ความหลากหลายของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากสายพันธุ์ข้าวไทยที่มีศักยภาพในจังหวัดนครพนม

Diversity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Potential Thai rice Cultivars in Nakhon Phanom

ตรี วาทกิจ[1*] และ บวรศักดิ์ ลีนานนท์[2]

Tree Vatakit[1*] and Borwonsak Leenanon[2]

[1]สาขาเทคโนโลยีอาหาร คณะเกษตรและเทคโนโลยี นครพนม มหาวิทยาลัยนครพนม 48000

[2]ภาควิชาเทคโนโลยีอาหาร คณะเทคโนโลยี ขอนแก่น มหาวิทยาลัยขอนแก่น 40002

[1]Food Technology Program, Faculty of Agriculture and Technology, Nakhon Phanom University 48000, Thailand

[2]Department of Food Technology, Faculty of Technology, Khon Kaen University 40002, Thailand

*Corresponding author: treevatakit@npu.ac.th

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อรวบรวมสายพันธุ์ข้าวที่มีศักยภาพในจังหวัดนครพนม โดยนำไปแยกและจำแนกเชื้อแบคทีเรียแลกติกเพื่อนำไปใช้ประโยชน์เป็นโพรไบโอติกเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ จากการรวบรวมสายพันธุ์ข้าวจากกลุ่มวิสาหกิจแปรรูปข้าวอินทรีย์ ซึ่งตั้งอยู่ในพื้นที่ตำบลธาตุพนมเหนือ อำเภอธาตุพนม ในจังหวัดนครพนม จำนวน 4 ชนิด ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ 105, ข้าวหอมมะลิ (ระยะน้ำนม), ข้าวไรซ์เบอรี่ และข้าวหอมนิล พบแบคทีเรียทั้งหมด 6 ไอโซเลท ได้แก่ MK1 ซึ่งแยกได้จากข้าวหอมมะลิ (ระยะน้ำนม), RB1, RB2, RB3 และ RB4 จากข้าวไรซ์เบอรี่ และ HN1 จากข้าวหอมมะลินิล ตามลำดับ จากนั้นตรวจสอบลักษณะสัณฐานของแบคทีเรียไอโซเลททั้งหมด พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่ทำปฏิกิริยาคะตะเลส และออกซิเดส ต่อมาจำแนกด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL ตรวจพบเชื้อ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus pentosus* และ *L. plantarum*

คำสำคัญ: ข้าวไทย, แบคทีเรียแลคติก, ชุดทดสอบแบบรวดเร็ว

ABSTRACT

The objectives of this research were to collect the potential Thai rice cultivars in Nakhon Phanom province and then isolation and identify lactic acid bacteria from those rice to be used as probiotic supplements in healthy food products. Thai rice cultivars were collected from a local community enterprise group located on Tombon Thatphanomnuea, Thatphanom District, Nakhon Phanom province who has produced the organic rice and their processed products. They were 4 Thai rice cultivars including jasmine rice 105, jasmine rice (milking period), riceberry rice and hom-nin rice. The results showed that 6 bacterial isolates were found. They were MK1 which was isolated from jasmine rice during milking period, RB1, RB2, RB3 and RB4 which were isolated from Riceberry rice and HN1 which was isolated from Hom-nin rice, respectively. The morphological examination of those bacteria isolates were examined and the results

revealed that they Gram' s positive, round shapes, non-motile, non-reaction with catalase and oxidase kit tests. After that, they were identified using API 50 CHL and it was revealed that they were *Lactobacillus pentosus* and *L. plantarum*.

