

การคัดแยกและบทบาทของแบคทีเรียชอบเกลือและแบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือ  
ที่เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีในกระบวนการหมักปลาร้า  
Isolation and Role of Halophilic Bacteria and Halotolerant Lactic Acid Bacteria  
Involved in Biochemical Reactions in Fermented Fish Fermentation Process

สมเกียรติ ศีลสุทธิ์ สุภาณี ตำนวิริยะกุล อำนาจ ภัคดีโต\* จันทรรัตน์ พิชญณ

สันติธรรม โชติประทุม และจัชชดา อารยกาญจน์

Somkiat Seilsuth, Supanee Danviriyakul, Amnat Pakdeeto\*, Chantharat Phitchayaphon

Suntitham Chotipratoom and Tajchada Arayakarn

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรและชีวภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กรุงเทพฯ 10900

Program in Food Science and Technology, Faculty of Agriculture and Life Sciences

Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok, Thailand 10900

\*Corresponding author: amnat.p@chandra.ac.th

Abstract

Received: June 19, 2020

Revised: January 26, 2021

Accepted: May 25, 2021

The objectives of this study were to isolate and characterize microorganisms presented in fermented fish (*pla-ra*). Forty-two samples from *pla-ra* producers and vendors in Sapphaya district, Chainat province were collected for the isolation of halophilic and halotolerant lactic acid bacteria that may potentially produce enzymes necessary for the fermentation process. The salt (NaCl) content varied from 9.2 to 24.5% with pH from 4.57 to 7.13. The total halophilic bacteria count was found to be in the range of  $3.3 \times 10^5$  -  $2.1 \times 10^8$  CFU/g. Out of 181 isolated halophilic strains, only 10 showed the ability to produce different enzymes including *Halobacillus* sp. 10MK2-2A and 10SB1-2 (protease); *Halobacillus* sp. 10PL2-1 and 10BL1-5A and *Halococcus* sp. 10BL2-3 and 10CL2-2B (gelatinase); *Halobacillus* sp. 10BL2-1 and *Halococcus* sp. 10PJ1-5B (lipase); *Halobacillus* sp. 10BL1-1S (amylase); and *Halobacillus* sp. 10PY2-2 (gelatinase and lipase). There were 104 isolates of halotolerant lactic acid bacteria presented and identified as *Pediococcus*, *Weissella* and *Lactobacillus*. The inhibitory effect of antimicrobial activities against *Bacillus cereus* ATCC 9634<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538<sup>T</sup>, *Salmonella abony* NCTC6017<sup>T</sup>, *Escherichia coli* ATCC 8739<sup>T</sup> and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853<sup>T</sup> were observed from all sixteen strains of *Pediococcus* spp., *Weissella* spp. and *Lactobacillus* spp.

**Keywords:** halophilic bacteria, halotolerant lactic acid bacteria, fermented fish (*pla-ra*)

## บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทำการคัดแยกและศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียชอบเกลือและแบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการหมักและสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในผลิตภัณฑ์ปลาร้าจากโรงงานผลิต และผู้จำหน่ายปลาร้าอำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท เพื่อใช้เป็นแนวทางในการพัฒนาหัวเชื้อทำปลาร้า โดยจากการศึกษาคุณลักษณะทั่วไปของตัวอย่างปลาร้าจำนวน 42 ตัวอย่าง พบว่ามีปริมาณเกลือในช่วง 9.2-24.5% ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.57-7.13 และแบคทีเรียทั้งหมด  $3.3 \times 10^5 - 2.1 \times 10^8$  CFU/กรัม สามารถแยกแบคทีเรียชอบเกลือรูปร่างแท่งและกลมได้ 181 ไอโซเลต และมีแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกกว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้ 10 ไอโซเลต ได้แก่ *Halobacillus* sp. 10MK2-2A และ 10SB1-2 (ผลิตโปรติเอส) *Halobacillus* sp. 10PL2-1 และ 10BL1-5A และ *Halococcus* sp. 10BL2-3 และ 10CL2-2B (ผลิตเจลาติเนส) *Halobacillus* sp. 10BL2-1 และ *Halococcus* sp. 10PJ1-5B (ผลิตไลเปส) *Halobacillus* sp. 10BL1-1S (ผลิตอะไมเลส) และ *Halobacillus* sp. 10PY2-2 (ผลิตเจลาติเนสและไลเปส) จากแบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือที่แยกได้จำนวน 104 ไอโซเลตจัดอยู่ในสกุล *Pediococcus*, *Weissella* และ *Lactobacillus* พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือสายพันธุ์ *Pediococcus* spp. *Weissella* spp. และ *Lactobacillus* spp. จำนวน 16 สายพันธุ์ มีคุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย คือ *Bacillus cereus* ATCC 9634<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538<sup>T</sup>, *Salmonella abony* NCTC6017<sup>T</sup>, *Escherichia coli* ATCC 8739<sup>T</sup> และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853<sup>T</sup>

