สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รายงานการวิจัย

ประจำปีงบประมาณ พ. ศ. 2549

เรื่อง

การพัฒนากล้าเชื้อจุลินทรีย์โพรไบโอติกสำหรับการผลิตอาหารหมักจากสัตว์น้ำ

(Development of probiotic starter cultures for production of fermented aquatic food animals)

โดย

ผศ. ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ หัวหน้าโครงการวิจัย

RCH
TP
248.65
.F66
ส867ร
เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 73019
วัน,เดือน,ปี 27 มิ.ย. 2550

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

b 11911960
i.....

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ในการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์และคุณภาพทางเคมีของอาหารหมักจากสัตว์น้ำทั้งหมด 40 ตัวอย่างได้แก่ หอยดอง แหนมปลา ปลาส้ม ปลาจ่อม กุ้งจ่อม และกะปี โดยได้วิเคราะห์จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวนโคลิฟอร์ม และตรวจหาการมีอยู่ของจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* พบว่าอาหารหมักทุกชนิดส่วนใหญ่มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลคติกค่อนข้างสูง คือ มีจำนวนอยู่ในช่วงน้อยกว่า 10 ถึงมากกว่า 1.6×10^9 โคโลนีต่อกรัม และน้อยกว่า 10 ถึงมากกว่า 1.9×10^9 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าอาหารหมักส่วนใหญ่ปนเปื้อนด้วยเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรค โดยเฉพาะแหนมปลา ปลาส้ม และกะปี ซึ่งทุกตัวอย่างที่วิเคราะห์ไม่ได้มาตรฐานตามข้อกำหนดของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม เกี่ยวกับการมีอยู่ของจุลินทรีย์ก่อโรค ส่วนหอยดองได้มาตรฐานมีเพียงร้อยละ 30 ปลาจ่อมและกุ้งจ่อมได้มาตรฐานร้อยละ 40 ของจำนวนตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ สำหรับการตรวจสอบคุณภาพทางเคมี พบว่าหอยดอง แหนมปลา ปลาส้ม กุ้งจ่อม ปลาจ่อม มีค่าพีเอชค่อนข้างต่ำ อยู่ในช่วง 4.4 -5.6 ยกเว้นกะปี มีค่าพีเอชสูงสุดอยู่ในช่วง 6.7-7.4 อย่างไรก็ตามพบว่าแหนมปลาและปลาส้มมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงสุด (ร้อยละ 1.24-1.73) และกะปีปริมาณกรดน้อยสุดเพียงร้อยละ 0.04-0.18 สำหรับอาหารหมักที่มีปริมาณเกลือสูงสุดคือ กะปี (ร้อยละ 0.58-0.78) ตามด้วยกุ้งจ่อม ปลาจ่อม หอยดอง แหนมปลาและปลาส้ม

การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหนมปลากราย และเนื้อปลาสดทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 3×10^5 ถึงมากกว่า 2.1×10^9 โคโลนีต่อกรัม จากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 138 ไอโซเลต นำมาศึกษาการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งได้แก่เชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Listeria monocytogenes* ด้วยเทคนิค agar spot test พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 30 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิดและได้ศึกษาการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียเหล่านี้ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 สามารถทนต่อกรดแลคติก (พีเอช 2.9 และ 3.2) กรดไฮโดรคลอริก (พีเอช 2.2) ทนต่อโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 6) และเกลือน้ำดี (ร้อยละ 5.25) ในอาหารเหลว MRS และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต มาทำการจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CH และการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 คือเชื้อ *Lactococcus lactis* และ ไอโซเลต 13IS4 คือเชื้อ *Lactobacillus sakei* ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่จะนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลตนี้มาทำเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ABSTRACT

Fourty samples of fermented aquatic food products including Hoidrong, Nham-Plaa, Plaa-som, Plaa-jom, Krung-jom and Kapi were collected and analyzed for microbiological and chemical quality. Total viable counts, total lactic acid bacteria, coliforms, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* in each sample were determined. The number of total viable counts and total lactic acid bacteria in most samples of all types was quite high (<10 - > 1.6×10^9 and <10 - > 1.9×10^9 CFU/g, respectively). Moreover, most samples of fermented foods were found to contaminate with pathogenic bacteria, especially all samples pf Nham-Plaa, Plaa-som and Kapi did not meet the standard of Thai Industrial Standards Institute, Ministry of Industry, regarding the presence of pathogenic bacteria. Hoidrong met the standard only 30% of total samples analyzed, but 40% of Plaa-jom and Krung-jom samples followed the standard. The results of chemical analysis showed that Hoidrong, Nham-Plaa, Plaa-som, Plaa-jom and Krung-jom had low pH (4.4-5.6), except for Kapi (the highest pH of 6.7-7.4). However, Nham-Plaa and Plaa-som contained the highest total titratable acidity (1.24-1.73%), and Kapi contained the lowest acidity (0.04-0.18%). The type of fermented foods contained the highest salt (0.58-0.78%) was Kapi, followed by Krung-jom, Plaa-jom, Hoidrong, Nham-Plaa and Plaa-som.

In this study, the number of lactic acid bacteria (LAB) was analyzed from 15 samples of Nham-plaa and raw fish. The total viable count of LAB were in the range of 3.0×10^5 to > 2.1×10^9 CFU/g. One hundred thirtyeight LAB isolates were selected and used to study antibacterial activity against other organisms, including *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus bulgaricus* and *Listeria monocytogenes* using agar spot test. The thirty isolates were found to inhibit at least one species of these test organisms. For the study of resistance to lactic acid, hydrochloric acid, sodium chloride and bile salt, the LAB isolates 13IS3 and 13IS4 were tolerant to lactic acid (pH 2.90 and 3.20), hydrochloric acid (pH 2.20), sodium chloride (6.00%) and bile salts (5.25%) in MRS broth. The two isolates, 13IS3 and 13IS4, were identified by morphological characterization, biochemical tests using API 50 CH system and sequence analysis of 16S rDNA, and shown to be *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus sakei*, respectively. Therefore, these two LAB isolates were selected for production of fermented fish starter culture.

คำสำคัญ (Keywords): คุณภาพทางจุลินทรีย์ของอาหารหมัก แบคทีเรียกรดแลคติก โพรไบโอติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบาญ

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	4
ผลการทดลองและวิจารณ์	13
สรุปผลการทดลอง	37
เอกสารอ้างอิง	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. บทนำ

การถนอมอาหารโดยการหมักไม่ว่าจะเป็นการทำผักดอง เนื้อหมักหรือปลาหมักมีการทำกันมานานหลายพันปี ในสมัยก่อนมนุษย์ได้ผลิตอาหารหมักโดยธรรมชาติและประสบความสำเร็จจากการลองผิดลองถูก เรียนรู้จากความผิดพลาดสืบทอดกันมาหลายช่วงอายุคน แม้แต่ในปัจจุบัน ชาวบ้านและโรงงานอุตสาหกรรมอาหารหมักบางแห่ง ยังคงผลิตอาหารหมักเช่น กุ้งจ่อม ปลาจ่อม ปล่าเจ่า หอยดอง และแหนมปลา ด้วยวิธีการดั้งเดิมโดยอาศัยจุลินทรีย์แลคติกที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ทำให้การหมักดำเนินไปได้ช้า คุณภาพไม่สม่ำเสมอและไม่ปลอดภัยเท่าที่ควร การขาดประสบการณ์และการควบคุมการผลิตที่ไม่ดีพอยังคงเป็นปัญหา ถึงแม้ว่าอาหารประเภทปลาหมักจะมีเกลือสูงถึง 10-12% แต่ก็ยังคงมีความเสี่ยงต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคเช่น *Clostridium botulinum* ซึ่งเป็นเชื้อที่สร้างสารพิษร้ายแรง เนื่องจากการหมักมักทำที่อุณหภูมิห้อง สปอร์ของเชื้อ *C. botulinum* อาจงอก เจริญและสร้างสารพิษก่อนที่ค่า pH จะลดลงจนถึงระดับที่จะยับยั้งเชื้อนี้ (pH 4.6)ได้ และสารพิษจากเชื้อนี้มีความเสถียรในสภาพที่เป็นกรด (pH 4.0-4.5) และสภาพที่มีเกลือถึง 26% ดังนั้นเมื่อการหมักดำเนินต่อไป สารพิษจะไม่ถูกทำลาย (Huss และ Peterson, 1980) การเติมเกลือและสารคาร์โบไฮเดรตในความเข้มข้นที่เหมาะสมและการใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์กรดแลคติกที่เหมาะสมจะทำให้การลด pH เป็นไปอย่างรวดเร็วซึ่งจะช่วยลดความเสี่ยงต่อการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

จากการศึกษาทางด้านสรีรวิทยาและศักยภาพในการเกิดเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยนักวิจัยหลายท่านที่ผ่านมา ทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักอาหารมากขึ้นในช่วงศตวรรษที่ 20 ซึ่งกลายเป็นรากฐานสำคัญในคัดเลือกกล้าจุลินทรีย์ใช้ในการผลิตอาหารหมักที่ทันสมัย กล้าเชื้อจุลินทรีย์ หมายถึงวัสดุที่มีจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจำนวนหนึ่งที่จะเติมลงไปในวัตถุดิบเพื่อเร่งการหมัก มีหน้าที่หลักคือช่วยควบคุมการหมักในขั้นแรก ช่วยลดระยะเวลาของการหมักโดยทำให้เกิดการผลิตกรดเร็วขึ้น มีผู้วิจัยพบว่า การเติมเชื้อ *Pediococcus cerevisiae* ทำให้ปลาเจ่าที่หมักนาน 5 วันมีค่า pH และ ปริมาณกรดใกล้เคียงกับปลาเจ่าที่หมักโดยวิธีธรรมชาตินาน 10 วัน และเช่นเดียวกัน การเติมเชื้อ *P. cerevisiae* และ *L. brevis* ทำให้การหมักปลาส้มเกิดได้เร็วขึ้นนอกจากนี้การใช้กล้าเชื้อจุลินทรีย์ยังมีประโยชน์อีกหลายประการคือ ช่วยลดการสะสมของไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารก่อมะเร็ง และสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคจากการสร้างสารยับยั้งชนิดต่างๆ เช่น กรดอินทรีย์ สารไดอะเซทธิล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (นภา, 2535; Holzapfel และคณะ, 2003) ซึ่งอาจกล่าวได้ว่ากล้าเชื้อจุลินทรีย์เป็นสารถนอมอาหารชีวภาพ (biopreservative agent) ชนิดหนึ่งที่มีหน้าที่หลากหลาย (multifunctional starter cultures) สามารถใช้แทนสารเคมีกันเสีย นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ที่สำคัญอีกประการหนึ่งที่จะเป็นประเด็นในการคัดเลือกและพัฒนากล้าเชื้อคือคุณสมบัติของเชื้อที่สามารถช่วยส่งเสริมสุขภาพอนามัย (health-promoting (probiotic) properties) ของผู้บริโภคได้ จึงเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ที่น่าสนใจถ้าหากสามารถคัดเลือกจุลินทรีย์โพรไบโอติกสายพันธุ์ที่ดีโดยให้ประโยชน์หลายประการดังกล่าวเพื่อใช้ในการผลิตอาหารหมักจากสัตว์น้ำได้

โพรไบโอติกคือจุลินทรีย์ที่อยู่ในอาหารช่วยให้ผู้บริโภคมีสุขภาพดีโดยการช่วยรักษาหรือปรับปรุงจุลินทรีย์ในลำไส้ให้มีความสมดุล (Fuller, 1989) และสามารถต่อต้านจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ต้านการเกิดมะเร็ง กระตุ้นให้เกิดภูมิคุ้มกัน และสร้างสารที่มีประโยชน์ต่อร่างกายเช่น กรดอะมิโน กรดแลคติก พลังงาน ไวตามินเค และไวตามินบี (Saarela และคณะ, 2000 ; Robinson และคณะ, 2002) โดยอาจนำจุลินทรีย์โพรไบโอติกมาพัฒนาเป็นอาหารเสริมในรูปแคปซูลหรือเม็ดหรืออาจนำมาใช้ในการผลิตกล้าเชื้อสำหรับทำผลิตภัณฑ์อาหารหมักและในบางครั้งอาจนำมาเติมในอาหารเพื่อช่วยให้อาหารมีคุณสมบัติของโพรไบโอติกหรือการทำงานของเชื้อโพรไบโอติก (Mattila-Sandholm และคณะ. 2002) ซึ่งก่อนการนำเชื้อโพรไบโอติกมาใช้ในอาหารนั้นควรทำการคัดเลือกจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกเสียก่อนเพื่อทำให้ได้จุลินทรีย์โพรไบโอติกที่มีคุณลักษณะเหมาะสมและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Saarala และคณะ, 2000) คุณลักษณะที่สำคัญของจุลินทรีย์โพรไบโอติกได้แก่ ความสามารถในการสร้างสารยับยั้งเช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (Cowley, 1988) การมีชีวิตรอดจากการเผชิญสภาพกรด และสภาพน้ำดีในระบบทางเดินอาหารได้จึงเกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ รวมทั้งต้องสามารถทนต่อสภาพที่เหมาะสมที่ทำให้เกิดการหมักของอาหารที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Saarela และคณะ, 2000 ; Sander และคณะ, 1999) จากรายงานการศึกษาของ Budde และคณะ (2003) เกี่ยวกับคุณสมบัติของเชื้อ *Leuconostoc carnosum* 4010 ที่แยกจากผิวของชิ้นหมูแฮม มาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี spot test พบว่า สามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria monocytogenes* ได้หลายสายพันธุ์ และเมื่อเร็วๆนี้ Thapa และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาการยับยั้งจุลิน ทรีย์ชนิดอื่นโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* SM:T1 ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปลาตากแห้งและรมควัน (sukako maacha) พื้นเมืองแถบหิมาลัยตะวันออกของประเทศเนปาลอินเดียด้วยวิธี agar spot พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *Listeria innocua* และ *Staphylococcus aureus* ได้นอกจากนี้ Ghalf และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 พบว่าสามารถต้านเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ปลาแซลมอลรมควันในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ จากความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคและเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารหมักนี้เองจึงทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นเชื้อโพรไบโอติกหลายชนิดถูกนำมาผลิตเป็นกล้าเชื้อให้กับผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

ดังนั้นถ้าสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกจากเนื้อปลาสด หรือปลาหมักซึ่งสามารถสร้างสารยับยั้งได้ นำมาใช้ผลิตกล้าเชื้อในการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมักอาจช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้แก่ *S. aureus*, *Bacillus cereus, Clostridium perfringens*, *Salmonella,* Coliform และfecal coliform ที่อาจปนเปื้อนในวัตถุดิบ ซึ่งทำให้ผู้บริโภคลดความเสี่ยงอันเกิดจากจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายเหล่านี้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้ทำการศึกษาคุณภาพ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทางจุลินทรีย์และคุณภาพทางเคมีของอาหารหมักจากสัตว์น้ำ และคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากเนื้อปลาสดและแหนมปลาที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus bulgaricus* และ *Listeria monocytogenes* ด้วยเทคนิค agar spot test และการที่จะได้รับประโยชน์อย่างแท้จริงนั้น จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์จะต้องมีชีวิตและอยู่รอดเมื่อผ่านเข้าไปยังลำไส้ โดยจะต้องทนต่อกรดและน้ำดีได้ ดังนั้นทดลองนี้จึงมีการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่คัดเลือกในการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือโซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดี

