

การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก

Screening of Lactic Acid Bacteria from Thai's Chilli Pastes

วัฒน์ เกตุสวัสดิวงศ์ และธีระชัย ธนาพันธ์

ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ศูนย์รังสิต ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 12120

นฤมล ธนาพันธ์*

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ ในพระบรมราชูปถัมภ์

ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง จังหวัดปทุมธานี 13180

Nawat Ketsawasdiwong and Theerachai Thanananta

Department of Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Thammasat University,

Rangsit Centre, Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 12120

Narumol Thanananta*

Faculty of Science and Technology, Valaya Alongkorn Rajabhat University under Royal Patronage,

Khlong Nueng, Khlong Luang, Pathum Thani 13180

บทคัดย่อ

น้ำพริกเป็นอาหารของคนไทยที่ประกอบไปด้วยวัตถุดิบ เครื่องปรุง และสมุนไพรต่าง ๆ หลายชนิดที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย รวมทั้งมีจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถพบได้ในอาหารที่เกิดจากการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจนทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติกที่สามารถช่วยยืดอายุในการเก็บรักษาอาหารและสามารถป้องกันการเจริญเติบโตของแบคทีเรียก่อโรคได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริกโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร de Man Regosa Sharpe agar (MRS) ที่มี 1 เปอร์เซ็นต์ แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) จากน้ำพริกปลาร้าและน้ำพริกหนุ่ม ซึ่งพบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 11 และ 5 ไอโซเลต ตามลำดับ เมื่อตรวจสอบลักษณะพื้นฐานและทดสอบทางชีวเคมีแล้วพบว่ามี ความมั่นใจว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถแบ่งเป็นสกุลต่าง ๆ ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Weissella* spp. เป็นต้น โดยจะนำไปตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA เพื่อยืนยันชนิดและระบุสายพันธุ์ต่อไป

คำสำคัญ : การคัดกรองแบคทีเรีย; แบคทีเรียกรดแลคติก; น้ำพริก

Abstract

Chilli pastes are the nutritious food of Thailand which included many raw materials, which are composed spices and herbs. They have benefit of microorganism such as lactic acid bacteria that

found in no oxygen food fermentation. Therefore, these products have lactic acid which preserve the shelf life of food and inhibit the pathogen and microbial spoilage. This study, we focused on screening and identified lactic acid bacteria from chilli pastes that grown in de Man-Regosa Sharpe agar (MRS) added with 1 % CaCO_3 . The result showed that 11 and 5 isolates of bacteria were found clear zone on agar in fermented fish chilli paste and Northern Thai green chilli paste, respectively. These isolates were screened and identified using Gram's strain and sugar fermentation for investigating bacterial morphology and biochemistry, so we found *Lactobacillus* sp. and *Weissella* sp. On further, we can certainly using 16S rDNA nucleotide sequence for investigating bacterial strains.

Keywords: screening of bacteria; lactic acid bacteria; chilli paste

1. คำนำ

น้ำพริกเป็นอาหารและเป็นภูมิปัญญาของคนไทยมาตั้งแต่โบราณ โดยมีอยู่หลากหลายรูปแบบทั้งในรูปแบบสดและแห้ง ด้วยรสชาติที่จัดจ้านทำให้น้ำพริกเป็นที่ชื่นชอบของคนไทยมาเป็นเวลานาน โดยนิยมบริโภคพร้อมกับผักสดหรือผักลวก น้ำพริกประกอบด้วยเครื่องปรุงต่าง ๆ มากมายรวมถึงสมุนไพรที่อุดมไปด้วยประโยชน์ต่อร่างกายจึงเป็นอาหารที่ชื่นชอบสำหรับคนที่รักษาสุขภาพได้เป็นอย่างดี (นิรมล, 2550)