Keywords: Thai Rice, lactic acid bacteria, rapid method kit

บทนำ

ข้าวเป็นสินค้าทางการเกษตรที่สำคัญและมีการเพาะปลูกทั่วทุกภาคของประเทศ ข้าวหอมมะลิถูกจัดเป็นสินค้าส่งออกอันดับหนึ่งของภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดนครพนมเป็นจังหวัดหนึ่งในพื้นที่ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ซึ่งมีพื้นที่ปลูกข้าวประมาณ 1,317,138 ไร่ (Rice Department, 2018) สินค้าเกษตรที่สำคัญของจังหวัดได้แก่ ข้าว, ยางพารา, สับปะรดท่าอุเทน, ลิ้นจี่ นพ.1 และแตงโม เป็นต้น ในสถานการณ์ปัจจุบันผู้ประกอบการข้าวต่างแข่งขันกันในด้านราคา ทำให้ไม่สามารถแข่งขันและได้เปรียบในเชิงการค้า แนวทางแก้ไขคือการสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับข้าวเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ โพรไบโอติก คือจุลินทรีย์ที่ยังคงมีชีวิตในขณะที่บริโภคเข้าไปในร่างกายและอาศัยอยู่ในบริเวณส่วนของลำไส้มนุษย์ (FAO/WHO, 2001) จากรายงานวิจัยพบว่ามีการผลิตและการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียโพรไบโอติกที่แยกได้จากแหล่งต่างๆ ในการหมักผลิตภัณฑ์จากธัญพืช (Muyanja *et al*., 2003; Jutatip and Vichern 2005; Wakil *et al*., 2008; Nwachukwu *et al*., 2010)

Chumphon *et al* (2016) ได้ศึกษาคุณลักษณะของเชื้อโพรไบโอติก *L. amylovorus* TISTR1110 ต่อการใช้ประโยชน์ในการย่อยแหล่งคาร์โบไฮเดรตจากข้าว 9 สายพันธุ์ พบว่าสามารถย่อยแหล่งคาร์โบไฮเดรตได้ทั้งหมด รวมทั้งจากการประเมินผลของการใช้ข้าวสายพันธุ์ต่างๆเพื่อเป็นตัวพาในผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก สอดคล้องกับงานของ Ashwar *et al* (2018) ที่ได้ผลิตแป้งต้านทานการย่อยจากแป้งข้าวเพื่อใช้เป็นสารนำพาและสารห่อหุ้มแก่โพรไบโอติก 3 สายพันธุ์ได้แก่ *L. casei*, *L brevis* และ *L. plantarum* ซึ่งสามารถรักษาความมีชีวิตของเชื้อกลุ่มโพรไบโอติกได้มากกว่า 10^7 โคโลนีต่อกรัม นาน 2 เดือนที่อุณหภูมิ 4°c

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการแยกและจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกจากข้าวไทยสายพันธุ์ต่างๆ เพื่อประยุกต์ใช้เป็นโพรไบโอติกเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพต่อไป เพื่อตอบสนองต่อกลุ่มผู้บริโภคที่ให้ความสำคัญทางด้านสุขภาพที่มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นในปัจจุบัน

อุปกรณ์และวิธีการ

การตรวจสอบคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างข้าว

สุ่มเก็บตัวอย่างสายพันธุ์ข้าวที่เพาะปลูก จากพื้นที่บริเวณวิสาหกิจชุมชนแปรรูปข้าวอินทรีย์ ตำบลธาตุพนมเหนือ อำเภอธาตุพนม จังหวัดนครพนม ได้แก่ ข้าวหอมมะลิ (ระยะน้ำนม), ข้าวหอมมะลิ,ข้าวไรซ์เบอรี่ และข้าวหอมมะลินิล ในถุงพลาสติกแบบปลอดเชื้อ จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ ในช่วง 8-15°ซ ตรวจสอบคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างสายพันธุ์ข้าว ได้แก่ ปริมาณจุลินทรีย์ที่มีชีวิตทั้งหมด, ยีสต์และรา, แบคทีเรียแลกติก และเชื้อ *Enterobacteriaceae* ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Plate count agar (PCA), Potato dextrose agar (PDA), De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar และ Violet Rea Bile Agar (VRBA) ตามลำดับ รายงานการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในรูปแบบล็อคของโคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยศึกษาสายพันธุ์ข้าวจำนวน 4 ทรีตเมนต์ๆ ละ 3 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจำนวนโคโลนีที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจากสายพันธุ์ข้าวที่แตกต่างกันและ

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยทรีตเมนต์ด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูปทางสถิติ

การแยกแบคทีเรียแลกติกจากตัวอย่างข้าว

ชั่งตัวอย่างข้าว 25 กรัมเติมลงใน peptone water เข้มข้นร้อยละ 1 ปริมาตร 225 มล. และตีผสมด้วยเครื่องตีป่นตัวอย่าง นาน 3 นาที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 24 ชม. แล้วนำมาเจือจางตัวอย่างด้วยวิธีเจือจางลดลงครั้งละ10 เท่าด้วย peptone water เข้มข้นร้อยละ 0.1 และใช้เทคนิค เทเพลทด้วยอาหาร MRS agar ที่เติม bromocresol purple เข้มข้นร้อยละ 0.04 ก่อนนำตัวอย่างไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 48 ชม. สังเกตโคโลนีที่เกิดการเปลี่ยนสีเป็นสีเหลือง ทำการเขี่ยเชื้อซ้ำลงบน MRS agar จนได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ตรวจสอบการย้อมติดสีแกรม, การตรวจสอบรูปร่าง, การจัดเรียงเซลล์, การทดสอบการเคลื่อนที่, การทดสอบปฏิกิริยาออกซิเดส และคาตาเลส คัดเลือกแบคทีเรียไอโซเลทที่ย้อมติดสีแกรมบวก, ไม่พบผลการทดสอบออกซิเดสและคาตะเลส, โคโลนีมีรูปร่างท่อน หรือ กลม และไม่พบการทดสอบการเคลื่อนที่เพื่อเข้าสู่ขั้นตอนการจำแนกต่อไป

การจำแนกแบคทีเรียแลกติก

การจำแนกแบคทีเรียแลกติกตามวิธีของ Curk *et al*. (1996) โดยการศึกษารูปแบบของการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL (bioMerieux, France) จากนั้นแปลผลการทดสอบที่ได้ด้วยโปรแกรม API WEB ผลการทดสอบการจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลกติก แสดงในรูปร้อยละของความน่าจะเป็นการจำแนก

ผลการทดลองและวิจารณ์

การตรวจสอบคุณลักษณะทางจุลชีววิทยาของตัวอย่างข้าว

จาก Table 1 พบว่า ข้าวไรซ์เบอรี่มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดสูงสุด รองลงมาได้แก่ ข้าวหอมมะลิ (ระยะน้ำนม), ข้าวหอมมะลินิลและข้าวหอมมะลิ 105 โดยมีจำนวนเชื้อเท่ากับ 5.60, 5.49, 5.47 และ 5.35 ล็อคโคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ในตัวอย่างข้าวต่างๆมีจำนวนยีสต์และราอยู่ในช่วง 3.10 ถึง 3.75 ล็อคโคโลนีต่อกรัม, จำนวนเชื้อกลุ่ม *Enterobacteriaceae* อยู่ในช่วง 3.17 ถึง 4.48 ล็อคโคโลนีต่อกรัม ส่วนจำนวนแบคทีเรียแลกติก พบว่า ข้าวไรซ์เบอรี่มีจำนวนสูงสุด (3.55 ล็อคโคโลนีต่อกรัม) สอดคล้องกับ Kanokwan *et al*., (2014) ที่ตรวจสอบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในตัวอย่างข้าวหอมมะลิหัก ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 4.5 ถึง 5.0 ล็อคโคโลนีต่อกรัม รวมทั้งงานของ Marcia *et al*. (2012) ที่ตรวจสอบปริมาณยีสต์และราในตัวอย่างข้าวทั้งเมล็ด มีค่าระหว่าง 3.5 ถึง 4.0 ล็อคโคโลนีต่อกรัม

การแยกแบคทีเรียแลกติกจากตัวอย่างข้าว

แยกตัวอย่างแบคทีเรียจากข้าวได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลท โดยแบ่งตามสายพันธุ์ของข้าว (Figure1) พบว่าส่วนใหญ่เป็นเชื้อรูปร่างกลม (cocci) ย้อมติดสีแกรมบวก มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบสายโซ่ หรือแบบเดี่ยว/คู่ หรือสี่เซลล์ เป็นต้น รวมทั้งมีคุณลักษณะต่างๆเป็นไปตามคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียแลกติกทุกประการ เช่น โคโลนี กลมนูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบโค้งนูน เจริญบนอาหาร MRS ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและออกซิเดส รวมทั้งไม่มีการเคลื่อนที่บนอาหารวุ้นแข็ง (Albert *et al*.,1992)

