# บทที่ 5
# สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

## 5.1 สรุปผลการวิจัย และอภิปรายผล

คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักต่างๆ 5 ชนิด คือ หอยดอง มาจากในห้างสรรพสินค้า ฟิวเจอร์ปาร์คบางแค , แหนม มาจากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้า เดอะ มอลล์ บางแค, แหนม ยี่ห้อ ห้วยแก้ว, ปลาส้ม ยี่ห้อ คุณยายทองวัน และ ไส้กรอกอีสาน มาจากบริเวณข้างห้างสรรพสินค้า เดอะ มอลล์ บางแค ได้เชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 10 สายพันธุ์ โดยทำการเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสอาการ์ จากนั้นทำการทดสอบลักษณะต่างๆของแบคทีเรียเพื่อยืนยันลักษณะของแบคทีเรีย พบว่าเชื้อที่แยกได้มีรูปร่างกลมและท่อน แกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส จัดเป็นแบคทีเรียแลคติก (ปิ่นมณี, 2546-2547)

จากนั้นทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบโดยเชื้อที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างท่อนสั้น ติดสีแกรมลบ *Bacillus subtilis* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก โดยใช้เกณฑ์การตัดสินจากบริเวณใสที่เกิดขึ้นบนอาหารนิวเทรียนอาการ์ที่ผสมเชื้อทดสอบนั่นเอง จากการทดลองสามารถแยกเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 6 สายพันธุ์ คือ $N_1$ $M_2$ $P_1$ $P_2$ $S_1$ และ $S_2$ โดยเชื้อ $S_1$ และ $S_2$ มีประสิทธิภาพยับยั้ง *E. coli* ได้ดีที่สุด เท่ากับ 2.6 และ $P_2$ มีประสิทธิภาพยับยั้ง *B . subtilis* ได้ดีที่สุด เท่ากับ 2.2 ส่วนเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุดคือ $S_2$ เท่ากับ 3.2 จะเห็นได้ว่าเมื่อทำการเปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติกพบว่า แบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของฐาปนี และ ศิริกานต์ (2543) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแกรมลบมีชั้นนอกสุดของเยื่อหุ้มเซลล์ (outer membrane layer) ทำให้สารยับยั้งเข้าสู่เซลล์ได้ยากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก อย่างไรก็ตามแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้สามารถสร้างสารที่มีผลยับยั้งการเจริญในแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ แต่ยังไม่สามารถสรุปได้ว่า การยับยั้งนั้นเกิดจากสารใด เพราะแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารหลายชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อได้ เช่น กรดแลคติก กรดแอซิติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล และแบคเทอริโอซิน เป็นต้น (Daeschel, M.A., 1989 และ Jay, J.M., 1982)

เมื่อศึกษาความสามารถในการผลิตกรดของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 สายพันธุ์ พบว่า $P_1$ มีการผลิตกรดน้อยที่สุดเท่ากับ 0.56 เปอร์เซนต์ และ $P_2$ มีการผลิตกรดมากที่สุดเท่ากับ 2.46 เปอร์เซนต์ การผลิตกรดแลคติกเป็นการใช้น้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน ได้ผลิตภัณฑ์หลักเป็นกรดแลคติก (ปิ่นมณี, 2546-2547) จากนั้นทำการศึกษาถึงความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของกรดแลคติกบริสุทธิ์ที่เปอร์เซนต์ความเข้มข้นต่างๆ ตามที่เชื้อผลิตจริง (0.5-2.46 เปอร์เซนต์) และมากกว่าที่เชื้อผลิตจริง (2.5 และ 50 เปอร์เซนต์) พบว่า มีเฉพาะเชื้อ *B. subtilis* เท่านั้นที่ถูกยับยั้งการเจริญได้โดยใช้กรดแลคติกบริสุทธิ์ความเข้มข้น 2.5 และ 50 เปอร์เซนต์ โดยความสามารถในการยับยั้งของกรดเท่ากับ 1.63 และ 2.33 ตามลำดับ แต่ความเข้มข้นของกรดที่ใช้ยังไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบชนิดอื่นได้ ดังนั้นจะเห็นได้ว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบของแบคทีเรียแลคติกเป็นผลมาจากสารชนิดอื่นซึ่งไม่ใช่ผลจากกรดแลคติกที่เชื้อผลิตได้ในปริมาณดังกล่าว

