บทความวิจัย

การคัดแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินจากแหนมปลา

นภดล เมตตาเมธา[1*] สมใจ ศิริโภค[1] และ อดิศร เสวตวิวัฒน์[2]

บทคัดย่อ

การศึกษาแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์แหนมปลาพร้อมบริโภค จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียแลคติก อยู่ในช่วง 1.2×10^7- 4.4×10^9 CFU/g เมื่อนำแบคทีเรียแลคติก จำนวน 100 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแหนมปลามาทดสอบการผลิตสารซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี direct agar spot method บนอาหาร bacteriocin screening medium (BSM) พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลทเมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบดีที่สุด จำนวน 12 ไอโซเลท มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth และนำไปศึกษาผลการยับยั้งเชื้อทดสอบ 21 ชนิด โดยวิธี spot-on-lawn พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลท ที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ คือ ไอโซเลท NP3.8 สามารถยับยั้ง *Bacillus coagulans* JCM 2257 และ *Listeria innocua* ATCC 33090 ได้ดี (1,600 AU/ml) และไอโซเลท NP5.4 สามารถยับยั้ง *Lactobacillus (Lb) sakei* JCM 1157 ได้ดี (3,200 AU/ml) สารยับยั้งที่สร้างจาก NP3.8 และ NP5.4 จะสูญเสียประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยเอนไซม์ย่อยโปรตีนหลายชนิด และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เมื่อปรับ pH เป็น 6.5 แต่สารยับยั้งที่ผลิตได้เมื่อมีการให้ความร้อนสูงยังคงแสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ เมื่อปรับ pH เป็น 3.0 ซึ่งจากคุณสมบัติของสารที่ผลิตจากแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลทดังกล่าว จึงยืนยันได้ว่าสารยับยั้งที่ผลิตอยู่ในกลุ่มแบคทีริโอซิน การทดสอบเอกลักษณ์เบื้องต้นโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH พบว่าไอโซเลท NP3.8 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lb. plantarum* (99.9%) และไอโซเลท NP5.4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis* (92.6%)

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีการหมัก คณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: noppadolm@swu.ac.th

เมื่อทำการทดลองใช้แบคทีเรียแลคติก 2 สายพันธุ์ ที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการทำผลิตภัณฑ์แหนมปลา เปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ พบว่า *Lb. plantarum* (NP3.8) ทำให้เกิดกระบวนการหมักที่รวดเร็วที่สุด นอกจากนี้การใช้กล้าเชื้อที่สามารถสร้างแบคทีริโอซินทั้ง 2 สายพันธุ์ คือ *Lb. plantarum* (NP3.8) เป็นเชื้อในการหมักแหนมปลาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ในการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของรสชาติเปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ แต่แสดงผลแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยมีความชอบมากกว่าแหนมปลาที่ใช้ *Lc. lactis* subsp. *lactis* (NP5.4) เป็นกล้าเชื้อ

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก แบคทีริโอซิน แหนมปลา

Isolation and Identification of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Minced Fermented Fish (Nham Pla)

Noppadol Mettametha[1*], Somjai Siripoke[1] and Adisorn Swetwiwathana[2]

ABSTRACT

Ten samples of retailed ready to eat minced fermented fish (Nham Pla) were investigated. It was revealed that the amount of lactic acid bacteria for these ready-to-eat samples were between 1.2×10^7 -4.4×10^9 CFU/g. One hundred strains of isolated lactic acid bacteria from the 10 samples of Nham Pla were tested for the production of antagonistic activity by direct agar spot method on bacteriocin screening medium (BSM). It was shown that 36 isolates were active against bacterial indicators. Among these, 12 isolates which showed the best antagonistic activity were selected to test their abilities for bacteriocin production in the MRS broth against 21 indicator strains by using spot-on-lawn method. The results show that supernatants from only 2 isolates exhibited activity against the sample indicators: 1) isolate NP3.8 was found to be good inhibitor against *Bacillus coagulans* JCM 2257 and *Listeria innocua* ATCC 33090 (1,600 AU/ml); and 2) isolate NP5.4 was found to be a good inhibitor against *Lactobacillus (Lb.) sakei* JCM 1157 (3,200 AU/ml). The antimicrobial substances produced by NP3.8 and NP5.4 stopped their activities when subjected to various proteases and heating at 121°C for 15 min when adjusted to pH 6.5, but the activity of the substances was seemingly heat stable when each supernatant was adjusted to pH 3.0. According to these characteristics, thus, the obtained antimicrobial substances in the culture supernatant of these 2 isolates were defined as bacteriocins. According to the API 50 CHL identification system, strains NP3.8 and NP5.4 were identified as *Lb. plantarum* with 99.9% identity and *Lactococcus (Lc.) lactis* subsp. *lactis* with 92.6% identity, respectively.

[1]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

[2]Department of Fermentation Technology, Faculty of Agro Industry, King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang.

[*]Corresponding author, e-mail: noppadolm@swu.ac.th

When using these 2 strains of bacteriocin-producing LAB as starter cultures for Nham Pla production compared to natural fermentation samples, *Lb. plantarum* (NP3.8) resulted in the most rapid fermentation period. Of the 2 bacteriocin-producing LAB as starter cultures, *Lb. plantarum* (NP3.8) exhibited no significant ($P > 0.05$) organoleptic preferability to the naturally fermented product, but was revealed to be significantly ($P \leq 0.05$) more preferable than using *Lc. lactis* subsp. lactis (NP5.4) as a starter.

Keywords: Lactic acid bacteria, bacteriocin, minced fermented fish (Nham Pla)

บทนำ

อาหารหมักพื้นเมืองของประเทศไทยมีหลายชนิด ซึ่งเกิดจากการหมักตามธรรมชาติ โดยอาศัยเชื้อที่ติดมากับวัตถุดิบ แต่ต้องควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสม อาหารหมักเหล่านี้ ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ส้มฟัก ปลาร้าข้าวหมาก ผักดอง เป็นต้น [1] จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักโดยทั่วไป ได้แก่ แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) แบคทีเรียในกลุ่มนี้จะเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตในอาหารให้เป็นกรดแลคติก อาหารจึงมีค่า pH ลดลงมีรสเปรี้ยว และมีผลช่วยในการถนอมอาหาร [2]