**คำสำคัญ:** แบคทีเรียชอบเกลือ แบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือ ปลาร้า

## คำนำ

ปลาร้า (*pla-ra*, fermented fish, salt-fermented fish) เป็นอาหารพื้นเมืองที่ได้รับความนิยมในการบริโภคทั่วทุกภาคของประเทศไทยรวมทั้งการส่งออก ปลาร้าเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักปลากับเกลือ ซึ่งอาจมีการเติมรำข้าว รำข้าวคั่ว หรือข้าวคั่ว (Sangjindavong *et al.*, 2008) ขึ้นอยู่กับภูมิปัญญาของแต่ละท้องถิ่น อำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท เป็นแหล่งผลิตปลาร้าที่มีชื่อเสียงแห่งหนึ่งของประเทศ มีโรงงานผลิตปลาร้า จำนวน 17 แห่ง เป็นอุตสาหกรรมระดับจังหวัดที่สามารถส่งปลาร้าออกจำหน่ายไปทั่วประเทศ การผลิตปลาร้าเป็นภูมิปัญญาดั้งเดิมที่ใช้ในการถนอมอาหาร เกลือที่เติมลงไปจะทำให้เกิดการเน่าเสีย โดยที่จุลินทรีย์บางชนิดยังสามารถเจริญได้ การผลิตปลาร้าด้วยภูมิปัญญาท้องถิ่นทั่วไปอาศัยกระบวนการหมักที่เกิดจากจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ ชาติความสม่ำเสมอของคุณภาพทั้งในแง่ของการควบคุมปริมาณเกลือที่ใช้และรสชาติของปลาร้าที่ได้ (Pumipan and Inmaung, 2016) รสชาติของปลาร้าแต่ละท้องถิ่นมีความเป็นเอกลักษณ์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับส่วนผสมและกรรมวิธีในการผลิต ซึ่งส่งผลให้เกิดความแตกต่างขององค์ประกอบและความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก (Mozzi *et al.*, 2013)

จุลินทรีย์ที่พบในกระบวนการหมักปลาร้า ได้แก่ *Halobacterium piscisalsi*, *Salinivibrio siamensis*, *Virgibacillus siamensis*, *Gracilibacillus thailandensis*, *Piscibacillus salipiscarius*, *Pediococcus halophilus*, *Lactobacillus acidipiscis*, *Weissella thailandensis* (Chamroensaksri *et al.*, 2009, 2010; Tanasupawat *et al.*, 2000, 2007, 2009, 2010; Yachai *et al.*, 2008) ส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียชนิดชอบเกลือปานกลาง (ร้อยละ 3-15) และชอบเกลือสูง (ร้อยละ 15-30) ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือเป็นพวกสามารถเจริญได้ทั้งสภาพมีเกลือและ

ไม่มีเกลือ โดยทั่วไปแบคทีเรียพวกนี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 5 หรือมากกว่า (Chaikulsareewath *et al.*, 2015; Namwong, 2010) ซึ่งมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติในการทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้นและให้ผลผลิตจากการหมักที่แตกต่างกัน รวมทั้งบทบาทในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียและทำให้เกิดโรค ซึ่งเป็นหน้าที่ที่จะช่วยส่งเสริมการผลิตอาหารที่ปลอดภัยได้อีกประการหนึ่ง (El Sheikha and Hu, 2018 อ้างใน Das *et al.*, 2020; Lee *et al.*, 2009) โดยมีรายงานการศึกษาความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก (LAB) ที่แยกได้จากอาหารหมักประเภทผักดอง กิมจิ และผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น *Lactobacillus plantarum* 307, *Lactobacillus brevis* 308, *Lactobacillus plantarum/pentosus* 358 (Grosu-Tudor and Zamfir, 2013) *Lactobacillus plantarum* 86, *Weissella cibaria* 92 (Patel *et al.*, 2014) *Lactococcus lactis* W8 (Mitra *et al.*, 2010) *Lactobacillus citreum* GJ7 (Chang *et al.*, 2007) และ *Lactococcus lactis* BH5 (Hur *et al.*, 2000) เป็นต้น

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียชอบเกลือและแบคทีเรียกรดแลคติกทนเกลือจากปลาร้า เพื่อใช้เป็นแนวทางในการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการหมักและคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค และเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาหัวเชื้อเริ่มต้นสำหรับปรับปรุงและพัฒนากระบวนการหมักปลาร้าต่อไป

### อุปกรณ์และวิธีการ

#### การเก็บตัวอย่าง การวิเคราะห์คุณภาพ และการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์

สุ่มตัวอย่างปลาร้าจำนวน 42 ตัวอย่าง จากโรงงานและผู้จำหน่ายปลาร้า 13 ราย อำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท มาทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง

(Seven Compact pH/ion meter S220, Mettler Toledo) วัดปริมาณเกลือ (NaCl) ด้วยวิธีการไทเทรตแบบมอห์รด้วยสารละลายมาตรฐาน 0.1M AgNO<sub>3</sub> โดยใช้เครื่องไทเทรตอัตโนมัติ (Titrator Excellence T5, Mettler Toledo) และตรวจนับแบคทีเรียชอบเกลือทั้งหมดด้วยวิธี Spread plate technique ลงบนอาหาร Halobacterium medium agar (JCM No. 377) (Chamroensaksri *et al.*, 2009) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 7 วัน จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนโคโลนี (CFU/กรัม)

