



Proceedings

การประชุมวิชาการระดับชาติ

วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีระหว่างสถาบัน (ASTC) ครั้งที่ 7

The 7th Academic Science and Technology Conference

นวัตกรรม

วิทยาศาสตร์พื้นฐาน

วิทยาศาสตร์ประยุกต์

วิทยาศาสตร์สุขภาพ

คอมพิวเตอร์และเทคโนโลยีสารสนเทศ

บูรณาการ วิจัย และ นวัตกรรม เพื่อสร้างเสริมสุขภาพ

Health Promotion Through Research Integration and Innovation

7 มิถุนายน 2562

ณ อาคารพิมเนศ มหาวิทยาลัยรังสิต จ.ปทุมธานี



[AS-P09] การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริกไทยในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Isolation of Lactic Acid Bacteria from Thai Chili Pastes for Inhibiting Bacteria

นิศารัตน์ สุขาบูน จิตรานนท์ เสือโต และอำพรธม ชัยกุลเสรีวัฒน์*

Nisarath Sukaboon, Jitranon Sueto, and Ampun Chaikulsareewath*

ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม

*ผู้ประสานงานหลัก อีเมล: ampun.cha@siam.edu

บทคัดย่อ

การศึกษาคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก 9 ชนิด ได้แก่ น้ำพริกที่มีส่วนผสมของปลาร้า มี 6 ชนิด คือแจ่วปลาร้า น้ำพริกปลาทุใส่ปลาร้า น้ำพริกปลาร้าสับคั่ว ปลาร้าสับ ซุปมะเขือและน้ำพริกปลาร้า และมีส่วนผสมของกะปิ 3 ชนิด คือ น้ำพริกกุ้งจ่อม น้ำพริกกะปิ น้ำพริกกะปิลงเรือ พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 16 ไอโซเลต จากน้ำพริก 7 ชนิด ซึ่งทุกไอโซเลตจะเจริญในอาหาร MRS agar ผสม CaCO_3 เข้มข้นร้อยละ 1 และทำให้เกิด clear zone รอบๆ โคลินีของเชื้อ พบว่า โคลินีของเชื้อมีลักษณะผิวเรียบจนถึงผิวขรุขระ นูนน้อยถึงนูนมาก และเมื่อนำมาตรวจดูการย้อมติดสีแกรม พบว่ามีรูปร่างท่อนติดสีแกรมบวก จำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ B1, B2, B3, E1, E2, E3, F1, G1, G2, H1, I1, I2 และ I3 และมีรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก จำนวน 3 ไอโซเลต C, G3, H2 พบว่าทั้ง 16 ไอโซเลต ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส จากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติก 16 ไอโซเลต ในการยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* TISTR 001, *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 3 ชนิด ได้แก่ *B.subtilis* *E.coli* และ *S.aureus* คือ E1 ที่ไม่ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ซึ่งให้ผลการยับยั้ง inhibition clear zone เท่ากับ 12.33 ± 0.58 , 14.00 ± 1.73 และ 14.00 ± 0.00 มิลลิเมตร ตามลำดับ