สารที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นหลายชนิดมีบทบาทในการถนอมอาหาร เช่น ไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ ไดอะซีทิล คาร์บอนไดออกไซด์ แบคทีริโอซิน และอื่นๆ โดยสารที่ได้รับการศึกษาวิจัยมากที่สุด คือ แบคทีริโอซิน [3] ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นโปรตีนหรือเปปไทด์ เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมักชนิดต่างๆ ซึ่งมนุษย์บริโภคมาเป็นเวลานานแล้ว ดังนั้นผู้บริโภคส่วนใหญ่จึงยอมรับว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักเป็น food-grade organism ที่ปลอดภัย (general recognized as safe, GRAS) ใช้เติมลงในอาหารได้ [4]

แบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับแบคทีเรียแลคติกชนิดที่สร้างแบคทีริโอซินนั้น มีรายงานว่าแบคทีริโอซินจากแบคทีเรียแลคติกบางชนิดยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษได้ เช่น *Bacillus cereus, Clostridium botulinum, Listeria monocytogenes* และ *Staphylococcus aureus* ทำให้มีผู้สนใจศึกษาเกี่ยวกับแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีริโอซินได้จากผลิตภัณฑ์อาหารชนิดต่างๆ กันอย่างกว้างขวาง เพื่อหาแนวทางในการนำมาใช้เป็น natural food preservative [5] ในการถนอมอาหารในอุตสาหกรรมการหมักต่างๆ แทนการใช้สารเคมีกันเสียในอาหาร เช่น ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ กรดเบนโซอิก กรดซอร์บิก ไนเตรท และไนไตรท์ เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกบางชนิดยังมีคุณสมบัติเป็น “โปรไบโอติก” (probiotic) ช่วยทำให้เกิดความสมดุลของลำไส้ และป้องกันโรคท้องร่วงจากเชื้อก่อโรคหลายชนิด [6]

จากประโยชน์ของสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ได้จากกลุ่มแบคทีเรียแลคติกดังกล่าว การศึกษานี้จึงมุ่งเน้นคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากแหนมปลา และนำมาศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมักที่ปลอดภัย และเป็นแนวทางในการผลิตแบคทีริโอซินสำหรับใช้ในการถนอมอาหารแทนสารเคมีซึ่งอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพต่อไป [7]

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

ตัวอย่างแหนมปลา

เก็บตัวอย่างแหนมปลาพร้อมบริโภคที่มีจำหน่ายจากแหล่งต่างๆ จำนวน 10 ตัวอย่าง จดบันทึกชื่อยี่ห้อ สถานที่ผลิต เก็บรักษาไว้ในถังควบคุมความเย็นด้วยน้ำแข็ง แล้วนำไปตรวจวิเคราะห์สมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยา

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

Bacillus (B.) cereus ATCC 11778, *B. circulans* JCM 2504, *B. coagulans* JCM 2257, *B. subtilis* JCM 1465, *Escherichia (E.) coli* JM 109, *Enterococcus (Ent.) faecalis* JCM 5803, *Kokuria varians* LTH 1545, *Lis. innocua* ATCC 33090, *Listeria (Lis.) innocua* LTH 3096, *Micrococcus luteus* IFO 12708, *Salmonella (Sal.)* Anatum WHO-BKK, *Staphylococcus (Staph.) aureus* ATCC 6538, *Staph. carnosus* LTH 2102, *Lactobacillus (Lb.) plantarum* ATCC 8014, *Lb. sakei* JCM 1157, *Lactococcus (Lc.) lactis* JCM 7638, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* TUA 1344L, *Leuconostoc (Leu.) mesenteroides* JCM 6124, *Pediococcus (P.) pentosaceus* JCM 5885, *P. pentosaceus* JCM 5890, *Streptococcus (Strep.) salivarius* JCM 5707 รวม 21 ชนิด

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลา

ชั่งตัวอย่างแหนมปลา 25 กรัม เจือจางใน 0.85% NaCl แล้วนำไป spread บน MRS agar + 0.5% $CaCO_3$ ทำ 2 ซ้ำ บ่มใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับโคโลนีที่มีวงใส (clear zone) จากความเจือจางที่เหมาะสม สุ่มเก็บเชื้อตัวอย่างละ 10 โคโลนี แยกเป็นเชื้อบริสุทธิ์บนจานอาหารแข็ง MRS agar + 0.5% $CaCO_3$ และเก็บแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ใน MRS agar + 1% $CaCO_3$ (deep tube) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยวิธี direct agar spot method (Fleming *et al.,* 1985) [8]

นำแบคทีเรียแลคติกที่เก็บใน deep tube มาเพาะลงใน MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นผสมให้เข้ากัน หยด 1 ไมโครลิตร ลงบนผิวหน้าอาหาร bacteriocin screening medium (BSM) [9] ที่แบ่งเป็นช่องๆ ช่องละ 1 ตัวอย่าง นำไปบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

นำเชื้อทดสอบ 8 ชนิด คือ *E. coli* JM 109, *Ent. faecalis* JCM 5803, *Lis. innocua* ATCC 33090, *Sal.* Anatum WHO-BKK, *Staph. aureus* ATCC 6538, *Lb. sakei* JCM 1157, *Lc. lactis* JCM 7638 และ *Strep. salivarius* JCM 5707 เพาะเลี้ยงลงใน tryptic soy broth (TSB) + 0.6% yeast extract (YE) หรือ MRS broth เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ดูดเชื้อทดสอบมา 2% (100 ไมโครลิตร) ใส่ลงใน 1% soft agar ปริมาณ 5 มิลลิลิตร (5,000 ไมโครลิตร) เขย่าให้เชื้อทดสอบกระจายทั่วถึง เทลงบนจานเพาะเชื้อ BSM agar ที่มีแบคทีเรียแลคติกที่ต้องการทดสอบเจริญอยู่ ทำ 2 ซ้ำ บ่มในสภาวะไร้ออกซิเจนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกโคโลนีที่เกิดโซนใสรอบๆ มาทดสอบเอนไซม์คะตะเลส ด้วย 3% H_2O_2 และนำไปย้อมสีแกรม ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

การศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกที่มีผลต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ โดยวิธี spot-on-lawn (Ennahar *et al.,* 1999) [10]

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาเพาะลงใน MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง แยกเซลล์ออกโดยนำไปเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 rpm นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำส่วนใสไปปรับ pH ให้ได้ 6.5 กรองด้วยเมมเบรน ขนาด 0.45 ไมโครเมตร (Nitrocellulose ∅ 0.45 μm, Millipore, USA) จากนั้นนำส่วนใสที่ได้ใส่ลงในหลอด eppendorf ที่ปราศจากเชื้อ เจือจางสารละลายที่ผ่านการกรองแบบ 2 fold dilution