เนื่องจากการนิยมบริโภคน้ำพริกเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ส่งผลให้มีการผลิตน้ำพริกออกมาเป็นจำนวนมาก ปัญหาที่เกิดขึ้นตามมาหลังจากที่มีการปรุงเสร็จและเก็บรักษาเพียงไม่กี่วัน คือ จุลินทรีย์สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะจุลินทรีย์ก่อโรค ซึ่งทำให้อาหารเน่าเสียและมีผลต่อสุขภาพ โดยอาจมีสาเหตุจากวัตถุดิบที่ใช้ในการทำน้ำพริกยังไม่สะอาด หรือภาชนะที่ใช้ในการบรรจุ น้ำพริกผ่านการฆ่าเชื้อไม่ได้มาตรฐาน จึงส่งผลต่อคุณภาพของผลิตภัณฑ์ ได้แก่ กลิ่น สี รสชาติของน้ำพริกเปลี่ยนไป ทำให้อายุในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ (shelf life) ลดลง เว้นแต่อาหารที่มีการใส่วัตถุกันเสียซึ่งจะช่วยชะลอและยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ได้ แต่มีผลข้างเคียง

ตามมาเมื่อมีการสะสมภายในร่างกายมาก โดยส่งผลต่อการทำงานของตับและไตในการกำจัดและขับวัตถุกันเสียออกจากร่างกาย

น้ำพริกสดถือว่าเป็นอาหารอย่างหนึ่งที่สามารถพบจุลินทรีย์ที่เป็นโทษได้ ถ้าอาหารไม่สะอาดเพียงพอ แต่บางครั้งอาจพบมีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งบางชนิดสามารถทนความร้อนได้ดีและส่งเสริมต่อการลดจำนวนของจุลินทรีย์อื่น ๆ ที่เป็นโทษ หรือที่เรียกว่า จุลินทรีย์โปรไบโอติก (probiotic) ซึ่งสามารถสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก ซึ่งสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย จึงมีผลในการช่วยยืดอายุในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ และมีความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค

2. อุปกรณ์และวิธีการ

2.1 การเก็บตัวอย่างน้ำพริกและการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

เก็บตัวอย่างน้ำพริกที่วางขายตามตลาดสดและห้างสรรพสินค้ามาวิเคราะห์ ตัวอย่างจำนวน 5 ตัวอย่าง คือ น้ำพริกปลาร้า 3 ตัวอย่าง (ยี่ห้อ A, B และ C) และ น้ำพริกหนุ่ม 2 ตัวอย่าง (ยี่ห้อ D, และ E) โดยชั่งตัวอย่างน้ำพริกใส่ลงในถุงซิปล็อก

อเนกประสงค์ที่ผสมกับสารละลาย phosphate buffer solution (PBS) pH 7.0 จนเป็นเนื้อเดียวกันโดยเจือจางที่ 10^{-1} แล้วดูเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวมาเจือจางต่อที่ระดับการเจือจางเป็น 10^{-2} ถึง 10^{-4} ในแต่ละตัวอย่าง (Draft International Standard, 2014) หลังจากนั้นดูตัวอย่างแต่ละระดับการเจือจางลงในอาหาร de Man Regosa Sharpe (MRS) agar ที่ผสมกับ 1 เปอร์เซ็นต์แคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) เกลี่ยเชื้อให้ทั่วด้วยแท่งแก้ว นำไปบ่มแบบไม่ใช้ออกซิเจนใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีที่เกิดเป็นวงใส (clear zone) บนจานเพาะเชื้อมาตรวจสอบลักษณะพื้นฐานและทดสอบทางชีวเคมีต่อไป (สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548)

2.2 การตรวจสอบลักษณะพื้นฐานและการทดสอบทางชีวเคมี

2.2.1 การย้อมสีแกรม นำโคโลนีของแบคทีเรียแต่ละลงบนแผ่นสไลด์ แล้วย้อมสีด้วยชุดย้อมแกรม แล้วล้างออกด้วยน้ำ ทั้งไว้ให้แห้งสุดท้ายตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100X โดยนำ immersion oil มาหยดบนแผ่นสไลด์ก่อนส่องดู (นงลักษณ์ และปรีชา, 2550)

2.2.2 การทดสอบทางชีวเคมีโดยการหมักน้ำตาล นำห้วงถ่ายเชื้อ (loop) และโคโลนีของแบคทีเรียใส่ลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร phenol red carbohydrate broth โดยใช้น้ำตาลที่ผสมลงในอาหารแตกต่างกันจำนวน 10 ชนิด ได้แก่ sorbitol, cellobiose, thehalose, lactose, maltose, mannitol, xylose, rhamnose, raffinose และ arabinose จากนั้นนำไปบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง วิเคราะห์ผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีและฟองอากาศที่เกิดขึ้น (Nielsen *et al.*, 2007)

