สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม

ISOLATION OF LACTIC ACID BACTERIA FROM PLA-SOM SAMPLE

โดย

นางสาวดวงใจ เนื่องแก้ว

นางสาวสาคร จำรัสฉาย

วน
จ 164 ก
2546

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 60055
วัน,เดือน,ปี 26 มิ.ย. 2549

b 11982118
.....

ปัญหาพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรครุศาสตร์อุตสาหกรรมบัณฑิต

สาขาวิชาอุตสาหกรรมเกษตร

ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร

คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ
ปีการศึกษา 2548

ชื่อเรื่อง	การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม
	Isolation of Lactic Acid Bacteria from Pla-Som Sample
ชื่อสกุล	นางสาวดวงใจ เนื่องแก้ว
	นางสาวสาคร จำรัสฉาย
สาขาวิชา	อุตสาหกรรมเกษตร **ภาควิชา** ครุศาสตร์เกษตร
คณะ	*ครุศาสตร์อุตสาหกรรม*
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ. ดร. ปิ่นมณี ขวัญเมือง

บทคัดย่อ

การทำปัญหาพิเศษครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้ม เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ เพื่อศึกษาสภาพการเจริญในอาหารชนิดต่าง ๆ ตลอดจนการจัดจำแนก

การศึกษาเริ่มต้นโดยการเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาส้มที่จำหน่ายในท้องตลาด ได้แก่ ตลาดหัวตะเข้ ตลาดมีนบุรี และตลาดลาดพร้าว จำนวน 3 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างปลาส้มมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในห้องปฏิบัติการ เมื่อนำตัวอย่างปลาส้มมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติก การตรวจนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าตัวอย่างปลาส้มในตลาดหัวตะเข้พบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ระหว่าง 17-23 โคโลนี ตัวอย่างปลาส้มในตลาดมีนบุรีพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก อยู่ระหว่าง 9-20 โคโลนี และตัวอย่างปลาส้มในตลาดลาดพร้าวพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงมากจนนับไม่ถ้วน

เมื่อแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในแต่ละตัวอย่างมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการสร้างกรด พบว่า ตัวอย่างปลาส้มที่มีวิถีการสร้างกรดแบบ homofermentative มีจำนวน 7 ไอโซเลต และตัวอย่างปลาส้มที่มีวิถีการสร้างกรดแบบ heterofermentative มีจำนวน 4 ไอโซเลต การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลตเจริญเล็กน้อย ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลตเจริญขึ้นได้อย่างเห็นได้ชัด การทดสอบการเจริญในเกลือ 4 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบทั้ง 11 ไอโซเลต มีการเจริญเป็นอย่างมาก และในเกลือ 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียกรดแลคติก แต่ละไอโซเลต เริ่มไม่เจริญตามลำดับ และเมื่อนำข้อมูลทั้งหมดมาจัดจำแนก ผลการจัดจำแนกพบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ *L. fermentum* 45.46 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสายพันธุ์ *L. plantarum* 36.36 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นเป็นสายพันธุ์ *L. pentosus* และ *P. pentosaceus*

ผลการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม สารปฏิชีวนะเกลือ ด่างทับทิม และฟอร์มาลิน แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลต สามารถต้านทานได้ สารปฏิชีวนะ เททราซัยคลิน แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถต้านทานได้มีจำนวน 8 ไอโซเลต และสารปฏิชีวนะออกซีเททราซัยคลิน แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลต ไม่สามารถต้านทานได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษนี้สำเร็จลงได้ โดยได้รับความช่วยเหลือจากบุคคลหลายท่าน ผู้จัดทำขอขอบพระคุณ ผศ. ดร. ปิ่นมณี ขวัญเมือง ที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขปัญหาพิเศษและความอนุเคราะห์ในการทำปัญหาพิเศษนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี และขอขอบพระคุณท่านอาจารย์จันทร์พร เจ้าทรัพย์ ที่ให้ความช่วยเหลือเรื่องเครื่องมือในการถ่ายทำผลการทดลอง ผู้จัดทำต้องขอขอบคุณ คุณอนุสรณ์ เมินแก้ว ที่ให้ความสะดวกในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทดลอง และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องสมุดทุกท่านที่ให้ความสะดวกในการค้นเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการทำทำปัญหาพิเศษเป็นอย่างดี จนทำให้ปัญหาพิเศษนี้ลุล่วงไปได้ด้วยดี จึงใคร่ขอขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูง ณ โอกาสนี้

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา ปู่ ย่า ตา ยาย ที่ให้ชีวิตการศึกษาและกำลังใจตลอดจนทุนทรัพย์ในการทำปัญหาพิเศษ ครูอาจารย์ผู้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้ พี่ ๆ เพื่อน ๆ ที่ให้ความช่วยเหลือและกำลังใจมาโดยตลอด และผู้มีพระคุณทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือจนปัญหาพิเศษสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวดวงใจ เนื่องแก้ว
นางสาวสาคร จำรัสฉาย
มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อปัญหาพิเศษ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์	2
1.3 ขอบเขตของปัญหา	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 การศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 การแปรรูปที่เกิดจากกระบวนการหมัก	3
2.2 ความสำคัญของกระบวนการหมัก	4
2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก	6
2.4 ชนิดของปลาและสัตว์น้ำที่นำมาแปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก	9
2.5 จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์ประมงที่เกิดจากกระบวนการหมักของไทย	10
2.6 แลคติก แอซิด แบคทีเรีย (Lactic acid bacteria)	11
2.7 การเจริญของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก	13
2.8 สารปฏิชีวนะ (Antibiotics)	16
2.9 การจัดจำแนกแบคทีเรียโดย API 50 CHL	22
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ	26
3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย	26
3.2 วิธีการ	27
3.3 สถานที่ทำการวิจัย	29
3.4 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย	30

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 4 ผลการวิจัยและวิเคราะห์ผล 31
บทที่ 5 สรุปและข้อเสนอแนะ 43
บรรณานุกรม 45
ภาคผนวก 49

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก ตามวิธีของ Orla-Jensens (1919)	13
2	การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	23
3	ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในตลาดหัวตะเข้ มีนบุรี และลาดพร้าว	34
4	ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* โดยระบบ API	37
5	ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus fermentum* โดยระบบ API	38
6	ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus pentusus* โดยระบบ API	39
7	ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก Pediococcus pentosaceus โดยระบบ API	40
8	แสดงผลการทนต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างปลาส้ม	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพผนวกที่		หน้า
1	การขีดเชื้อ โดยวิธี Simple streak plate techinques	53
2	การขีดเชื้อ โดยวิธี Cross streak plate techinques	53
3	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK1 (X 1,000)	56
4	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK2 (X 1,000)	56
5	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK3 (X 1,000)	57
6	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK4 (X 1,000)	57
7	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK5 (X 1,000)	58
8	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK6 (X 1,000)	58
9	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABM1 (X 1,000)	59
10	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABM2 (X 1,000)	59
11	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABM3 (X 1,000)	60
12	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABL2 (X 1,000)	60
13	แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABL5 (X 1,000)	61

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญของปัญหา

ปลาส้มเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักในแถบเอเชียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในประเทศไทยปลาส้มเป็นอาหารพื้นเมืองและพบมากทางภาคตะวันออกเฉียงเหนือ โดยการนำปลามาหมักกับส่วนผสมต่าง ๆ ปลาที่นำมาหมักนิยมใช้ปลาตะเพียน ปลาสวาย เครื่องปรุงรส เช่น เกลือ น้ำตาลทราย ผงชูรส ข้าวเหนียวนึ่งสุก กระเทียมปอกเปลือกทุบพอแหลก ขั้นตอนการทำปลาส้ม คือ นำปลามาล้างทำความสะอาด ขอดเกล็ดออกให้หมด ผ่าท้องควักไส้และอวัยวะต่าง ๆ ภายในท้องปลาออกให้หมดแล้วล้างให้สะอาดอีกครั้ง หลังจากนั้นนำปลาที่ทำเสร็จเรียบร้อยแล้วเทใส่กะละมัง เติมเครื่องปรุงผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันกับปลาให้ทั่วถึง ใช้ผ้าขาวบางคลุม หรือใช้ภาชนะที่มีฝาปิด หมักทิ้งไว้ประมาณ 8 ชั่วโมง ก็สามารถนำจำหน่ายหรือรับประทานได้ (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2538 : 23 ; พงพันธุ์ ชมพูเพชร, 2546 : 62)

การหมักปลาส้มต้องอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ในการทำให้เกิดรสชาติเปรี้ยว ซึ่งก็คือแบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า รูปร่างกลม ท่อนสั้นหรือยาว ต้องการอากาศเล็กน้อยในการเจริญ บางชนิดสามารถเจริญได้ในที่ที่ไม่มีอากาศ ให้ผลผลิตหลังจากการย่อยน้ำตาล คือ กรดแลคติกแบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมักคือ *Staphylococcus, Micococcus* และ *Bacillus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยโปรตีนจากเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบปริมาณมากในกระบวนการหมัก คือ *Pediococcus cerevisiae* และพบปริมาณรองลงมาคือ *Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis* จึงเชื่อว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นรสในปลาส้ม นอกจากนั้นแล้วแบคทีเรียกรดแลคติกยังเป็นจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์หลายด้าน เช่น ช่วยลดการเกิดสารมะเร็งบางชนิด ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเลือด ช่วยสร้างเอนไซม์แลคเตส ช่วยย่อยน้ำตาลในนม ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันทำให้ระบบภูมิคุ้มกันแข็งแรง ช่วยในการนำฮอร์โมนเอสโตรเจนกลับมาใช้ใหม่เป็นการช่วยชะลอความแก่ เป็นต้น (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 74, 84)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากลักษณะของปลาส้มและจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องโดยเฉพาะกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่กล่าวมาเบื้องต้น ผู้จัดทำมีความสนใจเกี่ยวกับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะที่แยกได้จากปลาส้มจึงนำปลาส้มมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติกและศึกษาลักษณะต่าง ๆ ที่เป็นประโยชน์ ตลอดจนศึกษารูปร่างของแบคทีเรียกรดแลคติกและการจัดจำแนก ซึ่งเป็นการศึกษาเบื้องต้นเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับเป็นแนวทางนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมการหมักต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากผลิตภัณฑ์ปลาส้มที่วางจำหน่ายในตลาดหัวตะเข้ ตลาดมีนบุรี และตลาดลาดพร้าว
2. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้
3. เพื่อศึกษาสภาพการเจริญในอาหารชนิดต่าง ๆ ตลอดจนการจัดจำแนก

1.3 ขอบเขตของปัญหา

1. ศึกษาชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในปลาส้ม จากตลาดหัวตะเข้ ตลาดมีนบุรี และตลาดลาดพร้าว
2. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาส้ม
3. ศึกษาลักษณะบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติก ที่แยกได้จากตัวอย่างปลาส้ม

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. รู้จักวิธีการตรวจสอบเชื้อเบื้องต้น ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้
2. ได้ข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับแบคทีเรียกรดแลคติก สำหรับการนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้เป็นหัวเชื้อต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การศึกษาเอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 การแปรรูปที่เกิดจากกระบวนการหมัก

การถนอมอาหารโดยกระบวนการหมัก เป็นวิธีที่นิยมทำกันมาช้านานเพราะเป็นวิธีง่าย ๆ โดยมีเกลือเป็นองค์ประกอบที่สำคัญ ปฏิกิริยาในกระบวนการหมักอาศัยการทำงานของเอนไซม์และปฏิกิริยาของจุลินทรีย์ (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 7) ผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปโดยกระบวนการหมักหรืออาหารหมักดองนิยมบริโภคอย่างกว้างขวางในประเทศแถบตะวันออกมากกว่าประเทศในแถบตะวันตก โดยเฉพาะในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น เวียดนาม ลาว กัมพูชาและไทย มีการนำสัตว์น้ำมาแปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก เช่น กะปิ น้ำปลา ปลาร้า ปลาส้ม ปลาจ่อม ปลาเจ่า ส้มฟัก กุ้งจ่อม กุ้งเจ่า ไตปลา บูดู แหนมปลา เค็มบักนัท และปลาแป้งแดง เป็นต้น ปัจจุบันผลิตภัณฑ์ประมงที่แปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก เป็นที่รู้จักกันดียิ่งในประเทศทางตะวันตกเนื่องจากมีผู้อพยพจากประเทศเวียดนาม กัมพูชาและลาวมาอาศัยอยู่นั่นเอง ผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมักมีชื่อเรียกแตกต่างกันไปตามภาษาของแต่ละประเทศหรือแต่ละท้องถิ่น เช่น น้ำปลา (fish sauce) มีชื่อเรียกต่าง ๆ กันคือ พม่า เรียก งาปี (ngapi) ฟิลิปปินส์เรียก ปาติส (patis) กะปิมาเลเซียเรียกว่า บลาชัน (blachan) อินโดนีเซียเรียกว่า แทรสซิ (trassi) และฟิลิปปินส์เรียกกะปิว่า บากู-อง (bagoong) เป็นต้น (Beddows, 1985 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 62)

มาริเนดฟิช (Marinaded fish) เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักของชาวตะวันตก ซึ่งทำกันมาตั้งแต่ศตวรรษที่ 7 ก่อนคริสตศักราช โดยทำจากปลาหรือเนื้อสัตว์ เครื่องปรุงที่ใช้ได้แก่ เครื่องเทศ ผัก เกลือ กรดอินทรีย์ (กรดแอซีติกหรือกรดน้ำส้ม) ปัจจุบันประเทศเนเธอร์แลนด์นิยมนำปลาเฮอร์ริง และหอยแมลงภู่มาแปรรูปโดยวิธีมาริเนด (Sikorski et al., 1995 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 8) วัตถุดิบที่นำมาทำมาริเนด บางครั้งผ่านการทำให้สุกโดยการต้มหรือทอดก่อนการนำมาดอง ในกระบวนการทำมาริเนดโปรตีนในเนื้อปลาถูกแปรสภาพโดยเกลือโซเดียมคลอไรด์และกรดอะซีติก การแปรสภาพโปรตีนที่เกิดจากกรดอะซีติกจะเริ่มต้นที่พีเอชมีค่าประมาณ 5 และจะดำเนินไปอย่างรวดเร็วจนมีค่าพีเอชลดลงประมาณ 4.0-4.2 ในบางประเทศมีการเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ลงไปในผลิตภัณฑ์เพื่อช่วยฟอกสีของปลาให้ดูขาวขึ้น ผลิตภัณฑ์มาริเนดที่มีความเป็นกรดสูงจะช่วยป้องกันการเสียอันเนื่องมาจากการเจริญของแบคทีเรีย เฮ็ตเทอโร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) ได้แก่ *Betabacterium buchneri* และ *Betabacterium breve* (Sikorski et al., 1995 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545:8) แบคทีเรีย *Erwinia herbicola* มักพบอยู่บริเวณส่วนบนของหัวหอมที่ใช้เป็นส่วนประกอบของมาริเนด แบคทีเรียชนิดนี้สามารถออกซิไดซ์ หมู่อะมิโน (-NH_2 groups) ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีน้ำตาล โดยปฏิกิริยานี้จะเกิดที่พีเอชและอุณหภูมิสูง (De Smedt and De Ley, 1979 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 8)

ปลาส้ม เป็นผลิตภัณฑ์ประมงชนิดหนึ่ง ที่ผ่านกระบวนการหมักแบบธรรมชาติให้เกิดกรดแลคติก โดยทั่วไปนิยมใช้ปลาตะเพียน ปลาโคก ปลาสร้อย นำมาหมักกับเกลือ และปัจจัยอื่น ๆ เช่น ข้าวเหนียว น้ำตาลทราย กระเทียม ฯลฯ เป็นอาหารพื้นบ้านของชาวไทยในแทบภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่ปัจจุบันนิยมบริโภคกันโดยทั่วไป

ปลาส้มสูตรอีสาน

1. วัตถุดิบ

ปลาตะเพียนขาว 200 กก. (กก. ละ 40-50 บาท)
ข้าวเหนียวครึ่งถัง (นำไปนึ่งให้สุก)
เกลือ 2 กก.
น้ำตาลทราย 3 กก.
กระเทียมปอกเปลือกทุบพอแหลก 4 กก.
ผงชูรส

2. วิธีการแปรรูป

1. นำปลาตะเพียนขาวมาล้างน้ำทำความสะอาด ขอดเกล็ดออกให้หมด ผ่าท้องควักไส้และอวัยวะต่าง ๆ ภายในท้องปลาออกให้หมด แล้วล้างให้สะอาดอีกครั้ง

2. นำปลาที่ทำสะอาดเรียบร้อยแล้วมาแบ่งใส่กะละมังครั้งละประมาณ 40 กิโลกรัม แบ่งเครื่องปรุงได้แก่ ข้าวเหนียวนึ่ง กระเทียม น้ำตาลทราย เกลือ และผงชูรสออกเป็น 5 ส่วนในปริมาณที่เท่ากัน นำลงผสมคลุกเคล้ากับปลาให้ทั่วถึง

ใช้ผ้าขาวบางคลุม หรือใช้ภาชนะที่มีฝาปิด หมักทิ้งไว้ประมาณ 8 ชั่วโมง ก็สามารถนำออกจำหน่ายหรือรับประทานได้

