

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ ในการหมักปลาซม

Selection of Lactic Acid Bacteria and Using as a Starter Culture in Thai Traditional Fermented Fish (Pla-som)

ณัฐฤทธา ภูทับทิม และวนิดา แซ่จิ่ง*

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา

ตำบลแม่กา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา 56000

Nadgrita Phutubtim and Wanida Saejung*

Division of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao,
Maeka, Muang, Phayao 56000

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสมบัติของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากปลาซมที่ผลิตในจังหวัดพะเยา จากนั้นคัดเลือกไอโซเลทและปริมาณของแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสม เพื่อใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักปลาซม โดยการนำแบคทีเรียแลคติก จำนวน 15 ไอโซเลท มาตรวจสอบปริมาณกรดโดยรวม ปริมาณกรดแลคติก และความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. ผลการทดลองพบว่า *Leuconostoc mesenteroides* ไอโซเลท LM2 ผลิตกรดโดยรวมและกรดแลคติกได้สูงที่สุด *Lactobacillus plantarum* ไอโซเลท LPB3 ไอโซเลท LPB1 และ *Wissella cibaria* ไอโซเลท WCD สามารถยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ได้ดีที่สุดในลำดับ จึงนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลท นี้ มาเตรียมเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบผสมที่ 10^4 , 10^6 และ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เติมนลงในปลาซมก่อนการหมัก ที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปริมาตรต่อน้ำหนัก) อีกทั้งยังมีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบผสมร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* หรือ *Salmonella* sp. เพื่อศึกษาการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งพบว่าต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบผสมที่ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมในทั้งสองการทดลองคุณภาพทางประสาทสัมผัสของปลาซมที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแบบเชื้อผสมที่ 10^4 , 10^6 และ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$) ยกเว้นด้านความเปรี้ยว ($p\leq 0.05$) ผลการศึกษานี้สรุปได้ว่าต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบผสมที่ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร เป็นปริมาณที่เหมาะสมในการหมักปลาซม

คำสำคัญ : ปลาซม; แบคทีเรียแลคติก; ต้นเชื้อบริสุทธิ์; กรดโดยรวม; การยับยั้งแบคทีเรีย

Abstract

The objective of this research was to study characteristics of the lactic acid bacteria (LAB) isolated from Pla-som produced in Phayao then select the LAB isolates and suitable amount and use as a starter culture for Pla-som fermentation. Fifteen isolates of LAB were studied for total acid content, lactic acid content and antibacterial activity against *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* sp. The results showed that *Leuconostoc mesenteroides* isolate LM2 produced the highest amount of total acid and lactic acid. *Lactobacillus plantarum*, isolate LPB3, isolate LPB1 and *Wissella cibaria* isolate WCD performed the best inhibition among other isolates against *E. coli*, *S. aureus* and *Salmonella* sp., respectively. These 4 isolates were prepared as LAB mixed starter cultures at 10^4 , 10^6 and 10^8 CFU/ml and added into Pla-som before fermentation at 1 % (v/w). We also added LAB mixed starter cultures with *E. coli*, *S. aureus* or *Salmonella* sp. to study antibacterial activity. It was shown that the 10^8 CFU/ml LAB mixed starter culture was an appropriate amount for both conditions. Sensory qualities of Pla-som added with LAB mixed starter cultures at 10^4 , 10^6 and 10^8 CFU/ml were similar ($p > 0.05$) regardless of amount, except for sour taste ($p \leq 0.05$). Based on these findings, the LAB mixed starter cultures at 10^8 CFU/ml appears to be an effective amount for Pla-som fermentation.

Keywords: Pla-som; lactic acid bacteria; starter culture; total acid; antibacterial activity

1. บทนำ

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่แปรรูปจากปลาน้ำจืดในประเทศไทยมีหลายประเภท ได้แก่ ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาส้ม น้ำปลา เป็นต้น ในประเทศไทยมีการผลิตปลาส้มกันอย่างแพร่หลายในเขตภาคเหนือและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ [1] โดยในจังหวัดพะเยาปลาส้มเป็นสินค้าหลักในโครงการหนึ่งตำบลหนึ่งผลิตภัณฑ์ของจังหวัด แหล่งผลิตปลาส้มในจังหวัดพะเยาอยู่ที่บ้านสันเวียงใหม่ ตำบลบ้านสา อำเภอเมือง จังหวัดพะเยา ซึ่งเป็นชุมชนรอบกว๊านพะเยาด้านตะวันตกที่ได้รับสืบทอดภูมิปัญญาการทำปลาส้มจากบรรพบุรุษและตกทอดมาถึงรุ่นลูกหลาน โดยสามารถผลิตปลาส้มที่มีรสชาติเป็นเอกลักษณ์ เป็นของฝากประจำจังหวัด มีการใช้ปลาจีนแช่แข็งในการทำปลาส้มไม่ต่ำกว่าวันละ 5,000 กิโลกรัม และสร้างรายได้ให้กับคนในชุมชนได้

เป็นอย่างดี โดยสร้างรายได้วันละ 50-300 บาทต่อคน [2] ปลาส้มแบ่งออกเป็น 4 ประเภท คือ ปลาส้มตัว ปลาส้มชิ้น ปลาส้มเส้น และปลาส้มฟักหรือแหยมปลา [3] ส่วนประกอบในการหมักปลาส้ม ได้แก่ ปลาน้ำจืด เช่น ปลาจีน ปลานวลจันทร์ ปลาตะเพียนขาว ปลายี่สก และข้าวสอยหรือข้าวเหนียวนึ่งสุก เกลือ และกระเทียม [4]

จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญในกระบวนการหมักปลาส้ม คือ แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria) ที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติหรืออาจปนเปื้อนมากับวัตถุดิบต่าง ๆ ซึ่งสามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศ แบคทีเรียแลคติกมีกระบวนการหมักน้ำตาลที่ให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกเป็นหลัก (homo-fermentative fermentation) และกระบวนการหมักน้ำตาลที่ให้ผลผลิตเป็นกรดแลคติกร่วมกับผลิตภัณฑ์

อื่น (heterofermentative fermentation) โดยกระบวนการหมักน้ำตาลทั้ง 2 แบบนี้เป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์ปลาส้มมีค่าความเป็นกรดต่าง (pH) ลดต่ำลง ในระหว่างการหมัก [5] นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกยังสามารถสร้างโปรตีนชื่อว่าแบคทีริโอซิน (bacteriocin) [6] ซึ่งมีสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและกลุ่มที่ทำให้อาหารเน่าเสีย ได้แก่ *Campylobacter* sp., *Escherichia coli* และ *Salmonella* sp. เป็นต้น ปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียแลคติกมาพัฒนาและใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลาย โดยใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ในกระบวนการหมักอาหารหลายชนิด ได้แก่ แหนม ไส้กรอกหมัก ผลิตภัณฑ์นมหมัก และโยเกิร์ต เป็นต้น [7] เพื่อช่วยให้การผลิตมีความสม่ำเสมอ ระยะเวลาการหมักสั้นลง และลดปริมาณแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสียได้ ทำให้ผู้บริโภคมีความมั่นใจในความปลอดภัยมากขึ้น

การศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ คณะผู้วิจัยมีจุดมุ่งหมายในการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากปลาส้มในท้องถิ่นที่มีความสามารถในการผลิตกรดโดยรวมและกรดแลคติกสูง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้ เพื่อเตรียมเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมความเข้มข้นต่าง ๆ และใส่ลงในปลาส้ม พร้อมทั้งตรวจสอบสมบัติของปลาส้มที่ได้ สำหรับใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงผลิตภัณฑ์ปลาส้มในท้องถิ่นให้มีคุณภาพได้มาตรฐานและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคต่อไป

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 ที่มาและการเก็บรักษาจุลินทรีย์