2.2.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส นำห้วงถ่ายเชื้อและโคโลนีของแบคทีเรียมาวางบนสไลด์ที่สะอาด จากนั้นหยด 3 เปอร์เซ็นต์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แล้วสังเกตการสร้างฟองอากาศที่เกิดขึ้น (Gelman *et al.*, 2001)

2.2.4 การทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย นำเข็มเย็บเชื้อ (needle) และโคโลนีของแบคทีเรียมาจิ้มลงบนอาหาร motility medium ที่อยู่ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สังเกตว่าแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตทั่วทั้งหลอดได้หรือไม่ (Horn *et al.*, 2002)

2.2.5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์อาร์จินีนไดไฮโดรเลสในอาหารที่มีการเติมอาร์จินีน นำเข็มเย็บเชื้อและโคโลนีของแบคทีเรียมาจิ้มลงบนอาหาร arginine dihydrolase broth ที่อยู่ในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารที่เกิดขึ้น ถ้าอาหารเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองในวันที่ 1 และเปลี่ยนสีกลับมาเป็นสีม่วงเหมือนเดิมในวันที่ 2 แสดงว่ามีผลเป็นบวก แต่กรณีแบคทีเรียกรดแลคติกจะต้องมีผลเป็นลบ (Williams *et al.*, 1971)

3. ผลการวิจัยและวิจารณ์

ผลการวิจัยพบว่าสามารถคัดกรองแบคทีเรียจากน้ำพริกปลาร้าทั้งหมด 11 ไอโซเลต คือ ยีห้อ A ได้แก่ PR01 ยีห้อ B ได้แก่ PR02, PR03, PR04, PR05, PR06, PR07 และ PR08 ยีห้อ C ได้แก่ PR09, PR10 และ PR11 ส่วนน้ำพริกหนุ่มมีทั้งหมด 5 ไอโซเลต คือ ยีห้อ D ได้แก่ NU01 และ NU02 ยีห้อ E ได้แก่ NU03, NU04 และ NU05 รวมทั้ง 16 ไอโซเลต โดยทั้ง 16 ไอโซเลต น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกเนื่องจากการสร้างวงใส (clear zone) เมื่อเจริญในอาหาร MRS agar

ส่วนกรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นนั้นเมื่อทำปฏิกิริยากับ CaCO_3 ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เป็นอนุพันธ์เชิงซ้อนของ $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$ น้ำและคาร์บอนไดออกไซด์เกิดขึ้น (Moorehead and Shumway, 2008) ซึ่งสารเชิงซ้อน $\text{Ca}(\text{C}_3\text{H}_5\text{O}_3)_2$ ทำให้เกิดวงไลบิโนอาหารแข็ง ดังรูปที่ 1 ลักษณะวงไลบิโนที่เกิดขึ้นสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้สำหรับการคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบด้วยวิธีอื่น ๆ และใช้พิสูจน์ว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกจริงหรือไม่ต่อไปได้ นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกทุกตัวสามารถสร้างกรดได้แล้ว บางสายพันธุ์ยังสามารถสร้างแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ได้ซึ่งเป็นโปรตีนหรือเพปไทด์ที่ถูกสร้างขึ้นจากไรโบโซมที่ช่วยส่งเสริมการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ก่อโรคและอาหารเน่าเสียและมีฤทธิ์ยับยั้งคล้ายกับยาปฏิชีวนะ (อรอนงค์, 2550) โดยการไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย (Jack et al., 1995) สายพันธุ์ที่สามารถสังเคราะห์ได้ เช่น *Lactococcus lactis* พบได้ในนมที่ไม่มีไขมัน (Choi et al., 2000) *Pediococcus pentosaceus* และ *Pediococcus acidilactici* (Papagianni and Anastasiadou, 2009) พบได้ในผักและเนื้อสัตว์ที่ผ่านกระบวนการหมัก โดยส่วนใหญ่แล้วจะสังเคราะห์ออกมาพร้อมกับกรดแลคติกและแบคทีเรียที่สามารถถูกยับยั้งได้ เช่น *Listeria monocytogenes* (Pucci, 1988) *Clostridium botulinum* (Okereke and Montville, 1991) *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* (Noonpakdee et al., 2009) โดยการเข้าไปยับยั้งการสร้างผนังเซลล์และทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปากมดลูก (cervical cancer) และลำไส้ใหญ่ (colon cancer) ได้ด้วย (Shukla and Goyal, 2013)

เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานด้วยวิธีย้อมแกรมจะใช้วิธีการทดสอบตามมาตรฐานของ

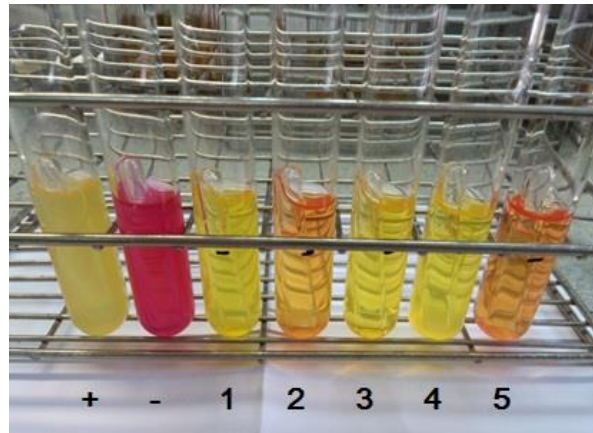
Bergey's manual (Breed et al., 1957) พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตย้อมติดสีม่วงของ crystal violet ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียแกรมบวก และมีลักษณะเป็นรูปท่อน (rod) ที่แตกต่างกันไป ดังรูปที่ 2 ผลไอโซเลตดังกล่าวสามารถคาดเดาได้ว่าทุกไอโซเลตมีสกุล *Lactobacillus* sp. เช่น PR11 และ *Weissella* sp. เช่น PR04 และ NU04 ดังรูปที่ 2 เนื่องจาก 2 สกุลนี้หลายสายพันธุ์มีลักษณะเป็นรูปท่อน โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิดที่เกิดจากการหมัก เช่น ปลาร้า พบ *Lactobacillus acidipiscis* (Tanasupawat et al., 2000) ปลาส้มพบ *Lactobacillus plantarum* (Hwanhlem et al., 2011) และคิมจิพบ *Weissella confusa* (Cho et al., 2009) หรืออาหารสดที่เก็บไว้เป็นเวลานาน เช่น Chili bo (Leisner et al., 1999) ซึ่งเป็นเครื่องปรุงรสของประเทศมาเลเซียที่มีพริกเป็นส่วนประกอบ ซึ่งผ่านการเก็บด้วยการแช่เย็นเป็นเวลา 25 วัน แล้วคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้อาหาร MRS agar และวิเคราะห์สายพันธุ์ของแบคทีเรียด้วยยีน 16S rRNA ได้ทั้งหมด 3 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus animalis*, *Weissella paramesenteroides* และ *Weissella viridescens* นอกจากนี้บางงานวิจัยยังพบแบคทีเรียรูปทรงกลม (coccus) ในอาหารอื่น ๆ ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* ที่พบในน้ำนม (Tserovska et al., 2002) คิมจิ (Jang et al., 2014) และไส้กรอก (Nie et al., 2014) เป็นต้น ซึ่งสามารถสังเกตได้จากการย้อมแกรมและส่องกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีกำลังขยาย 100X เช่นกัน (Cal et al., 1999) ส่วนการทดสอบทางชีวเคมีโดยการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ 10 ชนิด พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดได้จึงทำให้อาหาร phenol red carbohydrate broth มี pH ลดลง และเปลี่ยนสีของอาหารจากสีแดงเป็นสีเหลือง โดยไอโซเลตที่มีการสร้างกรดมากจะทำให้มีสีเหลืองเข้มมากขึ้น ดังรูปที่ 3 และทุกไอโซเลตไม่มี

การสร้างก๊าซเกิดขึ้น แต่มีบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างก๊าซได้ เช่น *Lactobacillus brevis* ที่พบในผลิตภัณฑ์จากนํ้านม (Nikita and Hemangi, 2012) โดยผลการหมักนํ้าตาลชนิดต่าง ๆ แสดงดังตารางที่