การจำแนกแบคทีเรียแลกติก

จำแนกแบคทีเรียแลกติกจากข้าวด้วยชุดทดสอบ API 50 CHL พบว่าส่วนใหญ่คือกลุ่ม Lactobacilli โดยจำแนกได้ 2 สายพันธุ์คือ *L. pentosus* และ *L. plantarum* ตามลำดับ (Table2) สอดคล้องงานวิจัยของ Angmo *et al*., (2016); Kumar *et al*., (2017) ที่แยกและจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. ได้จากผลิตภัณฑ์หมักจากธัญพืชและข้าวพื้นเมือง

สรุป

แบคทีเรียแลกติกสามารถแยกได้จากพันธุ์ข้าวไทยที่แตกต่างกัน โดยสายพันธุ์แบคทีเรียที่แยกได้อยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus* sp. ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อพัฒนาเป็นโพรไบโอติกเสริมในผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยร่วมกับมหาวิทยาลัยนครพนมภายใต้โครงการนวัตกรรมการพัฒนาทรัพยากรมนุษย์จังหวัดนครพนมสู่สังคมแห่งการเรียนรู้เชิงบูรณาการที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

Albert B., G. Hans, H.W. Martin and H. Karl. 1992 .The Prokaryotes, 2nd edition. New York. Springer-Verlag.

Angmo K, A. Kumari , T.C. Bhalla. 2016. Probiotic characterization of lactic acid bacteria isolated from fermented foods and beverage of Ladakh. LWT - Food Sci Technol 66: 428-435.

Ashwar B. A., G.A. Asima, F.A. Shah Masoodi. 2017. Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. Food Chem 239: 287-294.

Curk M.C., J.C. Hubert and F. Bringel. 1996. *Lactobacillus paralantarum* sp. nov., a new species related to *Lactobacillus paraplantarum*. Int. J. Syst. Bacteriol 46: 595-598.

FAO/WHO.2001. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/probioreport_en.pdf. July, 12, 2018.

Jutatip B and L. Vichern. 2005. Screening and identification of lactic acid bacteria from rice milk for yoghurt production. Proceedings of the 44th Academic conference Kasetsart University, Bangkok, 30 Jan- 2 Feb 2005. (in Thai)

Kanokwan T., P. Suthaya, J. Somkiat, T. Aphiwat, V. Jatuphon, N. Surat and P. Kajorndaj. 2014. Effect of Ultraviolet Radiation and Ultrasonication on Quality of Red Rice Extract Drink. The 6th International Conference on Science, Technology and Innovation for Sustainable Well-Being (STISWB VI), 28-30 August 2014, Apsara Angkor Resort & Conference, Siem Reap, Kingdom of Cambodia

Kumar V, A. Kumari, K. Angmo and T.C Bhalla. 2017. Isolation and characterization of lactic acid bacteria from traditional pickles of Himachal Pradesh, India. J Food Sci Technol 54 (7): 1945-1952.

Muyanja C.M.B.K., J.A. Narvhus, J. Treimo and T. Langsrud. 2003. Isolation characterization and identification of lactic acid bacteria from bushera: An Ugandan traditional fermented beverage. Int J Food Microbiol 80: 201-210.

Nwachukwu E, O.K. Achi and I.O. Ijeoma. 2010. Lactic acid bacteria in fermentation of cereals for the production of indigenous Nigerian foods. Afr. J. Food Sci 1(2): 21-26.

Rice Department. 2018. Rice cultivation situation 2017-2018 years. Available Source: www.ricethailand.go.th/web/home/images/brps/text2559/15092559/15092559.pdf,July 18, 2018. (in Thai)

Wakil S.M., A.A. Onilude, E.M. Adetutu and A.S. Ball. 2008. PCR-DGGE fingerprints of microbial successional changes during fermentation of cereal-legume weaning foods. Afr. J. Biotechnol 7 (24): 4643-4652.