คำสำคัญ: น้ำพริก, แบคทีเรียกรดแลคติก, การยับยั้งแบคทีเรีย

Abstract

The isolation of lactic acid bacteria from nine chili pastes was investigated. Nine chili pastes were grouped into two types of chili pastes due to ingredient from “pla-raa” or “ka-pi”. There were 6 types; jaew-pla-raa, nam-prik-pla-too-sai-pla-raa, nam-prik-pla-raa-sub-kua, pla-raa-sub, soup-ma-kaur and nam-prik-pla-raa containing pla-raa and 3 types; nam-prik-kung-jom, nam-prik-ka-pi and nam-prik-ka-pi-long-rae containing ka-pi. Sixteen isolate lactic acid bacteria were isolated from 7 of 9 types of chili pastes which grew in MRS agar with clear zone around their colony. The morphology of them was smooth to rough, convex to very convex. All isolated were examined by Gram’s staining and catalase test. Sixteen isolates were not able to produce catalase and were gram positive bacteria with two different shapes; 13 bacilli shapes (B1, B2, B3, E1, E2, E3, F1, G1, G2, H1, I1, I2 and I3) and 3 cocci shapes (C, G3, H2). Antibacterial activity against *Bacillus subtilis* TISTR 001, *Escherichia coli* TISTR 780 and *Staphylococcus aureus* TISTR 118 were conducted using agar well diffusion assay. The isolate E1 (no adjust pH) was the highest against *B. subtilis*, *E. coli* and *S. aureus* with inhibition clear zone at 12.33 ± 0.58 , 14.00 ± 1.73 and 14.00 ± 0.00 mm, respectively.

Keywords: chili paste, lactic acid bacteria, inhibiting bacteria

บทนำ

น้ำพริกเป็นอาหารไทยประเภทเครื่องจิ้มชนิดหนึ่ง ส่วนใหญ่ใช้รับประทานคู่กับผัก ที่มีส่วนประกอบสำคัญคือ พริกที่ต้องตำละเอียด มีอยู่หลายอย่างเรียกตามส่วนประกอบที่ใส่ลงไป น้ำพริกยังเป็นผลิตภัณฑ์ส่งขายออกนอกประเทศด้วย น้ำพริกถูกใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารต่าง ๆ หรือใช้ในการรับประทาน เป็นกับข้าว ก็ได้ และยังได้รับความนิยมมาตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สำหรับน้ำพริกแบบที่ใช้เป็นเครื่องปรุงส่วนผสมนั้น เกิดขึ้นเพราะอาหารไทยจำพวกแกง จำเป็นที่จะต้องมีส่วนประกอบ หรือกรรมวิธีการทำที่ค่อนข้างซับซ้อน ผู้ปรุงจึงคิดทำน้ำพริกขึ้น เพื่อรวบรวมส่วนผสมต่าง ๆ นั้นเข้าด้วยกัน เป็นการลดขั้นตอนการปรุงลง และยังสามารถทำเก็บไว้ได้ในจำนวนมาก⁽¹⁾ จากรายงานการศึกษาพฤติกรรมผู้บริโภคและความปลอดภัยทางอาหารของน้ำพริก โดยกรมอนามัย กระทรวงสาธารณสุขชี้ว่า คนไทยมากถึงร้อยละ 98.0 นิยมบริโภคน้ำพริก และกว่าร้อยละ 64.1 จัดให้น้ำพริกเป็นอาหารประจำครอบครัวที่ขาดไม่ได้ น้ำพริกเป็นอาหารที่ดีต่อสุขภาพ เพราะน้ำพริกแต่ละถ้วยอุดมด้วยวัตถุดิบที่มีประโยชน์ อาทิ กุ้งแห้ง กะปิ และปลาร้า รวมถึงเครื่องเทศต่าง ๆ ที่ไม่จำเป็นเป็นพริก กระเทียม หอมแดง ฯลฯ ล้วนแต่เป็นสมุนไพรที่มีคุณประโยชน์ต่อสุขภาพ⁽²⁾ ส่วนประกอบหลายชนิดของน้ำพริกมีฤทธิ์ทางสมุนไพรและฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ตัวอย่างเช่น พริกมีสารที่ทำให้มีรสเผ็ดร้อน คือ แคปไซซิน (capsaicin) ฤทธิ์ต่อระบบทางเดินอาหาร ทำให้เพิ่มการหลั่งของน้ำลายและกรดในกระเพาะอาหาร ช่วยย่อยอาหาร กระเทียมมีสรรพคุณ ได้แก่ ขับลมในลำไส้แก้ลมท้องลม แก้ไข ช่วยย่อยอาหาร พบสารอัลลิซินในกระเทียมที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังช่วยลดปริมาณไขมันในเลือด ได้อีกด้วย⁽³⁾ น้ำพริกถือว่าเป็นอาหารอย่างหนึ่งที่สามารถพบจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ และมีโทษ จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ที่อาจตรวจพบ เช่น แบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก และสารชนิดอื่นที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรค และที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น แบคทีเรียโอสซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะเซทิล และไมโครเกรต เป็นต้น จากงานวิจัยของ นวัธน์ และคณะ⁽⁴⁾ ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริกโดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร de Man Regosa Sharpe agar ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 จากน้ำพริกปลาร้าและน้ำพริกหนุ่ม ซึ่งพบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 11 และ 5 ไอโซเลตตามลำดับ เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานและทดสอบทางชีวเคมีแล้ว พบว่าน่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก จะเห็นได้ว่าน้ำพริกมีทั้งส่วนผสมและสมุนไพรต่าง ๆ ที่มีประโยชน์ต่อผู้บริโภค อีกทั้งหากมีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในน้ำพริกด้วยก็จะมีประโยชน์มากยิ่งขึ้น และยังส่งผลช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์น้ำพริก

