

## การแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากหน่อไม้ดองเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมัก

ธนากร บำรุงศักดิ์\*

### บทคัดย่อ

แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทสำคัญต่ออาหารหมักหลายชนิด ได้แก่ ผักดอง ผลไม้ดอง โยเกิร์ต ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม ปลาหมักชนิดต่างๆ รวมทั้งหน่อไม้ดองซึ่งในปัจจุบันมีการบริโภคกันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศและต่างประเทศ โดยประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตที่สำคัญโดยเฉพาะอย่างยิ่งจังหวัดปราจีนบุรีซึ่งมีพื้นที่ปลูกหน่อไม้จำนวน 58,383 ไร่ อย่างไรก็ตามในปี พ.ศ. 2549 ได้มีการระบาดของสารพิษโบทูลิน (botulin) จากเชื้อ *Clostridium botulinum* ในหน่อไม้บรรจุปีบทำให้ต้องหากระบวนการอื่นๆ มาใช้แปรรูปหน่อไม้เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าว พร้อมทั้งได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ และมีความหลากหลาย ดังนั้นจึงได้ศึกษาวิจัยการแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากหน่อไม้ดองที่มีจำหน่ายในจังหวัดขอนแก่นและที่ผลิตบริโภคในครัวเรือน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ผสม Bromocresol purple (BCP) 0.04 เปอร์เซ็นต์ และ แคลเซียมคาร์บอเนต ( $\text{CaCO}_3$ ) 1 เปอร์เซ็นต์ เริ่มจากการคัดเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใสโดยรอบและเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลต จากนั้นนำมาศึกษาคุณลักษณะทางด้านสรีระวิทยา สันฐานวิทยาและชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบระบบ API 50 CH เพื่อใช้จำแนกในระดับสกุลและสปีชีส์ พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากหน่อไม้ดองมี 2 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus pentosus* และ *Lactobacillus plantarum* จากนั้นนำแบคทีเรียทั้งสองสายพันธุ์มาศึกษากราฟการเจริญเติบโต (Growth Curve) พร้อมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) และค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด (กรดแลคติก) พบว่าเชื้อ *L. pentosus* จะมีการเจริญเข้าสู่เฟสคงที่ (stationary phase) ประมาณชั่วโมงที่ 18 โดยมีจำนวนเชื้อแบคทีเรีย 9.11 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร ส่วนเชื้อ *L. plantarum* จะมีการเจริญเข้าสู่เฟสคงที่ ประมาณชั่วโมงที่ 18 เช่นกัน แต่มีจำนวนเชื้อแบคทีเรีย 9.43 ล็อกโคโลนีต่อมิลลิลิตร สำหรับการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) พบว่าที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อ *L. pentosus* และ *L. plantarum* จะให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) เท่ากับ 4.10 และ 4.27 ตามลำดับ ( $P \leq 0.05$ ) ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงนั้น พบว่าเชื้อ *L. pentosus* และ *L. plantarum* จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด เท่ากับ 1.71 และ 1.55 ตามลำดับ ( $P \leq 0.05$ ) จากนั้นนำแบคทีเรียแลคติกทั้งสองสายพันธุ์ที่แยกได้ไปเป็นเชื้อเริ่มต้นในการผลิตหน่อไม้ดองที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อที่ต่างกัน 3 ระดับ คือ 2, 3 และ 4% เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง หลังจากการหมักพบว่าสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกและระดับความเข้มข้นของเชื้อที่เติมลงในหน่อไม้ดองมีอิทธิพลร่วมกันต่อค่าความเป็นกรด-ด่างและเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P \leq 0.05$ ) โดยเชื้อ *L. plantarum* ที่ระดับความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์ ให้ค่าความเป็นกรด-ด่างสูงสุดคือ 4.27 ( $P \leq 0.05$ ) ส่วนเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดพบว่า เชื้อ *L. plantarum* ที่ระดับความเข้มข้น 4 เปอร์เซ็นต์และเชื้อผสมระหว่าง *L. pentosus* กับ *L. plantarum* ที่ระดับความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์จะให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดสูงสุดคือ 0.73 จากนั้นนำหน่อไม้ดองที่ได้จากการใช้เชื้อเริ่มต้น *L. pentosus*, *L. plantarum* และเชื้อผสมทั้งสองชนิด ที่มีระดับความเข้มข้นของเชื้อ 2, 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์ มาทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าชนิดของสายพันธุ์และระดับความเข้มข้นของเชื้อ ไม่มีอิทธิพลร่วมต่อค่าคะแนน

\* วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (เทคโนโลยีการอาหาร) คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น. 110 หน้า.

