



การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น
จากหมักในจังหวัดสกลนคร

Isolation of Lactic Acid Bacteria with Antibacterial Property from
Fermented Ground Pork in Sakon Nakhon Province

ชุลีพร ข่านาค้า^{1*} จิรวรรณ เมืองนา¹ และสิรินาฏ เนติศรี¹

Received: February, 2017; Accepted: April, 2017

บทคัดย่อ

ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์หมัก 15 ตัวอย่าง ในจังหวัดสกลนครพบว่า แยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 165 ไอโซเลต หลังจากคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียโดยใช้วิธี Agar Spot และ Disc Diffusion พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ไอโซเลต (N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1) สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 และ *Lactobacillus delbrueckii* TISTR 326 โดยไอโซเลต N12-1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดี มีฤทธิ์การยับยั้งสูงถึง 8,000 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ในการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลต ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL พบว่า 3 ไอโซเลต (N11-1 N12-1 และ N15-1) คือ *Lactobacillus plantarum* 1 และ 1 ไอโซเลต (N14-2) คือ *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 3 นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลต สามารถใช้เป็นก้ำเชื้อในการผลิตหมักและหมักได้เร็วกว่าการใช้เชื้อธรรมชาติ โดยจะทำให้หมักมีค่าพีเอชประมาณ 3.60 - 3.70 ปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วงร้อยละ 1.24 - 1.42 และมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติกประมาณ 8.95 - 9.49 log CFU/g ในวันที่ 3 ของการหมัก เมื่อทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสพบว่า หมักที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1 ได้คะแนนความชอบโดยรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก; ฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรีย; หมัก

¹ คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ สกลนคร
* Corresponding Author E - mail Address: csncpc@ku.ac.th

Abstract

One hundred and sixty-five lactic acid bacteria were isolated from 15 samples of fermented ground pork (Nham) in Sakon Nakhon province and these isolates were then screened for antibacterial activity by using agar spot and disc diffusion assay test. There were 4 isolates of lactic acid bacteria; N11-1, N12-1, N14-2 and N15-1 displayed antibacterial activity and were able to inhibit the growth of *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus plantarum* TISTR 543 or *Lactobacillus delbrueckii* TISTR 326. The N12-1 exhibited the highest antibacterial activity (8,000 Au/ml) to inhibit growth of *S. aureus*. API 50 CHL strips were applied to identify the four isolates. The data showed that three of the isolates; (N11-1, N12-1 and N15-1) were identified as *Lactobacillus plantarum* 1. The fourth (N14-2) was identified as *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 3. In addition, the four isolates could be used as starter cultures for Nham production and are capable of fermentation faster than using natural cultures. Fermented ground pork containing each of these isolates obtained pH of 3.60 - 3.70, 1.24 - 1.42% lactic acid and 8.95 - 9.49 log CFU/ml of viable lactic acid bacteria within 3 days of fermentation period. Sensory evaluation was also determined. The results showed that overall preference of Nhams fermenting with each of these isolates was not significantly different ($p > 0.05$).

Keywords: Lactic Acid Bacteria; Antibacterial Activity; Fermented Ground Pork

บทนำ

การหมักของอาหารถือว่าการถนอมอาหารวิธีหนึ่งที่มีมานาน สามารถเก็บอาหารไว้บริโภคได้นานขึ้น โดยอาหารไม่เน่าเสีย สำหรับประเทศไทยโดยเฉพาะในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีการผลิตอาหารหมักพื้นบ้านไว้เพื่อบริโภคและจำหน่ายหลายชนิดด้วยกัน เช่น แหนม ปลาส้ม ไส้กรอกเปรี้ยว และผักเสี้ยนคอง เป็นต้น ในการผลิตแหนมมักจะใช้เนื้อหมูเป็นวัตถุดิบหลัก จากการตรวจสอบคุณภาพของเนื้อหมูในตลาดสดเทศบาลอำเภอเมือง จังหวัดสกลนคร พบว่าเนื้อหมูมีการปนเปื้อน *Escherichia coli* $> 1.1 \times 10^3$ MPN/g และมีการปนเปื้อนของเชื้อ *Staphylococcus aureus* $1.3 \times 10^5 - 3.9 \times 10^6$ CFU/g นอกจากนี้ยังตรวจพบ *Salmonella* spp. แสดงให้เห็นว่าผู้บริโภคมีความเสี่ยงที่จะได้รับเชื้อดังกล่าวจากการบริโภคเนื้อหมู หากมีการนำไปรับประทานดิบหรือแปรรูปที่ไม่ถูกสุขลักษณะ [1] สำหรับการผลิตอาหารหมักพื้นบ้านส่วนใหญ่จะใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติในการหมัก โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักทำให้เกิดกรด รสเปรี้ยว และกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก คือ กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) ซึ่งบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรีย [2] - [3] และสามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซิน ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกหลายชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์