วัตถุประสงค์การทดลอง

1. เพื่อวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และคุณภาพทางเคมีของอาหารหมักจากสัตว์น้ำที่จำหน่ายในประเทศไทย
2. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นจากตัวอย่างอาหารหมักจากสัตว์น้ำ
3. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นซึ่งมีคุณสมบัติการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริกที่ค่าพีเอชต่ำ โซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงได้ดี
4. เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้คัดเลือกโดยการศึกษาสัณฐานวิทยา การทดสอบทางชีวเคมีด้วยชุดทดสอบ API 50 CH และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 อุปกรณ์

2.1.1 วัตถุดิบ

วัตถุดิบที่ใช้ในการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์ได้แก่ เนื้อปลากราย และปลาชะโดสด รวมทั้งอาหารหมักทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ได้แก่ หอยดอง แหนมปลา ปลาส้ม กุ้งจ่อม ปลาจ่อม และกะปิ จากตลาดในกรุงเทพมหานคร

ตัวอย่างแหนมปลาและเนื้อปลาสดที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 15 ตัวอย่างได้แก่ แหนมปลา 10 ตัวอย่างจากตลาด ก.ม. 8 ตลาดหัวตะเข้ ตลาดสี่มุมเมือง ตลาดมีนบุรี ตลาดบางกะปิ ตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง ตลาดนำชัย ตลาดพัฒนาการ ตลาด ก.ม. 2 และตลาดพระโขนง เนื้อปลาสด 5 ตัวอย่างจากตลาดมีนบุรี ตลาดหัวตะเข้ ตลาดก.ม. 8 และตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง

2.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 และ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ได้จากศูนย์เก็บรักษา และรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

2.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้ทำเจือจาง และสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ de Man Rogosa Sharpe broth/ de Man Rogosa Sharpe Agar/ deMan Rogosa Sharpe Soft Agar (MRS, พีเอช 7.1 ± 0.2, Difco), Bacteriocin-Screening-Medium Agar (BSM), Tryptic Soy broth/ Tryptic Soy Agar (TSB/TSA, พีเอช 7.1 ± 0.2, Difco), Tryptic Soy Yeast Extract (TSYE) Soft Agar (พีเอช 7.1 ± 0.2) และ Luria-Bertani (LB) Eosin Methylene Blue Agar (EMB,Difco), Lactose Broth (LB, Merck), Plate Count Agar (PCA, Merck), Lauryl tryptose Broth (LB, Difco), Brilliant Green Lactose bile Broth (BGLB, Difco), EC broth (Difco), Nutrient Agar (NA), Baird-Parker medium (BP, Difco), Brain Heart Infusion (BHI, Difco), Manital-egg Yolk-Polymyxin agar (MYP, Difco), Cook Meat medium (CMM, Mast Diagnostics), Thisulphate Citrate Bile Salts Sucrose agar (TCBS, Difco), Triple Sugar Iron (TSI, Difco), Triple Sugar Iron (TSI, Difco), Lysine Indole Motility medium (LIM, Difco), Rappaport-Vassiliadis (RV, Difco), Tetrathionate (TT, Difco), Xylose Lysine Desoxycholate (XLD, Difco)

สารละลายที่ใช้ทำเจือจางตัวอย่างและสารเคมีได้แก่ สารละลายเพปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 สารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 สารละลายกรดแลคติก ความเข้มข้นร้อยละ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

85 สารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5 โมลาร์ เกลือน้ำดี โซเดียมคลอไรด์ และแคลเซียมคาร์บอเนต rabbit plasma, Kovac's reagent , NaOH, Phenolphthalein ในสารละลายเอทานอลร้อยละ 80, กรดไนตริกเข้มข้น (conc HNO_3) สาร $AgNO_3$, NH_4SCN และ $(Fe\ NH_4SCSO_4)_2 \cdot 12\ H_2O$

สารเคมีสำหรับการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส ได้แก่ บัฟเฟอร์ PCR บัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0) สารละลายบัฟเฟอร์ TE (Tris-HCl 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0) สารละลายฟีนอลอิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE (Tris-EDTA -buffer saturated phenol) บัฟเฟอร์ TBE (Tris-HCl 0.89 โมลาร์ กรดบอริก (boric acid) 0.89 โมลาร์ และ EDTA 0.02 โมลาร์) โซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 โซเดียมอะซิเทต 3 โมลาร์สารละลายเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 70 สารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 99 สารละลายแมกนีเซียมคลอไรด์ สารละลายไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ไพรเมอร์ FDNA ไพรเมอร์ RDNA เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase อะกาโรส (agarose) เจลสตาร์ (gelstar) และสีย้อมดีเอ็นเอ (Tracking dye)

2.1.4 เครื่องมือ

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แก่ เครื่องชั่ง อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เครื่องตีป่น หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ตู้บ่มปรับอุณหภูมิ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องวัดพีเอช เครื่องหมุนเหวี่ยง (บริษัท Harmle, รุ่น Z383K) ตู้บ่มเชื้อ (บริษัท Memmert) เครื่องวัดค่าดูดกลืนแสง (Microplate reader/Washer, รุ่น iEMS Reader MF, Labsystems) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine, บริษัท Perkin Elmer, รุ่นDNA thermal cycler 480)

2.2 วิธีการทดลอง

2.2.1 การศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์และทางเคมีในอาหารหมักจากสัตว์น้ำ

ทำการตรวจคุณภาพทางจุลินทรีย์ของอาหารหมักทั้งหมด 40 ตัวอย่าง ได้แก่ หอยดอง แหนมปลา ปลาส้ม กุ้งจ่อม ปลาจ่อม และกะปิ โดยทำการวิเคราะห์หาจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนแบคทีเรียแลคติก ตรวจหาแบคทีเรียโคลิฟอร์ม *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahaemolyticus* โดยใช้วิธีการตาม Bacteriological Analytical Manual Online ของ U. S. Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (www.cfsan.fda.gov/~ebam/)

นำตัวอย่างอาหารหมักได้แก่ หอยดอง แหนมปลาและส้มปลา จ่อมปลาและจ่อมกุ้ง และกะปิ ชนิดละ 3 ตัวอย่างทำการวิเคราะห์พีเอช ปริมาณเกลือตามวิธีของ AOAC (2000) และปริมาณกรดตามวิธีของ AOAC (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การวิเคราะห์หาจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมปลาและเนื้อปลาสด

2.2.2.1 การตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมปลาและเนื้อปลาสด

การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมปลาและเนื้อปลาสดด้วยเทคนิค spread plate ทำโดยชั่งแหนมปลาและเนื้อปลาสดตัวอย่างละ 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตรนำไปตีป่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างแหนมปลาและเนื้อปลาสดจนถึงระดับความเจือจาง $1:10^6$ จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^4 ถึง 10^6 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ในอาหารแข็ง (deMan Rogosa Shape, MRS พีเอช 7.1±0.2, Difco) ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 กรัมต่อปริมาตร ระดับความเจือจางละ 3 จาน เกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วผิวหน้าอาหารด้วยแท่งแก้วงอปราศจากเชื้อ คว่ำจานแล้วนำไปบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนี 25-250 โคโลนี คำนวนหาจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (อดิศร เศวตวิวัฒน์, 2542)

2.2.1.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการแยกเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 2.2.1.1 ที่มีวงใส (clear zone) รอบๆโคโลนี สุ่มเลือกจากโคโลนีทั้งหมด 138 โคโลนีโดยใช้เข็มปราศจากเชื้อแตะเชื้อจากโคโลนี ที่เลือกและแทงลงในหลอดอาหารแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 1 บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในขั้นต่อไป (อดิศร เศวตวิวัฒน์, 2542)

2.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 138 ไอโซเลต ทำโดยวิธี agar spot test (Fleming และคณะ, 1985) โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกเก็บไว้ แต่ละไอโซเลตจำนวน 138 ไอโซเลต ลงในหลอดอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เขี่ยเชื้อที่เพาะเลี้ยงไว้ในข้างต้นมาแตะบนผิวหน้าอาหาร Bacteriocin Screening Medium (BSM) ซึ่งประกอบด้วย กลูโคส 2 กรัม เนื้อสกัด 2 กรัม ทริปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 4 กรัม tween 80 1 มิลลิลิตร $(NH_3)_2C_6H_6O_7$ 2 กรัม $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 กรัม $MnSO_4.4H_2O$ 0.05 กรัม $K_2HPO_4.3H_2O$ 8.7 กรัม KH_2PO_4 8 กรัม และผงวุ้น 15 กรัมต่อน้ำกลั่น 1 ลิตร (Tichaczek และคณะ, 1992) ที่แบ่งเป็นช่องๆไว้ 8 ช่อง โดยใส่ช่องละ 1 ไอโซเลต ตัวอย่างละ 5 จาน และบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งได้แก่ *Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* ในอาหารเหลว TSB *Pediococcus acidilactici* และ *Lactobacillus bulgaricus* ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วถ่ายเชื้อเหล่านี้แต่ละชนิดในปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร ใส่ใน MRS soft agar หรือ Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE soft agar) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมเชื้อให้กระจายทั่วอาหาร soft agar ด้วยเครื่องผสม (vortex mixer) จากนั้นเทเชื้อแต่ละชนิดลงบนจานอาหาร BSM ที่บ่มแล้วข้างต้น โดยเชื้อที่ใช้ทดสอบ 1 เชื้อต่อ 1 จาน เกลี่ย soft agar ให้ทั่วจาน นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปทำการบ่ม โดยจานเพาะเชื้อที่ใช้เชื้อ *Pediococcus acidilactici* และ *Lactobacillus bulgaricus* บ่มในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนเชื้อ *Staphylococus aureus* และ *Listeria monocytogenes* บ่มในสภาวะมีอากาศที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติก จากนั้นคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่เกิดโซนใสรอบๆโคโลนีในอาหารที่มีเชื้อที่ใช้ในการทดสอบชนิดใดชนิดหนึ่ง โดยเพาะเลี้ยงและเก็บไว้ใช้ในขั้นต่อไป

2.2.4 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

2.2.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์จากข้อ 2.2.3 แต่ละไอโซเลตจากอาหารแข็ง MRS 1 ลูป ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตรและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วยสารละลายเพปโทนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โดยในการล้างแต่ละครั้งจะปิเปตสารละลายเพปโตนปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน นำไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสด้านบนทิ้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วยสารละลายเพปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตปรับความขุ่นให้เท่ากันโดยใช้ McFarland Standard เบอร์ 3 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7 ถึง 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ทดสอบในขั้นต่อไป

2.2.4.2 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยเติมสารแขวนลอยเซลล์ที่เตรียมไว้แต่ละไอโซเลตปริมาตรร้อยละ 25 ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดแลคติกจนได้ค่าพีเอชที่ต่างกัน 8 ระดับ ได้แก่ 6.30, 5.30, 4.00, 3.70, 3.35, 3.20, 2.90 และ 2.70 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนบ่มและหลังบ่มด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หาค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้โดยเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเพิ่มจำนวนได้จนทำให้เกิดความขุ่นที่ค่าพีเอชระดับนี้ (สังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงหลังบ่มมากกว่าก่อนบ่ม)

2.2.4.3 การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.4.2 ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับค่าพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกที่มีความเข้มข้น 5 โมลาร์ จนได้ค่าพีเอชที่ต่างกัน 8 ระดับ ได้แก่ 6.30, 5.00, 3.70, 3.00, 2.60, 2.20, 2.00 และ 1.90 หาค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตเจริญได้

2.2.4.4 การทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 2.2.4.2 ในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0, 1.50, 3.00, 4.50, 6.00, 7.50, 9.00 และ 10.50 หาค่าความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้

2.2.4.5 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตเช่นเดียวกับข้อ 2.2.4.2 ในอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0, 0.75, 1.50, 2.25, 3.00, 3.75, 4.50 และ 5.25 หาความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้

หลังจากการทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดี ของเชื้อแต่ละไอโซเลต คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถสูงสุดในการทนต่อสารต่างๆเหล่านี้ จำนวน 2 ไอโซเลต

2.2.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

2.2.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลต ซึ่งได้คัดเลือกไว้นำมาย้อมแกรมโดยเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตลงในหยดน้ำบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้งตรึงเชื้อด้วยความร้อน จากนั้นหยดสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ให้ท่วมเชื้อ ทิ้งไว้ 1 นาที และล้างสีคริสตัลไวโอเลตด้วยน้ำ จากนั้นหยดน้ำยาแกรมไอโอดีนให้ท่วมเชื้ออีกครั้งและทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างน้ำยาแกรมไอโอดีนด้วยน้ำแล้วตามด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลา 20 วินาที หยดสีซาฟรานีน (safranin) และทิ้งไว้ 1 นาที แล้วล้างออกด้วยน้ำ ตรวจดูรูปร่างและการติดสีของแบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.5.2 การศึกษาลักษณะทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เช่นเดียวกันโดยปรับความขุ่นของแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลต ให้มีความขุ่นเป็น 2 เท่าของ McFarland Standard เบอร์ 4 จากนั้นใช้ปิเปตปลอดเชื้อดูดสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตปริมาณ 0.4 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร API 50 CHL medium ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

ทำการแบ่ง API 50 CH strips ออกเป็น 5 strips ย่อยคือ strip 0-9, 10-19, 20-29, 30-39, และ 40-49 รวมทั้งหมด 49 หลอด โดยแต่ละหลอดประกอบด้วยสารต่างๆ (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 สารที่ใช้ทดสอบลักษณะทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้ชุดทดสอบ API50 CH

Cupule	ชนิดของสารที่ทดสอบ	Cupule	ชนิดของสารที่ทดสอบ
0	Control	25	Esuculin ferric citrate
1	Glycerol	26	Salicin
2	Erythritol	27	D-Celibiose
3	D-Arabinose	28	D-Moltose
4	L-Arabinose	29	D-Lactose
5	D-Ribose	30	D-Melibiose
6	D-Xylose	31	D-Saccharose
7	L-Xylose	32	D-Trehalose
8	D-Adonitol	33	Inulin
9	Methyl-β-D-Xylopyranoside	34	D-Melezitose
10	D-Galactose	35	D-Raffinose
11	D-Glucose	36	Amidon
12	D-Fructose	37	Glycogen
13	D-Mannose	38	Xylitol
14	L-Sorbose	39	Genitiobiose
15	L-Rhamnose	40	D-Turanose
16	Dulsitol	41	D-Lyxose
17	Inositol	42	D-Tagatose
18	D-Mannitol	43	D-Fucose
19	D-Sorbitol	44	L-Fucose
20	Methyl-α-D-Mannopyranoside	45	D-Arabinose
21	Methyl-α-D-Glucopyranoside	46	L-Arabinose
22	N-Acetylglucosamine	47	Potassium Gluconate
23	Amyldalin	48	Potassium 2-Ketogluconate
24	Arbutin	49	Potassium 5-Ketogluconate