การศึกษานี้มีจุดมุ่งหมายในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากน้ำพริกที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้ก่อให้เกิดโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตส่วนประกอบที่จะนำมาทำเป็นน้ำพริก และใช้เป็นแนวทางในการปรับปรุงผลิตภัณฑ์น้ำพริกให้มีคุณภาพได้มาตรฐานและมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก⁽⁴⁾

การเก็บตัวอย่างน้ำพริก

เก็บตัวอย่างน้ำพริกที่มีส่วนผสมของปลาร้าและกะปิ จำนวน 9 ตัวอย่าง จากแหล่งต่าง ๆ ต่อไปนี้ น้ำพริกที่มีส่วนผสมของปลาร้า มี 6 ชนิด ได้แก่ 1) แจ่วปลาร้า มาจากตลาดหมู่บ้านเพชรเกษม 2, 2) น้ำพริกปลาทุใส่ปลาร้า มาจากซอยเพชรเกษม 55/2, 3) น้ำพริกปลาร้าสับคั่วทรงเครื่อง มาจากตลาดบางแค, 4) ปลาร้าสับ มาจากตลาดพุทธมณฑลสาย 2, 5) ซุปมะเขือ มาจากตลาดพุทธมณฑลสาย 2 และ 6) น้ำพริกปลาร้า มาจากตลาดพุทธมณฑลสาย 2 และมีส่วนผสมของกะปิ 3 ชนิด ได้แก่ 1) น้ำพริกกุ้งจ่อม มาจากตลาดหมู่บ้านเพชรเกษม 2, 2) น้ำพริกกะปิ มาจากซอยเพชรเกษม 55/2 และ 3) น้ำพริกกะปิลงเรือ มาจากตลาดบางแค

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก

ชั่งตัวอย่างของน้ำพริก (9 ตัวอย่าง) ชนิดละ 25 กรัม ใส่ลงในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร 225 มิลลิลิตร (ความเจือจางเท่ากับ 10^{-1}) แล้วดูดเฉพาะส่วนที่เป็นของเหลวมาเจือจางต่อที่ระดับความเจือจาง

เป็น 10^{-2} จากนั้นนำตัวอย่างอาหารที่เจือจางแล้วมา spread ลงบนอาหาร de Man Regosa Sharpe (MRS) agar ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO_3) ความเข้มข้น ร้อยละ 1 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่เกิดเป็นวงใส บนจานเพาะเชื้อมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยการย้อมแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์แคตาเลส ตามวิธีของดวงพร⁽⁵⁾

ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตสารยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ⁽⁶⁾

เตรียมเชื้อแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Bacillus subtilis* TISTR 001, *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร nutrient broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางจากเชื้อแบคทีเรีย ให้เชื้อเริ่มต้นมีค่าความขุ่น (Optical density, O.D.) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.2 (ปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/ml) ด้วย nutrient broth

