การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักพื้นบ้านเพื่อใช้เป็นโพรไบโอติกในอาหารสัตว์น้ำที่ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียน

SCREENING LACTIC ACID BACTERIA FROM LOCAL FERMENTED FOOD FOR USING AS PROBIOTIC IN AQUATIC ANIMAL FEED MIXED WITH DIETARY FIBER FROM DURIAN RIND

หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์[1*] ปุญญิศา วัฒนะชัย[2] และ สราวุธ แสงสว่างโชติ[1]

Yardrung Suwannarat[1*], Punyisa Wattanachai[2], and Sarawut Sangsawanchote[1]

[1]คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี

[2]คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

[1]Faculty of Agricultural Technology, Rambhai Barni Rajabhat University

[2]Faculty of Science, Burapha University

[*]corresponding author e-mail: yardrung.s@rbru.ac.th

(Received: 6 April 2022; Revised: 9 June 2022; Accepted: 15 June 2022)

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนเป็นพรีไบโอติกในอาหารสัตว์น้ำร่วมกับโพรไบโอติกแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักเพื่อเลี้ยงปลาตะเพียน การทดลองประกอบด้วย การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก และการเตรียมอาหารสัตว์น้ำโดยใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนเป็นพรีไบโอติกร่วมกับโพรไบโอติกแบคทีเรีย สำหรับเลี้ยงปลา ผลการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก จำนวน 30 ตัวอย่าง พบว่า สามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทสามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน และสามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จำนวน 31 ไอโซเลท เมื่อทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่สามารถทนสภาวะกรดและเกลือน้ำดี จำนวน 6 ไอโซเลท คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกและเจริญได้ดีที่สุดไปใช้ในขั้นต่อไป การเตรียมอาหารเริ่มจากนำใยอาหารจากเปลือกทุเรียนผสมในสูตรอาหารเลี้ยงปลาที่ร้อยละ 0 10 20 30 และ 40 ผสมเซลล์แบคทีเรียและนำไปใช้เลี้ยงปลา ผลการทดลอง พบว่า การใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนผสมในอาหารเลี้ยงปลาตะเพียนที่ระดับต่างๆ ทำให้การเจริญเติบโตของชุดทดลองด้านน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักตัวเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อและอัตราการรอดตาย ไม่แตกต่างจากชุดควบคุม แสดงให้เห็นว่า

อาหารสัตว์น้ำที่เตรียมจากใยอาหารเปลือกทุเรียนสามารถใช้ร่วมกับโพรไบโอติกแบคทีเรียที่แยกจากอาหารหมักเพื่อเลี้ยงปลาตะเพียน และสามารถใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าเปลือกทุเรียน

คำสำคัญ: แบคทีเรียแลคติก อาหารหมัก ใยอาหาร เปลือกทุเรียน ปลาตะเพียน

Abstract

This research aimed to use dietary fiber (DF) from durian rind as a prebiotic with probiotic bacteria from fermented food in the aquatic feed for feeding the Thai carp. The experiments comprised of screening the lactic acid bacteria (LAB) from fermented food and preparation of aquatic animal feed by using DF from durian rind as a prebiotic with the isolated probiotic bacteria for feeding the Thai carp. The results of screening the LAB from 30 fermented food samples found that 35 isolates of LAB were isolated and all isolate were able to grow in anaerobic condition. There were 31 LAB isolates could grow in aerobic and anaerobic conditions. For the probiotic properties, there were 6 LAB isolates could tolerate acid and bile salt conditions. The LAB with the best probiotic property and growth was selected to use in the next experiment. The preparation diet was started by preparing the DF from durian rind, mixed the DF in Thai carp diet at the percentage of 0, 10, 20, 30, and 40 mixed the obtained diet with probiotic cells and used diet to feed fishes. The results found that the utilization of DF from durian rind mixed in Thai carp diet at different levels led to the growth of trial fish included weight gain, average daily gain (ADG), specific growth rate (SGR), feed conversion ratio and survival rate were not significant difference from the control. From the results indicated that the aquatic animal prepared from DF of durian rind could be used with isolated probiotic bacteria from fermented food for feeding Thai carp and can be a guideline to add value of durian rind.

Keywords: Lactic acid bacteria, Fermented food, Dietary fiber, Durian rind, Thai Carp

บทนำ

แบคทีเรียแลคติก เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe; GRAS) สามารถนำมาใช้ในการถนอมอาหารและใช้เป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ มีลักษณะเป็นท่อนยาวหรือสั้นและกลมหรือเกาะกันเป็นสายยาว รูปร่างของเซลล์เปลี่ยนแปลงไปตามสิ่งแวดล้อม สามารถทนกรดได้ดี (Wood & Hopzapfel,

1995) ส่วนใหญ่แบคทีเรียแลคติกต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ และมีบางชนิดที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญ มักพบในอาหารหมักดอง เช่น เนื้อหมัก นมหมัก ผักกาดดอง และปลาหมัก แบคทีเรียชนิดนี้เป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพ และมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (Zannini et al., 2016) มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก โดยจะผลิตกรดอินทรีย์ ทำให้ค่าความเป็นกรด–ด่าง ในผลิตภัณฑ์ลดลง สามารถสังเคราะห์กรดแลคติกและกรดอะซิติก ซึ่งเป็นกรดอินทรีย์ที่ใช้ในการถนอมอาหาร นอกจากสามารถควบคุมความเป็นกรดในอาหารหมักแล้ว ยังช่วยในเรื่องของการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเสื่อมเสียและแบคทีเรียที่ทำให้เกิดสารพิษในอาหารได้ (Kobayashi et al., 2004) แบคทีเรียแลคติกอาจสร้างสารบางชนิด เช่น ไดอะซิติล (Diacetyl) ที่เป็นสารให้กลิ่นรส ไฮโดรเจนเปอออกไซด์ (Hydrogen peroxide) และแบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) เป็นต้น โดยสารประเภทนี้อาจมีผลในการยับยั้งเชื้อที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Bacillus cereus Escherichia coli Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* spp. (Hwanhlem et al., 2010; Soria & Audisio, 2014) ปัจจุบันแบคทีเรียโพรไบโอติกนิยมนำมาใช้ในกลุ่มสัตว์น้ำทั้งการเลี้ยงปลาและกุ้ง การใช้โพรไบโอติกเสริมในอาหารสัตว์น้ำเป็นการช่วยรักษาระดับความสมดุลของจำนวนแบคทีเรียในทางเดินอาหาร ทำให้ตัวอ่อนของสัตว์น้ำมีอัตราการรอดชีวิต และผลผลิตจากสัตว์น้ำเพิ่มมากขึ้น (Villamil et al., 2003)

