การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาสดเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

Screening of Lactic Acid Bacteria from Raw Fish to be Used as Starter Culture in Fermented Fish Products

นางสาวกรรณิการ์ พรรณการ

นางสาวนพยงค์ วันวงษ์

นางสาวนันทรัตน์ มั่นคง

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Screening of Lactic Acid Bacteria from Raw Fish to be Used as Starter Culture in Fermented Fish Products

Kannika Phannakan

Noppayong Wanwong

Nuntarat Mankong

A SPECIAL PROJECT SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT

OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF BACHELOR OF SCIENCE

IN INDUSTRIAL MICROBIOLOGY

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ACADEMIC YEAR 2008

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาสดเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก Screening of Lactic Acid Bacteria from Raw Fish to be Used as Starter Culture in Fermented Fish Products
ชื่อนักศึกษา	นางสาวกรรณิการ์ พรรณการ นาวสาวนพยงค์ วันวงษ์ นางสาวนันทรัตน์ มั่นคง
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม ประจำปีการศึกษา 2551

คณะกรรมการสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์	
กรรมการ รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ	
กรรมการ รศ. อารี ฤทธิบูรณ์	

.....

(ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม)

ลิขสิทธิ์ของคณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาสดเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก
ชื่อนักศึกษา	กรรณิการ์ พรรณการ รหัสนักศึกษา 48050528
	นพยงค์ วันวงษ์ รหัสนักศึกษา 48050546
	นันทรัตน์ มั่นคง รหัสนักศึกษา 48050548
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชา	จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม
ปีการศึกษา	2551
อาจารย์ที่ปรึกษา	รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ

บทคัดย่อ

การศึกษานี้ได้ทำการวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีและจุลินทรีย์ของปลาสดจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิล ปลาตะเพียน ปลาหมอ และปลาทับทิม โดยศึกษาเฉพาะส่วนเหงือกปลา ท้องปลา และเนื้อปลา สายพันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง และแหนมปลาจำนวน 21 ตัวอย่าง พบว่าบริเวณท้องปลามีค่าพีเอชต่ำสุดคือ 6.21 ส่วนแหนมปลามีค่าพีเอชเฉลี่ย 5.2 และค่า a_w เฉลี่ย 0.975 และปริมาณไนไตรต์ตกค้างที่อยู่ในเกณฑ์ยอมรับได้ (น้อยกว่า 125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ยกเว้นแหนมที่ผลิตเองเพียง 2 ตัวอย่างที่มีปริมาณไนไตรต์ตกค้างเกินมาตรฐาน (126.66 และ 155.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างปลาทั้งหมดที่วิเคราะห์คืออยู่ในช่วง $1.2x10^3$-$2.2x10^6$ CFUต่อกรัม และทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี agar spot test พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด มีจำนวนทั้งหมด 37 ไอโซเลต จึงได้คัดเลือกไปทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทส ไนไตรต์รีดักเทสและอะมิโนเอซิดดีคาร์บอกซิเลส พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก 5 ไอโซเลตสร้างไนเตรตรีดักเทสได้ มีเพียง 1 ไอโซเลตที่สร้างเอนไซม์อะมิโนเอซิด-ดีคาร์บอกซิเลส และไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสและไนไตรต์รีดักเทสได้ ดังนั้นจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ปลาหมักได้จำนวน 5 ไอโซเลต ได้แก่ AMF19, BGT110, BMT31, RSS25 และ RST24 นำมาทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดี และเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BGT110 มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดเนื่องจากสามารถทนกรดแลคติกได้ที่ระดับพีเอชต่ำถึง 2.0 ทนกรดไฮโดรคลอริกที่ระดับพีเอชต่ำสุดคือพีเอช 1.5 สามารถทนความเข้มข้นของเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 3.0 และทนความเข้มข้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่ความเข้มข้นร้อยละ 12.0 เมื่อนำมาจำแนกชนิดโดยทำการศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Title	Screening of Lactic Acid Bacteria from Raw Fish to be Used as Starter Culture in Fermented Fish Products
Student	Kannika Phannakan Student ID. 48050528
	Noppayong Wanwong Student ID. 48050546
	Nuntarat Mankong Student ID. 48050548
Degree	Bachelor of Science
Major	Industrial Microbiology
Academic Year	2008
Advisor	Assoc. Prof. Dr. Suree Nanasombat

ABTRACT

In this study, chemical and microbiological qualities of four raw fish species, *Oreochromis niloticus*, *Barbodes gonionotus*, *Anabas testudineus* and ruby fish (ten samples each of fish gill, stomach and meat) and twenty-one samples of nham-plaa were determined. Among all parts, pH value of fish stomach was the lowest (2.1). Average pH and water activity of nham-plaa were 5.2 and 0.975, respectively. Residual nitrite contents of almost all samples tested were in acceptable range (125 mg/kg sodium nitrite), except for two samples of our products which contained high residual nitrite (126.66 and 155.10 mg/kg sodium nitrite). Total lactic acid bacteria in all fish samples tested were in the range of $1.2x10^3$ - $2.2x10^6$ cfu/g. Antimicrobial substance-producing lactic acid bacteria were screened by agar spot test. Thirty-seven isolates were found to inhibit growth of at least one indicator strain. They were determined for production of catalase, nitrate reductase, nitrite reductase and amino acid decarboxylase. Five isolates showed nitrate reductase activity. Only one isolate could produce amino acid decarboxylase. None of all isolates was able to produce catalase and nitrite reductase. Therefore, isolates of lactic acid bacteria such as isolates AMF19, BGT110, BMT31, RSS25 and RST24 showing suitable properties to be starter cultures in fermented fish products were selected to examine their tolerance to lactic acid, HCl, bile salts and NaCl. The isolates BGT110 was found to be the most suitable strain as this isolate was highly resistant to lactic acid (pH 2.0) and HCl (pH 1.5), and also showed ability to tolerate the highest concentration of bile salt (3.0 %) and NaCl (12.0 %) tested. This isolate was

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

studied for their morphological and biochemical characteristics, and found to be *Lactobacillus plantarum*.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ผู้ควบคุม รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ให้ความรู้ ข้อคิดเห็นในด้านต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ตลอดจนความช่วยเหลือ คำชี้แนะและแก้ไขให้เสร็จสิ้นสมบูรณ์ ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ และ ผศ.อารี ฤทธิบูรณ์ ซึ่งเป็นกรรมการสอบหัวข้อโครงงานพิเศษที่ให้คำชี้แนะในการแก้ไขให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ช่วยอำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์และสารเคมี ขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องธุรการภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ช่วยอำนวยความสะดวกและประสานงาน

ขอบคุณเพื่อน พี่ และน้องในภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจและที่สำคัญขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวพรรณการ ครอบครัววันวงษ์ และครอบครัวมั่นคง ที่คอยให้กำลังใจและสนับสนุนในด้านกำลังทรัพย์

สำหรับคุณค่าและประโยชน์ที่เกิดจากรายงานฉบับนี้ ผู้จัดทำขอมอบให้แด่ คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ที่เคารพทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ และถ่ายทอดประสบการณ์ตลอดจนผู้มีพระคุณทุกท่าน

กรรณิการ์ พรรณการ
นพยงค์ วันวงษ์
นันทรัตน์ มั่นคง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ค
กิตติกรรมประกาศ.....จ
สารบัญ.....ฉ
สารบัญตาราง.....ญ
สารบัญรูปภาพ.....ฎ
บทที่ 1 บทนำ
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....3
1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน.....3
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก.....4
2.1.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก.....4
2.1.2 แบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารของปลา.....9
2.2 กระบวนการหมักที่เกิดจากกรดแลคติก.....21
2.2.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ.....21
2.2.2 การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ.....22
2.3 กล้าแบคทีเรียกรดแลคติก.....24
2.3.1 คุณสมบัติที่ดีของกล้าแบคทีเรียกรดแลคติก.....24
2.3.2 ประโยชน์ของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก.....26
2.4 คุณสมบัติที่ดีของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก.....26
2.4.1 การมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก.....26
2.4.2 การไม่ก่อให้เกิดไบโอเจนิกเอมีน.....30
2.4.3 การสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสและไนเตรตรีดักเทส.....31
2.4.4 การสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ.....32
2.4.4.1 กรดอินทรีย์.....32
2.4.4.2 รูทีริน.....32

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

2.4.4.3 แบคเทอริโอซิน.....32
2.4.4.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....33
2.2.4.5 ไดอะซิล.....34
2.2.4.6 คาร์บอนไดออกไซด์.....34
2.5 ลักษณะทั่วไปของปลาน้ำจืด.....35
2.5.1 โครงสร้างและลักษณะภายนอกของปลา.....36
2.5.1.1 โครงสร้างของปลา.....36
2.5.1.2 ลักษณะภายนอกของปลา.....37
2.6 สายพันธุ์ปลาน้ำจืดที่ใช้ในงานวิจัย.....38
2.6.1 ปลาตะเพียน.....38
2.6.2 ปลานิล.....39
2.6.3 ปลาทับทิม.....39
2.6.4 ปลาหมอ.....39
2.7 การเน่าเสียของปลา.....40
2.8 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....41
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง
3.1 อุปกรณ์.....44
3.1.1 ตัวอย่างปลาสด.....44
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์.....44
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ.....44
3.1.4 สารเคมี.....44
3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์.....45
3.2 วิธีการทดลอง.....
3.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของปลาสดและแหนมปลา.....45
3.2.1.1 การวัดค่าพีเอช (pH) 45
3.2.1.2 การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w) 45
3.2.1.3 การหาปริมาณโซเดียมไนไตรต์ในแหนมปลาที่สุ่มจาก.....45
ตลาดและแหนมปลาที่ผลิตเอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2.2 การวิเคราะห์จำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในปลาสด.....47
3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์.....48
3.2.4 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....50
ที่คัดเลือก
3.2.4.1 การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส.....50
3.2.4.2 การทดสอบเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส.....50
3.2.4.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ในไตรต์รีดักเทส.....50
3.2.4.4 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก.....50
เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ของ
แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก
3.2.4.5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลส.....51
3.2.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก.....51
3.2.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก.....51
3.2.5.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นสำหรับ.....52
การจำแนกชนิดในระดับจีนัส
3.2.5.3 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH 53
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์
4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของปลาสดและแหนมปลา.....55
4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก.....56
ที่มีคุณสมบัติ เหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก
4.2.1 การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในปลาสดและ.....56
แหนมปลาและการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้ง
จุลินทรีย์ชนิดอื่น
4.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก.....61
4.2.3 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดี.....62
และเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก
4.2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก.....64
ปลาสายพันธุ์ต่างๆ และแหนมปลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....64
4.2.4.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส.....65
4.2.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสปีชีส์.....68
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....71
เอกสารอ้างอิง.....73
ภาคผนวก ก สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายทำเจือจาง.....78
ภาคผนวก ข คำนวณ.....81
ภาคผนวก ค ตารางผลการทดลอง.....83
ภาคผนวก ง รูปผลการทดลอง.....97
ภาคผนวก จ วิธีการใช้เครื่องมือ.....99

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

2.1 คุณสมบัติต่างๆของแบคทีเรียกรดแลคติก.....5
2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสัตว์น้ำ.....12
2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลารมควันและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก.....22
4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของปลาสดและแหนมปลา และการคัดเลือก.....59
แบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น
4.2 การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์.....62
ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์
4.3 คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จาก.....64
ปลาสายพันธุ์ต่างๆ
4.4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดและแหนมปลา.....65
4.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BGT110 ในระดับสปีชีส์โดย.....70
ใช้ชุดทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH)
ค.1 ปริมาณไนไตรต์ที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างแหนมปลา.....83
ค.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้.....84

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

2.1 การหมักคาร์โบไฮเดรตแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟและเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ.....25
ของแบคทีเรียกรดแลคติก
2.2 คุณสมบัติของโพรไบโอติก.....29
2.3 โครงสร้างทางเคมีของ BA บางชนิด.....31
2.4 โครงสร้างของปลา.....37
4.1 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต AMF19.....66
4.2 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BGT110.....66
4.3 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BMT31.....67
4.4 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต RSS25.....67
4.5 การติดสีย้อมแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต RST24.....68
4.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BGT110 ในระดับสปีชีส์.....69
โดยใช้ชุดการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50CH)
ง.1 โคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างโซนใสบนอาหาร MRS Agar.....97
ง.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร BSM.....97
ง.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส.....99
ง.4 การทดสอบการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสของแบคทีเรีย.....99
กรดแลคติกที่คัดเลือก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

การผลิตอาหารหมัก เป็นการแปรรูปอาหารซึ่งอาศัยกิจกรรมของจุลินทรีย์ตามธรรมชาติ โดยจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ และรา แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญมากที่สุด คือ แบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งการผลิตอาหารหมักที่ปฏิบัติมาแต่เดิมนั้นผลิตภัณฑ์ที่ได้มักมีคุณภาพไม่แน่นอน และไม่สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมัก หรือขยายกำลังการผลิตให้สูงขึ้นจากที่เป็นอยู่ได้ อีกทั้งยังเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อโรค ดังนั้นในการผลิตอาหารหมักในอุตสาหกรรมจึงได้มีการพัฒนามาใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก เพื่อให้อาหารหมักมีคุณภาพตามที่ต้องการ และช่วยลดระยะเวลาในการหมัก

แบคทีเรียกรดแลคติกจัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae สามารถย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลมและรูปท่อน มีการจัดเรียงตัวแบบคู่ คู่สี่ และโซ่ยาว เป็นต้น ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรตจะได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลโดยจะได้จากกระบวนการ substrate-level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน (fastidious microorganism) แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน ไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนน้อย อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 °C ช่วงพีเอชที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง

แบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาผลิตกล้าเชื้อต้องเป็นกล้าเชื้อที่บริสุทธิ์ไม่เป็นพิษและไม่ทำให้เกิดโรค หรือปนเปื้อนสารเคมีที่อาจทำให้เกิดอันตรายต่อสุขภาพ กล้าเชื้อที่ดีต้องมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ซึ่งก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ ลดคลอเลสเตอรอล ลดอาการท้องอืด ช่วยปรับปรุงการทำงานของระบบลำไส้ เสริมสร้างระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และลดความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งลำไส้ (Berner และคณะ, 2003) และต้องสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ รวมถึงกลุ่ม จุลินทรีย์ที่ก่อโรคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เช่น เกิดกรดอินทรีย์ คือ กรดแลคติกและกรดอะซิติก ทำให้พีเอชของอาหารลดลง ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ไดอะซิติล (Diacetyl) ซึ่งเป็นสารระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะตัว มีผลต่อลักษณะเฉพาะของอาหาร สารที่สำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งสารนี้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้อย่างจำเพาะ (อรอนงค์, 2550) นอกจากนั้นยังต้องสามารถสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสและไนเตรตรีดักเทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซึ่งช่วยให้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักมีสีสันน่ารับประทาน มีรสชาติและกลิ่นเฉพาะ สามารถเป็นสารกันเสียทำให้อาหารเก็บไว้ได้นาน และกล้าเชื้อที่ดีต้องไม่สร้างอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส (amino decar-boxylase) โดยเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดไบโอเจนิกเอมีน (biogenic amine) ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค ทำให้การทำงานของระบบประสาท กระเพาะอาหาร และความดันเลือดมีความผิดปกติ (Mohamed และคณะ, 2009)

แบคทีเรียกรดแลคติกยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในอวัยวะ เนื้อเยื่อต่างๆช่องปาก และระบบทางเดินอาหารของปลา ดังนั้นจึงมีผู้ทำการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกในส่วนต่างๆของปลา เช่น กระเพาะอาหาร (stomach) ลำไส้ (intestine) ขี้ปลา (feces) เหงือก (gill) หนังปลา (skin mucus) โดยแบคทีเรียที่พบส่วนใหญ่เป็น *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides, Carnobacterium piscola* (Einar และFrancois, 1997)

ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากส่วนต่างๆ ของปลานิล ปลาหมอ ปลาตะเพียน และปลาทับทิม เพื่อนำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ เช่น สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทนต่อกรด เกลือ และน้ำดีได้สูง สร้างเอนไซม์ไนเตรต-รีดักเทส ไนไตรต์รีดักเทส คะตะเลส ไม่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส เป็นพวกโฮโมเฟอร์เมนเททีฟจากนั้นนำเชื้อที่คัดเลือกมาจำแนกชนิด โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี ทำให้ทราบชื่อจีนัสและสปีชีส์ของแบคทีเรียที่คัดเลือก สำหรับนำมาใช้เพื่อพัฒนาเป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์ปลาหมัก โดยจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก นอกจากนี้ยังทำให้เกิดกลิ่น รส และลักษณะเนื้อสัมผัสดี และมีความปลอดภัยต่อผู้บริโภค

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาสดที่จำหน่ายในกรุงเทพมหานคร

1.2.2 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้ง ทดสอบคุณสมบัติต่างๆ และจำแนกชนิดของที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

ศึกษาคุณภาพและองค์ประกอบของปลาสดและปลาหมัก ได้แก่ พีเอช ปริมาณน้ำอิสระ ปริมาณไนไตรต์ตกค้าง จากนั้นนำมาทำการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาสด เพื่อนำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี ให้ได้แบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่เหมาะสมในการทำกล้าเชื้อของผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ได้เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการทำกล้าเชื้อ เช่น การทนกรดเกลือน้ำดี เป็นโพรไบโอติก สร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ

1.4.2 ได้ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีคุณภาพดีและปลอดภัยต่อผู้บริโภค

1.5 ขั้นตอนในการดำเนินงาน

1. การศึกษาคุณภาพทางเคมีของปลาสดและปลาหมัก

สุ่มตัวอย่างปลาสด 4 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง โดยนำส่วนต่างๆ ของปลา คือ เหงือกปลา ท้องปลา และเนื้อปลา มาวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด และวัดพีเอช

2. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสด

2.1 นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งด้วยวิธี agar spot test

2.2 คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งด้วยวิธี agar spot test จำนวนอย่างน้อย 150 ไอโซเลต และทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ ดังนี้

- ทดสอบการทนกรดเกลือน้ำดี เพื่อศึกษาคุณสมบัติความเป็นโพรไบโอติก
- ทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสและไนไตรต์รีดักเทส
- ทดสอบการผลิตแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส
- ทดสอบการสร้างคะตะเลสและอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส

2.3 จำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา และคุณสมบัติทางชีวเคมี

2.3.1 การศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา นำเชื้อที่แยกได้มาย้อมแกรม ส่องดูรูปร่าง และการเรียงตัว

2.3.2 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อการจำแนกชนิดระดับจีนัส และศึกษาคุณสมบัติการหมักสารคาร์โบไฮเดรต โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH (บริษัท Biomerieux) เพื่อใช้ในการจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

Lactic acid bacteria (LAB) เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเผาผลาญสารอาหาร (metabolic) และลักษณะทางสรีระวิทยาคล้ายคลึงกัน โดยทั่วไปลักษณะของแบคทีเรียแกรมบวกจะไม่สร้างสปอร์ รูปร่างกลมหรือท่อน ผลิตกรดแลคติก (lactic acid) เป็นผลผลิตหลักจากกระบวนการหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมัก รวมทั้งยังมีความเกี่ยวข้องกับผิวหน้าเยื่อบุเมือกของคนและสัตว์ การแบ่งแบคทีเรียออกเป็นสกุลต่างๆจะอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology) กระบวนการหมักกลูโคส อุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญ องค์ประกอบของกรดแลคติกที่ผลิตขึ้น ความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นเกลือสูง การทนกรดหรือด่าง นอกจากนั้นยังอาศัยการแบ่งโดยใช้ลักษณะทางเคมี (chemotaxonomy) ซึ่งได้แก่องค์ประกอบของกรดไขมัน และองค์ประกอบของผนังเซลล์อีกด้วย (Axelsson, 2004)

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ต้องการอากาศในการเจริญเล็กน้อย (microaerophilic) มีเปอร์เซนต์โมล G+C ในดีเอ็นเอน้อยกว่า 50 เปอร์เซนต์ โดยทั่วไปไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส หมักกลูโคสให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ หรือกรดแลคติก คาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล และ/หรือกรดอะซิติก แบคทีเรียกรดแลคติกอาจมีรูปร่างกลม หรือรูปท่อน แบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะสกุล *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* มักนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter culture) ในอาหารหมักและเครื่องดื่ม เนื่องจากจะทำให้อาหารเกิดกลิ่นรสที่ดี และทำให้อาหารเสื่อมเสียช้าลง กระบวนการหมักด้วยวิธีนี้เป็นเทคนิคที่เก่าแก่ที่สุดสำหรับการถนอมอาหาร (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.1.1 อนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติก (Taxonomy of Lactic Acid Bacteria)

ในการจัดจำแนกระดับสปีชีส์ (species) ทำได้โดยการตรวจสอบโมเลกุลใหญ่ต่างๆ ภายในเซลล์เพื่อนำมาวิเคราะห์ลักษณะของกรดนิวคลีอิก การหมักน้ำตาล การสลายอาร์จินีน การสร้าง acetoin (Voges-Proskauer test) การทนต่อน้ำดี การสลายเม็ดเลือดแดง การสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) ลักษณะการเจริญในน้ำนม เป็นต้น นอกจากนี้อาศัยลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะทางเคมีร่วมด้วย เช่น ส่วนประกอบของผนังเซลล์ อัตราส่วนของเบสในดีเอ็นเอ องค์ประกอบของกรดไขมัน และการเคลื่อนที่ผ่านสนามไฟฟ้าของเอนไซม์แลคเตสดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) (Axelsson, 2004) ลักษณะสำคัญของแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติก

คุณสมบัติ	รูปร่างท่อน		รูปร่างกลม							
	Carnobacterium	*Lactobacillus*	*Aerococcus*	*Enterococcus*	*Lactococcus* *Vagococcus*	*Leuconostoc* *Oenococcus*	*Pediococcus*	*Streptocoocus*	*Tetragenococcus*	*Weissella* [a]
รูปร่างสี่เซลล์	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
ผลิต CO_2 จากกลูโคส[b]	-	+/-	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่อุณหภูมิ 10 °C	+	+/-	+	+	+	+	+/-	-	+	+
เจริญที่อุณหภูมิ 40 °C	-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	-
เจริญในเกลือ 6.5 %	ND	+/-	+	+	-	+/-	+/-	-	+	+/-
เจริญในเกลือ 18 %	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่พีเอช 4.4	ND	+/-	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+/-
เจริญที่พีเอช 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-
ชนิดของกรดแลคติก[c]	L	D, L, DL[f]	L	L	L	D	L, DL[f]	L	L	D, DL[f]

<u>หมายเหตุ</u>
+ ผลการทดสอบเป็นบวก
- ผลการทดสอบเป็นลบ
+/- แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์
ND ไม่มีข้อมูล

[a] *Weissella* บางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน
[b] - homofermentative, + heterofermentative
[c] อาจผลิต CO_2 ปริมาณเล็กน้อยขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ
[d] ไม่มีการระบุถึงการเจริญในอาหารที่มี NaCl 8%
[e] ชนิดของกรดแลคติกจากการหมักกลูโคส
[f] ชนิดของกรดแลคติกแตกต่างกันตามสปีชีส์

ที่มา : Axelsson (2004)

ในปัจจุบันพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถจำแนกได้ถึง 12 สกุล คือ *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Weissella*, *Sterptococcus*, *Tetragenococcus* และ *Vagococcus* (Stiles และ Holzapfel, 1997)

1. สกุล *Lactobacillus*

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียแกรมบวก จัดเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด เซลล์มีรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ เปอร์เซนต์โมล G+C ในดีเอ็นเอเท่ากับ 33-35 เปอร์เซนต์ ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน เจริญได้ในแหล่งต่างๆไม่ว่าจะเป็น ช่องคลอด ลำไส้สัตว์เลือดอุ่น พืช ดิน น้ำ อาหารหมัก นม เนื้อ ผัก ธัญพืช ชอบสภาพกรด สามารถทำให้อาหารที่มีคาร์บอนเป็นองค์ประกอบมีพีเอชลดลงเหลือประมาณ 4.0 ซึ่งผลก็คือจะไปยับยั้งการเจริญหรือทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่น มักถูกนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter culture) สำหรับผลิตเนยแข็ง ผักดอง เนื้อสัตว์หมัก ไวน์ เบียร์ (Stiles และ Holzapfel, 1997) ในการเจริญพบว่ามีความต้องการองค์ประกอบของกรดอะมิโน เปปไทด์ อนุพันธ์ของกรดนิวคลีอิก วิตามิน เกลือแร่ กรดไขมัน และแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สมบูรณ์ สามารถเจริญได้สูงในสภาวะไร้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5-10 เปอร์เซนต์ เจริญในช่วงอุณหภูมิ 5-53 องศาเซลเซียส และเหมาะสมที่ 30-40 องศาเซลเซียส (Stiles และ Holzapfel, 1997) การแบ่งกลุ่มของ *Lactobacillus* จะอาศัยคุณสมบัติการหมัก โดยจะแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

- กลุ่ม Obligately homofermentative Lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสหรือน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (มากกว่า 85 เปอร์เซนต์) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden-Meyerhof-parnas (EMP) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ Fructose-1,6-bisphosphatealdolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase ดังนั้นจึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทส (น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม) และกลูโคเนตได้

- กลุ่ม Facultative heterofermentative Lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกโดยวิถี EMP สามารถผลิตเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase ดังนั้นจึงสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส (โดยทั่วไปจะเป็นกลูโคเนต)

- กลุ่ม Obligately heterofermentative Lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส ผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนตเป็นแลคเตท เอทานอล กรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ ปัจจุบันสามารถแบ่งชนิดของสกุล Lactobacilli ได้โดยการอาศัยการแบ่งกลุ่มโดยการพิจารณาจากคุณสมบัติในการหมัก

2. สกุล *Lactococcus*

Lactococcus เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรี ไม่เคลื่อนที่ ผลิตกรดแลคติกเป็นผลผลิตหลักจากการหมักกลูโคส (homofermentative) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีการนำ *Lactococcus* มาใช้อย่างกว้างขวาง โดยนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter culture) ในระดับอุตสาหกรรม (Stiles และ Holzapfel, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactococcus ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus garviae, Lactococcus lactis, Lactococcus plantarum, Lactococcus raffinolactis* และ *Lactococcus pisdium* ซึ่งสามารถแยกได้โดยวัดความสามารถที่จะเจริญในอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส และที่ความเข้มข้นเกลือสูงกว่า 4 เปอร์เซนต์ นอกจากนี้ทั้ง 5 สายพันธุ์ยังมีความสามารถที่ต่างกันออกไปในด้านการสร้างกรดจากน้ำตาลรวมไปถึงแลคโตส แมนนิทอล และราฟฟีโนส การตรวจสอบอย่างละเอียดเพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ *Lactococcus* (Salminen และคณะ, 1993)

3. สกุล *Streptococcus*

Streptococcus เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลแรกที่มีการศึกษาโดยนักชีววิทยา เนื่องจากเป็นกลุ่มของแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรี โดยมีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายโซ่โดยการเกิดเป็นสายโซ่ ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน เจริญได้ดีในแหล่งคาร์โบไฮเดรตและโปรตีน รวมทั้งเนื้อเยื่อและลำไส้สัตว์ นม ผลิตภัณฑ์นม ผัก และอาหารอื่นๆ (Jones, 1997) ผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส (homofermentative) บางสายพันธุ์อาจมีการสร้างแคปซูล (capsule) เจริญที่อุณหภูมิ 25-45 องศาเซลเซียส และเหมาะสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Salminen และคณะ, 1993)

4. สกุล *Enterococcus*

Enterococcus เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม เซลล์อาจอยู่เป็นคู่ๆ หรือต่อกันเป็นสายโซ่สั้น ไม่มีเอนโดสปอร์ ลักษณะของเชื้อในสกุลนี้ถูกบรรยายโดย Sherman ในปี 1937 ว่าเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีได้ สามารถทนเกลือได้ถึงร้อยละ 6.5 หรือมากกว่า เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอช 9.6 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เปอร์เซนต์โมล G+C ในดีเอ็นเอเท่ากับ 37-40 เปอร์เซ็นต์ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) และได้พลังงานจากการย่อยสลายกรดอะมิโน (Stiles และ Holzapfel, 1997) แบคทีเรียกรดแลคติกพวก Enterococci จัดเป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคทางด้านอาหาร ส่วนใหญ่จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ในด้านความปลอดภัยของอาหาร นอกจากนี้ยังถูกใช้เป็นโพรไบโอติก (Probiotic) สำหรับป้องกันและช่วยบำบัดอาการที่ผิดปกติภายในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์โดยเฉพาะเชื้อ *Enterococcus faecium* ถูกนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับกระบวนการหมักเพื่อผลิตเนยแข็งในหลายๆประเทศทางตอนใต้ของทวีปยุโรป ไม่นิยมใช้ในการผลิตอาหารเนื่องจากจะก่อให้เกิดโรค (Salminen และคณะ, 1993)

5. สกุล *Vagococcus*

Vagococcus ในอดีตจัดอยู่ในสกุล *Streptococcus* เซลล์มีลักษณะรี หรือท่อนสั้น อาจอยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่หรือสายโซ่สั้นๆบางสายพันธุ์สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาชนิดแฟลกเจลลารอบเซลล์ (peritrichous flagella) ไม่มีรีดิวซ์ไนเตรต อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ตัวอย่างสปีชีส์ เช่น *Vagococcus fluvialis* และ *Vagococcus salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles และ Holzapfel, 1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6. สกุล *Tetragenococcus*

Tetragenococcus เซลล์มีรูปร่างกลม ต้องการเกลือโซเดียมคลอไรด์ในการเจริญและสามารถเจริญได้ในอาหารที่ประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ เช่น ซอสถั่วเหลือง (soy sauce) ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการหมักกรดแลคติก (Stiles และ Holzapfel, 1997) ตัวอย่างสปีชีส์ ได้แก่ *T. Halophilus*, *T. muriaticus*

7. สกุล *Pediococcus*

Pediococcus มักทำให้เกิดการเสื่อมเสียในเบียร์ ซึ่งถูกศึกษาค้นคว้าเป็นครั้งแรกโดยหลุยส์ ปาสเตอร์ เซลล์มีรูปร่างกลม มีการแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกันทำให้เกิดการเรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกัน ทุกสปีชีส์ผลิตกรดแลคติกชนิด DL ยกเว้นสปีชีส์ *P. dextrinicus* ที่ผลิตกรดแลคติกจากการหมักกลูโคส สามารถเจริญได้ใน salt brines ที่มีความเข้มข้นถึง 5.5 เปอร์เซ็นต์ แต่จะเจริญได้ไม่ดีที่เกลือมีความเข้มข้นถึงประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงประมาณ 7-45 องศาเซลเซียส และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-32 องศาเซลเซียส

8. สกุล *Aerococcus*

Aerococcus เซลล์มีรูปร่างกลม มีขนาดเซลล์ 1.0-2.0 ไมโครเมตร การเจริญจะลดลงเมื่อมีก๊าซออกซิเจน มีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถ้าเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ไม่สามารถย่อยสลายสารจำพวกเจลาติน ไม่รีดิวซ์ไนเตรต อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 30 องศาเซลเซียส ตัวอย่าง 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus urinae* หรือ *A. viridans* ซึ่งเดิมเป็นสปีชีส์ในสกุล *Pediococcus* คือ *P. homari* หรือ *P. urinaeequi*

9. สกุล *Leuconostoc*

Leuconostoc เคยถูกเรียกชื่อว่า *Betacoccus* เนื่องจากเป็น heterofermentative ที่หมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติก กรดอะซิติก เอธิลแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายสกุล *Lactobacillus* แต่เมื่อเจริญในน้ำนมพบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว โคโลนีมีลักษณะเล็ก มีเมือก เมื่อเจริญบนอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครสเป็นพวก facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 20-30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายสารจำพวกอาร์จินีน (arginine) และไม่สร้างสารประกอบจำพวกอินโดล เซลล์อยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติก เอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง

10. สกุล *Oenococcus*

Oenococcus ประกอบด้วยสปีชีส์ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc onenos* ด้วยคุณสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูง เป็น facultative anaerobe พบใน fruit mashes สามารถเกิดกระบวนการ decarboxylation เปลี่ยนมาเลท (malate) เป็นกรดแลคติกและก๊าซ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คาร์บอนไดออกไซด์ จึงใช้ในการหมักไวน์ครั้งที่สองหลังจากหมักแอลกอฮอล์ เพื่อให้มีรสกลมกล่อม ไม่มีรสเปรี้ยวของกรดมาลิก (malic acid)

