บทความวิจัย

การคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากปลาร้า
Screening of Protease Producing Halophilic Bacteria from Fermented Fish (Pla-ra)

อำพรรณ ชัยกุลเสรีวัฒน์* ชนิตา ชูพรม และ อายูรีน มานะ
Ampun Chaikulsareewath*, Chanita Chooprom and Ayureen Mana

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอส จากตัวอย่างปลาร้า 6 แหล่ง จากการทดลองพบว่าสามารถแยกเชื้อได้ 12 ไอโซเลต ได้แก่ SA1, SA2, SA3, SB1, SC1, SC2, SD1, SE1, SE2, SF1, SF2 และ SF3 พบว่ามี 9 ไอโซเลต ได้แก่ SA2, SA3, SB1, SC1, SC2, SD1, SE1, SF1 และ SF3 มีลักษณะโคโลนี กลมนูน ขอบเรียบ ผิวมันวาวทั้งหมด ส่วนที่เหลืออีก 3 ไอโซเลต ได้แก่ SA1, SE2 และ SF2 มีลักษณะโคโลนีกลม แบน ขอบหยักเป็นคลื่น ผิวด้าน พบว่าแบคทีเรียทุกไอโซเลตมีการติดสีแกรมบวก 9 ไอโซเลต มีรูปร่างกลม และ 3 ไอโซเลต มีรูปร่างท่อน จากนั้นศึกษาความสามารถในการผลิตโปรติเอสของทั้ง 12 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรติเอสได้สูงสุด คือ SA1, SA2, SC2, SE2 และ SF3 (0.16 ± 0.03, 0.16 ± 0.07, 0.20 ± 0.04, 0.22 ± 0.03 และ 0.19 ± 0.01 ยูนิต/มิลลิลิตร) โดยไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรีย 12 ไอโซเลต ในอาหาร production medium ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0, 5, 10, 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร เลี้ยงแบคทีเรียที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าไอโซเลต SA1, SA3, SC1, SC2, SD1, SE1, SE2, SF1, SF2 และ SF3 เจริญได้สูงสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือ ร้อยละ 15 (อยู่ในช่วง 7.32-9.96 log CFU/ml) ส่วน SA2 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ ร้อยละ 5 (7.85 log CFU/ml) และ SB1 เจริญได้ดีสุดในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 20 (9.05 log CFU/ml)

คำสำคัญ: แบคทีเรียชอบเค็ม, โปรติเอส, ปลาร้า

ABSTRACT

This research aims to isolate protease producing halophilic bacteria from Pla-ra that obtained from 6 different areas. The 12 isolates namely SA1, SA2, SA3, SB1, SC1, SC2, SD1, SE1, SE2, SF1, SF2 and SF3 were selected and studied. The colonies of 9 isolates (SA2, SA3, SB1, SC1, SC2, SD1, SE1, SF1 and SF3) had a circular shape, convex, entire edges and glistening. The other colonies of 3 isolates (SA1, SE2 and SF2) had a circular shape, flat, undulate and rough surface. All isolates were Gram-positive. The 9 isolates were cocci shape and the 3 isolates were rod shape. Determination of protease activities from 12 isolates was performed. The highest protease activities were from SA1 SA2 SC2 SE2 and SF3 (0.16 ± 0.03, 0.16 ± 0.07, 0.20 ± 0.04, 0.22 ± 0.03 and 0.19 ± 0.01 units/ml, respectively) with no significant difference. After that, the growth and the protease activities of all isolates were investigated by culturing in the production medium with various concentration of sodium chloride of 0, 5, 10, 15 and 20% (w/v) and incubated at 37°C for 24 h. The results showed that highest growth in media containing 15% (w/v) of sodium chloride were found in SA1, SA3, SC1, SC2, SD1, SE1, SE2, SF1, SF2 and SF3 at the range of 7.32-9.96 log CFU/ml. Meanwhile, the highest growth of SA2 was in the production medium with 5% (w/v) sodium chloride (7.85 log CFU/ml). Whereas, the highest growth of SB1 was in the production medium that contained 20% (w/v) sodium chloride (9.05 log CFU/ml).

Keywords: Halophilic bacteria, protease, Pla-ra

*ampun.cha@siam.edu
อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร
Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok.

