

การพัฒนาเกลือเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับการทำ
ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

DEVELOPMENT OF SUITABLE PROPERTY LACTIC ACID BACTERIAL
STARTERS FOR FERMENTED FISH PRODUCTS

ฐิติรัตน์ ไชยชาติ
THITRUT JAICHALAD

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2552

KMITL-2009-SC-M-020-027

การพัฒนากล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับการทำ
ผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

DEVELOPMENT OF SUITABLE PROPERTY LACTIC ACID BACTERIAL
STARTERS FOR FERMENTED FISH PRODUCTS



T105310

ฐิติรัตน์ ใจฉลาด

THITIRUT JAICHALAD

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....105310
วัน,เดือน,ปี.....18 พ.ย. 2552



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2552

KMITL-2009-SC-M-020-027

**DEVELOPMENT OF SUITABLE PROPERTY LACTIC ACID BACTERIAL
STARTERS FOR FERMENTED FISH PRODUCTS**

THITIRUT JAICHALAD

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY
FACULTY OF SCIENCE
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

2009

KMITL-2009-SC-M-020-027

COPYRIGHT 2009

FACULTY OF SCIENCE

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การพัฒนาเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมัก
Development of Suitable Property Lactic Acid Bacterial Starters for Fermented Fish Products

นักศึกษา นางสาวจิตติรัตน์ ใจฉลาด

รหัสประจำตัว 48068304

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ผศ.ดร.สรัญญา พันธุ์พฤกษ์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
รศ.อารี	ฤทธิบูรณ์	
รศ.ดร.สุรีย์	นานาสมบัติ	
ผศ.ดร.สรัญญา	พันธุ์พฤกษ์	
รศ.ดร.อดิศร	เสวตวิวัฒน์	
รศ.ดร.สุนีย์	นิธิสินประเสริฐ	


สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

วัน / เดือน / ปี ที่สอบ 7 พฤษภาคม 2552 เวลา 13.30 – 15.30 น.

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารามวลัยลักษณ์ 1 ห้อง 424

คณะวิทยาศาสตร์รับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.ธีรวัฒน์ มงคลอัครวัฒน์)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

วันที่ 26 เดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2552

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การพัฒนากล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีสมบัติเหมาะสมสำหรับการทำผลิตภัณฑ์ปลาหมัก
นักศึกษา	นางสาว รุติรัตน์ ใจฉลาด
รหัสประจำตัว	48068304
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2552
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. สุรีย์ นานาสมบัติ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พุกภัย

บทคัดย่อ

ในการศึกษานี้ได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากกุ้งสด หอยแมลงภู่มัด กุ้งจ่อม หอยแมลงภู่มัด ปลาจ่อม ทั้งหมด 52 ตัวอย่าง แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดอยู่ในช่วง 3.0×10^3 ถึง 3.4×10^8 CFU ต่อกรัม จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้งหมด 222 ไอโซเลต มาทดสอบหากิจกรรมการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียจำนวน 8 ชนิดด้วยเทคนิค agar spot test สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีกิจกรรมการยับยั้งได้ดีทั้งหมด 52 ไอโซเลต และนำมาทดสอบความสามารถในการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดี และเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความสามารถในการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน (โดยใช้เทคนิค agar well diffusion assay) และเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 2 ไอโซเลต คือ IIS11 และ 4IS17 เป็นแบคทีเรียที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินและไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่เหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ แบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต IIS11 ยังสามารถทนทั้งกรดไฮโดรคลอริกและกรดแลคติกได้ที่พีเอชต่ำสุดคือพีเอช 2.0 ขณะที่ไอโซเลต 4IS17 สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกและกรดแลคติกได้ที่พีเอชต่ำสุดคือพีเอช 1.5 และ 2.0 ตามลำดับ โดยทั้ง 2 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นสูงสุดของโซเดียมคลอไรด์ (ร้อยละ 10) และเกลือน้ำดี (ร้อยละ 1.5) เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตนี้มาจำแนกชนิดโดยอาศัยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA พบว่าไอโซเลต IIS11 เป็น *Enterococcus faecium* และไอโซเลต เป็น *Enterococcus faecalis*

การศึกษาผลของการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสมของแบคทีเรีย *Ent. faecium* 11S11, *Ent. faecalis* 4IS17, *Pediococcus pentosaceus* P0805 แยกได้จากเนื้อหมูสดและ *Lactococcus lactis* 13IS3 แยกได้จากเนื้อปลาทรายต่อคุณภาพของแหนมปลาที่หมักที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วภายใน 48 ชั่วโมง ซึ่งแหนมปลาที่เติมกล้าเชื้อผสมทั้ง 4 ชนิดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดมากที่สุด (3.0×10^8 CFUต่อกรัม) และมีปริมาณกรดทั้งหมดสูงที่สุด (ร้อยละ 1.21) และค่าพีเอชของแหนมปลาลดลงอย่างรวดเร็ว (ต่ำกว่า 4.6) หลังจากหมัก 48 ชั่วโมง แหนมปลาชุดที่เติมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 11S11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis* 13IS3 มีค่า a_w ต่ำที่สุด (0.953) มีปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย น้ำหนักที่สูญเสียและค่า L^* (ค่าความสว่าง) เพิ่มขึ้นมากที่สุดเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก (96 ชั่วโมง) คุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลาที่เติมกล้าเชื้อได้รับการยอมรับมากกว่าแหนมปลาที่ไม่เติมกล้าเชื้อ

Thesis title	Development of Suitable Property Lactic Acid Bacterial Starters for Fermented Fish products
Student	Miss. Thitirut Jaichalad
Student ID	48068304
Degree	Master Degree
Program	Biotechnology
Year	2009
Thesis Advisor	Assoc. Prof. Dr. Suree Nanasombat
Thesis Co-Advisor	Asst. Prof. Dr. Saranya Phunpruch

ABSTRACT

In this study, the number of lactic acid bacteria (LAB) was analyzed from 52 samples of raw shrimp, raw mussel, kung-jom, hoi-dong and pla-jom. The total LAB counts were in the range of 3.0×10^3 to 3.4×10^8 CFU/g. A total of 222 LAB isolates was screened for their inhibitory activity against eight bacterial species by agar spot test. Among these LAB isolates, 52 isolates showed good inhibitory activity. They were further characterized for their ability to resist hydrochloric acid, lactic acid, bile salts and sodium chloride, and ability to produce bacteriocin (using agar well diffusion assay) and amino acid decarboxylase. The selected LAB isolates, 1IS11 and 4IS17 were bacteriocin-producing strains, and showed no amino acid decarboxylase activity which was suitable property for starter cultures. The isolate 1IS11 could resist both hydrochloric acid and lactic acid at the lowest pH of 2.0, while the isolate 4IS17 was able to tolerate hydrochloric acid and lactic acid at the lowest pH of 1.5 and 2.0, respectively. Both isolates could grow at the highest concentration of sodium chloride (10 %) and bile salts (1.5%). They were identified by morphological characterization, biochemical test and 16S rDNA sequence analysis. The isolate 1IS11 was found to be *Enterococcus faecium*, whereas the isolate was *Enterococcus faecalis*.

The effect of single culture and mixed cultures of *Ent. faecium* 11S11, *Ent. faecalis* 41S17, *Pediococcus pentosaceus* P0805 isolated from raw pork and *Lactococcus lactis* 131S3 isolated from raw fish on quality of nham-plaa during fermentation at 30°C for 96 hours was investigated. The number of total LAB rapidly increased within 48 h. Nham-plaa added with all four mixed cultures had the highest population of LAB (3.0×10^8 CFU/g), total acidity (1.21 %) and pH (< 4.6) after 48 hours of fermentation. Nham-plaa added with mixed cultures of *Ent. faecium* 11S11, *Ent. faecalis* 41S17 and *Lc. lactis* 131S3 had the lowest a_w (0.953) and the highest increase of released water, weight loss and L* value (lightness) after 96 hours of fermentation. Sensory quality of nham-plaa added with LAB starter cultures received higher acceptability than nham-plaa without addition of starter culture.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจากอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.สุรีย์ นานาสมบัติ ที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือ ให้การอบรมสั่งสอน ให้คำชี้แนะและช่วยแก้ไขปัญหาดังกล่าว รวมทั้งให้ประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า ตลอดจนช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้เสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร. สรัญญา พันธุ์พฤกษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วมที่ให้ความรู้ ความช่วยเหลือ ตลอดจนให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รศ. อารี ฤทธิบุรณ์ รศ.ดร. อติสร เสวตวิวัฒน์ และ รศ.ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ ซึ่งเป็นคณะกรรมการสอบหัวข้อวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและคำชี้แนะอีกทั้งยังเสียสละเวลาให้คำปรึกษาจนทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลงได้

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัย บัณฑิตคณะวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ธุรการภาควิชาชีววิทยา ประยุกต์ทุกท่าน ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำชี้แนะและอำนวยความสะดวกทั้งทางด้านเอกสาร และติดต่อประสานงาน ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ทุกท่านที่คอยช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี

ขอบคุณเพื่อนๆ พี่และน้องภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ ที่ให้ความช่วยเหลือและให้คำปรึกษา และช่วยเป็นกำลังใจให้ข้าพเจ้าเสมอมา

และสุดท้ายต้องกราบขอบพระคุณ คุณพ่อสำเร็จ ใจฉลาด และคุณแม่อุษา ฉายวัฒนะ รวมทั้งพี่อรทัย ใจฉลาด และบุคคลในครอบครัวข้าพเจ้าทุกท่าน ที่คอยให้กำลังใจ รับฟังปัญหา ให้การสนับสนุนและให้ความช่วยเหลือ รวมทั้งเสียสละเพื่อข้าพเจ้าเสมอมา

สำหรับคุณงามความดีและประโยชน์อันใดที่เกิดจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้กับบิดามารดา บุคคลในครอบครัว และผู้ให้การสนับสนุนและให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าทุกท่าน ตลอดจนครุอาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้และให้ประสบการณ์ที่ดีแก่ข้าพเจ้า ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณทุกท่านเป็นอย่างสูง

ฐิติรัตน์ ใจฉลาด

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	XI
สารบัญภาพ.....	XIV
บทที่ 1 บทนำ	
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
1.3 ขอบเขตของงานวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก.....	4
2.1.1 สกูลของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	5
2.2 เทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อ.....	34
2.2.1 คุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ.....	34
2.2.1.1 การผลิตสารยับยั้ง.....	34
2.2.1.2 อัตราการเจริญที่อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือ และพีเอชแตกต่างกัน.....	36
2.2.1.3 เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (Carbohydrate Metabolism).....	37
2.2.1.4 กิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสและไฮโดรไลซิสของ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์.....	39

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
2.2.1.5 การรีดิวซ์ไนเตรทและไนไตรต์.....	39
2.2.1.6 กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน.....	40
2.2.1.7 การต้านทานต่อสารประกอบที่กล้ำเชื้อผลิตขึ้น.....	40
2.2.1.8 การไม่ทำให้มีการสะสมของไบโอเจนิคเอมีนในอาหาร.....	41
2.2.1.9 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก.....	44
2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ผลิตกล้ำเชื้อ.....	48
2.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการหมักเนื้อ.....	50
2.3.2 หน้าที่ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักเนื้อ.....	53
2.4 สารแบคทีริโอซิน.....	55
2.4.1 คุณลักษณะของสารแบคทีริโอซิน.....	55
2.4.2 การจำแนกสารแบคทีริโอซิน.....	57
2.5 คุณลักษณะทางเคมีและกายภาพของสารแบคทีริโอซิน.....	59
2.5.1 องค์ประกอบทางเคมี.....	59
2.5.2 คุณลักษณะทางกายภาพ.....	59
2.5.3 ความคงตัวของสารแบคทีริโอซิน.....	60
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	68
3.1.1 ตัวอย่างอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก.....	68
3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์.....	68
3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้ทำเจือจางและสารเคมีและเอนไซม์.....	68
3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	70

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.2	วิธีการทดลอง	
3.2.1	การวิเคราะห์หาจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหาร ทะเลสดและอาหารทะเลหมัก.....	70
3.2.2	การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อการทดสอบ.....	71
3.2.3	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น....	71
3.2.4	การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดีและ โซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	72
3.2.5	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่มีกิจกรรมของ เอนไซม์ amino acid decarboxylase activity.....	73
3.2.6	การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก.....	74
3.2.7	การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	77
3.2.8	การศึกษาผลของการใช้กลูต้ามิโนแบคทีเรียกรดแลคติกต่อ คุณภาพของแฮมปลา.....	86
3.3	การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ.....	89

บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1	การตรวจนับจำนวนการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารทะเลสดและ อาหารทะเลหมักและการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสาร ยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar spot test.....	90
4.1.1	การตรวจนับจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในกุ้งสด กุ้งจ่อม ปลาจ่อม หอยแมลงภู่น้ำจืด หอยแมลงภู่น้ำเค็ม.....	90
4.1.2	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถ ผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์.....	92

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.2 คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้ง.....	94
4.2.1 การทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลีนน้ำดี และเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	94
4.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ amino decarboxylase activity.....	101
4.3 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก.....	102
4.3.1 การทดสอบการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน โดยวิธี agar well diffusion assay.....	102
4.3.2 ผลของอุณหภูมิ เอนไซม์ และพีเอช ต่อกิจกรรมแบคทีเรียโอซิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก.....	103
4.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลสด และอาหารทะเลหมัก.....	104
4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา.....	104
4.4.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อการจำแนกชนิดในระดับจีโนม.....	105
4.4.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อการจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์ โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH.....	105
4.4.4 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA.....	109
4.5 ผลของการเติมกลูต้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพของแหนมปลา.....	116
4.5.1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดใน แหนมปลาระหว่างกระบวนการหมัก.....	116
4.5.2 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดใน แหนมปลาระหว่างกระบวนการหมัก.....	118
4.5.3 การเปลี่ยนแปลงของค่า aw ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย น้ำหนัก ที่สูญหายในแหนมปลาระหว่างกระบวนการหมัก.....	121

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.5.4 การเปลี่ยนแปลงสีในแหวนปลาระหว่างกระบวนการหมัก.....	123
4.5.5 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหวนปลา.....	124
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	127
บรรณานุกรม.....	130
ภาคผนวก ก.....	142
ภาคผนวก ข.....	146
ภาคผนวก ค.....	151
ภาคผนวก ง.....	156
ภาคผนวก จ.....	161

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1 สกูลของแบคทีเรียกรดแลคติกและคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	6
2.2 คุณลักษณะของ <i>Leuconostoc</i> และ <i>Oenococcus</i>	13
2.3 คุณลักษณะของ <i>Pediococcus</i>	15
2.4 คุณลักษณะการหมักของ <i>Lactobacillus</i>	20
2.5 คุณลักษณะโดยทั่วไปหรือคุณลักษณะที่กเว้นบางประการของแบคทีเรีย ในกลุ่ม Enterococci.....	24
2.6 การทดสอบความแตกต่างระหว่าง <i>Ent. faecalis</i> กับกลุ่มของ <i>Ent. faecium</i> , <i>Ent. avium</i> , <i>Ent. gallinarum</i> และ <i>Ent. cecorum</i>	31
2.7 คุณลักษณะโดยทั่วไปของแบคทีเรีย <i>Ent. faecium</i> species group.....	32
2.8 คุณลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียแต่ละชนิดใน <i>Ent. faecium</i> species group.....	33
2.9 ไบโอเจนิคเอมีนในอาหารและผลของไบโอเจนิคเอมีนต่อสุขภาพ.....	42
2.10 จุลินทรีย์ที่สร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์.....	47
2.11 อาหารและเครื่องคั้นหมักที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียกรดแลคติก.....	49
2.12 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อ.....	52
2.13 เปปไทด์ที่ต่อต้านจุลินทรีย์ (peptide bacteriocins) ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก.....	58
2.14 คุณลักษณะทางกายภาพของสารแบคทีริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก.....	61
4.1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดและค่าพีเอช ของอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก.....	92
4.2 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลสดและอาหาร ทะเลหมักที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ.....	93
4.3 การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลือน้ำดีและโซเดียมคลอไรด์ ในอาหารเหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้.....	96

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4.4 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต IIS11 และ ไอโซเลต 4IS17 ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH.....	108
4.5 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต IIS11 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ได้จาก สิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน.....	115
4.6 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต 4IS17 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ที่ได้จาก สิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน.....	115
4.7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในหมานมปลาระหว่างการหมัก ด้วยวิธีธรรมชาติและการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม.....	117
4.8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในหมานมปลาระหว่างการหมักด้วย วิธีธรรมชาติและการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม.....	118
4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในหมานมปลาระหว่างการหมัก ด้วยวิธีธรรมชาติและการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม.....	119
4.10 การเปลี่ยนแปลงค่า a_w การสูญเสียน้ำหนัก และปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย ในหมานมปลาระหว่างการหมักด้วยวิธีธรรมชาติและการหมักโดย การเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม.....	122
4.11 การเปลี่ยนแปลงสีของหมานมปลาโดยการหมักด้วยวิธีธรรมชาติและ การหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม.....	123
4.12 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของหมานมปลาโดยการหมัก ด้วยวิธีธรรมชาติและการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม.....	125
ก1 การเตรียมฟอสเฟตบัพเฟอร์ที่ระดับพีเอชต่างๆกัน.....	144
ก2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด.....	145
ข1 แสดงคุณสมบัติที่แตกต่างกันทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติก.....	148

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข2 องค์ประกอบของสารคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH strips) ทั้ง 50 ชนิด.....	149
ค1 การวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในอาหารทะเลสดและหมัก.....	151
ค2 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลหมักที่มีฤทธิ์ ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์.....	153
ง1 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต P0805 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของ สิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน.....	160
จ1 ผลของความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่อค่าพีเอชของแหนมปลา.....	163
จ2 ผลของความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนม ปลา.....	164

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 phylogeny ของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น.....	7
2.2 phylogeny ของ <i>Lactococcus</i> ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ ของยีน 16S rRNA.....	8
2.3 phylogeny ของ <i>Leuconostoc</i> ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA	11
2.4 phylogeny ของ <i>Pediococcus</i> ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA.....	16
2.5 phylogeny ของ <i>Lactobacillus</i> ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA.....	19
2.6 Distance matrix tree ของ <i>Enterococcus</i> ได้จากการวัด homology ของลำดับยีน 16S rRNA.....	28
2.7 แผนภาพเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรด แลคติกในกลุ่ม Homo และ Heterofermentative (ซ้าย) และ bifidobacteria (ขวา).....	38
3.1 สภาวะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก แต่ละไอโซเลต.....	83
4.1 รูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต IIS11 และ 4IS17.....	107
4.2 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย.....	110
4.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA.....	110
4.4 ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.....	111
4.5 พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	112
4.6 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	113
ง1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก P0805.....	157
ง2 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA.....	157
ง3 ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์.....	158

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
ง4 พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลกติก P0805.....	159
ง5 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลกติก P0805 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ <i>EcoRI</i>	160

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของงานวิจัย

กล้าเชื้อ (starter culture) คือจุลินทรีย์ที่เติมลงไปในวัตถุดิบและก่อให้เกิดอาหารหมัก โดยสามารถเร่งและควบคุมกระบวนการหมัก (Leroy และ De Vuyst. 2004) การใช้กล้าเชื้อในการหมักอาหารจะช่วยเพิ่มอัตราการหมักและความคงตัวของผลิตภัณฑ์ซึ่งกล้าเชื้อช่วยปรับปรุงคุณลักษณะทางประสาทสัมผัส คุณภาพของจุลินทรีย์และลดระยะเวลาการหมักอาหารให้สั้นลง (Visessanguan และคณะ. 2006) รวมถึงช่วยให้อาหารหมักมีความปลอดภัยจากโรคอาหารเป็นพิษ (Swetwathana และคณะ. 1999) แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่ถูกนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักและอื่นๆ แบคทีเรียกรดแลคติกมีหน้าที่ที่สำคัญในกระบวนการผลิตอาหารหมักโดยสามารถใช้วัตถุดิบและก่อให้เกิดกรดอินทรีย์ได้อย่างรวดเร็ว โดยส่วนใหญ่แล้วเป็นกรดแลคติกอาจมีการผลิตกรดอะซิติก เอทานอลหรือสารประกอบให้กลิ่นรส สารแบคทีเรียโอซิน สารโพลีแซคคาไรด์หรือเอนไซม์ชนิดต่างๆ ซึ่งสารเหล่านี้จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาและเพิ่มความปลอดภัยจากจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ ช่วยปรับปรุงเนื้อสัมผัสและคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสในผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Leroy และ De Vuyst. 2004)

การนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักที่ดีต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก คือต้องสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นอันตรายโดยสามารถผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วหรือสร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์ (สารแบคทีเรียโอซิน) ต้องมีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติก (Ammor และ Mayo. 2007) ต้องสามารถทนต่อกรดและน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและทนต่อน้ำดีในลำไส้เล็กได้ (Goldin และ Gorbach. 1992) และต้องคำนึงถึงการสร้างไบโอเจนิกเอมีนในอาหารซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์ที่สามารถดีคาร์บอกซิเลชันกรดอะมิโนได้ โดยไบโอเจนิกเอมีนเป็นพิษก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภค นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกต้องสามารถที่จะแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นในวัตถุดิบและมีกิจกรรมเมแทบอลิกโดยสามารถเจริญและอยู่รอดในสภาวะการผลิตอาหารหมักได้ เช่น ต้องสามารถทนต่ออุณหภูมิและความเข้มข้นของ

เกลือสูง (Locke และ Hechelmann. 1987 ; Montel. 1999) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้เป็นสิ่งที่ควรคำนึงถึงสำหรับการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกมาเพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อสำหรับการผลิตอาหารหมัก

ผลิตภัณฑ์อาหารหมักของไทยที่ทำจากสัตว์น้ำที่นิยมบริโภคกันอย่างหนึ่งคือ ส้มผักซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีเกลือต่ำ ทำจากปลาหรือเนื้อปลาผสมกับเกลือ ข้าวสุกหรือข้าวเหนียวและกระเทียม หมักจนกระทั่งมีรสเปรี้ยวซึ่งการหมักเกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติก นิยมรับประทานกันในภาคกลางและภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (Paludan-Möller และคณะ. 2002) Riebroy และ Benjakul (2008) ได้ทำการหมักส้มผักจาก bigeye snapper (*Priacnathus tayenus*) โดยใช้ก้ำเชื้อ *Pediococcus acidilactici* ซึ่งการใช้ก้ำเชื้อจากแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดนี้สามารถลดระยะเวลาการหมักและช่วยปรับปรุงคุณภาพของส้มผักได้ การหมักโดยอาศัยจุลินทรีย์จากธรรมชาติแบบดั้งเดิมทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอและไม่สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพการหมักได้ และเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคได้ (นภา โล่ห์ทอง. 2534)

ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมักเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการเป็นก้ำเชื้อ ได้แก่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสีย มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก สามารถทนต่อกรด เกลือและน้ำดีได้ สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และไม่มีกิจกรรมอะมิโนแอกซิดิเคิร์ฟอกซิเลสและนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมดังกล่าวมาใช้เป็นก้ำเชื้อสำหรับการผลิตแฮมปลาโดยเปรียบเทียบคุณภาพทางจุลินทรีย์ เคมีและกายภาพของแฮมปลาที่ไม่เติมก้ำเชื้อรวมทั้งประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแฮมปลา

1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1.2.1 เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก โดยคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมกับการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมัก

1.2.2 เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ โดยศึกษาคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและคุณสมบัติทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของเอนไซม์ ฟิเฆซและอุณหภูมิต่อสารแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

1.2.4 เพื่อศึกษาผลของการเติมกลูต้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกต่อคุณภาพของแหนมปลา

1.3 ขอบเขตของงานวิจัย

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ คัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดี คัดเลือกสายพันธุ์ที่ไม่สร้างอะมิโนแอซิดคาร์บอกซิเลส รวมทั้งทดสอบความไวของสารแบคทีเรียโอซินต่อเอนไซม์ชนิดต่างๆ ฟิเฆซ และอุณหภูมิที่ระดับต่างๆ พร้อมทั้งจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้และนำมาทดสอบการหมักในแหนมปลา

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทำให้ได้แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ใหม่ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกลูต้าเชื้อ เช่นมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกเกลือและน้ำดี ไม่สร้างอะมิโนแอซิดคาร์บอกซิเลสซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิคเอมีนและอื่นๆ

1.4.2 ทำให้ทราบชื่อวิทยาศาสตร์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมดังกล่าว จุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการเป็นกลูต้าเชื้อผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

1.4.3 ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ปลาหมักที่มีคุณภาพดีทั้งทางด้านจุลินทรีย์ ด้านเคมี กายภาพและประสาทสัมผัส

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก

คำว่าแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เป็นคำที่ใช้เรียกชื่อกลุ่มของแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องกันทั้งในด้านการทำหน้าที่และลักษณะทางพันธุกรรม โดยไม่ได้มีฐานะอย่างเป็นทางการในระบบจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรีย แต่ทำเพื่อความสะดวกในการเรียกชื่อเท่านั้น แต่อย่างไรก็ตามคำว่าแบคทีเรียกรดแลคติกนี้ยังคงมีความหมายที่สำคัญต่อนักจุลชีววิทยาและผู้ที่ศึกษาเกี่ยวกับการหมักอาหาร แบคทีเรียกรดแลคติกโดยทั่วไปหมายถึงกลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกจากการหมัก มีปริมาณร้อยละของ G และ C ต่ำ ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างกลมและรูปท่อน แบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีคุณสมบัติทางเคมี คุณสมบัติทางกายภาพและลักษณะทางพันธุกรรมคล้ายคลึงกันแต่มีความแตกต่างกับแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่นที่สร้างกรดแลคติก (เช่น *Bacillus*, *Listeria* และ *Bifidobacterium*) จากลักษณะทางด้านพันธุกรรม (phenotypic and genotypic differences) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่สร้างคะตะเลส (catalase negative) ทนกรด (acid tolerant) ทนอากาศ (aerotolerant) และเจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobes) เมื่อพิจารณาถึงความต้องการคาร์บอนและพลังงานสามารถจัดแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่ม heterotrophic chemoorganotrophs หมายถึงแบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการคาร์บอนที่อยู่ในรูป preformed organic carbon ซึ่งใช้เป็นทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงาน จนกระทั่งเมื่อเร็วๆ นี้ได้มีผู้คิดว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกชนิดไม่มีไซโตโครมหรือโปรตีนที่มีความสำคัญในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport protein) ดังนั้นแบคทีเรียในกลุ่มนี้ไม่สามารถได้รับพลังงานจากกิจกรรมการหายใจสิ่งนี้เป็นจริงกับแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ แต่จากการค้นพบเมื่อเร็วๆ นี้ได้ชี้ให้เห็นว่าแบคทีเรียบางชนิดสามารถหายใจได้ในกระบวนการ substrate level phosphorylation ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักเป็นทางเลือกที่ทำให้ได้ ATP แบคทีเรียกรดแลคติกต้องการสารอาหารที่มีความซับซ้อน เช่นบางชนิดจะสามารถเจริญได้เฉพาะเมื่อเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารสมบูรณ์เท่านั้นภายใต้สภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญ แต่ก็มีแบคทีเรียกรดแลคติกอีกหลายชนิดที่มีความต้องการสารอาหารค่อนข้างหลายชนิดขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมที่

เจริญและยังสามารถเจริญได้ค่อนข้างดีในสภาวะที่มีสารอาหารน้อยกว่าที่คาดคิด นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น ในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก สิ่งนี้สะท้อนให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีแหล่งที่อยู่ที่หลากหลายไม่เพียงแต่จะพบบนพืชผัก น้ำมันและเนื้อสัตว์เท่านั้นแต่ยังพบได้ในน้ำเกลือ อาหารที่มีพีเอชต่ำและสภาวะที่มีแอลกอฮอล์ คุณสมบัติที่ตรงประเด็นที่สุดของแบคทีเรียกรดแลคติกก็คือ คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารอาหารซึ่งเป็นเหตุผลหลักของการนำแบคทีเรียกลุ่มนี้มาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมัก เนื่องจากแบคทีเรียนี้สามารถเมแทบอลิซึมน้ำตาลแล้วทำให้เกิดกรดแลคติกและกรดชนิดอื่นๆ เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายซึ่งวิธีการหมักโดยแบคทีเรียกรดแลคติกแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ homofermentative และ heterofermentative สำหรับกระบวนการหมักแบบ homofermentative นั้นซับซ้อนที่ใช้น้ำตาลประมาณร้อยละ 90 จะเปลี่ยนเป็นกรดแลคติก ส่วนกระบวนการหมักแบบ heterofermentative นั้นจะเกิดกรดแลคติกเพียงร้อยละ 50 และมีกรดอะซิติก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ในสัดส่วนที่สมดุล แบคทีเรียกรดแลคติกมีวิธีการหมักแบบใดแบบหนึ่งในสองวิธีการหมักนี้เช่นเป็นแบบ obligate homofermentative หรือเป็นแบบ obligate heterofermentative แต่ก็มีบางสายพันธุ์ที่พบว่าสามารถเกิดกระบวนการหมักผันแปรคือทำได้ทั้งสองแบบ (facultative homofermentative) (Hutkins. 2006)

2.1.1 สกุลของแบคทีเรียกรดแลคติก (The genera of lactic acid bacteria)

จากการจัดจำแนกแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 12 สกุล (ตารางที่ 2.1) ทั้งหมดอยู่ในสัคค์ (Phylum) *Firmicutes* ลำดับ (order) *Lactobacillales* และจากการพิจารณาลำดับของยีน 16S rRNA และเทคนิคทางชีวโมเลกุลอื่นๆ ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกเป็น phylogenetic cluster กว้างๆ แต่ละกลุ่มนั้นมีตำแหน่งอยู่ไม่ห่างจากแบคทีเรียแกรมบวกที่มีสัดส่วนของ G+C ต่ำ (ภาพที่ 2.1) ซึ่งจาก phylogenetic tree สามารถแบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย 5 กลุ่มคือ

- 1) *Streptococcus - Lactococcus* branch (Family *Streptococcaceae*)
- 2) *Lactobacillus* branch (Family *Lactobacillaceae*)
- 3) *Lactobacillus – Pediococcus* branch (Family *Lactobacillaceae*)
- 4) *Oenococcus - Leuconostoc-Weisella* branch (Family *Leuconostocaceae*) และ
- 5) *Carnobacterium – Aerococcus – Enterococcus – Tetragenococcus - Vagococcus* branch (Families *Carnobacteriaceae, Aerococcaceae and Enterococcaceae*)

ตารางที่ 2.1 สกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกและคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติก^{1,2}

สกุล	รูปร่างเซลล์	วิธีการหมัก	CO ₂ จาก glucose		การเจริญที่อุณหภูมิ		การเจริญที่ไซโตเมคคัลไรต์			Lactic acid isomer
			+	-	10 °C	45 °C	ร้อยละ 6.5	ร้อยละ 18	4.4	
<i>Lactobacillus</i>	ท่อน (rods)	homo/hetero ³	±	± ⁴	±	±	-	±	-	D, L, DL ⁵
<i>Lactococcus</i>	กลม (cocci)	homo	-	+	-	-	-	±	-	L
<i>Leuconostoc</i>	กลม (cocci)	hetero	+	+	-	±	-	±	-	D
<i>Oenococcus</i>	กลม (cocci)	hetero	+	+	+	±	-	±	-	D
<i>Pediococcus</i>	กลม (tetrad)	homo	-	±	±	±	-	+	-	D, L, DL
<i>Streptococcus</i>	กลม (cocci)	homo	-	-	+	-	-	-	-	L
<i>Tetragenococcus</i>	กลม (tetrad)	homo	-	+	-	+	+	-	+	L
<i>Aerococcus</i>	กลม (tetrad)	homo	-	+	-	+	-	-	+	L
<i>Carnobacterium</i>	ท่อน (rods)	hetero	-	+	-	-	-	-	-	L
<i>Enterococcus</i>	กลม (cocci)	homo	-	+	+	+	-	+	+	L
<i>Vagococcus</i>	กลม (cocci)	homo	-	+	-	-	-	±	-	L
<i>Weissella</i>	กลม (coccioid)	hetero	+	+	-	-	-	±	-	D, L, DL

¹ ดัดแปลงจาก Axelsson. 2004

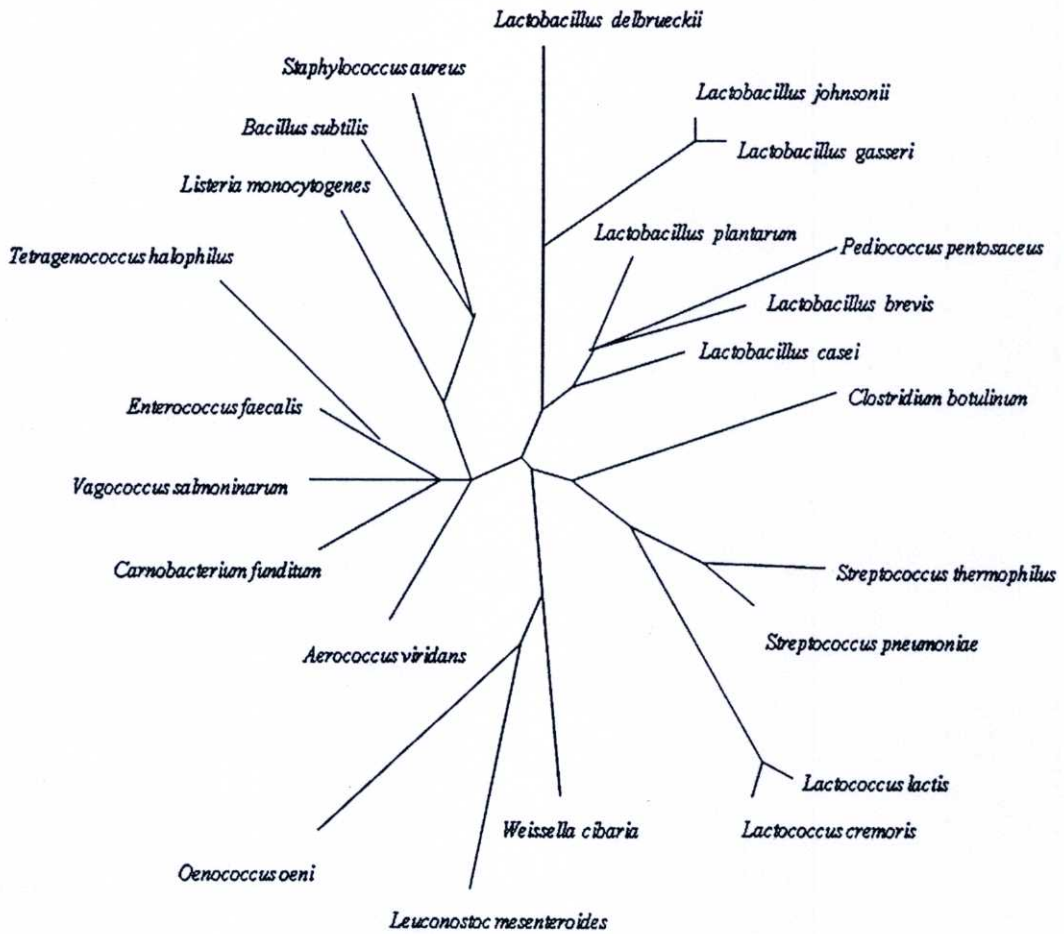
² คุณลักษณะโดยทั่วไปของสกุล บางสกุลอาจมีข้อยกเว้น

³ แบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *Lactobacillus* อาจเป็นได้ทั้ง homofermentative และ heterofermentative หรือเป็นได้ทั้ง 2 ชนิด

⁴ ความดันแปรทางฟิโน ไทป์ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย

⁵ แบคทีเรียบางชนิดสร้างได้ทั้ง D-, L- หรือ ผสมกันระหว่าง D- และ L- lactic acid

ที่มา : Hutkins. 2006 และ Axelsson. 2004

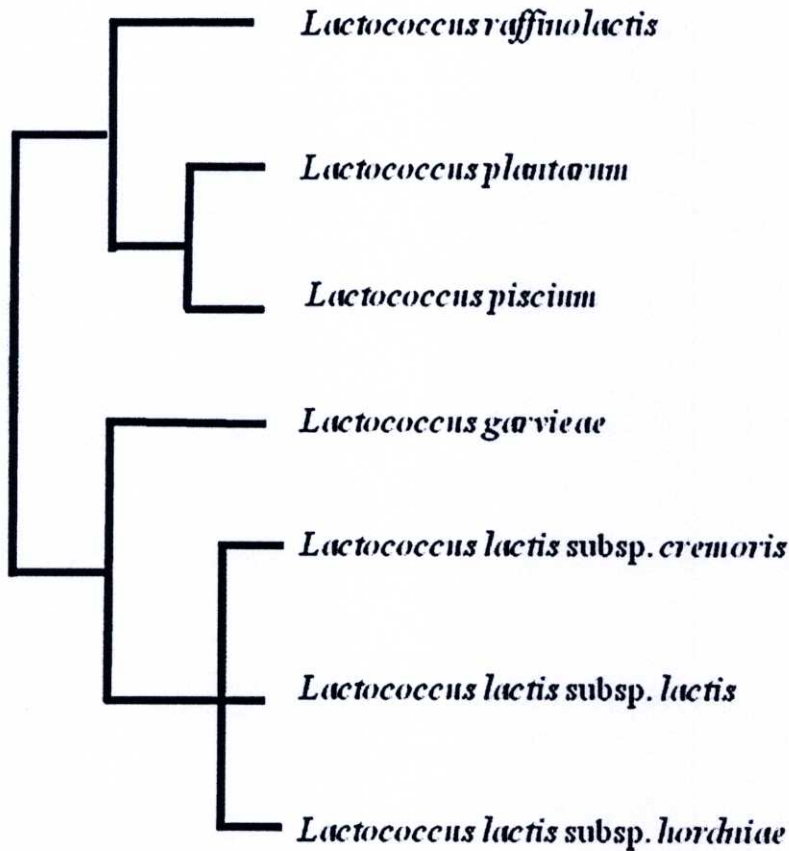


ภาพที่ 2.1 phylogeny ของแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียแกรมบวกชนิดอื่น (พิจารณาจากยีน 16S rRNA)

ที่มา : Hutkins. 2006

แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactococcus*

แบคทีเรียสกุล *Lactococcus* แบ่งได้เป็น 5 ชนิด (species) ตามความแตกต่างของลักษณะทางพันธุกรรม (five phylogenetically-distinct species) คือ *Lactococcus lactis*, *Lactococcus garviae*, *Lactococcus piscium*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis* (ภาพที่ 2.2) ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียที่ไม่เคลื่อนที่ มีการหมักเป็นแบบให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ (homofermentative) เป็น facultative anaerobe และอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือใกล้เคียง 30 องศาเซลเซียส และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่มีรูปแบบเฉพาะ คือ รูปกลม (cocci) ที่ต่อกันเป็นสายสั้น ๆ หรือ เป็นคู่ (Hutkins. 2006)



ภาพที่ 2.2 phylogeny ของ *Lactococcus* ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน
16S rRNA

ที่มา : Hutkins. 2006

Lactococcus ชนิดที่มีความสำคัญมากที่สุด คือ *Lc. lactis* ซึ่งเป็นชนิดที่มีความสำคัญมากที่สุด ในบรรดาแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่เกี่ยวข้องกับการหมักอาหาร โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นม (dairy product industry) นิยมใช้เป็นก้ำเชื้อในการผลิตเนยแข็งและผลิตภัณฑ์จากนมประเภทอื่นๆ และแบ่งออกเป็น 3 subspecies คือ *Lc. lactis* subsp. *lactis*, *Lc. lactis* subsp. *cremoris* และ *Lc. lactis* subsp. *hordinae* แต่มีเพียง *Lc. lactis* subsp. *lactis* และ *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ที่นำมาใช้เป็นก้ำเชื้อเริ่มต้นในกระบวนการหมัก *Lc. lactis* subsp. *hordinae* ไม่เกี่ยวข้องกับการผลิตอาหารหมัก *Lc. lactis* subsp. *lactis* อีกหนึ่งสายพันธุ์ซึ่งครั้งหนึ่งถูกเรียกว่า *Lc. lactis* subsp. *diacetylactis* (หรือ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) ซึ่งแยกความแตกต่างของเชื้อสายพันธุ์นี้ได้โดยอาศัยความสามารถในการเมแทบอลิซึมซิเตรท (citrate)

แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดย่อย (*Lc. lactis* subsp. *lactis* และ *Lc. lactis* subsp. *cremoris*) เดิมพิจารณาว่ามีแหล่งที่อยู่อาศัยดั้งเดิมในวัสดุจากพืช แต่จากหลายๆข้อสังเกต พบว่าน้ำนมเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยใหม่ ข้อสังเกตแรกคือแบคทีเรียเหล่านี้สามารถแยกได้จากนมดิบซึ่งที่จริงแล้วเป็นการยากที่จะพบ *Lc. lactis* subsp. *cremoris* ในทุกแห่งนอกจากนม ข้อสังเกตที่สองคือแบคทีเรียทั้งสองชนิดสามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในนมและผลิตภัณฑ์แลคติกทำให้พีเอชลดลงถึงต่ำกว่า 4.5 ดังนั้นแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียแข่งขันที่มีประสิทธิภาพ ข้อสังเกตสุดท้ายคือยีนที่อยู่บนพลาสมิด (extra chromosomal DNA) เป็นยีนที่ต้องการสำหรับการเจริญในนม (Hutkins. 2006)

กลุ่มของยีนที่ทำหน้าที่เฉพาะในพลาสมิดของเชื้อ Lactococci ส่วนใหญ่แปลรหัสเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งน้ำตาลแลคโตส (lactose transport) และเมแทบอลิซึมรวมทั้งการสลายเคซีนและการนำไปใช้ประโยชน์ ดังนั้นแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากนมควรมีพลาสมิดเหล่านี้เพื่อการเจริญเติบโตได้ดีในนม แต่ก็มีพลาสมิดของแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีการส่งถ่ายไปในระหว่างสายพันธุ์ต่างกันของแบคทีเรียผ่านทางกระบวนการ conjugal transfer และในอีกกรณีหนึ่งพลาสมิดดีเอ็นเอ (plasmid DNA) นี้จะรวมตัวเข้าเป็นส่วนหนึ่งของโครโมโซมก็จะทำให้ยีนกลุ่มนี้มีความเสถียรและมีสายพันธุ์ที่พัฒนาไปอย่างมีประสิทธิภาพ (Hutkins. 2006)

แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Streptococcus*

แบคทีเรียสกุล *Streptococcus* มีหลายชนิดอาศัยอยู่ในหลายๆ แหล่งบางชนิดก่อให้เกิดโรคในคนและสัตว์พบในช่องปากและลำไส้ *Streptococcus thermophilus* เป็นชนิดที่ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารหมัก โดยทั่วไป Streptococci ไม่เคลื่อนที่ (non-motile) เจริญได้ในสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobes) และกระบวนการเมแทบอลิซึมเป็นแบบ homofermentative เพียงอย่างเดียว (Hutkins. 2006)

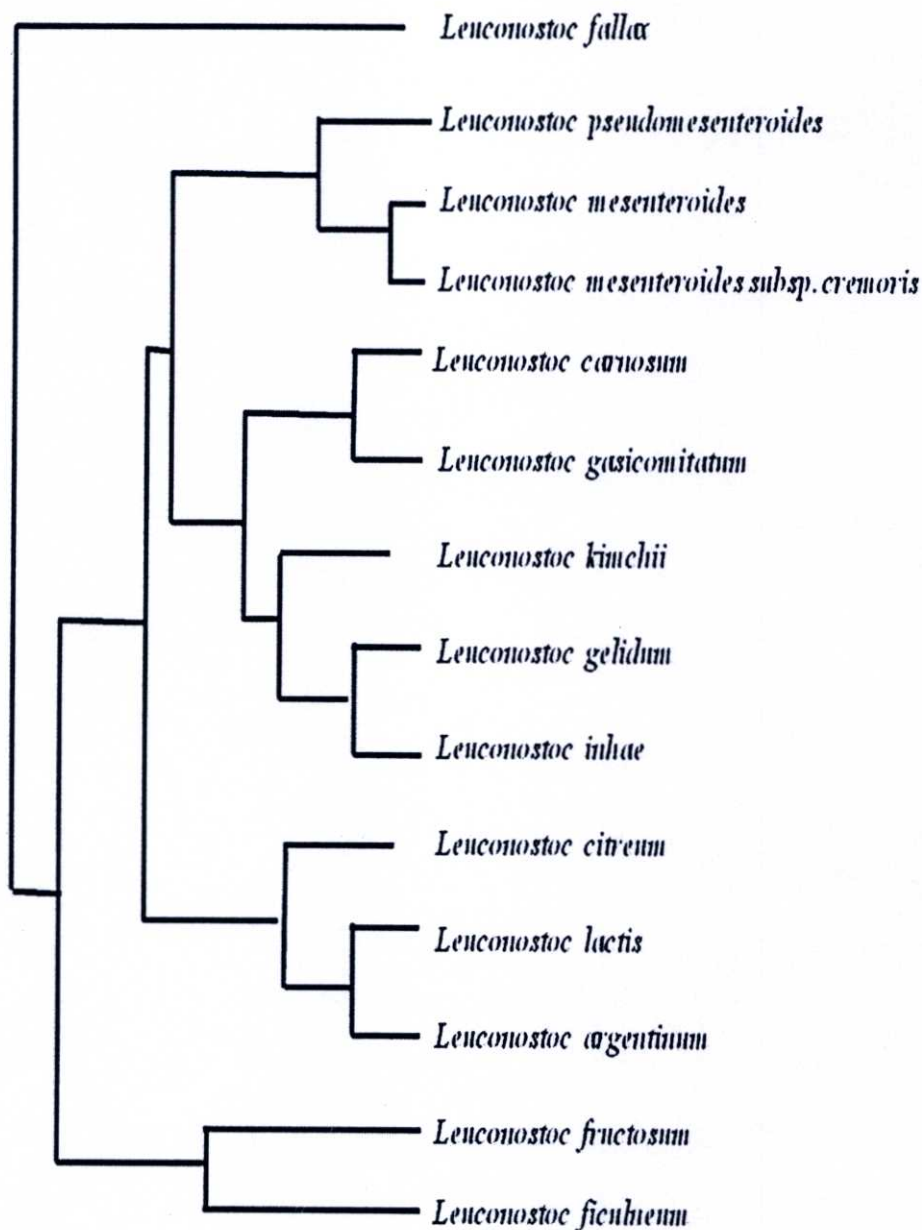
ตั้งแต่ช่วงกลางปี ค.ศ. 1980s (ค.ศ. 1980 ถึง 1989) ได้มีการแก้ไขการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียในสกุลนี้ใหม่ตามหลักอนุกรมวิธาน โดยการเปลี่ยนบางอย่างมีความเกี่ยวข้องอย่างตรงประเด็นสำหรับนักจุลชีววิทยาทางอาหาร เมื่อ 50 ปีก่อน Streptococci ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มหลักๆ คือ pyogenic, enterococcus, viridians และ lactic การจัดกลุ่ม Streptococcal ซึ่งได้ทำโดยอาศัยหลักการของ Sherman (Sherman scheme ซึ่งตีพิมพ์ในปี ค.ศ. 1937) นั้นได้มีการแก้ไขภายหลังแต่โดยทั่วไปเป็นวิธีหลักที่ใช้ในการจัดกลุ่มของแบคทีเรีย Streptococcal species เริ่มจากปี ค.ศ. 1984 ได้มีการเปลี่ยนแปลงแก้ไขการจัดจำแนกชนิดอื่น 2 ครั้ง ครั้งแรก enterococcus (หรือ

enteric streptococci) ซึ่งรวมถึง *Streptococcus faecalis*, *Streptococcus faecium* และ *Streptococcus durans* ได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุลใหม่คือ *Enterococcus* ต่อมาในปี ค.ศ. 1985 แบคทีเรียทั้ง 2 ชนิดซึ่งเดิมทราบกันดีว่าเป็น lactic streptococci (*Streptococcus lactis* และ *Streptococcus cremoris*) ได้ถูกจัดให้อยู่ในสกุลใหม่คือ *Lactococcus* ดังนั้น *S. thermophilus* ในปัจจุบันจึงเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวที่เป็นสมาชิกของแบคทีเรียสกุล *Streptococcus* ที่ใช้ในการหมักอาหาร (เช่น โยเกิร์ตและเนยแข็ง) เช่นเดียวกับแบคทีเรียในสกุล *Lactococci* เชื้อแบคทีเรีย *S. thermophilus* สามารถที่จะปรับตัวได้ดี โดยจะหมักแลคโตสในนมได้อย่างรวดเร็วให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ อย่างไรก็ตามวิธีการหมักแบบไอซ์แลคโตสโดย *S. thermophilus* แตกต่างจากการหมักแลคโตสโดย *Lc. lactis* อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ *S. thermophilus* อยู่ในช่วง 40 ถึง 42 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิสูงสุดที่เชื้อนี้สามารถเจริญเติบโตได้คือ 52 องศาเซลเซียส และสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้มากกว่า 60 องศาเซลเซียส แต่เชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ต้องการสารอาหารสำคัญที่ช่วยในการเจริญค่อนข้างมากกว่าสารอาหารที่ *Lactococci* ต้องการเนื่องจาก *S. thermophilus* สามารถย่อยโปรตีนได้น้อย (weakly proteolytic) ดังนั้นจึงต้องการ pre-formed amino acid ความสามารถในการทนเกลือไม่ทนน้ำดี และความหลากหลายของเมแทบอลิซึมเป็นคุณลักษณะของ *S. thermophilus* (Hutkins. 2006)

แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Leuconostoc*

Leuconostoc เป็นแบคทีเรียในวงศ์ (Family) *Leuconostocaceae* เช่นเดียวกับแบคทีเรียสกุลในกลุ่มที่ใกล้เคียงคือ *Weisella* และ *Oenococcus* แบคทีเรีย *Leuconostoc* ชอบเจริญที่อุณหภูมิปานกลาง (mesophilic) และช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 18 ถึง 25 องศาเซลเซียส บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส มีรูปร่างกลม (cocci) หรือมีลักษณะคล้ายรูปแท่ง (rod-like) โดยขึ้นอยู่กับองค์ประกอบและรูปแบบของอาหารเลี้ยงเชื้อ (อาหารเหลวหรืออาหารแข็ง) *Leuconostoc* แตกต่างกับ *Lactococci* และ *Streptococci* ตรงที่เป็นแบบ homofermentative อย่างแท้จริง (obligately homofermentative) ถึงแม้ว่า *Leuconostoc* นี้สามารถเจริญได้ในบรรยากาศปกติ (ambient atmosphere) แต่โดยทั่วไปสภาวะที่ไม่มีอากาศ (anaerobic environment) จะช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโต พลาสมิดพบบ่อยในแบคทีเรียชนิดนี้และเมื่อมีพลาสมิดอาจช่วยกำกับการทำหน้าที่สำคัญรวมถึงเมแทบอลิซึมของน้ำตาลแลคโตสและซิเตรทและการผลิตแบคเทอริโอซิน การจำแนกชนิดของแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* ได้ถูกเปลี่ยนแปลงแก้ไขเพราะ *Leuconostoc* หลายชนิดได้ถูกย้ายไปอยู่ในสกุลอื่นหรืออยู่ในสกุลที่ดั่งขึ้นใหม่ ตัวอย่างเช่น

Oenococcus oeni แต่ก่อนจำแนกเป็น *Leuconostoc oenos* และ *Leuconostoc* ชนิดอื่น ได้ถูกจัดจำแนกใหม่เป็น *Weissella* ปัจจุบันแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 13 ชนิด (ภาพที่ 2.3) (Hutkins, 2006)



ภาพที่ 2.3 phylogeny ของ *Leuconostoc* ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

16S rRNA

ที่มา : Hutkins, 2006

การจำแนกชนิดของแบคทีเรียอาศัยคุณลักษณะทางพันธุกรรมและลักษณะทางกรรมพันธุ์เป็นหลัก ภายหลังจากได้อาศัยการหมักคาร์โบไฮเดรต ความสามารถในการผลิตโพลีแซคคาไรด์เด็คเตริน (polysaccharide dextran) ความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะ vancomycin และคุณลักษณะทางสรีรวิทยาหลายประการ (ตารางที่ 2.2) แบคทีเรียชนิดนี้โดยมากสัมพันธ์กับถิ่นที่อยู่รวมทั้งวัสดุจากพืชและผัก นมและสภาพแวดล้อมของนมและผลิตภัณฑ์เนื้อ บางชนิดทำให้เกิดอาหารเน่าเสีย (เช่น *Leuconostoc gasicomitatum*) ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นใช้ในการหมักอาหาร ภายหลังได้ใช้แบคทีเรียชนิด *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* และ *Leuconostoc lactis* ในการหมักนมและ *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuconostoc kimchii* และ *Leuconostoc fallax* ใช้ในการผลิตผักดอง โดยทั่วไปแล้วถิ่นที่อยู่อาศัยของสายพันธุ์เหล่านี้สะท้อนให้เห็นถึงชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่แบคทีเรียเหล่านี้ใช้ในการหมัก สายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับพืช เช่น *Leu. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* สามารถหมักน้ำตาลในพืชได้ เช่น ฟรุคโตส ซูโครส อะราบิโนส และทรีฮาโรส ส่วนสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับนม (*Leu. mesenteroides* subsp. *cremoris* และ *Leu. lactis*) น่าจะหมักแลคโตส กาแลคโตส และกลูโคส เป็นไปได้ว่าแบคทีเรียชนิดที่ทำให้อาหารเน่าเสียเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ผลิตโพลีแซคคาไรด์ให้ซึ่งทำให้เกิดเมือก (slime) (Hutkins, 2006)

ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากกระบวนการหมักประเภท heterofermentative มีทั้งกรดแลคติก กรดอะซิติก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ได้จากกระบวนการหมักสามารถตรวจสอบได้และใช้เพื่อแยกแบคทีเรียนี้ออกจากกลุ่มของแบคทีเรียประเภท homofermentative (Lactococci, Streptococci และ Pediococci) ได้และโดยทั่วไปในขณะที่ *Leuconostoc* ลดพีเอชของอาหาร (growth medium) ลงถึงช่วง 4.5 ถึง 5.0 พบว่าการสร้างกรดโดย *Leuconostoc* บางชนิดค่อนข้างน้อยโดยเฉพาะเมื่อเปรียบเทียบกับ Lactococci หรือแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นที่เป็นพวก homofermentative ดังนั้นการสร้างกรดจึงไม่ใช่หน้าที่หลักของแบคทีเรียในกลุ่มนี้ในระหว่างการหมัก (Hutkins, 2006)

ในการหมักกะหล่ำปลีดองและผักดองชนิดอื่น *Leuconostoc* ทำให้ค่าพีเอชของผักลดต่ำลงในช่วงแรกของการหมักและสร้างคาร์บอนไดออกไซด์พอเพียงที่จะลดค่า redox potential ในสภาพแวดล้อมของอาหาร กิจกรรมเมแทบอลิซึมทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นเป็นเหตุให้มีการผลิตกรดมากขึ้น นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายของการหมักแบบ heterofermentative เป็นผลให้เกิดกลิ่นรสที่หลากหลาย (diverse flavor) และกลิ่น (aroma profile)

ของอาหารหมัก *Leuconostoc* ชนิดที่ใช้ในการหมักนมมีความสำคัญบางส่วนโดยเฉพาะในด้านการให้กลิ่นรสด้วยเหตุผล *Leuconostoc* สายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับผัก (Hutkins, 2006)

ตารางที่ 2.2 คุณลักษณะของ *Leuconostoc* และ *Oenococcus*¹

คุณลักษณะ	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp.			<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>
	<i>cremoris</i>	<i>mesenteroides</i>	<i>dextranicum</i>	<i>lactis</i>	<i>oeni</i>
ร้อยละ G+C	38-44	28-32	28-32	37-42	37-42
การเจริญที่ 37 °C	-	± ²	+	+	±
การเจริญที่พีเอช 4.8	-	-	-	-	+
เครื่องเตรนจากกลูโคส	-	+	+	-	-
การเจริญใน	-	-	-	+	+
เอทานอลร้อยละ 10					
กรดจาก					
อะราบิโนส (arabinose)	-	+	-	-	±
ฟรุคโตส (fructose)	-	+	+	+	+
มอลโตส (maltose)	±	+	+	+	-
เมลลิไบโอส (melibiose)	±	+	+	±	±
ซาลิซิน (salicin)	-	±	±	±	±
ซูโครส (sucrose)	-	+	+	+	-
ทรีฮาโรส (trehalose)	-	+	+	-	+

¹ดัดแปลงจาก *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*

²ปฏิกิริยาแปรผันได้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์

ที่มา : Hutkins, 2006

แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Oenococcus*

แบคทีเรียสกุลนี้ได้ถูกจัดตั้งในปี ค.ศ. 1995 และมีเพียง 1 ชนิดเท่านั้นคือ *Oenococcus oeni* ซึ่ง *O. oeni* ได้ถูกจัดทาง phylogenetic ให้อยู่ภายในสายของกลุ่ม *Leuconostocaceae* แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียสกุลนี้ก็อยู่ค่อนข้างห่างจาก *Leuconostoc* และ *Weissella* (ดังภาพที่ 2.1) ถึงแม้ว่า *O. oeni* มีคุณสมบัติทาง phenotypic หลายประการที่คล้ายคลึงกับ *Leuconostoc* sp. (ตัวอย่างเช่น กระบวนการเมแทบอลิซึมแบบ heterofermentative และชอบเจริญเติบโตที่อุณหภูมิปานกลาง) แต่ก็มีคุณลักษณะทางสรีรวิทยาที่สำคัญหลายประการที่แตกต่างจาก *Leuconostoc* sp. เช่น *O. oeni*

สามารถทนต่อกรดได้ดีกว่า *Leuconostoc* มาก เนื่องจาก *O. oeni* สามารถเริ่มเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชที่ต่ำกว่า 5.0 และนอกจากนี้ *O. oeni* ยังเป็นหนึ่งในแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ทนต่อเอทานอลได้ดีที่สุด เนื่องจากสามารถเจริญได้ในสภาพที่มีปริมาณเอทานอลร้อยละ 10 ได้โดยทั่วไปแล้วสายพันธุ์ของ *O. oeni* ส่วนใหญ่จะเจริญช้าและหมักน้ำตาลได้เพียงบางชนิดเท่านั้น การนำ *O. oeni* ไปใช้ประโยชน์ในอาหารหมักค่อนข้างจำกัดคือ ใช้ในการทำไวน์ชนิดเดียวเท่านั้น (oenos เป็นคำในภาษากรีก แปลว่า ไวน์) *O. oeni* มีสามารถในการขจัดกรดในไวน์ผ่านกระบวนการหมักมาโลแลคติก (malolactic fermentation) ซึ่งกรดมาลิก (malic acid) จะถูกดีคาร์บอกซิเลต (decarboxylated) ไปเป็นกรดแลคติก ยิ่งกว่านั้น *O. oeni* ยังมีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคสและฟรุกโตสใช้น้ำตาลได้บางชนิด ทนต่อพีเอชต่ำและทนต่อเอทานอลความเข้มข้นสูงได้ดีในไวน์หรือน้ำผลไม้ซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยตามธรรมชาติของแบคทีเรียชนิดนี้ (Hutkins, 2006)

แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Pediococcus*

แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่ม *Pediococci* นี้มีวิธีการหมักแบบ obligate homofermentative แบคทีเรียกลุ่ม *Pediococci* มีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ ซึ่งสามารถสังเกตได้ด้วยสายตาว่ามีการเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ (tetrad) เซลล์อาจมีการเรียงตัวเป็นคู่แต่ไม่มีการเรียงตัวเป็นสายอย่างกลุ่ม *Lactococci*, *Streptococci* และ *Leuconostoc* แบคทีเรียกลุ่ม *Pediococci* มีความเหมือนกับแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มอื่นคือ เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultative anaerobe) ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25 ถึง 40 องศาเซลเซียส แต่บางชนิดสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส *Pediococci* แตกต่างจากแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มอื่นคือ สามารถทนต่อสภาพที่มีกรดสูงได้ (เจริญได้ที่พีเอช 4.2) และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่มีเกลือสูง (เจริญได้ที่โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5) ดังตารางที่ 2.3 เชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pediococci* สามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมที่หลากหลาย เช่น พืชผัก นม น้ำเกลือ ปัสสาวะของสัตว์ และเบียร์ โดยพบ *Pediococcus* 5 สายพันธุ์ ดังภาพที่ 2.4 *Pediococcus* หลายชนิดมีความสำคัญในการหมักอาหาร *Pediococcus acidilactici* และ *Pediococcus pentosaceus* พบได้ตามธรรมชาติในผักสดภายใต้สภาวะที่เหมาะสมแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการหมักกะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) และผักดองชนิดอื่นและยังสามารถใช้เติมลงในเนื้อสัตว์เพื่อผลิตเป็นไส้กรอกหมัก ถึงแม้ว่าแบคทีเรียสองชนิดนี้จะไม่สามารถหมักแลคโตสได้แต่ก็พบบ่อยใน

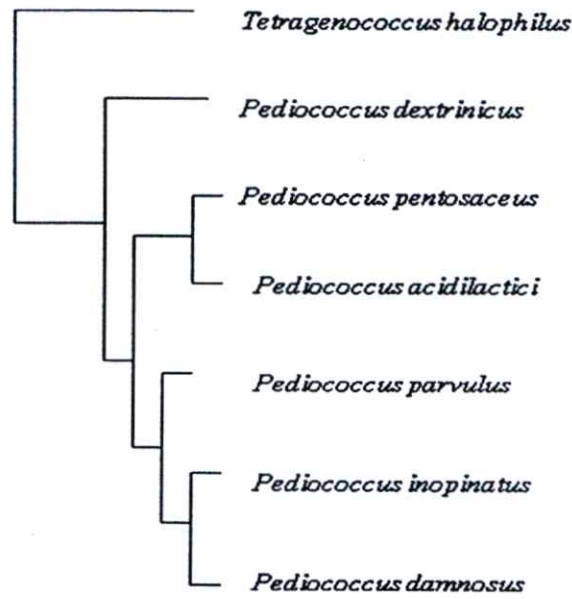
เนยแข็งโดยมีส่วนร่วมในกระบวนการบ่มเนยแข็ง *Pediococcus* ยังสำคัญต่อการเสีของอาหารหมัก โดยเฉพาะในเบียร์ ไวน์และไซเดอร์ (cider) ซึ่ง *Pediococcus damnosus* ก่อให้เกิดปัญหาในเบียร์ โดยสร้างไดอะซีทิล (diacetyl) ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการในเบียร์ (Hutkins. 2006)

พลาสมิดที่พบได้บ่อยใน *Pediococci* ยีนบนพลาสมิดเหล่านี้อาจกำกับการทำหน้าที่ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการใช้น้ำตาลแรฟฟิโนส (raffinose) และซูโครส และการผลิตแบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็น โปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่นรวมทั้งแบคทีเรียที่ก่อโรคในเนื้อสัตว์ ได้แก่ *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* และ *Clostridium botulinum* คุณสมบัติในการสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pediococci* มีความสำคัญ ดังนั้นมีการนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการผลิตไส้กรอกหมักซึ่งอาจช่วยในการถนอมอาหารได้ดีขึ้น (Hutkins. 2006)

ตารางที่ 2.3 คุณลักษณะของ *Pediococcus*

คุณลักษณะ	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Pediococcus damnosus</i>
% G + C	38 ถึง 44	37	37 ถึง 42
การเจริญที่			
35 ° C	+	+	-
40 ° C	+	+	-
50 ° C	+	-	-
อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญ (° C)	40	28 ถึง 32	28 ถึง 32
การเจริญที่			
พีเอช 4.2	+	+	+
พีเอช 7.0	+	+	-
การเจริญที่			
โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 4.0	+	+	-
โซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5	+	+	-
Arginine hydrolysis	+	+	-

ที่มา : Hutkins. 2006



ภาพที่ 2.4 phylogeny ของ *Pediococcus* ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน

16S rRNA

ที่มา : Hutkins, 2006

แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Tetragenococcus*

Tetragenococcus เป็นแบคทีเรียประเภท homofermentative มีการเรียงตัวของเซลล์แบบ เกาะกันสี่เซลล์ (tetrad-forming) และเป็นพวก facultative anaerobes เช่นเดียวกับ *Pediococci* นอกจากนี้ยังเป็นพวกเจริญที่อุณหภูมิปานกลางและที่พีเอชเป็นกลาง อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25 ถึง 30 องศาเซลเซียสและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 6.5 และ 8.0 แบคทีเรียสกุลนี้มีเพียง 3 ชนิดคือ *Tetragenococcus halophilus*, *Tetragenococcus muriaticus* และ *Tetragenococcus solitarius* เมื่อพิจารณาจาก 16s rRNA พบว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้เมื่อจัดเรียงตาม phylogenetic tree มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus* และ *Enterococcus* มากกว่าเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Pediococcus* แบคทีเรีย *Tetragenococcus* ถูกจัดจำแนกครั้งแรกเมื่อปี ค.ศ. 1990 โดยแบคทีเรียชนิด *Pediococcus halophilus* ถูกจำแนกใหม่เป็นแบคทีเรีย *Tetragenococcus halophilus* และ *Tetragenococcus* ชนิดที่สองคือ *T. muriaticus* แยกได้จากน้ำปลา ซึ่งได้ถูกเสนอขึ้นในปี ค.ศ. 1997 และในปี 2005 *Enterococcus salitarius* ถูกจำแนกใหม่เป็นแบคทีเรีย *T. solitarius* แบคทีเรีย *T. halophilus*, *T. muriaticus* และ *T. solitarius* แยกคุณลักษณะได้

จากความสามารถในการทนเกลือ ซึ่งนอกจากจะสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นของเกลือสูงถึงร้อยละ 25 แต่ยังคงการความเข้มข้น โซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วงร้อยละ 3 ถึง 10 เพื่ออัตราการเจริญสูงสุด และไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่ไม่มีเกลือ และสามารถเจริญได้ดีที่ water activity ต่ำ เนื่องจากมีความสามารถในการรักษาระดับของความดันออสโมติกภายในเซลล์ โดยการสะสมเบตาอีน (betaine) คาร์นิทีน (carnitine) และตัวถูกละลาย (compatible solute) ชนิดอื่น (Hutkins. 2006)

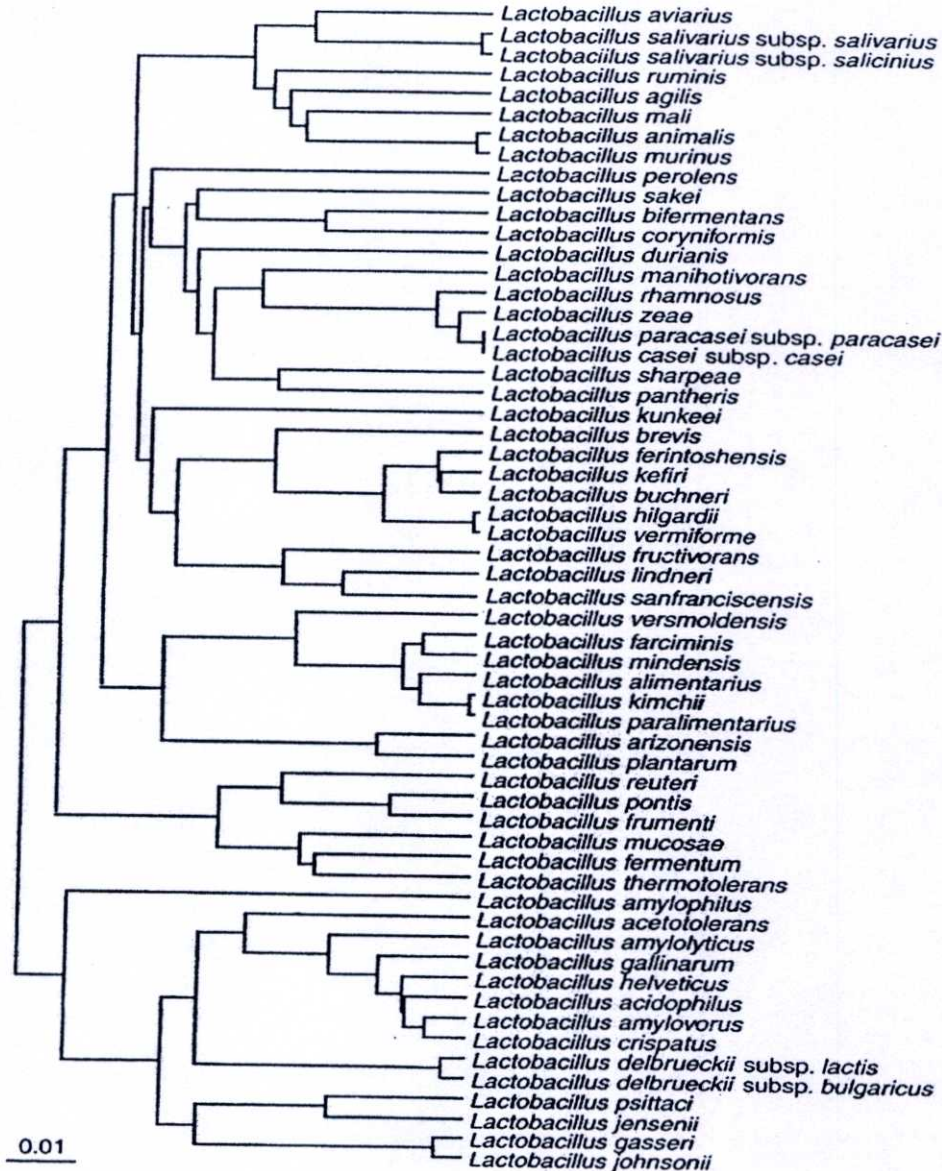
แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus*

แบคทีเรียในสกุลนี้มีมากกว่า 80 ชนิด ดังภาพที่ 2.5 ลักษณะโดยทั่วไปของแบคทีเรียในสกุลนี้ทั้งหมดเป็นแบคทีเรียรูปท่อน คือ ไม่สร้างสปอร์ (non-sporing rods) แต่ *Lactobacillus* บางชนิดมีรูปร่างท่อนค่อนข้างสั้นคือ น้อยกว่า 1.5 ไมโครเมตร ในขณะที่บางชนิดมีความยาวถึง 5 ไมโครเมตร และมีรายงานว่าบางชนิดมีความยาวได้ถึง 10 ไมโครเมตร และอาจมีลักษณะบาง โค้งและงอ ลักษณะของโคโลนีบนอาหารแข็งก็มีความหลากหลายบางสายพันธุ์โคโลนีมีลักษณะกลมใหญ่ ในขณะที่บางสายพันธุ์มีลักษณะกลมเล็กหรือมีรูปร่างไม่ปกติ แบคทีเรียสกุลนี้มีหลายชนิดและมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกันมากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลอื่น แต่แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้มีความหลากหลายมากที่สุดในทางนิเวศวิทยา ทางกายภาพและทางชีวเคมี ในธรรมชาติสามารถพบเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacilli* ได้ในสิ่งแวดล้อมที่มีความหลากหลายยกเว้นในสิ่งแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญมากๆ (extreme environment) มีเพียงสองสามสถานะเท่านั้นที่ไม่พบเชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียสามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติ *Lactobacillus* บางชนิดเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในพืช ผักและยังพบได้บ่อยในนมและเนื้อสัตว์ น้ำผลไม้ เครื่องดื่มหมัก (fermented beverage) ธัญพืชและผลิตภัณฑ์จากธัญพืช นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียชนิดนี้ในระบบทางเดินอาหารของคนและสัตว์รวมทั้งกระเพาะอาหาร ปาก ดังนั้นเป็นเหตุผลที่สนับสนุนข้อเสนอแนะที่ว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีกิจกรรมการเป็น โพรไบโอติกค่อนข้างกว้าง ซึ่งหมายความว่า *Lactobacillus* ช่วยส่งเสริมสุขภาพทั้งในลำไส้และภายนอกลำไส้สำหรับในอาหาร *Lactobacillus* เกี่ยวข้องไม่เพียงแต่ในการผลิตอาหารหมักที่สำคัญแล้วยังเกี่ยวข้องกับการนำเสียของอาหารหมักและผลิตภัณฑ์ที่ไม่ใช่อาหารหมัก (Hutkins. 2006)

ความสามารถของ *Lactobacilli* ในการเจริญและทนต่อสภาวะแวดล้อมที่หลากหลายได้สะท้อนให้เห็นถึงคุณสมบัติทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียกลุ่มนี้ แม้ว่า *Lactobacilli* ส่วนใหญ่จะชอบ

เจริญที่อุณหภูมิปานกลางแต่ก็มีบางชนิดที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic) ทนความร้อน (thermoduric) หรือชอบอุณหภูมิสูง (thermophilic) ส่วนอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อสกุลนี้ผันแปรในช่วงที่กว้างคือ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส *Lactobacillus* บางชนิดสามารถทนต่อเกลือ สภาพความดันออสโมติก (osmotic pressure) สูง และสภาพที่มี water activity ต่ำได้ดี ความสามารถในการทนต่อกรดเป็นคุณลักษณะทั่วไปของแบคทีเรีย *Lactobacilli* (ซึ่งมีหลายสายพันธุ์ที่ชอบสภาวะแวดล้อมที่เป็นกรด) และบางชนิดมีความสามารถในการทนต่อเอทานอลหรือเกลือแร่ นอกจากนี้ *Lactobacillus* ส่วนใหญ่ยังสามารถทนต่ออากาศ ในขณะที่ *Lactobacillus* ชนิดอื่นต้องการสภาพที่ไม่มีอากาศอย่างแท้จริงในการเจริญ (strictly anaerobic) *Lactobacilli* เหมือนกับแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นคือ มีคุณสมบัติในการหมักแต่มีความหลากหลายในเมแทบอลิซึมมากกว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลอื่นโดยสามารถที่จะแบ่งกลุ่มของ *Lactobacillus* ออกเป็นกลุ่มย่อยๆ ได้เป็น 3 กลุ่มโดยอาศัยวิถีการหมักน้ำตาลได้แก่ กลุ่มที่ 1 คือ obligate homofermentative กลุ่มที่ 2 คือ facultative heterofermentative และกลุ่มที่ 3 คือ obligate heterofermentative (ตารางที่ 2.4) เนื่องจากเมแทบอลิซึมมีความหลากหลาย ดังนั้น *Lactobacilli* จึงต้องการอาหารจำเพาะสำหรับการเจริญเติบโตและหลายชนิดต้องการสภาพที่มีสารอาหารสมบูรณ์ (nutrient-rich environment) *Lactobacilli* ไม่ใช่แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีนและไขมันได้ดี ดังนั้นจึงมักจะต้องการกรดอะมิโน เปปไทด์และกรดไขมันสำหรับการเจริญเติบโตที่รวดเร็ว บางสายพันธุ์ต้องการวิตามินหลายชนิด นิวคลีโอไทด์ และสารอาหารชนิดอื่นๆ รวมทั้งต้องการคาร์โบไฮเดรตที่สามารถหมักได้ (fermentable carbohydrates) ซึ่งขึ้นอยู่กับแหล่งที่อยู่อาศัยกับสภาวะแวดล้อม แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลได้หลายชนิดซึ่งไม่เพียงหมักน้ำตาลปกติที่ใช้อยู่ (เช่นกลูโคส ฟรุคโตส แลคโตส) เท่านั้นยังหมักคาร์โบไฮเดรตจากพืชได้ เช่นเซลโลไบโอส (cellobiose) อะไมดาลิน (amygdalin) และทรีฮาโรส (trehalose) และบางชนิดยังสามารถหมักสตาโรซได้ (ตารางที่ 2.4) *Lactobacillus* หลายชนิดเกี่ยวข้องกับการหมักอาหารและบางชนิดใช้เป็นหัวเชื้อเริ่มต้นในการผลิต *Lactobacillus* หลายชนิดมีอยู่แล้วในวัตถุดิบหรือบนผิวของอุปกรณ์ ซึ่งมีผลกระทบต่อการผลิตหรือคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์อาหารหมักทางอ้อม เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacilli* มีความหลากหลายทางพันธุกรรมถึงแม้ว่า *Lactobacillus* โดยทั่วไปจะมีปริมาณร้อยละของ G + C ต่ำคือประมาณร้อยละ 35 ถึง 40 บางชนิดอาจต่ำถึงร้อยละ 32 และแต่ก็มีบางชนิดมีปริมาณร้อยละของ G + C สูงถึงร้อยละ 55 ดังนั้นจึงสามารถจัด *Lactobacilli* ใน phylogenetic ได้เป็นสองแขนง เช่น *Lb. plantarum* และ *Lb. brevis* เป็นส่วนหนึ่งของแขนง *Lactobacillus - Pediococcus* ขณะที่

Lb. delbrueckii, *Lb. helveticus* และ *Lb. acidophilus* อยู่ในสายที่ต่างกันคือ *Lb. delbrueckii* (ดังภาพที่ 2.1 และ 2.5) พลาสมิดในแบคทีเรียกลุ่มนี้พบได้บ่อยแต่หน้าที่ของยีนที่กำกับอยู่ยังไม่มีการศึกษาถึงคุณสมบัติมากนักแต่พบว่ายีนในพลาสมิดหนึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการใช้น้ำตาลแลคโตส (lactose metabolism) และยังเกี่ยวข้องกับการสร้างแบคทีเรียโอซินและระบบการต้านทานสารปฏิชีวนะ (Hutkins. 2006)



ภาพที่ 2.5 phylogeny ของ *Lactobacillus* ตามการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

ที่มา : Hutkins. 2006

ตารางที่ 2.4 คุณลักษณะการหมักของ *Lactobacillus*¹

Representative strains	การเจริญที่ 15 °C		การหมัก						Arginine Hydrolysis
	% G + C	Cel ²	Fru	Gal	Lac	Mal	Starch	Suc	
กลุ่ม 1									
Obligate homofermentative									
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	34-37	+	+	+	+	+	nd ³	+	-
<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	49-51	± ⁴	+	-	+	±	nd	±	±
<i>Lactobacillus helveticus</i>	38-40	+	±	+	+	±	nd	-	-
<i>Lactobacillus amylophilus</i>	44-46	-	+	+	-	+	+	-	nd
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	40-41	+	+	+	-	+	+	+	nd
<i>Lactobacillus crispatus</i>	35-38	+	+	+	+	+	nd	+	-
<i>Lactobacillus gasserii</i>	33-35	+	+	+	±	±	nd	+	-
<i>Lactobacillus jensenii</i>	35-37	+	+	+	+	±	nd	+	+
กลุ่ม 2									
Facultative heterofermentative									
<i>Lactobacillus paracasei</i>	46	+	+	+	±	+	nd	+	-
<i>Lactobacillus curvatus</i>	43	+	+	+	±	+	nd	-	-
<i>Lactobacillus plantarum</i>	45	+	+	+	+	+	nd	+	-
<i>Lactobacillus sakei</i>	43	+	+	+	+	+	nd	+	-
<i>Lactobacillus bavaricus</i>	43	+	+	+	+	+	nd	+	-
<i>Lactobacillus homohiochii</i>	36	±	+	-	-	+	nd	-	-
<i>Lactobacillus coryniformis</i>	36	-	+	+	±	+	nd	-	-
<i>Lactobacillus alimentarius</i>	36	+	+	+	-	+	nd	+	-
กลุ่ม 3									
Obligate heterofermentative									
<i>Lactobacillus fermentum</i>	53	±	+	+	+	+	nd	+	+
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	37	-	-	+	-	-	nd	-	-
<i>Lactobacillus reuteri</i>	41	-	+	+	+	+	nd	+	+
<i>Lactobacillus buncheri</i>	45	-	+	+	±	+	nd	±	+
<i>Lactobacillus brevis</i>	45	-	+	±	±	+	nd	±	+
<i>Lactobacillus kimchii</i>	35	+	+	W ⁵	+	+	-	+	-
<i>Lactobacillus kefirii</i>	41	-	+	+	-	+	nd	-	+
<i>Lactobacillus divergens</i>	34	+	+	+	-	+	nd	+	+

¹ Adapted from Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 2 (1986), ²Cel = cellulose; Fru = fructose; Gal = galactose; Lac = lactose; Mal = maltose; Suc = sucrose; ³Not determined, ⁴Variable reaction, depending on strain or subspecies, ⁵Weak positive reaction

ที่มา : Hutkins. 2006

แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Enterococcus*

ลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ของสกุล *Enterococcus* Schleifer และ Klipper-Balz ได้อธิบายเกี่ยวกับลักษณะของสกุลนี้ในปี 1984 และ 1987 วั้ดังต่อไปนี้ เซลล์เป็นรูปไข่ (ovoid) แกรมบวก อยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ หรือเป็นสายสั้นๆ ภายในสายเดียวกัน เซลล์มักจะจัดเรียงตัวอยู่เป็นคู่ๆ และขนาดตามแนวยาวของสาย ไม่สร้างสปอร์ (endospore are absent) อาจจะเคลื่อนที่ได้ (maybe motile) เป็นพวกที่เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultatively anaerobic) เป็นแบคทีเรียประเภท chemoorganotroph ในเมแทบอลิซึมเป็นปฏิกิริยาการหมัก ซึ่งแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococci* มีกระบวนการหมักแบบ homofermentative และในกระบวนการหมักกลูโคสจะได้ผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดแลคติกชนิด L(+) (L (+) - lactic acid) เป็นส่วนใหญ่ สามารถสร้างกรดไขมันสายยาวได้โดยเฉพาะประเภทอิ่มตัวสายตรง (straight - chain saturated) หรือประเภทไม่อิ่มตัวซึ่งมีพันธะคู่ 1 พันธะ (monounsaturated) *Enterococcus* หลายชนิดสามารถสร้างกรดไซโคลโพรเพนริง (cyclopropane ring acids) ชนิดของเปปติโดไกลแคน (peptidoglycan) คือไลซีน-ดี-แอสพาราจีน (lysine-D-asparagine) ซึ่งมีดี-ไอโซแอสพาราจีน (D-isoasparagine) เป็น cross bridge ยกเว้นใน *Ent. faecalis* ซึ่งมีเปปติโดไกลแคนเป็นชนิด lysine-alanine_{2,3} สารอาหารอย่างน้อยที่ต้องการสำหรับการเจริญเติบโตนั้นค่อนข้างซับซ้อน ไม่สร้างเบนซิดีน (benzidine) และคะตะเลส (catalase) แต่พบว่ามีบางสายพันธุ์สามารถสร้างซูโดคะตะเลส (pseudo-catalase) (Devriese และ Pot. 1995)

ลักษณะของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีข้อยกเว้นบางประการแต่ก็ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 2.5 นอกจากนี้มีคุณลักษณะอื่นของแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* ที่ได้อธิบายโดย Schleifer และ Klipper-Balz (1984) ซึ่งยังไม่สามารถนำไปใช้ได้กับ *Enterococcus* ชนิดใหม่ทั้งหมดซึ่งมีคุณลักษณะดังต่อไปนี้คือ 1) มี Lanfield group D antigen ซึ่งพบในหลายๆสายพันธุ์ของ avium species group ได้แก่ *Ent. cecorum*, *Ent. columbae*, *Ent. dispar* และ *Ent. saccharolyticus* 2) การเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส : บางชนิดไม่เจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เช่น *Ent. dispar* และ *Ent. sulfureus* ขณะที่บางชนิดไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส เช่น *Ent. cecorum* และ *Ent. columbae* 3) การเจริญในสภาพที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ : บางชนิดไม่สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 ได้แก่ *Ent. cecorum*, *Ent. columbae* และ *Ent. avium* และ 4) Pyrrolidonylarylamidase : ไม่พบการสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ใน *Ent. saccharolyticus*, *Ent. cecorum* และ *Ent. columbae*

ก) การจัดจำแนกของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus*

การจัดจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* ยังไม่มีเกณฑ์ทางฟิโนไทป์ที่ใช้แยกเชื้อชนิดนี้ออกจากเชื้อชนิดอื่น ได้อย่างชัดเจนชนิดที่รู้จักกันดีคือ *Ent. faecalis* และ *Ent. faecium* ที่มีลักษณะแตกต่างจากเชื้อแบคทีเรียชนิดอื่น โดยคุณสมบัติต่อไปนี้คือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่สร้างเอนไซม์อะซิติลเอส มีรูปร่างกลม เจริญได้ทั้งสภาพที่มีและไม่มีอากาศ (facultatively anaerobic cocci) สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในอาหารเหลวที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 และที่พีเอช 9.6 จากผลการทดสอบในตารางที่ 2.5 เป็นเพียงผลการศึกษา *Enterococci* ที่เป็นตัวแทนของ *Enterococci* เท่านั้นซึ่งผลที่ได้อาจไม่จำเพาะต่อ *Enterococci* ทั้งหมด (Devriese และ Pot. 1995)

การทดสอบ VP (Voges Proskauer, acetoin production) และกรดที่ได้จากน้ำตาลไรโบสของ *Enterococcus* เกือบทุกชนิดให้ผลบวกอย่างชัดเจนขณะที่ *Streptococci* เพียงบางชนิด (*Streptococcus agalactiae*, *Strep. uberis* และ *Strep. porcinus*) ก็ให้ผลบวกในการทดสอบทั้งสองประเภท เช่นเดียวกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Pediococcus* อาจให้ผลการทดสอบ VP และการทดสอบน้ำตาลไรโบสเป็นบวก การทดสอบทั้งสองชนิดนี้อาจมีประโยชน์ในการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* อย่างน้อย 1 ชนิดคือ *Enterococcus saccharolyticus* ที่ให้ผลการทดสอบ VP เป็นลบและ *Ent. flavescens* ให้ผลลบในการทดสอบน้ำตาลไรโบส (ตารางที่ 2.5) *Ent. saccharolyticus* มักคัดแยกได้จากฟางข้าวในคอกปศุสัตว์ *Ent. flavescens* เป็นแบคทีเรียที่สร้างเมดิที่ให้สีเหลืองและเคลื่อนที่ได้ซึ่งมีรายงานน้อยมากในการทำให้เกิดการติดเชื้อในคน แต่ฐานะของเชื้อชนิดนี้ในอนุกรมวิธานยังไม่แน่นอนอย่างไรก็ตามมีผู้รายงานว่า การให้ผลบวกในการทดสอบ VP พบว่ามีอัตราที่ต่ำใน *Enterococcus* หลายชนิดสาเหตุอาจจะเป็นเพราะวิธีการทดสอบที่ใช้มีความไวต่ำ (Devriese และ Pot. 1995)

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแอสคูลิน (aesculin hydrolysis) ร่วมกับการทดสอบความต้านทานต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นร้อยละ 40 เป็นการทดสอบที่มีประโยชน์ที่สุดที่ Meyer และ Schonfeld ได้อธิบายไว้ในปี ค.ศ. 1926 และได้ถูกปรับปรุงแก้ไขโดย Facklam และ Moody ในปี ค.ศ. 1970 ซึ่งยังคงมีประโยชน์สำหรับจำแนกชนิดของ *Enterococcus* ชนิดใหม่ๆ ทั้งหมดแต่แบคทีเรีย *Streptococci* บางชนิดก็ให้ผลบวกในการทดสอบนี้ ในการทดสอบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติชอบกำซาร์บอนไดออกไซด์ (carboxyphylic) ได้แก่ *Ent. cecorum* และ *Ent. columbae*

จะต้องนำไปบ่มที่สภาวะอากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาณมาก นอกจากนี้สามารถใช้สาร selective agent บางชนิด เช่น kanamycin ร่วมกับแอสคูลินเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อคัดเลือกแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* ได้แก่ Kanamycin Aesculine Azide Agar ซึ่งแสดงผลการยับยั้งการย่อยสลายแอสคูลินของแบคทีเรียในกลุ่ม *Ent. avium* และ *Ent. cecorum* (Devriese และ Pot. 1995)

การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตบางชนิดนอกเหนือจากน้ำตาลไรโบส (carbohydrate acidification test) ก็มีประโยชน์ไกลโคเจนมักจะให้ผลเป็นลบกับแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* และ *Gemella* และให้ผลเป็นบวกในการทดสอบ Streptococci หลายชนิด นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรีย *Enterococcus* หลายชนิดสามารถใช้น้ำตาลแอล-อะราบินโนส (L-arabinose) ได้ ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย Streptococci ไม่สามารถใช้น้ำตาลในกลุ่มนี้ได้ยกเว้น *Strep. bovis* บางสายพันธุ์ (Devriese และ Pot. 1995)

การทดสอบเบต้า-กลูโคซิเดส (β -glucosidase) และ leucinearylamidase เป็นการทดสอบที่มีประโยชน์ *Enterococcus* ทุกชนิดให้ผลบวกกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ *Gemella*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* ให้ผลเป็นลบเมื่อทดสอบการสร้างเบต้า-กลูโคซิเดส ส่วนเชื้อ *Aerococcus*, *Leuconostoc* และ *Helcococcus* ไม่สร้างเอนไซม์ leucinearylamidase สำหรับในทางปฏิบัติคุณลักษณะที่สามารถใช้จำแนกได้อย่างคร่าวๆว่าเป็น Enterococci ได้แก่ catalase negative แบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 (w/v) และเจริญได้ดีในอาหารที่มีส่วนผสมของโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) ร้อยละ 0.04 มักใช้เพื่อคัดแยกแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* ในกรณีที่สงสัยอาจเพิ่มการทดสอบ VP และการทดสอบการหมักน้ำตาลไรโบส ซึ่งการทดสอบทั้งสองการทดสอบนี้สามารถใช้แทนการทดสอบการเจริญในสภาพที่โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 ได้ ซึ่งมีข้อควรระวังคือ *Strep. bovis* (*Strep. equinus*) มีลักษณะโคโลนีที่ปรากฏบนอาหาร selective media คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* แต่ *Strep. bovis* ไม่สามารถใช้น้ำตาลไรโบสได้ (ribose negative) และไม่สามารถเจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 ได้ แต่การทดสอบ VP ไม่สามารถนำมาใช้แยก *Strep. Bovis* ออกจาก *Enterococcus* ได้เนื่องจาก *Strep. bovis* ทั้งหมดให้ผลบวกในการทดสอบ VP วิธีการที่กล่าวนี้ไม่ได้รวมถึงการจำแนกชนิดของ *Enterococcus* ในหลายชนิด แต่ถ้าต้องการค้นหา *Enterococcus* เฉพาะบางชนิดวิธีการที่กล่าวมานี้ก็สามารถใช้ได้อย่างถูกต้องและมีประโยชน์ เช่นเมื่อต้องทำงานเกี่ยวข้องกับตัวอย่างจากมนุษย์หรือเกี่ยวข้องกับวิธีการที่มีการ

ควบคุมการปนเปื้อนจากสิ่งขับถ่ายสำหรับการตรวจติดตามด้านสุขลักษณะของน้ำดื่ม (Devriese และ Pot. 1995)

ตารางที่ 2.5 คุณลักษณะโดยทั่วไปหรือคุณลักษณะที่ยกเว้นบางประการของแบคทีเรียในกลุ่ม

Enterococci

คุณลักษณะ	ผลการทดสอบ
Resistant to 40% (v/v) bile	+
β -Glucosidase	+
Urease	-
VP	+*
Leucine arylamidase	+
β -Glucuronidase	-†
Aesculin hydrolysis	+
Acid from	
N-Acetyl glucosamine	+
Amygdalin	+
D-Arabinose	-
Arbutin	+
Cellobiose	+
Erythritol	-
D-Fructose	+
Galactose	+
β -Gentiobiose	+
Glucose	+
Glycogen	-‡
Inositol	-§
D-Fucose	-
L-Fucose	-
Lactose	+¶
Maltose	+
D-Mannose	+
Methyl- β -D-glucopyranoside	+
α -Methyl-D-xyloside	-
Pullulan	-
Ribose	+**
Salicin	+
Trehalose	+¶
L-Xylose	-

* ให้ผลลบเฉพาะ *Ent. saccharolyticus*

† ให้ผลบวกเฉพาะในสายพันธุ์ของ *Ent. cecorum* เป็นส่วนใหญ่

‡ ให้ผลบวกเฉพาะใน *Ent. gallinarum*, *Ent. cecorum* และ *Ent. columbae* บางสายพันธุ์

§ ให้ผลบวกซ้ำใน *Ent. raffinosus*

¶ สายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* (asaccharolytic variant) ที่คิดเชื่อในมนุษย์อาจไม่สามารถหมักแลคโตสหรือที่ฮาโลสได้

|| ไม่มีรายงานใน *Enterococcus* ชนิดใหม่

** ให้ผลลบเฉพาะ *Ent. flavescens*

ที่มา : Devriese และ Pot. 1995

ข) แบคทีเรียชนิด *Enterococcus faecalis*

Ent. faecalis ก่อนหน้านี้ได้ถูกจัดเป็น *Streptococcus faecalis* Type strain : Strain Tissier (LMG 7937; NCTC 775; ATCC 19433; NCFB 581; DSM 20478; FIRDI 66; CCUG 19916; CECT 481; NCIMB 775; RIMD 3116001)

ข.1) คุณลักษณะทางพันธุกรรม

ความแตกต่างของขนาด โครโมโซมในเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ มีความแตกต่างกันมาก OGIX เป็นสายพันธุ์ที่มีการนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านพันธุกรรมกันอย่างแพร่หลายมีขนาด 2.75 ถึง 2.76 Mb ขณะที่อีกสองสายพันธุ์มีขนาด 2.0 ถึง 2.28 Mb ปริมาณของ G+C ในสายดีเอ็นเอ มีประมาณ 37 ถึง 40 mol% การศึกษาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ได้แสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียชนิดนี้มีลำดับของยีนที่มีความแตกต่างกับ *Enterococcus* ชนิดอื่น (ภาพที่ 2.6) โครโมโซมของ *Ent. faecalis* ได้รับความสนใจน้อยยกเว้นการวิเคราะห์ เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สำหรับจุดประสงค์ด้านการศึกษาการระบาด แต่ transporons และพลาสมิดของ *Ent. faecalis* เป็นที่สนใจศึกษากันมากเมื่อเร็ว ๆ นี้ เนื่องจาก *Ent. faecalis* มีระบบพันธุกรรม 2 ระบบคือ sex pheromone plasmids และ conjugative transporons (Devriese และ Pot. 1995)