#### การแยก การจำแนกชนิดแบคทีเรียและการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

ทำการแยกแบคทีเรียชอบเกลือดัดแปลงจากวิธีของ Chamroensaksri *et al.* (2009) ด้วยวิธี Spread plate technique บนอาหารแข็ง JCM No. 377 (NaCl 100 กรัม Casamino acid 5 กรัม Yeast extract 5 กรัม Sodium glutamic 1 กรัม KCl 2 กรัม Trisodium citrate 3 กรัม MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 20 กรัม FeCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.362 กรัม MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 0.0362 กรัม Agar 20 กรัม และ Distilled water 1,000 มล. และปรับ pH 7.2) ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 7 วัน เลือกเก็บโคโลนีเชื้อที่แตกต่างกันมาทำการศึกษาคูณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น รูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ สีโคโลนี การติดสีแกรม และการสร้างเอนไซม์แคตาเลส (Catalase) ส่วนการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทนเกลือทำตามวิธีการของ Tanasupawat *et al.* (2000) โดยการนำตัวอย่างปลาร้าใส่ในอาหารเหลว MRS บ่มเชื้อที่ 30°C. นาน 48 ชม. และนำน้ำหมักที่ได้มาทำการ Streak plate บนอาหารแข็งดัดแปลง (MRS ที่ประกอบด้วย CaCO<sub>3</sub> 0.5%) ที่ระดับความเข้มข้นเกลือ 5 และ 7% บ่มเชื้อที่ 30°C. นาน 3-5 วัน เลือกเชื้อที่มีการสร้างโซนใสรอบๆ โคโลนีไปศึกษาคูณสมบัติของเชื้อ โดยเฉพาะการสร้างแก๊สจากกลูโคส การเจริญที่ความเป็นกรด-ด่าง 4.4 และ 9.6 เกลือ 5 และ 7% ในอาหารเหลว MRS (Axelsson, 1998; Collins *et al.*,

1993; Dicks *et al.*, 1995) เก็บรักษาโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแต่ละชนิดในสารละลายกลีเซอรอล 10% ที่อุณหภูมิ -40 ถึง -50°C.

ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ทนเกลือที่แยกได้แต่ละชนิดด้วยการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็งในจานเพาะเชื้อที่อุณหภูมิ 30°C. เป็นเวลานาน 2 วัน จากนั้นถ่ายเชื้อลงในน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (w/v) ทำการปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากัน ( $OD_{600}=0.5$ ) ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer รุ่น Specord210 plus) ถ่ายสารละลายเชื้อปริมาณ 5% ลงในอาหารเหลว MRS บ่มที่ 30°C. นาน 5 วัน ทดสอบการสร้างกรดของเชื้อโดยการวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียด้วยวิธีการทดสอบแบบ Kirby-Bauer disk diffusion (Hudzicki, 2009) โดยนำกระดาษปลอดเชื้อ (Paper discs; Whatman™ Grade AA, Ø 6 มม., CAT no. 2017-006) จุ่มลงในอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Cultured medium) พอหมาดๆ นำมาวางทับบนเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 9634<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538<sup>T</sup>, *Escherichia coli* ATCC 8739<sup>T</sup>, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853<sup>T</sup> (ATCC, American Type Cultures Collection) และ *Salmonella abony* NCTC6017<sup>T</sup> (National Collection of Type Cultures (NCTC), England) ที่ถูกเกลี่ยไว้ก่อนบนอาหาร Nutrient agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30°C. นาน 3 วัน ทำการบันทึกผลการยับยั้งเชื้อ

#### การทดสอบประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์

ทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส เจลาติเนส ไลเปส และอะไมเลส ของเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือตามวิธีของ Chamroensakri *et al.* (2009) โดยเตรียมสารแขวนลอยเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือที่แยกได้แต่ละชนิดด้วยเกลือ 0.85% และปรับความขุ่นให้เท่ากัน ( $OD_{600}=0.5$ ) ถ่ายสารละลายเชื้อที่ได้ลงในอาหารเหลว JCM No. 377

บ่มที่อุณหภูมิ 37°C. นาน 7 วัน จากนั้นนำกระดาษปลอดเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มม. จุ่มสารละลายเชื้อพอหมาดๆ และวางทับบนอาหารแข็งทดสอบแต่ละชนิด (ความเป็นกรด-ด่าง 7.2) ประกอบด้วย Casein agar (JCM No.377 agar ที่ใส่ Skim milk 1% แทน Casamino acid) Starch agar (JCM No.377 agar + Soluble starch 10%) Tween 80 agar (JCM No.377 agar + Tween 80 2%) และ Gelatin agar (JCM No.377 agar ที่ใส่ gelatin 10% แทน Casamino acid) เพื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์โปรติเอส อะไมเลส ไลเปส และเจลาติเนสตามลำดับ บ่มเชื้อที่ 37°C. นาน 5 วัน บันทึกการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น โดยเชื้อที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสจะเกิดโซนใสรอบโคโลนี ในขณะที่เอนไซม์อะไมเลสจะเกิดโซนใสเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไอโอดีน เอนไซม์ไลเปสจะเกิดตะกอนขุ่น และเอนไซม์เจลาติเนสจะเกิดโซนใสเมื่อหยดสารละลาย Trichloroacetic acid 10% บริเวณที่เกิดตะกอนขุ่นรอบๆ โคโลนี