11. สกุล *Weissella*

Weissella เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมค่อนข้างรีคล้ายแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* เซลล์มักจะอยู่เดี่ยวๆ หรือบางครั้งพบเป็นสายโซ่สั้นๆ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างก๊าซจากการหมักกลูโคส เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ผลิตกรดแลคติกทั้ง DL และ D มีเปอร์เซนต์โมลของดีเอนเออยู่ระหว่าง 46.3 – 47.0 เปอร์เซนต์ ในปัจจุบันถูกจัดให้เป็นสกุลใหม่ เพื่อจะหลีกเลี่ยงความสับสนในด้านการจัดจำแนกแบคทีเรียระหว่างสกุล *Lactobacillus Lactococcus* และ *Leuconostoc*

12. สกุล *Carnobacterium*

Carnobacterium เซลล์เป็นรูปร่างท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์คู่ ไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ก๊าซคาร์บอน-ไดออกไซด์ แอซิเตท และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ไม่รีดิวซ์ไนเตรต พบในผลิตภัณฑ์จำพวกเนื้อ และปลา มีหนึ่งสปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคคือ *C. piscicola* ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคกับปลาแซลมอน (Wood และ Holzapfel, 1995)

2.1.2 แบคทีเรียกรดแลคติกจากทางเดินอาหารของปลา

การอธิบายลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก

- การแยกเชื้อ

ปัจจัยหลัก 3 ข้อที่มีความสำคัญในการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลา คือ ในอาหารเลี้ยงเชื้อ อุณหภูมิในการบ่มเชื้อ และเวลาที่ใช้บ่มเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้มากที่สุดในการตรวจสอบคืออาหาร trypticase soy agar (TSA) marine-medium หรือ brain-heart infusion agar (BHIA) ได้เคยใช้แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้และอวัยวะภายใน เช่น ไต ตับ ม้าม และอื่นๆ อย่างไรก็ตาม Shotts และ Teska (1989) ได้รายงานว่าในการแยกเชื้อแรกเริ่มจะใช้อาหารร้อยละ 5 (ปริมาตรโดยปริมาตร) ของ bovine หรือ rabbit blood agar หรือ tomato juice agar หนึ่งในปัจจัยต่างๆ ที่จะจำกัดการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากลำไส้ปลา อาจจะเป็นอุณหภูมิสูงมากในการบ่ม โดย Shotts และ Teska (1989) ได้พบว่าสภาวะที่ใช้ในการบ่ม สามารถทำได้ที่อุณหภูมิ 20-25 องศา-เซลเซียส เป็นเวลา 2-3 วัน หรือที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากไต ในกรณีของเวลาในการบ่ม สิ่งที่ควรทราบก็คือแบคทีเรียกรดแลคติกจากส่วนของทางเดินอาหารและลำไส้ของปลาจากแหล่งน้ำที่มีอุณหภูมิต่ำ เป็นแบคทีเรียที่เจริญได้ช้า เพราะฉะนั้นจึงควรใช้เวลาในการบ่มเชื้อนานถึง 4 สัปดาห์ (Ringø และ Gatesoupe, 1998)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- การจำแนกชนิดของเชื้อ

ก่อนที่จะอภิปรายถึงเรื่องการแบ่งแยกประเภทเชื้อ ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องหรืออาจไม่เกี่ยวข้องกับทางเดินอาหารของปลา จึงจำเป็นต้องระบุลักษณะเฉพาะของจุลินทรีย์ที่เป็นแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างท่อนและรูปร่างกลม ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส และมีลักษณะโดยทั่วไปบางลักษณะทางสรีระวิทยาและนิเวศวิทยาที่คล้าย ๆ กัน โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงานและผลิตกรดแลคติก เป็นผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่ของเมแทบอลิซึม (homolactic fermentation) หรือเป็นผลิตภัณฑ์หลักในขั้นสุดท้าย (heterolactic fermentation) ไม่เคลื่อนที่และไม่รีดิวซ์ไนเตรต แบคทีเรียกรดแลคติกจะประกอบด้วยสมาชิกของแบคทีเรียสกุล *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Leuconostoc*, *Lactococcus* และ *Pediococcus* (Ringø และ Gatesoupe, 1998)

มีรายงานการวิจัยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นเชื้อประจำถิ่นของสัตว์น้ำ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากส่วนต่างๆ ของสัตว์น้ำมีความผันแปร แสดงในตารางที่ 2.2 เป็นความผันแปรที่แท้จริง ซึ่งพบระหว่างชนิดของปลา แต่เหตุผลนี้ไม่ได้ส่งผลกระทบต่อวิธีการคัดแยกแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังใช้สถานที่ที่พบมาใช้พิจารณาด้วย

เมื่อเร็วๆนี้มีการรายงานถึงแบคทีเรียโพรไบโอติกที่ใช้เป็นตัวควบคุมชีวภาพ(biological control agent) ในการเลี้ยงสัตว์น้ำโดย Verschuere และผู้ร่วมงานได้ทำการอภิปรายว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสำคัญเพราะเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ปลา อาจจะมีข้อสงสัยว่าแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถให้ผลต่อสุขภาพของสัตว์น้ำอย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่ เหตุผลหลักที่ไม่คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากสัตว์น้ำ อาจเป็นเพราะจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้อย่างช้าๆ ของ Ringø และ Gatesape ได้แนะนำว่าควรทำการบ่มเป็นเวลา 4 สัปดาห์ขึ้นไปที่อุณหภูมิต่ำ

ก่อนหน้านี้มีการอภิปรายถึงการจัดหมวดหมู่ซึ่งอาจเกี่ยวข้องหรืออาจจะไม่เกี่ยวข้องกับทางเดินอาหารของปลา การให้ข้อมูลเกี่ยวกับเชื้อการจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลานั่นเป็นสิ่งที่สำคัญ คุณลักษณะของเชื้อที่แสดงในตารางที่ 2.2 กล่าวถึงข้อมูลของรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา อย่างไรก็ตามยังมีวิธีการใช้ molecular methods ที่สำคัญได้แก่ 16s rRNA, ribosomal RNA(rRNA), amplified fragment length polymorphism (AFLP), DNA-DNA similarity และ random amplification of polymorphic DNA (RAPD) ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลา (Ringø, 2004)

2.1.2.1 Lactobacilli

Lactobacillus spp. จากทางเดินอาหารของปลาที่อ้างอิงในเอกสารนี้อาจเป็นแบคทีเรียในสกุล *Carnobacterium* ความแตกต่างระหว่าง Lactobacilli และ Carnobacteria สามารถแยกออกจากกันได้โดยใช้ลักษณะต่างๆ คือ การเจริญบน acetate agar (pH 5.4) การเจริญที่ pH 5.4 การเจริญบน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CTAS agar (cresol thallium acetate sucrose) (pH 9.1) การเกิดกรด meso-diaminopimelic ในผนังเซลล์ การสร้างไอโซเมอร์ของกรดแลคติก สารประกอบหลักที่มีคาร์บอน 18 อะตอมและ 1 พันธะคู่ในผนังเซลล์ GC content และการทำ PCR (Ringø, 2004)

ในปีค.ศ. 1947 Dyer ได้รายงานเกี่ยวกับ Lactobacilli ที่พบบนผิวหนัง เหงือก และลำไส้ของปลาเป็นครั้งแรก ในการศึกษาปลา Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) และอีก 14 ปีต่อมา Kraus ได้แยกเชื้อ Lactobacilli จากปลา herring (*Clupea harengus* L.) Kvasnikov และ Coworkers ได้บรรยายถึง Lactobacilli ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นของ Cyprindae, Eacocidae และ Percidae ที่ระยะตัวอ่อนลูกปลา และตัวโตเต็มวัย นอกจากนี้ยังมีผู้เขียนได้อธิบายถึงเชื้อ Lactobacilli ในปลาตัวโตเต็มวัยซึ่งเปลี่ยนแปลงไปตามฤดูกาล ตัวอย่างเช่น *Cyprinus carpio*, *Aristichthys nobilis* และ *Hypophthalmichthus molitrix* ซึ่งจะมีระดับจำนวนประชากรมากที่สุดในกลางฤดูร้อน ในปัจจุบันได้มีเอกสารการรายงานถึงเชื้อ Lactobacilli ซึ่งเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ของปลา Arctic charr (*Salvclinus alpinus*), ปลา Atlantic cod, ปลา Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) และปลา brown trout (*Salmo trutta*) ดังตารางที่ 2.2 อย่างไรก็ตาม Lactobacilli จะไม่ค่อยพบเป็นเชื้อประจำถิ่น (dominant microbiota) ในปลามากนัก โดย Gonzalez และคณะ รายงานว่าพบเชื้อ Lactobacilli เพียงร้อยละ 0.44 ของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่แยกได้จากลำไส้ของปลา brown trout จากตารางที่ 2.2 ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อสายพันธุ์ที่คล้าย *Lactobacillus plantarum* คัดแยกได้จากอวัยวะในระบบทางเดินอาหารของปลา Arctic charr, saithe (*Gadus viren* L.) และปลา brown trout (Ringø, 2004)

2.1.2.2 Carnobacteria

การพบเชื้อ Carnobacteria ในระบบทางเดินอาหารของปลาแสดงในตารางที่ 2.2 บางครั้งมีรายงานการพบเชื้อ *Carnobacterium* spp. ในปลา Arctic charr ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) ปลา brown trout และบางชนิดอื่นๆ บางสายพันธุ์น่าจะเป็นสายพันธุ์ที่รู้จักกันดี อย่างไรก็ตามยังไม่มีการรายงานเกี่ยวกับคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียในปลาเหล่านี้ และยังมีความจำเป็นต้องศึกษาทางชีวโมเลกุล (molecular method) เพื่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้อย่างถูกต้องตามลักษณะเฉพาะของเชื้อ

การศึกษาครั้งแรกโดย Strøm ได้กล่าวถึงการพบเชื้อสายพันธุ์ที่มีลักษณะคล้าย *Carnobacterium divergens* ในปลา และพบว่าสปีชีส์ของแบคทีเรียนี้พบมากในทางเดินอาหาร เช่น ในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ของปลา Atlantic salmon ที่ยังไม่เจริญเติบโตเต็มที่ ปลา Atlantic cod ทั้งที่ยังไม่โตและที่โตเต็มวัย และปลา saithe ต่อมามีการคัดแยกเชื้อสายพันธุ์ที่คล้าย *C. divergens* ในทางเดินอาหารของปลา Arctic charr ที่โตเต็มวัย และตัวอ่อนของปลา Atlantic cod นอกจากนี้ยังพบในลำไส้ใหญ่และ hindgut chamber ของปลา Atlantic cod ตัวเต็มวัย รวมทั้งปลา brown trout และปลา wolfish (*Anarhichas lupus* L.) ที่พบบ่อย (Ringø, 2004)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสัตว์น้ำ

ชนิดของแบคทีเรียและแหล่งที่พบ	ระยะการเจริญของปลา	บริเวณที่แยกแบคทีเรียกรดแลคติก					
		บริเวณของลำไส้ทั้งหมด	ท้อง	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่	อุจจาระ	เหงือก
Lactobacillus spp.							
ปลา Arctic charr	A		+			+	
	A			+	+		
	A					+	
	A					+	
	A		+	+	+	+	
	A			+	+	+	
ปลา Atlantic cod		+					
ปลา Atlantic salmon		+					
	A			+	+		
	A	+	+	+			
ปลา Brown trout[a]							
ปลา Herring		+					
		+					
ปลาชนิดต่างๆ		+					
Lactobacillus plantarum-like							
ปลา Arctic charr	A		+	+	+	+	

ตาราง 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสัตว์น้ำ (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรียและแหล่งที่พบ	ระยะการเจริญของปลา	บริเวณที่แยกแบคทีเรียกรดแลคติก					
		บริเวณของลำไส้ทั้งหมด	ท้อง	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่	อุจจาระ	เหงือก
ปลา Brown trout[a]							
ปลา Saithe	A	+					
Carnobacterium spp.							
ปลา Arctic charr	A		+	+	+	+	
	A				+		
	A				+		
ปลา Brown trout[a]							
ปลา Rainbow trout		+					
		+					
	J	อยู่ในลำไส้					
	A			+	+		
ปลาชนิดต่างๆ		อยู่ในลำไส้					
Carnobacterium divergens-like							
ปลา Arctic charr	A				+		
	A			+	+		
	A			+			
ปลา Atlantic cod	J/A			+	+		

ตาราง 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสัตว์น้ำ (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรียและแหล่งที่พบ	ระยะการเจริญของปลา	บริเวณที่แยกแบคทีเรียกรดแลคติก					
		บริเวณของลำไส้ทั้งหมด	ท้อง	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่	อุจจาระ	เหงือก
	L	+[b]					
	A				+[c]		
ปลา Atlantic salmon	A			+	+		
ปลา Brown trout[a]							
ปลา Saithe	A		+	+			
ปลา Wolffish	F	+					
Carnobacterium funditum-like							
ปลา Arctic charr	A				+		
Carnobacterium gallinarum-like							
ปลา Atlantic cod	A				+[c]		
Carnobacterium inhibens							
ปลา Atlantic salmon		+					
ปลา Atlantic cod	A				+[c]		
Carnobacterium mobile-like							
ปลา Arctic charr	A				+		
ปลา Atlantic cod	A				+[c]		
ปลา Atlantic salmon	A				+		

ตาราง 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสัตว์น้ำ (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรียและแหล่งที่พบ	ระยะการเจริญของปลา	บริเวณที่แยกแบคทีเรียกรดแลคติก					
		บริเวณของลำไส้ทั้งหมด	ท้อง	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่	อุจจาระ	เหงือก
ปลา Brown trout	A				+		
Carnobacterium piscicola-like							
ปลา Arctic charr	A		+	+	+	+	
	A			+			
ปลา Atlantic cod	A			+	+		
	A					+	
	A				+[c]		
ปลา Atlantic salmon	A			+	+		
	A						+
	J				+		
	J			+	+	+	
ปลา Brown trout[a]							
ปลา[a]		+					
ปลา Brown trout		+					
ปลา Saithe	A			+	+		
ปลา Turbot	J		+				

ตาราง 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสัตว์น้ำ (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรียและแหล่งที่พบ	ระยะการเจริญของปลา	บริเวณที่แยกแบคทีเรียกรดแลคติก					
		บริเวณของลำไส้ทั้งหมด	ท้อง	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่	อุจจาระ	เหงือก
Aerococcus spp.							
ปลา Atlantic salmon	A	+					
Enterococcus spp.							
ปลา Brown trout[a]							
ปลา Common carp		+					
Enterococcus.durans-like							
ปลา Brown trout[a]							
Enterococcus faecium-like							
ปลา Common carp/prawn		+					
Enterococcus. gallinarum-like							
ปลา Atlantic salmon	A				+		
Enterococcus pseudoavium-like							
ปลา Atlantic salmon	A				+		
Enterococcus faecium-like							
ปลา Common carp		+					
Enterococcus gallinarum-like							
ปลา Atlantic salmon	A				+		

ตาราง 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสัตว์น้ำ (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรียและแหล่งที่พบ	ระยะการเจริญของปลา	บริเวณที่แยกแบคทีเรียกรดแลคติก					
		บริเวณของลำไส้ทั้งหมด	ท้อง	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่	อุจจาระ	เหงือก
Enterococcus pseudoavium-like							
ปลา Atlantic salmon	A				+		
Lactococcus spp.							
ปลา Brown trout[a]							
ปลา Common carp		+					
Lactococcus garvieae-like							
ปลา Common carp		+					
Lactococcus lactis-like							
Rotifer[d]							
Leuconostoc spp.							
ปลา Arctic charr	A					+	
Leuconostoc mesenteroides-like							
ปลา Arctic charr	A		+	+	+		
Pediococcus acidilactici-like							
ปลา Common carp		+					
ปลา[a]		+					

ตาราง 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสัตว์น้ำ (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรียและแหล่งที่พบ	ระยะการเจริญของปลา	บริเวณที่แยกแบคทีเรียกรดแลคติก					
		บริเวณของลำไส้ทั้งหมด	ท้อง	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่	อุจจาระ	เหงือก
Streptococcus spp.							
ปลา Arctic charr	A		+			+	
	A			+	+		
	A					+	
	A				+	+	
	A		+	+	+		
	A			+	+		
ปลา Atlantic salmon	A			+	+		
ปลา carp		+					
ปลา Eel, European		+					
ปลา Eel, Japanese		อยู่ในลำไส้					
ปลาทอง		+					
ปลา Rainbow trout		อยู่ในลำไส้					
ปลาแซลมอนสายพันธุ์ต่างๆ		+		+	+		
ปลา Turbot	J		+	+	+		
ปลา Yellowtail		+					
ปลา Giant freshwater prawn	L	+					

ตาราง 2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากสัตว์น้ำ (ต่อ)

ชนิดของแบคทีเรียและแหล่งที่พบ	ระยะการเจริญของปลา	บริเวณที่แยกแบคทีเรียกรดแลคติก					
		บริเวณของลำไส้ทั้งหมด	ท้อง	ลำไส้เล็ก	ลำไส้ใหญ่	อุจจาระ	เหงือก
Vagococcus spp.							
ปลา Brown trout[a]							
Weissella hellencia							
ปลา Flounder		+					

[a] ไม่มีข้อมูลเพิ่มเติม

[b] ถูกจัดจำแนกใหม่จาก *Lactobacillus plantarum* ไปเป็น *Carnobacterium divergens*

[c] แยกได้จากส่วน hindgut chamber

[d] แยกได้จากสัตว์ทั้งตัว

A, ตัวโตเต็มวัย; J, ลูกปลา; F, ลูกปลาที่เพิ่งเกิด; L, ระยะตัวอ่อน

ที่มา : Ringø (2004)

แบคทีเรียที่จำแนกชนิดได้ว่ามีลักษณะคล้าย *Carnobacterium funditum* แยกได้จากลำไส้ใหญ่ของปลา Arctic charr ที่กินน้ำมัน linseed ก่อนที่จะให้เผชิญกับเชื้อก่อโรคในปลา เช่น *Aeromonus salmonicida* ssp. *salmonicida* เมื่อเร็วๆ นี้ได้มีการศึกษาเชื้อ *C. gallinarum* จากลำไส้ใหญ่และ hindgut chamber ของปลา Atlantic cod และมีรายงานว่าพบเชื้อ *Carnobacterium inhibens* ในอวัยวะของระบบทางเดินอาหารของปลา Atlantic salmon และปลา Atlantic cod โดยพบว่ามี *Carnobacterium* เพียงสปีชีส์เดียวที่เคลื่อนที่ได้ คือ *Carnobacterium mobile* เมื่อเร็ว ๆ นี้มีรายงานถึงการพบเชื้อสายพันธุ์ที่คล้ายกับ *C. mobile* ในทางเดินอาหารของปลา Arctic charr และปลา Atlantic cod ส่วน *C. pisicola* แยกได้จากกระเพาะอาหารและลำไส้ อุจจาระและเหงือกของปลาสายพันธุ์ต่างๆ เช่น Arctic charr, Atlantic cod, Atlantic salmon, brown trout, rainbow trout, saithe และ turbot (ตารางที่ 2.2) (Ringø, 2004)

2.1.2.3 *Aerococcus*

แบคทีเรียสายพันธุ์ที่คล้าย *Aerococcus* ไม่ค่อยจะมีการรายงานว่าแยกได้จากสัตว์น้ำ มีเพียงรายงานเดียวที่พบเชื้อชนิดนี้ในทางเดินอาหารของปลาโดยแยกได้ 5 สายพันธุ์จากปลา Atlantic salmon แต่ผู้เขียนไม่ได้รายงานข้อมูลเกี่ยวกับจำนวนแบคทีเรียที่พบ แต่ได้เน้นศึกษากิจกรรมการยับยั้งของแบคทีเรียในลำไส้ (Ringø, 2004)

2.1.2.4 *Enterococcus*

แบคทีเรียสกุล *Enterococcus* แยกได้จากลำไส้ของปลา common carp (*Cyprinus carpio*) และกุ้งน้ำจืด (*Macrobranchium rosenbergii*) ปลา brown trout และปลา Atlantic salmon ในปลา common carp แยก *Enterococcus faecium* ได้ปริมาณน้อย ผู้เขียนแนะนำว่าสายพันธุ์นี้อาจมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เนื่องจากเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถเจริญเติบโตที่พีเอช 9.6 ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 น้ำดีร้อยละ 40 และในสภาวะการเลี้ยงที่อุณหภูมิสูง (50°C) อย่างไรก็ตามสมมุติฐานนี้ยังต้องทำการทดสอบเพื่อศึกษาต่อไป ในการศึกษาปลาน้ำจืด ส่วนใหญ่เป็นปลา brown trout Gonzalez และ Coworkers แยกเชื้อได้ 249 สายพันธุ์ ซึ่งมี 8 สายพันธุ์ที่เป็นแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* (มี 6 สายพันธุ์ที่คล้าย *E. durans* และ อีก 2 สายพันธุ์เป็น *Enterococcus* spp.)

2.1.2.5 *Lactococcus*

สายพันธุ์ *Lactococcus* สามารถแยกเชื้อได้จากสัตว์น้ำบางชนิด

2.1.2.6 *Leuconostoc*

แบคทีเรียในสกุล *Leuconostoc* มี 2 การรายงานที่กล่าวว่าได้แยกแบคทีเรียสกุลนี้ ในการศึกษาปลา Arctic charr Ringø และ Strom ได้แสดงให้เห็นว่าร้อยละ 4.5 ของจำนวนเชื้อที่มีชีวิตแยกได้จากในอุจจาระของปลาที่เลี้ยงด้วย capelinroe diet เป็นเชื้อในสกุล *Leuconostoc* ต่อมา Ringø และเพื่อนร่วมงานได้ทำการศึกษาจุลินทรีย์ในปลา Arctic charr ที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีกรดไขมันชนิด polyunsaturated ซึ่งได้ทำการคัดแยกเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* จากท้อง ลำไส้เล็ก และลำไส้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใหญ่ของปลา อย่างไรก็ตาม ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบ *L. mesenteroides* ในอุจจาระของปลา (Ringø, 2004)

2.1.2.7 *Pediococcus*

เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คล้าย *Pediococcus acidilactici* มีรายงานจาก 2 การศึกษาที่กล่าวว่าแยกเชื้อชนิดนี้ได้จากปลา โดยเชื้อชนิดนี้อาจมีคุณลักษณะของความเป็นโพรไบโอติก เช่น การสร้างแบคเทอริโอซินและเร็วๆนี้มีการศึกษาการใช้ *P. acidilactici* ร่วมกับเชื้อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ใน enrichment process ของ *Artemia nauplii* (Ringø, 2004)

2.1.2.8 *Streptococcus*

Trust และ Sparrow เป็นผู้ที่ได้รายงานเป็นครั้งแรกว่าแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* เป็นหนึ่งในจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบอยู่ในทางเดินอาหารของปลา ตั้งแต่นั้นมาแบคทีเรียสกุลนี้ได้ถูกแยกได้จากกระเพาะอาหาร ลำไส้เล็ก และลำไส้ใหญ่ของปลาสายพันธุ์ต่างๆ และกุ้งเล็ก (ตารางที่ 2.2)

2.1.2.9 *Vagococcus*

Vagococcus แบคทีเรียสกุลนี้คัดแยกได้จากปลาเพียงชนิดเดียว คือ ปลา brown trout

2.1.2.10 Aquatic Habitats of LAB

จากการรายงานทั้งหมดที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกในปลาน้ำจืดและสิ่งแวดล้อมในทะเล ซึ่งได้ชี้ให้เห็นว่าทางเดินอาหารของปลาอาจเป็นแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติของแบคทีเรียกรดแลคติกแหล่งที่อยู่อื่นๆ อาจจะเป็นสัตว์ทะเล ตะกอนในทะเลและน้ำทะเล แบคทีเรียกรดแลคติกเหมือนกับแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์ชนิดอื่นๆ คือ สามารถอยู่รอดได้ในน้ำ (water column) Franzmann และผู้ร่วมงาน ได้แยกเชื้อ *C. alterfunditum* และ *C. funditum* จากน้ำของ Ace Lake ใน Antarctica และ Joborn ได้แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *C. inhibens* ที่แยกจากลำไส้ของปลา Atlantic salmon สามารถอยู่รอดได้อย่างน้อย 26 วันในน้ำทะเลเทียม ซึ่งผลการทดลองที่น่าสนใจนี้นักจุลชีววิทยาควรนำไปศึกษาในขั้นต่อไป

นอกเหนือจากหลายการศึกษาที่รายงานการพบแบคทีเรียกรดแลคติกในทางเดินอาหารของปลาหลายชนิดแล้ว ยังมีรายงานอีกหลายเรื่องที่ได้ทำการศึกษาเรื่องการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (*Carnobacterium*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus*) จากปลารมควันและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก (ตารางที่ 2.3)

2.2 กระบวนการหมักที่เกิดจากกรดแลคติก

2.2.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) เป็นการหมักที่จะได้แลคเตทอย่างเดียว เป็นผลผลิตสำคัญที่ผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส (Emden-Meyerhof-Parnas glycoytic pathway) หรือ EMP pathway เริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (C-6) ถูกเติมฟอสฟอรัสและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) จะเข้าทำปฏิกิริยาเป็นผล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ให้โมเลกุลของกลูโคสแตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (ซึ่งมีคาร์บอน3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวท เกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุล จากการหมักกลูโคส 1 โมเลกุล ขั้นสุดท้ายเป็นการริดิวซ์ไพรูเวทเป็น แลคเตท ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้ NAD^+ กลับคืนมาจากที่ใช้ไปในการออกซิเดชันกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

ตาราง 2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลารมควันและผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

แหล่งที่พบ	ชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก
Carnobacterium	
ปลาแซลมอนรมควันที่บรรจุแบบสุญญากาศ	*Carnobacterium piscicola*
ปลาแซลมอนรมควันที่บูดแล้ว	*Carnobacterium* spp.
Lactobacillus	
ปลาแช่แข็ง	*Lactobacillus plantarum*
ปลาแซลมอนรมควันที่บูดแล้ว	*Lactobacillus curvatus*; *Lactobacillus sakei*; *Lactobacillus plantarum*
ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก	*Lactobacillus pentosus*; *Lactobacillus plantarum*
ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีเกลือต่ำ	*Lactobacillus pentosus*; *Lactobacillus plantarum*
ปลา rainbow trout รมควันที่บรรจุแบบสุญญากาศ	*Lactobacillus plantarum*
ผลิตภัณฑ์ปลาหมักของเกาหลี (Jeot-gal)	*Lactobacillus. brevis*
ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก	*Lactobacillus acidipiscis* sp. nov
Lactococcus	
ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีเกลือต่ำ	*Lactococcus lactis* ssp. *lactis*
ผลิตภัณฑ์ปลาหมักของเกาหลี (Jeot-gal)	*Lactococcus lactis*
Leuconostoc	
ปลาแซลมอนรมควันที่บูดแล้ว	*Leuconostoc* spp.
ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีเกลือต่ำ	*Leuconostoc citreum*
ปลา rainbow trout รมควันที่บรรจุแบบสุญญากาศ	*Leuconostoc citreum*
	Leuconostoc mesenteroides ssp. *mesenteroides*.
Pediococcus	
ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีเกลือต่ำ	*Pediococcus pentosaceus*

ที่มา : Ringø (2004)

2.2.2 การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) เป็นการหมักที่จะได้แลคเตท เอทธานอล หรืออะซิเตท และคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส เนื่องจากแบคทีเรียขาดเอนไซม์ อัลโดเลส จึงเปลี่ยนรูปจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมไปเป็นเพนโตส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการสร้างโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชัน และดีคาร์บอกซิเล-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชันร่วมด้วย น้ำตาลที่มี 5 อะตอมนี้จะถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟต (ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่มีคาร์บอน 3 อะตอม) และอะซีติลฟอสเฟต โดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) โดยกลีเซอรอลดีไฮด์ฟอสเฟตจะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตทเช่นเดียวกับการเกิดไกลโคไลซีสในการหมัก โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (แต่เนื่องจากการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟมีกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1 โมเลกุล จึงเกิด ATP เพียง 1 โมเลกุล) ส่วนอนาคตของอะซีติลฟอสเฟตนั้นขึ้นอยู่กับว่าจะมีสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ด้วยหรือไม่ ในสภาวะที่ขาดตัวรับอิเล็กตรอนอะซีติลฟอสเฟต ซึ่งจะทำหน้าที่นี้เสียเองทำให้ถูกรีดิวซ์เป็นเอทธานอล และจะได้ NAD^+ ขึ้นมาใหม่ 2 โมเลกุลจากเอนไซม์ NADH แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน NAD^+ สามารถสร้างขึ้นใหม่จากเอนไซม์ NADH oxidases และ peroxidases ปล่อยให้อะซีติลฟอสเฟตมีมากพอสำหรับการเปลี่ยนให้เป็นอะซีเตท จึงเท่ากับเป็นการเติมฟอสเฟตให้กับสับสเตรตอีกทางหนึ่ง เป็นผลให้ได้ ATP เพิ่มขึ้นมาอีก 1 โมเลกุล เป็น 2 โมเลกุล จากกลูโคส 1 โมเลกุล เช่นเดียวกับการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ ในกรณีที่มีการเพิ่มขึ้นของ ATP สะท้อนให้เห็นได้จากอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ผลเช่นเดียวกันนี้สามารถเกิดขึ้นกับตัวรับออกซิเจนอื่นๆ ด้วย เช่น ฟรุกโตส ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแมนนิทอล (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

การระบุว่าเกิดการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) หรือไม่อาศัยการชี้บ่งด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น เมื่อไม่นานมานี้แบคทีเรียแลคโตบาซิลไลชนิดที่ทำให้เกิดการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ ซึ่งบางชนิดที่ไม่ทนกรดถูกนำมาจัดรวมไว้ในจีนัสใหม่ คือ *Carnobacterium* และน่าจะมีความสำคัญต่อไปในอนาคต

ในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคโตแบซิลไลออกเป็นกลุ่มย่อยๆ 3 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟเพียงอย่างเดียว (obligate homofermenters) สปีชีส์ที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. delbruckii* และ *L. helveticus*

2. กลุ่มที่ทำให้เกิดการหมักได้ทั้งสองแบบ (facultative homofermenters) สปีชีส์ที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. fermentum*

3. กลุ่มที่ทำให้การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟเพียงอย่างเดียว (obligate homofermenters) สปีชีส์ที่นิยมใช้หมัก ได้แก่ *L. brevis*, *L. fermentum* และ *L. kefir*

สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นๆ ที่มิใช่แลคโตแบซิลไล ประกอบด้วย

-สกุลลิวโคนอสตอค (*Leuconostoc*) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างกลมอันเป็นลักษณะสำคัญ ที่ทำให้สามารถจำแนกออกจากพวกแลคโตแบซิลไลได้ง่าย แบคทีเรียชนิดนี้ไม่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติก เพราะเกิดเมือก

-สกุลเพดิโอคอกคัส (*Pediococcus*) เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาใช้ในการหมักกรดแลคติกมากกว่า เช่น *P. pentosaceus* ส่วน *P. halophilus* ในปัจจุบันถูกใช้ในสปีชีส์ใหม่ในชื่อว่า *Tetragenococcus halophnus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

-สกุลเสตรปโตคอกคัส (*Streptococcus*) เป็นแบคทีเรียสปีชีส์หนึ่ง จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียในกลุ่มเสตรปโตคอกไค จะมีลักษณะเด่นที่สามารถจำแนกย่อยออกเป็น 3 กลุ่ม (จีนัส) คือ *Enterococcus*, *Lactococcus* และ *Streptococcus*

2.3 กล้าแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีบทบาทในการหมักอาหารหลายชนิดด้วยกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่าง ๆ ผักและผลไม้ดอง ไส้กรอกและผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดอื่น ๆ นอกจากนั้นยังมีกิจกรรมร่วมกับยีสต์ในการหมักเต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว เมรัย และผลิตภัณฑ์แป้งหมัก แบคทีเรียกลุ่มนี้มีทั้งพวก homofermentative ซึ่งจะเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคไลติก (glycolytic pathway) และพวก heterofermentative ซึ่งเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติก เอทธานอล กรดแอซีติกและคาร์บอนไดออกไซด์ ด้วยวิถีฟอสฟอคีโตเลส (phosphoketolase pathway) นอกจากนั้นยังมีเชื้อหลายสายพันธุ์สามารถเมแทบอไลซ์กรดซิตริก หรือเกลือซิเตรทให้ได้สารพวกไดอะซิติล (diacetyl) แอซิโตน (acetoin) และบิวธิลลีนไกลคอล (2,3-butylene glycol) ดังนั้นบทบาทที่สำคัญในการหมักอาหารของแบคทีเรียกรดแลคติกจึง ได้แก่ การผลิตกรดทำให้เกิดรสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอม ซึ่งมีประโยชน์ในด้านอื่นๆ ที่แตกต่างกันออกไปตามประเภทของผลิตภัณฑ์

