บทที่ 4

ผลและวิจารณ์

1. ตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาศึกษา

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ได้แก่ ไตปลา ปลาจิ้งจั้งหมัก และบูดู จำนวนตัวอย่างทั้งหมด 40 ตัวอย่าง สำหรับใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวน	เปอร์เซ็นต์
ไตปลา	10	25
ปลาจิ้งจั้งหมัก	2	5
บูดู	28	70

ตัวอย่างอาหารหมักเกลือความเข้มข้นสูงที่ใช้ในการศึกษานี้หาซื้อจากแหล่งผลิตอยู่ในตำบลบ้านทอน และอำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี และที่วางจำหน่ายตามท้องตลาดในเขตอำเภอเมืองปัตตานี โดยตัวอย่างบูดูได้มาจากการหมักบูดูรายย่อย ๆ จาก 4 หมู่บ้าน คือ หมู่ที่ 1 บ้านปาตา บาระ หมู่ที่ 2 บ้านบน หมู่ที่ 3 บานปะเสยาวอ และหมู่ที่ 7 บ้านลุ่ม อำเภอสายบุรี ตัวอย่างที่เก็บส่วนใหญ่จะอยู่ในช่วงปลายของการหมัก และบูดูที่สิ้นสุดกระบวนการการหมัก ซึ่งมีอายุการหมักประมาณ 12 เดือน นอกจากนี้ยังเก็บตัวอย่างบูดูที่บรรจุถุงจำหน่ายตามตลาดในเขตอำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี ซึ่งมาจากแหล่งผลิตต่างกัน สำหรับตัวอย่างไตปลา และปลาจิ้งจั้งหมักจะหาซื้อตัวอย่างจากตลาดในจังหวัดปัตตานี ลักษณะตัวอย่างของอาหารหมักเกลือความเข้มข้นสูงที่นำมาใช้ศึกษา ดังแสดงในรูปที่ 2

Prince of Songkla University Pattani Campus

(A)

(B)

รูปที่ 2 ลักษณะทางกายภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (A) ตัวอย่างบูดูที่มีอายุการหมัก 12 เดือน (B) ตัวอย่างไตปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาด

Prince of Songkla University Pattani Campus

จากตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาศึกษา เมื่อดูลักษณะของผลิตภัณฑ์ พบว่ามีความแตกต่างกัน บูดูในระยะช่วงปลายของการหมักเนื้อปลาเริ่มเปื่อย เมื่อจับต้องส่วนของเนื้อปลาจะรู้สึก นิ่ม ๆ เละ น้ำหมักปลาเป็นสีน้ำตาล มีกลิ่นคล้ายน้ำปลา บูดูที่ได้จะมีกลิ่นหอม เนื้อปลาจะละเอียดเพิ่มขึ้น น้ำหมักปลาจะมีสีน้ำตาลเข้ม ส่วนลักษณะของไตปลา มีกลิ่นคาว สีน้ำตาลข้น และปลาจิ้งจั้ง ลักษณะคล้ายปลาดองเค็ม น้ำหมักเป็นสีเทาปนเหลือง การเปลี่ยนแปลงทางกายภาพของตัวปลา และสีที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักบูดู เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างน้ำตาลกับสารประกอบอะมิโน เช่น น้ำตาลไรโบส นอกจากนี้

เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างไขมันกับสารประกอบอะมิโน เช่น ฟอสโฟลิปิด (phospholipid) และลิโปโปรตีน (lipoprotein) ทำให้เกิดสีน้ำตาล ในขณะที่กลิ่นหอมของบูดูเกิดจากสารที่ระเหยได้ ซึ่งจำแนกเป็น สารที่ให้กลิ่นแอมโมเนีย ได้แก่ สารประกอบแอมโมเนีย (ammonia) และไตรเมธิลานีน (trimethylanine) นอกจากนี้ยังมีสารที่ให้กลิ่นเนยแข็ง ได้แก่ กรดเอทาโนอิก (ethanoic acid) และกรดบิวทาโนอิก(butanoic acid) และสารที่ให้กลิ่นเนื้อ ได้แก่ สารประกอบพวกคีโตน (ketone) และกรดคีโต (keto acid) (มาลี, 2522 อ้างโดย ธนุสรา และคณะ, 2533)

เมื่อนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของเกลือ NaCl และค่า pH ของตัวอย่าง (ตารางที่ 4) พบว่า บูดู มีค่าความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 17.3 - 26.6% ค่า pH 5.2 - 6.0 ในขณะที่ไตปลามีค่าความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 24.8 - 25.0% ค่า pH 5.0 - 5.7 และปลาจิ้งจั้งหมัก มีค่าความเข้มข้น NaCl เท่ากับ 21.8 - 22.0% ค่า pH ประมาณ 5.0 ค่าที่ได้อยู่ในช่วงเดียวกับตัวอย่างปลาร้า พบว่า มีความเข้มข้น NaCl 11.5 – 23.9% pH 4.33 – 5.64 (Tanasupawat *et al*., 1998)

