

การประยุกต์ใช้แบคทีเรียโปรไบโอติก (*Lactobacillus plantarum*)
ในแหนมไก่

APPLICATION OF PROBIOTIC BACTERIA (*Lactobacillus plantarum*)
IN CHICKEN NHAM

อัฉรภา เฟื่อง และ สุภาพร เพ็งเลื้อ

โปรแกรมวิชาชีววิทยา และชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

จังหวัดสงขลา 90000

Atchara Phoem* and Supaporn Pengloh

*Program of Biology and Applied Biology, Faculty of Science and Technology, Songkhla Rajabhat University

Songkhla 90000

*E-mail: aphoem@yahoo.com

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความสามารถของแบคทีเรียโปรไบโอติก คือ *Lactobacillus plantarum* ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรค คือ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 ทดสอบโดยวิธี agar spot พบว่า สภาวะที่ไม่จำกัดการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 มีค่าโซนการยับยั้งมากกว่าสภาวะที่จำกัดการสร้างสารยับยั้ง เมื่อทดสอบโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันพบว่า เชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถทำให้จำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ลดลงจาก 5.52 เป็น 4.58 log CFU/mL และลดลงจาก 5.25 เป็น 4.30 log CFU/mL ตามลำดับภายในเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคในแหนมไก่พบว่า เชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถทำให้จำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ลดลงจาก 5.78 เป็น 4.20 log CFU/g และลดลงจาก 6.27 เป็น 5.21 log CFU/g ตามลำดับภายในเวลา 72 ชั่วโมง

คำสำคัญ : โปรไบโอติก แหนมไก่ *Lactobacillus plantarum* *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311

ABSTRACT

Growth-inhibiting activities of the probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* were determined against the food poisoning bacteria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311 using the agar spot method. Results indicated that antibacterial activities of *L. plantarum* (AP1) against *S. aureus* ATCC 25923 and *S. Typhimurium* ATCC 13311 in condition of unlimited inhibitory substances were better than in condition of limited inhibitory substances. Using the co-culture technique, *L. plantarum* (AP1) inhibited growth of *S. aureus* ATCC 25923 and *S. Typhimurium* ATCC 13311 with decrease in their numbers from 5.52 to 4.58 log CFU/mL and 5.25 to 4.30 log CFU/mL, respectively within 24 h. Further investigation using chicken Nham indicated that *L. plantarum* (AP1) inhibited growth of *S. aureus* ATCC 25923 and *S. Typhimurium* ATCC 13311, with reduction in their numbers from 5.78 to 4.20 log CFU/g and 6.27 to 5.21 log CFU/g, respectively within 72 h.

Keywords: probiotic, chicken Nham, *Lactobacillus plantarum*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311

บทนำ

ปัจจุบันผู้บริโภคหันมาสนใจดูแลสุขภาพของตนเองมากขึ้น เนื่องจากสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไป และพฤติกรรมการบริโภคอาหารมีส่วนทำให้เกิดความเสี่ยงก่อเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคไขมันอุดตันในเส้นเลือด โรคหัวใจ และโรคท้องร่วง เป็นต้น ดังนั้นผู้บริโภคจึงหันมาให้ความสนใจในการบริโภคอาหารที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย เช่น ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติก และผลิตภัณฑ์พรีไบโอติก เป็นต้น โปรไบโอติก (probiotic) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพของผู้บริโภค เช่น *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* โดยช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และสามารถสร้างสารมายับยั้งเชื้อก่อโรค (Vandenplas et al., 2015)

การผลิตแหนมในครัวเรือนและอุตสาหกรรมมีมากขึ้น แต่การผลิตยังคงอาศัยหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ตามธรรมชาติในวัตถุดิบที่ใช้ในการหมัก ดังนั้น จึงไม่สามารถควบคุมคุณภาพการผลิตให้มีความสม่ำเสมอได้แนวทางหนึ่งที่น่าสนใจคือ การนำโปรไบโอติกมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตแหนมไก่จะทำให้มีการหมักที่สม่ำเสมอและรวดเร็วสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค

ที่มีอยู่ในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์เป็นสื่อ นำ เชื้อโรคถ่ายทอดมาสู่คนคือเชื้อ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* Typhimurium ได้อีกด้วย โดยเชื้อ *S. aureus* เป็นเชื้อที่สามารถสร้างสารพิษชนิดเอนเทอโรท็อกซิน (enterotoxin) และ *S. Typhimurium* ใช้ตัวเชื้อทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดศีรษะ เป็นตะคริวในช่องท้อง และอ่อนเพลีย การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษอาจมาจากวัตถุดิบเนื้อสัตว์ที่ใช้ทำแฮมและการบริโภคแฮมที่ไม่ผ่านความร้อนหรือผ่านความร้อนไม่เพียงพอจึงมีเชื้อก่อโรคเหลือรอด (Ahmad et al., 2017; Swetwiwathana et al., 2007) จากรายงานของ Swetwiwathana & Visessanguan (2015) พบว่ามีการใช้เชื้อ *Pediococcus pentosaceus* ที่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินมายับยั้งเชื้อก่อโรคอาหารเป็นพิษในแฮมเช่น *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* และ *S. aureus* โดยทำให้เชื้อลดจำนวนลง 2 log CFU/mL ในงานวิจัยครั้งนี้จึงสนใจที่จะใช้เชื้อกลุ่ม lactobacilli เพราะเป็นโปรไบโอติกที่มีความปลอดภัยสามารถใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารได้ (Generally Recognized as Safe: GRAS) โดยใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* 2 สายพันธุ์ คือ AP1 และ AP2 ที่คัดแยกมาจากอุจจาระของคนที่มีสุขภาพดีและอาหารหมักประเภทปลาร้าตามลำดับ มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีคือ ทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.5% ทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 3 สามารถย่อยโปรตีนไขมันและแบ่งได้ (Phoem et al., 2017) ที่จะนำมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตแฮมไก ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ในแฮมไกเพื่อเป็นแนวทางในการประยุกต์ใช้หัวเชื้อโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ (functional food) ประเภทอื่น ๆ เพื่อเพิ่มความปลอดภัยและสุขภาพที่ดีของผู้บริโภคต่อไป

วิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 โปรไบโอติกได้รับความอนุเคราะห์จากงานวิจัยของ Phoem et al. (2017) ประกอบด้วยเชื้อ *L. plantarum* 2 สายพันธุ์ คือ AP1 แยกจากอุจจาระคนแก่ที่มีสุขภาพดี และ AP2 แยกจากปลาร้ามีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกที่ดีคือ ทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.5 % ทนต่อกรดที่ระดับ พีเอช 3 และสามารถย่อยโปรตีนไขมัน และแบ่งได้

1.2 แบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษคือ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311

2. การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (AP1 และ AP2) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella* Typhimurium ATCC 13311

การเตรียมเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2)

เตรียมหัวเชื้อ (inoculum) โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ De Man Rogosa and Sharpe agar (MRS; Merck, Damstadt, Germany) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่บริสุทธิ์มาใส่ใน 0.85% Normal Saline Solution (NSS) แล้วปรับความขุ่นเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland จะทำให้มีปริมาณเชื้อเป็น 1.5×10^8 CFU/mL แล้วเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^7 CFU/mL

การเตรียมเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311

เตรียม inoculum โดยเลี้ยงเชื้อแต่ละสายพันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase Soy broth (TSB; Merck, Damstadt, Germany) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีที่บริสุทธิ์มาใส่ใน 0.85% Normal Saline Solution (NSS) แล้วปรับความขุ่นเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland จะทำให้มีปริมาณเชื้อเป็น 1.5×10^8 CFU/mL แล้วเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^7 CFU/mL

2.1 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อบนอาหารแข็งด้วยวิธี agar spot (ดัดแปลงจากวิธีการของ Spelhaug & Harlander, 1989)

1) การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่ไม่จำกัดสารยับยั้ง

นำเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) ความเข้มข้นเชื้อ 10^7 CFU/mL หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (Merck, Damstadt, Germany) เชื้อละ 5 ไมโครลิตร จานละ 2 เชื้อ โดยทำจานละ 2 เชื้อทิ้งไว้ให้แห้ง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion soft agar (BHI; Merck, Damstadt, Germany) มีวุ้น 0.7% ปริมาตร 10 มิลลิเมตร ซึ่งมีเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ ตรวจผลการยับยั้งดูจากวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) จากขอบแบคทีเรียแลคติกจนสุดขอบวงใสของการยับยั้ง

2) การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อในสภาวะที่จำกัดสารยับยั้ง

ทำการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 1) แต่ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (มีน้ำตาลกลูโคส 0.2%) ใส่ใน anaerobic jar (Difco, Dickinson, USA) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.2 การทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (ดัดแปลงจากวิธีการของ Gonzalez et al., 1993)

นำเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์มาอย่างละ 200 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ผสมด้วย 0.5% yeast extract (Merck, Damstadt, Germany) ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร

จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเป็น 10^6 CFU/mL นำเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) มาอย่างละ 200 ไมโครลิตร ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth ผสมด้วย 0.5% yeast extract ปริมาตร 2,000 ไมโครลิตร จะได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเชื้อเป็น 10^7 CFU/mL นำเชื้อทั้ง 2 กลุ่ม มาเพาะเลี้ยงร่วมกัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนชุดควบคุมจะไม่มี การเติมเชื้อโปรไบโอติก นำทุกชุดการทดลองมาตรวจนับเชื้อด้วยวิธี pour plate โดยใช้อาหาร เลี้ยงเชื้อ ดังต่อไปนี้ คือ Salmonella-Shigella agar (SS; Merck, Darmstadt, Germany) สำหรับเชื้อ *S. Typhimurium* และ Mannitol Salt agar (MSA; Merck, Darmstadt, Germany) สำหรับเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3. การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (AP1) ในการ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 ในแฮมมูก (ดัดแปลงจากวิธีการของ Swetwathana et al., 2007)

การเตรียมส่วนผสมของเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2)

นำเชื้อ *L. plantarum* (AP1) ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง เชื้อก่อโรคได้ดีที่สุดมาเป็นหัวเชื้อในการผลิตแฮมมูก นำเชื้อ *L. plantarum* (AP1) มาเลี้ยง ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไป หมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อเก็บตัวเซลล์ นำตัวเซลล์มาใส่ใน 0.85% NSS ปรับความขุ่นเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland จะทำให้มี ปริมาณเชื้อเป็น 1.5×10^8 CFU/mL แล้วเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^7 CFU/mL นำเชื้อใส่ผสมในแฮมมูกโดยมีอัตราส่วนเชื้อต่อแฮมมูกเป็น 1 mL : 1,000 g

การเตรียมส่วนผสมของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium*

นำเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 g อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาทีเพื่อเก็บตัวเซลล์ นำตัวเซลล์มาใส่ใน 0.85% NSS ปรับความขุ่นเชื้อให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland จะทำให้มีปริมาณเชื้อเป็น 1.5×10^8 CFU/mL แล้วเจือจางให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นเป็น 10^6 CFU/mL นำเชื้อใส่ผสมในแฮมมูกโดยมีอัตราส่วน เชื้อต่อแฮมมูกเป็น 1 mL : 1,000 g

3.1 การเตรียมแฮมมูกเพื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค

นำเนื้อไก่มา 1 กิโลกรัมล้างให้สะอาด นำไปบดให้ละเอียดผสมกับข้าวสวย 3 ช้อนโต๊ะ กระเทียมบด 1 ช้อนโต๊ะ น้ำตาลทรายแดง 1/2 ช้อนโต๊ะ เกลือป่น 1 ช้อนโต๊ะ เติมหั้วเชื้อ ลงในแฮมมูกแบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เติมส่วนผสมของเชื้อ *L. plantarum* (AP1) ผสมกับ