การเตรียมสารยับยั้งจากแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้เลี้ยงในอาหารเหลว MRS broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อทดสอบจนมีค่าความขุ่น เท่ากับ 0.5 ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร (ประมาณ 10^8 CFU/ml) ด้วย MRS broth⁽⁷⁾ จากนั้นแบ่งสายละลายเชื้อเป็น 2 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1: กรองให้ปราศจากเชื้อโดยใช้กระดาษกรอง Membrane filter ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร (มีค่า pH อยู่ระหว่าง 4-5)

ส่วนที่ 2: ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 ด้วย 1 N NaOH กรองให้ปราศจากเชื้อโดยใช้กระดาษกรอง Membrane filter ที่มีขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar well diffusion assay⁽⁸⁾

นำเชื้อทดสอบ จากข้อ 2.1 ที่มีค่าความขุ่นที่ 600 nm เท่ากับ 0.2 มาเลี้ยงเชื้อบนจานเพาะเชื้อ ด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar เจาะรูด้วย cork border เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.6 มิลลิเมตร จากนั้นเปิดสารกรองที่ได้ (culture filtrate) จากข้อ 2.2 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงหลุมในจานเพาะเชื้อ นำมาบ่มไว้ที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเกิดบริเวณใสรอบ ๆ หลุม (Inhibition zone) วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางการเกิดวงใส คำนวณประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบตามสูตรดังนี้

ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญ
ของแบคทีเรียทดสอบ (มิลลิเมตร) = $\frac{\text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสรอบหลุม} - \text{ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหลุม}}$

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

ผลจากการศึกษาการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริกที่มีส่วนผสมของปลาร้าและกะปิ 9 ตัวอย่าง ได้แก่ น้ำพริกที่มีส่วนผสมของปลาร้า มี 6 ชนิด ได้แก่ แก้วปลาร้า (ตลาดหมู่บ้านเพชรเกษม 2) น้ำพริกปลาทุใส่ปลาร้า (ซอยเพชรเกษม 55/2) น้ำพริกปลาร้าสับคั่วทรงเครื่อง (ตลาดบางแค) ปลาร้าสับ (ตลาดพุทธมณฑลสาย 2) ชูปะมะเขือ (ตลาดพุทธมณฑลสาย 2) น้ำพริกปลาร้า (ตลาดพุทธมณฑลสาย 2) และมีส่วนผสมของกะปิ 3 ชนิด ได้แก่ น้ำพริกกุ้งจ่อม (ตลาดหมู่บ้านเพชรเกษม 2) น้ำพริกกะปิ (ซอยเพชรเกษม 55/2) น้ำพริกกะปิลงเรือ (ตลาดบางแค) โดยทำการคัดแยกเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่ผสมแคลเซียมคาร์บอเนต และสังเกตลักษณะ clear zone ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

จากการศึกษาพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 16 ไอโซเลต โคโลนีมีลักษณะผิวเรียบจนถึงผิวขรุขระ นูนน้อย ถึงนูนมาก การเกิด clear zone รอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ เนื่องจาก เชื้อผลิตกรดออกมาแล้วมีผลในการย่อยสลายแคลเซียมคาร์บอเนตที่เป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ⁽⁸⁾ และเมื่อนำมาตรวจดูการย้อมติดสีแกรม พบว่าเชื้อมีรูปร่างท่อน จำนวน

