บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

1. ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Fermented fish)

ในแถบเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีผลิตภัณฑ์ปลาหมักหลายชนิด ส่วนใหญ่จัดเป็นผลิตภัณฑ์อาหารพื้นเมืองมีชื่อเรียกที่แตกต่างกันไปตามกรรมวิธีการผลิต และวัตถุดิบที่นำมาใช้ในการหมักที่แตกต่างกัน แต่สิ่งที่มีความเหมือนกัน คือ การใช้ปลาและเกลือเป็นวัตถุดิบหลักในการหมัก มัทนา (2548) ได้จำแนกผลิตภัณฑ์ปลาหมักออกได้เป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มผลิตภัณฑ์ชนิดที่เป็น fermented fish salt / carbohydrate products ได้แก่ ปลาร้า (pla-ra) ปลาเจ่า (pla-chao) ปลาส้ม (pla-som) และส้มฟัก (som-fak)

2. กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่เป็นชนิด fish sauce เช่น น้ำปลา (nam-pla) บูดู (budu) ไตปลา (tipla) และปลาจิ้งจั้งหมัก (pla Jing Jung)

นอกจากนี้ ผลิตภัณฑ์ปลาหมักสามารถจำแนกตามกรรมวิธีผลิต และกระบวนการหมัก ออกเป็น 3 ประเภท คือ (นฤมล, 2550)

1. กลุ่มผลิตภัณฑ์พื้นเมือง ที่กระบวนการผลิตอาศัยปฏิกิริยาจากเอนไซม์ของเนื้อปลา และอวัยวะภายในของปลา โดยใช้เกลือปริมาณสูงในกระบวนการหมัก เพื่อป้องกันการเน่าเสียจากแบคทีเรีย ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ น้ำปลา น้ำบูดู กะปิ ไตปลา ปลาทูเค็ม และปูเค็ม เป็นต้น

2. ผลิตภัณฑ์พื้นเมือง ที่ปฏิกิริยาในกระบวนการหมักมี 2 ระยะ คือ ระยะที่เกิดจากเอนไซม์ในเนื้อปลา กับระยะที่เกิดจากการเติมเชื้อจุลินทรีย์ หรือการใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ผลิตภัณฑ์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ ปลาร้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม ปลาเจ่า ปลาส้ม ไข่ปลาดอง ปลาแป้งแดง และส้มฟัก เป็นต้น

Prince of Songkla University Pattani Campus

3. ผลิตภัณฑ์ที่เกิดโดยอาศัยการย่อยสลายทางเคมี เช่น การเติมกรดบางชนิดเพื่อเร่งปฏิกิริยา มีผักหรือผลไม้เป็นส่วนประกอบ อาหารหมักส่วนใหญ่เป็นอาหารที่นิยมกันในท้องถิ่น เช่น เค็มหมักนัด (เค็มสับปะรด) เป็นปลาหมักเกลือผสมสับปะรด ปลาหม่ำ ปลาหมักเกลือผสมข้าวคั่ว มะละกอ และข่า

ผลิตภัณฑ์ปลาหมักเกลือความเข้มข้นสูงในภาคใต้ ได้แก่

บูดู เป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักพื้นเมืองของภาคใต้ที่สำคัญมีแหล่งผลิตสำคัญอยู่ที่อำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี ซึ่งนิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย มีคุณค่าทางโภชนาการสูง เนื่องจากมีองค์ประกอบสำคัญคือ โปรตีนจากเนื้อปลา ซึ่งมีส่วนประกอบของกรดอะมิโน (amino acid) กรดไขมัน (fatty acid) แร่ธาตุที่สำคัญ ๆ หลายชนิด เช่น โปรตีน แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก ไขมัน วิตามินบี 12 ในปริมาณมาก (นำพล และคณะ, 2544) บูดูมีค่า water activity (a_w) เท่ากับ 0.72 – 0.73 ปริมาณโปรตีน 2 – 12% เกลือ (NaCl) 12 – 30% และกรดแลคติก 0.03 – 0.14% ขึ้นกับเกรดของน้ำบูดู (วิภาดา และคณะ, 2552) คุณค่าทางโภชนาการ และรสชาติของบูดู ขึ้นอยู่กับชนิดและความสดของปลา อัตราส่วนของปลากับเกลือ ระยะเวลาในการหมัก อุณหภูมิในการหมัก รวมถึงเทคนิคเฉพาะในการหมัก ปัจจัยที่มีผลต่อการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ประกอบด้วย