ใยอาหาร (Dietary fiber) ประกอบด้วย ส่วนที่เหลือของเซลล์พืชที่มีความต้านทานต่อการย่อยโดยเอนไซม์ในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ (Rodriguez et al., 2006) ซึ่งส่วนประกอบของใยอาหาร ประกอบด้วย เฮมิเซลลูโลส (Hemicelluloses) เซลลูโลส (Cellulose) ลิกนิน (Lignin) โอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharides) เพคติน (Pectins) กัม (Gums) และแวกซ์ (Wax) ใยอาหารสามารถต้านทานการย่อยหรือการดูดซึมในลำไส้เล็กของมนุษย์และมีการหมักที่สมบูรณ์หรือบางส่วนในลำไส้ใหญ่ (The American Association of Cereal Chemists, 2001) โดยแบ่งตามลักษณะการละลายในลำไส้ได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ ใยอาหารที่ละลายน้ำ (Soluble dietary fiber) และใยอาหารที่ไม่ละลายน้ำ (Insoluble dietary fiber) สำหรับใยอาหารที่ละลายน้ำได้รับการยอมรับอย่างแพร่หลายว่ามีผลดีต่อสุขภาพของมนุษย์สามารถป้องกันโรคได้หลายโรค รวมทั้งการป้องกันโรคมะเร็ง (Rodriguez et al., 2006) การเสริมใยอาหารลงในอาหารจะทำให้ได้อาหารที่มีแคลอรี คอเลสเตอรอลและไขมันต่ำ เศษเหลือจากพืชที่ได้จากการแปรรูป เช่น เปลือก แกน และส่วนที่ไม่สามารถรับประทานได้ สามารถนำมาสกัดใยอาหารเพื่อใช้ประโยชน์ตามคุณสมบัติเชิงหน้าที่ของใยอาหารที่สกัดได้ นอกจากนี้สารสกัดจากใยอาหารของเปลือกผลไม้ยังมีคุณสมบัติในการต้านออกซิเดชันสูง และสามารถต้านจุลินทรีย์บางชนิดได้ มีรายงานว่าใยอาหารจากเปลือกมะม่วงมีประสิทธิภาพเป็นสารต้านออกซิเดชันสูงกว่าสาร DL–α–tocopherol ที่ใช้ในทางการค้า (Larrauri, Ruperez, & Saura–Calixto, 1997) สารสกัดจากเปลือกมังคุดและเปลือกมะม่วงมีประสิทธิภาพเป็นสารต้านจุลินทรีย์ได้

(พงศธร, จิตศิริ, และศศิธร, 2551) และสารสกัดจากเปลือกทุเรียนมีความสามารถในการเป็นสารต้านออกซิเดชันและต้านแบคทีเรีย (หยาดรุ้ง และคณะ, 2560; หยาดรุ้ง และจิรพร, 2561) ในแต่ละฤดูกาลที่ทุเรียนให้ผลผลิต จะมีเปลือกทุเรียนเป็นเศษเหลือเป็นจำนวนมากที่ไม่ได้นำไปใช้ประโยชน์ แต่ปล่อยทิ้งเป็นขยะซึ่งสามารถส่งผลเสียให้กับสภาพแวดล้อมได้ในอนาคต ดังนั้นหากสามารถใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนเป็นพรีไบโอติกสำหรับแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากอาหารหมัก จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจศึกษา เพื่อนำไปใช้ประยุกต์ใช้ในรูปแบบต่างๆ โดยเฉพาะในอาหารสัตว์น้ำ โดยทั่วไปอาหารสัตว์น้ำถือเป็นต้นทุนหลักสำหรับเกษตรกรผู้เลี้ยงปลา อย่างไรก็ตามอาหารที่ดีต้องมีคุณสมบัติในการทำให้สัตว์น้ำโตเร็ว แข็งแรง ทนต่อโรคและสิ่งแวดล้อม อัตราแลกเนื้อต่ำ และก่อให้เกิดของเสียน้อยที่สุด (ไพรัตน์, ม.ป.ป) หากลดต้นทุนส่วนค่าอาหารได้จะก่อให้เกิดประโยชน์แก่เกษตรกร

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกโพรไบโอติกแบคทีเรียจากอาหารหมัก พัฒนาอาหารสัตว์น้ำโดยใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนและนำไปใช้ร่วมกับโพรไบโอติกแบคทีเรียที่แยกได้จากอาหารหมักเพื่อเลี้ยงปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) ซึ่งเป็นปลาที่นิยมบริโภคและมีการเลี้ยงกันทั่วไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมโพรไบโอติก

เก็บตัวอย่างอาหารหมักจากร้านค้าในสถานที่ต่างๆ ของจังหวัดชลบุรี คัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกและทดสอบคุณสมบัติของเชื้อที่แยกได้ (ภณิดา, วิลาวัณย์, และดวงพร, 2557; ผุสดี, จิรโรจน์, และกานต์ 2559; Lee, Kim, & Kunz., 2006) ดังนี้

1.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก

เตรียมตัวอย่างอาหารหมัก 25 กรัม ผสมกับสารละลายน้ำเกลือปราศจากเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ (Stomacher bag) ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องตีบดอาหาร (Stomacher) จากนั้นนำสารละลายตัวอย่างมาทำการเจือจางจนได้ระดับความเจือจางที่ 10^{-3} 10^{-4} 10^{-5} แล้วทำการ spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS agar) ที่เติมสาร Bromocresol purple (BCP) ร้อยละ 0.04 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน โดยทำระดับความเจือจางละ 2 ซ้ำ จนเกิดโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกโคโลนีที่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ จากสีม่วงเป็นสีเหลืองและโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกันนำมาขีดเชื้อ (Streak) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบคุณสมบัติแบคทีเรียแลคติกเบื้องต้นโดยการย้อมสีแกรม ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และการสร้างเอนไซม์

คะตะเลส เก็บรักษาแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ที่เติมสารละลายกลีเซอรอล ความเข้มข้นร้อยละ 30 ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป

1.2 การทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และปรับความขุ่นเริ่มต้นด้วยสารมาตรฐาน McFarland ให้มีค่า 0.5 (ปริมาณเชื้อประมาณ $1.5x10^8$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทดลอง 3 ซ้ำ และวัดการเจริญด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีค่าการดูดกลืนแสงมากกว่า 1.5 ไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

