

ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Penicillium digitatum* ของแบคทีเรียกรดแลคติก

Antifungal Activity of Lactic Acid Bacteria Against *Penicillium digitatum*

จินตนา ต๊ะย่วน* ทิพวัลย์ อรรคราช นาฏนภา กลั่นกล้า และ เสาวคนธ์ ต่วนเทศ

Chintana Tayuan*, Tippawan Akkarach, Natnapha Klanklam and Sowvakon Tuanted

Received: 12 March 2021, Revised: 31 April 2021, Accepted: 22 June 2021

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *Penicillium digitatum* ที่เป็นสาเหตุของโรคราสีเขียวในส้มหลังการเก็บเกี่ยว คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักและผลไม้ (กะเพรา ผักชี เม้าและมะละกอ) และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (ผักกาดดอง, ผักเสี้ยนดอง, หม่าเนื้อ และส้มเท้าวัว) ได้จำนวน 38 และ 32 ไอโซเลต ตามลำดับ เมื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการ พบว่ามีรูปแบบการหมักน้ำตาลทั้งแบบ Homofermentative และ Heterofermentative สามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้โดยปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดแลคติกมีค่าระหว่าง 0.10 ถึง 1.49 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ค่าความเป็นกรดต่างอยู่ในช่วง 4.44 ถึง 6.28 แบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 6 ไอโซเลตมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. digitatum* สูง เมื่อศึกษาด้วยวิธี agar well diffusion โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งระหว่าง 11.16±1.30 ถึง 24.23±5.63 มิลลิเมตร โดยฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. digitatum* พบทั้งจากเซลล์และส่วนใสปราศจากเซลล์ เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยวิธี 16S rRNA gene sequencing พบว่าทุกไอโซเลตเทียบเคียงเป็น *Lactobacillus pentosus* (99% identity) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์เป็นปฏิปักษ์ต่อ *P. digitatum* นี้จะเป็นประโยชน์ในการนำมาใช้ควบคุมทางชีวภาพในส้มต่อไป

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก, *Lactobacillus pentosus*, ฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา, *Penicillium digitatum*

คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร 47000

Faculty of Natural Resources and Agro-industry, Kasetsart University, Chalermphrakiat Sakon Nakhon Province Campus, Sakon Nakhon 47000, Thailand.

*ผู้รับผิดชอบประสานงาน ไปรษณีย์อิเล็กทรอนิกส์ (Corresponding author, e-mail): fnacnt@ku.ac.th

ABSTRACT

The aim of this study was to isolate lactic acid bacteria with antifungal activity against *Penicillium digitatum*, a major source of post-harvest decay in citrus. Thirty-eight and 32 isolates were isolated from vegetables and fruits (basil, coriander, mao and papaya) and fermented foods (fermented lettuce, fermented spider weed, Thai traditional fermented beef sausage and fermented cattle feet), respectively. Some morphological and physiological characteristics were investigated. Glucose fermentation patterns are both homofermentative and heterofermentative. Titratable acidity as lactic acid was from 0.10 % to 1.49% (pH 4.44 to 6.28). Six lactic acid bacterial isolates had displayed high antifungal activity against *Penicillium digitatum* by an agar well diffusion assay. The diameter of inhibition zones was found to range between 11.16 ± 1.30 to 24.23 ± 5.63 mm. Both cell suspension and cell-free supernatant exhibited inhibitory effect against the target mold. Identification by 16S rRNA gene sequencing showed that all six isolates were *Lactobacillus pentosus* (99% identity). Lactic acid bacterial isolates with antagonistic activity could be good biocontrol candidate against *P. digitatum* in citrus.