แบคทีเรียแลคติกจำนวน 15 ไอโซเลท ที่ใช้ในการศึกษานี้ คัดแยกได้จากปลาส้มขึ้นและปลาส้มพักที่ผลิตโดยผู้ประกอบการจากบ้านสันเวียงใหม่ ตำบลบ้านสาบ อำเภอมือง จังหวัดพะเยา [8] ซึ่งตรวจสอบ

ชนิดของแบคทีเรียแลคติกโดยวิธีทางชีวโมเลกุล [9] โดยแบ่งเป็น *Lactobacillus plantarum* 12 ไอโซเลท *Leuconostoc mesenteroides* 2 ไอโซเลท และ *Weissella cibaria* 1 ไอโซเลท ส่วน *E. coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. ที่ใช้ในการศึกษาได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา จุลินทรีย์ทั้งหมดเก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 15 โดยปริมาตรต่อปริมาตร ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2 การตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดโดยรวม และปริมาณกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เก็บรักษาในสารละลายกลีเซอรอลที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสมาเลี้ยงในอาหารเหลว deMan, Rogosa Sharpe (MRS) จนมีความเข้มข้นเท่ากับความขุ่นมาตรฐานแมกซ์ฟาร์แลนด์ (McFarland) เบอร์ 0.5 ซึ่งเทียบเท่ากับ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร จากนั้นถ่ายแบคทีเรียแลคติกที่ความเข้มข้น 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหารเหลว MRS ปริมาตร 150 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียทุก 12 ชั่วโมง เป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยนำเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียจากแต่ละการทดลองมากรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน (Whatman®) เบอร์ 1 จากนั้นนำตัวอย่างที่กรองแล้วมาตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดโดยรวมและปริมาณกรดแลคติก โดยในการตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่างตรวจสอบด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรดต่าง ส่วนการตรวจสอบปริมาณกรดโดยรวมตรวจสอบโดยการไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ [10]

ปริมาณกรดแลคติกคำนวณจากปริมาณกรดโดยรวม โดยใช้วิธีของ AOAC [11] ในการตรวจสอบค่าต่าง ๆ ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.3 การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธีหยดบนอาหารแข็ง (agar spot assay)

นำแบคทีเรียแลคติกมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS จนได้ความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นมาตรฐานแมกซ์ฟาร์แลนด์ เบอร์ 0.5 จากนั้นหยดแบคทีเรียแลคติกปริมาตร 10 ไมโครลิตร จำนวน 1 หยด ลงบนอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขณะที่เดียวกันเลี้ยง *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ในอาหารเหลว brain heart infusion (BHI) จนเชื่อมีความเข้มข้นเท่ากับความเข้มข้นมาตรฐานแมกซ์ฟาร์แลนด์ เบอร์ 0.5 จากนั้นดูดเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตร ใส่ในอาหารแข็ง BHI ปริมาตร 7 มิลลิตร [12] คนให้เข้ากันและเททับลงบนอาหารแข็ง MRS ที่หยดแบคทีเรียแลคติกและผ่านการบ่มมาแล้ว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบทุก ๆ 24 ชั่วโมง จนถึง 72 ชั่วโมง โดยวัดความกว้างของวงใสที่เกิดขึ้น และทำการวัดตัวอย่างละ 3 ซ้ำ โดยนำผลการทดลองมาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี ANOVA (analysis of variance) วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

2.4 การตรวจสอบคุณภาพของปลาสดหลังการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสม

2.4.1 การตรวจสอบความเข้มข้นของต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสม

นำแบคทีเรียแลคติกไอโซเลทที่มีสมบัติ

ในการผลิตกรดโดยรวมและกรดแลคติกได้ดีที่สุด และแบคทีเรียแลคติกไอโซเลทที่มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* หรือ *Salmonella* sp. ได้ดี มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS จากนั้นนำแบคทีเรียทั้งหมดมาเตรียมเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่ความเข้มข้นเชื้อ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร และเจือจางต่อจนได้ความเข้มข้น 10^6 และ 10^4 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร นำต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่ความเข้มข้นเชื้อ 0 (ชุดควบคุม), 10^4 , 10^6 และ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาณ 100 มิลลิตร และกรองด้วยกระดาษกรองวอทแมน เบอร์ 1 นำส่วนที่ผ่านการกรองมาตรวจสอบโดยวัดค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดโดยรวม ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกโดยเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS และตรวจนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ plate count agar (PCA) โดยวัดค่าต่าง ๆ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.4.2 การตรวจสอบความเข้มข้นของต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* หรือ *Salmonella* sp.

นำปลาสดชิ้นที่ผสมเสร็จของปลาสดศรีทนามาเติมแบคทีเรียที่ความเข้มข้นแตกต่างกันดังนี้ ต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 10^4 , 10^6 และ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร ร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* หรือ *Salmonella* sp. ที่ความเข้มข้น 10^5 ซีเอฟยูต่อ

มิลลิลิตร [1] โดยเติมแบคทีเรียแต่ละส่วน ในสัดส่วน 1 มิลลิลิตรต่อปลาซั่ม 100 กรัม เก็บตัวอย่างปลาซั่มที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมและแบคทีเรียของทุกชุดการทดลอง ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 5 วัน และนำมาตรวจสอบโดยวัดค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดโดยรวม ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกและจุลินทรีย์ทั้งหมดโดยเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS และ PCA ตามลำดับ ตรวจนับจำนวน *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. โดยเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ eosin-methylene blue agar (EMBA), mannitol salt agar (MSA) และ brilliant green agar (BGA) ตามลำดับ โดยวัดค่าต่าง ๆ ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ

2.4.3 การทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ปลาซั่ม

นำตัวอย่างปลาซั่มขึ้นผสมเสร็จของปลาซั่มศรีทนามาเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบผสมความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม), 10^4 , 10^6 และ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และผ่านการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน มาทำให้สุกโดยการชุบแป้งทอด จากนั้นนำมาทดสอบคุณภาพของผลิตภัณฑ์ปลาซั่มโดยให้ผู้ทดสอบชิมอย่างน้อย 30 คน ให้คะแนนความพึงพอใจแบบสเกลความชอบ 9 คะแนน (9-point hedonic scale) ทำการประเมินความชอบ 7 ด้าน ได้แก่ ด้านคุณลักษณะของสี กลิ่น กลิ่นคาว รสชาติ รสเปรี้ยว เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD, completely randomized design) นำผลคะแนนประเมินความชอบของคุณลักษณะต่าง ๆ มาวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติด้วยวิธี ANOVA วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธีของ Duncan ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการศึกษาแบ่งเป็น 2 ส่วน ดังต่อไปนี้

3.1 การศึกษาสมบัติที่เหมาะสมของแบคทีเรียแลคติกเพื่อนำไปพัฒนาเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์

3.1.1 การตรวจสอบค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดโดยรวม และปริมาณกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก

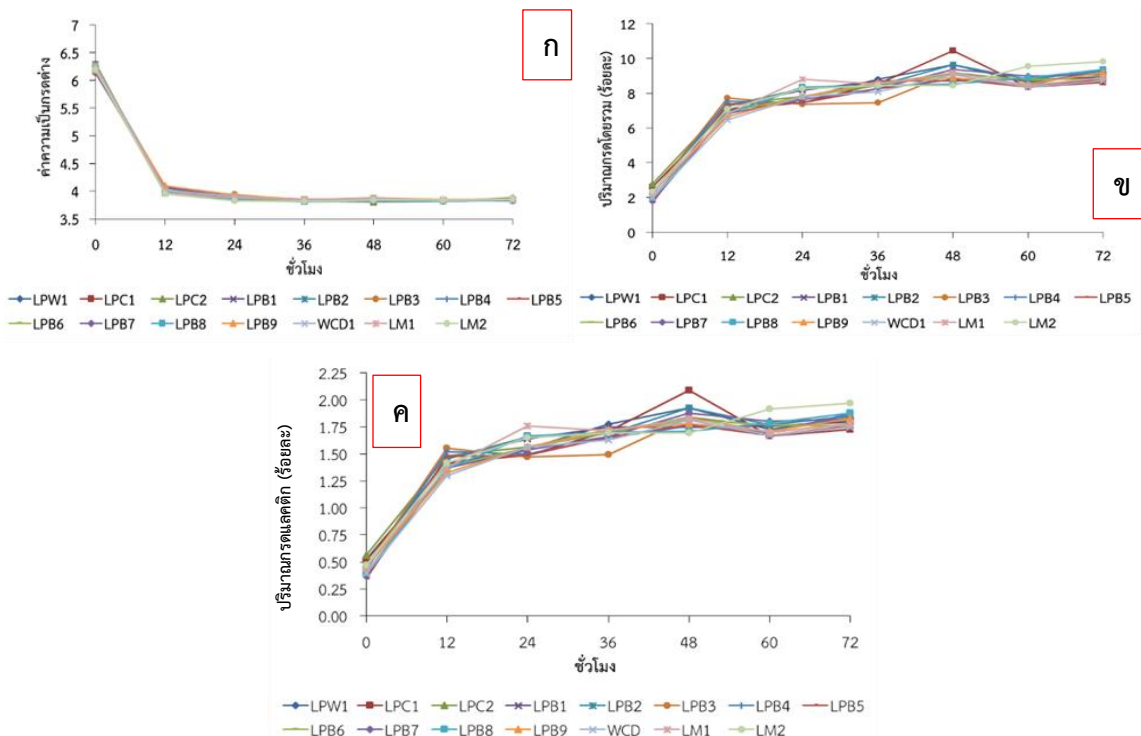
การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียแลคติกทั้ง 15 ไอโซเลท ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS พบว่าค่าความเป็นกรดต่างมีค่าลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นลดลงอีกเล็กน้อยและคงที่หลังชั่วโมงที่ 36 โดยมีค่าความเป็นกรดต่างที่ 72 ชั่วโมงใกล้เคียงกัน คือ 3.83-3.88 (รูปที่ 1ก และ ตารางที่ 1) ส่วนปริมาณกรดที่เชื้อผลิตพบว่าแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* ไอโซเลท LM2 สามารถผลิตกรดโดยรวมและกรดแลคติกได้สูงสุดร้อยละ 8.86 และ 1.97 ตามลำดับ (ตารางที่ 1) โดยปริมาณกรดโดยรวมและกรดแลคติกเพิ่มสูงขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 12 ชั่วโมงแรก และเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงชั่วโมงที่ 48 และเริ่มคงที่หลังชั่วโมงที่ 48 (รูปที่ 1ข และ 1ค) ดังนั้นแบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* ไอโซเลท LM2 จึงมีความสามารถในการผลิตกรดโดยรวมและกรดแลคติกได้สูงสุด

3.1.2 การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ด้วยวิธีหยดบนอาหารแข็ง

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกเพื่อทำเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ สมบัติที่สำคัญประการหนึ่งที่ต้องตรวจสอบ คือ ความสามารถของแบคทีเรียแลคติกในการป้องกันอาหารเน่าเสียและการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร [13] โดยการศึกษาครั้งนี้เลือกเชื้อแบคทีเรียมา 3 ชนิด คือ *E. coli*, *S. aureus* และ

Salmonella sp. เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยในอาหารและถูกระบุไว้ให้มีการตรวจสอบตามเกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร [14] ผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลทสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบทั้ง 3 ชนิดได้ ซึ่งแต่ละไอโซเลทมีความกว้างของวงใสคงที่หรือเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหลังจากบ่มเป็นเวลานานขึ้น และเมื่อพิจารณาจากความกว้างของวงใสหลังจากบ่มเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลท LPB3 ไอโซเลท LPB1 และ *W. cibaria* ไอโซเลท WCD สามารถยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ได้ดีตามลำดับ โดยมีความกว้างของวงใสสูงสุดเท่ากับ 27.5, 27.1 และ 25.9 มิลลิเมตร ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม ความกว้างวงใสของทั้ง 3 ไอโซเลท นี้ มีค่าสูงสุดในทั้ง 3 ระยะ การบ่มที่ 24, 48

และ 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 2) ผลการทดลองในครั้งนี้แบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ได้น้อยกว่าแบคทีเรียแลคติกในการศึกษาของ Hwanhlem และคณะ เมื่อพิจารณาจากความกว้างของวงใสที่ 24 ชั่วโมง [12] การที่แบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งแบคทีเรียในอาหารได้นั้น เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารอินทรีย์ เช่น กรดอินทรีย์ชนิดต่างๆ และแบคทีเรียโอซินซึ่งแบคทีเรียโอซินจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยอาศัยแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatic) เหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย และขัดขวางกระบวนการแรงขับเคลื่อนโปรตอน (proton motive force) รวมทั้งรบกวนสมดุลของความเป็นกรดต่าง เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของกรดอะมิโนและไอออน เกิดการสลายตัวของ



รูปที่ 1 (ก) การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรดต่าง (ข) ปริมาณกรดโดยรวม และ (ค) ปริมาณกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก 15 ไอโซเลท หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดโดยรวม และปริมาณกรดแลคติกของแบคทีเรียแลคติก หลังจากเลี้ยงในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ชื่อ	แบคทีเรียแลคติก	สายพันธุ์	ค่าความเป็นกรดต่าง	ปริมาณกรดโดยรวม (ร้อยละ)	ปริมาณกรดแลคติก (ร้อยละ)
1	LPW1	<i>L. plantarum</i>	WCP931	3.83±0.03	8.26±0.68	1.84±0.12
2	LPC1	<i>L. plantarum</i>	CJLP136	3.85±0.02	7.78±0.39	1.73±0.07
3	LPC2	<i>L. plantarum</i>	CJLP136	3.87±0.02	7.83±1.07	1.81±0.19
4	LPB1	<i>L. plantarum</i>	B-10	3.84±0.02	8.07±0.29	1.79±0.05
5	LPB2	<i>L. plantarum</i>	B-10	3.84±0.03	8.31±0.10	1.85±0.02
6	LPB3	<i>L. plantarum</i>	B-10	3.85±0.03	8.02±0.27	1.78±0.05
7	LPB4	<i>L. plantarum</i>	B-10	3.85±0.01	8.43±0.24	1.87±0.04
8	LPB5	<i>L. plantarum</i>	B-10	3.87±0.03	7.91±0.60	1.76±0.11
9	LPB6	<i>L. plantarum</i>	B-10	3.85±0.03	7.91±0.41	1.76±0.07
10	LPB7	<i>L. plantarum</i>	B-10	3.88±0.01	8.21±0.34	1.82±0.06
11	LPB8	<i>L. plantarum</i>	B-10	3.84±0.01	8.45±0.19	1.88±0.03
12	LPB9	<i>L. plantarum</i>	B-10	3.86±0.03	8.15±0.83	1.83±0.15
13	WCD	<i>W. cibaria</i>	DFR3	3.84±0.01	7.85±0.46	1.75±0.08
14	LM1	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	ระบุไม่ได้	3.85±0.01	7.99±0.27	1.78±0.12
15	LM2	<i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	ระบุไม่ได้	3.86±0.02	8.86±0.34	1.97±0.07

ของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) ทำให้เซลล์ตายในที่สุด [12] อีกทั้งนฤมล [7] ได้รายงานว่าการกรดแลคติกสามารถทำลายชั้นลิพอโพลีแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide layer) ของเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ของ *E. coli* จนทำให้ *E. coli* ตายได้ และจากรายงานการศึกษาของ Przybylski และคณะ [15] พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างของน้ำนมวัวหมัก เนื้อวัวหมัก และหญ้าแห้งหมักที่สร้างแบคทีเรียโอซินสามารถยับยั้ง *E. coli* และ *S. enterica* ได้โดยมีวงใสกว้างมากกว่า 25 มิลลิเมตร ซึ่งเป็นผลจากการผลิต

แบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียแลคติก [16] นอกจากนี้ Srionnual และคณะ [17] ได้รายงานการค้นพบแบคทีเรียแลคติก *W. cibaria* 110 จากการคัดแยกเชื้อจากผลิตภัณฑ์ปลาสด ซึ่งสามารถสร้างแบคทีเรียโอซินที่มีสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้

3.2 การตรวจสอบคุณลักษณะของปลาสดเมื่อมีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสม

3.2.1 การตรวจสอบความเข้มข้นของต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสม

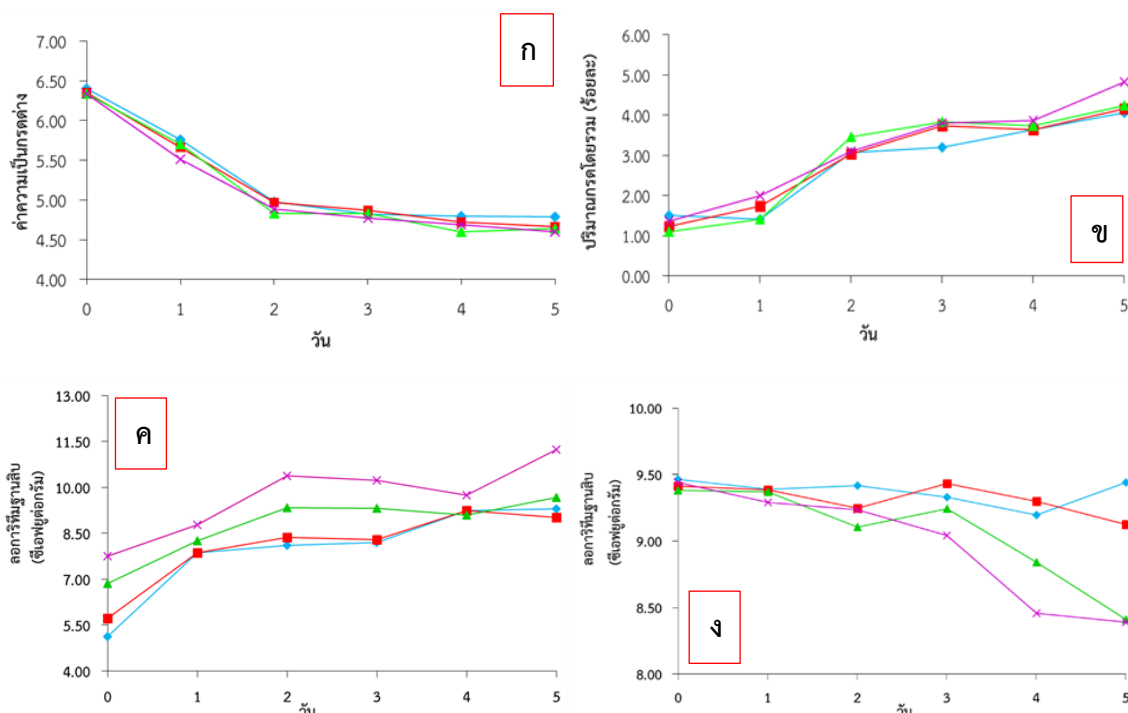
ผลการทดลองในข้อ 3.1.1 และ 3.1.2

ตารางที่ 2 ความกว้างวงใสของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. หลังจากบ่มเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

ไอโซเลท	ความกว้างของวงใส (มิลลิเมตร)								
	<i>E. coli</i>			<i>S. aureus</i>			<i>Salmonella</i> sp.		
	บ่ม 24 ชม.	บ่ม 48 ชม.	บ่ม 72 ชม.	บ่ม 24 ชม.	บ่ม 48 ชม.	บ่ม 72 ชม.	บ่ม 24 ชม.	บ่ม 48 ชม.	บ่ม 72 ชม.
LPW1	22.8 ^{abc}	24.0 ^a	24.3 ^a	21.0 ^{ab}	22.5 ^{bcde}	24.0 ^{abc}	19.8 ^a	21.2 ^b	21.6 ^a
LPC1	24.0 ^{abc}	24.4 ^a	24.8 ^a	21.8 ^{ab}	23.2 ^{abcde}	24.0 ^{abc}	21.5 ^a	22.9 ^{ab}	23.3 ^a
LPC2	22.1 ^{abc}	22.5 ^a	22.9 ^a	23.2 ^{ab}	25.1 ^{ab}	25.5 ^{ab}	23.0 ^a	23.2 ^{ab}	23.2 ^a
LPB1	23.3 ^{abc}	24.1 ^a	23.7 ^a	24.2 ^a	25.8 ^a	27.1 ^a	22.0 ^a	24.0 ^{ab}	24.1 ^a
LPB2	26.3 ^{ab}	27.0 ^a	27.2 ^a	20.7 ^{ab}	22.7 ^{bcde}	22.7 ^{bcd}	21.3 ^a	23.1 ^{ab}	23.1 ^a
LPB3	26.9 ^a	27.3 ^a	27.5 ^a	21.9 ^{ab}	23.0 ^{abcde}	23.3 ^{bc}	20.0 ^a	22.0 ^{ab}	22.7 ^a
LPB4	24.6 ^{abc}	26.0 ^a	27.0 ^a	19.2 ^b	19.4 ^f	19.4 ^d	21.8 ^a	22.8 ^{ab}	22.8 ^a
LPB5	25.0 ^{abc}	26.0 ^a	26.5 ^a	19.4 ^b	20.4 ^{ef}	21.0 ^{cd}	20.3 ^a	22.0 ^{ab}	22.0 ^a
LPB6	21.4 ^{bc}	21.8 ^a	22.5 ^a	22.0 ^{ab}	24.4 ^{abc}	25.3 ^{ab}	20.8 ^a	22.8 ^{ab}	22.8 ^a
LPB7	23.6 ^{abc}	23.6 ^a	24.0 ^a	21.6 ^{ab}	23.3 ^{abcde}	23.3 ^{bc}	22.5 ^a	23.8 ^{ab}	23.8 ^a
LPB8	20.4 ^{bc}	22.9 ^a	23.2 ^a	20.8 ^{ab}	22.3 ^{bcde}	22.3 ^{bcd}	21.9 ^a	23.1 ^{ab}	23.6 ^a
LPB9	21.5 ^{bc}	23.5 ^a	24.0 ^a	21.5 ^{ab}	21.5 ^{cdef}	23.3 ^{bc}	22.0 ^a	23.9 ^{ab}	23.9 ^a
WCD	22.4 ^{abc}	22.7 ^a	22.7 ^a	20.1 ^{ab}	20.8 ^{ef}	22.4 ^{bcd}	23.1 ^a	25.9 ^a	25.9 ^a
LM1	19.7 ^c	22.3 ^a	22.3 ^a	22.3 ^{ab}	24.3 ^{abcd}	24.3 ^{abc}	20.3 ^a	22.0 ^{ab}	22.3 ^a
LM2	20.0 ^c	21.4 ^a	21.4 ^a	20.0 ^{ab}	21.1 ^{def}	21.5 ^{cd}	21.3 ^a	22.9 ^{ab}	23.2 ^a

สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมได้ 4 ไอโซเลท คือ แบคทีเรียแลคติก *L. mesenteroides* ไอโซเลท LM2 ที่สามารถผลิตกรดโดยรวมและผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด ส่วนแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* ไอโซเลท LPB3 ไอโซเลท LBP1 และ *W. cibaria* ไอโซเลท WCD สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียในอาหาร *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ได้ดีตามลำดับ ดังนั้นจึงได้นำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลท นี้มาทำเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบเชื้อผสมและนำมาทดสอบความเข้มข้นของต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่เหมาะสม 4 ชุดการทดลอง ใน 2.4.1 ผลการทดลองพบว่าค่าความเป็นกรดต่างของปลาสัมผัสลงอย่าง