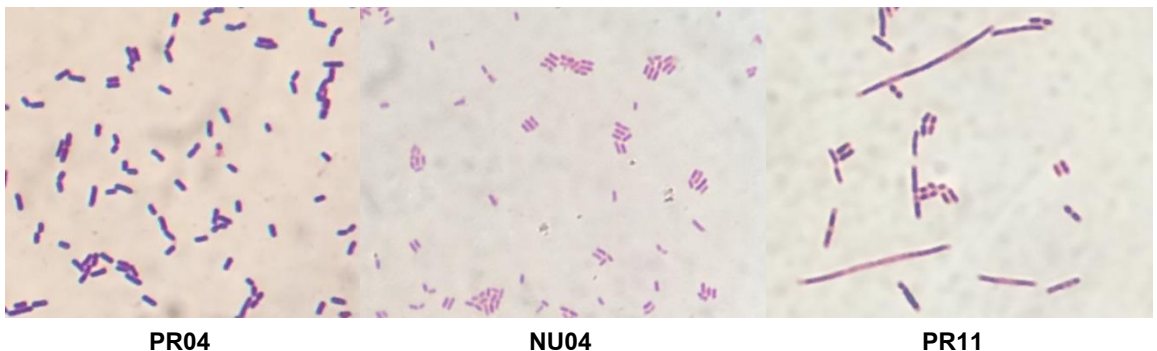
1 นอกจากนี้แบคทีเรียทรงกลมกลุ่ม *Pediococcus* sp. ให้ผลแตกต่างกันจากแบคทีเรียรูปท่อนเช่นกัน (Cal et al., 1999)



รูปที่ 1 ลักษณะวงใสรอบโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลต คือ PR05 (ซ้าย) และ PR06 (ขวา)



รูปที่ 3 ตัวอย่างการทดสอบทางชีวเคมีโดยการหมักน้ำตาลแลคโตส (lactose) [+ คือ *Klebsiella pneumonia* (positive control), - คือ *Pseudomonas aeruginosa* (negative control), 1-5 คือ ตัวอย่าง PR05, PR08, NU01, NU04 และ PR09 ตามลำดับ]



รูปที่ 2 รูปร่างลักษณะของแบคทีเรียแลคติกเมื่อย้อมด้วยสีแกรมและตรวจดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่มีกำลังขยาย 100X

การทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลสของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าทุกสายพันธุ์ไม่มีเอนไซม์แคตาเลส เนื่องจากไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น จึงมีผลเป็นลบทุกตัว ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกไม่

สามารถสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้กลายเป็นก๊าซออกซิเจนกับน้ำได้ แต่ *Lactobacillus* sp., *Leuconostocs* sp., *Streptococcus* sp. และ *Pediococcus* sp. บางสายพันธุ์สามารถทำให้เกิด

ฟองอากาศได้เล็กน้อย เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารแข็งที่มีส่วนผสมของแมงกานีสไดออกไซด์ (MDO) และ Blood o-dianisidine (HBD) ที่มีการให้ความร้อนและบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Whittenbury, 1964) ส่วนการทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียพบว่าทุกสายพันธุ์ไม่มีการสร้าง rhizoid จึงไม่สามารถเจริญเติบโตทั่วทั้งหลอดอาหาร แต่จะเจริญเติบโตเฉพาะบริเวณที่มีการจุ่มตัวอย่างของแบคทีเรียลงไปเท่านั้น จึงสรุปได้ว่าทุกสายพันธุ์คาดว่าจะแบคทีเรียกรดแลคติก ยกเว้น *Sporolactobacillus* sp. ที่สามารถสร้าง rhizoid ได้เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร motility medium (Wood, 1992) ส่วนการทดสอบการสร้างเอนไซม์อาร์จินีน-