Key words: lactic acid bacteria, *Lactobacillus pentosus*, antifungal activity, *Penicillium digitatum*

บทนำ

โรคราเขียว (Green Mold) เป็นสาเหตุของความเสียหายทางเศรษฐกิจที่สำคัญของส้ม ทำให้ส้มเกิดการเน่าเสียภายหลังการเก็บเกี่ยวโดยมีเชื้อราเขียว *Penicillium digitatum* เป็นเชื้อราสาเหตุ โดยทำให้เกิดความสูญเสียแก่ผลส้มในระหว่างการเก็บรักษา การเจริญของเชื้อราบนผลส้มจะพบลักษณะคล้ายผงแป้งสีเขียวมะกอก อาการเริ่มแรกจะเกิดรอยชำใสบ้างเป็นวง ต่อมาจะเพิ่มขยายขนาดขึ้น พบการสร้างเส้นใยสีขาวบริเวณกลางรอยชำและจะมีการสร้างสปอร์ที่อุณหภูมิระหว่าง 15 ถึง 28 องศาเซลเซียสในวันที่ 3-5 และจะพบสปอร์สีเขียวจำนวนมากในวันที่ 7-8 โดยจะทำให้เกิดการแพร่กระจายของโรคอย่างรวดเร็ว การควบคุมเชื้อราสามารถทำได้โดยใช้สารเคมีหลายชนิด เช่น imazalil, thiabendazole และ ortho-phenylphenol เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามพบการเกิดสายพันธุ์ดื้อยาของ *P. digitatum* ที่มีสาเหตุจากการใช้สารเคมีที่ไม่ถูกวิธี (Palou, 2014) อีกทั้งผู้บริโภคใน

ปัจจุบันให้ความสำคัญต่อการบริโภคอาหารที่ปลอดภัย ดังนั้นการยืดอายุการเก็บรักษาส้มด้วยวิธีการที่ไม่ก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภคจึงมีความน่าสนใจ แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ได้รับการยอมรับแล้วว่าเป็นแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe bacteria; GRAS) พบได้ทั่วไปในแหล่งธรรมชาติและมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักอาหารหลายชนิด จากรายงานพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา (Antifungal activity) ได้หลายชนิด เช่น *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ (Dalié *et al.*, 2010) Temitope and Oluchi (2015) พบว่า *A. niger*, *Rhizopus stolonifer* และ *Mucor* sp. ถูกยับยั้งได้ด้วย *L. plantarum* ที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์นมหมักเป็นต้น อย่างไรก็ตามข้อมูลเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* โดยแบคทีเรียกรดแลคติกยังมีน้อย อีกทั้งยังขาดรายงานเกี่ยวกับฤทธิ์ในการยับยั้ง

P. digitatum ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากพืชและอาหารหมักของไทยด้วย

งานวิจัยนี้จึงคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ศึกษาพื้นฐานวิทยา สรีรวิทยาและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* รวมทั้งระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ เพื่อเพิ่มโอกาสในการพบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของส้มและจะนำไปสู่การใช้เพื่อควบคุมการเจริญของเชื้อราให้สามารถเก็บรักษาส้มได้ยาวนานขึ้น ทั้งยังมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคอีกด้วย

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างผัก ได้แก่ กระเพราและผักชี ผลไม้ ได้แก่ มะละกอสุก อาหารหมักประเภทผัก ได้แก่ ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง อาหารหมักประเภทเนื้อสัตว์ ได้แก่ หม่าเนื้อและส้มตำวุ้นจากตลาดใน อ.เมือง จ.สงขลา เก็บรักษาตัวอย่างที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และนำมาวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง

2. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก โดยชั่งตัวอย่าง 25 กรัม เจือจางด้วย 0.1% peptone water ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ตีปั่นด้วยเครื่อง Stomacher นาน 90 วินาที เจือจางตัวอย่างให้มีระดับความเจือจางที่เหมาะสม คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธี spread plate ที่ระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำโดยใช้อาหาร MRS agar ที่เติม 1% CaCO_3 บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี และรายงานจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกในแต่ละ

ตัวอย่าง (CFU/g) เลือกโคโลนีเดี่ยวแล้วทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar แล้วเก็บรักษาเชื้อใน 10% Skimmed milk ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

3. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.1 ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ย้อมสีแบบแกรมและศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

3.2 ศึกษารูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคส

เจือเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่บรรจุหลอดดักแก๊ส บ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลจากการเกิดแก๊สในหลอดดักแก๊ส โดยกลุ่ม heterofermentative lactic acid bacteria จะพบสร้างแก๊สในหลอดดักแก๊ส ส่วน homofermentative lactic acid bacteria จะไม่พบการสร้างแก๊ส