ส่วนใสของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 2 เติมน้ำใสของเชื้อ *L. plantarum* (AP1) ผสมกับส่วนใสของเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ปริมาตรอย่างละ 1 มิลลิลิตร กลุ่มที่ 3 เติมน้ำใสของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม) และกลุ่มที่ 4 เติมน้ำใสของเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม) นวดให้ส่วนผสมเข้ากันนำมาใส่ในถุงพลาสติก ใส่ฟริกซ์หนูสดลงไป ห่อละเม็ด ใส่อากาศออกให้หมด มัดปากถุงให้แน่น วางไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ

3.2 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงในแฮมไก่

1) การตรวจนับจำนวนเชื้อ

นำตัวอย่างของแฮมไก่ทั้ง 4 กลุ่มที่หมักไว้เป็นเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มาชั่งน้ำหนักกลุ่มละ 10 กรัม แล้วเติม 0.85% NSS 90 มิลลิลิตร จากนั้นทำ 10-fold serial dilution นับจำนวนเชื้อโดยวิธี pour plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อตามข้อ 2.2 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (AOAC, 2005)

2) การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก

ตัวอย่างของแฮมไก่ทั้ง 4 กลุ่มที่หมักไว้เป็นเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำแฮมไก่แต่ละกลุ่มมา 10 กรัมใส่น้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร ดูดตัวอย่างใส่ในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask) หยดฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยดไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (Difco, Dickinson, USA) ความเข้มข้น 0.1 N จนกระทั่งเกิดเป็นสีชมพู (AOAC, 2005) คำนวณหา % กรดแลคติกตามสูตร

$$\text{ปริมาณกรดแลคติก} = \frac{(N \times V_1 \times 90.08 \times 100)}{1000 \times V_2}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (N)

V1 = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไทเทรต (mL)

V2 = ปริมาตรของสารละลายตัวอย่างที่ใช้ไทเทรต (mL)

4. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ผลการทดลองที่ได้รายงานผลเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานที่ได้จากการทดลอง 3 ซ้ำ ผลที่ได้นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SPSS และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการทดลอง

1. การทดสอบความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (AP1 และ AP2) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311

1.1 การทดสอบการยับยั้งบนอาหารแข็งด้วยวิธี agar spot

นำเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 โดยวิธี agar spot ดังแสดงในตารางที่ 1 พบว่าสภาวะที่ไม่จำกัดการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 มีค่าโซนการยับยั้งเป็น 16.56 และ 14.72 มิลลิเมตรตามลำดับ ($p < 0.05$) สภาวะที่จำกัดการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 มีค่าโซนการยับยั้งเป็น 12.13 และ 12.00 มิลลิเมตรตามลำดับ ($p < 0.05$) จะเห็นได้ว่าสภาวะที่ไม่จำกัดการสร้างสารยับยั้งจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคได้ดีกว่าสภาวะที่จำกัดการสร้างสารยับยั้ง โดยที่เชื้อ *L. plantarum* (AP1) มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดได้ดีกว่าเชื้อ *L. plantarum* (AP2)

ตารางที่ 1 ความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (AP1 และ AP2) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และ *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 โดยวิธี agar spot

จุลินทรีย์ที่ศึกษา	ค่าเฉลี่ยโซนการยับยั้ง (มิลลิเมตร) $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน			
	สภาวะที่ไม่จำกัดสารยับยั้ง		สภาวะที่จำกัดสารยับยั้ง	
	AP1	AP2	AP1	AP2
<i>S. aureus</i>	16.56 $\pm$ 1.07 ^{aA}	15.42 $\pm$ 1.36 ^{bA}	12.13 $\pm$ 1.05 ^{aA}	5.50 $\pm$ 0.00 ^{bA}
<i>S. Typhimurium</i>	14.72 $\pm$ 1.00 ^{aB}	12.40 $\pm$ 3.69 ^{bB}	12.00 $\pm$ 1.66 ^{aA}	5.47 $\pm$ 0.00 ^{bA}