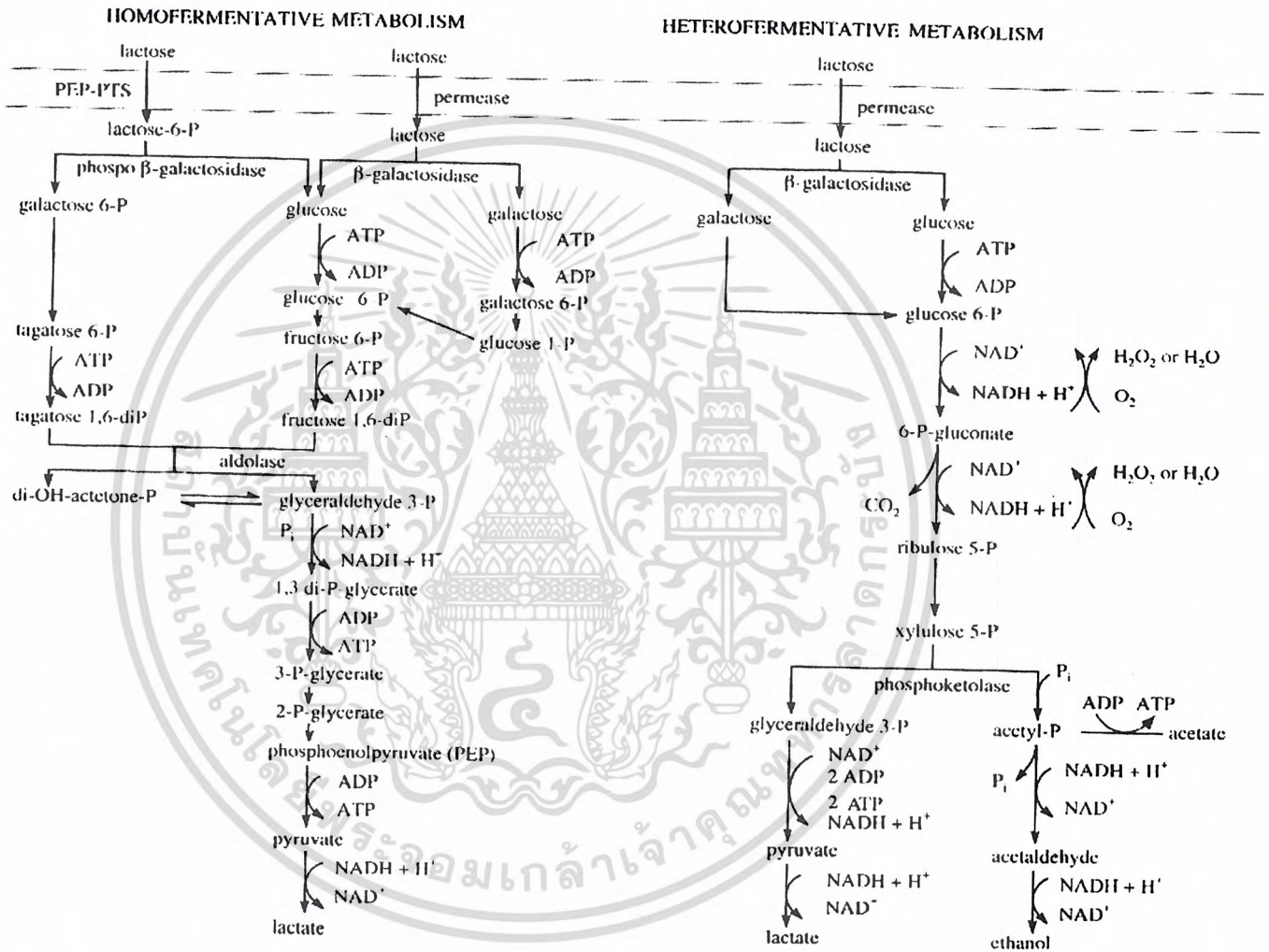
ถึงแม้ว่ามนุษย์จะรู้จักการถนอมหรือแปรรูปอาหาร โดยการหมักดองซึ่งเป็นผลมาจากกิจกรรมของแบคทีเรียกรดแลคติกมาเป็นเวลานานไม่น้อยกว่าการหมักที่เกิดจากเชื้อราและยีสต์ แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าทั้งประเทศตะวันออกและประเทศตะวันตก ต่างก็ไม่มีเทคโนโลยีในการผลิตกล้าเชื้อแบบพื้นบ้านโดยเฉพาะกล้าเชื้อที่ไม่ได้อยู่ในรูปเชื้อผสมกับยีสต์ การหมักอาหารที่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียในยุคก่อนที่จะมีการพัฒนาการผลิตกล้า โดยใช้เชื้อบริสุทธิ์จึงอาศัยเชื้อจากธรรมชาติที่ติดมากับวัตถุดิบโดยควบคุมสภาวะการหมักให้เหมาะสม เพื่อให้แบคทีเรียชนิดที่ต้องการเจริญได้ดี สำหรับอาหารหมักบางชนิดการหมักในลักษณะเช่นนี้ยังคงมอยู่จนถึงปัจจุบัน เช่น การดองผักและการหมักผลิตภัณฑ์จากเนื้อสัตว์ในหลายๆ ประเทศ ส่วนผลิตภัณฑ์นมหมักที่ผลิตกันแต่เดิมนั้น ใช้วิธีเก็บบางส่วนจากการหมักในรุ่นก่อนไว้เป็นกล้าสำหรับการหมักรุ่นต่อไป จนประมาณ ค.ศ. 1880 จึงได้มีการใช้เชื้อบริสุทธิ์ผลิตเนยแข็งเป็นครั้งแรกในประเทศเดนมาร์ก และได้มีการพัฒนาวิธีการผลิตกล้าแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมประเภทนี้มาอย่างต่อเนื่องจนเกิดเป็นอุตสาหกรรมการผลิตกล้าอย่างเป็นล่ำสัน

2.3.1 คุณสมบัติที่ดีของกล้าแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่ว ๆไป มีดังนี้

2.3.1.1 ใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในวัตถุดิบและผลิตกรดได้ในระยะเวลาและปริมาณที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ชนิดนั้น ๆ

2.3.1.2 ผลิตสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของอาหารหมักชนิดนั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 การหมักคาร์โบไฮเดรตแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟและเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟของแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่มา : De Vuyst และ Vandamme (1994)

2.3.1.3 อยู่ในสภาพที่เมื่อนำไปเป็นกล้าเชื้อจะสามารถเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้ดี

2.3.1.4 คุณสมบัติที่สำคัญมากที่สุดข้อหนึ่ง คือ การปลอดฟาจก์ (phage) ซึ่งสามารถหลีกเลี่ยงปัญหานี้ได้หลายวิธีด้วยกัน ซึ่งได้แก่ เตรียมกล้าในรูปเชื้อผสม โดยมีเหตุผลว่าในขณะนำไปใช้หากเชื้อสายพันธุ์ใดสายพันธุ์หนึ่งถูกทำลาย จะยังคงเหลือสายพันธุ์อื่นๆ ที่ไม่มีความเฉพาะกับฟาจก์ชนิดนั้นพอที่จะดำเนินกิจกรรมหมักต่อไปได้ ใช้เชื้อแต่ละสายพันธุ์สลับหมุนเวียนกันไป คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่ต้านทานต่อฟาจ์ก เช่น การใช้สายพันธุ์ผ่าเหล่า (phage resistant mutant) เตรียมกล้าโดยเฉพาะที่เลี้ยงในอาหารที่ยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของฟาจก์ ในกรณีที่มีการเพิ่มปริมาณกล้าก่อนใช้งาน (bulk strater) ต้องระมัดระวังการปนเปื้อนของฟาจก์ (นภา, 2534)

2.3.2 ประโยชน์ของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

2.3.2.1 ช่วยลดระยะเวลาในการหมัก เช่น การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักปลาหลายชนิด พบว่าจะลดระยะเวลาการหมักที่ใช้อยู่ประมาณ 150 ชั่วโมง และเหลือเพียง 32-48 ชั่วโมง สามารถควบคุมการหมักและคุณภาพของผลิตภัณฑ์ได้ง่ายขึ้น

2.3.2.2 ลดการสะสมของไนโตรซามีนอันเป็นสารก่อมะเร็ง กล่าวคือ การเติมกล้าเชื้อทำให้การผลิตกรดเป็นไปอย่างรวดเร็ว มีผลให้ไนไตรต์ที่เกิดจากการรีดิวส์ไนเตรต หรือที่เติมลงในผลิตภัณฑ์สลายเป็นไนตรัสออกไซด์จึงทำให้ปริมาณการสะสมของไนไตรต์ลดลง การเกิดไนโตรซามีนจึงลดลงตามด้วย (Doods และ Collins-Thomson, 1984)

2.3.2.3 กล้าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิด เช่น *Pediococcus* spp. และ *Micrococcus* spp. ผลิตเอนไซม์ซูโดแคตาเลส (pseudocatalase) ซึ่งมีปฏิกิริยาเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้เป็นน้ำและออกซิเจนเป็นการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ให้หมดไป ซึ่งสารเหล่านี้จะมีผลทำให้สีของผลิตภัณฑ์ซีดไม่น่ารับประทาน

2.3.2.4 ลดระดับฮีสตามีนในอาหารหมัก ในการหมักโดยใช้เชื้อจากธรรมชาติโดยปกติในอาหารหมักจะพบจุลินทรีย์กันอยู่หลายชนิด โดยจุลินทรีย์ชนิดที่ผลิตเอนไซม์ฮีสทิดีนดีคาร์บอกซิเลสจะเปลี่ยนฮิสทิดีนเป็นฮิสตามีน การเติมกล้าเชื้อจะทำให้การหมักเกิดขึ้นรวดเร็วจึงจัดเป็นการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์เหล่านั้น ซึ่งฮีสตามีนเป็นสารก่อภูมิแพ้โดยอาการที่เกิดขึ้นมีหลายระดับขึ้นอยู่กับปริมาณสารและบุคคลที่ได้รับสารพิษ อาการที่พบ เช่น หน้าแดง คอแดง ไม่สบาย ปวดบริเวณหน้าผาก ขมับ หัวใจเต้นเร็ว (Fleming และคณะ, 1985)

2.3.2.5 ยับยั้งและทำลายจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรค

2.4 คุณสมบัติที่ดีของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

2.4.1 การมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก (probiotic)

โพรไบโอติก คือจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่เติมลงไปในอาหารเพื่อก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่จะเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พวกแบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus casei, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus plantarum* และ *Streptococcus lactis* (Yoon และคณะ, 2006)

เราจะทราบถึงวิธีการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้โดยในการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกนั้น ก่อนการตัดสินใจเลือกจะต้องพิจารณาคุณสมบัติอื่นอีกมากนอกเหนือจากที่มาของเชื้อ และสกุล (genus) และสปีชีส์ (species) เมื่อเลือกสปีชีส์ได้แล้วจำเป็นต้องหาลักษณะเฉพาะของเชื้อสปีชีส์นั้นๆ รวมทั้งหาคุณสมบัติที่จำเป็นเพื่อให้ได้เชื้อที่มีประสิทธิภาพเหมาะสม หากเราไม่ทราบว่าคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียโพรไบโอติกนั้นเป็นเช่นไร ก็เป็นไปไม่ได้ที่เราจะเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกได้ ความรู้บางอย่างทำให้เราทราบถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียโพรไบโอติก แม้ว่าจะไม่สมบูรณ์ก็ตาม แต่สามารถช่วยให้เราได้เชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติตามต้องการดังวัตถุประสงค์ ต่อจากนี้จะเป็นการสรุปคุณสมบัติโดยย่อที่สำคัญๆ ซึ่งจะนำมาใช้ในการพิจารณาการคัดเลือกแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก การทนกรดและเกลือน้ำดี หากแบคทีเรียโพรไบโอติกไม่สามารถรอดได้ในกระเพาะอาหารและบริเวณส่วนปลายและลำไส้เล็กที่ต่อกับกระเพาะอาหาร (duodenum) ก็จะก่อให้เกิดประโยชน์น้อยหรือไม่เกิดประโยชน์เลย เนื่องจากในกระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดสูง ดังนั้นจุลินทรีย์ควรมีความสามารถในการทนกรดได้สูง หรือใช้ encapsulation technology ช่วยในการป้องกันเซลล์ให้อยู่รอดได้ วิธีที่มีความนิยมใช้วัดว่าจุลินทรีย์นั้นทนกรดหรือไม่ทำได้โดย การประเมินความสามารถในการอยู่รอดได้ที่พีเอช 3 หรือต่ำกว่า เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาเฉลี่ยที่อาหารผ่านลงสู่กระเพาะอาหาร ขณะที่แบคทีเรียโพรไบโอติกหลายชนิดไม่สามารถป้องกันตัวเองจากสภาวะเครียดในกระเพาะอาหารได้ ดังนั้นมันจึงถูกทำลายด้วยวิธีการนี้ แต่หากในระยะแรกทำการเลี้ยงแบคทีเรียโพรไบโอติกในสภาวะเครียดที่ไม่รุนแรงก่อน ก็จะชักนำให้แบคทีเรียให้สร้างกลไกป้องกันตัวต่อสภาวะเครียดที่รุนแรงมากขึ้นที่จะเผชิญในระยะเวลาต่อมาได้ เพราะฉะนั้นเชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกที่มีศักยภาพซึ่งแยกได้นั้นไม่จำเป็นต้องทนต่อพีเอช 3 ได้โดยตรง ในทำนองเดียวกันเชื้อที่ทำการคัดแยกจะต้องมีความสามารถในการทนกรดเกลือน้ำดี เพื่อที่จะสามารถรอดได้ขณะเคลื่อนที่ผ่านลำไส้เล็กที่ต่อกับกระเพาะอาหาร (duodenum) ได้อีกด้วย กิจกรรมของเบต้ากาแลคโตซิเดส (ß-galactosidase) จากจำนวนประชาชนทั้งหมดพบว่ามีประชาชนบางส่วนที่แพ้แลคโตส อาจขึ้นกับเชื้อชาติ เช่น ชาวแอฟริกา อเมริกา และลาตินอเมริกา โดยประชากรทางตอนเหนือของยุโรปจะแพ้น้ำตาลแลคโตสน้อยที่สุด เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ß-galactosidase) และฟอสโฟเบต้ากาแลคโตซิเดส (phospho-ß-galactosidase) มาย่อยน้ำตาลแลคโตส จึงนำจุลินทรีย์ชนิดนี้มาใช้ลดอาการของผู้ป่วยที่มีความผิดปกติในการย่อยแลคโตส เชื้อแบคทีเรียโพรไบโอติกจะสามารถผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณที่แตกต่างกัน เชื้อที่พบทั่วไปจะผลิตเอนไซม์ได้ในปริมาณต่ำ แต่จะผลิตได้สูงขึ้นหากเลี้ยงในอาหารที่มีแลคโตสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยแลคโตสจะเป็นตัวเหนี่ยวนำให้มีการสร้างเอนไซม์เบต้ากาแลคโตซิเดส (ß-galactosidase) โดยแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โพรไบโอติกจะใช้เอนไซม์ชนิดนี้ในการย่อยแลคโตสได้ การเกาะยึดในลำไส้ ความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียโพรไบโอติกภายในลำไส้มนุษย์เป็นสิ่งที่สนใจกันมาก ถึงแม้ว่าไม่มีหลักฐานอย่างเด่นชัดที่แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกยึดเกาะติดกับเซลล์ภายในร่างกาย ซึ่งภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน อธิบายได้เพียงว่าการเกาะยึดของแบคทีเรียโพรไบโอติกจะใช้เทคนิค dehydrate ในชั้นของมิวซินเท่านั้น โดยมิวซินเป็นเซลล์สร้างเยื่อเมือกของผนังลำไส้เล็ก ที่ช่วยปกป้องลำไส้จากการติดเชื้อภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่าแบคทีเรียในชั้นเมือก (mucin layer) เกาะที่บริเวณ Epithelial cell จากหลักฐานทางนิเวศวิทยาได้แนะนำว่าการที่แบคทีเรียโพรไบโอติกจะสามารถรอดชีวิต และอยู่ได้ในระบบนิเวศน์ตามธรรมชาติในบริเวณต่างๆ ของร่างกาย เช่น ในลำไส้ของมนุษย์ จากการศึกษาแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียโพรไบโอติกสามารถยึดเกาะบริเวณมิวซินซึ่งมีข้อมูลยืนยันว่ามีสปีชีส์ใดบ้างที่ยึดเกาะได้ ซึ่งการวัดความสามารถในการยึดเกาะของแบคทีเรียในลำไส้ไม่ใช่เรื่องง่าย เนื่องจากความหลากหลายในลำไส้ของมนุษย์และความแตกต่างกันภายในเซลล์ เมื่อเร็ว ๆ นี้ได้มีผู้ทำการทดลองวัดความสามารถในการยึดเกาะเซลล์ 2 ชนิด คือ Caco-2 และ HT-29 ซึ่งเซลล์สองเซลล์ใช้เป็นตัวแทนของเซลล์เดี่ยวจากลำไส้ของคน 2 คน การวัดโดยวิธีนี้ไม่ใช่การวัดความสามารถในการยึดเกาะที่แท้จริงของเซลล์ที่แยกมา อย่างไรก็ตามผลการทดสอบให้ผลบวกก็สามารถใช้เป็นสิ่งบ่งชี้ที่ดีของการเกาะได้ แต่ก็ไม่ควรเน้นเกี่ยวกับการเกาะติดของเซลล์มากเกินไป จนกว่าจะพิสูจน์ได้ว่าการเกาะติดกับเซลล์ของลำไส้มีความสำคัญต่อการอาศัยของเซลล์แทนที่จะเป็นมิวซิน การสร้างแบคเทอริโอซินในการศึกษาทางระบบนิเวศวิทยาพบว่า จุลินทรีย์บางชนิดจะมีกลไกในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียคู่แข่งกระบวนการหนึ่งในนั้นคือการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยแบคเทอริโอซินเป็นสารยับยั้งจำพวกโปรตีน พวก Lactobacilli มักจะสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ เนื่องจากมีรายงานว่า Lactobacilli จำนวนมากสามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้ด้วย รวมทั้งชนิดที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกอีกด้วย ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus*, *L. reuteri*, *L. rhamnosus*, *L. gasseri*, *L. salivarius* และ *L. johnsonii* (O'Sullivan และคณะ, 2006)

คุณสมบัติของโพรไบโอติกซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ และสามารถนำมาใช้เป็นโพรไบโอติกในระดับอุตสาหกรรมได้นั้นจะต้องมีลักษณะดังนี้ ทนต่อกรดและเกลือน้ำดี เกาะติดในร่างกายมนุษย์บริเวณผนังลำไส้ (Epithelial cell) การยึดติดภายในลำไส้มนุษย์ การผลิตสารต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น ที่เรียก bacteriocin (Balcázar และคณะ, 2008) แบคทีเรียโพรไบโอติกก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพแก่มนุษย์ ดังแสดงในรูปที่ 2.2

2.4.1.1 ประโยชน์ของแบคทีเรียโพรไบโอติก

1. กรดแลคติกที่แบคทีเรียโพรไบโอติกผลิตออกมาจะทำให้สภาวะภายในลำไส้มีความเป็นกรดมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ทำให้ระบบขับถ่ายดีไม่เกิดการสะสมของเสียในร่างกายเป็นการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งตับ

3. ช่วยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด

4. ไวตามินบีที่ได้จะทำให้เซลล์ในระบบภูมิต้านทานทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ และยังทำให้มีการผลิตเม็ดเลือดแดงดีขึ้นด้วย

5. ลดระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในเลือด

6. ผลิตเอนไซม์แลคเตส ซึ่งช่วยย่อยน้ำตาลในนมทำให้ไม่มีอาการท้องอืดจากการดื่มนม และช่วยการดูดแคลเซียมให้ดีขึ้น (ธารารัตน์, 2542)

รูปที่ 2.2 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

ที่มา : Prado และคณะ (2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.4.2 การไม่ก่อให้เกิดไบโอเจนิกเอมีน

ไบโอเจนิกเอมีน(Biogenic amine หรือ BA) เป็นสารอินทรีย์ที่มีโครงสร้างเป็นแบบอะลิฟาติก ซึ่งได้แก่ พิวทริซีน คาดาวารีน สเปอมีน และสเปอมิดีน พวกที่มีโครงสร้างเป็นแบบอะโรมาติก ซึ่งได้แก่ ไทรามีน ฟีนิลไมรามีน หรือพวกที่มีโครงสร้างเป็นแบบเฮทเทอโรไซคลิก ได้แก่ ฮิสตามีน ทริปตามีน ซึ่งสามารถพบได้ในอาหารหลายชนิด ไบโอเจนิกเอมีนที่พบในอาหารส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชั่น (decarboxylation) ของกรดอะมิโนโดยพวกจุลินทรีย์ กรดอะมิโนที่ว่านั้นจะไม่รวมถึงโพลีเอมีน (polyamine) (Silla, 1996)

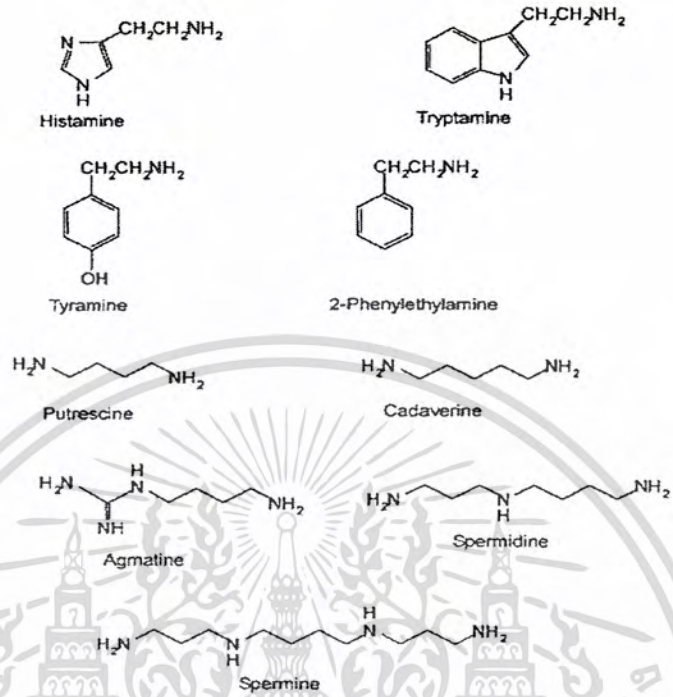
ไบโอเจนิกเอมีนที่มักเกิดขึ้นในอาหาร เกิดจากการกระทำของจุลินทรีย์ที่ผ่านปฏิกิริยาการดึงหมู่คาร์บอกซิลจากกรดอะมิโน (decarboxylation of amino acid) และปฏิกิริยาการโยกย้ายหมู่อะมิโน (decarboxylation of amino acid) ของพวกอัลดีไฮด์ (aldehyde) และคีโตน (ketone) (Askar และ Treptow, 1986) จุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดไบโอเจนิกเอมีนมีอยู่ด้วยกันหลายกลุ่ม อาทิเช่น *Bacillus*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Klebsiella*, *Escherichia*, *Proteus*, *Pseudomonas*, *Shigella*, *Photobacterium* และแบคทีเรียกรดแลคติก (*Lactobacillus*, *Pediococcus* และ *Streptococcus*) นอกจากนั้นสารประกอบเอมีนทุติยภูมิ ตัวอย่างเช่น เพียวทริซีน และคาดาเวอรีน มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดอาหารเป็นพิษ โดยมีความสามารถในการทำให้ฮิสตามีนเป็นพิษ (Bjeldanes และคณะ, 1978) ปริมาณของไบโอเจนิกเอมีนยังสามารถพิจารณาได้จากระดับของการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารอีกด้วย (Leuschner และคณะ, 1999) ด้วยเหตุผลนี้จึงทำให้มีการควบคุมระดับไบโอเจนิกเอมีน (biogenic amine) ในอาหารมีความสำคัญ

ไบโอเจนิกเอมีนเป็นสารประกอบที่ก่อตัวขึ้นและสามารถสลายตัวลงได้ด้วยกระบวนการเมตาบอลิซึม (metabolism) ภายในเซลล์จุลินทรีย์ รวมทั้งการเจริญเติบโต (สเปอมีน สเปอมิดีน และคาดาเวอรีน) การสื่อสัญญาณของระบบประสาท (catechol amine และ ซีโรโทนิน) และการอักเสบของตัวกลางประสานงาน (ฮิสตามีนและไทรามีน) (Tabor และ Tabor, 1976) สารประกอบเอมีนนี้ยังพบในผลิตภัณฑ์อาหารหลายๆ ชนิดอีกด้วย เช่น ช็อกโกแลต ซาวเออเคราท์ (sauerkraut) ปลาและผลิตภัณฑ์ปลา เบียร์ ไวน์แดง เนยแข็ง เป็นต้น โดยทั่วไปโมโนเอมีน (monoamine) ส่วนใหญ่ได้แก่ ฮีสตามีน (histamine) ไทรามีน (tyramine) และทริปตามีน (tryptamine) และไดเอมีน (หรือพอลีเอมีน) ซึ่งได้แก่ เพียวทริซีน และคาดาเวอรีน มักจะก่อตัวมากจากฮิสทิดีน ไทโรซีน ทริปโทเฟน ออนิทีน และไลซีน ตามลำดับโพลีเอมีน (polyamine) ได้แก่ สเปอมิดีน และสเปอมีน เกิดจากเพียวทรีซีน

ไบโอเจนิกเอมีนสามารถถูกสร้างขึ้นในระหว่างการเก็บ หรือในระหว่างกระบวนการสร้างผลิตภัณฑ์ โดยอาศัยความร้อนหรือเอนไซม์ที่ใช้ในกระบวนการดีคาร์บอกซิเลส (decarboxylase) กรดอะมิโนอิสระโดยจุลินทรีย์ *Bacillus*, *Clostridium*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Morganella morganii*, *Proteus*, *Lactobacillus* เช่น *L. buchneri* และ *L. delbrueckii* ในเนยแข็ง Enterobacteriaceae และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Enterococcus ในปลา เนื้อ และผลิตภัณฑ์ปลาและผลิตภัณฑ์เนื้อ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้สามารถพบได้ในอาหารหมัก เช่น เนยแข็ง (camembort) ไวน์ และสารสกัดยีสต์



รูปที่ 2.3 โครงสร้างทางเคมีของไบโอเจนิกเอมีนบางชนิด
ที่มา: Onal (2007)

2.4.3 การสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสและไนเตรตรีดักเทส

แบคทีเรียมีการรีดิวซ์ไนเตรตได้หลายแบบ ถ้าเป็นแบบ assimilation ไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นแอมโมเนีย (NH_3) โดยมีไนไตรต์ (NO_2^-) เป็นสารตัวกลาง (intermediate) ไนเตรตที่เกิดขึ้นเซลล์จะนำไปสังเคราะห์กรดอะมิโนและสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ส่วนแบบ dissimilation หรือ respiration ไนเตรตหรือไนไตรต์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย ในกรณีที่ขาดออกซิเจนสามารถเกิดขึ้นได้กับแบคทีเรียที่ต้องการอากาศในการเจริญ (aerobic bacteria) เรียก nitrate respiration ทำให้เจริญในสภาพที่ไม่มีอากาศได้ เช่น *Pseudomonas* sp. การรีดิวซ์ไนเตรตไม่ว่าจะเป็นแบบ assimilate หรือ dissimilate จะใช้เอนไซม์ nitrate reductase ดังสมการ

$$NO_3^- \xrightarrow[\text{reductase}]{\text{nitrate}} NO_2^- + NH_3$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เชื้อไนเตรตรีดิวส์ซิงแบคทีเรีย (nitrate reducing bacteria) เช่น *Micrococcus varians* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส (nitrate reductase) และรีดิวส์ไนเตรต (NO_3^-) ไปเป็นไนเตรต์ (NO_2^-)ได้ ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด หลังจากนั้นไนเตรตจะสลายตัวให้สารไนตริกออกไซด์ และจะรวมตัวกับรงควัตถุในเนื้อไมโอโกลบินให้สารประกอบสีชมพูแดงของไนโตรโซไมโอโกลบิน

2.4.4 การสร้างสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ สารแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างขึ้นมีดังนี้

2.4.4.1 กรดอินทรีย์

กระบวนการหมักของแบคทีเรียกรดแลคติกจะได้กรดอินทรีย์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก และยังสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เช่น กรดแลคติก กรดแอซีติก และกรดโพรพิโอนิก ทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ เป็นผลเนื่องมาจากการลดลงของพีเอช ค่าคงที่การแตกตัว (pKa) และความเข้มข้นของกรด ซึ่งจะเป็นตัวกำหนดความสามารถในการยับยั้ง กรดแลคติกทำให้โปรตีนเสียสภาพและลดค่าพีเอชภายในเซลล์ของ *Clostridium acetobylicum* กรดแอซิติกยับยั้งการขนส่งกรดอะมิโนที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ในราในสภาวะพีเอชต่ำ กรดที่มีค่าคงที่การแตกตัวสูงจะอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดที่มีค่าคงที่การแตกตัวต่ำ เช่น กรดแอซิติก (pKa = 4.75) มีกรดอยู่ในรูปไม่แตกตัวมากกว่ากรดแลคติก (pKa = 3.08) 2-4 เท่า ที่พีเอชในช่วง 4.0-4.6 ทำให้มีผลในการยับยั้งมากกว่ากรดแลคติก (Wood, 1992)

2.4.4.2 รูทีริน (reuterin)

เป็นสารที่มีโมเลกุลต่ำที่ไม่ใช้โปรตีนและสามารถละลายน้ำได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง โดยสารรูทีรินจะเจริญในสภาพไม่มีอากาศในสารผสมของกลูโคสและกลีเซอรอล หรือกลีเซอรอลดีไฮด์ และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ เช่น ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว จึงสามารถนำไปใช้ในการถนอมอาหารเพื่อเพิ่มจุลินทรีย์ที่ก่อโรค และทำให้อาหารเน่าเสีย

2.4.4.3 แบคเทอริโอซิน (bacteriocins)

แบคเทอริโอซิน หมายถึง เปปไทด์หรือโปรตีนที่สังเคราะห์จากไรโบโซม และมีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรีย แบคเทอริโอซินแตกต่างจากยาปฏิชีวนะ (antibiotic) คือ แบคเทอริโอซินมีฤทธิ์การยับยั้งแคบและเป็นพิษกับแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้เคียงกัน แบคเทอริโอซินสามารถสร้างได้จากแบคทีเรียกลุ่มแกรมลบและแกรมบวกหลายสปีชีส์ แต่แบคเทอริโอซินที่ถูกสร้างจากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกกลับเป็นที่ได้รับความสนใจมากที่สุด

แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียกรดแลคติก ส่วนใหญ่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ใกล้ชิดกับแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดที่สร้างแบคเทอริโอซินนั้น อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิด สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *Listeria monocytogenes* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Staphylococcus aureus การนำแบคเทอริโอซินไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร จะช่วยลดการใช้สารเคมี รวมทั้งลดการใช้ความร้อนทำให้อาหารอุดมยังคงไปด้วยคุณค่าสารอาหารซึ่งเป็นทางเลือกหนึ่งที่ผู้บริโภคต้องการเนื่องจากมีความปลอดภัย มีรสชาติสดใหม่ และพร้อมรับประทาน

Swetwiwatthana (2005) ได้ทำการศึกษาการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากแหนมจำนวน 309 ไอโซเลต พบว่ามี 14 ไอโซเลตที่มีแนวโน้มในการสร้างแบคเทอริโอซิน และในจำนวนนี้มี 3 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้ออื่นๆ ได้สูง เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของไอโซเลตทั้งสามพบว่าไอโซเลต N100 และ N190 เป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ซึ่งสามารถผลิตไนซิน Z และอีกไอโซเลตหนึ่งเป็น *Pseudomonas pentosaceus* TISTR 536 ซึ่งสามารถผลิตเพดดิโอซิน PA-1

สมใจ และคณะ (2007) ได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างแบคเทอริโอซินได้จากอาหารหมักในประเทศไทยทั้งหมด 50 ตัวอย่าง พบ 8 ไอโซเลตที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีที่สุด เมื่อทำการจัดจำแนกพบว่าเป็น *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* โดยแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นมีสมบัติที่ดีกล่าวคือทนความร้อน 100 องศาเซลเซียส ได้นาน 10 นาที มีความคงตัวดีในช่วง pH 4-7 และมี antibacterial spectrum ค่อนข้างกว้าง

