# การคัดแยกโพรไบโอติกในกระบวนการหมักเต้าเจี้ยวสดและการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

# Isolation of probiotics in salted soybean fermentation and microbiological quality assay based on community product standards

พัชรินทร์ เทียมใหม่ และกัญญา สอนสนิท*

*สาขาวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครปฐม*
**jkanya@windowslive.com*

**บทคัดย่อ**

*วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อคัดแยกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากเต้าเจี้ยวในระหว่างการหมักและตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 327 ไอโซเลท นำมาศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของการเป็นโพรไบโอติก คือ การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง การทนเกลือน้ำดี การทนเกลือ การเจริญที่ pH ต่าง ๆ การเจริญในสภาวะมีและไม่มีออกซิเจน การเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ และทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ผลการศึกษาพบว่า จำนวน 5 ไอโซเลท ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไวต่อยา streptomycin และไอโซเลท PT6 และ PT44 ไวต่อยา ampicillin และ amoxicillin ในขณะที่อีก 3 ไอโซเลท ดื้อต่อยา ampicillin และ amoxicillin ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อก่อโรค พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ S. aureus ได้ ผลการตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน พบว่าผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวผ่านเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน*

**คำสำคัญ:** โพรไบโอติก เต้าเจี้ยว การหมัก คุณภาพ

**Abstract**

*The purpose of this study was to isolate probiotic bacteria from salted soybean fermentation and microbiological quality assay on community product standards. The probiotic properties of total 327 bacterial isolates were investigated (Hemolytic activity, bile salt tolerance, salt tolerance, pH, oxygen, temperatures and antibiotic resistance test). The results showed that 5 isolates showed $\gamma$ - haemolysis and sensitive to streptomycin. The isolate PT6 and PT44 were sensitive to ampicillin and amoxicillin while the other 3 isolates were resistant to ampicillin and amoxicillin. The result of pathogens inhibition found that all 5 isolates were able to inhibit S. aureus but could not inhibit E. coli and B. cereus. The microbiological quality assay according to the standard of community products were checked. It found that soybean products passed the standard of community products.*

**Keywords:** probiotic, salted soybean, fermentation, quality

**1. บทนำ**

เต้าเจี้ยว (soy paste) เป็นผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากการหมัก (fermentation) เพื่อการถนอมอาหารจัดในกลุ่มอาหารหมักเกลือ มีวัตถุดิบสำคัญคือถั่วเหลือง (soybean) เต้าเจี้ยวถูกนำมา ใช้เป็นส่วนประกอบอาหาร และเป็นเครื่องปรุงรส การทำเต้าเจี้ยวเริ่มต้นทำการเตรียมโคจิ โดยใช้ถั่วเหลือง ข้าว หรือข้าว บาร์เลย์ คลุกเคล้าผสมกับแป้งสาลีคั่ว แล้วถ่ายกล้าเชื้อรา *Aspergillus oryzae* แล้วคลุกเคล้าให้ผสมกันดีแล้วนำไปบ่มก็จะได้โคจิที่ใช้ในการหมักแล้วนำโคจิที่ได้ไปหมักกับน้ำเกลือ แล้วหมักบ่มทิ้งไว้ 1-2 เดือน (ภัทราภรณ์, 2557) จุลินทรีย์ที่พบในอาหารหมักส่วนใหญ่ได้แก่ ยีสต์ รา และแบคทีเรีย ซึ่งโพรไบโอติก (Probiotics) เป็นจุลินทรีย์ที่น่าสนใจ เพราะเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งก่อประโยชน์ให้กับสุขภาพของผู้บริโภคในการคงจุลินทรีย์ในร่างกายไว้ หรือช่วย ปรับสภาพความสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดมะเร็ง ลดระดับคอเลสเทอรอลในเลือด ป้องกันและรักษาโรคท้องร่วงทั้งที่เกิดจาก แบคทีเรีย และไวรัส เป็นต้น จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติค ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Bifidobacterium* spp. (Vinderola and Reinheimer, 2003) ซึ่งเป็นกลุ่มของจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่ดีที่สุด (Rial, 2000) ทั้งนี้เนื่องจากแบคที เรีย เหล่านี้ทนต่อกรด และเกลือน้ำดี ทำให้สามารถรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหารซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญในการเป็นโพรไบโอติก (Kos et al., 2000) รวมทั้งสามารถสร้างกรดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซินในการต่อต้านการเติบโตของเชื้อก่อโรค นักวิทยาศาสตร์พยายามที่จะคัดแยกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากแหล่งต่าง ๆ เพื่อใช้ในอุตสาหกรรม เช่น คัดแยกจากมนุษย์ อาหาร ผลิตภัณฑ์นม และอาหารหมัก (Mathara et al., 2008) โพรไบโอติกเมื่อจะนำมาใช้กับมนุษย์จะต้องมีข้อควรคำนึงถึงในเรื่องของความปลอดภัยหรือผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นที่นอกเหนือจากประโยชน์ของโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว โดยทั่วไปการคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่จะนำมาใช้กับมนุษย์นั้น มีแนวทางหลักคือ 1) สามารถอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารได้ 2) ไม่เป็นสายพันธุ์ที่ก่อให้เกิดโรค 3) สามารถเจริญเพิ่มจำนวนในทางเดินอาหารได้ 4) มีปริมาณสูงเพียงพอที่จะก่อให้เกิดผลดีต่อสุขภาพ (ภณิดา เกื้อสุวรรณ และวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2557)