ค่าเฉลี่ยของโซนการยับยั้ง $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวนอนที่ต่างกันคือ โซนการยับยั้งของเชื้อ AP1 และ AP2 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งที่ต่างกันคือ โซนการยับยั้งของเชื้อ *S. aureus* และ *S. Typhimurium* แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

1.2 การทดสอบการยับยั้งโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

นำเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันดังแสดงในตารางที่ 2 พบว่า เชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิดได้ไม่แตกต่างกัน เชื้อ *L. plantarum* (AP1) จะทำให้จำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ลดลงเหลือ 4.58 log CFU/mL เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีจำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เป็น 8.12 log CFU/mL ที่เวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และ เชื้อ *L. plantarum* (AP1) จะทำให้จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ลดลงเหลือ 4.30 log CFU/mL เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 เป็น 8.06 log CFU/mL ที่เวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 ความสามารถของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (AP1 และ AP2) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 และเชื้อ *Salmonella Typhimurium* ATCC 13311 โดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกัน

เชื้อก่อโรค	โปรไบโอติก	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเชื้อก่อโรค (log CFU/mL)	
			ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
<i>S. aureus</i>	AP1	0	6.25±0.05 ^{aB}	5.52±0.04 ^{bA}
		24	8.12±0.10 ^{aA}	4.58±0.18 ^{bB}
	AP2	0	6.25±0.05 ^{aB}	5.09±0.19 ^{bA}
		24	8.12±0.10 ^{aA}	4.50±0.09 ^{bB}
<i>S. Typhimurium</i>	AP1	0	6.17±0.02 ^{aB}	5.25±0.24 ^{bA}
		24	8.06±0.06 ^{aA}	4.30±0.03 ^{bB}
	AP2	0	6.17±0.02 ^{aB}	5.01±0.11 ^{bA}
		24	8.06±0.06 ^{aA}	4.53±0.07 ^{bB}

ชุดควบคุม คือ เชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์ ชุดทดสอบ คือ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) ผสมกับเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์

ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวนอนที่ต่างกันคือ จำนวนเชื้อก่อโรคในชุดควบคุมและชุดทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งที่ต่างกันคือ จำนวนเชื้อก่อโรคในแต่ละช่วงเวลาที่ทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ส่วนเชื้อ *L. plantarum* (AP2) จะทำให้จำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ลดลงเหลือ 4.50 log CFU/mL เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีจำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เป็น 8.12 log CFU/mL ที่เวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และ เชื้อ *L. plantarum* (AP2) จะทำให้จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ลดลงเหลือ 4.53 log CFU/mL เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 เป็น 8.06 log CFU/mL ที่เวลา 24 ชั่วโมง ($p < 0.05$)

2. ทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคและการสร้างกรดแลคติกในแฮมไก

นำเชื้อ *L. plantarum* (AP1) มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 และศึกษาการสร้างกรดแลคติกในแฮมไกดังแสดงในตารางที่ 3 พบว่า เชื้อ *L. plantarum* (AP1) จะทำให้จำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ลดลงเหลือ 4.20 log CFU/g เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีจำนวนเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 เป็น 7.98 log CFU/g ที่เวลา 72 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และเชื้อ *L. plantarum* (AP1) จะทำให้จำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ลดลงเหลือ 5.21 log CFU/g เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่มีจำนวนเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 เป็น 8.17 log CFU/g ที่เวลา 72 ชั่วโมง ($p < 0.05$) และปริมาณกรดแลคติกของแฮมไกในชุดทดสอบมีค่ามากกว่าชุดควบคุมที่เวลา 72 ชั่วโมง ($p < 0.05$)