1.3 ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนต่างกัน

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ เลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ถ่ายเชื้อลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร โดยปรับความขุ่นเริ่มต้นด้วยสารมาตรฐาน McFarland ให้มีค่า 0.5 นำไปบ่มโดยแยกเป็น 2 ชุดการทดลอง คือ ชุดการทดลองที่ 1 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ 2 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีออกซิเจนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทดลอง 3 ซ้ำ และตรวจการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญทั้ง 2 สภาวะ

1.4 ทดสอบสภาวะการทนกรด

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อโดยปรับความขุ่นเริ่มต้นด้วยสารมาตรฐาน McFarland ให้มีค่า 0.5 ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS brothปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีการปรับค่าความเป็นกรด–ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 นอร์มัล ให้มีค่าความเป็นกรด–ด่าง 2 3 4 และ 5 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ทดลอง 2 ซ้ำ และนับจำนวนโคโลนีโดยวิธีดรอบเพลต (Drop plate)

1.5 ทดสอบการทนต่อสภาวะเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เลี้ยงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อโดยปรับความขุ่นเริ่มต้นด้วยสารมาตรฐาน McFarland ให้มีค่า 0.5 ลงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth ปริมาตร

5 มิลลิลิตร ที่มีการปรับความเป็นกรด–ด่าง ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล และสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 4 นอร์มัล ให้มีค่าความเป็นกรด–ด่าง 8 และผสมด้วยเกลือน้ำดี (Bile salt powder) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.3 0.6 และ 1.0 โดยมีอาหารที่ไม่เติมเกลือน้ำดี และค่าความเป็นกรด–ด่าง ของอาหาร 6.5 เป็นชุดควบคุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ที่สภาวะไม่มีออกซิเจน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ จากนั้นนับจำนวนเชื้อที่เหลือรอดของทุกความเข้มข้น โดยวิธีดรอบเพลต

2. การเตรียมใยอาหารเปลือกทุเรียน

ล้างทำความสะอาดเปลือกทุเรียนพันธุ์หมอนทองเพื่อกำจัดสิ่งสกปรกที่ติดมา แช่เปลือกในน้ำยาล้างผัก 10 นาที ผึ่งให้สะเด็ดน้ำ นำมาลดขนาดโดยการหั่นและบดในเครื่องปั่น หากยังไม่ทำการทดลองให้บรรจุทุเรียนบดใส่ถุงและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส สกัดใยอาหารโดยแช่เปลือกทุเรียนที่ผ่านการลดขนาดในน้ำสะอาดด้วยอัตราส่วน 1 : 1 (น้ำหนักต่อปริมาตร) กวนอย่างสม่ำเสมอที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที บีบแยกส่วนกากไปทำแห้งโดยใช้ตู้อบแบบลมร้อน (Oven drying) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หรือจนกว่าตัวอย่างมีความชื้นร้อยละ 9–10 โดยน้ำหนัก บดตัวอย่างแห้งด้วยเครื่องบด จากนั้นร่อนผ่านตะแกรงขนาด 150 ไมครอน เก็บใยอาหารในถุงฟอยล์ปิดสนิท ที่อุณหภูมิห้อง (Fuentes–Alventosa et al., 2009; Larrauri, Ruperez, & Saura–Calixto, 1997)

3. การเตรียมและการวิเคราะห์อาหารสัตว์น้ำที่ใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียน

ดัดแปลงจากสูตรอาหารสำเร็จรูปสำหรับเลี้ยงปลากินพืชน้ำจืด โดยให้มีปริมาณโปรตีนอย่างน้อยร้อยละ 25 วัตถุดิบ ประกอบด้วย ปลาป่น กากถั่วเหลือง รำละเอียด เปลือกกุ้ง สารเหนียว และใยอาหารจากเปลือกทุเรียนร้อยละ 0 10 20 30 และ 40 อบแห้งอาหาร และนำไปวิเคราะห์คุณค่าสารอาหาร (Proximate analysis) ได้แก่ โปรตีน ไขมัน เถ้า กากใย และความชื้น (AOAC, 2000) และค่าพลังงานด้วยเครื่องหาค่าพลังงานความร้อน (Bomb calorimeter IKA รุ่น C5003) ทดลอง 3 ซ้ำ นำอาหารที่เตรียมสำหรับเลี้ยงปลาในแต่ละชุดการทดลองมาผสมเซลล์โพรไบโอติกแบคทีเรียที่มีเซลล์แบคทีเรีย 10^8 โคโลนีต่อกรัม โดยวัดความขุ่นของสารแขวนลอยเทียบกับกราฟความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับจำนวนเซลล์ปริมาณร้อยละ 1 ผึ่งลมให้แห้งสนิท เตรียมอาหารในปริมาณที่ใช้หมดใน 1 สัปดาห์

4. การศึกษาการใช้อาหารสัตว์น้ำในการเลี้ยงปลาตะเพียน

นำอาหารสัตว์น้ำที่เตรียมได้มาเลี้ยงปลาตะเพียน (นัยนา, 2558) โดยสุ่มปลาตะเพียนที่มีอายุประมาณ 30 วัน ที่มีน้ำหนักตัวประมาณ 1.97–2.42 กรัมต่อตัว มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 46x137x53 เซนติเมตร จำนวน 15 ตู้ มีปริมาตรน้ำในตู้ 200 ลิตร กำหนดความหนาแน่น 15 ตัวต่อตู้ ให้ปลาตะเพียนได้รับอาหารที่ทดลองในระดับร้อยละ 10 ของน้ำหนักต่อตัวต่อวัน แบ่ง

การให้อาหารเป็น 2 ครั้งต่อวัน (เวลา 08.00 น. และ 16.00 น.) ดูดตะกอนของเสียออกจากตู้ทดลองทุกวันก่อนให้อาหารช่วงเช้า ตรวจสอบคุณภาพน้ำโดยตลอดการทดลอง เปลี่ยนถ่ายน้ำทุกสัปดาห์ และเลี้ยงเป็นระยะเวลา 60 วัน บันทึกผลการทดลองโดยจับปลาทั้งหมดจำนวน 15 ตัวต่อตู้ ของแต่ละซ้ำของชุดการทดลองในวันแรกและทุกๆ 2 สัปดาห์ จนครบ 60 วัน นำปลามาชั่งน้ำหนักด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าแบบดิจิทัลที่มีทศนิยม 3 ตำแหน่ง (Denver instrument, รุ่น Standard–T/TP series) และวัดความยาว (Total length) ของตัวปลาด้วยเวอร์เนียคาลิปเปอร์ (Vernier caliper) บันทึกปริมาณอาหารที่ปลากิน และนับจำนวนปลาทดลองที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง นำข้อมูลน้ำหนักของปลา ปริมาณอาหารที่ใช้และจำนวนปลาที่เหลือมาคำนวณน้ำหนักตัวเฉลี่ย (Average body weight) ความยาวเฉลี่ย (Average body length) น้ำหนักตัวเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน (Average daily gain; ADG) อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ (Feed conversion ratio; FCR) อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (Specific growth rate; SGR) และอัตราการรอดตาย (Survival rate) ดังสมการที่ 1–4

