

บทความวิจัย (Research Article)**การศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์
ในกระบวนการหมักปลาส้ม**พนิตนาฏ อู่พุดินันท์^{1*}, วราภรณ์ กุศลารักษ์²**Characterization of probiotic lactic acid bacteria as pure culture starter for Plasom
fermentation**Panitnart Auputinan^{1*}, Waraporn Kusalaruk²¹ Department of Biotechnology, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao,
Phayao Province 56000² Department of Food safety, School of Agriculture and Natural Resources, University of Phayao,
Phayao Province 56000

* Correspondence to: panitnart.au@gmail.com

Naresuan Phayao J. 2020;13(2):42-50.

Received; 31 May 2020; Revised: 31 August 2020; Accepted: 31 August 2020

บทคัดย่อ

ใช้ *Lactobacillus plantarum* NM4-2 และ PS1-3 เพื่อศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติก ทั้งสองให้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก (homofermentative) ไม่ย่อยสลายโปรตีน ไขมันและแป้ง ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคผ่านอาหาร *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Shigella flexneri* และ *Listeria monocytogenes* อย่างไรก็ตาม ทั้งสองไวต่อ penicillin G, และ amoxicillin แต่ดื้อต่อ ciprofloxacin ใช้ทั้งสองเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์เพื่อหมักปลาส้มระดับห้องปฏิบัติการ ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรดแลคติก และปริมาณแบคทีเรียแลคติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เช่นเดียวกับการยอมรับทางประสาทสัมผัสเมื่อเปรียบเทียบกับหมักแบบธรรมชาติ ดังนั้น โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกศึกษาอาจเป็นทางเลือกหนึ่งเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเสริมกระบวนการหมักปลาส้ม

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก, โปรไบโอติก, หัวเชื้อ, ปลาส้ม¹ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000² สาขาวิชาความปลอดภัยทางอาหาร คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา จังหวัดพะเยา 56000

Abstract

Lactobacillus plantarum NM4-2 and PS1-3 were used to study the probiotic properties. Both showed the homofermentative property, non-hydrolyzed of proteins, fats, and soluble starches, and non-inhibit the food borne pathogen growth, including *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhi, *Shigella flexneri* and *Listeria monocytogenes*. However, both were sensitive to penicillin G and amoxicillin, but not ciprofloxacin. Using both strains as pure culture starter for Plasom fermentation on a laboratory scale, and there were no statistical differences in pH, lactic acid, and the quantity of lactic acid bacteria, comparison to the natural fermented one ($p < 0.05$), and the taste perception as well. Therefore, the studied probiotics lactic acid bacteria might be alternatively used add-on as pure culture starter in Plasom fermentation process.

Keywords: Lactic acid bacteria, probiotic, starter culture, Plasom

คำนำ

โปรไบโอติกส์ (probiotics) หมายถึงจุลินทรีย์ (ปกติเป็นแบคทีเรีย) ที่ให้ประโยชน์ ซึ่งพบในลำไส้มนุษย์ ใช้บริโภคเป็นอาหารเสริม (dietary supplement) หรือพบในอาหาร โปรไบโอติกส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียคล้ายคลึงกับแบคทีเรียที่พบในลำไส้ตามธรรมชาติ ยกตัวอย่าง แลคโตบาซิลลัส (*Lactobacillus*) และไบฟิโดแบคทีเรีย (*bifidobacterium*) อันเกิดขึ้นตามธรรมชาติในโยเกิร์ตและอาหารหมักบางอย่าง [1] การแบ่งหมวดหมู่แบบดั้งเดิมอิงคุณสมบัติลักษณะภายนอก (phenotypic property) วิธีการหมักกลูโคส (glucose fermentation) การเติบโตต่างอุณหภูมิ สัณฐานกรดแลคติก (lactic acid configuration) และการหมักคาร์โบไฮเดรตหลากหลาย (various carbohydrate) อย่างไรก็ตาม การจำแนกกลุ่ม (taxon) โดยลักษณะภายนอกไม่สอดคล้องกับร่องรอยวิวัฒนาการสัมพันธ์ ดังนั้นบางสายพันธุ์จัดกลุ่มไม่เหมาะกับการแยกแยะโดยลักษณะภายนอก ยกตัวอย่าง บางสายพันธุ์ของ *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* กับ *Lactobacillus paracasei* และ *bifidobacteria* ดังนั้นเทคนิคโมเลกุลสมัยใหม่ประกอบด้วยปฏิกิริยาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (polymerase chain reaction – PCR) การตรวจดีเอ็นเอ (genotyping) กลายเป็นวิธีการระบุหาโปรไบโอติกสายพันธุ์แตกต่างกัน เพื่อเลือกใช้ประโยชน์อิงคุณสมบัติการทำหน้าที่และสรีรวิทยา การจัดหมวดหมู่และการระบุหาสายพันธุ์โปรไบโอติกอาจเป็นตัวอย่างชี้แหล่งกำเนิดและที่พำนักอาศัยเฉพาะชนิด (species) และสกุล (genus) รวมถึง

