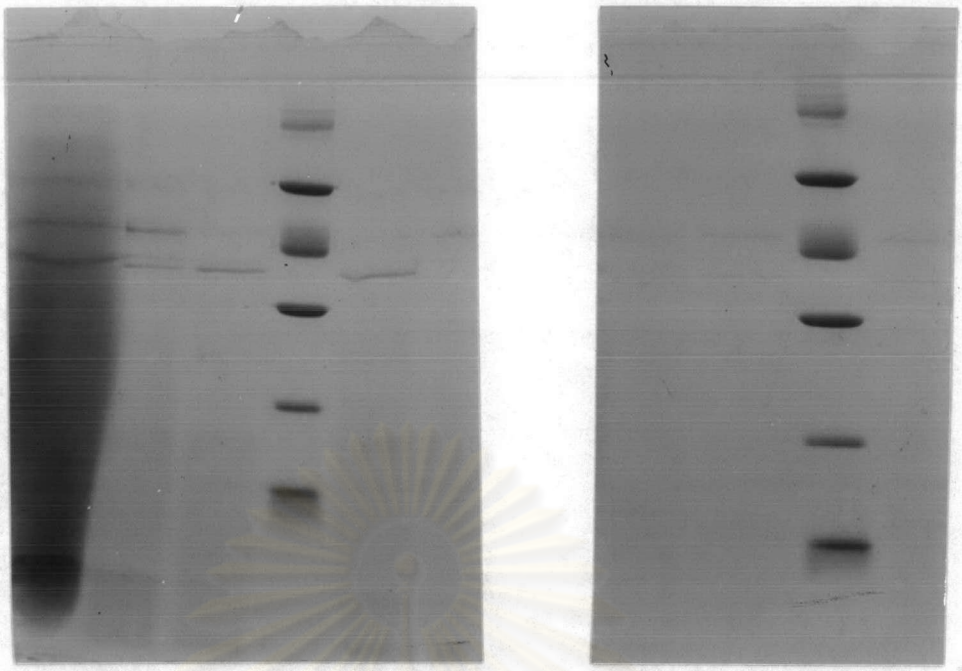
รูปที่ 3.28 แสดงการทำโครมาโตกราฟีของสารต่อต้านจุลชีพที่ผลิตโดย *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL โดยใช้คอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75 รายละเอียดการทดลองได้แสดงไว้ในหัวข้อ 2.10.4



รูปที่ 3.29 แสดงการหน่วงเหนี่ยวการเจริญของเชื้อทดสอบแบบ Tube Test ในช่วงเวลาต่างๆ ของส่วนน้ำใสที่ปรับให้มีค่าความเป็นกรดด่าง 6.5 ของ *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ที่ผ่านออกจากคอลัมน์เซฟาเดกซ์ จี-75

1. ลำดับที่ 37 —◇— 2. ลำดับที่ 39 —+— 3. ตัวควบคุม —□—

เมื่อใช้ *B. subtilis* เป็นเชื้อทดสอบ ที่ 37 °ซ



รูปที่ 3.30 โซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลคโตรโฟริซิสของสารต่อต้านจุลชีพที่ผลิตจาก *Lactobacillus* sp. สายพันธุ์ BL ในขั้นตอนต่างๆของการทำให้บริสุทธิ์ และโปรตีนมาตรฐานเมื่อเจลมีความเข้มข้น 12 %

3.30 ก. ช่องที่ 1 สารละลายตะกอนที่ได้จากการตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟตอิ่มตัว 70 % (ปริมาณโปรตีน 3,462 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 2 สารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกจากคอลัมน์ ดีอีเออี-เซฟาเดกซ์ เอ-50 (ปริมาณโปรตีน 2,250 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 3 สารต่อต้านจุลชีพที่ผ่านออกจากคอลัมน์ เซฟาเดกซ์ จี-75 (ปริมาณโปรตีน 1,080 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 4 โปรตีนมาตรฐาน (ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 5 สารต่อต้านจุลชีพที่ย่อยด้วยเอนไซม์อะไมเลส (1 มก./มล.)

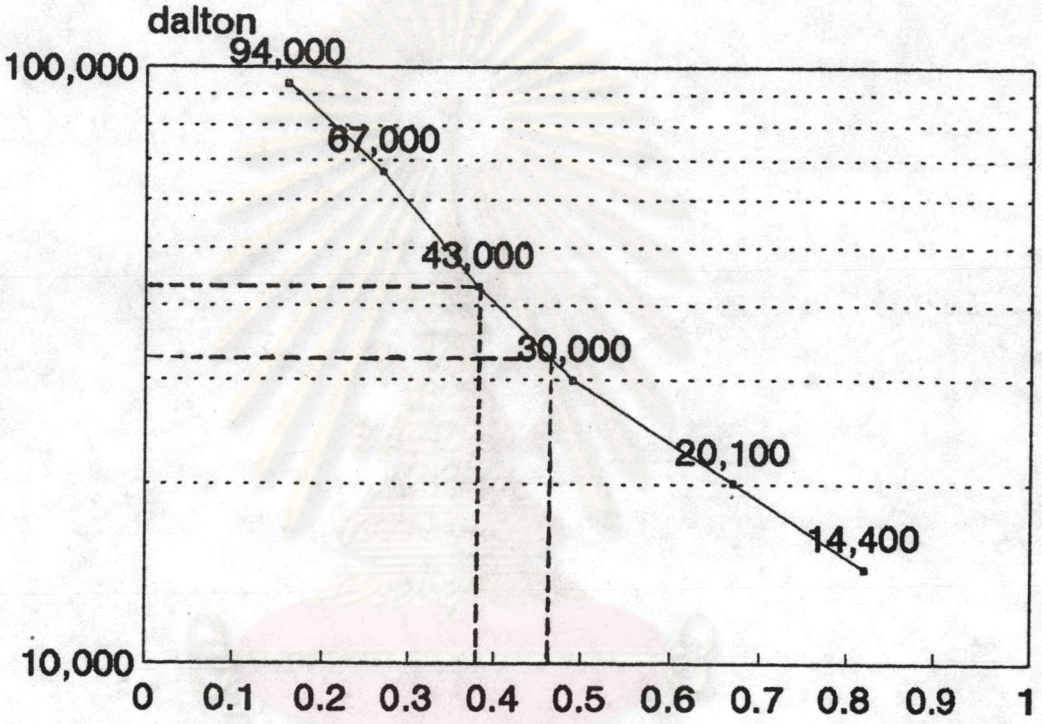
ช่องที่ 6 สารต่อต้านจุลชีพที่ย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส (1 มก./มล.)

3.30 ข. ช่องที่ 1 สารต่อต้านจุลชีพที่ย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสกับไลเปส (1 มก./มล.)

ช่องที่ 2 สารต่อต้านจุลชีพที่ย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอสกับอะไมเลส (1 มก./มล.)

ช่องที่ 3 โปรตีนมาตรฐาน (ปริมาณโปรตีน 5 ไมโครกรัม)

ช่องที่ 4 สารต่อต้านจุลชีพที่ย่อยด้วยเอนไซม์ไลเปส (1 มก./มล.)



รูปที่ 3.31 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการเคลื่อนที่ของโปรตีนมาตรฐาน และลอกการีธึม ของน้ำหนักโมเลกุล โดยการทำโซเดียมโดเดซิลซัลเฟตโพลีอะคริลาไมด์เจลอิเลกโตร โฟริซิส ตามวิธีการทดลองในข้อ 2.10.5