1. <u>วัตถุดิบ</u> วัตถุดิบในการหมัก ได้แก่ (นงนุช, 2538)

1.1 ชนิดของปลา มีผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ซึ่งลักษณะเนื้อของปลาแต่ละชนิดซึ่งต่างกัน ทำให้เหมาะแก่การทำผลิตภัณฑ์แต่ละประเภท ชนิดและความสดของปลาแต่ละชนิดมีส่วนประกอบทางเคมี ได้แก่ โปรตีน ไขมัน น้ำ และแร่ธาตุแตกต่างกัน ปลาส่วนใหญ่ที่นำมาใช้หมักบูดู ได้แก่ ปลากะตัก (*Stolephorus indicus*) ปลาหลังเขียว (*Sardine* sp.) ปลาแดง (*Phalacronotus bleekeri*) และปลาทูแขก (*Decapterus macrosoma*) แต่ที่นิยมกันมาก คือ ปลากะตักสด เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นคือที่ทำให้บูดูมีกลิ่นหอมรสชาติดี (นำพล และคณะ, 2544) เนื่องจากปลากะตักมีไขมัน 13 - 16% ซึ่งไขมันในตัวปลาชนิดนี้เป็นไขมันชนิดที่ไม่อิ่มตัวสูง ประกอบด้วยไตรกลีเซอไรด์ (triglyceride) เป็นส่วนใหญ่ซึ่งจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ในตัวปลาและจากจุลินทรีย์ให้กรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid) กรดโพรไพโอนิก

Prince of Songkla University Pattani Campus

(propionic acid) กรดบิวทิริก (n-butyric acid) กรดไอโซวาเลอริก (iso-valeric acid) และ กรดไขมันระเหยไม่ได้ ได้แก่ กรดแลคติก นอกจากนี้ยังพบคีโตน (ketone) และแอลดีไฮด์ (aldehyde) (จริยา และคณะ, 2552)

1.2 เกลือ ใช้เพื่อควบคุมชนิดและการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์ เนื่องจากเกลือมีผลทำให้แรงดันออสโมติค (osmotic pressure) ของผลิตภัณฑ์เปลี่ยนไป ค่า water activity ลดลง จึงมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ตามรายงานของ Grakikoski (1971) อ้างโดย ธนุสรา และคณะ (2533) กล่าวว่าในเกลือทะเลจะพบจุลินทรีย์ในกลุ่ม *Bacillus* ได้แก่ *B. subtilis, B. megaterium* นอกจากนี้ยังพบ *Micrococcus* sp. *Sarcina* sp. และ *Halobacterium* sp.