สรุปและวิจารณ์ผล

โปรไบโอติกมีความสามารถในการสร้างสารมายับยั้งเชื้อก่อโรค สามารถทำการทดสอบได้หลายวิธี เช่น การสร้างสารยับยั้งบนอาหารแข็งโดยวิธี agar spot และการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

1. การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี agar spot

การทดสอบความสามารถของเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ในสภาวะที่ไม่จำกัดการสร้างสารยับยั้ง โปรไบโอติกสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส 2% ที่มีอยู่ในอาหาร MRS agar เปลี่ยนเป็นกรดแลคติกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ทั้งบวกและแกรมลบ โดยที่เชื้อ AP1 และ AP2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแกรมบวกได้ดีกว่าแกรมลบ เนื่องจากเชื้อแกรมลบมี outer membrane ช่วยในการป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเชื้อ (Tejero-Sarina et al, 2012) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Leite et al. (2015) พบว่าเชื้อ *Lactobacillus paracasei* และ *Lactococcus lactis* ที่แยกจากเมล็ดคัสเฟอร์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Listeria* spp., *Salmonella* spp. และ *Escherichia coli*

ตารางที่ 3 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อก่อโรคและปริมาณกรดแลคติก (%) ในแหนมไก่

เชื้อก่อโรค	เวลา (ชั่วโมง)	จำนวนเชื้อก่อโรค (log CFU/g)		กรดแลคติก (%)	
		ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ	ชุดควบคุม	ชุดทดสอบ
<i>S. aureus</i>	0	6.02±0.05 ^{aB}	5.78±0.77 ^{aA}	0.13±0.03 ^{aA}	0.47±0.03 ^{aA}
	24	8.15±0.10 ^{aA}	4.78±0.28 ^{bB}	0.17±0.09 ^{aA}	0.60±0.08 ^{aA}
	48	8.13±0.07 ^{aA}	4.39±0.69 ^{bB}	0.20±0.05 ^{aA}	0.72±0.12 ^{aA}
	72	7.98±0.07 ^{aA}	4.20±0.62 ^{bB}	0.31±0.04 ^{bA}	1.40±0.04 ^{aA}
<i>S. Typhimurium</i>	0	6.17±0.02 ^{aB}	6.27±0.10 ^{aA}	0.15±0.02 ^{aA}	0.51±0.08 ^{aA}
	24	8.16±0.06 ^{aA}	5.49±0.06 ^{bB}	0.22±0.07 ^{aA}	0.62±0.05 ^{aA}
	48	8.28±0.00 ^{aA}	5.34±0.06 ^{bB}	0.25±0.03 ^{aA}	0.75±0.03 ^{aA}
	72	8.17±0.07 ^{aA}	5.21±0.65 ^{bB}	0.36±0.05 ^{bA}	1.45±0.05 ^{aA}

ชุดควบคุม คือ แหนมที่เติมเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์ ชุดทดสอบ คือ แหนมที่เติมเชื้อ *L. plantarum* (AP1) ผสมกับเชื้อก่อโรคแต่ละสายพันธุ์

ค่าเฉลี่ยของจำนวนเชื้อ/กรดแลคติก $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์เล็กในแนวนอนที่ต่างกันคือ ค่าที่ได้ในชุดควบคุมและชุดทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตัวอักษรภาษาอังกฤษพิมพ์ใหญ่ในแนวตั้งที่ต่างกันคือ ค่าที่ได้ในแต่ละช่วงเวลาทดสอบแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ได้ดี และงานวิจัยของ Hwanhlem et al. (2017) ทำการแยกเชื้อ *Enterococcus faecalis* จากลำไส้ไก่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* และ *S. Typhimurium* ได้ดี ส่วนสภาวะที่จำกัด การสร้างสารยับยั้งโดยลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar เหลือ 0.2% ทำให้มีการสร้างปริมาณกรดแลคติกลดลง และการบ่มใน anaerobic jar จะไปจำกัดการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนั้นโปรไบโอติกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคโดยใช้สารยับยั้งชนิดอื่น เช่นแบคทีริโอซินจะทำให้เกิดบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้เสียสมดุลขององค์ประกอบภายในเซลล์ และตายในที่สุด (Nuphet et al., 2004) จะเห็นได้ว่าเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 ชนิด ได้น้อยลงเมื่อเทียบกับการทดสอบในสภาวะที่ไม่จำกัดการสร้างสารยับยั้ง

