7th NATIONAL SCIENCE AND TECHNOLOGY CONFERENCE 2022

สวทท

สมาคมครูวิทยาศาสตร์คณิตศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

รายงานสืบเนื่อง
งานประชุมวิชาการระดับชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี เครือข่ายสถาบันอุดมศึกษาภาคใต้ ครั้งที่ 7

วันที่ 10-11 มีนาคม พ.ศ. 2565

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏสุราษฎร์ธานี

(ฉบับปรับปรุง)

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้มในพื้นที่จังหวัดยะลา

Screening of Lactic Acid Bacteria from Pla-som in Yala Province

โซเฟีย นิตา[1] และ นุรอัยนี หะยียูโซะ[2*]

[1] หลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

[2] หลักสูตรจุลชีววิทยาทางการแพทย์และอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

[*] Email address: Nur-ainee.h@yru.ac.th

บทคัดย่อ

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถย่อยสลายน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก พบในอาหารหมักเกือบทุกชนิดรวมทั้งปลาส้ม บางชนิดมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเพื่อเพิ่มคุณค่าของปลาส้ม ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีแนวโน้มว่าจะเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นโปรไบโอติกจากปลาส้มในพื้นที่จังหวัดยะลา โดยทำการคัดแยกจากตัวอย่างปลาส้มใน อ.ธารโต จ.ยะลา เพาะลงบนอาหาร MRS agar ที่ผสม Bromocresol purple 0.04% พบแบคทีเรียทั้งหมด 9 ไอโซเลต แบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต A1 A2 และ A3 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สั้น ให้ผลคะตะเลสเป็นลบ และการทดสอบทนเกลือ พบว่า ไอโซเลต A1 และ A2 เจริญใน NaCl4% และ 8% ส่วนไอโซเลต A3 เจริญใน NaCl 4% จากการทดสอบชีวเคมีบางประการ พบว่าทั้งสามไอโซเลตมีแนวโน้มจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp. คุณสมบัติโปรไบโอติกบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าไอโซเลต A3 สามารถทนสภาวะที่ค่า pH ต่ำ 3.52 และให้ผลผลิตสุดท้ายเป็นกรด ไม่เกิดแก๊ส จัดเป็น Homolactic fermentative งานวิจัยนี้สามารถคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีแนวโน้มจะมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นเหมาะสำหรับใช้เป็นหัวเชื้อโปรไบโอติกในการหมักปลาส้มในอนาคตและสามารถต่อยอดเชิงพาณิชย์ได้

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก, โปรไบโอติก, ปลาส้ม

Abstract

Lactic acid bacteria can break down sugars into lactic acid, which is found in almost all fermented foods, including Pla-som. In addition, some species have probiotic properties to enhance the value of Pla-som. Therefore, this research aims to select probiotic lactic acid bacteria from Pla-som in Yala province. Lactic acid bacteria were isolated from Pla-som products in Thanto District, Yala Province. The culture was cultured on MRS agar medium containing 0.04% Bromocresol purple added. That was found that all 9 isolates of bacteria and lactic acid bacteria were isolated. 3 isolates lactic acid A1, A2 and A3. Gram-positive, shot rod-shaped, negative on catalase test. Salt tolerance test was indicated that A1 and A2 isolates grow on NaCl4% and 8%, while A3 isolates grow on 4% NaCl. Biochemical tests found that all three isolates tend to be in the genus *Lactobacillus* sp. Some of the probiotic properties of lactic acid bacteria showed that A3 was tolerant of low pH 3.52 conditions and yielded an acidic, non-gassed final product, as homolactic fermentative. It is likely to have primary probiotic properties and is suitable for use as probiotic inoculum in the future fermentation of Pla-som and can be commercialized.