นำเชื้อทดสอบ 21 ชนิด เพาะลงใน 1% soft agar (TSA+0.6% YE หรือ MRS agar) ผสมให้เข้ากัน แล้วเททับลงบนผิวหน้าอาหาร NA ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แล้วแบ่งจานเพาะเชื้อเป็น 10 ช่อง ดูดส่วนใสแต่ละระดับความเจือจางจากหลอด eppendorf 10 ไมโครลิตร หยดลงบนผิวหน้าอาหาร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (สำหรับแบคทีเรียแลคติกบ่มในสภาวะไร้ออกซิเจน) คำนวณหาความเข้มข้นของสารยับยั้งจากระดับความเจือจางสูงสุดที่ทำให้เกิดโซนใส โดยจากการที่ดูดส่วนใสจากแต่ละความเจือจางมาหยดลงบนผิวหน้าอาหาร 10 ไมโครลิตร จึงต้องคูณระดับความเจือจางสูงสุดที่ทำให้เกิดโซนใสด้วย 100 จะได้หน่วยเป็นมิลลิลิตร และได้ค่าเป็น Arbitrary Unit (AU/ml)

การทดสอบยืนยันว่าสารยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นโปรตีน

นำส่วนใสที่กรองเซลล์ออกแล้วมาทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ คือ α-chymotrypsin, ficin, proteinase K และ trypsin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ปรับ pH เป็น 6.5) และเอนไซม์ protease type XIII และ pepsin (ปรับ pH เป็น 3.0) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วจึงนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อทดสอบโดยวิธี spot-on-lawn โดยใช้ส่วนใสที่ปรับ pH 3.0 กับ pH 6.5 เป็นชุดควบคุม

การทดสอบการทนความร้อนของแบคทีริโอซิน

นำส่วนใสที่กรองเซลล์ออกแล้วมาแบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนแรกปรับ pH เป็น 3.0 และส่วนที่สองปรับ pH เป็น 6.5 นำไปให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำไปทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อโดยวิธี spot-on-lawn เปรียบเทียบกับส่วนใสที่ไม่ได้ผ่านความร้อน

การจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้

เตรียมแบคทีเรียแลคติกแขวนลอยในอาหารเหลว API 50 CHL นำไปหยดในชุดทดสอบ API 50 CH test kit (BioMérieux, France) ตรวจผลและวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับชนิดของเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก จาก API 50 CH database

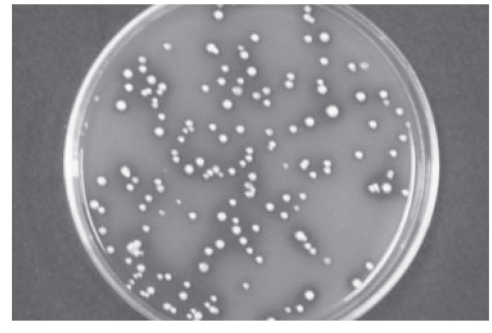
การทดสอบทางด้านการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลา

ทำการศึกษารสชาติที่ยอมรับมากที่สุดของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลา โดยพิจารณาปัจจัยคุณภาพทางประสาทสัมผัส คือ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว รสชาติ ความชอบโดยรวม ของแหนมปลาที่หมักโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก เปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักตามธรรมชาติ โดยใช้วิธีทดสอบแบบฮีโดนิก แบบ 9-จุด (Hedonic test) [11] ใช้ผู้ทดสอบที่ได้ผ่านการฝึกฝน และชอบบริโภคแหนมปลา จำนวน 30 คน วางแผนการทดลองแบบ Randomize Complete Block Design (RCBD) คำนวณโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS แสดงผลการวิเคราะห์ด้วย Duncan ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทำการทดลองทำผลิตภัณฑ์แหนมปลา 3 สูตร คือ สูตร 010 แหนมปลาที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP 3.8 สูตร 020 แหนมปลาที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP 5.4 และ สูตร 030 แหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ

ผลการทดลอง

การศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลา

การนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลา พบว่าแหนมปลาทั้ง 10 ตัวอย่าง มีปริมาณแบคทีเรียแลคติกอยู่ระหว่าง 7.08-9.64 $\log_{10}$CFU/g ดังแสดงในตารางที่ 1 โคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากแหนมปลา มีลักษณะโคโลนีกลมนูน สีขาว อาจมีขนาดเล็ก หรือใหญ่ก็ได้ เกิดโซนใสรอบๆ โคโลนี (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากแหนมปลา บนอาหาร MRS agar +0.5% $CaCO_3$

ตารางที่ 1 ปริมาณแบคทีเรียแลคติกในแหนมปลาจากตัวอย่างต่างๆ

รหัสแหนมปลา	ตราผลิตภัณฑ์	ปริมาณแบคทีเรียแลคติก	
		CFU/g	$\log_{10}$CFU/g
NP1	ตราช้อนทอง	7.4×10^7	7.87
NP2	แหนมปลากรายเจ๊รดา	9.7×10^7	7.99
NP3	แหนมปลากรายนิตยา	2.3×10^8	8.36
NP4	แหนมปลากรายแม่สุนี	1.2×10^7	7.08
NP5	แหนมปลาส้มฟัก เจ้าตำหรับแม่น้อย	4.5×10^8	8.65
NP6	TESCO Minced Fermented Fish	8.3×10^8	8.92
NP7	แหนมปลาแม่หงษ์	9.3×10^8	8.97
NP8	แหนมปลาตลาดอุดร	1.2×10^8	8.08
NP9	ตราลีดเดอร์ไพรซ์ (Leader Price)	1.3×10^8	8.11
NP10	ตราเอราวัณ	4.4×10^9	9.64

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยวิธี direct agar spot method

จากการนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ 100 ไอโซเลท มาทดสอบพบว่ามี 36 ไอโซเลท ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบในกลุ่มที่ก่อโรคอาหารเป็นพิษ เช่น *E. coli* JM 109, *Ent. faecalis* JCM 5803, *Staph. aureus* ATCC 6538 หรือ *Sal.* Anatum WHO-BKK ได้ โดยไอโซเลท NP 3.8 และ NP 5.4 สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้มากถึง 5 ชนิด คือ *Lb. sakei* JCM 1157, *Strep. salivarius* JCM 5707, *Ent. faecalis* JCM 5803, *Staph. aureus* ATCC 6538 และ *Lis. Innocua* ATCC 33090 โดยมีขนาดของวงใสกว้างกว่าแบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ผลของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 8 ชนิด

