

ผลการทดลอง

4.1 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและการทำให้บริสุทธิ์

4.1.1 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ผลจากการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรด (acid-producing bacteria) ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.3 เปอร์เซ็นต์ โดยคัดเลือกโคโลนีที่สร้างโซนใส (clear zone) รอบโคโลนีของเชื้อ จากตัวอย่างไก่มีชีวิตละพันธุ์ ตัวอย่างมูลสัตว์ ปลาน้ำจืดละพันธุ์ อาหารหมักดองจากแหล่งต่างๆ และผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ (commercial probiotic) จำนวน 30 25 15 9 และ 1 ตัวอย่างตามลำดับ รวม 80 ตัวอย่าง

พบว่าจากตัวอย่างสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมดจำนวน 216 ไอโซเลท ในเบื้องต้นสามารถแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติก ออกได้เป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาจากการย้อมสีแกรมคือ กลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างท่อนจำนวน 121 ไอโซเลท กลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างกลมเป็นคู่และสายโซ่จำนวน 63 ไอโซเลท และกลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างกลมเรียงเป็นสี่เหลี่ยมจำนวน 32 ไอโซเลท และแยกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกของต่างประเทศจำนวน 3 ไอโซเลท แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างท่อนจำนวน 2 ไอโซเลท กลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะรูปร่างกลมเป็นคู่และสายโซ่จำนวน 1 ไอโซเลท

4.1.2 การทำให้เชื้อบริสุทธิ์

นำเชื้อคัดเลือกที่ได้มาตรวจสอบลักษณะรูปร่าง ขนาด และ การจัดเรียงตัวของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การย้อมติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์แคตาเลส รวมทั้งถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS โดยการเลี้ยงเชื้อด้วย enrichment media แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบ หรือเก็บเชื้อในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และแบ่งเก็บเชื้อโดยการทำให้โอฟิลไลส์ (สมบุญ, 2544) เพื่อเก็บเชื้อไว้ศึกษาหรือทดสอบในขั้นต่อไป

4.2 ทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก

4.2.1 การศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ (antibiotic susceptibility)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 50 ไอโซเลท จาก 216 ไอโซเลทที่ได้จากการเลือกตัวอย่างโดยอาศัยความน่าจะเป็น ด้วยวิธีเลือกตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling) และจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกทั้งหมด 3 ไอโซเลท นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 53 ไอโซเลท ดังตารางที่ 5 มาทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะด้วยวิธี disc diffusion test ตรวจสอบผลความไวต่อยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ โดยสังเกตบริเวณใสรอบ antibiotic disc ขอบเขตการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย แบ่งได้ 3 ลักษณะ คือ Resistant (R), Intermediate (I) และ Susceptible (S) ในการศึกษาได้ใช้ยาปฏิชีวนะ (antibiotic disc) จำนวน 12 ชนิด (Oxoid) ตารางการแปลผลสำหรับการทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยวิธี disc diffusion แสดงดังตารางที่ 17 (ภาคผนวก ข)

ผลการทดสอบพบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม penicillins (amoxycycline/clavulanic acid และ ampicillin), กลุ่ม polypeptide (เฉพาะ bacitracin), tetracycline (doxycycline และ tetracycline), lincosamides (clindamycin), macrolides (erythromycin) และต้านทานต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม cephalosporins (aztreonam), aminoglycosides (streptomycin), polypeptide (เฉพาะ colistin), quinolones (nalidixic acid) และยาต้านจุลชีพอื่นๆ (vancomycin) ยกเว้นไอโซเลท C70-2 และ Fr-C ที่ให้ผลไวต่อยา vancomycin คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ผลต้านทานต่อยาปฏิชีวนะได้สูงสุดจำนวน 15 ไอโซเลท และจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก 3 ไอโซเลท วัตถุประสงค์ในการศึกษาในขั้นตอนต่อไป รูปแบบความต้านทานและความไวต่อยาปฏิชีวนะ 12 ชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 18 ไอโซเลทแสดงดังตารางที่ 6 ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าวไม่เป็นความต้านทานที่ผิดปกติ โดยได้มีการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของ Charteris และคณะ (1998) ได้รายงานว่ แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 46 สายพันธุ์ ส่วนใหญ่ต้านทานต่อ vancomycin, kanamycin, norfloxacin และ ciprofloxacin เช่นเดียวกับ สุพรรณิการ์ (2548) ที่พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก 10 สายพันธุ์ ต้านทานต่อยาปฏิชีวนะดังกล่าว ทำนองเดียวกับ Cebeii และ Gurakan (2003) ที่พบว่า *Lactobacillus* จำนวน 14 สายพันธุ์ โดยเกือบทุกสายพันธุ์ต้านทานต่อ vancomycin ยกเว้น *L. plantarum* C1 และ C3 และ *L. plantarum* บางสายพันธุ์ต้านทานต่อ polymycin B นอกจากนี้ Temmerman และคณะ (2003) ยังรายงานว่แบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 187 สายพันธุ์ ต้านทานต่อ kanamycin 79 เปอร์เซ็นต์ และ vancomycin 65 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น ความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะนี้ ได้รับการยืนยันว่เป็นความต้านทานที่พบโดยทั่วไป ไม่เป็นความ

ด้านทานที่ผิดปกติ แต่การต้านทานส่วนใหญ่ของ *Lactobacillus* ไม่ใช่ลักษณะที่ถ่ายทอดได้ เนื่องจากยีนที่ควบคุมยาปฏิชีวนะอยู่บนโครโมโซม (Curragh and Collins, 1992) นอกจากนี้ พลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการดื้อยาก็พบได้ยากใน *Lactobacillus* ดังนั้น *Lactobacillus* จึงเป็นสายพันธุ์ที่ปลอดภัย โดยไม่มีการถ่ายทอดความต้านทานสารปฏิชีวนะและเคมีบำบัด (Saarela et al., 2000) ด้วยเหตุนี้ ความต้านทานยาปฏิชีวนะและเคมีบำบัดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้นี้ เป็นความต้านทานที่พบโดยทั่วไป ไม่เป็นความต้านทานที่ผิดปกติ จึงปลอดภัยต่อการนำไปใช้เป็นโปรไบโอติก

ตารางที่ 5 ชนิดตัวอย่าง รหัสชื่อ และจำนวนไอโซเลท

| ชนิดตัวอย่าง | รหัส | จำนวนไอโซเลท |
|---------------------|--|--------------|
| ไก่ | C1-1, C2-2, C3-1, C6-1, C9-1, C10-2, C13-1, C13-4, C18-1, C22-1, C25-2, C32-1, C34-3, C35-1, C35-2, C40-1, C43-1, C47-2, C52-1, C53-2, C56-1, C62-1, C70-2, C72-1, C76-1, C79-2, C80-2, C81-1, C82-1, C87-1, C90-2 | 31 |
| ปลา | F9-2, F12-2, F14-3, F23-1, F26-1 | 5 |
| มุลส์ตว์ | | |
| - ไก่ | Fe1-2, Fe8-1, Fe12-1, Fe12-2, Fe18-2, Fe21-1, Fe22-3 | 7 |
| - หมูป่า | Fe3-3 | 1 |
| - โค | Fe4-3 | 1 |
| อาหารหมักดอง | | |
| - แหนม | N2-1, N3-1, N3-2 | 3 |
| - ปลาซ้่ม | PS21-2, PS22-2 | 2 |
| ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก | Fr-A, Fr-B, Fr-C | 3 |
| | รวม | 53 |

