นิพนธ์ต้นฉบับ

โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสำหรับประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสะวิรัติ

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล[1] ดวงพร คันธโชติ [2] และ วราภรณ์ วุฑฒะกุล[3]

Abstract

Charernjiratrakul, W., Kantachote, D. and Vuddhakul, V.

Probiotic lactic acid bacteria for applications in vegetarian food products

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2007, 29(4) : 981-991

Total of 225 isolates of lactic acid bacteria were isolated from 152 samples of various fermented foods. The strains were investigated for their probiotic properties based on stability in bile salt (0.30%) and high acidity (pH 3), growth under both aerobic and anaerobic conditions, ability to grow without vitamin B12. According to the above criteria, 40 isolates were selected. Using an agar spot method, 16 isolates were able to inhibit *Salmonella typhimurium, S. typhi, S. enteritidis, S. paratyphi* and 4 strains of *E. coli* O157 : H7 as clear zone greater than 10 mm. Moreover, utilization of protein or fat or starch was also considered. Only 5 isolates were able to utilize protein and further selected for antibiotics sensitivity test. The selected isolates were susceptible to following antibiotics: ampicillin, chloramphenicol, erythromycin , kanamycin, tetracycline and vancomycin; however they were resistant to ceptazidime and norfloxacin. They all showed better growth in vegetarian medium (coconut juice medium) than MRS medium both under static and shaking conditions. Five active isolates were identified as *Lactobacillus plantarum* LL13, LN18, LP11, LS35 and *Pediococcus pentosaceus* LT02 by API 50 CH system. All cultures grew well in carrot juice by reducing pH

Department of Microbiology, Faculty of Science, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkla, 90112 Thailand.

[1]วท.ม. (จุลชีววิทยา) รองศาสตราจารย์ [2]Ph.D. (Soil Science) รองศาสตราจารย์ [3]Ph.D. (Microbiology) รองศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail : wilawan.c@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 7 กันยายน 2549 รับลงพิมพ์ 30 มกราคม 2550

from 6.4 to below 4.0 after 24 h of fermentation at 35°C. The lactic cultures in fermented carrot juice lost their viability about 2 log cycles after 15 days of cold storage at 4°C.

Key words : lactic acid bacteria, probiotic, vegetarian food products, fermented foods

บทคัดย่อ

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ดวงพร คันธโชติ และ วราภรณ์ วุฑฒะกุล

โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสำหรับประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารมังสะวิรัติ

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2550 29(4) : 981-991

การแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย จำนวน 152 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 225 สายพันธุ์ นำเชื้อมาทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติก ได้แก่ การทนต่อเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้น 0.30% ทนต่อกรดที่ระดับพีเอช 3 เจริญได้ทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน เจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบี 12 สามารถคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติดังกล่าวได้ 40 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar spot พบแบคทีเรียแลกติก 16 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *Salmonella typhimurium, S. typhi S. enteritidis S. paratyphi* และ *E. coli* O157 : H7 4 สายพันธุ์โดยมีขอบวงใสของการยับยั้งมากกว่า 10 มม. คัดเลือกเชื้อได้ 5 สายพันธุ์ที่สามารถย่อยโปรตีนได้ดี และเมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบกับยาปฏิชีวนะ พบว่า ทุกสายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin chloramphenicol erythromycin kanamycin tetracycline และ vancomycin แต่ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ceptazidime และ norfloxacin แบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์มีการเจริญในอาหารที่ปราศจากแหล่งที่มาจากเนื้อสัตว์ (อาหารน้ำมะพร้าว) ได้ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการเขย่า และเมื่อบ่งชี้ชนิดโดยใช้ API 50 CH พบว่า เป็น *Lactobacillus plantarum* LL13 LN18 LP11 LS35 และ *Pediococcus pentosaceus* LT02 ทุกสายพันธุ์เติบโตได้ดีในน้ำแครอท โดยสามารถทำให้น้ำแครอทหมักลดพีเอชจาก 6.4 ลงต่ำกว่า 4.0 เมื่อการหมักผ่านพ้นไป 24 ชั่วโมง ที่ 35°C และเมื่อเก็บรักษาน้ำแครอทหมักไว้ที่เย็นอุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 15 วัน จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก ลดลงประมาณ 2 log