2. <u>กระบวนการหมักบูดู</u> กรรมการวิธีการผลิตเป็นแบบภูมิปัญญาชาวบ้าน โดยการ คัดปลากะตักสดตาใส เนื้อแน่น ท้องไม่แตก ขจัดสิ่งเจือปน และปลาตัวใหญ่ออก ผสมด้วยเกลืออัตราส่วน 3 ต่อ 1 ส่วน คลุกเคล้าให้เข้ากันแล้วนำมาอัดลงในโอ่งเคลือบหรือบ่อซีเมนต์หมักทิ้งไว้ประมาณ 8 - 12 เดือน (ทัศนียา, 2546) โดยให้โรยเกลือเพื่อรองพื้นโอ่งลงไปก่อน 1 ชั้น แล้วจึงเทปลาที่คลุกเกลือไว้แล้วลงไปในโอ่ง โรยเกลือทับด้านบนอีกครั้งก่อนปิดฝาโอ่งด้วยกระสอบปิดไว้ รอจนปลายุบตัว เพื่อให้อากาศเข้าไปในบ่อหมักให้น้อยที่สุดแล้วจึงเติมปลาที่คลุกเกลือทับลงไปในบ่ออีกครั้งจนเต็มบ่อ โดยให้เว้นบริเวณขอบเล็กน้อยเพื่อกันแก๊สที่ดันออกมา แล้วปิดด้วยกระสอบให้มิดชิด และปิดทับด้วยกระเบื้องด้านบนอีกครั้ง เพื่อไม่ให้โดนฝน หมักทิ้งไว้ประมาณ 10 - 12 เดือน ในระหว่างการหมักไม่ควรเปิดบ่อหมัก เพราะจะทำให้รบกวนกระบวนหมักบูดู จนอาจจะส่งผลต่อคุณภาพของบูดู หรือส่งผลให้บูดูเสียสภาพได้ การเก็บน้ำหมักบูดู หลังจากที่อายุการหมักครบ 1 ปีก็จะเปิดฝาบ่อแล้วนำแกลลอนเจาะรูปเปิดหัวท้ายวางลงตรงกลางบ่อ เพื่อให้น้ำหมักซึมเข้าในแกลลอน แล้วตักน้ำหมักออกแล้วนำไปกรองสิ่งสกปรกออก นำไปบรรจุขวดเพื่อจำหน่ายหรือบรรจุถังเพื่อแบ่งขายตามท้องตลาด

การหมักมี 2 รูปแบบ คือ การหมักไว้ในที่ร่ม และการหมักกลางแจ้ง ซึ่ง วรรณา และคณะ (2541) พบว่า การหมักไว้กลางแจ้งอุณหภูมิประมาณ 38 – 45°C ทำให้บูดูมีคุณภาพดีกว่าการหมักในที่ร่ม โดยทั่วไปบูดูจะใช้เวลาในการหมัก 10 – 12 เดือน ใน

Prince of Songkla University Pattani Campus

ระหว่างการหมักมีการเปลี่ยนแปลงทางทางภาพของเนื้อปลา บูดูที่หมักเป็นเวลา 15 - 60 วัน จะมีลักษณะคือ เนื้อปลานิ่มลงผลเนื่องจากเอนไซม์จากปลาและแบคทีเรียร่วมกันย่อยสลายให้เนื้อปลานิ่มลง สีของเนื้อปลาซีดลง กลิ่นคาวปลาลดลง เมื่อกวนน้ำหมักปลาจะข้นมากกว่าน้ำหมักปลาในระยะแรก ไขมันของปลาจะเปลี่ยนจากสีเหลืองเป็นสีน้ำตาล และลอยอยู่บนผิวน้ำมากขึ้น บูดูที่หมักเป็นเวลา 3 - 4 เดือน เนื้อปลาเริ่มเปื่อยหลุดออกจากก้างปลากลายเป็นของเหลวข้นสีเทาอมแดง ส่วนน้ำหมักปลาเป็นสีน้ำตาลเป็นผลจากกรดอะมิโน (amino acid) ทำปฏิกิริยากับน้ำตาลไรโบส (ribose) และกลิ่นคาวปลาจะหายไป แต่มีกลิ่นคล้ายน้ำปลาแทน บูดูที่หมักเป็นเวลา 8 - 12 เดือน จัดเป็นบูดูที่มีคุณภาพดี บูดูที่ได้จะมีกลิ่นหอม เนื้อปลาจะละเอียด น้ำหมักปลาจะมีสีน้ำตาลและใสขึ้น (ทัศนียา, 2546) สำหรับอัตราการย่อยสลายของเนื้อปลาในกระบวนการหมักบูดูจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 10 – 70 วันแรกของการหมัก และปริมาณแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 และวันที่ 10 ของการหมัก