3.3 ศึกษาการสร้างเอนไซม์คาตาเลส

เจือเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ทดสอบโดยหยดสารละลาย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ตรวจผลโดยแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์คาตาเลสจะพบฟองแก๊ส

3.4 ทดสอบความสามารถในการสร้างกรดแลคติก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสปราศจากเซลล์ มาไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์มาตรฐาน (0.1 N NaOH) คำนวณปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปของกรดแลคติก ตามวิธีของ AOAC (2000)

4. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *P. digitatum*

(Temitope and Oluchi, 2015)

4.1 การเตรียมแบคทีเรียกรดแลกติก

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง เติมน้ำที่มียานวน 10^6 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 15 มิลลิลิตร โดยใช้ปริมาณเท่ากับ 2% inoculum บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แยกส่วนใสและนำส่วนที่เป็นเซลล์แบคทีเรียไปล้างด้วย 0.5 % NaCl ปลอดเชื้อ 3 ครั้ง นำสารละลายส่วนใสปราศจากเซลล์และเซลล์ซัสเพนชันที่ได้มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum*

4.2 การเตรียมเชื้อทดสอบ

เลี้ยงเชื้อ *P. digitatum* ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ ปริมาตร 2-3 มิลลิลิตร ลงบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ราเจริญแล้ว ใช้ลูปปลอดเชื้อเขี่ยสปอร์เบาๆ ให้หลุดออก แล้วใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดสปอร์ นำสปอร์ซัสเพนชันไปนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้ hemacytometer แล้วเจือจางสปอร์ซัสเพนชันให้มีจำนวนสปอร์ประมาณ 10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร

4.3 การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อราโดยวิธี agar well diffusion

ปิเปตสปอร์ซัสเพนชันที่เตรียมได้จากข้อ 4.2 เติมน้ำลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ด้วยเทคนิค pour plate จะได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสปอร์ของ *P. digitatum* เท่ากับ 10^4 สปอร์ต่อมิลลิลิตร เจาะรูให้เป็นหลุมขนาด 6 มิลลิเมตร โดยใช้ cork borer

ปลอดเชื้อ จากนั้นนำสารละลายส่วนใสปราศจากเซลล์และเซลล์ซัสเพนชันที่เตรียมไว้ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมน้ำลงในหลุมที่เจาะไว้แล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน วัดขนาดบริเวณยับยั้งโดยใช้ Vernier caliper ในหน่วยมิลลิเมตร เปรียบเทียบผลการทดลองกับอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เป็นชุดควบคุมเชิงลบ

5. การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติก

ระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วย 16S rRNA gene sequencing การแอมพลิฟิเคชัน 16S rRNA ใช้ universal primers 27F 5' (AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG) 3' และ 1492R 5' (TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACT T) 3' ปฏิบัติ PCR ประกอบด้วย การ activation เอนไซม์ Taq polymerase ที่อุณหภูมิ 95°C, 2 นาที ในแต่ละรอบของ PCR กำหนดให้ Denaturation ที่อุณหภูมิ 95°C, 1 นาที, Annealing ที่อุณหภูมิ 55°C, 1 นาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72°C, 1 นาที ทำซ้ำจำนวน 35 รอบ ส่วนในรอบสุดท้ายตามด้วยอุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วทำให้ PCR product ที่ได้บริสุทธิ์โดยใช้ multiscreen filter plate (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) การ sequencing ใช้ PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle sequencing Kit ร่วมกับ sequencing primer 785F 5' (GGA TTA GAT ACC CTG GTA) 3' และ 907R 5' (CCG TCA ATT CMT TTR AGT TT) 3' หลังจากนั้นนำมาตรวจสอบลำดับเบสโดยใช้ ABI Prism 3730XL DNA analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA)

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติก

เมื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกจากตัวอย่างผักและผลไม้ 4 ชนิด ได้แก่ กะเพรา ผักชี เม่า และมะละกอ พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกในตัวอย่าง