$$\text{น้ำหนักตัวเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน (กรัม)} = \frac{\text{น้ำหนักตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (กรัม)} - \text{น้ำหนักตัวปลาเริ่มต้น (กรัม)}}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)}} \quad (1)$$

$$\text{อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ} = \frac{\text{น้ำหนักอาหารที่ให้ทั้งหมด (กรัม)}}{\text{น้ำหนักปลาตลอดการเลี้ยง (กรัม)}} \quad (2)$$

$$\text{อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (ร้อยละ)} = \frac{\ln(\text{น้ำหนักตัวปลาเมื่อสิ้นสุดการทดลอง}) - \ln(\text{น้ำหนักตัวปลาเริ่มต้น}) \times 100}{\text{ระยะเวลาการเลี้ยง (วัน)}} \quad (3)$$

$$\text{อัตราการรอดตาย (ร้อยละ)} = \frac{\text{จำนวนปลาที่เหลือเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (ตัว)} \times 100}{\text{จำนวนปลาเริ่มต้นทดลอง (ตัว)}} \quad (4)$$

5. การวิเคราะห์ข้อมูล

วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD) ทำการทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ความแปรปรวน (Analysis of variance) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้วิธี Tukey's range test สำหรับการทดสอบแบคทีเรียแลคติก และวิธี Duncan's multiple range test; DMRT สำหรับการเปรียบเทียบการเลี้ยงปลา โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

ผลการวิจัย

1. ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมัก

จากการเก็บตัวอย่างอาหารหมักจากพืชและสัตว์มาคัดแยกเชื้อ จำนวน 30 ตัวอย่าง ประกอบด้วย ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง ผักเสี้ยนดอง ลูกคะน้าดอง กุ้งส้ม ปลาส้ม หอยดอง แหนมปลา แหนมหมูและไส้กรอกอีสาน ผลการทดลอง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้จำนวน 35 ไอโซเลท จากอาหารหมักจากพืชจำนวน 13 ไอโซเลท และอาหารหมักจากสัตว์จำนวน 12 ไอโซเลท โดยทั้ง 35 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ออกซิเดส มีเซลล์รูปท่อน 31 ไอโซเลท เซลล์รูปไข่ 1 ไอโซเลท และรูปกลม 3 ไอโซเลท ลักษณะเซลล์และโคโลนีของตัวอย่างอาหารหมัก ดังภาพที่ 1

ภาพที่ 1 ลักษณะเซลล์และโคโลนีจากตัวอย่างอาหารหมัก (ก) รูปท่อน (ข) รูปไข่ และ (ค) รูปกลม

2. ผลการทดสอบความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติต่างๆ ในการเป็นโพรไบโอติก ผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 35 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อยู่ในระดับที่ดีไปจนถึงดีเยี่ยม ดังตารางที่ 1 สำหรับการทดสอบสภาวะที่มีออกซิเจนต่างกัน พบว่า มีแบคทีเรียแลคติก จำนวน 31 ไอโซเลท สามารถเจริญได้ทั้ง 2 สภาวะ คิดเป็นร้อยละ 88.57 และมี 4 ไอโซเลท ที่เจริญได้ไม่ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน คิดเป็นร้อยละ 11.43

ตารางที่ 1 ค่าการดูดกลืนแสงของแบคทีเรียแลคติก 35 ไอโซเลท

ค่าการดูดกลืนแสง (ความยาวคลื่น 660 nm)	ค่าการเจริญ	จำนวนไอโซเลท (ไอโซเลท)	ไอโซเลท (ร้อยละ)
>1.5	เจริญได้ดีเยี่ยม	33	94.29
1.0–1.5	เจริญได้ดี	2	5.71
<1.0	เจริญได้ไม่ดี	0	0
รวม		**35**	**100.00**

เมื่อนำเชื้อที่แยกได้มาทดสอบคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกเบื้องต้น โดยทดสอบความสามารถในการรอดชีวิตของแบคทีเรียแลคติกที่ค่าความเป็นกรด–ด่างต่างๆ กัน โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 31 ไอโซเลท และคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถคงชีวิตอยู่ได้มากกว่า 6 log cfu/ml เนื่องจากเป็นปริมาณที่เพียงพอต่อการเกิดผลดีต่อสุขภาพ (สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2563) จากผลการทดสอบพบว่า ที่สภาวะค่าความเป็นกรด–ด่าง 2 แบคทีเรียแลคติก จำนวน 11 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตได้ 7 log cfu/ml ที่ค่าความเป็นกรด–ด่าง 3 แบคทีเรียแลคติก จำนวน 20 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตในช่วง 7–8 log cfu/ml ที่ค่าความเป็นกรด–ด่าง 4 แบคทีเรียแลคติกจำนวน 22 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตในช่วง 7–8 log cfu/ml และที่ค่าความเป็นกรด–ด่าง 5 แบคทีเรียแลคติก จำนวน 27 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตได้อยู่ในช่วง 7–9 log cfu/ml สำหรับการทดสอบความสามารถในการทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีของแบคทีเรียแลคติก พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตได้มากกว่า 7 log cfu/ml ในเกลือน้ำดีทุกความเข้มข้น จากผลการทดสอบที่ได้ใช้เป็นข้อมูลเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีการเจริญดีที่สุด และมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกไปใช้ทดลองเลี้ยงปลาตะเพียน ได้แก่ แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผักกาดดอง ให้ลักษณะโคโลนีขนาดเล็กสีครีม ขอบเรียบ แกรมบวก รูปท่อนสั้นค่อนข้างกลม เรียงตัวกระจัดกระจาย ให้ผลทดสอบเอนไซม์คะตะเลสเป็นลบ สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนต่างกัน โดยเจริญได้ดีมากในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สามารถทนกรดและเกลือน้ำดีได้

3. ผลการวิเคราะห์อาหารสัตว์น้ำที่ใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียน

จากการเตรียมอาหารสัตว์น้ำโดยใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนที่ระดับต่างๆ ลักษณะของอาหารสัตว์น้ำที่ได้มีสีน้ำตาลไม่แตกต่างกัน ดังภาพที่ 2 เมื่อนำอาหารสัตว์น้ำที่เตรียมได้ไปวิเคราะห์คุณค่าสารอาหารและพลังงาน ดังตารางที่ 2 พบว่า ปริมาณโปรตีนมีค่าเฉลี่ยร้อยละ 24.96±0.31–31.38±0.30 โดยอาหารที่ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนร้อยละ 20 30 และ 40 มีปริมาณโปรตีนน้อยกว่าอาหารที่ไม่ได้เติมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) ปริมาณไขมันมีแนวโน้มลดลงเมื่อเพิ่มปริมาณใยอาหารจากเปลือกทุเรียนในสูตรอาหารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) โดยมีปริมาณระหว่างร้อยละ 4.87±0.35–9.84±0.27 ปริมาณเถ้าในอาหารสัตว์น้ำที่ไม่ได้ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนมีปริมาณสูงที่สุด ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสัตว์น้ำที่มีการผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนร้อยละ 20 30 และ 40 ($P \leq 0.05$) ปริมาณกากใยในอาหารมีปริมาณเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณใยอาหารจากเปลือกทุเรียน โดยมีปริมาณระหว่างร้อยละ 6.40±0.42–10.00±0.13 และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับอาหารสัตว์น้ำที่ไม่ได้ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียน เมื่อผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนในอาหารสัตว์น้ำมีความชื้นปริมาณน้อยกว่าอาหารที่ไม่มีการผสมใยอาหาร

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05) อาหารสัตว์น้ำที่เตรียมได้โดยใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนร้อยละ 40 มีค่าพลังงานน้อยที่สุด และแตกต่างจากระดับอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

ภาพที่ 2 ลักษณะของอาหารสัตว์น้ำที่เตรียมได้จากใยอาหารเปลือกทุเรียน (ก) เปลือกทุเรียนอบแห้ง (ข) ใยอาหารที่เตรียมได้จากเปลือกทุเรียน และ (ค) อาหารสัตว์น้ำที่เตรียมได้

ตารางที่ 2 ปริมาณส่วนผสม คุณค่าสารอาหารและพลังงานของอาหารสัตว์น้ำที่ใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนที่ระดับต่างๆ

ส่วนผสม (ร้อยละ)	**ระดับใยอาหารจากเปลือกทุเรียน (ร้อยละ)**				
	0	**10**	**20**	**30**	**40**
ปลาป่น	10	10	10	10	10
กากถั่วเหลือง	12	12	12	12	12
รำละเอียด	56	46	36	26	16
เปลือกทุเรียน	0	10	20	30	40
เปลือกกุ้ง	20	20	20	20	20
น้ำมันพืช	1	1	1	1	1
สารเหนียว	1	1	1	1	1
รวม	**100**	**100**	**100**	**100**	**100**
คุณค่าสารอาหาร (ร้อยละโดยน้ำหนักแห้ง)					
โปรตีน	31.38±0.30^{a}	30.86±0.47^{a}	24.96±0.31^{d}	28.79±0.52^{b}	27.21±0.51^{c}
ไขมัน	9.84±0.27^{a}	8.79 0.08^{b}	8.75±0.14^{b}	6.15±0.09^{c}	4.87±0.35^{d}
เถ้า	13.52±0.03^{ab}	13.76±0.06^{a}	10.03±0.07^{d}	12.92±0.27^{c}	13.45±0.21^{b}
ใยอาหาร	4.86±0.41^{d}	6.40±0.42^{c}	6.97±0.84^{c}	8.65±0.16^{b}	10.00±0.13^{a}
ความชื้น	9.13±0.14^{a}	6.45±0.06^{d}	6.73±0.18^{d}	8.55±0.13^{b}	7.74±0.09^{c}
พลังงาน (กิโลแคลอรีต่อ 100 กรัม)	4125.38±4.46^{c}	4174.11±5.18^{b}	4204.83±3.20^{a}	3920.45±8.07^{d}	3815.01±5.88^{e}

หมายเหตุ : อักษร a–e ในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P≤0.05)

4. ผลการศึกษาการใช้อาหารสัตว์น้ำในการเลี้ยงปลาตะเพียน

หลังจากนำอาหารสัตว์น้ำที่เตรียมได้ไปใช้ในการเลี้ยงปลาตะเพียนและเก็บข้อมูลเพื่อดูการเจริญเติบโตและอัตราการรอด เป็นเวลา 60 วัน ผลการทดลองดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 การเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลาตะเพียนที่ได้รับอาหารที่ใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนที่ระดับต่างๆ เป็นเวลา 60 วัน

การเจริญเติบโต	ระดับใยอาหารจากเปลือกทุเรียน (ค่าเฉลี่ย±ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน ร้อยละ)				
	0	10	20	30	40
น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	2.27±0.13^{a}	2.33±0.08^{a}	2.27±0.06^{a}	2.20±0.08^{ab}	2.05±0.10^{b}
น้ำหนักสุดท้าย (กรัม/ตัว)^{ns}	10.07±0.05	10.59±1.27	10.19±0.96	10.08±1.24	9.92±0.09
น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (กรัม/ตัว)^{ns}	7.79±0.09	8.26±1.34	7.92±1.02	7.89±1.19	7.87±0.06
ความยาวเริ่มต้น (เซนติเมตร/ตัว)	4.37±0.01^{c}	4.71±0.06^{a}	4.39±0.09^{c}	4.31±0.06^{c}	4.59±0.03^{b}
ความยาวสุดท้าย (เซนติเมตร/ตัว)^{ns}	7.1 3±0.11	7.26±0.34	7.31±0.21	7.24±0.45	7.04±0.06
ความยาวที่เพิ่มขึ้น (เซนติเมตร/ตัว)^{ns}	2.76±0.11	2.55±0.28	2.92±0.13	2.93±0.50	2.44±0.07
น้ำหนักตัวเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน (กรัม/วัน)^{ns}	0.13±0.00	0.14±0.02	0.13±0.02	0.13±0.02	0.13±0.00
อัตราการเจริญเติบโตเฉพาะ (ร้อยละ/วัน)^{ns}	2.48±0.09	2.51±0.26	2.50±2.50	2.53±0.17	2.63±0.07
อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ ^{ns}	2.94±0.02	2.91±0.06	2.84±0.18	3.08±0.10	2.89±0.17
อัตราการรอดตาย (ร้อยละ)	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