2.4.4.4 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

ในสภาพที่มีออกซิเจนแบคทีเรียกรดแลคติกจะผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport system) โดยการทำงานของฟลาโวโปรตีน (floavaprotein) ของเอนไซม์ออกซิเดส (oxidase) และซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) เพื่อกำจัดอิเล็กตรอนส่วนเกินออกจาก NADH โดยปราศจากการสร้าง ATP นอกจากนี้พบว่าไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถสังเคราะห์จากสารตั้งต้นต่างๆ เช่น α-glycerophosphate และ lactate ในสภาวะที่ไม่มีธาตุเหล็กแบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ซึ่งจะทำหน้าที่สลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและออกซิเจน แต่จะมีระบบอื่นที่จะใช้กำจัดปริมาณของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ซึ่งจะเป็นไปตามกลไกการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามไม่มีการสะสมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ เพราะกิจกรรมดังกล่าวสามารถถูกทำลายโดยเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) ฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) และซูโดคะตาเลส (pseudo-catalase)

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดส์ที่มีฤทธิ์รุนแรงต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะออกซิไดส์ส่วนประกอบของเซลล์ ที่มีหมู่ซัลไฮดริล (sulhydryl) ได้แก่ โปรตีนในเซลล์ และไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ในปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขนส่งออกซิเจน จึงทำให้เกิดสภาวะการขาดออกซิเจน ส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในอาหารหมักจะมีการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในปริมาณน้อย เนื่องจากมีการหมักในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่มีผลดีตรงที่จะไม่เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มากเกินไป ซึ่งอาจจะไปยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่เป็นตัวการหมักได้ (สุมณฑา, 2545)

ในสภาพธรรมชาติเมื่อมีไทโอไซยาเนท ไฮโดนเจนเปอร์ออกไซด์ และเอนไซม์แลกโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) ซึ่งสามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชันของไทโอไซยาเนตเปลี่ยนเป็นไฮโปไซยาไนต์ (hypocynite, $OSCN^-$) และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จำนวนมากจะทำให้เปลี่ยนเป็น O_2SCN^- และ O_3SCN^- ตามลำดับ ซึ่ง $OSCN^-$ จะมีผลต่อเยื่อหุ้มเซลล์ กลไกหลักในการยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่น คือการขัดขวางกระบวนการไกลโคไลซิสในขั้นตอนการขนส่งกลูโคส รวมทั้งขัดขวางการทำงานเอนไซม์เฮกโซไคเนส (hexokinase) และกลีเซอราลดีไฮด์-3-ฟอสเฟตดีไฮโดรจีเนส (glyceraldehydes-3-phosphase dehydrogenase) เนื่องจากเอนไซม์เหล่านี้จะมีหมู่ซัลไฮดริลเป็นองค์ประกอบ ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตได้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม lactobacilli นั้น จะสามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารเป็นพิษและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดย *Lactobacillus plantarum* ในระยะระหว่างการเก็บรักษาหอยนางรม โดยการแช่แข็งสามารถยับยั้ง *Pseudomonas* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของการเน่าเสียอาหารที่อุณหภูมิต่ำได้ (อรวรรณ, 2546)

2.4.4.5 ไดอะซิล (Diacety)

ไดอะซิติล (2,3-butanedione) เป็นสารตัวกลางในการสังเคราะห์ pyruvate diacetyl เป็นสารที่ทำให้เนยมีกลิ่นหอม ซึ่งพบว่าเมื่อแบคทีเรียกรดแลคติกเจริญในสภาวะที่มีซิเตรทอยู่ด้วยจะสร้างไพรูเวตออกมาในปริมาณที่มาก ซึ่งสารตัวนี้จะเปลี่ยนต่อไปอีกเป็นไดอะซิติลและอะซิโตน โดยไดอะซิติลสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้โรคและทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ ผลในการยับยั้งของสารในกลุ่มนี้จะมีผลแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรา มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากไดอะซิติลจะไปขัดขวางการใช้อาร์จินีนของแบคทีเรียแกรมลบ โดยเข้าไปแทนที่อาร์จินีนในการรวมตัวกับ argintine-binding protein

ไดอะซิติลได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS:Generally Recognized as Safe) สามารถใช้เป็นสารกันบูดในอาหารแต่ก็มีข้อจำกัด เนื่องจากจะต้องใช้ในปริมาณที่มากจึงจะมีผลในการถนอมอาหารและเนื่องจากมีกลิ่นแรง จึงทำให้สามารถใช้ในอาหารได้เพียงบางชนิด อย่างไรก็ตามไดอะซีติล อาจใช้ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในภาชนะเครื่องมือเครื่องใช้ที่สัมผัสกับอาหารได้ เพราะระเหยง่าย (De Vuyst และ Vandamme, 1994)

2.4.4.6 คาร์บอนไดออกไซด์

คาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์หลักในกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส โดยแบคทีเรียกรดแลคติกในกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) บางชนิดนี้สามารถผลิตคาร์บอนไดออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากมาเลต (malate) และซิเตรท (citrate) โดยมาเลตจะเปลี่ยนเป็นแลคเตต (lactate) และคาร์บอน-ไดออกไซด์ โดยเอนไซม์มาโลแลกติก (malolactic) ขณะที่ซิเตรตเปลี่ยนไปเป็นอะซิเตต และออกซาโลอะซิเตต โดยเอนไซม์ซิเตรตไลเอส (citrate lyase) จากนั้นออกซาโลอะซิเตตเปลี่ยนเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ (อรวรรณ, 2546)

การผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เนื่องจากคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้เกิดสภาพไร้อากาศ โดยการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจน ทำให้พีเอชทั้งภายในและภายนอกเซลล์ลดลง นอกจากนี้พบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ ดังนั้นจึงทำให้คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิดซึ่งมีความสำคัญโดยเฉพาะการทำผักดอง และหญ้าหมักเพื่อป้องกันการเจริญของเชื้อรา (อรวรรณ, 2546)

2.5 ลักษณะทั่วไปของปลาน้ำจืด

ปลาเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังที่กำเนิดขึ้นเมื่อ 400 ล้านปีมาแล้ว โดยในปัจจุบันปลามีจำนวนประมาณ 20,000 ชนิด หรือ ร้อยละ 42.6 ของบรรดาสัตว์มีกระดูกสันหลังด้วยกัน เมื่อคิดเทียบสัดส่วนเป็นร้อยละ พบว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดนั้นมีสัดส่วนคิดเป็นร้อยละ ดังนี้คือ นก ร้อยละ 22.9 สัตว์เลื้อยคลาน ร้อยละ16 สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ ร้อยละ 6.5 และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมร้อยละ 12 สาเหตุที่ปลาสามารถดำรงพันธุ์ได้จนถึงปัจจุบันจากข้อมูลเบื้องต้นจึงอาจกล่าวได้ว่าปลามีชีวิตที่ยืนยาวและสืบทอดบรรพบุรุษมาถึงปัจจุบัน เนื่องจากว่าปลาสามารถปรับตัวในสภาพแวดล้อมต่างๆ ได้ดี ดังนี้

1. ปลาสามารถอาศัยในที่ๆ มีอุณหภูมิสูงกว่า 100 องศาฟาเรนไฮต์ (38 องศาเซลเซียส) เช่นปลาบริเวณเขตน้ำพุร้อน

2. ปลาสามารถอาศัยในที่ ๆ มีอุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ได้แก่ ปลา Icefish (*Trematomus borchgrevinki*) และปลาโนโตเธ็น (*Notothenia* sp.) ซึ่งปลาพวกนี้ไม่มี haemoglobin ปลาพวกนี้เลือดไม่มีการแข็งตัวเนื่องจากมีสารต่อต้านการเกิดการแข็งตัวของเลือด (antifreeze) โดยเป็นสาร glycoprotein ที่ทำให้เลือดไม่มีการแข็งตัวแม้จะอยู่ในบริเวณที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า -1.8 องศาเซลเซียส (ร่างกายปลาจะสามารถทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิอยู่ในช่วง 6.7-8.3 องศาเซลเซียส และร่างกายปลามีอุณหภูมิแตกต่างจากน้ำภายนอกประมาณ 0.5-1.0 องศาเซลเซียส)

3. ปลาสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่จืดสนิท เช่น ปลาน้ำจืด

4. ปลาสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเค็มจัด เช่น ปลาน้ำเค็ม

5. ปลาสามารถอาศัยอยู่ในน้ำที่มีความลึกและมืดสนิท

ปลาโดยส่วนใหญ่มักอาศัยอยู่ในน้ำ แต่จากการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์หลายท่านพบว่า มีสิ่งมีชีวิตหลายๆ ชนิด อาศัยอยู่ในน้ำที่มิใช่ปลา แม้บางครั้งจะมีคำนำหน้าชื่อว่าปลา เช่น ปลาหมึก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลาวาฬหรือปลาดาว แต่สัตว์เหล่านี้ก็มิใช่เป็นปลาตามความหมายทางมีนวิทยา (วิชาที่ว่าเกี่ยวกับเรื่องของปลา) ที่แท้จริง คำจำกัดความของปลา มีดังนี้

1. ปลามีแหล่งอาศัยอยู่ในน้ำ หรืออย่างน้อยต้องเป็นที่ชื้นแฉะ

2. ปลาเป็นสัตว์เลือดเย็น (poikilothermal animal) หมายถึง อุณหภูมิในร่างกายเปลี่ยนแปลงตามสภาพแวดล้อม

3. ร่างกายปลาแบ่งออกเป็นส่วนหัว ลำตัว และหางชัดเจน

4. ปลามีร่างกายแบบสมมาตรด้านข้าง (bilateral symmetry) ยกเว้นในกลุ่มปลาซีกเดียว (Order Heterosomata)

5. ร่างกายปลาปกคลุมด้วยเกล็ด (scale) หรือมีเมือกหุ้ม

6. มีระบบต่าง ๆ แยกออกจากกันอย่างชัดเจน

7. หายใจด้วยเหงือก (gill) และมีช่องเปิดเหงือก (gill silt) ให้น้ำออกสู่ภายนอก

8. มีท่อประสาทกลวง (dorsal hollow nerve tube) อยู่เหนือทางเดินอาหาร

9. มีจมูกสำหรับดมกลิ่น

10. ปลาส่วนมากออกลูกเป็นไข่ (oviparous) แต่มีปลาบางชนิดออกลูกเป็นตัว โดยตัวอ่อนได้รับอาหารจากไข่แดง (ovoviviparous) และบางชนิดออกลูกเป็นตัวโดยที่ตัวอ่อนได้รับอาหารทางสายสะดือ (viviparous)

2.5.1 โครงสร้างและลักษณะภายนอกของปลา

2.5.1.1 โครงสร้างของปลา

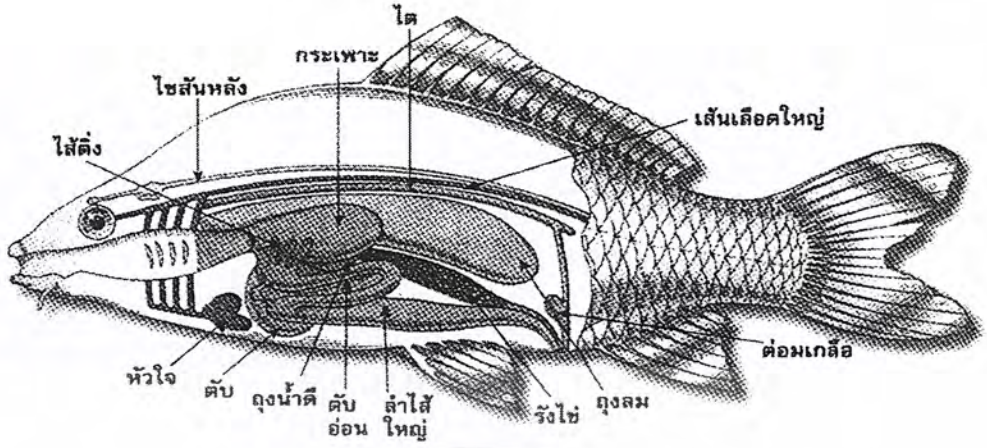
โดยทั่วๆ ไปแล้ว เราสามารถแบ่งร่างกายของปลาออกเป็น 3 ส่วน คือ ส่วนหัว ส่วนลำตัว และส่วนหาง แต่ละส่วนที่ตั้งของอวัยวะต่างๆดังนี้

1.ส่วนหัว เป็นส่วนหน้าสุดของร่างกายปลา พื้นที่ส่วนหัวจะเริ่มนับจากปลายสุดของจงอยปากไปจนถึงขอบสุดท้ายของแผ่นปิดเหงือกในปลากระดูกแข็ง หรือจนถึงขอบสุดท้ายของช่องเปิดเหงือกช่องสุดท้าย ในปลากระดูกอ่อน ส่วนหัวเป็นที่ตั้งอวัยวะสำคัญ ๆ เช่น ตา ปลา จมูก สมอง ฟัน รูรับน้ำ หนวด ท่อทางเดินอาหาร อวัยวะรับสัมผัสพิเศษ และเกล็ด เป็นต้น บางตำราอาจจะกล่าวไว้ว่าส่วนหัวเป็นส่วนที่เป็นตั้งของอวัยวะรับความรู้สึกเกือบทุกชนิด

2. ส่วนลำตัว อยู่ถัดจากส่วนหัว พื้นที่ของส่วนลำตัวนับจากแผ่นปิดเหงือกไปจนถึงบริเวณเส้นตั้งฉากจากรูก้น ส่วนนี้เป็นที่ตั้งของครีบเกือบทุกครีบ ยกเว้นครีบหางและครีบก้น นอกจากนี้ส่วนลำตัวเป็นที่ตั้งของเกล็ด ต่อมเมือก และอวัยวะภายในอีกด้วย

3. ส่วนหาง พื้นที่ส่วนนี้นับจากรูก้นไปจนสุดปลายหาง เป็นที่ตั้งของครีบก้นและครีบหาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.4 โครงสร้างของปลา
ที่มา : นฤมล (2550)

2.5.1.2 ลักษณะภายนอกของปลา

เมื่อพิจารณาลักษณะภายนอกของปลาแล้ว พบว่ามีส่วนประกอบที่คล้ายคลึงกันไม่ว่าจะเป็นปลากระดูกอ่อนหรือกระดูกแข็ง ซึ่งลักษณะภายนอกของปลาจะเป็นดัชนีการบอกถึงลักษณะนิสัยการกินอาหาร และถิ่นที่อยู่อาศัยได้ดีพอสมควร

1. ปาก เป็นอวัยวะในการรับอาหาร ลักษณะของปากปลาขึ้นอยู่กับอาหารที่กินและลักษณะนิสัยการกินอาหารเป็นสำคัญ จึงมีผลทำให้ปลาแต่ละชนิดมีรูปทรงและตำแหน่งที่ตั้งของปากนั้นแตกต่างกัน เช่น ปลาที่มีนิสัยการกินอาหารตามพื้นดินใต้น้ำ ปากมีตำแหน่งอยู่ทางด้านล่างของส่วนหัว (inferior mouth) ปลาที่กินอาหารบริเวณผิวน้ำ ปากมีตำแหน่งอยู่ทางด้านบนของส่วนหัว (superior mouth)

2. ตา โดยปกติตาปลาจะตั้งอยู่บริเวณส่วนหัว สำหรับขนาดของตาปลาจะแตกต่างกันตามชนิดของปลา แต่ส่วนใหญ่ตาปลาจะกลมโต ยกเว้นปลาที่อาศัยบริเวณน้ำลึกหรือบริเวณที่ไม่มีแสงสว่าง ตาปลาจะมีขนาดเล็ก หรือบางชนิดอาจไม่มีตาเลยก็ได้

3. จมูก ปลาไม่ได้มีจมูกไว้เพื่อหายใจ แต่จะมีจมูกไว้ดมกลิ่น เนื่องจากในโพรงจมูกจะมีเส้นประสาทรับกลิ่น ทำให้ปลาสามารถรับกลิ่นได้ดี

4. ครีบอกหรือครีบหู ปลาที่มีครีบอกเพื่อการว่ายน้ำและหยุดเพื่อบังคับทิศทางการว่ายน้ำ ขนาดและรูปร่างของครีบจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของปลา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. ครีบหลัง จัดเป็นครีบเดี่ยว ที่ตั้งอยู่บริเวณส่วนหลังของลำตัว หน้าที่ที่สำคัญของครีบหลัง คือ ช่วยในการว่ายน้ำ ปลาบางชนิดครีบหลังเปลี่ยนแปลงไปเป็นครีบไขมัน (กลุ่มปลาดุก) เปลี่ยนเป็นครีบฝอย (กลุ่มปลาทู) หรือเปลี่ยนแปลงไปเป็นเงี่ยงแหลม (ปลากระเบน) ไว้สำหรับป้องกันตัว หรือเปลี่ยนแปลงไปอวัยวะยึดเกาะ (ปลาเหาฉลาม)

6. ครีบท้อง เป็นครีบคู่ ทำหน้าที่ในการทรงตัวและช่วยในการว่ายน้ำ ในปลาบางชนิด เช่น ปลาบู่ ตัวผู้จะมีครีบท้องที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นท่อสำหรับส่งน้ำเชื้อ (priapium) เพื่อช่วยในการส่งน้ำเชื้อเข้าสู่ตัวเมียและทำหน้าที่ในการขับถ่ายปัสสาวะ ตำแหน่งที่ตั้งของครีบท้องจะเป็นตัวบอกถึงวิวัฒนาการของปลาได้อีกด้วย

7. ครีบก้น เป็นครีบเดี่ยวอยู่ติดกับรูก้น ทำหน้าที่ช่วยในการว่ายน้ำ

8. ครีบหาง เป็นครีบเดี่ยวที่มีขนาดใหญ่ รูปร่างแตกต่างกันตามชนิดของปลาหน้าที่หลักของครีบหางคือช่วยบังคับทิศทางในการเคลื่อนที่

9. ครีบไขมัน เป็นครีบเดี่ยวที่ไม่มีก้านครีบ ตำแหน่งที่พบตั้งอยู่หลังครีบหลัง

10. ครีบฝอย มักพบอยู่เป็นคู่ กระจายอยู่ทางด้านท้ายของครีบหลังและครีบก้น มีลักษณะเป็นเส้น ๆ มีก้านครีบอ่อนมากมาย พบในปลาทู ปลาอินทรีย์ ปลาโอ และปลาสีกุน

11. ปลาโดยทั่วไปมีเส้นข้างลำตัว 1 คู่ ภายในเส้นข้างลำตัวจะมีส่วนของระบบที่ทำหน้าที่รับความรู้สึก เพื่อบอกให้ปลาทราบถึงสภาพแวดล้อมที่อยู่รอบตัว เช่น อุณหภูมิ ความดัน

12. เกล็ดปลา ทำหน้าที่ในการป้องกันอันตรายให้กับตัวปลา (นฤมล, 2550)

2.6 สายพันธุ์ปลาน้ำจืดที่ใช้ในงานวิจัย

2.6.1 ปลาตะเพียนขาว

ชื่อสามัญ : Common Silver Barb

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Barbodes gonionotus*

ปลาตะเพียนขาว อังกฤษเรียก barb, Thai silver barb, Thai carp จีนเรียก เต๊กเคี้ยง เวียดนามเรียก Catre vinch อินโดนีเซียเรียก Tawes, Bader, Kandia มาเลเซียเรียก Lampamjawa ประเทศไทยทางแถบภาคกลางเรียก ตะเพียนขาว ตะเพียน ทางแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เรียก ปลาปาก ทางแถบภาคเหนือเรียก ปลาปึก ปลาตะเพียนขาว มีชื่อสามัญว่า Common Silver หรือ Thai Barb ลักษณะลำตัวกว้างและแบนข้าง แผ่นหลังยกสูง หัวและปากมีขนาดเล็ก มีหนวดขนาดเล็ก 2 คู่ อยู่ที่ขากรรไกรบนและล่าง พื้นลำตัวสีเงินอมน้ำตาล เกล็ดเป็นมันแวววาวเรียงเป็นระเบียบ แผ่นหลังสีคล้ำ ใต้ท้องสีจางขาว มีครีบ 7 ครีบ ครีบหลังและหางสีเทาหรือสีเทาอมเหลือง ครีบท้องและครีบทวารสีส้มจาง ๆ ส่วนครีบอกโปร่งใสไม่มีสี อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตคือ 25-31 องศาเซลเซียส ปลาตะเพียนเป็นปลาที่รักสงบ ชอบอยู่รวมกันเป็นฝูงและว่ายน้ำตลอดเวลา (นฤมล, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6.2 ปลานิล

ชื่อสามัญ : Nile Tilapi

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Oreochromis niloticus*

ปลานิล มีรูปร่างคล้ายกับปลาหมอเทศ ลักษณะพิเศษของปลานิล คือ ริมฝีปากบนและล่างเสมอกัน ที่บริเวณแก้มมีเกล็ด 4 แถว ลักษณะทั่วไปมีดังนี้ คือ ครีบหลังมีเพียง 1 ครีบ ประกอบด้วยก้านครีบแข็งและก้านครีบอ่อนเป็นจำนวนมาก ซึ่งครีบก้นประกอบด้วยก้านครีบแข็งและอ่อนเช่นกัน มีเกล็ดตามแนวเส้นข้างลำตัว 33 เกล็ด ลำตัวมีสีเขียวปนน้ำตาล บริเวณครีบหลัง ครีบก้นและครีบหางนั้นมีจุดสีขาวและสีดำตัดขวาง ปลานิลนั้นมีนิสัยชอบอยู่รวมกันเป็นฝูง จากการศึกษาพบว่าปลานิลสามารถทนต่อความเค็มได้ถึง 20 พีพีที ทนต่อค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ได้ดีที่ช่วง 6.5-8.3 และสามารถทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่เจริญเติบโตได้ดีในช่วงอุณหภูมิ 25-38 องศาเซลเซียส (นฤมล, 2550)

2.6.3 ปลาทับทิม

ชื่อสามัญ Ruby fish

ปลาทับทิม เป็นปลาที่พัฒนาสายพันธุ์มาจากตระกูลปลานิล โดยบริษัทเครือโภคภัณฑ์ได้ศึกษาวิจัย และได้พัฒนาสายพันธุ์จนได้สายพันธุ์ใหม่ ปลาทับทิมมีเกล็ดและผิวหนังสีแดง นอกจากนี้ยังมีคุณสมบัติพิเศษคือ หัวเล็ก สันหนา มีปริมาณเนื้อมากถึงร้อยละ 40 ของน้ำหนักตัว มีความต้านทานโรค เจริญเติบโตเร็ว เนื้อขาวแน่นละเอียด รสชาติดี และมีโภชนาการสูง อุดมด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว หากบริโภคก็จะลดความเสี่ยงต่อการเป็นโรคหัวใจ โรคความดันโลหิต โรคหลอดเลือดหัวใจตีบตัน นอกจากนี้ปลาทับทิมที่เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป เมื่อสิ้นสุดการเลี้ยง พบว่า ปลาทับทิมมีปริมาณกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดโอเมก้า 3 สูงกว่าปลาน้ำจืด ปลาน้ำกร่อยและปลาทะเลที่จับได้ตามธรรมชาติถึง 4 เท่า ซึ่งโอเมก้า 3 จะช่วยลดคอเลสเตอรอลในเส้นเลือด ป้องกันการเกิดโรคหัวใจและหลอดเลือดอุดตัน ช่วยบำรุงสมองเสริมสร้างความจำ ช่วยบรรเทาอาการปวดบวมข้ออักเสบเป็นต้น (นฤมล, 2550)

2.6.4 ปลาหมอ

ชื่อสามัญ : Climbing gouramies หรือ Climbing Perch

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Anabas testudineus*

ปลาหมอเป็นปลาที่มีอวัยวะพิเศษช่วยหายใจ (labyrinth organ) ทำให้สามารถอาศัยอยู่ได้ในบริเวณที่มีน้ำน้อยๆ หรือที่ชุ่มชื้นได้เป็นเวลานาน พบทั้งแหล่งน้ำนิ่งและน้ำไหล พบมากในแถบจีนตอนใต้ อินโดจีน ไทย มลายู พม่า อินเดีย ศรีลังกา ฟิลิปปินส์ และออสเตรเลีย ปลาหมอมีรูปร่างลำตัวป้อมค่อนข้างแบน ความยาวประมาณ 3 เท่า ของความลึก ลำตัวมีสีน้ำตาลเหลืองปนดำ ลักษณะเด่นคือ มีเกล็ดแข็งห่อหุ้มตัวโดยตลอด ดวงตากลมโต ปากแยงขึ้นเล็กน้อย มีจุดดำที่โคนหาง ฟันค่อนข้างแหลมคม ปลาหมอเป็นปลาที่กินสัตว์น้ำที่มีขนาดเล็กกว่า ชอบกินอาหารที่ผิวน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และกลางน้ำ และยังสามารถกิน เมล็ดข้าว ธัญพืช ปลวก ตัวอ่อนแมลงน้ำ ตั๊กแตน กุ้งฝอยหรือลูกปลาเล็กปลาน้อยที่มีชีวิตหรือตายเป็นอาหาร (สันต์, 2548)

2.7 การเน่าเสียของปลา

ปลาเป็นแหล่งโปรตีนที่สำคัญ เนื่องจากมีปริมาณโปรตีนค่อนข้างสูง ซึ่งส่วนใหญ่เป็น nitrogenous compounds ที่ย่อยสลายได้ง่าย เนื้อปลาจึงเป็นที่นิยมบริโภคกันอย่างกว้างขวาง ปลามีองค์ประกอบ คือ ความชื้นเฉลี่ยร้อยละ 80 ปริมาณไขมันร้อยละ 1-2 ปริมาณโปรตีนร้อยละ 15 แร่ธาตุต่างๆ ร้อยละ 3 ส่วนคาร์โบไฮเดรตมีปริมาณน้อยมาก นอกจากนี้ ยังพบวิตามินที่แตกต่างกันตามชนิดของปลา (สันต์, 2548)

การเน่าเสียของปลาเกิดขึ้นโดยการย่อยสลายตัวเอง การรวมตัวกับออกซิเจนของไขมัน และกิจกรรมของจุลินทรีย์โดยเฉพาะแบคทีเรีย แต่ส่วนใหญ่การเน่าเสียของปลาจะมีสาเหตุร่วมกัน คือ ปลาสดจะเน่าเสียเร็วกว่าเนื้อสัตว์ เนื่องจากโมเลกุลของ nitrogenous compounds มีขนาดเล็ก จึงย่อยสลายได้ง่ายกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ในเนื้อสัตว์ และปลามีความเป็นกรด–ด่างเป็นกลาง ทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ดี รวมทั้งไขมันปลามีความไวในการทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในอากาศมากกว่าไขมันจากสัตว์ชนิดอื่นๆ ตามปกติไกลโคเจนในเนื้อปลามีปริมาณน้อย เนื่องจากจุลินทรีย์จะใช้ไปอย่างรวดเร็ว จากนั้นจุลินทรีย์กลุ่มที่ย่อยโปรตีนจะทำการย่อยสลาย nitrogenous compounds เปลี่ยนเป็นแอมโมเนียทำให้พีเอชสูงขึ้นทำให้เนื้อปลาเกิดการเน่าเสีย (สันต์, 2548)

จุลินทรีย์ที่พบในปลาส่วนใหญ่มักเป็นชนิดเดียวกับที่มีอยู่ในแหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่ ซึ่งพบมากที่บริเวณเมือก เหงือก และลำไส้ของปลา ตัวอย่าง เช่น แบคทีเรีย *Pseudomonas, Alcaligenes, Micrococcus, Flavobacterium, Corynebacterium, Sarcina, Serratia, Vibrio* และ *Bacillus* เป็นต้น อุณหภูมิของน้ำ เป็นตัวคัดเลือกชนิดของแบคทีเรียที่อยู่บนตัวปลา เช่น แบคทีเรียที่พบในปลาที่อยู่ในแหล่งน้ำเขตหนาว (temperate zone) จะเป็นพวก psychrophile ส่วนแบคทีเรียที่พบบนตัวปลาที่อยู่ในแหล่งน้ำเขตอบอุ่น (tropical zone) จะเป็นพวก mesophile แหล่งน้ำจืดและแหล่งน้ำเค็ม ถ้าเป็นปลาน้ำจืดจะพบแบคทีเรียในกลุ่มแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ ปลาน้ำเค็มก็เป็นแบคทีเรียที่ชอบเกลือหรือทนเกลือได้รวมกับพวก *Aeromonas, Lactobacillus, Brevibacterium, Alcaligenes* และ *Streptococcus* ส่วนแบคทีเรียที่อยู่ในลำไส้ของปลาน้ำเค็มและปลาน้ำจืดมักเป็นแบคทีเรียในสกุล *Alcaligenes, Pseudomonas, Flavobacterium, Vibrio, Bacillus, Clostridium* และ *Escherichia* (สันต์, 2548)

จุลินทรีย์เมื่อปนเปื้อนในเนื้อเยื่อปลาจะใช้สารอาหารต่างๆ ในเนื้อเยื่อ เช่น กรดอะมิโน วิตามิน แร่ธาตุต่างๆ เป็นต้น เพื่อการเจริญและเพิ่มจำนวนขึ้น ผลิตสารหลายชนิดที่มีกลิ่นหรือรสชาติผิดปกติไปจากธรรมชาติ ได้แก่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การผลิตแอมโมเนีย ได้จากการสลายยูเรียและสารประกอบที่มีไนโตรเจนเพื่อนำไปใช้เป็นพลังงานของแบคทีเรียพวก *Achromobacter thalassius, A. butyric, A. delicatulum, Pseudomonas geniculata, Flavobacterium funcatum* และ *Micrococcus* ทำให้เกิดกลิ่นฉุนในเนื้อปลา

2. histamine เกิดจากแบคทีเรีย *Achromobacter histameneum* ที่ผลิตเอนไซม์ histamine decarboxylase ย่อยสลายกรดแอมิโนฮิสติดีน (histidine) ให้กลายเป็น histamine ซึ่งสารใช้เป็น spoilage index วัดความสดของปลาได้ด้วย หากผู้บริโภครับประทาน histamine เข้าไปเป็นจำนวนมากจะก่อให้เกิดอันตรายได้

3. trimethylamine ผลิตโดย *Micrococcus* และ *Achromobacter* สารนี้พบมากในปลาที่เน่า จึงใช้เป็นดัชนีแสดงการเน่าเสียของปลา

4. กรดอินทรีย์ต่างๆ ในปลาที่เน่าเสีย มีหลายชนิดเป็นผลผลิตจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* กรดอินทรีย์ที่พบมากได้แก่ formic acid, citric acid, butyric acid, propionic acid และ valeric acid กรดเหล่านี้ ทำให้เนื้อปลามีกลิ่นและรสแตกต่างกันไป (สันต์, 2548)

2.8 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Kim และ Austin (2008) ได้ทำการศึกษาถึงลักษณะเฉพาะของ Carnobacteria ที่ใช้เป็นโพรไบโอติก(probiotic) โดยมี 2 ไอโซเลต คือ *Carnobacterium maltaromaticum* (B26) และ *C. divergens* (B33) ที่แยกได้จากลำไส้ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) โดยพบว่าการเลี้ยงเชื้อของทั้งสองชนิดนี้ที่ได้จากโคโลนีจากเยื่อบุเมือกลำไส้ของปลานั้น จะประกอบด้วย nonsporogenous ไม่เคลื่อนที่ ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส และเอนไซม์ออกซิเดส และเป็นรูปท่อน การเจริญของ carnobacteria ทั้ง 2 ไอโซเลตจะเกิดขึ้นระหว่างอุณหภูมิที่ 0 และ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นของสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 0-10 (น้ำหนักต่อปริมาตร) และที่พีเอช 5-10 โดยเฉพาะสายพันธุ์ B26 จะเจริญที่อาหารที่เติม สารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 15 (น้ำหนักโดยปริมาตร) อาหารเลี้ยงเชื้อที่อุดมสมบูรณ์ด้วย fatty acid ซึ่งคือ 9-ocradecenoic acid (18:1 n-9) (B26 = ร้อยละ52.6; B33 = ร้อยละ40.6) ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะของ *Carnobacterium* โดยการเลี้ยงเชื้อพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลตจะยับยั้ง *Aeromonas salmonicida, A. hydrophila, Streptococcus iniae* และ *Vibrio anguillarum* และสายพันธุ์ B33 จะยับยั้ง *Listeria monocytogenes* โดย carnobacteria ทั้ง 2 สายพันธุ์ ไม่มี พลาสมิด และผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ ซึ่งการเลี้ยงเชื้อโพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ (B26 และ B33) จะมีลักษณะเฉพาะของ phenotypic และแสดงถึงช่วงที่กว้างสำหรับการต้านทาน antibiotic ที่ผันแปรกับแบคทีเรียก่อโรค ผลของการศึกษานี้จะช่วยให้ได้ข้อมูลใหม่ และมีความสำคัญต่อสปีชีส์ *Carnobacterium*