2.2 ความสำคัญของกระบวนการหมัก

เอนไซม์เป็นตัวการสำคัญที่สุดในกระบวนการหมัก นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเน่าเสียของ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ การศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่างกันในการที่แบคทีเรียจะสร้างเอนไซม์ออกมานั้นจะแตกต่างกันทั้งชนิดและปริมาณของเอนไซม์ กล่าวคือ ในที่อุณหภูมิต่ำแบคทีเรียอาจจะสร้างเอนไซม์ต่างชนิดกันกับในที่อุณหภูมิสูง แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักจัดเป็นแบคทีเรียที่ให้ประโยชน์ เพราะมีส่วนในการทำให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติและกลิ่นดีขึ้น แบคทีเรียในสกุล *Pseudomonas* สร้างน้ำย่อยโปรตีเอส (proteases) เป็นส่วนใหญ่ เช่น *Pseudomonas fluorescens* สร้างเอนไซม์โปรตีเอสปริมาณมากที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่เมื่ออุณหภูมิสูงขึ้นปริมาณเอนไซม์จะน้อยลง ส่วนแบคทีเรีย *P. fragi* จะสร้างเอนไซม์ไลเปสเฉพาะที่อุณหภูมิต่ำเท่านั้น (*Lee and Kraft, 1984* อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 62) อาหารหมักดองจากปลาและสัตว์น้ำที่มีจุลินทรีย์เกี่ยวข้องในกระบวนการหมัก ได้แก่ กะปี (kapi, fish paste) น้ำปลา (nampla, fish sauce) น้ำบูดู (budu, muslimsauce) ไตปลา (tai-pla, fermentated fish bowels) ปลาร้า (pla-ra, fermented fish) บางแห่งเรียกปลาแดก (pla-dag) ปลาส้ม (pla-som, fermented fish) หรือปลาเข้าวสุก (pla-khao-sug) ปลาฮะ (pla-ha) ส้มฟัก (som-fug, Thai fermented fish) บางแห่งเรียกส้มดอก (somdoc) ปลาฟัก ปลาหมัก ฟักส้ม ปลาจ่อม (pla-chom, fermented fish) หรือปลาข้าว (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) คือปลาเจ่าหรือปลาข้าวหมาก (pla-khao-mak) ปลาแป้งแดง (ภาคใต้) pla-paeng-daeng หรือ red fermented rish

ประเภทของการหมักให้เกิดกรดแลคติก

Homofermentative

Homofermentative หรือ homolactic fermentation เป็นการหมักให้เกิดกรดแลคติกที่เกิดขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตกรดแลคติกจากการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยผ่านกระบวนการที่เรียกว่า Emden- Meyerhof-parnas (EMP) หรือ glycolttic pathway ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้ประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์ จากการหมักกลูโคสหรือกาแลคโตส โดยกลูโคส 1 โมเลกุล เมื่อเข้าสู่ EMP จะได้ไพรูเวท 2 โมเลกุล จากนั้นไพรูเวทจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายคือกรดแลคติกที่เกิดขึ้นพบทั้ง D-Lactic และ L-Lactic (Adamsและ Moss, 1995 ; Singleton และ Sainsbury, 1988 อ้างโดย ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546 : 22)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีวิถีการหมักแบบ homofermentative มีทั้งชนิดที่มีรูปร่างเป็นแท่ง เช่น สกุล *Lactobacillus* และชนิดที่มีรูปร่างกลม ได้แก่ สกุล *Streptococcus* และ *Lactococcus* *Enterococcus* เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Heterofermentative

Heterofermentative หรือ heterlactic fermentative เป็นการหมักให้เกิดกรดแลคติก ซึ่งหมักน้ำตาลกลูโคสและแลคโตสไปเป็นผลิตภัณฑ์หลายชนิด ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซีติก กรดฟอร์มิค เอธานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ (Schlegel, 1993 ; Adams และ Moss, 1995 อ้างโดย ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546 : 25)

2.3 ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก

จุลินทรีย์

โปรตีโอไลติก แบคทีเรีย (Proteolytic bacteria) ในกระบวนการหมักจำเป็นต้องอาศัยจุลินทรีย์บางชนิดในการย่อยสลายโปรตีน จากรายงานได้ศึกษากระบวนการหมักกะปิปลาแองโชวี่กับเกลือปริมาณต่ำ โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อนำเอาเอนไซม์โปรตีเนสจากแบคทีเรียที่สามารถสร้างเอนไซม์ดังกล่าวได้ในปริมาณสูงมาใช้ในอุตสาหกรรมเพื่อช่วยเร่งกระบวนการหมัก พบว่าแบคทีเรีย 2 ชนิด ที่แยกเชื้อจากกะปิปลาดังกล่าวคือ *Bacillus subtilis* และ *B. licheniformis* จัดเป็นโปรตีโอไลติกแบคทีเรียที่ดีที่สุด แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ในอาหารที่มีพีเอช 7.0 และมีเกลือร้อยละ 1 การทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสสูงสุดที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *B. licheniformis* คือ 300 nmole-Tyr/min.ml. (tyrosine ถูกปล่อยออกมา 300 nanomole ต่อนาทีต่อ 1 มิลลิลิตรของสับสเตรท) และการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสสูงสุดที่สกัดได้จากแบคทีเรีย *B. subtilis* คือ 335 nmole-Tyr/min.ml. ทั้งนี้การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวเกิดขึ้นภายหลังจากเลี้ยงเชื้อ 28 และ 30 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้น *B. subtilis* จัดเป็นโปรตีโอไลติกแบคทีเรียที่ดีที่สุด เหมาะสำหรับนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอีก 2 ชนิด จัดเป็นพวกโปรตีโอไลติกแบคทีเรีย คือ *Aeromonas anaerogenes* และ *Staphylococcus saprophyticus* (Cha and Lee, 1989 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 63)

สัตว์ทะเลซึ่งพบว่ามีโปรตีโอไลติกเอนไซม์ที่สกัดได้จากเนื้อเยื่อ ได้แก่ หมึกยักษ์ (*Octopus variabilis*) หอยเป๋าฮื้อ หรือ abalone (*Haliotis discus hannai*) ปลิงทะเล (*Stichopus japonicus*) หอยฝาเดียว top shell (*Turbo cornutus*) ปลาฉลาม cat shark (*Scillion hinus tarazame*) ปลาแมกเคเรล (*Scomber japonicus*) ปลาซาร์ดีน (*Sardinops melanosticta*) เมื่อนำเนื้อเยื่อจากสัตว์ทะเลดังกล่าวมาสกัดเอนไซม์พบว่า เอนไซม์โปรตีนเนสที่สกัดได้จากส่วนของไพลอริก ซีคา (pyloric caeca) ของปลาแมกเคเรล และจากตับของปลาซาร์ดีนมีความเป็นด่างสูงที่สุด มีค่าพีเอช 9.4 และ 9.8 ตามลำดับ อัลคาไลน์โปรตีนเนส (alkaline proteinase) ที่สกัดได้จาก pyloric caeca ของปลาแมก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เคเรลมี 3 ชนิด โดยแบ่งตามน้ำหนักโมเลกุล และเมื่อสกัดเอนไซม์โปรตีนเนสจากแบคทีเรีย *Pseudomonas* FU 101 เพื่อเปรียบเทียบพบว่า เอนไซม์ที่ได้นี้ทำงานได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส และที่พีเอช 7 ผลสรุปของการทดลองดังกล่าวคือ เอนไซม์โปรตีนเนสที่สกัดได้จาก pyloric caeca ของปลาแมกเคเรลและจาก *Pseudomonas* FU 101 มีคุณสมบัติดีทั้ง 2 ชนิด แต่โปรตีนเนสที่ได้จากแบคทีเรียเหมาะสำหรับนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมมากกว่าเอนไซม์โปรตีนเนสที่สกัดได้จาก pyloric caeca ของปลาแมกเคเรล เพราะเป็นการยากที่จะนำเอา pyloric caeca จากกระเพาะปลาแมกเคเรลจำนวนมากมาเป็นวัตถุดิบในการสกัดเอนไซม์ดังกล่าวนั่นเอง โปรตีนเนสยังสกัดได้จากแบคทีเรียในสกุล *Streptococcus* sp. ซึ่งเอนไซม์โปรตีนเนสที่ได้จากแบคทีเรียนี้ มีความไวในการจับโลหะจึงถูกยับยั้งโดย EDTA และ Phydroxymercuribenzoate (Chang and Lee, 1983 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 63-64)

เอนไซม์

เอนไซม์ เป็นตัวการสำคัญในกระบวนการหมักและยังเป็นสาเหตุของการเน่าเสียของปลาและสัตว์น้ำอื่น ๆ เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องคือ โปรตีเนส (proteinase) และไลเปส (lipase) การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิต่ำในการสร้างเอนไซม์พบว่า *Pseudomonas fluorescens* จะสร้างเอนไซม์โปรตีเนสปริมาณมากที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่การสร้างเอนไซม์จะน้อยลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น ส่วนแบคทีเรีย *Pseudomonas fragi* จะสร้างเอนไซม์ไลเปสที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส เท่านั้น นอกจากนี้ยังพบว่าในปลาซาร์ดีนมีการทำงานของเอนไซม์โปรตีเนสหรือโปรตีเอส (protease) บริเวณ pyloric caeca สูงกว่าในกระเพาะอาหาร และเอนไซม์ที่ได้จาก pyloric caeca ของปลาหางเหลืองในประเทศญี่ปุ่นจะหยุดชะงักการทำงานเมื่อความเข้มข้นของเกลือน้อยกว่าร้อยละ 1 และจะทำงานดีที่สุดเมื่อความเข้มข้นของเกลืออยู่ระหว่างร้อยละ 2-15 ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส แต่ถ้าความเข้มข้นของเกลือสูงกว่าร้อยละ 15 การทำงานของเอนไซม์จะลดลง (Chang et al., 1986 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 75)

เกลือ

เกลือที่ใช้ทั่ว ๆไปในอุตสาหกรรมแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิดคือ เกลือบริสุทธิ์ (purified salt) เกลือสมุทรหรือเกลือทะเล (solar salt) เกลือเหมืองหรือเกลือสินเธาว์ (rock salt) ในยุโรปและอเมริกาเดิมใช้เกลือสมุทรในอุตสาหกรรมอาหารหมัก แต่ปัจจุบันนิยมใช้เกลือเหมืองแทนมากขึ้น เนื่องจากมีความบริสุทธิ์มากกว่าเกลือทะเล ประเทศไทยมีเกลือ 2 ชนิดคือ เกลือสมุทรกับเกลือสินเธาว์ เกลือสมุทรทำโดยเอาน้ำทะเลมาตากแดดและลมในนาเกลือจนแห้ง ทำกันตามริมฝั่งทะเล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้านตะวันออกของอ่าวไทย เช่น สมุทรปราการ ฉะเชิงเทรา ชลบุรี และระยอง ส่วนชายฝั่งทะเลด้านตะวันตกของอ่าวไทยมีการทำนาเกลือที่จังหวัดสมุทรสงคราม สมุทรสาคร และเพชรบุรี ส่วนเกลือสินเธาว์เป็นเกลือบก มีอยู่ในพื้นดินตามธรรมชาติ มักขุดเอามาจากผิวดินแล้วนำมาละลายน้ำเอาแต่ส่วนใสไปเคี่ยวจนแห้ง มีในจังหวัดภาคตะวันออกเฉียงเหนือ เช่น เลย ร้อยเอ็ด สุรินทร์ นครพนม ศรีสะเกษ หนองคาย สกลนคร ขอนแก่น มหาสารคาม และนครราชสีมา เป็นต้น เกลือที่นิยมใช้บริโภคและในอุตสาหกรรมปลาหมักคือ เกลือสมุทร เพราะเป็นเกลือที่หาง่าย ราคาถูก การขนส่งไปมาสะดวก เกลือสมุทรที่ใช้นั้นเป็นเกลือที่ยังไม่ได้ฟอก แบ่งออกได้เป็น เกลือขาวและเกลือหม่น เกลือขาวเป็นเกลือสีขาวที่สะอาด แต่เกลือหม่นมีละอองดินทราย และมีความสกปรกมาก เป็นเกลือที่ไม่บริสุทธิ์ ความเหมาะสมของเกลือที่ใช้ในอุตสาหกรรมปลาหมักขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง แต่ปัจจัยที่สำคัญ ได้แก่ ส่วนประกอบทางเคมี คุณสมบัติทางฟิสิกส์ ปริมาณและชนิดของแบคทีเรีย (เติมศักดิ์ โชติวรรณวิรัช, 2523 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงศ์, 2545 : 75-76)

ปัจจัยอื่น ๆ

ต้องให้แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้รวดเร็วและสร้างกรดแลคติก ทำให้ พีเอช ลดลง เป็นผลให้แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ถูกกำจัดออกไป ปัจจัยที่ควรพิจารณาเกี่ยวกับกระบวนการหมัก คือ

- ต้องหาคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะในการหมัก เช่น ข้าวสุก ข้าวคั่ว
- สารอินทรีย์ที่ช่วยในการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ วิตามิน เกลือแก่ กรดอะมิโนจากเนื้อปลา (สัตว์น้ำ)
- สภาพไร้การหมักแบบอากาศ (anaerobiosis)
- อุณหภูมิที่เหมาะ ค่อนข้างสูงระหว่าง 20-35 องศาเซลเซียส
- ความเข้มข้นของเกลือที่เหมาะสม
- ความเข้มข้นของกรดอินทรีย์และค่าพีเอช (กรดแลคติก)
- ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ พวกแบคทีเรียแลคติกมีความทนทานต่อคาร์บอนไดออกไซด์
- สารประกอบอื่นที่เกิดขึ้นมีผลยับยั้งการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
- ความเป็นกลางของอาหารคาร์โบไฮเดรตที่ใส่ลงไปต้องพอเหมาะ ถ้าอยู่ในสภาพที่เป็นกรด (pH 5-6) อาจเสียได้
- ปริมาณแบคทีเรียแลคติกในตอนเริ่มต้นควรมีปริมาณมาก
- ปริมาณของแบคทีเรียชนิดอื่นที่เป็นคู่แข่งในตอนเริ่มต้นควรมีปริมาณน้อย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ส่วนประกอบในการปรุงอาหาร เช่น หอม กระเทียม พริก เป็นต้น โดยกระเทียมเป็นส่วนประกอบที่สำคัญอย่างหนึ่งในกระบวนการหมัก เช่น การทำปลาส้ม ส้มฟัก ปลาจ่อม เป็นต้น ได้มีการทดลองพบว่าส่วนที่เป็นน้ำของกระเทียม (garlic juice) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิด ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Bacillus, Micrococcus, Pseudomonas* และเชื้อราสกุล *Aspergillus* แต่น้ำกระเทียมไม่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสกุล *Lactobacillus* และ *Leuconostoc* ซึ่งการทดลองดังกล่าวได้ศึกษาจากอาหารหมักชนิดหนึ่งของเกาหลีชื่อว่า Gajami Sik-Hae อาหารชนิดนี้ทำจากปลาทะเลชนิดหนึ่ง โดยนำปลาทะเลชนิดหนึ่งมาหั่นเป็นชิ้นแล้วหมักกับเกลือ กระเทียม เครื่องเทศ ร้อยละ 2.5-5 ส่วนเครื่องเทศชนิดอื่น ๆ เช่น พริกแดงและขิงให้ผลในการยับยั้งจุลินทรีย์น้อยมาก และไม่มีความสำคัญเหมือนส่วนที่เป็นน้ำของกระเทียมดังกล่าวข้างต้น (Soune , et al., 1987 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 78)

2.4 ชนิดของปลาและสัตว์น้ำที่นำมาแปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมัก

ประเทศต่าง ๆ ในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้มีผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปโดยเกิดจากกระบวนการหมักมากกว่า 60 ชนิด (Amano, 1962 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 74, 84)ในประเทศไทยมีผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักมากกว่า 10 ชนิด และปลาที่นำมาแปรรูปมีทั้งปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม (National Research Council of Thailand, 1981-1982 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 78) ตัวอย่างของผลิตภัณฑ์ปลาในประเทศไทยได้แก่

ปลาร้า ส่วนใหญ่นิยมทำจากปลาน้ำจืด ปลาที่ใช้ทำ ได้แก่ ปลากระดี่ กระดี่นาง ปลาสร้อย ปลาสร้อยนกเขา ปลาช่อน ปลาตะเพียนขาว ปลาโคก เป็นต้น และปลาร้าที่ทำจากปลาทะเล ได้แก่ ปลาจวด ปลาข้างเหลือง ปลาทูและปลาช่อนทะเล เป็นต้น

ปลาส้ม นิยมใช้ปลาตะเพียน ปลาโคก ปลาสร้อย

ส้มฟัก นิยมใช้ปลาเค้า ปลาเค้าคำ ปลาสวาย ปลาเทโพ ปลาเนื้ออ่อน ปลาตะเพียน ปลาสร้อย ปลาชะโด ปลาสลาด

ปลาจ่อม นิยมใช้ทั้งปลาน้ำจืด เช่น ปลาสร้อย และปลาทะเล เช่น ปลาไส้ตัน นอกจากนี้ยังนิยมนำกุ้งขนาดเล็กมาทำเป็นกุ้งจ่อม

ปลาเจ่า นิยมใช้ปลาน้ำจืด เช่น ปลาตะเพียน ปลาเทโพ ปลาสวาย ปลาเนื้ออ่อน

ปลาแป้งแดง นิยมใช้ปลาทะเล เช่น ปลาตะเพียนน้ำเค็มหรือปลาทะเลชนิดอื่น ๆ เช่น ปลาแมว ปลาหางไก่ ปลาไส้ตัน และปลาหลังเขียว

บูดู นิยมใช้ปลาทะเล เช่น ปลาไส้ตัน ปลาชาร์ดีน ปลาสีกุน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

น้ำปลา ปลาทะเลที่นิยมนำมาแปรรูปเป็นน้ำปลา ได้แก่ ปลากะตัก ปลาไส้ตัน ปลาหลังเขียว และปลาทู เป็นต้น

กะปิ ทำจากเคย กุ้ง หรือปลา แต่ส่วนใหญ่ทำจากเคยและกุ้ง

2.5 จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์ประมงที่เกิดจากกระบวนการหมักของไทย

ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ประมงที่เกิดจากระบวนการหมักของไทย โดย มัทนา แสงจินดาวงษ์ (2545 : 78-79, 83-84) ได้กล่าวไว้ ดังนี้

น้ำปลา แบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมักคือ *Bacillus* เชื่อว่ามีบทบาทเกี่ยวกับการสลายโปรตีนในเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นของน้ำปลาคือ *Pediococcus halophilus* เช่นเดียวกับที่ Saisiti (1967 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 83)

บูดู แบคทีเรียที่พบ ได้แก่ *Bacillus, Staphylococcus* และ *Coryneform bacteria* ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมักและจะพบแบคทีเรียชนิดนี้สูงถึงร้อยละ 90 เมื่อสิ้นสุดการหมักจึงเชื่อว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นในบูดู

ปลาร้า แบคทีเรียที่พบในระยะแรกส่วนใหญ่เป็นพวก *Taphylococcus, Micrococcus Bacillus* แบคทีเรียดังกล่าวมีส่วนช่วยในการสลายโปรตีนจากเนื้อปลา ส่วน *Pediococcus halophilus* มีปริมาณเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหมักปลาร้าเช่นเดียวกับในน้ำปลาและบูดู โดยพบปริมาณสูงถึงร้อยละ 90 เมื่อสิ้นสุดการหมักจึงเชื่อว่าเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกรดและกลิ่นรสในปลาร้า