หมายเหตุ : อักษร a–e ในแนวนอนแสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$)
อักษร ns แสดงถึง ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ผลการทดลอง พบว่า การใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนในสูตรอาหารร่วมกับการใช้โพรไบโอติกที่แยกได้จากอาหารหมักทำให้น้ำหนักตัวของปลาตะเพียนเพิ่มขึ้นสูงกว่าในชุดควบคุมที่ไม่ได้ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนร่วมกับโพรไบโอติกแบคทีเรีย แต่ผลที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 7.79±0.09–8.26±1.34 กรัมต่อตัว ความยาวของปลาในการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนมีความยาวเพิ่มขึ้นไม่แตกต่างจากชุดควบคุม โดยมีความยาวที่เพิ่มขึ้นระหว่าง 2.44±0.07–2.93±0.50 เซนติเมตรต่อตัว ปลาที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมใยอาหารเปลือกทุเรียนร่วมกับพรีไบโอติกแบคทีเรียจากอาหารหมักมีน้ำหนักตัวเพิ่มเฉลี่ยต่อวันไม่แตกต่างกัน และไม่แตกต่างจากชุดควบคุม โดยมีน้ำหนักตัวเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน 0.13±0.00–0.14±0.02 กรัมต่อวัน ปลาตะเพียนในทุกชุดการทดลองมีอัตราการเจริญเติบโตจำเพาะไม่แตกต่างกัน โดยปลาในชุดการทดลองที่มีการใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียน

ร้อยละ 40 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงที่สุด เมื่อพิจารณาอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ พบว่า ปลาตะเพียนชุดที่ได้รับอาหารสูตรที่ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนที่ระดับร้อยละ 20 มีอัตราการแลกเนื้อต่ำที่สุด แต่ไม่แตกต่างจากสูตรที่ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนในระดับอื่นๆ รวมทั้งสูตรที่ไม่ได้ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียน โดยมีอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อระหว่าง 2.84±0.18–3.08±0.10 ปลาที่เลี้ยงทุกชุดการทดลองยังมีชีวิตตลอดการเก็บข้อมูล คิดเป็นอัตราการรอดชีวิตร้อยละ 100

อภิปรายผล

การศึกษาครั้งนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้จากอาหารหมักดองทั้งพืชและสัตว์ สอดคล้องกับ สุรัตน์ และปริยาภรณ์ (2557) ที่ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีศักยภาพเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติกจากอาหารหมักพื้นบ้านไทยประเภทข้าว เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ โดยพบแบคทีเรียแลคติก จำนวน 14 ไอโซเลท ที่ไม่สร้างเอ็นไซม์คะตะเลส มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน มีทั้งท่อนยาวและท่อนสั้น และลักษณะเซลล์กลม มีทั้งขนาดเล็กและใหญ่ จัดเรียงตัวต่อกันเป็นสายโซ่สั้นและสายโซ่ยาวอยู่กันเป็นกลุ่ม หรือต่อกันตั้งแต่สองเซลล์และสี่เซลล์ หรือจับกันเป็นกลุ่ม จากการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียแลคติกในสภาวะที่มีออกซิเจนต่างกัน พบว่า มีแบคทีเรียแลคติก 31 ไอโซเลท จากทั้งหมด 35 ไอโซเลท คิดเป็นร้อยละ 88.57 ที่สามารถการเจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน และไม่มีออกซินเจน จึงคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถเจริญได้ในทั้ง 2 สภาวะ เนื่องจากสภาวะที่โพรไบโอติกต้องพบเจอเมื่อนำไปใช้งานต้องสัมผัสกับออกซิเจน และระบบทางเดินอาหารเมื่อยิ่งลึกลงไปยิ่งมีปริมาณออกซิเจนเบาบางหรือไม่มีเลย ดังนั้น สายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนจึงเป็นผลดีต่อการรอดชีวิตในการใช้งานและระบบทางเดินอาหาร (ผุสดี, จิรโรจน์, และกานต์, 2559)

ความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของแบคทีเรียแลคติกเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของโพรไบโอติก ซึ่งโพรไบโอติกที่ดีจะต้องมีความสามารถในการทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างอย่างน้อย 3 เนื่องจากเป็นมาตรฐานทั่วไปที่ใช้ในการทดสอบการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของโพรไบโอติก (Kobayashi et al., 2004) เนื่องจากในกระเพาะอาหารมีน้ำย่อยหลั่งออกมาและมีค่าความเป็นกรดลดลง จากนั้นอาหารจะอยู่ในกระเพาะประมาณ 2–4 ชั่วโมง และมีการเคลื่อนที่ไปยังลำไส้เล็กที่มีเกลือน้ำดีเป็นองค์ประกอบ (จีรนุช, สิริรัตน์, และสุรีย์พร, 2560) จากการทดสอบการทนต่อสภาวะความเป็นกรดของแบคทีเรียแลคติก พบว่า มีแบคทีเรียแลคติก 11 ไอโซเลท จาก 31 ไอโซเลท สามารถรอดชีวิตได้ถึง 7 log cfu/ml หรือมากกว่า ในสภาวะความเป็นกรด-ด่างที่ทดสอบ โดยลักษะของเซลล์ยังคงเดิม และการจัดเรียงตัวเปลี่ยนไปเล็กน้อย เนื่องจากรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์สามารถเปลี่ยนแปลงไปได้ตามสิ่งแวดล้อม คุณสมบัติในการทนต่อ

สภาวะเกลือน้ำดีจึงถือเป็นคุณสมบัติสำคัญของโพรไบโอติกแบคทีเรีย เนื่องจากเกลือน้ำดีเป็นอันตรายต่อแบคทีเรีย ส่งผลต่อโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียที่มีส่วนประกอบของไขมันและกรดไขมัน ทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายโดยน้ำดี (ผุสดี, จิรโรจน์, และกานต์, 2559) จากผลการทดสอบแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้สามารถเจริญในสภาวะเกลือน้ำดีและรอดชีวิตได้ถึง 7 log cfu/ml หรือมากกว่าในทุกระดับความเข้มข้นของเกลือน้ำดีที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สอดคล้องกับงานวิจัยของจีรนุช, สิริรัตน์, และสุรีย์พร (2560) ที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากฟาร์มและโรงฆ่าสุกรและทดสอบคุณสมบัติในการเป็นจุลินทรีย์โพรไบโอติก พบว่า แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้สามารถทนต่อสภาวะเกลือน้ำดีได้ จากคุณสมบัติที่ได้จากการทดสอบคาดว่าแบคทีเรียแลคติกที่พบจัดอยู่ในกลุ่ม Lactobacillus Lactococcus และ Pediococcus ซึ่งพบได้ในอาหารหมัก