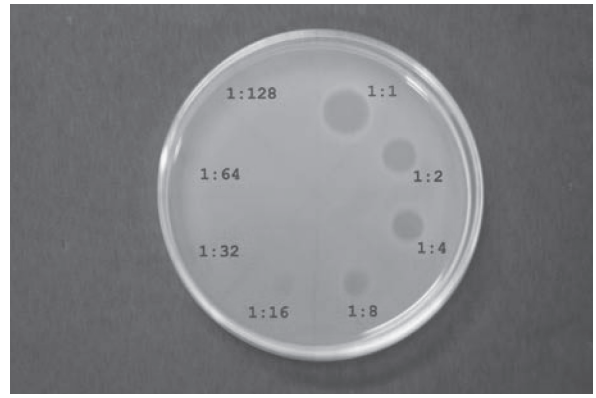
ลำดับ	แบคทีเรียแลคติก (ไอโซเลท)	เชื้อทดสอบ (แสดงผลเป็นขนาดรัศมีของวงใส หน่วยเป็น มม.)							
		Lb. sakei JCM 1157	*Lc. lactis* JCM 7638	*Strep. salivarius* JCM 5707	*E. coli* JM 109	*Ent. faecalis* JCM 5803	*Staph. aureus* ATCC 6538	*Sal. Anatum* WHO-BKK	*Lis. innocuua* ATCC 33090
1	NP1.4	2.10	3.20	-	-	-	-	-	-
2	NP1.5	2.06	-	-	-	-	-	-	-
3	NP1.7	2.13	-	-	-	-	-	-	-
4	NP1.8	2.10	-	-	-	-	-	-	-
5	NP2.1	-	2.10	3.03	-	-	-	-	-
6	NP2.2	2.10	-	-	-	-	-	-	-
7	NP2.4	-	-	10.40	-	-	-	-	-
8	NP2.5	2.06	-	-	-	-	-	-	-
9	NP3.5	-	-	4.06	-	-	-	-	-
10	NP3.6	-	-	4.38	-	-	-	-	-
11	NP3.8	10.30	-	4.40	-	6.28	4.20	-	6.06
12	NP3.10	-	-	10.03	-	-	-	-	-
13	NP4.3	-	2.20	-	-	-	-	-	-
14	NP4.4	-	2.10	-	-	-	-	-	-
15	NP4.10	-	-	4.20	-	-	-	-	-
16	NP5.1	-	2.06	-	-	-	-	-	-
17	NP5.2	-	2.00	-	-	-	-	-	-
18	NP5.3	-	2.12	-	-	-	-	-	-
19	NP5.4	6.06	-	20.20	-	10.06	10.03	-	20.02
20	NP5.6	-	2.06	-	-	-	-	-	-
21	NP5.7	-	2.03	-	-	-	-	-	-
22	NP5.8	-	2.00	-	-	-	-	-	-
23	NP5.9	-	2.10	-	-	-	-	-	-
24	NP5.10	-	2.20	-	-	-	-	-	-
25	NP6.2	-	-	-	-	-	4.24	-	-
26	NP7.3	-	-	-	-	-	2.24	-	-
27	NP7.5	-	2.06	-	-	-	-	-	-
28	NP7.8	-	2.12	-	-	-	2.00	-	-
29	NP7.9	-	2.20	-	-	-	2.12	-	-
30	NP9.3	-	2.06	-	-	-	-	-	-
31	NP9.5	-	2.03	-	-	-	-	-	-
32	NP10.4	-	4.18	-	-	-	-	-	-
33	NP10.6	-	-	-	2.12	-	2.03	-	-
34	NP10.7	-	-	-	2.06	-	2.00	-	-
35	NP10.8	-	-	4.24	-	-	-	-	-
36	NP10.9	-	-	4.20	-	-	-	-	-

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 36 ไอโซเลท ที่สร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ มาย้อมสีแกรมและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสพบว่า 36 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อนสั้น 12 ไอโซเลท ท่อนยาว 11 ไอโซเลท รูปไข่ 6 ไอโซเลท และทรงกลมเป็นกลุ่ม 4 เซลล์ 7 ไอโซเลท และทุกไอโซเลทไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลส

การศึกษาประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกที่มีผลต่อเชื้อทดสอบชนิดต่างๆ โดยวิธี spot-on-lawn แบบ 2 fold dilution

จากการนำแบคทีเรียแลคติก 12 ไอโซเลท ซึ่งยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีและยับยั้งได้มากกว่า 1 ชนิด ได้แก่ ไอโซเลท NP1.4, NP2.1, NP2.4, NP3.8, NP3.10, NP5.4, NP6.2, NP7.3, NP7.8, NP7.9, NP10.6 และ NP10.7 มาทดสอบยืนยันความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 21 ชนิด รวมถึงแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ โดยวิธี spot-on-lawn แบบ 2 fold dilution (รูปที่ 2) พบว่ามีเพียงส่วนใสจาก NP3.8 และ NP5.4 ที่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ ดังแสดงในตารางที่ 3 โดยไอโซเลท NP 3.8 สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 16 ชนิด สามารถยับยั้ง *B. coagulans* JCM 2257 และ *Lis. innocua* ATCC 33090 ได้ดีที่สุด (1,600 AU/ml) รวมทั้งไม่ยับยั้งตัวเอง และไม่ยับยั้งไอโซเลท NP5.4

ในขณะที่ไอโซเลท NP5.4 สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 19 ชนิด สามารถยับยั้ง *Lb. sakei* JCM 1157 ได้ดีที่สุด (3,200 AU/ml) ยับยั้ง *B. subtilis* JCM 1465, *B. cereus* ATCC 1178 และ *Lis. innocua* LTH 3096 ได้ นอกจากนี้ยังยับยั้งไอโซเลท NP3.8 (200 AU/ml) แต่ไม่ยับยั้งตัวเอง



รูปที่ 2 ผลการทดสอบหาความเข้มข้นของสารที่ผลิตจากไอโซเลท NP3.8 ในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Lis. innocua* ATCC 33090 โดยวิธี spot-on-lawn

ตารางที่ 3 ประสิทธิภาพของสารยับยั้งที่ได้จากแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 23 ชนิด

เชื้อทดสอบ	ความเข้มข้นของสารยับยั้ง (AU/ml)	
	NP3.8	NP5.4
1. *B. cereus* ATCC 11778	0	400
2. *B. circulans* JCM 2504	800	100
3. *B. coagulans* JCM 2257	1,600	100
4. *B. subtilis* JCM 1465	0	1,600
5. *E. coli* JM 109	0	0
6. *Ent. faecalis* JCM 5803	400	200
7. *K. varians* LTH 1545	800	100
8. *Lis. innocua* ATCC 33090	1,600	100
9. *Lis. innocua* LTH 3096	200	400
10. *M. luteus* IFO 12708	0	200
11. *Sal.* Anatum WHO-BKK	0	0
12. *Staph. aureus* ATCC 6538	100	100
13. *Staph. carnosus* LTH 2102	200	100
14. *Lb. plantarum* ATCC 8014	800	800
15. *Lb. sakei* JCM 1157	800	3,200
16. *Lc. lactis* JCM 7638	100	0
17. *Lc. cremoris* TUA 1344L	800	1,600
18. *Leu. mesenteroides* JCM 6124	400	800
19. *P. pentosaceus* JCM 5885	400	1,600
20. *P. pentosaceus* JCM 5890	400	800
21. *Strep. salivarius* JCM 5707	800	800
22. NP3.8	0	200
23. NP5.4	0	0