ตารางที่ 4 ความเข้มข้นของ NaCl และ pH ของตัวอย่างอาหารหมัก

อาหารหมัก	จำนวนตัวอย่าง	pH	NaCl (%)
ไตปลา	10	5.0 - 5.7	24.8 - 25.0
ปลาจิ้งจั้งหมัก	2	5.1 - 5.2	21.8 - 22.0
บูดู	28	5.2 - 6.0	17.3 - 26.6

2. ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ปลาหมักความเข้มข้นของเกลือสูง จำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่สร้างกรด (acid-producing bacteria) ซึ่งเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม $CaCO_3$ 1% (w/w) ได้จำนวน 110 ไอโซเลท โดยอาศัยสมบัติ คือ สามารถสร้างกรดในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้โดยการหมักน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ ปรากฏวงใสรอบโคโลนี อย่างเห็นได้ชัดเจน (รูปที่ 3) และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

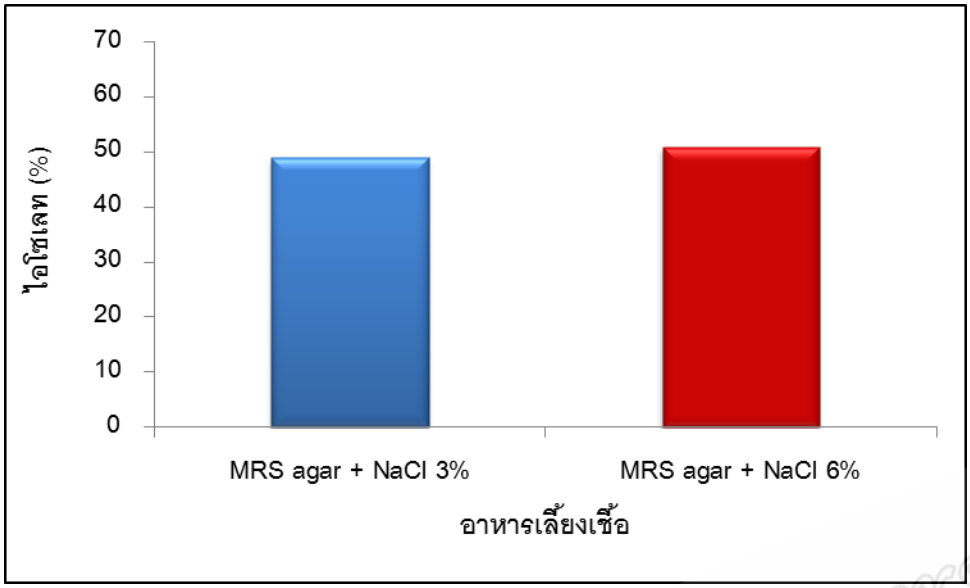
Prince of Songkla University Pattani Campus

รูปที่ 3 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีวงใสรอบๆ เมื่อเลี้ยงบนอาหาร MRS agar ผสมด้วย NaCl 3% และเติม $CaCO_3$ 1% (w/w)

การที่โคโลนีที่เกิดในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสมด้วย $CaCO_3$ ปรากฏวงใสรอบ ๆ โคโลนี นั้น เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตกรดอินทรีย์ได้หลายชนิด ซึ่งส่วนใหญ่เป็น กรดแลคติก นอกจากนี้ยังมีกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก เป็นต้น

จากผลการคัดแยกเชื้อโดยการใช้อาหาร MRS agar ที่มี NaCl 3 และ 6% พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้ในจำนวนที่ใกล้เคียงกัน โดยมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสมด้วย NaCl 3% จำนวน 54 ไอโซเลท (49%) และ 6% จำนวน 56 ไอโซเลท (51%) ดังแสดงในรูปที่ 4

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 4 จำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ผสม NaCl เข้มข้น 3% และ 6%