ผักและผลไม้ มีจำนวนระหว่าง 4.40×10^3 ถึง 8.90×10^4 CFU/g (ตารางที่ 1) และคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 38 ไอโซเลท และส่วนตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 4 ชนิด ได้แก่ ผักกาดดอง, ผักเสี้ยนดอง, หม่าเนื้อ และ ส้มเท้าวัว มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกระหว่าง 1.06×10^8 ถึง 1.04×10^9 CFU/g และคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 32 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทมีลักษณะโคโลนีกลม นูนเล็กน้อย ผิวหน้าเรียบ ส่วนใหญ่มีสีขาวใสและสีครีม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางตั้งแต่ 0.05 ถึง 0.4 เซนติเมตร แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในเนื้อ ผลิตภัณฑ์จากนม ระบบทางเดินอาหาร

ของมนุษย์และสัตว์และอาหารหมักดองต่างๆ (Axelsson, 2004; Liu *et al.*, 2014) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักมีจำนวนระหว่าง 10^5 ถึง 10^7 CFU/g (Rezac *et al.*, 2018) นอกจากนี้ยังมีรายงานการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากผักและผลไม้บางชนิด (Di Cagno *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2016; Ruiz Rodríguez *et al.*, 2019) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มีจำนวนระหว่าง $<10^2$ ถึง 10^4 CFU/g (Di Cagno *et al.*, 2013; Ruiz Rodríguez *et al.*, 2019)

ตารางที่ 1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผัก ผลไม้และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ตัวอย่าง	จำนวนโคโลนี (CFU/g)
กระเพรา	4.60×10^3
ผักชี	4.40×10^3
มะ	6.50×10^3
มะละกอ	8.90×10^4
ผักกาดดอง	3.50×10^8
ผักเสี้ยนดอง	1.33×10^8
หม่าเนื้อ	1.04×10^9
ส้มเท้าวัว	1.06×10^8

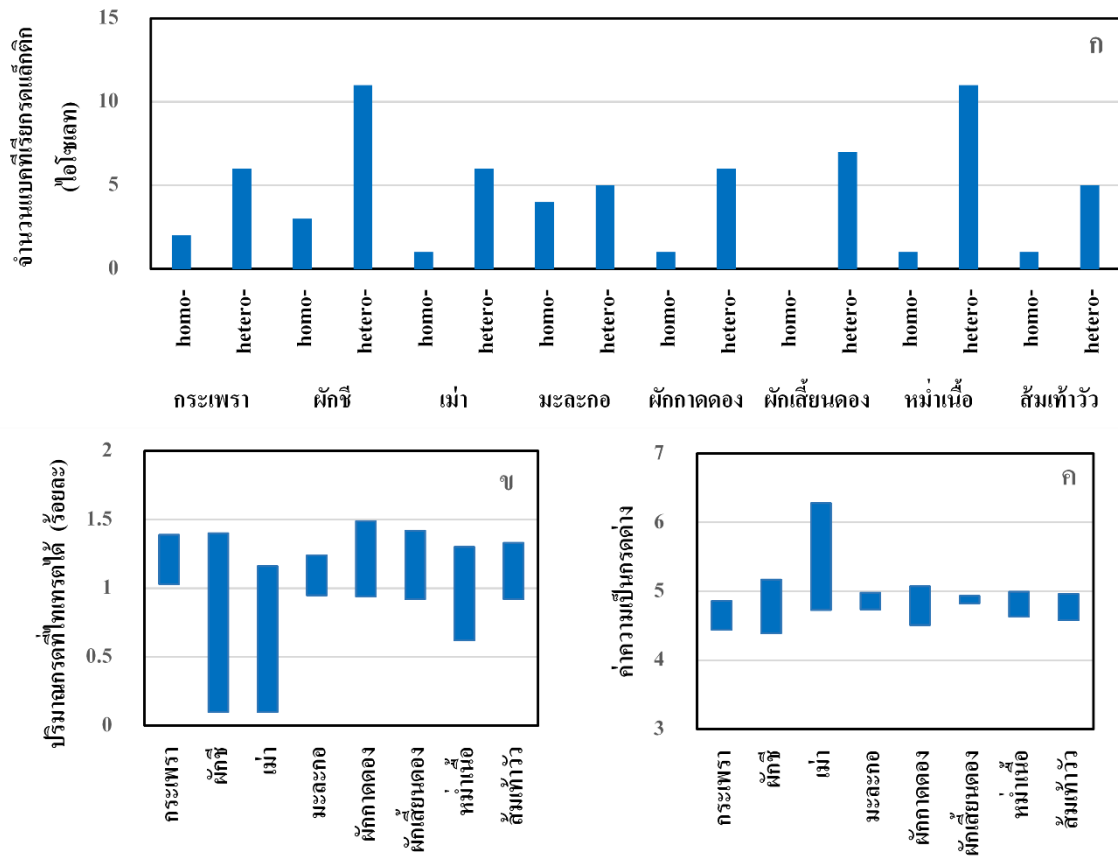
2. การศึกษาพื้นฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม (cocci) จำนวน 35 ไอโซเลท รูปไข่ (oval) จำนวน 29 ไอโซเลท และรูปท่อน (rod) จำนวน 6 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 57 ไอโซเลท มีรูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคสแบบโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ และจำนวน 13 ไอโซเลท เป็นแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเททิฟ (ภาพที่ 1ก) แบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตกรดแลคติกซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่ได้จาก