ไดไฮโดรเลส พบว่าหากแบคทีเรียกรดแลคติกมีการสร้างกรดจะทำให้ pH ของอาหารมีค่าต่ำลง และอาหารจะเปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลืองในวันที่ 1 และต่อมาจะเปลี่ยนสีกลับมาเป็นสีม่วงเหมือนเดิมในวันที่ 2 เมื่อมีการสร้างแอมโมเนียของแบคทีเรียเกิดขึ้น ซึ่งจะแสดงว่ามีผลเป็นบวก แต่กรณีของแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่จะให้ผลเป็นลบเนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนสีหรือเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแต่ไม่กลับมาเป็นสีม่วง แต่มีงานวิจัยที่ทดสอบพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus brevis* และ *Streptococcus thermophilus* ให้ผลเป็นบวก (Nikita and Hemangi, 2012)

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบการหมักน้ำตาล 10 ชนิด ของแบคทีเรียที่คัดกรองได้จากน้ำพริก

ไอโซเลต	ชนิดของน้ำตาล									
	Sorbitol	Cellobiose	Thehalose	Lactose	Maltose	Mannitol	Xylose	Rhamnose	Raffinose	Arabinose
PR01	-	+	-	-	+	+	-	-	-	-
PR02	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
PR03	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-
PR04	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PR05	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PR06	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
PR07	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
PR08	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
PR09	-	-	+	-	-	+	+	-	+	-
PR10	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+
PR11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NU01	-	-	+	+	-	+	+	-	+	-
NU02	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NU03	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NU04	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-
NU05	+	-	-	-	+	-	+	-	-	+

ดังนั้นลักษณะพื้นฐานและการทดสอบทางชีวเคมีนี้ยังไม่สามารถระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรีย

ได้อย่างชัดเจน เนื่องจากมีหลายงานวิจัยที่ให้ผลค่อนข้างหลากหลายและไม่มีรูปแบบที่แน่นอน

ส่งผลให้การระบุสายพันธุ์ต้องอาศัยการคาดเดาเป็นหลัก จึงต้องนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (nucleotide) ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S *rDNA* เพื่อระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อไป ซึ่งมีหลายงานวิจัยได้กล่าวไว้ เช่น การตรวจสอบแบคทีเรียกรดแลคติกจากไส้กรอกแห้งหมักด้วยวิธีเทคนิคพีซีอาร์แบบรวดเร็ว (RAPD-PCR) โดยใช้ไพรเมอร์สายเดี่ยว 1 สาย และไพรเมอร์ที่จำเพาะอีก 1 คู่ ในการตรวจสอบยีน 16S *rDNA* เพื่อตรวจสอบแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp. และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์พบว่ามีความสามารถตรวจสอบสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ (Fleck *et al.*, 2012) บางงานวิจัยใช้ยีนอื่น ๆ ร่วมกับ 16S *rDNA* เพื่อระบุสายพันธุ์ได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เช่น การตรวจหาแบคทีเรียกรดแลคติกของคิมจิที่อยู่ในขั้นตอนของการหมักด้วยวิธีมัลติเพล็กซ์พีซีอาร์ (multiplex PCR) โดยการเพิ่มจำนวนยีนเป้าหมายที่แตกต่างกัน เพื่อใช้ในการตรวจสอบแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ให้มีความละเอียดและจำเพาะเจาะจงมากยิ่งขึ้น ซึ่งเทคนิคนี้มีประสิทธิภาพในการตรวจสอบสูงถึง 86.5-100 เปอร์เซ็นต์ (Cho, 2009) ซึ่งหลังจากการระบุสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกแล้วสามารถนำงานไปต่อยอดเพื่อศึกษาการทำงานของยีนต่าง ๆ ของแบคทีเรียได้ด้วยการศึกษาและประยุกต์ใช้วิชาชีววิทยาระบบ (system biology) เข้ามาช่วยเพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนและน่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น โดยการใช้คอมพิวเตอร์วิเคราะห์ลักษณะของยีน เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนว่ามีการเหนี่ยวนำหรือยับยั้ง เช่น ยีนที่มีสามารถในการสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรีย (de Vos, 1999) จนสุดท้ายนำไปใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรม โดยการปรับปรุงสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ประโยชน์สำหรับการปรับปรุงคุณภาพของอาหาร เช่น ไวน์ โดยการตัดต่อยีนของแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อผลิตกรดแลคติกให้มีปริมาณที่