ปัจจุบันความต้องการในการบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่เกี่ยวกับสุขภาพเพิ่มขึ้นอย่างมาก ดังนั้นจึงทำให้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพที่เฉพาะมากขึ้น ผลิตภัณฑ์ที่ได้รับความสนใจอย่างหนึ่งคือ อาหารเสริมโปรไบโอติกซึ่งมีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งก่อประโยชน์ให้กับสุขภาพของผู้บริโภคในการคงไว้หรือช่วยปรับสภาพความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Saarela *et al.*, 2000) กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุให้เกิดมะเร็ง ป้องกันและรักษาโรคท้องร่วงทั้งที่เกิดจากแบคทีเรียและไวรัส เป็นต้น (Kaur *et al.*, 2002; Reid, 1999) แบคทีเรียที่มีสมบัติที่เหมาะสมในการใช้เป็นโปรไบโอติก ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก ส่วนใหญ่เป็นสกุล *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียเหล่านี้ทนกรดและเกลือน้ำดี ทำให้สามารถอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นสมบัติที่สำคัญในการเป็นโปรไบโอติก (Reid, 1999; Vinderola and Reinheimer, 2003; Cebeci and Gurakan, 2003) รวมทั้งสามารถสร้างกรด เปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซินในการต่อต้านการเติบโตของเชื้อก่อโรค (Saarela *et al.*, 2000) เนื่องจากในปัจจุบันผลิตภัณฑ์อาหารโปรไบโอติกที่จำหน่ายในท้องตลาดส่วนใหญ่อยู่ในรูปผลิตภัณฑ์นม (Saarela *et al.*, 2000) เช่น ยาคูลท์และนมเปรี้ยวชนิดต่างๆ เท่านั้น ในขณะที่ผู้บริโภคอาหารมังสะวิรัติได้เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างมากในทุกภูมิภาค แต่ยังไม่มีผลิตภัณฑ์มังสะวิรัติเสริมโปรไบโอติก จึงทำให้ผู้บริโภคที่เป็นมังสะวิรัติหรือผู้ที่ไม่ชอบบริโภคผลิตภัณฑ์นมขาดโอกาสในการได้รับประโยชน์จากแบคทีเรียโปรไบโอติก (Heenan *et*

al., 2004) ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักจากพืชให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ นำมาคัดเลือกสมบัติซึ่งทดสอบได้ในห้องปฏิบัติการว่าเหมาะสมสำหรับใช้เป็นโปรไบโอติก ความสามารถในการเติบโตและการอยู่รอดในอาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารจากสัตว์เพื่อการนำไปประยุกต์ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมังสะวิรัติ รวมทั้งทดลองหมักและศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในอาหารหมักจากพืช เพื่อเป็นแนวทางที่จะช่วยเพิ่มความปลอดภัยและสุขภาพที่ดีของผู้บริโภคกลุ่มมังสะวิรัติหรือผู้ที่ไม่นิยมบริโภคผลิตภัณฑ์นม รวมทั้งเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคทุกกลุ่มอีกด้วย

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. อาหารหมักที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแลกติก

อาหารหมักจากพืช เช่น ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง ข้าวหมาก ซีเซ็กฉ่าย สะตอดอง ขนมจีน หัวไชโป๊ หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง และตั้ง-ฉ่าย ตัวอย่างเหล่านี้เก็บจากตลาดสดหรือตลาดนัดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา และผักดองชนิดต่าง ๆ ที่หมักเองในห้องปฏิบัติการ เช่น หน่อไม้ดอง ผักเสี้ยนดอง กระหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง เพื่อเก็บตัวอย่างทุกวันของอายุการหมัก เพราะแบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทในการหมักแต่ละระยะจะแตกต่างกัน จำนวนรวม 152 ตัวอย่าง

2. การแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างอาหารหมัก streak บนอาหาร MRS agar (De Man Rogosa and Sharpe agar (Difco)) ที่เติม bromocresol purple 0.04% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม เก็บโคโลนีเชื้อที่รอบโคโลนีเป็นสีเหลือง และมีลักษณะโคโลนีแตกต่างกัน มาทำให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ streak บนอาหาร MRS agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. นำมาย้อมสีแกรม ดูการติดสี รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ถ้าเป็นแบคทีเรียแลกติกติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน MRS agar slant

3. การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ไปทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ แต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ ดังนี้

3.1 การทนต่อเกลือน้ำดี

นำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากข้อ 2 มา streak ลงบน MRS agar ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดี (bile salt) 0.30% แล้วนำเชื้อมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วตรวจดูการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร

3.2 การทนต่อกรด

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.1 ถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 6 มล ที่มีการปรับ pH ด้วย 1 N HCl ให้ได้ 3 และ 4 นำเชื้อมาบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร

3.3 การเจริญในสภาวะที่มี และไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.2 ถ่ายลงใน MRS broth เชื้อละ 4 หลอด แบ่งเชื้อเป็น 2 ชุด คือ ชุดที่ 1 คลายฝาเกลียว เก็บในโถไร้ออกซิเจน (anaerobic jar) พร้อม Gas Pak Anaerobic system (BBL) แล้วนำไปบ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ชุดที่ 2 นำไปบ่มในตู้บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญของเชื้อโดยวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่มีความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร เปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญทั้ง 2 สภาวะ

3.4 การเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามิน B12

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 3.3 ถ่ายลงในหลอดอาหาร vitamin B12 assay medium (Difco) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูการเจริญโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง ด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร

3.5 ความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ทดสอบด้วยวิธีการยับยั้งบนอาหารแข็ง (agar spot method) (Spelhaug and Harlander, 1989) โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่เลี้ยงใน MRS broth จนมีอายุ 18