13 ไอโซเลต ได้แก่ B1, B2, B3, E1, E2, E3, F1, G1, G2, H1, I1, I2 และ I3 และมีรูปร่างกลม จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ C, G3, H2 พบว่าทั้ง 16 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส ส่วนน้ำฟริกที่ตรวจไม่พบแบคทีเรียกรดแลคติก มี 2 ชนิด ได้แก่ น้ำฟริกปลาทุใส่ปลาร้า จากปากซอยเพชรเกษม และน้ำฟริกกุ้งจ่อม จากตลาดหมู่บ้านเพชรเกษม 2 ผลการทดลองนี้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ นวัฒน์ และคณะ⁽⁴⁾ ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จากน้ำฟริกโดยเฉพาะเลี้ยงในอาหาร de Man Regosa Sharpe agar (MRS) ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต (CaCO₃) ร้อยละ 1 พบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้งหมด 11 ไอโซเลต จากน้ำฟริกปลาร้า และ 5 ไอโซเลต จากน้ำฟริกหนุ่ม เมื่อตรวจสอบลักษณะสัณฐานและทดสอบทางชีวเคมี แล้ว พบว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก โดยสามารถแบ่งเป็นสกุลต่างๆ ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Weissella* spp. เป็นต้น แบคทีเรียแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เซลล์มีรูปร่างหลายแบบ คือ มีทั้งแบบกลม (cocci) หรือแบบท่อน (rods) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ได้รับความสนใจในวงการอาหารและเภสัชกรรมอย่างมาก เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่ก่อโรคแก่มนุษย์และสัตว์ แบคทีเรียแลคติกจะเปลี่ยนอาหารที่มีน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติกประมาณร้อยละ 50 และผลิตภัณฑ์อื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไตอะเซทิล อะเซโทอิน และกรดอินทรีย์ แบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) และมักใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้น (starter culture) เติมนลงในอาหารภายใต้ภาวะควบคุม ตัวอย่างของจีโนสที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Carnobacterium*^(9, 10)

ผลจากการศึกษาความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรีย

จากนั้นนำ culture filtrate ของจุลินทรีย์ทั้ง 16 ไอโซเลต ทั้งที่ปรับและไม่ปรับ pH มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย ด้วยวิธี agar well diffusion assay โดยใช้เชื้อทดสอบ คือ *Bacillus subtilis* TISTR 001, *Escherichia coli* TISTR 780 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ซึ่งเป็นทั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย แสดงผลการทดลองดังตารางที่ 2

เมื่อเปรียบเทียบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 9 ไอโซเลต ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบ พบว่า culture filtrate ที่ไม่ปรับค่า pH ส่วนใหญ่ มีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบ โดยมีเพียงบางไอโซเลตเท่านั้นที่ culture filtrate ที่มีการปรับค่า pH มีผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบ ได้แก่ E1 G2 I1 และ I2 เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบชนิดเดียวกัน พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *B.subtilis* ได้ดีที่สุดคือ E1 (ไม่ปรับค่า pH) ให้ผลการยับยั้งระดับ+++ (12.33±0.58 มิลลิเมตร) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีผลในการยับยั้ง *E.coli* ได้ดีที่สุด คือ E1 (ไม่ปรับค่า pH) ให้ผลการยับยั้งระดับ+++ (14.00±1.73 มิลลิเมตร) ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีผลในการยับยั้ง *S.aureus* ได้ดีที่สุด คือ B3 (ไม่ปรับค่า pH) ให้ผลการยับยั้งระดับ+++ (14.67±0.58 มิลลิเมตร) แสดงให้เห็นว่าน้ำฟริกกะปilingเรือ จากตลาดบางแค (พบเชื้อ E1 E2 และ E3) มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อทดสอบทั้ง 3 ชนิดได้ดีที่สุด จากการทดลองพบว่า culture filtrate ส่วนใหญ่ที่ไม่ปรับค่า pH มีผลในการยับยั้งเชื้อทดสอบได้ดีกว่าที่ปรับ pH เนื่องจากกรดแลคติก หรือสารที่ทำงานได้ดีในสภาวะเป็นกรด ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นมีผลในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าสารที่ไม่ใช่กรดแลคติกหรือสารที่ทำงานในสภาวะเป็นกลาง ซึ่งการทดลองดังกล่าว สอดคล้องกับการทดลองของมุสตีและคณะ⁽¹¹⁾ ที่ได้ทำการคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก 42 ตัวอย่าง จากนั้นทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคอาหารเป็นพิษ 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Typhimurium* และ *Escherichia coli* พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 26 ไอโซเลต สามารถรอดชีวิตและเจริญได้มากกว่า 10⁶ CFU/ml ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีค่า pH เหมาะสมต่อการเจริญโดยอยู่ในช่วง 5.58-6.20 แต่จะมีอัตราการเจริญลดลง เมื่อมีค่า pH ลดลง หรือเพิ่มขึ้น⁽¹²⁾