3. <u>จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก</u> ปริมาณจุลินทรีย์ที่พบในน้ำบูดูอยู่ในช่วง 10^6-10^9 เซลล์ต่อกรัม เชื้อที่พบมากในการหมัก คือ แบคทีเรียแกรมบวกในสกุล *Pediococcus, Staphylococcus* และ *Micrococcus* (พงษ์เทพ, 2546) ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียในกระบวนการหมักนี้ออกได้เป็น 3 กลุ่ม คือ (มาลี, 2522 อ้างโดย ธนุสรา และคณะ, 2533) กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่ย่อยโปรตีน ได้แก่ *Bacillus* spp. และ *Micrococcus* spp. กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ย่อยไขมัน ได้แก่ *Lactobacillus* spp. *Bacillus* spp. และ *Achromobacter* spp. กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Pediococcus* spp.

4. <u>ปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการหมัก</u> ประกอบด้วย pH จะช่วยควบคุมทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ สารอาหารที่จุลินทรีย์ใช้เป็นแหล่งพลังงานซึ่งมีความแตกต่างสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด ปริมาณสารอาหารเป็นตัวควบคุมชนิดของการหมักได้ ปริมาณออกซิเจน (O_2) ในกระบวนการหมักต้องการออกซิเจนในปริมาณเล็กน้อย (microaerophilic fermentation) อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญหรือในการสร้างเอนไซม์จุลินทรีย์แต่ละชนิดและปริมาณเกลือมีผลในการเลือกชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในกระบวนการหมัก รวมถึงเป็นตัวกำหนดลักษณะของผลิตภัณฑ์ (Desrosier,1970 อ้าง

โดย พงษ์เทพ, 2546)

ไตปลา (ภาคกลาง) หรือ พุงปลา (ภาคใต้) เป็นการถนอมอาหารแบบหมักดองชนิดหนึ่ง โดยใช้กระเพาะของปลา เช่น ปลาทู ปลาลัง ปลาดุก ปลาช่อน หรือปลาอื่น ๆ นำมาหมักกับเกลือในปริมาณที่ค่อนข้างสูง หมักไว้นาน 10 - 30 วัน หรือบางแหล่งผลิตหรือบางท้องที่อาจจะใช้ส่วนสัดส่วนของเครื่องในปลากับเกลือในอัตราส่วน 5 ต่อ 1 ใช้เวลาในการหมักนาน 3 - 4 สัปดาห์ บางรายอาจผสมดินประสิวเพื่อให้ไตปลามีสีแดง (นงนุช, 2538) ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในไตปลา ได้แก่ *Bacillus subtilis B. polymyxa Micrococcus* sp. *Pediococcus halophilus Pediococcus* sp. *Staphylococcus epidermidis* และ *Vibrio fisheri* (อรดี, 2542)