ชม. นำมาปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland (จำนวนประมาณ 10^8 CFU/มล.) จากนั้นเจือจางลงอย่างเป็นลำดับให้มีจำนวนเชื้อ 10^7 CFU/ มล. หยดลงบนอาหาร MRS agar เชื้อละ 5 ไมโครลิตร แต่ละเชื้อห่างกัน 3 ซม. จานละ 4 เชื้อ ทิ้งไว้ให้แห้ง บ่มเชื้อที่ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำมาเททับด้วย BHI soft agar มีวุ้นร้อยละ 0.7 ปริมาตร 7 มล ซึ่งมีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ จำนวนประมาณ 10^6 CFU/มล (แบคทีเรียก่อโรคที่ใช้ ได้แก่ *Salmonella typhimurium S. typhi S. enteritidis S. paratyphi., E. coli* O157 : H7 4 สายพันธุ์) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจผลการยับยั้ง คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ดีคือมีวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone) จากขอบแบคทีเรียแลกติกจนสุดขอบวงใสมากกว่า 10 มม. ไว้ศึกษาในขั้นต่อไป

3.6 ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง (Michael and Pelezar, 1995)

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้มา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Milk agar Casein agar Tributyrin agar และ Starch agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชม. ตรวจผลการย่อยโปรตีน ไขมัน โดยวัดวงใสรอบ ๆโคโลนีของเชื้อบนอาหาร Milk และ Casein agar การย่อยไขมัน โดยวัดวงใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อบนอาหาร Tributyrin agar ทดสอบการย่อยแป้งโดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนอาหาร Starch agar ถ้ามีการย่อยแป้งเกิดวงใสรอบ ๆ โคโลนี

3.7 การต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (ดัดแปลงจาก Charteris *et al.*, 1998)

ใช้ cotton swab ถ่ายแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ที่เลี้ยงใน MRS broth อายุประมาณ 18-24 ชม. ปรับให้มีความขุ่น 0.5 Mc Farland (จำนวนประมาณ 10^8 CFU/มล) นำไปป้าย (swab) ให้ทั่วผิวหน้าของอาหาร MRS agar แล้วปล่อยให้แห้ง 3-5 นาที จากนั้นวาง anti-biotic discs ได้แก่ penicillin G (10μg) ampicillin (10μg) cephalothin (30μg) ceftazidime (30μg) cefoperazone (75μg) vancomycin (30μg) bacitracin (10μg, gentamicin (10μg) kanamycin (30μg) streptomycin (10μg) tetracycline (30μg) chlor-amphenicol (30μg) erythromycin (15μg) norfloxacin (10μg) และ polymyxin B (30μg) วางลงบนบริเวณที่ป้ายเชื้อไว้ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. รายงานผลโดยการวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสการยับยั้ง (inhibition zone) แล้วนำผลที่ได้มาเปรียบเทียบเพื่อดูว่าเชื้อดังกล่าว ไว (susceptible) หรือต้านทาน (resistant) ต่อยาปฏิชีวนะนั้น ๆ

4. ความสามารถในการเติบโตในอาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารจากสัตว์

นำเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ซึ่งมีจำนวนประมาณ 10^4 CFU/มล. ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth และอาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารจากสัตว์ ได้แก่ soy peptone yeast extract agar (SPY2) (ในอาหาร 1 ลิตรประกอบด้วย soy peptone, yeast extract และน้ำตาลกลูโคส อย่างละ 25 กรัม) (Heenan *et al.*, 2002) อาหารน้ำมะพร้าว (ในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 5 กรัม sodium acetate 5 กรัม amonium citrate 2 กรัม Tween 80 1 มล. น้ำมะพร้าวแก่ 1 ลิตร) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. นับจำนวนเชื้อโดยวิธี spread plate บน MRS agar แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม. และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญใน MRS broth SPY2 และอาหารน้ำมะพร้าว คัดเลือกเชื้อที่สามารถเติบโตได้ดีในอาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารจากสัตว์ไว้ศึกษาต่อไป โดยนำไปหาค่าเวลาในการแบ่งตัว (generation time) ของเชื้อแบคทีเรียแลกติกในอาหารที่ปราศจากแหล่งอาหารจากสัตว์ที่เชื้อเจริญเติบโตได้ดีเปรียบเทียบกับอาหาร MRS โดยศึกษาทั้งสภาวะที่มีการเขย่า 150 รอบ/นาที และสภาวะที่ไม่เขย่า เก็บตัวอย่างทุก 3 ชม. จนครบ 28 ชม. วัดความขุ่นที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร เขียนกราฟการเจริญ หาค่าเวลาในการแบ่งตัว

5. การบ่งชี้ชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยใช้ API 50 CH ของบริษัท Biomerieux

6. การหมักและความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ในอาหารหมักจากพืชและการควบคุมเชื้อก่อโรค