ปลาเจ่า แบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมักคือ *Staphylococcus, Micrococcus* และ *Bacillus* จึงมีส่วนช่วยในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลาเช่นกัน ส่วนแบคทีเรียที่พบตลอดกระบวนการหมัก และพบปริมาณมากคือ *Pediococcus cerevisiae* จึงเชื่อว่าน่าจะเป็นตัวการสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นรสในปลาเจ่า ส่วนยีสต์ในสกุล *Saccharomyces* และสกุล *Endomycopsis* ที่พบในผลิตภัณฑ์น่าจะมีบทบาทในการสร้างแอลกอฮอล์และเอสเทอร์ในปลาเจ่า

ปลาส้ม แบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมักคือ *Staphylococcus, Micrococcus* และ *Bacillus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายโปรตีนจากเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียแลคติกที่พบปริมาณมากในกระบวนการหมักคือ *Pediococcus cerevisiae* และพบปริมาณรองลงมาคือ *Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis* จึงเชื่อว่าแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นรสในปลาส้ม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ส้มฟัก แบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมักคือ *Staphylococcus* จึงมีบทบาทในการสลายโปรตีนในเนื้อปลา ส่วนแบคทีเรียแลคติกที่พบ ได้แก่ *Lactobacillus brevis* ซึ่งพบมากที่สุดตลอดกระบวนการหมักและชนิดที่พบรองลงมาคือ *Pediococcus cervisiae* จึงเชื่อว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 2 ชนิด ดังกล่าวมีบทบาทในการสร้างกรดและกลิ่นรสในส้มฟัก

2.6 แลคติก แอซิด แบคทีเรีย (Lactic acid bacteria)

แลคติก แอซิด แบคทีเรีย หรือ แบคทีเรียกรดแลคติกจัดอยู่ในแฟมมิลี่ แลคโตบาซิลแลคซีอี พบในอาหารที่เกิดจากกระบวนการหมักทั้งพืชและสัตว์ และในผลิตภัณฑ์นม ในช่องปาก ทางเดินอาหารของคนและสัตว์ เป็นแบคทีเรียพวกแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ มีทั้งเซลล์รูปกลมและเซลล์รูปแท่ง (รูปท่อน) ไม่สร้างน้ำย่อยแคตาเลส (catalase negative) นอกจากบางสายพันธุ์ (strain) ในสกุล *Pediococcus* สร้างน้ำย่อย pseudocatalase จึงให้ผลเป็น false positive มี 2 กลุ่ม คือ homofermentative กับ heterofermentative Sharpe and Fryer (Sharpe and Fryer, 1966 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 64) จัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกเป็น 4 สกุล คือ

- ***Streptococcus*** จัดเป็นโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) หมักน้ำตาลให้กรดแลคติกชนิดเดียว เซลล์รูปกลม (cocci) อยู่เป็นคู่หรือเป็นสาย

- ***Leuconostoc*** จัดเป็นเฮเทโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) หมักน้ำตาลให้กรดแลคติก คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) และ volatile acid เซลล์รูปกลม (cocci) อยู่เป็นคู่หรือเป็นสาย

- ***Pediococcus*** เซลล์รูปกลม (cocci) อาจอยู่รวมกันเป็นกลุ่มหรือเป็นซ่อ บางครั้งอยู่ในลักษณะเซลล์ 4 เซลล์ติดกัน (tetrads) หมักน้ำตาลให้กรดแลคติกชนิดเดียว

- ***Lactobacillus*** เซลล์รูปแท่ง (rod shape) มีทั้งกลมที่เป็น homofermentative คือหมักน้ำตาลให้กรดแลคติกชนิดเดียวและกลุ่ม heterofermentative ภายหลังการหมักน้ำตาลให้กรดแลคติก แล้วยังให้สารอย่างอื่น คือ กรดอะซีติกและคาร์บอนไดออกไซด์รวมอยู่ด้วย

Stiles และ Holzapfel (1997 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 64) ยอมรับวิธีการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกตามวิธีของ Orla-Jensens (1919 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 64) ซึ่งเป็นผู้ริเริ่มจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรียแลคติกอย่างเป็นระบบ โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ และชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติก ซึ่งจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกไว้เป็น 7 สกุลคือ *Betabacterium, Thermobacterium, Streptococcus, Betacoccus, Microbacterium* และ *Tetracoccus* ตามตาราง ที่ 1 ต่อมาในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกสกุลเพิ่มเติมจากเดิมเป็น 12 สกุลคือ *Lactobacillus, Weissella, Carnobacterium, Streptococcus, Enterococcus,*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Lactococcus, Vagococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Brochothrix, Pediococcus และ *Tetragenococcus* (Stilles and Holzapfel, 1997 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 64-65)

Sherman (1937 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 65) ได้แยกกลุ่มแบคทีเรียแลคติกซึ่งเจริญได้เฉพาะในสภาวะไร้อากาศ (strictly anaerobes) และกลุ่ม pneumococci ออกจากสกุล *Streptococcus* นอกจากนี้แบ่งส่วนที่เหลือเป็น 4 กลุ่ม คือ pyogenic, viridans, lactic และ enterococci

Pot et al. (1994 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 65) จัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรด - แลคติกเป็น 3 กลุ่มใหญ่ ๆ คือ Obligately homofermentative lactobacilli Facultatively heterofermentative lactobacilli และ Obigately heterofermentative gas-forming lactobacilli

และยังแบ่งเป็นกลุ่ม lactobacilli อื่น ๆ ซึ่งรวมเอาสกุลต่าง ๆ ไว้ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Carnobacterium, Streptococcus, Lactococcus, Enterococcus, Vagococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Alloiococcus, Tetragenococcus* และ *Bifidobacterium*

Obligately homotermentative lactobacilli สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) เป็นส่วนใหญ่ แต่ไม่สามารถใช้น้ำตาลเพนโทส (pentose) ได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii L. acidophilus, L. helveticus*

Facultatively heterofermentative lactobacilli ได้แก่ *Lactobacillus plantarum, L. pentosus, L. casei*

Obligately heterofermentative gas-gorming lactobacilli แบคทีเรียแลคติกในกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) ได้กรดแลคติก กรดแอซีติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ถ้าเป็นการใช้น้ำตาลเพนโทส จะได้เฉพาะกรดแลคติกและกรดอะซีติก แบคทีเรียแลคติกที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus brevis, L. buchneri* เป็นต้น Axelsson (1998 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 67) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกเป็น 2 กลุ่มใหญ่คือ กลุ่มแรกเซลล์รูปท่อน ติดสี แกรมบวก (Gram rod positive) และกลุ่มที่ 2 เซลล์รูปกลม ติดสีแกรมบวก (Gram cocci positive) กลุ่มแรกมี 3 สกุลได้แก่ สกุล *Carnobacterium, Lactobacillus* และ *Weisella* กลุ่มที่ 2 ประกอบด้วย 10 สกุล ได้แก่ *Leuconostoc, Oenococcus, Weissella, Aerococcus, Enterococcus, Lactococcus, Vagococcus, Pediococcus, Streptococcus* และ *Tetragenoccus* สกุลที่จัดไว้ทั้ง 2 กลุ่ม คือ สกุล *Weissella* (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 63, 67)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 1 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก ตามวิธีของ Orla-Jensens (1919)

Genus	Shape	Catalase	Nitrite reduction	Fermentation	Current genera
Betabacterium	Rod	-	-	Hetero-	*Lactobacillus*
					Weissella
Thermobacterium	Rod	-	-	Homo-	*Lactobacillus*
Streptobacterium	Rod	-	-	Homo-	*Carnobacterium*
Streptococcus	Coccus	-	-	Homo	*Streptococcus*
					Enterococcus
					Lactococcus
					Vagococcus
Betacoccus	Coccus	-	-	Hetero-	*Leuconostoc*
					Oenococcus
					Weissella
Microbacterium	Rod	+	+	Homo-	*Brochothrix*
Tetracoccus	Coccus	+	+	Homo-	*Pediococcus*
					Tetragenococcus

หมายเหตุ โดยทั่วไป pediococci ให้ผล catalase negative มีบางสายพันธุ์สร้างน้ำย่อย pseudocatalase จึงให้ผล false positive

ที่มา : Stiles and Holzapfel (1997) อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 65

2.7 การเจริญของแบคทีเรียในระหว่างการหมัก

ผลการศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียในระยะต้นของการหมักน้ำปลา 4 เดือนพบว่า ในระยะ 15 วันแรกของการหมัก แบคทีเรียที่พบทั้งหมดร้อยละ 90 เป็นพวกรูปกลม (cocci) และในระยะ 24 วันหลังจากการหมักพบพวกรูปท่อนหรือรูปแท่ง (rod shape) เพิ่มปริมาณมากขึ้น โดยปริมาณของพวกรูปท่อนใน 55 วัน มีค่าเฉลี่ย $1.5 \times 10^5 - 2.06 \times 10^4$ โคโลนีต่อกรัม หลังจาก 55 วัน ปริมาณแบคทีเรียลดน้อยลงมีค่าเฉลี่ย 2.8×10^3 โคโลนีต่อกรัม ในการทดลองดังกล่าวใช้ปลาทูแขกหมักกับเกลือในอัตราส่วน 3:1 แบคทีเรียที่แยกเชื้อได้จากน้ำปลาดังกล่าว ได้แก่ *Micrococcus roseus, M. variansm, Pediococcus cerevisiae, P. halophilus, Bacillus pumilus, B. megaterium,*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

B. firmus, B. alvei, B. laterospirus จากการศึกษาจุลินทรีย์ในน้ำปลา 4 ชนิดจากประเทศไทย ฟิลิปปินส์ และญี่ปุ่น พบว่าแบคทีเรียแยกเชื้อจากน้ำปลาดังกล่าวส่วนใหญ่จัดอยู่ในสกุล *Bacilus* ได้แก่ *B. licheniformis, B. megaterium, B. subtulis, B. pumilus, B. circulans, B. cereus, B. sphaericus* ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นที่แยกเชื้อได้คือ *Micrococcus colpogenes, M. varians* เชื้อรา ที่พบคือ *Penicillium notatum, Cladosporium herbarum,* และ *Aspergillus fumigatus* (Crisan and Sands, 1975 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 82) มีรายงานว่า *Pediococcus halophilus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างกลิ่นหอม (aroma) ในน้ำปลาไทยโดยการย่อยสลายกรดอะมิโนเป็นกรดที่ระเหยได้ (volatile acid) นั่นเอง (Saisithi, 1967 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 75) ปริมาณของแบคทีเรียในผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก เช่น กะปิ น้ำปลา พบว่าเมื่อระยะเวลาหมักนานขึ้นปริมาณแบคทีเรียจะลดลง เช่น กะปีของฟิลิปปินส์ (bagoong) ซึ่งใช้ปลาไส้ตันหมัก ปริมาณแบคทีเรียในตอนเริ่มต้นหมักคือ 3.5×10^6 โคโลนีต่อกรัม หลังจากหมักได้ 7 วัน ปริมาณลดลงเหลือ 5.8×10^4 โคโลนีต่อกรัม และเมื่อหมักนาน 56 วัน ปริมาณแบคทีเรียลดลงเหลือเพียง 100 โคโลนีต่อกรัม (Amano, 1962 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 82)

จากการศึกษาพบว่า เอนไซม์จากยางมะละกอคือ พาเพน (papain) ช่วยเร่งปฏิกิริยาการเกิดน้ำปลาในปลาหมึกกล้วย (มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2517 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 82-83) และเอนไซม์บรอมเมลินจากสับปะรดช่วยเร่งกระบวนการเกิดน้ำปลาในปลาสร้อยได้เช่นกัน (บังอรและคณะ, 2524 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 83) กะปีปลาที่ทำจากปลาทูแขกอัตราส่วน ปลาต่อเกลือ คือ 3 : 1 แบคทีเรียในระยะ 12 วัน ของการหมักมีปริมาณ 2.29×10^4 โคโลนีต่อกรัม หมักนาน 25 วัน มีปริมาณ 3.1×10^2 โคโลนีต่อกรัม และปริมาณแบคทีเรียลดลงเหลือ 1.5×10^2 CFU/gm เมื่อหมักนาน 40 วัน สำหรับกะปีที่ทำมาจากเคยพบว่า ในสัปดาห์แรกมีปริมาณแบคทีเรีย 1.03×10^7 CFU/gm และในสัปดาห์ที่ 18 จำนวนแบคทีเรียลดลงเหลือ 401×10^6 โคโลนีต่อกรัม

ได้มีการศึกษาแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ shiokara ซึ่งทำจากหมึกกล้วย หมึกยักษ์และหอยแครง แบคทีเรียแลคติกที่พบคือ *Lactobacillus* หลายชนิด ได้แก่ *L. farciminis, L. confuses* และ *L. coryniformis* แบคทีเรียแลคติกชนิดอื่นที่พบคือ *Micrococcus* spp. และ *Staphylococcus epidermidis* (Morishita et., 1995 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 74, 84) จุลินทรีย์ที่พบในผลิตภัณฑ์ ika-shiokara ซึ่งทำจากตับ หนัง และต่อมหมึกของปลาหมึก คือ *coryneform, Bacillus* sp., *Staphylococcus* spp., *Micrococcus* sp. (Takai et al., 1993 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 83) ส่วนในผลิตภัณฑ์ที่มีชื่อว่า Kurozukuri ซึ่งทำมาจากเนื้อปลาหมึกหมักกับเกลือ โดยเติมตับและต่อมหมึกลงไปด้วย แบคทีเรียที่พบคือ *Staphylococcus warneri* และในผลิตภัณฑ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Akazurimi (ไม่เติมต่อมหมึก) พบแบคทีเรีย *S. warneri, S. xylosus* และ *S. epidermidis* (Takai et al., 1992 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 83)

ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ได้มีการนำเอาแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้ประโยชน์ทางอุตสาหกรรมอาหารอย่างกว้างขวางโดยเฉพาะอุตสาหกรรมที่เกี่ยวกับผลิตภัณฑ์นม เช่น การทำนมเปรี้ยว การทำเนยแข็ง เป็นต้น แบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในอุตสาหกรรม ดังกล่าว ได้แก่ *Lactobacillus delbrueckii subsp. Bulgaricus, L. helviticus, L. lactis, Streptococcus thermophilus* (Stiles, and Holzapfel, 1997 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 73) ประโยชน์ที่สำคัญ ของแบคทีเรียแลคติก คือ สร้างสารที่เรียกว่า แบคเทอริโอซิน (bacteriocins) ได้แก่ แอซิโดลิน (acidolin) แอซิโดฟิลิน (acidophilin) บัลการิแคน (bulgarican) แล็กโทซิลิน (lactocilin) และไนซิน (nisin) ซึ่งสารเหล่านี้สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียที่ให้โทษต่อร่างกาย เช่น เชื้อที่ทำให้เจ็บคอ เชื้อที่ทำให้ท้องร่วง เชื้อที่ทำให้เกิดโรคกระเพาะอาหารอักเสบเรื้อรัง *(Helicobacter pylori)* และเชื้อที่ทำให้เกิดแผลผุพองเรื้อรัง (*Staphylococcus aureus*) เป็นต้น (ธารารัตน์, 2542 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์,2545 : 73) จากการศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่แยกเชื้อจากผลิตภัณฑ์ที่แปรรูปโดยเกิดจากกระบวนการหมักจำนวน 50 ตัวอย่าง ได้แก่ ปลาร้า ปลาจ่อม ปลาเจ่า กุ้งจ่อม ปลาส้ม และส้มฟัก พบว่า *Enterococcus faecalis* เป็นแบคทีเรียแลคติกชนิดเดียวที่สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของ *Listeria ivanovii* DMST 4553, *Lactobacillus plantarum* ATCC8014 และ *Pediococcus pentosaceus* ATCC 33316 (จินดา, 2544 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 65) *Lactobacillus lactis* สามารถสร้างสาร bacteriocins โดยเฉพาะไนซิน (nisin) ซึ่งมีผลในการทำลายแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด เช่น *Listeria monocytogenes, Salmonella* และ *Clostridium botulinum* ได้มีการนำเอาไนซินมาใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) มากกว่า 45 ประเทศโดยได้รับการรับรองจาก WSO ให้ใช้เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร (Stiles and Holzapfel, 199 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 73) อาหารสดและอาหารแปรรูปที่มีการทดลองใช้ไนซิน ได้แก่ เนยแข็งสวิส น้ำมะเขือเทศ ซุปข้าวโพด เบียร์ และ meat slurries โดยพบว่าไนซินมีส่วนช่วยในการทำเนยแข็งสวิสทำให้สายพันธุ์ที่เป็นประโยชน์ต่อการทำเนยแข็งเจริญมากกว่าสายพันธุ์อื่นที่ไม่ต้องการนั่นเอง ประโยชน์อื่น ๆ ของแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ ช่วยลดการเกิดสารก่อมะเร็งบางชนิด เช่น ไนโทรซามีน (nitrosamine) จึงลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็งในลำไส้ใหญ่ ช่วยลดระดับคอเลสเทอรอลในเลือด สร้างเอนไซม์แลคเทส ย่อยน้ำตาลในนม ป้องกันและยับยั้งการติดเชื้อในลำไส้และช่องปัสสาวะโดยการผลิตสารต่อต้านแบคทีเรียและ/หรือกระตุ้นระบบ lactoperoxidase นอกจากนี้ยังทำให้ระบบภูมิคุ้มกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แข็งแรง บรรเทาอาการโรคภูมิแพ้ บรรเทาอาการของผลข้างเคียงที่เกิดจากการฉายรังสีและการทำเคมีบำบัดหลังการผ่าตัดมะเร็ง และช่วยในการทำให้มีการนำเอาฮอร์โมนเอสโทรเจน (estrogen) กลับมาใช้ใหม่ เป็นการช่วยชะลอความแก่และบรรเทาการเกิดโรคกระดูกพรุน เนื่องจากขาดฮอ-โมนร์เอสโทรเจนจึงทำให้การดูดซึมแคลเซียมบกพร่อง (ธารารัตน์, 2542; จินตลา, 2544; Gilliand, 1990 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 74)