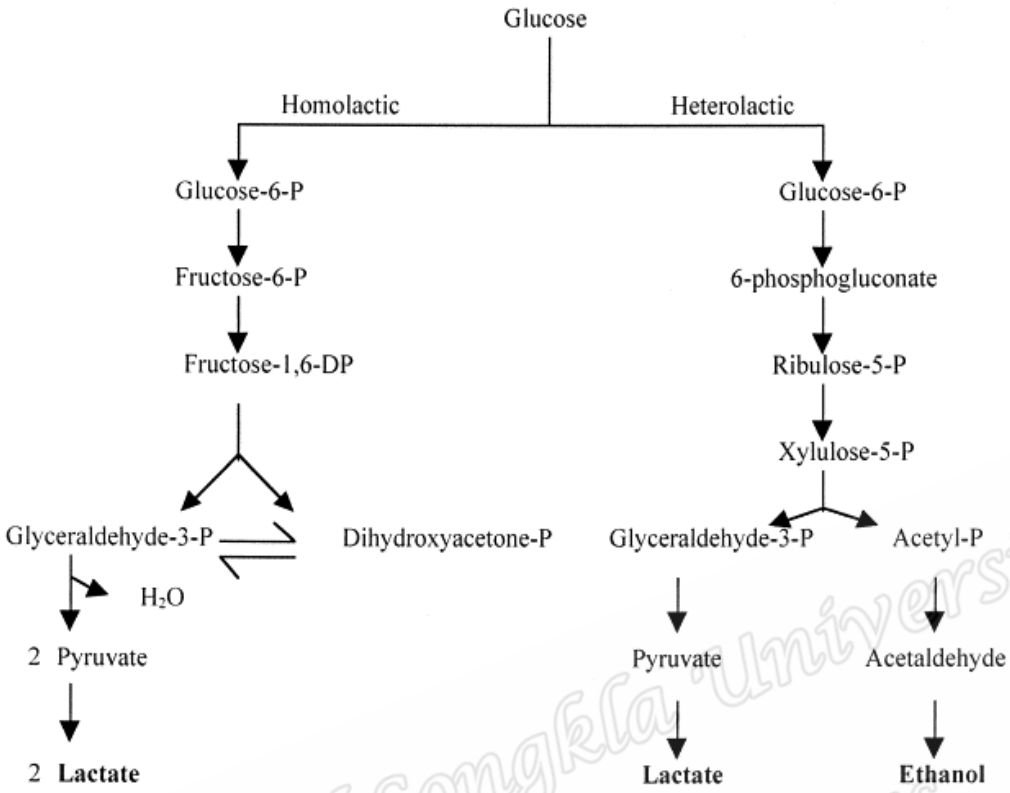
2 แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างกลม ท่อนสั้นและท่อนยาว ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนในการเจริญเพียงเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีอากาศ และไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส แต่สามารถสร้างคะตะเลสเทียม (psuedo catalase) ต้องการพลังงานจากการหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) โดยไม่ใช้ออกซิเจน ความต้องการอาหารค่อนข้างสลับซับซ้อน ใช้กรดอะมิโนเป็นแหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) และสามารถเจริญเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีส่วนผสมของวิตามินต่าง ๆ เพื่อช่วยเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไบโอติน (biotin) ไรโบฟลาวิน (riboflavin) นอกจากนี้ยังต้องการสารอนินทรีย์ เช่น แมงกานีส (manganese) แมกนีเซียม (magnesium) ฟอสฟอรัส (phosphorus) ในปริมาณสูง (Axelsson, 1993) แบคทีเรียกรดแลคติกประกอบไปด้วยแบคทีเรีย 12 สกุล ตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา กระบวนการหมักน้ำตาล ความสามารถในการเจริญที่สภาวะต่างๆ ชนิด ไอโซเมอร์ของกรดแลคติกรวมถึงข้อมูลด้านพันธุกรรม ได้แก่ *Aerococcus Carnobacterium Enterococcus Lactobacillus Lactococcus Leuconostoc Oenococcus Pediococcus Streptococcus Tetragenococcus Weissella* และ *Vagococcus* (Stiles and Holzafel, 1997) กรดแลคติกออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ ตามการใช้อาหารและการสร้างอาหาร (Wood and Holzapfel, 1995) คือ

2.1 Homofermentative bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกได้ประมาณ 85-95% จากการหมักคาร์โบไฮเดรต มีการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลแลคโตสแล้วซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโทพลาซึม (Caplice and Fitzgerald,1999) เชื้อที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ *Enterococcus faecalis Lactobacillus casei L. delbrueckii L. plantarum* และ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* (Holzapfel and Wood, 1995) ซึ่งกระบวนการหมักของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1A