ระบบ conjugative transporons สามารถที่จะส่งผ่านระหว่างเซลล์ของ *Enterococcus* ชนิดเดียวกันหรือต่างชนิดกันได้ ในลักษณะที่เหมือนกับการ conjugation ซึ่งต้านทาน DNase สำหรับ transporons นั้นเชื่อว่ามียับยั้งหน้าที่สำคัญในการแพร่กระจายยีนที่สัมพันธ์กับความสามารถในการต้านทานยาปฏิชีวนะของเชื้อแบคทีเรียในกลุ่ม Enterococci และกลุ่มของแบคทีเรียที่ใกล้เคียงกัน (Devriese และ Pot. 1995)

ระบบ sex pheromone plasmids ดูเหมือนว่าจะพบใน *Ent. faecalis* ชนิดเดียวเท่านั้น ซึ่งทำหน้าที่ดังต่อไปนี้ เซลล์ที่ทำหน้าที่เป็นตัวให้พลาสมิด (donor cell) จะถูกกระตุ้นโดยสารหลังฟีโรโมนโดยเซลล์ของตัวรับที่ปราศจากพลาสมิด (recipient cell) เพื่อให้มีการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการยึดเกาะหรือ aggregation substance ผลที่ได้ทำให้เกิดการยึดเกาะของเซลล์ทั้งสองชนิดดังนั้นการส่งผ่าน sex pheromone plasmids ระหว่างสองเซลล์มีความเป็นไปได้มากขึ้นระบบนี้สามารถควบคุมได้และใช้ประโยชน์ได้หลายอย่าง (Devriese และ Pot. 1995)

ข.2) องค์ประกอบทางเคมี

โครงสร้างของเปปติโดไกลแคนแตกต่างจาก Enterococci ชนิดอื่นๆคือเป็นชนิด Lys-Ala_{2,3} ซึ่ง glycerol teichoic acid group D antigen ถูกศึกษาคุณลักษณะโดยสังเกตุได้จากกรณีที่

เป็นตัวที่ใช้สำหรับจำแนกลักษณะเฉพาะ glucose disaccharide kojibiose ถูกเอสเทอร์ไฟด์ที่ตำแหน่งที่ 2 ของกลีเซอรอลและมีส่วนของ D-alanine ที่เชื่อมกับโมเลกุลของกลูโคสส่วนกรดไขมันชนิดหลักๆ ได้แก่ hexadecanoic, octadecenoic และ cis-11, 12-methylenoctadecanoic และสายพันธุ์ส่วนใหญ่มี demethylmenaquinones นี้มีหน่วยของ isoprene 9 หน่วย (Devriese และ Pot. 1995)

ข.3) คุณลักษณะทางชีวเคมี

Enterococcus สามารถใช้ไพรูเวท (pyruvate) ซีรีน (serine) ซิเตรท (citrate) กลูโคนेट (gluconate) มาเลต (malate) และอาร์จินีน (arginine) เป็นแหล่งพลังงาน ผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการหมักน้ำตาลกลูโคสที่ระดับพีเอชสูงกว่าเป็นกลาง ได้แก่ เอทานอล กรดฟอร์มิก และกรดแอสติค ถ้าพีเอชลดต่ำกว่า 5 จะสร้างกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่

การเลี้ยงเชื้อในสภาพที่ให้อากาศในปริมาณมากจะทำให้ได้ปริมาณเซลล์มากกว่าการเลี้ยงเชื้อในสภาวะไร้อากาศในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นองค์ประกอบ และมีผู้รายงานว่า *Ent. faecalis* มีกิจกรรมของเอนไซม์ NADH oxidase, NADH peroxidase, superoxide dismutase และ pyruvate oxidase นอกจากนี้ *Ent. faecalis* เป็นแบคทีเรียที่ค่อนข้างเด่นคือสามารถใช้อากาศในกระบวนการหายใจ (aerobic respiration) ได้เมื่อเติมฮีมีน (haemin) ลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อการมีสารชนิดนี้ในอาหารเลี้ยงเชื้อจะชักนำให้เกิดการสร้างไซโตโครม (cytochrome) และกระตุ้นให้เกิดกระบวนการ oxidative dissimilation คุณลักษณะของ *Ent. faecalis* ซึ่งเหมือนกับคุณลักษณะของ Enterococci ชนิดอื่นดังแสดงในตารางที่ 2.5 ส่วนผลการทดสอบอื่นๆ ซึ่งแตกต่างกับ *Enterococcus* ชนิดอื่นเช่น *Ent. avium*, *Ent. cecorum*, *Ent. faecium* และ *Ent. gallinarum* แสดงไว้ในตารางที่ 2.6 (Devriese และ Pot. 1995)

ข.4) คุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ

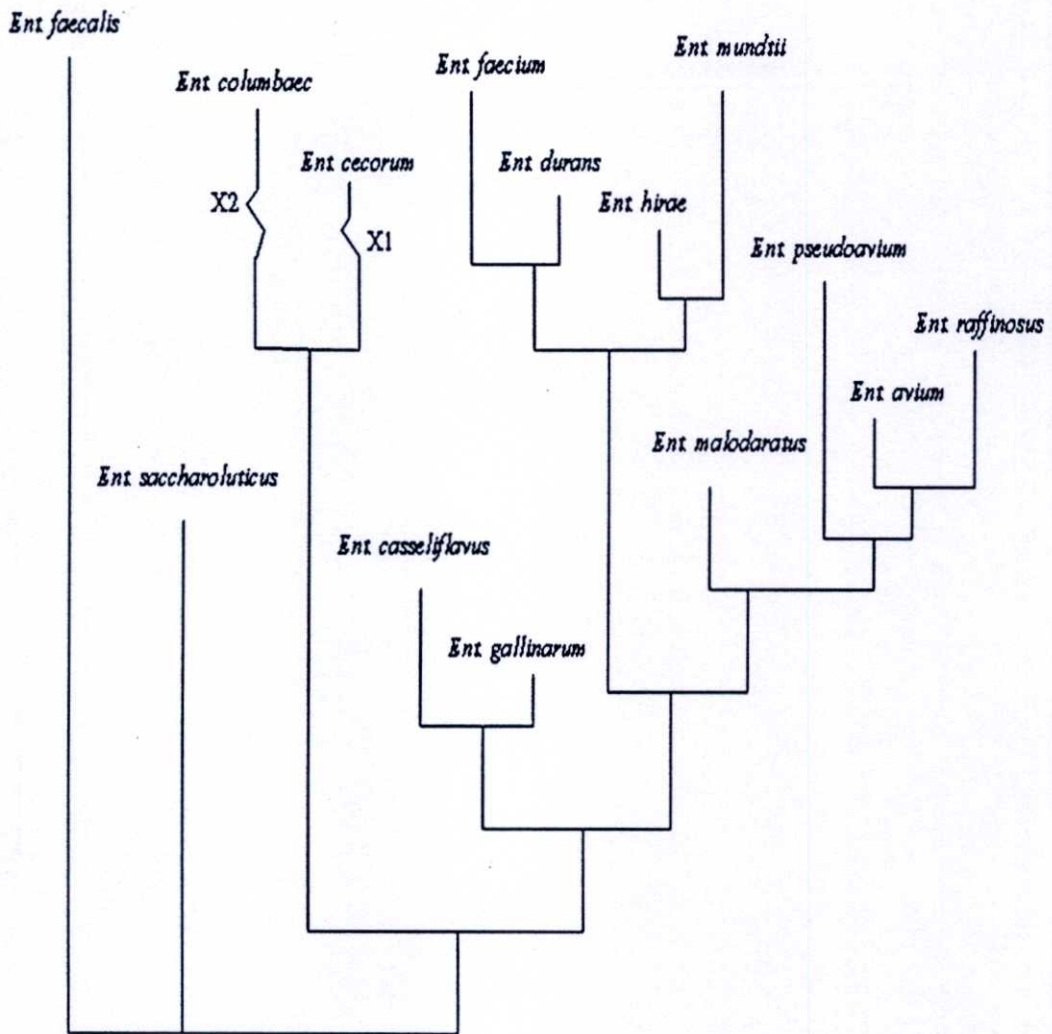
เซลล์ส่วนใหญ่เป็นรูปไข่หรืออาจอยู่เดี่ยวๆ เป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ลักษณะโคโลนีกลมและผิวเรียบโดยตลอด เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลวจะทำให้อาหารขุ่นและมีตะกอน ไม่เคลื่อนที่ แต่พบลักษณะการเคลื่อนที่ได้ในบางสายพันธุ์ดังที่ได้อธิบายไว้ บางสายพันธุ์ที่มีพลาสมิดที่กำกับด้วยไซโตไลซิน (cytolysin-coding plasmid) จะทำให้มีเซลล์แตกแดง (β-haemolytic) ในเลือดของม้า แต่จะไม่แสดงผลในเลือดของแกะ

ข.5) การจำแนกชนิด

การวินิจฉัยอย่างคร่าวๆ ที่ค่อนข้างเชื่อถือได้สามารถจำแนกโคโลนิของแบคทีเรีย *Ent. faecalis* เบื้องต้นโดยอาศัยอาหารคัดเลือกที่มีสาร tetrazolium (TTC) เป็นองค์ประกอบซึ่งโคโลนิของ *Ent. faecalis* จะปรากฏสีแดงบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้แก่ Slanetz and Bartley Agar หรือทดสอบความต้านทานและการสลายของโพแทสเซียมเทลลูไรด์ (potassium tellurite) ความเข้มข้นร้อยละ 0.004 ความสามารถสูงในการรีดิวซ์ tetrazolium พบน้อยมาก การที่แบคทีเรียสกุล *Enterococcus* สามารถรีดิวซ์ Tellurite เชื้อถือได้น้อยกว่าความสามารถรีดิวซ์ TTC นอกจากนี้การตรวจสอบน้ำตาลซอร์บิทอล (sorbitol) และแอล-อะราบินโนส (L-arabinose) มีประโยชน์ในการจำแนก *Ent. faecium* ส่วนการทดสอบชนิดอื่นๆ แสดงในตารางที่ 2.6 (Devriese และ Pot. 1995)

ข.6) แหล่งที่พบและแหล่งที่อยู่

Ent. faecalis พบมากในทางเดินอาหารของคน แม้ว่า *Ent. faecium* อาจจะพบได้มากกว่า *Ent. faecalis* ในคนบางคนโดยเฉพาะในบางประเทศ ในสัตว์การพบ *Ent. faecalis* ขึ้นอยู่กับอายุของสัตว์มักพบ Enterococci ในทางเดินอาหารของลูกวัวเท่ากับที่พบ *Ent. faecium* ในลูกไก่อายุ 1 วัน แต่จะพบน้อยกว่าร้อยละ 10 ของจำนวนสัตว์ที่มีอายุแก่กว่าเพียง 2 ถึง 3 สัปดาห์ นอกจากนี้ยังสามารถคัดแยกได้จากลำไส้และต่อมทอมซิลประมาณร้อยละ 50 ของจำนวนสุนัขและแมวที่นำมาตรวจสอบประมาณร้อยละ 50 มักพบ *Ent. faecalis* ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสัตว์เลื้อยคลานน้อยกว่า *Ent. faecium* ได้มีรายงานว่าพบ *Ent. faecalis* มากในเนื้อหมูและเนื้อวัวที่ตัดแต่งแล้วแต่ *Ent. faecalis* จากอาหารประเภทพืชผักอาจจำแนกชนิดได้ยาก ได้มีผู้ที่พยายามจะแยกความแตกต่างระหว่าง *Ent. faecalis* ที่ได้จากคนและพืชแต่การจำแนก *Enterococcus* จากพืชยังคงไม่แน่นอน นอกจากนี้ยังพบ *Ent. faecalis* ได้บ่อยในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิดแต่การพบเชื้อนี้ในผลิตภัณฑ์ต่างกันมีความผันแปรในหลายๆประเทศ (Devriese และ Pot. 1995)



ภาพที่ 2.6 Distance matrix tree ของ *Enterococcus* ได้จากการวัด homology ของลำดับยีน 16S rRNA

ก) แบคทีเรียชนิด *Enterococcus faecium*

คุณลักษณะซึ่งเหมือนกันใน *Enterococcus* ทุกชนิดในกลุ่มของ *Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Ent. hirae* และ *Ent. mundtii* แสดงในตารางที่ 2.6 การทดสอบที่ใช้จำแนกความแตกต่างของแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกจากแบคทีเรียชนิดอื่นแสดงไว้ในตารางที่ 2.7 และลักษณะเฉพาะที่ใช้แยกความแตกต่างของแต่ละชนิดในกลุ่ม *Ent. faecium* แสดงไว้ในตารางที่ 2.8 *Ent. faecium* นี้เดิมเป็นที่รู้จักในชื่อของ *Streptococcus faecium* โดยมี Type strain ดังนี้ : LMG 8149; NCTC 7171; ATCC 19434; NCFB 942; DSM 20477; CCUG 542

ค.1) ลักษณะทางพันธุกรรม

ปริมาณ G+C ในสายดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 37 ถึง 40 mol% ในสายพันธุ์ที่ปราศจากพลาสมิดมีขนาดของโครโมโซมประมาณ 2170 ถึง 2155 kb ได้มีผู้รายงานการกระจายของลำดับเบสในดีเอ็นเอของพลาสมิดใน *Ent. faecium* ที่พบในสิ่งขับถ่ายของคน การวิเคราะห์เอนไซม์ตัดจำเพาะ (restriction enzyme) สามารถนำมาใช้ศึกษาลักษณะของ DNA ในโครโมโซมของสายพันธุ์นั้นๆ เพื่อตรวจหาความสัมพันธ์กับการศึกษาด้านการระบาด (epidemiological studies)

ค.2) องค์ประกอบทางเคมี

เปปติโดไกลแคนเป็นแบบ Lys-D-Asp ส่วน Group D antigen ประกอบด้วยโคจิไตโอส (kojitriose) ซึ่งเอสเทอร์ไฟด์กลีเซอรอลที่ตำแหน่งที่ 2 ตรงส่วน teichoic acid backbone พบ D-Alanine และ L-lysine เชื่อมต่อกับหมู่ไฮดรอกซิล (hydroxyl group) ของน้ำตาลกลูโคสในสายโพลีเมอร์นี้ นอกจากนี้ไม่พบทั้ง menaquinones และ ubiquinonones ซึ่งทำหน้าที่ในฐานะของตัวพาอิเล็กตรอนที่ไม่มีไซโตโครม (non-cytochrome electron carriers) ใน Enterococci บางชนิด ในแบคทีเรีย *Ent. faecium* กรดไขมันส่วนใหญ่คือกรด hexadecanoic, octadecenoic และ cis-11,12-methylenoctadecanoic (Devriese และ Pot. 1995)

ค.3) การจำแนกลักษณะโดยอาศัยวิธีทางชีวเคมี

Ent. faecium มีความแตกต่างจาก *Ent. faecalis* เรื่องความต้องการสารอาหารในการเจริญเติบโตและเมแทบอลิซึม *Ent. faecium* ต้องการกรดโฟลิก (folic acid) ในการเจริญและไม่สามารถใช้ไพรวาท ซิเตรท มาเลต กลูโคเนตและซีรีนเป็นแหล่งพลังงานได้ นอกจากนี้ *Ent. faecium* มีการสร้างเอนไซม์ superoxide dismutase, NADH oxidase และ L-lactate oxidase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ NADH peroxidase และ pyruvate oxidase ในแบคทีเรีย *Ent. faecium* ยังได้มีลักษณะทั่วไปอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 2.5 รวมทั้งลักษณะของ *Ent. faecium* species group ในตารางที่ 2.6 และ 2.7 และมีรายละเอียดเกี่ยวกับแบคทีเรียชนิดต่างๆ ในกลุ่มนี้ดังตารางที่ 2.8 *Ent. faecium* ที่แยกได้จากสัตว์ปีกสามารถหมักราฟฟิโนส (raffinose) ได้และสายพันธุ์ที่เกี่ยวกับโค กระบือ (bovine) และสุนัข (canine) สามารถสร้างกรดจากน้ำตาลดี-ไซโลส (D-xylose) ในขณะที่สายพันธุ์ที่ได้จากแหล่งอื่นไม่สามารถใช้น้ำตาลดี-ไซโลสและสายพันธุ์ส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องกับสุนัขสามารถใช้น้ำตาล sorbitol ได้ (Devriese และ Pot. 1995)

ค.4) ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและลักษณะการเจริญ

เซลล์เป็นรูปไข่และเรียงตัวเป็นคู่หรือสายสั้นๆ เพิ่มขนาดของเซลล์ไปตามทิศทางเดียวกับสายโซ่ ลักษณะโคโลนีเป็นรูปกลมเรียบ โดยตลอด ไม่มีการสร้างเมือกและมีคุณสมบัติทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (haemolytic) เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว มีความชุ่มอย่างสม่ำเสมอและไม่เคลื่อนที่ แต่มีผู้กล่าวว่าบางสายพันธุ์สามารถเคลื่อนที่ได้ เช่น *Ent. gallinarum*

ค.5) การจำแนกชนิด

Ent. faecium จะสร้างโคโลนีสารสีชมพูซีดเมื่อเลี้ยงอาหารเลี้ยงเชื้อที่มี tetrazolium และยังพบลักษณะสีของโคโลนีเช่นเดียวกันนี้ใน *Enterococcus* ชนิดอื่นๆที่เกี่ยวข้องได้แก่ *Ent. durans*, *Ent. hirae* และ *Ent. mundtii* นอกจากนี้ *Streptococcus bovis* ยังสร้างโคโลนีลักษณะเดียวกันและง่ายที่จะแยกความแตกต่างของ *Ent. faecium* ออกจาก *Ent. faecalis* ซึ่ง *Ent. faecalis* จะสร้างโคโลนีสีแดงเนื่องจากสามารถรีดิวซ์ triphenyl tetrazolium choride นอกจากนี้ยังสามารถตรวจสอบยืนยันตัวอย่างจากคนได้จากการใช้วิธีทางชีวเคมีเนื่องจาก *Ent. faecium* สามารถใช้อะราบีโนสแต่ไม่สามารถใช้ซอร์บิทอลได้แต่บางครั้ง *Ent. faecalis* ไม่สามารถใช้ซอร์บิทอลได้ซึ่งไม่ค่อยจะพบในสายพันธุ์ที่ได้จากคนและ *Ent. faecium* ส่วนใหญ่ที่ได้จากสุนัขบางครั้งก็อาจใช้ซอร์บิทอลได้และอาจมีความยากที่จะแยกความแตกต่างของสายพันธุ์ที่ใช้ราฟิโนสได้ซึ่งมาจากสัตว์ปีกก็คือ *Ent. gallinarum* คุณลักษณะอื่นๆ ที่มีประโยชน์สำหรับการจำแนกชนิดแสดงไว้ในตารางที่ 2.6 และ 2.8

ค.6) แหล่งที่พบ

ในคนจะพบทั้งเชื้อ *Ent. faecium* และ *Ent. faecalis* ซึ่งเป็นเชื้อหลักที่พบในระบบทางเดินอาหารแต่ก็อาจพบจากสิ่งแวดล้อมอื่นๆได้ อาหารที่ทานเข้าไปจึงมีผลต่อเชื้อที่อยู่ในทางเดินอาหารด้วย ในสัตว์ประเภทโค กระบือและสัตว์ปีกพบว่า *Ent. faecium* ลดลงเมื่อสัตว์มีอายุมากขึ้นและพบบ่อยในสุกร สุนัขและแมว รวมทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆและสัตว์เลี้ยงคละน *Ent. faecium* เคยถูกแยกจากพืช อาหารแห้งแข็งหรืออาหารแห้งแต่หลายสายพันธุ์มีลักษณะที่ปกติไม่ค่อยพบ ซึ่งต้องทำการจำแนกอย่างละเอียด นอกจากนี้ *Ent. faecium* ยังพบในอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปน้ำนมดิบ และผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด (Devriese และ Pot. 1995)

ค.7) การนำไปประยุกต์ใช้

Ent. faecium มีคุณสมบัติเป็น probiotic เมื่อนำไปเลี้ยงสัตว์ พบว่า สามารถส่งเสริมการเจริญได้และป้องกันการเกิดโรคในสัตว์และคนได้ (Devriese และ Pot. 1995)

ตารางที่ 2.6 การทดสอบความแตกต่างระหว่าง *Ent. faecalis* กับกลุ่มของ *Ent. faecium* (*Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Ent. hirae*, *Ent. mundtii*) กลุ่มของ *Ent. avium* (*Ent. avium*, *Ent. pseudoavium*, *Ent. malodoratus*, *Ent. raffinose*) กลุ่มของ *Ent. gallinarum* (*Ent. gallinarum*, *Ent. casseliflavus*, *Ent. flavescens*) และกลุ่มของ *Ent. cecorum* (*Ent. cecorum*, *Ent. columbae*) species

Test	<i>Enterococcus</i>				
	<i>faecalis</i>	<i>faecium</i> group	<i>avium</i> group	<i>gallinarum</i> group	<i>cecorum</i> group
Motility	-	-	-	+	-
Group D antigen	+	D+*	D	+	-
APPA†	-	-	+	-	-
PYRA‡	+	+	+	+	-
Alkaline phosphatase	-	-	-	-	D+
β -Galactosidase	-	D	D	+	+
Arginine dihydrolase	+§	+	-	+	-
Acid production from					
Adonitol	-	-	D+	-	-
L- Arabinose	-	D	D	+	D
D-Arabitol	-	-	+	-	D
L- Arabitol	-	-	D	-	W
D-Cyclodextrin	+	D+	D-	D	+
Dulcitol	-	-	D	-	-
Gluconate	D+	D	D+	+	-
Glycerol	+¶	-	D	D	-
Inulin	-	-(D-?)	-	+(D?)	+
2-Ketogluconate	D	-	+	-	D
D-Lyxose	-	-	D	-	-
Mannitol	+	D	+	+	D
Melezitose	D+	-	D	D-	D
Melibiose	-	D	D	+	+
α - Methyl-D- glucoside	-	D	D	+	+
D-raffinose	D+	D-	+	D-	D
Sorbitol	-	-	+	-	-
L-Sorbose	-	-	D+	-	D-
Xylitol	-	D	D-	+	D
D-Xylose	+	-	D	-	?

Pyruvate fermentation

*D, แยกต่างหรือคืนแปร; D+, โดยทั่วไปให้ผลบวก; D-, โดยทั่วไปให้ผลลบ; W, ให้ผลการหมักเล็กน้อย, †Alanyl-phenylalanyl-prolinearylamidase ยังไม่มีรายงานใน *Enterococcus* ทุกชนิด, ‡Pyrolydonylarylamidase, §สายพันธุ์ *Ent. faecalis* น้อยมากอาจจะให้ผลการสร้าง arginine dihydrolase เป็นลบ, ¶ในสภาวะไม่มีอากาศ (โดยใช้พาราฟินปิดผิวหน้า), || ยังไม่แน่ชัดในการอธิบายสปีชีส์ของ *Ent. mundtii* แต่รายงานว่าให้ผลบวกในการอธิบายสปีชีส์ของ *Ent. gallinarum* และ *Ent. casseliflavus* ให้ผลลบใน *Ent. gallinarum* และให้ผลบวกใน *Ent. casseliflavus* จากหลักเกณฑ์การจำแนกชนิดของ Facklam และ Collins (1989)

ที่มา : Devriese และ Pot. 1995

ตารางที่ 2.7 คุณลักษณะ โดยทั่วไปของแบคทีเรีย *Ent. faecium* species group (*Ent. faecium*, *Ent. durans*, *Ent. hirae*, *Ent. mundtii*) ที่มีความแตกต่างจากตารางที่ 2.5 และ 2.6

Good growth in 6.5% NaCl, at 10 and 45°C

Resistance to 0.04% NaN₃

Less resistant than *Ent. faecalis* to tellurite

Triphenyl tetrazolium chloride not reduced

Posses neither menaquinones nor ubiquinones

Main fatty acid: hexadecanoic, octadecanoic and cis-11, 12- methylenoctadecanoic

Hippurate variable

N-Acetyl- β -glucosaminidase variable

β -Mannosidase variable

Acid not produced from

5-Ketogluconate

D-Turanose

Acid variable with

Amidon

α - Methyl-D-mannoside

Rhamnose

Sucrose

D-Tagatose

ที่มา : Devriese และ Pot. 1995

ตารางที่ 2.8 คุณลักษณะที่แตกต่างกันระหว่างแบคทีเรียแต่ละชนิดใน *Ent. faecium* species group

คุณลักษณะ	<i>Ent. faecium</i>	<i>Ent. durans</i>	<i>Ent. hirae</i>	<i>Ent. mundtii</i>
Yellow pigment	-	-	-	+
Hippurate	D+*	D	D	-
Acid from				
L- Arabinose	+	-	-	+
Gluconate	D	-	-	-
Mannitol	D+	-	-	+
Melibiose	D+	-†	+	+
α- Methyl-D-mannoside	D-	-	-	D+
D-Raffinose	-‡	D-	D-	D+
Rhamnose	D-	-	-	D+
Sorbitol	-§	-	-	D
Sucrose	D+	-¶	+	+
D-Xylose	D-	-	-	+

*D แตกต่างกัน; D+ มักจะให้ผลบวก; D- มักจะให้ผลลบ

† สายพันธุ์ที่สามารถหมัก melibiose ได้ (ให้ผลบวก) ซึ่งจำแนกชนิดโดย Facklam และ Collin (1989) ว่าเป็น *Ent. durans* การแยกความแตกต่างของ *Ent. hirae* ยังไม่แน่นอน

‡ สายพันธุ์ของ *Ent. faecium* ที่แยกได้จากเนื้อสัตว์ปีกมักจะใช้ raffinose ได้ (ให้ผลบวก)

§ สายพันธุ์ของ *Ent. faecium* ที่แยกได้จากมนุษย์และที่แยกได้จากสุนัขน้อยมากที่จะสามารถหมัก sorbitol ได้ (ให้ผลบวก)

¶ *Ent. durans* ที่หมัก sucrose ได้จากการทดสอบด้วยระบบ RAPID ID 20 STREP (API-Bio Mérieux) ซึ่งการแยกความแตกต่างจาก *Ent. hirae* ยังไม่แน่นอน

ที่มา : Devriese และ Pot. 1995

2.2 เทคโนโลยีการผลิตกล้าเชื้อ

2.2.1 คุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าเชื้อ

2.2.1.1 การผลิตสารยับยั้ง

ก) กรดอินทรีย์

การผลิตกรดอินทรีย์โดยมากจะเป็นกรดแลคติกซึ่งในการหมักไส้กรอกแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำหน้าที่ในการหมักคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติกซึ่งการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักไส้กรอกขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาทางเคมี ปฏิกิริยาทางกายภาพ และปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นในเซลล์ของจุลินทรีย์ในขณะที่ทำให้มีความเป็นกรดเกิดขึ้นในเนื้อไส้กรอก แบคทีเรียกรดแลคติกมีส่วนร่วมในการตกตะกอนโปรตีนในกล้ามเนื้อทำให้เพิ่มความคงตัวของไส้กรอก ความแข็งแรง (firmness) และการเกาะติดกัน (cohesiveness) ของผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Hugas และ Monfort. 1997 ; Ordonez และคณะ. 1999) ได้มีการพยายามที่จะเพิ่มการรีดิวซ์ไนไตรต์ไปเป็นไนตริกออกไซด์ตามธรรมชาติซึ่งจะทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน (myoglobin) ไปเป็นไนโตรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin) ซึ่งสารประกอบนี้ทำให้ตัวอย่างไส้กรอกเป็นสีชมพู นอกจากนั้นไนไตรต์และไนตริกออกไซด์ยังมีผลทำให้รสชาติของผลิตภัณฑ์สุดท้ายโดยให้กลิ่นรสของกรดอย่างเด่นชัดและมีกลิ่นรสของน้ำส้มสายชู (acetic acid) สภาวะความเป็นกรดคาดว่าจะช่วยเพิ่มกิจกรรมของคาร์ทีปซินดี (cathepsin D) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนในกล้ามเนื้อ (Molly และคณะ. 1997) การผลิตกรดอินทรีย์เป็นสิ่งที่บ่งบอกได้ถึงอายุการเก็บรักษาและความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์สุดท้าย การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียขึ้นอยู่กับการสร้างกรดอินทรีย์อย่างรวดเร็วและเพียงพอ สุดท้ายแล้วได้มีผู้รายงานว่าการลดของพีเอชอย่างรวดเร็วโดยกล้าเชื้อที่ไม่สร้างเอมีน (amine - negative starter culture) สามารถช่วยป้องกันการสะสมของไบโอเจนิคเอมีน (biogenic amine) ในไส้กรอก (Maijala และคณะ. 1993) การสร้างกรดโดยรวดเร็วและทันทีในตอนเริ่มต้นกระบวนการหมักและการผลิตกรดอินทรีย์ที่เพียงพอทำให้พีเอชถึงหรือลดต่ำกว่า 5.1 เป็นคุณสมบัติที่สำคัญของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก กล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักเนื้อการสร้างกรดที่มากเกินไปมักจะทำให้เกิดคำหนิในด้านสีเนื่องจากการยับยั้งแบคทีเรียรูปร่างกลมที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (coagulase negative cocci : CNC) ส่วนใหญ่เป็น *Staphylococcus* และ *Kocuria* และในบางครั้งการสร้างแก๊สก็เป็นปัญหาที่สำคัญอย่างหนึ่งในการหมักไส้กรอก (Buckenhöskes. 1993)

ดั่งที่กล่าวมาข้างต้นหน้าที่หลักอย่างหนึ่งของกล้ำเชื้อในการหมักเนื้อต้องผลิตกรดอินทรีย์ได้อย่างรวดเร็วซึ่งกรดนี้จะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและเพิ่มความปลอดภัยและอายุในการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ ผลของกรดอินทรีย์ในการต้านจุลินทรีย์เกิดขึ้นเนื่องจากระดับพีเอชที่ลดลงและการกระทำของกรดที่ไม่แตกตัว (Podolak และคณะ. 1996) พีเอชภายนอกที่ต่ำเป็นสาเหตุให้เกิดความเป็นกรดในไซโทพลาสซึม (cytoplasm) ธรรมชาติของกรดที่ไม่แตกตัวซึ่งชอบไขมัน (lipophilic) จะทำให้กรดนี้แพร่กระจายผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ (Kashket. 1987) และมีผลต่อความแตกต่างของ electrochemical proton gradient อีกนัยหนึ่งการยอมให้สารบางชนิดผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้อาจมีผลในการขัดขวางระบบการขนส่งสาร (substrate transport system) เข้าออกจากเซลล์ (Snijders และคณะ. 1985)

ชนิดและระดับของกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ องค์ประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงและสภาวะในการเจริญ (Lindgren และ Dobrogosz. 1990) ซึ่งกรดแลคติกแบบ L (+) ยับยั้งจุลินทรีย์ได้มากกว่ากรดแลคติกชนิด D (-) เนื่องจาก D (-) isomer ไม่ถูกไฮโดรไลส์โดยเอนไซม์แลคเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ในมนุษย์อาจจะเป็นปัญหาต่อสุขภาพ ดังนั้นควรคัดเลือกลายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) มาทำกล้ำเชื้อ (Buckenhöskes. 1993)

ข) การผลิตแบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

ในช่วงทศวรรษที่ผ่านมาได้มีผู้สนใจสารแบคเทอริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการหมักเนื้อกันมากขึ้นซึ่งเป็นผลมาจากคุณลักษณะและหน้าที่ที่สำคัญของกล้ำเชื้อสารแบคเทอริโอซินสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักไส้กรอก เช่น *Lb. sakei*, *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* และ *Pediococcus acidilactici* แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในเนื้อสัตว์สามารถผลิตสารแบคเทอริโอซินที่มีผลยับยั้งแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นซึ่งเจริญแข่งขันกับสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินและยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ก่อให้เกิดโรค เช่น *Listeria monocytogenese*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens* และ *Bacillus cereus* (Ammor และ Mayo. 2007) สารแบคเทอริโอซินสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นโดยการทำให้เกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน เซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มชั้นนอก (outermembrane) ซึ่งจะช่วยป้องกันสารแบคเทอริโอซินและสารประกอบชนิดอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลมากกว่า 600 ดาลตัน (Da) ไม่ให้เข้าถึงเยื่อหุ้มเซลล์ได้ (Abee และคณะ. 1995)

De Martinis และ Franco (1998) ได้รายงานว่า bacteriogenic meat lactic acid bacteria สามารถใช้เป็น bioprotective culture ซึ่งจะป้องกันการเจริญของเชื้อก่อโรคในไส้กรอก โดยที่จริงแล้วการผลิตสารแบคทีเรียโอซินโดยกล้าเชื้อ *Lb. sakei* จะลดจำนวนของ *Listeria* ในไส้กรอกหมัก ซึ่ง *Lb. curvatus*, *Lb. plantarum* และ *P. acidilactici* มีผลในการต่อต้าน *Listeria* การผลิตสารแบคทีเรียโอซินมีช่วงขั้วกว้าง โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อโรคในอาหารดั่งนั้นกล้าเชื้อต้องมีการแข่งขันสูงกว่าจุลินทรีย์ ก่อโรคซึ่งกล้าเชื้อต้องลดจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นอันตราย

2.2.1.2 อัตราการเจริญที่อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือและพีเอชแตกต่างกัน

ความสามารถของกล้าเชื้อในการแข่งขันกับจุลินทรีย์ธรรมชาติในวัตถุดิบและการมีกิจกรรมเมแทบอลิก (metabolic activity) ซึ่งคาดว่าจะขึ้นอยู่กับสภาวะในการเจริญและการอยู่รอดในการหมักไส้กรอก เช่น สภาวะที่ไม่มีอากาศ ความเข้มข้นของเกลือค่อนข้างสูง อุณหภูมิต่ำ พีเอชต่ำ ความเข้มข้นของเกลือประมาณร้อยละ 2 ($a_w = 0.94$ ถึง 0.98) ในส่วนผสมและสามารถสูงถึงร้อยละ 15 ($a_w = 0.85$ ถึง 0.86) ในผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Locke และ Hechelmann. 1987 ; Montel. 1999) อุณหภูมิที่ใช้ในการผลิตอยู่ในช่วง 4 ถึง 7 องศาเซลเซียส ในขั้นตอนการเตรียมส่วนผสมซึ่งในขั้นตอนการหมักอุณหภูมียู่ระหว่าง 18 ถึง 24 องศาเซลเซียส (Montel. 1999) และในระหว่างการทำแห้งและการบ่มอุณหภูมียู่ระหว่าง 12 ถึง 15 องศาเซลเซียส พีเอชเริ่มต้นของส่วนผสมซึ่งโดยทั่วไปแล้วจะอยู่ประมาณ 6.0 และจะลดในระหว่างการหมักและค่าพีเอชอาจจะอยู่ระหว่าง 4.6 ถึง 5.1 หลังจากนั้นยีสต์ส่วนใหญ่เป็น *Debaryomyces hansenii* ที่จะช่วยเพิ่มพีเอชของผลิตภัณฑ์ซึ่งค่าพีเอชสุดท้ายอยู่ในช่วง 5.1 ถึง 5.5 (Cook. 1995)

ดังนั้นอัตราการเจริญที่อุณหภูมิแตกต่างกัน (2 ถึง 24 องศาเซลเซียส) การทนต่อความเข้มข้นของเกลือที่ร้อยละ 2 ถึง 10 (สูงสุดร้อยละ 15) และพีเอชอยู่ในช่วง 4.2 ถึง 6.0 เป็นปัจจัยที่จะจำกัดการคงอยู่และการแข่งขันเจริญของกล้าเชื้อตลอดกระบวนการหมักและกระบวนการบ่ม *Lb. sakei* สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 และมีค่าพีเอช 4.2 และที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส ในสภาพที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 2 เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีอยู่ในเนื้อสามารถมี generation time 0.55 ต่อชั่วโมง (Ammor และคณะ. 2005) Chaillou และคณะ (2005) กล่าวว่าคุณลักษณะการทนความเย็น (psychrotropic character) และการทนเกลืออาจเนื่องมาจากความสามารถในการสะสมตัวถูกละลายภายในเซลล์ (osmo and cryoprotective solutes) เช่น บีเทน (betaine) และคาร์นิทีน (carnitine) และอาจเป็นผลมาจากการ

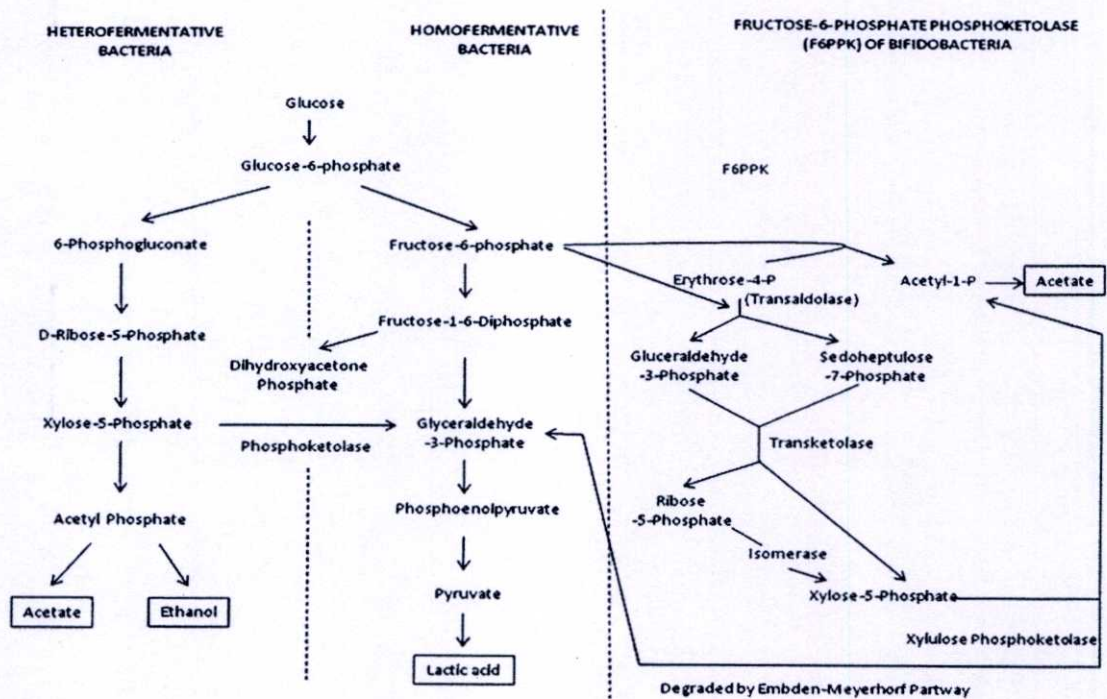
ตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่อความเย็น Chaillou และคณะ (2005) รายงานว่า *Lb. sakei* มียีนที่ทนต่อความเครียด (cold - stress gene) จากความเย็นมากกว่า lactobacilli ชนิดอื่น การร่วมกันของกลไกเหล่านี้รวมถึงการคัดแปลงเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (downregulation of glycolysis) และการกระตุ้นสภาวะเครียดจากออกซิเดทีฟ (oxidative) อาจจะช่วยฟื้นตัวจากความเย็น (Marceau และคณะ. 2004)

2.2.1.3 เมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism)

แบคทีเรียกรดแลคติก เช่น *Lactobacillus*, *Enterococcus* และ *Bifidobacteria* เป็นจุลินทรีย์ประเภท Chemo-organotrophic สามารถเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตไปเป็นกรดแลคติกในกระบวนการหมัก (ภาพที่ 2.7) Lactobacilli และ Enterococci มีการหมักอย่างสมบูรณ์แบบโดยหมักกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกในสายพันธุ์แบบ Homofermentative เช่น *Lactobacillus* และ *Enterococcus* หรือในสายพันธุ์แบบ Heterofermentative (*Lactobacillus*) ซึ่งจะผลิตทั้งกรดแลคติก คาร์บอนไดออกไซด์ และเอทานอล หรือกรดอะซิติก แบคทีเรียโพรไบโอติกชนิดที่สำคัญในสกุล *Lactobacillus* คือ *Lactobacillus acidophilus* แม้ว่าแลคโตสจะเป็นน้ำตาลที่พบส่วนใหญ่ในนมแต่ก็มีรายงานว่า *Lb. acidophilus* สามารถใช้ซูโครสได้อย่างมีประสิทธิภาพมากกว่าแลคโตส ข้อสังเกตนั้นอาจเป็นผลเนื่องมาจากความแตกต่างในกิจกรรมของเอนไซม์กาแลคโตซิเดส (galactosidase) และฟรุคโตฟูราโนซิเดส (fructofuranosidase) ในขณะที่เอนไซม์ฟรุคโตฟูราโนซิเดสเป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่มีอยู่เดิมในเซลล์แต่เอนไซม์กาแลคโตซิเดสอาจถูกชักนำขึ้นได้ใน *Lb. acidophilus* นอกจากนี้ทั้งโมเลกุลของกลูโคสและฟรุคโตสที่จะถูกใช้โดย *Lb. acidophilus* แต่เชื้อนี้ไม่สามารถใช้กาแลคโตสได้แม้แต่แลคโตสก็ใช้ได้ไม่มาก การเจริญของ *Lb. acidophilus* อาจเกิดขึ้นที่อุณหภูมิสูงถึง 45 องศาเซลเซียส แต่การเจริญที่เหมาะสมเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 35 ถึง 40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมเป็น 5.5 ถึง 6.0 *Lb. acidophilus* เป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ดังนั้นอาจส่งเสริมการเจริญที่ผิวของอาหารแห้งได้โดยการบ่มในสภาวะไร้อากาศหรือสภาวะลดความดันออกซิเจนและมีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ถึง 10 (De Vuyst. 2000)

Bifidobacteria เป็น Saccharoclastic organism ผลิตกรดอะซิติกและกรดแลคติกโดยไม่สร้างคาร์บอนไดออกไซด์ ยกเว้นในระหว่างการย่อยสลายกลูโคเนต (ภาพที่ 2.7) Heterofermentation เริ่มต้นโดยการแยก fructose -6- phosphate ไปเป็น O_2 และ C_4 การเปลี่ยน C_2 ไปเป็นอะซิเตท (acetate) คล้ายคลึงกับการสร้าง heptose -7- phosphate จาก C_4 พร้อมกับการสร้าง

ไตรโอต (triose) ที่ได้จากการเติม fructose - 6 - phosphate ซึ่งเปลี่ยนเป็นแลคเตท (lactate) สำหรับ heptose - 7 - phosphate ต่อมาแยกเป็นอะซิเตท 2 โมเลกุล และไพรูเวท (pyruvate) 1 โมเลกุล ไตรโอตโมเลกุลที่ 2 จาก fructose -6- phosphate นอกจากกลูโคสแล้ว *Bifidobacteria* ทั้งหมดที่เค็มอยู่อาศัยในมนุษย์สามารถใช้กาแลคโตส (galactose) แลคโตส (lactose) และบ่อยครั้งใช้ฟรุคโตส (fructose) เป็นแหล่งคาร์บอน *Bifidobacteria* spp. สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อนได้ ซึ่งพีเอชที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของ *Bifidobacteria* อยู่ที่ 6.0 ถึง 7.0 แต่เกือบจะไม่เจริญที่พีเอช 4.5 ถึง 5.0 หรือต่ำกว่านั้นหรือไม่เจริญที่พีเอช 8.0 ถึง 8.5 หรือสูงกว่านั้น มีอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญที่ 37 ถึง 41 องศาเซลเซียส ซึ่งสามารถเจริญได้สูงสุดที่ 43 ถึง 45 องศาเซลเซียส และเกือบจะไม่เจริญที่อุณหภูมิ 25 ถึง 28 องศาเซลเซียส หรือต่ำกว่านั้น *Bifidobacteria* เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญอย่างแท้จริง (แม้ว่าจะต้องการคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศบ้างก็ตาม) แต่บางสายพันธุ์ของ *Bifidobacterium lactis* เป็นเชื้อที่ทนต่อออกซิเจน (oxygen-tolerant) (De Vuyst. 2000)



ภาพที่ 2.7 แผนภาพเมแทบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรตและเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลคติก

ในกลุ่ม Homo และ Heterofermentative (ซ้าย) และ bifidobacteria (ขวา)

ที่มา : De Vuyst. 2000

2.2.1.4 กิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสและไฮโดรไลซิซของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Lactobacilli ส่วนมากสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้โดยการออกซิไดส์แลคเตทไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีผลทำให้ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่ได้มีคุณภาพทางประสาทสัมผัสไม่ดี โดยจะเพิ่มความหืนและทำให้สีของผลิตภัณฑ์สุดท้ายเปลี่ยนไป เอนไซม์คะตะเลสไฮโดรไลซิซไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องในการหมักเนื้อเช่น *Lb. sakei*, *Lb. plantarum*, *Lb. pentosus* และ *P. acidilactici* มี heme-dependent catalase activity ซึ่งจะทำงานได้ในผลิตภัณฑ์เนื้อเนื่องจากสับสเตรทเหล่านี้มี heamin ปริมาณมาก Noonpakdee และคณะ (2004) ศึกษาการแสดงออกของยีน *kataA* ของ *Lb. sakei* สายพันธุ์ที่ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลสและ *Lb. plantarum* ที่แยกได้จากไส้กรอกมีกิจกรรมคะตะเลสสูงมากกว่าในสายพันธุ์ดั้งเดิมประมาณ 3 เท่า ระดับของการออกซิเดชันของไขมัน (lipid oxidation) ในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักที่เดิมกล้าเชื้อที่ดัดแปลงให้สร้างคะตะเลสได้ (catalase - modified starter culture) ต่ำกว่าระดับการออกซิไดส์ไขมันในไส้กรอกที่เดิมเชื้อสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ขาดเอนไซม์คะตะเลสเมื่อเทียบกับคะตะเลสที่ได้จากแบคทีเรียรูปร่างกลมที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์โคเอกกูเลสซึ่งจะชักนำกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสซึ่งเป็นคุณสมบัติที่พึงประสงค์ของสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการหมักเนื้อ

กิจกรรมคะตะเลสของกล้าเชื้อในการหมักเนื้อโดยทั่วไปเป็นคุณสมบัติของสายพันธุ์ *Micrococcaceae* อย่างไรก็ตามก็มีรายงานว่าเอนไซม์คะตะเลสไม่ได้เกิดโดยแบคทีเรียกรดแลคติกเท่านั้น แบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งโดยทั่วไปไม่สังเคราะห์ heme และไม่มี heme ปริมาณเอนไซม์ เช่น ไฮโดโครม คะตะเลสและเปอร์ออกซิเดรส (Ammor และ Mayo. 2007)

2.2.1.5 การรีดิวซ์ไนเตรทและไนไตรต์

เนื่องจากมีรายงานกล่าวถึงมากกว่าในขณะนี้ที่เอนไซม์แบคทีเรียกรดแลคติกมีส่วนร่วมในการทำให้เกิดสีชมพูโดยการรีดิวซ์ไนไตรต์ไปเป็นไนตริกออกไซด์ซึ่งเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในเนื้อบางสายพันธุ์มีเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตรส (nitrate reductase) และเอนไซม์ heme - dependent และ heme - independent nitrite reductase เอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับโดยตรงกับกลไกการสร้างไนโตรโซไมโอโกลบิน (nitrosomyoglobin) ดังนั้นการคัดเลือกแบคทีเรียสายพันธุ์ที่สร้างเอนไซม์ไนเตรตรีดักเตรสและไนไตรตรีดักเตรสได้จึงเป็นสิ่งที่จะต้องทำแม้ว่า