อาจบ่งชี้ความปลอดภัยและการใช้ประโยชน์ของสายพันธุ์ [2]

ตลาดอาหารเพื่อสุขภาพ (functional food) ร้อยละ 60 เป็นอาหารโปรไบโอติกประเภทแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกสำคัญที่สุดที่เกี่ยวข้องกับทางเดินลำไส้และกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ด้านสุขภาพยังช่วยธำรงรักษาจุลินทรีย์ประจำถิ่น (microflora) ในลำไส้ ป้องกันการติดเชื้อบรรเทาความไม่ทนทานแลคโตส (lactose intolerance) ลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ส่วนการค้นคว้าหาความจริง (research) เกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างสรีรวิทยา จุลชีววิทยา เทคโนโลยีอาหาร ชีวโมเลกุล และการทดลองคลินิก อาจนำมาซึ่งการผลิตโปรไบโอติกสายพันธุ์ใหม่ [3] การแนะนำบริโภคแบคทีเรียแลคติกมักกล่าวถึงขอบเขตประโยชน์ต่อสุขภาพประกอบด้วย กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน และเพิ่มแรงต้านทาน (resistance) ต่อมะเร็งและการติดเชื้อ การศึกษาหนึ่งในหนูรายงานการเสริมอาหารด้วย *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) หรือ *Bifidobacterium lactis* (HN019) สามารถเพิ่มพูนดัชนีภูมิคุ้มกันตามธรรมชาติและเกิดภายหลัง [4]

การทำปลาหมักเป็นการถนอมอาหารวิธีหนึ่งแพร่หลายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นการแปรรูปปลาสด ปิ้งด้วย ปลา เกลือ กระเทียม ข้าวสุก หมักจนมีรสเปรี้ยว ทั้งใช้ปลาทั้งตัว และใช้เฉพาะเนื้อปลา ก่อนรับประทานทำให้สุกด้วยปิ้งหรือทอด [5] การเกิดรสเปรี้ยวในปลาหมักเป็นกลไกการทำงานของ

แบคทีเรียแลคติก ซึ่งในระยะแรกของการหมักปลาส้ม จะพบแบคทีเรียพวก *Staphylococcus*, *Micrococcus* และ *Bacillus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลาย โปรตีนในเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียที่พบในปริมาณมาก และพบตลอดระยะเวลาในการหมัก คือ *Pediococcus cerevisiae* ซึ่งจะเติบโตอย่างรวดเร็วและสร้างกรดแลคติกขึ้น ส่วน *Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis* ในระยะแรกจะเติบโตอย่างช้า ๆ จึงมีจำนวนน้อย หลังจากหมักประมาณ 2-3 วัน *Pediococcus* ซึ่งทนกรดได้ไม่มากนักจะเติบโตได้ช้าลง และหยุดเติบโตในที่สุด ในระยะนี้ *Lactobacillus* จะเติบโตและสร้างกรดต่อไป ซึ่งเชื่อว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นรสในปลาส้ม ในปัจจุบัน มีการผลิตปลาส้มโดยใช้วิธีดั้งเดิมที่มีการสืบทอดกันมา รุ่นสู่รุ่นของแต่ละครัวเรือน โดยจะมีการใช้เชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติภายใต้การปรับสภาวะ เช่น ความเข้มข้นของเกลือ การใช้เครื่องเทศ เพื่อให้แบคทีเรียแลคติกเจริญลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นที่ไม่เกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตามการปรับสภาวะดังกล่าวไม่สามารถควบคุม จุลินทรีย์ได้ทั้งหมด อาจมีจุลินทรีย์อื่นที่ไม่เกี่ยวข้อง ปนเปื้อนอยู่ในปลาส้ม ทำให้รสชาติ กลิ่น และสีของ ผลผลิตไม่คงที่ถึงแม้จะทำจากสูตรเดียวกัน จึงไม่สามารถก้าวสู่มาตรฐานการส่งออกได้ ดังนั้นการควบคุมจุลินทรีย์เริ่มต้นในกระบวนการผลิตปลาส้มจึงเป็นสิ่งสำคัญ

การนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกมาใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารหมักจะต้องมีคุณสมบัติในการหมักผลิตภัณฑ์ได้ตามต้องการ มีความปลอดภัยไม่ก่อโรค และทนต่อสภาพแวดล้อมทั้งในกระบวนการหมักและสภาวะในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ดี [6] โดยจะมีการคัดเลือกแบคทีเรียจากอาหารหมักต้อง ชนิดต่าง ๆ นำมาทดสอบคุณสมบัติความเป็นโปรไบโอติกด้วยการทดสอบการทนต่อเกลือ น้ำดี สภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหาร (gastric juice simulation) การทนต่อค่าความเป็นกรดต่ำ การทนต่อยาปฏิชีวนะฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และความสามารถในการย่อยเมดเลียดแดง ถึงแม้ว่าจะสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารได้เป็นจำนวนมาก แต่โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกอาจมีเพียงไม่กี่ชนิด

การเติมหัวเชื้อบริสุทธิ์เข้าไปในกระบวนการผลิตอาหารหมักดองนั้นอาจทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น และลดการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่เกี่ยวข้อง ในงานวิจัยการผลิตกุ่มส้มด้วยการเติมหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกเปรียบเทียบกับการผลิตแบบไม่เติมหัวเชื้อพบว่าการผลิตแบบเติมหัวเชื้อนั้นมีการเปลี่ยนทางคุณภาพทางเคมีที่ดีกว่าการผลิตแบบไม่เติมหัวเชื้อ [7] และในการประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในแฮมไม้พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่ทำการเติมเข้าไปสามารถลดปริมาณของ *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella Typhimurium* ได้ [8]

คณะผู้วิจัยคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากแฮมและปลาส้มในจังหวัดพะเยา กำหนดชื่อ *Lactobacillus plantarum* NM4-2 และ PS1-3 ทั้งสองผ่านการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นแล้วว่า สามารถทนต่อเกลือ น้ำดี สภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหาร และไม่ย่อยสลายเมดเลียดแดง งานวิจัยนี้จะใช้ทั้งสองเป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์หมักปลาส้มระดับห้องปฏิบัติการ รวมถึงมุ่งหมายศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับคุณสมบัติโปรไบโอติก ทั้งนี้เพื่อให้ผลิตภัณฑ์ปลาส้มมีรสชาติ กลิ่น และสีที่คงที่ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการทางอาหารจากโปรไบโอติก อีกทั้งยังเป็นการเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์ให้เป็นที่ยอมรับและได้มาตรฐานการส่งออกเพื่อพัฒนาต่อยอดการผลิตในเชิงพาณิชย์

วัสดุและวิธีการ

เลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* NM4-2 และ *L. plantarum* PS1-3 ใน MRS agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE), Merck, Germany บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง จนปรากฏกลุ่มจุลินทรีย์ (colony)

ทดสอบความสามารถในการหมัก โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกทั้งสองลงใน MRS broth ที่บรรจุหลอดดักก๊าซ (Durham tube) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง วัดค่าความเป็นกรดต่าง (pH) และสังเกตฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซ ทำการบันทึกผล ถ้าเกิดฟองก๊าซเป็นการหมักแบบให้ผลผลิตสุดท้ายหลายตัว (heterofermentative) กรณีไม่เกิด

ฟองเป็นการหมักแบบให้ผลผลิตสุดท้ายส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก (homofermentative)

ทดสอบความสามารถย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง โดยเกลี่ยแบคทีเรียแลคติกลงจาน MRS agar ร่วมกับ skim milk ร้อยละ 2 tributyrin ร้อยละ 1 และ soluble starch ร้อยละ 2 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง สังเกตวงใสรอบเชื้อ

เตรียมแบคทีเรียแลคติก โดยเกลี่ยกลุ่มจุลินทรีย์ลงขวดบรรจุ MRS broth 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง บั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นดูดส่วนใสเหนือตะกอน (supernatant) ใส่หลอด หมุนด้วยความเร็วอีกครั้งหนึ่ง กรองอนุภาคปนเปื้อนส่วนเหนือตะกอนผ่านตัวกรองกระบอกดูด (syringe filter) ขนาด 0.22 ไมครอน

เตรียมตัวอย่างกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรคผ่านอาหารได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ประกอบด้วย *Escherichia coli* DMST4212, *Salmonella* Typhi DMST22842, *Shigella flexneri* DMST4423 และ *Listeria monocytogenes* DMST17303 เพาะเลี้ยงใน Muller Hinton Broth (MHB) นาน 24 ชั่วโมง จนความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mcfarland standard เบอร์ 0.5