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากนั้นเติมสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตที่ได้เตรียมไว้ลงบนชุด API 50 CH strips ที่ได้แบ่งไว้ โดยขณะปล่อยเซลล์จุลินทรีย์ลงในแต่ละหลอดให้เอียง strips เล็กน้อยและแตะปลายปิเปตลงบน cupule ของแต่ละหลอดเพื่อป้องกันการเกิดฟอง จากนั้นทำการเติมเชื้อปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรต่อหลอดเติมจนครบทั้ง 50 หลอดและปิดทับด้วย mineral oil นำ strips ทั้งหมดใส่ลงในถาดรังผึ้งที่มีน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร ปิดฝาครอบ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงสีที่เกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแสดงว่าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) ยกเว้นในหลอดที่ 25 ซึ่งเป็นสาร Esuculin ferric citrate ถ้าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำและถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสี (สีม่วง) แสดงว่าไม่เกิดการหมัก (ให้ผลลบ) บันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลองที่ได้โดยใช้โปรแกรม API Identification Software (Bio Merieux) จะทราบถึงชนิด (species) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบ

2.2.5.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ก) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จำนวน 2 ไอโซเลต แต่ละไอโซเลต ลากลงบนอาหารแข็ง Luria-Bertani (LB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เจริญบนอาหาร LB ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ TE ที่มีความเข้มข้นของ Tris-HCl 50 มิลลิโมลาร์ สารละลาย EDTA ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิโมลาร์ พีเอช 8.0 ปริมาตร 400 ไมโครลิตรที่มีไลโซไซม์ (lysozyme) 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที เติมสารละลายโซเดียมโดเดคซิลซัลเฟต (SDS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน เติมสารละลายฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE 1 เท่า ปริมาตร 420 ไมโครลิตรผสมให้เข้ากันโดยพลิกหลอดกลับไปกลับมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 5 นาที ดูดส่วนใสชั้นบนมาสกัดอีก 2 ครั้ง โดยใช้ฟีนอลที่อิ่มตัวด้วยบัฟเฟอร์ TE 1 เท่า จากนั้นดูดส่วนใสด้านบนจากการสกัดครั้งสุดท้ายปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมสารละลายโซเดียมอะซิเทต (sodium acetate) ความเข้มข้น 3 โมลาร์ ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 99 ปริมาตร 440 ไมโครลิตร แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วนใสด้านบนและล้างตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที ทิ้งส่วนใสด้านบนและตากตะกอนให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และเติมสารละลาย RNase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร จะได้จีโนมิกดีเอ็นเอเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข) การวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟเรซิส

เตรียมเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยชั่งอะกาโรส 0.64 กรัม เติมบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 80 มิลลิลิตร ทำให้ละลายในไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่น เติมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar) ปริมาตร 8 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเทใส่แม่พิมพ์เจล เมื่อแผ่นเจลแข็งย้ายแผ่นเจลลงอ่าง (gel chamber) เติมบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดข้างต้น (ก) ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมและหยอดลงในหลุมแผ่นเจล ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซ็นติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเลต

ค) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอวิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลองโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและซ้ำกันหลายๆ รอบเป็นลูกโซ่ โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาและมีองค์ประกอบสำหรับการเกิดปฏิกิริยาซึ่งมีปริมาตรของสารชนิดต่างๆดังนี้

น้ำกลั่น	33.5	ไมโครลิตร
สารละลาย พีซีอาร์ บัฟเฟอร์ 10 เท่า	5.0	ไมโครลิตร
แมกนีเซียมคลอไรด์ปริมาตร	3.0	ไมโครลิตร
สารละลายไดออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต (dNTPs) ความเข้มข้น 10 โมลาร์	1.0	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ FDNA (5′-TCCTACGGAGGCAGCAG-3′)	2.5	ไมโครลิตร
ไพรเมอร์ RDNA (5′-TTGTGCGGGCCCCCGTCAAT-3′)	2.5	ไมโครลิตร
จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากข้อ 3.2.4.3 (ก)	2.0	ไมโครลิตร
Taq DNA polymerase	0.5	ไมโครลิตร

จากนั้นนำหลอดจีโนมิกดีเอ็นเอเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) ที่มีสภาวะดังแสดงในตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ

ขั้นตอนที่	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
1	94	10 นาที
2	94	30 วินาที } 35 รอบ
	55	30 วินาที } 35 รอบ
	72	30 วินาที } 35 รอบ
3	72	10 นาที

จากนั้นเมื่อครบกำหนดเวลานำหลอด PCR ที่บรรจุดีเอ็นเอนำไปวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิส เช่นเดียวกับข้อ (ข)

ง) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของยีน 16S rDNA

นำผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลต ไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Big dye Terminator Reaction ด้วยเครื่อง ABIPRSM^{R} 3700 DNA Analyzer นำนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานในธนาคารยีน โดยใช้โปรแกรม BLAST server ของ National Center for Biotechnology Information, National Institutes of Health, U.S.A. (http://www.ncbi.nlm.nih.gov)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. ผลการทดลองและวิจารณ์

3.1 คุณภาพทางจุลินทรีย์และทางเคมีของอาหารหมักจากสัตว์น้ำ

จากผลการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์น้ำ (ตารางที่ 3) พบว่าหอยดองมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วงน้อยกว่า 10 ถึง 4.5×10^{7} โคโลนี/กรัม และจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบ มีจำนวนอยู่ในช่วงน้อยกว่า 10 ถึงมากกว่า 4×10^{7} โคโลนี/กรัม พบแบคทีเรียแลคติกในจำนวนมากในตัวอย่างร้อยละ 60 จากจำนวนตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง เนื่องจากหอยดองยังไม่ถูกกำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนจึงยังไม่มีข้อกำหนดปริมาณจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค แต่เมื่อนำผลการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ได้จากหอยดองมาเทียบกับมาตรฐานอาหารหมักชนิดอื่นที่รับประทานดิบ เช่นจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มผช. 147/2546 สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ผลิตภัณฑ์กุ้งจ่อมต้องไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคชนิด *Salmonella* ในตัวอย่าง 25 กรัม จำนวน *S. aureus* โดยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม และจำนวน *E. coli* โดยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม พบว่ามีผลิตภัณฑ์หอยดองที่ผ่านมาตรฐานมีเพียง 3 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 30

แหนมปลา และปลาส้มมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 3.6×10^{8} ถึงมากกว่า 1.6×10^{9} โคโลนี/กรัม และแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในตัวอย่างแหนมปลาและปลาส้ม มีจำนวนอยู่ในช่วง 2.3×10^{7} ถึงมากกว่า 1.9×10^{9} โคโลนี/กรัม โดยในทุกตัวอย่างของแหนมปลา และปลาส้มพบแบคทีเรียแลคติกเป็นจำนวนมาก จากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน มผช. 26/2546 สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ปลาส้มต้องไม่พบจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคชนิด *Salmonella* ในตัวอย่าง 25 กรัม *Cl. perfringens* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม และจำนวน *E. coli* โดยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 10 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม พบว่าแหนมปลาและปลาส้มที่ได้ทำการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคทุกตัวอย่างไม่เข้ามาตรฐาน

ปลาจ่อมและกุ้งจ่อม มีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วงน้อยกว่า10ถึงมากกว่า2.6×10^{8}โคโลนี กรัม และแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบมีจำนวนอยู่ในช่วงน้อยกว่าน้อยกว่า10 ถึงมากกว่า 1.4×10^{9} โคโลนี/กรัม โดยในตัวอย่างของปลาจ่อมและกุ้งจ่อม ที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกคิดเป็นร้อยละ 90 จากตัวอย่างทั้งหมด 10 ตัวอย่าง และมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ได้กำหนดว่ากุ้งจ่อมต้องไม่พบเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคชนิด *Salmonella* ในตัวอย่าง 25 กรัม จำนวน *S. aureus* โดยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม และจำนวน *E. coli* โดยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม พบว่ามีตัวอย่างที่เข้ามาตรฐานร้อยละ 40 จากตัวอย่างอาหารปลาจ่อมและกุ้งจ่อมทั้งหมด 10 ตัวอย่าง

กะปิมีจุลินทรีย์ทั้งหมดอยู่ในช่วง 5×10^{5} โคโลนี/กรัม ถึงมากกว่า 1.3×10^{9} โคโลนี/กรัม พบว่าทุกตัวอย่างมีแบคทีเรียแลคติกน้อยกว่า 10 โคโลนี/กรัม และจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม มอก.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1080-2535 สำนักงานมาตรฐานอุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม ได้กำหนดว่ากะปิจะต้องไม่พบจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด มากกว่า 1×10^5 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม Coliform โดยวิธี MPN ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม *S. aureus* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม *Salmonella* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม และ *Cl. Perfringens* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.01 กรัม ดังนั้นทุกตัวอย่างของกะปิไม่ผ่านมาตรฐานที่ได้กำหนดไว้

ตารางที่ 3 คุณภาพทางจุลินทรีย์จากอาหารหมักจากสัตว์น้ำ

ชนิดของจุลินทรีย์ที่วิเคราะห์	จำนวนจุลินทรีย์ (โคโลนี /กรัม)			
	หอยดอง	แหนมปลาและปลาส้ม	กุ้งจ่อมและปลาจ่อม	กะปิ
จุลินทรีย์ทั้งหมด (โคโลนี/กรัม)	$<10->4.5\times10^7$	$<10->2.6\times10^8$	$3.6\times10^8->1.6\times10^9$	$3\times10^5->1.3\times10^9$
แบคทีเรียกรดแลคติก (โคโลนี/กรัม)	$<10->4\times10^7$	$<10->1.4\times10^9$	$2.3\times10^7->1.9\times10^9$	<10
แบคทีเรียโคลิฟอร์ม (MPN/กรัม)	1.8-350 (2[a])	23- >1600 (6)	7.8- >1600 (6)	1.8-5.5 (2)
Bacillus cereus	พบเชื้อ (3[a])	พบเชื้อ (5)	พบเชื้อ (3)	พบเชื้อ (4)
Escherichia coli	พบเชื้อ (1)	พบเชื้อ (4)	พบเชื้อ (1)	ไม่พบเชื้อ
Clostridium perfringens	พบเชื้อ (8)	พบเชื้อ (8)	พบเชื้อ (6)	พบเชื้อ (9)
Vibrio parahaemolyticus	พบเชื้อ (2)	พบเชื้อ (6)	พบเชื้อ (6)	ไม่พบเชื้อ
Staphylococcus aureus	พบเชื้อ (6)	พบเชื้อ (7)	พบเชื้อ (4)	พบเชื้อ (8)
Salmonella	พบเชื้อ (4)	พบเชื้อ (9)	พบเชื้อ (5)	พบเชื้อ (2)
จำนวนที่วิเคราะห์ (ตัวอย่าง)	10	10	10	10

[a] จำนวนตัวอย่างที่ตรวจพบเชื้อที่วิเคราะห์

จากผลการวิเคราะห์ค่าทางเคมีโดยเฉลี่ยจากอาหารหมัก (ตารางที่ 4) พบว่า หอยดอง แหนมปลาและปลาส้ม กุ้งจ่อมและปลาจ่อม มีค่าพีเอชค่อนข้างเป็นกรด และค่าที่ได้ใกล้เคียงกัน คือมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.4 ถึง 5.6 ส่วนกะปิ มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.7-7.4 จากค่าพีเอชซึ่งสูงกว่าค่าพีเอชของอาหารหมักชนิดอื่น ส่วนปริมาณกรดทั้งหมดของแหนมปลาและปลาส้มมีปริมาณสูงสุด และตามด้วยหอยดอง กุ้งและปลาจ่อมซึ่งปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากัน และในกะปิปริมาณกรดน้อยสุดเพียง 0.04 เปอร์เซ็นต์ แต่ปริมาณเกลือในกะปิพบว่ามีค่าสูงสุดคือร้อยละ 0.68 ตามด้วยกุ้งและปลาจ่อม หอยดองและแหนมและปลาส้ม ตามลำดับ จากค่าพีเอช และปริมาณกรดทั้งหมดที่วิเคราะห์ได้พบว่ามีความสัมพันธ์กันคือ ปริมาณกรดสูงก็จะให้ค่าพีเอชต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 คุณภาพทางเคมีของอาหารหมักจากสัตว์น้ำจากตลาดกรุงเทพมหานคร และต่างจังหวัด

ชนิดของอาหารหมัก	จำนวนที่วิเคราะห์ (ตัวอย่าง)	ค่าพีเอช	ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ)	ปริมาณเกลือทั้งหมด (ร้อยละ)
หอยดอง	10	4.4-4.8	1.26-1.30	0.16-0.29
แหนมปลาและปลาส้ม	10	4.3-5.0	1.24-1.73	0.05-0.06
กุ้งจ่อมและปลาจ่อม	10	4.3-5.6	1.26-1.30	0.06-0.17
กะปี	10	6.7-7.4	0.04-0.18	0.78-0.58

จากการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและทางจุลินทรีย์ของอาหารจากสัตว์น้ำ 4 ชนิด เป็นจำนวน 40 ตัวอย่าง พบว่าค่าพีเอชที่ได้ส่วนใหญ่อยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน ปริมาณกรดและปริมาณเกลือมีค่าต่ำกว่ามาตรฐานอย่างมากคาดว่าเนื่องมาจากความผิดพลาดจากการทดลองที่เกิดขึ้น และอาหารหมักประเภทหอยดอง แหนมปลา ปลาส้ม ปลาจ่อม และกุ้งจ่อม มีปริมาณกรด เกลือ และพีเอช ใกล้เคียงกันเนื่องจากอาหารหมักดังกล่าวใช้กรดที่ได้จากกระบวนการหมักถนอมอาหารซึ่งต่างจากกะปีที่ใช้ความเค็มของเกลือถนอมอาหาร จากการวิเคราะห์จุลินทรีย์ในอาหารหมักพบว่าจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดมีจำนวนมากในอาหารหมักทุกประเภท แต่แบคทีเรียกรดแลคติกพบเฉพาะในอาหารหมักประเภท หอยดอง แหนมปลา ปลาส้ม ปลาจ่อม และกุ้งจ่อม เท่านั้น โดยเฉพาะอาหารหมักประเภทแหนมปลา และปลาส้ม พบแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุดคิดเป็นร้อยละ 100 จาก 10 ตัวอย่างซึ่งเนื่องมาจากพีเอช ปริมาณกรด และปริมาณเกลืออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก และจากการวิเคราะห์เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคพบว่าจากอาหารหมัก 40 ตัวอย่างมีเพียง 7 ตัวอย่างที่ผ่านมาตรฐาน โดยจากหอยดอง 3 ตัวอย่าง และปลาจ่อมและกุ้งจ่อม 4 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 17.5 จากตัวอย่างอาหารทั้งหมด และเมื่อเปรียบเทียบอาหารหมักจากสัตว์น้ำที่ผ่านมาตรฐานทั้ง 4 ประเภทพบว่า หอยดองผ่านมาตรฐานมากที่สุดคือร้อยละ 30 และตามด้วยปลาจ่อมและกุ้งจ่อม (ร้อยละ40) ส่วนกะปีและแหนมปลาพบว่าทุกตัวอย่างไม่ผ่านมาตรฐาน และจากตารางพบว่ามีเพียงกะปีที่ไม่พบเชื้อ *V. parahaemolyticus* เนื่องจากคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *V. parahaemolyticus* ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นสูงกว่าร้อยละ 10 ซึ่งวิธีการถนอมอาหารของกะปีต้องใช้ปริมาณเกลืออย่างน้อยร้อยละ 36 จึงทำให้เชื้อ *V. parahaemolyticus* ไม่สามารถเจริญได้ในกะปี ผลจากการวิเคราะห์จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคแสดงให้เห็นถึงความไม่ปลอดภัยในการบริโภคอาหารหมักจากสัตว์น้ำที่บริโภคดิบที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นจึงควรให้คำแนะนำต่อผู้บริโภคให้เลือกผลิตภัณฑ์ที่ถูกสุขลักษณะ และหลีกเลี่ยงการบริโภคดิบ จากการที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากในอาหารหมักจึงได้สุ่มตัวอย่างแหนมปลาและเนื้อปลาสดนำมา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกและคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติสร้างสารยับยั้งได้เพื่อนำมาศึกษาในขั้นต่อไป

3.2 ผลการตรวจนับจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมปลาและเนื้อปลาสด

จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในตัวอย่างแหนมปลากราย 5 ตัวอย่าง แหนมปลาชะโด 5 ตัวอย่าง เนื้อปลากราย 3 ตัวอย่าง และเนื้อปลาชะโด 2 ตัวอย่างในอาหารแข็ง MRS ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 น้ำหนักต่อปริมาตร พบว่าแหนมปลากรายมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 4.2×10^{8} โคโลนีต่อกรัม ถึง 2.1×10^{9} โคโลนีต่อกรัม แหนมปลาชะโดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่า 6.8×10^{8} โคโลนีต่อกรัม เนื้อปลากรายมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 3.0×10^{5} โคโลนีต่อกรัม ถึง 7.3×10^{5} โคโลนีต่อกรัม และเนื้อปลาชะโดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 4.5×10^{5} โคโลนีต่อกรัม ถึง 2.5×10^{6} โคโลนีต่อกรัม (ตารางที่ 5)

การที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากในแหนมปลากรายและแหนมปลาชะโด คาดว่าอาจเป็นเพราะเนื้อปลาสดที่ใช้เป็นวัตถุดิบเป็นสับสเตรทที่ดีของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งเป็นกล้าเชื้อในการผลิตแหนมปลา แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เจริญในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยเป็นจุลินทรีย์ชนิดสำคัญที่ทำให้เกิดการหมักของผลิตภัณฑ์ โดยการเปลี่ยนสารคาร์โบไฮเดรตให้เป็นสารยับยั้งหลายชนิดได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และแบคเทอริโอซิน (Sobrino และคณะ, 1991 ; Vandenbergh, 1993) โดยที่สารยับยั้งเหล่านี้ไม่เป็นอันตรายต่อตัวมันเอง ในปี ค.ศ. 1999 Sander และคณะ กล่าวว่าระหว่างการหมักแบคทีเรียกรดแลคติกจะต้องสามารถทนต่อการสะสมผลิตภัณฑ์ซึ่งเกิดจากการคาร์โบไฮเดรต เช่น กรดแลคติก และต้องทนต่อสภาพแวดล้อมที่อาจเป็นอันตรายต่อเซลล์ซึ่งจำเป็นต่อการหมักที่เหมาะสมของอาหารชนิดนั้นๆ สารที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกไม่เพียงทำให้รสชาติและกลิ่นของผลิตภัณฑ์อาหารหมักเป็นที่น่าพอใจเท่านั้นแต่ยังสามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในอาหารอีกด้วย (De Vuyst และ Vandarmme, 1994; Buckenhuskes, 1993 ; Daeschel, 1989 ; Gonzalez และคณะ, 1994) ในปี ค.ศ. 2002 Paludan-Müller และคณะ ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้มที่ประกอบด้วย เนื้อปลาชะโด 750 กรัม เกลือ 100 กรัม น้ำมันปาล์ม 125 มิลลิลิตร และข้าวคั่ว 80 กรัม พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 10^{8} ถึง 10^{9} โคโลนีต่อกรัม ขณะที่ผลิตภัณฑ์ที่ทำจากปลาแฮร์ริง ซึ่งประกอบด้วย ปลาแฮร์ริงสับ น้ำตาล เกลือ เครื่องเทศ (allspice) และแครอท พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 4.5×10^{8} ถึง 2.4×10^{9} โคโลนีต่อกรัม (Lyhs และคณะ, 2004) นอกจากนี้ Gram และ Huss (1996) ได้ทำการศึกษาชนิดและจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก พบว่าเมื่อเก็บอาหารหมักไว้หลายๆ สัปดาห์จำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้นเป็น 10^{7} ถึง 10^{8} โคโลนีต่อกรัม ส่งผลให้กลิ่น รสชาติ และเนื้อสัมผัสไม่เป็นที่ยอมรับ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากในตัวอย่างเนื้อปลากรายและเนื้อปลาชะโด คาดว่าอาจเป็นเพราะ แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถปรับตัวให้อาศัยอยู่และเจริญเติบโตได้ในสภาพแวดล้อมในปลา ซึ่งเกี่ยวข้องกับปัจจัยภายในหลายประการ โดยทั่วไปปัจจัยภายในที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติในเนื้อปลาที่พบว่าเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสียชนิดอื่นสามารถอาศัยอยู่ได้และทำให้เนื้อปลาเกิดการเน่าเสียได้แก่ การที่เนื้อปลามีโพสมอร์เทม พีเอช (Post-mortem pH) สูง (สูงกว่า 6.0) หลังการตาย ซึ่งเนื่องมาจากการที่เนื้อปลาส่วนใหญ่มีคาร์โบไฮเดรตในปริมาณที่น้อยมาก (น้อยกว่าร้อยละ 0.5) จึงทำให้เกิดกรดแลคติกขึ้นเพียงเล็กน้อยเท่านั้นหลังจากปลาตาย ด้วยเหตุนี้จึงทำให้จุลินทรีย์ที่ไวต่อกรดสามารถเจริญเติบโตอยู่ในปลาได้ นอกจากนี้ในเนื้อปลายังมีสารประกอบไนโตรเจนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำซึ่งละลายน้ำได้เช่น กรดอะมิโนอิสระ และนิวคลีโอไทด์ ซึ่งเป็นสารประกอบที่จุลินทรีย์จะเอาไปใช้เพื่อการเจริญเติบโตได้ นอกจากนี้ในเนื้อปลายังมีไตรเมทิลลามีนออกไซด์ (Trimethylamine oxide, TMAO) ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่ไม่ใช่โปรตีนชนิดหนึ่งที่พบในปลาทะเลทั้งหมดและปลาน้ำจืดบางชนิด ไตรเมทิลลามีนออกไซด์นี้เป็นสาเหตุทำให้เนื้อปลามีค่าความต่างศักย์ของออกซิเดชัน-รีดักชัน (redox potential, Eh) สูง หรือมีค่าเป็นบวก อย่างไรก็ตามความสำคัญของค่า Eh ต่อการเสียของปลายังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่การมี TMAO เกี่ยวข้องกับการเสียของปลาอย่างแน่นอนโดยเฉพาะในสภาวะที่ขาดออกซิเจน แบคทีเรียชนิดที่ทำให้ปลาเน่าเสียได้แก่ เชื้อ *Shewanella putrefaciens, Photobacterium phosphoreum* และ *Vibrionacea* สามารถใช้ TMAO ได้โดยใช้เป็นตัวรับอิเลคตรอนตัวสุดท้ายในกระบวนการหายใจในสภาวะขาดอากาศ (anaerobic respiration) เป็นผลทำให้เกิดกลิ่นรสผิดปกติของไตรเมทิลเอมีน (trimethylamine, TMA) (Gram และคณะ, 1989)

ในปี ค. ศ. 2006 Bucio และคณะ ได้ทำการจำแนกจุลินทรีย์จากปลาแม่น้ำและปลาจากฟาร์ม พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด Lactobacilli เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่พบภายในลำไส้ของปลา นอกจากนี้ Ringø และคณะ (1998) ได้ทำการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในปลาพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มสำคัญที่พบในปลา โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่เป็นประโยชน์จะอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหารของปลาและชนิดที่เป็นโทษมักพบตามเยื่อบุช่องท้อง ไต ตับ หัวใจ และม้าม ขณะที่ Gram และ Huss (1996) ได้รายงานว่าในผลิตภัณฑ์ปลาแห้ง และปลารมควันจากประเทศเนปาลมีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนระหว่าง log 4.7-8.3 ถึง log 5.1-8.5 โคโลนีต่อกรัม นอกจากนี้ได้มีการศึกษาของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในปลา rainbow trout และปลา *Oncorhynchus mykiss* Walbaum พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก 3×10^5 โคโลนีต่อกรัม

73019

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในเนื้อปลาสดและแหนมปลาและจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (โคโลนี/กรัม)	จำนวนไอโซเลตที่คัดเลือก
1	แหนมปลากราย	ตลาดหัวตะเข้ กรุงเทพฯ	2.1×10^{9}	10
2	แหนมปลากราย	ตลาด ก.ม. 8 กรุงเทพฯ	6.6×10^{8}	9
3	แหนมปลากราย	ตลาดสี่มุมเมืองกรุงเทพฯ	1.4×10^{9}	9
4	แหนมปลากราย	ตลาดมีนบุรี กรุงเทพฯ	4.2×10^{8}	9
5	แหนมปลากราย	ตลาดบางกะปิ กรุงเทพฯ	1.3×10^{9}	9
6	แหนมปลาชะโด	ตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง กรุงเทพฯ	1.8×10^{8}	9
7	แหนมปลาชะโด	ตลาดนำชัย กรุงเทพฯ	6.8×10^{8}	9
8	แหนมปลาชะโด	ตลาดพัฒนาการ กรุงเทพฯ	TNTC	9
9	แหนมปลาชะโด	ตลาด ก.ม. 8 กรุงเทพฯ	TNTC	13
10	แหนมปลาชะโด	ตลาดพระโขนง กรุงเทพฯ	TNTC	13
11	เนื้อปลากราย	ตลาดมีนบุรี กรุงเทพฯ	3.0×10^{5}	9
12	เนื้อปลากราย	ตลาดหัวตะเข้ กรุงเทพฯ	3.0×10^{5}	3
13	เนื้อปลากราย	ตลาด ก.ม. 8 กรุงเทพฯ	7.3×10^{5}	5
14	เนื้อปลาชะโด	ตลาดนิคมอุตสาหกรรมลาดกระบัง กรุงเทพฯ	4.5×10^{5}	9
15	เนื้อปลาชะโด	ตลาดมีนบุรี กรุงเทพฯ	2.5×10^{6}	13
รวม				138

TNTC หมายถึง มีจำนวนโคโลนีมากเกินกว่าที่จะนับได้ (มากกว่า 250 โคโลนีต่อจานเพาะเชื้อ)

3.3 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบ ด้วยวิธี Agar Spot Test

3.3.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี Agar Spot Test

การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกจากแหนมปลา และเนื้อปลาสดทั้งหมด 138 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 30 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 21.74 จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 138 ไอโซเลต ซึ่งแต่ละไอโซเลตสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน โดยเชื้อที่ถูกยับยั้งมากที่สุดได้แก่ เชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 คิดเป็นร้อยละ 80 และเชื้อที่ถูกยับยั้งรองลงมาได้แก่ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 คิดเป็นร้อยละ 16.66 จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 30 ไอโซเลต ส่วนเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylococcus aureus TISTR 118 และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 พบว่าไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดสามารถยับยั้งได้ (ตารางที่ 6)

จากผลการทดลองการที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ส่วนใหญ่ (ร้อยละ 80) สามารถยับยั้งเชื้อ *L. bulgaricus* TISTR 451 และเชื้อ *P. acidilactici* TISTR 051 แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย 2 ชนิดนี้มีความไวต่อการถูกยับยั้งด้วยสารยับยั้งที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกผลิตขึ้น ซึ่งอาจเป็นส่วนผสมของสารยับยั้งหลายชนิดได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน (Cowley, 1988) ส่วนเชื้อ *S. aureus* TISTR118 และ *L. monocytogenes* DMST 11256 ที่ไม่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดสามารถยับยั้งได้อาจเป็นไปได้ที่เชื้อทั้งสองสามารถทนต่อสารยับยั้งชนิดต่างๆ ที่แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นได้หรืออาจเป็นเพราะสารยับยั้งที่ได้มีความเข้มข้นไม่เพียงพอที่จะต้านการเจริญของเชื้อได้