ต่อเนื่องในทุกชุดการทดลอง ส่วนปริมาณกรดโดยรวมเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 1 เพิ่มขึ้นมากในวันที่ 2 และเพิ่มขึ้นอีกเล็กน้อยอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 5 ในทุกชุดการทดลอง (รูปที่ 2ก และ 2ข) จำนวนแบคทีเรียแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ส่วนจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมีค่าลดลงอย่างต่อเนื่องในทุกชุดการทดลอง โดยชุดการทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบเชื้อผสม 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีจำนวนแบคทีเรียแลคติกในวันที่ 5 สูงที่สุดเท่ากับ 1.75×10^{11} ซีเอฟยูต่อกรัม และมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในวันที่ 5 ต่ำที่สุดเท่ากับ 2.45×10^8 ซีเอฟยูต่อกรัม (รูปที่ 2ค และ 2ง) การที่จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เป็นไปในทิศทางเดียวกับจำนวนแบคทีเรียแลคติก เนื่องจากแบคทีเรีย

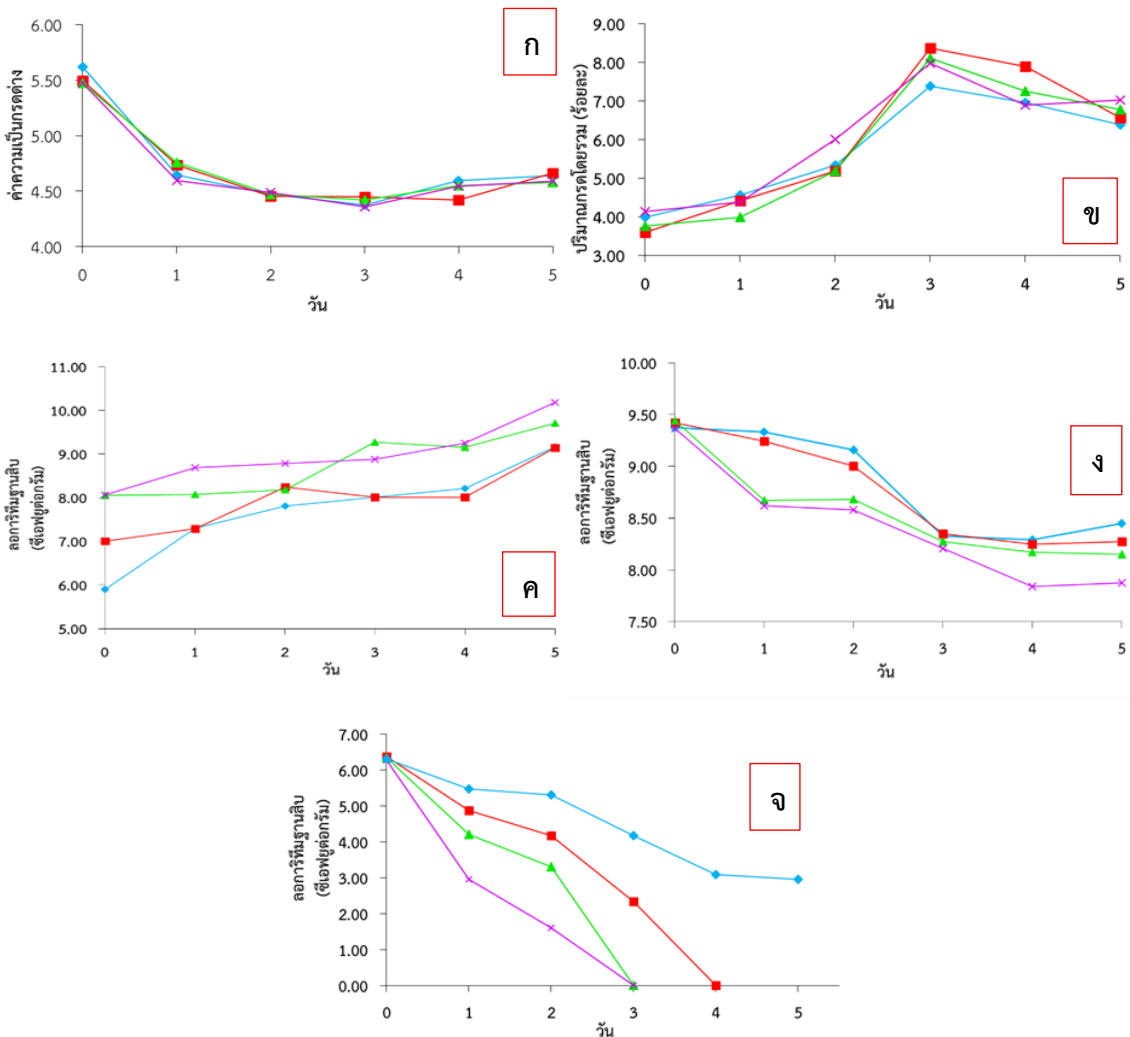


รูปที่ 2 คุณลักษณะของปลาสดเมื่อมีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ และหมักเป็นเวลา 5 วัน (ก) วัดค่าความเป็นกรดต่าง (ข) ปริมาณกรดโดยรวม (ค) จำนวนแบคทีเรียแลคติก และ (ง) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด โดยมีชุดควบคุม (◆) และชุดที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกที่ความเข้มข้น 10^4 (■), 10^6 (▲) และ 10^8 (×) ซีเอฟยูต่อมิลลิตร

แลคติกสามารถเจริญได้ใน MRS แต่ไม่สามารถเจริญได้ใน PCA ทั้งไป แต่จะเจริญได้ก็ต่อเมื่อมีการเติมอินดิเคเตอร์ชนิดบรอมครีซอลเพอร์เพิล (bromocresol purple) เท่านั้น [18,19] จากผลการทดลองที่พบว่า ชุดการทดลองที่เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบเชื้อผสม 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิตร มีจำนวนแบคทีเรียแลคติกสูงที่สุด สัมพันธ์กับการมีปริมาณกรดโดยรวมสูงที่สุด มีค่าความเป็นกรดต่างต่ำที่สุด และมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำที่สุด (รูปที่ 2ก, 2ค และ 2ง) เนื่องจากเมื่อแบคทีเรียแลคติกผลิตกรดทำให้สภาวะของปลาสดมีความเป็นกรดสูง ประกอบกับปลาสดมีความเค็มสูง ทำให้มีสภาพไม่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียทั่วไป [20]

จึงทำให้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดลดน้อยลงอย่างเห็นได้ชัด ดังนั้นการมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกสูงจึงไม่ทำให้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมากตามไปด้วย การทดลองชุดนี้จึงสรุปได้ว่าการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสม 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิตรเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ในการเติมลงในปลาสดซึ่งสามารถผลิตกรดได้สูงที่สุด มีแบคทีเรียแลคติกสูงที่สุด และจุลินทรีย์ทั้งหมดน้อยที่สุด

3.2.2 การตรวจสอบความเข้มข้นของต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp.