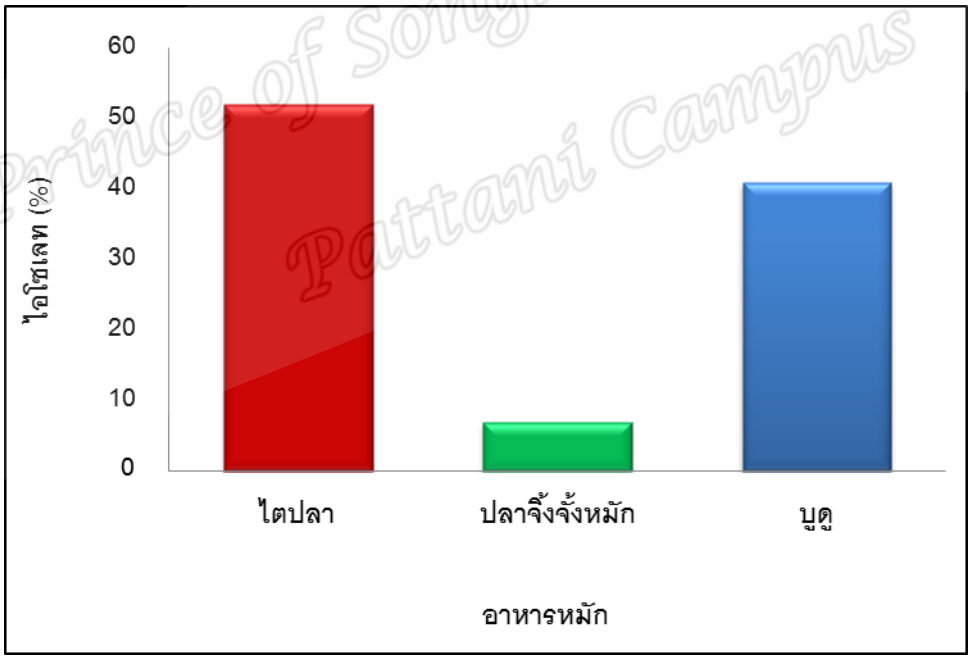
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูงจะใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม NaCl ต่าง ๆ กัน Bouttefroy *et al.* (2000) พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนเกลือสามารถเจริญเติบโตได้ที่ความเข้มข้น NaCl อย่างน้อย 6% หรือมากกว่า Chen *et al.* (2006a) คัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก จาก dochi (fermented black beans) ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไต้หวันซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือ 15 % ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มี NaCl 6% หรือ 15% พบแบคทีเรีย *Enterococcus faecium* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมากในกระบวนการหมัก dochi นอกจากนี้ยังพบ *Tetragenoccus muriaticus* และ *Pediococcus acidilactici* ซึ่งแบคทีเรียทั้งสามชนิดนี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของ NaCl 0 และ 10 %

ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก จากอาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไต้หวัน suan–tsai (fermented mustard) ซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือในช่วง 9.6 % ถึง 12.8 % ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มี NaCl 6 % พบว่า *Tetragenoccus halophilus* ไม่เจริญในอาหารที่ไม่มี NaCl และสามารถเจริญได้ที่ NaCl 10% ในขณะที่

Prince of Songkla University Pattani Campus

Pediococcus pentosaceus สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีเกลือ แต่ไม่เจริญในอาหารที่มี NaCl 10% (Chen *et al*.,2006b) นอกจากนี้การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ชอบเกลือหรือทนเกลือจากตัวอย่างอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง สามารถคัดแยกโดยใช้อาหารที่ไม่เติมเกลือได้เช่นกันเช่นในการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก terasi หรือผลิตภัณฑ์กุ้งหมักเกลือ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ไม่มีการเติม NaCl และอาหาร MRS agar ที่มี NaCl ความเข้มข้น 10% พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมดสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้น NaCl 18% (Kobayashi *et al.,* 2003)

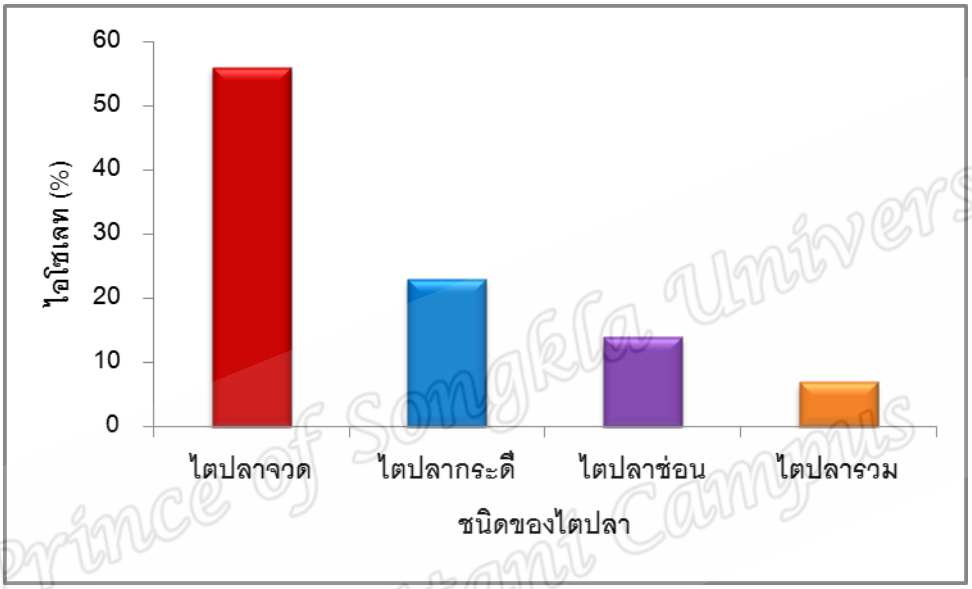
จากจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 110 ไอโซเลท เมื่อพิจารณาจากตัวอย่างที่ใช้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย พบว่า คัดแยกมาจากไตปลา จำนวน 57 ไอโซเลท (52%) ปลาจิ้งจั้งหมัก จำนวน 8 ไอโซเลท (7%) และคัดแยกจากบูดู จำนวน 45 ไอโซเลท (41%) ดังแสดงในรูปที่ 5