บทนำ

ปลาร้าเป็นอาหารที่คู่กับคนไทยมานาน เพราะช่วยให้รสชาติอาหารดี สามารถเก็บปลาไว้บริโภคได้นาน นอกจากนี้ ปลาร้ายังเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีราคาไม่แพง มีสารอาหาร แร่ธาตุ วิตามินที่สำคัญ อาทิ แคลเซียม ฟอสฟอรัส ที่ช่วยให้กระดูกและฟันแข็งแรง ส่วนมากปลาที่ใช้ทำเป็นปลาน้ำจืดที่หาได้ในท้องถิ่น และเป็นปลาประเภทที่ไม่มีเกล็ด (เช่น ปลาเนื้ออ่อน) ในการแปรรูปนั้น จะต้องรักษาคุณภาพในเรื่องรสชาติ และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคด้วย [1] ในกระบวนการหมักปลาร้าจะทำโดยผสมปลากับเกลือ ที่มีความเข้มข้นระหว่างร้อยละ 6.69-17.17 ในการหมักปลามีผลทำให้เกิดการย่อยของสารอาหารต่างๆ เช่น โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต เป็นต้น โดยกิจกรรมของเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ ส่งผลกับเนื้อสัมผัส กลิ่นรสและรสชาติของปลาร้าที่มีลักษณะเฉพาะตัว เอนไซม์ที่มีบทบาทหลักในการหมักปลาร้า ได้แก่ เอนไซม์โปรติเอส [2] เอนไซม์โปรติเอสอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ไฮโดรเลสที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายพันธะเปปไทด์ในโปรตีน ทำให้เกิดเปปไทด์ และกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ซึ่งมีผลต่อรสชาติของอาหารหมัก และเป็นสารตั้งต้นที่สามารถทำปฏิกิริยากับองค์ประกอบอื่นๆ ในอาหาร เช่น น้ำตาล ไขมัน เกิดเป็นสารใหม่ที่ให้กลิ่น สี และลักษณะเฉพาะตัว [3, 4] เอนไซม์โปรติเอสมีบทบาทสำคัญในกระบวนการต่างๆ ในอุตสาหกรรม เช่น กระบวนการซักล้าง การกำจัดของเสียจากอุตสาหกรรมทะเลที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง [5]

เอนไซม์โปรติเอสผลิตได้จากจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียชอบเค็ม (halophilic bacteria) เป็นจุลินทรีย์ที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ดี เพราะเอนไซม์ที่ผลิตขึ้นจากจุลินทรีย์เหล่านี้ไม่เพียงแต่จะเป็นพวกชอบเกลือ บางชนิดยังเป็นพวกทนอุณหภูมิสูงได้อีกด้วย [6] แบคทีเรียชอบเค็ม หมายถึง แบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของเกลือสูง มีค่า water activity (a_w) ต่ำสุดที่แบคทีเรียกลุ่มนี้เจริญได้ คือ 0.75 แบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสีย (microbial spoilage) ของอาหารที่มีเกลือสูง เช่น ซีอิ๊ว กะปิ น้ำปลา ปลาเค็ม เต้าเจี้ยว มิโซ (miso) แบคทีเรียชอบเค็ม แบ่งตามความเข้มข้นของเกลือที่ต้องการใช้ในการเจริญได้เป็น 4 พวก ได้แก่ 1) พวกชอบเค็มเล็กน้อย (slightly halophilic bacteria) เป็นพวกที่เติบโตได้ดีในอาหารที่มีเกลือ ความเข้มข้น ร้อยละ 0.5-3 แยกได้จากปลาและอาหารทะเล 2) พวกชอบเค็มปานกลาง (moderate halophilic bacteria) เป็นพวกที่เติบโตได้ดีในอาหารที่มีเกลือ ร้อยละ 3-15 แยกได้จากปลาเค็ม เนื้อเค็ม ผักดอง 3) พวกชอบเค็มสูง (extreme halophilic bacteria) เป็นพวกที่เติบโตได้ดีในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 15-30 4) พวกทนเค็ม (halotolerant) เป็นพวกสามารถเจริญได้ทั้งสภาพมีเกลือและไม่มีเกลือ โดยทั่วไปแบคทีเรียพวกนี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 5 หรือมากกว่า [7] มีงานวิจัยหลายฉบับที่แสดงถึงแบคทีเรียที่สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสได้ เช่น *Bacillus cereus, B. licheniformis, Staphylococcus aureus*และ *Pseudomonas alcaligenes* แยกได้จากน้ำปลาในไทย [8] *Halobacterium* sp. แยกได้มาจากน้ำปลาในไทย [9] *Thrissina thryssa, Bacillus halodurans*, *Scoliodon* sp., แยกได้มาจากปลาเค็ม ในอินเดีย [10] *Salinivibrio* sp. MS-7 (พวกชอบเค็มปานกลาง) แยกได้มาจากทะเลสาบน้ำเค็มมาฮาลู (Maharlou salt lake) ในอิหร่าน [11]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงสนใจคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มจากปลาร้าที่มีคุณสมบัติในการสร้างโปรติเอส และศึกษาความสามารถในการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเค็มระดับต่างๆ เพื่อเป็นประโยชน์นำไปใช้ในการเร่งการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลา ลดระยะเวลาในการหมักปลาร้า และสามารถนำจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้ไปใช้ประโยชน์ต่อไป