6.1 การหมักน้ำแครอท

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ที่มีอายุ 24 ชม. จำนวน 0.1 ml ถ่ายลงในอาหารเหลวน้ำมะพร้าวปริมาตร 10 มล. นำไปบ่มที่มีอุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. นำมาปรับให้มีจำนวนเชื้อเริ่มต้นมากกว่า 10^6 CFU/มล. ใส่ในหลอดทดลองขนาด 25x200 มม. ที่บรรจุน้ำแครอทที่ไม่มีการเติมส่วนประกอบอื่นที่ปราศจากเชื้อ 15 มล. หมักไว้ที่ 35°C ตรวจนับจำนวนเชื้อ วัดพีเอช ปริมาณกรด ปริมาณน้ำตาล หลังการหมักที่ 0 24 48 และ 72 ชม. นำน้ำแครอทหมักที่ได้มาทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรค โดยใช้น้ำแครอทหมักปริมาตร 100 µl หยดในถ้วย (cup) ที่วางบนอาหาร BHI agar ที่มี *E. coli* O157: H7 และ *Salmonella typhi* บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม. ตรวจผลการยับยั้ง โดยวัดจากวงใสของการยับยั้ง (inhibition zone)

6.2 ศึกษาความสามารถในการอยู่รอดในน้ำแครอทหมัก

ศึกษาผลการเก็บรักษาน้ำแครอทหมักไว้ที่อุณหภูมิ 4°C ต่อการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยเก็บน้ำแครอทหมักหลัง 72 ชั่วโมงที่ได้จากข้อ 6.1 ไว้ที่ อุณหภมิ 4°C โดยนำมาตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่เหลือรอดโดยวิธี pour plate ทุก 3 วันเป็นเวลา 15 วัน

ผลการทดลอง และวิจารณ์

การเก็บตัวอย่างอาหารหมักจากพืช ได้แก่ ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง สะตอดอง หน่อไม้ดอง กระเทียมดอง กะหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง ซีเซ็กฉ่าย หัวไชโป๊ ตั้งฉ่าย ข้าวหมาก และขนมจีน จำนวนรวม 152 ตัวอย่าง สามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 225 สายพันธุ์ (Table 1) เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ ไปทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ การอยู่รอดในระบบทางเดินอาหารโดยการทนต่อเกลือน้ำดีที่ระดับความเข้มข้น 0.30% และทนต่อกรดในกระเพาะอาหารซึ่งที่ระดับพีเอช 3 (Erkkila and Petaja, 2000) พบว่า แบคทีเรียแลกติกสามารถทนต่อเกลือน้ำดี 0.3% ได้จำนวน 156 สายพันธุ์ สามารถทนต่อกรดพีเอช 3 ได้ 69 สายพันธุ์ (มีค่าการดูดกลื่นแสงที่ 660 นาโนเมตรมากกว่า 0.2) และเมื่อนำมาทดสอบการเจริญทั้งในสภาวะที่มีออกซิเจน เพื่อความสะดวกในการผลิตเชื้อจำนวนมากรวมถึงการเก็บรักษาเชื้อ และสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนเพื่อความจำเป็นในการนำไปใช้ในระบบทางเดินอาหารซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ที่พบในระบบทาง

Table 1. Lactic acid bacteria from fermented foods.

Fermented foods	No. of collected samples	No. of detected samples	Percent detected samples	No. of isolates
Fermented vegetable (Puk-sian-dong)	22	22	100.0	34
Fermented vegetable (Puk-gard-dong)	26	20	76.9	36
Fermented vegetable (Naw-mai-dong)	46	46	100.0	75
Fermented vegetable (Sa-taw-dong)	15	15	100.0	39
Fermented vegetable (Kra-tium-dong)	8	3	37.5	6
Fermented vegetable (Hao-chai-po)	9	1	11.1	1
Fermented vegetable (See-jek-sai)	2	0	0	0
Fermented vegetable (Tang-sai)	1	0	0	0
Fermented vegetable (Sauerkraut)	11	11	100	21
Fermented vegetable (pickle)	5	5	100	7
Fermented rice (Khao-mark)	3	2	66.7	4
Fermented rice (Thai noodle)	4	1	25.0	2
Total	152	126	82.9	225

เดินอาหารไม่ต้องการออกซิเจน (Salminen and Wright, 1993) พบว่า เชื้อจำนวน 40 สายพันธุ์สามารถเจริญทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน รวมทั้งเจริญในอาหารที่ปราศจากวิตามินบี 12 (มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตรมากกว่า 1.0) และเมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคที่เป็นข้อกำหนดในเกณฑ์คุณภาพของอาหารหมักจากพืชของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์คือ *E. coli* และ *Salmonella* พบว่า เมื่อทดสอบโดยวิธี agar spot มีแบคทีเรียแลกติก 16 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium, S. typhi S. enteritidis S.paratyphi., E. coli* O157 : H7 4 สายพันธุ์ โดยมีวงใสการยับยั้งจากขอบเชื้อจนสุดวงใส มากกว่า 10 มม. การยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องมาจากการที่แบคทีเรียแลกติกสร้างกรด ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน หรือสร้างสารยับยั้งตัวอื่นๆ (วิลาวัณย์, 2543) ทั้งนี้แม้โปรไบโอติกหลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินได้ แต่แบคเทอริโอซินส่วนใหญ่จะยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น ดังนั้นสารยับยั้งพวกกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติกที่โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นจึงมีความสำคัญมากกว่าเนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งได้กว้างกว่าโดยสามารถยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่ก่อโรค (Ogawa *et al.*, 2001; Saarela *et al.*, 2000) นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 16 สายพันธุ์มาทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง พบว่า เชื้อ

Table 2. Properties used to select lactic acid bacteria for use as probiotics.