#### ผลการวิจัยและวิจารณ์

##### การวิเคราะห์คุณภาพและจำนวนจุลินทรีย์ในปลาร้า

จากการสุ่มตัวอย่างปลาร้าจากโรงงานปลาร้าและผู้จำหน่ายจำนวน 13 ราย (Factory/Vendor A-M) ในอำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท รวมทั้งสิ้นจำนวน 42 ตัวอย่าง และนำมาทำการตรวจวัดค่าความเป็นกรด-ด่างและปริมาณเกลือ พบว่ามีค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ระหว่าง 4.57-7.13 ( $5.20\pm0.62$ ) และมีปริมาณเกลือระหว่าง 9.2-24.5% ( $15.9\pm3.8$ ) โดยมีปริมาณเกลือสูงใกล้เคียงกับปลาร้าที่ผลิตใน 4 จังหวัด ในภาคอีสานตอนบน ได้แก่ จังหวัดอุดรธานี หนองคาย นครพนม และสกลนคร โดยมีความเข้มข้นของเกลือ 24.53% (Suriyanont and Chancharoonpong, 2018) โดยค่าความเป็นกรด-ด่างของปลาร้าส่วนใหญ่ (86.4%) มีค่าต่ำกว่า 5.5 ส่วนแบคทีเรียทั้งหมดพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง  $3.3\times10^5$  -  $2.1\times10^8$  CFU/กรัม (Table 1) ความแตกต่าง

ของปริมาณเกลือที่พบซึ่งนอกเหนือจากปัจจัยที่มาจาก การใช้สูตรที่ต่างกันแล้ว พบว่ายังขาดความสม่ำเสมอ ในการควบคุมการผลิต โดยในรายของ Factory A (11.0-24.5%) และ Factory B (11.5-22.6%) พบว่ามีความ

แตกต่างของปริมาณเกลือระหว่างตัวอย่างที่นำมาใช้ในการวิเคราะห์ในปริมาณสูงถึง 13.5 และ 11.1% ตามลำดับ

**Table 1** Chemical properties and total halophilic bacterial cell counts of *pla-ra*

| Source<br>of samples | Code | Number<br>of samples | Chemical properties |                 | Halophilic bacterial counts<br>(CFU/g)                             |
|----------------------|------|----------------------|---------------------|-----------------|--------------------------------------------------------------------|
|                      |      |                      | pH                  | NaCl (%)        |                                                                    |
| Factory A            | SB   | 6                    | 4.60-5.36           | 11.0-24.5       | $1.0 \times 10^6$ - $1.4 \times 10^8$                              |
| Factory B            | MK   | 7                    | 4.59-5.71           | 11.5-22.6       | $3.3 \times 10^5$ - $2.0 \times 10^7$                              |
| Factory C            | JV   | 3                    | 4.66-6.57           | 12.7-18.6       | $4.7 \times 10^6$ - $2.1 \times 10^8$                              |
| Factory D            | PL   | 4                    | 4.83-5.27           | 15.6-18.5       | $2.5 \times 10^6$ - $2.1 \times 10^7$                              |
| Factory E            | PB   | 2                    | 5.54-7.13           | 11.9-12.9       | $2.3 \times 10^6$ - $1.6 \times 10^7$                              |
| Factory F            | CL   | 2                    | 4.57-4.60           | 11.9-12.6       | $3.1 \times 10^6$ - $2.2 \times 10^7$                              |
| Factory G            | BL   | 2                    | 5.03-5.07           | 20.3-22.1       | $1.5 \times 10^6$ - $1.7 \times 10^7$                              |
| Factory H            | PJ   | 3                    | 4.93-5.32           | 14.7-22.1       | $2.7 \times 10^6$ - $2.4 \times 10^7$                              |
| Factory I            | SC   | 3                    | 4.66-6.57           | 17.2-19.5       | $1.1 \times 10^7$ - $1.5 \times 10^7$                              |
| Factory J            | PY   | 4                    | 4.65-4.89           | 12.6-16.5       | $1.4 \times 10^7$ - $1.7 \times 10^8$                              |
| Factory K            | SS   | 2                    | 5.16-5.62           | 18.6-23.1       | $2.4 \times 10^6$ - $2.1 \times 10^7$                              |
| Vendor L             | JP   | 2                    | 5.13-7.03           | 12.7-17.2       | $3.4 \times 10^6$ - $2.4 \times 10^7$                              |
| Vendor M             | CD   | 2                    | 4.77-5.00           | 9.2-10.3        | $3.6 \times 10^6$ - $3.4 \times 10^7$                              |
| <b>Total</b>         |      | <b>42</b>            | <b>4.57-7.13</b>    | <b>9.2-24.5</b> | <b><math>3.3 \times 10^5</math> - <math>2.1 \times 10^8</math></b> |