รูปที่ 5 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักชนิดต่าง ๆ

Prince of Songkla University Pattani Campus

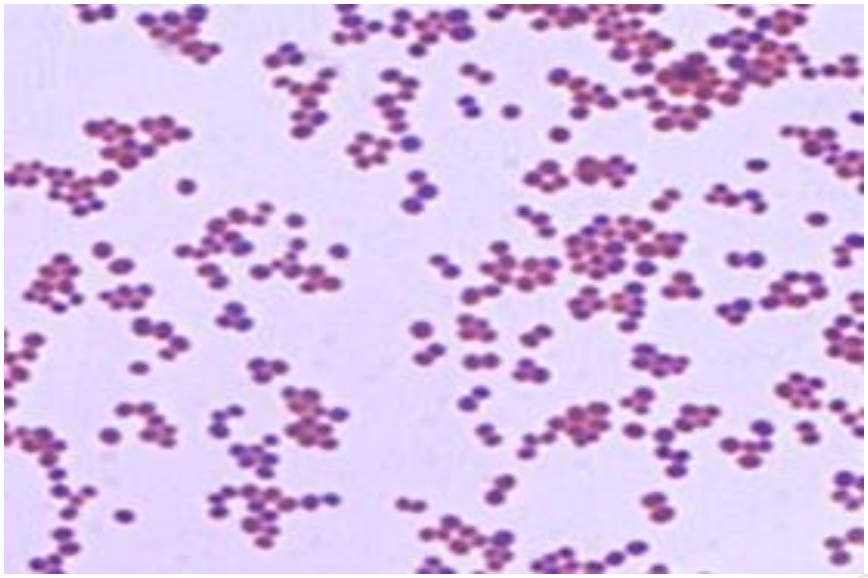
ในส่วนของไตปลามีความแตกต่างกันในเรื่องของชนิดของปลาที่นำมาศึกษา จากตัวอย่างไตปลาที่นำมาทั้งหมด 57 ไอโซเลท ประกอบด้วยไตปลาที่ทำจากปลาจวด จำนวน 32 ไอโซเลท ปลากระดี่จำนวน 13 ไอโซเลท ปลาช่อน จำนวน 8 ไอโซเลท และเป็นไตปลารวม จำนวน 4 ไอโซเลท ซึ่งสัดส่วนของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากไตปลาชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากไตปลา

เมื่อนำเชื้อที่คัดแยกได้มาทำให้บริสุทธิ์ ดูลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้นั้นติดสีแกรมบวก รูปร่างทรงกลม หรือแท่ง การเรียงตัวของเซลล์ เรียงตัว จับคู่ หรือเรียงตัวเป็น 4 เซลล์ ซึ่งลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกบางส่วนที่คัดเลือกได้ แสดงดังรูปที่ 7

Prince of Songkla University Pattani Campus



รูปที่ 7 ลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวของแบคทีเรียกรดแลคติก ที่กำลังขยาย 1,000 เท่า