Keywords: Lactic acid bacteria, Probiotic, Pla-som

1. บทนำ

ปัจจุบันได้มีการนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาพัฒนาและใช้ประโยชน์กันอย่างแพร่หลายโดยใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ในกระบวนการหมักอาหารหลายชนิด เพื่อลดระยะเวลาการหมักสั้นลง และลดปริมาณแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสียได้ ทำให้ผู้บริโภคมีความมั่นใจในความปลอดภัยมากขึ้น (ณัฐกฤตา ภู่ทับทิม และวนิดา แซ่จึง, 2559) จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (lactic acid bacteria: LAB) ตัวอย่างเช่น *Lactobacillus* และ *Bifidobacterium* ซึ่งเป็นกลุ่มโปรไบโอติกที่ดีที่สุดทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ทนต่อกรดและเกลือน้ำดีทำให้สามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการเป็นโปรไบโอติกรวมทั้งสามารถสร้างกรดอินทรีย์ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งเชื้อก่อโรค (สุรัตน์ วังพิกุล และปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์, 2564)

การทำปลาส้มเป็นการถนอมอาหารวิธีหนึ่ง แพร่หลายในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เป็นการแปรรูปปลาสดปรุงด้วย ปลา เกลือ กระเทียม ข้าวสุก หมักจนมีรสเปรี้ยว ใช้ปลาทั้งตัวและใช้เฉพาะเนื้อปลา ก่อนรับประทานทำให้สุกด้วยทอดและปลาส้มเป็นอาหารหมักพื้นบ้านที่มีมาแต่โบราณโดยอาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบ ผลิตภัณฑ์ที่ได้มักมีคุณภาพไม่แน่นอน และเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักอาจเป็นโทษต่อผู้บริโภคได้ ผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่ดีต้องมีความเปรี้ยวที่พอดีเหมาะกับการบริโภค ซึ่งความเปรี้ยวของปลาส้มนั้นมาจากกิจกรรมการหมักจากจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวในการเปลี่ยนรูปกลูโคสที่ได้มาจากการย่อยของส่วนผสมที่มีองค์ประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติก กรดอะซิติก ซึ่งเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่าแบคทีเรียที่มีความปลอดภัย (สุริศา กัณหา และคณะ, 2564)

การผลิตปลาส้มโดยใช้วิธีดั้งเดิมที่มีการสืบทอดต่อกันมารุ่นสู่รุ่นของแต่ละครัวเรือน โดยจะมีการใช้เชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติภายใต้การปรับสภาวะ เช่น ความเข้มข้นของเกลือ การใช้เครื่องเทศ เพื่อให้แบคทีเรียแลคติกเจริญ ลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นที่ไม่เกี่ยวข้อง อย่างไรก็ตามการปรับสภาวะดังกล่าวไม่สามารถควบคุม จุลินทรีย์ได้ทั้งหมด อาจมีจุลินทรีย์อื่นที่ไม่เกี่ยวข้องปนเปื้อนอยู่ในปลาส้ม ทำให้รสชาติ กลิ่น และสีของผลผลิตไม่คงที่ ถึงแม้จะทำจากสูตรเดียวกันจึงไม่สามารถก้าวสู่มาตรฐานการส่งออกได้ (พนิตนาฎ อู่พุฒินันท์ และวราภรณ์ กุศลารักษ์, 2563)

ในภาคใต้มีวิธีการผลิตปลาส้มที่แตกต่างจากทางภาคกลางและภาคอีสาน คือ ไม่ใส่กระเทียมและข้าวสวย แต่จะใช้น้ำเชื่อมและข้าวคั่วแทน ทำโดยนำปลาน้ำจืดมาขอดเกล็ดและควักเอาไส้ออกล้างทำความสะอาดและทิ้งให้สะเด็ดน้ำ จากนั้นนำไปคลุกเคล้ากับเกลือ น้ำเชื่อมและข้าวคั่ว บรรจุในภาชนะที่ปิดสนิท หมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 8-12 วัน จะได้ปลาส้มที่ในบางท้องถิ่นอาจเรียกว่า ปลาใส่อวนหรือปลาเปรี้ยวหรือปลาพอง ในการผลิตปลาส้มของแต่ละแห่งนั้นจะมีสูตรการคัดเลือกใช้วัตถุดิบชนิดปลาสัดส่วนระหว่างส่วนผสมตลอดจนขั้นตอนวิธีการและระยะเวลาในการหมักปลาที่แตกต่างกัน จึงทำให้รสชาติและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ที่ได้มีความแตกต่างกันไป ความเปรี้ยวในปลาส้มนั้นเกิดจากกิจกรรมการหมักจากจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเฉพาะตัวในการเปลี่ยนกลูโคสที่ได้มาจากการย่อยส่วนผสมที่มีองค์ประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติกจึงเรียกจุลินทรีย์กลุ่มนี้ว่าแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria) โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นจุลินทรีย์กลุ่มใหญ่ที่พบในปลาส้ม (พิทยา ใจดำ และภัทรนารี แก้วเจริญ, 2562)