#### การแยก จำแนกชนิดแบคทีเรียและการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค

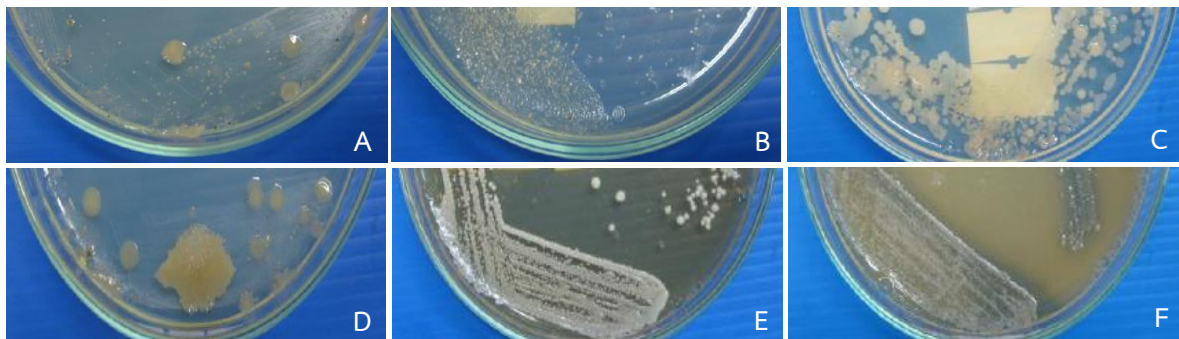
จากการแยกแบคทีเรียในปลาร้า พบว่ามีแบคทีเรียชอบเกลือจำนวนทั้งหมด 181 ไอโซเลต เซลล์ติดสีทั้งแกรมบวกและแกรมลบ จัดเรียงตัวแบบเดี่ยวและคู่ โคโลนีมีลักษณะกลมมน ขอบเรียบ มันวาว มีสีและขนาดที่ต่างกัน เช่น สีครีมขนาดใหญ่ (Figure 1D) ขนาดกลาง (Figure 1A) ขนาดเล็ก (Figure 1B) และสีขาวที่มีขนาดแตกต่างกัน (Figure 1C) ส่วนใหญ่รูปร่างแท่งมากกว่ารูปร่างกลม เจริญในอาหารเหลวแบบต้องการอากาศ (Aerobe) สร้างเอนไซม์แคตาเลสเมื่อทดสอบด้วย

สารละลาย  $H_2O_2$  3% แล้วเกิดแก๊ส อาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีนี้สามารถแบ่งแบคทีเรียชอบเกลือออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 มีรูปร่างแท่งจัดอยู่ในสกุล *Halobacillus* (Namwong *et al.*, 2006) และกลุ่มที่ 2 มีรูปร่างกลมจัดอยู่ในสกุล *Halococcus* (Namwong *et al.*, 2007)

ส่วนแบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือที่คัดแยกได้ทั้งหมดมีจำนวน 104 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส มีลักษณะแตกต่างกันทางด้านขนาด การจัดเรียงเซลล์ และสีของโคโลนี เช่น ขาวขุ่น กลมมน เจริญในอาหารเหลวแบบ Facultative anaerobe มีการ

สร้างโซนใสรอบๆ โคลนบนอาหารแข็งดัดแปลง MRS ที่มี NaCl 5% สามารถเจริญได้เร็วและสร้างกรดแลกติกได้สูงกว่า NaCl 7% โดยสังเกตได้จากปฏิกิริยาการเกิดโซนใสที่แตกต่างกัน (Figure 1E and 1F) พบเซลล์ส่วนใหญ่เป็นรูปร่างกลมมากกว่าแท่ง สามารถแบ่งออกเป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่มที่ 1 Homofermentative LAB ที่มีรูปร่างกลมต่อกันสี่เซลล์ (Tetrad) ไม่สามารถสร้าง CO<sub>2</sub> จากน้ำตาลกลูโคส เจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.4 แต่ไม่เจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.6 อาศัยคุณสมบัติทาง

สัณฐานวิทยาและชีวเคมีนี้สามารถจัดจำแนกอยู่ในสกุล *Pediococcus* (Axelsson, 1998; Collins *et al.*, 1993) กลุ่มที่ 2 Heterofermentative LAB รูปร่างกลม สร้างแก๊สสร้างเมือก (Slime) ไม่เจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.6 จัดอยู่ในสกุล *Weissella* (Collins *et al.*, 1993; Tanasupawat *et al.*, 2000) และกลุ่มที่ 3 Homofermentative LAB รูปร่างแท่ง ไม่สร้างแก๊ส ไม่สามารถเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 9.6 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* (Tanasupawat *et al.*, 2000)



**Figure 1** Differential colony characteristics of halophilic bacteria grown on JCM No.377 agar after incubation at 37°C for 7 days (A-D) and halotolerant lactic acid bacteria grown on modified MRS agar + 5% NaCl (E) and 7% NaCl (F) after incubation at 30°C for 5 days

นอกจากนี้ยังสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียได้จำนวน 16 ไอโซเลต ในด้านประสิทธิภาพของการสร้างกรดพบว่าแบคทีเรียรูปร่างแท่ง (ความเป็นกรด-ด่าง 4.15-4.16) มีแนวโน้มในการผลิตกรดได้ในปริมาณที่สูงกว่าแบคทีเรียรูปร่างกลม (ความเป็นกรด-ด่าง 4.60-6.39) (Table 2) จากการศึกษาคุณสมบัติในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย พบว่าเชื้อกลุ่ม *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp. และ *Weissella* spp. สามารถผลิตสารยับยั้ง

แบคทีเรียก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสีย สายพันธุ์มาตรฐาน (T=type strain) คือ *Bacillus cereus* ATCC 9634<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538<sup>T</sup>, *Salmonella abony* NCTC6017<sup>T</sup>, *Escherichia coli* ATCC 8739<sup>T</sup> และ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853<sup>T</sup> ได้น้อยกว่า 9 มม. ของเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนใส (Clear zone) ตามมาตรฐาน (Hudzik, 2009) (Table 2) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานการผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคของแบคทีเรียทนเกลือที่พบในอาหารหมัก (Sumitha *et al.*, 2018)