2. การสร้างสารยับยั้งเชื้อก่อโรคในอาหารเหลวโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

การทดสอบความสามารถของเชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) ในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 1331 พบว่าเชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทั้งสองชนิดได้ดีกว่า *L. plantarum* (AP2) เนื่องจากเชื้อ *L. plantarum* (AP1) อาจมีเอ็นในการควบคุมการสร้างสารยับยั้งได้หลากหลายชนิดและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งที่ดี ซึ่งฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคเกิดจากการสร้างกรดแลคติกผ่านกระบวนการ Embden-Meyerhof Pathway (EMP) (Vandenplas et al., 2015) เชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีกว่าเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 1331 เนื่องจากเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 1331 มี outer membrane ช่วยในการป้องกันอันตรายที่จะเกิดขึ้นกับเชื้อ (Tejero-Sarina et al., 2012) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nuphet et al. (2004) ทำแยกเชื้อ *Lactobacillus* spp. จากเห็ดนำมาใช้ในการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *E.coli* ATCC 25922 โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่า เชื้อ *Lactobacillus* spp. สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ 80-100%

3. การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อก่อโรคและปริมาณกรดแลคติกในแฮมไก่

จากการทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี agar spot และเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่า เชื้อ *L. plantarum* (AP1) มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ดีจึงนำมาประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อในแฮมไก่ที่หมักนานเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยที่เชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีกว่าเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 1331 และกรดแลคติกมีการสร้างในปริมาณที่มากกว่าชุดควบคุม มีกลไกการทำลายเชื้อก่อโรคโดยในสภาวะที่พีเอชลดลง กรดแลคติกอยู่ในรูปโมเลกุลที่ไม่แตกตัว จากนั้นโปรตอนจะออกมาทำให้เซลล์สูญเสียพลังงาน ATP เมื่อมีปริมาณโปรตอนมากเกินไปจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงพีเอชภายในเซลล์ มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ เยื่อหุ้มเซลล์ การลำเลียงสารอาหาร กิจกรรมเมแทบอลิซึม และเซลล์ตายในที่สุด (Vandenplas et al., 2015) นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากส่วนผสมในแฮมไก่ คือ กระเทียมมีสารอัลลิซิน (allicin) ที่ช่วยในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (Swetwathana & Visessanguan, 2015; Vandenplas et al., 2015) สอดคล้องกับงานวิจัยของ Swetwathana et al. (2007) แยกเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* จากแฮมสามารถยับยั้งเชื้อ *Salmonella anatum* ที่ปนเปื้อนในแฮมได้ดี และงานวิจัยของ Kingcha et al. (2012) แยกเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 จากแฮมหมักยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* โดยทำให้จำนวนเชื้อก่อโรคในแฮมลดลง 3.2 log CFU/g ภายในเวลา 72 ชั่วโมง นอกจากนี้ *L. plantarum* (AP1) ที่แยกมาจากอุจจาระของคนที่มีสุขภาพดีสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตแฮมไก่และเมื่อบริโภคเข้าสู่ร่างกายคน เชื้อนี้มีแนวโน้มที่จะเกาะติดในลำไส้และรอดชีวิตได้สูง ส่งผลดีต่อสุขภาพของผู้บริโภคในการคงไว้หรือช่วยปรับสภาพ

ความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และควรมีการนำหัวเชื้อ *L. plantarum* (AP1) ไปประยุกต์ใช้ในการหมักแหนมชนิดอื่นๆ เช่น แหนมปลา แหนมหมู เป็นต้น ซึ่งจะทำให้เกิดความหลากหลายของผลิตภัณฑ์มากขึ้น