ตารางที่ 6 ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก

| ตัวอย่าง (Isolates) | ยาปฏิชีวนะ (Antibiotic Disc) | | | | | | | | | | | |
|------------------------|------------------------------------|------------|-----------|------------|--------------|----------|------------------------------|--------------|-------------|--------------|-------------------|------------|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| | Amoxycillin/ Clavulanic acid | Ampicillin | Aztreonam | Bacitracin | Streptomycin | Colistin | Doxycycline Hydrochloride | Tetracycline | Clindamycin | Erythromycin | Nalidixic acid | Vancomycin |
| 1 C6-1 | S | S | R | I | R | R | I | R | R | R | R | R |
| 2 C10-2 | S | S | R | I | R | R | I | R | R | S | R | R |
| 3 C13-1 | S | S | R | S | R | R | I | R | R | R | R | R |
| 4 C35-2 | S | S | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R |
| 5 C43-1 | S | S | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R |
| 6 C47-2 | S | S | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R |
| 7 C70-2 | S | S | R | R | R | R | S | R | R | R | R | S |
| 8 C72-1 | S | S | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R |
| 9 C76-1 | S | S | R | I | R | R | R | R | R | R | R | R |
| 10 C80-2 | S | S | R | S | R | R | R | R | R | S | R | R |
| 11 C82-1 | S | S | R | R | R | R | I | R | R | S | R | R |
| 12 F23-1 | S | S | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R |
| 13 Fe12-1 | S | S | R | S | R | R | I | R | R | I | R | R |
| 14 Fe21-1 | S | S | R | S | R | R | S | R | R | R | R | R |
| 15 PS22-2 | S | S | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R |
| 16 Fr-A | S | S | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R |
| 17 Fr-B | S | S | R | S | R | R | S | R | R | S | R | R |
| 18 Fr-C | S | S | R | S | R | R | S | R | R | R | R | S |

R (Resistant), I (Intermediate), S (Susceptible)

4.2.2 การทนกรด

การศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้นำแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้งหมด 18 ไอโซเลท มาทดสอบคุณสมบัติการทนกรดในสภาวะ pH 2.5 ผลการทดสอบพบว่า แต่ละไอโซเลททนต่อกรดได้ต่างกัน โดยไอโซเลท C43-1, C72-1, F23-1 C70-2, C76-1, C80-2, Fr-A, Fr-B และ Fr-C มีอัตราการรอดชีวิต 97.1, 97.0, 99.0, 80.5, 83.0, 97.0, 96.1, 95.7 และ 71.9 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบอัตราการอยู่รอดของเชื้อทดสอบในสภาวะกรด pH 2.5

| Isolates | Incubation time (h) | | Survival rate (%) |
|----------|---------------------|----------|-------------------|
| | 0 | 3 | |
| 1. C43-1 | 7.74E+06 | 4.88E+06 | 97.1 |
| 2. C72-1 | 7.60E+06 | 4.76E+06 | 97.0 |
| 3. F23-1 | 7.98E+06 | 6.86E+06 | 99.0 |
| 4. C70-2 | 1.03E+06 | 6.40E+05 | 80.5 |
| 5. C76-1 | 9.20E+05 | 8.90E+05 | 83.0 |
| 6. C80-2 | 3.87E+06 | 1.44E+06 | 97.0 |
| 7. Fr-A | 9.84E+06 | 7.84E+06 | 96.1 |
| 8. Fr-B | 8.74E+06 | 6.12E+06 | 95.7 |
| 9. Fr-C | 4.32E+06 | 7.92E+04 | 71.9 |

4.2.3 การทนน้ำดี

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผ่านการตรวจสอบคุณสมบัติการทนกรด จำนวน 9 ไอโซเลท มาศึกษาการเจริญเติบโตในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น ซึ่ง Gilliland, 1984 ได้ประกาศใช้ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ 0.3 เปอร์เซ็นต์ อย่างเป็นทางการในการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเพื่อให้เป็นมาตรฐานเดียวกัน (Erkkila and Petaja, 2000)

ผลการทดสอบพบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลทสามารถเจริญเติบโตได้ดีในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 1 และ 4 เปอร์เซ็นต์ (Gilliland, 1984) พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทุกไอโซเลท สามารถเจริญได้ดีในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำดีทั้งสามความเข้มข้น แสดงผลการทดสอบดังตารางที่ 8 และแสดงค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ดังตารางที่ 18 (ภาคผนวก ข)

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบคุณสมบัติการทนน้ำดีที่ความเข้มข้น 0.3, 1 และ 4 เปอร์เซ็นต์

| ตัวอย่าง | ความเข้มข้นของน้ำดี (%) | | |
|----------|-------------------------|---|---|
| | 0.3 | 1 | 4 |
| 1. C43-1 | + | + | + |
| 2. C72-1 | + | + | + |
| 3. F23-1 | + | + | + |
| 4. C70-2 | + | + | + |
| 5. C76-1 | + | + | + |
| 6. C80-2 | + | + | + |
| 7. Fr-A | + | + | + |
| 8. Fr-B | + | + | + |
| 9. Fr-C | + | + | + |

หมายเหตุ + หมายถึง แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้

การทดสอบคุณสมบัติการทนต่อกรดและการทนต่อน้ำดีนั้น อาจมีทั้งการทดสอบแยกกันหรือทดสอบร่วมกัน ในการทดสอบของ Huang และ Adam (2004) ได้คัดเลือกโปรไบโอติกจากการศึกษาการรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติกในของเหลวจำลองสภาวะกระเพาะอาหารที่มี pH เป็นกรด (pH 2, 3 และ 4) ร่วมกับเอนไซม์เพปซิน และการรอดชีวิตในของเหลวจำลองสภาวะลำไส้เล็กที่มี pH เป็นด่างร่วมกับเอนไซม์แพนครีเอติน และเกลือน้ำดี พบว่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีความแปรปรวนในการทนต่อกรดต่างกัน แต่มีชีวิตรอดได้ดีในเกลือน้ำดี เช่นเดียวกับ Chou และ Weimer (1999) ได้คัดเลือกสายพันธุ์ *L. acidophilus* ที่ทนต่อกรดและเกลือน้ำดี โดยทดสอบกรดและเกลือน้ำดีแยกกัน ส่วนการศึกษาของ Cebei และ Gurakan (2003) ได้ศึกษาการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่ทนกรดได้ในอาหาร acidified MRS ที่ pH 3.5 นาน 90 นาที แล้วนำสายพันธุ์ที่ทนกรดนี้มาทดสอบความทนต่อกรดที่ pH 4 และมีเกลือน้ำดี 0.3 เปอร์เซ็นต์ พบว่าแต่ละสายพันธุ์ทนต่อกรดได้ต่างกัน แต่ไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีทั้งกรดและเกลือน้ำดีร่วมกัน

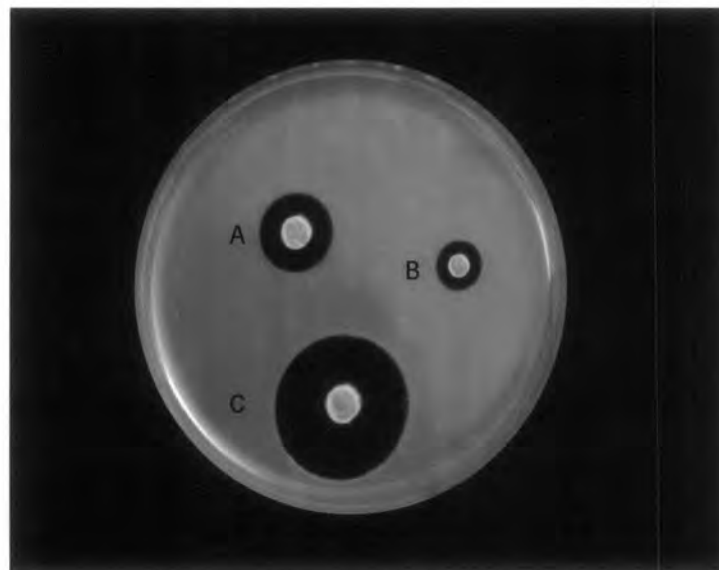
4.2.4 การผลิตสารต่อต้านจุลชีพ

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบโดยวิธี Agar spot และการทดสอบโดยวิธี Agar well diffusion