นอกจากพวกโปรตีโอไลติกและแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์ที่ผ่านกระบวนการหมักคือ เชื้อรา ได้แก่ ราแดง *Monascus purpureus* หรือ *ang-kak, Mucor* sp., *Amlomyces* sp., *Rhizopus* sp. ราดังกล่าวมีความสำคัญกับลูกแป้งข้าวหมาก ส่วนราในสกุล *Aspergillus* sp. มีความสำคัญในการทำเต้าเจี้ยวและซีอิ๊ว (นภา, 2536 อ้างโดย มัทนา แสงจินดาวงษ์, 2545 : 74-75)

2.8 สารปฏิชีวนะ (Antibiotics)

สารปฏิชีวนะที่เรารู้จักกันดีส่วนใหญ่จะผ่านการทดสอบกับอาหารดิบมาแล้วทั้งสิ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารประเภทโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ ปลา และสัตว์ปีก เป็นต้น ทั้งนี้เพื่อช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาในช่วงอุณหภูมิแช่เย็น ในบรรดาสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบนั้นพบว่า ออรีโอมายซิน (aureomycin หรือ chlortetracycline) เป็นสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงสุดทั้งนี้เพราะมีช่วงของการยับยั้งจุลินทรีย์ที่กว้าง (broad spectrum) ยังมีสารปฏิชีวนะสองชนิดที่ได้รับการยอมรับว่าให้ผลดีต่อการยืดอายุการเก็บรักษาอาหาร ได้ แก่ เททราซัยคลิน (tetracycline หรือ oxy tetracycline) และ คลอโรมายซิน (chloromycin หรือ chloramphenicol) ทั้งนี้สารปฏิชีวนะทั้งสามชนิดก่อให้เกิดผลต่อการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนภายในเซลล์ของจุลินทรีย์ สำหรับสารปฏิชีวนะชนิดอื่น ๆ เช่น สเตรปโตมายซิน (streptomycin) นีโอมายซิน (neomycin) โพลีมายซิน (polymyxin) ไนซิน (nisin) ซับทิลิน (subtilin) และ บาซิทราซิน (bacitracin) ไม่เป็นที่นิยมที่จะใช้กับอาหารในขณะที่ เพนนิซิลิน (penicillin) มีการใช้ในอาหารเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

ในยุโรปมีการใช้ไนซิน (nisin) เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในกลุ่มแอนแอโรบส์ (anaerobes) ในเนยแข็งและผลิตภัณฑ์เนยแข็ง ส่วนนาทับซิน (natamtcin) ซึ่งมีผลต่อการยับยั้งยีสต์และเชื้อรานั้นถูกใช้กับผลิตภัณฑ์ประเภทน้ำส้ม ผลไม้สด ไส้กรอก และเนยแข็ง

ได้มีการศึกษาทดลองการใช้สารปฏิชีวนะร่วมกับความร้อน ทั้งนี้เพื่อพยายามที่จะลดปริมาณความร้อนที่จำเป็นในการถนอมอาหารบรรจุกระป๋องที่มีความเป็นกรดต่ำและปานกลาง ทั้งนี้การศึกษาส่วนใหญ่จะใช้เพปไตด์ (peptides) ซับทิวลิน (subtilin) ร่วมกับไนซิน และ ไทโลซิน (tylosin) ผลของการทดลองที่ใช้ความร้อนเพียงพอในการยับยั้งสปอร์ทั้งหมดของแบคทีเรีย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

clostridium botulinum ร่วมกับการเติมสารปฏิชีวนะดังที่กล่าวในระดับความเข้มข้นที่เพียงพอต่อการยับยั้งการงอกและการเจริญเติบโตของสปอร์ที่รอดชีวิตของแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดความเสื่อมเสียของอาหารและสามารถต้านทานความร้อนได้สูง และ putrefactive anaerobes ผลที่ได้จากการทดลองพบว่า ซับทิวลินไม่มีผลต่อความต้านทานความร้อนของสปอร์ของแบคทีเรียแต่จะมีผลในการยับยั้งเซลล์ที่บาดเจ็บที่รอดชีวิตมา ในขณะที่ไนซินจะมีผลต่อการงอกของสปอร์และการย่อยสลายของผนังหุ้มสปอร์ ส่วนไทโลซิน อาจมีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จุลินทรีย์ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2538 : 176)

การจำแนกสารปฏิชีวนะ

การจำแนกสารปฏิชีวนะสามารถจำแนกได้หลายลักษณะ เช่น จำแนกโดยอาศัยโครงสร้างทางเคมี เช่น carbohydrate-containing antibiotics, marcrocyclic lactones, Quinones and related antibiotics, amino acid and peptide antibiotics เป็นต้น และยังมีการจำแนกอีกหลายแบบ โดย ปิ่นมณี ขวัญเมือง (2547 : 177-178) ได้กล่าวถึงการจัดจำแนกสารปฏิชีวนะไว้ ดังนี้

การจำแนกสารปฏิชีวนะตามความสามารถในการยั้บยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้แก่

1. Broad spectrum antibiotics ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ได้หลายชนิด เช่น เซฟาโลสปอริน สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ทั้งชนิดแกรมบวกและชนิดแกรมลบ

2. Narrow spectrum antibiotics ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้เฉพาะกลุ่ม เช่น เพนนิซิลิน สามารถยับยั้งการเจริญได้เฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก

การจำแนกประเภทของสารปฏิชีวนะตามกลไกการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น

1. สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ เช่น เพนนิซิลิน และเซฟาโลสปอริน

2. สารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน เช่น คลอแรมฟีนิคอล สเตรปโตมัยซิน และเททราซัยคลิน

3. สารปฏิชีวนะที่มีผลยับยั้งต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) เช่น ไรแฟมพิน (rifampin)

4. สารปฏิชีวนะที่มีผลในการทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ เช่น โพลีมิกซินบี (polymyxin B) และคีโตโคนาโซล (ketokonazole)

5.สารปฏิชีวนะที่ยับยั้งการสังเคราะห์สารเมแทบอไลท์ที่จำเป็น เช่น ซัลฟานิลาไมด์ (sulfanilamide) ซึ่งเป็นยาซัลฟาที่มีโครงสร้างคล้าย para-aminobenzoic acid (PRBA) ซึ่งสามารถ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

60055

ยับยั้งการสังเคราะห์กรดโฟลิก ซึ่งเป็นโคเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์พิวรีน ไพริมีดีน และกรดอะมิโนหลายชนิด

การแบ่งประเภทของสารปฏิชีวนะตามกรรมวิธีการผลิต (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2547 : 177-178)

1. Biosynthetic antibiotic ได้แก่ สารปฏิชีวนะที่ผลิตจากกระบวนการหมัก โดยเฉพาะเมื่อเติม side chain precursor เช่น เพนนิซิลินจี

2. Semi- synthetic antibiotic ได้แก่สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากกระบวนการหมัก แล้วนำมาดัดแปลงโครงสร้างทางเคมี เช่น แอมพิซิลิน (ampicillin)

3. synthetic antibiotic ได้แก่สารปฏิชีวนะที่ผลิตได้จากกระบวนการสังเคราะห์ทางเคมี เพราะใช้ต้นทุนการผลิตต่ำกว่ากระบวนการหมัก เช่นคลอแรมฟินิคอล

นอกจากการแบ่งประเภทของสารปฏิชีวนะตามที่กล่าวมาแล้ว ยังมีการจัดแบ่งตามชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิต เช่น เพนนิซิลิน ผลิตจาก Penicillium เซฟาโคสปอริน ผลิตได้จากเชื้อรา Cephasporium และสเตรปโตมัยซินผลิตได้จาก Streptomyces เป็นต้น

ประโยชน์ของสารปฏิชีวนะ

ประโยชน์ของสารปฏิชีวนะมีมาก แต่จะใช้ในการรักษาโรคของมนุษย์เรามากที่สุด รองลงมาก็ใช้ในการเกษตร การถนอมอาหาร และปริมาณเล็กน้อยในการศึกษาทางด้านชีวเคมี และจุลชีววิทยา เป็นต้น

ปริมาณความต้องการสารปฏิชีวนะในการเลี้ยงสัตว์ ป้องกันโรคพืช และถนอมอาหารมีมากขึ้นที่อเมริกา ในปี ค.ศ. 1964 ใช้สารปฏิชีวนะประมาณ 58 ล้านปอนด์ การนำสารปฏิชีวนะมาใช้กับสัตว์เลี้ยง เริ่มมีการทดลองในปี ค.ศ. 1949 โดยให้ในระดับต่ำ และในปี ค.ศ. 1950 ก็ผลิตเป็นการค้าเพื่อใช้กับสัตว์ในครั้งแรกใช้คลอร์เททราซัยคลิน (chlortetracycline) ออกซีเททราซัยคลิน เพนนิซิลิน และ สเตรปโตมายซิน ต่อมาใช้บาซิทราซิน (bacitracin nystatin) และ ไทโลซินด้วย เสริมลงในอาหารสัตว์ โดยปริมาณที่ใช้อยู่ในระดับต่ำคือ สารปฏิชีวนะ 50 กรัมต่ออาหารหนึ่งตัน (ประมาณ 50 ppm) ระดับ 200 ppm ก็มีใช้บ้าง ใส่เพื่อส่งเสริมการเจริญของสัตว์เลี้ยง เช่น ไก่ หมู และลูกวัว เท่าที่มีการศึกษาไม่มีการตกค้างในเนื้อสัตว์ และไม่มีหลักฐานเช่นกันว่าทำให้ดื้อยาไปสู่จุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อโรคของคน และไม่ได้ทำให้เกิดการต้านยาของสัตว์แต่อย่างใด เพราะใช้ในปริมาณต่ำมาก การใช้สารปฏิชีวนะในการรักษาโรคสัตว์เช่น ทำลายเชื้อไก่งวง สารปฏิชีวนะที่ใช้รักษาโรคติดเชื้อสัตว์ เช่น ไฮโกรมายซิน (hygromycin) และ ไทโลซิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการวัดความเข้มข้นของดิไฮโดรสเตรปโตมายซิน (dihydrostreptomycin) ในน้ำนมจากแม่โคที่ใช้สารชนิดนี้ โดยฉีดเข้าที่กล้ามเนื้อพบว่ายังคงอยู่ในน้ำนมระยะแรก ๆ โดยทดลองให้ในระดับต่าง ๆ พบว่ายาจะถูกกำจัดออกจากเต้านมสัตว์ภายใน 48 ชั่วโมง หลังจากที่ให้ หรือการฉีด chlortetracycline เข้าทางเส้นเลือดสารจะอยู่ได้ 48 ชั่วโมงเช่นกันแล้วถูกกำจัดออก จะเห็นได้ว่าการใช้สารปฏิชีวนะกับสัตว์ 2 กรณี คือเพื่อส่งเสริมการเจริญและเพื่อการรักษาโรคติดเชื้อของสัตว์ กลไกของสารปฏิชีวนะที่กระตุ้นการเจริญในสัตว์และคนยังไม่เป็นที่เข้าใจดีนัก

สำหรับการนำสารปฏิชีวนะใช้กับพืชนั้นมีมานานแล้วหลังจากค้นพบเพนิซิลลินได้ไม่นาน สารปฏิชีวนะที่นำมาใช้รักษาโรคพืชระยะนั้นมี สเตรปโตมายซิน เททราซัยคลิน ไซโคลเฮกซิไมด์ (cycloheximide) และ กริซีโอฟูลวิน (griscofulvin) เป็นต้น โดยเฉพาะสเตรปโตมายซิน เป็นสารปฏิชีวนะชนิดแรกที่นำมาใช้กับการเกษตรของอเมริกา จะใช้สเตรปโตมายซิน และ เททราซัยคลิน ควบคุมโรคพืชที่เกิดจากแบคทีเรีย ส่วนการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราจะใช้ ไซโคลเฮกซิไมด์ และ กริซีโอฟูลวิน สำหรับ ไซโคลเฮกซิไมด์ ฆ่าเชื้อราได้ดีมาก แต่ข้อเสียคือทำลายเซลล์พืชด้วย ทำลายไวรัสใช้ไซโตวิริน (cytovirin) ในญี่ปุ่นมีการใช้สารปฏิชีวนะมากขึ้นเมื่อค้นพบบลัสติซิดิน (blasticidin) ที่ใช้ป้องกันโรคใบไหม้ของข้าวได้ผลดีมาก ต่อมามีสารปฏิชีวนะชนิดใหม่ ๆ ตามมา เช่น คาซูกามายซิน (kasugamycin) โพลีออกซิน (polyoxins) และ วาลิดามายซิน (validamycin) โดยนำมาใช้แทนวัตถุมีพิษ เช่น เมอคูริค ฟังจิไซด์ (mercuric fungicides) และ แอซินิค ฟังจิไซด์ (arsenic fungicides) ซึ่งมีพิษตกค้างสูง ประโยชน์ของการใช้สารปฏิชีวนะในการเกษตรแทนวัตถุมีพิษคือ ปริมาณของสารปฏิชีวนะที่ใช้ต่ำมากประมาณ 10 - 50 ppm และเมื่อเปรียบเทียบประมาณสารที่ฉีดพ่นไปหนึ่งหน่วยพบว่าพื้นที่นั้นก็จะน้อยกว่าการใช้วัตถุมีพิษมากที่สำคัญคือ ไม่เป็นพิษกับพืช หรือถ้ามีก็น้อยมาก และสารปฏิชีวนะจะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วโดยจุลินทรีย์ จึงไม่มีปัญหาเรื่องมลพิษ และ การผลิตสารปฏิชีวนะจะใช้วัตถุดิบจากผลิตผลทางการเกษตรเป็นส่วนใหญ่ แต่การนำสารปฏิชีวนะมาใช้ยังมีขีดจำกัดเพราะราคาแพงกว่าสารเคมี (ดวงพร คันธโชติ, 120)

คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างเนื้อหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ สิ่งที่สมควรพิจารณาอีกประการหนึ่ง คือ ความสามารถในการต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เนื่องจากว่าการเลี้ยงสัตว์เพื่อการบริโภค เมื่อสัตว์เกิดโรคต้องมีการป้องกันและรักษาโรคที่เกิดขึ้นโดยใช้สารปฏิชีวนะ และมีโอกาสที่สารปฏิชีวนะอาจตกค้างในเนื้อสัตว์ภายหลังการชำแหละ ดังคุณสมบัติประการหนึ่งของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาเป็นกล้าเชื้อ คือ ควรมีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารปฏิชีวนะ (antibiotics) หมายถึงผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากเชื้อจุลินทรีย์ โดยที่ความเข้มข้นเพียงเล็กน้อยมีผลในการทำลายจุลินทรีย์บางชนิดได้ ในปัจจุบันสารปฏิชีวนะรวมถึงสารสังเคราะห์ด้วย สารปฏิชีวนะสามารถยับยั้งแบคทีเรียทั้งหมดได้ บางชนิดมีความจำเพาะต่อสปีชีส์ของจุลินทรีย์บางสปีชีส์ บางชนิดยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ คุณสมบัติของสารปฏิชีวนะเป็นได้ทั้งทำลายแบคทีเรีย (bacteriocidal) หรือยับยั้งแบคทีเรีย (bacteriostatic) หรือสารปฏิชีวนะบางชนิดมีคุณสมบัติทั้งสองประการ แต่ใช้ในความเข้มข้นที่ต่างกัน กลไกการทำลายของสารปฏิชีวนะมีตำแหน่งที่จำเพาะต่อเซลล์ โดยบริเวณที่ทำลายเป็นได้ทั้งเมมเบรนหรือเกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน (Singleton, 1997 อ้างโดย ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546 : 34)

การต้านทานสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกอาจเนื่องมาจากเซลล์ไม่มีโครงสร้างที่จำเพาะต่อสารปฏิชีวนะชนิดนั้น ๆ เช่น Mycoplasma ซึ่งไม่มีผนังเซลล์ จึงไม่มีผลเมื่อใช้แพนนิซิลิน การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะในแบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไปมักใช้วิธีการที่เรียกว่า agar diffusion method ซึ่งทดสอบใน agar madia เป็นการวัดความอ่อนแอ (susceptibility) ของเชื้อที่ใช้ทดสอบเมื่อได้รับสารปฏิชีวนะนั้น ๆ (Rosenblatt, 1991 อ้างโดย ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546 : 34) ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่

เททราซัยคลิน (tetracyclines) เป็นสารปฏิชีวนะ มีโครงสร้างเป็น hydronaphtacenenucleds ตัวอย่างกลุ่มนี้เช่น คลอเตตราซัยคลิน (chlortetracycline) สามารถจับกับ 305 subunit t-RNA ของไรโบโซม และยับยั้งเอนไซม์ที่จะต่อ aminoacyl t-RNA กับ ribosome acceptor site จึงหยุดการสังเคราะห์โปรตีนได้ ยากลุ่มนี้มีขอบข่ายการออกฤทธิ์กว้าง คือมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบหลายตัว ยกเว้น โปรตียูส (Proteus) ซีโดโมเนส (Pseudomonas) และ ซาลโมเนลลา (Salmonalla) แต่วิถีการออกฤทธิ์เป็นแบบยับยั้ง (พิมพ์พันธ์ เลียงพิบูลย์, 2536 : 203) ความต้านทานของจุลินทรีย์ที่ได้รับเททราซัยคลินชนิดหนึ่ง พบบ่อยที่ทำให้เกิดการต้านยาเททราซัยคลินชนิดอื่น ๆ เชื้อจุลินทรีย์ติดแกรมลบรูปแท่งที่ต้านยาเททราซัยคลินได้ระดับปานกลาง (ดวงพร คันธโชติ, 116)