ที่ก่อโรคในอาหาร เช่น *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* spp. และ *Staphylococcus aureus* [4] - [6] อย่างไรก็ตามการหมักด้วยแบคทีเรียธรรมชาติจะเกิดขึ้นช้า และคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาจจะไม่คงที่ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหนมในเขตเทศบาลเมือง จังหวัดสกลนคร ที่มีคุณสมบัติยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น เพื่อนำมาใช้เป็นก้ำเชื้อบริสุทธิ์สำหรับผลิตแหนมให้มีคุณภาพดียิ่งขึ้น ซึ่งอาจจะสามารถป้องกันเชื้อก่อโรคที่อาจปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ ทำให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านมีความปลอดภัยมากขึ้น

วิธีดำเนินการวิจัย

1. แบคทีเรียที่ใช้เป็นเชื้อทดสอบ

Lactobacillus delbrueckii TISTR 326, *Lactobacillus plantarum* TISTR 543, *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium และ *Staphylococcus aureus* ได้จากห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา คณะทรัพยากรธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร

2. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์แหนม [3]

ซึ่งตัวอย่างแหนม 25 กรัม เจือจางด้วย 0.1 % peptone water จนได้ระดับความเจือจางถึง $1 : 10^6$ จากนั้นปิเปตตัวอย่าง 0.1 มิลลิลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS-CaCO₃ agar ที่มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และโบรโมไทมอลบลู (Bromothymol Blue) เป็นอินดิเคเตอร์ นำไปบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobic) โดยบ่มใน Anaerobic Jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเฉพาะโคโลนีที่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลืองเขียวลงบน MRS Agar นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ตรวจสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram's Stain)

3. ศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแหนม

3.1 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Agar Spot [7] เชื้อโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากแหนมในข้อ 2 เติลงในอาหาร BSM (Bacteriocin Screening Medium) broth บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเชื้อ 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร BSM Agar บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เททับด้วย NA กึ่งแข็ง ปริมาตร 5 มิลลิลิตร อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ที่ผสมด้วยเชื้อทดสอบแต่ละชนิดซึ่งมีปริมาณเชื้อเริ่มต้น 10^6 CFU/ml นำมาบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง วัดโซนใส (Inhibition Zone) ที่เกิดขึ้นล้อมรอบโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติก

3.2 ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion [7] เพาะแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดโซนใสล้อมรอบโคโลนีจากข้อ 3.1 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตเซลล์สัสมันร้อยละ 10 โดยปริมาตรลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BSM Broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง แยกเซลล์โดยการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 g นาน 20 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

นำส่วนใสมาปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 นอร์มัล กรองผ่านแผ่นกรองปลอดเชื้อขนาด 0.22 ไมครอน นำเชื้อทดสอบซึ่งมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml เกลี่ยลงบนบนอาหาร NA หรือ MRS Agar วางกระดาษกรอง (Paper Disc) ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 5 มิลลิเมตร ลงบนผิวหน้าอาหาร จากนั้นหยดส่วนใสที่ได้ 8 ไมโครลิตร ลงบนกระดาษกรอง ทิ้งให้สารละลายซึมลงหมดประมาณ 30 นาที นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลโดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (Inhibition Zone)

3.3 ทดสอบฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ ทำการเจือจางส่วนใสที่ได้จากการเหวี่ยงแยกเซลล์ในข้อ 3.2 ด้วยน้ำกลั่นปลอดเชื้อลำดับละ 2 เท่า จนมีความเจือจางสุดท้ายเท่ากับ 64 เท่า ทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ ตามวิธีในข้อ 3.2 คำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียเป็น Arbitrary Unit (AU) ต่อมิลลิเมตร จากลำดับความเจือจางสูงสุดซึ่งสังเกตเห็นโซนใสได้ชัดเจน

$$\text{AU ต่อมิลลิเมตร} = \frac{\text{ระดับความเจือจางสูงสุดที่ให้ผลบวกชัดเจน} \times 1,000}{\text{ปริมาตรของส่วนใสที่ใช้ทดสอบ}} \quad (1)$$

4. การจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ [8]

จำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL (Biomérieux) และวิเคราะห์ผลด้วย apiweb™ - API 50 CHL V5.1

5. การผลิตหมักโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์

เตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ผลการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้สูงจากข้อ 3.2 ถ่ายลงในอาหาร MRS Broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 10^6 CFU/ml จากนั้นผลิตหมักโดยเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณร้อยละ 0.4 ผสมให้เข้ากันกับเนื้อหมูบด 1 กิโลกรัม หนักรวม 400 กรัม กระเทียม 140 กรัม เกลือ 40 กรัม พริกชี้หนู 100 กรัม และข้าวเหนียว 200 กรัม [9] นำส่วนผสมทั้งหมดบรรจุลงในถุงพลาสติก รัดหนัวยางให้แน่นหมักเป็นเวลา 3 วัน ตรวจวิเคราะห์ความเป็นกรด - เบส โดยใช้ pH meter วัดปริมาณกรดทั้งหมด (ในรูปกรดแลคติก) โดยใช้วิธีไตเตรท [10] และนับจำนวนแบคทีเรียแลคติก โดยวิธี Spread Plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar [11]

6. การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส

ทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสโดยใช้วิธีการทดสอบการยอมรับแบบสเกลความชอบทั้งหมดโดยการให้คะแนน (Nine-Point Hedonic Scale) ใช้ผู้ทดสอบชิมที่ไม่ผ่านการฝึกฝน 30 คน ทำการทดสอบความชอบด้านสี กลิ่น รสเปรี้ยว กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป

ผลการวิจัยและการอภิปรายผล

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์นม

เมื่อคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากนมเนื้อหมูและนมเนื้อวัวในเขตเทศบาลเมืองจังหวัดสกลนคร ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง โดยเฉพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS-CaCO₃ Agar ที่มีการเติมโบรโมไทมอลบลู (Bromothymol Blue) เป็นอินดิเคเตอร์ และแคลเซียมคาร์บอเนตปริมาณร้อยละ 0.1 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร พบแบคทีเรียกรดแลคติก 165 ไอโซเลต ที่โคโลนีมีสีเหลืองและเกิดโซนใสล้อมรอบ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกใช้น้ำตาลในอาหารเลี้ยงเชื้อและสร้างกรดทำให้สีของอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีน้ำเงินม่วงเป็นเหลือง [3] เมื่อทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ คะตะเลส และศึกษาสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram's Stain) ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 165 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คอะตะเลส รูปร่างกลม 103 ไอโซเลต และรูปร่างท่อน 62 ไอโซเลต

2. ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากนมในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบอื่น

เมื่อทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 165 ไอโซเลต ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบด้วยวิธี Agar Spot และวัดเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใส (Inhibition Zone) ที่เกิดขึ้นล้อมรอบโคโลนี พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 21 ไอโซเลต สามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ ส่วนใหญ่แสดงความสามารถในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดี มีโซนใสอยู่ในช่วง 19 - 30 มิลลิเมตร ดังแสดงในตารางที่ 1 แม้ว่าการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นโดยวิธี Agar Spot เป็นวิธีที่สะดวก นิยมใช้เป็นวิธีเบื้องต้นในการศึกษาประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบ แต่มีข้อบกพร่อง คือ โซนใสที่เกิดขึ้นอาจไม่ได้เป็นผลจากสารต้านแบคทีเรียเพียงอย่างเดียว แต่อาจเป็นผลจากการกรดแลคติกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้น [12], [7]