ในกระบวนการหมักอาหาร ปัจจัยสภาวะแวดล้อมมีผลต่อการหมัก จะเป็นตัวควบคุม ทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ ได้แก่ pH ปริมาณออกซิเจน (O_2) และอุณหภูมิ เนื่องจากความต้องการของจุลินทรีย์แต่ละชนิดไม่เหมือนกัน ดังนั้นจึงมีผลต่อการสร้างเอนไซม์ นอกจากนี้ปริมาณสารอาหารสามารถใช้เป็นตัวควบคุมชนิดของการหมักได้ ในอาหารหมักที่ใช้เกลือ ปริมาณเกลือเป็นปัจจัยอย่างหนึ่งที่มีผลต่อชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในกระบวนการหมักซึ่งเมแทบอลึซึมของจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะทำให้ผลผลิตต่าง ๆ ที่มีผลต่อกลิ่นและรสของอาหารหมัก การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมักเกลือ พบแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Pediococcus, Lactobacillus* , *Enterococcus*, *Weissella* (Chen *et al*., 2006a) สำหรับแบคทีเรียในสกุล *Tetragenococcus* สามารถพบได้ทั่วไปในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือ NaCl ในปริมาณสูง ๆ (Tanasupawat *et al.,* 2002) ซึ่งลักษณะของ *Tetragenococcus* มีลักษณะเป็นทรงกลม มีการจัดเรียงตัวของเป็นเซลล์ คู่ หรือเซลล์เรียงตัวกัน 4 เซลล์ (tetrad formation) ซึ่งการจัดเรียงจับกลุ่ม 4 เซลล์มักจะพบบ่อยของแบคทีเรียสกุลนี้

Prince of Songkla University Pattani Campus

3. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย ด้วย agar spot method

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ ที่คัดแยกได้ จำนวน 110 ไอโซเลท เพาะเชื้อลงในอาหาร MRS agar ที่มีความเข้มข้น NaCl 3% หรือ 6% แล้วนำมาเททับด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Agar (TSA) ซึ่งมีส่วนผสมของเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* DMST 8840 เท่ากับ 10^5CFU/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจดูบริเวณใสซึ่งเกิดขึ้นรอบๆ พบว่าจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้ง 110 ไอโซเลท มีเพียง 12 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 คือ LB50 LB51 LB78 LB80 LB81 LB83 LB85 LB88 LB90 LB92 LB93 และ LB94 ผลการศึกษาดังแสดงในตารางที่ 5 แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลทคัดแยกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ผสมด้วย NaCl 3% โดยมาจากไตปลาช่อน 2 ไอโซเลท ได้แก่ LB 50 และ LB 51 และจำนวน 10 ไอโซเลทคัดแยกมาจากบูดู รูปร่างของเซลล์กลม (coccus) และแท่ง (rod)

จากข้อมูลในตารางแสดงให้เห็นว่ากิจกรรมการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลทครั้งนี้ อาจจะเป็นผลมาจากกรดอินทรีย์หรือสารอื่น ๆ ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตออกมา เช่น แบคเทอริโอซิน หรือไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถสร้างสารอื่น ๆ ได้อีก ถึงแม้ว่าสารเหล่านั้นผลิตได้ในปริมาณที่น้อยแต่มีผลในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ เช่นกัน ได้แก่ กรดฟอร์มิก (formic acid) กรดไขมันอิสระ (free fatty acid), แอมโมเนีย (ammonia) เอทานอล (ethanol) ไดอะซีทิล (diacetyl) อะซีโตอิน (acetoin), อะซีทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) และเอนไซม์ที่มีผลทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก (bacteriolytic enzyme) รวมทั้งสารยับยั้งที่ยังไม่สามารถจัดจำแนกได้อีกหลายชนิด (De Vuyst and Vandamme, 1994) ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกมาจากอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงมีรายงานว่าสามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้เช่นกัน

จากการศึกษาของ Chen *et al.* (2006a) พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากอาหารหมัก dochi ซึ่งมีความเข้มข้น NaCl 15% พบว่า เชื้อ *Enterococcus*

Prince of Songkla University Pattani Campus

faecium ที่คัดแยกได้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อ *Lactococcus sakei* JCM 1157^{T} เช่นเดียวกับการศึกษาของ Pal *et al.* (2004) พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้แก่ *Pediococcus pentosaceous Lactobacillus plantarum* และ *Tetragenococcus halophilus* ที่คัดแยกจากอาหารหมักของอินเดียที่เรียกว่า appam สามารถผลิตสารที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *Bacillus cereus Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* รวมทั้งแบคทีเรียแกรมลบ ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa*

ตารางที่ 5 การยับยั้งเชื้อ *S. aureus* DMST 8840 ของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วย agar spot method

รหัสไอโซเลท	แหล่งที่มา	อาหารเลี้ยงชื้อ	ลักษณะของเชื้อ	ประสิทธิภาพการยับยั้ง* *S. aureus* DMST 8840
LB50	ไตปลาช่อน	MRS + NaCl 3%	coccus	+
LB51	ไตปลาช่อน	MRS + NaCl 3%	coccus	+
LB78	บูดู	MRS + NaCl 3%	coccus	+
LB80	บูดู	MRS + NaCl 3%	rod	+
LB81	บูดู	MRS + NaCl 3%	coccus	+
LB83	บูดู	MRS + NaCl 3%	coccus	+
LB85	บูดู	MRS + NaCl 3%	coccus	+
LB88	บูดู	MRS + NaCl 3%	coccus	+
LB90	บูดู	MRS + NaCl 3%	rod	+
LB92	บูดู	MRS + NaCl 3%	coccus	+
LB93	บูดู	MRS + NaCl 3%	coccus	+
LB94	บูดู	MRS + NaCl 3%	rod	+