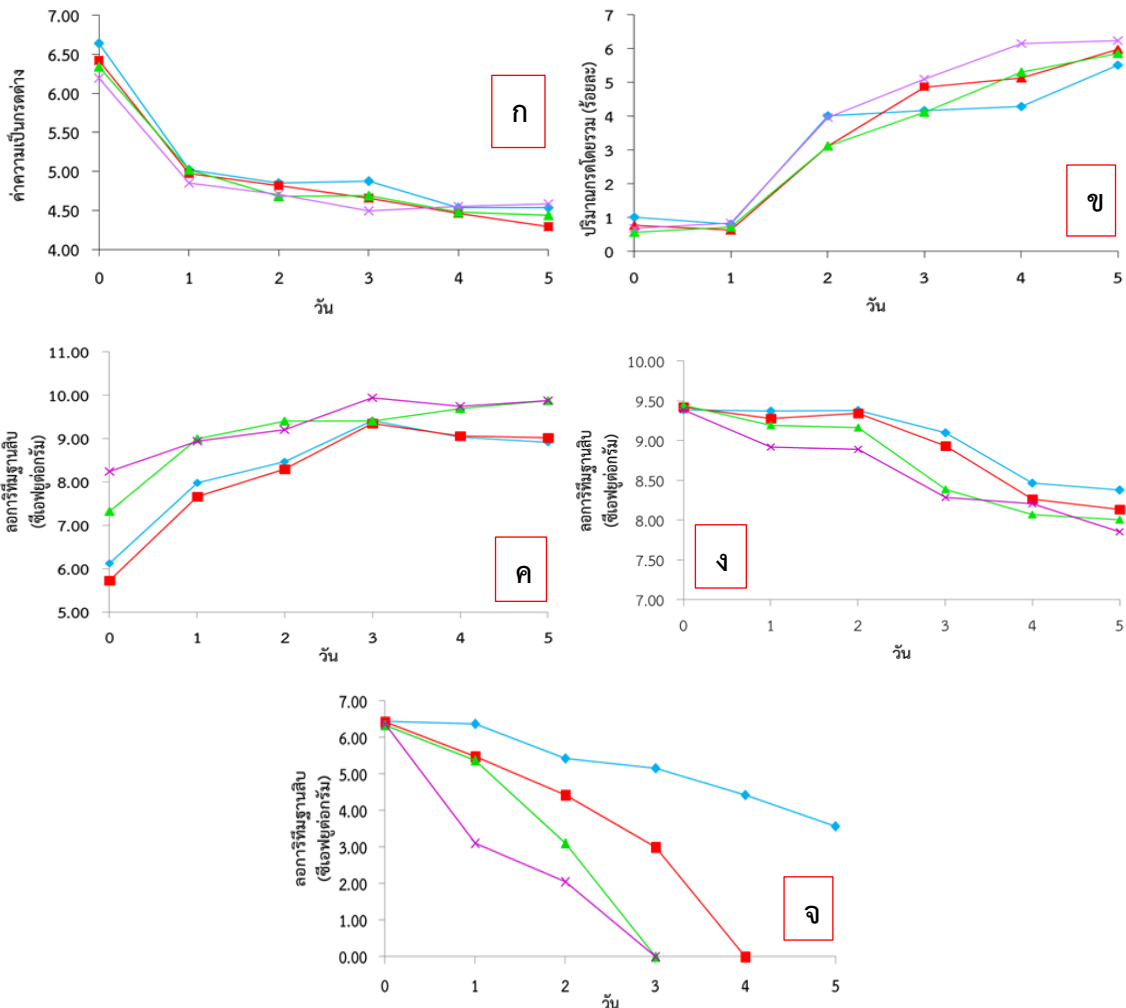
รูปที่ 3 คุณลักษณะของปลาสมเมื่อมีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการเติมแบคทีเรีย *E. coli* ความเข้มข้น 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และหมักเป็นเวลา 5 วัน (ก) วัดค่าความเป็นกรดต่าง (ข) ปริมาณกรดโดยรวม (ค) จำนวนแบคทีเรียแลคติก (ง) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ (จ) จำนวน *E. coli* โดยมีชุดควบคุม (◆) และชุดที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกที่มีความเข้มข้นเชื้อ 10^4 (■), 10^6 (▲) และ 10^8 (×) ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

การทดลองนี้ได้เติมแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ร่วมกับต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมลงในปลาสม เพื่อศึกษาความสามารถของต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus*

และ *Salmonella* sp. ในสภาพการหมักจริงหลังจากที่ได้ทดสอบโดยวิธีหยดบนอาหารแข็งในห้องปฏิบัติการไปแล้ว โดยใช้แบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ที่มีความเข้มข้น 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร [1] เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจน

ผลการทดลองพบว่าในทุกชุดการทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมร่วมกับแบคทีเรีย *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ปลา سالمมีค่าความเป็นกรดต่างลดลงและปริมาณกรดโดยรวมเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องจนถึงวันที่ 5 โดยชุดการทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อแบคทีเรีย

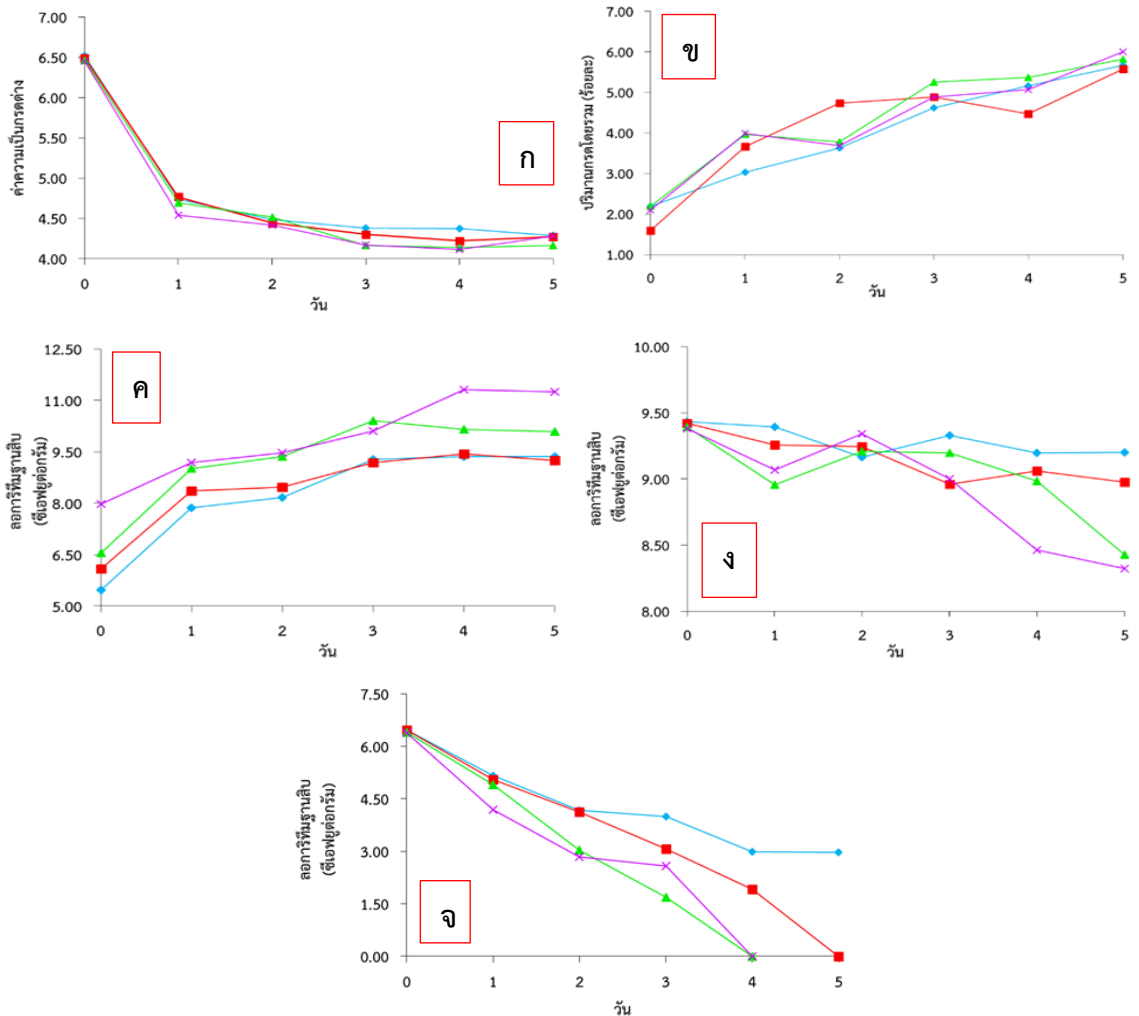
แบบเชื้อผสมความเข้มข้น 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีค่าความเป็นกรดต่างต่ำที่สุด และมีปริมาณกรดโดยรวมสูงที่สุด (รูปที่ 3ก, 3ข, 4ก, 4ข, 5ก และ 5ข) ส่วนจำนวนแบคทีเรียแลคติกมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องในทางกลับกันจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและจำนวน *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. มีค่าลดลง