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. แหล่งของตัวอย่าง

ตัวอย่างปลาร้าจากตลาด 6 แหล่ง ได้แก่ 1) ตลาดในหมู่บ้านรัตนาธิเบศร์ จังหวัดนนทบุรี 2) ตลาดบางใหญ่ จังหวัดนนทบุรี 3) ตลาดบางคอแหลม จังหวัด

*ampun.cha@siam.edu
อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร
Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok.

กรุงเทพฯ 4) ตลาดบางรัก จังหวัดกรุงเทพฯ 5) ตลาดแม่ต๋ำ จังหวัดพะเยา 6) ตลาดเชียงของ จังหวัดเชียงราย

2. ศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากปลาร้า (ดัดแปลงตามวิธีของวัชรา, 2545 [8] และ Norberg และ Hofsten, 1969 [12])

นำตัวอย่างปลาร้า 1 กรัม ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Brain Heart Infusion (BHI) broth ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำลูปเขี่ยเชื้อมาลาก (streak) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร และ Skim milk ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเกิดวงใสรอบๆ โคโลนี หากโคโลนีใดเกิดวงใส แสดงว่าเชื้อสร้างโปรติเอส ตรวจสอบการติดสีแกรม ตามวิธีของ Harrigan (1998) [13] เก็บโคโลนีที่เกิดวงใสทุกโคโลนีเลี้ยงในอาหาร BHI agar ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 5 เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

3. ศึกษาการผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากแบคทีเรียชอบเค็ม (วัชรา, 2545) [8]

3.1 นำเชื้อบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อที่มีค่า OD_{600} = 0.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 เก็บส่วนใส 75 ไมโครลิตร มาเติม TrisHCl ความเข้มข้น 50 มิลลิโมลาร์, pH 9 ที่มี $CaCl_2$ ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ 1 มิลลิลิตร และเติม azocasein ความเข้มข้นร้อยละ 2 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย Trichloroacetic acid ปริมาตร 600 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน

3.3 นำสารละลายไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 275 นาโนเมตร แล้วนำค่าที่ได้มาเทียบกับกราฟมาตรฐานไทโรซีน (ความเข้มข้น 0-360 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) เพื่อหาความเข้มข้นของไทโรซีนในตัวอย่าง (ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง) คำนวณหาค่ากิจกรรมของโปรติเอส โดยกำหนดให้ 1 หน่วยของเอนไซม์ หมายถึง เอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีน และให้กรดอะมิโนในรูปของไทโรซีน 1 ไมโครกรัม ในเวลา 1 นาที

4. ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

เลี้ยงเชื้อที่คัดแยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อที่มีค่า OD_{600} = 0.5 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ในอาหาร production medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยการแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ ร้อยละ 0, 5, 10, 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดการเจริญของเชื้อโดยวิธี pour plate method (Harrigan, 1998) [13]

5. สถิติที่ใช้ในงานวิจัย

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) ทดลอง 3 ซ้ำ วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป R Project for Statistical Computing (R Version 2.10.1, USA) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยใช้วิธี Duncan's New Multiple Range test ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลการคัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสจากปลาร้า

จากการนำตัวอย่างจากปลาร้า 6 แหล่ง เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI broth แล้วนำมาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อที่ได้มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI ที่เติม โซเดียมคลอไรด์ และ skim milk ได้ผลการทดลองดังแสดงใน Table 1

*ampun.cha@siam.edu
อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร
Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok.

Table 1 Colony characteristics and arrangements of the various bacterial isolates from Pla-ra.

