

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารช่วยให้ผู้บริโภคมีสุขภาพดีโดยการช่วยรักษาหรือปรับปรุงจุลินทรีย์ในลำไส้ให้มีความสมดุล (Fuller, 1989) และสามารถต่อต้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคด้านการเกิดมะเร็ง กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน และสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเช่น กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน ไบโตามีนเค และไบโตามีนบี (Saarela และคณะ, 2000 ; Robinson และคณะ, 2002) โดยอาจนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมในรูปแคปซูลหรือเม็ดหรืออาจนำมาใช้ในการผลิตถั่วงอกสำหรับทำผลิตภัณฑ์อาหารหมักและในบางครั้งอาจนำมาเติมในอาหารเพื่อช่วยให้อาหารมีคุณสมบัติของโพรไบโอติกหรือการทำงานของเชื้อโพรไบโอติก (Mattila-Sandholm และคณะ, 2002) ซึ่งก่อนการนำเชื้อโพรไบโอติกมาใช้ในอาหารนั้นควรทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเสียก่อนเพื่อทำให้ได้จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีคุณลักษณะเหมาะสมและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Saarela และคณะ, 2000) คุณลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้แก่ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน (Cowley, 1988) การมีชีวิตรอดจากการเผชิญสภาพกรด และสภาพน้ำดีในระบบทางเดินอาหารได้จึงเกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ รวมทั้งต้องสามารถทนต่อสภาพที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการหมักของอาหารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Saarela และคณะ, 2000 ; Sander และคณะ, 1999) จากรายงานการศึกษาของ Budde และคณะ (2003) เกี่ยวกับคุณสมบัติของเชื้อ *Leuconostoc carnosum* 4010 ที่แยกจากผิวของชิ้นหมูแฮมมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี spot test พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้หลายสายพันธุ์และเมื่อเร็วๆนี้ Thapa และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SM:T1 ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปลาตากแห้งและรมควัน (sukako maacha) พื้นเมืองแถบหิมาลัยตะวันออกของประเทศเนปาล และอินเดียด้วยวิธี agar spot พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* และ *Staphylococcus aureus* ได้นอกจากนี้ Ghalifi และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาระบบแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 พบว่าสามารถต้านเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ปลาชาลมอนรมควัน ในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ จากความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารหมักนี้เองจึงทำให้แบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อโพรไบโอติกหลายชนิดถูกนำมาผลิตเป็นถั่วงอกให้กับผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ดังนั้นถ้าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อโพรไบโอติกจากเนื้อปลาสดหรือปลาหมักซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งได้นำมาใช้ผลิตกล้าเชื้อในการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมักอาจช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ *S. aureus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *Coliform* และ fecal coliform ที่อาจปนเปื้อนในวัตถุดิบ ซึ่งทำให้ผู้บริโภคลดความเสี่ยงอันเกิดจากจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายเหล่านี้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากเนื้อปลาสดและແหมมปลาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้แก่ *S. aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *L. monocytogenes* ด้วยเทคนิค agar spot test และการที่จะได้รับประโยชน์จากจุลินทรีย์โพรไบโอติก จุลินทรีย์จะต้องมีชีวิตรอดในทางเดินอาหาร โดยจะต้องทนต่อกรดและน้ำดี ดังนั้นทดลองนี้จึงมีการศึกษาคุณสมบัติการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียที่คัดเลือกอีกด้วย