ในการทดลองนี้ที่พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดและแหนมปลาสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้นั้นสอดคล้องกับการทดลองของนักวิจัยท่านอื่นที่ได้ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากผลิตภัณฑ์เนื้อและปลาหลายชนิด พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้เช่นเดียวกันดังเช่นการทดลองของ Budde และคณะ (2003) ซึ่งได้นำเชื้อ *Leuconostoc carnosum* 4010 ที่แยกจากผิวของชิ้นหมูแฮมที่บรรจุในห่อสุญญากาศ มาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี spot test พบว่าเชื้อ *L. carnosum* 4010 สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้หลายสายพันธุ์ และต้านเชื้อ *L. innocua* และแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด แต่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *S. aureus, Brochotrix thermosphacta, Bacillus cereus, Salmonella infantis, S. typhimurium, E. coli* และ *Yersinia enterocolitica* ได้ และเมื่อเติมเชื้อ *L. carnosum* 4010 ลงในชิ้นไส้กรอกที่มีการเติมเชื้อ *L. monocytogenes* จำนวน 10^4 โคโลนีต่อกรัม และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 28 วัน พบว่าอัตราการยับยั้งเซลล์ *L. monocytogenes* ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของเชื้อ *L. carnosum* 4010 ที่เติมลงในชิ้นไส้กรอก โดยเมื่อเติมเชื้อ *L. carnosum* 4010 จำนวน 1.2×10^5 เซลล์ต่อกรัม พบว่าไม่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ในชิ้นไส้กรอกได้ แต่เมื่อเติมเชื้อ *L. carnosum* 4010 เพิ่มขึ้นเป็น 6.3×10^6 เซลล์ต่อกรัมพบว่าจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* ในชิ้นไส้กรอกลดลงเหลือเพียง 10 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งการลดลงของเชื้อ *L. monocytogenes* เมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ของ *L. carnosum* 4010 นี้ ผู้ทดลองได้อธิบายว่าอาจเป็นเพราะสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *L. carnosum* 4010 ซึ่งมีความเข้มข้นสูงขึ้น (Budde และคณะ, 2003) และเมื่อเร็วๆนี้ Thapa และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาผลการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยเชื้อ *L. lactis* subsp. *cremoris* SM: T1 ที่ได้จากผลิตภัณฑ์ปลาตากแห้งและรมควัน (sukako maacha) พื้นเมืองของแถบหิมาลัยตะวันออกของประเทศเนปาลและอินเดียด้วยวิธี agar spot พบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *L. innocua* และ *S. aureus* ได้ และในปี ค.ศ. 2006 Ghalfi และคณะได้ทำการศึกษาสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *L. curvatus* CWBI-B28 พบว่าสามารถต้านเชื้อ *L. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์ปลาแซลมอนรมควันในระหว่างเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ขณะที่ Ammor และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คณะ (2005) ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นในไบโอฟิล์ม (biofilm) โดยแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดที่สามารถสร้างสารคล้ายแบคเทอริโอซินได้แก่ *Vagococcus carniphilus* 5 สายพันธุ์ *Enterococcus faecium* 3 สายพันธุ์ *L. sakei* 1 สายพันธุ์ และ *Enterococcus* sp. 1 สายพันธุ์ พบว่าเชื้อ *E. faecium* 2 สายพันธุ์ และเชื้อ *V. carniphilus* 3 สายพันธุ์ ให้ผลในการยับยั้งเชื้อ *L. innocua*, *S. aureus* และ *Hafnia alvei* EIE-25 ได้สูงสุด โดยพบว่าสามารถลดจำนวนเชื้อลงเหลือ log 2, log 2.7 และ log 2.4 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับเมื่อเทียบกับชุดควบคุม

ตารางที่ 6 คุณสมบัติการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากปลาสดและแหนมปลา

ไอโซเลต	ตัวอย่างที่มาของเชื้อที่แยก	ชนิดของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ			
		S. aureus TISTR 118	*P. acidilactici* TISTR 051	*L. bulgaricus* TISTR 451	*L. monocytogenes* DMST 11256
2IS1	2	-	-	+	-
3IS3	3	-	-	+	-
3IS4	3	-	-	-	-
3IS6	3	-	-	+	-
3IS7	3	-	-	+	-
4IS1	4	-	-	+	-
4IS3	4	-	-	+	-
4IS5	4	-	-	+	-
4IS6	4	-	-	+	-
4IS8	4	-	+	-	-
5IS2	5	-	+	-	-
5IS4	5	-	+	-	-
5IS8	5	-	-	+	-
5IS9	5	-	-	+	-
9IS1	9	-	-	+	-
9IS2	9	-	-	+	-
9IS3	9	-	-	+	-
9IS5	9	-	-	+	-
9IS7	9	-	-	+	-
9IS8	9	-	-	+	-
13IS2	13	-	-	+	-
13IS3	13	-	-	+	-
13IS4	13	-	+	+	-
13IS5	13	-	+	+	-
14IS3	14	-	-	+	-
14IS4	14	-	-	+	-
14IS7	14	-	-	+	-
14IS8	14	-	-	+	-
14IS9	14	-	-	-	-
14IS12	14	-	+	-	-

- หมายถึง ไม่สามารถยับยั้งได้

+ หมายถึง สามารถยับยั้งได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดและจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้ง

ตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (โคโลนีต่อกรัม)	จำนวนไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตที่สร้างสารยับยั้ง[a]
<u>แหนมปลา</u>				
ปลากราย	5	4.2×10^{8} – 2.1×10^{9}	46	14
ปลาชะโด	5	$\geq 6.8\times10^{8}$	53	6
<u>ปลาสด</u>				
ปลากราย	3	3.0×10^{5} – 7.3×10^{5}	17	4
ปลาชะโด	2	4.5×10^{5} – 2.5×10^{6}	22	6

[a]ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้แก่ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 415 และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ได้อย่างน้อย 1 ชนิด

3.4 ผลการทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.4.1 การทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก 30 ไอโซเลต พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตสามารถทนต่อกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอชต่างกัน (ตารางที่ 7) โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.30 ถึง 4.00 นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 11 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ในช่วงพีเอช 6.30 ถึง 3.70 ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 36.70 ส่วนที่ระดับพีเอช 6.30 ถึง 3.35 แบคทีเรียกรดแลค ติก จำนวน 7 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 23.30 สามารถเจริญได้ แต่ที่ระดับพีเอช 6.30 ถึง 3.20 มีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 4 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 6.70 และพีเอช 6.30 ถึง 2.90 มีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 4 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ คิดเป็นร้อยละ 6.70 จากจำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต ดังนั้นระดับพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้คือ พีเอช 2.90 ไอโซเลตที่สามารถทนต่อระดับพีเอช 2.90 ได้แก่ ไอโซเลต 13IS4 และ 14IS9

3.4.2 การทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ในการทดสอบการทนกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตสามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกได้แตกต่างกันในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก (ตารางที่ 7) พบว่าในช่วงพีเอช 6.30 ถึง 2.60 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเจริญได้จำนวน 12 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 40 รองลงมาคือพีเอชที่อยู่ในช่วง 6.30 ถึง 3.70 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้ 8 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 26.70 ส่วนระดับพีเอชในช่วง 6.30 ถึง 3.00 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้จำนวน 6 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 20 และพีเอชที่อยู่ในช่วง 6.30 ถึง 2.20 มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้จำนวน 2 ไอโซเลตคิดเป็นร้อยละ 13.30 จากจำนวนทั้งหมด 30 ไอโซเลต ดังนั้นค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้คือ พีเอช 2.2 ไอโซเลตที่เจริญได้ที่พีเอชต่ำสุดคือ 5IS9, 13IS3, 13IS4 และ 13IS5

3.4.3 การทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการทดสอบการทนต่อโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้คัดเลือกจำนวน 30 ไอโซเลต พบว่าทุกไอโซเลตพบว่าสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง 4.50 ในอาหารเหลว MRS (ตารางที่ 7) ขณะที่โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง 6.00 พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้จำนวน 17 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 56.66 โซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0 ถึง 9.00 มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้จำนวน 2 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 6.66 จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 30 ไอโซเลต และมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 1 ไอโซเลต ที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่ำสุดคือร้อยละ 4.5 และไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุด (ร้อยละ 9.00) ได้แก่ไอโซเลต 5IS4 และ 14IS8

3.4.4 การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่ทดสอบ (27 ไอโซเลต หรือร้อยละ 90) สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือ ร้อยละ 5.25 ยกเว้นไอโซเลต 3IS3, 3IS6 และ 14IS7 เจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือน้ำดีระดับต่ำกว่าคือร้อยละ 1.50, 2.25 และ 3.00 ตามลำดับ (ตารางที่ 7)

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกส่วนใหญ่สามารถทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ เกลือน้ำดี ที่มีความเข้มข้นสูงได้ อาจเป็นเพราะโดยธรรมชาติของแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อสภาวะที่เป็นอันตรายดังกล่าวได้ดีตามที่ Yousef และ Courtney (2003) ได้กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกโดยตั้งแต่กำเนิดจะมีความสามารถในการทนต่อกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ซึ่งความสามารถในการทนต่อกรดจะเพิ่มขึ้นหลังจากเกิดการปรับตัวต่อกรด และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก สามารถอยู่รอดในทางเดินอาหารได้ดีกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยสามารถทนต่อกรด และเกลือน้ำดีในทางเดินอาหารของมนุษย์ได้ (Conwey และคณะ, 1987 ; Tuomola และคณะ,. 2001) ส่วนการที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีกรดไฮโดรคลอริกที่ค่าพีเอชต่ำกว่ากรดแลคติกอาจเป็นไปได้ที่กรดแลคติกเป็นกรดอ่อน ซึ่งเป็นกรดที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวจึงมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้ดีกว่ากรดไฮโดรคลอริก ซึ่งเป็นกรดแก่ที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แตกตัวได้หมดภายนอกเซลล์จึงไม่สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์ได้ เนื่องจากธรรมชาติของเซลล์ที่จะไม่ยอมให้อิออนบวกและอิออนลบผ่านสู่เซลล์ได้โดยง่าย (Kashket, 1987)

ดังนั้นกรดไฮโดรคลอริกจึงมีผลยับยั้งน้อยกว่า การที่กรดอยู่ในรูปไม่แตกตัวสามารถยับยั้งการเจริญได้ดีนั้นเนื่องมาจากกรดที่ไม่แตกตัวนี้สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้อย่างง่ายดายและจะแตกตัวภายในเซลล์ เนื่องจากภายในเซลล์มีค่าพีเอชสูงกว่าภายนอกเซลล์ ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียจึงต้องรักษาค่าพีเอชภายในเซลล์ให้ใกล้เคียงกับค่าเป็นกลาง (พีเอช 7) เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีน เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และฟอสโฟลิปิด โดยโปรตอนที่เกิดขึ้นภายในเซลล์จากการแตกตัวของกรดอินทรีย์จะมีผลทำให้ไซโตพลาสซึมมีสภาพเป็นกรด ดังนั้นเซลล์จึงจำเป็นต้องขับโปรตอนออกสู่ภายนอก ซึ่งการขับโปรตอนออกจากเซลล์นี้จำเป็นต้องใช้พลังงานในรูป ATP ดังนั้นการขับโปรตอนอย่างต่อเนื่องนี้อาจทำให้พลังงานของเซลล์หมดลงในที่สุด ส่งผลให้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ช้าลง (Dakin และ Day, 1958) ซึ่งได้มีรายงานว่าเมื่อปรับค่าพีเอชภายนอกเซลล์ของเชื้อ *L. lactis* และ *Streptococcus bovis* ด้วยกรดแลคติกจะมีผลทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ต่ำกว่าปรับด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Poolman และคณะ, 1987 ; Cook และ Russel, 1994)

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก ที่ความเป็นกรดสูง (พีเอชต่ำ) และทนต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดีที่มีความเข้มข้นสูง ซึ่งเป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยจากการทดลองนี้สรุปว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS4 และ 14IS9 สามารถทนต่อกรดแลคติกได้ที่พีเอชต่ำที่สุด (2.90) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ไอโซเลต 5IS9, 13IS3, 13IS4 และ 13IS5 สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกได้ที่พีเอชต่ำที่สุด (2.20) เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลตอื่น ดังนั้นจึงเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 ซึ่งคาดว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตนี้อาจจะสามารถทนต่อกรดในกระเพาะอาหารและสามารถอยู่รอดได้ Ekkila และ Petaja, (2000) ได้กล่าวว่าแม้กรดที่ถูกขับออกมาจากกระเพาะอาหารจะมีค่าพีเอชเท่ากับ 0.9 แต่ค่าพีเอชจะเพิ่มมากขึ้นเป็น 3.0 เมื่อมีอาหารผสมรวมอยู่ในกระเพาะอาหาร นอกจากนี้พบว่าส่วนประกอบบางอย่างของน้ำย่อยภายในกระเพาะอาหารอาจช่วยปกป้องเซลล์ของแบคทีเรียทำให้แบคทีเรียสามารถอาศัยอยู่ในกระเพาะอาหารได้แม้ว่าจะมีค่าความเป็นกรดต่ำมากก็ตาม (Conwey และคณะ, 1987)

นอกจากนี้การที่ไอโซเลต 13IS3 สามารถทนต่อกรดแลคติกที่พีเอช 3.20 และโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.0 ในขณะที่ไอโซเลต 13IS4 สามารถทนต่อกรดแลคติกที่พีเอช 2.90 และโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้นร้อยละ 6.0 ซึ่งความสามารถในการทนต่อกรดและเกลือที่ความเข้มข้นดังกล่าวเพียงพอที่จะทำให้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตสามารถอยู่รอดได้ในระหว่างการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมักถ้าหากใช้แบคทีเรียทั้งสองเป็นกล้าเชื้อ เนื่องจากในแหนมปลาที่มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.53 ถึง 5.80 และความเข้มข้นเกลืออยู่ในช่วงร้อยละ 1.61 ถึง 1.97 (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545) และปลาส้มที่มีค่าพีเอช 4.5 ถึง 5.0 ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 (Paludan-Müller, 2002) นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบค่าความขุ่นของเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่เติมกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไรด์ หรือ เกลือน้ำดีของเชื้อไอโซเลตต่างๆ พบว่าไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 สามารถเจริญได้ดีกว่าเชื้อไอโซเลตอื่นๆ จึงคาดได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 อาจนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อโพรไบโอติกสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

ตารางที่ 7 การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากแหนมปลาและปลาสด

ไอโซเลต	สภาวะที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติก			
	กรดแลคติก (พีเอช)	กรดไฮโดรคลอริก (พีเอช)	โซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ)	เกลือน้ำดี (ร้อยละ)
2IS1	4.00	3.70	6.00	5.25[b]
3IS3	3.70	3.70	6.00	1.50
3IS4	4.00	3.70	6.00	5.25[b]
3IS6	3.70	3.00	6.00	2.25
3IS7	4.00	3.70	7.50	5.25[b]
4IS1	4.00	3.70	7.50	5.25[b]
4IS3	3.70	3.00	6.00	5.25[b]
4IS5	3.70	3.00	7.50	5.25[b]
4IS6	4.00	2.60	7.50	5.25[b]
4IS8	3.70	3.00	6.00	5.25[b]
5IS2	4.00	2.60	6.00	5.25[b]
5IS4	4.00	3.00	9.00[a]	5.25[b]
5IS8	3.70	2.60	6.00	5.25[b]
5IS9	3.70	2.20[a]	6.00	5.25[b]
9IS1	3.70	3.00	6.00	5.25[b]
9IS2	4.00	3.70	4.50	5.25[b]
9IS3	3.70	3.70	7.50	5.25[b]
9IS5	3.20	3.70	7.50	5.25[b]
9IS7	3.70	2.60	7.50	5.25[b]
9IS8	3.35	2.60	6.00	5.25[b]
13IS2	3.35	2.60	6.00	5.25[b]
13IS3	3.20	2.20[a]	6.00	5.25[b]
13IS4	2.90[a]	2.20[a]	6.00	5.25[b]
13IS5	3.35	2.20[a]	6.00	5.25[b]
14IS3	3.35	2.60	7.50	5.25[b]
14IS4	3.35	2.60	6.00	5.25[b]
14IS7	3.35	2.60	7.50	3.00
14IS8	3.35	2.60	9.00[b]	5.25[b]
14IS9	2.90[a]	2.60	6.00	5.25[b]
14IS12	3.70	2.60	7.50	5.25[b]