Sample sources	Isolate code	Colony characteristics					Cell morphologies		
		Color	Shape	Margin	Elevation	Texture	Shape	Arrangement	Gram's reaction
Mooban Ratanatibates Market, Nonthaburi	SA1	White	Irregular	Undulate	Raised	Dull	Rod	In chain	+
	SA2	White	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Single	+
	SA3	Light brown	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Single	+
Bangyai Market, Nonthaburi	SB1	White	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Single	+
Bangkorlam market, Bangkok	SC1	White	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Single	+
	SC2	Yellow	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Single	+
Bangrak market, Bangkok	SD1	White	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Single	+
Mae Tam market, Phayao	SE1	White	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Single	+
	SE2	White	Irregular	Undulate	Raised	Dull	Rod	In chain	+
Chiang Khong market, Chiang Rai	SF1	White	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Single	+
	SF2	White	Irregular	Undulate	Raised	Dull	Rod	In chain	+
	SF3	Yellow	Circular	Entire	Convex	Shiny	Cocci	Single	+

จาก Table 1 พบว่าแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร BHI agar มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันไป มีทั้งสีขาว สีเหลือง และสีน้ำตาลอ่อน โดยที่โคโลนีส่วนใหญ่มีลักษณะกลมนูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว ทั้งหมด 9 ไอโซเลต ได้แก่ SA2, SA3, SB1, SC1, SC2, SD1, SE1, SF1 และ SF3 ส่วนที่เหลืออีก 3 ไอโซเลต มีลักษณะกลมไม่นูน ขอบหยักเป็นคลื่น ผิวด้านไม่วาว ได้แก่ SA1, SE2 และ SF2 เมื่อศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีแกรม พบว่าแบคทีเรีย ทุกสายพันธุ์ติดสีแกรมบวก ส่วนใหญ่มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเดี่ยว 9 ไอโซเลต ได้แก่ SA2, SA3, SB1, SC1, SC2, SD1, SE1, SF1 และ SF3 ส่วนที่เหลืออีก 3 ไอโซเลต มีลักษณะรูปร่างท่อน จัดเรียงตัว ต่อกันเป็นสายยาว ได้แก่ SA1, SE2 และ SF2 จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียที่แยกได้มี 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ รูปร่างกลม และรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก ซึ่งแบคทีเรียที่แยกได้คล้ายกับการทดลองของ Rajan และคณะ (2010) [10] ที่ทำการคัดแยกจุลินทรีย์ชอบเค็มได้ 93 ไอโซเลต โดยคัดแยกจากปลาฉลามแห้งได้ 48 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม 42 ไอโซเลต และติดสีแกรมบวก มีรูปร่างท่อน 6 ไอโซเลต และคัดแยกจากปลาแอนโชวี่แห้ง ได้ 45 ไอโซเลต โดยมี 43 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน และ 2 ไอโซเลต ติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม และเมื่อตรวจสอบชนิดของแบคทีเรีย พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Scoliodon* sp., *Thrissina thryssa* และ *Bacillus halodurans*

2. ผลความสามารถในการผลิตเอนไซม์โปรติเอสของแบคทีเรียชอบเค็ม

นำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาศึกษาความสามารถในการผลิตโปรติเอสโดยเลี้ยงในอาหาร production medium บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นวัดปริมาณโปรติเอส ได้ผลการทดลองดังแสดงใน Figure 1 พบว่าแบคทีเรียแต่ละไอโซเลตมีความสามารถในการผลิตโปรติเอสได้แตกต่างกัน พบว่า

*ampun.cha@siam.edu
อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร
Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok.