Gonzalez และคณะ (2000) ได้ศึกษาถึงลักษณะเฉพาะและการระบุลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก 249 สายพันธุ์ (237 สายพันธุ์เป็นรูปท่อน และ 12 สายพันธุ์เป็นทรงกลม) ที่แยกได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากปลาน้ำจืด (ส่วนใหญ่เป็นปลา brown trout) และจากสภาวะสิ่งแวดล้อมประมาณร้อยละ 90 (226 สายพันธุ์) ไม่สามารถเจริญบน acetate (rogosa) agar ซึ่งแสดงถึง phenotypic homogeneity และกำหนดให้เป็นจีนัส *Carnobacterium* มีเพียง 22 สายพันธุ์ จะเป็นจีนัส *Lactobacillus* *Enterococcus* *Lactococcus* หรือ *Vagococcus* มีเพียงสายพันธุ์เดียวที่ระบุถึงระดับจีนัสไม่ได้ ในการระบุลักษณะของเชื้อ มี Carnobacteria มากที่สุด คือ *C. piscicola* (156) ขณะที่สปีชีส์ *C. divergens* มีเพียง 10 สายพันธุ์ Carnobacteria ทั้งหมด 59 สายพันธุ์ที่ยังระบุสปีชีส์ไม่ได้ หลังจากนั้นการจัดจำแนกด้วยวิธี numerical taxonomy ใช้เป็นพื้นฐานระบุลักษณะของ phenotypic ที่ระดับความคล้ายคลึงกันร้อยละ 86 และค่าเฉลี่ยการเชื่อมต่อกันของกลุ่ม Cluster I และII จะอธิบายถึง *Enterococcus durans* และ *Lactobacillus* spp. ตามลำดับ Cluster III และ VI จะระบุถึง *C. piscicola* ขณะที่ Cluster 5 จะกล่าวถึงสปีชีส์ *C. divergens* การวินิจฉัยที่ถูกต้องระหว่าง Carnobacteria และ *Lactobacillus* จะต้องใช้วิธี numerical taxonomy ถึงแม้ว่าการแยกระหว่าง *Carnobacterium* จะมีคำอธิบายไม่ชัดเจน โดยอาจดูที่ความแตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ของลักษณะ phenotypic

Itoi และคณะ (2008) ได้ทำการแยกเชื้อ *Lactococcus lactis* ที่มีความทนเกลือสูงจากลำไส้เล็กของปลาบริเวณชายฝั่ง พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกได้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth กับน้ำทะเลร้อยละ 50 ในการทดสอบ โดยการคัดเลือกเชื้อจะใช้วิธี phenotypic test เช่น การย้อมแกรม ดูรูปร่างของเซลล์ การเกิดคะตะเลส (catalase) ออกซิเดส (oxidase) และการหมักกลูโคส ผลที่ได้คือ แยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกได้จำนวน 227 ไอโซเลต เมื่อทำการทดสอบด้วย species-specific PCR พบว่ามี 4 ไอโซเลตที่ให้ผลเป็นบวก และคาดว่าเป็น *Lactococcus lactis* (การเพิ่มขึ้นของ DNA M58837) โดยมี 3 ไอโซเลตที่มียีน 16S rRNA ที่มีความคล้ายคลึงกันสูงมากที่จะเป็นเชื้อ *Lactococcus. lactis* subsp. *lactis* ส่วนอีก 1 ไอโซเลตพบว่าเป็นเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* การศึกษาลักษณะเฉพาะของเชื้อใช้วิธี API 50 CH สำหรับการหมักคาร์โบไฮเดรตและทางฟีโน-ไทป์ในการทนเกลือและเปรียบเทียบลักษณะกับ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ในการเป็นกล้าเชื้อในชีส สำหรับการหมักคาร์โบไฮเดรตพบว่ามีรูปร่างของไอโซเลตนี้เป็นลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์ *L. lactis* subsp. *lactis* จากการเป็นกล้าเชื้อในเนยแข็ง เชื้อ *Lactococcus lactis* ได้แสดงถึงการทนเกลือในอาหาร MRS agar ที่ประกอบด้วยน้ำทะเล 200 หรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6 นี้เป็นการรายงานครั้งแรกในการศึกษาการคัดแยกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* ที่มีความทนเกลือสูงจากสิ่งแวดล้อมในทะเล

Balcázer และคณะ (2008) ได้ศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำการแยกเชื้อจากลำไส้เล็กของปลา โดยการศึกษานี้จะทำการประเมินความสามารถของแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากปลา คือ *Lactococcus lactic* CLFP 101 *Lactobacillus plantarum* CLPP 238 และ *Lactobacillus fermentum* CLFP 242 ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลา (*Aeromonas hydrophila, Aeromonas salmonicido, Yersinia ruckeri* และ *Vibrio anguillarum*) อยู่ในเยื่อบุเมือกในลำไส้เล็ก ผลการทดลองพบว่ามีเพียง *Lactococcus lactis* CLFP 101 ที่สามารถลดแบคทีเรียที่ก่อโรคในปลาได้ อย่างไรก็ตาม *Lactobacillus plantarum* CLPP 238 สามารถลด *Aeromonas hydrophila* และ *Aeromonas salmonicida* ส่วนสายพันธุ์ *Lactococcus fermentum* CLFP 242 สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในปลาได้ทั้งหมด ยกเว้น *Vibrio anguillarum* นอกจากนี้มีเพียงเชื้อ *Lactococcus lactis* CLFP 101 ที่สามารถยับยั้งกิจกรรมของแบคทีเรียก่อโรคในปลาทั้งหมดได้ โดยทำการทดลองในอาหารเหลว แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดสามารถอยู่รอดได้ที่พีเอชต่ำ และความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูง การศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถนำไปทดสอบผลของความเป็นโพรไบโอติกในปลาต่อไปได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างปลาสด

ตัวอย่างปลาสดที่ใช้ในการทดลองคือ ส่วนของเหงือก ท้อง และเนื้อของปลาน้ำจืดทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ปลาตะเพียน (*Barbodes gonionotus*) ปลาหมอ (*Anabas testudineus*) และปลาทับทิม (Ruby fish) สายพันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง และตัวอย่างแหนมปลา 20 ตัวอย่างจากตลาดหัวตะเข้ ตลาดมีนบุรี จังหวัดกรุงเทพ และตลาดสำโรงจังหวัดสมุทรปราการ

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* TISTR 050, *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 และ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 และ *Escherichia coli* DMST 4212 ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุขกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 แยกได้จากกุ้งแชบ๊วยสด

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ deMan Rogosa Sharpe Medium (MRS Broth/MRS Agar), Bacteriocin-Screening-Medium Agar (BSM), Decarboxylase Medium, Nutrient Agar, Gibson's Semi Tomato Juice Medium, Tryptic Soy Broth (TSB, Difco), TSB Soft Agar, MRS Soft Agar, MRS Agar ที่เติมโพแทสเซียมไนเทรต (KNO_3) 1 กรัมต่อลิตร และสารละลายที่ใช้เจือจาง ได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 และชุดทดสอบ API 50 CH (Biomereux)

3.1.4 สารเคมี

สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 37 กรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 95 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) สารละลาย NIT 1 (กรดซัลฟานิลิก 0.8 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอล ปริมาตร 100 มิลลิลิตร) สารละลาย NIT 2 (ไดเมทิลแนฟทิลลามีน 0.6 กรัมในกรดอะซิติกความเข้มข้น 5 นอร์มอลปริมาตร 100 มิลลิลิตร) กลีเซอรอล bile extract porcine (Sigma) โซเดียมคลอไรด์ (NaCl) แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) และชุดสารเคมีสำหรับย้อมแกรมซึ่งประกอบด้วยคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) แกรมไอโอดีน (Gram's iodine) เอธิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 สีซาฟรานิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

(safranin) สารเคมีที่ใช้วิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ตกค้าง ได้แก่ โพแทสเซียมเฟอโรไซยาไนด์ [$K_4Fe(CN)_6 \cdot 3H_2O$] ซิงค์อะซิเตท [$(CH_3COO)_2Zn \cdot 2H_2O$] โซเดียมเตตระบอเรท [$(Na_2B_4O_7) \cdot 3H_2O$] ซัลฟานิลามายด์ ($C_5H_8N_2O_2S$) กรดอะซิติก N-1-แนฟทิลลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (N-1-naphthylene diamine dihydrochoride) โซเดียมไนไตรต์ ($NaNO_2$) และกรดอะมิโน ได้แก่ L-tyrosine, histidine monohydrochloride, ornithine monohydrochloride และ lysine monohydrochloride

3.1.5 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ เครื่องตีป่นอาหาร (stomacher) เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (Aqualab series 3TE) เครื่องวัดพีเอช (Testo 205) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Shimadzu รุ่น UV 1601) โถไร้อากาศ (anaerobic jar) เครื่องผสมตัวอย่างในหลอดทดลอง (vortex mixer) เครื่องปั่นเหวี่ยง (centrifuge) กล้องจุลทรรศน์ หม้อนึ่งอัดไอความดันต่ำ ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow) ตู้บ่มเชื้อ (incubator) microplate reader (iEMS Reader MF, Labsystems) และเครื่องแก้วพร้อมอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่จำเป็น ได้แก่ ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับตีป่น จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง ลูป เข็มเขี่ยเชื้อ บีกเกอร์ แท่งแก้วคน ปิเปต ลูกยาง กระบอกตวง แผ่นสไลด์ และอุปกรณ์อื่นๆ ที่จำเป็น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของปลาสดและแหนมปลา

นำตัวอย่างที่สุ่มมาจากตลาด ได้แก่ ปลาสด 4 สายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง แหนมปลา 10 ตัวอย่าง และแหนมปลาที่ผลิตเอง คือ แหนมที่เติมโซเดียมไนไตรต์ 10 ตัวอย่าง นำมาวัดค่าพีเอช ปริมาณน้ำอิสระและปริมาณไนไตรต์ตกค้าง (วิเคราะห์เฉพาะแหนมปลา) โดยใช้วิธีการดังนี้

3.2.1.1 การวัดค่าพีเอช (pH)

นำตัวอย่างปลาสดแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 10 ตัวอย่าง มาวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่องวัดพีเอช (Testo 205)

3.2.1.2 การวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (water activity, a_w)

นำตัวอย่างปลาสดแต่ละสายพันธุ์ สายพันธุ์ละ 10 ตัวอย่างมาวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (a_w) โดยใช้เครื่องวัดค่าปริมาณน้ำอิสระ (Aqualab series 3TE)

3.2.1.3 การหาปริมาณโซเดียมไนไตรต์ในแหนมปลาที่สุ่มจากตลาดและแหนมปลาที่ผลิตเอง (Kirk และ Sawyer, 1991)

ก) สารเคมีที่ใช้ในการหาปริมาณไนไตรต์

1. สารละลายโพแทสเซียมเตรียมโดยชั่ง potassium ferrocyanide trihydrate 109 กรัม ละลายน้ำและปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ชั่ง Zinc acetate dehydrate 220 กรัม ละลายน้ำและเติม glacial acetic acid 20 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

3. ชั่ง Sodium tetraborate decahydrate 50 กรัม เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร คนให้ละลาย

4. ชั่ง Sulphanilamide 2 กรัม ละลายในน้ำอุ่น 800 มิลลิลิตร ทำให้เย็นแล้วทำการกรอง เติมกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นปริมาตร 100 มิลลิลิตร (คนตลอดเวลา) ปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น

5. N-1-naphthylene diamine dihydrochoride 0.25 กรัม ละลายน้ำปรับปริมาตรให้เป็น 250 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น เก็บไว้ในขวดสีชาและนำไปแช่ตู้เย็น เตรียมใหม่ทุกสัปดาห์

6. สารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น ปริมาตร 445 มิลลิลิตร เจือจางกับน้ำเป็น 1 ลิตร

ข) การทำกราฟมาตรฐาน

- สารละลายมาตรฐานโซเดียมไนไตรต์ (stock) เตรียมโดยชั่งโซเดียมไนไตรต์ 1,000 กรัมพอดี ละลายน้ำและปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร

- สารละลายโซเดียมไนไตรต์ที่ใช้ในการทดลองควรเตรียมใหม่ทุกวันโดยเตรียมสารละลายโซเดียมไนไตรต์ 3 ระดับความเข้มข้นดังนี้

- ปิเปตสารละลาย stock 5 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำให้ได้ 1 ลิตร และนำมาเจือจางต่อโดยเติมสารละลายนี้ปริมาตร 5, 10 และ 20 มิลลิลิตร ลงในน้ำ 100 มิลลิลิตร สารละลายที่ได้นี้จะมีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรต์เป็น 2.5, 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

ค) การเตรียมตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์

ทำให้ตัวอย่างเป็นเนื้อเดียวกันโดยใส่ในเครื่องบด วิเคราะห์ตัวอย่างสดทันที สำหรับตัวอย่างอื่นให้วิเคราะห์เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้โดยควรทำการวิเคราะห์ภายใน 24 ชั่วโมง ชั่งตัวอย่างที่ทำให้เป็นเนื้อเดียวกันแล้วปริมาณ 10 กรัมใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมสารละลายบอแรกซ์ (สารข้อ ก(3)) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นร้อนปริมาตร 70 มิลลิลิตร (อุณหภูมิห้ามต่ำกว่า 70 องศาเซลเซียส) ลงในบีกเกอร์ที่ใส่ตัวอย่าง คนผสมให้เข้ากัน ถ่ายตัวอย่างใส่ฟลาสก์สำหรับปรับปริมาตรขนาด 200 มิลลิลิตรโดยใช้น้ำร้อน 75 มิลลิลิตรช่วยในการถ่ายตัวอย่าง ให้ความร้อนโดยเอาไปต้มในอ่างน้ำเดือดนาน 30 นาทีและเขย่าอย่างสม่ำเสมอ รอให้เย็นและเติมสารเคมีในข้อ ก (1) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรผสมกับสารเคมีในข้อ ก (2) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้เกือบถึง 200 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น ปรับพีเอชของสารละลาย (supernatant solution) ให้ได้ค่าพีเอช 8.3 โดยค่อยๆหยดสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์หรือสารละลายกรดไฮโดรคลอริก (HCl) ความเข้มข้น 4 โมลาร์ หลังปรับพีเอชปรับปริมาตรให้ได้ถึงขีด 200 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที ค่อยๆกรองสารละลายส่วนใสด้วยกระดาษกรองที่ปราศจากไนเตรตและไนไตรต์อย่างระมัดระวัง เพื่อให้ได้ส่วนกรองที่ใส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ง) การวัดสี (colour measurement)

ทำโดยปิเปตสารที่กรองได้ v มิลลิลิตร (v ไม่เกิน 1 มิลลิลิตร) ลงในขวดสำหรับปรับปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นประมาณ 60 มิลลิลิตร เติมสารเคมีในข้อ ก (4) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และสารเคมีในข้อ ก (6) ปริมาตร 6 มิลลิลิตรลงไป ทิ้งไว้ในที่มืด 5 นาที เติมสารเคมีในข้อ ก (5) ปริมาตร 2 มิลลิลิตรทิ้งไว้ในที่มืด 3 นาที ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 538 นาโนเมตร ทำกราฟมาตรฐานโดยนำสารละลายโซเดียมไนไตรต์ที่เตรียมไว้แต่ละความเข้มข้น (โซเดียมไนไตรต์ความเข้มข้น 2.5, 5.0 และ 10.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร)โดยปิเปตมาความเข้มข้นละ 10 มิลลิลิตร ทำการเตรียม blank โดยใช้น้ำกลั่นแทนสารละลายโซเดียมไนไตรต์ นำสารละลายโซเดียมไนไตรต์ที่แต่ละความเข้มข้นมาทำตามขั้นตอนการวัดสีของตัวอย่าง แต่เปลี่ยนตัวอย่างเป็นสารละลายโซเดียมไนไตร์ตที่ความเข้มข้นต่างๆ แทน นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรต์

<u>หมายเหตุ</u> ถ้าค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่างมีค่ามากกว่าค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดของสารละลายโซเดียมไนไตรต์ ให้เจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างใหม่โดยใช้ปริมาตรน้อยกว่าเดิม

3.2.2 การวิเคราะห์จำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในปลาสด

3.2.2.1 การตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกในปลาสด

การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในส่วนต่างๆของปลาสด ได้แก่ เหงือก ท้อง และเนื้อของปลาสดแต่ละตัว การวิเคราะห์ทำได้โดยชั่งตัวอย่าง ตัวอย่างละ 11 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) จากนั้นใส่ลงในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 99 มิลลิลิตร นำไปตีป่นด้วยเครื่อง stomacher เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างเหงือกปลา ท้องปลา และเนื้อปลา จนถึงระดับความเจือจาง $1:10^4$ จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}- 10^{-4} ปริมาตร 1 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเชื้อ แล้วเททับด้วยอาหาร MRS Agar ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนตความเข้มข้นร้อยละ 0.5 หมุนจานเพาะเชื้อไปทางซ้ายและทางขวา 5 ครั้ง เพื่อให้ตัวอย่างผสมกับอาหารทั่วทั้งจานเพาะเชื้อ รอให้ผิวหน้าอาหารแข็ง คว่ำจาน จากนั้นนำไปบ่มในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคโลนีบนจานอาหารที่มีจำนวนโคโลนีในช่วง 25-250 โคโลนี คำนวณหาจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง

3.2.2.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการแยกเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 3.2.2.1 ที่มีวงใส (clear zone) รอบๆโคโลนี สุ่มเลือกจากโคโลนีทั้งหมดมา 230 โคโลนี โดยใช้ลูปปราศจากเชื้อแทงลงในอาหารบริเวณโคโลนีที่มีวงใส แล้วนำมาลากผิวหน้าอาหารแข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วจึงถ่ายลงอาหาร MRS Agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

slant นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นเขี่ยเชื้อจาก slant ประมาณ 2-3 ลูป ถ่ายลงหลอดทนความเย็น (cryotube) ที่มีอาหาร MRS ที่เติม glycerol ร้อยละ 15 หลอดละ 1 มิลลิลิตร เก็บในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

3.2.3.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำการแยกจากปลาสดจากหลอดเก็บเชื้อทนความเย็น (cryotube) มา 1 ลูป นำมาลากลงบนผิวหน้าอาหารแข็ง MRS และนำไปบ่มในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อจากอาหารแข็งมา 1 ลูป ใส่ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งเทส่วนใสทิ้งแล้วปิเปตสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับตะกอนเซลล์ (cell pellet) ให้เข้ากันด้วย แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงเทส่วนใสทิ้ง เมื่อล้างเซลล์ครบ 2 ครั้งแล้ว ทำให้เป็นสารแขวนลอยเซลล์ (cell suspension)แต่ละไอโซเลต โดยปิเปตสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน และนำสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตไปปรับความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 3 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7-10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.2.3.2 การเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบการยับยั้ง

เขี่ยเชื้อที่ใช้ทดสอบการยับยั้ง (indicator strain) ได้แก่ *L. plantarum* TISTR 050, *P. pentosaceus* TISTR 414, *S.* Typhimurium DMST 0562, *S. aureus* TISTR118, *L. monocytogenes* DMST 11256, *P. fluorescens* DMST 20076, *E. coli* DMST 4212 และ *V. parahaemolyticus* SH1 ชนิดละ 1 ลูปใส่ลงในอาหารเหลวที่เหมาะสม โดย *S.* Typhimurium DMST 0562, *S. aureus* TISTR 118, *L. monocytogenes* DMST 11256, *P. fluorescens* DMST 20076 และ *E. coli* DMST 4212 ใช้อาหารเหลว TSB ปริมาตร 10 มิลลิลิตร *V. parahaemolyticus* SH1 ใช้อาหารเหลว TSB ที่เติมเกลือร้อยละ 1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และ *L. plantarum* TISTR 050 และ *P. pentosaceus* TISTR 414 ใช้อาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำเชื้อไปปั่นเหวี่ยงที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งและทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง เช่นเดียวกับข้อ 3.2.3.1 ทำให้ได้สารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อ โดยปิเปตสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน และนำสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อแต่ละชนิดไปปรับความ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 3 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^7-10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร

3.2.3.3 การทดสอบการสร้างแบคเทอริโอซินด้วยวิธี agar spot test

ทำการทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ด้วยวิธี agar spot test (Schillinger and Lücke, 1989) ทำได้โดยหยดเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงบนอาหาร Bacteriocin-Screening-Medium (BSM) ซึ่งดัดแปลงมาจาก MRS และมีส่วนประกอบดังนี้คือ glucose ร้อยละ 0.2, meat extract ร้อยละ 0.2, tryptone ร้อยละ 1, yeast extract ร้อยละ 0.4, tween 80 ร้อยละ 0.1, citric acid diammonium salt ร้อยละ 0.2, $MgSO_4.7H_2O$ ร้อยละ 0.02, $MnSO_{4.4}H_2O$ ร้อยละ 0.005, $K_2HPO_4.3H_2O$ ร้อยละ 0.87, KH_2PO_4 ร้อยละ 0.8 และวุ้น ร้อยละ 1.5 บ่มในสภาพไร้ออกซิเจนเพื่อป้องกันการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอะซิติกที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของ *S.* Typhimurium DMST 0562, *S. aureus* TISTR 118, *L. monocytogenes* DMST 11256, *P. fluorescens* DMST 20076 และ *E. coli* DMST 4212 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร TSB Soft Agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ *V. parahaemolyticus* SH1 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหาร TSB Soft Agar ที่เติมเกลือร้อยละ 1 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส และปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ *L. plantarum* TISTR 050 และ *P. pentosaceus* TISTR 414 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MRS Soft Agar ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส โดยผสมเชื้อให้กระจายทั่วอาหารด้วย vortex mixer จากนั้นเทเชื้อที่ใช้ทดสอบแต่ละชนิดลงบนอาหาร BSM ที่บ่มแล้วข้างต้น โดยใช้เชื้อทดสอบหนึ่งเชื้อต่ออาหารหนึ่งจาน เกลี่ยอาหารที่มีเชื้อใช้ทดสอบให้ทั่วจาน นำจานเพาะเชื้อทั้งหมดไปบ่ม โดยจานเพาะเชื้อที่ใช้เชื้อทดสอบ *S.* Typhimurium DMST 0562 , *S. aureus* TISTR 118, *L. monocytogenes* DMST 11256, *P. fluorescens* DMST 20076, *E. coli* DMST 4212 และ *V. parahaemolyticus* SH1 นำไปบ่มในสภาพมีอากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนจานเพาะเชื้อที่มีเชื้อทดสอบ *L. plantarum* TISTR 050 และ *P. pentosaceus* TISTR 414 นำไปบ่มในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยสังเกตบริเวณโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ โคโลนีในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อทดสอบ แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบได้อย่างน้อยหนึ่งชนิด ถือว่าให้ผลบวกกับวิธีทดสอบ agar spot test จากนั้นคัดเลือกโคโลนีที่เกิดโซนใสมาทดสอบขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.4 การทดสอบคุณสมบัติการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

3.2.4.1 การทดสอบการผลิตเอนไซม์คะตะเลส

ทำการทดสอบโดยการเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตที่จะทดสอบจาก MRS slant มาแตะบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ลงไป สังเกตการเกิดฟองก๊าซที่เกิดขึ้นในทันที ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นในทันทีแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (ให้ผลบวก) แต่ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่ามีการผลิตเอนไซม์คะตะเลส (ให้ผลลบ)

3.2.4.2 การทดสอบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

การทดสอบเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสทำโดยวิธี agar plate method ตามวิธีการของ Miralles และคณะ (1996) โดยใช้อาหาร MRS Agar ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ความเข้มข้น 1 กรัมต่อลิตรในจานเพาะเชื้อ จากนั้นเจาะหลุมให้มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร แล้วปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบซึ่งเตรียมไว้ปริมาตร 30 ไมโครลิตรใส่ลงไปในหลุมนั้น นำไปบ่มในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลโดยราดสารละลายของ NIT 1 และ NIT 2 ในอัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ให้ท่วมผิวหน้าอาหาร MRS Agar ที่เติมโพแทสเซียมไนเตรต (KNO_3) ถ้ามีไนไตรต์จะเกิดสีแดงรอบหลุมที่ใส่สารแขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทำการทดสอบซึ่งแสดงถึงกิจกรรมของเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส

3.2.4.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส

ทำตามวิธีการของ Woft และ Hammes (1988) ซึ่งทำโดยถ่ายเชื้อสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสลงในอาหารเหลว Modified Nitrite MRS Medium บ่มในสภาพไร้อากาศที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งมีปริมาณเซลล์ 2.0×10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จากนั้นวิเคราะห์หาปริมาณไนไตรต์ลดลงตามวิธีการของ Kirk และ Sawyer (1991) ถ้ามีปริมาณไนไตรต์ลดลงแสดงว่ามีกิจกรรมของเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทส

3.2.4.4 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ก) การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริก

ทำการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 85 และการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกในอาหารเหลวชนิดเดียวกันที่ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 นอร์มอล โดยปรับพีเอชของอาหารเหลวที่เติมกรดทั้ง 2 จนได้ค่าพีเอชที่ต่างกัน 6 ระดับ ได้แก่ 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0 และ 5.0 การทดสอบทำได้โดยปิเปตอาหารเหลวดังกล่าวที่แต่ละระดับพีเอชปริมาตร 95 ไมโครลิตรต่อหลุม จากนั้นเติมสารแขวนลอยเซลล์ ลงไปในหลุมนั้นปริมาตร 5 ไมโครลิตรต่อหลุม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนบ่มด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงหลังบ่ม ถ้าค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้นมากกว่าแสดงว่ามีการเจริญของเชื้อเกิดขึ้น หาค่าพีเอชต่ำสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตเจริญได้

ข) การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์

ทำการทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์เช่นเดียวกับการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกและกรดไฮโดรคลอริก ต่างกันที่อาหารเหลวที่ใช้ทดสอบ คืออาหารเหลว MRS ที่เติมเกลือน้ำดีความเข้มข้นร้อยละ 0.3, 0.5, 1.0, 1.5 และ 3.0 สำหรับการทดสอบการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ใช้อาหารเหลว MRS ที่เติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 7.0, 8.0, 9.0, 10.0, 11.0 และ 12.0 หลังจากวัดค่าการดูดกลืนแสงก่อนบ่มและหลังบ่มเชื้อ หาค่าความเข้มข้นของเกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุดที่เชื้อแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้

3.2.4.5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลส (amino acid decarboxylase)

ก) การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกประมาณ 5-10 ครั้งลงในอาหารเหลว MRS ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน L-tyrosine, histidine monohydrochloride, ornithine monohydrochloride และ lysine monohydrochloride ชนิดละร้อยละ 0.1 และเติม pyridoxal-5-phosphate ร้อยละ 0.005 และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (Bover-Cid และ Holzapfel, 1999)

ข) อาหารสำหรับคัดแยกเชื้อ (Screening medium)

เตรียมอาหารแข็ง Decarboxylase Medium ซึ่งปรับ pH เป็น 5.3 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 21 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่จะทดสอบลากลงในอาหารแข็ง Decarboxylase Medium ที่เตรียมไว้ รวมทั้งลากลงบนอาหารแข็ง Decarboxylase Medium ที่ปราศจากกรดอะมิโน (ใช้เป็นตัวควบคุม) นำไปบ่มในโถไร้อากาศ (anaerobic jar) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ตรวจผลการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์เป็นสีม่วงหรือเกิดบริเวณใสรอบๆรอยลาก ถ้าเกิดการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์เป็นสีม่วงหรือเกิดบริเวณใสรอบๆรอยลาก แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีการสร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลสซึ่งอาจก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีน (Bover-Cid และ Holzapfel, 1999) โดยจะคัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ไม่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซีเลส

3.2.5 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

3.2.5.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติก โดยนำไอโซเลตซึ่งได้จากการคัดเลือกข้อ 3.2.4 มาย้อมแกรม โดยสเมียร์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตลงในหยดน้ำบนสไลด์ ตรึงเซลล์ด้วยความร้อนแล้วนำมาย้อมด้วยสีคริสตัลไวโอเลตให้ท่วมรอยสเมียร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นาน 1 นาที จากนั้นเอียงสไลด์เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำพร้อมกับหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นเทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ล้างสไลด์ด้วยน้ำพร้อมกับหยดเอธิลแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 ไล่สีออก ใช้เวลาไม่เกิน 20 วินาที ล้างน้ำซับให้แห้งและหยดสีซาฟรานินให้ท่วมรอยสเมียร์ทิ้งไว้ 1 นาที จากนั้นล้างน้ำแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรรศน์ตรวจดูรูปร่างการเรียงตัวและการติดสี

3.2.5.2 การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นสำหรับการจำแนกชนิดในระดับจีนัส

ก) การทดสอบการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส

นำอาหาร Gibson's Semi solid Tomato Juice Medium มาหลอมและทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส เติมสารแขวนลอยเซลล์ที่ได้เตรียมไว้ตามวิธีการในข้อ 3.2.3.1 ของแต่ละไอโซเลตปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรลงในอาหารผสมให้เข้ากัน เมื่ออาหารเริ่มแข็งตัวให้ปิดทับด้วยอาหาร Nutrient Agar (45 องศาเซลเซียส) ให้มีความหนาประมาณ 2-3 เซนติเมตร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นในอาหารหรืออาหารแยกตัวออกเป็น2 ชั้น แสดงว่ามีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลบวก) และถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้นในอาหารแสดงว่าไม่มีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลลบ)

ข) การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส

ปิเปตสารแขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่ได้เตรียมไว้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

ค) การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18

ปิเปตสารแขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่ได้เตรียมไว้ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS broth ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

ง) การทดสอบการเจริญของแบคทีเรียที่พีเอช 4.4 และ 9.6

ปิเปตสารแขวนลอยของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่ได้เตรียมไว้ ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS Broth ที่มีพีเอช 4.4 และ 9.6 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ) เมื่อได้ผลการทดสอบทุกทดสอบแล้ว นำไปเปรียบเทียบกับตารางคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก (Axelsson, 2004) ในหน้า 5

3.2.5.3 การศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

ทำการเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้องการทดสอบตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.1 โดยการปรับความขุ่นของแบคทีเรียแลคติกของแต่ละไอโซเลตให้มีความขุ่นให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 2 จากนั้นนำสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตปริมาตรที่จะทำให้ได้ระดับความขุ่นดังกล่าวใส่ลงในอาหาร API 50 CHL Medium (Bio Merieux, France) ที่มีปริมาตร 10 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากัน จากนั้นหยดสารแขวนลอยเชื้อจุลินทรีย์ที่ผสมกับอาหาร API 50 CH ลงในหลอด (tube) ทุกหลอดของAPI 50 CH Strips ซึ่งแบ่งได้เป็น 5 ชุดย่อย คือ strips 0-9, 10-19, 20-29, 30-39, 40-49 รวมทั้งหมด 50 หลอด โดยแต่ละหลอดประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ได้แก่ 1) หลอดที่ 0-9 ประกอบด้วย control, Glycerol (GLY), Erythritol (ERY), D-Arabinose (DARA), L-Arabinose (LARA), D-Ribose (RIB), D-Xylose (DXYL), L-Xylose (LXYL), D-Adonitol (ADO), Methy-D-Xylopyranoside (MDX) ตามลำดับ 2) หลอดที่ 10-19 ประกอบด้วย D-galactose (GAL) D-Galactose (GLU), D-Fructose (FRU), D-Mannose (MNE), L-Sorbose (SBE), L-Rhamnose (RHA), Dulsitol (DUL), Inositol (INO), D-Mannitol (MAN), D-Sorbitol (SOR) 3) หลอดที่ 20-29 Methyl-αD-Mannopyranoside (MDM), Methyl-αD-Glucopyranoside (MDG), N-Acetylglucosamine (NAG), Amyldalin (AMY), Arbitin (ARB), Esuculin ferric citrate (ESC), Salicin (SAL), D-Celibiose (CEL), D-Moltose (MAL), D-lactose (bovine origin) (LAC) 4) หลอดที่ 30-39 ประกอบด้วย D-Melibiose (MEL), D-Saccharose (sucrose, SAG), D-Trehalose (TRE), Inulin (INU), D-Melezitose (MLZ), D-Raffinose (RAF), Amidon (starch) (AMD), Glycogen (GLYG), Xyliyol (XLT), Genitiobiose (GEN) 5) หลอดที่ 40-49 ประกอบด้วย D-Turanose (TUR), D-Lyxose (LYX), D-Tagatose (TAG), D-fucose (DFUC), L-fucose (LFUC), D-Arabinose (DARL), L-Arabinose (LARL), Potassium Gluconate (GNT), Potassium 2-Ketogluconate (2KG) และ Potassium 5-Ketogluconate (5KG) ตามลำดับ โดยหยดสารแขวนลอยเชื้อผสมกับอาหารเหลวดังกล่าวให้มีระดับอยู่ที่ขอบหลอด เอียง strips เล็กน้อยแตะลงบน cupule เพื่อป้องกันการเกิดฟอง ทำซ้ำจนครบทั้ง 50 หลอด และหยด mineral oil ปิดทับทุกหลอดเพื่อทำให้มีสภาพมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย จากนั้นนำ strips แต่ละอันมาวางลงในถาดรังผึ้งที่เติมน้ำกลั่นเพื่อให้เกิดความชื้น และปิดด้วยฝาครอบและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลง ถ้าอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแสดงว่าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) แต่หลอดที่ 25 ซึ่งเป็นสาร Esuculin และ Ferric citrate อาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ แสดงว่าเกิดการหมัก (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่เปลี่ยนสี แสดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ว่าไม่เกิดการหมัก (ให้ผลลบ) บันทึกผลการทดลอง และนำผลการทดลองที่ได้ไปเข้าโปรแกรม API Identification Software (Bio Merieux, France)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางเคมีของปลาสดและแหนมปลา

จากการศึกษาคุณลักษณะทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช a_w และปริมาณไนไตรต์ตกค้างในตัวอย่างปลาสดและแหนมปลา พบว่าปลาสดจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิล ปลาตะเพียน ปลาหมอและปลาทับทิม ซึ่งแต่ละสายพันธุ์จะทำการศึกษาส่วนเหงือกปลา ท้องปลาและเนื้อปลา ซึ่งส่วนเหงือกปลาแต่ละสายพันธุ์มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.33-6.89 โดยมีค่าเฉลี่ยคือ 6.61 ส่วนท้องปลาแต่ละสายพันธุ์มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.01-6.41 โดยมีค่าเฉลี่ยคือ 6.21 ส่วนเนื้อปลาแต่ละสายพันธุ์มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 6.40-6.84 โดยมีค่าเฉลี่ยคือ 6.62 ซึ่งพบว่าส่วนท้องปลามีค่าพีเอชเฉลี่ยต่ำที่สุด ส่วนแหนมปลามีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.56-5.84 โดยมีค่าเฉลี่ยคือ 5.20 ซึ่งมีค่าต่ำกว่าปลาสด (ตารางที่ 4.1) และค่า a_w ของแหนมปลามีค่าอยู่ในช่วง 0.971-0.978 โดยมีค่าเฉลี่ยคือ 0.975 และปริมาณไนไตรต์ตกค้างที่พบในแหนมปลาที่สุ่มตัวอย่างมาตรวจพบว่าอยู่ในช่วง 0-155.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม

จากผลการทดลองการที่ปลาสดมีพีเอชค่อนข้างเป็นกรด อาจเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงของกล้ามเนื้อสัตว์ภายหลังจากสัตว์ตาย โดยกล้ามเนื้อจะทำงานภายใต้สภาวะไม่มีอากาศจึงทำให้ไพรูเวตที่เกิดขึ้นจากกระบวนการไกลโคไลซีสถูกเปลี่ยนไปเป็นกรดแลคติก ซึ่งต่อมาอาจแทรกซึมเข้าสู่เนื้อเยื่ออื่นและถูกนำไปโดยระบบหมุนเวียนโลหิตเพื่อสร้างเป็นไกลโคเจน โดยประมาณร้อยละ 80 ไกลโคเจนจะถูกเปลี่ยนต่อไปเป็นกรดแลคติก ปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้นจะมากหรือน้อยเพียงใดจะขึ้นอยู่กับสภาวะร่างกาย การอดอาหาร การพักผ่อนและความเครียดของสัตว์ก่อนที่จะถูกฆ่า โดยปริมาณกรดแลคติกที่เกิดขึ้นนั้นจะมีผลต่อการลดลงของค่าความเป็นกรด-ด่าง (ค่าพีเอช) ในกล้ามเนื้อ ซึ่งสามารถแบ่งได้ 3 กรณี คือ ค่าพีเอชลดลงปกติ ลดลงเล็กน้อยและลดลงมาก สำหรับปลาสดพบว่าหลังการตายค่าพีเอชลดลงเพียงเล็กน้อย คือกล้ามเนื้อจะมีค่าพีเอชประมาณ 6.5-6.8 ในเวลา 24 ชั่วโมงหลังสัตว์ตาย การสะสมกรดแลคติกเป็นจำนวนมากในช่วงแรกหลังสัตว์ตายนั้นจะสามารถส่งผลถึงคุณภาพของเนื้อได้ เนื่องจากการมีกรดแลคติกมากขึ้นจะทำให้สภาวะของเนื้อมีความเป็นกรดสูง ขณะที่อุณหภูมิของซากสูงขึ้นจะทำให้โปรตีนของกล้ามเนื้อเกิดการเสียสภาพทางธรรมชาติไป โปรตีนจะสูญเสียความสามารถในการละลาย (solubility) สูญเสียความสามารถในการจับน้ำและสูญเสียความเข้มของรงควัตถุที่เป็นตัวกำหนดสีของเนื้อ จึงทำให้เนื้อมีสีที่ไม่ต้องการได้ การเสียสภาพทางธรรมชาติของเนื้อปลานั้นขึ้นอยู่กับระดับของอุณหภูมิและระดับการลดลงของค่าพีเอชแต่อุณหภูมิจะมีผลต่อการเสียสภาพทางธรรมชาติมากกว่าค่าพีเอช (นฤมล, 2550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับปริมาณไนไตรต์ตกค้างที่พบในแหนมปลาที่สุ่มจากตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดสมุทรปราการ พบว่าอยู่ในระดับที่ยอมรับได้ตามมาตรฐานอุตสาหกรรมแหนมกำหนดไว้คือโซเดียมไนไตรต์ไม่เกิน 125 กรัมต่อกิโลกรัมแหนม ส่วนโซเดียมไนเตรตไม่เกิน 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม (มอก.1216, 2537) หากบริโภคในปริมาณมากเกินจะเป็นพิษแก่ร่างกาย เพราะอาจทำให้เกิดสารประกอบเอมีนได้เป็นสารไนโตรซามีนซึ่งเป็นสารเคมีที่ทำให้เกิดมะเร็งได้ โดย เฉพาะสารไนไตรต์มีพิษแรงกว่าไนเตรต เมื่อซึมผ่านลำไส้เข้าสู่กระแสโลหิตแล้วจะไปออกซิไดส์ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงกลายเป็นเมทไมโอโกลบิน (methmyoglobin) ซึ่งจะทำให้เม็ดเลือดนั้นหมดสภาพไม่สามารถลำเลียงออกซิเจนได้อีก ไนไตรต์ที่ถูกดูดซึมร้อยละ 30-40 จะถูกขับถ่ายโดยไม่เปลี่ยนแปลงออกไปกับสภาวะปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่สำคัญที่สุดที่เกิดขึ้นในร่างกายคือการเปลี่ยน hemoglobinไปเป็น methmyoglobin ทำให้รงควัตถุชนิดนี้ไม่สามารถทำหน้าที่เป็นตัวพาออกซิเจนได้อีก สำหรับคนปริมาณไนไตรต์ที่ทำให้ถึงแก่ความตาย คือ 0.18-2.5 กรัม (อรอนงค์, 2548)

4.2 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์และคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

4.2.1 การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในปลาสดจำนวน 4 สายพันธุ์และแหนมปลา และการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น

จากการวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของปลาสดจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิล ปลาทับทิม ปลาตะเพียน และปลาหมอ โดยศึกษาเฉพาะส่วนของท้องปลา เหงือกปลา และเนื้อปลา และแหนมปลาซึ่งสุ่มตัวอย่างมาจากตลาดสดในกรุงเทพมหานครและจังหวัดสมุทรปราการทั้งหมด 140 ตัวอย่าง ได้ผลดังตารางที่ 4.1 พบว่าปลานิลมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุด คืออยู่ในช่วง 1.5×10^3-2.2×10^6 CFUต่อกรัม ส่วนปลาทับทิมมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยที่สุด คืออยู่ในช่วง 1.2×10^3-1.1×10^6 CFUต่อกรัม สำหรับในตัวอย่างปลาสดของแต่ละสายพันธุ์พบว่าบริเวณเหงือกปลามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 1.2×10^3-1.6×10^6 CFUต่อกรัม บริเวณท้องปลามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 1.4×10^4-2.2×10^6 CFUต่อกรัม และเนื้อปลามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 1.5×10^3-1.3×10^6 CFUต่อกรัม พบว่าบริเวณท้องปลามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุด ส่วนแหนมจำนวน 20 ตัวอย่างที่ทำการวิเคราะห์ แบ่งเป็นแหนมที่สุ่มตัวอย่างจากตลาดสดและแหนมที่ได้ผลิตเอง โดยแหนมที่สุ่มมาจากตลาดสดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 6.5×10^4-1.3×10^6 CFUต่อกรัม และแหนมที่ผลิตเองมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 1.8×10^5-2.1×10^6 CFUต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 230 ไอโซเลต ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากปลาสด 4 สายพันธุ์ แบ่งเป็นเหงือกปลา 45 ไอโซเลต ท้องปลา 80 ไอโซเลต และเนื้อปลา 64 ไอโซเลต และเป็นเชื้อที่แยกได้จากแหนมที่สุ่มตัวอย่างจากตลาดสด 19 ไอโซเลต และแหนมผลิตเอง 22 ไอโซเลต (ตารางที่ 4.1) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้มีจำนวนทั้งสิ้น 37 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 16.1 ของจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้งหมด เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ/หรือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 มีจำนวน 24 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 64.9 ของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งได้ทั้งหมด โดยทั้ง 24 ไอโซเลตที่สร้างสารยับยั้งแยกได้จากปลาสด 20 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AGF33, AGT 21, AGT 28, AMF 26, AMT 21, AST 42, BGT110, BMT13, BMT31, OGF25, OMF15, RGF28, RGS35, RMF17, RSF24 , RST24 และ RSS110 แหนมจากตลาดสด 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NS11, NS12 และ NT310 และแหนมทำเอง 1 ไอโซเลต คือไอโซเลต TNF19 ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ *S. aureus*, *S.* Typhimurium, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. fluorescens* และ *V. parahaemolyticus* โดยยับยั้งได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์มี 19 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 51.4 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งได้ทั้งหมด โดยทั้ง 19 ไอโซเลตที่สร้างสารยับยั้งแยกได้จากปลาสด 16 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AGF29, AGT21, AMF24, AMF25, AMT21, ASS210, BGF44, BGT110, BMT31, OMF79, OSF69, OSF99, RSF14, RST26, RSS25 และ RSS310 แหนมจากตลาดสด 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต NS62 และไอโซเลต NT310 และแหนมทำเอง 1 ไอโซเลตคือ ไอโซเลต TNF 18

จากผลการทดลองที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกในปลาสดแต่ละสายพันธุ์ พบว่าปลานิลมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุด คืออยู่ในช่วง 1.5×10^3-2.2×10^6 CFUต่อกรัม อาจเป็นเพราะปลานิลมีแหล่งที่อยู่อาศัย และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก โดยปลานิลสามารถทนต่อความเค็มได้ถึง 20 พีพีที ทนต่อค่าความเป็นกรดเป็นด่างได้ดีที่ช่วง 6.5-8.3 และทนต่ออุณหภูมิได้ถึง 40 องศาเซลเซียส อาจเป็นไปได้ว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในปลาสดแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณแตกต่างกันนั้นขึ้นกับนิเวศวิทยาของปลา เช่น แหล่งน้ำที่อยู่อาศัย (ปลาน้ำจืด ปลาทะเล) การกินอาหาร เป็นต้น (นฤมล, 2550) Bucio และคณะ (2006) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก lactobacilli จากลำไส้ของปลาน้ำจืดที่อาศัยในแม่น้ำและจากฟาร์มที่เลี้ยงด้วยระบบน้ำวน พบว่าปลาที่กินสัตว์และพืชเป็นอาหาร (Omnivonous) มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากถึง 9.16 log CFUต่อกรัม และเมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่อาศัยอยู่ในเขตฤดูร้อน ฤดูใบไม้ร่วง และฤดูหนาวพบว่าปลาในเขตฤดูร้อนมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุดคืออยู่ใน ช่วง 4.75-9.02 log CFUต่อกรัม ส่วนปลาที่อยู่ในเขตฤดูหนาวมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยที่สุดคืออยู่ในช่วง 2.0-7.03 log CFUต่อกรัม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในส่วนต่าง ๆ ของปลาสด พบว่าบริเวณท้องของปลาสดแต่ละสายพันธุ์มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากที่สุดคืออยู่ในช่วง 1.4×10^4- 2.2×10^6 CFUต่อกรัม อาจเป็นเพราะบริเวณท้องปลามีระบบทางเดินอาหารของปลา เช่น ลำไส้เล็ก ลำไส้-ใหญ่ กระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ Verchuere และคณะ (2000) กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสำคัญเพราะเป็นเชื้อประจำถิ่นในลำไส้ปลา ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Bucio และคณะ (2006) ซึ่งได้รายงานว่าในปลาจากแม่น้ำและฟาร์มเลี้ยงปลาในเขตต่างๆของประเทศเนเธอร์แลนด์ (จำนวน 102 ตัวอย่าง) มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก lactobacilli จำนวนมาก ซึ่งพบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในลำไส้ของปลาปริมาณ 10^2-10^8 CFUต่อกรัม เช่นเดียวกับการทดลองของ Ringø และคณะ (2003) ซึ่งได้ทำการศึกษาเชื้อประจำถิ่นในระบบทางเดินอาหารของปลาพบว่าในบริเวณท้องปลามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก 2×10^4-10^5 CFUต่อกรัม นอกจากนี้ Kim และ Austin (2008) ได้ทำการศึกษาการแยก *Carnobacterium maltaromaticum* และ *C. divergens* จากลำไส้ปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อน ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

สำหรับแหนมปลาที่สุ่มมาจากตลาดและแหนมปลาที่ทำเองพบว่า มีจำนวนแบคทีเรียกรด-แลคติกในแหนมปลาปริมาณ 10^4-10^6 CFUต่อกรัม แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบอาจเกิดจากการปนเปื้อนมากับเนื้อปลาที่ใช้เป็นวัตถุดิบ รวมทั้งส่วนผสมอื่นๆ และอาจติดอยู่กับเครื่องมือที่ใช้ในการผลิต แหนมปลาเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่เกิดจากการหมักตามธรรมชาติ แบคทีเรียกรดแลคติกจึงมีบทบาทสำคัญมากในกระบวนการหมัก นอกจากนี้ในผลิตภัณฑ์อาจมีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกลงไปเพื่อให้กระบวนการหมักเกิดขึ้นได้รวดเร็วขึ้น และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาได้อีกด้วย แบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมนำมาทำเป็นกล้าเชื้อ ได้แก่ Lactobacilli และ Pediococci (Hammes และคณะ, 1986) เช่นเดียวกับรายงานของ Gelman และคณะ (2001) ได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก lightly preserved herring products พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 10^5-10^6 CFUต่อกรัม โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้มีจำนวน 23 ไอโซเลต ส่วนใหญ่เป็นเชื้อ *Lactobacillus* spp. และ *Leuconostoc* spp. เช่นเดียวกับการทดลองของ Riebroy และคณะ (2008) ซึ่งได้ทำการศึกษาการเติมกล้าเชื้อลงในปลาส้มฟัก พบว่า *Pediococcus acidilactici* ที่เติมเชื้อลงไปจำนวน 10^4 CFUต่อกรัม มีความเหมาะสมในการนำมาทำเป็นกล้าเชื้อเนื่องจากเกิดการหมักอย่างรวดเร็วและผลิตกรดแลคติกเป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับปลาส้มฟักที่ไม่ได้ทำการเติม *Pediococcus acidilactici*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 การวิเคราะห์คุณภาพทางจุลินทรีย์ของปลาสดและแหนมปลา และการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	ค่าพีเอช	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)	จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	จำนวนไอโซเลตที่ยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด
ปลานิล					
เหงือกปลา	10	6.35-6.89	$1.5x10^3$ - $1.6x10^6$	9	1
ท้องปลา	10	6.01-6.27	$1.4x10^4$ - $2.2x10^6$	14	2
เนื้อปลา	10	6.40-6.84	$2.4x10^3$-$1.1 x10^6$	14	3
ปลาทับทิม					
เหงือกปลา	10	6.33-6.51	$1.2 x10^3$ - $8.1 x10^5$	3	2
ท้องปลา	10	6.18-6.39	$1.9 x10^4$ - $1.1 x10^6$	30	6
เนื้อปลา	10	6.49-6.73	$1.5 x10^3$ - $1.0 x10^6$	20	1
ปลาตะเพียน					
เหงือกปลา	10	6.69-6.89	$4.7 x10^4$ - $1.4 x10^6$	14	2
ท้องปลา	10	6.10-6.24	$1.6 x10^4$ - $8.5 x10^4$	20	1
เนื้อปลา	10	6.50-6.71	$1.4 x10^4$ - $1.3 x10^6$	16	2
ปลาหมอ					
เหงือกปลา	10	6.75-6.87	$4.3 x10^4$ -$5.2 x10^5$	9	4
ท้องปลา	10	6.30-6.41	$1.4 x10^4$ - $1.4 x10^6$	16	3
เนื้อปลา	10	6.67-6.79	$3.2 x10^3$ - $4.7 x10^5$	14	4
แหนมปลา[a]	10	5.12-5.84	$6.5 x10^4$ - $1.3 x10^6$	19	5
แหนมปลา[b]	11	4.56-5.14	$1.8 x10^5$ - $2.1 x10^6$	22	2
รวม	141			230	37

[a] ตัวอย่างที่สุ่มจากตลาด

[b] ตัวอย่างที่ผลิตเองซึ่งมีการเติมโซเดียมไนไตรต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถยับยั้งเชื้อ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ได้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตสารประกอบที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ Østergaard และคณะ (1998) กล่าวว่าแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตสารประกอบหลายชนิดที่มีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน Østergaard และคณะ (1998) จึงได้แยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้ง *Listeria* sp. จากผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทย โดยใช้วิธี agar well diffusion ซึ่งแยกได้ 44 สายพันธุ์ มี 43 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้ง *Listeria monocytogenes* แบคทีเรียทั้งหมด 44 สายพันธุ์ ที่แยกได้นั้น สามารถยับยั้งทั้ง *Vibrio cholerae* และ *V. parahaemolyticus* และ 37 สายพันธุ์ สามารถยับยั้ง *Aeromonas* sp. ที่เป็นแบคทีเรียก่อโรคในปลา เช่นเดียวกับการทดลองของ Jamuna และ Jeevaratnam (2004) ได้แยกแบคทีเรียกรด-แลคติกจากอาหารหมักดั้งเดิม เช่น แตงกวาดอง โดยเชื้อที่แยกได้คือ *Lactobacillus acidophilus* และ *L. casei* ซึ่งเป็นแบคทีเรียโพรไบโอติก โดยเชื้อทั้ง 2 ชนิด สามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ในช่วงกว้าง ซึ่งแบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นนั้นสามารถต้านกิจกรรมของ *Listeria*, *Clostridium*, *Pseudomonas* และ *E. coli* นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคเทอริโอซินจากแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษได้ เช่น *Bacillus cereus*, *Clostridium botulinum*, *L. monocytogenes* และ *S. aureus* โดยสมใจและคณะ (2550) ได้ศึกษาสมบัติเบื้องต้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* FFL 17-2 พบว่าสามารถยับยั้ง *L. sakei*, *L. plantarum*, *P. pentosaceus*, *B. cereus* และ *L. monocytogenes* ได้อีกด้วย แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ได้ โดยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้ เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดส์ที่มีฤทธิ์รุนแรงต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยสารนี้จะออกซิไดส์ส่วนประกอบของเซลล์ที่มีหมู่ซัลไฮดริล (sulhydryl) นอกจากนี้ในปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขนส่งออกซิเจน สาเหตุนี้จึงทำให้เกิดสภาวะขาดออกซิเจนส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถเจริญได้ ไดอะซิล (diacetyl) โดยไดอะซิติลนั้นจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค และทำให้อาหารเกิดการเน่าเสียได้ ดังนั้นผลการยับยั้งของสารในกลุ่มนี้จะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบ ยีสต์และรามากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก ส่วนคาร์บอนไดออกไซด์ การผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์โดยแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ เนื่องจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะทำให้เกิดสภาพไร้อากาศโดยการแทนที่โมเลกุลของออกซิเจน จึงทำให้พีเอชทั้งภายในและภายนอกเซลล์ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าคาร์บอนไดออกไซด์มีผลทำลายเยื่อหุ้มเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

จากผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนเตรตรีดักเทส ไนไตรต์รีดักเทสและอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส (เพื่อคัดเลือกเชื้อที่จะไม่ทำให้เกิดการสะสมของไบโอเจนิกเอมีนของแบคทีเรียกรดแลคติก) ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ทั้งหมด 37 ไอโซเลต พบว่าไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสและไนไตรต์รีดักเทสได้ สำหรับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสได้มี 5 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต AMF19 แยกจากปลาหมอ ไอโซเลต BGT110 และไอโซเลต BMT31 แยกจากปลาตะเพียน ไอโซเลต RSS25 และไอโซเลต RST24 แยกจากปลาทับทิม คิดเป็นร้อยละ 13.51 ของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่สร้างสารยับยั้งได้ และการทดสอบเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่จะไม่ทำให้เกิดการสร้างและสะสมไบโอเจนิกเอมีน (Biogenic amine) ในอาหาร ทำได้โดยการคัดเลือกไอโซเลตที่ไม่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์-บอกซิเลสซึ่งพบว่ามีเพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้นคือ ไอโซเลต OMF79 ที่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส

การศึกษาการทดสอบนี้พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกทุกไอโซเลตไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสจะเป็นตัวกลางในการสลายไฮโดรเจนเปอร์-ออกไซด์ ซึ่งแบคทีเรียที่เจริญในสภาพมีอากาศและแบคทีเรียที่เจริญได้ทั้งสภาพมีอากาศและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) โดยส่วนใหญ่จะมีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสร่วมกับเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส ซึ่งจะทำให้เกิดการสลายขององค์ประกอบสารพิษที่มาจากออกซิเจน โดยปกตินั้นจะไม่พบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสในแบคทีเรียที่ชอบเจริญในสภาวะที่มีอากาศอย่างแท้จริง (strict anaerobe) รวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติก อย่างไรก็ตามยังมีแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสที่แท้จริงหรือเอนไซม์ซูโดคะตะเลส (pseudocatalase) ได้ (Dominic, 1995)

สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 5 ไอโซเลตที่สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดัก-เทสนับว่ามีความสำคัญมาก เนื่องจากเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทสสามารถช่วยปรับปรุงสีและกลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ได้ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจะรีดิวส์ไนเตรตเป็นไนไตรต์ และพบว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่ก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีน (biogenic amine) ในอาหารหมักไบโอเจนิก-เอมีนส่วนใหญ่เกิดขึ้นในอาหาร โดยจุลินทรีย์ทำปฏิกิริยา decarboxylation ของกรดอะมิโนและปฏิกิริยา transamination ของอัลดีไฮด์ และคีโตน (Askar และ Treptow, 1986) Halasz และคณะ (1994) กล่าวว่าแบคทีเรียบางชนิดที่มีการสร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลสซึ่งจะกระทำกับกรดอะมิโนอิสระในกล้ามเนื้อปลาในระหว่างเน่าเสีย ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Brink และคณะ (1990) ที่กล่าวว่ากล้ามเนื้อปลาสามารถสนับสนุนแบคทีเรียหลายกลุ่มสร้างสารประกอบเอมีนจากปฏิกิริยาการดึงหมู่คาร์บอกซิลจากกรดอะมิโน (decarboxylation of amino acid) ผู้บริโภคที่ได้รับไบโอเจ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นิกเอมีนเข้าไปในร่างกายในปริมาณมากอาจทำให้เกิดอาการคลื่นไส้ (nausea) ตื่นตัว (hot flushes) เหงื่อออกมาก (cold sweat) หัวใจเต้นแรง (palpitation) ปวดหัว (headaches) อารมณ์ฉุนเฉียว (red rash) ความดันเลือดสูงหรือต่ำ (high or low blood pressure) (Mohamed และคณะ, 2009)

4.2.3 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดี และเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

จากการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากปลาสายพันธุ์ต่างๆ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต AMF19 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดแลคติกระดับพีเอชต่ำสุด คือพีเอช 1.5 ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดไฮโดรคลอริกระดับพีเอชต่ำสุดที่ 1.5 ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงสุดคือ ร้อยละ 3.0 และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุด คือร้อยละ 12.0 มีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต BGT110, BMT31, RST24 และ RSS25 (ตารางที่ 4.2)

ตารางที่ 4.2 การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ไอโซเลต	แหล่งที่มาของไอโซเลต	พีเอช[a]ของกรดแลคติก	พีเอช[a]ของกรดไฮโดรคลอริก (%w/v)	ความเข้มข้นของเกลือน้ำดี[b] (%w/v)	ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์[b]
AMF19	เนื้อปลาหมอ	1.5	2.5	1.5	11.0
BGT110	เหงือกปลาตะเพียน	2.0	1.5	3.0	12.0
BMT31	เนื้อปลาตะเพียน	2.5	1.5	3.0	12.0
RST24	ท้องปลาทับทิม	2.5	1.5	3.0	12.0
RSS25	ท้องปลาทับทิม	3.0	1.5	3.0	12.0

[a] ระดับพีเอชต่ำสุดที่สามารถเจริญได้

[b] ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่สามารถเจริญได้

จากการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้จากปลาสายพันธุ์ต่างๆ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต AMF19 และไอโซเลต BGT110 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRSที่มีกรดแลคติกระดับพีเอชต่ำสุด คือ 1.5 และ 2.0 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติกอีก 3 ไอโซเลต แบคทีเรียกรดแลคติก 4 ใน 5 ไอโซเลตที่คัดเลือกมาทดสอบสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดไฮโดรคลอริกระดับพีเอชต่ำสุดที่ 1.5 และเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือน้ำดีความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือร้อยละ 3.0 นอกจากนี้ยังเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นสูงสุดที่ทดสอบคือร้อยละ 12.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ยกเว้นไอโซเลต AMF19 ที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดไฮโดรคลอริกระดับพีเอชสูงกว่า คือ 2.5 และเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือน้ำดีและเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นต่ำกว่า คือร้อยละ 1.5 และ 11.0 ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2)

จากผลการทดสอบการทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดี และเกลือโซเดียมคลอไรด์ พบว่าเชื้อที่น่าจะมีคุณลักษณะเหมาะสมนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อ ได้แก่ ไอโซเลต BGT110 เนื่องจากเชื้อไอโซเลตนี้ทนต่อเกลือน้ำดีและโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นสูงสุด คือ ร้อยละ 3.0 และร้อยละ 12.0 ตามลำดับ และยังทนต่อสภาพที่มีกรดไฮโดรคลอริกต่ำสุดคือ พีเอช 1.5 และทนต่อสภาพที่มีกรดแลคติกที่พีเอชค่อนข้างต่ำคือที่พีเอช 2.0 ดังนั้นจึงได้คัดเลือกไอโซเลต BGT110 ไปจำแนกชนิดถึงระดับสปีชีส์ ตามรายงานของ Mattila-Sandholm และคณะ (2002) กล่าวว่าแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติของโพรไบโอติกซึ่งเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพของมนุษย์ต้องมีความสามารถทนต่อกรดและเกลือน้ำดีได้สูง เพื่อที่จะสามารถอยู่รอดได้ขณะเคลื่อนที่ผ่านกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก (duodenum) โดยต้องมีความสามารถในการเกาะติดบริเวณผนังลำไส้ มีรายงานว่า *Lactobacillus plantarum* ทั้งสายพันธุ์ที่แยกได้จากลำไส้ และสายพันธุ์ที่แยกได้จากอาหารหมักมีความสามารถสูงในการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกได้ (พีเอช 2.0) และเกลือน้ำดีที่เผชิญได้อย่างต่อเนื่อง (Haller และคณะ, 2001) De Smet และคณะ (1995) กล่าวว่าความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.3 ใช้สำหรับคัดเลือกแบคทีเรียโพรไบโอติกในมนุษย์ (human probiotics) นอกจากนี้ความสามารถในการทนเกลือน้ำดียังเกี่ยวข้องกับการที่แบคทีเรียมีกิจกรรมของเอนไซม์ bile salt hydrolase อีกด้วย มีรายงานว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus fermentum* ค่อนข้างมีความต้านทานสูงต่อสภาพพีเอชต่ำ โดยอยู่รอดได้หลังจากเผชิญกับสภาพพีเอชต่ำอยู่ในช่วง 2.5-6.5 เป็นเวลานาน 1.5 ชั่วโมง แต่ไม่สามารถอยู่รอดได้ที่พีเอช 1.0-2.0 ยกเว้น *L. plantarum* สามารถทนต่อพีเอช 2.0 ได้เล็กน้อย (Balcázar และคณะ, 2008) จากการรายงานของ Liu และคณะ (2007) กล่าวว่าโดยทั่วไปน้ำย่อยในกระเพาะอาหารมีค่าพีเอชเท่ากับ 0.9 แต่การมีอาหารอยู่ในกระเพาะทำให้ค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเป็น 3.0 ปริมาณเกลือน้ำดีในลำไส้เล็กของมนุษย์เท่ากับ 0.33 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเป็นเหตุผลที่เลือกความเข้มข้นเกลือน้ำดีเฉลี่ยร้อยละ 0.3 มาใช้ในการทดสอบความสามารถของเชื้อในการทนต่อเกลือน้ำดี อย่างไรก็ตามความเข้มข้นเกลือน้ำดีร้อยละ 0.1 และ 0.2 มีอิทธิพลน้อยมากต่อแบคทีเรียที่ทำการทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสายพันธุ์ต่างๆ และแหนมปลา

4.2.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสายพันธุ์ต่างๆ จึงได้ทำการคัดเลือกไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตอาหารหมัก คือสามารถยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้ สามารถสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส และ/หรือสร้างเอนไซม์ไนไตร์ตรีดักเทส ไม่ก่อให้เกิดไบโอเจนิกเอมีนและสามารถทนกรด เกลือและน้ำดีที่ระดับความเข้มข้นสูงได้ ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ BGT110, BMT31, AMF19, RST24 และ RSS25 นำมาศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาพบว่าทุกไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไอโซ-เลต AMF19, RST24 และ RSS25 มีรูปร่างกลม ยกเว้นไอโซเลต BGT110 และ BMT31 ที่มีรูปร่างท่อน และจากการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตมีรูปร่างกลมนูน ขอบโคโลนีมีลักษณะเกลี้ยง ไม่มีรอยเว้า ผิวโคโลนีมีลักษณะเกลี้ยง โคโลนีของไอโซเลต AMF19, RST24 และ RSS25 มีสีขาว ยกเว้นไอโซเลต BMT31 และ BGT110 ที่โคโลนีมีสีครีม ดังตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.3 คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสายพันธุ์ต่างๆ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	ผลการตรวจสอบแบคทีเรียกรดแลคติก				
	BGT110	BMT31	AMF19	RST24	RSS25
การย้อมแกรม	แกรมบวก	แกรมบวก	แกรมบวก	แกรมบวก	แกรมบวก
รูปร่างเซลล์	ท่อน	กลม	กลม	กลม	ท่อน
ลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง					
- รูปร่าง	กลมนูน	กลมนูน	กลมนูน	กลมนูน	กลมนูน
- ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง(มม.)	1	1.5	1	1	1.5
- สีโคโลนี	ครีม	ครีม	ขาว	ขาว	ขาว
- ผิวโคโลนี	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.4.2 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับจีนัส

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดสายพันธุ์ต่างๆ ทั้ง 5 ไอโซเลต ได้แก่ BGT110, BMT31, AMF19, RST24 และ RSS25 พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลตไม่มีการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส จากการทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่ามีเฉพาะไอโซเลต RST24 และ RSS25 เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และพบว่ามีเฉพาะไอโซเลต BMT31, BGT110 และ AMF19 เท่านั้นที่สามารถเจริญในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 แต่ในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 18 ไม่มีไอโซเลตใดที่สามารถเจริญได้ สำหรับการทดสอบการเจริญที่พีเอช 4.4 พบว่าทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ ส่วนการทดสอบการเจริญที่พีเอช 9.6 พบว่ามีเฉพาะเชื้อไอโซเลต RST24 และ RSS25 เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ที่สภาวะนี้