ทดสอบการยับยั้งกลุ่มจุลินทรีย์ก่อโรค โดยใช้ไม้พินสำลีจุ่มซับจุลินทรีย์ใน MHB ที่ปรับความขุ่นแล้ว เกลี่ยบน Muller Hinton agar (MHA), Merck, Germany เาะหลุมบน MHA เพื่อบรรจุส่วนเหนือตะกอนของแบคทีเรียแลคติกทั้งสองด้วยหลอดวัดและถ่ายเทของเหลว (pipette) หยอดใส่หลุมบรรจุ MHA หลุมละ 30 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นสังเกตพื้นที่ใส

ทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกทั้งสองใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง ปรับความขุ่นด้วยสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 ให้มีความขุ่นเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mcfarland standard เบอร์ 0.5 ใช้ไม้พินสำลีเกลี่ยแบคทีเรียแลคติกที่ปรับความขุ่น

แล้วบน MRS Agar วางแผ่นยาปฏิชีวนะ (antibiotic disc), Oxoid, UK ประกอบด้วย penicillin G (10 ยูนิต), ciprofloxacin (5 ไมโครกรัม), amoxicillin (30 ไมโครกรัม) และ ceftriaxone (30 ไมโครกรัม) วางบนผิวหน้าอาหารเพาะเลี้ยง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง วัดพื้นที่ยับยั้งยาปฏิชีวนะแต่ละตัวแบ่งเป็น 3 ระดับ ไว (susceptible – S) ปานกลาง (intermediate – I) และต้านทาน (resistant – R) อิงแผนผังมาตรฐาน อื่นๆยาปฏิชีวนะแต่ละตัวมีแผนผังมาตรฐานแตกต่างกัน [9]

วิเคราะห์ลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการ (phylogenetic tree analysis) โดยนำลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน 16S rRNA gene ได้จากการบ่งบอกสายพันธุ์ของ *L. plantarum* NM4-2 และ PS1-3 เข้าในฐานข้อมูลของ GenBank และวิเคราะห์ลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของแบคทีเรียแลคติกกับจุลินทรีย์ใกล้เคียง โดยใช้โปรแกรม MEGA X อาศัยวิธีเชื่อมโยงความใกล้เคียง (neighbor joining method) [10-12]

ใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเป็นหัวเชื้อตั้งต้นหมักปลาสดระดับห้องปฏิบัติการ ประกอบด้วยชุดควบคุม ปลาสดสูตรดั้งเดิม (วิสาหกิจชุมชน จังหวัดพะเยา) ปราศจากหัวเชื้อ ส่วนชุดการทดลองเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก ใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง จากนั้นปรับความขุ่นด้วยสารละลาย NaCl ร้อยละ 0.85 จนความขุ่นเทียบเท่ากับสารละลายมาตรฐาน Mcfarland standard เบอร์ 0.5 แบ่งชุดการทดลองเป็น 3 ชุด แจกแจงตามชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก และความเข้มข้นหัวเชื้อเริ่มต้นผสมปลาสดผสมเสร็จตามสูตรดั้งเดิม

- ชุด 1 *L. plantarum* NM 4-2 ร้อยละ 1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)
- ชุด 2 *L. plantarum* PS1-3 ร้อยละ 1 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)
- ชุด 3 *L. plantarum* NM4-2 และ PS1-3 ร้อยละ 0.5 และ 0.5 (น้ำหนัก/น้ำหนัก)

ทดลองชุดละ 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน นำมาวัดค่าความเป็นกรดต่างปริมาณกรด [13] นับจำนวนที่มีชีวิตอยู่ทั้งหมด (total viable cell count) ของแบคทีเรียแลคติกบน MRS วันที่ 0, 3, 5 และ 7

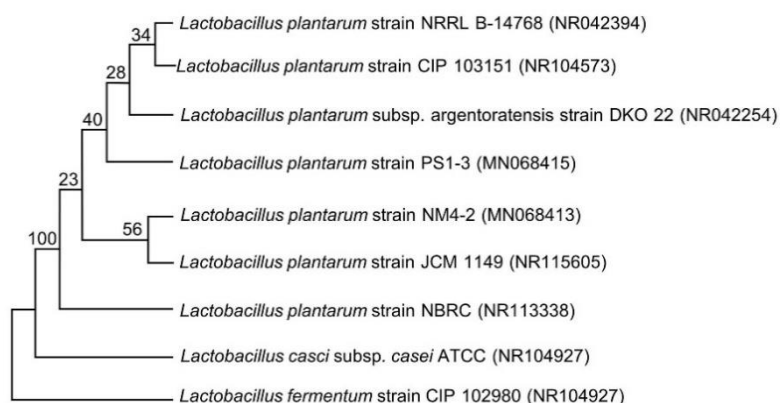
อาสาสมัคร 20 คนให้คะแนนการยอมรับทางประสาทสัมผัสปลาส้มหมักนาน 5 วันทอดน้ำมัน แต่ละชุดการทดลอง ประกอบด้วย สี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบภาพรวม ระบุระดับคะแนนความชอบ แก้วจุด (9-point hedonic scale) [14] จากน้อยไปหามากตั้งแต่ 1 ถึง 9