Probiotic properties	Number of strains tested	Number of strains selected
Stability in bile salt	225	156
Stability at low pH	156	69
Growth aerobically and anaerobically	69	40
Ability to grow without vitamin B12	40	40
Inhibition of pathogens	40	16
Utilization of protein, fat or starch	16	5

Table 3. Antibiotic susceptibility of selected strains of lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables.

Antibiotics	Isolates of lactic acid bacteria				
	LL13	LN18	LP11	LS35	LT02
Penicillin G (10µg)	M	M	R	M	M
Ampicillin (10µg)	S	S	S	S	S
Ceptazidime (30µg)	R	R	R	R	R
Cefoperazone (75µg)	R	R	R	S	R
Vancomycin (30µg)	S	S	S	S	S
Bacitracin (10µg)	R	S	R	R	R
Kanamycin (30µg)	S	S	S	S	S
Streptomycin (10µg)	S	M	R	S	S
Tetracycline (30µg)	S	S	S	S	S
Chloramphenicol (30µg)	S	S	S	S	S
Erythromycin (15µg)	S	S	S	S	S
Norfloxacin (10µg)	R	R	R	R	R
Polymyxin B (30µg)	M	M	R	M	M

R : Resistant M : Moderately susceptible S : Susceptible

ทั้ง 16 สายพันธุ์ ไม่สามารถย่อยไขมันและแป้งได้ แต่สามารถคัดเลือกเชื้อที่สามารถย่อยโปรตีนได้ จำนวน 5 สายพันธุ์ (Table 2) ได้แก่ LL13 LN18 LP11 LS 35 และLT02 การที่เชื้อมีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีนช่วยในการทำงานของระบบย่อยอาหาร ทำให้ร่างกายสามารถดูดซึมสารอาหารเหล่านี้ไปใช้ได้เร็วขึ้น นำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้มาทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ 13 ชนิด โดย disc diffusion พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์มีแบบแผนการต้านต่อยาแตกต่างกัน โดยเชื้อ LP11 ต้านต่อยามากที่สุดคือ 7 ชนิด เชื้อทั้ง 5 สายพันธุ์ไวต่อยาปฏิชีวนะ ampicillin vancomycin kanamycin tetracycline chloramphenicol และ erythromycin และดื้อต่อยาปฏิชีวนะ ceptazidime และnorfloxacin (Table 3) ซึ่งสำหรับแบคทีเรียแลกติกพวกแลกโตแบซิลัสแม้มีการดื้อยาโดยธรรมชาติอย่างกว้างขวางแต่การดื้อยาส่วนใหญ่ของแลกโตแบซิลัสไม่ใช่ลักษณะที่ถ่ายทอดได้ นอกจากนี้พลาสมิดที่เกี่ยวกับการดื้อยาก็พบได้ยากในแลกโตแบซิลัส จึงปลอดภัยต่อการใช้เป็นโปรไบโอติก (Saarela *et al.*, 2000)

การผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกมังสะวิรัติต้องปราศจากส่วนประกอบที่มาจากเนื้อสัตว์ รวมถึงอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์โปรไบโอติกด้วย ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทดสอบความสามารถในการเจริญในอาหารที่ปราศจากเนื้อสัตว์ ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ใช้อาหาร SPY2 ซึ่งเป็นอาหารที่ มีส่วนประกอบ คือ soy peptone, yeast extract และน้ำตาลกูลโคส อย่างละ 25 กรัม/ลิตร (Heenan *et al.*, 2002) และอาหารน้ำมะพร้าวซึ่งในอาหาร 1 ลิตร ประกอบด้วย yeast extract 5 กรัม sodium acetate 5 กรัม ammonium citrate 2 กรัม Tween 80 1 มล. น้ำมะพร้าวแก่

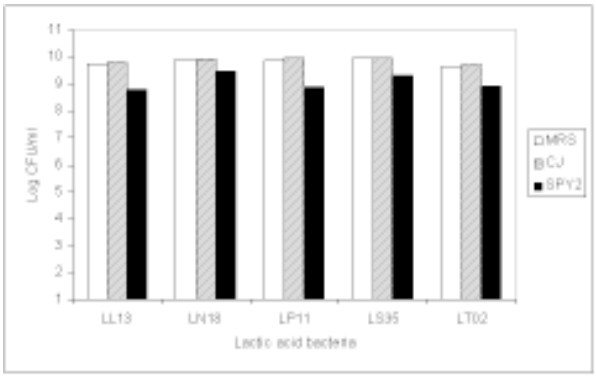

Figure 1. Growth of selected strains of lactic acid bacteria in MRS medium and vegetarian medium (Coconut juice (CJ), SPY2) based on viable cells at 35°C 24 h.