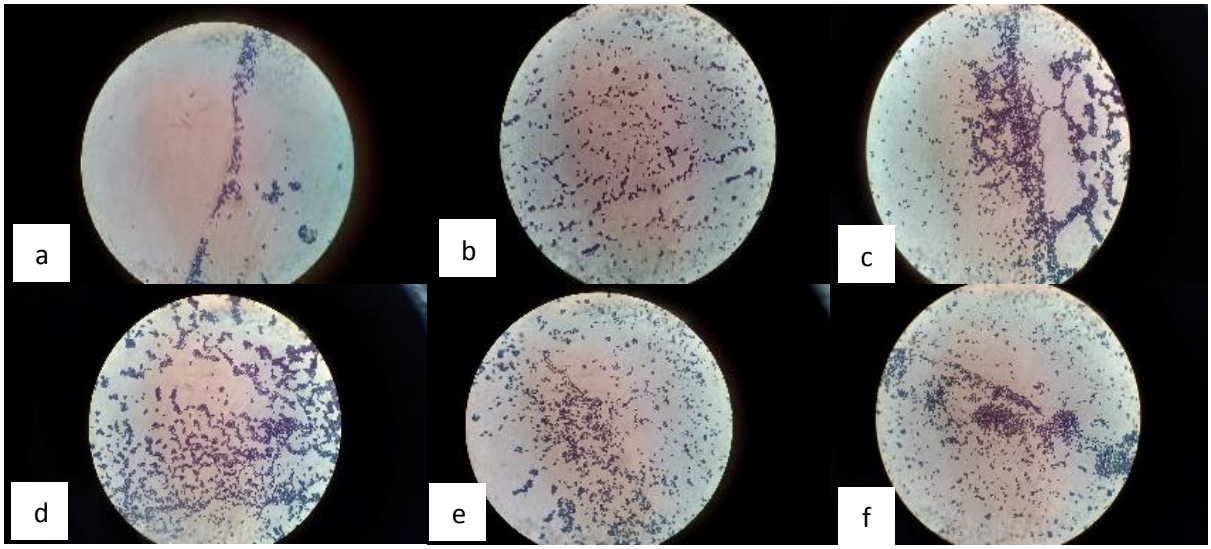

Figure 1 Morphological characteristics of bacterial isolates isolated from Thai rice cultivars
a= MK1, b= RB1, c=RB2, d=RB3, e=RB4 and f= HN1
MK: Jasmine rice (milking period); RB: Riceberry rice; HN: Hom-nin rice

Table 1 Microbiological characteristics of Thai rice cultivars.

Thai rice cultivars	Cell counts (logCFU/g)			
	Total viable count	Yeast and mold	Lactic acid bacteria	*Enterobacteriaceae*
Jasmine rice 105 (milking period)	5.49±0.35 b	3.34±0.04 b	3.21±0.04 b	3.17±0.13 a
Riceberry rice	5.60±0.05 c	3.51±0.10 c	3.55±0.06 c	3.52±0.08 b
Jasmine rice 105	5.35±0.05 a	3.10±0.1 a 1	2.91±0.07 a	4.48±0.31 c
Hom-nin rice	5.47±0.10 ab	3.75±0.07 d	3.42±0.10 c	3.17±0.58 a

Different letters within a column indicate differences determined by Duncan's new multiple range test (DMRT) at the 95 percent level of significance.

Table 2 Identification of LAB isolated from Thai rice cultivars using API 50CHL.

Bacterial isolates	Rice sources	Bacterial identification	% Identification probabilities
MK1	Jasmine rice 105 (milking period)	*Lactobacillus pentosus*	97.6
RB1	Riceberry rice	*Lactobacillus pentosus*	85.0
RB2	Riceberry rice	*Lactobacillus pentosus*	89.6
RB3	Riceberry rice	*Lactobacillus pentosus*	97.6
RB4	Riceberry rice	*Lactobacillus pentosus*	97.6
HN1	Hom-nin rice	*Lactobacillus plantarum*	99.6

Different letters within a column indicate differences determined by Duncan's new multiple range test (DMRT) at the 95 percent level of significance.