ใช้โปรแกรม SPSS รุ่น 25 วิเคราะห์หาค่าเฉลี่ย และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard deviation - SD) ที่ระดับความเชื่อมั่นทางสถิติร้อยละ 95 ($p < 0.05$)

ผลการศึกษา

L. plantarum NM4-2 มีค่า pH อยู่ที่ 4.76 ไม่สร้างก๊าซ และ *L. plantarum* PS1-3 มีค่า pH อยู่ที่ 3.25 ไม่สร้างก๊าซเช่นเดียวกัน แบคทีเรียแลคติกทั้งสองมีการหมักแบบได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก (homofermentative)

แบคทีเรียแลคติกทั้งสองไวต่อ ceftriaxone, penicillin G และ amoxicillin แต่ดื้อต่อ ciprofloxacin และทั้งสองไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคผ่านอาหาร เช่นเดียวกับไม่ย่อยสลาย โปรตีน ไขมัน และแป้ง ผลการนำเข้าสู่ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีนส่วน 16S rRNA gene ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสอง รูป 1



รูป 1 ความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการระหว่าง *Lactobacillus* spp. และแบคทีเรียศึกษา (PS1-3, NM4-2) ส่วนตัวเลขกำกับเป็นร้อยละของจำนวนร่วมกิ่งวิวัฒนาการ (bootstrap values)

กระบวนการหมักปลาส้มทั้งชุดควบคุม ชุดทดลองความเป็นกรดต่างลดลงตามลำดับจนถึงวันที่ 5 และเพิ่มขึ้นเล็กน้อยในวันที่ 7 ในทำนองกลับกันกับปริมาณกรดเพิ่มขึ้นตามลำดับจนถึงวันที่ 5 และลดลงในวันที่ 7 ขณะที่ชุดควบคุมแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นจนถึง

วันที่ 3 และลดลง ชุดทดลองแบคทีเรียเพิ่มขึ้น (นานกว่าชุดควบคุม) จนถึงวันที่ 5 และลดลง (ตาราง 1)

คะแนนเฉลี่ย (SD) การยอมรับทางประสาทสัมผัสปลาส้มทอดน้ำมันไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างชุดควบคุม และชุดการทดลอง คะแนนเฉลี่ย 8.6 (1.2)

ตาราง 1 ความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรด และปริมาณแบคทีเรียแลคติกซูดควมและทดลอง ตามระยะเวลา

	หมักวันที่ 0/ 3/ 5/ 7					
	ความเป็นกรดต่าง (SD)		ปริมาณกรด ร้อยละ (SD)		แบคทีเรียแลคติก (log cfu/g) (SD)	
ซูดควม	5.92 (0.02)cd/ 4.64 (0.02)c/		0.82 (0.02)a/ 1.80 (0.02)a/		5.75 (0.02)a/ 7.23 (0.01)a/	
	4.61 (0.01)d/ 4.68 (0.02)d		1.95 (0.02)a/ 1.76 (0.01)a		6.90 (0.02)a/ 6.27 (0.02)a	
ซูดทดลอง 1	5.91 (0.01)bc/ 3.94 (0.02)b/		0.90 (0.01)b/ 1.87 (0.02)b/		5.87 (0.02)b/ 7.23 (0.03)a/	
	3.80 (0.02)c/ 3.82 (0.02)c		2.24 (0.02)c/ 2.02 (0.02)c		7.23 (0.15)b/ 7.10 (0.02)d	
ซูดทดลอง 2	5.95 (0.01)ab/ 3.96 (0.01)b/		0.95 (0.01)b/ 1.94 (0.01)c/		5.87 (0.01)b/ 7.33 (0.03)b/	
	3.62 (0.02)b/ 3.69 (0.01)b		2.00 (0.02)b/ 1.91 (0.01)b		7.39 (0.01)c/ 6.32 (0.01)b	
ซูดทดลอง 3	5.89 (0.02)ab/ 3.72 (0.02)a/		0.92 (0.02)b/ 2.17 (0.01)d/		5.99 (0.01)b/ 7.38 (0.01)c/	
	3.58 (0.02)a/ 3.60 (0.01)a		2.30 (0.02)d/ 1.92 (0.02)b		7.44 (0.02)d/ 6.86 (0.03)c	