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นในการคัดแยกเชื้อโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์เต้าเจี้ยวสด เพื่อศึกษาโพรไบโอติกจากกระบวนการหมักเต้าเจี้ยวสดที่ระยะเวลาหมัก ได้แก่ 2, 15, 30 และ 45 วัน และตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

**2. วิธีการดำเนินการวิจัย**

**2.1 การคัดแยกโพรไบโอติกจากเต้าเจี้ยวสด**

ตัวอย่างเต้าเจี้ยวที่นำมาใช้แยกเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติก ได้นำมาจากกลุ่มแม่บ้านเกษตรมะขามทอง จังหวัดกาญจนบุรีโดยเก็บตัวอย่างใส่ขวดปราศจากเชื้อ โดยเก็บจากตัวอย่างที่หมักนาน 15 วัน 3 ตัวอย่าง 30 วัน 1 ตัวอย่าง และ 45 วัน 2 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 6 ตัวอย่าง

**2.1.1 การหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและการแยกเชื้อโพรไบโอติกจากเต้าเจี้ยวสด**

นำตัวอย่างเต้าเจี้ยว 25 กรัมผสมกับ Peptone Water 0.1% 225 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ทำการเจือจางตัวอย่าง $10^{-1}$ - $10^{-8}$ นำความเจือจางที่ $10^{-6}$ , $10^{-7}$, $10^{-8}$ มา Pour plate บนอาหาร Plate Count Agar และ Plate Count Agar +3% sodium chloride โดยจะต้องทำ 2 ชุด โดยชุดที่ 1 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24-48 ชั่วโมง และชุดที่ 2 นำไปบ่มในปี๊บ เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีรายงานผลเป็นหน่วย CFU/ml และนำโคโลนีที่แตกต่างมา streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

**2.1.2 การตรวจสอบสมบัติการเป็นโพรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ**

1) ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง โดยนำแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำเชื้อมา point inoculation ลงบนอาหาร Blood agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เก็บเชื้อกลุ่ม Gramma haemolysis โคโลนีของเชื้อไม่มีการเปลี่ยนแปลง ซึ่งเป็นกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติ นำเชื้อกลุ่มนี้ไปศึกษาต่อไป

2) ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี โดยนำแบคทีเรียที่ไม่มีความสามารถในการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth + Bile salt 0.3%, 0.6%, 0.9% โดยมี Nutrient broth ที่ไม่เติม Bile salt เป็นตัวควบคุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

3) ทดสอบการทนต่อเกลือ โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth + sodium chloride 1%, 3%, 6%, 10% โดยมี Nutrient broth ที่ไม่เติม sodium chloride เป็นตัวควบคุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