กระบวนการหมักน้ำตาลแบบ homofermentation และเมื่อมีการหมักแบบ heterofermentation จะพบการสร้างกรดแลคติกแล้วยังได้กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วย กรดอินทรีย์เป็นสารเมตาบอไลต์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง เมื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้ในรูปกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผักและผลไม้สร้างกรดโดยมีปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้มีค่าระหว่าง 0.10 ถึง 1.40 เปอร์เซ็นต์ และทำให้ค่าความเป็นกรดต่างในอาหาร

เลี้ยงเชื้อ MRS broth มีค่าลดลงมีค่าอยู่ในช่วง 4.44-6.28 ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักมีปริมาณกรดทั้งหมดที่ไทเทรตได้

ระหว่าง 0.62 ถึง 1.49 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรดต่างระหว่าง 4.51-5.10 (ภาพที่ 1ข และ 1ค)



ภาพที่ 1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ ที่มีการหมักน้ำตาลกลูโคสแบบ homofermentative และ heterofermentative (ก), ปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ (ข) และค่าความเป็นกรดต่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth หลังเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ค)

3. การทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* ของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยวิธี Agar well diffusion

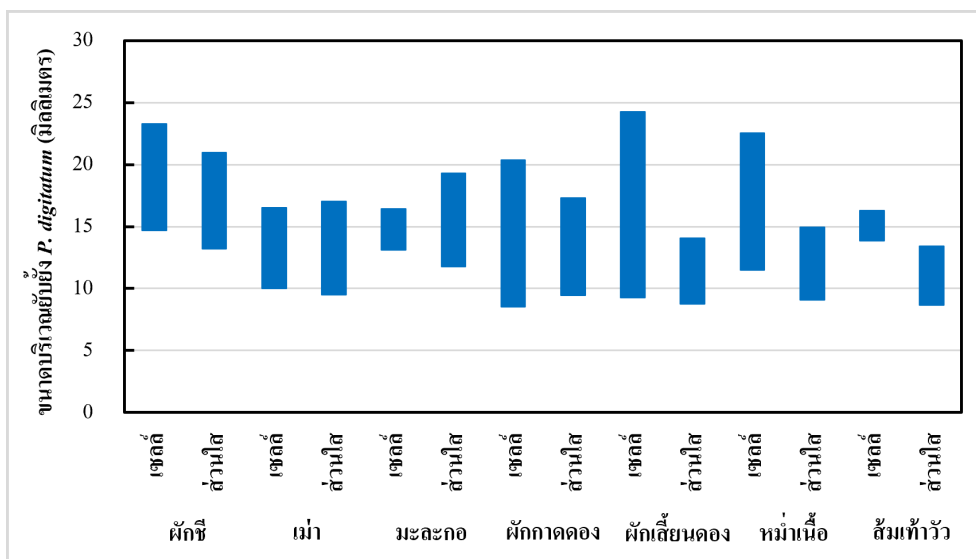
แบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดแยกได้จำนวน 31 ไอโซเลตมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* โดยเป็นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากผักชี, มะนาว, มะละกอ, ผักกาดคอง, ผักเสี้ยนคอง, หอม้านือ และส้มเท่าั่ว จำนวน 4, 3, 5, 4, 4, 7 และ 4 ไอโซเลต ตามลำดับ เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้ง *P. digitatum* ด้วยเซลล์สปอร์ พบว่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ

บริเวณยับยั้งมีขนาดระหว่าง 8.54 ± 1.06 ถึง 24.23 ± 5.63 มิลลิเมตร และเมื่อทดสอบด้วยสารละลายส่วนใส ปราศจากเซลล์ พบว่ามีขนาดระหว่าง 8.66 ± 0.75 ถึง 20.98 ± 4.29 มิลลิเมตร (ภาพที่ 2) แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. digitatum* ได้ดี ได้แก่ ไอโซเลต CR2-B และ CR3-A ที่คัดแยกได้จากผักชี, FLT6-2 จากผักกาดคอง, KJ6-1 จากผักเสี้ยนคองและ FSB5-3 และ FSB7-1 จากหอม้านือ โดยบริเวณยับยั้งของเซลล์ สปอร์มีขนาดระหว่าง 18.06 ± 4.04 ถึง 24.23 ± 5.63

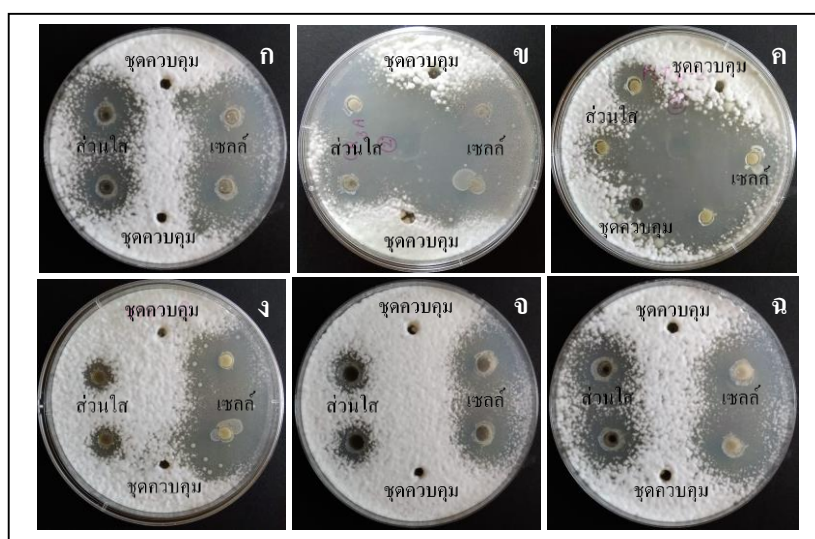
มิลลิเมตร ส่วนสารละลายส่วนไฮปราสาจากเซลล์มีขนาดระหว่าง 11.16 ± 1.30 ถึง 20.98 ± 4.29 มิลลิเมตร ทั้งนี้สารละลายส่วนไฮปราสาจากเซลล์ของทั้ง 6 ไอโซเลทมีปริมาณกรดที่ไทเทรตได้ระหว่าง 0.94 ถึง 1.38 เปอร์เซ็นต์ ก่อนหน้านี้เคยมีรายงานถึงฤทธิ์ยับยั้ง *P. digitatum* ของแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่ Ma *et al.* (2019) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากผิวและใบส้ม ดินที่เก็บจากสวนส้ม รวมทั้งใบของถั่วลิสงได้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดจำนวน 68 ไอโซเลท พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ยับยั้ง *P. digitatum* ได้ดี เช่นเดียวกับ Gerez *et al.* (2010) รายงานการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 8 ไอโซเลทที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* จากแบคทีเรียทั้งหมด 33 ไอโซเลทที่คัดแยกจากผลิตภัณฑ์นม, มะเขือเทศ, ถั่ว, กระหล่ำปลี และ sourdough การยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเกี่ยวข้องกับกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดอะซิติกและกรดแลคติกซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ที่ทำให้ค่าความเป็นกรดต่างของซบสเตรดต่ำลง กรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ทั้งยีสต์ ราและแบคทีเรีย นอกจากนี้ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ยังเกี่ยวข้องกับกรดอ่อนที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวที่แพร่เข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์เกิดการแตกตัวในไซโตพลาสซึม ทำให้เกิดสภาวะที่ยับยั้งกระบวนการเมแทบอลิซึมที่จำเป็นต่อเซลล์จึงมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้นอกจากนี้ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกอาจเป็นผลมาจากการผลิตสารอื่นอีก เช่น