2.2 Heterofermentative bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกประมาณ 50% ส่วนที่เหลือเป็นกรดอะซิติก (acetic acid) แอลกอฮอล์ (alcohol) และคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide: CO_2) จากการหมักคาร์โบไฮเดรต (Caplice and Fitzgerald,1999) เชื้อที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus brevis L. bifermentans L. fermentum Leuconostoc lactis* และ *L. mesenteroides* (Holzapfel and Wood, 1995) ซึ่งกระบวนการหมักของแบคทีเรียกลุ่มนี้ ดังแสดงไว้ในรูปที่ 1B

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 1 กระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติก
(A) Homofermentative (B) Heterofermentative

ที่มา : Caplice and Fitzgerald (1999)

Prince of Songkla University Pattani Campus

3. แบคทีเรียกรดแลคติกชอบเกลือ (Halophilic lactic acid bacteria)

Halophillic bacteria หรือ halophile เป็นแบคทีเรียที่เจริญเติบโตได้ดีในที่ ๆ มีความเข้มข้นของเกลือสูง ค่า water activity (aw) ต่ำสุดที่แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้คือ 0.75 แบคทีเรียชนิดนี้สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามความเข้มข้นของ NaCl ที่ต้องการใช้ในการเจริญเติบโต (Cyplik *et al*., 2007)

3.1 กลุ่มที่ชอบเกลือเล็กน้อย (poor halophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่เติบโตได้ดีในอาหารที่มี NaCl เข้มข้น 0.5 - 3% สามารถแยกได้จากปลาและอาหารทะเล

3.2 กลุ่มที่ชอบเกลือปานกลาง (moderate halophilic bacteria) เป็นแบคทีเรียกรด แลคติกที่เติบโตได้ดีในอาหารที่มี NaCl เข้มข้น 3 - 15% สามารถแยกได้จากปลาเค็ม เนื้อเค็ม ผักดองต่าง ๆ

3.3 กลุ่มที่ชอบเกลือสูง (extreme halophiles) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่เติบโตได้ดีในอาหารที่มี NaCl เข้มข้น 15 - 30%

3.4 กลุ่มที่ทนเกลือ (halotolerant) คือ สามารถเติบโตได้ทั้งในสภาพมีเกลือและไม่มีเกลือ โดยทั่วไปพวกนี้สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มี NaCl เข้มข้น 5% หรือมากกว่า

จากการศึกษาของ Kobayashi *et al.* (2003) ซึ่งได้คัดแยกและศึกษาลักษณะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกชอบเกลือจาก terasi ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์จากการหมักของอินโดนีเซียที่นำกุ้งมาหมักกับเกลือ (shrimp paste) เชื้อที่พบเป็นแบคทีเรียในกลุ่มของ *Tetetragenococcus* ได้แก่ *Tetragenococcus halophilu*s และ *T. muriaticus* ในขณะที่การศึกษาของ Hanagata *et al.* (2003) ซึ่งคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากซอสถั่วเหลืองของญี่ปุ่น รายงานว่า เชื้อทั้งหมดที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม จับกลุ่ม 4 เซลล์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้าง เอนไซม์คะตะเลส จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative lactic acid bacteria สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้น NaCl 0 - 15% แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ NaCl เข้มข้น 2.5 – 5.0% อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อยู่ในช่วง 23 - 30°C เชื้อมีการผลิตกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose) ฟรุกโตส (fructose) กาแลค