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จะมีกิจกรรมเหล่านี้ได้ต่ำกว่าแบคทีเรียรูปร่างกลมที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส (Ammor และ Mayo. 2007) กิจกรรมไนเตรทและไนไตรต์รีดักเตสเป็นเอนไซม์ที่จำเป็นสำหรับการลดนอสมิซึ่งโดยทั่วไปเป็นคุณสมบัติของสายพันธุ์ *Micrococcaceae* อย่างไรก็ตาม Hammes และคณะ (1990) ได้สรุปกิจกรรมไนเตรทและไนไตรต์รีดักเตสของแบคทีเรียกรดแลคติกว่าสามารถแบ่งออกเป็น heme - dependent และ heme - independent ซึ่ง heme ไม่เป็นองค์ประกอบที่จำกัดในเนื้อ ดังนั้นแบคทีเรียกรดแลคติกอาจจะช่วยสนับสนุนการพัฒนาศีของเนื้อหมักซึ่งภายในสายพันธุ์ *Lb. plantarum* และ *Lb. pentosus* มีกิจกรรมไนเตรทและไนไตรต์รีดักเตสและบางสายพันธุ์ของ *Pediococcus pentasaceus* มีกิจกรรม heme - dependent nitrite reductase กิจกรรมไนไตรต์รีดักเตสไม่สามารถพบใน *Lb. curvatus* และสายพันธุ์ดังกล่าวนี้มีกิจกรรมไนไตรต์รีดักเตสน้อยกว่าใน *Lb. sakei* (Wolf และคณะ. 1990) กล่าวว่าเอนไซม์ heme - dependent nitrite reductase มีแอมโมเนียเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายของไนไตรต์ส่วนเอนไซม์ heme - independent nitrite reductase ได้รีดิวซ์ไนไตรต์ไปเป็นไนตรัสออกไซด์และไนตริกออกไซด์ซึ่งช่วยสนับสนุนการเกิดสี

2.2.1.6 กิจกรรมการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน

แบคทีเรียกรดแลคติกมีการย่อยโปรตีน (proteolytic activities) ชนิด myofibrillar protein ได้ไม่ดี อย่างไรก็ตาม *Lb. casei*, *Lb. plantarum*, *Lb. curvatus* และ *Lb. sakei* บางสายพันธุ์สามารถไฮโดรไลส์ sarcoplasmic protein และต่อมจะย่อยสลายเปปไทด์ไปเป็นกรดอะมิโน มีรายงานว่า *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* และ *Lb. plantarum* ที่แยกได้จากไส้กรอกมีกิจกรรมของเอนไซม์เปปติเดส นอกจากนี้เชื้อบางสายพันธุ์ของ *Lb. sakei*, *Lb. curvatus* และ *Lb. plantarum* มีเอนไซม์ลิวซีน (leucine) และวาเลอีนอะมิโนเปปติเดส (valine amino - peptidases) ซึ่งมีส่วนในปฏิกิริยาคะตะบอลิซึม (catabolism) ของโปรตีนและเปปไทด์ทำให้เกิดกรดอะมิโนอิสระ ซึ่งเป็น precursors ของสารประกอบที่ให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Ammor และคณะ. 2005)

2.2.1.7 การต้านทานต่อสารประกอบที่กล้าเชื้อผลิตขึ้น

กล้าเชื้อที่ใช้ในการหมักเนื้อโดยส่วนใหญ่แล้วเป็นเชื้อผสมระหว่างแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียรูปกลมที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลส ดังนั้นเพื่อที่เชื้อจะทำหน้าที่ที่ต้องการแบคทีเรียกรดแลคติกต้องสามารถทนหรือเสริมฤทธิ์กับสารประกอบที่เชื้อแบคทีเรียรูปกลมที่ไม่สร้างเอนไซม์โคแอกกูเลสสร้างขึ้น (Ammor และ Mayo. 2007) Hammes และคณะ (1990) ได้แสดง

ให้เห็นว่า *Lb. sakei* และ *Lb. curvatus* บางสายพันธุ์สามารถยับยั้งเชื้อชนิดอื่นในการหมักเนื้อชนิดอื่นนอกเหนือจากเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ เช่น *Kocuria varians* ดังนั้นสายพันธุ์ที่จะนำมาใช้ในการเป็นกล้าเชื้อผสมควรตรวจสอบความเป็นปรปักษ์ (antagonism) ก่อน

2.2.1.8 การไม่ทำให้มีการสะสมของไบโอเจนิคเอมีนในอาหาร

ไบโอเจนิคเอมีน (Biogenic amine ; BA) เป็นสารอินทรีย์ซึ่งมีโครงสร้างเป็น aliphatic, aromatic หรือ heterocyclic ซึ่งพบได้ในอาหารหลายชนิด (Suzzi และ Gardini. 2003) เช่น ปลา ผลัดภัณฑ์ปลา ผลัดภัณฑ์เนื้อสัตว์ ไข่ เนยแข็ง ผักดอง ผลัดภัณฑ์ถั่วเหลือง เบียร์และไวน์ (Shalaby. 1996) ซึ่งส่วนใหญ่สร้างสารขึ้นโดยจุลินทรีย์จากปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) ของกรดอะมิโนโพลีเอมีน (polyamine) (Suzzi และ Gardini. 2003) ไบโอเจนิคเอมีนที่สำคัญที่สุดซึ่งเกิดขึ้นในอาหาร ได้แก่ ฮิสตามีน (histamine) พิวตรีซีน (putrescine) คาดาวารีน (cadavarine) ไทรามีน (tyramine) ทริปตามีน (tryptamine) บีต้าเฟนิลเอทิลเอมีน (β -phenylethylamine) สเปออร์มีน (spermine) และสเปอิมิดีน (spermidine) ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างไบโอเจนิคเอมีนในอาหารได้แก่ การมีกรดอะมิโนอิสระ การมีจุลินทรีย์ที่สามารถคาร์บอกซิเลตกรดอะมิโนและสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตเอนไซม์ของจุลินทรีย์นั้น (Shalaby. 1996) ได้มีผู้รายงานการสะสมไบโอเจนิคเอมีนในอาหาร เช่น ไส้กรอกแห้งโดยจะต้องมี precursor (เช่นกรดอะมิโน) และสภาวะที่เหมาะสม เช่นมีจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์อะมิโนแอกซิเดคาร์บอกซิเลสได้ (amino acid decarboxylase) ซึ่งอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญและการคั่งหมักคาร์บอกซิล (Bover-Cid และคณะ. 2001) ถึงแม้ว่าเอมีนมักจะเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการสลายหรือการเน่าเสียซึ่งก่อให้เกิดการสร้างกรดอะมิโนอิสระจากกระบวนการย่อยโปรตีนร่วมกับการผลิตเอนไซม์ amino acid decarboxylase และการกระทำของเอนไซม์ชนิดนี้แต่ก็อาจเกิดฮิสตามีนปริมาณมากก่อนที่จะเห็นว่าอาหารเกิดการเน่าเสียหรือลักษณะทางประสาทสัมผัสไม่เป็นที่ยอมรับ (Shalaby. 1996) นอกจากนี้การมีโปรตีนและเอนไซม์ย่อยโปรตีนในระหว่างการบ่มจะทำให้เกิด precursor สำหรับปฏิกิริยาคาร์บอกซิเลชัน โดยกล้าเชื้อจุลินทรีย์และจุลินทรีย์ประจำถิ่นเช่นกัน (Bover-Cid และคณะ. 2001) ไบโอเจนิคเอมีนเป็นสิ่งที่ไม่ต้องการเพราะเป็นพิษ ได้มีผู้รายงานการเกิดโรคโลหิตเป็นพิษจากการบริโภคอาหารที่มีเอมีน (biologically active amine) ดังตารางที่ 2.9 (Shalaby. 1996) ปัจจุบันไบโอเจนิคเอมีนเป็นสิ่งที่ได้รับความสนใจมากขึ้นเพราะผู้บริโภคจำนวนมากแพ้สารไบโอเจนิคเอมีนเนื่องจากในร่างกายของผู้บริโภคเหล่านั้นขาดเอนไซม์เอมีนออกซิเดส (amine

oxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในการจัดความเป็นพิษของสารเหล่านี้ (Suzzi และ Gardini. 2003)

ตารางที่ 2.9 ไบโอเจนิคเอมีนในอาหารและผลของไบโอเจนิคเอมีนต่อด้านสุขภาพ

เอมีน (amine)	สารตั้งต้น (precursor) ใน การเกิดเอมีน	ผลของเอมีนต่อสุขภาพ
ฮิสตามีน (histamine)	ฮิสติดีน (histidine)	- ปลั่งอะดรีนาลีน (adrenaline) และ นอร์อะดรีนาลีน (noradrenaline) อย่างอิสระ - กระตุ้นกล้ามเนื้อเรียบของมดลูก ลำไส้และ ระบบหายใจ - กระตุ้นเซลล์ประสาทเคลื่อนไหว และประสาท สัมผัส - ควบคุมการขับกรดน้ำย่อย
ไทรามีน (tyramine)	ไทโรซีน (tyrosine)	- เกี่ยวกับการบีบตัวของหลอดเลือด - สาเหตุของการหลั่งน้ำตาและ salvation - การหายใจเพิ่มขึ้น - ระดับน้ำตาลในเลือดเพิ่มขึ้น - ปลั่งนอร์อะดรีนาลีนจากระบบ - เป็นสาเหตุของไมเกรน
พิวตรีซีนและ คาดาวารีน (putrescine และ cadaverine)	ออร์นิทีนและไลซีน (ornithine and lysine)	- ความดันโลหิตต่ำ - หัวใจเต้นช้ากว่าปกติ - โรคชากรรไกรแข็ง - อัมพาตที่ปลายแขนและขา - เพิ่มฤทธิ์ความเป็นพิษของเอมีนชนิดอื่น
เบต้าฟีนิล- เอทิลเอมีน β -phenylethylamine	ฟีนิลอะลานีน (phenylalanine)	- ปลั่งนอร์อะดรีนาลีนจากระบบ sympathetic nervous - ความดันโลหิตเพิ่มขึ้น - สาเหตุของไมเกรน
ทริปตามีน (tryptamine)	ทริปโตเฟน (tryptophane)	- ความดันเลือดเพิ่มขึ้น

ที่มา : Shalaby. 1996

ก) แบคทีเรียที่ทำให้เกิด ไบโอเจนิคเอมีน

การผลิตเอมีนบ่อยครั้งเป็นผลมาจากการมีแบคทีเรียที่สามารถดึงหมู่คาร์บอกซิลของกรดอะมิโน (decarboxylating amino acid) เอนไซม์ decarboxylase พบได้ในแบคทีเรียบางสายพันธุ์ *Enterobacteriaceae, Clostridium, Lactobacillus, Streptococcus, Micrococcus* และ *Pseudomonas* ได้มีผู้รายงานว่าแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนแยกได้จากปลาซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดโรค scombroid poisoning ได้แก่ *Morganella (Proteus) morganii, Klebsiella pneumonia* และ *Hofnia alvei* นอกจากนี้สายพันธุ์ *Proteus vulgaris, Proteus mirabilis, Clostridium perfringens, Enterobacter aerogenes* และ *Vibrio alginolyticus* เคยถูกแยกได้จากปลาและพบว่าสามารถผลิตฮิสตามีนได้และยังมีผู้รายงานอีกว่าได้แยกแบคทีเรีย 14 ชนิด ที่มีกิจกรรม histamine decarboxylase activity จากปลาเน่า ได้แก่ *Acinetobacter lwoffii, Pseudomonas putrefaciens* และ *Aeromonas hydrophila* นอกจากนี้ *Plesiomonas shigelloids* เป็นแบคทีเรียชนิดแยกได้บ่อยจากปลาและสิ่งแวดล้อมในน้ำที่อาศัยและได้ถูกจำแนกชนิดในฐานะของแบคทีเรียชนิดใหม่ที่สร้างฮิสตามีนได้ (new histamine - former) ได้มีผู้รายงานว่าแบคทีเรียที่สร้างฮิสตามีนได้ ซึ่งชอบความเค็ม (เจริญได้ในอาหารพวกที่มีโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 12) ทั้งชนิดที่ชอบอุณหภูมิต่ำและชนิดที่ชอบอุณหภูมิปานกลางสำหรับการเจริญได้เคยถูกแยกได้จากปลาทะเลและพบว่าสร้างเอมีนชนิดที่ไม่ระเหย (non-volatile amines) ในเนื้อปลาซาร์ดีนที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 12 ซึ่งนอกจากนี้ยังมีรายงานว่าแบคทีเรียทนเค็มซึ่งสร้างฮิสตามีนได้ (halotolerant histamine - forming bacteria) ได้ถูกจำแนกว่าเป็นสายพันธุ์แบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus, Vibrio* และ *Pseudomonas* และยังมีผู้รายงานอีกว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้จากปลาแอนโชวีที่ถนอมไว้ด้วยเกลือ (salted semi-preserved anchovies) ซึ่งมี histamine activity สูงที่สุดคือ *Morganella morganii, Bacillus* spp. 2 สายพันธุ์ และ *Staphylococcus xylosum* 1 สายพันธุ์ ซึ่งสามารถสร้างฮิสตามีนได้ 2.123, 11 และ 110 พีพีเอ็ม ตามลำดับ หลังจากบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เนื่องจากแบคทีเรียมีเอนไซม์ amino acid decarboxylase หลายชนิดซึ่งไม่น่าประหลาดใจเลยว่ามีกรพบเอมีนชนิดอื่น ๆ อีกมากมายในอาหาร ข้อมูลเชิงปริมาณเกี่ยวกับ decarboxylase activity ยังมีน้อยมากจึงได้มีผู้ทดสอบแบคทีเรีย 400 ไอโซเลตซึ่งแยกได้จากปลาเน่าถึงการมีกิจกรรมของเอนไซม์ lysine decarboxylase activity, arginine decarboxylase activity หรือ ornithine decarboxylase activity สำหรับการดีคาร์บอกซิเลตกรดอะมิโน 1 ชนิดหรือมากกว่า 1 ชนิด นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรีย mesophyllic ไอโซเลตที่แยกได้จากปลา mahimahi นำมีปฏิกิริยา decarboxylation ของ ornithine

และ lysine ร้อยละ 38 และ 92 ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรีย psychrotrophic พบว่าสามารถดีคาร์บอกซิเลตออรันิทีน (decarboxylating ornithine) และไลซีนได้คิดเป็นร้อยละ 13 และ 15 ของแบคทีเรียที่ชอบอุณหภูมิต่ำทั้งหมด ตามลำดับ โดยทั่วไปแล้วจุลินทรีย์ชนิดที่สามารถสร้างฮีสตามีนและชนิดที่สร้างไบโอเจนิคเอมีนจะเป็นชนิดเดียวกัน ได้มีผู้รายงานว่าการคอะมิโนฮีสตามีน พิวดริซิน และกาตาวารีนสามารถเกิดขึ้นในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ปลาซาร์ดีนที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส มีปริมาณเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 12 และพบจำนวนของ halotolerant bacteria น้อยกว่า 10 เซลล์ต่อกรัมถึง 10^4 เซลล์ต่อกรัม (shalaby. 1996) สิ่งสำคัญในการคัดเลือกลำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับการผลิตไส้กรอกคือต้องไม่มี amino acid decarboxylase activity การเจริญและการผลิตกรดต้องรวดเร็ว ซึ่งจะป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์ที่ผลิตเอมีน ซึ่งจากบทความวิจัยหลายบทความได้รายงานถึงความสามารถของ *Lb. sakei* ในการลดการสะสมของไบโอเจนิคเอมีนในไส้กรอกหมัก (Bover-Cid และคณะ. 2001) การใช้ลำเชื้อที่มี amine oxidase activity อาจเป็นวิธีที่ช่วยลดปริมาณของไบโอเจนิคเอมีนที่เกิดขึ้น ซึ่งกิจกรรมเหล่านี้ได้มีรายงานแล้วในการหมักไส้กรอกด้วยแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ เช่น *Lb. plantarum* และ *Lb. casei* (Fadda และคณะ. 2001)

2.2.1.9 คุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติก

โพรไบโอติก (Probiotic) คือ จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่และถูกใช้รับประทานเพื่อให้เข้าไปช่วยปรับสมดุลของสภาวะแวดล้อมภายในทางเดินอาหารของร่างกายมนุษย์และสัตว์ จุลินทรีย์ที่ใช้ได้แก่ ยีสต์ และแบคทีเรียกรดแลคติก (เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ. 2547) Lilly และ Stillwell (1965) ได้ให้คำจำกัดความของ “โพรไบโอติก” ไว้ว่าเป็นปัจจัยที่ช่วยส่งเสริมการเจริญที่เกิดโดยจุลินทรีย์ คำว่า “โพรไบโอติก” นั้นมีรากศัพท์มาจากภาษากรีกหมายถึง “pro life” Parker (1974) ได้ให้คำจำกัดความของโพรไบโอติกว่า “สิ่งมีชีวิตและสาร” ซึ่งมีประโยชน์กับสัตว์โดยเพิ่มประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในลำไส้ โดยคำว่า “สาร” ไม่รวมถึงสารปฏิชีวนะ และ Fuller (1989) ได้ให้คำจำกัดความของ “โพรไบโอติก” ไว้ว่าเป็นอาหารเสริมซึ่งประกอบด้วยจุลินทรีย์ที่มีชีวิตเมื่อรับประทานเข้าไปจะมีประโยชน์ในการช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ นิยามของโพรไบโอติกไม่สามารถใช้ส่งเสริมจุลินทรีย์ที่มีชีวิตในด้านอื่นๆ มากกว่าทางด้านอาหารคนหรืออาหารสัตว์ ต่อมาได้มีการปรับปรุงนิยามของ Fuller ใหม่ และให้คำจำกัดความว่า

โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตซึ่งอาจเป็นเชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสมสามารถใช้กับมนุษย์หรือสัตว์ และมีประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยช่วยปรับคุณภาพของจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิม”

Metchnikoff (1908) ได้กล่าวว่าการรับประทาน *Lactobacilli* เพื่อเข้าไปเจริญเติบโตจะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ก่อโรคทั้งหลายที่อาจเข้าสู่ร่างกายได้ จะช่วยให้มีสุขภาพดี และมีชีวิตยืนยาว

แบคทีเรียโพรไบโอติกมีประโยชน์ต่อร่างกายดังนี้ ควบคุมการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงปรารถนาในระบบทางเดินอาหาร (กรดแลคติกที่แบคทีเรียโพรไบโอติกผลิตออกมาจะทำให้สภาวะภายในลำไส้มีความเป็นกรดมากพอที่จะยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรค) ทำให้ระบบขับถ่ายดีไม่เกิดการสะสมของเสียในร่างกายเป็นการลดอัตราเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะอย่างยิ่งมะเร็งลำไส้ใหญ่และมะเร็งตับ ปรับปรุงการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายวิตามินบีช่วยให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันทำงานอย่างมีประสิทธิภาพและทำให้มีการผลิตเม็ดเลือดแดง ปรับปรุงการย่อยแลคโตสโดยการผลิตเอนไซม์แลคเตส ซึ่งช่วยย่อยน้ำตาลในนมทำให้ไม่มีอาการท้องอืดจากการดื่มนมและช่วยดูดซึมแคลเซียมให้ดีขึ้น ต่อต้านสารก่อมะเร็ง โดยยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งและกำจัดสารก่อมะเร็งบางชนิด ควบคุมโคเลสเตอรอล โดยการช่วยลดระดับน้ำตาลและโคเลสเตอรอลในเลือด (Marth และ Steele. 2001)

ก่อนที่จะนำแบคทีเรียโพรไบโอติกมาใช้ควรคำนึงถึงความสามารถในการอยู่รอดได้ดี และกิจกรรมของโพรไบโอติก อย่างไรก็ตามได้มีรายงานว่าโพรไบโอติกที่ไม่มีชีวิตก็สามารถให้ประโยชน์กับสุขภาพได้ เช่น ช่วยปรับระบบภูมิคุ้มกันและจับกับสารก่อมะเร็งในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ ดังนั้นสำหรับโพรไบโอติกบางสายพันธุ์อาจเพียงพอที่จะเจริญในระหว่างการผลิตขั้นต้นเพื่อที่จะให้ได้จำนวนเซลล์ปริมาณมากในผลิตภัณฑ์ แต่แบคทีเรียเหล่านี้ไม่จำเป็นต้องอยู่รอดได้ดีในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียโพรไบโอติกโดยทั่วไปต้องคำนึงถึง (Mattila-Sandholm และคณะ. 2002)

ก) การทนต่อกรดและน้ำย่อยในกระเพาะอาหารของมนุษย์

แบคทีเรียโพรไบโอติกที่รับประทานเข้าไปอย่างน้อยต้องสามารถอยู่รอดในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็กเพียงชั่วคราว ถึงแม้ว่าจะเป็นสิ่งจำเป็นขั้นต่ำสำหรับการเป็นโพรไบโอติก แต่ก็พบว่าแบคทีเรียหลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียที่ผลิตโยเกิร์ต เช่นสายพันธุ์ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* บ่อยครั้งที่ไม่สามารถอยู่รอดได้เมื่อผ่านไปถึงลำไส้ส่วนกลางซึ่งสาเหตุที่เป็นเช่นนี้เนื่องจากในกระเพาะอาหารมีพีเอชต่ำ ในคน

ที่อดอาหารค่าพีเอชของกระเพาะอาหารจะอยู่ระหว่าง 1.0 และ 2.0 จุลินทรีย์ส่วนมากรวมทั้ง *Lactobacilli* สามารถมีชีวิตอยู่ได้ตั้งแต่ 30 วินาที ถึงหลายนาที่ภายใต้สภาพนี้ ดังนั้นเพื่อให้ได้สายพันธุ์โพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถอยู่รอดในกรดที่พีเอช 3.0 ได้ ช่วงขณะควรจะให้แบคทีเรีนั้นอยู่ในอาหารที่มีสภาพเป็นบัฟเฟอร์ เช่นในน้ำนม โยเกิร์ตหรืออาหารอื่นๆ (Goldin และ Gorbach. 1992)

ข) การทนต่อน้ำดี (คุณลักษณะที่สำคัญสำหรับการอยู่รอดในลำไส้เล็ก)

การทนต่อน้ำดีเป็นคุณลักษณะที่สำคัญสำหรับการอยู่รอดในลำไส้เล็กและลำไส้ใหญ่ ซึ่งมีปริมาณความเข้มข้นของกรดน้ำดี (bile acids) สูง สามารถยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้หลายชนิด ดังนั้นโพรไบโอติกที่มีประสิทธิภาพควรจะสามารถเจริญในอาหารแข็ง oxgall agar ที่ประกอบด้วย oxgall ร้อยละ 0.15 ถึง 0.30 ได้ (Goldin และ Gorbach. 1992)

ค) การยึดเกาะผนังลำไส้และในระบบทางเดินอาหารของมนุษย์

สำหรับการยึดเกาะผนังลำไส้ของแบคทีเรียโพรไบโอติกยังไม่แน่ชัดว่าเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการอยู่รอดภายในลำไส้มนุษย์ อย่างไรก็ตามดูเหมือนว่าคุณสมบัตินี้จะช่วยส่งเสริมการอยู่รอดของแบคทีเรียโพรไบโอติกให้ยาวนานขึ้น ซึ่งความสามารถในการยึดเกาะผนังลำไส้ของจุลินทรีย์มีความจำเพาะในแต่ละสายพันธุ์ Kleeman และ Klaenhammer (1982) ได้ศึกษาความสามารถของ *Lb. acidophilus* ที่แยกได้จากร่างกายมนุษย์จำนวน 32 ไอโซเลต ในการเกาะกับเซลล์จากผนังลำไส้ทารกในครรภ์และเมื่อเติมแคลเซียมพบว่าทุกสายพันธุ์สามารถเกาะกับเซลล์ของผนังลำไส้ทารกได้ แต่ในสภาพที่ขาดแคลเซียมมีเพียง 4 สายพันธุ์ ที่มีคุณสมบัติในการเกาะกับเซลล์ผนังลำไส้ได้ ดังนั้นแสดงว่ากลไกในการจับกันมีทั้งแบบจำเพาะและไม่จำเพาะ

ง) การผลิตสารต่อต้านจุลินทรีย์

จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยภายในลำไส้มีระบบนิเวศน์ที่ซับซ้อนซึ่งจุลินทรีย์ชนิดใหม่ ที่เข้าไปต้องเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่น ดังนั้นจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างผลิตภัณฑ์ที่ยับยั้งการเจริญหรือฆ่าจุลินทรีย์ที่มีอยู่ได้ก็จะได้เปรียบ ในปัจจุบัน ได้มีผู้รายงานถึงชนิดของแบคทีเรียโพรไบโอติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งได้ (ตารางที่ 2.10) (Goldin และ Gorbach. 1992)

ในการคัดเลือกสายพันธุ์ลำไส้เชื้อจุลินทรีย์ความสามารถในการผลิตกรดเป็นคุณลักษณะที่สำคัญมากอย่างหนึ่ง อย่างไรก็ตามเกณฑ์ในการคัดเลือกโพรไบโอติกต้องเกี่ยวข้องกับผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์เนื่องจากสภาพแวดล้อมภายในระบบทางเดินอาหารมีความแตกต่างกับสภาพแวดล้อมในอาหารมาก ซึ่งพบโพรไบโอติกมักจะไม่เหมาะสมที่จะใช้เป็นกล้ำเชื้อ เช่นอัตรา

การเจริญอาจช้ามากและกลั่นรสที่ผิดปกติ ดังนั้นเพื่อที่จะปรับปรุงความเหมาะสมของอาหารที่ใช้เป็นสับสเตรทของโพรไบโอติกอาจเติมแหล่งพลังงาน (เช่น กลูโคส) ปังจัยการเจริญ (ยีสต์สกัดและโปรตีนไฮโดรไลเซต) หรือ สารแอนติออกซิเจนซ์ที่เหมาะสม แร่ธาตุหรือวิตามิน ใดๆก็ตามการปรับอาหารให้เหมาะสมอาจช่วยปรับปรุงประสิทธิภาพในการเป็นกล้าเชื้อ ในการคัดเลือกโพรไบโอติก ต้องคำนึงถึงปัจจัยหลายประการ ได้แก่ คุณลักษณะทางประสาทสัมผัส การต้านทานฝาจก์ ความสามารถในการอยู่รอดในระหว่างกระบวนการแปรรูป ความคงตัวในผลิตภัณฑ์และระหว่างการเก็บรักษา (Mattila-Sandholm และคณะ. 2002)

ตารางที่ 2.10 จุลินทรีย์ที่สร้างสารต่อต้านจุลินทรีย์

แบคทีเรียโพรไบโอติก	สารประกอบ
<i>Lactobacillus GG</i>	ยาปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด
<i>Lb. acidophilus</i>	acidocin, acidophilin, bacteriocin, lactocidin
<i>Lb. bulgaricus</i>	bulgarican
<i>Lb. plantarum</i>	lactolin
<i>Lb. brevis</i>	lactobacillin lactobrevin
<i>Lb. reuteri</i>	reuterin

ที่มา : Goldin และ Gorbach. 1992

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นโพรไบโอติกส่วนใหญ่ได้แก่ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lb. bulgaricus* ซึ่งอาจใช้ในรูปแบบของเชื้อเดี่ยวหรือเชื้อผสม ซึ่งเชื้อทั้งสองชนิดแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารที่ทำจากนม นอกจากนี้ยังมีสายพันธุ์ที่แยกได้จากมนุษย์คือ *Lb. rhamnosus* สายพันธุ์ GG ซึ่งนำมาผลิตเป็นแคปซูลอาหารเสริมในสหรัฐอเมริกา สายพันธุ์นี้อยู่รอดได้ดีในทางเดินอาหาร เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะเข้ายึดเกาะกับผนังลำไส้ และยังคงอยู่นานหลายสัปดาห์หลังจากรับประทานแต่ละครั้ง (เสาวนีย์ ธรรมสถิตติ. 2547) แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนมากถูกนำมาผลิตเป็นกล้าเชื้อทางการค้า ซึ่งแบคทีเรียที่นำมาทำเป็นกล้าเชื้อต้องมีจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ไม่บาดเจ็บจำนวนมาก ในสมัยก่อนการใช้กล้าเชื้ออาจอยู่ในรูปของของเหลวหรือแช่แข็ง การทำให้กล้าเชื้ออยู่ในรูปผงโดยการแช่แข็งแห้ง (freeze-dried) และสเปรย์คราย (spray-dried) จะช่วย

ปรับปรุงความคงตัวและสามารถประหยัดค่าขนส่งและเก็บรักษาได้ การผลิตกล้าเชื้อปริมาณมากๆ โดยใช้วิธีการผลิตแบบสเปรย์ทรายจะประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าแบบแช่แข็งแห้งแต่แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงในระหว่างการทำแห้งแบบสเปรย์ทรายได้ ซึ่งการแช่แข็งแห้งเป็นวิธีการที่นิยมมากที่สุดสำหรับการผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกในรูปผง การเตรียมกล้าเชื้อโพรไบโอติกทางการค้าส่วนมากอยู่ในรูปที่เข้มข้นสูงและนำมาใช้ได้โดยตรง ซึ่งกล้าเชื้อแช่แข็งหรือแช่แข็งแห้งมีความเข้มข้นสูงมากโดยการแช่แข็งแบบ deep-frozen มีปริมาณเชื้อมากกว่า 10^{10} โคโลนีต่อกรัม ส่วนการแช่แข็งแห้งมีปริมาณเชื้อมากกว่า 10^{11} โคโลนีต่อกรัม ซึ่งความเข้มข้นของเซลล์ต่อกรัมผลิตภัณฑ์จะแตกต่างกันในแต่ละเชื้อจุลินทรีย์และชนิดของจุลินทรีย์ที่ใช้ (Mattila-Sandholm และคณะ. 2002)

2.3 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ผลิตกล้าเชื้อ

ปัจจุบันนี้ผู้บริโภคได้ให้ความสนใจเกี่ยวกับอาหารและสุขภาพกันมากขึ้น ซึ่งทำให้ตลาดอาหาร functional food เติบโตเป็นพิเศษมากกว่าปีที่ผ่านมา ซึ่งการใช้สารปรุงแต่งอาหารจะทำให้อาหารไม่เป็นธรรมชาติและไม่ปลอดภัย แต่สารปรุงแต่งก็ถูกเติมลงไปเพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์อาหารและช่วยปรับปรุงคุณลักษณะทางด้านการสัมผัส ความต้องการในการลดการใช้สารปรุงแต่งและลดกระบวนการผลิตจะมีความขัดแย้งกับความต้องการของตลาด สำหรับผลิตภัณฑ์ต้องการความสด ปลอดภัย รสชาติดีและน้ำตาลต่ำ ไขมัน และเกลือ และง่ายต่อการเตรียมตัวอย่างเช่น การผลิตเนยแข็ง ซึ่งใช้นมดิบที่มาจากหลายแหล่งจะมีความเสี่ยงสูงต่ออันตรายจากจุลินทรีย์ก่อโรค เช่น อาจพบเชื้อ *Listeria monocytogenes* ในการหมักอาหารสิ่งสำคัญอย่างหนึ่งคือ ระดับของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งอุตสาหกรรมกล้าเชื้อยังขาดคุณลักษณะที่จำเป็นซึ่งจะทำให้ผลิตภัณฑ์มีความหลากหลายและกล้าเชื้อทางการค้าที่มียังมีความจำกัดอยู่ การเพิ่มความเข้าใจในด้านยีนและเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ในอาหารสามารถเปิดมุมมองการปรับปรุงกล้าเชื้อได้ การใช้วิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลสามารถทำให้กล้าเชื้อแสดงออกในคุณสมบัติที่พึงประสงค์และสามารถกำจัดคุณลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ของกล้าเชื้อได้ เมื่อเร็ว ๆ นี้ การใช้ functional starter culture ในอุตสาหกรรมการหมักอาหารสามารถช่วยให้อาหารปลอดภัย หรือมีข้อดีอย่างน้อยหนึ่งข้อหรือมากกว่านั้นในด้านคุณสมบัติทางประสาทสัมผัส โภชนาการ เทคโนโลยีหรือสุขภาพ (ตารางที่ 2.11) การคัดเลือกสายพันธุ์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อหรือใช้ร่วมกับกับกล้าเชื้อในกระบวนการหมักสามารถส่งเสริมคุณสมบัติของกล้าเชื้อ การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ให้เป็นไปตามธรรมชาติและถูก

อนามัย ตัวอย่างเช่น แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารต่อต้านจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์น้ำตาล โพลีเมอร์ สารให้ความหวาน สารประกอบอะโรมาติก เอนไซม์ที่เป็นประโยชน์และสารอาหารที่เป็นประโยชน์ทางโภชนาการ (Leroy และ De Vuyst. 2004)

ตารางที่ 2.11 อาหารและเครื่องดื่มหักที่เกี่ยวข้งกับแบคทีเรียกรดแลคติก

ชนิดของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก	แบคทีเรียกรดแลคติก
ผลิตภัณฑ์นม	
Hard cheeses without eyes	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i>
Cheeses with small eyes	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Swiss และ Italian-type cheeses	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lb. helveticus</i> , <i>Lb. casei</i> , <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Butter และ buttermilk	<i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> , <i>Lc. lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> subsp. <i>cremoris</i>
Yoghurt	<i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> , <i>S. thermophilus</i>
Fermented, probiotic milk	<i>Lb. casei</i> , <i>Lb. acidophilus</i> , <i>Lb. rhamnosus</i> , <i>Lb. johnsonii</i> , <i>B. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>B. breve</i>
Kefir	<i>Lb. kefir</i> , <i>Lb. kefiranofacies</i> , <i>Lb. brevis</i>
ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก	
Fermented sausage (Europe)	<i>Lb. sakei</i> , <i>Lb. curvatus</i>
Fermented sausage (USA)	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i>
Fermented fish products	<i>Lb. alimentarius</i> , <i>C. piscicola</i>
ผลิตภัณฑ์ผักดอง	
Sauerkraut	<i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>P. acidilactici</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>P. cerevisiae</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i>

ตารางที่ 2.11 (ต่อ) อาหารและเครื่องดื่มหมักที่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียกรดแลคติก

ชนิดของผลิตภัณฑ์อาหารหมัก	แบคทีเรียกรดแลคติก
Fermented olives	<i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Lb. pentosus</i> , <i>Lb. plantarum</i>
Ferment Vegetables	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. fermentum</i>
Soy sauce	<i>T. halophilus</i>
ผลิตภัณฑ์ธัญพืช	
Soudough	<i>Lb. sanfransiscensis</i> , <i>Lb. farciminis</i> , <i>Lb. fermentum</i> , <i>Lb. brevis</i> , <i>Lb. plantarum</i> , <i>Lb. amylovorus</i> , <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. pontis</i> , <i>Lb. panis</i> , <i>Lb. alimentarius</i> , <i>W. cibaria</i>
เครื่องดื่มแอลกอฮอล์	
Wine (malolactic fermentation)	<i>O. oeni</i>
Rice wine	<i>L. sakei</i>

^a*B.* = *Bifidobacterium*, *C.* = *Carnobacterium*, *Lc.* = *Lactococcus*, *Lb.* = *Lactobacillus*,

Leu. = *Leuconostoc*, *O.* = *Oenococcus*, *P.* = *Pediococcus*, *S.* = *Streptococcus*, *T.* =

Tetragenococcus, *W.* = *Weisella*.

ที่มา : Leroy และ De Vuyst. 2004

2.3.1 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการหมักเนื้อ

Hammes (1990) ได้ให้นิยามของกล้าเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการหมักเนื้อว่าเป็นจุลินทรีย์ซึ่งมีชีวิตหรือจุลินทรีย์ในระยะพักตัวซึ่งจะพัฒนากิจกรรมเมแทบอลิก (metabolic activity) ที่ต้องการในเนื้อ ตามหลักเกณฑ์ในการเลือกสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่จะใช้เป็นกล้าเชื้อที่เจริญได้ในสภาวะที่มีอากาศและไม่มีอากาศและเป็นพวกที่หมักคาร์โบไฮเดรตให้เกิดสารประกอบหลายชนิด (facultatively heterofermentative) ซึ่งสายพันธุ์นี้จะผลิตกรดแลคติกจากน้ำตาลเฮกโซส (hexose) เช่นกลูโคสและแลคโตส เนื่องจากผลิตภัณฑ์เหล่านี้เป็นผลิตภัณฑ์เมแทบอลิกจากวิถีไกลโคลิซิส (glycolysis) เนื่องจากกลูโคสที่อยู่ในเนื้อไม่เพียงพอต่อการผลิตกรดแลคติกซึ่งจะทำให้พีเอชลดลงอย่างเห็นได้ชัดจึงต้องมีการเติมกลูโคสลงไปร้อยละ 0.4 ถึง 0.7 โดยน้ำหนักต่อน้ำหนักในส่วนผสมของไส้กรอกสำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่หมักน้ำตาลแลคโตสได้ เช่น *Lactobacillus sakei* ซึ่งแลคโตสอาจถูกใช้ไปร้อยละ 0.5 ถึง 1.0 อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกรดแลคติกไม่ได้ทุกสายพันธุ์ที่จะ

สามารถหมักน้ำตาลแลคโตสได้อย่างง่ายและโดยเฉพาะจุลินทรีย์โพรไบโอติกบางชนิด เช่น *Lactobacillus rhamnosus* GG ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ ดังนั้นต้องคำนึงถึงคุณสมบัติของกล้าเชื้อก่อนนำมาใช้ประโยชน์ กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้หมักเนื้อจะผลิตทั้งกรดแลคติกและกรดอะซิติกจากการหมักน้ำตาลเพนโทส เช่น อะราบินโนส (arabinose) และไซโลส (xylose) ผ่านวิถี 6-phosphogluconate / phosphoketolase ซึ่งปริมาณกรดอะซิติกที่กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตขึ้นมีปริมาณ 1 ใน 10 ของปริมาณกรดแลคติกที่กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผลิตได้ ชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกในทางการค้าที่ใช้ในการหมักเนื้อ ได้แก่ *Lactobacillus casei*, *Lb. curvatus*, *Lb. pentosus*, *Lb. plantarum*, *Lb. sakei*, *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* (Tyopponen และคณะ. 2003)

ในการผลิตไส้กรอกหมักแห้งและกึ่งแห้งสามารถใช้เชื้อเดี่ยวเป็นกล้าเชื้อเช่น *Pediococcus cerevisiae*, *P. pentosaceum*, *Lb. plantarum* หรือ *Penicillium* spp. หรือสามารถหมักโดยใช้เชื้อผสม เช่น *P. cerevisiae* และ *Micrococcus varians* (ตารางที่ 2.12) บทบาทหลักๆของแบคทีเรียกรดแลคติกคือการผลิตกรดแลคติกอย่างรวดเร็วจากน้ำตาลกลูโคสที่เติมลงไปในส่วนผสมของไส้กรอก กรดแลคติกจะทำให้พีเอชของไส้กรอกหมักลดต่ำลง โดยวิธีนี้สามารถเพิ่มคุณภาพการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ นอกจากนี้กรดแลคติกยังให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์เนื้อและทำให้โปรตีนเสียสภาพ การเสียสภาพนี้จะทำให้จะให้น้ำถูกขับออก ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดลักษณะเนื้อสัมผัสของไส้กรอกหมัก (Smith และ Palumbo. 1983) นอกจากนี้กล้าเชื้อผสมของ *P. cerevisiae* และ *Micrococcus varians* ถูกใช้สำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก *P. cerevisiae* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติกได้มาก ส่วน *M. varians* เป็นสายพันธุ์ที่ผลิตกรดได้น้อย จุลินทรีย์ในกลุ่ม *Micrococci* ที่เติมลงไปจะช่วยปรับปรุงรสชาติและสีของไส้กรอก เอนไซม์อะไมเลสผลิตโดยจุลินทรีย์กลุ่ม *Micrococci* จะย่อยสลายเปอร้ออกไซด์ที่สร้างขึ้นโดยจุลินทรีย์หรือปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดขึ้นในเนื้อทำให้เกิดเปอร้ออกไซด์ซึ่งทำให้เกิดค้ำหนิในด้านของสีของไส้กรอกได้ Raccach และ Baker (1978) ได้แสดงให้เห็นว่า *P. cerevisiae* และ *Lb. plantarum* สามารถนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อทางการค้าสำหรับการหมักเนื้อซึ่งจะผลิตเปอร้ออกไซด์ในรูปของไฮโดรเจนเปอร้ออกไซด์ได้น้อยมาก Bartholomew และ Blumer (1997) ได้แนะนำให้เติมเชื้อ *P. cerevisiae* และ *Lb. plantarum* ลงในแฮมเพื่อลดระยะเวลาในการแปรรูปของ country-style ham ให้สั้นลง Tanaka และคณะ (1980) ได้เติมเชื้อ *Lb. plantarum* ลงในเบคอนที่มีซูโครสมากกว่าร้อยละ 0.5 การทำเช่นนี้สามารถลดระดับของไนไตรต์ที่จำเป็นต้องใช้ลงได้ กรดที่เกิดโดย *Lactobacillus* สามารถช่วยป้องกันการเจริญของ *Clostridium botulinum*

ดังนั้นความต้องการใช้ไมโครจีจึงลดลง เป็นที่น่าสนใจว่าการใช้กลูลินทรีย์จะไปช่วยเพิ่มอายุการเก็บรักษาของเนื้อ โดยเฉพาะเนื้อสด Kaletta และคณะ (1989) พบว่าการเติม *Lb. brevis* ลงไปในเนื้อบดจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบซึ่งทำให้อายุการเก็บรักษาของเนื้อเพิ่มขึ้นหลายวัน การใช้กล้าเชื้อผสมของ *P. cerevisiae* และ *Lb. plantarum* ในอัตราส่วน 50 ต่อ 50 จะช่วยยืดอายุการเก็บรักษาของเนื้อสัตว์และเนื้อสัตว์ปีกทั้งชนิดที่ปรุงสุกและเนื้อสดที่เลาะกระดูกออกเนื่องจากช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิด เช่น *Pseudomonas* นักวิจัยท่านอื่นได้รายงานว่าสามารถใช้แบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดในการยืดอายุการเก็บรักษาของเนื้อบดและเนื้อชิ้นหนาให้ยาวนานขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม Moon และคณะ (1982) ได้แสดงให้เห็นว่า *Streptococcus lactis* และ *Lb. casei* สามารถยับยั้งการเจริญของ *Pseudomonas* ในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ แต่ไม่มีประสิทธิภาพในการป้องกันการเน่าเสียของกึ่งในระหว่างการเก็บรักษาในน้ำแข็งได้ การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในการยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์เนื้อสดยังคงเป็นประเด็นที่ยังถกเถียงกันอยู่และยังคงต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อหาว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีศักยภาพในการเป็นจุลินทรีย์ที่ยับยั้งการเน่าเสียได้หรือไม่

ตารางที่ 2.12 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ชนิดของจุลินทรีย์	ชนิดของผลิตภัณฑ์เนื้อ
แบคทีเรีย	
1. <i>Pediococcus cerevisiae</i>	A. ไส้กรอกหมักกึ่งแห้ง ได้แก่ summer sausage, cervelat, Thuringer, pork roll, summer-style turkey sausage
	B. ไส้กรอกหมักแห้ง dry sausage, dry turkey sausage, salami, peperoni, hot bar sausage
	C. กระบวนการทำเนื้อ country-style ham
2. <i>Pediococcus pentosaceus</i>	A. ไส้กรอกหมักกึ่งแห้ง summer sausage
	B. ไส้กรอกหมักแห้ง peperoni, Genoa

ตารางที่ 2.12 (ต่อ) จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์เนื้อ

ชนิดของจุลินทรีย์	ชนิดของผลิตภัณฑ์เนื้อ
3. <i>Lactobacillus plantarum</i>	A. ไส้กรอกหมักกึ่งแห้ง summer sausage B. ไส้กรอกหมักแห้ง salami, European-type dry sausage C. กระบวนการทำเนื้อ bacon, country-style ham
4. <i>Lactobacillus brevis</i>	A. เนื้อสด minced meat
5. กล้าเชื้อผสมของ <i>P. cerevisiae</i> และ <i>L.plantarum</i>	A. ไส้กรอกหมักกึ่งแห้ง lebanon bologna, summer sausage, cervalet B. ไส้กรอกหมักแห้ง pepperoni, dry turkey sausage C. กระบวนการทำเนื้อ cooked , mechanically deboned poultry meat D. เนื้อสด mechanically deboned poultry meat, ground poultry breast meat E. ไส้กรอกหมักแห้ง Genoa, dry sausage

ที่มา : Smith และ Palumbo. 1983

2.3.2 หน้าที่ของแบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักเนื้อ

การหมักไส้กรอกเป็นการนำเนื้อหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ ผสมกับไขมันและเกลือไนเตรทหรือไนไตรต์ น้ำตาล พริกไทยดำ จากนั้นผสมให้เข้ากันแล้วนำบรรจุใส่ถุงหมักสักระยะและนำมาทำแห้ง ซึ่งสามารถถนอมผลิตภัณฑ์สุดท้ายไว้อย่างดีและยังสามารถเพิ่มอายุการเก็บรักษาโดยการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย การหมักเนื้อ โดยธรรมชาติแบคทีเรีย

กรดแลคติกได้มาจากวัตถุดิบหรือสภาพแวดล้อมซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากทั้งสองแหล่งจะผลิตกรดแลคติกจากการใช้คาร์โบไฮเดรต และทำให้ค่าพีเอชต่ำลง (5.8 ถึง 4.6) เนื่องจากพีเอชลดลงทำให้กล้ามเนื้อโปรตีน (muscle protein) จับตัวเป็นก้อนซึ่งทำให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเกิดความแข็งแรงและเกาะติดกัน sliceability การบ่มจะทำให้ค่าพีเอชลดลงและทำให้ใกล้เคียงค่า Isoelectric point ของโปรตีน การพัฒนาสีของไส้กรอกหมักจะเกิดขึ้นแม้ว่าอยู่ในสภาวะที่เป็นกรดก็ตามเมื่อไนตริกออกไซด์ผลิตไนไตรต์และสามารถทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน การยับยั้งจุลินทรีย์ที่เน่าเสียเป็นผลที่เกิดจากการสะสมกรดแลคติก เช่นเดียวกับกรดอะซิติก กรดฟอร์มิก กรดไขมัน เอทานอล แอมโมเนียม ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อะซิโตนัลดีไฮด์ ยาปฏิชีวนะ และสารแบคทีเรียโอซิน ในปัจจุบันนี้อุตสาหกรรมในการผลิตไส้กรอกมีคุณภาพสูงขึ้นซึ่งสามารถลดการแปรผันและเพิ่มคุณลักษณะในด้านสัมผัสซึ่งไม่สามารถทำให้เกิดได้ในการหมักที่เกิดโดยธรรมชาติ เมื่อ 40 ปีที่ผ่านมาได้มีการพัฒนาเกลือซึ่งสามารถลดระยะเวลาในการหมักและยังช่วยให้ปริมาณไนเตรทและไนไตรต์ในผลิตภัณฑ์ลดลงและทำให้คุณลักษณะด้านสัมผัสเป็นมาตรฐานขึ้น ปัจจุบันนี้เกลือซึ่งที่พบในวัตถุดิบไส้กรอกสามารถแบ่งออกเป็น 2 ประเภท ดังนี้ 1) First generation starter ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในวัตถุดิบประเภทพืชเช่น *Lb. plantarum*, *P. pentosaceus* เป็นต้น และ 2) Second generation starter ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในเนื้อและแบคทีเรียที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมักเนื้อ (Hugas และ Monfort. 1997)