Prince of Songkla University Pattani Campus

4. ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย

4.1 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย disc diffusion method

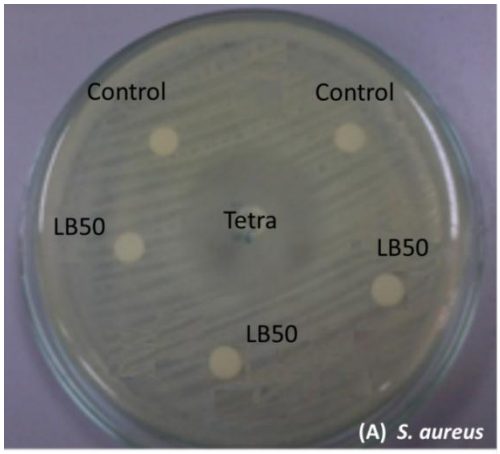
นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่ผสมด้วย NaCl ความเข้มข้น 3% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในสภาวะการเลี้ยงแบบไม่เขย่า (static condition) และสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่า (shaking condition) ที่ความเร็วรอบ 100 รอบต่อนาที เมื่อสังเกตความขุ่นของการเจริญ พบว่า เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่เลี้ยงไว้ในสภาวะแบบไม่เขย่า สามารถเจริญเติบโตได้ดีกว่าแบบเขย่า แสดงให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้เจริญได้ดีในสภาวะที่มีอากาศน้อยได้ดีกว่าสภาวะที่มีอากาศ

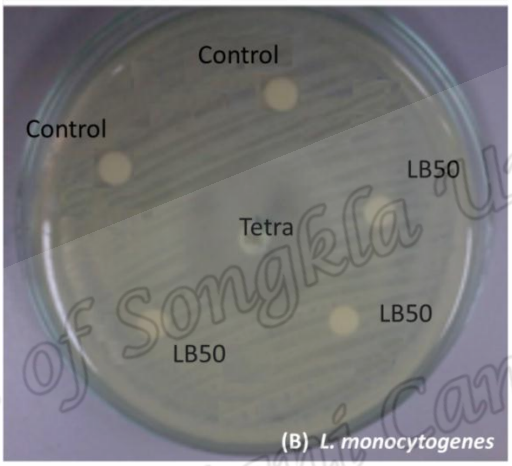
เมื่อนำอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใส (cell free supernatant : CFS) ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลท มาปรับ pH ให้เป็นกลาง และ treat ด้วยเอนไซม์คะตะเลส กรองผ่านกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมโครเมตร แล้วนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 และ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/mL โดย disc diffusion method พบว่า CSF จากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลท ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ *S. aureus* DMST 8840 และ *L. monocytogenes* DMST 17303 ผลการทดสอบบางส่วนแสดงดังรูปที่ 8

4.2 ผลการทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วย agar well diffusion method

เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 และ *L. monocytogenes* DMST 17303 ที่มีปริมาณเชื้อ 10^5 CFU/mL โดยทำการศึกษาด้วย agar well diffusion method พบว่า ส่วนใสจากเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลท ไม่แสดงผลการยับยั้งเช่นเดียวกัน ผลการทดลองดังแสดงในรูปที่ 9

Prince of Songkla University Pattani Campus

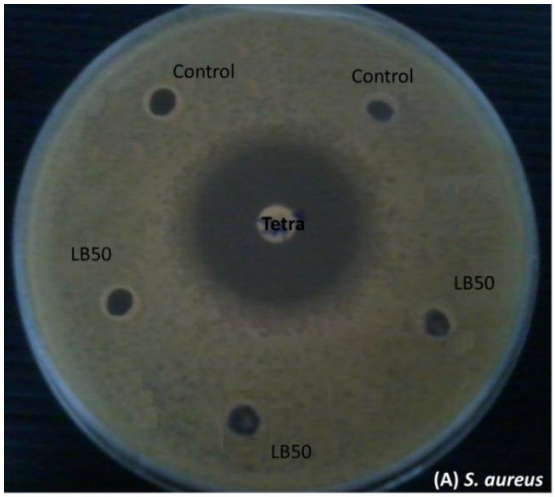




control= MRS broth LB= cell free supernatant tetra = tetracycline (30 µg/disc)