คาร์บอนไดออกไซด์, ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ diacetyl สารขนาดเล็กอื่นๆ เช่น reuterin และแบคทีเรียโอซิน (Lindgren and Dobrogosz, 1990; Axelsson, 2004; Ouwehand and Vesterlund, 2004) จากการศึกษาของ Gerez *et al.* (2010) รายงานว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* เกี่ยวข้องกับกรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดฟีนอลแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้น อย่างไรก็ตามนอกจากกรดอินทรีย์ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. digitatum* แล้ว Ma *et al.* (2019) ยังพบว่าสารประกอบประเภทโปรตีนที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นก็มีบทบาทต่อการยับยั้ง *P. digitatum* ด้วย

ฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. digitatum* พบทั้งจากกิจกรรมของเซลล์ชีพบนชั้นและสารละลายส่วนไฮปราสาจากเซลล์ (ภาพที่ 3) สอดคล้องกับรายงานของ Denkova *et al.* (2013) ที่พบว่าทั้งเซลล์ *Lactobacillus* ในอาหารเหลว (Liquid culture) และสารละลายส่วนไฮมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา เช่นเดียวกับ Abbaszadeh *et al.* (2015) พบว่าเซลล์ของ *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. casei*, *L. paracasei* และ *Bifidobacterium bifidum* ในอาหารเหลวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *A. flavus*, *P. chrysogenum*, *A. niger* และ *A. parasiticus* ได้ดีกว่าสารละลายส่วนไฮ เนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา นอกจากจะเกี่ยวข้องกับกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นแล้ว ยังอาจเกิดจากการแข่งขันและแย่งอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติกและเชื้อรา รวมทั้งมีการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิโดยแบคทีเรียกรดแลคติกด้วย



ภาพที่ 2 ค่าต่ำสุดและสูงสุดของขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* โดยเซลล์ชั้นเพนชั้นและสารละลายส่วนใสปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแหล่งต่างๆ เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion



ภาพที่ 3 ขนาดบริเวณยับยั้ง *P. digitatum* เมื่อทดสอบด้วยเซลล์ชั้นเพนชั้นและสารละลายส่วนใสปราศจากเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท CR2-B (ก), CR3-A (ข), FLT6-2 (ค), KJ6-1 (ง), FSB5-3 (จ) และ FSB7-1 (ฉ) เมื่อทดสอบด้วยวิธี Agar well diffusion เปรียบเทียบกับ MRS broth ที่เป็นชุดควบคุมเชิงลบ

4. การระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทที่ยับยั้ง *P. digitatum* ได้ดี ได้แก่ CR2-B, CR3-A, FLT6-2, KJ6-1, FSB5-2 และ FSB7-1 โดย

ใช้เทคนิค 16S rRNA gene sequencing พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท เทียบเคียงเป็น *Lactobacillus pentosus* (99% identity) ดังแสดงในตารางที่ 2 Ma et al. (2019) ได้ระบุชนิดแบคทีเรีย

กรดแลคติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. digitatum* จำนวน 10 ไอโซเลท พบว่าเป็น *L. suvicola*, *Weissella paramesenteroides* และ *Pediococcus acidilactici* นอกจากนี้ Gerez *et al.* (2010) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 8 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. plantarum* (CRL

1081, CRL 778, และ CRL 1073), *L. casei* (CRL 76 และ CRL 208), *L. acidophilus* CRL 1063, *L. paracasei* CRL 1501 และ *P. pentosaceus* CRL 908 มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. digitatum* ได้

ตารางที่ 2 ผลการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อรา *P. digitatum* ได้ดี โดยใช้เทคนิค 16S rRNA gene sequencing

ไอโซเลท	แหล่งที่มา	Accession	Description	Identities	
				Match/Total	percent
CR2-B	ผักชี	NR_029133.1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1497/1499	99
CR3-A	ผักชี	NR_029133.1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1499/1504	99
FLT6-2	ผักกาดคอง	NR_029133.1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1501/1503	99
KJ6-1	ผักเสี้ยนคอง	NR_029133.1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1503/1506	99
FSB5-3	หม่ำเนื้อ	NR_029133.1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1501/1503	99
FSB7-1	หม่ำเนื้อ	NR_029133.1	<i>Lactobacillus pentosus</i>	1505/1506	99