จากการจัดจำแนกสายพันธุ์ Lactobacilli ที่ได้จากการหมักไส้กรอกแห้งของชาวสเปนโดยการหมักตามธรรมชาติสามารถคัดแยกได้ทั้งหมด 254 ไอโซเลต และได้สายพันธุ์ที่แตกต่างกัน 15 สายพันธุ์ คือ *Lb. sakei* พบมากที่สุดถึงร้อยละ 55 ตามด้วยสายพันธุ์ *Lb. curvatus* พบร้อยละ 26 และ *Lb. baviricus* พบร้อยละ 11 ส่วน *Lb. plantarum* พบร้อยละ 8 ดังนั้นสายพันธุ์ *Lb. sakei* และ *Lb. curvatus* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้กันมากใน Second generation starter และสายพันธุ์เหล่านี้สามารถควบคุมทั้งกระบวนการหมักและการบ่มได้ซึ่งยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นโดยธรรมชาติได้ การใช้ First generation starter สำคัญมากเพราะจะเป็นการเริ่มกระบวนการหมักและสามารถทำให้กระบวนการหมักเป็นไปตามต้องการได้ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติอาจจะทำให้เกิดคุณลักษณะที่ไม่พึงประสงค์ในด้านประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์สุดท้ายได้ โดย Lactobacilli ส่วนมากสามารถก่อให้เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และเปอร์ออกไซด์เหล่านี้จะทำให้เกิดสีที่ไม่ต้องการของ nitroso heme pigment ซึ่งใน Second generation starter จะมีกิจกรรมของเอนไซม์คะตะเลสและสามารถใช้เอนไซม์นี้กับ catalase -

positive cocci ทำให้สามารถหลีกเลี่ยงปัญหาในการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hugas และ Monfort. 1997)

2.4 สารแบคทีริโอซิน (bacteriocin)

2.4.1 คุณลักษณะของสารแบคทีริโอซิน

โดยทั่วไปไม่สามารถแยกสารแบคทีริโอซินได้ถ้าไม่มีเซลล์ที่ผลิตแบคทีริโอซินอยู่ด้วย นักวิจัยท่านอื่นพบว่าสารยับยั้งนี้จะถูกผลิตขึ้นเฉพาะในอาหารแข็งเท่านั้นและไม่เกิดในอาหารเหลวซึ่งการที่แบคทีริโอซินไม่ถูกสร้างขึ้นในอาหารเหลวเนื่องจากการผลิตกรดแลคติก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ หรือ สารยับยั้งอื่นที่สามารถแยกออกได้โดยวิธีไดอะลิซิส ซึ่งความไวต่อเอนไซม์โปรติเอสเป็นเกณฑ์สำคัญของคุณลักษณะของตัวยับยั้งที่เป็นสารแบคทีริโอซิน เนื่องจากสารแบคทีริโอซิน คือสารที่เป็นโปรตีน (proteinaceous substances) โดยทั่วไปแล้วสารแบคทีริโอซินถูกทำลายได้ด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic enzyme) ตัวอย่างเช่นเอนไซม์ trypsin, proteinase K, α -chymotrypsin, pepsin เป็นต้น นอกจากนี้รูปแบบความไวต่อเอนไซม์โปรติเอสอาจจะชี้ให้เห็นถึงลักษณะเด่นของแบคทีริโอซินที่แยกได้ เนื่องจากสารแบคทีริโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนไม่เหมือนกัน ในทางตรงกันข้ามรูปแบบของความไวต่อเอนไซม์โปรติเอสที่เหมือนกันประกอบด้วยกิจกรรมที่เหมือนกันอาจบ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียที่ผลิตสารแบคทีริโอซินนั้นเป็นแบคทีเรียชนิดเดียวกัน นอกจากนี้ความไวของสารแบคทีริโอซินต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่ได้มาจากกระเพาะอาหารและลำไส้เป็นสิ่งที่น่าสนใจมากเพราะเกี่ยวข้องกับการนำสารแบคทีริโอซินไปใช้ประโยชน์ในการใช้เป็นสารถนอมอาหารทางชีวภาพในอาหารคนและอาหารสัตว์ เนื่องจากหมายถึงว่าการย่อยสลายสารแบคทีริโอซินในทางเดินอาหารจะไม่ส่งผลกระทบต่อจุลินทรีย์ที่มีอยู่เดิมในลำไส้หรือระบบทางเดินอาหาร อย่างไรก็ตามสารแบคทีริโอซินบางชนิดอาจไม่มีความไวต่อเอนไซม์โปรติเอสบางชนิด ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารแบคทีริโอซินเหล่านี้มีส่วนประกอบที่เป็นโปรตีนขนาดเล็กซึ่งที่จริงแล้วสารแบคทีริโอซินโดยทั่วไปประกอบด้วยโมเลกุลของคาร์โบไฮเดรต ไขมันหรือฟอสฟอรัสอยู่ครั้งหนึ่ง การมีโมเลกุลที่ไม่ใช่โปรตีนอยู่ด้วยนี้สามารถยืนยันได้จากกรณีที่แบคทีริโอซินมีความไวต่อเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรต (α -amylase) เอนไซม์ย่อยไขมัน (lipase) และเอนไซม์ phospholipase เช่น สาร bacteriocin 466 และ lactocin 27 เป็นตัวอย่างของสารประกอบ

เชิงซ้อนของ lipocarbohydrate protein ส่วน caseisin LHS และ leuconocin S มีคุณสมบัติเป็น ไกลโคโปรตีน นอกจากนี้สารแบคทีเรียโอซินบางชนิดประกอบด้วยกรดอะมิโนที่พบไม่บ่อย เช่น $[\alpha, \beta\text{-unsaturated amino acid (lantibiotic) thioether amino acid (lantibiotic) หรือกรดอะมิโนที่มีพันธะเชื่อมไขว้ disulfide bridge (เช่น leucocin A-UAL187) และ thioether bridge (lantibiotic) เป็นต้น การที่กรดอะมิโนมีลักษณะแปลกๆ เช่นนี้ทำให้ยากต่อการศึกษาโครงสร้างขั้นต้น เช่น ภายหลังการแปลรหัสของ thioether amino acid ระหว่างการสังเคราะห์ lantibiotic เป็นผลให้เกิด การสร้างวงแหวนภายในโมเลกุลโดย monosulfur bridge โครงสร้างวงแหวนเช่นนั้นจะมีผลใน blank cycle ระหว่าง automated sequencing โดยวิธี Edman degradation สุดท้ายแล้วมวลโมเลกุล ของสารแบคทีเรียโอซินที่เกิดโดยแบคทีเรียกรดแลคติกอาจมีความแปรผันอย่างมาก ซึ่งโครงสร้าง ของสารแบคทีเรียโอซินแบ่งออกเป็นเปปไทด์สายเล็ก ๆ (เช่น lactacin 481, 1,700 คาลตัน) โปรตีน จับกับโปรตีน โปรตีนจับกับไขมัน และโมเลกุลขนาดใหญ่ที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 200,000 คาล- ตัน (Da) (เช่น lactacin 27, lactacin B, lactacin F, helveticin J) การจับรวมกันของสารประกอบ เหล่านี้อาจถูกทำลายได้โดยใช้วิธี ultrafiltration หรือโดยการใช้ detergent หรือ ยูเรีย ซึ่งการทำลาย นี้บ่อยครั้งจะทำให้เกิด โมโนเมอร์ซึ่งจะแยกที่ฟามากกว่าสารประกอบเชิงซ้อนของแบคทีเรียโอซิน คั้งเดิม ตัวอย่างเช่น ในการทำ polyacrylamine gel electrophoresis ของ lactacin 27 ในสภาพที่มีสาร SDS ได้แสดงให้เห็นว่าโมเลกุลที่แยกที่ฟเป็น โปรตีนที่มีมวลโมเลกุล 12,400 แทนที่จะเป็น 200,000 เมื่อหาโดยวิธี column chromatography นอกจากนี้แบคทีเรียสปีชีส์ต่างกันแต่อยู่ในจีนัส เดียวกันอาจผลิตสารแบคทีเรียโอซินที่มีมวลโมเลกุลแตกต่างกันได้ การทำสารแบคทีเรียโอซินให้ บริสุทธิ์ทำได้ยากโดยเฉพาะสารแบคทีเรียโอซินที่เกิดโดยแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่งปัญหาที่พบใน ระหว่างการทำบริสุทธิ์เกี่ยวข้องกับความชอบของโมเลกุลที่จะรวมกับ โมเลกุลของสารอื่น ความไม่ ชอบน้ำ (hydrophobicity) เป็นต้น การที่สารตั้งต้นต่างชนิดกัน (heterogenous group of substance) ในการทำแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดให้บริสุทธิ์จึงต้องใช้วิธีที่เฉพาะซึ่งเหมาะสมสำหรับสาร แบคทีเรียโอซินแต่ละชนิด สิ่งนี้อาจอธิบายได้ว่าทำไมสารแบคทีเรียโอซินเพียงน้อยชนิดเท่านั้นที่ ถูกทำให้บริสุทธิ์เป็นเนื้อเดียวกัน เช่น ไนซิน (nisin), bacteriocin 466, lactocin 27, diplococcin, lactacin B, helveticin J, pediocin AcH, caseicin 80, lactacin F, lactococcin A, lactococcin 85LO30, lactocin S, carnobacteriocin A และ B, carnocin UI49, lactacin 481, pediocin PA-1, curvacin A, sakacin P, mesenteriocin Y105, sakacin A และ lactococcin G (De Vuyst และ Vandamme. 1994)$

2.4.2 การจำแนกสารแบคทีเรียโอซิน

สารแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียแกรมบวก เช่น แบคทีเรียกรดแลคติกมีเปปไทด์ขนาดเล็ก 3 ถึง 6 kDa (Nes. 1992) ได้มีนักวิทยาศาสตร์แบ่งกลุ่มของสารแบคทีเรียโอซินออกเป็น 4 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 สารแบคทีเรียโอซินที่เป็นแลนติไบโอติก (lantionine-containing bacteriocin หรือ lantibiotic) มีขนาดเล็ก (ประกอบด้วยกรดอะมิโน 19 ถึง 37 กรดอะมิโน) เป็นสารแบคทีเรียโอซินที่มีความคงตัวต่อความร้อน ตัวอย่างสารแบคทีเรียโอซิน เช่น lacticin 481, lactocin S, carnocin UI49 และ ไนซิน (ตารางที่ 2.13) (De Vuyst และ Vandamme. 1994)

กลุ่มที่ 2 สารแบคทีเรียโอซินที่ไม่ใช่แลนติไบโอติกมีความคงตัวต่อความร้อนต่ำ (Non-lantibiotics) (มีขนาดเล็กกว่า 15,000 Da) ความคงตัวต่อความร้อนตั้งแต่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลามากกว่า 30 นาที ถึงอุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ตัวอย่างสารแบคทีเรียโอซิน เช่น diplococcin, lactococcin A, lactocin 27, lactacin B, lactacin F, sakacin A, pediocin PA-1, leucocin A-UAL187, carnobacteriocins (De Vuyst และ Vandamme. 1994) สามารถแบ่งออกเป็น 1) แบคทีเรียโอซินกลุ่ม pediocin-like bacteriocin ตัวอย่างเช่น pediocin PA-1, sakacin A, sakacin P, leucocin A-UAL187, curvacin A, mesenteriocin Y105 และ carnobacteriocin B2 และ 2) แบคทีเรียโอซิน lactococcin-like bacteriocin สารแบคทีเรียโอซินที่อยู่ในกลุ่มเดียวกันจะมีลำดับกรดอะมิโนใน N - terminus บางตัวเหมือนกัน (Nes. 1992)

กลุ่มที่ 3 สารแบคทีเรียโอซินที่ไม่ใช่แลนติไบโอติกซึ่งมีขนาดใหญ่ (Non-lantibiotics) มีขนาดมากกว่า 15,000 ดาลตัน มีความไวต่อความร้อน ไม่ทำงานที่อุณหภูมิ 60 ถึง 100 องศาเซลเซียส ภายในเวลา 10 ถึง 15 นาที ตัวอย่างสารแบคทีเรียโอซินเช่น helvaticin J, acidophilucin A, lacticin A และ B (De Vuyst และ Vandamme. 1994)

กลุ่มที่ 4 สารแบคทีเรียโอซินที่มีองค์ประกอบของโปรตีนผสมกับไขมันและคาร์โบไฮเดรตซึ่งแบคทีเรียโอซินกลุ่มนี้ส่วนใหญ่กิจกรรมของแบคทีเรียโอซินมาจากส่วนใส (cell-free supernatant) ตัวอย่างเช่นกิจกรรมของ *Lb. plantarum* LPCO10 จะไม่ถูกทำลายโดยการทรีตด้วยเอนไซม์โปรติเอสแต่จะถูกทำลายด้วยไกลโคไลติก (glycolytic) และเอนไซม์ย่อยไขมัน (lipolytic enzyme) (Jimenez-Diaz และคณะ. 1993)

ตารางที่ 2.13 เปปไทด์ที่ต่อต้านจุลินทรีย์ (peptide-bacteriocins) ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

สารแบคทีริโอซิน lantibiotics (modified bacteriocin)		สารแบคทีริโอซิน (unmodified bacteriocin)	
ชนิด A	ชนิด B	สารแบคทีริโอซิน 1 เปปไทด์	สารแบคทีริโอซิน 2 เปปไทด์
ไนซิน (nisin)	NK ^a	Pediocin-like bacteriocins	- lactococcin G
- lactocin S		- pediocin PA1	- lactacin F
- lactacin 481		- leucocin A	- plantaricin E/F
- carnocin UI49		- sakacin P	- plantaricin J/K
ไซโทไลซิน (cytolysin)		- carvacin A	- lactobin A
		- mesenteriocin Y 105	- plantaricin S
		- carnobacteriocin BM1	- pediocin L50
		- carnobacteriocin B2	- thermophilin 13
		- enterocin A	
		- piscicolin 126	
		- bavaricin MN	
		- piscicocin V1a	
		Non- pediocin-like bacteriocins	
		- lactococcin A และ B	
		- crispacin A	
		- divergicin 750	
		- lactococcin 972	
		- enterocin B	
		- carnobacteriocin A	

NK^a ยังไม่ทราบเกี่ยวกับแบคทีริโอซินชนิด B ที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่มา : Aly และคณะ. 2006

2.5 คุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารแบคทีเรียโอซิน

2.5.1 องค์ประกอบทางเคมี

แบคทีเรียโอซินประกอบด้วยกลุ่มของสารต่างชนิดกัน (heterogenous group) ถึงแม้ว่าจะประกอบด้วยสารที่มีความแตกต่างกันทางเคมีแต่คุณสมบัติหนึ่งที่เป็นจุดเด่นของแบคทีเรียโอซินก็คือมีโปรตีนเป็นส่วนสำคัญ การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ที่จำเพาะ (โปรติเอสและไลเปส เป็นต้น) ถูกนำมาใช้ในการจัดจำแนกองค์ประกอบทางเคมีของโมเลกุลสารแบคทีเรียโอซิน จากหลักการนี้มีผู้รายงานว่า streptocin STH อาจเป็นโมเลกุลที่ประกอบด้วยหมู่ของโปรตีน ไขมันและฟอสเฟตที่สำคัญ การวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสารแบคทีเรียโอซินบ่งชี้ได้ว่าสารแบคทีเรียโอซินบางชนิดประกอบด้วยโปรตีนอย่างง่าย อย่างไรก็ตามจากขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียโอซินของ *Staphylococcal*, *Clostridial* และ *Lactobacillus* เป็นโมเลกุลที่ค่อนข้างซับซ้อนซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของไขมันและคาร์โบไฮเดรตนอกเหนือจากโปรตีนที่มีอยู่ในโมเลกุลสำหรับองค์ประกอบของ staphylococin 414 คล้ายกับองค์ประกอบโปรตีนในเยื่อหุ้มเซลล์ของ *Staphylococcus* จากการวิเคราะห์สาร colicins พบว่ามีส่วนประกอบของแอกทิฟโปรตีนที่ซับซ้อนซึ่งมีไลโปพอลิแซคคาไรด์แอนติเจน (lipopolysaccharide antigen) อยู่ที่บริเวณผิวเซลล์ของแบคทีเรียที่สร้างสาร colicins นั้น โมเลกุลของสาร butyricin 7423 และ perfringocin 11105 ประกอบด้วยส่วนที่เป็นแอมฟิฟิลิกโปรตีน (amphiphilic protein) และคาดการณ์ว่ามีส่วนที่ไม่ชอบน้ำอยู่ด้วยซึ่งอาจช่วยให้การกระทำกับเยื่อหุ้มเซลล์ของจุลินทรีย์ที่มีความไวต่อสารแบคทีเรียโอซินเกิดได้ง่ายขึ้น (Tagg และคณะ. 1976)

2.5.2 คุณลักษณะทางกายภาพ

สารที่จัดเป็นแบคทีเรียโอซินประกอบด้วย โปรตีนขนาดต่างๆ กัน อยู่ในช่วงตั้งแต่ขนาดโมเลกุลเล็กอย่างง่ายและมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น streptococin A-FF22 มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 8,000 ดาลตัน จนกระทั่งถึงขนาดโมเลกุลใหญ่ที่ซับซ้อนมีน้ำหนักโมเลกุลมากถึง 10^6 แบคทีเรียโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำโดยทั่วไปแล้วจะมีความไวต่อเอนไซม์ทริปซิน (trypsin) สูงแต่มีความไวต่อความร้อนต่ำ นักวิจัยได้เคยตรวจสอบแบคทีเรียโอซินในกลุ่มที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนและพยายามที่จะศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของสารแบคทีเรียโอซินกับโครงสร้างที่เห็นภายใต้กล้อง ซึ่งคุณลักษณะของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตโดยแบคทีเรีย

แกรมบวคที่พบได้บ่อยคือมีโครงสร้างทางกายภาพ 2 แบบหรือมากกว่านั้น ซึ่งโมเลกุลของสารแบคทีเรียโอซินที่แตกต่างกันในแบคทีเรียโอซินเหล่านี้ ดูเหมือนว่าจะมีความสมดุลในแง่ของสัดส่วนของโมเลกุลที่มีขนาดเล็กและโมเลกุลขนาดใหญ่ที่รวมกันอยู่โดยค่าพีเอชและความแรงของไอออน (ionic strength) จะมีอิทธิพลต่อแบคทีเรียโอซินเหล่านี้ (Tagg และคณะ. 1976)

2.5.3 ความคงตัวของสารแบคทีเรียโอซิน

ความคงตัวของสารแบคทีเรียโอซินจะลดลงอย่างมาก เมื่อสารแบคทีเรียโอซินถูกทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นและพบว่าการเติม bovine serum albumin จะช่วยป้องกันสารแบคทีเรียโอซินที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์จากการถูกยับยั้งการทำงาน (inactivation) ตัวอย่างสารแบคทีเรียโอซิน เช่น staphylococcin 1580 และสารปฏิชีวนะที่เกิดจาก *Staphylococcus aureus* จะมีความไวสูงต่อการเสียสภาพทางกล (mechanical denaturation) (Tagg และคณะ. 1976)

ความคงตัวของสารแบคทีเรียโอซินแต่ละชนิดมีความแตกต่างกันอย่างมาก โดยความไวของสารแบคทีเรียโอซินต่อการถูกยับยั้งการทำงานเมื่อมีการเปลี่ยนแปลงพีเอชสารแบคทีเรียโอซิน และ bacteriocin-like substrate ส่วนใหญ่สามารถทนกรดได้สูงกว่าด่าง ซึ่งหลักเกณฑ์ของความคงตัวต่ออุณหภูมิของสารแบคทีเรียโอซินสามารถอธิบายได้ยากเนื่องจากขึ้นอยู่กับขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์และปัจจัยอื่นๆ เช่น พีเอช ความแรงของไอออนและการมีโมเลกุลที่ช่วยปกป้องสารแบคทีเรียโอซินจากการเสียสภาพอยู่ด้วย (protective molecules) ซึ่งตารางที่ 2.14 แสดงคุณลักษณะทางกายภาพของสารแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวค (Tagg และคณะ. 1976)

ตารางที่ 2.14 คุณลักษณะทางกายภาพของสารแยกเทอริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก

สารแยกเทอริโอซิน	การทนความร้อน	น้ำหนักโมเลกุล	ผลของพีเอช	ความไวต่อเอนไซม์	
				ความไวต่อเอนไซม์	การทนต่อเอนไซม์
megacin A - 216	R 60°C for 30 min	5.1 × 10 ⁴	stable pH 2-7	chymotrypsin	
	S 80°C for 30 min		unstable pH > 7.5	pepsin	
megacin B - B1	S 60°C for 60 min	5.0 × 10 ⁴		trypsin	trypsin
megacin C - C4MA	S 60°C for 60 min	1.5 × 10 ⁵			α-chymotrypsin
megacin C _x - 337	S 60°C for 60 min	1.6 × 10 ⁵		pepsin	trypsin
				pepsin	papain
				α-chymotrypsin	trypsin
				pepsin	
				α-chymotrypsin	
				papain	

ตารางที่ 2.14 (ต่อ) คุณลักษณะทางกายภาพของสารเบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก

สารเบคทีเรียโอซิน	การทนความร้อน	น้ำหนักโมเลกุล	ผลของพีเอช	ความไวต่อเอนไซม์	
				ความไวต่อเอนไซม์	การทนต่อเอนไซม์
clostocin A	R 100°C for 30 min	nondialyzable	stable pH 4-9	trypsin	RNase ^b
				chymotrypsin	DNase ^c
				pronase P	
clostocin B	S 80°C for 10 min	nondialyzable	stable pH 4-9	trypsin	RNase
				chymotrypsin	DNase
				pronase P	
clostocin C	S 80°C for 10 min	nondialyzable	stable pH 4-9	trypsin	RNase
				chymotrypsin	DNase
				pronase P	

ตารางที่ 2.14 (ต่อ) คุณลักษณะทางกายภาพของสารแบคทีเรียที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก

สารแบคทีเรียไอซอิน	การทนความร้อน	น้ำหนักโมเลกุล	ผลของพีเอช	ความไวต่อเอนไซม์	
				ความไวต่อเอนไซม์	การทนต่อเอนไซม์
clostocin D	R 100°C for 30 min	nondialyzable	stable pH 4-9	trypsin	RNase
boticin E – S5 (small form)	R 100°C for 10 min	$< 3.0 \times 10^4$	stable pH 1.1-9.5	chymotrypsin pronase P trypsin	DNase DNase
			unstable pH > 12.4	chymotrypsin	DNase
boticin E – S5 (large form)	R 100°C for 10 min	$> 4.0 \times 10^7$		pepsin	pepsin
				trypsin	DNase
boticin P	S 60°C for 30 min	$> 4.0 \times 10^6$	stable pH 6.5-7.5	chymotrypsin trypsin	DNase DNase RNase
					alkaline phosphatase phospholipases C,D

ตารางที่ 2.14 (ต่อ) คุณสมบัติทางกายภาพของสารเบคทีริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก

สารเบคทีริโอซิน	การทนความร้อน	น้ำหนักโมเลกุล	ผลของพีเอช	ความไวต่อเอนไซม์	
				ความไวต่อเอนไซม์	การทนต่อเอนไซม์
butyricin 7423	R 100°C for 10 min	3.25×10^4	stable pH 2-12	trypsin	
perfringocin 11105	R 100°C for 30 min	7.6×10^4	stable pH 2-12	trypsin	
perfringocin a - BP ₆ K	S 50°C for 15 min	nondialyzable	stable pH 4-10	trypsin	
perfringocin b -1127	S 55°C for 15 min	nondialyzable	inactive pH 1-3	papain	
perfringocin c -541	S 55°C for 30 min		stable pH 4-10		
perfringocin d -496	S 55°C for 15 min		inactive pH 1-3		
bacteriocin 28 of <i>Clostridium perfringens</i>	S 55°C for 30 min		stable pH 4-10		
			inactive pH 1-3	trypsin	
lactocin LP27	R 100°C for 60 min	1.24×10^{4d}		trypsin	ficin

ตารางที่ 2.14 (ต่อ) คุณสมบัติทางกายภาพของสารเบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก

สารเบคทีเรียโอซิน	การทนความร้อน	น้ำหนักโมเลกุล	ผลของพีเอช	ความไวต่อเอนไซม์	ความไวต่อเอนไซม์	การทนต่อเอนไซม์
bacteriocin 466 of <i>Lactobacillus fermenti</i>	R 96°C for 30 min	nondialyzable		trypsin	lysozyme	
listeriocins D,S	R 45°C for 30 min		stable pH 5-10	pepsin		trypsin
	S 50°C for 15 min		inactive pH 1-4			
listeriocins L,W	R 56°C for 30 min		stable pH 4.2-10			trypsin
	S 60°C for 15 min		inactive pH 1-4			
staphylococin C55	R 100°C for 15 min	$>1.0 \times 10^5$	stable pH 4-8.5	pronase		
				trypsin		
staphylococin 414	R 70°C for prolonged time	1.25×10^{4d}	stable pH 8	trypsin	ficin	
				pronase		
staphylococin 462	R 50°C for 24 h	9.0×10^{3d}		pronase		lipase
	S 70°C for 3 h			ficin		
				chymotrypsin		

ตารางที่ 2.14 (ต่อ) คุณลักษณะทางกายภาพของสารเบคทีเรียที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก

สารเบคทีเรียไอซัน	การทนความร้อน	น้ำหนักโมเลกุล	ผลของพีเอช	ความไวต่อเอนไซม์	
				ความไวต่อเอนไซม์	การทนต่อเอนไซม์
staphylococin 1580	R 120°C for 15 min	2.0×10^4 ^d	stable pH 3.5-8.5	trypsin	lysozyme
staphylococin A-1262a	R 100°C for 60 min		stable pH 1-10	pronase	lyso-staphin
	R 100°C for 60 min			chymotrypsin	
streptococin A -FF22	R 100°C for 60 min	8.0×10^3	stable pH 2-7	trypsin	trypsin
	S 60°C for 10 min	3.0×10^4 ^d	inactive in alkali	pronase	pepsin
streptocin STH ₁	R 100°C for 60 min		biphasic stability	trypsin	DNase
	S 60°C for 10 min		at pH 5 and 10	phospholipase C	RNase
streptococin B-73	R 120°C for 15 min			alkaline phosphatase	phospholipase D
	S 80°C for 20 min	1.0×10^4		pepsin	chymotrypsin
				trypsin	α -amylase

ตารางที่ 2.14 (ต่อ) คุณสมบัติทางกายภาพของสารเบคทีริโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแกรมบวก

สารเบคทีริโอซิน	การทนความร้อน	น้ำหนักโมเลกุล	ผลของพีเอช	ความไวต่อเอนไซม์	ความไวต่อเอนไซม์
streptococcin B-74628	R 100°C for 60 min	1.0×10^4 ^d	stable pH 2-6.5	pronase	การทนต่อเอนไซม์
viridin B	S 65°C for 30 min	nondialyzable	inactive in alkali pH 5-8	trypsin trypsin protease	การทนต่อเอนไซม์
enterococcin E-1	S 80°C for 20 min	dialyzable			trypsin

หมายเหตุ ^aR, Resistance ; S, Sensitivity at temperature

^bRNase, Ribonuclease

^cDnase, Dioxiribonuclease

^dThese bacteriocins exist in more than one form, with different molecular weight ; the ones shown are for smallest form.

ที่มา : Tagg และคณะ. 1976

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 ตัวอย่างอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก

ตัวอย่างอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมักที่ใช้ในการทดลองมีทั้งหมด 52 ตัวอย่าง ได้แก่ กุ้งขาวสด (*Litopenaeus vannamei*) 10 ตัวอย่าง กุ้งจ่อม 10 ตัวอย่าง หอยแมลงภู่งสด (*Perna viridis*) 10 ตัวอย่าง หอยแมลงภู่งดอง 12 ตัวอย่าง และปลาจ่อม 10 ตัวอย่าง จากตลาดบ้านเพ จ.ระยอง ตลาดวัดหลวงพ่อ โสธร จ. ฉะเชิงเทรา ตลาดสดตราด ตลาดคลองใหญ่ จ.ตราด ตลาดประสิทธิ์ ตลาดนัดวันพุธ ตลาดคลองถม ตลาดหน้าค่ายจักรพงษ์ ตลาดนัดวันอังคาร ตลาดบ้านสร้าง ตลาดดงขี้เหล็ก ตลาดดงพระราม ตลาดสามแยกนเรศวร จ.ปราจีนบุรี ตลาดราชบุรี จ.ราชบุรี ตลาดสดรังสิต จ.ปทุมธานี ตลาดสดปากเกร็ด จ.นนทบุรี และตลาดหัวตะเข้ จ. กรุงเทพมหานคร

3.1.2 เชื้อจุลินทรีย์

แบคทีเรียที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งมีจำนวนทั้งหมด 8 ชนิด ได้แก่ *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 และ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 ได้จากศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางการแพทย์สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์สาธารณสุข กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 และ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 541 ได้จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย และ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 แยกได้จากกุ้งแช่บ๊วยสด (นวรรตน์ โพธิราช และ ประทุม แสนมา. 2549)

3.1.3 อาหารเลี้ยงเชื้อ สารละลายที่ใช้ทำเจือจางตัวอย่าง สารเคมีและเอนไซม์

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดลอง ได้แก่ deMan Rogosa Sharpe Broth/deMan Rogosa Sharpe Agar/deMan Rogosa Sharpe Soft Agar (MRS, พีเอช 7.2 ± 0.2 , Difco), MRS Agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนตร้อยละ 0.5, MRS Agar ที่เติมกลูโคสร้อยละ 0.2, Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE Soft Agar, 7.1 ± 0.2), Tryptic Soy Broth / Tryptic Soy Agar (TSB/TSA, pH 7.1

± 0.2 , Difco), MRS Broth ที่เติมกรดอะมิโนร้อยละ 0.1 (ประกอบด้วย L-tyrosine, L-histidine monohydrochloride, L-ornithine monohydrochloride และ L-lysine monohydrochloride, บริษัท Merck) Decarboxylation Medium, Gibson's Semi Solid Tomato Juice Medium, Nutrient Agar (NA), API 50 CHL Medium และ Luria-Bertani (LB) Broth

สารละลายที่ใช้เจือจางตัวอย่างได้แก่ สารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ สารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองได้แก่ แคลเซียมคาร์บอเนต กลีเซอรอล สารละลายกรดแลคติก ความเข้มข้นร้อยละ 85 สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 โมลาร์ สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ เกลื่อน้ำดี (porcine bile salt) เกลือโซเดียมคลอไรด์ สารเคมีสำหรับการทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase (ได้แก่ pyridoxal-5-phosphate, thiamine และ bromocresol purple) บัฟเฟอร์ฟอสเฟต (phosphate buffer) ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ สารเคมีสำหรับย้อมแกรม (ได้แก่ สีย้อมคริสตัลไวโอเลต สารละลายไอโอดีน เอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 และสีย้อมซาฟรานีน) และสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 3

สารเคมีสำหรับการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ได้แก่ บัฟเฟอร์ PCR ใดคือออกซินิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต ไพรเมอร์ FDNA ไพรเมอร์ RDNA อะกาโรส (agarose) เจลสตาร์ (gelstar) และสีย้อมดีเอ็นเอ (tracking dye) kanamycin (บริษัท Sigma ประเทศเยอรมนี) IPTG (บริษัท Amresco ประเทศสหรัฐอเมริกา) X gal (บริษัท Biobasic ประเทศแคนาดา) Taq DNA polymerase (บริษัท Promega ประเทศสหรัฐอเมริกา)

เอนไซม์ชนิดต่างๆ ได้แก่ เอนไซม์ catalase (จาก bovine liver จากบริษัท Fluka) เอนไซม์ α -chymotrypsin (จาก bovine pancreas จากบริษัท Merck) เอนไซม์ trypsin (จาก porcine pancreas จากบริษัท Fluka) เอนไซม์ protease (จาก *Streptomyces griseus* จากบริษัท Sigma) เอนไซม์ pepsin (จาก porcine gastric mucosa จากบริษัท Fluka) เอนไซม์ α -amylase (จาก *Aspergillus oryzae* จากบริษัท Fluka) เอนไซม์ lipase (จาก porcine pancreas จากบริษัท Fluka) เอนไซม์ Taq DNA polymerase (จากบริษัท Promega) และเอนไซม์ EcoRI (จากบริษัท Biolabs)

ชุดทดสอบ (kit) ต่างๆ สำหรับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยวิธีทางชีวเคมี ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH kit และโดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ได้แก่ชุดสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอสำหรับแบคทีเรียแกรมบวก (MasturePure™ Gram Positive DNA Purification Kit บริษัท EPICENTRE® ประเทศ สหรัฐอเมริกา) ชุดทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (QIAquick PCR purification kit บริษัท Qiagen ประเทศ เยอรมนี) ชุดสำหรับโคลนนิ่งดีเอ็นเอ (QIAGEN PCR Cloning Kit บริษัท Qiagen ประเทศ เยอรมนี) และชุดสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ (QIAprep® Spin Miniprep Kit บริษัท Qiagen ประเทศ เยอรมนี)

3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

เครื่องมือที่ใช้ในการทดลองได้แก่ หม้อนึ่งฆ่าเชื้อความดันสูง (บริษัท Tommy, รุ่น SS-325) เครื่องหมุนเหวี่ยง (บริษัท Harmle, รุ่น Z383K) ตู้ถ่ายเชื้อ (บริษัท Astec Microflow, รุ่น ABS 1200) ตู้บ่มเชื้อ (บริษัท Memmert, รุ่น 600) เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Microplate reader/Washer, บริษัท Labsystems, รุ่น iEM Reader MF) เครื่องวัดพีเอชสำหรับอุตสาหกรรมอาหาร (pH meter, บริษัท Testo, รุ่น 205) และเครื่องวัดพีเอช (pH meter, บริษัท Cyberscan, รุ่น 2000) เครื่องตีปั่น (Stomacher, บริษัท IUL instrument) เครื่องวัดสี (บริษัท มินอลต้า รุ่น CR-300) เครื่องวัดค่ากิจกรรมของน้ำ (บริษัท Aqualab, รุ่น series 3 TE) และเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรม (PCR thermal cycler, บริษัท Perkin Elmer รุ่น DNA thermal cycler 480) เครื่องทำแห้งแบบใช้ความเย็น (Freeze-Dry, บริษัท Helo LyoLab, รุ่น 3000) และอุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การวิเคราะห์หาจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก

3.2.1.1 การตรวจหาปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด

การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในกุ้งสด กุ้งจ่อม หอยแมลงภู่สด หอยแมลงภู่คองและปลาจ่อมด้วยเทคนิค spread plate ทำโดยชั่งตัวอย่างๆละ 25 กรัมด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ และเติมสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นด้วยเครื่องตีปั่น เป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตน ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จนถึงระดับความเจือจาง $1 : 10^7$ จากนั้นปิเปตตัวอย่างที่ระดับความเจือจาง 10^5 ถึง 10^7 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็ง MRS

(พีเอช 7.2 ± 0.2 , Difco) ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 ระดับความเจือจางละ 3 งาน เกลี่ยตัวอย่างด้วยแท่งแก้วปราศจากเชื้อ นำไปบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกบนงานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนี 25 ถึง 250 โคโลนี คำนวณหาจำนวนโคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (อดิสร เสวตวิวัฒน์. 2539)

3.2.1.2 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการแยกเชื้อจากโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียกรดแลคติกในข้อ 3.2.1.1 ที่มีวงใส (clear zone) รอบ ๆ โคโลนี สุ่มเลือกโคโลนีทั้งหมด 222 ไอโซเลต โดยนำลูปปราศจากเชื้อแตะโคโลนีเดี่ยวนำมาลาบนอาหารแข็ง MRS ด้วยเทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อใส่ในอาหารเหลว MRS ที่เติมกลีเซอรอลร้อยละ 20 ที่บรรจุในหลอดทนความเย็น นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อการเก็บรักษาเชื้อสำหรับการวิเคราะห์ในขั้นต่อไป

3.2.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อการทดสอบ

ทำการเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตลงในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งทำการล้างเซลล์ 2 ครั้ง ในการล้างเซลล์แต่ละครั้งเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที เทส่วนใสทิ้งไปและทำซ้ำเช่นเดิมจนครบ 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์โดยเติมสารละลายเปปโตนความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ผสมให้เข้ากันและปรับความขุ่นของเซลล์แต่ละสายพันธุ์ให้เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 2

3.2.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น

การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น โดยแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 222 ไอโซเลตทำได้โดยใช้วิธี agar spot test (Schillinger และ Locke. 1989) โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากข้อ 3.2.1.2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปเซนตริฟิวส์ ล้างเซลล์และทำให้ได้สารแขวนลอย

ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตด้วยวิธีการตามข้อ 3.2.2 และนำมาปริมาณ 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.2 ซึ่งแต่ละจานเพาะเชื้อใส่เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบลงไปจานละ 6 ไอโซเลต ทำ 3 ซ้ำและบ่มในสภาวะที่ไม่มีอากาศใน anaerobic jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งจำนวน 8 ชนิด ได้แก่ *E. coli*, *L. monocytogenes*, *P. fluorescens*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* และ *V. parahaemolyticus* SH1 ในอาหารเหลว TSB ส่วนเชื้อ *P. acidilactici* และ *Lb. bulgaricus* เพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นเชื้อ *P. fluorescens* บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นำไปปั่นเหวี่ยง ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ทำให้เป็นสารแขวนลอยเซลล์และปรับให้เซลล์มีความขุ่นเท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 (มีความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFU ต่อมิลลิลิตร) จะได้สารแขวนลอยของเชื้อที่จะใช้ทดสอบแต่ละชนิด จากนั้นเปิดสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียแต่ละชนิดปริมาณ 0.5 มิลลิลิตร ลงในอาหาร MRS Soft Agar (สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบ) หรือ TSYE Soft Agar (สำหรับแบคทีเรียชนิดอื่นที่นำมาทดสอบ) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องเขย่าแล้วเทเชื้อแต่ละชนิดลงบนอาหารแข็ง MRS ที่มีกลูโคสร้อยละ 0.2 ที่บ่มแล้วข้างต้น และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นของแบคทีเรียกรดแลคติกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกิดบริเวณใส (Clear zone) รอบๆ โคลินีในอาหารที่มีเชื้อแต่ละชนิดที่ใช้ในการทดสอบเพื่อนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2.4 การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก กลีโกลิซีน และโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.2.4.1 การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่แยกได้ตามวิธีการของ (Chung และคณะ. 1999) ซึ่งทำได้โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 5 โมลาร์ ให้ได้พีเอช 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 จากนั้นเปิดอาหารเหล่านี้ที่แต่ละระดับพีเอช ปริมาตร 190 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุมของ microtiter plate และเติมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เตรียมไว้ตามวิธีการข้อ 3.2.2 ลงในทุกหลุมปริมาตรหลุมละ 10 ไมโครลิตร (ร้อยละ 5 โดยปริมาตรต่อปริมาตร) จากนั้น

นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ก่อนบ่มและหลังบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร หาค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตสามารถเจริญได้ โดยเชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้จนทำให้เกิดความขุ่นเพิ่มมากขึ้นสังเกตจากค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มมากขึ้นกว่าก่อนบ่ม

3.2.4.2 การทดสอบการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบการทนต่อกรดแลคติกด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.1 ในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชด้วยกรดแลคติกความเข้มข้นร้อยละ 85 ให้ได้พีเอช 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0 และ 7.0 หาค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้

3.2.4.3 การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติก

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกใช้วิธีการเดียวกันกับข้อ 3.2.4.1 โดยอาหารเหลว MRS มีการเติม porcine bile ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 0.15, 0.3, 0.5, 1.0 และ 1.5 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) ปรับพีเอชให้ได้เท่ากับ 8 และ หาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้

3.2.4.4 การทดสอบการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ทำการทดสอบโดยใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.4.1 ในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติมเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0 และ 11.0 (โดยน้ำหนักต่อปริมาตร) และหาค่าความเข้มข้นสูงสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้

3.2.5 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity

ในขั้นแรกทำการกระตุ้นแบคทีเรียที่จะทดสอบ (activity of microbial cultures) เพื่อให้เกิดการชักนำการสร้างเอนไซม์ก่อนการทดสอบจริง โดยนำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้แต่ละไอโซเลตมาถ่ายเชื้อ 5 ครั้ง ในอาหารเหลว MRS ที่เติมกรดอะมิโนทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ L-tyrosine, L-histidine monohydrochloride, L-ornithine monohydrochloride และ L-lysine monohydrochloride แต่ละความเข้มข้นร้อยละ 0.1 และ pyridoxal-5-phosphate ร้อยละ 0.005 หลังจากการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นที่ 2 ทำการทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity (ไม่ก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิคเอมีน) ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกตามวิธีการของ (Bovid-Cid และ Holzapfel, 1999) โดยนำแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่ผ่านการกระตุ้น มาลาภบนอาหารแข็ง Decarboxylation Medium (ประกอบด้วย ทริปโตน 5 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม เนื้อสกัด 5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 2.5 กรัม กลูโคส 0.5 กรัม tween 80 1 มิลลิลิตร $MgSO_4$ 0.2 กรัม $MnSO_4$ 0.05 กรัม $FeSO_4$ 0.004 กรัม ammonium citrate 2 กรัม thiamine 0.01 กรัม K_2PO_4 2 กรัม $CaCO_3$ 0.1 กรัม pyridoxal – 5 – phosphate 0.05 กรัม bromocresol purple 0.06 กรัม ผงวุ้น 15 กรัม รวมทั้งกรดอะมิโน L-tyrosine, L-histidine monohydrochloride, L-ornithine monohydrochloride และ L-lysine monohydrochloride แต่ละความเข้มข้นร้อยละ 1 (ปรับพีเอชให้ได้ 5.3 นำเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที) สังเกตการตกตะกอนรอบๆ โคลโลนี เปรียบเทียบกับ Decarboxylation Medium ที่ไม่เติมกรดอะมิโน (ชุดควบคุม) จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 วัน ภายใต้สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน ตรวจสอบการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ เป็นสีม่วงหรือเกิดบริเวณใสรอบๆ รอยลาก แสดงว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity (มี amino acid decarboxylase activity มากกว่า 350 มิลลิกรัมของกรดอะมิโนต่อลิตร)

3.2.6 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

3.2.6.1 การศึกษาคุณสมบัติการสร้างสารแบคทีเรียโอซินโดยวิธี agar well diffusion assay

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ คือ ขยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ ทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก โซเดียมคลอไรด์ และเกลือน้ำดีได้ และการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity (ไม่ก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิคเอมีน) มาทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion assay (Schillinger และ Locke 1989) โดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที และนำส่วนใสที่ได้ปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จนส่วนใสมีพีเอชเท่ากับ 6.5 (เพื่อกำจัดผลการยับยั้งที่

เกิดจากกรด) จากนั้นนำส่วนใสดังกล่าวไปกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.20 ไมโครเมตร (เพื่อกำจัดจุลินทรีย์) นำส่วนใสที่ผ่านการกรองมากำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ด้วยการเติมเอนไซม์คะตะเลส (จาก bovine liver จากบริษัท Fluka) ลงไปในส่วนใสดังกล่าวปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (จนกว่าจะทำการทดลอง) จากนั้นเตรียมเชื้อที่ใช้ทดสอบการผลิตสารยับยั้งด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.3 และปีเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบ ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร สำหรับเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 541 และ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 เติมลงในอาหาร MRS Soft Agar ส่วนเชื้อ *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 และ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 เติมลงในอาหาร TSYE Soft Agar ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ผสมให้เข้ากัน จากนั้นเทลงบนจานเพาะเชื้อที่ปราศจากเชื้อ ทิ้งไว้ให้วุ้นแข็งตัวและเจาะรูให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5 มิลลิเมตร และเติมส่วนใสที่เตรียมได้ปริมาณ 20 ไมโครลิตรลงในหลุมดังกล่าว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการยับยั้งจุลินทรีย์โดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสที่เกิดขึ้น

3.2.6.2 การศึกษาอุณหภูมิ เอนไซม์ และพีเอช ต่อกิจกรรมแบคทีริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

ก) การเตรียมสารแบคทีริโอซินหยาบ (crude bacteriocin)

การเตรียมสารแบคทีริโอซินหยาบทำได้โดยใช้วิธีการที่ดัดแปลงของ Janes และคณะ (1999) ทำได้โดยเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่ให้ผลบวกจากการทดสอบในข้อ 3.2.6.1 ในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 10 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที นำส่วนใสที่ได้ (bacteriocin-containing supernatant) ไปปรับพีเอชด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 1 โมลาร์ จนมีพีเอช 6.5 เพื่อกำจัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรด นำส่วนใสดังกล่าวไปทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน membrane filter (whatman) ขนาด 0.20 ไมโครเมตร จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นด้วยเครื่องทำแห้งแบบใช้ความเย็นและนำไปละลายในน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เพื่อให้มีความเข้มข้นเป็น 0.4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ข) การทดสอบผลของอุณหภูมิ เอนไซม์และพีเอชต่อความคงตัวของสารแบคทีริโอซินหยาบ (crude bacteriocin)

1) ผลของอุณหภูมิที่มีต่อความคงตัวของสารแบคทีริโอซินหยาบ

การทดสอบผลของอุณหภูมิที่มีต่อสารแบคทีริโอซินหยาบทำตามวิธีการของ Janes และคณะ (1999) ทำได้โดยนำสารแบคทีริโอซินหยาบ (0.4 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร) มาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 63 และ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 และ 30 นาที และที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.6.1 เปรียบเทียบผลการยับยั้งกับสารแบคทีริโอซินหยาบที่ไม่ได้ผ่านการให้ความร้อน

2) ผลของความไวของสารแบคทีริโอซินหยาบต่อเอนไซม์

การทดสอบผลของเอนไซม์ที่มีต่อสารแบคทีริโอซินหยาบทำตามวิธีการของ Janes และคณะ (1999) ทำได้โดยนำสารแบคทีริโอซินหยาบ (0.4 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร) มาผสมกับเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ α -chymotrypsin (จาก bovine pancreas จากบริษัท Merck), trypsin (จาก porcine pancreas จากบริษัท Fluka), protease (จาก *Streptomyces griseus* จากบริษัท Sigma), pepsin (จาก porcine gastric mucosa จากบริษัท Fluka), α -amylase (จาก *Aspergillus oryzae* จากบริษัท Fluka) และ lipase (จาก porcine pancreas จากบริษัท Fluka) ที่ละลายในบัฟเฟอร์ฟอสเฟต ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ให้มีความเข้มข้นของเอนไซม์ใน 1 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร และเอนไซม์ pepsin (จาก porcine gastric mucosa จากบริษัท Fluka) ที่ละลายในกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล รวมทั้งน้ำกลั่นซึ่งเป็นชุดควบคุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ยกเว้นสารแบคทีริโอซินหยาบที่เติมเอนไซม์ α -chymotrypsin, trypsin และ α -amylase นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส) และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.6.1