ปลาที่นำมาแปรรูปเป็นปลาที่มีอยู่ในพื้นที่ อำเภอธารโต เป็นพื้นที่ที่มีแหล่งน้ำอุดมสมบูรณ์ จึงเป็นแหล่งที่มีปลาตะเพียนจำนวนมากและเป็นวัตถุดิบหลักเนื่องจากปลาตะเพียนตัวเล็ก เมื่อนำมาหมักเกลือจะทั่วถึงทำให้ปลาไม่มีกลิ่นคาวเนื้อหวาน รสชาติกำลังพอดี ไม่เปรี้ยวจนเกินไป ทอดแล้วไม่ติดกระทะ เนื้อไม่แตก ด้วยแนวคิดภูมิปัญญาชาวบ้านใช้พัดลมเป่าไล่น้ำให้ปลาสะเด็ดน้ำและที่สำคัญข้าวก็จะคั่วใหม่ๆเพื่อให้ได้กลิ่นหอม

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีแนวโน้มมีคุณสมบัติโปรไบโอติกบางประการเพื่อพัฒนาคุณภาพการทำปลาส้มโดยใช้กล้าเชื้อบริสุทธิ์

2. วิธีดำเนินการวิจัย

2.1 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากปลาส้มในท้องถิ่น

การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาส้ม ต.แม่หวาด อ.ธารโต จ.ยะลา จำนวน 3 ตัวอย่าง ชั่งตัวอย่างปลาส้มจำนวน 25 กรัม เจือจางใน NaCl 0.85% ปริมาตร 225 ml ความเจือจาง 10^{-1} ถึง 10^{-8} ทำการทดลองตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ดูดใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS Agar ที่มี Bromocresol purple 0.04% เป็นอินดิเคเตอร์ และบ่มใน Anaerobic Jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกเฉพาะโคโลนีที่อาหารเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลืองเขี่ยลงบนอาหาร MRS Agar และอาหาร NA (Nutrient gar) นำโคโลนีเดี่ยวที่ได้ตรวจสอบชีวเคมีและศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาโดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram´s Stain) และทดสอบชีวเคมี (Kopermsub *et al*., 2006)

2.2 ทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติกบางประการ

ทดสอบความสามารถในการหมักโดยเกลี่ยแบคทีเรียแลคติกลง MRS broth มีค่าพีเอชเริ่มต้น 6.5 ที่บรรจุหลอดดักก๊าซ (Durham tube) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมงวัดค่าความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter และสังเกตฟองก๊าซในหลอดดักก๊าซทำการบันทึกผลถ้าเกิดฟองก๊าซเป็นการหมักแบบให้ผลผลิตสุดท้ายหลายตัว (heterofermentative) กรณีไม่เกิดฟองเป็นการหมักแบบให้ผลผลิตสุดท้ายส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติก (homofermentative) โดยทำการทดสอบทั้งหมด 3 ซ้ำ (พนิตนาฎ อู่พุฒินันท์ และวราภรณ์ กุศลารักษ์, 2563)