**Table 2** Morphology, biochemistry and antimicrobial activity of selected halotolerant lactic acid bacteria

| Strains                  | Shape          | Gas from glucose <sup>a</sup> | pH   | Inhibition effect <sup>b</sup>             |                                            |                                           |                                                 |                                          |  |
|--------------------------|----------------|-------------------------------|------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|-------------------------------------------|-------------------------------------------------|------------------------------------------|--|
|                          |                |                               |      | <i>B. cereus</i><br>ATCC 9634 <sup>T</sup> | <i>S. aureus</i><br>ATCC 6538 <sup>T</sup> | <i>S. abony</i><br>NCTC 6017 <sup>T</sup> | <i>P. aeruginosa</i><br>ATCC 27853 <sup>T</sup> | <i>E. coli</i><br>ATCC 8739 <sup>T</sup> |  |
| <i>Pediococcus</i> sp.   |                |                               |      |                                            |                                            |                                           |                                                 |                                          |  |
| CD2-2                    | cocci (tetrad) | -                             | 5.53 | -                                          | +                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| CL1-1B                   | Cocci (tetrad) | -                             | 5.39 | -                                          | +                                          | +                                         | -                                               | +                                        |  |
| CL1-1C                   | cocci (tetrad) | -                             | 5.04 | -                                          | +                                          | +                                         | -                                               | +                                        |  |
| JV1-2M                   | cocci (tetrad) | -                             | 4.63 | +                                          | -                                          | +                                         | -                                               | +                                        |  |
| JV1-1S                   | cocci (tetrad) | -                             | 4.77 | +                                          | -                                          | +                                         | -                                               | +                                        |  |
| JV1-1B                   | cocci (tetrad) | -                             | 4.76 | +                                          | +                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| JV1-4B                   | cocci (tetrad) | -                             | 6.39 | +                                          | -                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| JV2-1                    | cocci (tetrad) | -                             | 5.27 | -                                          | -                                          | +                                         | -                                               | +                                        |  |
| PL2-3A                   | cocci (tetrad) | -                             | 4.95 | +                                          | +                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| <i>Weissella</i> sp.     |                |                               |      |                                            |                                            |                                           |                                                 |                                          |  |
| CD2-1B                   | cocci          | +                             | 4.60 | +                                          | +                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| CD2-1BS                  | cocci          | +                             | 4.60 | +                                          | +                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| <i>Lactobacillus</i> sp. |                |                               |      |                                            |                                            |                                           |                                                 |                                          |  |
| SB3-1B                   | rods           | -                             | 4.16 | +                                          | -                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| SB3-2B                   | rods           | -                             | 4.16 | +                                          | -                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| SB3-5B                   | rods           | -                             | 4.17 | +                                          | -                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| SB3-1S                   | rods           | -                             | 4.16 | +                                          | +                                          | +                                         | +                                               | +                                        |  |
| SB3-2S                   | rods           | -                             | 4.15 | +                                          | -                                          | +                                         | -                                               | +                                        |  |

<sup>a</sup> (-) negative; (+) positive reaction; <sup>b</sup> (-) absence of clear zone; (+) resistant visible clear zone (<9 mm diameter) data from Hudzicki, (2009); T=type strain

### ประสิทธิภาพการสร้างเอนไซม์

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียที่ชอบเกลือ พบว่ามีแบคทีเรียที่ผ่านการคัดเลือกกว่าสามารถผลิตเอนไซม์ได้สูง 10 ไอโซเลต (Table 3) ในจำนวนนี้มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ที่ระดับปานกลาง-สูง จำนวน 9 ไอโซเลต ประกอบด้วยแบคทีเรียรูปร่างแท่ง 7 สายพันธุ์ ได้แก่ *Halobacillus* sp. 10MK2-2A และ 10SB1-2 (ผลิตโปรติเอส) *Halobacillus* sp. 10PL2-1 และ 10BL1-5A (ผลิตเจลาติเนส) *Halobacillus* sp. 10BL2-1 (ผลิตไลเปส) *Halobacillus* sp. 10BL1-1S (ผลิตอะไมเลส) และ *Halobacillus* sp. 10PY2-2 (ผลิตเจลาติเนสและไลเปส) และแบคทีเรียรูปร่างกลม 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Halococcus* sp. 10BL2-3 และ 10CL2-2B (ผลิตเจลาติเนส) ส่วน *Halococcus* sp. 10PJ1-5B สามารถผลิตไลเปสได้ในระดับเล็กน้อย (Das *et al.*, 2019; Gaonkar and Furtado, 2020)

การย่อยของสารอาหารประเภทโปรตีน คาร์โบไฮเดรต และไขมันที่เกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในกระบวนการหมักส่งผลต่อคุณภาพด้านเนื้อสัมผัส กลิ่น และรสชาติของปลาร้า เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักมีแหล่งที่มาจากสารประกอบที่อาจพบในตัวปลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นของการทำปลาร้า หรือผลิตโดยจุลินทรีย์ที่เจริญในปลาร้า จากรายงานของ Thongthai *et al.* (1990) อ้างใน Namwong (2010) พบว่า 15% ของเอนไซม์โปรติเอสที่พบในการผลิตน้ำปลาเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารของปลาและ 85% มาจากจุลินทรีย์ ดังนั้นการคัดแยกจุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ได้ดีจะช่วยในการพัฒนาการออกแบบกระบวนการผลิต โดยการนำจุลินทรีย์บริสุทธิ์มาใช้ในการผลิตปลาร้าและผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดอื่นๆ ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น