การทดสอบยืนยันว่าสารยับยั้งเชื้อทดสอบเป็นโปรตีน

เมื่อนำสารยับยั้งเชื้อทดสอบที่ได้จากไอโซเลท NP3.8 และ NP5.4 ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดี มาทดสอบยืนยันคุณสมบัติความเป็นแบคทีริโอซิน ด้วยเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes) ดังแสดงในตารางที่ 4 พบว่าส่วนใสจาก NP3.8 ที่ใช้ *Lis. innocua* ATCC 33090 เป็นเชื้อทดสอบ และ NP5.4 ที่ใช้ *Lb. sakei* JCM 1157 เป็นเชื้อทดสอบ ถูกยับยั้งประสิทธิภาพอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ α-chymotrypsin, ficin และ trypsin หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 ชั่วโมง แต่ไม่ถูกยับยั้งประสิทธิภาพด้วยเอนไซม์ proteinase K โดยส่วนใสจาก NP3.8 กับ NP5.4 ยังคงเหลือประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบเท่ากับ 200 AU/ml เมื่อทดสอบกับเอนไซม์ pepsin ส่วนใสจาก NP3.8 ยังคงเหลือประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบเท่ากับ 100 AU/ml โดยส่วนใสจาก NP5.4 ยังคงเหลือประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบเท่ากับ 800 AU/ml และเมื่อทดสอบกับเอนไซม์ protease XIII ส่วนใสจาก NP3.8 กับ NP5.4 ยังคงเหลือประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบเท่ากับ 400 AU/ml แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งเชื้อทดสอบที่คัดแยกได้จากแหนมปลาทั้ง 2 ไอโซเลท มีคุณสมบัติเป็นโปรตีนและเป็นแบคทีริโอซิน

ตารางที่ 4 ผลของเอนไซม์ย่อยโปรตีนต่อประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบของสารยับยั้งที่ได้จาก NP3.8 และ NP5.4

Proteolytic enzyme		Residual Activity (AU/ml)	
		NP3.8	NP5.4
Control	pH 3.0	3,200	3,200
Control	pH 6.5	1,600	1,600
α-Chymotrypsin	pH 6.5	0	0
Ficin	pH 6.5	0	0
Proteinase K	pH 6.5	200	200
Trypsin	pH 6.5	0	0
Pepsin	pH 3.0	100	800
Protease XIII	pH 3.0	400	400

หมายเหตุ: NP3.8 ใช้ *Lis. innocua* ATCC 33090 เป็นเชื้อทดสอบ
NP5.4 ใช้ *Lb. sakei* JCM 1157 เป็นเชื้อทดสอบ

มีงานวิจัยคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากแหนมปลาเช่นเดียวกัน ได้เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 สร้างแบคทีริโอซินนำมาทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน trypsin และ pancreatin ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Staph. aureus* พบว่ายับยั้งเชื้อได้น้อยลงเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ทดสอบด้วยเอนไซม์ [12]

การทดสอบการทนความร้อนของแบคทีริโอซิน

จากผลการทดสอบยืนยันคุณสมบัติการทนความร้อนของแบคทีริโอซินโดยวิธี spot-on-lawn แบบ 2 fold dilution พบว่าส่วนใสจาก NP3.8 ที่ใช้ *Lis. innocua* ATCC 33090 เป็นเชื้อทดสอบ ถูกปรับค่า pH เป็น 3.0 และให้ความร้อนสูง ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบอยู่ คือ ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (1,600 AU/ml) และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (400 AU/ml) ส่วนใสจาก NP3.8 ที่ปรับค่า pH เป็น 6.5 และให้ความร้อนสูง ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบเช่นกัน คือที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (800 AU/ml) และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (100 AU/ml) แต่ค่าประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบอาจลดลงบ้าง แสดงว่าสารยับยั้งจาก NP3.8 จัดว่าเป็นแบคทีริโอซินที่ทนความร้อนได้สูง เมื่อมีค่า pH ที่ต่ำ ส่วนใสจาก NP5.4 ถูกปรับค่า pH เป็น 3.0 และให้ความร้อนสูง ยังมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบอยู่ คือ ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (800 AU/ml) และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที (200 AU/ml) ส่วนใสจาก NP5.4 ที่ปรับค่า pH เป็น 6.5 และให้ความร้อน ยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ คือ ที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (400 AU/ml) แต่เมื่อให้ความร้อนสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารยับยั้งจาก NP5.4 ถูกทำลายประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ดังแสดงในตารางที่ 5 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบเป็นโปรตีนที่ทนความร้อนได้สูงและมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อได้ดีในสภาพที่มีความเป็นกรด

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากแหนมปลาเช่นเดียวกัน พบว่าได้เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 สร้างแบคทีริโอซินที่สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที โดยที่ประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ *Staph. aureus* ไม่ได้ลดลง เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และมีความคงตัวได้ดีในช่วง pH 4.0-7.0 [12]

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบการทนความร้อนของแบคทีริโอซินที่ได้จาก NP3.8 และ NP5.4

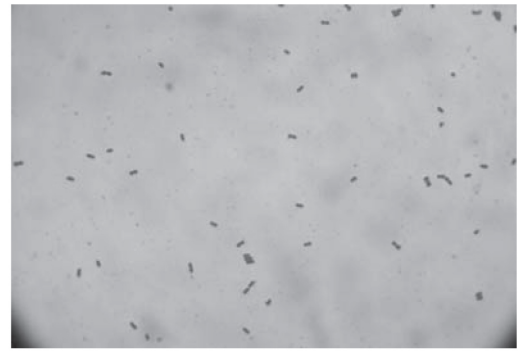
Isolate	Residual Activity (AU/ml)					
	pH 3.0			pH 6.5		
	Control	100˚C 10 min	121˚C 15 min	Control	100˚C 10 min	121˚C 15 min
NP3.8	3,200	1,600	400	1,600	800	100
NP5.4	3,200	800	200	1,600	400	0

หมายเหตุ: NP3.8 ใช้ *Lis. innocua* ATCC 33090 เป็นเชื้อทดสอบ
NP5.4 ใช้ *Lb. sakei* JCM 1157 เป็นเชื้อทดสอบ

การจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้

จากผลการทดลองการหมักย่อยน้ำตาลชนิดต่างๆ ของไอโซเลท NP3.8 และ NP5.4 ดังแสดงในตารางที่ 6 โดยชุดตรวจ API 50 CH ที่มีน้ำตาลชนิดต่างๆ อยู่ 49 ชนิด จำนวน 49 ช่อง และมีช่องควบคุมที่ไม่มีน้ำตาล 1 ช่อง นำผลที่ได้ไปอ่านผลหาความสัมพันธ์ของชนิดเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจาก API 50 CH database เมื่อนำไปทดสอบเอกลักษณ์เบื้องต้นของชนิดเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจาก API 50 CH Database พบว่าไอโซเลท NP3.8 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lb. plantarum* 99.9% ดังแสดงในรูปที่ 3 และไอโซเลท NP5.4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* 92.6% ดังแสดงในรูปที่ 4 ซึ่งแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลท มีความสอดคล้องกับรูปร่างทางสัณฐานวิทยาที่ได้จากการย้อมแกรม

รูปที่ 3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท NP3.8 รูปร่างเป็นท่อนยาว กำลังขยาย 1,000 เท่า



รูปที่ 4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไอโซเลท NP5.4 รูปร่างเป็นรูปไข่ กำลังขยาย 1,000 เท่า

ตารางที่ 6 ผลการย่อยคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท NP3.8 และ NP5.4 โดยใช้ชุดตรวจ API 50 CH

Tests	NP3.8	NP5.4	Tests	NP3.8	NP5.4
Control	-	-	Esculin (ESC)	+	+
Glyceral (GLY)	-	-	Salicin (SAL)	+	+
Erythritol (ERY)	-	-	Cellobiose (CEL)	+	+
D-Arabinose (DARA)	-	-	Maltose (MAL)	+	+
L-Arabinose (LARA)	+	-	Lactose (LAC)	+	+
Ribose (RIB)	+	+	Melibiose (MEL)	-	-
D-Xylose (DXYL)	-	+	Saccharose (SAC)	+	+
L-Xylose (LXYL)	-	-	Trehalose (TRE)	+	+
Adonitol (ADO)	-	-	Inulin (INU)	?	-
β-Methyl xyloside (MDX)	-	-	Melezitose (MLZ)	+	-
Galactose (GAL)	+	+	D-Raffinose (RAF)	-	-
D-Glucose (GLU)	+	+	Amidon (AMD)	-	?
D-Fructose (FRU)	+	+	Glycogene (GLYG)	-	-
D-Mannose (MNE)	+	+	Xylitol (XYT)	-	-
L-Sorbose (SBE)	-	-	β-Gentiobiose (GEN)	?	+
Rhamnose (RHA)	-	-	D-Turanose (TUR)	+	-
Dulcitol (DUL)	-	-	D-Lyxose (LYX)	-	-
Inositol (INO)	-	-	D-Tagatose (TAG)	-	-

ตารางที่ 6 (ต่อ)

Tests	NP3.8	NP5.4	Tests	NP3.8	NP5.4
Mannitol (MAN)	+	+	D-Fucose (DFUC)	-	-
Sorbitol (SOR)	+	-	L-Fucose (LFUC)	-	-
α-Methyl-D-mannoside (MDM)	+	-	D-Arabitol (DARL)	-	-
α-Methyl-D-glucoside (MDG)	-	-	L-Arabitol (LARL)	-	-
N-Acetyl glucosamine (NAG)	+	+	Gluconate (GNT)	?	?
Amygdalin (AMY)	+	?	2-Ketogluconate (2KG)	-	-
Arbutin (ARB)	+	+	5-Ketogluconate (5KG)	-	-

หมายเหตุ: ผล (+) หมายถึง มีการหมักย่อยสารคาร์โบไฮเดรตได้ เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง
ผล (-) หมายถึง ไม่สามารถย่อยสารคาร์โบไฮเดรต ยังคงเป็นสีม่วง
ผล (?) แสดงว่ามีการหมักย่อยน้ำตาลไม่สมบูรณ์ เป็นสีเขียว

การทดสอบทางด้านการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลา

จากการทดสอบทางด้านการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลาทั้ง 3 สูตร โดยพิจารณาปัจจัยคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัส คือ สี กลิ่น รสชาติ ความเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวมของแหนมปลาที่หมักโดยกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก เปรียบเทียบกับแหนมปลาที่หมักตามธรรมชาติดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของรสชาติผลิตภัณฑ์แหนมปลา ทั้ง 3 สูตร

การทดสอบ	ผลิตภัณฑ์แหนมปลาสูตรต่างๆ		
	010	020	030
สี	7.00 ± 0.76^{a}	5.47 ± 0.68^{b}	6.80 ± 0.74^{a}
กลิ่น	6.37 ± 0.57^{a}	5.43 ± 0.68^{b}	6.57 ± 0.76^{a}
รสชาติ	6.70 ± 0.70^{a}	5.57 ± 0.57^{b}	6.77 ± 0.82^{a}
ความเปรี้ยว	7.23 ± 0.70^{a}	5.80 ± 0.66^{c}	6.70 ± 0.77^{b}
เนื้อสัมผัส	6.97 ± 0.72^{a}	5.63 ± 0.67^{b}	7.17 ± 0.79^{a}
ความชอบโดยรวม	6.90 ± 0.66^{b}	5.73 ± 0.58^{c}	7.60 ± 0.72^{a}