3) ผลของพีเอชที่มีต่อความคงตัวของสารแบคทีริโอซินหยาบ

การทดสอบผลของพีเอชที่มีต่อสารแบคทีริโอซินหยาบทำตามวิธีการของ Janes และคณะ (1999) ทำได้โดยนำสารแบคทีริโอซินหยาบ (0.4 มิลลิลิตรต่อมิลลิลิตร) มาปรับพีเอชให้ได้ 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 และ 10 ด้วยสารละลายกรดไฮโดรคลอริก ความเข้มข้น 5 โมลาร์ หรือสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 5 โมลาร์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาปรับพีเอชให้เป็น 7.0 และนำมาทดสอบกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ตามข้อ 3.2.6.1

3.2.7 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.2.7.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ (ให้ผลบวกกับ agar spot test) การมีความสามารถสูงในการทนต่อกรดเกลือ น้ำดี ไม่สร้างเอนไซม์ amino acid decarboxylase activity ซึ่งจะไม่ก่อให้เกิดการสะสมไบโอเจนิกเอมีนและอาจสร้างสารแบคทีเรียโอซินเนื่องจากให้ผลบวกกับ agar well diffusion assay ซึ่งจะนำมาทำการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อไป การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทำตามวิธีการของ (Paul, 1999) ซึ่งทำได้โดยวิธีดังนี้ คือ

ก) การย้อมแกรม (Gram stains)

การย้อมแกรมทำได้โดยนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้มาย้อมดูลักษณะรูปร่าง การเรียงตัวของเซลล์และการติดสี โดยหยดน้ำลงบนสไลด์ที่สะอาด เชื้อเชื้อลงบนหยดน้ำ และเกลี่ยเชื้อให้กระจาย ตรงเซลล์ด้วยความร้อนและนำมาหยดด้วยสีย้อมคริสตัลไวโอเลตให้ทั่วรอยเสมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างสไลด์ด้วยน้ำและหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอยเสมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำและหยดเอทิลแอลกอฮอล์ความเข้มข้นร้อยละ 95 เป็นเวลาไม่เกิน 20 วินาที จากนั้นล้างน้ำและหยดสีย้อมซาฟรานีนให้ทั่วรอยเสมียร์ ทิ้งไว้เป็นเวลา 1 นาที จากนั้นล้างน้ำซับแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง นำมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ข) การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility)

การทดสอบการเคลื่อนที่ทำได้โดยทำการเชื้อเชื้อที่ต้องการทดสอบลงในหลอดอาหาร MRS ที่มีปริมาณวุ้นร้อยละ 0.2 โดยแทง (stab) ลงไปตรงๆ เพียงครั้งเดียวประมาณ 2 ใน 3 ของส่วนสูงของอาหาร และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ถึง 24 ชั่วโมง อ่านผลถ้ายังให้ผลลบให้ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องต่อไปอีก 1 ถึง 2 สัปดาห์ สังเกตการเปลี่ยนแปลงเป็นระยะ ถ้าเห็นการเจริญของเชื้อออกมานอกรอยแทงหรือไม่มีรอยการเจริญที่ชัดเจนบริเวณรอยแทงแต่อาหารขุ่นกว่าเดิมแสดงว่าเกิดการเคลื่อนที่ (ให้ผลบวก) และถ้าเห็นการเจริญของเชื้ออย่างชัดเจนที่บริเวณรอยแทงโดยเห็นขอบเขตของเชื้อที่เจริญอย่างชัดเจนแม้จะบ่มเชื้อต่ออีก 2 สัปดาห์ก็ไม่มี การเปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่เกิดการเคลื่อนที่ (ให้ผลลบ)

3.2.7.2 การศึกษาสมบัติทางชีวเคมี

ก) ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น

ทำการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลต ได้แก่ การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส การเจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18 การเจริญที่ pH 4.4 และ 9.6 การทดสอบการผลิตเอนไซม์อะมิลเลส และการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส จากนั้นนำผลการทดสอบที่ได้ไปเปรียบเทียบกับตาราง Key identification สำหรับการจำแนกชนิดระดับจีโนส (ตารางที่ ข1 ภาคผนวก ข) (Axelsson, 2004) จะได้ทราบชื่อของจีโนสของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตที่ทดสอบ การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีทำโดยวิธีการดังนี้

ก.1) การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส

การทดสอบการเจริญที่พีเอชต่างๆ ทำตามวิธีการของ (Axelsson, 2004) ซึ่งทำได้โดยปิเปตสารแขวนลอยของเซลล์แต่ละไอโซเลตที่ได้เตรียมไว้ตามวิธีการในข้อ 3.2.2 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

ก.2) การทดสอบการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 6.5 และ 18

การทดสอบการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำตามวิธีการของ (Axelsson, 2004) ซึ่งทำได้โดยปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลต ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ลงในอาหารเหลว MRS ที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 และ 18 และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

ก.3) การทดสอบการเจริญที่พีเอช 4.4 และ 9.6

การทดสอบการเจริญที่พีเอชต่างๆ ทำตามวิธีการของ (Axelsson, 2004) ซึ่งทำได้โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่มีพีเอช 4.4 และ 9.6 จากนั้นปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมลงในอาหารเหลว MRS ดังกล่าว และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็น

เวลา 24 ถึง 72 ชั่วโมง สังเกตการเจริญ ถ้าอาหารขุ่นแสดงว่ามีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลบวก) และถ้าอาหารไม่ขุ่นแสดงว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรีย (ให้ผลลบ)

ก.4) การทดสอบการผลิตเอนไซม์อะคะเตเลส (catalase activity)

การทดสอบการผลิตเอนไซม์อะคะเตเลสทำตามวิธีการของ (Harrigan. 1998) ซึ่งทำได้โดยเขี่ยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตมาลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทดสอบการผลิตเอนไซม์อะคะเตเลสโดยเติมสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นร้อยละ 3 ลงไป ให้มีปริมาตรเท่ากับปริมาตรของอาหารเหลว MRS และสังเกตการเกิดฟองก๊าซภายในเวลา 10 นาที ถ้าเกิดฟองก๊าซคือมีเอนไซม์อะคะเตเลส (ให้ผลบวก) ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซคือไม่มีเอนไซม์อะคะเตเลส (ให้ผลลบ)

ก.5) การทดสอบการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส

การทดสอบการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสทำตามวิธีการของ (Harrigan. 1998) ซึ่งทำได้โดยปิเปตสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลตมาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร Gibson's Semi Solid Tomato Juice Medium ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องผสม (vortex) ทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว จากนั้นเทอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Agar (NA) ทับลงไป ประมาณ 3 เซนติเมตร ทิ้งให้แข็งตัวและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบผลการทดลองโดยสังเกตการเกิดฟองก๊าซหรือเกิดการแยกชั้นของอาหาร แสดงว่ามีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลบวก) แต่ถ้าไม่เกิดฟองก๊าซหรืออาหารไม่เกิดการแยกชั้น แสดงว่าไม่มีการผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ให้ผลลบ)

ข) การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH (BioMérieux)

API 50 CH คือชุดทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีทั้งหมด 50 การทดสอบ เพื่อศึกษาเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตของจุลินทรีย์ที่ทดสอบเพื่อศึกษาการจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และสกุลที่เกี่ยวข้อง

อุปกรณ์สำคัญที่จำเป็น ได้แก่

ข.1) API 50 CHL medium

API 50 CHL medium เป็นอาหารเหลวที่ประกอบด้วยโพลิเปปโตน 10 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม tween 80 1 มิลลิลิตร dipotassium phosphate 2 กรัม sodium acetate 5 กรัม diammonium

citrate 2 กรัม magnesium sulfate 0.20 กรัม manganese sulfate 0.05 กรัม bromocresol purple 0.17 กรัม น้ำกลั่น 1 ลิตร ปรับพีเอชให้ได้ 6.7 ถึง 7.1

ข.2) API 50 CH strips

API 50 CH strips ประกอบด้วย 50 microtube ที่ใช้ในการศึกษาการหมักคาร์โบไฮเดรตและอนุพันธ์ของคาร์โบไฮเดรต (heterosides, polyalcohols และ uronic acids) ซึ่ง microtube ทั้งหมด 50 หลอดแบ่งออกเป็น 5 ชุดย่อย คือ 0 ถึง 9, 10 ถึง 19, 20 ถึง 29, 30 ถึง 39, 40 ถึง 49 แต่ละชุดมี 10 microtube โดยสารคาร์โบไฮเดรตในแต่ละ strip มีดังนี้

Strip ที่ 1 (หลอดที่ 0 ถึง 9) : หลอดควบคุม (ไม่มีสารคาร์โบไฮเดรต), glycerol (GLY), erythritol (ERY), D-arabinose (DARA), L-arabinose (LARA), D-ribose (RIB), D-xylose (DXYL), L-xylose (LXYL), D-adonitol (ADO) และ methyl-βD- xylopyranoside (MDX)

Strip ที่ 2 (หลอดที่ 10 ถึง 19) : D-galactose (GAL), D-glucose (GLU), D-fructose (FRU), D-mannose (MNE), L-sorbose (SBE), L-rhamnose (RHA), dulcitol (DUL), inositol (INO), D-mannitol (MAN) และ D-sorbitol (SOR)

Strip ที่ 3 (หลอดที่ 20 ถึง 29) : methyl-αD-mannopyranoside (MDM), methyl-αD-glucopyranoside (MDG), N-acetylglucosamine (NAG), amyldalin (AMY), arbutin (ARB), esuculin ferric citrate (ESC), salicin (SAL), D-cellobiose (CEL), D-maltose (MAL) และ D-lactose (bovine origin) (LAC)

Strip ที่ 4 (หลอดที่ 30 ถึง 39) : D-melibiose (MEL), D-saccharose (sucrose) (SAG), D-trehalose (TRE), inulin (INU), D-melizitose (MLZ), D-raffinose (RAF), amido (starch) (AMD), glucogen (GLYG), xylitol (XLT) และ genitiobiose (GEN)

Strip ที่ 5 (หลอดที่ 40 ถึง 49) : D-turanose (TUR), D-lyxose (LYX), D-tagatose (TAG), D-fucose (DFUC), L-fucose (LFUC), D-arabinose (DARL), L-arabinose (LARL), potassium gluconate (GNT), potassium 2-ketogluconate (2KG) และ potassium 5-ketogluconate (5KG) ปริมาณของสารคาร์โบไฮเดรตแต่ละชนิดแสดงในภาคผนวก ก

ข.3) สารละลายมาตรฐาน McFarland Standard เบอร์ 2

ข.4) Mineral oil

ข.5) ถาดรังผึ้ง

ข.6) โปรแกรม API Identification software

วิธีการทดสอบ

1) การเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สำหรับทดสอบ (Preparation of the inoculum)

ทำการเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ตามวิธีการข้อ 3.2.2 หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS นำมาปั่นเหวี่ยงและล้างเซลล์ทั้งหมด 2 ครั้ง เติมน้ำกลั่นละลายเปปโตเนอ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ลงไปปริมาตร 500 ไมโครลิตร จะได้สารแขวนลอยเซลล์ที่เข้มข้น จากนั้นเปิดสารแขวนลอยเซลล์เข้มข้นนี้เติมลงในสารละลายเปปโตเนอ ความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จนกระทั่งได้สารแขวนลอยที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 2 (บันทึกปริมาตรของสารแขวนลอยเซลล์เข้มข้นที่ใช้ในการปรับความขุ่น สมมติว่าเท่ากับ V ไมโครลิตร) จากนั้นเปิดสารแขวนลอยเซลล์เข้มข้นปริมาตร V ไมโครลิตร เติมน้ำกลั่นในอาหาร API 50 CH medium ปริมาตร 10 มิลลิลิตร (จะได้สารแขวนลอยเซลล์ในอาหาร API 50 CHL ที่มีความขุ่นเท่ากับ McFarland Standard เบอร์ 2)

2) การถ่ายเชื้อที่จะทดสอบลงใน API 50 CH strips

การถ่ายเชื้อที่จะทดสอบทำได้โดยเปิดอาหาร API 50 CHL medium ที่เดิมเชื้อที่ต้องการทดสอบแล้วนำมาใส่ลงในหลอด (cupule) ของแต่ละ strip ซึ่งได้แยกเป็น 5 strip ย่อยแล้ว คือ strip ที่ 1 (หลอดที่ 0 ถึง 9) strip ที่ 2 (หลอดที่ 10 ถึง 19) strip ที่ 3 (หลอดที่ 20 ถึง 29) strip ที่ 4 (หลอดที่ 30 ถึง 39) strip ที่ 5 (หลอดที่ 40 ถึง 49) โดยแต่ละปีเปิดลงข้างๆหลอด เพื่อป้องกันการเกิดฟองอากาศเติมอาหาร API 50 CHL ลงไปจนเต็มหลอด เติมนครบทั้ง 50 หลอด จากนั้นหยอดด้วย mineral oil ให้เต็มหลอดเพื่อทำให้มีสภาพมีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยและนำ strip ใส่ลงในถาดรังผึ้งที่เตรียมไว้ เติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงไป (เตรียมไว้ล่วงหน้า) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3) การอ่านผลการทดสอบ

ทำการอ่านผลในชั่วโมงที่ 48 ของการบ่ม โดยจดบันทึกลงในตารางการทดสอบ ถ้าให้ผลบวกแสดงว่า มีการสร้างกรด bromocresol purple ที่ใช้เป็น indicator จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ถ้าให้ผลลบอาหารจะไม่เปลี่ยนสี (สำหรับในหลอดที่ 25 เป็นการทดสอบ esculin ถ้าผลการทดสอบเป็นบวกอาหารจะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ) หลังจากนั้นนำผลการทดสอบที่บันทึกได้มาเข้าโปรแกรม API identification software เพื่อการแปลผลการทดสอบทำให้ทราบชื่อสปีชีส์ของแบคทีเรียที่ทดสอบ

3.2.7.3 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ก) การสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก

วิธีการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอของแบคทีเรียทำตามวิธีการทดลองของชุด MasturePure™ Gram Positive DNA Purification Kit (บริษัท EPICENTRE® ประเทศสหรัฐอเมริกา) โดยนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้แต่ละไอโซเลตตากกลงบนอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเขี่ยเชื้อแต่ละไอโซเลตที่เจริญบนอาหาร MRS ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ Tris-HCl ความเข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ และ EDTA ความเข้มข้น 1 มิลลิโมลาร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 150 ไมโครลิตร เติม ready-lyse lysozyme 1 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติมเอนไซม์ proteinase K ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และนำมาเขย่าเป็นระยะเวลาดำเนินๆ ทุก 5 นาที จากนั้นนำหลอดมาทำให้เย็นลงจนได้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และแช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติมสารละลาย MPC protein precipitation ปริมาตร 175 ไมโครลิตร ลงในสารละลาย ผสมให้เข้ากัน เป็นเวลา 10 วินาที นำหลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ย้ายส่วนใสใส่หลอดใหม่ จากนั้นเติมสารละลายเอนไซม์ RNase A ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม Isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน โดยพลิกหลอดกลับไปกลับมาประมาณ 30 ถึง 40 ครั้ง และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทิ้งส่วนใส เปิดเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 70 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากัน ปั่นเหวี่ยง ทิ้งส่วนใสด้านบนและตากตะกอนดีเอ็นเอให้แห้ง จากนั้นละลายตะกอนดีเอ็นเอด้วยบัฟเฟอร์ TE ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จะได้จีโนมิกดีเอ็นเอเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ข) การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสทำได้ดังนี้ เตรียมเจลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยชั่งอะกาโรส 0.16 กรัม เติมบัฟเฟอร์ TBE ปริมาตร 20 มิลลิลิตร ทำให้ละลายในไมโครเวฟ ทิ้งไว้ให้อุ่น เติมสารละลายเจลสตาร์ (gelstar บริษัท CAMBREX ประเทศ

USA) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันจากนั้นเทใส่แม่พิมพ์เจล เมื่อแผ่นเจลแข็งย้ายแผ่นเจลลงอ่าง (gel chamber) เต็มบัฟเฟอร์ TBE ให้ท่วมแผ่นเจล นำจีโนมิกดีเอ็นเอที่ได้จากการสกัดจากข้อ 3.2.8.1 ปริมาตร 2 ไมโครลิตร ผสมกับสีย้อมดีเอ็นเอ และหยอดลงในหลุมแผ่นเจล ทำการแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้าที่มีความต่างศักย์คงที่ 8 โวลต์ต่อเซนติเมตร เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำเจลไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ต

ค) การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชัน การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอวิธีนี้เป็นวิธีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอชิ้นส่วนเป้าหมาย (target DNA) ในหลอดทดลองโดยให้ปฏิกิริยาการสังเคราะห์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและซ้ำกันหลายๆรอบ เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ โดยใช้เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา

ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอไรเซชันปริมาณ 50 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ PCR 1 เท่า ที่มีแมกนีเซียมคลอไรด์ 1.5 มิลลิโมลาร์ ไดดีออกซีนิวคลีโอไทด์ไตรฟอสเฟต 0.2 มิลลิโมลาร์ ไพรมเมอร์ F 16S rDNA-27bac (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') 0.25 ไมโครโมลาร์ ไพรมเมอร์ R 16S rDNA-1492bac (5'-GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 0.25 ไมโครโมลาร์ เอนไซม์ *Taq* DNA polymerase 2.5 ยูนิต (บริษัท Promega ประเทศ สหรัฐอเมริกา) และจีโนมิกดีเอ็นเอ 100 นาโนกรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 50 ไมโครลิตร

จากนั้นนำมาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ในเครื่องเพิ่มปริมาณสารพันธุกรรมที่มีสถานะดังแสดงในตารางที่ 3.1 และเมื่อครบกำหนดเวลานำหลอด PCR ไปวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยเทคนิคอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสเช่นเดียวกับ 3.2.8.2

ตารางที่ 3.1 สถานะที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละไอโซเลต

ขั้นตอน	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	เวลา
Initial denaturation	94	10 นาที
Denaturation	94	30 วินาที
Annealing	55	30 วินาที
Primer extension	72	90 วินาที
Final extension	72	10 นาที

ง) การทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

นำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากข้อ 3.2.8.3 มาทำให้บริสุทธิ์ด้วยชุด QIAquick PCR purification kit (บริษัท Qiagen ประเทศ เยอรมนี) โดยนำผลิตภัณฑ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร มาเติม บัฟเฟอร์ PBI ปริมาตร 400 ไมโครลิตร จากนั้นนำส่วนผสมที่ได้ใส่ใน spin column ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที เทส่วนใส่ทิ้ง เติบบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ลงในคอลัมน์ปั่นเหวี่ยงอีกครั้ง เทส่วนใส่ทิ้งและปั่นเหวี่ยงซ้ำเป็นเวลา 1 นาที จากนั้นย้ายคอลัมน์ใส่หลอดทดลองใหม่และเติบบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงจะได้ดีเอ็นเอที่บริสุทธิ์และนำมาวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

จ) ปฏิกริยาการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ

ปฏิกริยาการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ด้วยชุด QIAGEN PCR Cloning kit (บริษัท Qiagen ประเทศ เยอรมนี) ประกอบด้วยบัฟเฟอร์ ligation 1 เท่าที่มีเวกเตอร์ pDrive 50 นาโนกรัม ผลิตภัณฑ์ PCR 120 นาโนกรัม และเอนไซม์ T4 DNA ligase 3 ยูนิต นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

ฉ) การ Transformation

การ Transformation ทำได้โดยนำ Competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5 α ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เติมดีเอ็นเอที่ผ่านการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอมาปริมาตร 10 ไมโครลิตร (จากข้อ 3.2.8.5) จากนั้นวางหลอดในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที นำหลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที แช่ในน้ำแข็ง 3 นาที เติมหาอาหารเหลว LB ปริมาตร 900 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง นำหลอดมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที กระจายเซลล์ในอาหารเหลว LB และนำไป spread บนอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร X gal ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร และ IPTG ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์ คัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวจากงานเพาะเชื้อนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอในขั้นตอนต่อไป

ช) การสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอ

ทำการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุด QIAprep[®] Spin Miniprep Kit (บริษัท Qiagen ประเทศเยอรมนี) ทำได้โดยนำเชื้อ *E. coli* DH5 α โคลนีสืขาวจากข้อ 3.2.8.6 มา 1 โคลนึเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่เติมยาปฏิชีวนะ kanamycin ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที เพื่อเก็บเซลล์และนำตะกอนเซลล์ที่ได้มาเติมบัฟเฟอร์ P1 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร ปิเปิดขึ้นลง เติมบัฟเฟอร์ P2 ปริมาตร 250 ไมโครลิตร และเติมบัฟเฟอร์ N3 ปริมาตร 350 ไมโครลิตร กลับหลอดไปมา ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสที่ได้ใส่ในคอลัมน์และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที ทิ้งส่วนใส เติมบัฟเฟอร์ PE ปริมาตร 750 ไมโครลิตร ปั่นเหวี่ยง 1 นาที ทิ้งส่วนใส ปั่นหลอดเปล่าอีก 1 นาที ย้ายคอลัมน์ใส่หลอดทดลองใหม่ เติมบัฟเฟอร์ EB ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 1 นาที ปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที

ซ) การตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

ปฏิกิริยาการตัดพลาสมิดดีเอ็นเอ 10 ไมโครลิตร ประกอบด้วย บัฟเฟอร์ 1 เท่าที่มีพลาสมิดดีเอ็นเอ 70 และ 94 นาโนกรัม เอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* (บริษัท BioLabs, ประเทศสหรัฐอเมริกา) 10 ยูนิต และน้ำกลั่น จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์พลาสมิดดีเอ็นเอที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะด้วยวิธีอะกาโรสอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอมาวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

ด) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA

นำพลาสมิดดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลกติกไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยวิธี Big dye Terminator Reaction ด้วยเครื่อง ABI PRISM[®] 3700 DNA Analyser (บริษัท 1st Base ประเทศมาเลเซีย) และนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ที่รายงานในธนาคารยีนโดยใช้โปรแกรม BLAST server ของ National Center Biotechnology Information, National Institutes of Health, USA

3.2.8 การศึกษาผลของการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพของแหนมปลา

3.2.8.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับการหมักแหนมปลา

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อได้แก่ 1) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมชนิดที่ 1 คือ *Ent. faecium* IIS11 (เชื้อ A) ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองข้างต้น 2) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมชนิดที่ 2 คือ *Ent. faecalis* 4IS17 (เชื้อ B) ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองข้างต้น 3) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการรีดิวส์ไนเตรทและไนไตรต์ คือ *Pediococcus pentosaceus* P0805 (เชื้อ C) แยกได้จากเนื้อหมูสด (พัชรตรีบรรณกุล และ สุนิสา กิตติศรีโสภิต, 2550) และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็น โพรไบโอติก คือ *Lactococcus lactis* 13IS3 (เชื้อ D) แยกได้จากเนื้อปลากราย (นิระชา ศรีวงษ์, 2550) ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 โดยให้ปรับความขุ่นของสารแขวนลอยเซลล์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับเติมลงในแหนมปลาในขั้นต่อไป

3.2.8.2 กระบวนการผลิตแหนมปลา

ในการทดลองนี้ได้ทดลองใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเดี่ยวและกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกผสมเปรียบเทียบกับไม่ใช้กล้าเชื้อในการหมักแหนมปลา โดยได้ทำการผลิตแหนมปลาทั้งหมด 3.5 กิโลกรัม ซึ่งประกอบด้วย เนื้อปลาช่อน (*Channa striatus*) ร้อยละ 81 ข้าวสุกบดร้อยละ 12 กระเทียมร้อยละ 5 และเกลือร้อยละ 2 โดยนำส่วนผสมทั้งหมดมาผสมให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสมเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นแบ่งส่วนผสมออกเป็น 7 ส่วน ส่วนละ 500 กรัม และนำส่วนผสมของแหนมปลาแต่ละส่วนมาเติมกล้าเชื้อที่เตรียมไว้ดังนี้ แหนมปลาส่วนที่ 1) ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก (ชุดควบคุม) ส่วนที่ 2) เติมเชื้อ A ส่วนที่ 3) เติมเชื้อ B ส่วนที่ 4) เติมเชื้อ A และ B ในอัตราส่วน 1:1 ส่วนที่ 5) เติมเชื้อ A, B และ C ในอัตราส่วน 1:1:1 ส่วนที่ 6) เติมเชื้อ A, B และ D ในอัตราส่วน 1:1:1 และส่วนที่ 7) เติมเชื้อ A, B, C และ D ในอัตราส่วน 1:1:1:1 โดยผสมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^6 เซลล์ต่อกรัม จากนั้นผสมกล้าเชื้อและส่วนผสมของแหนมปลาให้เข้ากันอย่างสม่ำเสมอด้วยเครื่องผสมเป็นเวลา 5 นาที บรรจุแหนมปลาใส่ในถุงพลาสติกถุงละ 40 กรัม มัดให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สุ่มตัวอย่างแหนมปลาแต่ละชุดมาตรวจหาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด วัดค่าพีเอช

หาปริมาณกรดทั้งหมดที่ทุกๆ 24 ชั่วโมงของการหมัก จนครบ 96 ชั่วโมง ส่วนค่ากิจกรรมของน้ำ
น้ำหนักที่สูญเสียไป การปลดปล่อยน้ำและการวัดสี วัดที่เวลาเริ่มต้นและเวลาสุดท้ายของการหมัก
รายละเอียดของการวิเคราะห์มีดังนี้

3.2.8.3 การวิเคราะห์แหมนปลาที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติและหมักด้วยกล้าเชื้อ

แบคทีเรียกรดแลคติกเดี่ยวและกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติกผสม

ก) การวัดค่าพีเอชและการวิเคราะห์หาปริมาณกรดทั้งหมด

การวัดค่าพีเอชของแหมนปลาวัด โดยใช้เครื่องวัดพีเอช Testo 205 และการวิเคราะห์หา
ปริมาณกรดทั้งหมด (% TA) ทำตามวิธีการของ (Riebroy และคณะ. 2008) ทำได้โดยชั่งตัวอย่าง
แหมนปลา 5 กรัม เติมน้ำกลั่นปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ (น้ำต้มเดือด 5 นาที) ปริมาตร 40
มิลลิลิตร ตีปั่นเป็นเวลา 1 นาที และปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที นำ
ส่วนใสมากรองผ่านกระดาษกรอง whatman เบอร์ 4 ไทเทรตส่วนที่กรองได้กับสารละลาย
มาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ จนถึงจุดยุติ (ใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเค-
เตอร์) บันทึกปริมาตรของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปและนำมาคำนวณปริมาณกรดทั้งหมดใน
แหมนปลา

$$\% TA = \frac{(N \times V_1 \times 90.08 \times 100)}{1000 \times V_2}$$

N คือ ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มอล)

V_1 คือ ปริมาตรของสารละลายมาตรฐาน โซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)

V_2 คือ ปริมาณของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตรต่อกรัม)

ข) การวัดน้ำหนักที่สูญเสีย (weight loss)

นำตัวอย่างแหมนปลาปริมาณ 40 กรัม ที่ผ่านการบรรจุมาชั่งน้ำหนักก่อนและหลังหมัก
คำนวณหาร้อยละการสูญเสียน้ำหนักตามสูตรดังนี้

$$\text{น้ำหนักที่สูญเสีย (ร้อยละ)} = \frac{\text{น้ำหนักก่อนหมัก} - \text{น้ำหนักหลังหมัก}}{\text{น้ำหนักก่อนหมัก}} \times 100$$

ค) การหาปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยออกมา (Release water)

การหาปริมาณน้ำที่ออกมาทำตามวิธีการของ (Riebroy และคณะ. 2008) นำตัวอย่างแผ่นปลาที่ผ่านการบรรจุปริมาณ 20 กรัม มาชั่งน้ำหนักดังนี้ นำตัวอย่างที่บรรจุพร้อมถุง (A) มาชั่งน้ำหนัก จากนั้นนำตัวอย่างแผ่นปลาออกจากถุงและซับน้ำออกจากผิวของตัวอย่างด้วยกระดาษกรอง (whatman เบอร์ 4) และชั่งน้ำหนักตัวอย่าง (B) จากนั้นนำถุงเปล่ามาชั่งน้ำหนัก (C) บันทึกน้ำหนักและนำมาคำนวณดังนี้

$$\text{ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย (ร้อยละ)} = 100 \times \frac{(A-B) - C}{(A - C)}$$

ง) การวัดสี

การวัดสีของตัวอย่างแผ่นปลาทำได้โดยใช้เครื่องวัดสี Konica Minolta รุ่น CR-300 โดยวัดค่าสีด้วยระบบ CIE ค่าสีที่วัดได้แสดงในรูปของค่า L^* , a^* และ b^* ซึ่งค่า L^* บ่งบอกถึงความสว่างค่า a^* บ่งบอกถึง สีแดง (+) หรือสีเขียว (-) และค่า b^* บ่งบอกถึง สีเหลือง (+) หรือสีน้ำเงิน (-)

จ) การหาค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity)

การหาค่ากิจกรรมของน้ำทำได้โดย นำตัวอย่างแผ่นปลามาใส่ในตลับวัดค่ากิจกรรมของน้ำโดยเกลี่ยตัวอย่างให้ทั่วทั้งตลับ โดยให้มีความสูงประมาณ 1 ใน 2 ของตลับนำมาใส่เครื่องวัดค่ากิจกรรมของน้ำ (Aqualab Series 3TE) เครื่องจะทำการวัดค่ารอจนเครื่องมีเสียงดังเตือนแสดงว่าทำการวัดค่าเสร็จแล้วบันทึกค่าที่วัดได้

ฉ) การวิเคราะห์หาปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด

การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแผ่นปลาด้วยเทคนิค pour plate ทำได้โดยชั่งตัวอย่างแผ่นปลาตัวอย่างละ 25 กรัม ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ จากนั้นใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อและเติมสารละลายเปปโตเนอความเข้มข้นร้อยละ 0.1 ปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปตีปั่นเป็นเวลา 1 นาที ทำการเจือจางตัวอย่างด้วยสารละลายเปปโตเนอความเข้มข้นร้อยละ 0.1 จนถึงระดับความเจือจาง $1 : 10^7$ จากนั้นเปิดตัวอย่างที่แต่ละระดับความเจือจางปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในอาหารแข็ง MRS ที่ไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อยใน candle jar ตรวจนับจำนวนโคโลนีและคำนวณหาปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกต่อแผ่นปลา 1 กรัม

ข) การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลา

นำแหนมปลาที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติ (ไม่เติมกล้ำเชื้อ) และแหนมปลาที่หมักด้วยกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเดี่ยวและแบคทีเรียกรดแลคติกผสมที่ผ่านการหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง มาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ทางด้านสีที่ปรากฏ กลิ่นรส ลักษณะเนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว ความเค็ม และความชอบโดยรวมของแหนมปลา โดยใช้วิธีทดสอบแบบ 9 - point hedonic scale โดยใช้ผู้ประเมินที่ไม่ได้รับการฝึกฝนทั้งหมด 30 คน ผู้ทดสอบชิมแต่ละคนได้รับตัวอย่างทั้งหมด 7 ตัวอย่าง คือแหนมปลาสดควบคุมและแหนมปลาที่ผ่านกระบวนการหมักโดยใช้กล้ำเชื้อ ตัวอย่างแหนมปลาทั้งหมดจะผ่านการทอดเป็นเวลา 5 นาที นำมาหั่นเป็นชิ้นๆ มีความหนา 1 เซนติเมตร ก่อนเสิร์ฟ ในผู้ทดสอบชิมแต่ละคนจะต้องตอบแบบสอบถามและให้คะแนน โดยมีระดับการให้คะแนนดังนี้ คะแนน 9 หมายถึง ชอบมากที่สุด 8 ชอบมาก 7 ชอบปานกลาง 6 ชอบเล็กน้อย 5 บอกรับไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ 4 ไม่ชอบเล็กน้อย 3 ไม่ชอบปานกลาง 2 ไม่ชอบมาก 1 ไม่ชอบมากที่สุด โดยทำการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลาทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.3 การวิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ

นำผลการทดลองตัวอย่างแหนมปลาที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติ (ไม่เติมกล้ำเชื้อ) และแหนมปลาที่หมักด้วยกล้ำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเดี่ยวและแบคทีเรียกรดแลคติกผสมทั้ง 3 ซ้ำ ได้แก่ ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด ผลพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด ค่ากิจกรรมของน้ำ น้ำหนักที่สูญเสียไป การปลดปล่อยน้ำ การวัดสีและการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลาทางด้านสีที่ปรากฏ กลิ่นรส ลักษณะเนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว ความเค็ม และความชอบโดยรวม มาวิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้วิธี Duncan Multiple Range Test และ Analysis of Variance ด้วยโปรแกรม SPSS Version 11.5

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิจารณ์

4.1 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก และการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Agar spot test

4.1.1 การตรวจนับจำนวนและการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกในกุ้งสด กุ้งจ่อม ปลาจ่อม หอยแมลงภู่สด หอยแมลงภู่ดอง

จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในตัวอย่างกุ้งสด หอยแมลงภู่สด กุ้งจ่อม หอยแมลงภู่ดองและปลาจ่อมรวมทั้งหมด 52 ตัวอย่าง พบว่ากุ้งสดและหอยแมลงภู่สดมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกใกล้เคียงกัน โดยมีจำนวนอยู่ในช่วง 3.0×10^4 ถึง 3.0×10^6 CFU ต่อกรัม สำหรับอาหารทะเลหมักที่นำมาวิเคราะห์ ได้แก่ กุ้งจ่อม และปลาจ่อม พบว่ามีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกมากกว่าเล็กน้อยคืออยู่ในช่วง 3.0×10^3 ถึง 3.4×10^8 CFU ต่อกรัม ส่วนหอยแมลงภู่ดองมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกน้อยที่สุด อาหารทะเลสดมีพีเอชค่อนข้างเป็นกรดเล็กน้อยอยู่ในช่วง 6.08 ถึง 6.63 ส่วนอาหารทะเลหมักมีพีเอชค่อนข้างเป็นกรดอยู่ระหว่าง 4.09 ถึง 5.56 (ตารางที่ 4.1) จากนั้นจึงได้แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างที่นำมาวิเคราะห์ได้ทั้งหมด 222 ไอโซเลต เพื่อนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไป

การที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณมากในกุ้งสดและหอยแมลงภู่สดคาดว่า เป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกมีถิ่นอาศัยอยู่ในระบบทางเดินอาหาร ผิวหนังหรือเปลือกของสัตว์น้ำรวมทั้งในสิ่งแวดล้อม เช่น ในน้ำและโคลน ดังเช่นการรายงานของ Buntin และคณะ (2008) ซึ่งได้วิเคราะห์หาแบคทีเรียกรดแลคติกจากระบบทางเดินอาหารของกุ้งและหอยพบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 4.0×10^4 ถึง 5.0×10^5 CFU ต่อกรัมของตัวอย่าง เช่นเดียวกับ Nair และ Surendran (2004) ได้ทำการคัดแยกเชื้อและจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกจากกุ้งสดสามารถพบสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกชนิด *Streptococcus* ร้อยละ 20 *Leuconostoc* ร้อยละ 10 *Pediococcus* ร้อยละ 10 และ *Lactobacillus* ร้อยละ 80 ของตัวอย่างทั้งหมดที่วิเคราะห์ นอกจากนี้ Shiflett และคณะ (1966) ได้รายงานว่า *Lactobacillus* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นหลักๆ ที่พบในหอยนางรมแถบแปซิฟิก และพบ

Lactobacillus ร้อยละ 75 หลังจากเก็บหอยนางรมที่อุณหภูมิ 44 องศาฟาเรนไฮต์ (7 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2 วัน

การที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวนมากในสัตว์น้ำจำพวกหอยแมลงภู่อาจเกี่ยวข้องกับธรรมชาติในการกินอาหารของสัตว์ประเภทนี้ซึ่งจัดเป็น bivalve molluscan shellfish (มีลำตัวอ่อนนุ่ม ซึ่งถูกห่อหุ้มด้วยเปลือกที่สมมาตรกันทั้ง 2 ข้าง) สัตว์ประเภทนี้เป็นพวก filter feeders ซึ่งจะได้รับอาหารและออกซิเจนจากน้ำปริมาณมากที่จะผ่านเข้าทางเหงือกรวมทั้งสิ่งอื่นๆจากน้ำ รวมทั้งจุลินทรีย์ ก็จะถูกดักไว้ด้วย (Cook, 1991) นอกจากนี้ได้มีผู้รายงานไว้ว่า สัตว์ประเภทนี้หลังถูกจับจะมีจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด 10^3 ถึง 10^7 เซลล์ต่อกรัม ซึ่งจำนวนจุลินทรีย์ที่พบนี้ปกคิมิมีปริมาณมากกว่าจุลินทรีย์ที่พบในน้ำบริเวณที่สัตว์อาศัยอยู่ประมาณ 1 ถึง 2 log unit ซึ่งเป็นไปได้ว่าจุลินทรีย์ปริมาณมากในหอยได้มาจากน้ำในระหว่างการกินอาหาร โดยการกรองและทำให้ส่วนหนึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น มีนักวิจัยหลายๆท่าน ได้กล่าวไว้ว่าจุลินทรีย์ประจำถิ่นในกึ่งน้ำจืดหรือกึ่งน้ำทะเลจะมีประชากรของจุลินทรีย์แตกต่างกันขึ้นอยู่กับถิ่นที่อยู่อาศัย จุลินทรีย์ประจำถิ่นที่แตกต่างกันในกึ่งน้ำจืดขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อม เช่น น้ำและโคลน ซึ่งสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่พบจะแตกต่างกัน (Cobb และคณะ, 1971 ; Liston, 1980 ; Shewan, 1977)

การที่พบแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารทะเลหมักสูงกว่าในอาหารทะเลสดเป็นเพราะว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่พบได้ในสัตว์น้ำซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบและเมื่อผ่านกระบวนการหมักแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในวัตถุดิบทำให้สามารถเพิ่มปริมาณมากขึ้นและผลิตกรดอินทรีย์ขึ้น ซึ่งทำให้พีเอชลดต่ำลง นอกจากนี้ในบางครั้งอาหารหมักที่จำหน่ายในท้องตลาดอาจมีการเติมกลีเซอแลคทีเรียกรดแลคติกลงไปเพื่อช่วยเร่งการหมักจึงทำให้ตรวจพบแบคทีเรียกรดแลคติกปริมาณมาก ดังเช่นการทดลองของ Tanasupawat และคณะ (1998) ที่ได้ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักของไทย ได้แก่ ปลาจ่อมพบปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 4.20×10^7 ถึง 2.72×10^{10} เซลล์ต่อกรัม กุ้งจ่อมพบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 7.30×10^7 ถึง 9.56×10^{11} เซลล์ต่อกรัม และหอยแมลงภู่ออกพบแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ 1.92×10^7 ถึง 3.60×10^{10} เซลล์ต่อกรัม ซึ่งพีเอชที่ตรวจวัดได้ในปลาจ่อม กุ้งจ่อมและหอยแมลงภู่ออกเท่ากับ 4.16 ถึง 6.20, 3.85 ถึง 4.67 และ 3.98 ถึง 4.74 ตามลำดับ

ตารางที่ 4.1 จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดและค่าพีเอชของอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก

ชนิดของตัวอย่าง	จำนวน (ตัวอย่าง)	pH	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)
กุ้งสด	10	6.08–6.63	$3.8 \times 10^4 - 9.1 \times 10^5$
หอยแมลงภู่สด	10	6.08–6.19	$3.0 \times 10^4 - 3.0 \times 10^6$
หอยแมลงภู่คอง	12	4.53–4.58	$3.2 \times 10^3 - 2.0 \times 10^5$
กุ้งจ่อม	10	4.09–4.28	$1.2 \times 10^5 - 9.3 \times 10^7$
ปลาจ่อม	10	4.30–5.56	$3.0 \times 10^3 - 3.4 \times 10^8$
รวม	52	-	-

4.1.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์

จากการทดสอบการผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar spot test ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดแยกไว้ทั้งหมด 222 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 52 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบได้อย่างน้อย 1 ชนิด คิดเป็นร้อยละ 23.42 ของจำนวนไอโซเลตทั้งหมด (222 ไอโซเลต) โดยคัดแยกได้จากหอยแมลงภู่สด กุ้งสด หอยแมลงภู่คอง ปลาจ่อม กุ้งจ่อม ซึ่งเชื้อที่ถูกยับยั้งมากที่สุด คือ *Escherichia coli* DMST 4212 คิดเป็นร้อยละ 71.15 ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้ง (52 ไอโซเลต) รองลงมาคือเชื้อ *Salmonella* Typhimurium DMST 0562 และเชื้อ *Vibrio parahaemolyticus* SH1 คิดเป็นร้อยละ 65.38 และ 63.46 ตามลำดับ ส่วนเชื้อ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 541 คิดเป็นร้อยละ 53.38 เชื้อ *Listeria monocytogenes* DMST 11256 คิดเป็นร้อยละ 48.08 เชื้อ *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 คิดเป็นร้อยละ 38.46 และเชื้อ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 คิดเป็นร้อยละ 25.00 โดยเชื้อถูกยับยั้งน้อยที่สุดโดยแบคทีเรียกรดแลคติกเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้น คือเชื้อ *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076 คิดเป็นร้อยละ 1.92 (ตารางที่ 4.2)

จากการทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบด้วยการทดลองข้างต้นสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลตจากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการเป็นโพรไบโอติก (ทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดี โซเดียมคลอไรด์) ทดสอบการไม่มีกิจกรรมของเอนไซม์ amino acid decarboxylase และทดสอบการสร้างสารแบคทีเรียโอซินด้วยวิธี agar well diffusion assay ต่อไป

ตารางที่ 4.2 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมักที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทดสอบ

แหล่งของไอโซเลต	จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก	จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างสารยับยั้ง	ไอโซเลตที่สร้างสารยับยั้ง			แบคทีเรียที่ทดสอบอย่างน้อย 3 ชนิด
			แบคทีเรียกรดแลคติก ^a	ก่อโรค ^b	แบคทีเรียที่ทำให้เน่าเสีย ^c	
หอยแมลง กูด	47	10	1IS2, 1IS3,	1IS2, 1IS3, 1IS11,	- ^d	1IS2, 1IS3,
			1IS11, 1IS5,	39IS5, 41IS5, 42IS3,		1IS11, 39IS5,
			46IS2, 47IS1	45IS3, 45IS4, 46IS2, 47IS1		42IS3, 46IS2, 47IS1
กูด	44	11	3IS1, 3IS17, 49IS1, 49IS2, 52IS3	3IS1, 3IS17, 35IS3, 37IS1, 49IS2, 49IS3, 49IS5, 50IS3, 52IS2	3IS1	3IS1, 3IS17, 50IS3,
หอยแมลง กูด	30	10	6IS5, 6IS12,	6IS5, 6IS6, 6IS12,	-	6IS5, 6IS6,
			6IS16, 6IS17,	6IS14, 6IS15, 6IS16,		6IS12, 6IS14,
			6IS18, 6IS19,	6IS17, 6IS18, 6IS19,		6IS15, 6IS16,
			6IS20	6IS20		6IS17, 6IS18, 6IS19, 6IS20
ปลาช่อม กูด	36 65	2 19	33IS3, 33IS5 4IS1, 4IS2, 4IS6, 4IS9, 4IS10, 4IS11 4IS12, 4IS17, 4IS18, 4IS19, 4IS20, 4IS21, 4IS22, 4IS23	33IS3, 33IS5 4IS1, 4IS4, 4IS5, 4IS6, 4IS9, 4IS10, 4IS11, 4IS12, 4IS13, 4IS14, 4IS16, 4IS17, 4IS18, 4IS19, 4IS20, 4IS21, 4IS22, 4IS23	- -	33IS3, 33IS5 4IS1, 4IS4, 4IS5, 4IS6, 4IS9, 4IS10, 4IS11, 4IS12, 4IS14, 4IS16, 4IS17, 4IS18, 4IS19, 4IS20, 4IS21, 4IS22, 4IS23
รวม	222	52				

^a เชื้อ *L. bulgaricus* TISTR 541 และ *P. acidilactici* TISTR 051

^b เชื้อ *V. parahaemolyticus* SH1, *S. Typhimurium* DMST 0562 และ *E. coli* DMST 4212, *L. monocytogenes* DMST 11256 และ *S. aureus* TISTR 118

^c เชื้อ *P. fluorescens* DMST 20076

^d ไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้

การที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบด้วยวิธี agar spot test คาดว่าเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งชนิดต่างๆ Holzzapfel และคณะ (1995) ได้กล่าวว่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเมแทบอลิซึมหลายชนิดที่มีคุณสมบัติต่อต้านจุลินทรีย์ได้แก่ กรดอินทรีย์ (เช่นกรดแลคติกและกรดอะซิติก) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอนไซม์แลคโตเปอร์ออกซิเดส (lactoperoxidase) และเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) สารเมแทบอลิซึมโมเลกุลต่ำ (เช่นริวเทอร์ริน (reuterin) ไดอะซิติกและกรดไขมัน) สารแบคทีริโอซิน (ไนซินและอื่นๆ) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการทดลองของนักวิจัยหลายท่าน De Carvalho และคณะ (2006) ได้แยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากไส้กรอกแห้งของอิตาลี (Italian salami) และนำมาทำการทดสอบการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Listeria monocytogenes* ด้วยวิธี agar spot test พบว่าสามารถทำให้เกิดวงใสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 20 มิลลิเมตร หลังจากบ่ม 24 ชั่วโมง นอกจากนี้ Schillinger และ Locke (1989) ได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากเนื้อพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus sake* 9 สายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* 3 สายพันธุ์ และ *Lactobacillus curvatus* 1 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacilli* ชนิดอื่นด้วยวิธี agar spot test เช่นเดียวกับ Lopez และ Mayo (1997) ได้ทำการแยก *Lactobacillus* จาก artisan starter-free cheeses พบว่า *Lactobacillus* 8 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sake* CECT 906 และ *Lactobacillus* 13 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LMG 13563 ด้วยวิธี agar spot test และ Olasupo และคณะ (1994) ได้แยกแบคทีเรียกรดแลคติก 200 ไอโซเลต จากอาหารหมักของชาวแอฟริกัน พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Lactobacillus sake* DSM 20017 โดยใช้วิธี agar spot test

4.2 คุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตสารยับยั้ง

4.2.1 การทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลื่อน้ำดี และเกลือโซเดียมคลอไรด์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการศึกษาการทนต่อกรดไฮโดรคลอริกของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ในอาหารเหลว MRS ที่มีค่าพีเอช 3.0 ถึง 7.0 ซึ่งปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริกและมีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำถึง 2.5

และ 2.0 จำนวน 1 และ 9 ไอโซเลต ตามลำดับ ซึ่งคิดเป็นร้อยละ 1.92 และ 17.31 ของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (52 ไอโซเลต) ตามลำดับ นอกจากนี้ที่พีเอช 1.5 ซึ่งเป็นพีเอชต่ำสุดที่ทดสอบพบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 24 ไอโซเลต สามารถเจริญได้คิดเป็นร้อยละ 46.15 (ตารางที่ 4.3)