Prince of Songkla University Pattani Campus

โตส (galactose) แมนโนส (mannose) และอินูลิน (inulin) เชื้อที่พบ คือ *T. halophilus* ส่วนการศึกษาของ Tanasupawat *et al*., (2002) ซึ่งศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากซอสถั่วเหลือง โดยใช้ตัวอย่างจากโรงงานผลิตในจังหวัดสมุทรสาคร และสมุทรปราการ พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ เป็นแบคทีเรีย แกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ และไม่สร้างสปอร์ รูปร่างกลมและรูปร่างท่อน สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ความเข้มข้นของ NaCl 10 - 18% เชื้อที่พบได้แก่ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในจีนัส *Tetragenococcus* และ *Lactobacillus* การศึกษาของ Chen *et al.* (2006a) ได้คัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจาก dochi ผลิตภัณฑ์จากการหมักถั่วดำของประเทศไต้หวัน เป็นอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 15% สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 52 ไอโซเลท เชื้อที่พบส่วนใหญ่คือ *Enterococcus faecium* แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกทั้งหมดเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของ NaCl 6% และเฉพาะ *Enterococcus* spp. *Pediococcus* spp. และ *Tetragenococcus* spp. เจริญในอาหาร MRS broth ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 10% และการศึกษาของ Udomsil *et al. (*2010) คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทนเกลือจาก mashes ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักในช่วงอายุการหมัก 1 - 12 เดือน พบว่า เชื้อทั้งหมดที่แยกได้เป็นเชื้อแกรมบวก รูปร่างกลมจับคู่สี่เซลล์ และเจริญในสภาวะที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0 - 25% pH ในช่วง 4.5 - 9.0 เชื้อที่พบจัดจำแนกเป็น *T. halophilus*

Prince of Songkla University Pattani Campus

4. สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียของอาหารได้ ได้แก่ *B. cereus Clostridium botulinum C. perfringens S. aureus* และ *Listeria monocytogenes* De Vuyst and Vandamme (1994) นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งรวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดได้อีกด้วย การประยุกต์ใช้สารยับยั้งที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติก มีข้อดีหลายประการ กล่าวคือ ช่วยยืดอายุการเก็บของอาหาร สามารถเก็บอาหารที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ ลดความเสี่ยงจากการแพร่กระจายของเชื้อก่อโรคในอาหาร ลดค่าใช้จ่ายจากการเน่าเสียของอาหาร ลดการใช้สารเคมีในการถนอมอาหาร รักษาคุณค่าของสารอาหารและวิตามินในอาหาร เนื่องจากไม่ใช้ความร้อนในการทำลายเชื้อแบคทีเรียในอาหาร สารยับยั้งจากแบคเรียกรดแลคติกได้แก่ (อรอนงค์, 2550)

4.1 กรดอินทรีย์ (organic acid) ที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ได้แก่กรดแลคติก และ กรดอะซิติก เกิดจากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต มีผลทำให้ค่า pH ของอาหารลดลง ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญทำให้แบคทีเรียกรดแลคติก ถูกนำมาใช้ในการถนอมอาหาร เนื่องจากสภาวะความเป็นกรดจะสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทั้งแกรมลบ และแกรมบวกได้ (Davidson, 1997) โดยกรดอะซิติกจะมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดแลคติก (Blam and Mortvedt, 1991) กรดอื่น ๆ ได้แก่ กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid) แอมโมเนีย (ammonia) และเอทานอล (ethanol) เหล่านี้มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก

4.2 ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2)แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้าง H_2O_2 ได้ ในสภาวะที่มีออกซิเจน H_2O_2 เป็นสารฆ่าเชื้อ (sanitizer) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งโดยการทำให้เกิดปฏิกิริยา peroxidation ของไขมันที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย ทำให้ความสามารถในการซึมผ่านเข้าและออกของสารต่าง ๆ บนเยื่อหุ้มเซลล์เสียไป โดยจะทำให้เกิด oxidizing effect ภายในเซลล์ ไปทำลายโครงสร้างโมเลกุลของโปรตีนภายในเซลล์ (DeVuyst and Vandamm, 1994) จุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งการเจริญด้วย H_2O_2 เช่น *S. aureus Pseudomonas* spp. และ *P. fragi*

(Caplice and Fitzgerald, 1999)

4.3 **คาร์บอนไดออกไซด์** (CO_2) การศึกษาของ Todorov *et al.* (2006) ซึ่งศึกษาคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก boza ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักของชาวบัลเกเรีย พบว่า เชื้อที่ได้สามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักกลูโคส และสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 10 % (v/v) สามารถลดจำนวนแบคทีเรียได้ถึง 50 % และสามารถยับยั้งราได้ 20 - 50 % (Blam and Mortvedt, 1991)