เททราซัยคลิน เป็นสารปฏิชีวนะที่ผลิตจาก Streptomyces หลายสปีชีส์ เช่น *S. aureofaciens, S. rimosus* และยังได้จากกระบวนการกึ่งสังเคราะห์ เป็นสารปฏิชีวนะตัวแรกที่ใช้ต่อต้านแบคทีเรีย กลไกการออกฤทธิ์มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนหรืออาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเมมเบรน เททราซัยคลินถูกนำมาใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคติดต่อที่เกิดจากแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ เช่น Mycoplasma, Chlamydia และ Rickettsia (Singleton, 1997 อ้างโดย ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546 : 34) ความสามารถในการต่อต้านต่อเททราซัยคลินของแบคทีเรีย ทั้งชนิดแกรมบวกและแกรมลบอาจเกิดจากการไหลออกของตัวยา และการเปลี่ยนแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตำแหน่งการจับของตัวยากับเซลล์ หรือโครงสร้างของยาถูกทำลาย โดยทั่วไปแล้วความต้านทานของแบคทีเรียตามธรรมชาติเกิดได้กับแบคทีเรียแทบทุกสกุล ซึ่งอาจมาจากพลาสมิด การถ่ายทอดของโครโมโซมตามธรรมชาติ นอกจากนั้นการใช้ tetracycline จนได้เกิดการสลายตัวตามธรรมชาติก็เป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดความต้านทานขึ้นมาได้ และยังพบว่าแบคทีเรียบางชนิดมีการทำลายพิษของสารปฏิชีวนะได้ เช่น *E. coli* และ *Bacteroides fragilis* พบว่าโครงสร้างของ เททราซัยคลินมีการเปลี่ยนแปลงทำให้ไม่มี active site ที่จะจับกับเซลล์ได้ เซลล์จึงมีความต้านทานเกิดขึ้น (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546 : 36)

ฟอร์มาลดีไฮด์ (foemaldehyde) มีขายในท้องตลาดในรูปของเหลวที่เรียกฟอร์มาลิน คือ ฟอร์มาลดีไฮด์เข้มข้น 37 % ในน้ำ สามารถฆ่าเชื้อได้ภายใน 6-12 ชั่วโมง แต่ถ้าเป็นสปอร์ของแบคทีเรียใช้เวลา 2-4 วัน Ethicon, CF_{15} เป็น formaldehyde + isopropyl alcohol มีโซเดียมไนไตรท์เป็นตัวกันสนิม สามารถฆ่าจุลชีพแกรมบวกและแกรมลบได้ใน 30 นาที และฆ่าสปอร์ของแบคทีเรียได้ใน 18 ชั่วโมง

ด่างทับทิม (Potassium permanganate, $KMnO_4$) มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อราด้วย เมื่อถูกกับสารอินทรีย์ฤทธิ์ในการทำลายเชื้อจะลดลง ความเข้มข้น 1:10,000 ฆ่าจุลชีพได้หมดใน 1 ชั่วโมง ถ้าความเข้มข้นมากกว่า 1:5,000 จะระคายเคืองเนื้อเยื่อ ใช้ล้างแผล สวนล้างกระเพาะปัสสาวะ แช่ผักผลไม้ต่าง ๆ (พิมพ์พันธ์ เลียงพิบูลย์, 2536 : 195)

เกลือ (salt) เกลือที่นิยมใช้ ได้แก่ เกลือแกงโซเดียมคลอไรด์ (NaCl) โดยความเข้มข้นของเกลือที่ใช้จะเป็นตัวกำหนดผลที่เกิดขึ้น ความเข้มข้นที่ใช้เพียงพอที่ป้องกันหรือทำให้การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ช้าลง หรือใช้ความเข้มข้นเพียงพอที่จะทำให้เกิดการหมักเพื่อผลิตกรด (acid fermentation) ขึ้นได้ ผลของเกลือที่ใช้แบ่งออกเป็นข้อ ๆ ได้ดังนี้

1.เกลือทำให้ความดันออสโมติกสูงขึ้นและก่อให้เกิด plasmosis ของเซลล์ ส่วนความเข้มข้นของเกลือที่จำเป็นต่อการยับยั้งหรือการทำลายเซลล์ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์เป็นสำคัญ

2. เกลือทำให้อาหารแห้งโดยดึงออกไปจากอาหารหรือโดยการจับความชื้นเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นกับเซลล์จุลินทรีย์ที่ถูกทำให้แห้งด้วยเกลือ

3. เกลือจะเกิดการแตกตัวเป็นประจุคลอไรด์ซึ่งก่อให้เกิดผลร้ายต่อจุลินทรีย์

4. เกลือมีผลทำให้ความสามารถในการละลายของออกซิเจนในความชื้นหรือน้ำลดลง

5. เกลือทำให้เซลล์ถูกกระทบด้วยคาร์บอนไดออกไซด์ได้ง่าย

6. เกลือจะมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการย่อยสลายโปรตีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประสทธิภาพของเกลือในการต่อต้านการเจริญของจุลินทรีย์ขึ้นกับความเข้มข้นและอุณหภูมิเป็นสำคัญ (วราวุฒิ ครูส่ง, 2538 : 173)

2.9 การจัดจำแนกแบคทีเรียโดย API 50 CHL

หลักการ

การทดสอบโดยใช้หลักการของ API ต้องใช้อาหาร 50 ชนิด ในการหมักจะใช้คาร์โบร์ไฮเดรต 49 ชนิด โดยทำในหลอดเพื่อดูผลการทดลอง ซึ่งดูจากผิวของอาหารที่ผ่านการบ่มว่าแต่ละหลอดมีลักษณะอย่างไร คาร์โบไฮเดรตเมื่อผ่านการหมักจะทำให้มีกรดเพิ่มขึ้น พีเอชลดลง และสังเกตได้จากสีจะเปลี่ยนไป จากนั้นนำผลที่ได้มาจัดจำแนกโดยซอร์ฟแวร์ของ API ต่อไป

วัสดุ-อุปกรณ์

1. API 50 CH สทริพ
2. McFarland Standard
3. อุปกรณ์ตรวจสอบ
4. ปิเปต
5. *Mineral oil*
6. *Ampoule rack*
7. สำลี
8. อาหารเลี้ยง MRS
9. suspension MRS 2 ml และ 5 ml

เครื่องมือ

1. ตู้บ่มเชื้อ
2. ตะเกียงแก๊ส (ใช้สำหรับให้ความร้อน)
3. ปากกามาร์กเกอร์
4. ตู้ปลอดเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

Suspension Medium 2 and 5 ml	Demineralized water	
API 50 CHL Medium 10 ml	Polypeptone	10 g
	Yeast extract	5 g
	Tween 80	1 ml
	Dipotassium phosphate	2 g
	Sodium acetate $3H_2O$	5 g
	Diammonium citrate	2 g
	Magnesium sulphate $7H_2O$	0.2 g
	Manganese sulphate $4H_2O$	0.05 g
	Bromocresol Purple	0.17 g
	Demineralized water to make	1000 ml

การเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อ

เก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ที่ อุณหภูมิ 2-8 องศาเซลเซียส

ข้อควรจำและข้อควรระวัง

1. ใช้สำหรับวินิจฉัยโรคเท่านั้น
2. ห้องปฏิบัติการทดลองต้องปลอดเชื้อ และป้องกันไม่ให้เชื้อปนเปื้อนสู่ภายนอก
3. ไม่ใช้ปากดูดปิเปต
4. ไม่ใช้อาหารที่หมดอายุ
5. เก็บอาหาร ในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ 20-30 องศาเซลเซียส
6. เปิด ampoules อย่างระมัดระวังดังนี้
   - ใช้มือจับ ampoule อยู่ในระดับตั้งฉาก
   - จับแล้วเขย่า
   - ใช้นิ้วหัวแม่มือจับตรงส่วนบน ซึ่งมีฝาปิด
   - ใช้นิ้วหัวแม่มือกดไปทางด้านนอก
   - หมุน ampoule ให้กลับหัวกลับหาง และอยู่ในระดับตั้งฉาก
   - ย้าย reagent ลงขวด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7. การบ่มเชื้อต้องระวังไม่ให้เชื้อภายนอกปนเปื้อนลงไป และเก็บในสภาวะที่เหมาะสม

8. หลังจากบ่มเชื้อ และจำแนกเชื้อให้นำเชื้อทั้งหมด autoclaved ให้เรียบร้อย

9. ในการทดลองต้องใช้ตารางจัดจำแนก และกล้องจุลทรรศน์ ชนิดพิเศษ ที่มีกำลังขยายสูง

ขั้นตอนการส่งตัวอย่างตรวจ

การส่งตัวอย่างตรวจ ต้องเลี้ยงแบคทีเรียให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ทำโดยผู้เชี่ยวชาญ ในการจำแนกกลุ่มแบคทีเรียต้องทำให้อยู่ในสภาพที่ปลอดเชื้อตามขั้นตอน

การเลือกโคโลนี

1. เลือกโคโลนีเดี่ยว เป็นสายพันธุ์

2. เลี้ยงในอาหารสูตร MRS บ่มในสภาวะไร้อากาศ ที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง ทั้งนี้การบ่มขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาของสายพันธุ์

3. ลักษณะของกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก เป็นแบบแท่ง ส่วนใหญ่ติดแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส ไม่สร้างสปอร์ ไม่ใช้ออกซิเจน เจริญบนอาหารสูตร *MRS*

การเตรียมเชื้อ

1. ใช้เครื่องวัดความหนาแน่น

- เปิด ampoule *API* 50 CHL ตามวิธีการใช้ ที่บอกไว้ และใช้อย่างระมัดระวัง
- เลือกโคโลนีที่มีลักษณะเหมือนกัน และ suspension ที่ขุ่นเท่ากัน 2 McFarland

2. ไม่ใช้เครื่องวัดความหนาแน่น

- เปิด ampoule ที่ใส่ suspension (2 ml) ตามคำแนะนำ และใช้อย่างระมัดระวัง (หรือใช้น้ำกลั่นในหลอดทดลองที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว)
- ใช้สำลีเป็นตัวช่วยในการเลือกซับเอาแบคทีเรียที่โตเต็มที่จาก suspension ใน ampoule
- เปิด ampoule ที่มีสาร suspension (5 ml) เทออกมาไม่เกิน 5 ml ถ้ามากกว่านั้น อาจเกิดอันตราย เอาเชื้อ suspension มา 2 McFarland เทออกตามเรคคอร์ด (record) ที่ต้องการ ทำการบันทึก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- เปิด ampoule ตามระบบ API 50 CHL ตามข้อควรระวัง และคำเตือน และเริ่มเพาะเชื้อโดยการใช้จำนวนเรคคอร์ด (record) ตามที่บันทึกไว้ แต่ทำ 2 ซ้ำ

3. โฮโมจีไนซ์

การเพาะเชื้อจากสทริพ

1. บรรจุอาหาร API 50 CHL ลงหลอดเพื่อเพาะเชื้อ และปิดให้เรียบร้อย ทดสอบกับ mineral oil

2. บ่มสภาพที่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 30 หรือ 37 องศาเซลเซียส เวลา 48 ชั่วโมง

การอ่านสทริพ

ให้อ่านสองครั้ง คือ หลังจากการบ่มที่ 24 และ 48 ชั่วโมง

การทดสอบจะให้ผลที่แน่นอน และตรงกัน คือ จะผลิตกรด อาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงกลายเป็นสีเหลือง

การจัดการกับวัสดุ-อุปกรณ์ที่ใช้แล้ว

หลังจากใช้ สทริพ ampoules swab และปิเปต ควรจะเผาทิ้ง นึ่งฆ่าเชื้อ หรือจุ่มลงในยาฆ่าเชื้อโรค เพื่อขจัดสิ่งเจือปน ก่อนที่จะนำไปใช้ใหม่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการ

3.1 อุปกรณ์ที่ใช้ในการวิจัย

<u>วัตถุดิบ</u>

1. ตัวอย่างปลาส้ม ซึ่งรวบรวมจากตลาดหัวตะเข้ มีนบุรี และลาดพร้าว
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก)

<u>เครื่องมือ</u>

1. เครื่องชั่งสาร
2. ตู้บ่มเชื้อ
3. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
4. กล้องจุลทรรศน์
5. กล้องถ่ายภาพ Olympus
6. ตู้บ่มเพาะเชื้อ
7. เทอร์โมมิเตอร์
8. ตู้เย็น
9. ตู้ถ่ายเชื้อ
10. จานเพาะเชื้อ
11. หลอดทดลอง
12. เข็มเขี่ยเชื้อ
13. ตะเกียงแอลกอฮอล์
14. ช้อนตักสาร
15. กระบอกตวง
16. ขวดชมพู่
17. หลอดดักแก๊ส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

18. แท่งแก้วแก่น

19. บีกเกอร์

3.2 วิธีการ

3.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

1. การเก็บตัวอย่าง

นำตัวอย่างปลาส้มที่วางจำหน่ายในท้องตลาด คือ ตลาดหัวตะเข้ มีนบุรี และลาดพร้าว โดยตัวอย่างปลาส้มที่เก็บรวบรวมเป็นปลาส้มที่มีการผลิตและจำหน่ายค่อนข้างมากในท้องตลาด

2. การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างปลาส้มใส่ถุงผสมตัวอย่างจำนวน 10.0 กรัม ขยี้ตัวอย่างให้ละเอียด เติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 90 มิลลิลิตร ผสมสารละลายเปปโตนกับตัวผลิตภัณฑ์ให้เข้ากันดีโดยการเขย่าอย่างแรงประมาณ 1 นาที จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 10 เท่า จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างและเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการ

3. การหาปริมาณจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลคติกและปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดสารละลายตัวอย่างที่ 10^{-5} ซึ่งเตรียมได้จากข้อ 2 จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยทำ 3 ซ้ำ จากนั้นเททับด้วยอาหารแข็งสูตร MRS ที่ใส่อินดิเคเตอร์ และผ่านการหลอมไว้ที่อุณหภูมิ 50 – 55 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าจานอาหารเลี้ยงเชื้อเบา ๆ เพื่อให้ อาหารและสารละลายตัวอย่างผสมกันอย่างทั่วถึง ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีที่เกิดจากการเปลี่ยนสีม่วง เป็นสีเหลือง

4. การแยกและการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

หลังจากนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว เลือกเขี่ยเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวและสามารถสร้างกรดได้มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นใช้เข็มเขี่ยเชื้อเขี่ยโคโลนีที่อยู่เดี่ยว ๆ มาแทง (stap) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารสูตรเดียวกันและมีแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อไว้ที่ตู้เย็นสำหรับใช้ทดลองขั้นต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การย้อมแกรมและการศึกษารูปร่างแบคทีเรีย

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ซึ่งหยดน้ำกลั่น 1 หยด สเมียร์เชื้อให้เป็นวง ปล่อยให้รอยสเมียร์แห้ง และตรึงเซลล์โดยนำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟจนแห้ง นำมาย้อมด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเลตเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนเกินทิ้ง พร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ล้างรอยสเมียร์เพื่อกำจัดคริสตัลไวโอเลตส่วนเกินด้วยแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น หยดสาร Saflanin solution เป็นเวลา 30 วินาที ล้างสารละลายส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้แผ่นสไลด์แห้ง นำไปศึกษารูปร่างของเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.2.3 ศึกษาการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

1. การทดสอบแคตาเลส

ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ แตะโคโลนีบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้มาขยี้ลงบนแผ่นสไลด์ที่หยดด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1- 2 หยด ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดนั้นให้ผลเป็นบวก หรือสร้างแคตาเลสถ้าไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นลบ หรือไม่สร้างแคตาเลส คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียไม่สร้างแคตาเลสไปทดสอบต่อไป

2. การทดสอบวิธีในการสร้างกรดว่าเป็น homofermentativc หรือ heterofermentative เขี่ยเชื้อที่เจริญในอาหารแข็งสูตร MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว MRS และหลอดดักแก๊ส จำนวน 1 ลูป จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเจริญของเชื้อในหลอดทดสอบ ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊สแสดงว่ามีการสร้างกรดเป็นแบบ heterofermentative ถ้าไม่มีแก๊สเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊สแสดงว่ามีการสร้างกรดแบบ homofermentative บันทึกผล

3. การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส

เขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 และ 45 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญที่อายุการบ่ม 24 ชั่วโมง และ 7 วัน บันทึกผลการเจริญของเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. การทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์

เตรียมอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ โดยอบเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1- 2 ชั่วโมง นำไปเติมลงในอาหารเหลว MRS โดยให้มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำอาหารเหลวดังกล่าวไปฆ่าเชื้อ เขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูป ลงในอาหารเหลวเตรียมไว้ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการเจริญ ของเชื้อภายใน 2-7 วัน บันทึกผล

3.2.4 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

การเตรียมอาหารสำหรับทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ เพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเจือจางเชื้อลงในอาหารแข็ง MRS ที่มีองค์ประกอบของวุ้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ และหลอมไว้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผสมเชื้อกับอาหารให้เข้ากันแล้วเททับลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารแข็ง (มีองค์ประกอบของวุ้น 1.5 เปอร์เซ็นต์) อยู่ก่อนแล้ว ปล่อยให้อาหารแข็งตัว

นำกระดาษกรอง Whatman มาตัดให้มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6 เซนติเมตร (ใช้สำหรับเป็นตัวทดสอบสารปฏิชีวนะ) และนำไปฆ่าเชื้อ จากนั้นนำไปจุ่มสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ เททราซัยคลิน ออกซีเททราซัยคลิน ด่างทับทิม ฟอร์มาลิน และเกลือ ที่ความเข้มข้น 10, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร วางผึ่งให้แห้งบนกระดาษที่ปราศจากเชื้อ คีบกระดาษกรองที่จุ่มสารละลายปฏิชีวนะที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาวางบนจานอาหารเพาะเชื้อที่เตรียมไว้ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อว่าทนต่อสารปฏิชีวนะหรือไม่ โดยดูจากวงใสที่เกิดขึ้นรอบกระดาษกรอง ซึ่งวงใสที่เกิดขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกนั้นมีความไวต่อสารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ บันทึกผล (ดวงพร คันธโชติ, 2537 อ้างโดย ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546 : 57-60)

3.3 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการของภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ถนนฉลองกรุง เขตลาดกระบัง กรุงเทพมหานคร 10520

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 ระยะเวลาที่ใช้ในการวิจัย

ตั้งแต่เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2548 – กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การศึกษาการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้มเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ เริ่มต้นด้วยกระบวนการรวบรวมตัวอย่างปลาส้มจากท้องตลาด นำตัวอย่างปลาส้มมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในห้องปฏิบัติการด้วยอาหารแข็งสูตร MRS จนได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ มาจัดจำแนกแบคทีเรียโดยการย้อมแกรม ทดสอบวิธีในการสร้างกรดว่าเป็นแบบ homofermentative หรือ heterofermentative ทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 8 และ 45 องศาเซลเซียส ทดสอบความสามารถในการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ และทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ

4.1 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม

การเก็บรวบรวมตัวอย่างปลาส้มที่จำหน่ายในท้องตลาด ได้แก่ ตลาดหัวตะเข้ ตลาดมีนบุรี และตลาดลาดพร้าว จำนวน 3 ตัวอย่าง จากนั้นนำตัวอย่างปลาส้มมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในห้องปฏิบัติการ เมื่อนำตัวอย่างปลาส้มมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติก การตรวจนับโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติก ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติก จากตัวอย่างปลาส้มทั้งหมด พบว่าตัวอย่างปลาส้มแต่ละตลาดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกต่อนข้างต่างกัน โดยตัวอย่างปลาส้มในตลาดหัวตะเข้พบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ระหว่าง 17-23 โคโลนี ตัวอย่างปลาส้มในตลาดมีนบุรี พบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ระหว่าง 9-20 โคโลนี และตัวอย่างจากตลาดลาดพร้าวพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกสูงมากจนนับไม่ถ้วน

ผลการตรวจนับโคโลนี จะเห็นได้ว่าในตัวอย่างปลาส้มแต่ละพื้นที่ตลาด พบจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ค่อนข้างต่างกัน ทั้งนี้อาจเกี่ยวข้องกับสภาพแวดล้อมหลายประการ เช่น วัตถุดิบที่ใช้ในการผลิต ทั้งส่วนผสมและเครื่องปรุง ตลอดจนความสะอาดในการผลิต

เมื่อแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจนได้เชื้อบริสุทธิ์ นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ในแต่ละตัวอย่างมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และการสร้างกรด พบว่า ตัวอย่างปลาส้มที่มีวิถีการสร้างกรดเป็นแบบ homofermentative ได้แก่ ปลาส้มในตลาดหัวตะเข้ 4 ไอโซเลต และตลาดมีนบุรี 3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไอโซเลต ตัวอย่างปลาส้มที่มีวิถีการสร้างกรดเป็นแบบ heterofermentative ได้แก่ ปลาส้มในตลาดหัวตะเข้ 2 ไอโซเลต และตลาดลาดพร้าว 2 ไอโซเลต

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างเซลล์เป็นแบบแท่ง มีจำนวน 8 ไอโซเลต คิดเป็น 54.54 % ได้จากปลาส้มในตลาดหัวตะเข้ไอโซเลตที่ 1 - 6 และ ปลาส้มในตลาดมีนบุรีไอโซเลตที่ 1 – 2 แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างเซลล์เป็นแบบกลม มีจำนวน 2 ไอโซเลต คิดเป็น 18.18 % ได้จากปลาส้มในตลาดมีนบุรีไอโซเลตที่ 3 และปลาส้มในตลาดลาดพร้าวไอโซเลตที่ 1 และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีรูปร่างเซลล์เป็นแบบรีและแท่งผสมกัน มีจำนวน 1 ไอโซเลต คิดเป็น 0.09 % ได้จากปลาส้มในตลาดลาดพร้าวไอโซเลตที่ 5 ผลการติดสีการย้อมแกรม พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 11 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียชนิดแกรมบวกทั้งหมด ผลการทดสอบการสร้างก๊าซ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีวิถีการสร้างกรดเป็นแบบ homofermentative มีจำนวน 7 ไอโซเลต ได้จากปลาส้มในตลาดหัวตะเข้ ไอโซเลตที่ 2 – 5 และปลาส้มในตลาดมีนบุรี ไอโซเลตที่ 1 - 3 ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติก ที่มีวิถีการสร้างกรดเป็นแบบ heterofermentative มีจำนวน 4 ไอโซเลต ได้จากปลาส้มในตลาดหัวตะเข้ ไอโซเลตที่ 1และ 6 และได้จากปลาส้มในตลาดลาดพร้าวไอโซเลตที่ 2 และ 5

4.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยลักษณะทางสรีระวิทยาและการสร้างกรด

เมื่อทราบถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการสร้างกรดของแบคทีเรียแล้ว นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 8 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส มีจำนวน 5 ไอโซเลต ได้จากปลาส้มในตลาดหัวตะเข้ ไอโซเลตที่ LABK1 และ LABK5 ปลาส้มในตลาดมีนบุรีไอโซเลตที่ LABM1 และ LABM2 และปลาส้มในตลาดลาดพร้าว ไอโซเลตที่ LABL2 ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีจำนวน 10 ไอโซเลต ซึ่งได้จากปลาส้มในตลาดหัวตะเข้ ไอโซเลตที่ LABK1 – LABK6 ปลาส้มในตลาดมีนบุรี ไอโซเลตที่ LABM1 – LABM3 และปลาส้มในตลาดลาดพร้าว ไอโซเลตที่ 2 โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากปลาส้มในตลาดมีนบุรีไอโซเลตที่ LABM2 และ LABM3 เชื้อมีการเจริญเป็นอย่างมาก

การทดสอบการเจริญที่มีโซเดียมคลอไรด์ 4 8 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญในโซเดียมคลอไรด์ 4 เปอร์เซ็นต์มีจำนวน 10 ไอโซเลต ซึ่งมีเพียงไอโซเลตที่ LABL5 เท่านั้นที่ไม่เจริญ การเจริญที่มีโซเดียมคลอไรด์ 8 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้มีไอโซเลตเดียวคือ LABK5 เจริญเพียงเล็กน้อย ส่วนการเจริญที่มีโซเดียมคลอ-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้ มีจำนวน 2 ไอโซเลต คือLABK5 และ LABM2 เจริญเพียงเล็กน้อย นอกนั้นไม่มีการเจริญ

จากนั้นนำข้อมูลทั้งหมดประกอบด้วย ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีระวิทยา วิถีการสร้างกรด รวมกับการจัดจำแนกสปีชีส์ด้วยระบบ API ผลการจัดจำแนกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ที่พบมาก คือ *Lactobacillus fermentum,* โดยพบมากถึง 45.46 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* 36.36 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนั้นเป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus pentosus* และ *Pidiococcus pentosaceus* (ตารางที่ 3)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ผลการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในตลาดหัวตะเข้ มีนบุรี และลาดพร้าว

ไอโซเลตที่	รูปร่างของเซลล์	แกรม	การสร้างก๊าซ	แคทาเลส	การเจริญที่อุณหภูมิ		การเจริญในกลือ (%)			ผลการจัดจำแนกโดยระบบ เอ พี ไอ
					8	45	4	8	10	
LABK1	แท่งยาว เท่ากัน หัวมน	+	+	-	+	++	++	-	-	*Lactobacillus fermentum*
LABK2	แท่งยาว เท่ากัน หัวมน	+	-	-	-	++	+	-	-	*Lactobacillus plantarum*
LABK3	แท่งยาว เท่ากัน หัวมน มีขนาดเล็ก	+	-	-	-	++	+	-	-	*Lactobacillus plantarum*
LABK4	แท่งยาว เท่ากัน หัวมน มีขนาดเล็ก	+	-	-	-	++	+	-	-	*Lactobacillus plantarum*
LABK5	แท่งยาว เท่ากัน หัวมน มีขนาดเล็ก	+	-	-	+	+	+	+	+	*Lactobacillus plantarum*
LABK6	แท่งสั้น หัวมน มีขนาดเล็ก	+	+	-	-	++	+	-	-	*Lactobacillus fermentum*
LABM1	แท่ง รวมกันเป็นรูปโซ่ หัวมน	+	-	-	+	++	+	-	-	*Lactobacillus pentosus*
LABM2	แท่ง รวมกันเป็นรูปโซ่ หัวมน	+	-	-	++	+++	+	-	+	*Pediococcus pentosaceus*
LABM3	กลม รวมกันเป็นกลุ่ม	+	-	-	-	+++	+	-	-	*Lactobacillus fermentum*
LABL2	กลม มีขนาดเล็ก	+	+	-	+	++	+	-	-	*Lactobacillus fermentum*
LABL5	รีผสมแท่ง มีขนาดเล็ก	+	+	-	-	-	-	-	-	*Lactobacillus fermentum*

หมายเหตุ - = สร้าง หรือ เจริญ

+ = ไม่สร้าง หรือ ไม่เจริญ

ข้อมูลการจัดจำแนกจากตารางที่ 3 สายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก ที่พบคือ

สายพันธุ์ *L. fermentum* แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Cb เซลล์มีรูปร่างเป็นแบบแท่ง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8-0.9 ไมโครเมตร และขนาดความยาวจะเปลี่ยนแปลงได้ จัดเรียงตัวเป็นแบบเดี่ยว หรือเป็นคู่สอง ต้องการแคลเซียม เพนโตทีเนต (calcium pentothenate) ไนอะซิน (niacin) และไทอะมีน (thiamine) ในการเจริญ ไม่ต้องการไรโบฟลาวิน (riboflavin) ไพริดีอกซอล (pyridoxdoxal) และกรดโฟลิก สามารถพบแบคทีเรียชนิดนี้ได้จากผลิตภัณฑ์นม เชื้อที่ใส่ขนมปัง การหมักพืช ปุ๋ย น้ำเสีย ปากมนุษย์ และอุจจาระ แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในสายพันธุ์ ATCC 14931 (Hammes and Vogel, 1995 : 45) แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์นี้แยกได้จากปลาส้มในตลาดหัวตะเข้ ไอโซเลตที่ LABK1 และ LABK6 ตลาดลาดพร้าวไอโซเลตที่ LABL2 และ LABL5 และในตลาดมีนบุรี ไอโซเลตที่ LABM3

สายพันธุ์ *L. plantarum* แบคทีเรียชนิดนี้มีการแตกหน่อ จัดอยู่ในกลุ่มพืช Bb เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งตรงหรือกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.9-1.2 by 3.0-8.0 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นแบบเดี่ยว เป็นคู่สองหรือเป็นแบบโซ่สั้น ๆ มีความสามารถในการต่อต้านสารไนไตรท เป็นลักษณะเฉพาะสายพันธุ์ที่ใช้กลูโคสในปริมาณต่ำ มีผนังเซลล์ ใช้ไรบีทอล (ribitol) หรือกลีเซอรอล (glycerol) ต้องการแคลเซียมเพนโตทีเนต (calcium pentothenate) และไนอะซิน (niacin) ในการเจริญเติบโต ไม่ต้องการไทอะมิน (thiamine) ไพรีดีอกซอล (pyridoxdoxal) หรือ ไพรีดีอกซามีน (pyridoxamine) กรดโฟลิก วิตามินบีสิบสอง ไทมีดีน (thymidind) หรือ ดีออกซีไดโบไซด์ (deoxyribosides) เป็นสายพันธุ์ที่พบได้จากผลิตภัณฑ์นม อาหารสัตว์ ผักดอง วัว เป็ด เชื้อที่ใช้ในขนมปัง ช่องปากมนุษย์ ลำไส้ และจากสิ่งปฏิกูล แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในสายพันธุ์ ATCC 14917 (Hammes and Vogel, 1995 : 44) แบคทีเรียกรด แลคติกสายพันธุ์นี้แยกได้จากปลาส้มในตลาดหัวตะเข้ ไอโซเลตที่ LABK2 – LABK5

สายพันธุ์ *L. pentosus* แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่กลุ่มที่ใช้น้ำตาลเพนโตส เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จัดอยู่ในหมู่กลีเซอรอล เซลล์มีรูปร่างเป็นแบบแท่งตรงและกลมต่อกัน ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.0-1.2 by 2.0-5.0 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่สอง หรือเป็นโซ่สั้น ๆ สามารถพบได้จาก อาหารสัตว์ โดยเฉพาะหญ้าที่หมักเก็บไว้ให้สัตว์ น้ำมันมะกอก สิ่งปฏิกูล แบคทีเรียชนิดนี้จัดอยู่ในสายพันธุ์ ATTC 8041 (Hammes and Vogel, 1995 : 43) แบคทีเรียกรด - แลคติกสายพันธุ์นี้แยกได้จากปลาส้มในตลาดมีนบุรี ไอโซลเลตที่ LABM1

สายพันธุ์ *P. pentosaceus* แบคทีเรียชนิดนี้มีชื่อมาจากภาษาละติน ว่า *pentosum* ใช้น้ำตาลเพนโตสในการสร้างกรด เซลล์มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.6-1.0 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่สอง เป็นคู่สี่ หรือเป็นกลุ่ม เจริญที่พีเอช 8.0 และ พีเอช 8.5 ชอบอุณหภูมิสูง คือ 39-45

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

องศาเซลเซียส *P. pentosaceus* จะทนต่ออุณหภูมิสูงได้น้อยกว่า *P. acidilactici* สภาวะเจริญที่เหมาะสมคือ อุณหภูมิ 28-32 องศาเซลเซียส และเจริญในเกลือโซเดียมคลอไรด์ ที่ 9-10 เปอร์เซ็นต์ ทำปฏิกิริยาในการหมักน้ำตาลคล้ายกับ *P. acidilactici* สามารถหมักมอลโตส และเจริญที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งต่างจาก *P. acidilactici* ที่สามารถย่อยสลายแป้งได้ ไม่สามารถย่อยสลายอาร์จินีน (arginne) ได้ นอกจากนั้นแล้วบางสายพันธุ์ของ *P. pentosaceus* จะคล้ายกับสายพันธุ์ *micrococci* จนทำให้สับสนได้ เพราะมีโคโลนีที่เล็ก และเจริญบนอาหารแข็งที่ไม่ใช้น้ำตาล และที่พีเอช 9.0 เหมือนกัน (Simpson and Taguchi, 1995 : 161-162) แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์นี้แยกได้จากปลาส้มในตลาดมีนบุรี ไอโซเลตที่ LABM2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* โดยระบบ API

การใช้น้ำตาลในการสร้างกรด	ผล	การใช้น้ำตาลในการสร้างกรด	ผล
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-arabinose	-	Maltose	+
L-arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-xylose	-	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehaiose	+
Anonitol	-	Inuline	-
β-methyl-D-xyloside	-	Melezitose	+
Galactose	+	D-raffinose	-
D-glucose	+	Starch	-
D-fructose	+	Glycogene	-
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	β-gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-turanose	+
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	-	D-tagatose	-
Manhnitol	+	D-fucose	-
Sorbitol	+	L-fucose	-
α-methyl-D-mannoside	+	D-arabitol	-
α-methyl-D-glucoside	-	L-arabitol	-
N-acetyl-glucosamine	+	gluconate	-
Amygdaline	+	2-keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-keto- gluconate	-
Esculine	+		

หมายเหตุ Remark : + ve = Gram positive bacteria

+ = Psitive reaction

- = Negative reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus fermentum* โดยระบบ API

การใช้น้ำตาลในการสร้างกรด	ผล	การใช้น้ำตาลในการสร้างกรด	ผล
Glycerol	-	Salicine	-
Erythritol	-	Cellobiose	-
D-arabinose	-	Maltose	+
L-arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-xylose	+	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehaiose	+
Anonitol	-	Inuline	-
β-methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-raffinose	+
D-glucose	+	Starch	-
D-fructose	+	Glycogene	-
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	β-gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-turanose	-
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	-	D-tagatose	-
Manhnitol	-	D-fucose	-
Sorbitol	-	L-fucose	-
α-methyl-D-mannoside	-	D-arabitol	-
α-methyl-D-glucoside	-	L-arabitol	-
N-acetyl-glucosamine	-	gluconate	+
Amygdaline	-	2-keto-gluconate	-
Arbutine	-	5-keto- gluconate	-
Esculine	-		

หมายเหตุ Remark : + ve = Gram positive bacteria

+ = Psitive reaction

- = Negative reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus pentosus* โดยระบบ API

การใช้น้ำตาลในการสร้างกรด	ผล	การใช้น้ำตาลในการสร้างกรด	ผล
Glycerol	+	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-arabinose	-	Maltose	+
L-arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-xylose	+	Sucrose	+
L-xylose	-	Trehalose	+
Anonitol	-	Inuline	-
β-methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-raffinose	+
D-glucose	+	Starch	-
D-fructose	+	Glycogene	-
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	β-gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-turanose	-
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	-	D-tagatose	-
Manhnitol	+	D-fucose	-
Sorbitol	+	L-fucose	-
α-methyl-D-mannoside	+	D-arabitol	-
α-methyl-D-glucoside	-	L-arabitol	-
N-acetyl-glucosamine	+	gluconate	+
Amygdaline	+	2-keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-keto- gluconate	-
Esculine	+		

หมายเหตุ Remark : + ve = Gram positive bacteria

+ = Psitive reaction

- = Negative reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติก *Pediococcus pentosaceus* โดยระบบ API

การใช้น้ำตาลในการสร้างกรด	ผล	การใช้น้ำตาลในการสร้างกรด	ผล
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-arabinose	-	Maltose	+
L-arabinose	+	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	-
D-xylose	+	Sucrose	-
L-xylose	-	Trehaiose	+
Anonitol	-	Inuline	-
β-methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	D-raffinose	-
D-glucose	+	Starch	-
D-fructose	+	Glycogene	-
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	β-gentiobiose	+
Rhamnose	-	D-turanose	-
Dulcitol	-	D-lyxose	-
Inositol	-	D-tagatose	+
Manhnitol	-	D-fucose	-
Sorbitol	-	L-fucose	-
α-methyl-D-mannoside	-	D-arabitol	-
α-methyl-D-glucoside	-	L-arabitol	-
N-acetyl-glucosamine	+	gluconate	-
Amygdaline	+	2-keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-keto- gluconate	-
Esculine	+		

หมายเหตุ Remark : + ve = Gram positive bacteria

+ = Psitive reaction

- = Negative reaction

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างปลาส้ม

จากการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกในตัวอย่างปลาส้ม พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกจากปลาส้มแต่ละตัวอย่าง เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกต่างกลุ่มกัน จึงได้นำแต่ละตัวอย่างมาศึกษาถึงความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ ตัวอย่างของสารปฏิชีวนะที่ใช้ในการเลี้ยงปลา ได้แก่ เททรา - ซัยคลิน ออกซีเททราซัยคลิน ฟอร์มาลิน ด่างทับทิม และเกลือ ซึ่งสารปฏิชีวนะทั้ง 5 ชนิดนี้เป็นชนิดที่นำมาใช้ศึกษาในครั้งนี้ และการใช้สารปฏิชีวนะทั้งห้าในการรักษาโรคปลา อาจมีสารปฏิชีวนะตกค้างในเนื้อปลา เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาใช้เป็นคล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์ควรต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้ ซึ่งจะทำให้กิจกรรมการหมักในผลิตภัณฑ์เป็นไปตามปกติ ผล *การศึกษาถึงความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติก* แสดงในตารางที่ 8