สรุป

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากผัก ผลไม้ และผลิตภัณฑ์อาหารหมัก จำนวน 6 ไอโซเลท มีฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. digitatum* ได้ดี เมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยเทคนิค 16S rRNA gene sequencing พบว่าเป็น *Lactobacillus pentosus* โดยฤทธิ์ในการยับยั้ง *P. digitatum* พบทั้งในส่วนเซลล์สดเพนซ์และส่วนไลสพลาสมจากเซลล์ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ในการนำไปใช้เป็นสารควบคุมทางชีวภาพในส้มต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และขอขอบคุณคณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนครที่สนับสนุนสถานที่และเครื่องมือในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

- Abbaszadeh, S., Tavakoli, R., Sharifzadeh, A., Shokri, H. 2015. Lactic acid bacteria as functional probiotic isolates for inhibiting the growth of *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. niger* and *Penicillium chrysogenum*. **Journal of Medical Mycology** 25(4): 263-267.
- AOAC. 2000. **Official Method of Analysis**. 17th ed. Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Axelsson, L. 2004. Lactic acid bacteria: Classification and physiology, pp. 1-66. In Salminen, S. and Wright, A.V., eds. **Lactic Acid Bacteria:**

Microbiological and Functional Aspects.

Marcel Dekker Inc., New York.

Dalie, D.K.D., Deschamps, A.M. and Richard-Forget, F. 2010. Lactic acid bacteria-potential for control of mould growth and mycotoxins: a review. **Food Control** 21(4): 370-380.

Denkova, R., Denkova, Z., Yanakieva, V. and Blazheva, D. 2013. Antimicrobial activity of probiotic lactobacilli, bifidobacteria and propionic acid bacteria, isolated from different sources. **Microbial Pathogens and Strategies for Combating Them: Science Technology and Education** 2: 857-864.

Di Cagno, R., Coda, R., De Angelis, M. and Gobetti, M. 2013. Exploitation of vegetables and fruits through lactic acid fermentation. **Food Microbiology** 33: 1-10.

Gerez, C.L., Carbajo, M.S., Rollán, G., Torres, L.G. and Font de Valdez, G. 2010. Inhibition of citrus fungal pathogens by using lactic acid bacteria. **Journal of Food science** 75(6): M354-359.

Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. **FEMS Microbiology Reviews** 7: 149-163.

Liu, W., Pang, H., Zhang, H. and Cai, Y. 2014. Biodiversity of lactic acid bacteria, pp 103-203. In Zhang, H. and Cai, Y., eds. **Lactic Acid Bacteria**. Springer, Dordrecht.

Ma, J., Hong, Y., Deng, L., Yi, L. and Zeng, K. 2019. Screening and characterization of lactic acid bacteria with antifungal activity against

Penicillium digitatum on citrus. **Biological Control** 138: 1-8.

Ouwehand, A.C. and Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria, pp. 375-395. In Salminen, S., Von Wright, A. and Ouwehand, A., eds. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. Marcel Dekker, Inc., New York.

Palou, L. 2014. *Penicillium digitatum*, *Penicillium italicum* (Green Mold, Blue Mold), pp.45-102. In Bautista-Baños, S., eds. **Postharvest Decay**. Academic Press, Elsevier Inc., London, UK.

Rezac, S., Kok, C.R., Heermann, M. and Hutkins, R. 2018. Fermented foods as a dietary source of live organisms. **Frontiers in Microbiology** 9: 1785. doi: 10.3389/fmicb.2018.01785.

Ruiz Rodríguez, L.G., Florencia, M., Juliana, B., Roxana, M., Luc, D.V., Hebert, E.M. and Fernanda, M. 2019. Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. **Frontiers in Microbiology** 10: 1091. doi: 10.3389/fmicb.2019.01091.

Temitope, F.P. and Oluchi, U.E. 2015. Studies on the antifungal activity of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum* on spoilage fungi of tomato fruit. **Journal of Microbiology Research** 5(3): 95-100.

Yang, J., Tan, H. and Cai, Y. 2016. Characteristics of lactic acid bacteria isolates and their effect on silage fermentation of fruit residues. **Journal of Dairy Science** 99(7): 5325-5334.