จากการทดลองเลี้ยงปลาตะเพียนด้วยอาหารสัตว์น้ำที่เตรียมได้จากใยอาหารจากเปลือกทุเรียนร่วมกับโพรไบโอติกแบคทีเรียจากอาหารหมัก พบว่า สามารถนำใยอาหารจากเปลือกทุเรียนไปทดแทนในสูตรอาหารได้ถึงร้อยละ 40 สอดคล้องกับรายงานการใช้เปลือกทุเรียนบดแห้งทดแทนปลายข้าวในสูตรอาหารเลี้ยงปลาตะเพียนขาวในอัตราการทดแทนร้อยละ 50 และทดแทนปลายข้าวในสูตรอาหารเลี้ยงปลาไนได้ร้อยละ 25 (คณิสร และคณะ, 2556; คณิสร และคณะ, 2559) น้ำหนักตัวและความยาวที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักตัวเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการเจริญเติบโตเฉพาะหลังสิ้นสุดการเลี้ยงของชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนที่ระดับต่างๆ ไม่แตกต่างจากชุดการทดลองที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียน เมื่อพิจารณาอัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อจะเห็นได้ว่า ในทุกชุดการทดลองมีค่าใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแหล่งของโปรตีนมีปริมาณเพียงพอต่อการเจริญของปลา ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนไม่กระทบต่อการเจริญ แม้จะมีรายงานว่าอาหารที่มีส่วนผสมของวัตถุดิบจากพืชผสมมากจะมีปริมาณน้ำและกากอาหารมาก และส่งผลต่อความอยากกินอาหารของปลาลดลง (เวียง, 2545; Deyab & Magdy, 2003; Rumsey, Hughes, & Winfree, 1993) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการแลกเนื้อกับการทดลองของคณิสร และคณะ (2565) พบว่า การใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนทดแทนในสูตรอาหารร้อยละ 40 ร่วมกับการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียในการศึกษานี้ มีอัตราการแลกเนื้อต่ำกว่า และไม่พบการตายของปลาตะเพียนตลอดการเลี้ยงแสดงให้เห็นว่าการใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนร่วมกับการใช้โพรไบโอติกแบคทีเรียจากอาหารหมักมีความปลอดภัยและสามารถผสมในอาหารเลี้ยงปลาตะเพียนได้ โดยโพรไบโอติกมีคุณสมบัติในการช่วยเสริมสร้างภูมิคุ้มกัน เพิ่มการเจริญเติบโต ทำให้เกิดความสมดุลในทางเดินอาหาร (ชาญวิทย์ และชนกันต์, 2563) เมื่อมีการเพิ่มปริมาณของส่วนผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียนส่งผลถึงการลดต้นทุนการผลิตอาหารสัตว์น้ำ โดยสูตรที่มีการใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนทดแทนในสูตรอาหารร้อยละ 40 สามารถ

ลดต้นทุนการผลิตอาหารปลาตะเพียนได้ 6 บาทต่อกิโลกรัม หากมีการนำไปใช้จะสามารถช่วยเหลือเกษตรกรผู้เลี้ยงสัตว์น้ำในการลดต้นทุนค่าอาหารที่เป็นต้นทุนหลักของการเลี้ยงได้

สรุปผลการวิจัย

งานวิจัยนี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 35 ไอโซเลท ในอาหารหมักที่ได้จากพืชและสัตว์ ทุกไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนในระดับที่ดีถึงดีเยี่ยม สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน จำนวน 31 ไอโซเลท และมีแบคทีเรียแลคติกที่สามารถทนกรดและทนต่อสภาวะเกลือน้ำดี จำนวน 6 ไอโซเลท คัดเลือกแบคทีเรียแลคติก ที่มีการเจริญและคุณสมบัติการเป็นพรีไบโอติกที่ดีที่สุดไปใช้ผสมกับอาหารสัตว์น้ำที่เตรียมได้จากใยอาหารเปลือกทุเรียนเพื่อเลี้ยงปลาตะเพียน โดยสามารถใช้ใยอาหารจากเปลือกทุเรียนผสมในอาหารเลี้ยงปลาได้ถึงร้อยละ 40 และทำให้การเจริญเติบโตของชุดทดลองในด้านน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้น น้ำหนักตัวเพิ่มเฉลี่ยต่อวัน อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ อัตราการเปลี่ยนอาหารเป็นเนื้อ และอัตราการรอดตาย ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารที่ไม่ได้ผสมใยอาหารจากเปลือกทุเรียน ซึ่งงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้ประโยชน์โดยใช้เป็นแนวทางในการเพิ่มมูลค่าให้กับเปลือกทุเรียนโดยใช้ผสมในอาหารสำหรับปลาน้ำจืด และสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่เกษตรกรผู้เลี้ยงปลาให้สามารถลดต้นทุนในการผลิตและเพิ่มรายได้ ข้อเสนอแนะในการวิจัยควรมีการทดสอบความสามารถและการคงอยู่ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกในอาหารสัตว์น้ำ เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปผลิตอาหารสัตว์น้ำในเชิงพาณิชย์ได้

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ประจำปีงบประมาณ 2563

เอกสารอ้างอิง

คณิสร ล้อมเมตตา, สิทธิพัฒน์ แผ้วฉ่ำ, สนธยา กูลกัลยา, และอุมารินทร์ มัจฉาเกื้อ. (2556). การใช้เปลือกทุเรียนและเมล็ดทุเรียนบดแห้งทดแทนปลายข้าวในสูตรอาหารเลี้ยงปลาตะเพียนขาว. ใน **การประชุมนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ ครั้งที่ 6** (น. 474–484) ภูเก็ต: มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต.

คณิสร ล้อมเมตตา, สิทธิพัฒน์ แผ้วฉ่ำ, สนธยา กูลกัลยา, และอุมารินทร์ มัจฉาเกื้อ. (2559). การใช้เปลือกทุเรียนและเมล็ดทุเรียนบดแห้งทดแทนปลายข้าวในสูตรอาหารเลี้ยงปลาไน. **วารสารวิจัยรำไพพรรณี**, **10**(2), 109–117.

จีรนุช วันแสนซื่อ, สิริรัตน์ แสงอ่อน, และสุรีย์พร เอี่ยมศรี. (2560). การคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากฟาร์มและโรงฆ่าสุกรที่มีประสิทธิภาพยับยั้งแบคทีเรียดื้อยาปฏิชีวนะ. ใน **การประชุมวิชาการระดับชาติวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน ครั้งที่ 5** (น. 729–737). กรุงเทพฯ: โรงแรมมิราเคิล แกรนด์ คอนเวนชั่น.