แบคทีเรียที่สามารถผลิตโปรติเอสได้สูงสุด คือ SA1, SA2, SC2, SE2 และ SF3 โดยผลิตได้ 0.16 ± 0.03, 0.16 ± 0.07, 0.20 ± 0.04, 0.22 ± 0.03 และ 0.19 ± 0.01 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 จากการทดลองจะเห็นได้ว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่คัดแยกได้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีทั้งรูปร่างท่อน และกลม มีความสามารถในการผลิตโปรติเอสได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยหลายฉบับที่แสดงถึงความสามารถของแบคทีเรียชอบเค็ม ซึ่งมีทั้งรูปร่างท่อน และกลม สามารถผลิตโปรติเอสในปริมาณที่แตกต่างกัน เช่น รายงานของวัชรา (2545) [8] ที่พบว่าคัดแยกแบคทีเรียออกจากตัวอย่างน้ำปลาได้จุลินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ *S. aureus* ผลิตโปรติเอส ได้อยู่ในช่วง 8.93-24.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร *B. cereus* และ *B. licheniformis* ผลิตได้ 0.80-29.20 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รายงานของ Shahbazi (2012) [11] พบว่าแบคทีเรีย *Salinivibrio* sp. MS-7 สามารถผลิตโปรติเอส ได้ 494 ยูนิตต่อมิลลิลิตร รายงานของ Tanasupawat และคณะ (2011) [14] พบว่า *Virgibacillus* TKNR 13-3 เจริญในอาหาร JCM No.377 สามารถผลิตโปรติเอสได้ 0.90 ยูนิตต่อมิลลิลิตร เป็นต้น จากการทดลองจะเห็นได้ว่าโปรติเอสที่ผลิตได้มีปริมาณต่ำกว่างานวิจัยฉบับอื่นๆ อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสายพันธุ์จุลินทรีย์ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการผลิตเอนไซม์ และวิธีที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ เป็นต้น

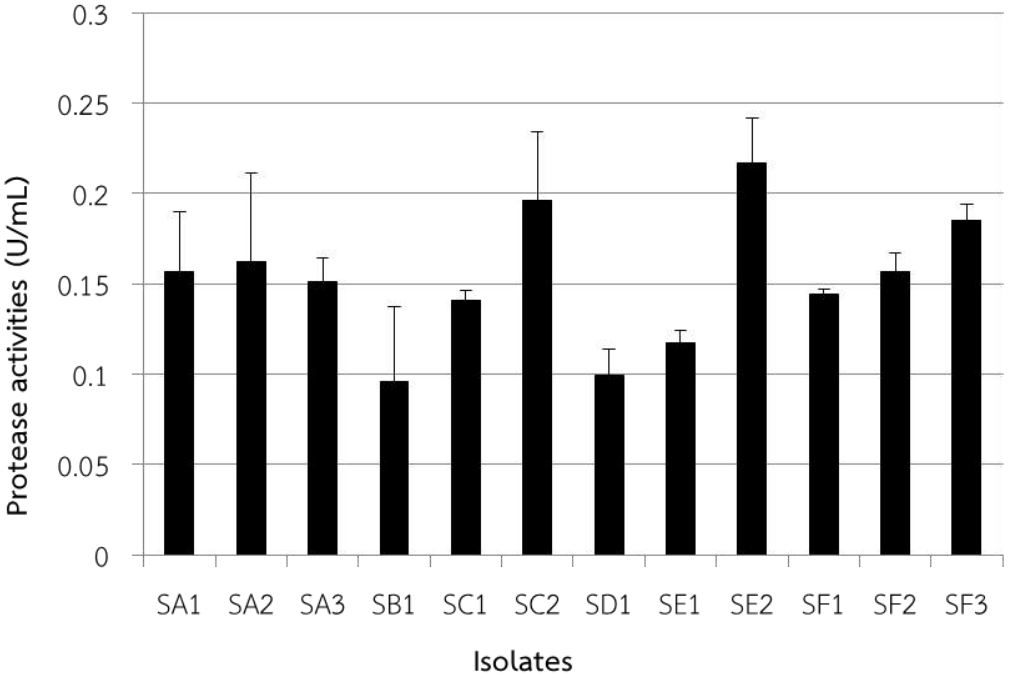

Figure 1 Extracellular protease activities produced by various bacterial isolates

3. ผลความสามารถของแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตเอนไซม์โปรติเอสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ

ศึกษาความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 12 ไอโซเลต เมื่อเลี้ยงในอาหาร production medium ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0, 5, 10, 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ในเวลา 24 ชั่วโมง ได้ผลการทดลองดังแสดงใน Table 2 พบว่าเชื้อทุกไอโซเลตเจริญได้ในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือทุกความเข้มข้น แบคทีเรียส่วนใหญ่มีการเจริญเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของเกลือที่เพิ่มขึ้น โดยเจริญได้มากในที่มีความเข้มข้นเกลือ ร้อยละ 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ยกเว้น SA2 มีการเจริญลดลง เมื่อมีความเข้มข้นของ

*ampun.cha@siam.edu
อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร
Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok.