ในการผลิตกล้าเชื้อโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะผลิตอยู่ในรูปแช่แข็งแห้งเนื่องจากสะดวกในการขนส่งและเก็บรักษา (Champagne และคณะ. 1991 ; Gölker. 1993) แต่การผลิตกล้าเชื้อในรูปแช่แข็งแห้งมักเกิดปัญหาการรอดชีวิตและประสิทธิภาพของเชื้อที่ต่ำลงมากหลังจากผ่านการแช่แข็งแห้ง (Gilland. 1985) ดังนั้นจึงมีการทดลองนำสารป้องกันเซลล์มาใช้ในการป้องกันหรือบรรเทาการบาดเจ็บของเซลล์ในระหว่างที่เซลล์ถูกทำแห้งหรือเก็บรักษา (Champagne และคณะ. 1991 ; Souza. 1992) สารป้องกันเซลล์ที่นำมาใช้ในการผลิตกล้าเชื้อได้แก่ แกลูโตส ซูโครส โมโนโซเดียมกลูตาเมต (monosodium glutamate, MSG) และแอสคอร์เบต (ascorbate) ในน้ำนมหรือน้ำเป็นต้น (Mäyrä-Mäkinen และ Bigret. 1998) แต่ในสารบางชนิด เช่นนมถั่วเหลืองซึ่งมีสารประกอบที่มีคุณค่าหลายชนิด ได้แก่ โปรตีนในปริมาณสูงเช่นเดียวกับนมวัว และยังประกอบด้วย ไขมัน คาร์โบไฮเดรต แคลเซียม ฟอสโฟรัส ไรโบฟลาวิน (riboflavin) ธาตุเหล็ก และไทอามิน (thiamin) และไนอาซิน (niacin) (Liener. 1978) และไข่แดงซึ่งมีส่วนประกอบของโปรตีนถึงร้อยละ 33 และไขมันอีกหลายชนิด ได้แก่ ไตรกลีเซอไรด์ ฟอสโฟลิปิด และคลอเรสเตอรอล (Zeidler และคณะ. 1994) ที่อาจมีผลช่วยป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งแห้ง แต่ยังมีการศึกษาไม่มากนัก ดังนั้นการศึกษาผลของการป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งแห้งของสารทั้งสองชนิดนี้อาจทำให้ได้สารป้องกันเซลล์จากการแช่แข็งแห้งชนิดใหม่ๆ เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ถ้าหากใช้สารป้องกันเซลล์หลายๆ ชนิดร่วมกันอาจทำให้เชื้อโพรไบโอติกมีการอยู่รอดหลังการแช่แข็งแห้งสูงขึ้น ดังเช่นจากการศึกษาของ Palmfeldt และคณะ (2003) พบว่าเชื้อ *Pseudomonas chlororaphis* ในสารป้องกันเซลล์ที่ประกอบด้วยหางนม 50 กรัมต่อลิตร ทรีฮาโลส 50 กรัมต่อลิตร และกรดแอสคอร์บิก 1 กรัมต่อลิตร ทำให้เชื้อมีการอยู่รอดร้อยละ 4.3 ซึ่งสูงกว่าการใช้หางนมเป็นสารป้องกันเพียงอย่างเดียว (200 กรัมต่อลิตร) ที่มีอัตราการอยู่รอดเพียงร้อยละ 0.6 แต่อย่างไรก็ตามเชื้อโพรไบโอติกในสารป้องกันผสมเมื่อผ่านการแช่แข็งแห้งไม่สามารถอยู่รอดได้ทั้งหมด ดังนั้นจึงต้องศึกษาวิธีปรับปรุงการอยู่รอดให้ดีขึ้น หนึ่งในหลายวิธีการปรับปรุงการอยู่รอดคือการปรับตัวให้เกิดการป้องกันข้าม (cross protection) ที่เกิดจากการนำเชื้อมาปรับตัวต่อความเครียดหนึ่ง