จากข้อมูลการทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม (ตารางที่ 8) โดยใช้สารปฏิชีวนะห้าชนิด คือ เกลือ ด่างทับทิม ฟอร์มาลิน เททรา ซัย-คลิน และออกซีเททราซัยคลิน พบว่า *สารปฏิชีวนะ 3 ชนิดแรก ได้แก่ เกลือ ด่างทับทิม และ* ฟอร์มาลินไม่มีผลต่อการยับยั้งเชื้อทั้ง 11 ไอโซเลต สารปฏิชีวนะเททราซัยคลิน เชื้อส่วนใหญ่เริ่มไม่เจริญ เส้นผ่าศูนย์กลางของเคลียร์โซนค่าสูงสุด คือ 1.0 เซนติเมตร (ไอโซเลตที่ LABL2) ค่าต่ำสุด คือ 0.1 (ไอโซเลตที่ LABM1) มีไอโซเลตที่ LABK5, LABM2 และ LABM3 ที่ยังสามารถเจริญได้ ส่วนสารปฏิชีวนะออกซีเททราซัยคลิน เชื้อทั้ง 11 ไอโวเลตที่ทดสอบไม่สามารถเจริญได้ เส้นผ่าศูนย์กลางของเคลียร์โซนค่าสูงสุด คือ 2.2 เซนติเมตร (ไอโซเลตที่ LABK3) ค่าต่ำสุด คือ 1.0 เซนติเมตร (ไอโซเลตที่ LABK5) แสดงให้เห็นว่าสารปฏิชีวนะออกซีเททราซัยคลิน และเททรา ซัยคลิน แบคทีเรียกรดแลคติกไม่สามารถเจริญได้ จึงมีผลในการทำลายที่รุนแรง นั่นเป็นเพราะว่าสารปฏิชีวนะทั้ง 2 ชนิด มีผลในการยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน หรืออาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเมมเบรน สารปฏิชีวนะเกลือ ด่างทับทิม และฟอร์มาลิน แบคทีเรียกรดแลคติกยังเจริญได้ แสดงว่าไม่มีผลต่อการทำลายเชื้อที่ทดสอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 แสดงผลการทนต่อสารปฏิชีวนะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างปลาส้ม

ไอโซเลตที่	สารปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ/ขนาดของเคลียร์โซน (ซม.)				
	เกลือ	ด่างทับทิม	ฟอร์มาลิน	เททราซัยคลิน	ออกซีเททราซัยคลิน
LABK1	-	-	-	+0.4	+1.07
LABK2	-	-	-	+0.3	+1.9
LABK3	-	-	-	+0.4	+2.2
LABK4	-	-	-	+0.3	+2.0
LABK5	-	-	-	-	+1.0
LABK6	-	-	-	+0.4	+1.6
LABM1	-	-	-	+0.1	+1.3
LABM2	-	-	-	-	+1.2
LABM3	-	-	-	-	+1.1
LABL2	-	-	-	+1.0	+2.0
LABL5	-	-	-	+0.8	+1.7

หมายเหตุ + = สร้างเคลียร์โซน

- = ไม่สร้างเคลียร์โซน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5

สรุปและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม ในแต่ละส่วนของการศึกษาสรุปได้ดังนี้

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างปลาส้ม และการจัดจำแนกโดยตัวอย่างปลาส้มที่นำมาศึกษามีจำนวน 3 ตัวอย่าง เป็นตัวอย่างในตลาดหัวตะเข้ ตลาดมีนบุรี และตลาดลาดพร้าว เมื่อนำตัวอย่างทั้งหมดมาแยกแบคทีเรียกรดแลคติก ผลการตรวจนับพบว่าจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกสูงสุดเป็นของตัวอย่างปลาส้มในตลาดลาดพร้าว และแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มที่มีรูปร่างแท่งและการสร้างกรดแบบ homofermentative โดยมีสูงถึง 63-64 เปอร์เซ็นต์ เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้มาจัดจำแนกโดยใช้ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีระวิทยา และจัดจำแนกโดยใช้ระบบ API สายพันธุ์ที่พบมากที่สุดคือ *Lactobacillus fermentum* 45.46 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือ *Lactobacillus plantarum* 36.36 เปอร์เซ็นต์ นอกนั้นเป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus pentosus* และ *Pediococcus pentosaceus*

2. การทดสอบความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะ พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกที่นำมาทดสอบทั้ง 11 ไอโซเลต ต้านทานต่อสารปฏิชีวนะเกลือ ด่างทับทิม และฟอร์มาลิน สารปฏิชีวนะเททราซัยคลิน แบคทีเรียกรดแลคติกที่ต้านทานได้ มีจำนวน 8 ไอโซเลต และสารปฏิชีวนะออกซิเททราซัยคลิน แบคทีเรียรดแลคติกที่นำมาทดสอบทั้ง 11 ไอโซเลต ไม่สามารถต้านทานได้

แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากตัวอย่างปลาส้มในการศึกษครั้งนี้มี 2 จีนัส คือ *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ซึ่งทั้งสองจีนัสเป็นกล้าเชื้อที่ใช้ในเชิงพาณิชย์ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาการจัดจำแนกแบคทีเรียแบบเทียบเคียงควบคู่ไปด้วย
2. ควรนำเชื้อที่แยกได้ ไปทำการศึกษาต่อในผลิตภัณฑ์อื่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

เกรียงศักดิ์ แม่งอำพัน. 2543. หลักการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ. ภาควิชาเทคโนโลยีการประมง คณะผลิตภัณฑ์การเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. 199 น.

จินดลา ลิ้มภักดี. 2544. การคัดเลือกและศึกษาลักษณะเฉพาะของแบคทีเรีย แลคติกที่ผลิตสารยับยั้งจุลชีพจากผลิตภัณฑ์ประมงซึ่งแปรรูปโดยผ่านกระบวนการหมักและนำไปใช้ประโยชน์. วิทยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (ผลิตภัณฑ์ประมง) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ดวงพร คันธะโชติ. 2537. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียและปฏิบัติการ. กรุงเทพฯ ; โอเดียนสโตร์. 202 น.

_____. มมป. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม : ผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์ ; กรุงเทพฯ. 191 น.

เติมศักดิ์ โชติวรรณวิรัช. 2523. การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมัก หมักพื้นเมือง : กระปิ. วิยานิพนธ์ วิทยาศาสตร์บัณฑิต (จุลชีววิทยา) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์.

ธารารัตน์ ศุภศิริ. 2542. ประโยชน์ของแบคทีเรียกรดแลคติก. วารสารวิทยาศาสตร์. พ.ย.- ธ.ค. 2512.

นภา ศุภศิริ. 2542. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. หจก. ฟันนี่พับบลิชชิ่ง. กรุงเทพฯ.

บุษบา ยงสมิทธ์. 2542. จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

บังอร เชื้อโพธิ์หักและคณะ. 2524. การใช้เอนไซม์บรอมเมลินจากสับปะรดเพื่อเร่งขบวนการทำปลาสร้อย. วารสารการประมง. 34(6) : 649-659.

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้ง 3. โอ.เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์ ; กรุงเทพมหานคร. 507 น.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2546. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ. วิทยานิพนธ์ ปริญญาศุษฎีบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ) บัณฑิตวิทยาลัย 167 น.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. มปป. เอกสารประกอบวิชาเทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. ภาควิชาครุศาสตร์เกษตร คณะครุศาสตร์อุตสาหกรรม สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. 204 น.

พงษ์พันธุ์ ชมภูเพชร. 2546. รวยด้วยปลา. กรุงเทพฯ : มติชน. 126 น.

พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์. 2536. แบคทีเรียพื้นฐาน. พิมพ์ครั้งที่ 1. โรงพิมพ์ศิริยอด ; กรุงเทพฯ. 248 น.

มัทนา แสงจินดาวงษ์. 2545. ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 323 น.

_____. 2545. ผลิตภัณฑ์ประมงของไทย. กรุงเทพ ฯ : มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์. 323 น.

วราวุฒิ ครูส่ง. 2538. จุลชีววิทยาในกระบวนการแปรรูปอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. สำนักพิมพ์โอ. เอส.พริ้นติ้ง เฮาส์ ; กรุงเทพฯ. 210 น.

Amano, K. 1962. The influence of fermentation on the nutritive value of fish with special reference to fermented fish product of Southeast Asia, pp. 180-200. In : fish in Nutrition. E. Heen and R. Krunezer. (eds.) . Fishing News (Book) Ltd., London.

API 50 CHL. แหล่งที่มา : IDENTIFICATION AND SUSCEPTIBILITY TESTING manual Methods.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : Classification and physiology, pp. 1-22. In : Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Funtional Aspects. S. Salminen and A. Von Wright (eds.). Marcel Decller , New York.

Beddows, C.G. 1985. Fermented fish and fish product , pp. 1-39. In : Microbiology of fermented food. Vol 2. B. J. B. Wood (ed.). Elsevier Applied Science Publishers, London.

Cha, Y J, and F.H. Lee. 1989. Studies on the processing of rapid fermented anchiovy perpard with low salt contents by adapted microorganisms 1. Biochemical characterization of proteolytic bacteria and their extracellular. Protease isolated from fermented fish paste. Bull. Korean Fish Soc. 22 (5) : 363-369.

Chang, D.S., J . H . Pyeun, H . R . Kim, and H.R . cho . 1986. Purification and characterization of proteolytic enzymes. Isolated from marine animals. Bull. Natl. fish. Univ. Busem (Nat. scil). 26 (1-2) : 123-139.

Chang , D.S., J.S. Lee. 1983. Characterization of proteolylic streptococcus sp. Isolated from market food. Bull. Korean. Fish. Soc. 16(3) : 225-230.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Crisan, E.V. and A. Sands. 1975. Microflra of four fermetal fish sauce . Applied Microbiology . 29(1) : 106-108.

De Smedt , J. and J. De Ley. 1979. Identification of Ruiter ' s strain, isolated from browned marinaded herring , as members of Erwinia herbicola . International Journal of Systematic Bacteriology . 29 : 183-187.

Hammes, W.P., and VOGEL,R.F., (1995) The genus Lactobacillus. In B. J.B. Wood amd W.H. Halzapfel. The Genera of Lactic acid Bacteria. 3, 43-45.

Lee, J.S. and A.A. Kraft . 1984 Proteolytic microorganisms, pp. 155-159. In ; Compendium of Methods for the Microbiological Examination of food . (2 nd ed.). American Public Health Association , Washing , D.C.

Morishita , K.,W. Otakaska , K. Yamazaki , N. Inoue , and H. Shinano. 1995. Isolation and characteristics of lactic acid bacteria in commercial ika-shiokara. Fisheries Science. 61(2) : 371-372.

National Research Council of Thailand. 1981-1982. Report on Thai Thai Traditional Fermented Food Research Project. Phase.l.

Orla – Jensens, S. 1919. The lactic acid bacteria. Fred Host and Son, Copenhagen.

Pot, B, W. Ladwig, W. Kersters, and K. H. Schleifer. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. Microbiology, gentics and applicatattions, pp. 13-67. In : L. De Vuyst and E.J. Vandamme (eds.). Bacteriocins of Lactic acid bacteria. Chapman and Hall, London.

Saisithi, P. 1967. Studies on the origins and development of the typial flavor and aroma of thai fish souce. Thesis Submitted in partial fulfillment for the degree of Doctor of philosophy, Univ. of Washington.

Sherman, J. M. 1937. The Streptococci. Bacterial. Rev. 1 : 3 -97.

Sharpe, M. E. and T. F. Fryer. 1966. Identification Methods for biologists. Part A. B. Gibbs and F. A. Skinner (eds.). Academic Press, London.

Sikorski, Z. E., A. Gildberg, and A. Ruiter. 1995. Fish Products, pp, 315-346. In Fish and fishery products. A. Ruiter (ed.). CAB International, Wallingford, VK.

Simpson, W.J., andThguchi, H., (1995) The genus Pediococcus, with notes on the genera Tetratogonococcus and Aerococcus. In B. J.B. Wood amd W.H. Halzapfel. The Genera of Lactic acid Bacteria. 5, 161-162.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Singleton, P. 1997. Chromosome and plasmid. Bacteria in Biology, Biotechnology and Medicine. John wiley and Son, New York. pp. 96-97.

Souane, M., Y.B. Kim, and C.H. Lee. 1987. Microbial characterization of Gajami Sik-Hae Fermentation, Korean J.Appl. Microbial. Bioeng. 15 (3) : 150-157.

Stiles, M.E., and W.H. Holzapfel. 1997. Lactic acid Bacteria of food and their current taxonomy. Internationnal Journal of food Microbiology. 36 : 1-29.

Takai, M., Y. Kawai, N. Inoue, and H. Shinano. 1992. Comparative Studies on microbiological And chemical characteristics of ika-shiokara Akazukuri and ika-shiokara Kurozukuri. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fishereis. 58 (12) : 2373-2378.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1. การใช้เครื่องมือต่าง ๆ ในห้องปฏิบัติการ

1. ตู้เป่าลมปลอดเชื้อ (Biohazard Laminar Flow)

1. เสียบปลั๊กสายไฟให้เรียบร้อย หลังจากนั้นกดปุ่ม Reset ระบบ U.V.C เพื่อฆ่าเชื้อบริเวณพื้นที่ทำงานประมาณ 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาที่ตั้งไว้ ระบบจะถูกตัดอัตโนมัติ (Automatic Timer) ถ้าต้องการเพิ่มหรือลดเวลาในการฆ่าเชื้อก็สามารถทำได้โดยปรับ 0-3 ชั่วโมงในกรณีระบบ U.V.C ยังไม่ถึงเวลาที่ตั้งเอาไว้ แต่มีความจำเป็นจะต้องใช้เครื่อง ให้หมุนตัวปรับเวลามาทาง "0" จนสุด จน U.V.C ตัดไป และให้หมุนกลับไปที่ตัวเลขเดิมเพื่อการใช้งานครั้งต่อไป ไฟที่โชว์ที่ Timer ติดสองดวง แสดงว่าหลอด U.V ถูกสั่งปิด ไฟโชว์ที่ Timer ติด 1ดวง แสดงว่าหลอด U.V กำลังฆ่าเชื้ออยู่

2. เปิดสวิทซ์แสงสว่าง (Light)

3. เปิดสวิทซ์ Blower ทำความสะอาดบริเวณพื้นที่ทำงานด้วยแอลกอฮอล์ 70%

4. เครื่องมือพร้อมใช้

5. การปิดเครื่องโดยปิดสวิทซ์ Blower แล้วปิดแสงสว่างจากนั้นจึงกดปุ่ม Reset เพื่อตั้งเวลาฆ่าเชื้อ สำหรับทำการฆ่าเชื้อที่ตกค้างอยู่บริเวณใช้งาน ประมาณ 15-20 นาที เมื่อเสร็จสิ้นการฆ่าเชื้อ ถอดปลั๊กออกให้เรียบร้อย

<u>การเปิดตะเกียงแก๊ซ</u>

1. เปิดวาล์วที่ตัวถังแก๊สให้เรียบร้อย ถ้ามีปุ่ม Safty valve ให้กดปุ่มนี้ลงไป จากนั้นยกปุ่ม แล้วหมุนปุ่มเปิดแก๊สที่อยู่ในตู้ Laminar Flow

2. จุดไฟด้วยไฟแช็ค แล้วปรับระดับไฟ โดยหมุนช่องปรับอากาศเข้าที่บริเวณตะเกียง ปรับจนได้ไฟสีน้ำเงินเขียว

3. เมื่อใช้ตะเกียงเสร็จเรียบร้อยแล้ว ให้ทำการปิดวาล์วที่ถังแก๊สเป็นอันดับแรก หลังจากเมื่อสังเกตว่าไม่มีเปลวไฟออกจากตะเกียงแล้ว ทำการหมุนปุ่มปิดสายท่อแก๊สที่อยู่ในเครื่อง Laminar Flow ให้อยู่ในลักษณะที่สังเกตเห็นในครั้งแรก

2. หม้อนึ่งอัดความดันไอ (Pressure cooker หรือ Autoclave)

1. ใส่น้ำกลั่นลงในเครื่อง Autoclave พอประมาณ อย่าให้ท่วมจานวางตะกร้า

2. เสียบปลั๊กไฟตัวเครื่องให้เรียบร้อย นำของที่ต้องการฆ่าเชื้อใส่ลงไปในตะกร้าและใส่ของลงไปใน Autoclave

3. กดปุ่ม Power ไปที่ ON

4. เช็คปุ่ม Exhaust ให้อยู่ที่ Close

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5. กดปุ่ม MODE แล้วกดปุ่ม TEMP หน้าแป้นโชว์เลข "121" ถ้าต้องการเปลี่ยนอุณหภูมิตัวเลขให้กดลูกศร " ▼ " เมื่อต้องการปรับอุณหภูมิขึ้น และลูกศร " ▲ " เมื่อต้องการปรับอุณหภูมิลง

6. กดปุ่ม "STER TIME" เป็นเวลาที่ต้องการฆ่าเชื้อโดยปกติตั้งค่าไว้ที่ 15 นาที แต่ถ้าต้องการแก้ไขสามารถเปลี่ยนค่า ตั้งขึ้น หรือลงได้เช่นเดียวกันกับข้อ 5

7. กดปุ่ม START เพื่อเริ่มการใช้งาน

8. ให้ยืนรอดูว่าไม่มีเสียงอะไรผิดปกติและตัวเลขของอุณหภูมิขึ้นจึงเดินออกไปได้

ข้อควรระวังในการใช้งาน

1. ตรวจสอบอุณหภูมิให้ได้ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว

2.เวลาฆ่าเชื้อเสร็จแล้วไม่ควรเปิดฝาออกทันที ควรรอให้สเกลความดันลดลงถึง "0" ก่อนเพื่อความปลอดภัยในการใช้งาน จึงจะเปิดฝาออกได้

3. ตู้บ่มเพาะเชื้อ (Incubator)

1. เสียบปลั๊กเพื่อจ่ายไฟเข้าเครื่อง

2. เปิดสวิทซ์โดยหมุนปุ่ม Power จาก "0"มาที่ "I"