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ มาทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 14 สายพันธุ์ โดยวิธี agar spot (ภาพที่ 3) บนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MMRS พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในกลุ่มก่อโรคได้หมด (*Ls. monocytogenes* DMST 17303, *Ls. innocua* DMST 9011, *Y. enterocolitica* ATCC 27799, *S. Typhimurium* ATCC 13311, *S. Cholerasuis* ATCC 10708, *E. coli* ATCC 25922, *B. cereus* ATCC 11778 และ *Ps. aeruginosa* ATCC 27853) แต่ไม่สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติก (*L. plantarum* NRIC 1067, *L. sakei* ATCC 15521, *L. lactis* subsp. *lactis* ATCC 19435, *Lc. mesenteroides* NRIC 1541, *E. faecium* NRIC 1145 และ *E. faecalis* NRIC 1142) ยกเว้นไอโซเลท C70-2 และ Fr-C สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้หมดทั้ง 14 สายพันธุ์ ผลขอบเขตของการยับยั้ง (Inhibition zone) แสดงดังตารางที่ 9 และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดมาทดสอบยืนยันการสร้างสารยับยั้ง bacteriocin ด้วยอาหารเหลว MMRS โดยวิธี agar well diffusion จากสารละลายใส หรือน้ำเลี้ยงเชื้อที่แยกแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกไม่ปรับ pH เพื่อศึกษาผลการยับยั้งทั่วไป พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดไม่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้หมดทั้ง 14 สายพันธุ์ ยกเว้นไอโซเลท C70-2 และ Fr-C สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ *Listeria innocua* DMST 9011 (ภาพที่ 4) และส่วนที่สองปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย 1 N NaOH เพื่อศึกษาการสร้าง bacteriocin พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดไม่สามารถสร้าง bacteriocin ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบทั้งหมดได้

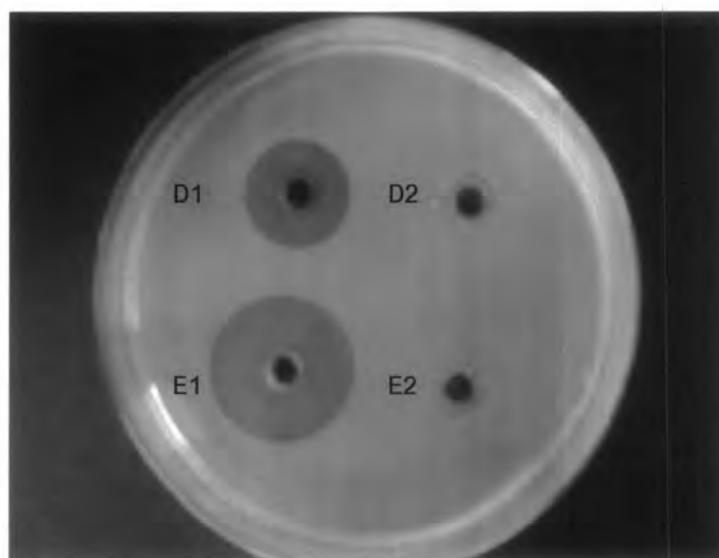
จากผลการศึกษาการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทดสอบในกลุ่มก่อโรค น่าจะมีผลมาจากกรดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น เนื่องจากน้ำเลี้ยงเชื้อส่วนที่สอง ปรับ pH ให้เป็นกลาง ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบได้ ซึ่งต่างจาก พงษ์เทพ (2546) ที่ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิต bacteriocin จากปลาร้า พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 11 สายพันธุ์จาก 281 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *B. cereus* JCM 2152, *E. faecalis* ATCC 19433 และ *Ls. innocua* LTH 3096 ได้



ภาพที่ 3 การเกิดบริเวณใสในการยับยั้งการเจริญแบคทีเรียทดสอบ

Listeria innocua DMST 9011 ของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธี agar spot

A ไอโซเลท C72-1 B ไอโซเลท C43-1 C ไอโซเลท Fr-C



ภาพที่ 4 ลักษณะการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสาร

ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ *Listeria innocua* DMST 9011

ด้วยวิธี agar well diffusion

หลุม D1 น้ำเลี้ยงเชื้อ C70-2 ที่ไม่ได้ปรับ pH

หลุม D2 น้ำเลี้ยงเชื้อ C70-2 ที่ปรับ pH

หลุม E1 น้ำเลี้ยงเชื้อ Fr-C ที่ไม่ได้ปรับ pH

หลุม E2 น้ำเลี้ยงเชื้อ Fr-C ที่ปรับ pH

ตารางที่ 9 ขอบเขตของการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียกรดแลคติก (Inhibition zone) ด้วยวิธี agar spot

| Isolates | Inhibition zone (mm) | | | | | | | | | | | | | |
|----------|------------------------------|------------------------------------|------------------------------------|---------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------------|---------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|---|
| | <i>E. coli</i> ATCC 25922 | <i>S.Typhimurium</i> ATCC 13311 | <i>S.Cholerasuis</i> ATCC 10708 | <i>Y.enterocolitica</i> ATCC 27799 | <i>L.innocua</i> DMST 9011 | <i>L.monocytogenes</i> DMST 17303 | <i>B.cereus</i> ATCC 11778 | <i>P.aeruginosa</i> ATCC 27853 | <i>L.mesenteroides</i> NRIC 1541 | <i>L.sakei</i> ATCC 15521 | <i>L.plantarum</i> NRIC 1067 | <i>E.faecium</i> NRIC 1145 | <i>E.faecalis</i> NRIC 1142 | <i>L.lactis</i> subsp. <i>lactis</i> ATCC19435 |
| 1. C43-1 | 0.7 | 15 | 16 | 14 | 0.8 | 10 | 11 | 22 | - | - | - | - | - | - |
| 2. C72-1 | 21 | 14 | 16 | 22 | 16 | 11 | 16 | 42 | - | - | - | - | - | - |
| 3. F23-1 | 20 | 17 | 22 | 27 | 18 | 10 | 20 | 41 | - | - | - | - | - | - |
| 4. C70-2 | 16 | 19 | 24 | 26 | 20 | 14 | 12 | 50 | 11 | 21 | 15 | 17 | 24 | 14 |
| 5. C76-1 | 20 | 17 | 20 | 24 | 10 | 10 | 13 | 44 | - | - | - | - | - | - |
| 6. C80-2 | 24 | 19 | 22 | 25 | 15 | 11 | 14 | 34 | - | - | - | - | - | - |
| 7. Fr-A | 18 | 15 | 18 | 26 | 12 | 12 | 15 | 30 | - | - | - | - | - | - |
| 8. Fr-B | 22 | 21 | 20 | 30 | 14 | 12 | 19 | 62 | - | - | - | - | - | - |
| 9. Fr-C | 26 | 19 | 15 | 23 | 22 | 15 | 14 | 32 | 10 | 26 | 15 | 14 | 22 | 14 |