4.4 **ไดอะซิติล** (Diacety) **หรือ** 2,3-butanedione เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์ pyruvate เป็นสารให้กลิ่นหอมในอาหารหมัก สามารถยับยั้งการเจริญได้ทั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารและเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์ และรา และยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้บ้าง นิยมนำมาใช้เป็น aseptic agent ในการทำความสะอาดภาชนะหรือเครื่องมือต่าง ๆ ในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากเป็นสารที่ระเหยได้เร็ว แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างไดอะซิติล ได้แก่ *Lactococcus Leuconostoc Streptococcus Pediococcus* และ *Lactobacillus* เป็นต้น (Caplice and Fitzgerald, 1999)

4.5 **แบคเทอริโอซิน** (Bacteriocin) เป็นสารประกอบโปรตีนที่ผลิตโดยแบคทีเรียมีคุณสมบัติการออกฤทธิ์ยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียชนิดเดียวกันหรือที่ใกล้เคียงกับแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินออกมา มีผลต่อการยับยั้งจุลินทร์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทางเดินทางอาหาร เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Staphylococcus aureus, Listeria monocytogenes, Aeromonas hydrophila* และ *Micrococcus luteus* (Halami *et al.,* 2000)

Prince of Songkla University Pattani Campus

5. คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูง

การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง พบว่า แบคทีเรียส่วนใหญ่ที่คัดแยกได้อยู่ในกลุ่มของ *Tetragenococcus* และ *Pediococcus* ซึ่งคัดแยกได้จากอาหารหมักที่มีความเข้มข้น NaCl สูง อยู่ในช่วง 15 – 30% ตามรายงานของ RÖling and Van Verseveld (1996) กล่าวว่า *T. halophilus* สามารถพบได้ในแหล่งที่มีความเข้มข้น NaCl อยู่ในช่วง 12 - 26% โดยแบคทีเรียในกลุ่ม moderate halophilic lactic acid bacteria สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นอย่างน้อย 0.5 - 30% แต่เจริญได้ดีที่ความเข้มข้น NaCl 10% (Ventosa *et al.*, 1998) คุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากอาหารหมักเกลือที่มีความเข้มข้นค่อนข้างสูงดังแสดงไว้ในตารางที่ 1

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 1 คุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกจากอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูง

ชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก	แหล่งที่มา (%NaCl)	การเจริญ			อ้างอิง
		(%) NaCl	pH	อุณหภูมิ (ºC)	
Enterococcus faecium	Dochi (15%)	0 , 6, 10	-	-	Chen *et al*. (2006a)
Lactococcus sp.	Miso-paste	-	-	-	Onda *et al.* (2003)
Pediococcus acidilactic	Dochi (15%)	0 ,6, 10	-	-	Chen *et al.* (2006a)
P. pentosaceus	Suan-tsai (13%)	0, 10* * no growth	-	45	Chen *et al.* (2006b)
Tetragenococcus halophilus	Dochi (15%)	0, 6, 10	-	-	Chen *et al.* (2006a)
T. halophilus	Terasi shrimp paste (17%)	0 ,18	7.5 , 8.5	40	Kobayashi *et al.* (2003)
T. halophilus	Soy sauce mash (8-17.3%)	18	8.5	42	Tanasupawat *et al.* (2002)
T. halophilus	Suan-tsai (13%)	10	-	45	Chen *et al.* (2006b)
T. halophilus	Shoyu mash (18%)	0 - 15	-	37	Hanagata *et al.* (2003)
T. muriaticus	Terasi shrimp paste (17%)	0, 18	7.5, 8.5	40	Kobayashi *et al*. (2003)

(-) = ไม่มีรายงาน

Prince of Songkla University Pattani Campus