เกลือที่เพิ่มขึ้น เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้สูงสุดในที่มีความเข้มข้นเกลือ ร้อยละ 15 ได้แก่ SA1, SA3, SC1, SC2, SD1, SE2, SF1, SF2 และ SF3 โดยมีค่าเท่ากับ 8.97, 9.24, 7.32, 9.16, 8.97, 9.91, 9.90, 9.96 และ 9.84 log CFU/ml ตามลำดับ ส่วนเชื้อ SB1 และ SE1 เจริญได้สูงสุดในที่มีความเข้มข้นเกลือ ร้อยละ 20 (9.05 และ 9.24 log CFU/ml ตามลำดับ) และเชื้อ SA2 เจริญได้สูงสุดในที่มีความเข้มข้นเกลือ ร้อยละ 5 (7.85 log CFU/ml) จะเห็นว่าเชื้อ SA1, SA3, SB1, SC1, SC2, SD1, SE1, SE2, SF1, SF2 และ SF3 จัดเป็นพวกแบคทีเรียชอบเค็มสูง เนื่องจากเชื้อในกลุ่มนี้จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ ร้อยละ 15-30 ยกเว้น SA2 จัดเป็นแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง โดยที่เชื้อกลุ่มนี้จะเจริญได้ดีในอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 3-15 [7] จากรายงานของ Rajan และคณะ (2010) [10] พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ 93 ไอโซเลต โดยเชื้อส่วนใหญ่ (ร้อยละ 75) เจริญได้ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3-10 จึงจัดเป็นพวกแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ส่วนที่เหลือเจริญได้ในที่มีความเข้มข้นของเกลือ น้อยกว่าร้อยละ 3 รายงานของ Tanasupawat และคณะ (2011) [14] พบว่า *Virgibacillus* TKNR 13-3 เจริญได้ในอาหาร JCM No.377 ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ทุกความเข้มข้น (ร้อยละ 0, 5, 10, 15 และ 20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร)

Table 2 Effect of sodium chloride concentrations on growth of various bacterial isolates in production medium.

Isolates	Growth of isolates on production medium (log CFU/ml)				
	0%	**5%**	**10%**	**15%**	**20%**
SA1	7.12	7.17	6.18	8.97	8.56
SA2	5.12	7.85	7.09	6.03	6.28
SA3	5.80	7.17	7.05	9.24	9.07
SB1	5.62	7.19	7.11	7.14	9.05
SC1	6.12	5.26	5.23	7.32	7.16
SC2	5.99	7.08	7.07	9.16	9.12
SD1	6.85	8.11	7.19	8.97	8.12
SE1	5.93	7.10	7.26	9.18	9.24
SE2	7.00	7.08	7.24	9.91	9.14
SF1	5.82	7.27	7.00	9.90	9.76
SF2	5.97	7.32	7.11	9.96	9.75
SF3	5.75	7.36	7.08	9.84	9.70

สรุปผล

งานวิจัยนี้ได้คัดแยกแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอสได้จากปลาร้า จากตลาด 6 แหล่ง พบว่าสามารถคัดแยกได้ 12 ไอโซเลต ส่วนใหญ่มีโคโลนีกลม นูน ขอบเรียบ ผิวมันวาว เมื่อทดสอบการติดสีแกรมพบว่าทั้ง 12 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวกทั้งหมด มี 2 แบบ คือรูปร่างกลม และท่อน มี 6 ไอโซเลตที่ผลิตเอนไซม์ได้สูง โดยผลิตได้ 0.16 ± 0.03 ถึง 0.22 ± 0.03 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ในที่มีความเข้มข้นเกลือร้อยละ 0-20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร มี 11 ไอโซเลตที่จัดเป็นพวกชอบเค็มสูง มี 1 ไอโซเลต ที่จัดเป็นพวกชอบเค็มปานกลาง แบคทีเรียที่

*ampun.cha@siam.edu
อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร
Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok.