ตารางที่ 1 ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การสร้างเอนไซม์แคตาเลส และความกว้างของวงใส (clear zone) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากน้ำพริก

ตัวอย่างอาหาร (แหล่ง)	รหัส	ลักษณะโคโลนี	การติดสีแกรม	รูปร่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์	การสร้างเอนไซม์แคตาเลส	ความกว้างของวงใส (มิลลิเมตร)
1. แจ่วปลาร้า (ตลาดหมู่บ้านเพชรเกษม 2)	B1	ผิวเรียบ สีขาวขุ่น นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนสั้น	ไม่สร้าง	3
	B2	ผิวขรุขระ สีขาวขุ่น นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนสั้น	ไม่สร้าง	2
	B3	ผิวเรียบ สีขาว นูนมาก	แกรมบวก	ท่อน	ไม่สร้าง	1
2. น้ำพริกกะปิ	C	ผิวเรียบ สีขาว นูนน้อย	แกรมบวก	กลม	ไม่สร้าง	1
3. น้ำพริกกะปิลงเรือ (ตลาดบางแค)	E1	ผิวเรียบ สีขาว นูนมาก	แกรมบวก	ท่อนสั้น	ไม่สร้าง	5
	E2	ผิวเรียบ สีขาว นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนสั้น	ไม่สร้าง	5
	E3	ผิวเรียบ สีขาว นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนสั้น	ไม่สร้าง	3
4. น้ำพริกปลาร้าสับ คั่วทรงเครื่อง (ตลาดบางแค)	F1	ผิวเรียบ สีขาวขุ่น นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนยาว	ไม่สร้าง	3
5. ปลาร้าสับ (ตลาดสาย2)	G1	ผิวเรียบ สีขาวขุ่น นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนยาว	ไม่สร้าง	4
	G2	ผิวเรียบ สีขาว นูนมาก	แกรมบวก	ท่อนยาว	ไม่สร้าง	4
	G3	ผิวเรียบ สีครีม นูนมาก	แกรมบวก	กลม	ไม่สร้าง	3
6. ซุปมะเขือ (ตลาดสาย2)	H1	ผิวเรียบ สีขาว นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนสั้น	ไม่สร้าง	1
	H2	ผิวแห้ง สีขาว นูนมาก	แกรมบวก	กลม	ไม่สร้าง	2
7. น้ำพริกปลาร้า (ตลาดสาย2)	I1	ผิวเรียบ สีขาว นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนสั้น	ไม่สร้าง	2
	I2	ผิวเรียบ สีขาวขุ่น นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนสั้น	ไม่สร้าง	2
	I3	ผิวเรียบ สีขาว นูนน้อย	แกรมบวก	ท่อนยาว	ไม่สร้าง	2

ตารางที่ 2 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียกรดแลคติกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ

รหัส ไอโซเลต	ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (mm)					
	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	ไม่ปรับ pH	ปรับ pH	ไม่ปรับ pH	ปรับ pH	ไม่ปรับ pH	ปรับ pH
B1	-	-	10.00±0.00 (++)	-	10.00±0.00 (++)	-
B2	-	-	10.00±0.00 (++)	-	10.00±0.00 (++)	-
B3	-	-	10.00±0.00 (++)	-	14.67±0.58 (+++)	-
C	-	-	-	-	-	-
E1	12.33±0.58 (+++)	-	14.00±1.73 (+++)	10.67±1.15 (++)	14.00±0.00 (+++)	-
E2	10.67±1.15 (++)	-	-	-	14.33±1.15 (+++)	-
E3	9.33±1.15 (++)	-	10.00±0.00 (++)	-	-	-