รูปที่ 4 คุณลักษณะของปลา سالمเมื่อมีการเติมต้นเชื้อแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการเติมแบคทีเรีย *S. aureus* ความเข้มข้น 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และหมักเป็นเวลา 5 วัน (ก) วัดค่าความเป็นกรดต่าง (ข) ปริมาณกรดโดยรวม (ค) จำนวนแบคทีเรียแลคติก (ง) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ (จ) จำนวน *E. coli* โดยมีชุดควบคุม (◆) และชุดที่มีการเติมต้นเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีความเข้มข้นเชื้อ 10^4 (■), 10^6 (▲) และ 10^8 (×) ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

อย่างต่อเนื่องในทุกชุดการทดลอง โดยในชุดการทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบบเชื้อผสม 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีจำนวนแบคทีเรียแลคติกสูงที่สุด มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำที่สุด และสามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ได้ดีที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับชุดการทดลองอื่น (รูปที่

3ค, 3ง, 3จ, 4ค, 4ง, 4จ, 5ค, 5ง และ 5จ) ในชุดควบคุมที่ไม่ได้เติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสม มีความสามารถในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ได้น้อยที่สุด โดยมีจำนวน *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. เหลือในวันที่ 5 มากที่สุด ส่วนชุดการทดลองที่มีการเติมต้น



รูปที่ 5 คุณสมบัติของปลาหมึกเมื่อมีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ร่วมกับการเติมแบคทีเรีย *Salmonella* sp. ความเข้มข้น 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร และหมักเป็นเวลา 5 วัน (ก) วัดค่าความเป็นกรดต่าง (ข) ปริมาณกรดโดยรวม (ค) จำนวนแบคทีเรียแลคติก (ง) จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด และ (จ) จำนวน *E. coli* โดยมีชุดควบคุม (◆) และชุดที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกที่มีความเข้มข้นเชื้อ 10^4 (■), 10^6 (▲) และ 10^8 (×) ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร

เชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมความเข้มข้น 10^6 และ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของ *E. coli* และ *S. aureus* จนตรวจไม่พบหลังจากหมัก 3-5 วัน (รูปที่ 3จ และ 4จ) และสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella* sp. จนตรวจไม่พบหลังจากหมัก 4-5 วัน (รูปที่ 5จ) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Saithong และคณะ [1] โดยชุดที่มีการเติมต้นเชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมความเข้มข้น 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีจำนวน *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. เหลือน้อยที่สุด อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาจากวันเริ่มต้นการหมักที่ 0 วัน ปลาสดในทุกชุดการทดลองมีจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้นของ *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. มากกว่า 10^5 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร ทั้งนี้อาจมาจากการที่ปลาสดมีเชื้อแบคทีเรียเหล่านี้ปนเปื้อนอยู่ในปลาสดในระดับหนึ่ง เมื่อเติมแบคทีเรียลงไปอีกจึงทำให้ตรวจพบจำนวนมากขึ้นกว่าจำนวนที่เติมลงไป

ต้นเชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วยแบคทีเรียแลคติก 4 ไอโซเลท 3 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* 2 ไอโซเลท *L. mesenteroides* 1 ไอโซเลท และ *W. cibaria* 1 ไอโซเลท และต้นเชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมทั้ง 3 สายพันธุ์ นี้สามารถยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ได้ดี ซึ่งผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Noonpakdee และคณะ [21] ที่ศึกษาแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* PMU33 ซึ่งแยกได้จากปลาสดปัก โดยพบว่าสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินในปริมาณสูงและทนความร้อนสูงได้ และสามารถยับยั้ง *S. aureus*, *Bacillus cereus* และ *Listeria monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของอาหารเน่าเสียและก่อโรคในคนได้อีกด้วย นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum*, *L. lactis*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Pediococcus* และ *Strepto-*

coccus ที่แยกได้จากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นกล่าเชื้อขนมจีนแป้งหมักสามารถยับยั้ง *E. coli*, *S. Typhimurium* และ *S. aureus* ได้เช่นเดียวกัน [6]

3.2.3 ทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคที่มีต่อผลิตภัณฑ์ปลาสด

นำต้นเชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมที่ความเข้มข้น 0 (ชุดควบคุม) 10^4 , 10^6 และ 10^8 ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตรเติมลงในปลาสดชิ้นและหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำให้สุกโดยการชุบแป้งทอด และนำมาการทดสอบคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของปลาสด 7 ด้าน ได้แก่ สี กลิ่น รสชาติ รสเปรี้ยว ความเค็ม เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม โดยใช้ผู้บริโภคจำนวน 56 คน เป็นผู้ทดสอบผลการประเมินความชอบของผู้บริโภค พบว่าคุณลักษณะด้านสี กลิ่น รสชาติ ความเค็ม เนื้อสัมผัส ความชอบโดยรวมของทั้ง 4 ชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบต่อรสเปรี้ยวในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมต้นเชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติกมากกว่าชุดการทดลองที่มีการเติมต้นเชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสม ($p \leq 0.05$) (ตารางที่ 3) จากการทดลองนี้เห็นได้ชัดว่าเมื่อมีการเติมต้นเชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติกแบบเชื้อผสมลงในปลาสด ทำให้ผลิตภัณฑ์ปลาสดมีค่าความเป็นกรดต่างลดต่ำลง ปริมาณกรดโดยรวมสูงขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 2ก และ 4ข) จึงทำให้มีรสเปรี้ยวขึ้น ผู้บริโภคจึงให้คะแนนความชอบน้อยลงซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Corsetti และคณะ [22] ที่เติมต้นเชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* และ *L. mesenteroides* ลงในปลาสด พบว่าผู้บริโภคให้คะแนนความชอบด้านรสเปรี้ยวน้อยกว่าชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมต้นเชื้อบิริสซูธแบคทีเรียแลคติก เนื่องจากแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* สามารถผลิตกรดได้สูง จึงทำให้ค่าความเป็นกรดต่างลดต่ำลง มี

ความเปรี้ยวมากกว่าชุดควบคุม อย่างไรก็ตาม โดยภาพรวมแล้วผู้บริโภคให้การยอมรับต่อผลิตภัณฑ์ปลาซั่มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื่อมผสม

ทั้ง 3 ความเข้มข้น ซึ่งมีคะแนนความชอบแตกต่างกับชุดควบคุมเพียงคุณลักษณะเดียวคือความเปรี้ยว