- ; No inhibition zone

4.3 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกคัดเลือกที่แยกได้มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ (Hammes et al., 1992; Axelsson, 2004)

4.3.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี (Tanasupawat et al., 1998)

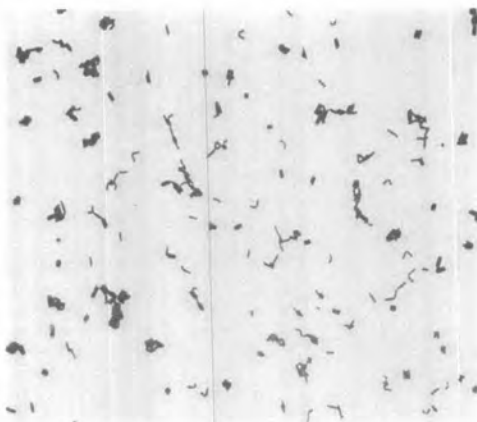
นำแบคทีเรียกรดแลคติกคัดเลือกที่ได้จากตัวอย่าง 6 ไอโซเลท (C43-1, C72-1, F23-1, C70-2, C76-1 และ C80-2) และจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก 3 ไอโซเลท (Fr-A, Fr-B และ Fr-C) มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 9 ไอโซเลท มีคุณสมบัติเหมือนกันคือ ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส และออกซิเดส ไม่สามารถผลิตก๊าซ ไม่มีดิวิชันในเดรท โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่าง 6 ไอโซเลท จำแนกกลุ่มตามรูปร่างเป็นรูปร่างแท่ง จำนวน 3 ไอโซเลท (C43-1, C72-1 และ F23-1) ทรงกลมเรียงตัวเป็นสายโซ่ จำนวน 2 ไอโซเลท (C70-2 และ C76-1) และทรงกลมเรียงเป็นสี่เหลี่ยม 1 ไอโซเลท (C80-2) แสดงดังภาพที่ 5 และจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจำแนกเป็นรูปร่างแท่ง จำนวน 2 ไอโซเลท (Fr-A และ Fr-B) และทรงกลมเรียงตัวเป็นสายโซ่ 1 ไอโซเลท (Fr-C) แสดงดังภาพที่ 6

แบคทีเรียกรดแลคติกรูปร่างแท่ง ไอโซเลท C72-1, F23-1 และ Fr-B มีลักษณะสำคัญคือ ไม่สามารถผลิตก๊าซ (homofermentative) เจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 4 ถึง 6 % สามารถเจริญได้ที่ 15 และ 45 องศาเซลเซียส (ตารางที่ 10) ผลิตกรดแลคติกชนิด DL เหมือนกับ *L. pentosus* และ *L. plantarum* (Tanasupawat et al., 1992a) จากคุณสมบัติเหล่านี้สามารถจัดทั้ง 3 สายพันธุ์ไว้ในสกุล *Lactobacillus* (Axelsson, 1993) นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติทางฟิโนไทป์ใกล้เคียงกับ *L. plantarum* NRIC 1067^T และ *L. pentosus* NRIC 1069^T คือมี meso-DAP อยู่ในผนังเซลล์ ซึ่งพบว่ามีอยู่ในเชื้อ *L. pentosus* และ *L. plantarum* (Tanasupawat et al., 1992a; 1995) และสามารถสร้างกรดจาก glycerol และ D-xylose (Tanasupawat et al., 1992a; Kandler and Weiss, 1986) (ตารางที่ 11) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Hammes และคณะ (1992) แบคทีเรียกรดแลคติกรูปร่างกลม ไอโซเลท C70-2, C76-1 และ Fr-C มีลักษณะที่สำคัญคือ ไม่สามารถผลิตก๊าซ (homofermentative) เจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือ 4 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ที่ 15 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญในอาหารเหลว MRS ที่ pH 3.5 ถึง 9.6 และไม่มี meso-DAP อยู่ในผนังเซลล์ ซึ่งมักจะไม่มีพบในแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างกลม (Collins et al., 1993) จากคุณสมบัติเหล่านี้สามารถจัดทั้ง 3 สายพันธุ์ไว้ในสกุล *Enterococcus* (Axelsson, 2004; Tanasupawat et al., 1992b) นอกจากนี้ C70-2 และ Fr-C ยังมีคุณสมบัติทางฟิโนไทป์ใกล้เคียงกับ *E. faecium* NRIC 1145^T มากกว่า *E. faecalis* NRIC 1142^T คือสามารถสร้างกรดจาก L-arabinose แต่ไม่สร้างกรดจาก D-melezitose และ D-sorbitol (Tanasupawat et al., 1992b) (ตารางที่ 11)

ก)



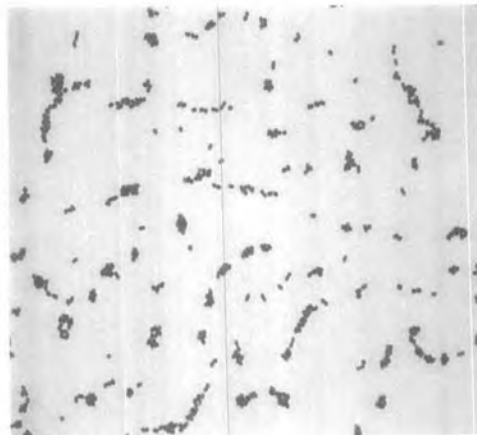
ข)



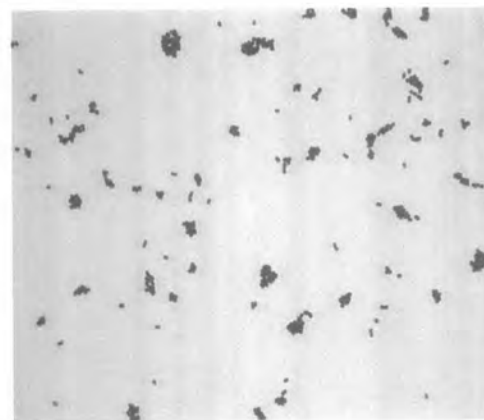
ค)



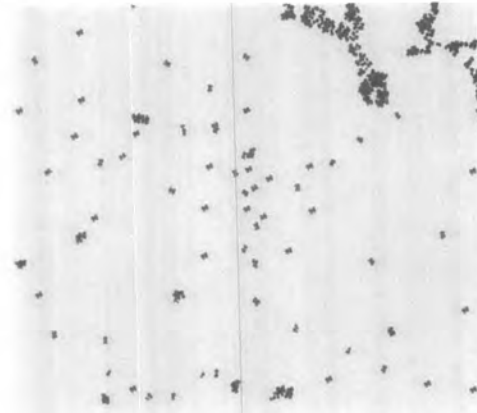
ง)



จ)



ฉ)



ภาพที่ 5 ลักษณะจุลทัศน์ฐานวิทยาและการติดสีแกรมบวกของเชื้อที่คัดเลือกจากตัวอย่าง ที่กำลังขยาย 100x