* a, b, c, d: แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$)

วิจารณ์

L. plantarum NM4-2 และ PS1-3 ให้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 85 (homofermentative) เป็นคุณลักษณะที่เหมาะสมในการใช้โปรไบโอติกในร่างกาย เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลคติกเป็นหลักทำให้ค่าความเป็นกรดต่างในระบบทางเดินอาหารต่ำลงจนจุลินทรีย์ก่อโรคผ่านอาหารไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้เมื่อใช้กลุ่ม homofermentative เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักอาหารประเภทต่าง ๆ ปริมาณกรดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นจะทำให้กระบวนการหมักเสร็จสิ้นเร็วกว่าเดิม ถึงแม้ว่า *L. plantarum* NM4-2 และ PS1-3 จะไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคที่นำมาทดสอบและไม่สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์โมเลกุลใหญ่ได้ อย่างไรก็ตาม Munoz [15] ได้รายงานว่าการหมักของโปรไบโอติกในร่างกายมีการทำงานแบบซับซ้อน ถึงแม้ว่าแบคทีเรียแลคติกชนิดหนึ่งอาจไม่ได้มีคุณสมบัติของโปรไบโอติกอย่างครบถ้วน แต่อาจจะมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นทำงานร่วมกับแบคทีเรียแลคติก การทำงานร่วมกันนี้ส่งผลให้เกิดคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกเพื่อที่จะเป็นประโยชน์กับร่างกาย ซึ่งจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป ในส่วนของการวิเคราะห์ลำดับความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการกับเชื้อใกล้เคียง ผลจากแผนภูมิต้นไม้ (phylogenetic tree) พบว่า *L. plantarum* NM4-2 และ PS1-3 มีความใกล้ชิดกับ *L. plantarum* สายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งเป็นการยืนยันว่าการบ่งบอกสายพันธุ์ของ *L.*

plantarum NM4-2 และ PS1-3 จากการศึกษที่ผ่านมา มีความถูกต้อง

L. plantarum NM4-2 และ PS1-3 มีความไวต่อยาปฏิชีวนะ Ceftriaxone, Penicillin G และ Amoxicillin แต่ต่อยา Ciprofloxacin เนื่องจาก *Lactobacillus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ที่สามารถถูกยับยั้งการเจริญได้ง่ายโดยกลุ่มยาปฏิชีวนะ Beta-lactam โดยออกฤทธิ์ขัดขวางการสร้างผนังเซลล์ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญของเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก แต่ *Lactobacillus* spp. ไม่มีความไวต่อยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Quinolones [16] โปรไบโอติกในร่างกายควรเป็นเชื้อที่มีชีวิตรอดเมื่อสัมผัสกับยาปฏิชีวนะ มีรายงานว่าถ้ารับประทานยาปฏิชีวนะเป็นระยะเวลานาน (6-8 สัปดาห์) โปรไบโอติกที่อาศัยในลำไส้ใหญ่จะถูกรบกวนโดยยาปฏิชีวนะ ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของทั้งชนิดและปริมาณของโปรไบโอติกในลำไส้ และทำให้เกิดท้องเสียตามมาได้ [17] อย่างไรก็ตาม ในการรักษาโรคติดเชื้อปกติที่จำเป็นต้องรับประทานยาปฏิชีวนะเข้าไปในร่างกาย แพทย์จะทำการจ่ายยาเพื่อรักษาโรคเป็นระยะเวลานาน ๆ ไม่เกิน 7 วัน ดังนั้นถึงแม้ *L. plantarum* NM4-2 และ PS1-3 จะมีความไวต่อยาปฏิชีวนะบางชนิด ซึ่งเมื่อใช้ยาปฏิชีวนะในร่างกายอาจทำให้ปริมาณของเชื้อทั้งสองในลำไส้ลดน้อยลงชั่วขณะหนึ่ง หลังจากนั้นเชื้อจะฟื้นฟูลงกลับมาจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนเป็นปกติเมื่อหยุดการรับประทานยาปฏิชีวนะแล้ว แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ไวต่อยาปฏิชีวนะ โดยเฉพาะอาหารหมักพิสซุนทรานแล้วเรื่องความ