[a] ค่าพีเอชต่ำสุดของกรดแลคติกหรือกรดไฮโดรคลอริกในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

[b] ความเข้มข้นสูงสุดของโซเดียมคลอไรด์หรือเกลือน้ำดีในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.5.1 การศึกษาทางสัณฐานวิทยา

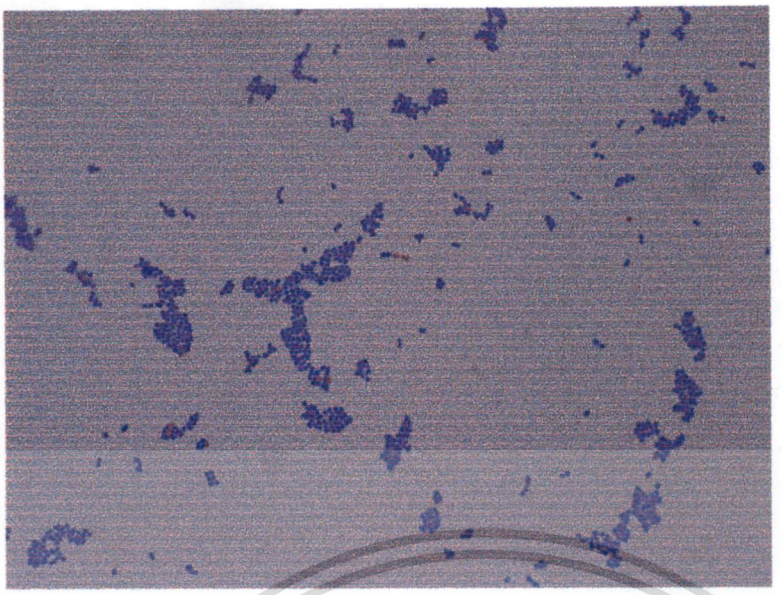
จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 ที่แยกได้จากเนื้อปลากรายสด โดยการย้อมแกรมพบว่าไอโซเลต 13IS3 มีรูปร่างกลม ขณะที่ไอโซเลต 13IS4 มีรูปร่างท่อน ทั้งสองไอโซเลตติดสีม่วงของคริสตัลไวโอเลตจึงเป็นแบคทีเรียแกรมบวก (รูปที่ 1) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ Ringø และ Gatesoupe (1998) ซึ่งได้ทำการศึกษาชนิดของจุลินทรีย์จากปลาในแหล่งต่างๆ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มที่มีลักษณะรูปร่างท่อน และรูปร่างกลม แกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีสปอร์ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียชนิดสำคัญที่อาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร โพรงบุช่องท้อง ไต ตับ หัวใจ และม้ามของปลา โดยแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดที่คัดเลือกจากระบบทางเดินอาหารของปลามีคุณสมบัติเป็นจุลินทรีย์เพื่อสุขภาพ (Probiotic) ซึ่งได้แก่เชื้อ *Lactococcus, Lactobacillus, Streptococcus* และ *Leuconostoc*

3.5.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

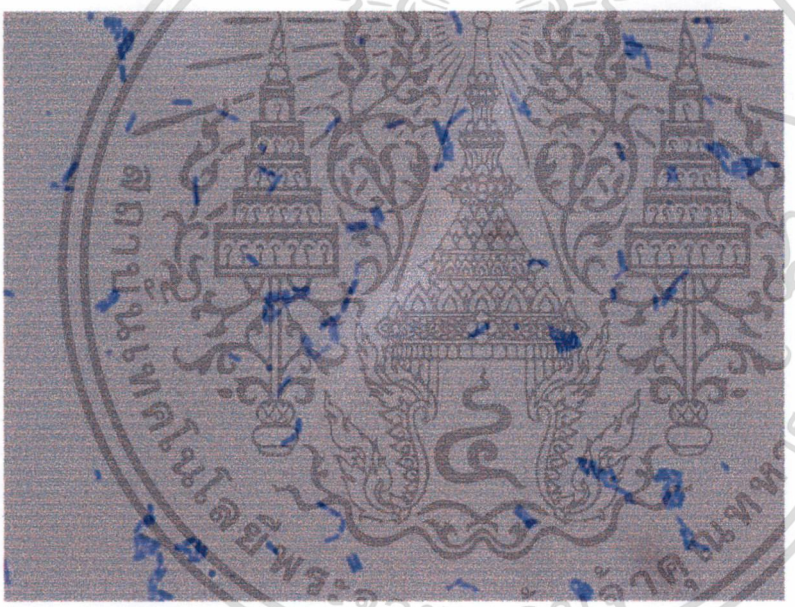
จากผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกถึงระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH และประมวลผลด้วยโปรแกรม API Identification Software (Bio Merieux) พบว่าคุณสมบัติทางชีวเคมีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 มีความคล้ายคลึงกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของเชื้อ *Lactococcus lactis* ร้อยละ 99.00 ในขณะที่ไอโซเลต 13IS4 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lactobacillus curvatus* ร้อยละ 43.50

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยใช้ API 50 CH เป็นวิธีที่ใช้ทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยการศึกษาการหมักน้ำตาล 50 ชนิด ร่วมกับการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CH medium ซึ่งการเปลี่ยนแปลงสีในหลอดชุดทดสอบเกิดจากการผลิตกรดในการหมักสารประกอบต่างๆ ในสภาวะไร้อากาศของแบคทีเรีย แต่การทดสอบด้วยวิธีนี้อาจมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นได้ เพราะการอ่านผลจากสีที่เกิดขึ้น ในบางครั้งสีที่เกิดขึ้นไม่ชัดเจนเช่นเกิดสีม่วงอ่อนหรือเขียวอ่อน เป็นต้น (รูปที่ 2) ด้วยเหตุนี้จึงต้องทำการจำแนกชนิดโดยอาศัยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ซึ่งเป็นวิธีการจำแนกชนิดแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่ามีความถูกต้องในการจำแนกชนิดของจุลินทรีย์ เพื่อให้ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น (Berthier และ Ehrlich, 1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(ก)



(ข)

รูปที่ 1 รูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4

รูป (ก) ลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต 13IS3

รูป (ข) ลักษณะรูปร่างของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต 13IS4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

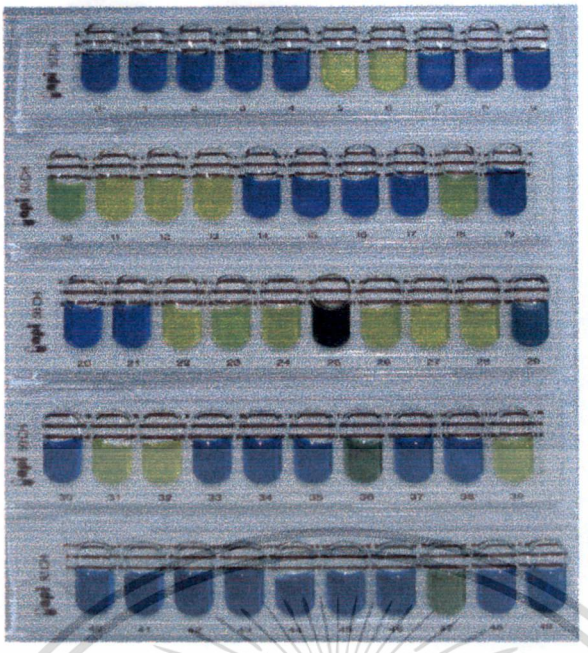
ตารางที่ 8 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

ชนิดของสารที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ		ชนิดสารทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	13IS3	13IS4		13IS3	13IS4
Control	-	-	Esuculin ferric citrate	+	+
Glycerol	-	-	Salicin	+	+
Erythritol	-	-	D-Celibiose	+	-
D-Arabinose	-	-	D-Maltose	+	-
L-Arabinose	-	-	D-Lactose	-	-
D-Ribose	+	+	D-Melibiose	-	+
D-Xylose	+	-	D-Saccharose	+	+
L-Xylose	-	-	D-Trehalose	+	+
D-Adonitol	-	-	Inulin	-	-
Methyl-β-D-Xylopyranoside	-	-	D-Melezitose	-	-
D-Galactose	-	+	D-Raffinose	-	-
D-Glucose	+	+	Amidon	-	-
D-Fructose	+	+	Glycogen	-	-
D-Mannose	+	-	Xylitol	-	-
L-Sorbose	-	-	Genitiobiose	+	+
L-Rhamnose	-	-	D-Turanose	-	-
Dulsitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	-	-	D-Tagatose	-	-
D-Mannitol	-	-	D-Fucose	-	-
D-Sorbitol	-	-	L-Fucose	-	-
Methyl-α-D-Mannopyranoside	-	-	D-Arabinose	-	-
Methyl-α-D-Glucopyranoside	-	-	L-Arabinose	-	-
N-Acetylglucosamine	+	+	Potassium Gluconate	-	-
Amyldalin	-	-	Potassium 2-Ketogluconate	-	-
Arbutin	-	-	Potassium 5-Ketogluconate	-	-

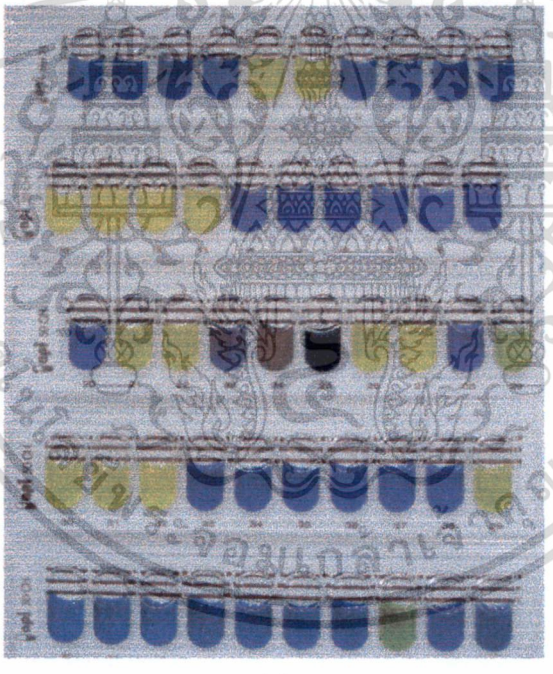
- หมายถึงให้ผลบวกในการทดสอบ (อาหารในหลอดเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองยกเว้น Esuculin ferric citrate เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ)

+ หมายถึงให้ผลลบในการทดสอบ (อาหารในหลอดไม่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองยกเว้น Esuculin ferric citrate ไม่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



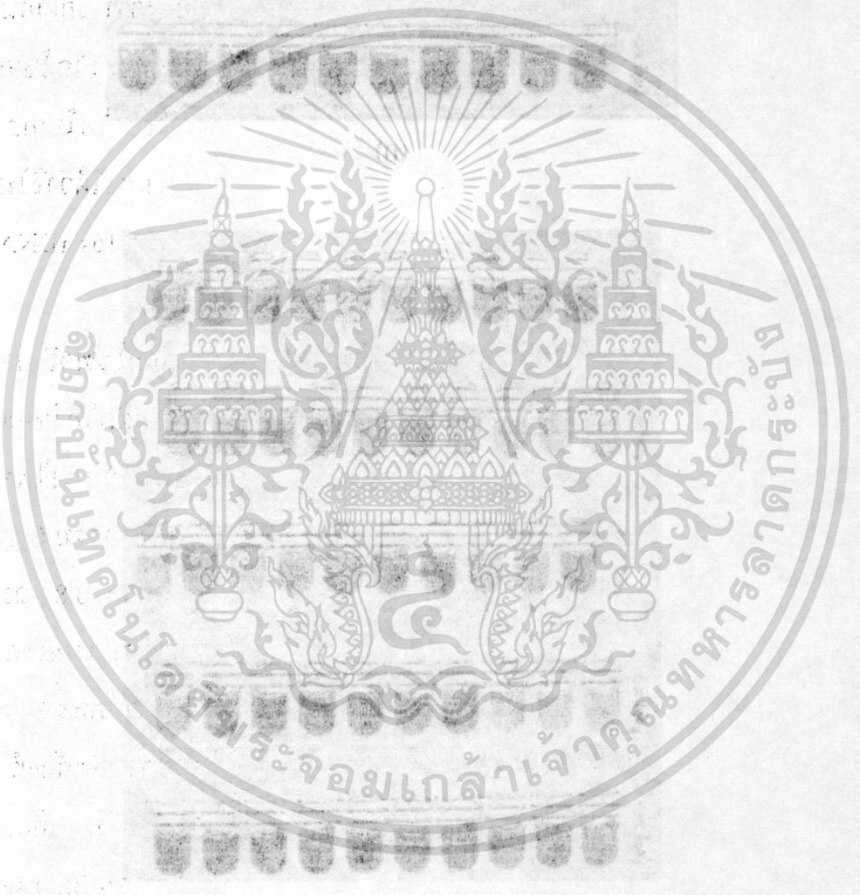
(ก)



(ข)

รูปที่ 2 ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 (รูป ก) และไอโซเลต 13IS4 (รูป ข) ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

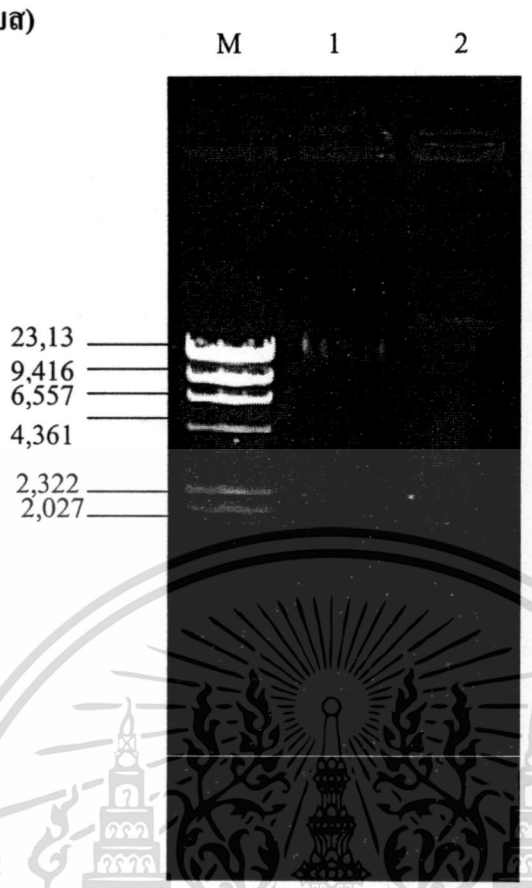
3.5.3.1 การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็คโตโฟเรซีส

จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 ในอาหาร LB และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยอะกาโรสเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 ด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII พบว่าแถบจีโนมิกของดีเอ็นเอทั้งสองไอโซเลตที่สกัดได้มีเพียงแถบเดียว (รูปที่ 3) โดยพบว่าไอโซเลต 13IS3 เกิดแถบของจีโนมิกดีเอ็นเออยู่ที่ระดับเดียวกับดีเอ็นเอมาตรฐานที่ขนาด 23.1 กิโลเบส ในขณะที่แถบจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS4 อยู่เหนือแถบดีเอ็นเอมาตรฐานที่ขนาด 23.1 กิโลเบส ซึ่งพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 มีปริมาณ 135 และ 195 นาโนกรัมต่อไมโครลิตรตามลำดับและจะเห็นได้ว่าจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์ จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16s rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอเรสต่อไป

3.5.3.2 การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

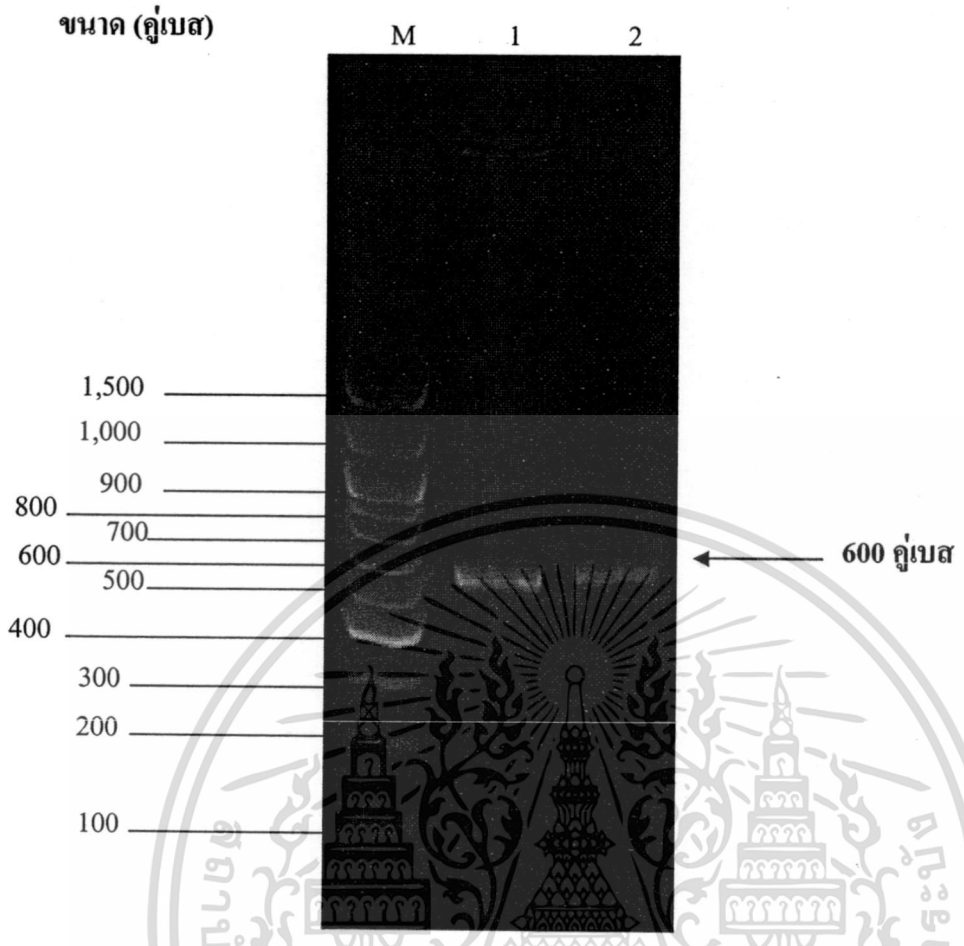
จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13S4 โดยการเติมส่วนประกอบต่างๆ ของปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสรวมทั้งไพรเมอร์ FDNA และ RDNA จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR machine) และวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ด้วยอะกาโรสเจลอิเล็คโตรโฟเรซิสที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 และเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder พบว่าเมื่อใช้จีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และไอโซเลต 13IS4 จะปรากฏแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ไอโซเลตละ 1 แถบที่มีขนาดประมาณ 600 คู่เบส (รูปที่ 4) จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้งสองไอโซเลต พบว่าได้ลำดับนิวคลีโอไทด์ 600 คู่เบส ดังแสดงในรูปที่ 5 และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม Blast server

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 3 จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4 จากการแยกด้วยเทคนิค
อิเล็คโตรโฟเรซิสในอะกาโรสเจลความเข้มข้นร้อยละ 0.8
เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอ็นไซม์ตัดจำเพาะ *Hin*dIII
เลน 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS3
เลน 3 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 13IS4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



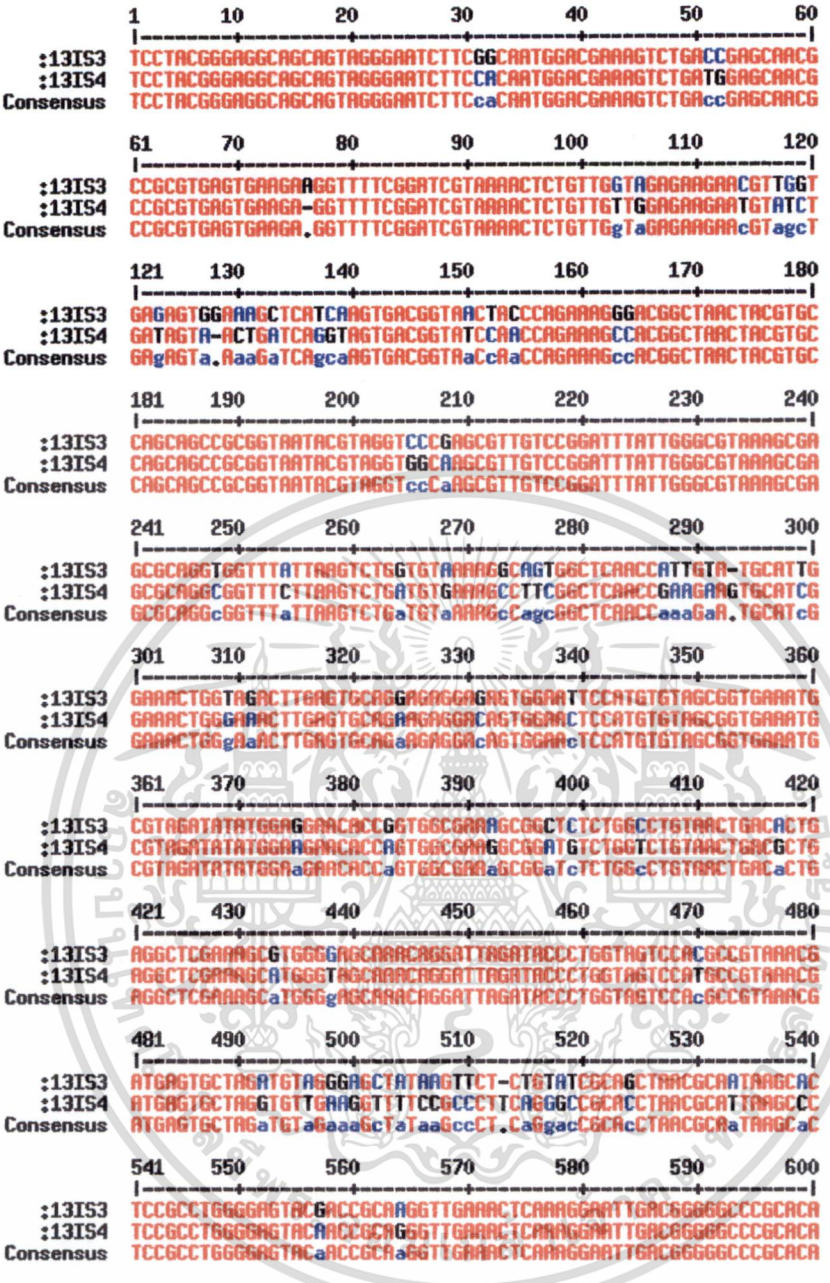
รูปที่ 4 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

เลน M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

เลน 1 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต 13IS3

เลน 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต 13IS4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 5 การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ขนาด 600 คู่เบส ของไอโซเลต 13IS3 และ 13IS4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lactococcus lactis* ร้อยละ 100 ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactococcus lactis* (ตารางที่ 9)

สำหรับไอโซเลต 13IS4 (ตารางที่ 10) จากผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ได้จากลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS4 มีความคล้ายคลึงกับเชื้อ *Lactobacillus sakei* ร้อยละ 100 และเชื้อ *Lactobacillus curvatus* ร้อยละ 99 และ 98 จึงทำให้ทราบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS4 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Lactobacillus sakei* และมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *Lactobacillus curvatus*

ตารางที่ 9 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต 13IS3 (ร้อยละ)
Lactococcus lactis (LA35)	100
Lactococcus lactis (CICC6023)	100
Lactococcus lactis (CICC6030)	100
Lactococcus lactis (CICC6017)	100
Lactococcus lactis (CICC6036)	100
Lactococcus lactis (CICC6018)	100
Lactococcus lactis subsp. *lactis* (CICC6024)	100
Lactococcus lactis subsp. *lactis* (CICC6021)	100
Lactococcus lactis subsp. *lactis* (CICC6016)	100
Lactococcus lactis subsp. *lactis* (CICC6022)	100

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 10 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต 13IS4 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต 13IS4 (ร้อยละ)
Lactobacillus sakei	100
Lactobacillus sakei (TISL2c)	99
Lactobacillus sakei (HNMRS2c)	99
Lactobacillus sakei subsp. *sakei* (DSM 20017)	99
Lactobacillus curvatus subsp. *Melibiosus*	99
Lactobacillus sakei (HJ9)	99
Lactobacillus curvatus subsp. *Curvatus*	99
Lactobacillus curvatus (YMRS3a)	98
Lactobacillus sakei	98
Lactobacillus curvatus (PSTJA3a)	98

3.5.4 ผลสรุปการจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต13IS3 และไอโซเลต 13IS4

เมื่อพิจารณาผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 พบว่าผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50 CH กับผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ให้ผลใกล้เคียงกันคือคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. lactis* ร้อยละ 99 และร้อยละ 100 ตามลำดับ (ตารางที่ 11) สำหรับการพิจารณาชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS4 ด้วยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ให้ผลการทดสอบที่สรุปว่าคล้ายคลึงกับเชื้อ *L. sakei* ถึงร้อยละ 100 ซึ่งต่างกับผลการทดสอบด้วยชุดทดสอบ API 50 CH ซึ่งให้ผลการทดสอบว่าเป็นเชื้อ *L. curvatus* เพียงร้อยละ 43.5 ดังนั้นสรุปว่าไอโซเลต 13IS4 เป็นเชื้อ *L. curvatus* เนื่องจากผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์น่าจะมีความถูกต้องมากกว่าผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี Kandler และ Weiss (1999) ได้กล่าวว่า *L. sakei* และ *L. curvatus* เป็นแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกันอย่างใกล้ชิดดังจะเห็นในการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *L. curvatus* และ *L. sakei* กับสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีนพบว่ามีความใกล้เคียงกันมาก (ตารางที่ 12) แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้เคยแยกได้จากผลิตภัณฑ์ผักและเนื้อหมัก และยังเป็นแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่พบในระหว่างการหมักกิมจิ ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ด้วยการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีไม่ง่ายนักเนื่องจากเชื้อทั้งสองมีความแตกต่างกันเพียงการไฮโดรไลซ์อาร์จีนีน (arginine) และผลการหมักมีไลโบโอส (melibiose) เท่านั้น และอาจมีเชื้อ *L. sakei* สายพันธุ์ที่ไม่ปกติ ซึ่งสามารถไฮโดรไลซ์ อาร์จีนีนได้ทำให้ผลการทดสอบเบี่ยงเบนไปจากมาตรฐานของผลการทดสอบคุณสมบัติชีวเคมีของ *L. sakei* ปกติที่ใช้ melibiose ได้ (Berth และ Ehrlich, 1999) ดังนั้น

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจำแนกชนิดของเชื้อทั้งสองด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16 rDNA จึงน่าจะให้ผลที่เชื่อถือได้มากกว่า

ตารางที่ 11 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต 13IS3 และ13IS4 โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การทดสอบชีวเคมี (API 50 CH) และการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

คุณสมบัติของแบคทีเรีย	ไอโซเลต	
	13IS3	13IS4
การย้อมแกรม	แกรมบวก	แกรมบวก
รูปร่าง	กลม	ท่อน
การทดสอบชีวเคมี (API 50 CH)	*Lactococcus lactis* (99%)	*Lactobacillus curvatus* (43.5%)
การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA	*Lactococcus lactis* (100%)	*Lactobacillus sakei* (100%)

จากการที่พบ *L. lactis* (13IS3) และ *L. sakei* (13IS4) ที่แยกได้จากเนื้อปลากรายมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดที่ทดสอบอาจเป็นเพราะ แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองชนิดนี้สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ดังเช่นการศึกษาของ Campos และคณะ (2006) ที่ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (Psetta maxima) ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* โดยจากการทดลองพบว่าเชื้อ *L. lactis* สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้สูงสุดในระยะคงตัว (stationary phase) นอกจากนี้พบว่าสารแบคเทอริซินที่ผลิตออกมามีความเสถียรเมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที นอกจากนี้ ในปี ค.ศ. 2000 Pongsak และ Parichat ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักท้องถิ่นที่สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินภายใต้สภาวะที่ไม่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *L. lactis* subsp. *lactis* สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อ *L. mesenteroides* TISTR 473 นอกจากนี้สารแบคเทอริโอซินที่เชื้อสร้างขึ้นได้พบว่าจะมีค่ากิจกรรมสูงสุดในระยะ stationary phase และกิจกรรมของสารแบคเทอริโอซินไม่ลดลงเมื่อผ่านความร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที ในปี ค.ศ. 2003 Noonpakdee และคณะ ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากแหนมพบว่าเชื้อ *L. lactis* WNC 20 สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซินเพื่อยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes, Clostridium perfringens, B. cereus* และ *S. aureus* โดยจากการศึกษาทางชีวเคมีพบว่าสารแบคเทอริโอซินมีความเสถียรเมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และสามารถทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพในช่วงพีเอช 2 ถึง 10 นอกจากนี้ Vinderola และ Reinheimer (2003) ทำการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 20 ชนิด พบว่าเชื้อ *L. lactis* สามารถทนต่อกรดและทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 1 ในอาหารเหลว MRS และน้ำย่อยที่มีค่าความเป็นกรดที่พีเอช 2