ก) *Lactobacillus salivarius* C43-1

ข) *Lactobacillus plantarum* C72-1

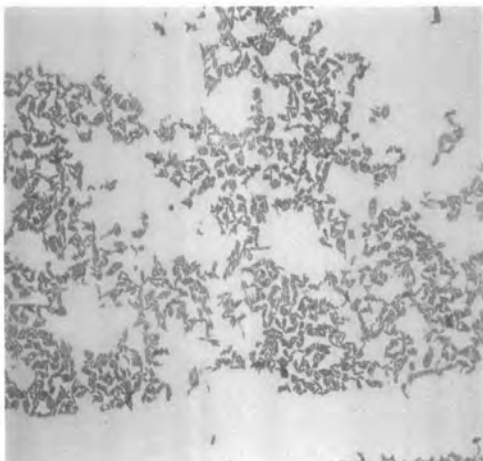
ค) *Lactobacillus plantarum* F23-1

ง) *Enterococcus faecium* C70-2

จ) *Enterococcus hirae* C76-1

ฉ) *Pediococcus pentosaceus* C80-2

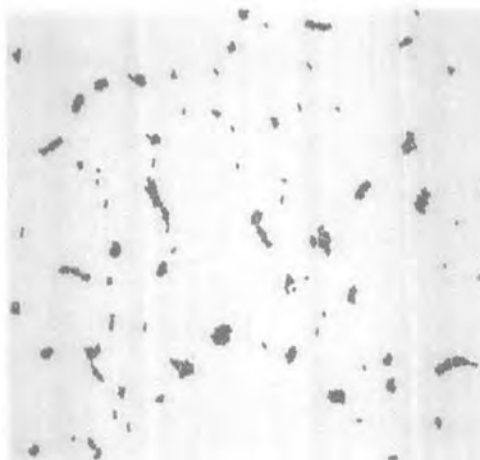
ข)



ค)



ง)



ภาพที่ 6 ลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมบวกของเชื้อที่คัดเลือกจากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่กำลังขยาย 100x

ข) *Lactobacillus casei* Fr-A

ค) *Lactobacillus plantarum* Fr-B

ง) *Enterococcus faecium* Fr-C

ตารางที่ 10 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

| Characteristics | Isolates | | | | | | | | |
|-------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|-------|
| | C43-1 | C72-1 | F23-1 | C70-2 | C76-1 | C80-2 | Fr-A | Fr-B | Fr-C |
| Cell form | Rods | Rods | Rods | Cocci | Cocci | Cocci | Rods | Rods | Cocci |
| Gas from glucose | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Arginine hydrolysis | - | - | - | - | - | + | - | - | + |
| Nitrate reduction | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Reaction in litmus milk | | | | | | | | | |
| Acidification | - | - | - | - | - | + | - | - | W |
| Coagulation | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| Liquefaction | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Reduction | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Growth at pH 3.5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pH 4.0 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pH 8.5 | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| pH 9.6 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Growth in 4% NaCl | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 6% NaCl | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 8% NaCl | - | - | - | + | + | + | + | - | + |
| 10% NaCl | - | - | - | + | + | + | + | - | + |
| Growth at 15 °C | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| 45 °C | - | - | - | + | + | - | - | - | + |
| 50 °C | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hydrolysis of starch | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Hydrolysis of casein | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Isomer of lactic acid | L | DL | DL | DL | L | DL | L | DL | DL |
| meso-Dpm in cell wall | - | + | + | - | - | - | - | + | - |

+, positive reaction; -, negative reaction; w, weakly positive

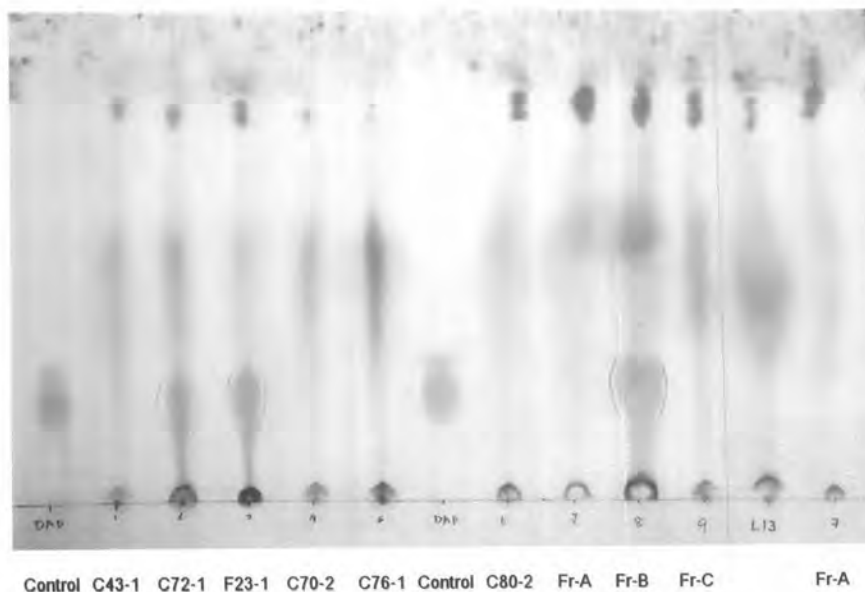
ตารางที่ 11 คุณสมบัติการสร้างกรดจากการใช้คาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

| Characteristics | Isolates | | | | | | | | |
|------------------------|----------|-------|-------|-------|-------|-------|------|------|------|
| | C43-1 | C72-1 | F23-1 | C70-2 | C76-1 | C80-2 | Fr-A | Fr-B | Fr-C |
| Growth in carbohydrate | | | | | | | | | |
| D-Amygdalin | + | + | + | - | - | + | + | + | - |
| L-Arabinose | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Cellobiose | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Esculin | - | + | + | + | W | + | + | + | W |
| Fructose | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Galactose | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Glucose | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Gluconate | W | W | W | W | W | + | + | W | W |
| Glycerol | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Inulin | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Lactose | + | + | + | + | + | - | - | + | + |
| Maltose | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Mannitol | + | + | + | + | + | - | - | + | + |
| D-Mannose | + | + | + | + | + | + | + | + | + |
| D-Melibiose | - | + | + | - | - | - | - | + | - |
| D-Melezitose | + | + | + | - | - | - | - | + | - |
| α-Methyl-D-glucoside | + | - | - | - | - | - | - | - | - |
| Raffinose | + | + | + | + | W | W | - | + | W |
| L-Rhamnose | - | - | - | + | + | + | - | - | + |
| D-Ribose | - | + | + | + | + | + | + | + | + |
| Salicin | - | + | + | + | + | + | + | + | W |
| D-Sorbitol | + | + | + | W | W | - | - | + | W |
| Sucrose | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| D-Trehalose | + | + | + | - | - | + | - | + | - |
| D-Xylose | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

+, positive reaction; -, negative reaction; w, weakly positive; ND, not determined

4.3.2 การวิเคราะห์ผนังเซลล์

ผลการวิเคราะห์ผนังเซลล์ พบว่า ไอโซเลท C72-1, F23-1 และ Fr-B มี *meso*-DAP (Diaminopimelic acid) ในผนังเซลล์คล้ายคลึงกับ *Lactobacillus plantarum* (Tanasupawat et al., 2000) แต่ไอโซเลท C43-1, C70-2, C76-1, C80-2, Fr-A และ Fr-C ไม่มี *meso*-DAP ในผนังเซลล์ ดังภาพที่ 7 และ ตารางที่ 12



ภาพที่ 7 ผล Thin Layer Chromograph ของการวิเคราะห์ผนังเซลล์

ตารางที่ 12 ผลการวิเคราะห์ผนังเซลล์ ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

| Isolates | <i>meso</i> -DAP |
|----------|------------------|
| 1. C43-1 | - |
| 2. C72-1 | + |
| 3. F23-1 | + |
| 4. C70-2 | - |
| 5. C76-1 | - |
| 6. C80-2 | - |
| 7. Fr-A | - |
| 8. Fr-B | + |
| 9. Fr-C | - |