ความชอบในทุกคุณลักษณะ ( $P>0.05$ ) และเมื่อพิจารณาจากปัจจัยหลักพบว่าชนิดของเชื้อเริ่มต้น มีผลต่อค่าคะแนนความชอบทางด้าน กลิ่น ความเปรี้ยว รสชาติ เนื้อสัมผัสและความชอบโดยรวม ( $P\leq 0.05$ ) แต่ไม่มีผลต่อค่าคะแนนความชอบทางด้านสี ( $P>0.05$ ) โดยเชื้อเริ่มต้นที่ให้ค่าคะแนนความชอบโดยรวมสูงสุดคือ *L. pentosus* และเชื้อผสมระหว่าง *L. pentosus* กับ *L. plantarum* โดยมีค่าคะแนน 6.33 และ 6.04 ตามลำดับ ขณะที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้นจะมีผลเฉพาะต่อค่าคะแนนความชอบด้านความเปรี้ยวเท่านั้น ( $P\leq 0.05$ ) โดยพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น 3 และ 4 เปอร์เซ็นต์จะให้ค่าคะแนนความชอบด้านความเปรี้ยวสูงสุด โดยมีค่าคะแนน 5.00 และ 5.44 ตามลำดับ จากนั้นศึกษาระดับความแก่อ่อนที่เหมาะสมของหน่อไม้ในการหมักดอง โดยติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่าความเป็นกรด-ด่างและเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของหน่อไม้ดองแก่, หน่อไม้ดองกลาง, หน่อไม้ดองอ่อน และหน่อไม้เลี้ยงไม่มีความแตกต่างกัน ( $P>0.05$ ) โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 3.31-3.44 ส่วนค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด พบว่าระดับความแก่อ่อนของหน่อไม้ มีผลต่อค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p\leq 0.05$ ) โดยที่หน่อไม้ดองแก่และไม้ดองกลางให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรดสูงสุดเท่ากับ 0.53 และ 0.52 ตามลำดับ ( $P>0.05$ ) รองลงมาคือ ไม้ดองอ่อนและไม้เลี้ยง โดยให้ค่าเปอร์เซ็นต์ความเป็นกรด เท่ากับ 0.51 และ 0.50 ตามลำดับ ( $P>0.05$ ) จากนั้นนำหน่อไม้ดองที่ผลิตจากหน่อไม้ซึ่งมีระดับความแก่อ่อนแตกต่างกันมาทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าให้ค่าคะแนนความชอบด้านสี กลิ่น ความเปรี้ยว รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ของหน่อไม้ดองแตกต่างกัน ( $p\leq 0.05$ ) โดยที่ไม้ดองแก่และไม้ดองกลางจะให้ค่าความชอบโดยรวมสูงสุดเท่ากับ 7.00 และ 6.70 ตามลำดับ ( $P>0.05$ ) เมื่อทราบระดับความแก่อ่อนที่เหมาะสมแล้ว จึงศึกษาสูตรการผลิตที่เหมาะสมและนำหน่อไม้ดองที่ได้ไปทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าค่าคะแนนความชอบของหน่อไม้ดองสูตรเติมน้ำข้าวข้าว และหน่อไม้ดองสูตรเติมน้ำตาล มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในด้าน กลิ่น ความเปรี้ยว รสชาติ เนื้อสัมผัส และความชอบโดยรวม ( $p\leq 0.05$ ) ยกเว้นค่าความชอบด้านสีที่ไม่แตกต่างกัน( $P>0.05$ ) จากนั้นศึกษารูปแบบการเจริญของเชื้อเริ่มต้นที่เหมาะสมที่ใช้ในกระบวนการหมักหน่อไม้พบว่า เมื่อเริ่มต้นการหมักจะมีจำนวนเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.39 Log CFU/g และมีความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.10 ต่อมาเมื่อเวลาผ่านไป 18 ชั่วโมงจะมีจำนวนเชื้อสูงสุดเท่ากับ 8.76 Log CFU/g ส่วนค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลงอย่างรวดเร็วเหลือ เท่ากับ 3.59

# Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Fermented Bamboo shoots to be Used as Mixed Starter Cultures for Fermentation