ตารางที่ 4.4 คุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดและแหนมปลา

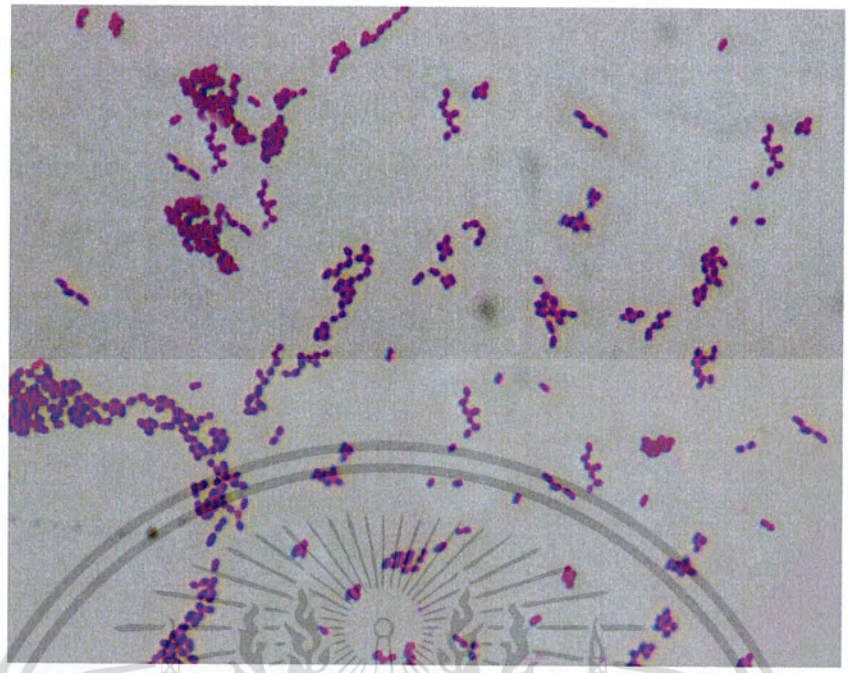
คุณสมบัติทางชีวเคมี	ผลการตรวจสอบแบคทีเรียกรดแลคติก				
	AMF 19	BMT 31	BGT 110	RST 24	RSS 25
การสร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	-	-	-	-
การเจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส	-	-	-	+	+
การเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	+	+	+	+	+
การเจริญที่โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5	+	+	+	-	-
การเจริญที่โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 18	-	-	-	-	-
การเจริญที่ค่าพีเอช 4.4	+	+	+	+	+
การเจริญที่ค่าพีเอช 9.6	-	-	-	+	+

- ไม่เกิดความขุ่น หรือไม่มีการเจริญ

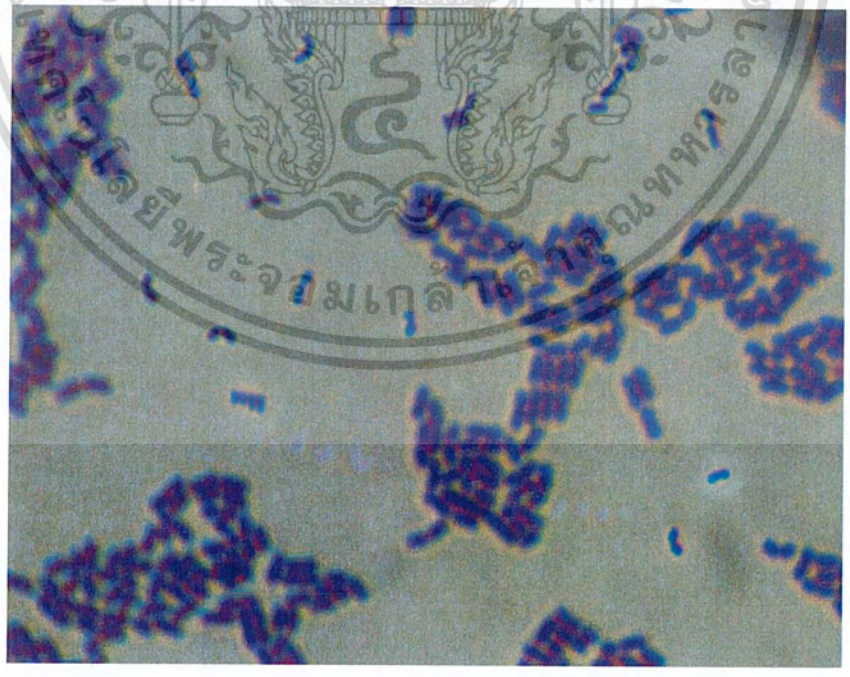
+ เกิดความขุ่น หรือมีการเจริญ

จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในระดับจีนัส จากนั้นทำการเปรียบเทียบคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกตาม Axelsson (2004) พบว่า ไอโซเลต AMF 19 น่าจะเป็นจีนัส *Pediococcus* (รูปที่ 4.1) ส่วนไอโซเลต BGT 110 และ RSS 25 น่าจะเป็นจีนัส *Lactobacillus* (รูปที่ 4.2 และ 4.3 ตามลำดับ) และอีก 2 ไอโซเลต ได้แก่ BMT 31 และ RST 24 น่าจะเป็นจีนัส *Enterococcus* (รูปที่ 4.4 และ 4.5 ตามลำดับ)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

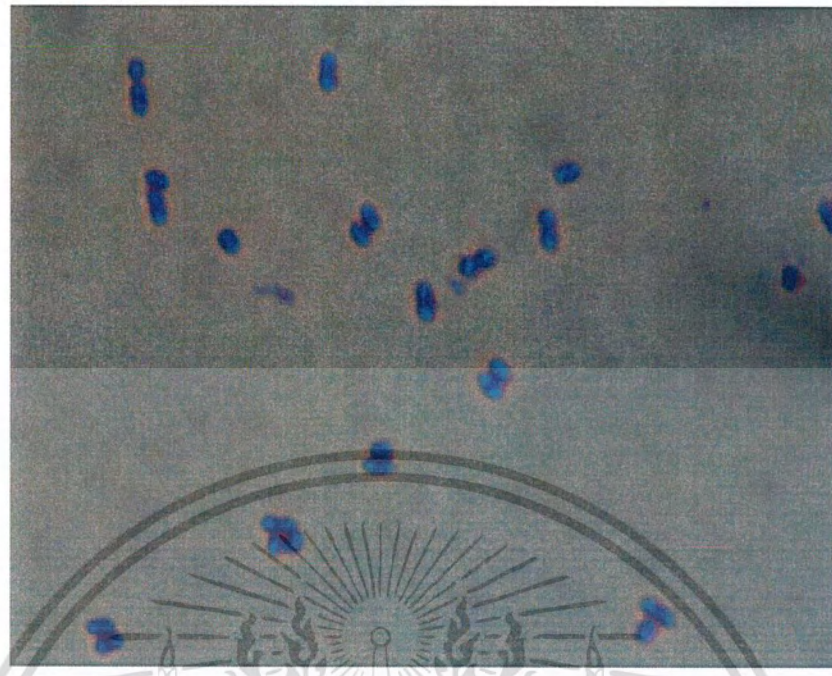


รูปที่ 4.1 การติดสีแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต AMF19

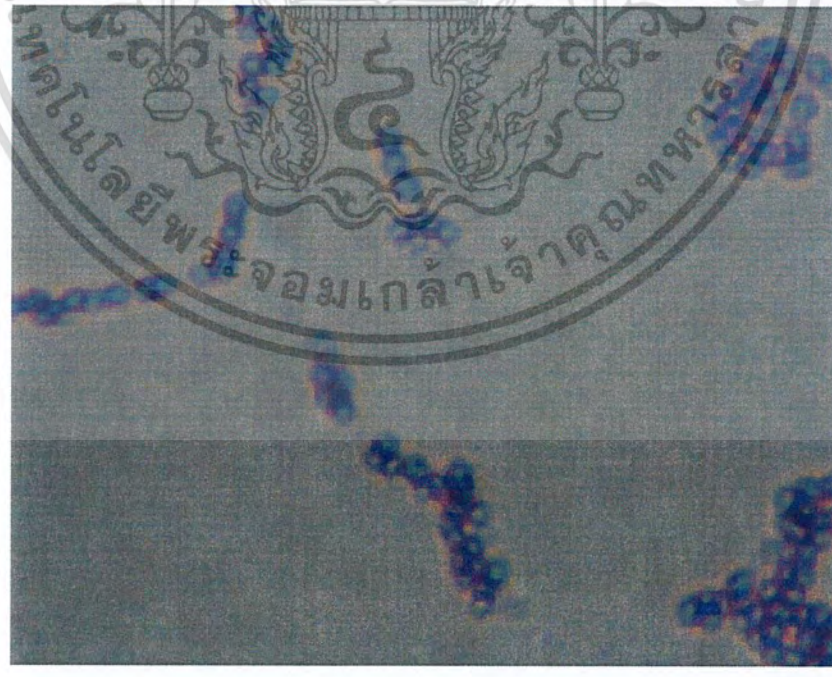


รูปที่ 4.2 การติดสีแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BGT110

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

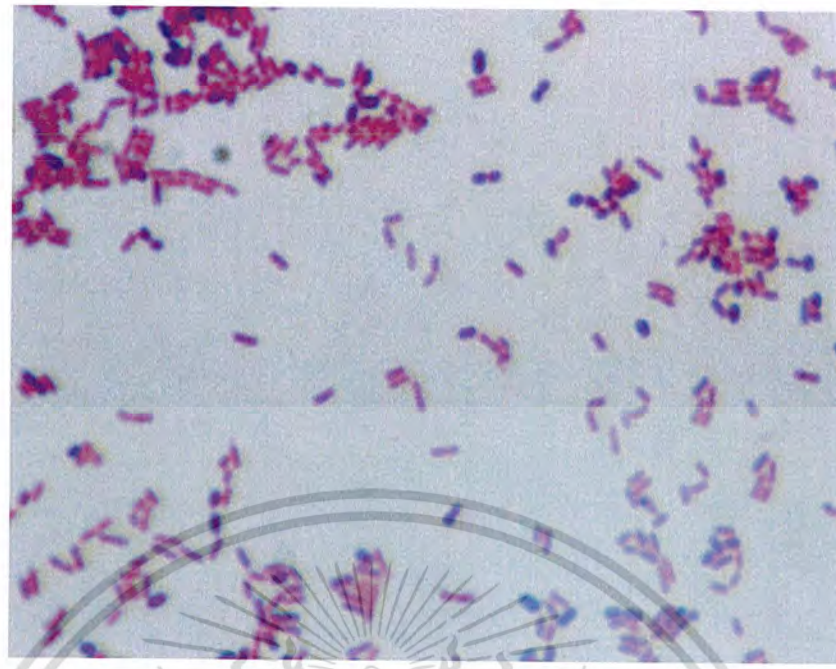


รูปที่ 4.3 การติดสีแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BMT31



รูปที่ 4.4 การติดสีแกรมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต RST24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



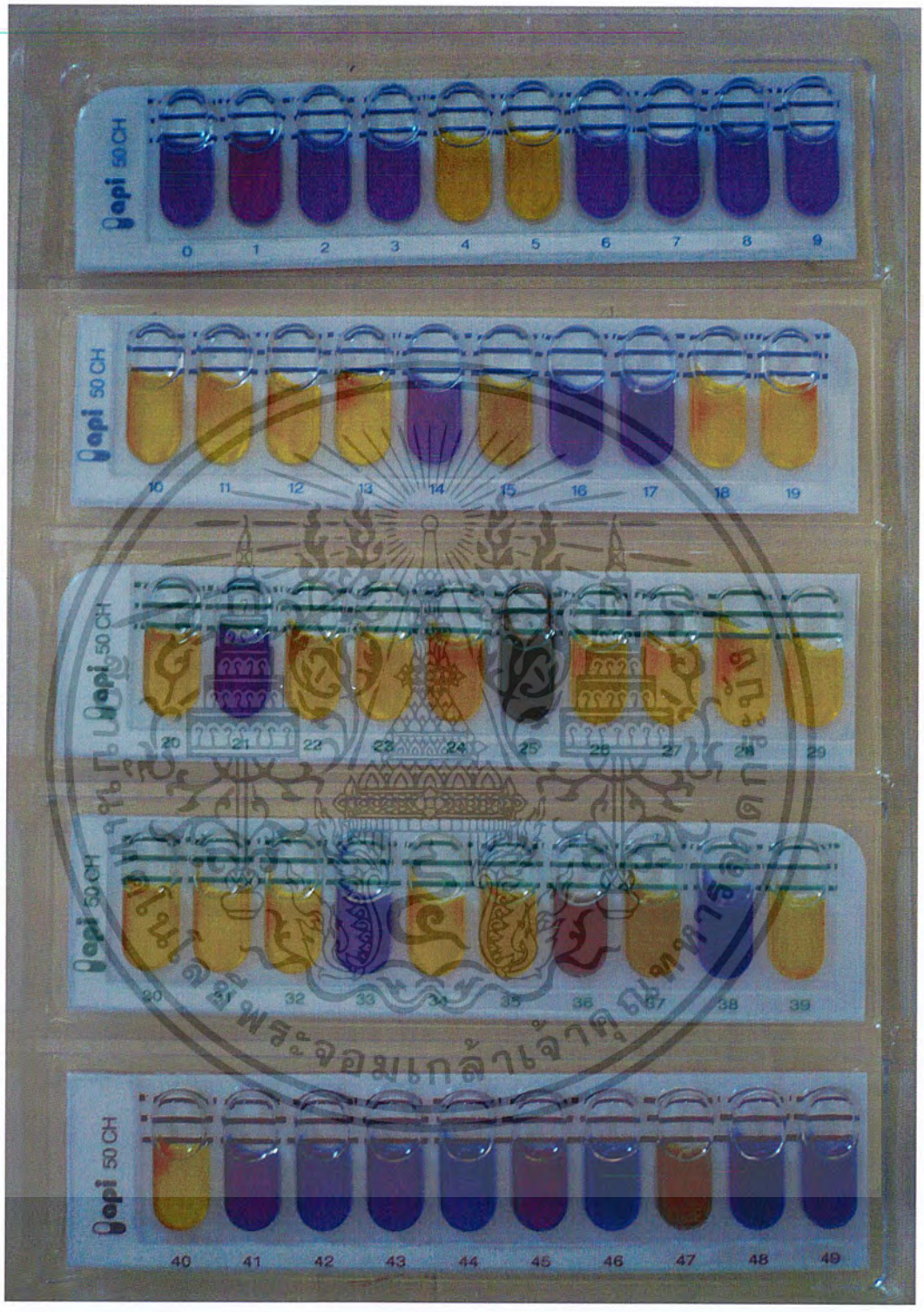
รูปที่ 4.5 การติดสีย้อมของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต RSS25

4.2.4.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสปีชีส์

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมที่สุดที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อ คือไอโซเลต BGT110 ซึ่งแยกได้จากเหงือกปลาตะเพียน นำมาทดสอบโดยใช้ชุดการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH) และจากผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิด (รูปที่ 4.6 และตารางที่ 4.5) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BGT110 มีผลการทดสอบคล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ร้อยละ 99.9

ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาสดและเหนมปลาสอดคล้องกับการรายงานของ Østergaard และคณะ (1998) ที่ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทย โดยใช้ API 50 CH ในการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ 29 ไอโซเลต โดยเมื่อนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วย API 50 CH พบว่ามี 18 ไอโซเลตที่เป็น *L. plantarum* เช่นเดียวกับการทดลองของ Bucio และคณะ (2006) ซึ่งได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* ได้จากลำไส้ของปลาน้ำจืดที่อาศัยบริเวณแม่น้ำและจากฟาร์มที่เลี้ยงในระบบน้ำวน นอกจากนี้ Wiriyacharee (1990) ได้ทำการศึกษาการหมักแหนมในประเทศนิวซีแลนด์ โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* เป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นในการปรับปรุงคุณภาพของแหนม พบว่าเชื้อสายพันธุ์นี้สามารถทำให้ความเป็นกรดด่างลดลงรวดเร็วในช่วงแรกของการหมัก หลังจากนั้นผลิตภัณฑ์มีเนื้อสัมผัสแน่น มีสีที่ดี และคงตัว *L. plantarum* มีความเหมาะสมที่จะนำมาเป็นกล้าเชื้อในแหนมปลา และผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.6 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BGT110ในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50CH)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 ผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BGT110 โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	ผลการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง	สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	ผลการทดสอบที่ 48 ชั่วโมง
Control	-	ESC	+
GLY	-	SAL	+
ERY	-	CEL	+
DARD	-	MAL	+
LARA	+	LAC	+
BIB	+	MEL	+
DXYL	-	SAC	+
LXYL	-	TRE	+
ADO	-	INU	-
MDX	-	MLZ	+
GAL	+	RAF	+
GLU	+	AMD	-
FRU	+	GLYG	-
MNE	+	XLT	-
SBE	-	GEN	+
RHA	-	TUR	+
DUL	-	LYX	-
INO	-	TAG	-
MAN	+	DFUC	-
SOR	+	LFUC	-
MDM	+	DARL	-
MDG	-	LARL	-
NAG	+	GTNT	-
AMY	+	2KG	-
ARB	+	5KG	-

+ เกิดการเปลี่ยนสี ; - ไม่เกิดการเปลี่ยนสี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ปลาสดที่นำมาใช้ศึกษามีจำนวน 4 สายพันธุ์ ได้แก่ ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ปลาตะเพียน (*Barbodes gonionotus*) ปลาหมอ (*Anabas testudineus*) และปลาทับทิม (Ruby fish) โดยบริเวณที่ทำการทดลองมี 3 ส่วน คือ เหงือกปลา เนื้อปลา และท้องปลา ซึ่งพบว่าส่วนเหงือกปลาและเนื้อปลามีค่าพีเอชเฉลี่ยประมาณ 6.61 และ 6.62 ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าพีเอชเฉลี่ยของส่วนท้องปลา คือ 6.21 และค่า a_w ของแหนมปลามีค่าเฉลี่ยคือ 0.975 สำหรับแหนมปลาที่สุ่มมาจากตลาดมีปริมาณไนไตรต์ตกค้างอยู่ในช่วง 0-2.186 ซึ่งมีค่าไม่เกินกำหนด (125 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) ส่วนแหนมที่ทำเองจะพบว่ามีปริมาณไนไตรต์ตกค้างเกินมาตรฐานเพียง 2 ตัวอย่าง (126.66 และ155.10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) สำหรับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกของปลาสดแต่ละสายพันธุ์นั้น ปลานิลมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงที่สุด คืออยู่ในช่วง 1.5×10^3-2.2×10^6 CFUต่อกรัม ส่วนท้องปลามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงที่สุดคือ อยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.4×10^4-2.2×10^6 CFUต่อกรัม ส่วนแหนมปลาที่ผลิตเองมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าแหนมปลาที่สุ่มจากตลาดสด คืออยู่ในช่วงตั้งแต่ 1.8×10^5-2.1×10^6 จากนั้นทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาสดและแหนมปลาทั้งหมด 230 ไอโซเลต โดยนำมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วยวิธี agar spot test พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้สามารถสร้างสารยับยั้ง *Lactobacillus plantarum* TISTR 050 และ/หรือ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 414 มีจำนวนทั้งหมด 24 ไอโซเลต ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ทดสอบ ได้แก่ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076, *E. coli* DMST 4212 และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยยับยั้งได้อย่างน้อย 1 สายพันธุ์มีจำนวน 19 ไอโซเลต การสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียกรด-แลคติกจัดเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมของการคัดเลือกกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อนำมาทำผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

จากการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ไนไตรตรีดักเทส ไนไตรต์รีดักเทส และอะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส โดยทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 37 ไอโซเลตที่ผ่านการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้อย่างน้อย 1 ชนิด พบว่าไม่มีแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตใดที่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสและเอนไซม์ไนไตรต์รีดักเทสได้เลย ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างเอนไซม์ไนไตรตรีดักเทสได้มีจำนวน 5 ไอโซเลต และการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส ซึ่งพบว่ามีเพียงไอโซเลตเดียวเท่านั้นที่สร้างเอนไซม์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส และจากการทดสอบมีแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่สร้างเอนไซม์ทุกชนิดที่ทดสอบทั้งหมด 31 ไอโซเลต

เมื่อพิจารณาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบ เช่น คุณสมบัติในการสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นและการสร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเทส จึงสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เหมาะสมได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต AMF19 แยกได้จากปลาหมอ ไอโซเลต BGT110 และไอโซเลต BMT31 แยกได้จากปลาตะเพียน ไอโซเลต RSS25 และไอโซเลต RST24 แยกได้จากปลาทับทิม พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต AMF19 สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดแลคติกระดับพีเอชต่ำสุด คือพีเอช 1.5 ส่วนแบคทีเรียกรด-แลคติกที่สามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีกรดไฮโดรคลอริกระดับพีเอชต่ำสุดที่ 1.5 ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูงสุดคือร้อยละ 3.0 และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์สูงสุด คือร้อยละ 12.0 มีจำนวน 4 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต BGT110, BMT31, RST24 และ RSS25 นอกจากนี้ยังพบว่าทุกไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม ยกเว้นไอโซเลต BGT110 และ BMT31 ที่มีรูปร่างท่อน และจากการศึกษาลักษณะโคโลนีบนอาหารแข็ง พบว่าทั้ง 5 ไอโซเลตมีรูปร่างกลมนูน ขอบโคโลนีมีลักษณะเกลี้ยง ไม่มีรอยเว้า ผิวโคโลนีมีลักษณะเกลี้ยง โคโลนีของไอโซเลต AMF19, RST24 และ RSS25 มีสีขาว ยกเว้นไอโซเลต BMT31 และ BGT110 ที่โคโลนีมีสีครีม และจาก การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีในระดับจีนัส แล้วทำการเปรียบเทียบคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกตาม Axelsson (2004) พบว่าไอโซเลต BMT31 และ BGT110 น่าจะเป็นจีนัส *Lactobacillus* ส่วนไอโซเลต AMF19 น่าจะเป็น *Pediococcus* และอีก 2 ไอโซเลต ได้แก่ ไอ-โซเลต RST24 และ ไอโซเลต RSS25 น่าจะเป็นจีนัส *Enterococcus*

จากการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกในระดับสปีชีส์ โดยคัดเลือกไอโซเลต BGT110 มาทดสอบโดยใช้ชุดการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH) และจากผลการทดสอบของการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 49 ชนิด พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต BGT110 มีผลการทดสอบที่คล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* ร้อยละ 99.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

ธารารัตน์ ศุภศิริ. (2542). PROBIOTIC : แบคทีเรียเพื่อสุขภาพ. วารสารวิทยาศาสตร์, *53*(6), 357-360.

นภา โล่ห์ทอง. (2534). กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. ภาควิชาจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาตร์. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ, 159 หน้า.

นฤมล อัศวเกศมณี. (2550). การเลี้ยงปลาน้ำจืด. คณะเทคโนโลยีการเกษตร. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา, 182 หน้า.

สมใจ ศิริโภค, ประวัติ อังประภาพรชัย, ขจีนาฏ โพธิเวธิกุล และอรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2550). การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคเทอริโอซินที่ผลิตได้. วารสารวิทยาศาสตร์. *2*(2), 145-152.

สันติ นาตะสุวรรณ. (2548). คู่มือปลาน้ำจืด. เพ็ท-แพล็นพับบลัชชิ่ง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. 400 หน้า.

สุมณฑา วัฒนศิลป์. (2545). จุลชีววิทยาทางอาหาร. มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. 400 หน้า.

เสาวนีย์ ธรรมสถิต. (2547). แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. นครปฐม: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อัจฉรา. (2550). แบคทีเรียแลคติก. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

อรวรรณ ละอองคำ. (2546). การจำแนกเชื้อและการตรวจหาสารยับยั้งจุลินทรีย์จากแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต KUB-L0026, KUB-FV1-4 และ KUB-FV4-3. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อรอนงค์ พริ้งศุลกะ. (2550). แบคทีริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติก. วารสารวิทยาศาตร์ มศว, *23*(2),145-156.

อรอนงค์ ไชยเชษฐ. (2548). การสร้างดัชนีคุณภาพจากองค์ประกอบหลักและการยอมรับของผู้บริโภคของแหนมที่ผลิตในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของไทย. วารสารวิทยาศาสตร์ มก, *23*(2), 83-99.

อุธร ฤทธิลึก. (2550). การเลี้ยงปลาเพื่อการค้า. โอเดียนสโตร์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. 248 หน้า.

Ammor, M.S., & Mayo, B. (2007). Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Science*, *76*(1), 138-146.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Askar, A., & Treptow, H. (1986). Biogene amine in lebensmitteln. In A. Askar, & H. Treptow, *Vorkommen, bedeutung und bestimmung* (pp. 21-74). Stuttgart, Germany: Verlag Eugen Elmer.

Axelsson, L. (2004). Lactic acid bacteria : Classification and Physiology. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand, *Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects*, 3rd ed (pp. 1-66). New York: Marcel Dekker.

Balcázar, J.L., Vendrell, D., Blas, I.D., Zarzuela, I.M., Muzquiz, J.L., & Girones, O. (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, *278*, 188–191.

Berner, L., & O'Donnell, J. (1998). Functional foods and health claims legislation: applications to dairy foods. *International Dairy Journal*, *8*, 355-362.

Bjeldanes, L.F., Schutz, D.E., & Morris, M.M. (1978). On the aetiology of scombroid poisoning: cadaverine potentiation of histamine toxicity in the guinea-pig. *Food and Cosmetics Toxicology*, *16*, 157-159.

Bover-Cid, S., & Holzapfel, W.H. (1999). Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*, *53*, 33-41.

Brink, B., Damink, C., Joosten, H.M.L.J., & Huisint, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. *International Journal of Food Microbiology*, *11*, 73-84.

Bucio, A., Hartemink, R., Schrama, J.W., Verreth, J., & Rombouts, F.M. (2006). Present 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.

Çon, A.H., Gökalp, H.Y., & Kaya, M. (2001). Antagonistic effect on *Listeria monocytogenes* and *L. innocua* of a bacteriocin-like metabolite produced by lactic acid bacteria isolated from sucuk. *Meat Science*, *59*, 437–441.

De Smet, I., Van Hoorde, L., Vande Woestyne, M., Christianes, H., & Verstraete, W. (1995). Significance of bile salt hydrolytic activities of lactobacilli. *Applied Microbiology*. *79*, 292–301.

De Vuyst, L., & Vandamme, E.J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In R. kenurve, & G. Rillo, *Bacteriocins of lactic acid bacteria microbiology, genetic and application* (pp. 91-142). Oxford: The Alden Press.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Dodds, K.L., & Collins-Thomson, D.L. (1984). Incidence of nitrite-depleting lactic acid bacteria in cured meats and in meat starter culture. *International Journal of Food Microbiology*, *47*, 710.

Enes Dapkevicius, M.L.N., Robert Nout, M. J., Rombouts, F.M., Houben, J.H., & Wymenga, W. (2000). Biogenic amine formation and degradation by potential fish silage starter microorganisms. *International Journal of Food Microbiology*, *57*, 107-114.

Fleming, H.P., Mofeeters., R.F., & Daeschel. M.A. (1985). The lactobacilli, pediococci and leuconostoc: vegetable products. In S.E. Gilland, *Bacterial starter cultures for foods* (pp. 234-285). Boca Raton: Florida.

Garriga, M., Pascual, M., Monfort, J.M., & Hugas, M. (1998). Selection of lactobacilli for chicken probiotic adjuncts. *Journal of Applied Microbiology*, *84*, 125-132.

Gelman, A., Drabkin, V., & Glatman, L. (2001). Evaluation of lactic acid bacteria, isolate from lightly preserved fish product, as starter cultures for new fish-based food product. *Innovative Food Science & Emerging Techonologies*, *1*, 219-226.

Gonzalez, C.J., Encinas, J.P., Garcia-Lopez, M.L., & Otero, A. (2000). Characterization and identification of lactic acid bacteria from freshwater fishes. *Food Microbiology*, *17*, 383-391.

Halasz, A., Barath, A., Simon-Sakardi, L., & Holzapel, W. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in food. *Food Microbiology*, *51*, 42-49.

Haller, D., Colbus, H., Ganzle, M. G., Scherenbacher, P., Bode, C., & Hammes, W. P. (2006). Metabolic and functional properties of lactic acid bacteria in the gastro-intestinal ecosystem: A comparative in vitro study between bacteria of intestinal and fermented food origin. *Systematic and Applied Microbiology*, *24*, 218–226.

Harrigan, W.F., & McCance, M.E. (1976). *Laboratory methods in food and dairy microbiology*. London: Academic Press.

Itoi, S., Abe, T., Washio, S., Ikuro, E., Kanomata, Y., & Sugita, H. (2008). Isolation of halotolerant *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* from intestinal tract of coastal fish. *International Journal of Food Microbiology*, *121*, 116–121.

Jamuna, M., & Jeevaratnam, K. (2004). Isolation and characterization of lactobacilli from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. *Applied Microbiology*, *50*, 79-90.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Kim, D.H., & Austin, B. (2008). Characterization of probiotic carnobacteria isolated from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) intestine. *Applied Microbiology*, *47*, 141-147.

Kirk, R.S., & Sawyer, R. (1991). *Pearson's Composition and Analysis of foods*, 9th ed. Singapore: Longman Scientific & Technical.

Leuschner, R.G., Kurthara, M., & Hammes, W.P. (1999). Formation of biogenic amines by proteolytic enterococci during cheese ripening. *Journal of Science and Food Agriculture*, *79*, 1141-1144.

Liu, Z., Jiang, Z., Zhou, K., Li, P., Liu, G., & Zhang, B. (2007). Screening of bifidobacteria with acquired tolerance to human gastrointestinal tract. *Food microbiology*, *13*, 215-219.

Mattila-Sandholm, T., Myllärinen, Crittenden, R., Crittenden, Mogensen, G., Fondén, R., & Saarela, M. (2002). Technological challenges for future probiotic foods. *International Dairy Journal*, *12*, 173-182.

Miralles, M.C., Flores, J., & Perez-Martinez, G. (1996). Biochemical tests for the selection of *Staphylococcus* strains as potential meat starter cultures. *Food Microbiology*, *13*, 227-236.

Mohamed, R., Livia, S.S., Hassan, S., Soher, E., & Ahmed-Adel, E.B. (2009). Changes in free amino acids and biogenic amines of Egyptian salted-fermented fish (Feseekh) during ripening and storage. *Food Chemistry*, *115*, 635-638.

Önal, A. (2007). A review : Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. *Food Chemistry*, *103*, 1475-1486.

Østergaard, A., Embarek, P.K., Wedell-Neergaard, C., Huss, H. H., & Gtam, L. (1998). Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria isolated from Thai fermented fish products. *Food Microbiology*, *15*, 223-233.

Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., & Soccol, C.R. (2008). Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Research International*, *41*, 111-123.

Riebroy, S.,Benjakul, S., & Visessanguan, W. (2008). Properties and acceptability of Som-fug, a Thai fermented fish mince, inoculated with lactic acid bacteria starters. *LWT*, *41*, 569-580.

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

Ringø, E., Olsen, R.E., Mayhew, T.M., & Myklebust, R. (2003). Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, *227*, 395-415.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Ringø, E. (2004). Lactic acid bacteria in fish and fish framing. In S. Salminen, A. von Wright, & A. Ouwehand, Lactic acid bacteria : microbiological and functional aspects, 3rd ed (pp. 581-610). New York: Marcel Dekker.

Salminen, S., & Wright, A.V. (1993). Lactic acid bacteria. (442-448). New York: Marcel Dekker.

Schilling, U., & Lücke, F.K. (1989). Antibacterial activity of *Lactobacillus sakei* isolated from meat. *Applied and Environmental Microbiology*, *55*(8), 1901-1906.

Shalaby, A.R. (1996). Signicance of biogenicamines to food safety and human health. *Food Research International*, *29*, 675-690.

Silla, M.H. (1996). Biogenic amines: their importance in foods. *International Journal of Food Microbiology*, *29*, 213-231.

Stiles, M.E., & Holzapfel, W.H. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*, *36*, 1-29.

Swetwiwathana, A., & Lothong, N. (2005). Selection of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from nham (thai fermented meat). *International Conference on Asian Network on Microbial Reserch*, (Nov. 29-Dec.1), 543-548.

Tabor, C.W., & Tabor, H. (1976). Polyamines. *Annual Review of Biochemistry*, *53*, 749-790.