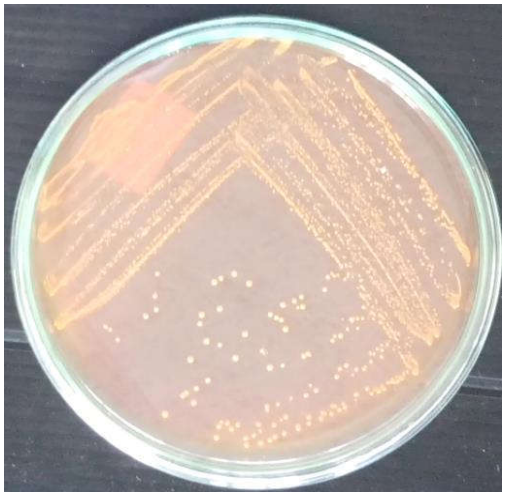
3. ผลการวิจัย

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้มใน ต.แม่หวาด อ.ธารโต จ.ยะลา จำนวนตัวอย่างปลาส้มจาก อ.ธารโต จำนวน 3 ตัวอย่าง เมื่อนำไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มีการเติม Bromocresol purple แบคทีเรียกรดแลคติกจะเปลี่ยนสีของอาหาร MRS agar จากสีน้ำตาลอมม่วงเป็นสีเหลืองแสดงถึงความสามารถของการสร้างกรดแลคติกโดยคัดเลือกจากระดับความเจือจางที่ 10^{-6}, 10^{-7} CFU/ml และสามารถคัดแยกเชื้อได้จำนวน 3 ไอโซเลต จากทั้งหมด 9 ไอโซเลต คิดเป็น 33.33% ได้แก่ ไอโซเลต A1, ไอโซเลต A2, ไอโซเลต A3 คิดเป็นจีนัส *Lactobacillus* spp. ซึ่งแต่ละไอโซเลตมีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันจากนั้นนำมาคัดแยกให้บริสุทธิ์และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกมาจำนวน 3 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนคู่ และรูปท่อนเดี่ยว ดังแสดงในตารางที่ 1 และรูปภาพที่ 1

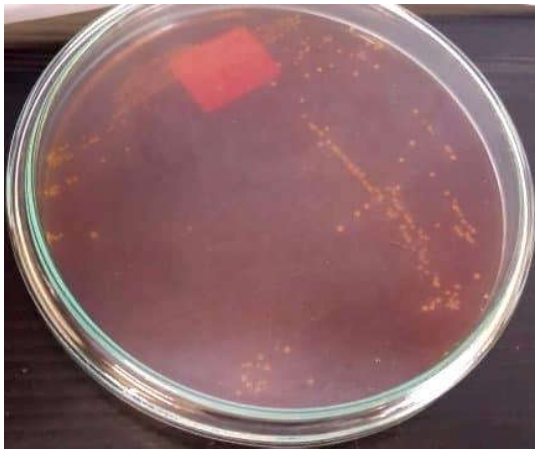
ตารางที่ 1 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติก (ไอโซเลต A1, ไอโซเลต A2, และไอโซเลต A3) บนผิวหน้าอาหาร MRS Bromocresol purple agar

ไอโซเลต	สี	ขอบ	Colony Morphology	ขนาดของโคโลนี (mm)
A1	สีเหลืองมันวาว	เรียบ	กลมนูน	2.45
A2	สีเหลืองขุ่น	เรียบ	กลมนูน	1.6
A3	สีเหลืองออกส้ม	เรียบ	กลมนูน	2.55

ไอโซเลต A1



ไอโซเลต A2

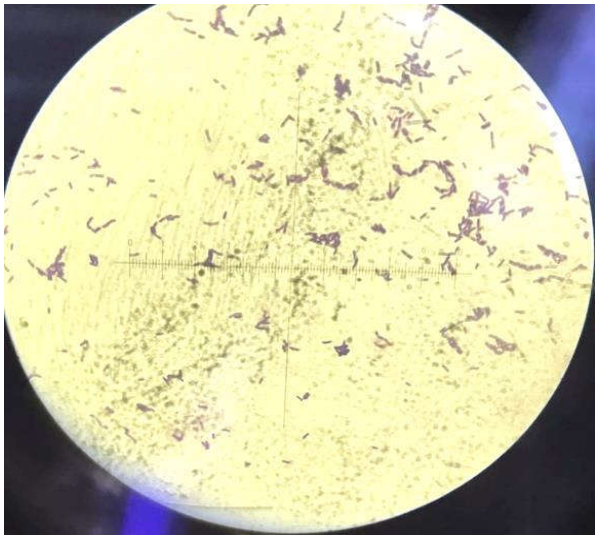


ไอโซเลต A3

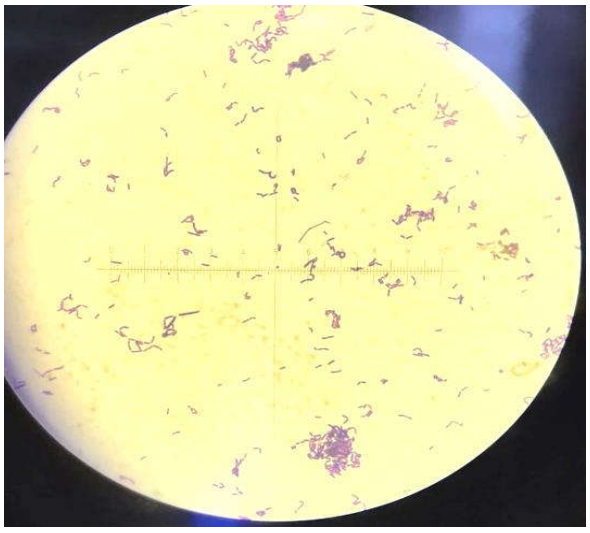
ภาพที่ 1 ลักษณะของโคโลนีแบคทีเรียกรดแลคติกบนผิวหน้าอาหาร MRS Bromocresol purple agar ที่ผสม 0.04% บ่มใน Anaerobic Jar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 2 ลักษณะสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก

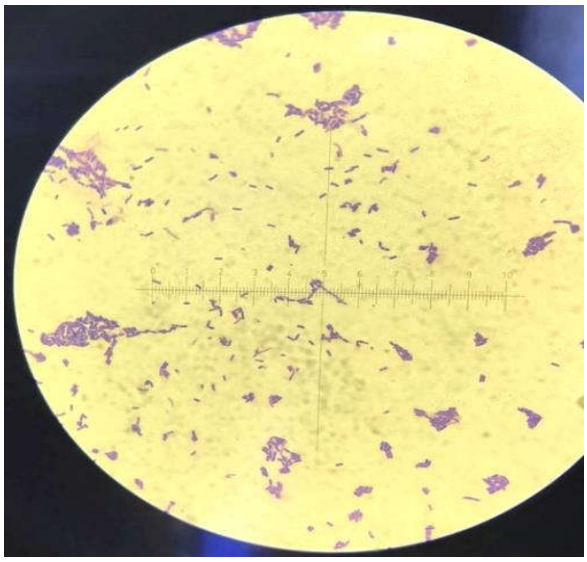
ไอโซเลต	**การติดย้อมแกรม**	**ลักษณะเซลล์ใต้กล้อง/การจัดเรียงตัวของเซลล์**	**ขนาดของเซลล์ (μm)**
A1	บวก	ท่อน สั้น/เดี่ยว	0.6×3
A2	บวก	ท่อน สั้น/เดี่ยว คู่	0.6×2
A3	บวก	ท่อน สั้น/เดี่ยว คู่	0.6×3



ก



ข



ค

ภาพที่ 2 การย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยายภาพ 1000X)

ก. ไอโซเลต A1 ข. ไอโซเลต A2 ค. ไอโซเลต A3

จากการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต มาทดสอบการเจริญใน NaCl 4% และการเจริญใน NaCl 8% พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต มีปริมาณในการเจริญที่แตกต่างกัน และเมื่อนำมาทดสอบการเคลื่อนที่ การสร้างเอนไซม์ Catalase พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ไม่มีการเคลื่อนที่และไม่มีการสร้างเอนไซม์ Catalase ดังแสดงในตารางที่ 3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 3 ไอโซเลต มาทำการทดสอบชีวเคมี มีแนวโน้มว่าจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* sp. เนื่องจากผลการทดสอบการย่อยน้ำตาล และการสร้างแก๊ส พบว่าแบคทีเรีย ไอโซเลต A1 สามารถย่อยน้ำตาล Fructose, Xylose, Galactose, Glucose ส่วนแบคทีเรียไอโซเลต A2 สามารถย่อยน้ำตาล Galactose และแบคทีเรียไอโซเลต A3 สามารถย่อยน้ำตาล Fructose, Galactose, Sucrose, Glucose และพบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างแก๊สได้ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 คุณสมบัติทางสรรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลต

คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี	ไอโซเลต A1	ไอโซเลต A2	ไอโซเลต A3
Growth at NaCl 4%	+++	++++	++
Growth at NaCl 8%	++	++++	-
Motility test	-	-	-
Catalase test	-	-	-
Arabinose	-/+	-/+	+/+
Fructose	+/+	-/+	+/-
Xylose	+/+	-/+	-/+
Galactose	+/+	+/+	+/-
Sucrose	-/+	-/+	+/+
Maltose	-/+	-/+	-/+
Raffinose	-/+	-/+	-/+
Glucose	+/+	-/+	+/-