จากการศึกษาการทนต่อกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติก (ตารางที่ 4.3) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้ที่พีเอชต่ำสุด 1.5 มีจำนวน 6 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 11.54 ส่วนที่ระดับพีเอช 2.0 พบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้มากที่สุด จำนวน 24 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 46.15 รองลงมาคือที่ระดับพีเอช 5.0 มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้จำนวน 15 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 28.85 และที่ระดับพีเอช 4.0 และ 2.5 มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถเจริญได้เท่ากัน คือ 3 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 5.77 นอกจากนี้ที่ระดับพีเอช 3.0 พบแบคทีเรียกรดแลคติกเพียงไอโซเลตเดียวที่สามารถเจริญได้

เมื่อพิจารณาค่าพีเอชต่ำสุดที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญได้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ (24 ไอโซเลต) ทนต่อกรดไฮโดรคลอริกได้ที่ระดับพีเอชต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรเจริญในสภาพที่มีกรดแลคติก โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถทนกรดได้ดีที่สุดสามารถทนต่อระดับพีเอชต่ำสุดที่ 1.5 ของทั้งกรดไฮโดรคลอริกและกรดแลคติก ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 3 ไอโซเลต ได้แก่ ไอโซเลต IIS3, 4IS19 และ 4IS23

จากผลการศึกษาการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลือน้ำดี (ตารางที่ 4.3) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุดร้อยละ 10 มีจำนวน 33 ไอโซเลต (ร้อยละ 63.46) และที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 9, 7, 6 และ 5 มีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 2, 13, 1 และ 3 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ตามลำดับ นอกจากนี้การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่ทดสอบ (51 ไอโซเลต) คิดเป็นร้อยละ 98.08 สามารถทนต่อเกลือน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 1.5 และมีเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้นที่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.5

ตารางที่ 4.3 การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลื่อน้ำดีและโซเดียมคลอไรด์ในอาหาร
เหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

แหล่งของ ไอโซเลต	ไอโซเลต	สภาวะที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติก				
		กรดไฮโดรคลอริก ^a	กรดแลคติก ^a	โซเดียมคลอไรด์ ^b (ร้อยละ)	เกลื่อน้ำดี ^b ที่ pH 8 (ร้อยละ)	
หอยแมลงภู่ สด	1IS2	2.0	2.5	10.0	1.5	
	1IS3	1.5	1.5	10.0	1.5	
	1IS11	2.0	2.0	10.0	1.5	
	39IS5	3.0	5.0	5.0	1.5	
	41IS5	3.0	5.0	7.0	1.5	
	42IS3	3.0	4.0	7.0	1.5	
	45IS4	3.0	5.0	6.0	0.5	
	45IS3	3.0	5.0	7.0	1.5	
	46IS2	3.0	4.0	7.0	1.5	
	47IS1	3.0	5.0	7.0	1.5	
	กุ้งสด	3IS1	2.0	1.5	10.0	1.5
		3IS17	2.0	1.5	10.0	1.5
		35IS3	3.0	5.0	5.0	1.5
		37IS1	3.0	5.0	9.0	1.5
49IS1		3.0	5.0	7.0	1.5	
49IS2		3.0	5.0	7.0	1.5	
49IS3		3.0	5.0	7.0	1.5	
49IS5		3.0	5.0	7.0	1.5	
50IS3		3.0	5.0	5.0	1.5	
52IS2		3.0	5.0	7.0	1.5	
52IS3	3.0	5.0	7.0	1.5		
หอยแมลงภู่ ดอง	6IS5	2.0	2.0	10.0	1.5	
	6IS6	1.5	2.0	10.0	1.5	
	6IS12	1.5	2.0	10.0	1.5	
	6IS14	1.5	2.0	10.0	1.5	
	6IS15	1.5	2.0	10.0	1.5	
	6IS16	1.5	2.0	10.0	1.5	

ตารางที่ 4.3 (ต่อ) การทนต่อกรดแลคติก กรดไฮโดรคลอริก เกลื่อน้ำดีและโซเดียมคลอไรด์ใน
อาหารเหลว MRS ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

แหล่งของ ไอโซเลต	ไอโซเลต	สภาวะที่ใช้ทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติก			
		กรดไฮโดรคลอริก ^a	กรดแลคติก ^a	โซเดียมคลอไรด์ ^b (ร้อยละ)	เกลื่อน้ำดี ^b ที่ pH 8 (ร้อยละ)
หอยแมลง คอง	6IS17	1.5	2.0	10.0	1.5
	6IS18	1.5	2.0	10.0	1.5
	6IS19	1.5	2.5	10.0	1.5
	6IS20	2.0	2.0	10.0	1.5
ปลาจ่อม	33IS3	3.0	4.0	7.0	1.5
	33IS5	3.0	5.0	7.0	1.5
กุ้งจ่อม	4IS1	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS2	2.0	1.5	10.0	1.5
	4IS4	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS5	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS6	2.0	2.0	10.0	1.5
	4IS9	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS10	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS11	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS12	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS13	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS14	2.5	3.0	10.0	1.5
	4IS16	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS17	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS18	1.5	2.0	10.0	1.5
	4IS19	1.5	1.5	10.0	1.5
4IS20	1.5	2.0	10.0	1.5	
4IS21	1.5	2.0	10.0	1.5	
4IS22	2.0	2.5	10.0	1.5	
4IS23	1.5	1.5	9.0	1.5	

^a ค่าพีเอชต่ำสุดของกรดแลคติกหรือกรดไฮโดรคลอริกในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

^b ความเข้มข้นสูงสุดของโซเดียมคลอไรด์หรือเกลื่อน้ำดีในอาหารเหลว MRS ที่แบคทีเรียกรดแลคติกเจริญได้

จากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีประสิทธิภาพสูงในการทนต่อกรดและเกลือ ซึ่งเป็นคุณสมบัติหนึ่งของจุลินทรีย์โพรไบโอติก โดยอาจนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้นี้ไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักอาหาร เนื่องจากการรับประทานอาหารที่มีจุลินทรีย์โพรไบโอติกจะให้ผลดีต่อสุขภาพ ได้แก่ ช่วยเสริมระบบภูมิคุ้มกัน ช่วยต้านมะเร็ง ช่วยต่อต้านจุลินทรีย์ก่อโรค ช่วยปรับสมดุลในลำไส้และกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (Marth และ Steele. 2001) แต่การที่แบคทีเรียโพรไบโอติกจะให้ผลดีต่อสุขภาพได้นั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกต้องสามารถมีชีวิตรอดได้ตลอดกระบวนการ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกต้องสามารถทนต่อกรดแลคติกและโซเดียมคลอไรด์ซึ่งเป็นสภาวะที่ต้องเผชิญในกระบวนการหมักอาหารและต้องทนต่อกรดไฮโดรคลอริกและเกลือน้ำดีเมื่อเข้าสู่กระเพาะอาหารและลำไส้ได้ ดังเช่น Erkkilä และ Petäjä (2000) ได้ทำการคัดเลือกกล้าเชื้อสำหรับการหมักเนื้อที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกโดยได้คัดเลือก *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) ที่สามารถอยู่รอดได้ดีในสภาวะที่มีความเป็นกรดและที่ความเข้มข้นของเกลือน้ำดีสูง

ปกติแล้วกระเพาะอาหารจะหลั่งน้ำย่อยออกมา 1 ถึง 2 ลิตรต่อวัน น้ำย่อยประกอบด้วยกรดไฮโดรคลอริก ซึ่งทำให้พีเอชของกระเพาะลดต่ำลงในน้ำย่อยมีพีเอชต่ำกว่า 3 (Mitsuoka และ Emeritus. 1992) แต่เมื่อรับประทานอาหารเข้าไปอาหารบางชนิด (โปรตีนและเปปไทด์) จะมีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์ทำให้พีเอชในกระเพาะอาหารเป็น 2 ดังนั้นแบคทีเรียโพรไบโอติกที่จะมีชีวิตรอดควรจะทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรดนี้ได้ แต่เมื่ออาหารเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) น้ำดีจะถูกสร้างขึ้นจากตับและเก็บไว้ในถุงน้ำดีจากนั้นจึงถูกขับออกมายังลำไส้เล็กเป็นที่ซึ่งน้ำดีจะมีส่วนร่วมในการย่อยอาหารและดูดซึมไขมัน น้ำดีเป็นของผสมที่ซับซ้อนของสารอินทรีย์และสารอนินทรีย์ ได้แก่ เกลือน้ำดี (bile salt) กรดน้ำดี (bile acid) ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่เป็นส่วนประกอบหลักของน้ำดีมีประมาณร้อยละ 50 ขององค์ประกอบที่เป็นของแข็งทั้งหมดรวมทั้งฟอสโฟลิปิด คอเลสเตอรอล bile pigment และอออนของสารอนินทรีย์หลายชนิด เช่น Na^+ (มีมาก) K^+ และ Ca^{++} (มีน้อย) Cl^- และ HCO_3^- (มีมาก) (Weisbrodt. 2007) Enger และ Ross (2000) รายงานว่าลำไส้เล็กส่วนต้นนอกจากจะทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์แล้วยังทำหน้าที่ในการหลั่งฮอร์โมนหลายชนิดซึ่งช่วยควบคุมการปล่อยอาหารออกจากกระเพาะอาหารและปล่อยสารคัดหลั่งออกจากตับอ่อนและตับโดยตับอ่อนจะผลิตเอนไซม์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารและจะหลั่งไบคาร์บอเนตอออน (bicarbonate ion) ออกมาปริมาณมากซึ่งจะทำให้กรดในกระเพาะอาหารมีความเป็นกลางจนกระทั่งทำให้พีเอชของลำไส้เล็กส่วนต้นมีค่าประมาณ 8.0 ด้วยเหตุนี้ในการศึกษา

การทนต่อเกลือน้ำดีของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกจึงได้ปรับพีเอชของอาหารเหลว MRS ที่เติมเกลือน้ำดีให้ได้เท่ากับ 8.0 เพื่อจะได้มีค่าพีเอชเท่ากับสภาพความเป็นจริงที่แบคทีเรียกรดแลคติกจะเผชิญในลำไส้เล็กส่วนต้น

การทนต่อกรดเกลือ น้ำดีของจุลินทรีย์แต่ละไอโซเลตขึ้นอยู่กับธรรมชาติของจุลินทรีย์เอง โดยการที่แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่ทดสอบสามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกได้ที่ระดับพีเอชต่ำกว่ากรดแลคติกอาจเป็นเพราะกรดแลคติกทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์มากกว่ากรดไฮโดรคลอริกเนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดอ่อนซึ่งในสภาพที่มีพีเอชต่ำกว่ากรดอ่อนสามารถแตกตัวได้ไม่สมบูรณ์จึงมีกรดบางส่วนที่อยู่ในรูปที่ไม่แตกตัว (undissociated lipophilic acid molecules) กรดในรูปนี้จะผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้าไปภายในเซลล์ได้ง่ายและไปแตกตัวให้ไฮโดรเจนไอออนภายในเซลล์ทำให้พีเอชภายในเซลล์ (internal pH) ลดลงแต่ในสภาพพีเอชต่ำเช่นเดียวกันกรดไฮโดรคลอริกซึ่งเป็นกรดแก่จะแตกตัวได้หมดและไฮโดรเจนไอออนที่อยู่ภายนอกเซลล์ไม่สามารถผ่านเข้าเซลล์ได้โดยง่าย ดังนั้นการทำให้พีเอชภายในเซลล์ลดลงจึงเป็นสาเหตุหลักในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียโดยกรดอ่อน (Adam และ Moss. 1995 ; Girgis และคณะ. 2003) ได้มีผู้รายงานว่าการปรับพีเอชภายนอกเซลล์ด้วยกรดแลคติกมีผลต่อการลดพีเอชภายในเซลล์ของ *Lactococcus lactis* และ *Streptococcus bovis* มากกว่าการปรับพีเอชภายนอกเซลล์ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (Cook และ Russel. 1994)

การที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบส่วนใหญ่สามารถทนต่อกรดที่พีเอชต่ำได้ดีน่าจะเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถปรับตัวต่อสภาพที่มีความเป็นกรดได้ดีซึ่งการชักนำการปรับตัวต่อกรดเกี่ยวข้องกับการตอบสนองการทนต่อกรด (acid tolerance response; ATR) และขึ้นอยู่กับการสังเคราะห์โปรตีน มีรายงานเกี่ยวกับ ATR ในแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Streptococcus mutans*, *Enterococcus hirae* และ *Lactococcus lactis* (Girgis และคณะ. 2003) นอกจากนี้การที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทนต่อกรดได้น่าจะเกิดจากเอนไซม์ F_0F_1 ATPase ช่วยรักษาพีเอชภายในเซลล์และป้องกันเซลล์ในระหว่างการเผชิญกับสภาพแวดล้อมที่เป็นกรดโดยการเคลื่อนย้ายโปรตอนออกสู่ภายนอกเซลล์ในขณะที่มีการใช้ ATP กิจกรรมและจำนวนของ proton-translocating ATPase เพิ่มขึ้นในแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดขณะที่มีการปรับพีเอชภายนอกเซลล์จากสภาพเป็นกลางให้ลดต่ำลงถึงพีเอช 5.0 (Girgis และคณะ. 2003)

การที่แบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถทนต่อเกลือน้ำดีได้ที่มีความเข้มข้นสูงสุด Moser และ Savage (2001) ได้ตั้งสมมติฐาน 2 ประการว่า ความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดีอาจเกี่ยวข้องกับ การที่แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถผลิตเอนไซม์ bile salt hydrolases (BSHs) ได้ เอนไซม์ชนิดนี้อาจไปเมแทบอลิซึมกรดเกลือ (bile acid) เอนไซม์ BSHs ผลิตโดยแบคทีเรียที่อยู่ใน กระเพาะอาหารและลำไส้รวมทั้ง *Enterococcus*, *Bifidobacterium* และ *Lactobacillus* สมมติฐานข้อแรกคือแบคทีเรียบางชนิดอาจจะสามารถดีคอนจูเกต (deconjugated) เกลือน้ำดี โดยใช้กรดอะมิโนทิวรีน (taurine) เป็นตัวรับอิเล็กตรอน สมมติฐานข้อที่สองคือ เอนไซม์ BSHs อาจจะไปลดความเป็นพิษของ conjugated bile acid ที่มีต่อแบคทีเรีย เมื่อเปรียบเทียบกับ conjugated bile acid พบว่า deconjugated bile acid มีความสามารถในการละลายต่ำกว่าและมีกิจกรรมของ detergent น้อยกว่า ดังนั้นจึงมีความเป็นพิษต่อแบคทีเรียในลำไส้ น้อยกว่า แต่อย่างไรก็ตาม Moser และ Savage (2001) ได้ทำการทดลองพิสูจน์สมมติฐานทั้ง 2 ข้อพบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้จากมนุษย์ 21 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์ taurodeoxycholic acid (TDCA) hydrolase และ *Lactobacillus* 20 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์ taurocholic acid (TCA) hydrolase และ *Lactobacillus* 14 ไอโซเลต สามารถต้านความเป็นพิษของ conjugated bile acid (TDCA) ได้แต่ก็มี *Lactobacillus* 11 ไอโซเลตที่ไม่สามารถต้านความเป็นพิษของ TDCA ได้ ซึ่งทำให้การทดลองของ Moser และ Savage ไม่สนับสนุนสมมติฐานที่ว่า *Lactobacilli* สามารถที่จะต้านทานความเป็นพิษต่อ conjugated bile salts ได้ แต่ผลการทดลองได้สนับสนุนสมมติฐานว่า เอนไซม์ bile salt hydrolase มีความสำคัญกับแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้มนุษย์ซึ่งแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ที่แยกได้จากมนุษย์มีทั้งเอนไซม์ TDCA hydrolase และ TCA hydrolase ดังนั้นกิจกรรมของ BSHs อาจจะมีมีความสำคัญสำหรับแบคทีเรียที่สามารถอยู่รอดและเพิ่มจำนวนในลำไส้

จากการศึกษาการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถที่จะทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ อาจเป็นเพราะแบคทีเรียมีการปรับตัวต่อสภาวะเครียดเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดและเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือสูง เซลล์เมื่ออยู่ในสภาพที่มีความดันออสโมติกภายนอกเซลล์สูงๆ จะทำให้น้ำภายในเซลล์เคลื่อนสู่ภายนอกเซลล์และการที่ปริมาณน้ำภายในเซลล์ลดลงเป็นผลให้ความดันเต่ง (turgor pressure) ภายในเซลล์ลดลงซึ่งจะทำให้ปริมาตรของเซลล์ (cytoplasmic volume) ลดลงเมื่อปริมาณน้ำลดลงความเข้มข้นของสารเมแทบอลิซึม (metabolites) ภายในเซลล์จึงเพิ่มขึ้นซึ่งเป็นเหตุให้ค่ากิจกรรมของน้ำ (water activity ; a_w) ภายในเซลล์ลดลงเท่ากับภายนอกเซลล์ เมื่อความเข้มข้นของโมเลกุลของสารภายในเซลล์เพิ่มสูงขึ้นอาจจะไปยับยั้งกระบวนการภายใน

เซลล์เช่นไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ภายในเซลล์ แต่ในสิ่งมีชีวิตที่มีการปรับตัวต่อสภาวะเครียดจากความดันออสโมติก (osmotic stress) จะตอบสนองโดยเพิ่มความเข้มข้นของตัวถูกละลายบางชนิดภายในเซลล์ที่ไม่มีผลไปยับยั้งปฏิกิริยาต่างๆภายในเซลล์ ตัวถูกละลายนี้เรียกว่า compatible solutes ซึ่งมีผลช่วยลดค่า a_w ภายในเซลล์ซึ่งเป็นผลให้ปริมาตรของเซลล์และความดันเต่งคืนสภาพ สาร compatible solutes ที่พบในแบคทีเรียได้แก่ โพแทสเซียมไอออน (K^+) กรดอะมิโน กลูตามัท (amino acid glutamate) กลูตามีน (glutamine) โพรลีน (proline) γ -aminobutyrate และ อะลานีน (alanine) quaternary amine glycine betaine และสาร N-methylated amino acid derivative และน้ำตาลซูโครส ทรีฮาโรส α -D-glucopyranosyl- α -D-glucopyranoside และ glucosylglycerol (Csonka. 1989) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกก็สามารถสะสมสาร compatible solutes ได้ดังเช่น การรายงานของ Kets และ De Bont (1994) ซึ่งได้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Lactobacillus plantarum* P743 ที่เจริญในอาหารเหลว MRS ที่เติมโซเดียมคลอไรด์มีการสะสม ไกลซีนบีเทน (glycine betaine) และ L-carnitine นอกจากนี้ Glaasker และคณะ (1996) ยังได้รายงานว่าพบการสะสมกลูตามัทและโพรลีนในเซลล์ของ *Lactobacillus plantarum* ที่เจริญในอาหารที่มีโพแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.8 โมลาร์ นอกจากนี้ Baliarda และคณะ (2003) ได้กล่าวว่า *Tetragenococcus halophilus* ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทนเกลือและมีปริมาณสาร compatible solutes ที่สะสมรวมทั้ง dimethylsulfonioacetate, dimethylsulfoniopropionate และ ectoine นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังสามารถนำสาร compatible solutes จากอาหารเข้าสู่เซลล์ได้ ดังการรายงานของ Glaasker และคณะ (1998) ซึ่งได้รายงานว่า *Lb. plantarum* ชอบที่จะสะสมไกลซีนบีเทนเมื่อเลี้ยงในอาหารที่มีการเติมสารนี้

4.2.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ amino decarboxylase activity ของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกลุ่มที่มีความสำคัญสำหรับที่ใช้เป็นกล้าเชื้ออาหารหมักซึ่งสายพันธุ์ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อที่ดีต้องเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ดีคาร์บอกซิเลต (decarboxylate) กรดอะมิโน ซึ่งจะช่วยส่งเสริมสุขภาพและลดความเสี่ยงต่อภาวะเป็นพิษที่เกิดจากไบโอเจนิคเอมีน เนื่องจากการที่มีไบโอเจนิคเอมีนในระดับสูงในอาหารหมัก เช่นผลิตภัณฑ์ปลาหมัก เนยแข็ง ไวน์ เบียร์และไส้กรอกหมัก ทำให้เกิดปัญหากับสุขภาพเพราะไบโอเจนิคเอมีนมีผลทำให้เกิดโรคมามากมาย เช่น ไมเกรน ปวดหัว ลำไส้เล็กและกระเพาะอาหารเป็นแผลพุพองและมีอาการแพ้ (Pereia และคณะ. 2001) ดังนั้นในการทดลองนี้จึงต้องการคัดเลือกไอโซเลตที่ไม่มีกิจกรรมการสร้างเอนไซม์อะมิโน

แอซิดดีคาร์บอกซิเลส (amino acid decarboxylase) (ให้ผลลบในการทดสอบ) จากการทดลองพบว่า ในจำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ทดสอบทั้งหมด 52 ไอโซเลต พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกเพียงจำนวน 3 ไอโซเลต (ร้อยละ 5.77) เท่านั้น ได้แก่ IIS11, 4IS16 และ 4IS17 ที่ไม่สร้างเอนไซม์ amino acid decarboxylase มีรายงานว่าเอนไซม์ amino acid decarboxylase พบได้ในแบคทีเรีย *Enterobacteriaceae*, *Clostridium*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* และ *Pseudomonas* เป็นต้น แบคทีเรียที่สร้างเอมีนที่พบเด่นๆ ในปลาส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมลบอยู่ในวงศ์ (family) *Enterobacteriaceae* ซึ่งสายพันธุ์ที่สามารถดีคาร์บอกซิเลตกรดอะมิโนฮิสติดีน (histidine-decarboxylating) ได้คือแบคทีเรียสกุล *Proteus*, *Klebsiella*, *Hafnia* และ *Enterobacter* (Joosten และ Northolt. 1999) จุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์ชนิดนี้มีผลทำให้เกิดการสร้างไบโอเจนิคเอมีนซึ่งการสร้างไบโอเจนิคเอมีนชนิด ทริปตามีน ฮีสตามีน ฟีนีลเอทิลเอมีน ทริปตามีน พิวตริซีน คาคาวารีน ที่เป็น precursor เช่น ไทโรซีน ฮีสติดีน ฟีนีลอะลานีน ทริปโตเฟน ฮอนิทิน และไลซีน ตามลำดับ (Bover-Cid และคณะ. 2001) ปัจจัยที่มีผลต่อการเกิดเอมีนได้แก่ ต้องมีกรดอะมิโนอิสระและมีจุลินทรีย์ที่สามารถดีคาร์บอกซิเลตกรดอะมิโนและสภาวะต้องเหมาะสมสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์ดีคาร์บอกซิเลส (Pereia และคณะ. 2001)

4.3 การศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

4.3.1 การทดสอบการสร้างสารแบคทีเรียโอซินโดยวิธี agar well diffusion assay

จากผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้จำนวน 52 ไอโซเลต ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน จากนั้นนำทั้ง 52 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการสร้างสารแบคทีเรียโอซิน พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลต ได้แก่ IIS11 มีเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 1 มิลลิเมตร และ 4IS17 มีเส้นผ่าศูนย์กลางวงใสเท่ากับ 6 มิลลิเมตร โดยทั้งสองไอโซเลตสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้เพียงชนิดเดียว คือ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 541 จากแบคทีเรียที่ใช้ทดสอบรวม 8 ชนิด จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต มาทดสอบผลของอุณหภูมิ พีเอชและเอนไซม์ต่อกิจกรรมแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกในการทดลองขั้นต่อไปโดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทดสอบเพียงชนิดเดียว คือ *Lb. bulgaricus*

การที่สารแบคทีเรียโอซินที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้นสามารถยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวกอาจเป็นเพราะแบคทีเรียแกรมบวกมีความไวต่อสารแบคทีเรียโอซินมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ Savadogo และคณะ (2004) ได้รายงานว่ สารแบคทีเรียโอซินที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติกจะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้มากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ Rattanachaikunsopon และคณะ (2003) ได้ทำการทดลองพบว่าแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติก *Leuconostoc mesenteroides* TFF5 สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น ที่เป็นเช่นนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียแกรมลบมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane) ซึ่งจะกีดขวางแบคทีเรียโอซินเข้าสู่เซลล์ (Stevens และคณะ. 1991) นอกจากนี้ Buntin และคณะ (2008) ได้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก *Pediococcus pentosaceus* APa4, *Pediococcus pentosaceus* APa1 และ *Enterococcus faecium* ARa1 สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus*, *Salmonella* sp. และยังสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรค เช่นเชื้อ *E. coli* และ *L. monocytogenes* ได้จากการทดสอบด้วยวิธี agar well diffusion

4.3.2 ผลของอุณหภูมิจน 4°C และพีเอช ต่อกิจกรรมแบคทีเรียโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือก

จากผลการทดลองนำสารแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดยแบคทีเรียกรดแลคติกมาทดสอบความไวต่ออุณหภูมิจน 4°C และพีเอช พบว่า สารแบคทีเรียโอซินที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ IIS11 และ 4IS17 ที่ผ่านการทรีตด้วยเอนไซม์ไลเปสและไม่ผ่านการทรีต (ชุดควบคุม) มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิด *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 541 ได้ แต่ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งการเจริญของเชื้อนี้เมื่อนำสารแบคทีเรียโอซินมาทรีตกับพีเอช อุณหภูมิและเอนไซม์ย่อยโปรตีน (pretease, pepsin, trypsin และ α -chymotrypsin) และเอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase) การที่สารแบคทีเรียโอซินทั้ง 2 ชนิด มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์เมื่อนำมาทรีตด้วยเอนไซม์ไลเปสอาจเป็นเพราะสารแบคทีเรียโอซินเหล่านี้ไม่มีส่วนประกอบของไขมันอยู่ ในทางตรงกันข้าม สารแบคทีเรียโอซินเหล่านี้ไม่มีกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์เมื่อนำมาทรีตด้วยเอนไซม์ย่อยโปรตีน และเอนไซม์ย่อยแป้งเป็นไปได้ว่าสารแบคทีเรียโอซินที่แบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ชนิด ผลิตขึ้นอาจมีส่วนประกอบของโปรตีนและคาร์โบไฮเดรตแต่เมื่อนำสารแบคทีเรียโอซินมาทรีตด้วยอุณหภูมิสูงและพีเอชที่ระดับต่างๆ พบว่าสารแบคทีเรียโอซินไม่มีกิจกรรมการยับยั้ง คาดว่าเป็นเพราะสารแบคทีเรียโอซินไม่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงและพีเอชต่ำได้ ซึ่งมีแนวโน้มว่าสาร

แบคทีเรียโอซินทั้ง 2 ชนิดอยู่ในกลุ่มของสารแบคทีเรียโอซินที่มีองค์ประกอบของโปรตีนผสมกับไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต ซึ่ง Olasupo และคณะ (1994) พบว่า *Enterococcus faecium* ที่แยกได้จากทางนมหมักของชาวไนจีเรียสามารถสร้างสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus*, *Enterococcus* และ *Listeria* ได้หลายชนิดซึ่งสารแบคทีเรียโอซิน enterocin 01 ซึ่งจะสูญเสียกิจกรรมเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ α -chymotrypsin และ proteinase K แต่ไม่สูญเสียกิจกรรมเมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin และ pepsin สาร enterocin 01 มีความคงตัวต่อความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที และที่พีเอช 2 ถึง 6 ซึ่งการให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาทีหรือมากกว่าทำให้เกิดการสูญเสียกิจกรรมของสาร enterocin 01 นอกจากนี้ได้มีรายงานว่า *Enterococcus* spp. เช่น *Ent. faecium*, *Ent. mundtii* หรือ *Ent. darans* สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินชนิด enterocin A, enterocin B, enterocin I, enterocin L หรือ enterocin P ซึ่งเชื่อว่าอยู่ใน class IIa ซึ่งสายพันธุ์ดังกล่าวส่วนใหญ่แยกได้เนื้อสด ใสักรอกหมักหรือมะกอกหมักมากกว่าแยกได้จากปลา (Ennahar และคณะ. 2001)

4.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลสด และอาหารทะเลหมัก

จากผลการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 222 ไอโซเลต จากกุ้งสด หอยแมลงภู่น้ำจืด หอยแมลงภู่น้ำเค็ม ปลาจ่อมและกุ้งจ่อม สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar spot test ได้ทั้งหมด 52 ไอโซเลต จากนั้นนำทั้ง 52 ไอโซเลตมาทดสอบความเป็นโพไซโตติก (ทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดีและโซเดียมคลอไรด์) การไม่สร้างกิจกรรมของเอนไซม์อะมิโนเอสเตอเรส และการสร้างสารแบคทีเรียโอซินสามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 2 ไอโซเลต ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวมาข้างต้น จากนั้นนำทั้ง 2 ไอโซเลต (IIS11 และ 4IS17) มาทดสอบผลของความไวต่ออุณหภูมิ พีเอชและเอนไซม์ที่มีต่อสารแบคทีเรียโอซิน และนำทั้ง 2 ไอโซเลต มาจำแนกคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยา ทางชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ซึ่งสามารถทำการจัดจำแนกได้ด้วยวิธีการดังนี้

4.4.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากผลการทดลองจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก โดยคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียชนิดอื่นได้

การทนต่อกรดไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลือน้ำดีและเกลือ โซเดียมคลอไรด์และไม่สร้างเอนไซม์ amino acid decarboxylase สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกได้ทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ IIS11 และ 4IS17 ซึ่งทั้ง 2 ไอโซเลตเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลม (ภาพที่ 4.1) ไม่เคลื่อนที่ และจากการศึกษาลักษณะโคโลนิบนอาหารแข็งพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีที่เหมือนกัน บนอาหารแข็ง คือ มีรูปร่างกลม โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าอาหารและขอบของโคโลนีมีลักษณะขอบเกลี้ยง ไม่มีรอยเว้า ผิวโคโลนีมีผิวเรียบ โคโลนีมีสีขาว จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสอง ไอโซเลตมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อการจำแนกชนิดในระดับจีโนสในขั้นตอนต่อไป

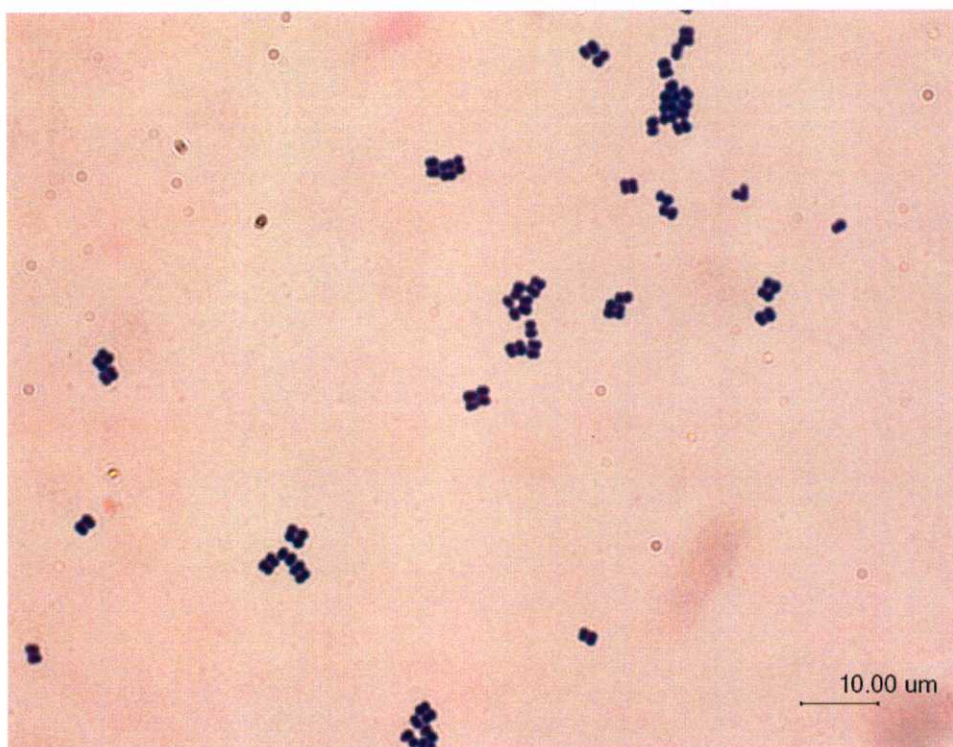
4.4.2 คุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นเพื่อการจำแนกชนิดในระดับจีโนส

จากการศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต ได้แก่ IIS11 และ 4IS17 พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต ไม่ผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส ไม่สร้างเอนไซม์อะเลส สามารถเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส และจากการทดสอบการเจริญที่พีเอช 4.4 และ 9.6 และการเจริญในอาหารเหลวในสภาพที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 6.5 พบว่าทั้ง 2 ไอโซเลต ให้ผลเหมือนกันคือสามารถเจริญได้ แต่ทั้ง 2 ไอโซเลต ไม่สามารถเจริญได้ในสภาพที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ร้อยละ 18 ซึ่งเมื่อนำผลการทดสอบ มาเปรียบเทียบกับตารางคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแลคติก (Axelsson, 2004) ในตารางที่ ข1 ภาคผนวก ข สามารถบอกได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต อยู่ในสกุลเดียวกันคือ *Enterococcus* sp. นอกจากนี้ทั้ง 2 ไอโซเลตที่ได้มาทดสอบการจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH ต่อไป

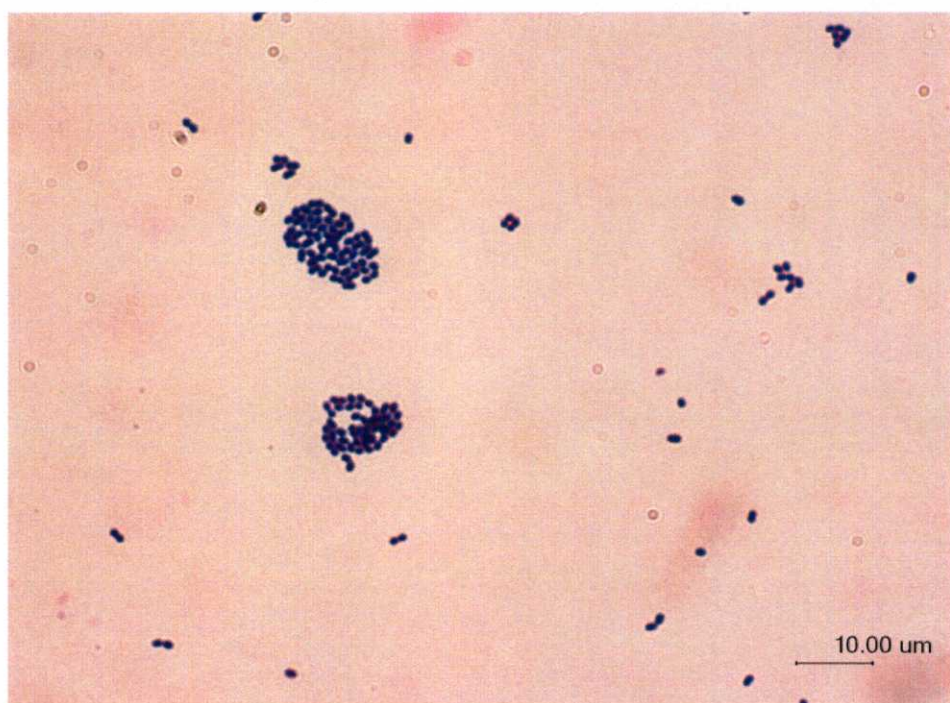
4.4.3 คุณสมบัติทางชีวเคมีเพื่อการจำแนกชนิดในระดับสปีชีส์โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

จากผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตชนิดต่างๆ โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CH พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่ IIS11 มีความเหมือนกับสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 2 ร้อยละ 58.4 และสายพันธุ์ 4IS17 มีความเหมือนกับสายพันธุ์ *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 3 ร้อยละ 76.5 ซึ่งผลการทดลองที่ได้ไม่ตรงกับผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นและมีร้อยละของความเหมือนกันข้างต่ำจึงนำผลการหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสองไอโซเลตนี้ไปเปรียบเทียบกับตารางงานของนักวิจัยท่านอื่น ในกรณีของ

Enterococcus faecium Thapa และคณะ. (2004) ได้แยกเชื้อและจำแนกชนิดของ *Ent. faecium* (รหัส ไอโซเลต H2 : B3) จาก hentak ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักของอินเดีย โดยได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Ent. faecium* สายพันธุ์นี้พบว่าได้ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตจำนวน 17 ชนิดซึ่งได้แก่ arabinose, ribose, xylose, galactose, sucrose, trehalose, rhamnose, mannose, sorbitol, esculin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, raffinose และ melezitose เช่นเดียวกับผลการทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตของไอโซเลตที่ IIS11 ที่ได้จากการทดลองนี้ (ตารางที่ 4.4) คือไม่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตชนิด melezitose, raffinose, sorbitol และ arabinose ได้แต่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตชนิด melibiose, lactose, maltose, cellobiose, salicin, esculin, mannose, trehalose, sucrose, galactose และ ribose ได้ นอกจากนี้ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 17 ชนิดนี้ยังเหมือนผลการหมักคาร์โบไฮเดรตที่ได้รายงานไว้โดย (Devriese และ Pot. 1995) สำหรับกรณีของ *Enterococcus faecalis* นั้น Thapa และคณะ. (2006) ได้แยกเชื้อ *Ent. faecalis* (รหัส ไอโซเลต CG1 : B2) จาก sider ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปลาตากแห้งของเนปาล และได้ศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Ent. faecalis* ที่แยกได้พบว่าได้ผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 17 ชนิด ได้แก่ arabinose, ribose, xylose, galactose, sucrose, trehalose, rhamnose, mannose, sorbitol, esculin, salicin, cellobiose, maltose, lactose, melibiose, raffinose และ melezitose เช่นเดียวกับผลการทดลองการหมักคาร์โบไฮเดรตไอโซเลต 4IS17 ที่ได้จากการทดลองนี้ (ตารางที่ 4.4) สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตชนิด melezitose, lactose, maltose, cellobiose, salicin, sorbitol, mannose, trehalose, sucrose, galactose และ ribose ได้ แต่ไม่สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตชนิด arabinose, xylose, rhamnose, melibiose และ raffinose ได้ ซึ่งผลการหมักคาร์โบไฮเดรตทั้ง 17 ชนิด ยังให้ผลเหมือนกับการรายงานของ (Devriese และ Pot. 1995) สำหรับ *Ent. faecium* และ *Ent. faecalis* มีผลการหมักคาร์โบไฮเดรตเพียง 3 ชนิดที่แตกต่างกันคือ sorbitol, melibiose และ melezitose (ตารางที่ 4.4) ดังนั้นจากผลการหมักคาร์โบไฮเดรต พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่ IIS11 คาดว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Ent. faecium* มากกว่า *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* 2 ส่วน แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่ 4IS17 น่าจะเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ *Ent. faecalis* มากกว่า *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* 3 เพื่อเป็นการยืนยันผลการทดลองที่แน่ชัดการทดลองนี้จึงได้นำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลตไปทำการจัดจำแนกด้วยวิธีการวิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ต่อไป



(ภาพ ก)



(ภาพ ข)

ภาพที่ 4.1 รูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต IIS11 (ภาพ ก) และ ไอโซเลต 4IS17 (ภาพ ข)

ตารางที่ 4.4 ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต IIS11 และไอโซเลต 4IS17 ด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

ชนิดของสารที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ		ชนิดของสารที่ใช้ทดสอบ	ผลการทดสอบ	
	IIS11	4IS17		IIS11	4IS17
control	-	-	esuculin ferric citrate	+	+
glycerol	-	+	salicin	+	+
erythritol	-	-	D-celobiose	+	+
D-arabinose	-	-	D-maltose	+	+
L-arabinose	-	-	D-lactose (bovine origin)	+	+
D-ribose	+	+	D-melibiose	+	-
D-xylose	-	-	D-saccharose (sucrose)	+	+
L-xylose	-	-	D-trehalose	+	+
D-adonitol	-	-	inulin	-	-
methyl- β D- xylopyranoside	-	-	D-melizitose	-	+
D-galactose	+	+	D-raffinose	-	-
D-glucose	+	+	amidon (starch)	-	-
D-fructose	+	+	glycogen	-	-
D-mannose	+	+	xylitol	-	-
L-sorbose	-	-	genitiobiose	+	+
L-rhamnose	-	-	D-turanose	-	-
dulcitol	-	-	D-lyxose	-	-
inositol	-	-	D-tagatose	+	+
D-mannitol	+	+	D-fucose	-	-
D-sorbitol	-	+	L-fucose	-	-
methyl- α D-mannopyranoside	-	-	D-arabitol	-	-
methyl- α D- glucopyranoside	-	-	L-arabitol	-	-
N-acetylglucosamine	+	+	potassium gluconate	-	+
amyldalin	+	+	potassium 2-ketogluconate	-	-
arbutin	+	+	potassium 5-ketogluconate	-	-

+ หมายถึงให้ผลบวกในการทดสอบ (อาหารในหลอดเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองยกเว้น esuculin ferric citrate เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีดำ)

- หมายถึงให้ผลลบในการทดสอบ (อาหารในหลอดไม่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองยกเว้น esuculin ferric citrate ไม่เปลี่ยนจากสีม่วงเป็นดำ)

4.4.4 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกโดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

4.4.4.1 ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลต (IIS11 และ 4IS17) จำเป็นต้องมีการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียก่อน ซึ่งทำได้โดยเฉพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกที่บริสุทธิ์แต่ละไอโซเลตในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาทำการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอด้วยชุด MasturePure™ Gram Positive DNA Purification Kit และวิเคราะห์แถบดีเอ็นเอด้วยการวิเคราะห์ดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบจีโนมิกดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ (ดังภาพที่ 4.2) และมีขนาดสูงกว่าแถบ 23.1 กิโลเบส จากนั้นนำมาคำนวณปริมาณดีเอ็นเอเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III ซึ่งพบว่าจีโนมิกดีเอ็นเอไอโซเลตที่ IIS11 และ 4IS17 มีปริมาณ 119 และ 145 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ นอกจากนี้จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้มีความบริสุทธิ์สูงปราศจากการปนเปื้อน จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในขั้นตอนต่อไป

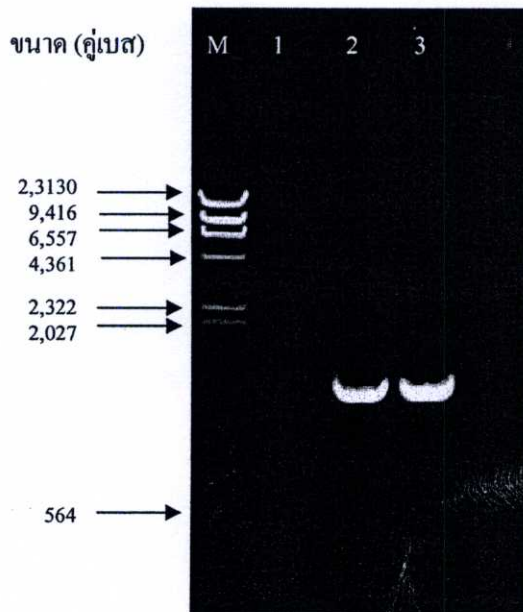
4.4.4.2 ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

การเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ทำได้โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้แต่ละไอโซเลต (IIS11 และ 4IS17) มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส พบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ไอโซเลตละ 1 แถบในทั้งสองไอโซเลตและนำมาเปรียบเทียบกับขนาดดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III พบว่าผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้มีขนาดต่ำกว่า 2.27 กิโลเบส แต่มีขนาดเหนือกว่า 564 คู่เบส ซึ่งตรงกับขนาดผลิตภัณฑ์ PCR ที่คาดว่าจะได้รับ 1,500 คู่เบส (ภาพที่ 4.3) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ 4.2 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากเชื้อแบคทีเรีย

- M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
- เลนที่ 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต IIS11
- เลนที่ 2 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต 4IS17



ภาพที่ 4.3 ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA

- M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
- เลนที่ 1 คือ negative control
- เลนที่ 2 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต IIS11
- เลนที่ 3 คือ ผลิตภัณฑ์ PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต 4IS17

4.4.4.3 ผลการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ การเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอและการ Transformation

การทำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณให้บริสุทธิ์ทำได้ด้วยชุด QIA quick PCR purification kit พบว่าแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ทั้ง 2 ไอโซเลต ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบสและมีปริมาณ 60 นาโนกรัม (ภาพที่ 4.4) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ของทั้ง 2 ไอโซเลตที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (ligation) เข้ากับเวกเตอร์ pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส ปริมาณ 50 นาโนกรัมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้พลาสมิด pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบสอยู่ หลังจากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่เซลล์ของ *E.coli* DH5 α และคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวบนอาหาร LB ที่เติม kanomycin (ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) X-gal (ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) และ IPTG (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์) ซึ่งการที่โคโลนีของ *E. coli* DH5 α มีสีขาวบนอาหาร LB แสดงว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanomycin ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป



ภาพที่ 4.4 ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III

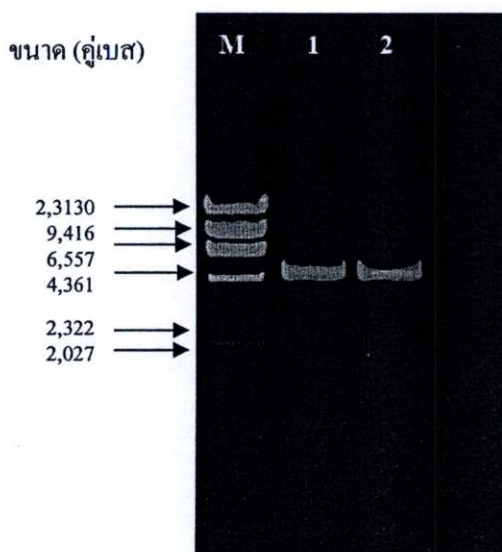
เลขที่ 1 คือ ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของไอโซเลต 1IS11

เลขที่ 2 คือ ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของไอโซเลต 4IS17

4.4.4.4 ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิด

ดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA

จากการคัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งผ่านการถ่ายโอนยีนแล้วนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุด QIA prep[®] Spin Miniprep kit และนำมาวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าไอโซเลตที่ IIS11 และ 4IS17 ปรากฏแถบพลาสมิดดีเอ็นเอไอโซเลตละ 1 แถบ ซึ่งทั้งสองไอโซเลตมีขนาดประมาณ 4.36 กิโลเบส (ดังภาพที่ 4.5) และมีปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ 35 และ 47 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ตามลำดับ