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

Verschuere, L., Rombout, G., Sorgeloos, P., & Verstraete, W. (2000). Probiotic bacterial as biological control agent in aquaculture-a review. *Applied Microbiology*, *64*, 655-671.

Wiriyacharee, P., Brooks, J. D., Earle, M. D., & Page, G. (1990). The improvement of a traditional Thai fermented sausage by use of mixed starter cultures. In V. Birte, & T. Semond, *Fermentation Technologies: Industrial Applications Conference: Massey University* (pp. 66-121), Palmerston North, New Zealand.

Wolf, G., & Hammes, W.P. (1988). Effect of hematin on the activities of nitrite reductase and catalase in lactobacilli. *Archives of Microbiology*, *149*, 220-224.

Wood, B.J.B. (1992). *The lactic acid bacteria in health and disease*. Cambridge: Elsevier Science.

Yoon, K.Y., Woodams, E.E., & Hang, Y.D. (2006). Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, *97*(12), 1427-1430.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายทำเจือจาง

1.1 de Man Rogosa and sharpe medium (MRS agar)

<u>ส่วนประกอบ</u>

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Triammonium Citrate	2	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSO_4$)	200	มิลลิกรัม
Manganese Sulfate ($MnSO_4$)	50	มิลลิกรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนจนวุ้นละลายและปรับพีเอชเป็น 6.2-6.6 แล้ว นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Gibson's Semi solid Tomato Juice Medium

<u>ส่วนประกอบ</u>

Yeast extract	2.5	กรัม
D-glucose	50	กรัม
Reconstitued skim milk	800	มิลลิลิตร
Nutrient agar	200	มิลลิลิตร

Tomato juice pH 6.5 100 มิลลิลิตร หรือ $MnSO_4$ Solution 0.4%

นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที ทำการฆ่าเชื้อทั้งหมด 3 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 modified nitrite MRS medium

<u>ส่วนประกอบ</u>

Glucose	1	กรัม
Sodium Nitrite ($NaNO_2$)	2	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
Manganese Sulfate ($MnSO_4$)	0.05	กรัม
Sodium Molybdate (Na_2MoO_4)	24.2	มิลลิกรัม
Sodium Acetate	5	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSO_4$)	0.2	กรัม
Furrus Chloride ($FeCl_3$)	5.4	มิลลิกรัม
Dipotassium hydrogen orthophosphate(K_2HPO_4)	2	กรัม

สารละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนจนวุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.4 Bacteriocin Screening Medium (BSM) (Tichaczele และคณะ, 1992)

ส่วนประกอบ (ต่อน้ำ 1 ลิตร)

Glucose	2	กรัม
Beef extract	2	กรัม
Yeast extract	4	กรัม
Tryptone	10	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
Diammonium Hydrogen Citrate $(NH_3)_2C_6H_6O_7$	2	กรัม
Manganese Sulfate ($MnSO_4$)	0.05	กรัม
Magnesium Sulfate ($MgSO_4$)	0.2	กรัม
Dipotassium hydrogen orthophosphate (K_2HPO_4)	8.7	กรัม
Potassium dihydrogen orthophosphate (KH_2PO_4)	8	กรัม
Agar	15	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนจนวุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.5 Tryptic Soy Broth (TSB)

<u>ส่วนประกอบ</u>

เปปโตนจากเคซีน (Peptone from casein)	15	กรัม
เปปโตนจากถั่วเหลือง (Peptone from soymeat)	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	5	กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร คนจนวุ้นละลายและนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.6 Decarboxylase Medium

<u>ส่วนประกอบ</u>

Tryptone	0.5	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Meat extract	0.5	กรัม
NaCl	0.25	กรัม
Glucose	0.05	กรัม
Tween 80	0.1	กรัม
$MgSO_4$	0.02	กรัม
$MnSO_4$	0.005	กรัม
$FeSO_4$	0.004	กรัม
Ammonium citrate	0.2	กรัม
Thiamine	0.001	กรัม
K_2PO_4	0.2	กรัม
$CaCO_3$	0.01	กรัม
pyridoxal-5-phosphate	0.005	กรัม
amino acid	1.0	กรัม
Bromcresol purple	0.006	กรัม
Agar	2	กรัม

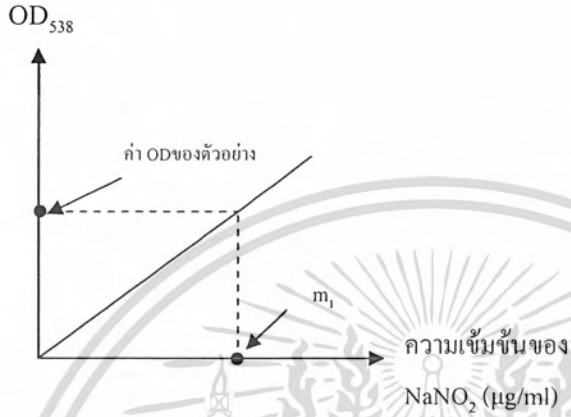
ปรับ pH ให้เท่ากับ 5.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

1. คำนวณปริมาณไนไตรต์

การสร้างกราฟมาตรฐาน



$$\text{Mg/kg ของ } NaNO_2 = \frac{200 \text{ ml}}{M_0 V}$$

M_1 = ค่าการดูดกลืนแสงของตัวอย่าง

M_0 = น้ำหนักของตัวอย่างที่ชั่งมา

V = ปริมาตรของตัวอย่างที่กรองได้

2. คำนวณจำนวนจุลินทรีย์

$$\text{CFU ต่อกรัม หรือ CFU ต่อมิลลิลิตร} = \frac{C}{V \times (n_1 + (0.1 \times n_2)) \times d}$$

เมื่อ C = ผลรวมของจำนวนโคโลนีที่นับได้ทุกจาน

V = ปริมาณของตัวอย่างที่เติมลงไปในแต่ละจาน

n_1 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางต่ำ*

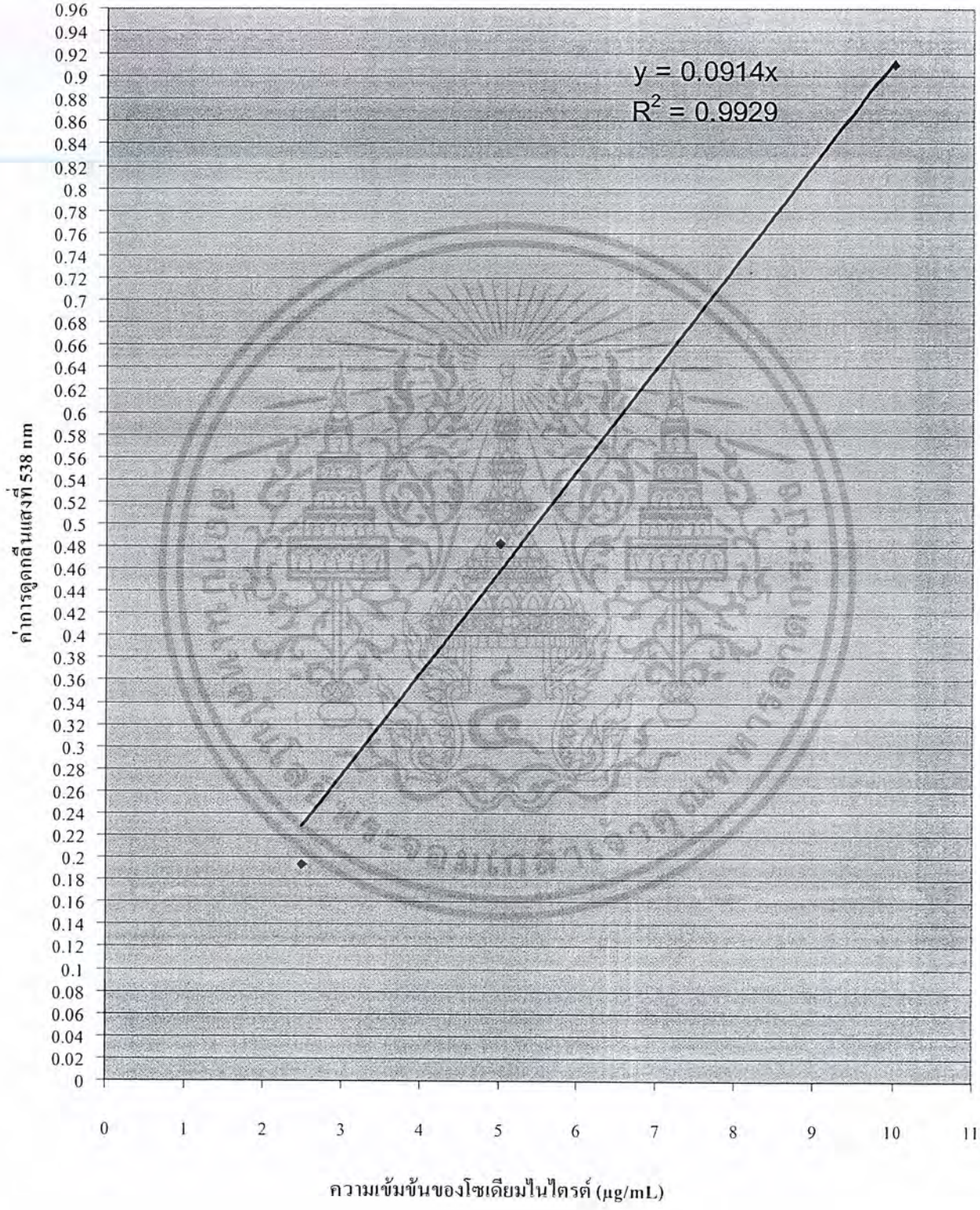
n_2 = จำนวนของจานที่นับได้ที่ระดับความเจือจางสูง

d = ระดับความเจือจางต่ำที่นับโคโลนีได้

*ระดับความเจือจางต่ำ หมายถึง ตัวอย่างที่เจือจางน้อยที่สุดที่นับโคโลนีได้ เช่น ถ้านับโคโลนีได้ที่ 10^{-2} และ 10^{-3} ดังนั้นตัวอย่างที่เจือจางน้อยกว่าก็คือที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กราฟมาตรฐานของโซเดียมไนไตรต์



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

ตาราง ค.1 ปริมาณไนไตรต์ที่ตกค้างอยู่ในตัวอย่างแหนมปลา

ตัวอย่างแหนมปลา	น้ำหนักตัวอย่างที่ชั่ง (g)	ปริมาณส่วนใสที่กรองได้ (มิลลิลิตร) (mg/kg)	ค่าการดูดกลืนแสง	ความเข้มข้นของ $NaNO_2$ เทียบกับกราฟมาตรฐาน (μg/ml)	ปริมาณ $NaNO_2$ ในตัวอย่าง
	m_0	V		m_1	$\frac{200m_1}{m_0V}$
NS01	10.001	0.9	-0.000	0	0
NS02	10.000	0.9	0.002	0.0218	0.4844
NS03	10.001	0.9	-0.000	0	0
NS04	10.002	0.9	0.004	0.0440	0.9776
NS05	10.000	0.9	0.009	0.0984	2.1867
NS06	10.002	0.9	0.000	0	0
NS07	10.000	0.9	-0.000	0	0
NS08	10.001	0.9	0.001	0.0110	0.2444
NS09	10.002	0.9	0.000	0	0
NS10	10.001	0.9	-0.001	0	0
NT01	10.000	0.9	0.000	0	0
NT02	10.001	0.9	0.071	0.7768	17.2622
NT03	10.001	0.9	0.108	1.1816	26.2315
NT04	10.000	0.9	0.096	1.0503	23.3377
NT05	10.002	0.9	0.245	2.6805	59.5548
NT06	10.001	0.9	0.278	3.0525	67.8266
NT07	10.001	0.9	0.312	3.4136	75.8502
NT08	10.002	0.9	0.348	3.8074	84.5920
NT09	10.001	0.9	0.478	5.2300	116.2106
NT10	10.000	0.9	0.521	5.7002	126.6584
NT11	10.001	0.9	0.638	6.9803	155.1023

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
NF 17	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NF 31	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NF 64	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NS 11	แหนมสุ่ม	-	+	-	-	-	-	-	-
NS 12	แหนมสุ่ม	+	+	-	-	-	-	-	-
NS 45	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NS 49	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NS 54	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NS 58	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NS 62	แหนมสุ่ม	-	-	+	-	-	-	-	-
NS 310	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NT 19	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NT 27	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NT 48	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
NT 55	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NT 63	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NT 66	แหนมสุ่ม	-	-	-	-	-	-	-	-
NT 310	แหนมสุ่ม	+	-	-	-	-	+	-	-
TNF 11	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 12	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 13	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 14	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 15	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 16	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 17	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 18	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	+	-
TNF 19	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 21	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 24	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
TNF 27	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 29	แหนมทำเอง	+	-	-	-	-	-	-	-
TNF 210	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 32	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 34	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 35	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 39	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 42	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 45	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 410	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-
TNF 53	แหนมทำเอง	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
OGF 25	เหงือกปลานิล	-	+	-	-	-	-	-	-
OGF 43	เหงือกปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OGF 47	เหงือกปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OGS 16	เหงือกปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OGS 18	เหงือกปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OGT 16	เหงือกปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMF 13	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMF 15	เนื้อปลานิล	+	-	-	-	-	-	-	-
OMF 21	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMF 22	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMF 39	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMF 49	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMF 79	เนื้อปลานิล	-	-	+	-	-	-	-	-
OMF 89	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMF 99	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMF 310	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
OMS 15	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMT 21	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OMT 27	เนื้อปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 12	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 14	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 19	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 23	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 24	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 29	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 33	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 36	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 39	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 59	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 69	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	+	-	+
OSF 89	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
OSF 99	ท้องปลานิล	-	-	+	+	+	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
OSS 25	ท้องปลานิล	-	-	-	-	-	-	-	-
RGF 18	เหงือกปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RGF 27	เหงือกปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RGF 28	เหงือกปลาทับทิม	-	+	-	-	-	-	-	-
RGF 47	เหงือกปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RGS 35	เหงือกปลาทับทิม	-	+	-	-	-	-	-	-
RGS 45	เหงือกปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RGT 18	เหงือกปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RGT 26	เหงือกปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RGT 28	เหงือกปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMF 17	เนื้อปลาทับทิม	+	-	-	-	-	-	-	-
RMF 25	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMF 29	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMF 39	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMF 45	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMF 47	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
RMF 110	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMF 410	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMS 16	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMS 26	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMT 15	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMT 16	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMT 17	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMT 36	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMT 45	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RMT 49	เนื้อปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSF 11	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSF 14	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	+	-
RSF 16	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSF 19	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSF 21	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSF 24	ท้องปลาทับทิม	+	+	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
RSF 31	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSF 43	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSS 21	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSS 25	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	+	-	-	-	+
RSS 33	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSS 43	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSS 44	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RSS 110	ท้องปลาทับทิม	+	-	-	-	-	-	-	-
RSS 310	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	+	-
RST 18	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RST 19	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RST 24	ท้องปลาทับทิม	+	+	-	-	-	-	-	-
RST 26	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	+	-	-
RST 29	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RST 38	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
RST 44	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
RST 48	ท้องปลาทับทิม	-	-	-	-	-	-	-	-
BGF 13	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BGF 14	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BGF 17	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BGF 19	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BGF 24	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BGF 25	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BGF 35	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BGF 44	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	+	-
BGF 49	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BGT 33	เหงือกปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BGT 110	เหงือกปลาตะเพียน	+	+	-	-	-	-	-	-
BMF 13	เนื้อปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BMF 54	เนื้อปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BMF 510	เนื้อปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BMT 13	เนื้อปลาตะเพียน	+	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
BMT 24	เนื้อปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BMT 31	เนื้อปลาตะเพียน	-	+	-	-	-	-	+	-
BSF 14	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BSF 24	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BSS 14	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BSS 16	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BSS 21	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BSS 26	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BSS 28	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BSS 38	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BSS 54	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BSS 510	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BST 11	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BST 12	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BST 17	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BST 18	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
BST 24	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BST 26	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BST 32	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BST 34	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BST 46	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
BST 58	ท้องปลาตะเพียน	-	-	-	-	-	-	-	-
AGF 12	เหงือกปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AGF 26	เหงือกปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AGF 29	เหงือกปลาหมอ	-	-	+	+	-	-	-	-
AGF 31	เหงือกปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AGF 33	เหงือกปลาหมอ	-	+	-	-	-	-	-	-
AGF 38	เหงือกปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AGT 21	เหงือกปลาหมอ	-	+	-	+	-	-	-	-
AGT 28	เหงือกปลาหมอ	-	+	-	-	-	-	-	-
AMT 16	เนื้อปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AMF 18	เนื้อปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
AMF 19	เนื้อปลาหมอ	+	-	-	+	-	-	-	-
AMF 24	เนื้อปลาหมอ	-	-	-	-	+	-	-	-
AMF 25	เนื้อปลาหมอ	-	-	-	+	+	-	-	+
AMF 26	เนื้อปลาหมอ	+	-	-	-	-	-	-	-
AMF 31	เนื้อปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AMF 34	เนื้อปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AMF 45	เนื้อปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AMT 21	เนื้อปลาหมอ	+	-	-	+	+	-	-	+
AMT 36	เนื้อปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AMT 210	เนื้อปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
ASF 22	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
ASF 26	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
ASS 17	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
ASS 29	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
ASS 33	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
ASS 37	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-

\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

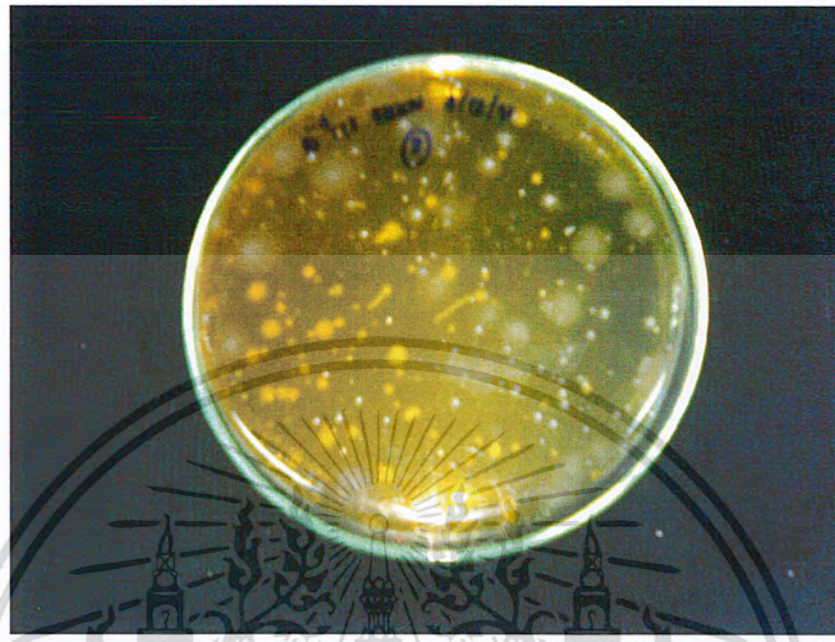
ตาราง ค.2 การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกได้ (ต่อ)

รหัสไอโซเลตที่แยกได้	แหล่งที่มา	การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น							
		Lactobacillus plantarum TISTR 050	*Pediococcus pentosaceus* TISTR 414	*Salmonella* Typhimurium DMST 0562	*Staphylococcus aureus* TISTR 118	*Listeria monocytogenes* DMST 11256	*Pseudomonas fluorescence* DMST 20079	*E.coli* DMST 4212	*Vibrio parahaemolyticus* SH1
ASS 44	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
ASS 210	ท้องปลาหมอ	-	+	-	+	-	-	-	+
AST 25	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AST 29	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AST 32	ท้องปลาหมอ	-	+	-	-	-	-	-	-
AST 42	ท้องปลาหมอ	+	-	-	-	-	-	-	-
AST 45	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-
AST 110	ท้องปลาหมอ	-	-	-	-	-	-	-	-

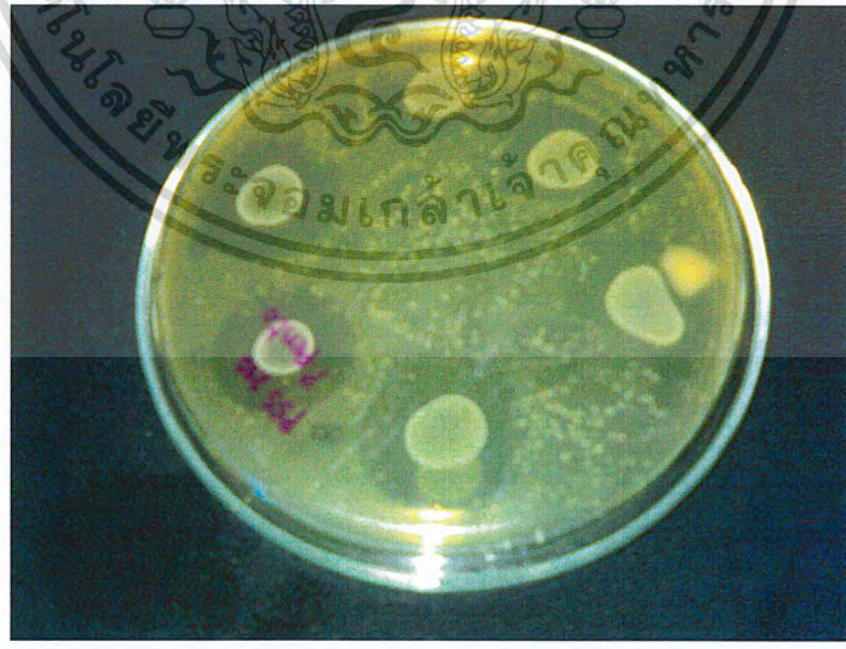
\+ ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

\- ไม่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ

ภาคผนวก ง

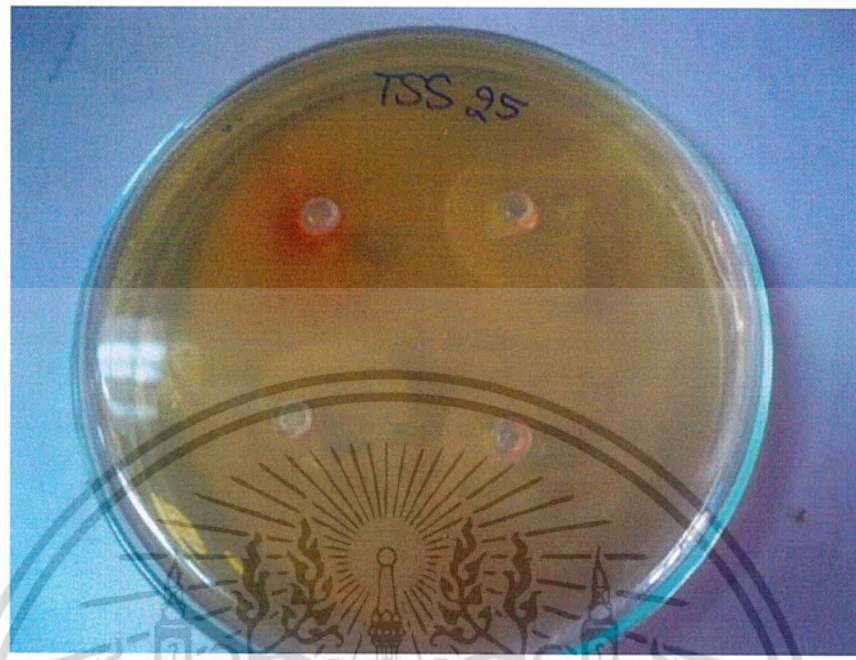


รูปที่ ง.1 โคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างโซนใส (clear zone) บนอาหาร MRS Agar



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ ง.2 การยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหาร BSM



รูปที่ ง.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ในเตรตรีดักเทส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

รูปที่ ง.4 การทดสอบการสร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก จ

1. วิธีการใช้เครื่องวัดพีเอช (Testo 205)

1. ดึงเครื่องออกจาก Storage Cap อย่างระมัดระวัง (มือซ้ายจับ Storage Capไว้ มือขวาค่อยๆดึงเครื่องมือออก ใช้นิ้วชี้และนิ้วกลางประคองเครื่องไว้ ง้างปลาย Storage Cap เล็กน้อยเพื่อดันเครื่องขึ้นมา จับอย่างระมัดระวัง ห้ามทำเครื่องหล่นโดยเด็ดขาด)

2. กดปุ่ม (ON) (กดแล้วปล่อยทันที) เพื่อเปิดเครื่อง

3. ทำการ Calibrate โดยกดปุ่ม (CAL) เครื่องจะบอกให้ Calibrate ที่ pH 4 ได้ (ตัวอักษร "Cal" ที่หน้าปัด จะกระพริบ) จุ่มลงในบัฟเฟอร์ pH4 (อย่าให้ Probe สัมผัสกับภาชนะใส่บัฟเฟอร์) รอจนค่านิ่งกดปุ่ม (CAL) อีกครั้ง (ตัวอักษร "Auto" จะกระพริบ รอเสียงสัญญาณดังติ๊ด แสดงว่าเครื่อง Calibrate เสร็จแล้ว) ล้าง Probe ด้วยน้ำกลั่น เช็ดด้วยกระดาษทิชชู่

4. ทำการ Calibrate ที่ค่า pH 7 ต่อไปโดยจุ่ม Probe ลงในบัฟเฟอร์ pH 7 รอจนค่านิ่ง กดปุ่ม (CAL) อีกครั้ง ตัวอักษร "Auto" จะกระพริบ รอเสียงสัญญาณดังติ๊ด เมื่อการ Calibrate เสร็จสิ้นเครื่องจะแสดงปริมาณ Gradient และ Offset Value ที่หน้าปัด (หน่วยมิลลิโวลต์) จากนั้นล้าง Probe ด้วยน้ำกลั่น เช็ดด้วยกระดาษทิชชู่

5. เปลี่ยนไปสู่โหมดการวัดโดยกดปุ่ม (CAL) อีกครั้ง (ตัวอักษร Auto hold จะกระพริบ) จึงทำการวัดค่า pH ของตัวอย่างได้

6. จุ่ม Probe ลงในตัวอย่าง รอสัญญาณดังติ๊ด บันทึกค่า pH และอุณหภูมิที่วัดได้ เมื่อวัดเสร็จแล้วก่อนจะวัดตัวอย่างต่อไป ล้าง Probe ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น ซับให้แห้งด้วยกระดาษทิชชู่

7. เมื่อจะวัด pH ของตัวอย่างถัดไปให้จุ่ม Probe ลงไปในตัวอย่างแล้วกดปุ่ม (ON/HOLD) อีกครั้ง เพื่อให้เครื่องทำการวัด pH ของตัวอย่าง รอสัญญาณดังติ๊ด บันทึกค่า pH และอุณหภูมิที่วัดได้

8. เมื่อเลิกใช้เครื่องมือให้ปิดเครื่องโดยกดปุ่ม (ON/HOLD) ค้างไว้สัก 2-3 วินาที จนตัวเลขที่หน้าปัดจะหายไป

9. ทำความสะอาด Probe โดยล้างด้วยน้ำสบู่เจือจาง ที่มีอุณหภูมิต่ำกว่า 40 °C (ห้ามใช้น้ำยาทำความสะอาดที่แรงเกินไป) ตามด้วยการล้างด้วยน้ำกลั่น เช็ดเครื่องให้สะอาดด้วยผ้าที่สะอาดหรือกระดาษทิชชู่ชุบน้ำพอหมาดๆ ห้ามถู

10. เสียบหัว Probe ลงใน Storage Cap ที่มี electrolyte gel (สีส้ม) อยู่ โดยเสียบเครื่องเข้าทางขวาของ Storage Cap

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หมายเหตุ : หัว Probe ต้องจุ่มลงใน electrolyte gel ขณะปิดเครื่อง ต้องรักษาให้ electrolyte gel ให้สะอาดอยู่เสมอ ถ้า Probe อยู่นอก electrolyte gel เป็นเวลานาน จะต้องจุ่มหัว Probe ลงใน electrolyte gel เป็นเวลาประมาณ 12 ชั่วโมง

2. วิธีการใช้เครื่องวัดปริมาณน้ำอิสระ (Water Activity) รุ่น Aqualab Series 3TE

<u>การเตรียมเครื่องก่อนใช้งาน</u>

หลังจัดวางเครื่องในที่เหมาะสมแล้วให้ต่อสายไฟเข้าที่ด้านหลังเครื่องและเสียบปลั๊ก โดยก่อนเปิดเครื่องให้เปิดลิ้นชักใส่ตัวอย่าง (โดยบิดปุ่มเปิด-ปิดไปที่ OPEN/LOAD) และเอาถ้วยใส่ตัวอย่างที่วางคว่ำไว้อยู่ออก จากนั้นกดสวิตส์เปิดที่อยู่ด้านหลังของตัวเครื่อง ซึ่งจะปรากฏหน้าจอดังนี้

AQUALAB

Series 3 V 1.7

จากนั้นจะปรากฏหน้าจอหลัก ดังนี้

0.000 a_w

0.00 °C

ซึ่งตัวเลขที่ตำแหน่งบนซ้ายแสดงถึงค่าปริมาณน้ำอิสระ หรือวอเตอร์แอคติวิตี้ (a_w) และตัวเลขด้านล่างแสดงอุณหภูมิของตัวอย่าง

<u>การเตรียมตัวอย่าง</u>

ในการเตรียมตัวอย่างให้ปฏิบัติดังนี้

1. ตัวอย่างต้องเป็นเนื้อเดียวกัน ตัวอย่างที่มีหลายองค์ประกอบ (เช่น มัฟฟินผสมลูกเกด) หรือตัวอย่างที่มีการเคลือบผิว (เช่น อาหารชุบเกล็ดขนมปัง) สามารถนำมาวัดค่า a_w ได้ แต่จะใช้เวลาปรับเข้าสู่สมดุลนาน ดังนั้นในกรณีตัวอย่างดังกล่าว เครื่อง Aqualab จะใช้เวลามากกว่า 5 นาทีในการอ่านค่า หรือต้องอาศัยการอ่านค่าหลายครั้ง
2. บรรจุตัวอย่างใส่ถ้วยตัวอย่าง ควรบรรจุตัวอย่างใส่ให้เต็มก้นถ้วยหากเป็นไปได้
3. อย่าใส่ตัวอย่างเกินครึ่งถ้วย เนื่องจากจะมีตัวอย่างไปเปื้อนที่ตัวเซนเซอร์ในเครื่องได้
4. ขอบและภายนอกถ้วยใส่ตัวอย่างต้องสะอาด หากมีตัวอย่างปนเปื้อนภายนอกหรือที่ขอบถ้วยใส่ตัวอย่างต้องเช็ดออกด้วยกระดาษที่สะอาด เนื่องจากจะไปเปื้อนที่ตัวเซนเซอร์ภายในเครื่องทำให้อ่านค่าผิดพลาดได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. หากต้องการอ่านค่าตัวอย่างเดิมซ้ำอีกครั้งให้ปิดฝาถ้วยใส่ตัวอย่างเพื่อป้องกันน้ำระเหย ซึ่งอาจใช้แผ่นฟิล์มหรือฝาของถ้วยใส่ตัวอย่างปิดไว้ก็ได้

<u>ขั้นตอนการวัด</u>

เมื่อเตรียมตัวอย่างเสร็จแล้ว ให้ปฏิบัติตามขั้นตอนดังนี้

1. บิดปุ่มจับลิ้นชักไปที่ OPEN/LOAD และดึงลิ้นชักให้เปิดออก
2. วางตัวอย่างที่เตรียมไว้ลงในลิ้นชัก ตรวจดูว่าที่ขอบและรอบๆถ้วยใส่ตัวอย่างไม่มีคราบสกปรก
3. เลื่อนลิ้นชักปิดเบาๆ โดยเฉพาะเมื่อตัวอย่างเป็นของเหลวซึ่งจะกระเด็นเปื้อนภายในเครื่องได้
4. หมุนปุ่มจับลิ้นชักไปที่ READ หน้าจอต่อไปนี้จะปรากฏขึ้น

Chamber sealed

Measurement started

เป็นการเริ่มอ่านค่า ภายใน 40 วินาที ค่าวอเตอร์แอคติวิตี้ค่าแรกที่อ่านได้จะปรากฏบนจอ ซึ่งระยะเวลาในการอ่านค่าจะขึ้นอยู่กับความแตกต่างระหว่างอุณหภูมิของตัวอย่างและภายในเครื่องและคุณสมบัติอื่นๆของตัวอย่าง

<u>การอ่านค่าของเครื่อง</u>

เครื่อง Aqualab จะอ่านค่าเป็นรอบๆจนกระทั่งอ่านค่าได้ติดกัน 2 ค่าคลาดเคลื่อนห่างกันไม่เกิน 0.001 และเมื่ออ่านค่าเสร็จสิ้นเครื่องจะแสดงสัญญาณไฟกระพริบและเสียงเตือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้