ดังนั้นจึงได้ยืนยันผลโดยนำแบคทีเรียกรดแลคติก 21 ไอโซเลต ที่ให้ผลบวกจากวิธี Agar Spot ทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบอีกครั้งด้วยวิธี Disc Diffusion ซึ่งสามารถกำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากการคือนทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 15 ไอโซเลต มีประสิทธิภาพยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 คิดเป็นร้อยละ 71.43 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ผล Agar Spot เป็นบวก นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลต (N5-12 N11-1 N12-1 N14-2 N14-7 และ N15-1) สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* ได้ดี และไอโซเลตที่ให้ผลการยับยั้ง *S. aureus* ดีที่สุด คือ N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1 โดยมีบริเวณใส 8 มิลลิเมตร ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งใกล้เคียงกับ *Lactococcus lactis* TISTR 1401 (Control) ที่ให้โซนใส 10 มิลลิเมตร แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้อาจเนื่องมาจากในระหว่างการเจริญแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารแบคทีริโอซินและสารคล้ายแบคทีริโอซิน (Bacteriocin-Like Molecules) ซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น *L. monocytogenes* และ *S. aureus* เป็นต้น [13] โดยแบคทีริโอซินจะยึดเกาะผิวเซลล์ของเชื้อเป้าหมายและสร้างรูในชั้นเยื่อหุ้มเซลล์ ทำลาย Permeability ของเยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้เซลล์เสียสภาวะสมดุล เอนไซม์สำคัญภายในเซลล์เสียคุณสมบัติ และสารพันธุกรรมเสียรูปร่างหรือเปลี่ยนหน้าที่ไปจากเดิม [7], [14]

เมื่อวัดฤทธิ์การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่ให้ผลการยับยั้ง *S. aureus* ดีที่สุด (N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1) พบว่า ส่วนใสของไอโซเลต N12-1 ที่ความเจือจาง 64 เท่า สามารถยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งสูงที่สุดเท่ากับ 8,000 ยูนิตต่อมิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต N11-1 และไอโซเลต N14-2 โดยทั้งสองไอโซเลตมีฤทธิ์ในการยับยั้ง *S. aureus* เท่ากับ 2,000 ยูนิตต่อมิลลิเมตร (ตารางที่ 3) จากการจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลต ด้วยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL พบว่าไอโซเลต N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1 คือ *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus plantarum* 1, *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 3 และ *Lactobacillus plantarum* 1 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4

3. การผลิตแหนมด้วยก๊าล้าเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้และการทดสอบทางประสาทสัมผัส

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ไอโซเลต (N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1) ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบได้ดี ผลิตเป็นก๊าล้าเชื้อบริสุทธิ์สำหรับการหมักแหนมพบว่า ในการหมักที่มีการเติมก๊าล้าเชื้อบริสุทธิ์และการหมักโดยใช้เชื้อในธรรมชาติ ผลิตก๊าล้าที่แหนมมีค่าพีเอชลดลงและมีปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก อย่างไรก็ตามการใช้ก๊าล้าเชื้อบริสุทธิ์ทำให้เกิดการหมักเร็วสังเกตได้จากแหนมที่หมักด้วยก๊าล้าเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 4 ไอโซเลต มีค่าพีเอชลดลงมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) มีปริมาณกรดแลคติกสูง และมีจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าแหนมที่หมักด้วยเชื้อธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 5) สอดคล้องกับรายงานของประเวทย์และคณะ [15] ในการใช้เชื้อ *Bifidobacterium* เป็นก๊าล้าเชื้อสำหรับการผลิตแหนม พบว่าการหมักเกิดขึ้นได้เร็ว รวมทั้งไม่พบ *Salmonella* ในตัวอย่างที่ทดสอบ และทำให้ปริมาณโคลิฟอร์มแบคทีเรียลดลง นอกจากนี้ยังสังเกตพบว่าเชื้อบริสุทธิ์ทั้ง 4 ไอโซเลต จะมีจำนวนเซลล์ลดลงเล็กน้อยหลังจากวันที่ 3 ของการหมัก อาจเป็นไปได้ว่าพีเอชของแหนมลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงจุดที่ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถเติบโตได้ โดย Steinkraus [16] รายงานว่า *Lactobacillus* สามารถสร้างกรดแลคติก ทำให้พีเอชต่ำสุดที่ 4 - 4.5 ส่วนบางสายพันธุ์จะทำให้พีเอชต่ำประมาณ 3.5 ก่อนจะมีการยับยั้งการเติบโตของตัวเอง อย่างไรก็ตามผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 4 ไอโซเลต (N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1) สามารถนำมาใช้เป็นก๊าล้าเชื้อในการผลิตแหนมได้ ทำให้แหนมมีปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วงร้อยละ 1.24 - 1.42 และมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.6 - 3.7 (ตารางที่ 5) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมแหนม (มอก. 1219 - 2547)

4. การทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัส

หลังจากการทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสของแหนมที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์และเชื้อธรรมชาติ โดยใช้ผู้ทดสอบที่ไม่ผ่านการฝึกฝนจำนวน 30 คน พบว่าแหนมที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์ (ไอโซเลต N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1) และแหนมที่หมักด้วยเชื้อในธรรมชาติ ได้คะแนนการยอมรับด้านสี กลิ่น รสเปรี้ยว กลิ่นรส และเนื้อสัมผัสไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 6 แหนมที่หมักด้วยเชื้อไอโซเลต N14-2 มีคะแนนการยอมรับด้านรสเปรี้ยวและกลิ่นรสมากที่สุด คือ 5.27 และ 5.7 ส่วนแหนมที่หมักด้วยเชื้อไอโซเลต N12-1 ได้คะแนนการยอมรับด้านเนื้อสัมผัสสูงสุดเท่ากับ 5.87 คะแนนความชอบโดยรวมของแหนมที่หมักด้วยเชื้อทุกไอโซเลตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 1 ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Agar Spot

ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (มิลลิเมตร)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. plantarum</i> TISTR 543	<i>L. delbrueckii</i> TISTR 326
N2-2	-	-	12.0	-	-
N2-5	-	20.0	-	-	-
N2-7	-	20.0	-	-	-
N2-11	-	25.0	10.0	-	-
N4-3	-	19.0	11.0	-	-
N5-1	-	20.0	13.0	-	-
N5-2	-	20.0	20.0	-	-
N5-3	-	-	11.0	-	-
N5-4	9.0	20.0	-	-	-
N5-5	13.0	25.0	-	-	-
N5-7	-	25.0	14.0	-	-
N5-11	-	20.0	-	-	-
N5-12	-	20.0	-	-	-
N5-13	10.0	30.0	-	-	-
N7-10	-	20.0	-	-	-
N7-14	-	-	13.0	12.0	12.0
N11-1	-	11.0	-	10.0	-
N12-1	-	19.0	10.5	-	-
N14-2	-	22.5	-	20.0	20.0
N14-7	-	28.0	-	-	-
N15-1	14.0	30.0	17.0	-	10.0

หมายเหตุ คือ ไม่เกิดโซนใส ค่าที่ปรากฏในตารางแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 2 ความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี Disc Diffusion

ไอโซเลต	ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (มิลลิเมตร)				
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>S. Typhimurium</i>	<i>L. plantarum</i> TISTR 543	<i>L. delbrueckii</i> TISTR 326
N2-2	-	-	-	6.0	-
N2-5	-	-	-	6.0	-
N2-7	-	-	-	6.0	-
N2-11	-	-	-	7.0	-
N4-3	-	-	-	6.0	-
N5-1	-	-	-	6.0	-
N5-2	-	-	-	-	-
N5-3	-	-	-	-	-
N5-4	-	-	-	-	-
N5-5	-	-	-	-	-
N5-7	-	-	-	-	-
N5-11	-	-	-	-	-
N5-12	-	8.0	-	-	-
N5-13	-	-	-	-	6.5
N7-10	-	-	-	-	6.0
N7-14	-	-	-	6.0	6.0
N11-1	-	8.0	-	-	6.0
N12-1	-	8.0	-	-	6.0
N14-2	-	8.0	-	8.0	6.0
N14-7	-	6.0	-	-	6.0
N15-1	-	8.0	-	6.0	6.0
control	-	10.0	-	8.5	10.0

หมายเหตุ คือ ไม่เกิดโซนใส, control คือ *L. lactis* TISTR 1401

ค่าที่ปรากฏในตารางแสดงค่าเฉลี่ยเส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสจากการทดลอง 3 ซ้ำ

ตารางที่ 3 การยับยั้งแบคทีเรียทดสอบของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากแหนม

ไอโซเลต	ความสามารถในการยับยั้ง (ยูนิตต่อมิลลิเมตร)		
	<i>S. aureus</i>	<i>L. plantarum</i> TISTR 543	<i>L. delbrueckii</i> TISTR 326
N11-1	2,000	-	125
N12-1	8,000	-	125
N14-2	2,000	125	125
N15-1	125	125	125
Control	125	1,000	125