4.3.3 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติก

นำเชื้อที่คัดเลือกได้มาศึกษาไอโซเมอร์ (isomer) ของกรดแลคติกที่เชื่อผลิดว่าเป็น D-form หรือ L-form ผลการวิเคราะห์พบว่า เชื้อที่สร้างกรดแลคติกชนิด L มี 3 ไอโซเลท (C43-1, C76-1 และ Fr-A) และเชื้อที่สร้างกรดแลคติกชนิด DL มี 6 ส่วนไอโซเลท (C72-1, F23-1, C70-2, C80-2, Fr-B และ Fr-C) ดังตารางที่ 13

ตารางที่ 13 ไอโซเมอร์ของกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

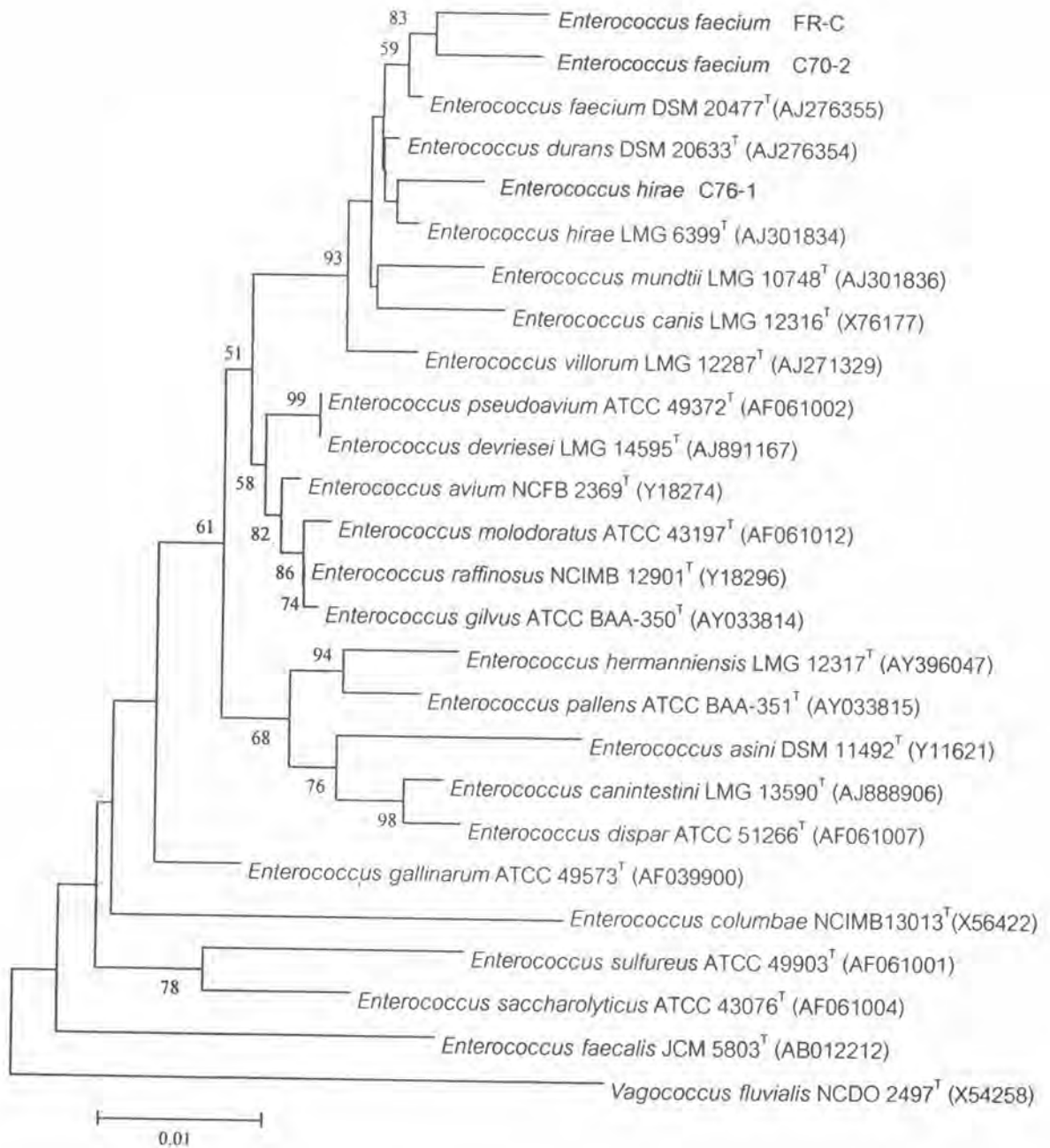
| ตัวอย่าง | ไอโซเมอร์ของกรดแลคติก |
|----------|-----------------------|
| 1. C43-1 | L |
| 2. C72-1 | DL |
| 3. F23-1 | DL |
| 4. C70-2 | DL |
| 5. C76-1 | L |
| 6. C80-2 | DL |
| 7. Fr-A | L |
| 8. Fr-B | DL |
| 9. Fr-C | DL |

ซึ่งการศึกษาไอโซเมอร์ของกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก เป็นประโยชน์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก จึงใช้การศึกษาไอโซเมอร์ของกรดแลคติกช่วยเสริมการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียในสกุลนี้