4) ทดสอบการทน pH ต่าง ๆ นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth pH 1, 3, 5, 7 บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

5) ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth โดยแบ่งเป็น 2 ชุด ชุดแรกบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ชุดที่ 2 บ่มในปี๊บ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

6) ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

7) ทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญโดยยาปฏิชีวนะด้วยวิธี Agar diffusion method โดยเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth บ่มที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง เทียบกับ 0.5 McFarland standard นำเชื้อมา swab ลงอาหาร Nutrient agar เจาะอาหารโดยใช้ Cork borer ขนาด 0.6 มิลลิเมตร ทั้งหมด 4 หลุม โดยหลุมที่ 1 – 3 หยดยาปฏิชีวนะที่มีความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ได้แก่ ampicillin, streptomycin และ amoxicillin หลุมละ 20 ไมโครลิตร ตามลำดับ ส่วนหลุมที่ 4 หยดน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร เพื่อทำเป็นหลุมที่ควบคุมผลลบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดขนาดโซนใสเป็นหน่วยเซนติเมตร

8) ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคได้แก่ *Escherichia coli, Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ด้วยวิธี Agar diffusion method โดยเพาะเลี้ยงเชื้อที่จะทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อแต่ละเชื้อลงในอาหาร Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเพาะเลี้ยงเชื้อก่อโรคลงในอาหาร Nutrient broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อที่จะทดสอบและรวมทั้งเชื้อก่อโรคไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที โดยเชื้อที่ทดสอบเก็บส่วนใสแล้วทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองด้วย syringe filter สำหรับเชื้อก่อโรคนั้นเทส่วนใสทิ้งแล้วเติม Normal saline 0.85% และ

ปรับความขุ่นให้เท่ากับ 0.5 McFarland standard จากนั้น swab เชื้อก่อโรคลงอาหาร Nutrient agar รอจนแห้ง แล้วเจาะอาหารโดยใช้ Cork borer ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนตริเมตร จำนวน 4 หลุม โดยหลุมที่ 1 และ 2 เติมส่วนใสอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่จะทดสอบลงปริมาตร 20 ไมโครลิตร หลุมที่ 3 เติมยาปฏิชีวนะ ampicillin ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และหลุมที่ 4 เติมน้ำกลั่น 20 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยวัดขนาดโซนใสเป็นหน่วยเซนติเมตร

**2.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน**

การตรวจวิเคราะห์เชื้อก่อโรคโดยใช้วิธีมาตรฐานสำหรับการวิเคราะห์อาหาร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค ได้แก่ *Salmonella* spp., *Bacillus cereus, Staphylococcus aureus,* coliform, ราและยีสต์ ในตัวอย่างเต้าเจี้ยว

## 3. ผลการวิจัย

**3.1 ผลการคัดแยกโพรไบโอติกจากเต้าเจี้ยวสด**

**3.1.1 การหาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและการแยกเชื้อโพรไบโอติกจากเต้าเจี้ยวสด**

จากตัวอย่างเต้าเจี้ยวสดในระยะการหมักต่าง ๆ ได้แก่ ระยะ 15 วัน 3 ตัวอย่าง ระยะ 30 วัน 1 ตัวอย่าง ระยะ 45 วัน 2 ตัวอย่าง รวมจำนวน 6 ตัวอย่าง พบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีในแต่ระยะการหมัก และจำนวน ไอโซเลทที่แยกได้ทั้งหมด 327 ไอโซเลท