หมายเหตุ คือ ไม่เกิดบริเวณใส, control คือ *L. lactis* TISTR 1401

ตารางที่ 4 คุณลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ไอโซเลตที่แยกได้

ไอโซเลต	ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา	Identification by API 50 CHL	Identification probabilities (%)
N11-1	แกรมบวก ท่อนยาว	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.2
N12-1	แกรมบวก ท่อนยาว	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	91.1
N14-2	แกรมบวก ท่อนยาว	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> 3	95.8
N15-1	แกรมบวก ท่อนยาว	<i>Lactobacillus plantarum</i> 1	99.1

ตารางที่ 5 การเปลี่ยนแปลงทางเคมีและจุลชีววิทยาของแหนมหลังจากการหมักเป็นเวลา 3 วัน

	Control	แหนม	แหนม	แหนม	แหนม
		N11-1	N12-1	N14-2	N15-1
ค่าพีเอช	4.13 ^a ± 0.06	3.70 ^b ± 0.00	3.70 ^b ± 0.00	3.63 ^{bc} ± 0.06	3.60 ^c ± 0.00
ปริมาณกรดแลคติก (ร้อยละ)	0.87 ^d ± 0.00	1.42 ^a ± 0.05	1.24 ^c ± 0.00	1.31 ^b ± 0.03	1.31 ^b ± 0.03
จำนวนเซลล์แบคทีเรีย กรดแลคติก (log CFU/g)	8.28 ^d ± 0.10	9.24 ^b ± 0.14	9.49 ^a ± 0.00	9.36 ^{ab} ± 0.01	8.95 ^c ± 0.04

หมายเหตุ ^{a,b,c} ตัวเลขที่มีอักษรกำกับต่างกันในแนวนอนเดียวกันแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p ≤ 0.05)

Control คือ การหมักแหนมโดยไม่เติมกลูโคสหรือสารให้ความหวานในตารางแสดงค่า mean ± s.d. (n = 3)

ตารางที่ 6 ผลการประเมินการยอมรับทางประสาทสัมผัสของแหนมที่ผลิตจากกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบริสุทธิ์

	Control	แหนม N11-1	แหนม N12-1	แหนม N14-2	แหนม N15-1
สี ^{ns}	6.00 ± 1.70	5.73 ± 1.17	5.70 ± 1.34	5.60 ± 1.07	5.93 ± 1.31
กลิ่น ^{ns}	5.73 ± 1.68	5.27 ± 1.48	5.67 ± 1.83	4.60 ± 1.75	5.00 ± 2.05
รสเปรี้ยว ^{ns}	5.23 ± 2.06	4.20 ± 2.16	4.83 ± 1.95	5.27 ± 2.03	4.93 ± 2.08
กลิ่นรส ^{ns}	5.57 ± 1.81	5.07 ± 1.87	5.23 ± 1.79	5.70 ± 1.88	4.87 ± 1.66
เนื้อสัมผัส ^{ns}	5.30 ± 1.91	5.57 ± 1.64	5.87 ± 1.70	5.37 ± 1.87	5.53 ± 1.81
ความชอบโดยรวม ^{ns}	5.80 ± 1.65	5.30 ± 1.64	5.60 ± 1.79	5.77 ± 1.57	5.53 ± 1.61

หมายเหตุ^{ns} ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

Control คือ การหมักแหนมโดยไม่เติมกล้าเชื้อบริสุทธิ์

บทสรุป

แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากผลิตภัณฑ์แหนมในตลาดสดเขตเทศบาลเมือง จังหวัดสกลนคร มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus*, *L. plantarum* TISTR 543 และ *L. delbrueckii* TISTR 326 ได้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1 แสดงประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของ *S. aureus* เท่ากับ 2,000 8,000 2,000 และ 125 ยูนิตต่อมิลลิเมตร ตามลำดับ จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL และศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน สายพันธุ์ *L. plantarum* 1, *L. plantarum* 1, *L. paracasei* ssp. *paracasei* 3 และ *L. plantarum* 1 ตามลำดับ เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลต มาใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนม ทำให้แหนมที่ได้มีปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วงร้อยละ 1.24 - 1.42 และมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.6 - 3.7 เมื่อทดสอบการยอมรับทางประสาทสัมผัสพบว่า แหนมที่หมักด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต N11-1 N12-1 N14-2 และ N15-1 ได้คะแนนการยอมรับด้านสี กลิ่น รสเปรี้ยว กลิ่นรส เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณคณะกรรมการธรรมชาติและอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร สำหรับการอนุเคราะห์สถานที่ทำวิจัย และขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ในการสนับสนุนทุนวิจัย