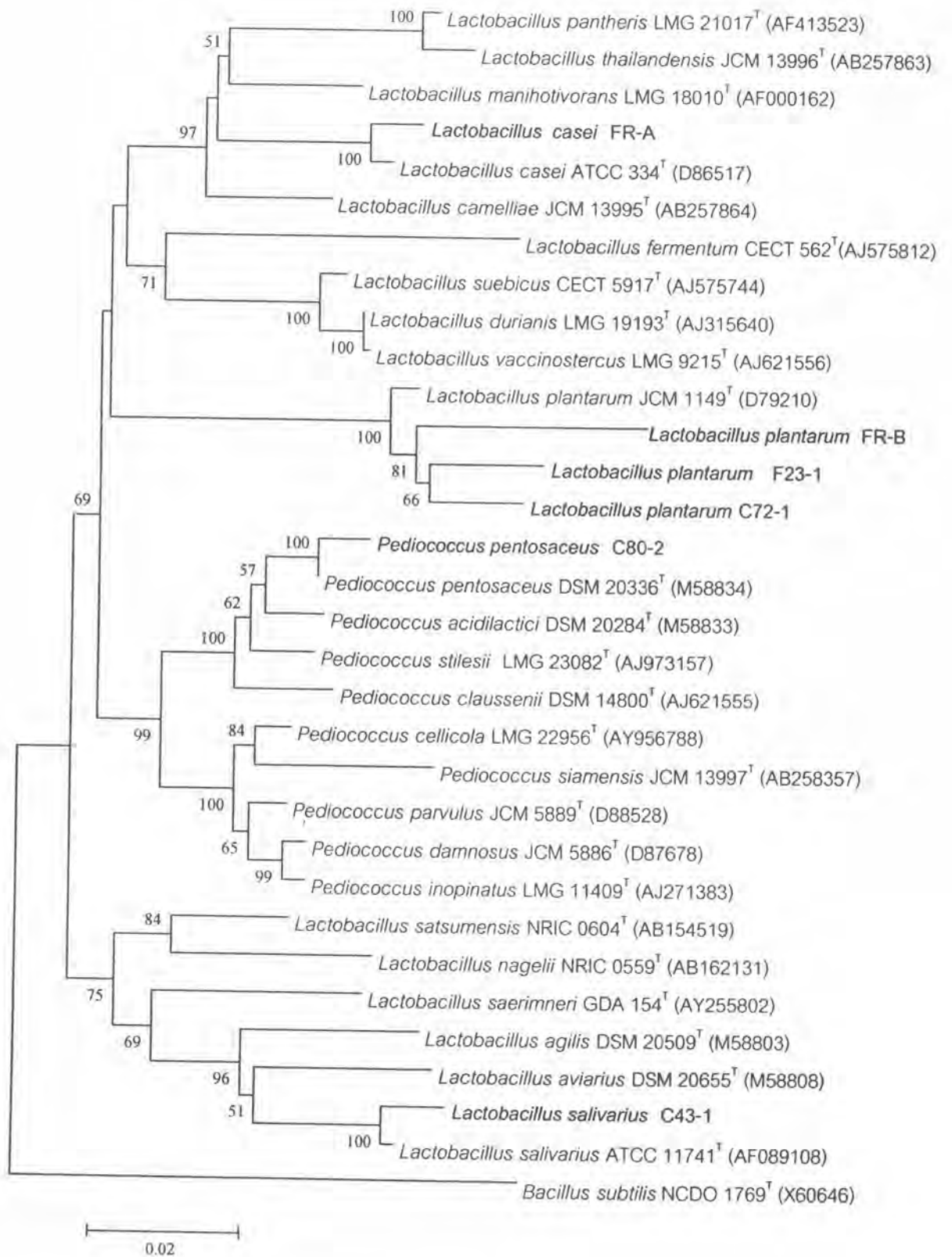
4.3.4 การแยกและการทำให้ DNA บริสุทธิ์

ผลการแยก DNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลท (C43-1, C72-1, F23-1, C70-2, C76-1, C80-2, Fr-A, Fr-B และ Fr-C) พบว่าแยก DNA ได้ทั้งหมดและเก็บ DNA ที่ถูกทำให้บริสุทธิ์ โดยละลาย DNA ด้วยสารละลายซาไลน์โซเดียมซิเตรต (0.1x SSC) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรลงในหลอดทดลองขนาดเล็ก เก็บที่ -20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป

4.3.5 การวิเคราะห์ลำดับเบสในช่วง 16S rDNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลท คือ C43-1, C72-1, F23-1, C70-2, C76-1, C80-2, Fr-A, Fr-B และ Fr-C ที่ผ่านการตรวจสอบความจำเพาะในการหมักน้ำตาล มาจัดจำแนก โดยนำ DNA ที่แยกได้และทำให้บริสุทธิ์ มาวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rDNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/ เพื่อให้ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์มีความถูกต้องมากขึ้น ผลการศึกษาการวิเคราะห์ลำดับเบสบนสาย 16S rDNA และการวิเคราะห์สายวิวัฒนาการ จากลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ โดยสร้างแผนภูมิ phylogenetic trees (ดังภาพที่ 8 และภาพที่ 9) แม้จะมีวิวัฒนาการมานาน แต่ลำดับเบสของนิวคลีโอไทด์จะมีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก (Axelsson, 2004; Pot et al., 1994) ผลการวิเคราะห์พบว่า ไอโซเลท C43-1 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741^T (Charles et al., 2000) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท C72-1, F23-1 และ Fr-B มีลำดับเบสใกล้เคียงแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus plantarum* JCM 1149^T (Liu and Dong, 2002) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 97.8, 97.1 และ 96.4 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ (แสดงดังตารางที่ 14) และไอโซเลท C70-2 และ Fr-C มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Enterococcus faecium* DSM 20477^T (Švec et al., 2005) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือน 99.1 เปอร์เซ็นต์ เท่ากันทั้งสองไอโซเลท ส่วนไอโซเลท C76-1 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Enterococcus hirae* LMG 6399^T (Švec et al., 2005) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.2 เปอร์เซ็นต์ ไอโซเลท C80-2 มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Pediococcus pentosaceus* DSM 20336^T (Charles et al., 2000) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99.3 เปอร์เซ็นต์ และไอโซเลท Fr-A มีลำดับเบสใกล้เคียงกับ *Lactobacillus casei* ATCC 334^T (Liu and Dong, 2002) มีเปอร์เซ็นต์ความเหมือนเท่ากับ 99 เปอร์เซ็นต์ (ดังตารางที่ 15) ผลการทดลองนี้ได้จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก 9 ไอโซเลท คือ C43-1, C72-1, F23-1, C70-2, C76-1, C80-2, Fr-A, Fr-B และ Fr-C ได้ใกล้เคียงหรือตรงกับการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา การตรวจสอบความจำเพาะในการหมักน้ำตาล และผลทางชีวเคมีคือ ไอโซเลท C43-1 ได้ตรงกับแบคทีเรียกรดแลคติก *L. salivarius*, ไอโซเลท C72-1, F23-1 และ Fr-B ใกล้เคียงแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *L. plantarum*, ไอโซเลท C70-2 และ Fr-C ใกล้เคียงกับแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *E. faecium*, ไอโซเลท C76-1 ใกล้เคียงกับแบคทีเรียกรดแลคติก *E. hirae*, ไอโซเลท C80-2 ใกล้เคียงแบคทีเรียกรดแลคติก *P. pentosaceus* และไอโซเลท Fr-A ใกล้เคียงแบคทีเรียกรดแลคติก *L. casei* ดังนั้นเพื่อความถูกต้องในการพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติก จึงจำเป็นต้องใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ควบคู่กันไป



ภาพที่ 8 Phylogenetic trees ของไอโซเลต Fr-C, C70-2 และ C76-1
เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน



ภาพที่ 9 Phylogenetic trees ของไอโซเลต C43-2, C72-1, F23-1, C80-2, Fr-A และ Fr-B เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

ตารางที่ 14 เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงของลำดับเบสในช่วง 16S rDNA ของไอโซเลท Fr-C, C70-2, C76-1 และสปีชีส์อื่น