ชาญวิทย์ สุวรรณ์, และชนกันต์ จิตมนัส. (2563). การใช้จุลินทรีย์จีไบโอติกเสริมอาหารปลานิล เพื่อเร่งการเจริญเติบโตและเสริมภูมิคุ้มกัน. **วารสารเกษตรพระวรุณ, 17**(1), 63–74.

นัยนา เสนาศรี. (2558). ผลของการใช้แบคทีเรีย Bacillus spp. เป็นโปรไบโอติกผสมอาหารในการเลี้ยงปลานิล, **วารสารวิจัย, 8**(2), 61 – 66.

ผุสดี ตังวัชรินทร์, จิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์, และกานต์ สุขสุแพทย์. (2559). การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก. **วารสารเกษตรพระจอมเกล้า, 34**(2), 67–76.

พงศธร ล้อสุวรรณ, จิตศิริ ราชตนะพันธุ์, และศศิธร จันทนวรางกูร. (2551). สารประกอบฟีนอลิกทั้งหมด สมบัติการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านจุลินทรีย์ของเปลือกผลไม้. ใน **การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 46** (น. 554–561). กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ไพรัตน์ กอสุธารักษ์. (ม.ป.ป). **การประเมินคุณภาพของอาหารสำเร็จรูปสำหรับสัตว์น้ำตามพระราชบัญญัติควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์**. สืบค้นเมื่อ 12 ตุลาคม 2563, จากhttps://www4.fisheries.go.th/local/file_document/20170120165958_file.pdf.

ภณิดา เกื้อสุวรรณ, วิลาวัณย์ เจริญจิรตระกูล, และดวงพร คันธโชติ. (2557). การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง. ใน **การประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 15** (น. 667–676). ขอนแก่น: มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

เวียง เชื้อโพธิหัก. (2545). **โภชนศาสตร์สัตว์น้ำและการให้อาหารสัตว์น้ำ**. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา. (2563). **ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร**. สืบค้นเมื่อ 15 ธันวาคม 2563 จาก http://www.ratchakitcha. soc.go.th/DATA/PDF/2554/E/086/21.PDF.

สุรัตน์ วังพิกุล, และปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์. (2557). **การคัดเลือกแลคติกแอสิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกจากอาหารหมักพื้นบ้านไทยประเภทข้าวเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในอาหารหมัก** (รายงานการวิจัย). พระนครศรีอยุธยา: มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ.

หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์, จิรพร สวัสดิการ, ปารณีย์ สร้อยศรี, และคมสัน มุ่ยสี. (2560). สมบัติทางกายภาพและความสามารถในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของใยอาหารจากเปลือกทุเรียน. ใน **การนำเสนอผลงานวิจัยระดับชาติ เครือข่ายบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยราชภัฏภาคเหนือ ครั้งที่ 17** (น. 2279–2287). พิษณุโลก: มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม.

หยาดรุ้ง สุวรรณรัตน์, และจิรพร สวัสดิการ. (2561). ปริมาณใยอาหารและคุณสมบัติการต้านแบคทีเรียของใยอาหารจากเปลือกทุเรียนที่ผ่านการทำแห้งแบบลมร้อนและแบบแช่เยือกแข็ง. **วารสารวิจัยรำไพพรรณี, 12**(1), 178–185.

AACC. (2001). The definition of dietary fiber. **CFW AACC Report, 46**(3), 112–116.

A.O.A.C. (2000). **Official methods of analysis association of official analytical chemists**. Washington, DC.

Deyab, M., & Magdy, M. (2003). Replacement of fish meal with a mixture of different plant protein sources in juvenile Nile tilapia, *Oreocromis niloticus* (L.) diets. **Aquaculture Research, 34,** 1119–1127.

Fuentes–Alventosa. J.M., Rodriguez–Gutierrez, G., Jaramillo–Carmona, S., & Expejo–Calvo, J.A. (2009). Effect of extraction method on chemical composition and functional characteristics of high dietary fibre powders obtained from asparagus by products. **Food Chemistry**, **113**(2), 665–671.

Hwanhlem, N., Watthanaskphuban, N., Riebroy, S., Benjakul, S., H–Kittikun, A., & Supasil, S. (2010). Probiotic lactic acid bacteria from Kung–Som: Isolation screening, inhibition of pathogenic bacteria. **International Journal of Food Science&Technology**, **45**(3), 594–601.

Kobayashi, T., Kajiwara, M., Wahyuni, M., Hamada–Sato, N., Imada, C., & Watanabe, E. (2004). Effect of culture conditions on lactic acid production of Tetragenococcus species. **Journal of Applied Microbiolgy**, **96**(6), 1215–1221.

Larrauri, J.A., Ruperez, P., & Saura–Calixto, F. (1997). Mango peel fibres with antioxidant activity. **Zeitschrift Fur Lebensmittel–Untersuchung Und–Forschung, 205**, 39–42.

Lee, J., Kim, C.J., & Kunz, B. (2006). Identification of lactic acid bacteria isolate from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. **Meat Science**, **72**, 437–445.

Rodriguez, R., Jimenez, A., Fernandez–Bolanos, J., Guillen, R., & Heredia, A. (2006). Dietary fibre from vegetable products as source of functional Ingredients. **Trends in Food Science and Technology**, **17**, 3–15.

Rumsey, G., Hughes, S., & Winfree, R. (1993). Chemical and nutritional evaluation of soya protein preparations as primary nitrogen sources for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). **Animal Feed Science and Technology**, **40**, 135–151.

Soria, M.C., & Audisio, M.C. (2014). Inhibition of *Bacillus cereus* strains by antimicrobial metabolites from *Lactobacillus johnsonii* CRL1647 and *Enterococcus faecium* SM21**. Probiotic and Antimicrobial Proteins**, **6**(3–4), 208–216.

Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., & Novoa, B. (2003). Control of *Vibrio alginolyticus* in artemia cuture by treatment with bacterial probiotic. **Aquaculture**, **219**, 43–56.

Wood, B.J.B, & Hopzapfel, W.H. (1995). **The genera of lactic acid bacteria.** London Chapman & Hall.

Zannini, E. Water, D.M., Coffey, A., & Arendt, E.K. (2016). Production, properties and industrial food application of lactic acid bacteria–derived exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, **100**(3), 1121–1135.