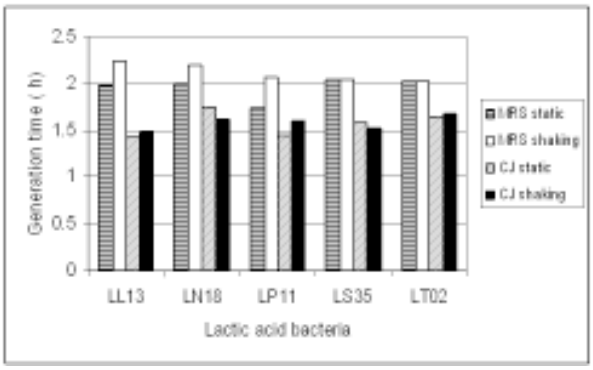

Figure 2. Generation time of selected strains of lactic acid bacteria in MRS medium and vegetarian medium (Coconut juice medium (CJ)) under static and shaking conditions at 35°C.

Table 4. Identification of selected lactic acid bacteria from fermented vegetables by API 50 CH system (bioMerieux, France).

Strain designation	Source	Genus and species		% Similarity
LL13	Kra ñlum-pee-dong	*Lactobacillus*	*plantarum*	99.9
LN18	Nor -mai-dong	*Lactobacillus*	*plantarum*	99.9
LP11	Puk-sian-dong	*Lactobacillus*	*plantarum*	87.3
LS35	Sa-taw-dong	*Lactobacillus*	*plantarum*	99.9
LT02	Tang-kwa-dong	*Pediococcus*	*Pentosaceus*	99.2

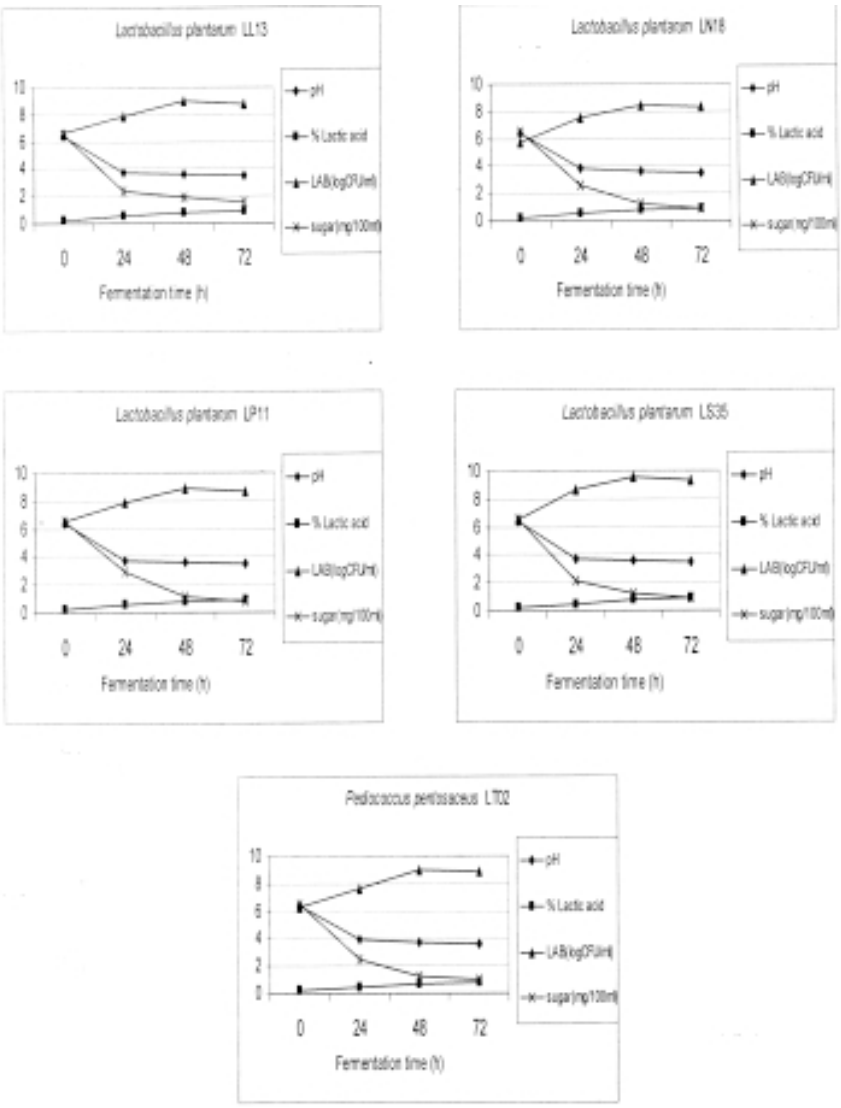

Figure 3. Time course of lactic fermentation of carrot juice by selected strains of lactic acid bacteria

1 ลิตร โดยเปรียบเทียบกับการเจริญในอาหาร MRS broth พบว่าแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์สามารถ เจริญในอาหารน้ำมะพร้าวได้ใกล้เคียงกับ MRS broth ในขณะที่สามารถเจริญในอาหาร SPY2 ได้น้อยกว่า (Figure 1) เมื่อนำไปหาค่า generation time พบว่าอาหารน้ำมะพร้าวให้ค่าที่สั้นกว่า MRS broth ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีการเขย่า (Figure 2) อาหารน้ำมะพร้าวจึงเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกสำหรับผู้บริโภคอาหารมังสวิรัติได้