Thanakorn Bumrungpukdee\*

## Abstract

Lactic acid bacteria have the important roles in many kinds of fermented foods including fermented fruits and vegetables, yogurt, fermented sausage, nham, fermented fish and also fermented bamboo shoots currently mostly consumed in Thailand and other countries. Particularly, Thailand is the main production site of bamboo shoots especially Prachinburi province with the growing area of 58,383 rai. However, in 2006, there was an outbreak of botulin toxin from *Clostridium botulinum* in peeled bamboo; thus, some other methods are chosen for bamboo processing to prevent the problem and also achieve the product with good quality and diversity. Therefore, the research was conducted to isolate and identify lactic acid bacteria from fermented bamboo shoots sold and home made in Khon Kaen using MRS agar mixed with 0.04% Bromocresol purple (BCP) and 1% calcium carbonate. First, the colonies with clear zone and medium color changed from purple to yellow were selected and found that there were 83 isolates in total. Then, all isolates were determined for their physiological and morphological characteristics. Also, biochemical tests using API 50 CH testing kit were analyzed for genus and species identification levels. It was found that lactic acid bacteria isolated from the fermented bamboo shoots were two strains of *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum*. Furthermore, two strains of these bacteria were determined for their growth curves and also monitored for pH and % acidity changes. It was found that *L. pentosus* and *L. plantarum* had grown into the stationary phase after 18 hr of incubation with the numbers of 9.11 and 9.43 Log CFU/ml respectively. In addition, for pH and % acidity changes, it was found that after 24 hrs of incubation, *L. pentosus* and *L. plantarum* gave out the pHs of 4.10 and 4.27 respectively ( $P \leq 0.05$ ) and % acidity of 1.71 and 1.55 respectively ( $P \leq 0.05$ ). Then, two strains of lactobacilli isolated were used as starter cultures for fermented bamboo shoots at the 3 levels of concentrations as 2, 3 and 4% and had undergone fermentation for 96 hrs. After fermentation, it was found that there was an interaction between strains of lactic acid bacteria and concentration levels on pH and % acidity ( $P \leq 0.05$ ) and *L. plantarum* at the level of 2% gave out the highest pH as 4.27 ( $P \leq 0.05$ ) whereas *L. plantarum* at the level of 4% and the combination of *L. pentosus* and *L. plantarum* at the level of 3% gave out the highest acidity as 0.73%. Then, the fermented bamboo shoots using *L. pentosus*, *L. plantarum* and the combination of both at the concentrations of 2, 3 and 4 % as starter cultures were sensory evaluated and found that there was no interaction between strains and concentration levels on likings with all attributes ( $P > 0.05$ ). When the main effects were considered, it was found that starter strains had the effects on likings of odor, sourness, taste, texture and overall ( $P \leq 0.05$ ) but color ( $P > 0.05$ ) and the starters giving the highest overall

---

\* Master of Science (Food Technology), Faculty of Technology, Khon Kaen University. 110 pages.

liking were *L. pentosus* and the combination of *L. pentosus* and *L. plantarum* with the scores of 6.33 and 6.04 respectively whereas concentration levels had the effect only on sourness liking ( $P \leq 0.05$ ) as at 3 and 4% concentration levels, the scores were highest with the values of 5.00 and 5.44 respectively. Furthermore, the suitable bamboo shoots maturity for fermentation was determined by following changes in pH and % acidity for 96 hrs and found that the pHs of old asper backer bamboo, medium asper backer bamboo, young asper backer bamboo and hedge bamboo were in the range of 3.31- 3.44 and were not significantly different ( $P > 0.05$ ) while the bamboo shoots maturity had the significant effect on % acidity ( $P \leq 0.05$ ) as the old and medium asper backer bamboos gave out the highest acidity as 0.53 and 0.52 % respectively ( $P > 0.05$ ). In addition, the young asper backer bamboo and hedge bamboo gave out the lower acidity as 0.51 and 0.50% respectively ( $P > 0.05$ ). Next, the fermented bamboo shoots with different initial maturities were sensory evaluated and found that the likings of all attributes including color, odor, sourness, taste, texture and overall liking were significantly different ( $P \leq 0.05$ ) as the old and medium asper backer bamboos gave out the highest overall liking as 7.00 and 6.70 respectively ( $P > 0.05$ ). After that, the suitable recipe was investigated and then the fermented bamboo shoots were sensory evaluated and found that the liking scores for fermented bamboo shoots made with rice rinsing water recipe and sugar added recipe were significantly different in odor, sourness, taste, texture and overall liking ( $P \leq 0.05$ ) but color liking ( $P > 0.05$ ). Finally, the growth profile of suitable starter during bamboo shoots fermentation were studied and found that at the beginning of fermentation, the starter numbers were 6.39 Log CFU/g with the pH of 6.10 and after 18 hrs of fermentation, the numbers were highest as 8.76 Log CFU/g while the pH drastically decreased to 3.59.