3. กดปุ่ม set ค้างไว้แล้วหมุนปรับอุณหภูมิ " ↷ " ได้ตามต้องการใช้งาน (ไม่ควรเกิน limit ของเครื่องคือประมาณ 70 องศาเซลเซียส)

4. เมื่อใช้งานเสร็จแล้วหมุนปุ่ม Power มาที่ "0" เพื่อปิดสวิทซ์ให้เรียบร้อย

5. ถอดปลั๊กออกทุกครั้งเมื่อใช้งานเสร็จ

2. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ Lactobacillus MRS Agar (MRS)

	กรัม/ลิตร
1. Proteose peptone	10
2. Beef Extract	10
3. Yeast Extract	5
4. Dextrose	20
5. Polysorbate 80	1
6. Ammonium citrate	2
7. Sodium acetate	5
8. Magnesium sulphate	0.1
9. Manganese sulphate	0.05

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. *Dipotassium phosphate* 2

11. Agar 1.5 %

3. การแยกเชื้อบริสุทธิ์

3.1 การเพาะเชื้อแบคทีเรีย โดยวิธี Agar deep culture

Agar deep culture หรือ stab culture เป็นวิธีเพาะเลี้ยงเชื้อในหลอดแก้วและใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นอาหารแข็ง 1.0 % หลอดแก้วจะวางตั้งตรง เมื่อนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงก็จะใช้ loop ที่มีเชื้อแทงผ่านอาหารเลี้ยงเชื้อจนถึงก้นหลอดแล้วค่อย ๆ ดึง loop ออกมา

การเลี้ยงเชื้อวิธีนี้ส่วนมากใช้ศึกษาการเคลื่อนที่หรือความต้องการอากาศในการเจริญของแบคทีเรีย

วิธีการทำ stab culture

1. นำ loop ลนไฟเพื่อฆ่าเชื้อ
2. เขี่ย suspension ของเชื้อจากหลอดที่มีเชื้อ
3. ถ่ายเชื้อใส่หลอดโดยใช้ loop แทงลงไปในอาหารจนถึงก้นหลอด
4. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง
5. เก็บไว้ในตู้เย็น

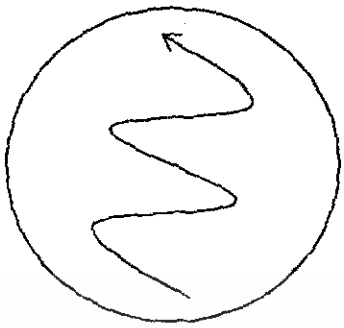
3.2 การแยกเชื้อแบคทีเรีย

การแยกเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์นั้นมีหลายวิธี ดังนี้

1. Streak plate techniques มี 2 วิธี คือ

1.1 Simple streak plate techniques วิธีนี้ใช้ loop ลนไฟจนร้อนแดง แล้วเขี่ย suspension ของเชื้อที่ผสมกันอยู่ในหลอดแก้ว จากนั้นนำมาขีด (streak) บนอาหารในจานเพาะเชื้อ (ภาพที่ 5) นำจานเพาะเชื้อไปบ่มเชื้อ (incuvate) ที่อุณหภูมิห้องหรืออุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแต่ละเชื้อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 1 การขีดเชื้อโดยวิธี Simple streak plate techniques

1.2 Cross streak plate techniques ใช้เทคนิคต่าง ๆ เหมือนกับวิธี Simple streak plate techniques แต่ต่างกันเฉพาะวิธีการขีดเท่านั้น

หลักการขีดเชื้อแบบ Cross streak plate techniques มีดังนี้

ก. นำ loop ลนไฟให้ร้อนแดง พักไว้ 10 วินาที จุ่มเชื้อผสมแล้วขีดในแนวที่ 1 ให้ขนานกัน ปิดฝาจานเพาะเชื้อและนำ loop ไปฆ่าเชื้อ

ข. นำ loop ที่ปราศจากเชื้อมาขีดในแนวที่ 2 ให้ขนานกันและต้องให้รอยขีดนี้ตัดกับแนวที่ 1 ปิดฝาจานเพาะเชื้อ นำ loop ไปฆ่าเชื้อ

จากนั้นก็ขีดด้วยวิธีการเดียวกันจนถึงแนวที่ 4 (ภาพที่ 6) ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้วบ่มเชื้อที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม (บัญญัติ สุขศรีงาม, 2534 : 153-154)

ภาพผนวกที่ 2 การขีดเชื้อโดยวิธี Cross streak plate techniques

สำหรับการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้การแยกเชื้อแบคทีเรียเพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ ใช้วิธี Cross streak plate techniques

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. *Pour plate techniques* การแยกเชื้อบริสุทธิ์แบบนี้มีวิธีการ ดังนี้

ก. ดูดสารละลายตัวอย่างที่เจือจางแล้ว 0.1 ml ใส่ลงในจานเพาะเชื้อ

ข. เทอาหารใส่จานเพาะเชื้อตามลงไป

เมื่อเทอาหารเลี้ยงเชื้อใส่จานเพาะเชื้อแล้วต้องรีบปิดฝา และหมุนจานเพาะเชื้อไปมา เพื่อให้อาหารกระจายทั่วจานเพาะเชื้อ นำเชื้อไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง หรืออุณหภูมิเหมาะสมตามเวลาที่ต้องการ แล้วตรวจผลการทดลอง

4. สารเคมี

4.1 สารละลายไอโอดีน (Gram' s iodine solution)

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300	กรัม

ละลาย iodine และ potassium iodine ในน้ำกลั่น ปริมาตรเล็กน้อย เมื่อสารทั้งสองละลายดีจึงเติมน้ำกลั่นให้ครบ เก็บไว้ในขวดสีชา

4.2 สารละลายคริสตัลไวโอเลต

สารละลาย A ประกอบด้วย	Crystal violet	2.0	กรัม
	Ethyl alcohol 95%	20.0	มล.
สารละลาย B ประกอบด้วย	Ammonium oxalate	0.8	กรัม
	น้ำกลั่น	80	มล.

ละลายส่วนผสมของ A และ B ให้เข้ากัน จากนั้นนำส่วนผสมทั้งสองส่วนมาผสมกันแล้วกรอง เก็บไว้ในขวดสีชา

4.3 สารละลายซาฟานีนโอ

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20.0	มล.

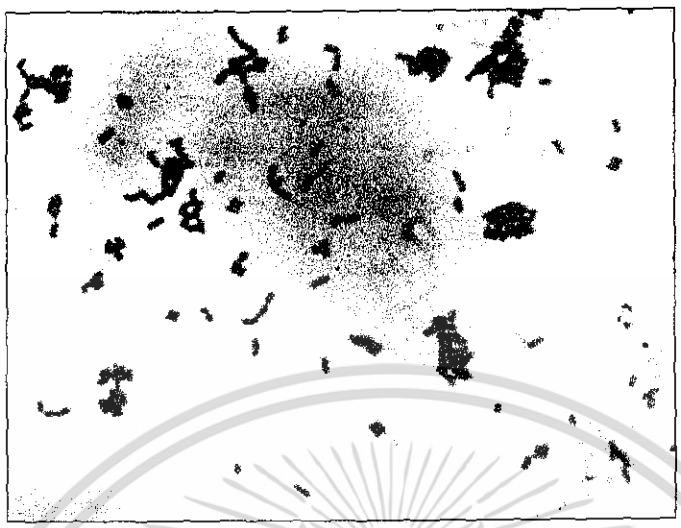
เตรียม stock solution ของซาฟานีนโอ โดยผสมทั้งสองส่วนให้เข้ากัน จากนั้นกรอง เมื่อจะใช้ให้เจือจางเป็น 1:10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

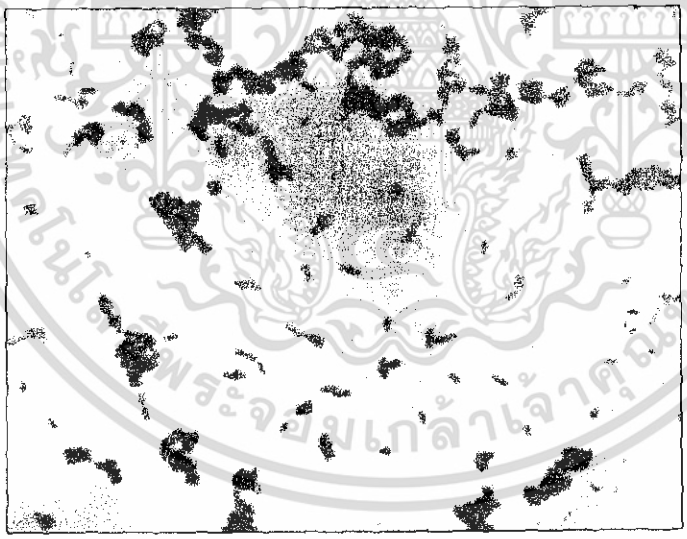
4.4 เอธ เนอล 95 เปอร์เซ็นต์

Ethyl alcohol 95 %	250	มล.
Acetone	250	มล.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

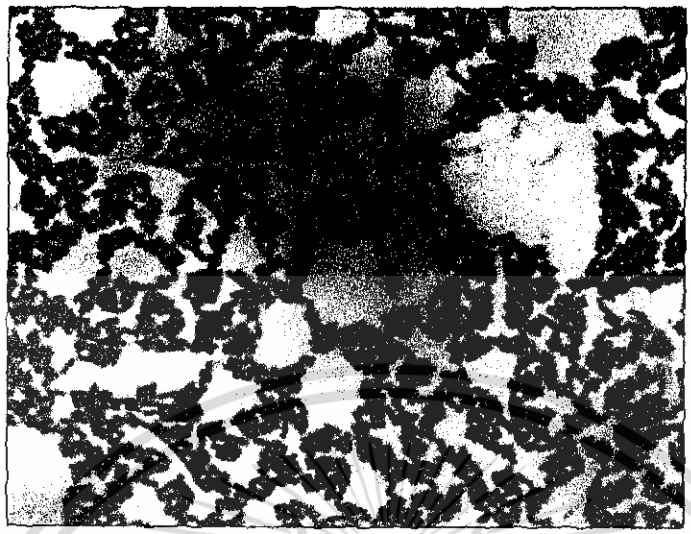


ภาพผนวกที่ 3 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK1 (X 1,000)

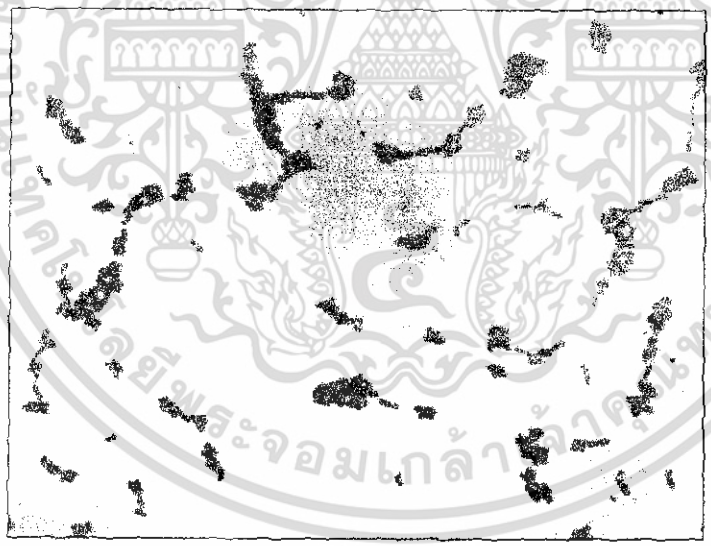


ภาพผนวกที่ 4 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK2 (X 1,000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

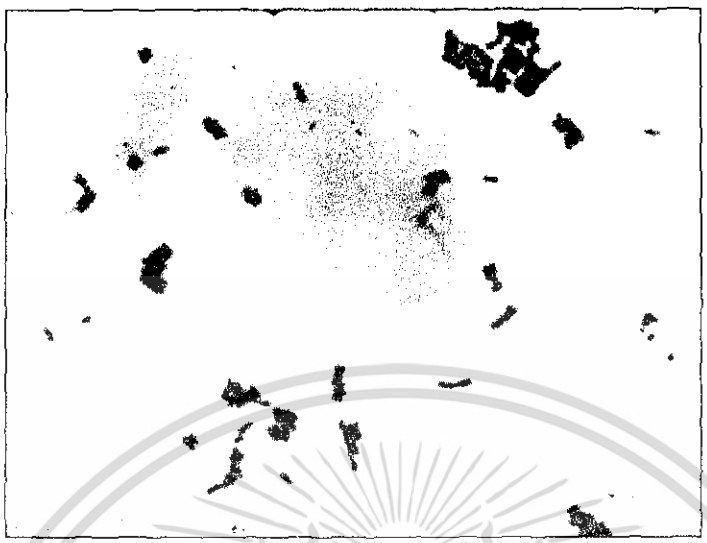


ภาพผนวกที่ 5 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ *LABK3 (X 1,000)*

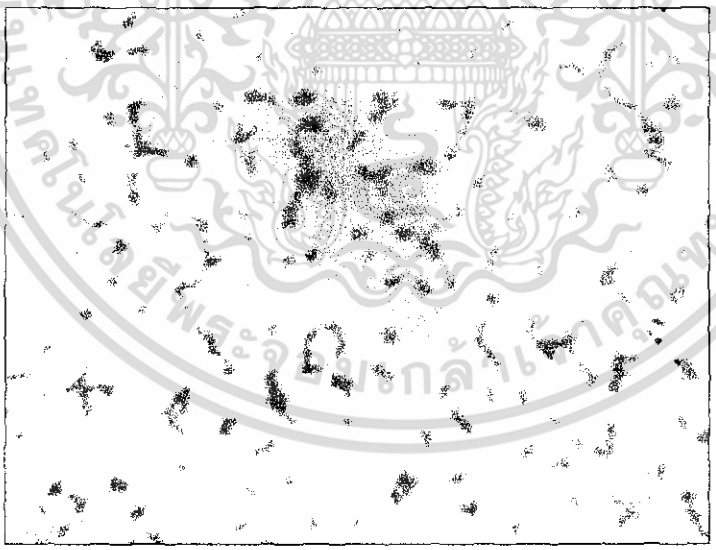


ภาพผนวกที่ 6 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK4 (X 1,000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

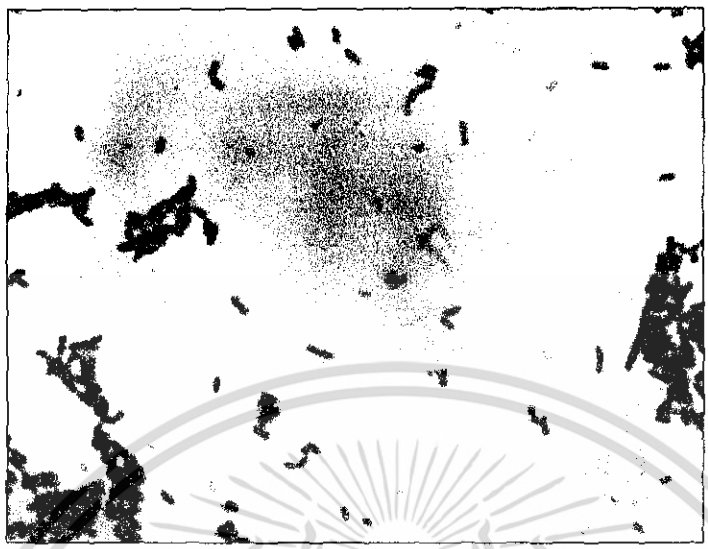


ภาพผนวกที่ 7 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK5 (X 1,000)



ภาพผนวกที่ 8 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABK6 (X 1,000)

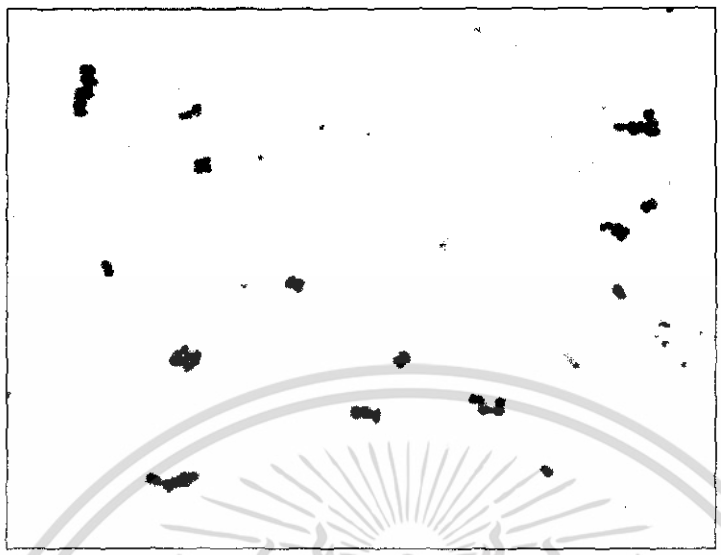
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 9 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABM1 (X 1,000)

ภาพผนวกที่ 10 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABM2 (X 1,000)

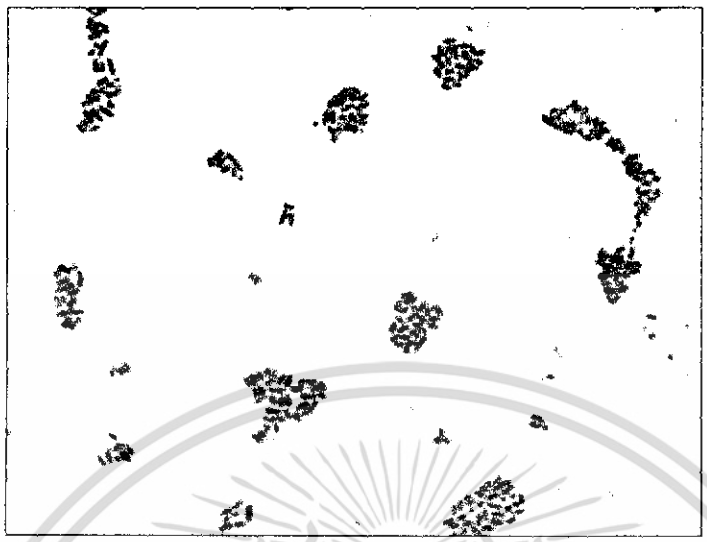
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 11 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABM3 (X 1,000)

ภาพผนวกที่ 12 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABL2 (X 1,000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 13 แสดงรูปร่างและการจัดเรียงตัวของ LABL5 (X 1,000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้