**Table 3** Morphology and enzyme production of selected halophilic bacteria

| Strains                          | Shape | Enzyme activity |            |        |         |
|----------------------------------|-------|-----------------|------------|--------|---------|
|                                  |       | Protease        | Gelatinase | Lipase | Amylase |
| <i>Halobacillus</i> sp. 10BL1-5A | rods  | +               | ++         | -      | -       |
| <i>Halobacillus</i> sp. 10BL1-1S | rods  | +               | -          | -      | ++      |
| <i>Halobacillus</i> sp. 10BL2-1  | rods  | -               | -          | ++     | -       |
| <i>Halobacillus</i> sp. 10MK2-2A | rods  | +++             | -          | -      | -       |
| <i>Halobacillus</i> sp. 10PL2-1  | rods  | +               | +++        | -      | -       |
| <i>Halobacillus</i> sp. 10PY2-2  | rods  | +               | ++         | ++     | -       |
| <i>Halobacillus</i> sp. 10SB1-2  | rods  | ++              | -          | -      | -       |
| <i>Halococcus</i> sp. 10BL2-3    | cocci | +               | +++        | -      | -       |
| <i>Halococcus</i> sp. 10CL2-2B   | cocci | -               | ++         | +      | -       |
| <i>Halococcus</i> sp. 10PJ1-5B   | cocci | -               | -          | +      | -       |

(-) negative; (+) low activity (within 1 cm diameter zone); (++) moderate activity (within 2 cm diameter zone);

(+++ high activity (larger than 2 cm diameter zone)

## สรุปผลการวิจัย

แบคทีเรียชอบเกลือทั้งหมดที่พบในโรงงานปลาร้า และผู้จำหน่ายปลาร้า จังหวัดชัยนาท มีค่าอยู่ระหว่าง  $3.3 \times 10^5$  -  $2.1 \times 10^8$  CFU/กรัม มีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 4.57-7.13 และมีปริมาณเกลือระหว่าง 9.2-24.5% แบคทีเรียชอบเกลือส่วนใหญ่พบรูปร่างแท่งมากกว่ารูปร่างกลม ในขณะที่แบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือพบมีรูปร่างกลมมากกว่า แบคทีเรียชอบเกลือรูปร่างแท่งสามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดี ได้แก่ *Halobacillus* sp. 10MK2-2A และ 10SB1-2 เอนไซม์เจลาติเนส ได้แก่ *Halobacillus* sp. 10PL2-1, 10BL1-5A และ 10PY2-2 เอนไซม์ไลเปส ได้แก่ *Halobacillus* sp. 10BL2-1 และ 10PY2-2 และผลิตเอนไซม์อะไมเลส ได้แก่ *Halobacillus* sp. 10BL1-1S ส่วนเชื้อแบคทีเรียชอบเกลือรูปร่างกลมผลิตเอนไซม์เจลาติเนสได้ดี ได้แก่ *Halococcus* sp. 10BL2-3 และ 10CL2-2B แบคทีเรียชอบเกลือเหล่านี้สามารถนำมาใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิตปลาร้าร่วมกับแบคทีเรียกรดแลกติกทนเกลือในกลุ่ม *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp. และ *Weissella* spp. ซึ่งมีคุณสมบัติในการผลิตกรดแลกติกและสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสียได้

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม ที่สนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้ ขอขอบคุณกลุ่มสถานประกอบการผลิตปลาร้าอำเภอสรรพยา จังหวัดชัยนาท และเจ้าหน้าที่สาธารณสุขจังหวัดชัยนาททุกท่าน ที่ให้ความอนุเคราะห์ข้อมูลและตัวอย่างปลาร้าสำหรับการวิจัยในครั้งนี้

## เอกสารอ้างอิง

- Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology. pp. 1-72. In Salminen, S. and A. von Wright (eds.). **Lactic Acid Bacteria: Microbiology and Function Aspects**. New York: Marcel Dekker, Inc.
- Chaikulsareewath, A., C. Chooprom and A. Mana. 2015. Screening of protease producing halophilic bacteria from fermented fish (pla-ra). **J. Food Technol SU**. 10(1): 1-8. [in Thai]
- Chamroensaksri, N., S. Tanasupawat, A. Akaracharanya, W. Visessanguan and T. Kudo. 2009. *Salinivibrio siamensis* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 59: 880-885.
- Chamroensaksri, N., S. Tanasupawat, A. Akaracharanya, W. Visessanguan, T. Kudo and T. Itoh. 2010. *Gracilibacillus thailandensis* sp. nov., from fermented fish (pla-ra) in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol**. 60: 944-948.
- Chang, J.Y., H.J. Lee and H.C. Chang. 2007. Identification of the agent from *Lactobacillus plantarum* KFRI464 that enhances bacteriocin production by *Leuconostoc citreum* GJ7. **J. Appl. Microbiol**. 103: 2504-2515.