เหมาะสมต่อคุณภาพของไวน์ (Nisiotou *et al.*, 2015) หรือโคลนยีนลงในสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ให้มีการสร้างกรดแลคติกได้ เช่น การโคลนยีนแบคทีเรียกรดแลคติกเข้าสู่สาหร่ายสีเขียวกวมน้ำ *Synechocystis* sp. เพื่อเพิ่มปริมาณของกรดแลคติก โดยเริ่มจากการศึกษาวิถีเมตาบอลิซึม (metabolic pathway) ของสิ่งมีชีวิตที่ต้องการโคลน จากนั้นหาเอนไซม์ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลคติก เช่น ยีน *ldh* ที่ทำหน้าที่สังเคราะห์เอนไซม์ lactate dehydrogenase ที่สามารถเปลี่ยนสารตั้งต้นจาก pyruvate ไปเป็น lactate ได้ แล้วโคลนยีนเข้าสู่สาหร่าย จากนั้นนำยีนไปศึกษาการแสดงออกของยีนโดยการทำพีซีอาร์แบบย้อนกลับ (RT-PCR) แล้วเพิ่มปริมาณเซลล์ของสาหร่ายและสกัดแยกเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำ (supernatant) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติกด้วยเครื่อง high-performance liquid chromatography (HPLC) เป็นลำดับสุดท้าย (Joseph *et al.*, 2013)

4. สรุป

การตรวจกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริกพบว่าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียได้ 16 ไอโซเลต เมื่อตรวจสอบลักษณะพื้นฐานและทดสอบทางชีวเคมีสามารถยืนยันผลเบื้องต้นว่าทั้ง 16 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งจะต้องนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอบริเวณ 16S *rDNA* เพื่อยืนยันชนิดและระบุสายพันธุ์ที่แน่ชัดต่อไป

5. รายการอ้างอิง

- นางลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2550, จุลชีววิทยาทั่วไป, สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- นิรมล ยวนบุญย์, 2550, น้ำพริก : ฐานทรัพยากรอาหาร วิถีชุมชน ภายใต้กระแสโลกาภิวัตน์,

- สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ, กรุงเทพฯ.
- สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม, 2548, จุลชีววิทยาของอาหารและอาหารสัตว์วิธีตรวจนับมีโซฟิลิกแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยเทคนิคการนับโคโลนีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส, มอก. 2239-2548.
- อรอนงค์ พริ้งศุลกะ, 2550, แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก, ว.วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, 23(2): 145-160.
- Breed, R.S., Murray, E.G.D. and Smith, N.R., 1957, *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 7th Ed., The Williams & Wilkins, Co., Ltd., U.S.A.
- Cal, Y., Kumal, S., Ogawa, M., Benno, Y. and Nakase, T., 2013, Characterization and identification of *Pediococcus* species isolated from forage crops and their application for silage preparation, *Appl. Environ. Microbiol.* 65: 2901-2906.
- Cho, K.M., Math, R.K., Islam, S.M.A., Lim, W.J., Hong, S.Y., Kim, J.M., Yun, M.G., Cho, J.J. and Yun, H.D., 2009, Novel multiplex PCR for the detection of lactic acid bacteria during kimchi fermentation, *Mol. Cell Probes.* 23: 90-94.
- Choi, M.H. and Park, Y.H., 2000, Selective control of lactobacilli in kimchi with nisin, *Lett. Appl. Microbiol.* 30: 173-177.
- de Vos, W.M., 1999, Gene expression systems for lactic acid bacteria, *Ecol. Ind. Microbiol.* 2: 289-295.
- Draft International Standard, 2014, *Microbiology of the food chain: Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination, Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions*, Draft Önorm EN ISO 6887-1.
- East African Community, 2006, *Milk and milk products - Methods of microbiological examination, Part 1: Total plate count*, EAS 68-1.
- Fleck, Z.C., Savic, V., Kozacinski, L., Njari, B., Zdolec N. and Filipovic, I., 2012, Identification of lactic acid bacteria isolated from dry fermented sausages, *Vet. Arhiv.* 82: 265-272.
- Horn, K.V., Toth, C., Kariyama, R., Mitsuhata, R. and Kumon, H., 2002, Evaluation of 15 motility media and a direct microscopic method for detection of motility in *Enterococci*, *J. Clin. Microbiol.* 40: 2476-2479.
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S., Tani, A. and Maneerat, S., 2011, Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (Plasom) and production of Plasom from selected strains, *Food Control* 22: 401-407.
- Jack, R.W., Tagg, J.R. and Ray, B., 1995, Bacteriocins of gram-positive bacteria, *Microbiol. Rev.* 59: 171-200.
- Jang, S., Lee, J., Jung, U., Choi, H.S. and Suh, H.J., 2014, Identification of an anti-listerial domain from *Pediococcus pentosaceus* T1 derived from Kimchi, a traditional fermented vegetable, *Food Control* 43: 42-48.
- Joseph, A., Aikawa, S., Sasaki, K., Tsuge, Y., Matsuda, F., Tanaka, T. and Kondo, A.,