คัดแยกได้สามารถเจริญได้ในที่มีความเข้มข้นของเกลือร้อยละ 0-20 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร ซึ่งเป็นช่วงความเข้มข้นที่กว้างมาก ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้จึงเป็นประโยชน์ต่อการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตปลาร้าหรือผลิตภัณฑ์ปลาหมักชนิดอื่นๆ ต่อไป เนื่องจากสามารถผลิตโปรติเอสได้ ซึ่งจะช่วยในการย่อยโปรตีนในปลา และลดระยะเวลาในการหมักปลาร้าให้เร็วขึ้น อย่างไรก็ตามจากการทดลองนี้พบว่าจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้สามารถผลิตโปรติเอสได้ปริมาณน้อย ดังนั้นหากจะนำไปใช้ประโยชน์จริง ควรศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการผลิตเอนไซม์ เช่น ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิที่ใช้ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ และระยะเวลาในการเลี้ยงจุลินทรีย์ เป็นต้น เพื่อให้สามารถผลิตเอนไซม์ได้มากขึ้น ซึ่งจะส่งผลให้หมักผลิตภัณฑ์ปลาหมักได้เร็วยิ่งขึ้นต่อไป

เอกสารอ้างอิง

[1] ตรี วาทกิจ, บวรศักดิ์ ลีนานนท์ และ จันทนี อุริยะพงศ์สรรค์. (2549). การแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียในปลานิลภายหลังการเก็บเกี่ยวและการเหลือรอดของเชื้อกลุ่ม *Aeromonas hydrophila* ระหว่างการแปรรูปโดยการรมควันแบบเย็น. วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร. 37(5):333-336.

[2] ศิริลักษณ์ นามวงษ์. (2553). ศักยภาพของแบคทีเรียชอบเค็มต่อการพัฒนาอุตสาหกรรมน้ำปลาไทย. บทความวิชาการ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม. 247: 470-477.

[3] Chaveesuk, R., Smith, J.P. and Simson, B.K. (1993). Production of fish sauce and acceleration of sauce fermentation using proteolytic enzymes. Journal of Aquatic Food Product Technology. 2(3): 59-77.

[4] Lopetcharat, K., Choi, Y.J., Park. J.W. and Daeschel, M.A. (2001). Fish sauce products and manufacturing: a review. Food Reviews International. 17: 68-88.

[5] Rao, M.B., Tanksale, A.M., Chatge, M.S. and Deshpande, V.V. (1998). Molecular and biotechnological aspects of microbial proteases. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 62: 597-635.

[6] Sánchez-Porro, C., Mellado, E., Bertoldo, C., Antranikian, G. and Ventosa, A. (2003). Screening and characterization of the protease CP1 produced by the moderately halophilic bacterium *Pseudalteromonas* sp. strain CP76. Extremophiles. 7: 221-228.

[7] พิมพ์เพ็ญ พรเฉลิมพงศ์ และ นิธิยา รัตนาปนนท์. Halophilic bacteria/แบคทีเรียที่ชอบเกลือ [ระบบออนไลน์]. แหล่งที่มาhttp://www.foodnetworksolution.com/wiki/word/1377/halophilic-bacteria-แบคทีเรียที่ชอบเกลือ (25 กันยายน 2557).

[8] วัชรา นิคมขำ. (2545). การศึกษาแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มที่มีการผลิตเอนไซม์โปรติเอสในน้ำปลา. วิทยานิพนธ์ประกาศนียบัตรบัณฑิต. สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร.

[9] Kanlayakrit, W. and Bovornreungroj, P. (2005). Isolation and characterization of salt-loving protease producing bacteria form fish sauce samples. Kasetsart Journal (Natural Science). 39: 88 – 97.

[10] Rajan, L.A., Joseph, T.C., Thampuran, N. and James, R. (2010). Studies on the microbial diversity of salted fishes under aerobic conditions. Microbiology Research. 2(4): 22-25.

[11] Shahbazi, M., Reza, H. and Heidari, K. (2012). A novel low molecular weight extracellular protease from a moderately halophilic bacterium *Salinivibrio* sp. strain MS-7: production and biochemical properties.

*ampun.cha@siam.edu

อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร

Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok.

Molecular Biology Research Communications. 1(2): 45-56.

[12] Norberg, P. and Hofsten, B.V. (1969). Proteolytic enzymes from extremely halophilic bacteria. Journal of General Microbiology. 55: 251-256.

[13] Harrigan, W.F. (1998). Laboratory Methods in Food Microbiology. academic press. USA. 532 p.

[14] Tanasupawat, S., Taprig, T., Akaracharanya, A. and Visessanguan, W. (2011). Characterization of *Virgibacillus* strain TKNR13-3 from fermented shrimp paste (ka-pi) and its protease production. African Journal of Microbiology Research. 5(26): 4714-4721.

*ampun.cha@siam.edu
อาจารย์ประจำ ภาควิชาเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสยาม กรุงเทพมหานคร
Lecturer, Department of Food Technology, Faculty of Science, Siam University, Bangkok.