รหัส ไอโซเลต	ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ (mm)					
	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Escherichia coli</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>	
	ไม่ปรับ pH	ปรับ pH	ไม่ปรับ pH	ปรับ pH	ไม่ปรับ pH	ปรับ pH
F1	-	-	-	-	-	-
G1	-	-	-	-	-	-
G2	-	10.00±0.00 (++)	-	-	-	-
G3	-	-	-	-	-	-
H1	-	-	-	-	-	-
H2	-	-	-	-	-	-
I1	-	-	-	7.00±0.00 (+)	9.00±1.00 (++)	10.00±0.00 (++)
I2	-	-	9.67±0.58 (++)	6.00±1.15 (+)	-	-
I3	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ มี 4 ระดับ ไม่เกิด clear zone = (-) 1-8 mm = (+) 8-12 mm = (++) มากกว่า 12 mm = (+++)

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารได้แก่ กรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีริโอซิน และไดอะเซทิล⁽¹³⁾ แบคทีริโอซินจะเข้าสู่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมายโดยอาศัยแรงไฟฟ้าสถิต (electrostatic) เหนี่ยวนำให้เกิดรูบนเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์เป้าหมาย และขัดขวางกระบวนการแรงขับเคลื่อนโปรตอน (proton motive force) รวมทั้งรบกวนสมดุลของความเป็นกรด-ด่าง เป็นผลให้เกิดการรั่วไหลของกรดอะมิโนและไอออน เกิดการสลายตัวของของอะดีโนซีนไตรฟอสเฟต (adenosine triphosphate, ATP) ทำให้เซลล์ตายในที่สุด⁽¹⁴⁾ อีกทั้งนฤมล⁽¹⁵⁾ ได้รายงานว่าการกรดแลคติกสามารถทำลายชั้นลิพอลิแซ็กคาไรด์ (lipopolysaccharide layer) ของเมมเบรนชั้นนอก (outer membrane) ของ *E.coli* จนทำให้ *E.coli* ตายได้ และสอดคล้องกับงานวิจัยของ Noonpakdee et al. (2009)⁽¹⁶⁾ ที่ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติก *L.plantarum* PMU33 ซึ่งแยกได้จากปลาสำผัก โดยพบว่าสามารถผลิตแบคทีริโอซินในปริมาณสูงและทนความร้อนสูงได้ และสามารถยับยั้ง *S.aureus* *B.cereus* และ *L.monocytogenes* ซึ่งเป็นเชื้อสาเหตุของอาหารเน่าเสียและก่อโรคในคนได้อีกด้วย

การศึกษารัชนี แสดงให้เห็นว่าในน้ำพริกส่วนใหญ่ที่มีส่วนผสมของกะปิ และปลาร้า จะสามารถตรวจพบแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตสารที่มีผลในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้ก่อให้เกิดโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย ดังนั้นหากเรานำเอาแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มาเป็นหัวเชื้อในการหมักกะปิ หรือปลาร้า ก็จะเพิ่มคุณประโยชน์ให้แก่ น้ำพริก และส่งผลให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค และสามารถยืดอายุการเก็บของผลิตภัณฑ์น้ำพริกให้นานขึ้น

สรุป

การศึกษานี้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ 16 ไอโซเลต จากน้ำพริก 9 ชนิด ที่มีส่วนผสมของปลาร้า และมีส่วนผสมของกะปิ เมื่อตรวจสอบลักษณะสัญญาณวิทยาแล้วพบว่าทั้ง 16 ไอโซเลต พบว่าติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลมและท่อน ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นท่อน และเมื่อนำไปศึกษาความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเชื้อ *Bacillus subtilis* *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการยับยั้งเชื้อได้แตกต่างกัน โดยไอโซเลตส่วนใหญ่ มี