จากการทดลองสรุปได้ว่าการทดสอบโดยวิธี agar spot เชื้อ *L. plantarum* (AP1 และ AP2) มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 และ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ในสภาวะที่ไม่จำกัดการสร้างสารยับยั้งได้ดีกว่าสภาวะที่จำกัดการสร้างสารยับยั้ง การทดสอบโดยวิธีเพาะเลี้ยงร่วมกันพบว่า เชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ดีกว่าเชื้อ *L. plantarum* (AP2) ที่เวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรคทั้ง 2 สายพันธุ์ในแหนมไก่ พบว่า เชื้อ *L. plantarum* (AP1) สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *S. aureus* ATCC 25923 ได้ดีกว่าเชื้อ *S. Typhimurium* ATCC 13311 ที่เวลา 72 ชั่วโมง

เอกสารอ้างอิง

- Ahmad, V., Khan, M.S., Jamal, Q.M.S., Alzohairy, M.A. & Siddiqui, M.U. (2017). Antimicrobial potential of bacteriocins: in therapy, agriculture and food preservation. *International Journal of Antimicrobial Agents*. 49(1), 1-11.
- A.O.A.C. (2005). *Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. 16th edition. Virginia : The Association of Official Analytical Chemists Inc.
- Gonzalez, S.N., Apella, M.C., Romero, N.C., De maciae, M.E. & Oliver, G. (1993). Inhibition of enteropathogens by lactobacilli strain used in fermented milk. *Journal of Food Protection*. 56, 773-776.
- Hwanhlem, N., Ivanova, T., Biscola, V., Choiset, Y. & Haertle, T. (2017). Bacteriocin producing *Enterococcus faecalis* isolated from chicken gastrointestinal tract originating from Phitsanulok, Thailand: isolation, screening, safety evaluation and probiotic properties. *Food Control*. 78, 187-195.
- Kingcha, Y., Tosukhowong, A., Zendo, T., Roytrakul, S., Luxananil, P. & Visessanguan, W. (2012). Anti-listeria activity of *Pediococcus pentosaceus* BCC 3772 and application as starter culture for Nham, a traditional fermented pork sausage. *Food Control*. 25, 190-196.

- Leite, A.M.O., Miguel, M.A.L., Peixoto, R.S., Ruas-Madiedo, P., Mayo, B. & Delgado, S. (2015). Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**. 98, 3622-3632.
- Nuphet, A. Kantachote, D. & Charernjiratrakul, W. (2004). Screening of probiotic lactic acid bacteria from Thai fermented foods for human. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. 2(5), 659-670. (in Thai)
- Phoem, A., Witajitsomboon, N., Saedeh, F. & Mayiding, A. (2017). **Screening of probiotic lactic acid bacteria from traditional fermented foods and healthy elderly people 's faeces**. The 9th National conference on integrating research for sustainable community development, 31 May 2017, Phuket Rajabhat University, Phuket, Thailand. p.1578-1587. (in Thai)
- Spelhaug, S.R. & Halander, S.K. (1989). Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. **Journal of Food Protection**. 52, 856-862.
- Swetwiwathana, A., Lotong, N., Nakayama, J. & sonsrnoto, K. (2007). Maturation of Nham-A Thai fermented meat product: Effect of pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR536) as starter culture, nitrate and garlic on *Salmonella anatum* during Nham fermentation. **Fleischwirtschaft International**. 22(3), 46-49.
- Swetwiwathana, A. & W. Visessanguan. (2015). Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for safety improvements of traditional Thai fermented meat and human health. **Meat Science**. 109, 101-105.
- Tejero-Sariñena, S., Barlow, J., Costabile, A., Gibson, G.R., & Rowland, I. (2012). In vitro evaluation of the antimicrobial activity of a range of probiotics against pathogens : evidence for the effects of organic acids. **Anaerobe**. 18(5), 530-538.
- Vandenplas, Y., Huys, G. & Daube, G. (2015). Probiotics: an update. **Journal of Pediatrics**. 91, 6-21.
-