ปลอดภัย [18] ยกเว้นผลิตภัณฑ์อาหารใหม่ที่มีแลคโตแบซิลไลสายพันธุ์แหล่งดั้งเดิม ส่วนการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อป้องกันสัตว์เลี้ยงติดเชื้ และส่งเสริมการเจริญเติบโต กลับเป็นสิ่งที่น่าตระหนกถึงการแพร่กระจายของการดื้อยาปฏิชีวนะ จนกระทั่งหลายประเทศห้ามนำเข้า อย่างไรก็ตาม แลคโตแบซิลไลคือยาปฏิชีวนะยังเป็นประเด็นด้านการประเมินความปลอดภัย [19]

เมื่อนำไปโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกมาใช้เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักปลาสมระดับห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่า เมื่อใช้ระยะเวลาการหมักเท่ากัน ค่าความเป็นกรดต่างและปริมาณกรดของปลาสมที่หมักแบบใส่หัวเชื้อตั้งต้นมีความเป็นกรดต่างต่ำกว่าและมีปริมาณกรดสูงกว่าปลาสมที่หมักแบบธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sanpa และคณะ [20] มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของปลาสมกำหนดไว้ว่า ค่าความเป็นกรดต่างของปลาสมต้องมีค่าไม่เกิน 4.6 ซึ่งชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์มีค่าต่ำกว่า 4.6 ในขณะที่ปลาสมแบบธรรมชาติมีค่าความเป็นกรดต่างต่ำสุดอยู่ที่ 4.61 และพบปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงสุดในปลาสมที่มีการใส่เชื้อผสมลงไป ค่าความเป็นกรดต่าง ปริมาณกรด และปริมาณของแบคทีเรียแลคติกมีค่าลดลงในวันที่ 7 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า กระบวนการหมักปลาสมควรมีระยะเวลาการหมักไม่เกิน 5 วัน

ปลาสมที่เติมเชื้อเดี่ยวและเชื้อผสมเป็นหัวเชื้อตั้งต้น ไม่มีความแตกต่างทางประสาทสัมผัสกับปลาสมแบบที่หมักธรรมชาติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยของ Sanpa และคณะ [20] และ Hwanhlem และคณะ [21] Holzafel [22] ได้ตั้งข้อสันนิษฐานว่า การหมักแบบธรรมชาติจะมีจุลินทรีย์ที่หลากหลายกว่าแบบเติมกล้าเชื้อทั้งชนิดและปริมาณ ซึ่งความหลากหลายของจุลินทรีย์เหล่านั้นทำให้เกิดการพัฒนากลิ่นรสที่จำเพาะเจาะจงเป็นเอกลักษณ์ของ

อาหารหมัก การหมักต้องเป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพทางเคมีของสารชนิดหนึ่งให้อยู่ในรูปของสารอีกชนิดหนึ่งโดยมีจุลินทรีย์เป็นตัวการทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว การผลิตอาหารหมักโดยทั่วไปจะมีการใช้เชื้อจากธรรมชาติและทำการควบคุมสภาวะต่าง ๆ เช่น เติมเกลือ เพื่อควบคุมจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ แต่ในบางครั้งอาจได้ผลิตภัณฑ์ที่มีรสชาติผิดไปจากเดิมเนื่องมาจากการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ไม่เกี่ยวข้องกับการหมัก ดังนั้นการใช้เชื้อบริสุทธิ์เป็นหัวเชื้อตั้งต้นจึงทำให้เกิดผลิตภัณฑ์ที่มีความจำเพาะมากขึ้น เป็นการปรับปรุงคุณภาพของอาหาร และน่าจะเป็นวิธีการพัฒนากระบวนการผลิตปลาสมในระดับชุมชนให้ได้เป็นมาตรฐานต่อไป

รสชาติ รูปแบบ และเนื้อสารขึ้นกับนานาเทคนิคการหมัก และสิ่งแวดล้อมของจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับอายุระธรรม ประเพณี วัฒนธรรม ความสัมพันธ์ทางสังคม และบางกรณีเป็นเรื่องความเชื่อ หรือศาสนา ล้วนเป็นที่มาของอาหารหมักหลายชนิดในนานาประเทศ [23,24] การเสริมโปรไบโอติกเป็นข้อแนะนำสำหรับการบำบัดหรือป้องกันโรคในปัจจุบัน โดยรวม การศึกษาเชิงลึกเกี่ยวกับโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกยังมีประเด็นที่เกี่ยวข้องมากมาย ตั้งแต่ชนิดพันธุ์ คุณสมบัติ และความปลอดภัย ที่ต้องมีการศึกษาต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้นิพนธ์ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยพะเยา ผู้ให้การสนับสนุนทางการเงิน ผ่านทุนอุดหนุนโครงการวิจัย งบประมาณประจำปี 2560 และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการสาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะเกษตรศาสตร์และทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยพะเยา ผู้ให้ความอนุเคราะห์พื้นที่และเครื่องมือในการศึกษา

เอกสารอ้างอิง

1. Stoppler MC. Medical definition of probiotics. MedicineNet. Available from: <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=97587>
2. Holzapfel WH, Haberer P, Geisen R, Björkroth J, Schillinger U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* 2001;73(2 Suppl):365S-3S.
3. Agrawal R. Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnol.* 2005;19(3): 227- 46. doi: 10.1080/08905400316474
4. Gill HS, Rutherford KJ, Prasad J, Gopal PK. Enhancement of natural and acquired immunity by *Lactobacillus rhamnosus* (HN001), *Lactobacillus acidophilus* (HN017) and *Bifidobacterium lactis* (HN019). *Br J Nutr.* 2000;83(2):167-76.
5. Thai Food Heritage. Fermented fish. Available from: http://www.thaifoodheritage.com/recipe_list/detail/%E0%B8%9B%E0%B8%A5%E0%B8%B2%E0%B8%AA%E0%B9%89%E0%B8%A1
6. Ogunremi OR, Banwo K, Sanni AI. Starter-culture to improve the quality of cereal-based fermented foods: Trends in selection and application. *Curr Opin Food Sci.* 2017;13:38-43.
7. Thongsom M. Study of Chemical and Microbiological Composition of Kung- Som from Pak Phanang, Nakhon Si Thammarat Using *Lactobacillus pentosus* L35 as a Fermentation Starter. *Wichcha J.* 2020;39(1): 114-25.
8. Phoem A, Pengloh S. Application of Probiotic bacteria (*Lactobacillus plantarum*) in chicken Nham. *Phranakhon RajabhatRes J (Science Technol.)* 2018;13(2):168-79.
9. Hudzicki J. Kirby- Bauer. Disk diffusion susceptibility test protocol. *Am Soc for Microbiol.* 2009.
10. Saitou N, Nei M. The neighbor- joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol.* 1987;4:406-25.
11. Tamura K, Nei M, Kumar S. Prospects for inferring very large phylogenies by using the neighbor- joining method. *PNAS.* 2004; 101(30): 11030- 5. doi: 10.1073/pnas.0404206101.
12. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol.* 2018;35:1547-1549.
13. Holzapfel WH. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int J Food Microbiol.* 2002;75(3):197-212.
14. Food and Agriculture Organization. Fermented Fruits and vegetables. A global perspective. Available from: <http://www.fao.org>.
15. Muñoz R, Moreno-Arribas MV, de las Rivas B. Chapter 8-Lactic Acid Bacteria. *Mol Wine Microbiol.* 2011;191-226.
16. Adewoyin AG, Majolagbe ON, Ogunmoyewa T, Abejide, MA. Antibiotic resistance profile of microbial isolates of toilet-bowl of some student's hostels in Ogbomoso, Nigeria. *Europ J Appl Sci.* 2013;5(3):76-79.
17. Bartlett JG. Clinical practice. Antibiotic-associated diarrhea. *N Engl J Med* 2002;346:334.

18. Georgieva R, Yocheva L, Tserovska L, Zhelezova G, Stefanova N, Atanasova A, et al. Antimicrobial activity and antibiotic susceptibility of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* spp. Intended for use as starter and probiotic cultures. *Biotechnol Equip.* 2015;29(1):84-91.
19. Franz CMAP, Hummel A, Holzapfel WH. Problems related to the safety assessment of lactic acid bacteria starter culture and probiotic. 2005; *Mitt Labensmittelunters Hyg.* 2005;96:39-65.
20. Sanpa S, Sanpa S, Suttajit M. Lactic acid bacteria isolates from Pla-som, their antimicrobial activities and fermentation properties in Pla-som. *JFHB.* 2019;12(1): 36-43.
21. Hwanhlem N, Buradaleng S, Wattanachant S, Benjakul S, Tani A, Maneerat S. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains. *Food Control.* 2011;22:401-407.
22. Holzapfel WH. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int J Food Microbiol.* 2002;75(3):197-212.
23. Food and Agriculture Organization. Fermented Fruits and vegetables. A global perspective. Available from: <http://www.fao.org>
24. Saloff-Coste CJ. *Latobacillus casei*. Danone World Newsletter no. 7: 2-8 http://www.danoneviapole.com/nutri-views/newsletteer/eng/new_7