- Collins, M.D., J. Samelis, J. Metaxopoulos and S. Wallbanks. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages: description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteriodes* group of species. **J. Appl. Bacteriol.** 75: 595-603.
- Das, D., I. Kalra, K. Mani, B.B. Salgaonkar and J.M. Braganca. 2019. Characterization of extremely halophilic archaeal isolates from Indian salt pans and their screening for production of hydrolytic enzymes. **Environ. Sustainability** 2: 227-239.
- Das, O., S.H. Kumar and B.B. Nayak. 2020. Relative abundance of halophilic archaea and bacteria in diverse salt-fermented fish products. **LWT-Food Sci. Technol.** 117: 1-7.
- Dicks, L.M.T., F. Dellaglio and M.D. Collins. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [Corrig.] gen. nov. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45: 395-397.
- El Sheikha, A.F. and D.-M. Hu. 2018. Molecular techniques reveal more secrets of fermented foods. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** 60(1): 1-22. [Online]. Available <https://doi.org/10.1080/10408398.2018.1506906> (9 May 2020).
- Gaonkar, S.K. and I.J. Furtado. 2020. Characterization of extracellular protease from the *Haloarcheon Halococcus* sp. strain GUGFAWS-3 (MF425611). **Curr. Microbiol.** 77(6): 1024-1034.
- Grosu-Tudor, S.S. and M. Zamfir. 2013. Functional properties of LAB isolated from Romanian fermented vegetables. **Food Biotechnol.** 27(3): 235-248. [Online]. Available <https://doi.org/10.1080/08905436.2013.811082> (29 March 2021).
- Hudzicki, J. 2009. **Kirby-Bauer Disk Diffusion Susceptibility Test Protocol.** American Society for Microbiology. 23 p.
- Hur, J.W., H.H. Hyun, Y.R. Pyun, T.S. Kim, I.H. Yeo and H.D. Paik. 2000. Identification and partial characterization of lacticin BH5, a bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* BH5 isolated from kimchi. **J. Food Prot.** 63(12): 1707-1712.
- Lee, J.K., D.W. Jung, Y.J. Kim, S.K. Cha, M.K. Lee, B.H. Ahn, N.S. Kwak and S.W. Oh. 2009. Growth inhibitory effect of fermented kimchi on food-borne pathogens. **Food Sci. Biotechnol.** 18(1): 12-17.
- Mitra, S., P.K. Chakrabartty and S.R. Biswas. 2010. Potential production and preservation of dahi by *Lactococcus lactis* W8, a nisin-producing strain. **LWT-Food Sci. Technol.** 43(2): 337-342.
- Mozzi, F., M.E. Ortiz, J. Bleckwedel, L. De Vuyst and M. Pescuma. 2013. Metabolomics as a tool for the comprehensive understanding of fermented and functional foods with lactic acid bacteria. **Food Res. Int.** 54: 1152-1161.

- Namwong, S., K. Hiraga, K. Takada, S. Tanasupawat and K. Oda. 2006. A halophilic serine proteinase from *Halobacillus* spp. SR5-3 isolated from fish sauce: purification and characterization. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** 70(6): 1395-1401.
- Namwong, S., S. Tanasupawat, W. Visessanguan, T. Kudo and T. Itoh. 2007. *Halococcus thailandensis* sp. nov., from fish sauce in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 2199-2203.
- Namwong, S. 2010. Halophilic bacteria potential for development of Thai fish sauce industry. **J. Sci. Technol. MSU.** 29(4): 470-477. [in Thai]
- Patel, A., J.B. Prajapati, O. Holst and A. Ljungh. 2014. Determining probiotic potential of exopolysaccharide producing LAB isolated from vegetables and traditional Indian fermented food products. **Food Biosci.** 5: 27-33.
- Pumipan, T. and U. Inmaung. 2016. Hygiene of Thai traditional fermented fish production in One District, Khon Kaen province. **KKU. Res. J. (GS).** 16(2): 75-85. [in Thai]
- Sangjindavong, M., P. Chuapoehuk, J. Runglerdkriangkrai, W. Klaypradit and D. Vareevanich. 2008. Fermented fish product (*pla-ra*) from marine fish and preservation. **Kasetsart J. (Nat. Sci.).** 42: 129-136.
- Sumitha, D., D. Preetha and J.C. Daniel. 2018. Functional properties of halophilic bacteria isolated from fermented foods. **Indian J. Appl. Microbiol.** 21(1): 37-45.
- Suriyanont, A. and C. Chancharoonpong. 2018. Making process and factors associating to properties of fermented fish (*pla-ra*) in some parts of upper Northeast area of Thailand. **Burapha Sci. J.** 23(1): 566-578. [in Thai]
- Tanasupawat, S., O. Shida, S. Okada and K. Komagata. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 50: 1479-1485.
- Tanasupawat, S., S. Namwong, T. Kudo and T. Itoh. 2007. *Piscibacillus salipiscarius* gen. nov., sp. nov., a moderately halophilic bacterium from fermented fish (*pla-ra*) in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 57: 1413-1417.
- Tanasupawat, S. 2009. Thai lactic acid bacteria: diversity and applications. **SWU. Sci. J.** 25(1): 1-13.
- Tanasupawat, S., N. Chamroensaksri, T. Kudo and T. Itoh. 2010. Identification of moderately halophilic bacteria from Thai fermented fish (*pla-ra*) and proposal of *Virgibacillus siamensis* sp. nov. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 56: 369-379.

- Thongthai, C., W. Panbangred, C. Khoprasert and S. Dhaweetianond. 1990. Protease Activity in the Traditional Process of Fish Sauce Fermentation. pp 61-65. *In* Reilly, P.J.A., R.W.H. Parry and L.E. Bariles (eds.). **Post-Harvest Technology, Preservation and Quality of Fish in Southeast Asia**. Manila: Echanis Press.
- Yachai, M., S. Tanasupawat, T. Itoh, S. Benjakul, W. Visessanguanand and R. Valyasevi. 2008. *Halobacterium piscisalsi* sp. nov., from fermented fish (*pla-ra*) in Thailand. **Int. J. Syst. Evol. Microbiol.** 58: 2136-2140.