รูปที่ 8 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (A) *S. aureus* DMST 8840 และ (B) *L. monocytogenes* DMST 17303 ของส่วนใสจากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ทดสอบด้วย disc diffusion method

Prince of Songkla University Pattani Campus



control= MRS broth LB= cell free supernatant tetra = tetracycline 30 (µg/disc)

รูปที่ 9 การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (A) *S. aureus* DMST 8840 และ (B) *L. monocytogenes* DMST 17303 ของส่วนใสจากอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ทดสอบด้วย agar well diffusion method

Prince of Songkla University Pattani Campus

จากผลการศึกษาที่ได้อาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใสของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลท ที่เพาะเลี้ยงในสภาวะเขย่าหรือไม่เขย่า ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์ได้ จึงอาจเป็นไปได้ว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มีความสามารถในการผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้น้อยมากหรือไม่ผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียในสภาวะการเพาะเลี้ยงดังกล่าวข้างต้น ซึ่งการสร้างสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียกรดแลคติกขึ้นกับปัจจัยหลายอย่าง เช่น pH และองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ จากการศึกษาของ Kobayashi *et al.* (2004) พบว่า การผลิตกรดแลคติกและการเจริญของ *Tetragenoccus halophilus* และ *T. muriaticus* ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ NaCl ของอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย *T. halophilus* และ *T. muriaticus* สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดในอาหาร MRS broth ที่มี NaCl ความเข้มข้น 15 % ซึ่งส่งผลต่อการลดลงของ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ ในขณะที่การผลิตสารยับยั้งชนิดอื่น ๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น enterocin B จากเชื้อ *Enterococcus faecium* MR006 ที่แยกจาก miso พบว่าการควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6.0 หรือ 7.0 ที่อุณหภูมิ 30°C เชื้อแบคทีเรียสามารถผลิต enterocin B ได้มากกว่าการไม่ควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Takumi *et al*., 2003) เช่นเดียวกันกับการผลิตแบคเทอริโอซินจาก *Lactococcus* sp. GM 005 ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกมาจาก miso-paste แบคเทอริโอซินดังกล่าวสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด โดย *Lactococcus* sp. GM 005 ผลิตแบคเทอริโอซินในสภาวะการเพาะเลี้ยงที่ควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เท่ากับ 6.0 อุณหภูมิ 30°C แบคเทอริโอซินมีแอคติวิตี้ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียมากกว่า 8 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงที่ไม่ควบคุม pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ (Onda *et al*., 2003) นอกจากนี้องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตสารแบคเทอริโอซินจาก *Enterococcus mundtii* โดยพบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS และ sour dough bacteria (SDB) มีความเหมาะสมสำหรับการผลิตแบคเทอริโอซิน โดย *E. mundtii* ซึ่งจะผลิตสารยับยั้งที่มีลักษณะคล้ายแบคเทอริโอซินได้สูงสุดในช่วง pH 6.0 - 8.0 นอกจากนี้ทั้งปัจจัยอื่น ๆ เช่น ชนิดของแหล่งไนโตรเจน แหล่งคาร์บอน ปริมาณของ NaCl ก็มีผลในการผลิตแบคเทอริโอซินเช่นกัน ซึ่งพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ NaCl ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีผลทำให้การผลิตสารยับยั้งที่มีลักษณะคล้ายแบคเทอริโอซินลดลง (Settanni *et al*., 2008)

5. คุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย

นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้ง 12 ไอโซเลท คือ LB50 LB51 LB78 LB80 LB81 LB83 LB85 LB88 LB90 LB92 LB93 และ LB94 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียในการทดสอบแบบ agar spot เพาะลงใน MRS agar ที่มีความเข้มข้นของ NaCl 3% บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ แล้วนำมาทดสอบ ผลของ NaCl อุณหภูมิ และ pH ต่อการเจริญ และการหมักน้ำตาลกลูโคสของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ผลการทดสอบแสดงดังตารางที่ 6

5.1 ผลของ NaCl ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 12 ไอโซเลท พบว่า มี 4 ไอโซเลทได้แก่ LB 51 LB 81 LB 85 และ LB 88 สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้น 18 % และ 21% และมีแบคทีเรียกรดแลคติคจำนวน 8 ไอโซเลทที่ไม่เจริญที่ NaCl ความเข้มข้น 18 % ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลทนี้มีความเป็นไปได้ที่จะอยู่ในจีนัส *Tetragenococcus* ซึ่งเป็นไปทำนองเดียวกันกับการศึกษาของ Kobayashi *et al.* (2003) ที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จาก terasi หรือ กะปิกุ้ง (shrimp paste) และได้จัดจำแนกเป็น *T. halophilus* หรือ *T. muriaticus* สามารถเจริญได้ที่ NaCl ความเข้มข้น 18 % *Tetragenococcus* spp. จึงจัดเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ชอบเกลือและทนเกลือสูงมากๆ

สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกอีก 8 ไอโซเลทก็อาจจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในจีนัสอื่น ๆ ในอาหารหมักที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงนั้นยังพบแบคทีเรียกรดแลคติกอื่น ๆ เช่น *Lactobacillus farciminis* ซึ่งคัดแยกมาจากกระบวนการหมักซีอิ๊ว (soy sauce mash) พบว่าสามารถเจริญที่ความเข้มข้นของ NaCl ในช่วง 0 – 10% (Tanasupawat *et al*., 2002)

5.2 ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ผลการศึกษาอุณหภูมิในช่วง 30 – 40°C ต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 12 ไอโซเลท พบว่า ทุกไอโซเลท สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 40°C เมื่อเปรียบเทียบการเจริญที่อุณหภูมิ 30 และ 37°C ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า เชื้อ

Prince of Songkla University Pattani Campus

แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญที่อุณหภูมิ 37°C ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิ 30°C ดังนั้น จึงอาจกล่าวได้ว่าอุณหภูมิมีอิทธิพลต่อการเจริญแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทนเกลือสูง ๆ ได้เช่น *Tetragenococcus halophilus* และ *T. muriaticus* พบว่าสามารถเจริญได้ที่ 40°C แต่ไม่เจริญที่ 45°C (Kobayashi *et al*., 2003) และการศึกษาของ Tanasupawat *et al.* (2002) พบว่า เชื้อ *T. halophilus* สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 42°C และ Pal *et al*. (2004) พบว่า *T. halophilus* ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45°C อย่างไรก็ตาม *T. halophilus* และ *Pediococcs pentosaceus* ที่คัดแยกจาก suan-tsai สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45°C (Chen *et al*., 2003)

5.3 ผลของ pH ต่อการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ผลการศึกษา pH ในช่วง 5.0 – 9.0 สำหรับการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้ง 12 ไอโซเลท พบว่า สามารถเจริญได้ที่ pH 5.0 – 9.0 เป็นไปในทำนองเดียวกับการศึกษาของ Kobayashi *et al*. (2003) พบว่า *Tetragenococcus halophilus* และ *T. muriaticus* ไม่เจริญที่ pH 4.2 แต่สามารถเจริญที่ pH 8.5 และจากรายงานของ Kobayashi *et al*. (2004) พบว่า *Tetragenococcus* spp. ซึ่งคัดแยกมาจาก terasi shrimp paste สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่ pH 6.5 และ 7.5 เจริญได้เล็กน้อยที่ pH 5.8 ในขณะที่ Pal *et al*. (2004) พบว่า *Tetragenococcus halophilus* สามารถเจริญได้ที่ pH 9.0 แต่ไม่เจริญที่ pH 5.0 และจากรายงานของ Tanasupawat *et al.* (2002) พบว่าเชื้อ *T. halophilus* ไม่เจริญที่ pH 4.5 แต่สามารถเจริญได้ที่ pH 8.5 แสดงให้เห็นว่า *Tetragenococcus* ในแต่ละสายพันธุ์มีความแตกต่างกันโดยจะไม่เจริญได้ในสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด

5.4 การสร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส

จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลท ไม่สร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส ซึ่งมีกระบวนการหมักแบบ homofermentative ผลิตสร้างกรดแลคติกส่วนใหญ่ สอดคล้องกับรายงานที่มีมาก่อนแล้ว เช่น Tanasupawat *et al.* (2002) พบว่า *Tetragenococcus halophilus* ที่คัดแยกจากการหมักซีอิ๊วไม่ผลิตแก๊ส เช่นเดียวกับ Kobayashi *et al*. (2004) ที่รายงานว่า *T. halophilus* และ *T. muriaticus* ซึ่งคัดแยกมาจาก terasi shrimp paste ไม่สร้างแก๊สจากการหมักน้ำตาลกลูโคส

Prince of Songkla University Pattani Campus

ตารางที่ 6 คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจากการทดสอบด้วย agar spot test

	LB50	LB51	LB78	LB80	LB81	LB83	LB85	LB88	LB90	LB92	LB93	LB94
Morphology	cocci	cocci	cocci	rod	cocci	cocci	cocci	cocci	rod	cocci	cocci	rod
Gram's staining	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 30°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 40°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 9% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 18% NaCl	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Growth in 21% NaCl	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-
Gas from glucose fermentation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) เชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ (-) เชื้อไม่เจริญ

Prince of Songkla University Pattani Campus