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และไม่มีการเคลื่อนที่ , ++ หมายถึง มีการเจริญน้อยใน NaCl
-/+ หมายถึง ไม่ย่อยน้ำตาล/เกิดแก๊ส , +++ หมายถึง มีการเจริญในระดับปานกลาง NaCl
+/+ หมายถึง ย่อยน้ำตาล/เกิดแก๊ส , ++++ หมายถึง มีการเจริญมากใน NaCl
+/- หมายถึง ย่อยน้ำตาล/ไม่เกิดแก๊ส
- หมายถึง ไม่มีการเจริญใน NaCl

จากการทดสอบความสามารถในการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากปลาส้มคอกช้างเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 ไอโซเลต มาทำการทดสอบในอาหาร MRS broth ที่มีหลอดดักแก๊ส พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต A1 และแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต A2 เกิดฟองก๊าซเป็นการหมักแบบให้ผลผลิตสุดท้ายหลายตัว (Heterofermentative) มีค่า pH = 3.72 และมีค่า pH = 3.68 ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต A3 ไม่เกิดฟองก๊าซเป็นการหมักแบบให้ผลผลิตสุดท้าย (Homofermentative) มีค่า pH = 3.52 ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ทดสอบความสามารถในการหมัก

ไอโซแลต	การสร้างก๊าซ	pH
A1	เกิดฟองก๊าซ	3.72
A2	เกิดฟองก๊าซ	3.68
A3	ไม่เกิดฟองก๊าซ	3.52

4. อภิปรายผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้มสามารถคัดเลือกจากระดับความเจือจางที่ 10^{-6}, 10^{-7} CFU/ml และสามารถจำแนกได้จำนวน 3 ไอโซเลต เนื่องจากผลิตภัณฑ์ปลาส้ม ที่นำมาคัดแยกเชื้อมีปริมาณน้อยในการเจอเชื้อ ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับปัจจัยการผลิตหลายประการ เช่น ขั้นตอนการผลิตวัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ส่วนผสม และเครื่องปรุง

แบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้มมีแนวโน้มจัดอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus* spp. สอดคล้องกับรายงานของ อังคณา ชมภูมิ่ง และคณะ (2553) ที่ได้คัดแยกเชื้อบริสุทธิ์จากปลาส้มด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มีการเติม Bromocresol purple 0.04 เปอร์เซ็น สามารถคัดแยกได้ 57 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส เช่นเดียวกับงานวิจัยของ ผุสดี ตังวัชรินทร์ และคณะ (2559) รายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้จากเนื้อหมักที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ได้ทั้งหมด 375 ไอโซเลต แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสจำนวน 354 ไอโซเลต และเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจำนวน 325 ไอโซเลต โดยมีเซลล์ที่มีรูปท่อน 259 ไอโซเลต

ผลการทดสอบชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้มที่คัดแยกไอโซเลต A3 ได้ เมื่อนำมาเทียบเคียงผลการทดสอบชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้รายงานโดย Sagar Aryal (2019) ซึ่งได้ศึกษาเกี่ยวกับ *Lactobacillus* spp. พบว่าผลการทดสอบน้ำตาลบางชนิดมีความสอดคล้องกันมาก โดยจากการงานวิจัยนั้นบ่งชี้ว่าเป็น *L. acidophilus* ซึ่งเชื้อชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Homolactic fermentation และรายงานวิจัยของ นวัฒน์ เกตุสวัสดิวงศ์ และธีระชัย ธนานันต์ (2559) รายงานว่าการทดสอบชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากน้ำพริกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน สามารถคาดเดาได้ว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* spp. เนื่องจากสกุลนี้หลายสายพันธุ์มีลักษณะเป็นรูปท่อน โดยส่วนใหญ่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิดที่เกิดจากการหมัก ที่สามารถเป็นโปรไบโอติกจะอยู่ในกลุ่ม Homolactic fermentation จากงานวิจัยของ วิศรุต ศิริพรกิตติ (2563) ได้ศึกษาเกี่ยวกับผลของการใช้คาร์โบไฮเดรตและอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อคุณภาพปลาส้มเส้น พบว่าผลิตภัณฑ์ปลาส้มสามารถคัดแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกชนิด *L. plantarum, L. pentosus, L. fermentum* และพบ *Pediococcus pentosaceus*. เป็นกลุ่มหลักในช่วงแรกที่พบแบคทีเรียแบบ Homofermentative ทุกไอโซเลต และรองลงมาตรวจพบ *L. plantarum* ซึ่งสาเหตุที่ตรวจไม่พบแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกกลุ่ม Heterofermentative อาจเนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารเจริญได้ดีในช่วงปริมาณเกลือไม่สูงมากนัก

จากการทดสอบความสามารถในการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าไอโซเลต A3 มีความเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกมากที่สุดเนื่องจากแบคทีเรียไอโซเลต A3 จัดอยู่ในกลุ่ม Homofermentative ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ พนิตนาฎ อู่พุฒินันท์ และวราภรณ์ กุศลารักษ์ (2563) ได้ศึกษาเกี่ยกับการหมักของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* NM4-2 และ PS1-3 ให้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ประมาณร้อยละ 85 (Homofermentative) เป็นคุณลักษณะที่เหมาะสมในการใช้โปรไบโอติกในร่างกาย เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลคติกเป็นหลักทำให้ค่าความเป็นกรดด่างในระบบทางเดินอาหารต่ำลงจนจุลินทรีย์ก่อโรคไม่สามารถเจริญได้ นอกจากนี้เมื่อใช้เชื้อในกลุ่ม Homofermentative เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกได้ประมาณร้อยละ 85-95 จากการหมักคาร์โบไฮเดรต มีการผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลแลคโตสแล้วซึมผ่านเข้าสู่เซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยเอนไซม์ที่อยู่บริเวณเยื่อหุ้มไซโทพลาซึม เชื้อที่พบในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus casei, L. delbrueckii, L. plantarum* และ *Lactococcus lactis subsp. lactis*

(สุแพรวพันธ์ โลหะลักษณาเดช และคณะ, 2563) เป็นหัวเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักอาหารประเภทต่าง ๆ ปริมาณกรดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นจะทำให้กระบวนการหมักเสร็จสิ้นเร็วกว่าเดิม ส่วน Heterofermentative bacteria เป็นแบคทีเรียกลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกร้อยละ 50 ส่วนที่เหลือเป็นกรดอะซิติก (Acetic acid) แอลกอฮอล์ (Alcohol) และคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จากการหมักคาร์โบไฮเดรต เชื้อที่พบในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus brevis*, *L. bifermentans, L. fermentum, Leuconostoc lactis* และ *L. mesenteroides* (สุแพรวพันธ์ โลหะลักษณาเดช และคณะ, 2563)

ในการประยุกต์ใช้เชื้อในการหมักจะใช้เชื้อในกลุ่มไอโซเลต A3 เนื่องจากการทดสอบความสามารถในการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าไอโซเลต A3 ไม่เกิดฟองแก๊ส เป็นกรด และเป็นการหมักแบบให้ผลผลิตสุดท้าย (Homofermentative) และในการหมักปลาส้มควรใช้หัวเชื้อแบบผสมดีที่สุด เนื่องจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของปลาส้มกำหนดไว้ว่าค่าความเป็นกรดด่างของปลาส้มต้องมีค่าไม่เกิน 4.6 ซึ่งชุดการทดลองที่ใส่หัวเชื้อบริสุทธิ์มีค่าต่ำกว่า 4.6 ในขณะที่ปลาส้มแบบธรรมชาติมีค่าความเป็นกรดด่างต่ำสุดอยู่ที่ 4.61 และพบปริมาณแบคทีเรียแลคติกสูงสุดในปลาส้มที่มีการใส่เชื้อผสมลงไปค่าความเป็นกรดด่าง ปริมาณกรด และปริมาณของแบคทีเรียแลคติกมีค่าลดลงในวันที่ 7 ผลการทดลองชี้ให้เห็นว่ากระบวนการหมักปลาส้มควรมีระยะเวลาการหมักไม่เกิน 5 วัน (Sanpa *et al*., 2019)

5. สรุปและเสนอแนะ

การทดสอบความสามารถในการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าไอโซเลต A3 มีความเป็นแบคทีเรียโปรไบโอติกมากที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต A3 จัดอยู่ในกลุ่ม Homofermentative หากทำการศึกษาต่อเพื่อนำโปรไบโอติกมาใช้ควรศึกษาเกี่ยวกับการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี, สภาวะจำลองกรดในกระเพาะอาหาร, การทนต่อค่าความเป็นกรดด่างต่ำ 2-9, ฤทธิ์ในการต้านจุลินทรีย์ก่อโรค และต้องมีการทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกให้ครบถ้วน