| ลำดับ | เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% similarity) | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--------------|---|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|--|--|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 | 13 | 14 | 15 | 16 | 17 | 18 | 19 | 20 | 21 | 22 | 23 | 24 | 25 | 26 | | |
| 1. FR-C | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. C70-2 | 98.6 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. C76-1 | 98.5 | 98.6 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. AF061002 | 97.9 | 98.1 | 98.3 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 5. AJ891167 | 97.9 | 98.1 | 98.3 | 100.0 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 6. AJ276355 | 99.1 | 99.1 | 99.1 | 98.4 | 98.4 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 7. AJ276354 | 98.9 | 98.9 | 99.2 | 98.7 | 98.7 | 99.7 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 8. AJ301836 | 98.1 | 98.1 | 98.6 | 98.0 | 98.0 | 98.9 | 99.2 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 9. AJ301834 | 98.6 | 98.6 | 99.3 | 98.5 | 98.5 | 99.6 | 99.7 | 99.0 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 10. AJ271329 | 98.3 | 98.3 | 98.6 | 98.7 | 98.7 | 99.2 | 99.2 | 98.8 | 99.2 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 11. X76177 | 98.0 | 98.0 | 98.4 | 97.9 | 97.9 | 99.0 | 99.0 | 98.6 | 98.9 | 98.5 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 12. AJ888906 | 96.9 | 96.9 | 97.2 | 97.9 | 97.9 | 97.5 | 97.5 | 96.8 | 97.4 | 97.8 | 97.4 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 13. AB012212 | 95.6 | 95.6 | 96.1 | 96.0 | 96.0 | 96.0 | 96.2 | 95.5 | 96.0 | 95.8 | 95.7 | 95.4 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | | |
| 14. AY396047 | 96.6 | 96.8 | 97.3 | 98.1 | 98.1 | 97.2 | 97.4 | 96.7 | 97.5 | 97.2 | 96.5 | 98.0 | 94.7 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | | |
| 15. AY033815 | 96.8 | 97.0 | 97.3 | 98.3 | 98.3 | 97.4 | 97.6 | 97.2 | 97.5 | 97.4 | 97.2 | 98.2 | 95.0 | 98.8 | 100.0 | | | | | | | | | | | | | |
| 16. Y18274 | 98.0 | 98.2 | 98.7 | 99.4 | 99.4 | 98.6 | 98.8 | 98.3 | 98.7 | 98.5 | 98.1 | 97.7 | 95.6 | 98.1 | 98.3 | 100.0 | | | | | | | | | | | | |
| 17. Y18296 | 97.9 | 98.1 | 98.6 | 99.5 | 99.5 | 98.5 | 98.7 | 98.2 | 98.6 | 98.5 | 98.0 | 97.9 | 95.6 | 98.3 | 98.5 | 99.7 | 100.0 | | | | | | | | | | | |
| 18. AY033814 | 97.9 | 98.0 | 98.5 | 99.4 | 99.4 | 98.5 | 98.6 | 98.1 | 98.5 | 98.5 | 97.9 | 97.8 | 95.6 | 98.2 | 98.4 | 99.7 | 99.9 | 100.0 | | | | | | | | | | |
| 19. AF061012 | 97.8 | 97.9 | 98.5 | 99.3 | 99.3 | 98.4 | 98.5 | 98.0 | 98.5 | 98.4 | 97.9 | 97.7 | 95.5 | 98.1 | 98.4 | 99.6 | 99.8 | 99.7 | 100.0 | | | | | | | | | |
| 20. AF039900 | 97.2 | 97.4 | 97.5 | 98.9 | 98.9 | 97.7 | 97.9 | 97.2 | 97.6 | 98.0 | 97.7 | 97.9 | 96.1 | 97.1 | 97.3 | 98.5 | 98.6 | 98.5 | 98.6 | 100.0 | | | | | | | | |
| 21. Y11621 | 96.3 | 96.4 | 96.1 | 97.2 | 97.2 | 96.7 | 96.5 | 96.2 | 96.3 | 96.4 | 96.5 | 97.9 | 94.8 | 97.1 | 97.5 | 96.9 | 96.9 | 96.8 | 96.7 | 96.8 | 100.0 | | | | | | | |
| 22. AF061007 | 96.9 | 96.9 | 97.1 | 97.9 | 97.9 | 97.3 | 97.5 | 96.8 | 97.2 | 97.6 | 97.2 | 99.4 | 95.6 | 97.9 | 98.0 | 97.5 | 97.7 | 97.6 | 97.5 | 97.9 | 97.7 | 100.0 | | | | | | |
| 23. X56422 | 93.6 | 93.8 | 94.0 | 95.2 | 95.2 | 94.2 | 94.3 | 93.6 | 94.1 | 94.5 | 94.0 | 95.0 | 92.8 | 94.0 | 94.4 | 95.2 | 95.2 | 95.1 | 95.1 | 95.6 | 94.2 | 95.0 | 100.0 | | | | | |
| 24. AF061001 | 95.1 | 95.3 | 95.5 | 96.4 | 96.4 | 95.7 | 95.7 | 95.3 | 95.6 | 95.6 | 95.7 | 96.0 | 94.5 | 95.5 | 95.6 | 96.5 | 96.6 | 96.5 | 96.5 | 97.0 | 95.0 | 95.7 | 94.1 | 100.0 | | | | |
| 25. AF061004 | 95.8 | 96.0 | 96.4 | 97.1 | 97.1 | 96.4 | 96.4 | 95.8 | 96.4 | 96.7 | 96.4 | 97.1 | 96.1 | 95.8 | 96.2 | 96.9 | 97.0 | 96.9 | 97.0 | 97.9 | 95.9 | 96.8 | 94.7 | 97.5 | 100.0 | | | |
| 26. X54258 | 92.6 | 92.8 | 92.9 | 93.7 | 93.7 | 93.1 | 93.2 | 93.0 | 93.0 | 93.1 | 93.4 | 93.1 | 93.1 | 92.6 | 93.1 | 93.5 | 93.6 | 93.5 | 93.5 | 94.0 | 93.5 | 93.0 | 91.9 | 93.7 | 93.3 | 100.0 | | |

4.4 การเปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

ผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างกับผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ โดยนำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ในการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ การทนกรด การทนน้ำดี การผลิตสารต่อต้านจุลชีพของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากตัวอย่างกับผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก โดยเปรียบเทียบแบคทีเรียกรดแลคติกในในสปีชีส์เดียวกัน แบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 แบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus plantarum*

L. plantarum C72-1, *L. plantarum* F23-1 ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่าง นำมาเปรียบเทียบกับ *L. plantarum* Fr-B ที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ พบว่าในการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสามสายพันธุ์ มีความต้านทานต่อยาในกลุ่ม aztreonam, streptomycin, colistin, tetracycline, nalidixic acid และ vancomycin ในสภาวะกรดที่ pH 2.5 พบว่า *L. plantarum* C72-1 และ *L. plantarum* F23-1 มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า *L. plantarum* Fr-B ได้ 1.3 และ 3.3 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ ทุกสายพันธุ์ทนน้ำดีได้ ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบในกลุ่มก่อโรคได้ ด้วยวิธี agar spot แต่ไม่สร้าง bacteriocin ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion

กลุ่มที่ 2 แบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Enterococcus faecium*

โดย *E. faecium* C70-2 ที่คัดเลือกได้จากตัวอย่าง นำมาเปรียบเทียบกับ *E. faecium* Fr-C ที่คัดเลือกได้จากผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจากต่างประเทศ พบว่าในการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มนี้ให้ผลเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1 ยกเว้นมีความไวต่อ vancomycin และในสภาวะกรด pH 2.5 *E. faecium* C70-2 ทนกรดได้มากกว่า *E. faecium* Fr-C ได้ถึง 8.6 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองสายพันธุ์ ทนน้ำดีได้ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง สามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียทดสอบในกลุ่มก่อโรคได้ ด้วยวิธี agar spot แต่ไม่สร้าง bacteriocin ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบเมื่อทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion เช่นเดียวกับกลุ่ม *Lactobacillus plantarum* ผลการศึกษาความไวต่อยาปฏิชีวนะ และผลการเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้งสองกลุ่ม แสดงดังตารางที่ 5 และตารางที่ 16 ตามลำดับ

ตารางที่ 16 การเปรียบเทียบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

| ตัวอย่าง | แหล่ง | คุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก | | |
|------------------------------------|--------------|----------------------------|-------------------------------|------------|
| | | การผลิตสารต่อต้านจุลชีพ | การทนกรด (อัตราการอยู่รอด) | การทนน้ำดี |
| กลุ่มที่ 1 (<i>L. plantarum</i>) | | | | |
| <i>L. plantarum</i> C72-1 | จากตัวอย่าง | ต้านแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค | 97.0 % | + |
| <i>L. plantarum</i> F23-1 | จากตัวอย่าง | ต้านแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค | 99.0 % | + |
| <i>L. plantarum</i> Fr-B | จากผลิตภัณฑ์ | ต้านแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค | 95.7 % | + |
| กลุ่มที่ 2 (<i>E. faecium</i>) | | | | |
| <i>E. faecium</i> C70-2 | จากตัวอย่าง | ต้านแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค | 80.5 % | + |
| <i>E. faecium</i> Fr-C | จากผลิตภัณฑ์ | ต้านแบคทีเรียกลุ่มก่อโรค | 71.9 % | + |