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ไปบ่งชี้ชนิด โดยใช้ API 50 CH ของบริษัท Biomerieux พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ LL13 LN18 LP11 LS 35 และ *Pediococcus pentosaceus* LT02 1 สายพันธุ์ (Table 4) ในขณะที่โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่ใช้กันในทางการค้าในปัจจุบัน

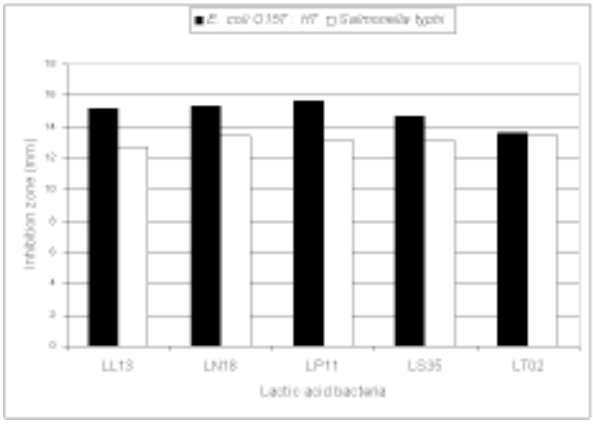

Figure 4. Inhibition of pathogens by fermented carrot juice with selected strains of lactic acid bacteria at 72 h of fermentation.

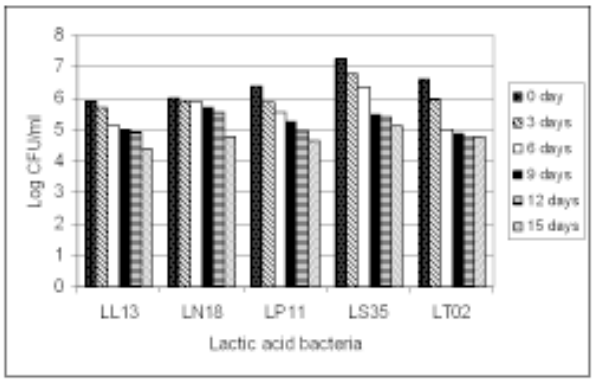

Figure 5. Effect of cold storage (4°C) on viability of lactic culture in fermented carrot juice

ส่วนใหญ่ ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* *L. casei* *L. rhamnosus* และ *Bifidobacterium* spp. (Saarela *et al.*, 2000; Kaur *et al.*, 2002; Ouwehand *et al.*, 2001) โดยผลิตจำหน่ายในรูปของแคปซูล เม็ด หรือเสริมในอาหารประเภทนมหมัก (Kaur *et al.*, 2002) แต่ก็มีการศึกษาที่พบว่า *Lactobacillus plantarum* มีสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นโปรไบโอติกเช่นกัน (Ccbeci and Gurakan, 2003) เห็นได้ว่าถ้ามีการนำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปทดลองใช้ในการผลิตอาหารประเภทอื่นที่ไม่ใช้ผลิตภัณฑ์นมเพื่อเพิ่มทางเลือกให้กับผู้บริโภคจึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง จึงได้นำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 5 สายพันธุ์ไปทดลองใช้ในการหมักน้ำแครอท ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้สามารถเจริญและหมักน้ำแครอทที่ไม่มีการเติมส่วนประกอบอื่นใดได้ หลังการหมักที่ 35°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง *L. plantarum* LS 35 มีการเจริญดีที่สุดโดยมีจำนวนเชื้อประมาณ 10^9 CFU/มล. ส่วนอีก 4 สายพันธุ์มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/มล. หลังจากนั้นจะมีการเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อไม่มากนัก (Figure 3) แต่อย่างไรก็ตาม เชื้อทุกสายพันธุ์สามารถหมักและทำให้พีเอชเริ่มต้นของน้ำแครอทที่ 6.4 ลดลงต่ำกว่า 4.0 คือจะลดลงเป็น 3.75-3.88 หลังจากการหมักไปแล้ว 24 ชม. ในขณะที่เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกมีค่าเพิ่มขึ้นเป็น 0.49-0.56 และเมื่อหมักต่อไปถึง 72 ชม. เปอร์เซ็นต์กรดแลกติกเพิ่มขึ้นเป็น 0.83-0.88 (Figure 3) และเมื่อนำน้ำแครอทที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์เป็นเวลา 72 ชม. มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรีย

อินดิเคเตอร์ 2 สายพันธุ์ พบว่า น้ำแครอทที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *E. coli* O157 : H7 ได้ดีกว่า *Salmonella typhi* (Figure 4) คือมีวงใสการยับยั้งเป็น 13.6-15.7 และ 12.2-13.5 ตามลำดับ ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้ส่วนหนึ่งมาจากกรดที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นนั้นเองเนื่องจาก *E. coli* O157 : H7 และ *Salmonella typhi* เป็นแบคทีเรียก่อโรคที่ไม่สามารถทนกรดได้ ในขณะที่น้ำแครอทที่ไม่ผ่านการหมักไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 2 สายพันธุ์