ความสามารถในการยับยั้งเชื้อทดสอบ เมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพดีที่สุดในการยับยั้งเชื้อทดสอบ 3 ชนิด คือ E1 (ไม่ปรับค่า pH) ซึ่งคัดแยกได้จากน้ำพริกกะปilingเรือ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม ที่สนับสนุนทั้งงบประมาณ สถานที่และอุปกรณ์ในการทำวิจัย

เอกสารอ้างอิง

1. วิกีพีเดีย สารานุกรมเสรี. น้ำพริก [อินเทอร์เน็ต]. 2559. [เข้าถึงเมื่อ 28 มีนาคม 2562] เข้าถึงได้จาก <https://th.wikipedia.org/wiki/น้ำพริก>
2. ศูนย์วิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ. น้ำพริก เมฆนทีศรชัย. กรุงเทพฯ: ศูนย์วิชาการ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ; 2553.
3. สิริมนต์ ชายเกตุ, ศาลินา วงษ์ไทย, อรุษา เขาวนลิขิต, อุลิสาน์ พาชีศรีพลาผล, ชาตริส การะเวก, สมชาย สุริยะศิริบุตร. การบริโภคน้ำพริกของผู้บริโภคในกรุงเทพมหานคร. วารสารมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี). 2553; 2: 64-79.
4. นวัฒน์ เกตุสวัสดิ์, ธีระชัย ธนानันต์, นฤมล ธนานันต์. การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก. วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 2559; 5: 67-76.
5. ดวงพร. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์; 2550.
6. สุนันทนา นูรภาภักดิ์, สุดฤดี ประเทืองวงศ์ อาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มกิจกรรมการยับยั้งโรคของเชื้อแบคทีเรียปฏิชีวนะสายพันธุ์ผสม. ในเอกสารประกอบการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 49. 1-4 กุมภาพันธ์ 2554. ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ; 2554.
7. จีระศักดิ์ ญาตริรักษ์, วิชญาพร ยืนยงม วีรยา เฟิงช่วย, มณฑล เลิศคณาวนิชกุล. การลดลงของระดับคอเลสเตอรอลที่ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว *Man Rogosa Sharpe* ในหลอดทดลองโดยแบคทีเรียกรดแลคติก. วารสารมหาวิทยาลัยทักษิณ 2557; 17: 30-9.
8. สมใจ ศิริโชค, ประวัติ อังประภา, พรชัย ขจีนาฏ, โพธิเวชกุล, อรอนงค์ พริ้งสุลกะ. การคัดเลือกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้. วารสารวิทยาศาสตร์ มศว. 2550; 23: 92-114.
9. Stiles M.E. and Hastings J.W. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. Trends Food Sci Technol 1991; 2: 247-51.
10. ศศิวิมล ชื่นอิม อาเหม็ด และอดิสร เสวตวิวัฒน์. การใช้ประโยชน์และการตรวจหาแบคทีเรียแลคติกในอาหาร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า 2548; 23: 88-101.
11. ผุสดี ดั่งวัชรินทร์, จิโรจน์ นิธิสันถวะคุปต์, กานต์ สุขสุแพทย์. การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก. ภาควิชาการเทคโนโลยีการผลิตสัตว์และประมง คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง; 2559.
12. Salminen S., Deighton M., Gorbach S. Lactic Acid Bacteria. New York: Marcel Dekker; 1993.
13. ดวงรัตน์ สารีภาวณษ์, นันทพล สุทธิพันธ์. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลชีพจากอาหารหมัก. ปริญญาานิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี; 2539.

14. Hwanhlem N., Buradaleng S., Wattana-chant 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 2010; 22: 401-7.
15. นฤมล ทองงาม. การศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีเรียแลคติกที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารเนื้อและปลาหมักของไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; 2553.
16. Noonpakdee W., Jumriangrit P., Witta-yakom K., Zendo J., Nakayama J., Sonomoto K., Panyim S. 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 and Biotechnol 2009; 17: 19-25.