- 2013, Utilization of lactic acid bacterial genes in *Synechocystis* sp. PCC 6803 in the production of lactic acid, Biosci. Biotechnol. Biochem. 77: 966-970.
- Leiner, J.J., Pot, B., Christensen, H., Rusul, G., Olsen, J.E., Wee, B.W., Muhamad, K. and Ghazali, H.M., 1999, Identification of lactic acid bacteria from Chili Bo, a Malaysian food ingredient, Appl. Environ. Microbiol. 65: 599-605.
- Moorehead, A.W. and Shumway, W.W., 2008, Methods and compositions relating to the control of the rates of acid-generating compounds in acidizing operations, U.S. Patent, pp. 1-24.
- Nie, X., Lin, S. and Zhang, Q., 2014, Proteolytic characterisation in grass carp sausage inoculated with *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus pentosaceus*, Food Chem. 145: 840-844.
- Nielsen, D.S., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P., Bresciani, J., Amoa-Awua, W., Holzapfel, W.H. and Jakobsen, M., 2007, *Lactobacillus ghanensis* sp. nov., a motile lactic acid bacterium isolated from Ghanaian cocoa fermentations, Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 57: 1468-1472.
- Nikita, C. and Hemangi, D., 2012, Isolation, identification and characterization of lactic acid bacteria from dairy sludge sample, J. Environ. Res. Develop. 7: 234-244.
- Nisiotou, A.A., Dourou, D., Filippousi, M.E., Diamantia, E., Fragkoulis, P., Tassou C. and Banilas G., 2015, Genetic and technological characterisation of vineyard- and winery- associated lactic acid bacteria, BioMed. Res. Int., Article ID 508254, 8 p.
- 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. Biol. Biotechnol. 7: 19-25.
- Okereke, A. and Montville, T.J., 1991, Bacteriocin- mediated inhibition of clostridium botulinum spores by lactic acid bacteria at refrigeration and abuse temperatures, Appl. Environ. Microbiol. 57: 3423-3428.
- Papagianni, M. and Anastasiadou, S., 2009, Pediocins: The bacteriocins of *Pediococci*: Sources, production, properties and applications, Microbiol. Cell Fact. 8: 1-16.
- Pucci, M.J., Vedamuthu, E.R., Kunka, B.S. and Vandenberg, P.A., 1988, Inhibition of *Listeria monocytogenes* by using bacteriocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC 1.0, Appl. Environ. Microbiol. 54: 2349-2353.
- Wood, B.J.B, 1992, The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease, Springer-Verlag, U.S.A.
- Shukla, R. and Goyal, A., 2013, Novel dextran from *Pediococcus pentosaceus* CRAG3 isolated from fermented cucumber with anti-cancer properties, Int. J. Biol. Macromol. 62: 352-357.
- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S. and

- Komagata, K., 2000, *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand, *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50: 1479-1485.
- Tserovska, L., Stefanova, S. and Yordanova, T., 2002, Identification of lactic acid bacteria isolated from Katyk, goat's milk and cheese, *J. Cult. Collect.* 3: 48-52.
- Whittenbury, R., 1964, Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria, *J. gen. Microbiol.* 35: 13-26.
- Williams, G.A., Blazevic, D.J. and Ederer, G.M., 1971, Detection of arginine dihydrolase in nonfermentative gram-negative bacteria by use of thin-layer chromatography, *Appl. Microbiol.* 22: 1135-1137.