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่า โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ สามารถอยู่รอดในน้ำแครอทหมักได้ในระดับหนึ่ง คือจากการเก็บรักษาน้ำแครอทที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 72 ชม. ไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 4°C พบว่าจำนวนแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ในน้ำแครอทหมักจะลดลงตามระยะเวลาในการเก็บ โดยจำนวนเชื้อจะลดลงไปประมาณ 2 log หลังจากเก็บไว้เป็นเวลา 15 วัน (Figure 5) ซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการทดลองของ Yoon และคณะ (2005) ที่พบว่าในน้ำบีทหมักเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จำนวนของ *L. casei* และ *L acidophilus* ลดลงประมาณ 1 และ 2 log ตามลำดับ และในน้ำกะหล่ำปลีหมัก จำนวนของ *L. plantarum* และ *L. delbrueckii* ลดลงประมาณ 1 log เช่นกัน แต่สำหรับ *L. casei* ไม่สามารถอยู่รอดได้เลย เมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 สัปดาห์ (Yoon *et al.*, 2006) สำหรับจำนวนเชื้อของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่ต่ำที่สุดในผลิตภัณฑ์ที่จะก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้บริโภคสูงสุด ควรเป็น 10^6 CFU/มล. (Shah, 2001) ดังนั้นการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์ในระหว่างการเก็บรักษาจึงเป็นสิ่งสำคัญอย่างมาก ซึ่งปัจจัยที่มีผลต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียโปรไบติกเหล่านี้ ได้แก่ การขาดแคลนอาหาร การมีสารยับยั้ง เช่น กรดในผลิตภัณฑ์ ระยะเวลาและอุณหภูมิในการเก็บ (Shah, 2001) ซึ่งจากการทดลองครั้งนี้ พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 4 สายพันธุ์มีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดในน้ำแครอทหมักหลังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ 4°C 15 วัน สูงกว่า 10^6 CFU/มล มีเฉพาะ *L. plantarum* LL13 เท่านั้นที่มีจำนวนเชื้อที่เหลือรอด 10^5 CFU/มล. ดังนั้นเพื่อประโยชน์สูงสุดของผู้บริโภคจะได้นำโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 5 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ไปทดลองพัฒนาการหมักผลิตภัณฑ์ในรูปแบบต่างๆ เพื่อให้มีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดในระหว่างการเก็บรักษาให้สูงขึ้นและสามารถเก็บรักษาได้นานขึ้นต่อไป

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ ประจำปี 2548

เอกสารอ้างอิง

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรีย ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22(2): 177-189.

Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli,L. and Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. J. of Food Prot. 61(12) : 1636-1643.

Cebeci, A. and Gurakan, C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. Food Microbiol. 20: 511-518.

Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. J. Meat Sci., 55 : 297-300.

Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W. and Flect, G.H. 2002. Growth medium for culturing probiotic bacteria for applications in vegetarian food products. Lebensm-Wiss.u.-Technol. 35 : 171-176.

Heenan, C.N., Adams, M.C., Hosken, R.W. and Flect, G.H. 2004. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. Lebensm-Wiss.u.-Technol. 37 : 461-466.

Kaur, I. P., Chopra, K. and Saini, A. 2002. Probiotics: potential pharmaceutical applications. Eur. J. of Pharmace. Sci. 15 : 1-9.

Michael, J. and Pelezar, J. 1995. Hydrolysis of polysaccharide protein and lipid. **In** laboratory exercises in microbiology. New York : MC Graw-Hill. pp. 126-188.

Ogawa, M., Shimizu, K., Nomoto, K., Tanaka, R., Hamabata, T., Ymasaki, S.,Takeda, T. and Takeda,

Y. 2001. Inhibition of *in vitro* growth of shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus strains* due to production of lactic acid. Int. J. Food Microbiol. 68 : 135-140.

Ouwehand, A.C., Tuomola, E.M., Tolkko, S. and Salminen, S. 2001. Assessment of adhesion properties of novel probiotic strains to human intestinal mucus. Inter. J. of Food Microbiol. 64:119-126.

Reid, G. 1999. The scientific basis for probiotics strains of *Lactobacillus*. Appl. Environ. Microbio. 60: 3763-3766.

Saarela, M., Mogensen, G.,Fonden, R., Matto, J. and Mattila-Sandholm,T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. J. of Biotechnol. 84 : 197-215.

Salminen, S and Wright, A.V. 1993. Lactic acid bacteria. New York : Marcel Dekker Inc. 442 pp.

Shah, N.P. 2001. Functional foods from probiotics and prebiotics. Food Technol. 55 : 46-53.

Spelhaug, S.R. and Halander, S.K. 1989. Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactic* and *Pediococcus pentasaceous*. J. Food Prot. 52 : 856-862.

Vinderola, C.G. and Reinheimer, J.A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: acomparative "*in vitro*" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Research Inter., 36 : 895-904.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. 2005. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. Lebensm-Wiss.u.-Technol. 38 : 73-75.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E. and Hang, Y.D. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. Bioresource Tecnol. 97 : 1427-1430.