References

- [1] Premmanee S. and Mathida M. (2006). The Quality Detection on Pork in Sakonnakhon Fresh Market. Bachelor of Science (Food Technology) Dissertation Kasetsart University Chalermphrakiat Sakonnakhon Province Campus (In Thai)
- [2] Bussakorn Utaraphichat. (2004). Food Microbiology. 2^{ed}. Songkhla: Thaksin University (In Thai)
- [3] Phikunthong, K., Sukanda, V and Sirinda, Y. (2006). Lactic Acid Bacteria Isolated from *Plaa-som*, a Thai Fermented Fish Product. Thai Journal Biotechnol. Vol. 7. No. 1. pp. 32-39
- [4] Yang, Y., Tao, W.Y., Liu, Y.J. and Zhu, F. (2008). Inhibition of *Bacillus cereus* by Lactic Acid Bacteria Starter Cultures in Rice Fermentation. Food Control. Vol. 19. Issue 2. pp. 159-161
- [5] Allende, A., Martinez, B., Selma, V., Gil, M.I., Suarez, J.E. and Rodriguez, A. (2007). Growth and Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria in Vegetable Broth and their Effectiveness at Reducing *Listeria monocytogenes* in Vitro and in Fresh-Cut Lettuce. Food Microbiology. Vol. 24. Issue 7-8. pp. 759-766
- [6] Avonts, L., Uytven, E.V. and Vuyst, L.D. (2004). Cell Growth and Bacteriocin Production of Probiotic *Lactobacillus* Strains in Different Media. International Dairy Journal. Vol. 14. Number 11. pp. 947-955
- [7] Sureerut Ngeandaung. (2002). Study on Bacteriocin-Producing Lactic Acid Bacteria from Fermented Food. Master of Science (Microbiology) Dissertation Kasetsart University (In Thai)
- [8] Sánchez, I., Seseña, S., Poveda, J.M., Cabezas, L. and Palop, L. (2005). Phenotypic and Genotypic Characterization of Lactobacilli Isolated from Spanish Goat Cheeses. International Journal of Food Microbiology. Vol. 102. pp. 355-362
- [9] Orrathai P. and Nualnoi W. (2551). Production of Fermented Ground Pork by *Lactobacillus plantarum* TISTR 541. Bachelor of Science (Food Technology) Dissertation Kasetsart University Chalermphrakiat Sakonnakhon Province Campus (In Thai)
- [10] AOAC. (2000). Official Method of Analysis of AOAC International, 15th ed. Association of official Analytical Chemists, Arilington, Virginia, U.S.A.
- [11] Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. (2006). Production of Probiotic Cabbage Juice by Lactic Acid Bacteria. Bioresource Technology. Vol. 97. pp. 1427-1430
- [12] Çon, A.H. and Gökalp, H.Y. (2000). Production of Bacteriocin-Like Metabolites by Lactic Cultures Isolated from Sucuk Samples. Meat Science. Vol. 55. Issue 1. pp. 89-96

- [13] Vuyst, L.D. and Leroy, F. (2007). Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, Purification, and Food Applications. *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*. Vol. 13. No. 4. pp. 194-199
- [14] Bruno, M.E.C. and Montville, T.J. (1993). Common Mechanistic Action of Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. Vol. 59. No. 9. pp. 3003-3010
- [15] Pravate T., Kooranee T., Jirawat K., Wimolsiri P. and Somboon T. (2540). High Quality Fermented Pork Sausage with Nitrate and Catalase Producing Starters and Bifidus. In *Proceedings of the 35th Kasetsart University Annual Conference: Plant, Agricultural Extension and Communication and Agro-Industry*. Bangkok: Kasetsart University. pp. 611-619 (In Thai)
- [16] Steinkraus, H.K. (1992). Lactic Acid Fermentation. In *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Food*. Academic Press. Washington, D.C. pp. 43-51