จากนั้นทำการศึกษาถึงปัจจัยที่มีผลในการผลิตและทำให้สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทำงานได้ดี คือ อุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เมื่อพิจารณาผลของอุณหภูมิที่ทดสอบ (30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส) เชื้อทุกสายพันธุ์จะผลิตสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้ง 3 ชนิด โดยมีประสิทธิภาพดีที่สุดที่ 37 องศาเซลเซียส รองลงมาเป็น 30 และ 45 องศาเซลเซียส ตามลำดับ ยกเว้นที่ 45 องศาเซลเซียส ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ เนื่องจากความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ซึ่งจากรายงานของ Tomas et al., 2003 พบว่าแบคทีเรียจะเจริญได้ดี ภายใต้อุณหภูมิที่เหมาะสม คือ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งภายใต้สภาวะเช่นนี้ จะทำให้ได้เซลล์มีปริมาณมากสุด มีอัตราการเจริญสูงสุด และมีช่วง lag phase สั้นสุด และในรายงานยังพบอีกว่าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นจะเกิดขึ้นในช่วงลอกอะลิทึมเฟส (logarithmic phase) และเออลีสเตชั่นนารี่เฟส (early stationary phase) ส่วนด้านของค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่า เชื้อ $S_1$ และ $S_2$ จะผลิตสารยับยั้งเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 3 5 7 และ 9 โดยจะยับยั้งเชื้อ *B. subtilis* ได้ ยกเว้น $S_2$ เมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5 จะไม่สามารถยับยั้ง *B. subtilis* ส่วน *S. aureus* ถูก $S_1$ และ $S_2$ ยับยั้งที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 7 เท่านั้น แต่ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 11 เชื้อทุกชนิดไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้เลย จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7 มีผลต่อการทำงานของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกมากที่สุด ในการยับยั้งเชื้อ *E. coli* *B. subtilis* และ *S. aureus* เนื่องจากช่วงอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ดังกล่าว มีผลทำให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีที่สุดและส่งผลให้ผลิตสารยับยั้งได้มากตามไปด้วย แต่ในบาง

ช่วงของอุณหภูมิ และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ของเชื้อบางชนิดจะไม่มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ เนื่องจากสภาวะดังกล่าวอาจไม่เหมาะต่อการเจริญและการผลิตสารยับยั้งก็ได้ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ความสัมพันธ์กับค่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Tomás, M.S.J. et al (2003) ที่รายงานว่า เชื้อ *Lactobacillus acidophilus* มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ซึ่งภายใต้สภาวะดังกล่าวจะส่งผลให้เชื้อสามารถเจริญได้สูงสุด และมีช่วงแลคเฟสสั้น โดยเชื้อจะสามารถผลิตสารมายับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ดีในช่วงลอกอะลิทึมเฟส และเออลีสเตชั่นนารี่เฟส

นอกจากนี้สารบางชนิดที่ผลิตออกมา อาจไม่มีประสิทธิภาพพอที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ ผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการทดลองของธิติมา และ ศิริกัญญา (2548) ที่พบว่า สารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 25 37 และ 60 องศาเซลเซียส โดยจะสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6-8

จากการทดสอบความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติกต่อความร้อนเปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินทางการค้า พบว่าสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ $S_1$ ไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนที่ระดับ 20 และ 30 นาทีมากสุด สารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อ $S_2$ และสารไนซิน ไวต่อการถูกทำลายด้วยความร้อนที่ระดับ 30 นาทีมากสุด ซึ่งสารที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้แต่ละสายพันธุ์จะทนความร้อนได้เป็นเวลานานแตกต่างกัน โดยสารที่ผลิตขึ้นจากเชื้อที่คัดแยกได้สามารถทนความร้อนได้น้อยลงเมื่อใช้เวลาเพิ่มขึ้น

จากการทดสอบความไวของสารยับยั้งแบคทีเรียจากแบคทีเรียแลคติกต่อเอนไซม์โปรติโอไลติก เปรียบเทียบกับแบคเทอริโอซินทางการค้า พบว่าสารที่ผลิตจากเชื้อ $S_1$ ไวต่อการถูกทำลายด้วยทริปซินมากสุด สารที่ผลิตจากเชื้อ $S_2$ ไวต่อการถูกทำลายด้วยทริปซินมากสุด ในการทำลาย *B. subtilis* และ *S. aureus* ไวต่อการถูกทำลายด้วยโปรติเนส เค มากสุด ในการทำลาย *E. coli* และ *S. aureus* ส่วนสารไนซินพบว่า ไวต่อการถูกทำลายด้วยทริปซินมากสุด ในการทำลาย *B. subtilis* และ *S. aureus* และไวต่อการถูกทำลายด้วยโปรติเนส เค มากสุด ในการทำลาย *B. subtilis* และ *S. aureus*

**5.2 ข้อเสนอแนะ**

จากการทดลองพบว่าเชื้อ $S_1$ และ $S_2$ น่าจะเป็นเชื้อสายพันธุ์ที่ดีเหมาะที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในการเป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่ดีทำให้อาหารหมักมีคุณภาพดี เนื่องจากเชื้อสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบซึ่งเป็นเชื้อก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสียได้ในช่วงอุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่กว้าง