ตารางที่ 3 คะแนนการทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัสของผู้บริโภคต่อผลิตภัณฑ์ปลาซั่มที่มีการเติมต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื่อมผสมที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้นของต้นเชื้อบริสุทธิ์ (ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร)	ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน						
	สี	กลิ่น	รสชาติ	รสเปรี้ยว	ความเคว	เนื้อสัมผัส	ความชอบ โดยรวม
0	7.79 $\pm$ 1.21 ^a	7.55 $\pm$ 1.31 ^a	7.34 $\pm$ 1.77 ^a	7.21 $\pm$ 1.74 ^a	6.79 $\pm$ 1.79 ^a	7.13 $\pm$ 1.41 ^a	7.34 $\pm$ 1.49 ^a
10 ⁴	7.68 $\pm$ 1.24 ^a	7.43 $\pm$ 1.48 ^a	7.30 $\pm$ 1.44 ^a	6.98 $\pm$ 1.51 ^{ab}	6.57 $\pm$ 1.71 ^a	7.29 $\pm$ 1.81 ^a	7.43 $\pm$ 1.41 ^a
10 ⁶	7.70 $\pm$ 1.22 ^a	7.36 $\pm$ 1.32 ^a	6.89 $\pm$ 1.60 ^a	6.59 $\pm$ 1.75 ^b	6.30 $\pm$ 1.85 ^a	7.07 $\pm$ 1.46 ^a	7.07 $\pm$ 1.54 ^a
10 ⁸	7.75 $\pm$ 1.20 ^a	7.61 $\pm$ 1.18 ^a	7.34 $\pm$ 1.23 ^a	6.86 $\pm$ 1.45 ^{ab}	6.52 $\pm$ 1.83 ^a	7.41 $\pm$ 1.51 ^a	7.52 $\pm$ 1.06 ^a

ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับเหมือนกันในแนวนอง ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p>0.05$); ค่าเฉลี่ยที่มีตัวอักษรกำกับแตกต่างกันในแนวนอง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p\leq 0.05$)

4. สรุป

การศึกษานี้คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้ 4 ไอโซเลท 3 สายพันธุ์ คือ *L. mesenteroides* ไอโซเลท LM2 ที่ผลิตกรดโดยรวมและกรดแลคติกได้สูงที่สุด *L. plantarum* ไอโซเลท LPB3, ไอโซเลท LPB1 และ *Wissella cibaria* ไอโซเลท WCD ที่สามารถยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ได้ดีที่สุด ตามลำดับ จากนั้นเตรียมเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื่อมผสมเพื่อเติมลงในปลาซั่ม ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกแบบเชื่อมผสมที่ความเข้มข้นเชื้อ 10⁸ ซีเอฟยูต่อมิลลิลิตร มีความเหมาะสมในการนำมาเตรียมเป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียแลคติกสำหรับผลิตภัณฑ์ปลาซั่ม โดยมีจำนวนแบคทีเรียแลคติกสูงที่สุด จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดต่ำที่สุด และมีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *E. coli*, *S. aureus* และ *Salmonella* sp. ในอาหารและสาเหตุของอาหารเน่าเสียได้ดีที่สุด นอกจากนี้

ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบของผลิตภัณฑ์ไม่แตกต่างจากชุดควบคุมยกเว้นด้านความเปรี้ยว

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ ทุนวิจัยมหาบัณฑิต สกว. สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภายใต้โครงการเชื่อมโยงภาคการผลิตกับงานวิจัย ทุน สกว.-อุตสาหกรรม ที่ให้งบประมาณสนับสนุนการวิจัย และขอขอบคุณ ห้องปฏิบัติการกลาง และห้องปฏิบัติการ คณะเกษตรศาสตร์ และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ที่เอื้อเฟื้อสถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

6. รายการอ้างอิง

- [1] Saithong, P., Panthavee, W., Boonyaratnakorkit, M. and Sikkhamondhol, C., 2010, Use of a starter culture of lactic acid bacteria in plaasom, a Thai fermented

- fish, J. Biosci. Bioeng. 110: 553-557.
- [2] สายอรุณ ปินะดวง, ปลาส้มเมืองกว๊าน ภูมิปัญญาพื้นบ้านอาหารไทย, แหล่งที่มา : <http://www.fisheries.go.th>, 8 มีนาคม 2559.
- [3] สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548, มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มผช. 26/2548, กระทรวงอุตสาหกรรม, กรุงเทพฯ, 10 น.
- [4] อังคณา ชมภูมิ่ง, ตะวัน ฉัตรสูงเนิน และธวัชชัย ชัยธวัชวิที, 2553, การปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ปลาสดด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ : กรณีศึกษาพื้นที่จังหวัดแพร่และจังหวัดพะเยา, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยแม่โจ้-แพร่ เฉลิมพระเกียรติ,แพร่, 124 น.
- [5] Kopermsub, P. and Yunchalard, S., 2010, Identification of lactic acid bacteria associated with the production of plaa-som a traditional fermented fish product of Thailand, Int. J. Food Micro. 138: 200-204.
- [6] สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2551, การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นกล้ำเชื้อขนมจีนแป้งหมัก, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ, 197 น.
- [7] นฤมล ทองงาม, 2553, การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย, วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพฯ, 162 น.
- [8] ทรรศนีย์ เตชะแก้ว, จรรยาลักษณ์ บัวผัด และวนิดา แซ่จิ่ง, 2551, การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักปลาสดเพื่อพัฒนาเป็นหัวเชื้อ, รายงานฉบับสมบูรณ์โครงการ IRPUS 2550, สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ, 9 น.
- [9] อรุณวรรณ บุสชา, สุภาพร ภัสสร, พนิตนาฏ อุพัฒน์นันท์ และวนิดา แซ่จิ่ง, 2556, การศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักปลาสด, น. BIO-256-261, การประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์วิจัยครั้งที่ 5, มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา.
- [10] นิตยา ผาคำ, 2553, การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในกระบวนการหมักปลาสด, การศึกษาอิสระปริญญาตรี, มหาวิทยาลัยนเรศวรพะเยา, พะเยา, 62 น.
- [11] AOAC., 1990, Official methods of analysis of the association of official analytical chemists, 15th Ed., The Association of Official Analytical Chemists, Inc., USA., 771 p.
- [12] Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattana-chant, S., Benjakul, S., Tani, A. and Maneerat, S., 2010, Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains, Food Cont. 22: 401-407.
- [13] Hammes, W.P. and Hertel, C., 1998, New developments in meat starter cultures, Meat Sci. 49: 125-138.
- [14] กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2543, เกณฑ์คุณภาพทางจุลชีววิทยาของอาหารและภาชนะสัมผัสอาหาร, ประกาศกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ฉบับที่ 2, กรุงเทพฯ, 7 น.
- [15] Przybylski, K.S. and Witter, L.D., 1979, Injury and recovery of *Escherichia coli*

- after sublethal acidification, Appl. Environ. Microb. 37: 261-265.
- [16] Tatsadjieu, N.L., Njintang, Y.N., Kemgang, S.T., Daoudou, B. and Mbofung, C.M.F., 2009, Characterization of lactic acid bacteria producing bacteriocins against chicken *Salmonella enterica* and *Escherichia coli*, Afr. J. Micro. Res. 3: 220-227.
- [17] Srionnual, S., Yanagida, F., Lin, L., Hsiao, K. and Chen, Y., 2007, Weissellicin 110, a newly discovered bacteriocin from *Weissella cibaria* 110, isolated from Plaa-Som, a fermented fish product from Thailand, Appl. Envi. Micro. 73: 2247-250.
- [18] Lin, W.H., Hwang, C.F., Chen, L.W. and Tsen, H.Y., 2006, Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products, Food Microbiol. 23: 74-81.
- [19] Lee, H.M. and Lee, Y., 2008, A differential medium for lactic acid-producing bacteria in a mixed culture, Let. Appl. Micro. 46: 676-681.
- [20] Abdulmumeen, H.A., Risikat, A.N. and Sururah, A.R., 2012, Food: Its preservatives, additives and applications, Inter. J. Chem. Bioch. Sci. 1: 36-47.
- [21] Noonpakdee, W., Jumriangrit, P., Wittayakom, K., Zendo, J., Nakayama, J., Sonomoto, K. and Panyim, S., 2009, Two-peptide bacteriocin from *Lactobacillus plantarum* PMU 33 strain isolated from som-fak, a Thai low salt fermented fish product, Asia Pac. J. Mol. Bio. Biotech. 17: 19-25.
- [22] Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J. and Damiani, P., 1998, Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: Identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1, Appl. Micro. Biotech. 50: 253-256.