หมายเหตุ: ตัวอักษร a, b และ c ที่ต่างกันตามแนวนอน แสดงว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากผลการทดสอบด้านประสาทสัมผัสของรสชาติผลิตภัณฑ์แหนมปลาทั้ง 3 สูตร พบว่าแหนมปลาสูตร 010 ที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP3.8 ทำให้ได้แหนมปลามีสีชมพูอ่อน มีกลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสมีคุณภาพใกล้เคียงกับแหนมปลาสูตร 030 ที่มีการหมักแบบธรรมชาติ มีคะแนนอยู่ในระดับความชอบปานกลาง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) แต่แหนมปลาสูตร 020 ที่ใส่แบคทีเรียแลคติก NP5.4 มีกระบวนการหมักเกิดขึ้นช้ากว่าสูตรอื่นๆ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีค่อนข้างซีด และมีรสชาติเปรี้ยวน้อยกว่าสูตรอื่นๆ จึงมีคะแนนอยู่ในระดับความชอบเล็กน้อย มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) จากการทดลองจึงสรุปได้ว่าแบคมีเรียแลคติก *Lb. plantarum* NP3.8 มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมปลาต่อไป เพราะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีใกล้เคียงกับแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาปริมาณแบคทีเรียแลคติก จากผลิตภัณฑ์แหนมปลาพร้อมบริโภค จำนวน 10 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณอยู่ในช่วง 1.2×10^7- 4.4×10^9 CFU/g เมื่อนำแบคทีเรียแลคติก จำนวน 100 ไอโซเลท ที่แยกได้จากแหนมปลามาทดสอบการสร้างสารซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 8 ชนิด โดยวิธี direct agar spot method พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่ยับยั้งเชื้อทดสอบได้ทั้งหมด 36 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือกแบคทีเรียแลคติก 12 ไอโซเลท ที่ได้ผลการยับยั้งเชื้อทดสอบดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลท NP1.4, NP2.1, NP2.4, NP3.8, NP3.10, NP5.4, NP6.2, NP7.3, NP7.8, NP7.9, NP10.6 และ NP10.7 มาทดสอบยืนยันการสร้างแบคทีริโอซินในอาหารเหลว MRS broth แล้วนำมาทดสอบกับเชื้อทดสอบ 23 ชนิด โดยวิธี spot-on-lawn พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลท คือ NP3.8 คัดแยกมาจากแหนมปลากรายนิตยา และ NP5.4 คัดแยกมาจากปลาส้มฟักเจ้าตำหรับแม่น้อย สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ โดยไอโซเลท NP3.8 สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 16 ชนิด สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ดี คือ *B. coagulans* JCM 2257 และ *Lis. innocua* ATCC 33090 (1,600 AU/ml) ส่วนไอโซเลท NP5.4 สามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อทดสอบได้ 19 ชนิด และสามารถยับยั้ง *Lb. sakei* JCM 1157 (3,200 AU/ml) รวมทั้งเชื้อทดสอบได้ดี คือ *B. subtilis* JCM 1465, *Lc. cremoris* TUA 1344L และ *P. pentosaceus* JCM 5885 (1,600 AU/ml) *B. cereus* ATCC 11778 และ *Lis. innocua* LTH 3096 (400 AU/ml)

จากการทดสอบยืนยันคุณสมบัติความเป็นโปรตีนของแบคทีริโอซิน ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ พบว่าสารที่ผลิตจากไอโซเลท NP3.8 และ NP5.4 ถูกยับยั้งประสิทธิภาพอย่างสมบูรณ์ด้วยเอนไซม์ α-chymotrypsin, ficin และ trypsin แต่ถูกยับยั้งประสิทธิภาพเพียงบางส่วนด้วยเอนไซม์ proteinase K, pepsin และ protease XIII แสดงว่าสารยับยั้งเชื้อทดสอบที่คัดแยกได้จากแหนมปลาทั้ง 2 ไอโซเลท นี้มีคุณสมบัติเป็นโปรตีน จากการทดสอบการทนความร้อนของแบคทีริโอซิน พบว่าส่วนใสจาก NP3.8 ที่ปรับค่า pH เป็น 3.0 และ 6.5 ยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบอยู่ แม้จะถูกให้ความร้อนสูงที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ในขณะที่ส่วนใสจาก NP5.4 ที่ปรับค่า pH เป็น 3.0 ยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบอยู่ แม้จะถูกให้ความร้อนสูงที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที แต่ถ้าปรับค่า pH เป็น 6.5 เมื่อให้ความร้อนสูงถึง 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที สารที่ผลิตจาก NP5.4

จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อทดสอบได้ การที่สารยับยั้งถูกทำลายประสิทธิภาพด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และทนความร้อนที่ pH ต่ำ จึงเป็นไปได้ว่าสารยับยั้งที่ผลิตจาก NP3.8 และ NP5.4 น่าจะอยู่ในกลุ่มของแบคทีริโอซิน [6]

การทดสอบเอกลักษณ์เบื้องต้นของไอโซเลท NP3.8 และ NP5.4 โดยการย้อมสีแกรม ศึกษาสัณฐานวิทยา และทดสอบสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ API 50 CH Kit เปรียบเทียบกับเอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติกจาก API 50 CH Database พบว่า NP3.8 เซลล์มีลักษณะเป็นท่อนยาว แกรมบวก และมีสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lb. plantarum* 99.9% ในขณะที่ NP5.4 เซลล์มีลักษณะรูปไข่ แกรมบวก และมีสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* 92.6% ซึ่งเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้มีรายงานว่าแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด และสามารถสร้างแบคทีริโอซินได้ เช่น มีรายงานการคัดแยกเชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* FFL17-2 จากแหนมปลา [12] เชื้อ *Lc. lactis* subsp. *lactis* H-559 จากกิมจิ [13] เชื้อ *Lc. lactis* NK24 จาก Jeot-gal [14] เชื้อ *Lc. lactis* MMFII จากนมหมัก Tunisian [15] และเชื้อ *Lc. lactis* WNC20 ได้จากแหนม [16] ซึ่งสามารถสร้างแบคทีริโอซินที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 100 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-30 นาที และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น *Staph. aureus, Lis. monocytogenes, B. cereus, B. subtilis, Clostridium perfringens, E. coli, Pseudomonas aeruginosa* และแบคทีเรียแลคติกหลายชนิด [12-16] และมีรายงานการแยกเชื้อ *Lb. plantarum* J23 จากน้ำองุ่นหมักในประเทศสเปน [17] เชื้อ *Lb. plantarum* KLDS1.0391 จากครีมหมัก Jiaoke ในประเทศจีน [18] และเชื้อ *Lb. plantarum* A-1 จาก Tortilla (maxican corn bread) [19] ซึ่งสามารถสร้างแบคทีริโอซินที่ทนความร้อนที่อุณหภูมิ 90 และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15-30 นาที และมีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรค เช่น *Staph. aureus, Lis. monocytogenes, Sal. typhimurium, E. coli* และแบคทีเรียแลคติกหลายชนิด [17-19]

มีการศึกษาคุณภาพของแหนมปลาโดยใช้เชื้อที่แยกได้มาใช้ในการผลิตแหนมปลาจากเชื้อบริสุทธิ์ โดยคัดแยกได้แบคทีเรีย *Lb. pentosus, Lb. plantarum, Lb. fermentum* และยีสต์ *Candida sake* ซึ่งพบว่าแหนมปลาที่เติม *Lb. plantarum* มีคะแนนความชอบด้านความยืดหยุ่นและความชอบรวมสูงกว่าแหนมปลาที่ไม่เติมเชื้อบริสุทธิ์ ($p \leq 0.05$) แต่ก็ไม่แตกต่างจากแหนมปลาที่เติมเชื้อผสม ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดี่ยวหรือสายพันธุ์ผสมของ *Lb. plantarum* เพื่อช่วยลดระยะเวลาในการหมักและปรับปรุงคุณภาพแหนมปลา [20]