**ตารางที่ 1** จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่แยกได้จากเต้าเจี้ยวสดในระยะการหมักต่าง ๆ

| ระยะการหมัก | ตัวอย่างที่ | จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด (CFU/ml) | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | บ่มเชื้อแบบใช้ออกซิเจน | | บ่มเชื้อแบบไม่ใช้ออกซิเจน | |
| | | PCA | PCA + 3%NaCl | PCA | PCA + 3%NaCl |
| 15 วัน | 1 | $6.35\times10^{7}$ | $1.52\times10^{8}$ | $1.435\times10^{8}$ | $1.8\times10^{8}$ |
| | 2 | $4.1\times10^{8}$ | $4.4\times10^{8}$ | $1.975\times10^{8}$ | $2.24\times10^{8}$ |
| | 3 | $2.585\times10^{8}$ | $5.95\times10^{8}$ | $4.1\times10^{8}$ | $7.9\times10^{8}$ |
| 30 วัน | 1 | $2.6\times10^{8}$ | $3.25\times10^{8}$ | $1\times10^{8}$ | $1.45\times10^{8}$ |
| 45 วัน | 1 | $1.615\times10^{9}$ | $2.715\times10^{8}$ | $1.665\times10^{9}$ | $1.02\times10^{9}$ |
| | 2 | $2.82\times10^{8}$ | $9.0\times10^{8}$ | $1.425\times10^{9}$ | $1.36\times10^{9}$ |

**3.1.2 ผลการตรวจสอบสมบัติการเป็นโพรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ**

จากการทดลองการตรวจสอบสมบัติการเป็นโพรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้จากเต้าเจี้ยวสดในระยะการหมักต่าง ๆ ซึ่งรวมทั้งหมด 327 ไอโซเลทมาศึกษาการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่ามีจำนวน 5 ไอโซเลทที่อยู่ในกลุ่ม Gramma haemolysis ซึ่งไม่มีการย่อยลสายเม็ดเลือดแดง มี 28 ไอโซเลทที่อยู่ในกลุ่ม Alpha haemolysis และ 294 ไอโซเลทอยู่ในกลุ่ม Beta haemolysis ซึ่งมีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงสมบูรณ์ ดังนั้นจึงเลือกเชื้อจำนวน 5 ไอโซเลทได้แก่ PT 6, PT 34, PT 35, PT 44 และ PT 100 ไปทดสอบในขั้นต่อไป

ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี จากการนำแบคทีเรียที่คัดเลือกมาจำนวน 5 ไอโซเลทคือ PT 6, PT 34, PT 35, PT 44 และ PT 100 มาทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.3 %, 0.6 % และ 0.9 % พบว่า แบคทีเรียทั้งหมด 5 ไอโซเลทสามารถทนต่อเกลือน้ำดี 0.3% ได้ แบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลทคือ PT6 , PT35,

PT44, PT100 สามารถทนต่อเกลือน้ำดี 0.6 %ได้ และแบคทีเรียจำนวน 3 ไอโซเลทคือ PT35, PT44, PT100 สามารถทนต่อเกลือน้ำดี 0.9% ได้

ทดสอบการทนต่อเกลือจากการทดสอบการทนต่อเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ พบว่าความเข้นข้น 1% 3% 6% และ 10% แบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ PT 6, PT 34, PT 35, PT 44 และ PT 100 สามารถทนต่อเกลือที่มีความเข้นข้น 1% 3% 6% และ 10% ได้ทั้งหมด

ทดสอบการทน pH จากการทดสอบการทน pH ต่าง ๆ ได้แก่ pH 3, 5, 7 และ 9 พบว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถทนต่อ pH 3, 5, 7, 9 ได้ทั้งหมด

ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน จากการทดสอบการการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน พบว่า แบคทีเรีย 5 ไอโซเลท สามารถเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนได้ทั้งหมด

ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ จากการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ คือ 25 องศาเซลเซียส 30 องศาเซลเซียส 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า แบคทีเรีย 5 ไอโซเลท สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 37 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส ได้ แต่มีแบคทีเรีย 3 ไอโซเลท คือ PT6, PT34, PT44 ที่เจริญที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส

ทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ จากการทดสอบการทนต่อยาปฏิชีวนะ 3 ชนิด คือ ampicillin, streptomycin และ amoxicillin พบว่า แบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่ดื้อต่อยา streptomycin แบคทีเรีย 2 ไอโซเลท คือ PT6 และ PT44 ไม่ดื้อต่อยา ampicillin และ amoxicillin