Vermeiren และคณะ (2004) ได้รายงานว่าเมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อ 27 ชนิด พบว่าเชื้อ *L. sakei* ที่ได้คัดเลือกสามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *L. monocytogenes, L. mesenteroides, L. carnosum* และ *Brochotrix thermosphacta* โดยพบว่าเกิดกรดอย่างรวดเร็วในระยะ lag-phase นอกจากนี้เชื้อ *L. sakei* บางไอโซเลตที่คัดเลือกได้พบว่าให้กลิ่นและรสชาติเป็นที่ยอมรับ ด้วยเหตุนี้เชื้อ *L. sakei* อาจเป็นเชื้อที่เหมาะต่อการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ในปี ค.ศ. 2003 Papamanoli และคณะ ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกจากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 147 ไอโซเลตในไส้กรอกแห้งหมักของประเทศกรีกพบเชื้อ *L. sakei* เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ในไส้กรอกและเชื้อ *L. sakei* ส่วนใหญ่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 สภาวะที่มีเกลือน้ำดี (พีเอช 5) เข้มข้นร้อยละ 0.1 ที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียสในอาหารเหลว MRS และในอาหารแข็งที่มีอะซิเตท (acetate) นอกจากนี้ *L. sakei* ยังสามารถยับยั้งการเจริญของ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้ ต่อมาในปี ค.ศ. 2005 Ammor และคณะ ได้ทำการคัดเลือกเชื้อ *L. sakei* ที่มีคุณสมบัติในการเป็นกล้าเชื้อจากทั้งหมด 30 ไอโซเลต จากไส้กรอกแห้งพื้นเมืองพบว่าเชื้อ *L. sakei* ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่พีเอชในช่วง 4.2 ถึง 9.6 บนอาหารแข็งอะซิเตทที่เติมโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 4 นอกจากนี้ทุกไอโซเลตเกิดการหมักแบบ homofermentative และเชื้อ *L. sakei* ร้อยละ 97 เกิดกิจกรรมของเอนไซม์คาตาเลส (catalase) ในขณะที่มีเพียงร้อยละ 3 ที่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. innocua* ได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงได้แยกเชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีเหมาะต่อการนำไปผลิตเป็นกล้าเชื้อโพรไบโอติกสำหรับทำผลิตภัณฑ์ปลาหมักและในการผลิตกล้าเชื้อในรูปแช่แข็งแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาคุณภาพทางจุลินทรีย์และคุณภาพทางเคมีของอาหารหมักจากสัตว์น้ำได้แก่ หอยดอง แหนมปลาและปลาส้ม ปลาจ่อมและกุ้งจ่อมทั้งหมด 40 ตัวอย่าง จากตลาดในกรุงเทพมหานคร นครปฐม ระยอง และโคราช ทำให้ทราบว่าอาหารหมักทั้งหมดที่ตรวจสอบมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดและแบคทีเรียกรดแลคติกค่อนข้างสูง และจากการวิเคราะห์หาจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคพบว่าอาหารหมักจากสัตว์น้ำผ่านมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กระทรวงอุตสาหกรรม เพียง 7 ตัวอย่าง จากหอยดอง 3 ตัวอย่าง ปลาจ่อม-กุ้งจ่อม 4 ตัวอย่าง คิดเป็น 17.5% จากตัวอย่างอาหารทั้งหมด ผลการวิเคราะห์ทางเคมีของอาหารหมักชนิด หอยดอง แหนมปลาและปลาส้ม กุ้งจ่อมและปลาจ่อม กะปี มีพีเอชอยู่ในช่วง 4.4-4.8, 4.3-5.0, 4.3-5.6 และ 6.7-7.4 ปริมาณกรด 1.26%-1.30%, 1.24%-1.73%, 1.26%-1.30% และ0.04%-0.18% ปริมาณเกลือ 0.16%-0.29%, 0.05%-0.06%, 0.06%-0.17% และ 0.78%-0.58% ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมปลากราย แหนมปลาชะโด เนื้อปลากราย และเนื้อปลาชะโดทั้งหมด 15 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 3.0×10^{5} ถึงมากกว่า 2.1×10^{9} โคโลนีต่อกรัม และได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 138 ไอโซเลต นำมาศึกษาคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051, *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 451 และ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 ด้วยเทคนิค agar spot test พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 30 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบดังกล่าวได้อย่างน้อย 1 ชนิด โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่ถูกยับยั้งมากที่สุดได้แก่เชื้อ *L. bulgaricus* และเชื้อที่ถูกยับยั้งรองลงมาได้แก่เชื้อ *P.acidilactici* ส่วนเชื้อ *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ไม่พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดสามารถยับยั้งได้ และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกคัดเลือกมาทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดี ในอาหารเหลว MRS พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อกรดแลคติกที่พีเอชต่ำสุด 2.9 แบคทีเรียจำนวน 4 ไอโซเลตทนต่อกรดไฮโดรคลอริกที่พีเอชต่ำสุด 2.20 จำนวน 10 ไอโซเลตทนต่อความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุดร้อยละ 7.5 และจำนวน 27 ไอโซเลตทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 5.25 และได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก 2 ไอโซเลตมาทำการจำแนกชนิด ซึ่งพบว่า ไอโซเลต 13IS3 คือ *Lactococcus lactis* ที่มีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อ *L. bulgaricus* ทนต่อกรดแลคติกที่พีเอช 3.20 กรดไฮโดรคลอริกพีเอช 2.20 โซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6.00 และเกลือน้ำดีเข้มข้นร้อยละ 5.25 และไอโซเลต 13IS4 คือ *Lactobacillus sakei* ซึ่งมีคุณสมบัติสามารถยับยั้งเชื้อ *P. acidilactici* และ *L. bulgaricus* ทนต่อกรดแลคติกที่พีเอช 2.90 กรดไฮโดรคลอริกพีเอช 2.20 โซเดียมคลอไรด์เข้มข้นร้อยละ 6.00 และเกลือน้ำดีเข้มข้นร้อยละ 5.25

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการทดลองนี้ทำให้ทราบถึงเชื้อที่มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ดีซึ่งได้แก่เชื้อ *L. lactis* และ *L. sakei* วัน แต่อย่างไรก็ตามความสามารถในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบของเชื้อ *L. lactis* และเชื้อ *L. sakei* ยังไม่ทราบแน่ชัดว่าเกิดจากการสร้างสารชนิดใด ดังนั้นหากได้ทำการค้นคว้าวิจัยเพิ่มเติมว่าเกิดจากสารชนิดใด สภาวะใดเหมาะต่อการผลิตสารยับยั้ง อาจช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคของเชื้อทั้งสองดียิ่งขึ้น และนำเชื้อทั้งสองชนิดนี้มาผลิตเป็นกล้าเชื้อผงสำเร็จรูปสำหรับการหมักปลา และทดลองหมักในขั้นต่อไปเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อที่แท้จริงรวมทั้งศึกษาถึงคุณลักษณะของผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่ได้เช่น กลิ่น สี รสชาติที่เกิดขึ้น อาจทำให้เกิดการพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาหมักให้มีจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ ปราศจากจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค อีกทั้งมีรสชาติเป็นที่น่าพอใจเพิ่มมากขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นภา โล่ห์ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2545. ผลิตภัณฑ์ประมงไทย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

อดิศร เศวตวิวัฒน์. 2542. วิธีการเบื้องต้นในการตรวจสอบเชื้อในกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้ง(แบคเทอริโอซิน). สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M. and Chaillou, S. 2005. Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures. Food Microbiology. 22 : 529-538.

Association of Official Analytical Chemists. 2000. Official Method of Analysis. Washington D.C.: George Banta.

Berthier, F. and Ehrlich, S. D. 1999. Genetic diversity within *Lactobacillus sakei* and design of PCR primers for its detection using randomly amplified polymorphic DNA. International Journal of Systematic Bacteriology. 49 : 997-1007.

Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J. W., Verreth, J. and Rombouts, F. M., 2006. Presence of lactobacilli in the intestinal content of freshwater fish from a river and from a farm with a recirculation system. Food Microbiology. 23: 476-482.

Budde, B. B., Hornæk, T., Jacobsen, T., Barkholt, V. and Koch, A. G. 2003. *Leuconostoc carnosum* 4010 has the potential for use as a protective culture for vacuum-packed meats: culture isolation bacteriocin identification, and meat application experiments. International Journal of Food Microbiology. 83 : 171-184.

Buckenhuskes, H. K. 1993. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starter cultures for various food commodities. FEMS Microbiology Review. 12 : 71-253.

Campos, C. A., Rodríguez, O., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barros-Velázquez, J. 2006. Preliminary characterization of bacteriocin from *Lactococcus lactis, Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strain isolated from turbot (*Psetta maxima*).Food Research International. 39 : 356-364.

Cook, G. M. and Russel, J. B. 1994. The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*. Current Microbiology. 28:165-168.

Conway, P. L., Gorbach, S. L. and Goldin, B. R. 1987. Survival of lactic acid bacteria in the human stomach and adhesion to intestinal cells. Journal of Dairy Science. 70 : 1-12.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cowley, G., 1988. The Microbe that ate *Salmonella.* Newsweek. August 22. pp. 56.

Daeschel, M. A. 1989. Antibacterial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. Food Technology. 43 : 7-164.

Dakin, J. C. and Day, P. M. 1958. Yeasts causing spoilage in acetic acid preserves. Journal of Applied Bacteriology. 21 : 94-98.

De Vuyst, L. and Vandermme, E. J. 1994. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In: De Vuyst. L. and Vandarmme E. J. (eds.) Bacteriocin of lactic acid bacteria. Blackie Academic and Professional. New York.

Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. Meat Science. 55: 297-300

Fleming, H. P., Mcfeeters, R. F. and Daesohel, M. A. 1985. The Lactobacilli, Pediococcus and Leuconostocs: vegetable products. In: Gilland, S. E. (ed.). Bacterial Starter Cultures for Foods. CRC press Inc. Boca Raton, Florida.

Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. Journal of Applied Bacteriology. 66: 365-378.

Ghalf, H., Allaoui, A., Destain, J., Benkerroum, N. and Thonart, P. 2006. Bacteriocin Activity by *Lactobacillus curvatus* CWBI-B28 to inactivate *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon during 4 °C Storage. Journal of Food Protection. 5 : 1066-1071.

Gilland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Antagonistic action of *Lactobacillus acidophilus* toward intestinal and food-borne pathogenic in associative cultures. Journal of Food Protection. 40: 820-823.

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B. and Suarez, J. E. 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C a bacteriocin produced by a *Lactiobacillus plantarum* strain of dairy origin. Applied and Evironmental Microbiology. 60 : 63-2158.

Gram, L., Oundo, J. and Bon, J. 1989. Storage life of Nile perch (*Lates niloticus*) dependent on storage temperature and initial bacterial load. Tropical Science. 29 : 221-236.

Gram, L. and Huss, H. H. 1996. Microbiological spoilage of fish and fish products. International Journal of Food Microbiology. 33 : 121-137.

Holzapfel, W. H., U. Schillinger, R. Geisen, and F. –K. Lücke. 2003. Starter and protective cultures, pp. 291-320. *In* N. J. Russell and G. W. Gould, eds., Food Preservatives, 2nd ed., Kluwer Academic/ Plenum Publishers, New York.

Huss, H. H., and R. Petersen. 1980. The stability of *Cl. botulinum* type E toxin in salty and/or acid environment. Food Technology. 15: 619-627.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kandler, O. and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. In: Sneath Mair, P. H. A., Sharpe, N. S. Holt, J. G. (eds.). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wikins. Baltimore.

Kashket, E. R. 1987. Bioenergetic of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. FEMS Microbiology Review. 46 : 233-244.

Lyhs, U., Koort, J. M. K., Lundström, H-S. and Björkroth, K. J. 2004. *Leuconostoc gelidum* and *Leuconostoc gasicomitatum* strains dominated the lactic acid bacterium population associated with strong slime formation in an acetic-acid herring preserve.International Journal of Food Microbiology. 90 : 207-218.

Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R. and Saarela, M. 2002. Technological challenges for future probiotic foods. International Dairy Journal. 12: 173-182.

Noonpakdee, W., Santivarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K. and Panyim, S. 2003. Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. International Journal of Food Microbiology. 81: 137-145.

Paludan-Müller, C., Madsen, M., Sophanodora, P., Gram, L. and Møller, P. L. 2002. Fermentation and microflora of plaa-som, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations. International Journal of Food Microbiology. 73 : 61-70.

Panoff, Jean-Michel., Thammavongs, B., Guéguen, M. and Boutibonnes, P. 1998. Cold stress responses in mesophilic bacteria. Cryobiology. 36 : 75-83.

Pongsak, R. and Parichat, P. 2000. A bacteriocin produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* isolated from Thai fermented foods. ScienceAsia. 26 : 195-200.

Poolman, B. and Driessen, A. J. et al. 1987. Regulation of arginine-ornithine exchange and the arginine deiminase pathway in *Streptococcus lactis*. Journal of Bacteriology. 169 (12): 604-5597.

Papamanoli, E., Tzanetakis, N. Litopoulou-Tzanetaki. E. and Kotzekidou, P. 2003. Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. Meat Science. 65 : 859-867.

Ringø, E. and Gatesoupe, F-J. 1998. Lactic acid bacteria in fish: a review. Aquaculture. 160: 177-203.

Robinson, R. K., Batt, C. A. and Patel, P. H. 2002. Encyclopedia of Food Microbiology. Academic Press. San Diego. 3 : 1570-1591.

Saarela, M., Mogensen, G., Fondén, R., Mätto, J. and Mattila-Sandholm, T. 2000. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. Journal of Biotechnology. 84 : 197-215.

เอกสารนี้สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Sander, J. W., Venema, G. et al. 1999. Environmental stress responses in *Lactococcus lactis*. FEMS Microbial Review. 23 : 483-501.

Sobrino, O. J., Rodriguez, J. M., Moreira, W. L., Fernandez, M. F., Sanz, B. and Hernandez, P. E. 1991. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from dry fermented sausages. International Journal of Food Microbiology. 13 : 1-10.

Thapa, N., Pal, J. and Tamang, J. P. 2006. Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of Eastern Himalayas. International Journal of Food Microbiology. 107: 33-38.

Tichaczek, P. S., Pohle, S. B., Vogel, R. F. and Hammes, W. P. 1995. Dry sausages fermented with bacteriocin producers. Trend in Food Science & Technology. 6 (9) : 317.

Tuomola, E., Crittenden, R., Playne, M., Isolauri, E. and Salminen, S. 2001. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. American Journal of Clinical Nutrition. 73 : 393-398.

Yousef, A. E. and Courtney, P.D. 2003. Basics of stress adaptation and limplication in new-generation food. In: Yousef, A. E. and Juneja, V. K. (eds.). Microbial Stress Adaptation and Food Safety. CRC Press. Boca Raton, Florida.

Vandenbergh, P. A. 1993. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbial Review. 12 : 37-221.

Vermeiren, L., Devlieghere, F. and Debevere, J. 2004. Evaluation of meat born lactic acid bacteria as protective cultures for the biopreservation of cooked meat products. International Journal of Food Microbiology. 96: 149-164.

Vinderola, C. G. and Reinheimer, J. A. 2003. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative in vitro study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. Food Resarch International. 36 : 895-504.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้