การใช้เชื้อในการหมักจะใช้เชื้อในกลุ่มไอโซเลต A3 เนื่องจากการทดสอบความสามารถในการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าไอโซเลต A3 ไม่เกิดฟองแก๊ส เป็นกรด และเป็นการหมักแบบให้ผลผลิตสุดท้าย (Homofermentative)

6. กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณหลักสูตรจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

7. เอกสารอ้างอิง

นวัฒน์ เกตุสวัสดิวงศ์ และธีระชัย ธนานันต์. (2559). การคัดกรองแบคทีเรียกรดแลคติกจากน้ำพริก. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีไทย*, 5(1), 68-76.

ณัฐกฤตา ภู่ทับทิม และวานิดา แซ่จึง. (2559). การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกและใช้เป็นต้นเชื้อบริสุทธิ์ในการหมักปลาส้ม. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 24(6), 963-966.

ผุสดี ตังวัชรินทร์, จิรโรจน์ นิธิสันถวะคุปต, และกานต์ สุขสุแพทย์. (2559). การคัดแยกและการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติความเป็นโปรไบโอติกเบื้องต้นจากผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก. *วารสารเกษตรพระจอมเกล้า,* 34(2), 67-76.

พิทยา ใจดำ และภัทรนารี แก้วเจริญ. (2562). ผลของพันธุ์ข้าวเหนียวไทยต่อการเกิดกลิ่นหืนและการยอมรับของปลาส้ม. *วารสารวิชชา*, 38(2), 14-26.

พนิตนาฎ อู่พุฒินันท์ และวราภรณ์ กุศลารักษ์. (2563). การศึกษาคุณสมบัติของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในกระบวนการหมักปลาส้ม. *วารสารนเรศวรพะเยา*, 13(2), 42-50.

สุแพรวพันธ์ โลหะลักษณาเดช, ชุตินุช สุจิตร และดำรง โลหะลักษณาเดช. (2563). *การเปลี่ยนแปลงคุณภาพของไตปลาหมักในระหว่างกระบวนการหมักที่ลดปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ร่วมกับกรดอินทรีย์และการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ไตปลาพร้อมปรุง.* (รายงานวิจัย). : ตรัง. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย วิทยาเขตตรัง

สุรัตน์ วังพิกุล และปริยาภรณ์ อิศรานุวัฒน์. (2564). การแยกและคัดเลือกแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกจากผลิตภัณฑ์ผักดองพื้นบ้านของไทย. *วารสารมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ*, 9(2), 150-163.

สุริศา กัณหา, ศราวุธ เถาว์โท, สุกัญญา ชอบธรรม, และมิตรประชา ดาชาพิมพ์. (2564). การทำปลาส้มตัวจากปลาสร้อยขาวที่เป็นเอกลักษณ์ตามแบบภูมิปัญญาของชุมชนกรณีศึกษาบ้านท่าค้อ ตำบลขุมเงิน อำเภอเมืองยโสธร จังหวัดยโสธร. *วารสารการพัฒนาชุมชนและคุณภาพชีวิต*, 9(2), 234-243.

วิศรุต ศิริพรกิตติ. (2563). ผลของการใช้คาร์โบไฮเดรตและอุณหภูมิการเก็บรักษาต่อคุณภาพปลาส้มเส้น. *วารสารกองวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ,* (1), 1-24.

อังคณา ชมภูมิ่ง, ตะวัน ฉัตรสูงเนิน, และธวัชชัย ชัยธวัชวิถี. (2553). *การปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ปลาส้ม ด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ : กรณีศึกษาพื้นที่จังหวัดแพร และจังหวัดพะเยา*. (รายงานการวิจัย). : พะเยา. มหาวิทยาลัยแม่โจ้.

Sagar Aryal. (2019). Biochemical Test of *Lactobacillus* spp. Search 15 May 2019, From https://microbenotes.com/biochemical-test-of-lactobacillus-spp

Sanpaa, S., Sanpaa, S., and Suttajit, M. (2019). Lactic acid bacteria isolates from Pla-som, their antimicrobial activities and fermentation properties in Pla-som. *Jounal l of Food Health and Bioenvironmental Science*, 12(1), 36-43.