การทดสอบทางด้านการยอมรับของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์แหนมปลาจากเชื้อบริสุทธิ์ *Lb. plantarum* NP3.8, *Lc. lactis* subsp. *lactis* NP5.4 เปรียบเทียบกับการหมักแบบธรรมชาติโดยไม่ได้ใส่แบคทีเรียแลคติก พบว่าเชื้อ NP3.8 หมักได้เร็วที่สุด ทำให้ได้แหนมปลาสีชมพู มีกลิ่น รสเปรี้ยวและเนื้อสัมผัสใกล้เคียงกับแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ ในขณะที่แหนมปลาสูตรที่ผลิตจากเชื้อ NP5.4 ใช้เวลาในการหมักนานกว่าสูตรอื่นๆ สีค่อนข้างซีด รสเปรี้ยวน้อยกว่าสูตรอื่นๆ และได้รับคะแนนการยอมรับอยู่ในระดับความชอบเล็กน้อย แตกต่างจากแหนมปลาสูตรอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

จากการทดลองในครั้งนี้สรุปได้ว่า *Lb. plantarum* NP3.8 มีศักยภาพสูงในการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมปลาต่อไป เพราะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีใกล้เคียงกับแหนมปลาที่หมักแบบธรรมชาติ ใช้เวลาในการหมักที่สั้นลง และยังสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ หลายชนิดที่อาจก่อโรคหรือทำให้อาหารเน่าเสีย จึงได้ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

เอกสารอ้างอิง

1. พัศมัย เอกก้านตรง. 2543. อาหารหมัก-ดองของไทย. ฝ่ายโภชนาการชุมชน. สถาบันวิจัยโภชนาการ. มหาวิทยาลัยมหิดล. นครปฐม: 1 -7.
2. Frazier, W. C., and Westhoff, D. C. 1988. Food Microbiology. 4th Edition. Singapore. McGraw-Hill Co. 539 p.
3. Adam, M. R. 1999. Safety of Industrial Lactic Acid Bacteria. *Journal of Biotechnology* 68: 171-178.
4. Rodriguez, J. M., Martinez, M. I., Horn, N, and Dodd, H. M. 2002. Heterologous Production of Bacteriocins by Lactic Acid Bacteria. *International Journal of Food Microbiology* 80: 101-116.
5. Adams, M. R., and Nicolaides, L. N. 1997. Review of the Sensitivity of Different Foodborne Pathogens to Fermentation. *Food Control* 8: 227-239.
6. De Vuyst, L., and Vandamme, E. J. 1994. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetic and Application. London. Blackie Academic and Professional. p. 91-130.
7. O'Sullivan, L., Ross, R. P., and Hill, C. 2002. Potential of Bacteriocins-Producing Lactic Acid Bacteria for Improvements in Food Safety and Quality. *Journal of Biochemistry* 84: 593-604.
8. Fleming, H. P., Etchells, J. L., and Costilow, R. L. 1985. Microbial Inhibition by an Isolate of Pediococcus from Cucumber Brines. *Applied Microbiology* 30: 1040-1042.
9. Tichaczek, P. S., Nissen-Meyer, J., Nes, I. F., Vogel, R. F., and Hamme, W. P. 1992. Characterization of the bacteriocin curvacin A from *Lactobacillus curvatus* LTH 1174 and sakacin from *Lactobacillus sakei* LTH 673. *Systematic and Applied Microbiology* 15: 460-468.
10. Ennahar, S., Zendo, T., Sonomoto, K., and Ishizaki, A. 1999. Investigation of Bacteriocin Production and Purification from *Nukadoto* Isolates Displaying Antimicrobial Activity. *Japanese Journal Lactic Acid Bacteria* 10: 29-37.
11. ปราณี อ่านเปรื่อง. 2547. หลักการวิเคราะห์อาหารด้วยประสาทสัมผัส. ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. p. 183-206.
12. Siripoke, S., Aungpraphapornchai, P., Potivejkul, K., and Pringsulaka, O. 2007. Screening and Identification of Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Fermented Foods and Preliminary Characterizastion of the Bacteriocin. *Srinakharinwirot Science Journal* 23(2): 145-60.
13. Lee, H.-J., Joo, Y.-J., Park, C.-S., Kim, S.-H., Hwang, I.-K., A, J.-S., and Mheen, T.-I. 1999. Purification and Characterization of a Bacteriocin Produce by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* H-559 Isolated from Kimchi. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 88(2): 153-159.

14. Lee, N.-K., and Paik, H.-D. 2001. Partial Characterization of Lacticin NK24, a Newly Identified Bacteriocin of *Lactococcus lactis* NK24 Isolated from Jeot-Gal. *Food Microbiology* 18: 17-24.
15. Ferchichi, M., Frère, J., Mabrouk, K., and Manai, M. 2001. Lactococcin MMFII, a Novel Class IIa Bacteriocin Produced by *Lactococcus lactis* MMFII, Isolated from a Tunisian Dairy Product. *FEMS Microbiology Letters* 205: 49-55.
16. Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangri, P., Sonomoto, K., and Panyim, S. 2003. Isolation of Nisin-Producing *Lactococcus lactis* WNC 20 Strain from Nham, a Traditional Thai Fermented Sausage. *International Journal of Food Microbiology* 81: 137-145.
17. Rojo-Bezares, B., Sàenz, Y., Navarro, L., Zarazaga, M., Ruiz-Larrea, F., and Torres, C. 2007. Cocuture-Inducible Bacteriocin Activity of *Lactobacillus plantarum* Strain J23 Isolated from Grape Must. *Food Microbiology* 24: 482-491.
18. Gong, H. S., Meng, X. C., and Wang, H. 2010. Plantaricin MG Active Against Gram-Negative Bacteria Produced by *Lactobacillus plantarum* KLDS1.0391 Isolated from "Jiaoke", a Traditional Fermented Cream from China. *Food Control* 21: 89-96.
19. Hata, T., Tanaka, R., and Ohmomo, S. 2010. Isolation and Characterization of Plantaricin ASM1: A New Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* A-1. *International Journal of Food Microbiology* 137: 94-99.
20. สิริโชค วงศ์ศรีไพศาล วลัยรัตน์ จันทรปานนท์ และเพ็ญขวัญ ชมปรีดา. 2552. การศึกษาคุณภาพของแหนมปลาที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการผลิต. *การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 47 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร.* กรุงเทพฯ. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 540-547.

ได้รับบทความวันที่ 9 เมษายน 2553
ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 3 กันยายน 2553