ชนิด ซึ่งช่วยให้ต้านทานต่อความเครียดอีกชนิดหนึ่งได้ (Juneja และ Novak, 2003) ซึ่งได้มีผู้วิจัยเกี่ยวกับการอยู่รอดของเชื้อ *Escherichia coli* 0517:H7 ที่ผ่านการเผชิญกับสภาพเครียดจากความร้อน พบว่าเชื้อสามารถทนต่อกรดได้ดีขึ้น (Wang และ Doyle, 1998) และในปี ค.ศ. 1996 Leu และ Yousef ได้นำเชื้อ *L. monocytogenes* ในระยะ exponential phase ซึ่งเป็นเชื้อที่มีความเครียดอันเกิดจากสภาพแวดล้อมอยู่แล้วพบว่าเชื้อสามารถต้านทานต่อความร้อนที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้ (อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง) และยังช่วยเพิ่มความต้านทานต่อไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอทานอล และโซเดียมคลอไรด์ ได้อีกด้วย ขณะที่ Panoff และคณะ (2000) นำเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* spp. *bulgaricus* CIP 101027T มาปรับตัวต่อความดันออสโมติกด้วยสารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ ได้แก่ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ กลีเซอรอล แลคโตส ซูโครส และทรีฮาโลส ที่มีความเข้มข้น 0.3 โมลาร์ในอาหารเหลว MRS และบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเชื้อสามารถต้านทานต่อความเย็นได้มากขึ้น นอกจากการปรับตัวเพื่อให้เกิดการป้องกันข้ามนี้แล้ว การปรับตัวต่อความเย็นก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่ช่วยให้เชื้อเพิ่มความต้านทานต่อการแช่แข็งและเก็บรักษาเชื้อโดยการแช่แข็ง (Béal และคณะ, 2001 ; Fernandez Murga และคณะ, 2000) ซึ่งปี ค.ศ. 1999 Wouter และคณะ ได้นำเชื้อ *Staphylococcus thermophilus* มาปรับตัวต่อความเย็นอย่างฉับพลันที่อุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่ามีผลทำให้เชื้อมีอัตราการอยู่รอดหลังการแช่แข็งแห้งเพิ่มขึ้น และจากการศึกษาของ Kim และคณะ (1999) พบว่าเชื้อ *L. lactis* มีความต้านทานต่อการแช่แข็งแห้งเพิ่มขึ้นหลังจากการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดังนั้นจึงน่าสนใจที่จะศึกษาผลของการปรับตัวของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ต่อความดันออสโมติกและการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับความเย็นต่อการอยู่รอดหลังการแช่แข็งแห้งและการเก็บรักษาในสภาพแช่แข็งได้ดีขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นจากปลาสดและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

1.2.2 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งมีคุณสมบัติการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก ที่มีค่าความเป็นกรดต่ำ โซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำเค็มที่มีความเข้มข้นสูงได้ดี

1.2.3 เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้คัดเลือกโดยการศึกษาฐานวิทา การทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CH และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

1.2.4 เพื่อศึกษาผลของการใช้สารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ และทดสอบสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของแบคทีเรียกรดแลคติก

1.2.5 เพื่อศึกษาผลของการปรับตัวของแบคทีเรียกรดแลกติกต่อความดันออสโมติก และการปรับตัวต่อแรงดันออสโมติกร่วมกับการปรับตัวต่อความเย็นต่อการอยู่รอดของเชื้อหลังการแช่แข็งแห้ง และเก็บรักษา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นและสามารถทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก ที่มีค่าความเป็นกรดต่ำที่สุด โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงที่สุด จำนวน 2 ไอโซเลต พร้อมทั้งจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลกติกที่ถูกคัดเลือก จากนั้นศึกษาผลของสารป้องกันเซลล์ชนิดต่างๆ และสูตรสารป้องกันผสมต่อการอยู่รอดของเชื้อหลังการแช่แข็งแห้ง และศึกษาผลของการปรับตัวต่อความดันออสโมติก และการปรับตัวต่อความดันออสโมติกร่วมกับการปรับตัวต่อความเย็นต่อการอยู่รอดของเชื้อหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น และสามารถทนต่อกรดแลกติก กรดไฮโดรคลอริก ที่มีค่าความเป็นกรดต่ำ โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูง

1.4.2 ทราบสูตรผสมของสารป้องกันเซลล์ที่ทำให้แบคทีเรียโพรไบโอติกมีการอยู่รอดสูงหลังการแช่แข็งแห้งและเก็บรักษา

1.4.3 เป็นแนวทางในการผลิตกล้าเชื้อแช่แข็งแห้งของแบคทีเรียโพรไบโอติก ซึ่งอาจนำมาใช้ในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก และทำให้ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ได้เป็นอาหารที่ปลอดภัยและเกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภค