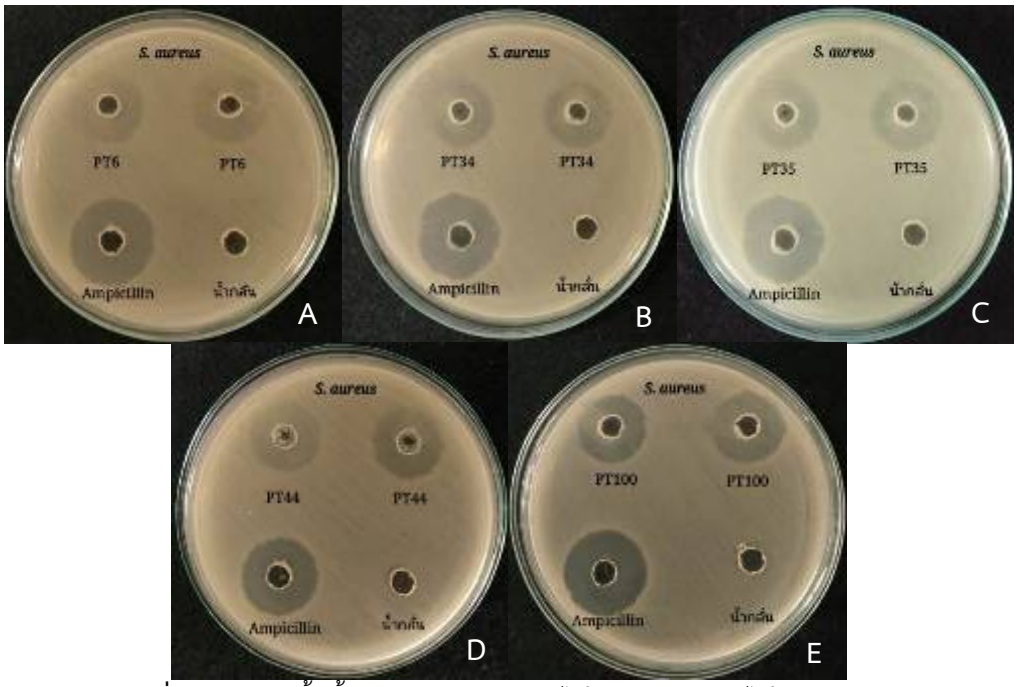
ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค จากการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค 3 ชนิด ได้แก่ *E. coli* , *B. cereus* และ *S. aureus* พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ทั้งหมดและทั้ง 5 ไอโซเลท ไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *B. cereus* ได้

**ตารางที่ 3** การตรวจสอบสมบัติของโพรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ

| **การทดสอบ** | | **PT 6** | **PT 34** | **PT 35** | **PT 44** | **PT 100** |
|---|---|---|---|---|---|---|
| ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง | | γ-haemolysis | γ -haemolysis | γ -haemolysis | γ -haemolysis | γ -haemolysis |
| ทนเกลือน้ำดี (%w/v) | 0.3% | ++ | + | +++ | ++ | ++++ |
| | 0.6% | + | - | ++ | ++ | +++ |
| | 0.9% | - | - | + | + | ++ |
| ทนเกลือ (%w/v) | 1% | +++ | ++ | + | ++ | + |
| | 3% | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| | 6% | + | ++++ | +++ | +++ | ++++ |
| | 10% | + | + | ++++ | + | ++++ |
| ทน pH | 3 | +++ | + | ++ | + | + |
| | 5 | +++ | ++ | ++ | ++ | + |
| | 7 | +++ | +++ | ++ | ++ | ++ |
| | 9 | ++++ | +++ | + | +++ | ++ |
| ออกซิเจน | $O_2$ | +++ | ++ | ++ | ++++ | ++ |
| | $ANO_2$ | ++ | +++ | ++ | +++ | +++ |
| อุณหภูมิ ($^{O}C$) | 25 | + | + | - | ++ | - |
| | 30 | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| | 37 | +++ | +++ | ++ | +++ | ++ |
| | 45 | +++ | ++ | +++ | +++ | + |
| ต้านทานยาปฏิชีวนะ (cm) | ampicillin | 3.75±0.24 | resistance | resistance | 3.42±0.49 | resistance |
| | streptomycin | 2.95±0.06 | 2.25±0.29 | 2.5±0.17 | 2.92±0.10 | 2.57±0.00 |
| | amoxicillin | 3.25±0.29 | resistance | resistance | 2.57±0.31 | resistance |
| ยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค (cm) | *E. coli* | - | - | - | - | - |
| | *B. cereus* | - | - | - | - | - |
| | *S. aureus* | 1.275±0.11 | 1.375±0.25 | 1.15±0.13 | 1.45±0.17 | 1.325±0.13 |

**3.2 การตรวจวิเคราะห์คุณภาพทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน**

จากการตรวจวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในตัวอย่างเต้าเตี้ยว พบว่า ไม่พบเชื้อ *Salmonella* spp. ต่อตัวอย่างเต้าเจี้ยว 25 กรัม ไม่พบ *S. aureus* ต่อตัวอย่าง 0.1 กรัม ไม่พบ coliform ในตัวอย่างเต้าเจี้ยวสด แต่พบ *B. cereus* 1,500 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม พบราและยีสต์ 30 โคโลนีต่อตัวอย่างเต้าเจี้ยว 1 กรัม ซึ่งผ่านมาตรฐานที่กำหนดไว้




**ภาพที่ 1** ผลการยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ของ (A) ไอโซเลท PT6, (B) ไอโซเลท PT34 , (C) ไอโซเลท PT35, (D) ไอโซเลท PT44 และ (E) ไอโซเลท PT100

**4. อภิปรายผลการวิจัย**

จำนวนจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่หมักนาน 15 30 และ 45 วัน มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเจริญเพิ่มขึ้นดังตารางที่ 1 จุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศ ทั้งที่เจริญได้ในอาหารที่เติมเกลือและไม่เติมเกลือ และคัดแยกแบคทีเรียทั้งหมดได้ 327 ไอโซเลท ซึ่งสามรถแยกได้ทั้งหมด 327 ไอโซเลท จากนั้นเมื่อนำมาทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 5 ไอโซเลท ที่ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือด (Gramma-hemolysis) ได้แก่ PT6, PT34, PT35, PT44 และ PT100 แล้วนำมทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี พบว่าไอโซเลท PT35, PT44 และ PT100 สามารถอยู่รอดในสภาวะดังกล่าวได้ การทดสอบทนต่อเกลือ 1% 3% 6% 10% ทดสอบการทน pH 3, 5, 7 และ 9 การทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนพบว่า ไอโซเลท PT6, PT34, PT35, PT44 และ PT100 สามารถอยู่รอดในสภาวะดังกล่าวได้ ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ พบว่า PT6, PT34 และ PT44 สามารถเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ได้ การทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าแบคทีเรียไอโซเลท PT34, PT35, PT100 ต้านทานต่อยา ampicillin และ amoxicillin แต่ไม่ต้านทานยา streptomycin ส่วนแบคทีเรียไอโซเลท PT6 และ PT100 ไม่ต้านทานต่อยาทั้ง 3 ชนิด และมีการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อโรค พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลทสามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ทั้งหมด และทั้ง 5 ไอโซเลทไม่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *B. cereus* ได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ หทัยรัตน์ มุสิกสังข์ มีการศึกษาโพรไบโอติกในไก่ พบว่า แบคทีเรียไพรโบโอติกที่คัดแยกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลท สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus* ได้ทั้งหมดทุกไอโซเลท แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *E. coli* ได้

**5. สรุปผลการวิจัย**

จากการหาปริมาณจุลินทรีย์ในตัวอย่างเต้าเจี้ยวที่หมักนานขึ้น ปริมาณจุลินทรีย์จะเพิ่มขึ้นนั้นเนื่องจากในขั้นตอนการเตรียมโคจิ แป้งจากข้าวซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน และโปรตีนจากถั่วเหลืองซึ่งเป็นหล่งไนโตรเจน *A. oryzae* จะสร้างเอนไซม์ย่อยวัตถุดิบได้น้ำตาลและกรดอะมิโน เมื่อเติมน้ำเกลือจะมีจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ที่สามารถเจริญในสภาพที่มีเกลือได้ ซึ่งจะส่งผลต่อค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณแอลกอฮอล์และสารหอมระเหย เมื่อระยะเวลาหมักนานขึ้นจะส่งผลให้สภาวะเหมาะสมต่อเชื้อกลุ่มเพิ่มปริมาณมากขึ้น (ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และสุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์, 2560) จากการคัดแยกได้จากกระบวนการหมักเต้าเจี้ยว 5 ไอโซเลตนั้นที่ไม่ย่อยสามารถเม็ดเลือดแดง แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียอีก 322 ไอโซเลต ที่ย่อยเม็ดเลือดแดงได้นั้นอาจเป็นเชื้อที่อันตรายหรืออาจเป็นเชื้อ *B. cereus* เพราะจากการตรวจวิเคราะห์ พบเชื้อ *B. cereus* จำนวน *1,500 cfu/g* ซึ่งสามารถย่อยเม็ดเลือดแดงได้ เนื่องจาก *B. cereus* เป็นเชื้อที่สร้างเอนโดสปอร์ทนทานต่อสภาวะต่าง ๆ ซึ่งพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ เช่น อากาศ น้ำ ดิน ฝุ่นละออง และพืชผัก (อัจฉรา เพิ่ม, 2549) เป็นต้นผลิตภัณฑ์จึงอยู่ในภาวะเสี่ยงที่ผลิตไม่ผ่านมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนเต้าเจี้ยวที่ได้กำหนดปริมาณเชื้อ *B. cereus* ไว้ไม่เกิน 2,500 *cfu/g* จึงต้องเพิ่มการควบคุมคุณภาพด้านสุขอนามัยมากยิ่งขึ้น เช่น การทำความสะอาดวัตถุดิบ การเปลี่ยนน้ำแช่เมล็ดถั่วเหลือง ความสะอาดอุปกรณ์และภาชนะต่าง การเตรียมน้ำเกลือ และการนึ่งฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ เป็นต้น

**6. เอกสารอ้างอิง**

ประสงค์สม ปุณยอุปพัทธ์ และสุกฤตา ปุณยอุปพัทธ์. (2560). **กระบวนการและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการผลิตอาหารหมัก.** (พิมพ์ครั้งที่ 1). กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรมหาวิทยาลัย.

ภณิดา เกื้อสุวรรณ และวิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. (2557). **การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง.** โครงการประชุมวิชาการเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ครั้งที่ 15 บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 667- 676.

ภัทราภรณ์ ศรีสมรรถการ, นิอร โฉมศรี, ณัฐธญาณ์ ศรีสุวอ. (2557). **เต้าเจี้ยวและซีอิ้ว**. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา สถาบันวิจัยเทคโนโลยีเกษตร

หทัยรัตน์ มุสิกสังข์. (2551). **การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่เป็นโปรไบโอติกในไก่และการเพิ่มการรอดชีวิตของเชื้อโดยการห่อหุ้ม**. ปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อัจฉรา เพิ่ม. (2549). **แบคทีเรียแลคติก**. (พิมพ์ครั้งที่1). สงขลา: คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

Kos, B., S˘us˘kovic´, J., Goreta, J. and Matos˘ic´, S. (2000). **Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions**. Food Technology and Biotechnology 38, 121–128.

Mathara JM, Schillinger U, Kutima PM, Mbugua SK, Guigas C, Franz C, Holzapfel WH. (2008). **Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Maasai traditional fermented milk products in Kenya**. Curr Microbiol; 56: 315–321.

Rial D. (2000). **The role of probiotics culture in the control of gastrointestinal health**, J.iutr., 130, 396s – 402.

Vinderola, C. G. and J. A. Reinheimer (2003). **Lactic acid bacteria: a comparative ‘‘in vitro’’ study of probiotic characteristics and biological barrier resistance**. Food Res Int 36: 895–904

Xu J, Liu X, Yang B, Li Z. (2008). **Antimicrobial susceptibility of probiotics**. Wei Sheng Yan Jiu. 37: 354-357.