ภาพที่ 4.5 พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก

M คือ พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก

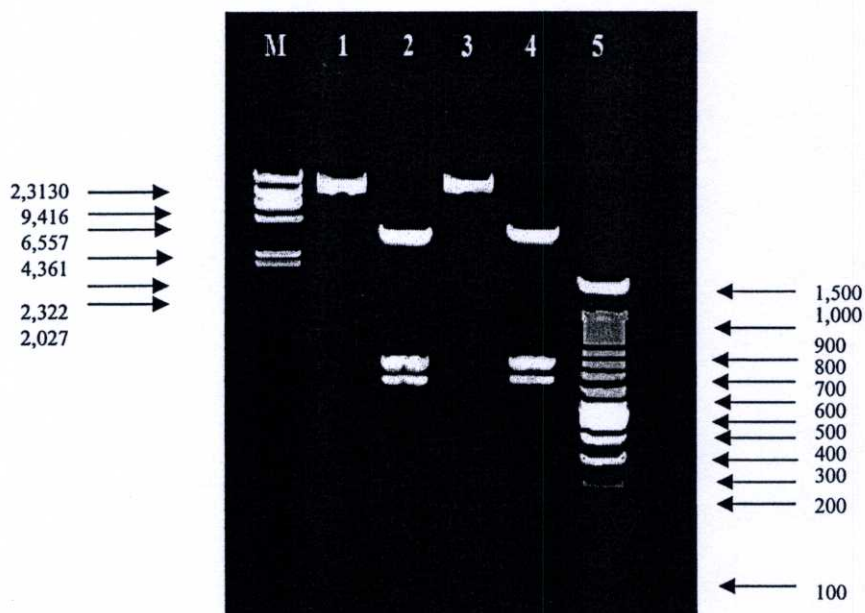
เลนที่ 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอของไอโซเลต IIS11

เลนที่ 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอของไอโซเลต 4IS17

4.4.4.5 การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

จากนั้นนำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อทดสอบว่าดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต ถูกถ่ายโอนเข้าไปในพลาสมิดจริง โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟเรซิส พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่ IIS11

และ 4IS17 ทั้งสองไอโซเลตปรากฏแถบพลาสติกดีเอ็นเอไอโซเลตละ 3 แถบ ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันมากโดยแถบที่ 1 มีขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส ส่วนแถบที่ 2 และ 3 มีขนาดประมาณ 800 คู่เบส และ 700 คู่เบส (ดังภาพที่ 4.6)



ภาพที่ 4.6 การตัดพลาสติกดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลกติกด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*

1 คือ พลาสติกดีเอ็นเอของไอโซเลตที่ 1IS11

2 คือ พลาสติกดีเอ็นเอของไอโซเลตที่ 1IS11 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

3 คือ พลาสติกดีเอ็นเอของไอโซเลตที่ 4IS17

4 คือ พลาสติกดีเอ็นเอของไอโซเลตที่ 4IS17 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*

5 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

จากผลการทดสอบการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต จาก หอยแมลงภู่มืดและกุ้งจ่อม โดยวิธีทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมีในระดับจีโนมพบว่าทั้ง 2 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียในสกุล *Enterococcus* sp. จากนั้นได้นำแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตมา วิเคราะห์หาลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต IIS11 มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* ร้อยละ 99 ทำให้ทราบได้ว่า แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่ IIS11 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Enterococcus faecium* IIS11 (ตารางที่ 4.5) สำหรับไอโซเลตที่ 4IS17 มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* ร้อยละ 99 ทำให้ทราบได้ว่าไอโซเลตที่ 4IS17 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกในสกุล *Enterococcus faecalis* 4IS17 (ตารางที่ 4.6) แบคทีเรียกรดแลคติกพบได้ในอาหารหมักของไทย เช่น ปลาหมัก (ปลาร้า ปลาแป็งแดง ปลาเจ้า ปลาจ่อม ปลาต้ม เป็นต้น) กุ้ง (กุ้งจ่อม) หมูหมัก (แหนม) ผักหมัก (ผักกาดคอง ผักขมคอง หอมคอง) และข้าว (ข้าวหมาก) เป็นต้น ซึ่งอาหารที่มีความเข้มข้นของเกลือ สูงๆจะพบแบคทีเรีย *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Enterococcus* และ *Staphylococcus* (Tanasupawat และคณะ. 2000) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Dalgaard และคณะ (2003) ได้ คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับการเน่าเสียของกุ้งสุกแช่น้ำเกลือซึ่งเก็บรักษาไว้ภายใต้ สภาวะปรับบรรยากาศที่อุณหภูมิ 15 และ 25 องศาเซลเซียส และนำมาจำแนกชนิดโดยวิธี phenotypic test และ SDS-PAGE electrophoresis ของโปรตีนในเซลล์ทั้งหมดรวมทั้งลำดับเบสของ ยีน 16S rDNA พบว่าเป็น *Enterococcus faecalis* นอกจากนี้ Campos และคณะ (2006) ได้รายงานว่ จากการจำแนกชนิดแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ USC-46 ที่แยกได้จากเนื้อปลา turbot (*Psetta maxima*) โดยวิธี 16s rRNA-targeted PCR method พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์นี้มีความเหมือนร้อยละ 100 กับ *Enterococcus faecium* อีก 4 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากอาหารหมักของเกาหลี ปลาคาร์ฟ กุ้ง แม่น้ำและกระต่าย

ตารางที่ 4.5 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต 1IS11 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต 1IS11 (ร้อยละ)
<i>Enterococcus faecium</i> (AY172570.1)	99
<i>Enterococcus faecium</i> SF (AY675247.1)	99
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC 2102 (EF533988.1)	99
<i>Enterococcus faecium</i> SL2 (AY692451.1)	99
<i>Enterococcus faecium</i> SF3 (AY735408.1)	99
<i>Enterococcus faecium</i> IDCC (EF 533987.1)	99
<i>Enterococcus faecium</i> CICC6078 (DQ 672262.1)	99

ตารางที่ 4.6 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต 4IS17 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต 4IS17 (ร้อยละ)
<i>Enterococcus faecalis</i> (AB154827.1)	99
<i>Enterococcus faecalis</i> RO90 (AF515223.1)	99
<i>Enterococcus faecalis</i> HN-N4 (FJ378659.2)	99
<i>Enterococcus faecalis</i> HN-N1 (378656.2)	99
<i>Enterococcus faecalis</i> HN-N33 (FJ378688.1)	99
<i>Enterococcus faecalis</i> V583 (AE 016830.1)	99
<i>Enterococcus faecalis</i> HN-S6 (FJ 378703.1)	99
<i>Enterococcus faecalis</i> HN-S4 (FJ 378701.1)	99

4.5 ผลของการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณภาพของแหนมปลา

4.5.1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในแหนมปลาระหว่างกระบวนการหมัก

การทดลองนี้ได้ทำการตรวจนับปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในแหนมปลาระหว่างกระบวนการหมักไม่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ในสภาพที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย (candle jar) แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ตรวจนับได้อาจเป็นแบคทีเรียที่เพิ่มจำนวนขึ้นจากแบคทีเรียที่มีอยู่เดิมในวัตถุดิบรวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกที่เติมลงไปเป็นกล้าเชื้อ จากการศึกษาทดลองนำเชื้อ *Enterococcus faecium* 1IS11 และ *Enterococcus faecalis* 4IS17 ที่คัดเลือกได้จากการทดลองนี้ รวมทั้ง *Lactococcus lactis* ที่แยกได้จากปลาสด (นิระชา ศรีวงษ์, 2550) และ *Pediococcus pentosaceus* ที่แยกได้จากเนื้อหมูสด (พัชรี ศรีบรรณกุล และ สุนิสา กิตติศรีโสภิต, 2550) เพื่อนำมาใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมปลาเปรียบเทียบกับการไม่ใช้กล้าเชื้อ พบว่าการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักโดยแหนมปลาที่เติมกล้าเชื้อส่วนใหญ่มีการเจริญสูงสุดภายในเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นแหนมปลาที่เติมเชื้อผสมของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 4 ชนิดดังกล่าวมีการเพิ่มจำนวนสูงสุดหลังหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.7) เมื่อเปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมปลาทุกชุดพบว่าแหนมปลาที่เติมกล้าเชื้อผสมของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มขึ้นมากที่สุดเป็น 3.0×10^8 CFU ต่อกรัม ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 1.23 log unit และเมื่อทำการหมักต่อไปจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมปลาทุกชุดมีจำนวนลดลงเล็กน้อยในช่วง 72 ถึง 96 ชั่วโมง โดยเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมปลาทุกชุดใกล้เคียงกันอยู่ในช่วง 4.67×10^7 ถึง 7.80×10^7 CFU ต่อกรัม (ตารางที่ 4.7) อย่างไรก็ตามที่แต่ละช่วงเวลาของการหมักไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในแหนมปลาทุกชุด ($P > 0.05$)

การที่แบคทีเรียกรดแลคติกเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการหมักคาดว่าเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้วัตถุดิบที่เป็นส่วนผสมของแหนมปลาเป็นสารตั้งต้นสำหรับการเจริญ (เช่น เนื้อปลา ข้าวสุก กระเทียมและเกลือ) ซึ่งเนื้อปลาประกอบด้วยโปรตีนร้อยละ 15 ถึง 20 คาร์โบไฮเดรตน้อยกว่าร้อยละ 1 และไขมัน (Adam และ Moss, 1995) ข้าวสุกเป็นสารอาหารจำพวกคาร์โบไฮเดรตซึ่งเป็นสารตั้งต้นสำหรับการเจริญและการหมักจุลินทรีย์ นอกจากนี้กระเทียมที่เติมลงไปสามารถกระตุ้นการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและเพิ่มการผลิตกรดแลคติก

ได้อีกด้วย ดังเช่นการทดลองของ Swetwivathana และคณะ (1999) ได้ทำการศึกษาผลของ กระทบต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อทางการค้า (*Lb. curvatus*, *Lb. sake* และ *P. pentosaceus*) โดยเปรียบเทียบการเติมกล้าเชื้อแต่ละชนิดร่วมกับการเติมและไม่เติม กระทบในการหมักเหนมและ nham model broth และเหนมที่ไม่เติมกล้าเชื้อ พบว่าเหนมและ nham model broth ทุกชุดที่มีการเติมกระทบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสูงกว่าเหนม ที่ไม่เติมกระทบ เป็นไปได้ว่ากระทบช่วยกระตุ้นการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก นอกจากนี้ การเติมเกลือและเครื่องเทศ เช่น กระทบหรือขิง ช่วยเพิ่มความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อีกด้วย (Paludan-Müller และคณะ. 1999) เช่นเดียวกับ Vernam (1995) ได้กล่าวไว้ว่าเกลือที่เติมลงไปอัตรา ร้อยละ 2 ถึง 3 จะมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์

ตารางที่ 4.7 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในเหนมปลาระหว่างการหมัก ด้วยวิธีธรรมชาติและการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม

ชุดของ เหนมปลา	จำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด (CFU ต่อกรัม)				
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
Control	3.2×10^7 a	5.1×10^7 a	1.3×10^8 a	6.9×10^7 a	5.5×10^7 a
A	1.2×10^7 a	8.2×10^7 a	4.9×10^7 a	5.3×10^7 a	6.8×10^7 a
B	1.3×10^7 a	1.7×10^8 a	4.0×10^7 a	6.2×10^7 a	4.7×10^7 a
AB	1.5×10^7 a	1.5×10^8 a	8.4×10^7 a	6.3×10^7 a	7.8×10^7 a
ABC	3.8×10^7 a	7.1×10^7 a	5.8×10^7 a	5.9×10^7 a	4.8×10^7 a
ABD	1.3×10^7 a	9.8×10^7 a	7.5×10^7 a	6.2×10^7 a	5.1×10^7 a
ABCD	1.77×10^7 a	7.4×10^7 a	3.0×10^8 a	7.5×10^7 a	4.7×10^7 a

Control คือ ไม่เติมกล้าเชื้อ; A คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecium* IIS11; B คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecalis* 4IS17; AB คือกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17; ABC คือกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *P. pentosaceus*; ABD คือกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis*; ABCD คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17, *P. pentosaceus* และ *Lc. lactis*

4.5.2 การเปลี่ยนแปลงของพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดในແหมมปลาระหว่าง

กระบวนการหมัก

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักແหมมปลาพบว่า ค่าพีเอชของແหมมปลาที่มีทุกชุดลดลงอย่างรวดเร็วหลังหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยค่าพีเอชของແหมมปลาตกลงจาก 5.94 ถึง 6.00 เหลือ 4.51 ถึง 4.52 (ตารางที่ 4.8) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) หลังจากหมักต่อไปจนถึง 72 ชั่วโมง และชั่วโมงที่ 96 ค่าพีเอชของແหมมปลาทุกชุดลดลงอีกเล็กน้อยเมื่อหมักແหมมจนครบ 96 ชั่วโมง พบว่าແหมมปลาทั้งหมดมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.34 ถึง 4.40 โดยແหมมปลาชุดที่มีพีเอชต่ำที่สุด คือແหมมปลาชุดที่เติมกล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecium* IIS11 (พีเอช 4.34) ซึ่งมีค่าพีเอชต่ำกว่าແหมมปลาที่เติมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *P. pentosaceus* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4.8 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในແหมมปลาระหว่างการหมักด้วยวิธีธรรมชาติและการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม

ชุดของ ແหมมปลา	ค่าพีเอช ± SD				
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
Control	5.98 ± 0.14a	4.79 ± 0.03a	4.52 ± 0.01a	4.39 ± 0.01a	4.35 ± 0.01ab
A	5.94 ± 0.14a	4.77 ± 0.03a	4.52 ± 0.03a	4.39 ± 0.01a	4.34 ± 0.02a
B	5.98 ± 0.12a	4.78 ± 0.02a	4.51 ± 0.02a	4.39 ± 0.02a	4.36 ± 0.02ab
AB	6.00 ± 0.14a	4.79 ± 0.04a	4.51 ± 0.01a	4.38 ± 0.01a	4.35 ± 0.03ab
ABC	5.95 ± 0.13a	4.77 ± 0.04a	4.51 ± 0.03a	4.43 ± 0.01b	4.40 ± 0.01b
ABD	5.97 ± 0.11a	4.78 ± 0.04a	4.51 ± 0.01a	4.40 ± 0.01a	4.35 ± 0.02ab
ABCD	5.95 ± 0.11a	4.76 ± 0.01a	4.52 ± 0.02a	4.43 ± 0.02b	4.38 ± 0.06ab

Control คือ ไม่เติมกล้าเชื้อ; A คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecium* IIS11; B คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecalis* 4IS17; AB คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17; ABC คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *P. pentosaceus*; ABD คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis*; ABCD คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17, *P. pentosaceus* และ *Lc. lactis*

เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดที่เกิดขึ้นในแฮมปลาทุกชุดระหว่างกระบวนการหมัก (ตารางที่ 4.9) พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของแฮมปลาเนื่องจากปริมาณกรดทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก (เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.26 ถึง 0.32 เป็นร้อยละ 0.81 ถึง 0.86) และเมื่อหมักต่อไปปริมาณกรดทั้งหมดของแฮมปลายังคงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องตามระยะเวลาการหมักที่เพิ่มขึ้นจนถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักที่ชั่วโมงที่ 96 ซึ่งเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแฮมปลาที่มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงที่สุด คือแฮมปลาที่เติมกล้าเชื้อผสมทั้ง 4 ชนิด ซึ่งมีปริมาณกรดทั้งหมดร้อยละ 1.21 ส่วนแฮมปลาชุดอื่นมีปริมาณกรดใกล้เคียงกันระหว่างร้อยละ 1.0 ถึง 1.1 อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างระหว่างปริมาณกรดทั้งหมดในแฮมปลาแต่ละชุด ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4.9 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในแฮมปลาระหว่างการหมักด้วยวิธีธรรมชาติ และการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม

ชุดของ แฮมปลา	ปริมาณกรดทั้งหมด (ร้อยละ) \pm SD				
	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
Control	0.26 \pm 0.04a	0.56 \pm 0.18a	0.86 \pm 0.17a	0.93 \pm 0.11a	1.08 \pm 0.05a
A	0.28 \pm 0.03a	0.57 \pm 0.19a	0.81 \pm 0.21a	0.94 \pm 0.08a	1.06 \pm 0.03a
B	0.29 \pm 0.03a	0.63 \pm 0.12a	0.84 \pm 0.15a	0.95 \pm 0.12a	1.02 \pm 0.03a
AB	0.29 \pm 0.03a	0.68 \pm 0.19a	0.83 \pm 0.12a	0.94 \pm 0.19a	1.00 \pm 0.04a
ABC	0.30 \pm 0.04a	0.62 \pm 0.08a	0.81 \pm 0.15a	1.01 \pm 0.14a	1.10 \pm 0.22a
ABD	0.32 \pm 0.02a	0.64 \pm 0.08a	0.83 \pm 0.07a	1.01 \pm 0.11a	1.02 \pm 0.07a
ABCD	0.28 \pm 0.05a	0.67 \pm 0.21a	0.83 \pm 0.14a	0.89 \pm 0.16a	1.21 \pm 0.39a

Control คือ ไม่เติมกล้าเชื้อ; A คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecium* 11S11; B คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecalis* 4IS17; AB คือกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 11S11 และ *Ent. faecalis* 4IS17; ABC คือกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 11S11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *P. pentosaceus*; ABD คือกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 11S11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis*; ABCD คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 11S11, *Ent. faecalis* 4IS17, *P. pentosaceus* และ *Lc. lactis*

การที่พีเอชของแฮมปลาลดลงอย่างรวดเร็วคาดว่าเป็นเพราะแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถใช้แหล่งคาร์โบไฮเดรตที่มีอยู่ในวัตถุดิบ เช่นข้าวและกระเทียมซึ่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก โดยผ่านวิถี glycolytic หรือ Embden-Meyrhopf pathway ซึ่งหมัก

กลูโคสได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ (ร้อยละ 90) (Hutkins, 2006) โดยเชื้อที่นำมาทดลองหมักเหนมปลาพบว่าเป็นแบบ homofermentative bacteria สามารถหมักกลูโคสและได้ผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติกซึ่งเชื้อ *Ent. faecium* IIS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17 ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากการทดลองนี้เป็น homofermentative bacteria เช่นเดียวกัน โดยทราบได้จากการทดลองการหมักคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคสซึ่งไม่ปรากฏว่ามีการผลิตก๊าซเกิดขึ้นส่วนเชื้อ *P. pentosaceus* เป็น homofermentative bacteria (ได้จากการทดลองของพัชรี ตรีบรรณกุล และ สุนิสา กิตติศรีโสภิต, 2550) เช่นเดียวกับ *Lc. lactis* เป็น homofermentative bacteria (ได้จากการทดลองของนิระชา ศรีวงษ์, 2550) การทดลองของพีเอชมีความสำคัญกับปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นและการที่ผลิตภัณฑ์ปลาหมักมีพีเอชต่ำกว่า 5 ถึง 4.5 มีผลช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย นอกจากนี้การเติมกล้าเชื้อมีผลทำให้ค่าพีเอชของผลิตภัณฑ์ลดลงเร็วกว่าการไม่เติมกล้าเชื้อ Asiedu และ Sanni (2002) ได้รายงานว่าการหมัก Enam Ne-setaakye (ผลิตภัณฑ์ปลาหมักของแอฟริกาตะวันออก) ด้วยกล้าเชื้อทำให้พีเอชลดลงถึง 4.3 และปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 3.1 ภายในเวลา 72 ชั่วโมง ส่วนผลิตภัณฑ์ที่หมักโดยไม่เติมกล้าเชื้อมีพีเอชเท่ากับ 5.1 และมีปริมาณกรดทั้งหมดเท่ากับร้อยละ 2.4 ภายในเวลาเดียวกัน เช่นเดียวกับ Sakhare และ Narasimha-Rao (2003) ได้กล่าวว่พีเอชของเนื้อลดลงอย่างรวดเร็วโดยการหมักด้วยกล้าเชื้อผสม (*Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus casei* และ *Lactococcus lactis*) ในช่วงต้นของการเจริญแบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างกรดแลคติกและกรดอะซิติกซึ่งมีผลทำให้พีเอชลดลงได้เร็วพอกัน โดยไม่แตกต่างกับเหนมปลาที่เติมกล้าเชื้อ อาจเป็นเพราะจำนวนกล้าเชื้อที่เติมลงไป (10^6 เซลล์ต่อกรัม) มีจำนวนไม่มากพอที่จะเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์ประจำถิ่นซึ่งมีมากถึง 3.24×10^7 เซลล์ต่อกรัมในวัตถุดิบก่อนหมัก จึงทำให้กรดอินทรีย์ที่ถูกผลิตในเหนมปลาทุกชนิดมีปริมาณใกล้เคียงกันซึ่งทำให้ค่าพีเอชลดลงไม่แตกต่างกัน

เมื่อเปรียบเทียบค่าพีเอชและปริมาณกรดทั้งหมดของเหนมปลาที่ได้จากการทดลองนี้ทั้ง 7 ชุดกับเหนมปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาด และเหนมปลาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน พบว่าที่สิ้นสุดกระบวนการหมัก (96 ชั่วโมง) เหนมปลาทั้ง 7 ชุด มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 4.34 ถึง 4.40 ซึ่งเมื่อเทียบกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน พบว่าเหนมปลาทั้ง 7 ชุด มีคุณภาพอยู่ในเกณฑ์ซึ่งค่าพีเอชของเหนมปลาต้องไม่เกิน 4.6 เช่นเดียวกับการทดลองของ Riebroy และคณะ (2004) ซึ่งได้ศึกษาคุณลักษณะของเหนมปลาที่มีจำหน่ายตามท้องตลาดจาก 7 แหล่งผลิตพบว่า ค่าพีเอชของเหนมปลาจากการทดลองที่ได้และเหนมปลาจากท้องตลาดมีค่าใกล้เคียงกัน (อยู่ในช่วง 4.56 ถึง 4.60)

เช่นเดียวกับปริมาณกรดทั้งหมดของแฮมปลาที่ได้จากการทดลอง (ร้อยละ 1.00 ถึง 1.21) มีค่าใกล้เคียงกับแฮมปลาตามท้องตลาดซึ่งอยู่ในช่วงร้อยละ 1.42 ถึง 2.35

4.5.3 การเปลี่ยนแปลงของค่า a_w ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย น้ำหนักที่สูญหายในแฮมปลา ระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่า a_w ในระหว่างกระบวนการหมักแฮมปลาชุดที่เดิมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 1IS11, *Ent. faecalis* 4IS17, *P. pentosaceus*, *Lc. lactis* พบว่ามีค่า a_w ลดลงมากที่สุดจากชั่วโมงที่ 0 (0.972 ถึง 0.973) จนถึงชั่วโมงที่ 96 (0.953) ส่วนแฮมปลาอีก 5 ชุดที่เหลือ มีการค่า a_w ลดลงอยู่ในช่วง 0.953 ถึง 0.960 ซึ่งแฮมปลาทุกชุดทั้งที่เดิมกล้าเชื้อและไม่เดิมกล้าเชื้อ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย พบว่าน้ำหนักที่สูญหายมีความสัมพันธ์กับน้ำหนักของแฮมที่สูญหายไปและค่า a_w ที่ลดลงหลังจากหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.10) โดยแฮมปลาที่เดิมกล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecalis* 4IS17 มีปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยทั้งหมดหมักและหลังหมัก 96 ชั่วโมงน้อยกว่าแฮมปลาชุดอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ขณะที่หลังหมัก 96 ชั่วโมงแฮมปลาชุดที่เดิมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 1IS11, *Ent. faecalis* 4IS17, *Lc. lactis* มีปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย (ร้อยละ 7.99) มากกว่าแฮมปลาชุดอื่นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ค่าน้ำหนักที่สูญหายไปของกล้าเชื้อผสมดังกล่าวมีปริมาณสูงด้วยเช่นกัน โดยมีค่าน้ำหนักที่สูญหายไปเท่ากับร้อยละ 2.41 แต่อย่างไรก็ตามก็ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) กับแฮมปลาชุดอื่น

การที่แฮมปลากเกิดการสูญเสียน้ำเนื่องจากมีการปลดปล่อยน้ำที่เพิ่มขึ้นเป็นผลให้ค่า a_w ของแฮมปลาลดลงในระหว่างกระบวนการหมักคาดว่าอาจเป็นเพราะค่าพีเอชที่ลดลงและปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการหมักมีผลต่อการสูญเสียความสามารถในการอุ้มน้ำ (water-holding capacity) ของ myofibrillar protein และเกิดจากการเสียสภาพโปรตีนทำให้แฮมมีการปลดปล่อยน้ำออกมา ซึ่ง Toldrá และคณะ (2001) ได้กล่าวว่าการลดพีเอชที่เกิดจากการผลิตกรดแลคติกที่เพิ่มมากขึ้นมีความสำคัญต่อการถนอมผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก นอกจากนี้การลดของพีเอชมีผลทำให้เกิดกลิ่นรสที่ดีจากการสร้างสารเมแทบอลิซึมและผลิตภัณฑ์ที่ได้มีลักษณะเนื้อที่นุ่มสม่ำเสมอเนื่องจากเมื่อพีเอชเข้าใกล้จุดไอโซอิเล็กตริกของโปรตีนในเนื้อสัตว์ส่วนใกล้เคียงจะทำให้โปรตีนเกิดการจับก้อน (protein coagulation) เป็นผลให้ความสามารถในการอุ้มน้ำลดลง นอกจากนี้เกลือที่เติมลงไป

ส่วนผสมมีผลทำให้เหมมปลาเกิดการสูญเสียน้ำและทำให้ค่า a_w ของเหมมปลาลดลงเช่นกัน ดังเช่น Varnam และ Sutherland (1995) ได้กล่าวว่าผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีการเติมตัวถูกละลายลงไป (โซเดียมคลอไรด์) จะทำให้ปริมาณน้ำลดลง เช่นเดียวกับ Toldrá และคณะ (2001) ได้รายงานว่า ความเข้มข้นของเกลือที่ร้อยละ 2 ถึง 3 ทำให้ระดับของค่า a_w ลดเหลือ 0.96 ซึ่งค่า a_w เป็นปัจจัยที่สำคัญในการควบคุมการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร การลดค่า a_w ในสภาพแวดล้อมมีผลต่อการลดความสามารถในการเจริญของจุลินทรีย์ (Adam และ Moss, 1995) ค่า a_w ที่ต่ำกว่า 0.6 จะยับยั้งปฏิกิริยาที่เกิดจากจุลินทรีย์และปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ส่วนที่ a_w ต่ำกว่า 0.7 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้ส่วนยีสต์และแบคทีเรียจะถูกยับยั้งการเจริญที่ a_w ต่ำกว่า 0.8 ถึง 0.9 ซึ่งในอาหารหมักมีค่า a_w อยู่ระหว่าง 0.93 ถึง 0.98 ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิดสามารถเจริญได้

ตารางที่ 4.10 การเปลี่ยนแปลงค่า a_w การสูญเสียน้ำหนัก และปริมาณน้ำที่ปลดปล่อยในเหมมปลา ระหว่างการหมักด้วยวิธีธรรมชาติและการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม

ชุดของ เหมมปลา	การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก \pm SD				น้ำหนักที่สูญหายไปหลังหมัก 96 ชม (ร้อยละ)
	ค่า a_w (25°C)		ปริมาณน้ำที่ปลดปล่อย (ร้อยละ)		
	0 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง	0 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง	
Control	0.961 \pm 0.02 a	0.955 \pm 0.01 a	5.17 \pm 0.21 bc	6.89 \pm 1.07 ab	2.33 \pm 2.46 a
A	0.967 \pm 0.01 a	0.960 \pm 0.00 a	4.45 \pm 0.94 bc	6.44 \pm 1.13 ab	2.69 \pm 3.06 a
B	0.966 \pm 0.01 a	0.954 \pm 0.00 a	1.82 \pm 1.06 a	5.31 \pm 1.20 a	1.95 \pm 0.52 a
AB	0.966 \pm 0.01 a	0.953 \pm 0.01 a	3.50 \pm 0.84 ab	5.20 \pm 0.72 a	1.98 \pm 2.13 a
ABC	0.968 \pm 0.01 a	0.960 \pm 0.00 a	4.09 \pm 1.50 bc	5.79 \pm 0.97 ab	1.64 \pm 1.80 a
ABD	0.972 \pm 0.01 a	0.953 \pm 0.00 a	5.40 \pm 1.12 bc	7.99 \pm 1.87 b	2.41 \pm 2.37 a
ABCD	0.973 \pm 0.02 a	0.953 \pm 0.00 a	5.75 \pm 1.67 c	6.13 \pm 2.10 ab	0.92 \pm 1.62 a

Control คือ ไม่เติมกล้าเชื้อ; A คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecium* IIS11; B คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecalis* 4IS17; AB คือกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17; ABC คือกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *P. pentosaceus*; ABD คือกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis*; ABCD คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17, *P. pentosaceus* และ *Lc. lactis*

4.5.4 การเปลี่ยนแปลงสีในแฮมปลาระหว่างกระบวนการหมัก

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของแฮมปลาพบว่า เมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักแฮมปลาทุกชุดมีค่าความสว่างและสีเหลืองเพิ่มมากขึ้นส่วนค่าสีแดงลดลง โดยแฮมปลาที่เติมกล้าเชื้อมีค่าความสว่าง (L^*) มากกว่าแฮมปลาชุดควบคุม (ดังตารางที่ 4.11) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ขณะที่แฮมปลาชุดที่เติมกล้าเชื้อผสมทั้ง 4 ชนิด มีค่าสีแดงมากที่สุด (0.79) และมีค่าใกล้เคียงกับชุดควบคุมและแฮมปลาชุดอื่น (0.51 ถึง 0.76) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนการเปลี่ยนแปลงสีเหลืองแฮมปลาที่เติมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis* มีค่าสีเหลืองมากที่สุด (5.80) แต่ก็ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับแฮมปลาชุดอื่น ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4.11 การเปลี่ยนแปลงสีของแฮมปลาโดยการหมักด้วยวิธีธรรมชาติและการหมักโดยการเติมกล้าเชื้อเดี่ยวและกล้าเชื้อผสม

ชุดทดสอบ แฮมปลา	ระยะเวลาของการหมัก					
	0 ชั่วโมง			96 ชั่วโมง		
	L^*	a^*	b^*	L^*	a^*	b^*
Control	61.80 ± 2.05a	1.23 ± 0.46a	2.78 ± 0.50a	71.85 ± 0.91a	0.74 ± 0.09a	4.09 ± 0.08a
A	62.94 ± 0.71a	1.06 ± 0.62a	2.76 ± 0.47a	72.17 ± 0.86a	0.51 ± 0.38a	3.88 ± 0.44a
B	63.78 ± 1.92a	0.93 ± 0.88a	2.98 ± 0.43a	73.05 ± 1.16a	0.65 ± 0.07a	4.68 ± 1.15a
AB	63.41 ± 0.97a	1.48 ± 0.73a	2.77 ± 0.59a	72.77 ± 1.57a	0.76 ± 0.12a	4.09 ± 0.35a
ABC	63.80 ± 1.00a	1.07 ± 0.56a	2.93 ± 0.53a	73.62 ± 0.77a	0.39 ± 0.22a	4.23 ± 0.35a
ABD	63.60 ± 0.83a	0.75 ± 0.33a	3.50 ± 2.37a	73.85 ± 1.04a	0.68 ± 0.11a	5.80 ± 1.80a
ABCD	62.88 ± 1.92a	1.15 ± 0.54a	2.75 ± 0.47a	73.57 ± 1.97a	0.79 ± 0.29a	5.06 ± 1.73a

Control คือ ไม่เติมกล้าเชื้อ; A คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecium* IIS11; B คือ กล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecalis* 4IS17; AB คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17; ABC คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *P. pentosaceus*; ABD คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis*; ABCD คือ กล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17, *P. pentosaceus* และ *Lc. lactis*

การที่แฮมปลาที่มีความสว่าง (L) เพิ่มสูงขึ้นหลังจากกระบวนการหมักอาจเป็นเพราะเนื้อปลามี haem pigment ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีในแฮมปลา ซึ่ง Varnam และ Sutherland (1995) ได้กล่าวว่า การเกิดสีในไส้กรอกเกิดจากไส้กรอกมี haem pigment โดยที่พีเอชต่ำความคงตัว

ของ myoglobin จะลดลงและอัตราการ autoxidation ไปเป็น metmyoglobin เพิ่มขึ้น ซึ่งจะทำให้ haem แยกตัวและสีของไส้กรอกดั้งเดิมเปลี่ยนไปเป็น nitrosylmyoglobin Riebroy และคณะ (2006) รายงานว่าการเปลี่ยนลักษณะของ heme protein จะทำให้มีของเหลวไหลซึมออกมาจากผลิตภัณฑ์ของเหลวดังกล่าวมีคุณลักษณะในการช่วยกระจายความสว่างซึ่งเป็นตัวที่ทำให้เกิดสีขาว โดยความแตกต่างของสีในแต่ละตัวอย่างเกิดจากปริมาณเม็คสีและปริมาณ โปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปในระหว่างการหมัก จากผลการทดลองที่ได้จากการหมักแหนมปลาทั้ง 7 ชุด เทียบกับแหนมปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาด ดังเช่นรายงานของ ศิริพร เรียบร้อย และคณะ (ม.ป.ป.) พบว่าแหนมปลาที่ได้จากการทดลองนี้ (71.85 ถึง 73.89) มีค่าความสว่าง (L^*) สูงกว่าแหนมปลาตามท้องตลาด (46.17 ถึง 50.43) แต่พบว่ามีสีแดงและสีเหลืองที่ใกล้เคียงกันกับแหนมปลาที่จำหน่ายตามท้องตลาด ($a = 0.39$ ถึง 0.79 และ $b = 3.88$ ถึง 5.80) แต่ผลการทดลองสอดคล้องกับการทดลองของ Riebroy และคณะ (2006) ที่ได้ทำการหมักแหนมปลาจากปลาต่างชนิดกันพบว่าปลา barracuda ปลา obtuse barracuda และ lizardfish มีค่าความสว่างใกล้เคียงกับการทดลองนี้โดยมีค่า L เท่ากับ 71.05 , 71.15 และ 70.46 ตามลำดับ

4.5.5 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลา

จากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลาที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติและหมักด้วยกล้าเชื้อเป็นเวลา 96 ชั่วโมงพบว่าแหนมปลาทุกชุดเป็นที่ยอมรับของผู้ทดสอบชิมโดยผู้ทดสอบชิมชอบสีของแหนมปลาปานกลางถึงชอบเล็กน้อยซึ่งแหนมปลาที่เติมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 1IS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17 มีคะแนนความชอบ (7.20) มากกว่าแหนมปลาชุดควบคุมและแหนมปลาชุดอื่น (6.89 ถึง 7.04) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 4.12

จากการประเมินคุณภาพทางด้านกลิ่นรส ลักษณะเนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว และความเค็มของแหนมปลาพบว่าผู้ทดสอบชิมชอบคุณลักษณะดังกล่าวเล็กน้อย โดยคะแนนความชอบด้านกลิ่นรสของแหนมปลามีความใกล้เคียงกัน (6.45 ถึง 6.67) แต่แหนมปลาชุดควบคุมมีคะแนนความชอบสูงที่สุด (6.67) แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากนี้ผู้ทดสอบชิมยังชอบความเปรี้ยวของแหนมปลาชุดควบคุมมากที่สุดอีกด้วย (6.90) แต่ไม่พบความแตกต่างกับแหนมปลาชุดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) นอกจากคุณลักษณะด้านสีของแหนมปลาที่เติมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 1IS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17 จะเป็นที่ยอมรับมากที่สุดแล้ว

ลักษณะเนื้อสัมผัสและความเค็มของแฮมปลาชุดนี้ยังได้รับการยอมรับมากที่สุดอีกด้วย (6.69 และ 6.67 ตามลำดับ) แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างกับแฮมปลาชุดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$) ส่วนแฮมปลาที่ผู้บริโภครู้สึกเค็มมากที่สุดคือแฮมปลาที่เติมเกลือผสมของ *Ent. faecium* IIS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis* 13IS3 แต่ไม่พบความแตกต่างกับแฮมปลาชุดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$)

ตารางที่ 4.12 การประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแฮมปลาโดยการหมักด้วยวิธีธรรมชาติ และการหมักโดยการเติมเกลือเดี่ยวและเกลือผสม

ชุดของ แฮมปลา	คุณลักษณะของแฮมปลาสำหรับการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัส ^a ± SD					
	สีที่ปรากฏ	กลิ่นรส	ลักษณะ เนื้อสัมผัส	ความ เปรี้ยว	ความ เค็ม	ความชอบ โดยรวม
Control	7.00 ± 0.27a	6.67 ± 0.44a	6.68 ± 0.62a	6.90 ± 0.39a	6.47 ± 0.50a	6.84 ± 0.31a
A	6.89 ± 0.24a	6.46 ± 0.43a	6.41 ± 0.56a	6.72 ± 0.27a	6.30 ± 0.27a	6.80 ± 0.37a
B	6.89 ± 0.21a	6.47 ± 0.12a	6.67 ± 0.19a	6.57 ± 0.23a	6.50 ± 0.19a	6.76 ± 0.05a
AB	7.20 ± 0.15a	6.61 ± 0.27a	6.69 ± 0.51a	6.86 ± 0.32a	6.67 ± 0.25a	6.91 ± 0.32a
ABC	7.04 ± 0.25a	6.66 ± 0.47a	6.62 ± 0.36a	6.77 ± 0.18a	6.62 ± 0.25a	6.94 ± 0.25a
ABD	6.95 ± 0.27a	6.45 ± 0.21a	6.25 ± 0.30a	6.50 ± 0.40a	6.42 ± 0.37a	6.67 ± 0.38a
ABCD	6.97 ± 0.15a	6.49 ± 0.25a	6.58 ± 0.45a	6.81 ± 0.23a	6.42 ± 0.19a	6.88 ± 0.37a

Control คือ ไม่เติมเกลือ; A คือ เกลือเดี่ยวของ *Ent. faecium* IIS11; B คือ เกลือเดี่ยวของ *Ent. faecalis* 4IS17; AB คือเกลือผสมของ *Ent. faecium* IIS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17; ABC คือเกลือผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *P. pentosaceus*; ABD คือเกลือผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis*; ABCD คือ เกลือผสมของ *Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17, *P. pentosaceus* และ *Lc. lactis*

จากการทดลองครั้งนี้ให้ผลการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสของแฮมปลาส่วนใหญ่ในระดับชอบเล็กน้อยถึงชอบปานกลาง ซึ่งต่างกับการทดลองของ Riebroy และคณะ (2008) นี้ได้ทำการผลิตแฮมปลาโดยใช้เกลือทั้ง 3 ชนิด (*P. acidilactici*, *Lb. plantarum* และ *P. pentosaceus*) ที่ระดับ 10^4 และ 10^6 เซลล์ต่อกรัม พบว่าคุณลักษณะที่ปรากฏ สี กลิ่น เนื้อสัมผัส รสชาติ กลิ่นรสและความชอบโดยรวมของแฮมปลาอยู่ในระดับชอบปานกลางถึงชอบมาก เช่นเดียวกับ Riebroy และคณะ (2004) ได้ทำการนำตัวอย่างแฮมปลาทั้ง 7 ชนิดที่จำหน่ายตามท้องตลาดมาประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสพบว่าผู้

ทดสอบชิมมีความชอบกลิ่นรส ลักษณะที่ปรากฏ รสชาติและความชอบรวมของແໜມປລາในระดับบอกได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ ไปจนถึงชอบปานกลาง ซึ่งการที่ผู้ทดสอบให้คะแนนคุณลักษณะทางประสาทสัมผัสที่แตกต่างกันเป็นเพราะผู้ทดสอบมีความชอบส่วนตัวต่างกัน เช่น ชอบรสเปรี้ยว รสเค็มและเนื้อสัมผัสที่แตกต่างกัน ซึ่งແໜມປລາที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติและແໜມປລາที่หมักด้วยกล้ำเชื้อที่ได้จากการทดลองนี้มีลักษณะโดยรวมที่ใกล้เคียงกัน เช่น สีของແໜມປລาจะออกเป็นสีขาวปนเหลืองซึ่งเป็นสีของวัตถุดิบ (เช่น เนื้อปลาอ่อน ข้าวและกระเทียม) กลิ่นรสที่ได้เป็นกลิ่นของແໜມและมีกลิ่นของความเปรี้ยว เนื้อสัมผัสของແໜມປລามีความสม่ำเสมอเข้ากันทั้งชิ้น นอกจากนี้ແໜມປລามีความแน่นและยืดหยุ่น มีโพรงอากาศเล็กน้อยซึ่งແໜມປລาที่เติมกล้ำเชื้อมีเนื้อสัมผัสที่นุ่มนวลรับประทานมากกว่าແໜມປລาที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติ โดยແໜມປລาที่ได้จากการทดลองนี้มีมาตรฐานใกล้เคียงกับมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนตามมาตรฐานของสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม ฉบับ มผช 471/2547 ได้กล่าวว่าແໜມປລາของต้องมีการกระจายตัวของส่วนประกอบที่ใช้อย่างสม่ำเสมอ ไม่มีโพรงอากาศ มีน้ำน้อย มีสีตามธรรมชาติของส่วนประกอบที่ใช้ กลิ่นรสเกิดจากการหมัก รสเปรี้ยวที่พอเหมาะ ไม่มีกลิ่นอับ เหม็นหรือรสขม เนื้อต้องแน่น ไม่ยุ่ย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของແໜມປລາคาดว่าเกิดจากเปลี่ยนแปลงคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน โดยอาจเกิดจากจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ในเนื้อปลา นอกจากนี้เกลือ ข้าวสุกและกระเทียมมีผลต่อกลิ่นรสและเนื้อสัมผัสของແໜມປລາเช่นกัน Toldrá และคณะ (2001) ได้กล่าวว่าคุณลักษณะด้านกลิ่นรสของไส้กรอกโดยทั่วไปแล้วเกิดจากการแตกตัวของคาร์โบไฮเดรต ไขมันและโปรตีน โดยอาจเกิดจากจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ในเนื้อ การหมักคาร์โบไฮเดรตทำให้เกิดรสเปรี้ยวเมแทบอลิซึมคาร์โบไฮเดรตและโปรตีนที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมักจะมีผลทำให้พีเอชลดลงและเกิดการพัฒนาด้านกลิ่นรส ดังเช่น Ricke และ Keeton (1997) ได้กล่าวว่ากรหมักคาร์โบไฮเดรตทำให้เกิดกรดแลคติกและการย่อยสลายเนื้อเยื่อปลาเกิดจากเอนไซม์ย่อยโปรตีนและเอนไซม์ย่อยไขมันของที่มีในเนื้อปลาซึ่งสารประกอบโมเลกุลต่ำที่ได้จากการย่อยเนื้อเยื่อปลาจะทำให้เกิดคุณลักษณะทางด้านกลิ่นรส Toldrá และคณะ (2001) รายงานว่าการที่พีเอชของเนื้อลดระดับลงเหลือ 5.4 ถึง 5.5 จะทำให้โปรตีนในเนื้อจับตัวเป็นก้อน (coagulation) และทำให้ความสามารถในการอุ้มน้ำของโปรตีนลดลงเป็นเหตุให้เกิดการสูญเสียน้ำและทำให้เกิดความแน่นเนื้อ (firmness) ขึ้น นอกจากนี้การเติมเกลือลงในส่วนผสมยังทำให้โปรตีนเกาะกันเป็นก้อน (cohesion) อีกด้วย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในตัวอย่างกุ้งสด หอยแมลงภู่น้ำจืด กุ้งจ่อม ปลาจ่อม และหอยแมลงภู่น้ำจืดรวมทั้งรวมทั้งหมด 52 ตัวอย่าง พบว่ากุ้งสดและหอยแมลงภู่น้ำจืดมีแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 3.0×10^4 ถึง 3.0×10^6 CFU ต่อ กรัม ส่วนอาหารทะเลหมักมีจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในช่วง 3.0×10^3 ถึง 3.4×10^8 CFU ต่อ กรัม และได้ทำการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 222 ไอโซเลต นำมาคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Escherichia coli* DMST 4212, *Listeria monocytogenes* DMST 11256, *Pseudomonas fluorescens* DMST 20076, *Salmonella* Typhimurium DMST 0562, *Staphylococcus aureus* TISTR 118, *Vibrio parahaemolyticus* SH1, *Pediococcus acidilactici* TISTR 051 และ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR 541 ด้วยวิธี agar spot test พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 52 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทดสอบอย่างน้อย 1 ชนิด เชื้อที่ถูกยับยั้งมากที่สุดคือเชื้อ *E. coli* รองลงมาคือเชื้อ *S. Typhimurium* เชื้อ *V. parahaemolyticus* เชื้อ *Lb. bulgaricus* เชื้อ *L. monocytogenes* เชื้อ *P. acidilactici* และเชื้อ *S. aureus* แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่นำมาทดสอบได้น้อยที่สุดคือ สามารถยับยั้งการเจริญของ *P. fluorescens* ได้เพียงชนิดเดียวมีเพียง 1 ไอโซเลตเท่านั้น จากนั้นนำทั้ง 52 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการทนต่อไฮโดรคลอริก กรดแลคติก เกลื่อน้ำดีและโซเดียมคลอไรด์ ปรากฏว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 24 ไอโซเลต ที่สามารถทนต่อกรดไฮโดรคลอริกได้ที่พีเอชต่ำสุดคือ 1.5 คิดเป็นร้อยละ 46.15 และแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลต ที่สามารถทนต่อกรดแลคติกได้ที่พีเอชต่ำสุด 1.5 คิดเป็นร้อยละ 11.54 จากการศึกษาการทนต่อเกลือโซเดียมคลอไรด์และเกลื่อน้ำดีพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่สามารถเจริญได้ที่ระดับความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงสุดร้อยละ 10 มีจำนวน 33 ไอโซเลต (ร้อยละ 63.46) และแบคทีเรียกรดแลคติกส่วนใหญ่ที่ทดสอบ (51 ไอโซเลต) สามารถทนต่อเกลื่อน้ำดีที่ความเข้มข้นสูงสุดร้อยละ 1.5 คิดเป็นร้อยละ 98.08 และเมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 52 ไอโซเลตมาทดสอบการสร้างเอนไซม์อะมิโนแอซิดดีคาร์บอกซิเลส (amino acid decarboxylase) ได้คัดเลือกไอโซเลตที่ไม่สร้างเอนไซม์ดังกล่าว ซึ่งมีเพียงจำนวน 3 ไอโซเลต (ร้อยละ 5.77 ของจำนวน 52 ไอโซเลต) เท่านั้น ได้แก่ IIS11, 4IS16

และ 4IS17 และจากการทดสอบความสามารถในการสร้างสารแบคทีเรียโอซินด้วยวิธี agar well diffusion พบว่ามีเพียง 2 ไอโซเลตเท่านั้น (จากทั้งหมด 52 ไอโซเลต) ได้แก่ IIS11 (แยกได้จาก หอยแมลงภู่มืด) และ 4IS17 (แยกได้จากกุ้งจ่อม) ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Lb. bulgaricus* ซึ่งมีเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสเท่ากับ 1 และ 6 มิลลิเมตรตามลำดับ จากนั้นทดสอบความไวต่อ อุณหภูมิ พีเอชและเอนไซม์ของน้ำหมักที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อทั้ง 2 ไอโซเลตดังกล่าว พบว่ามี การสูญเสียกิจกรรมของสารแบคทีเรียโอซินเมื่อนำมาทรีตด้วยอุณหภูมิ (63, 100 และ 121 องศา เซลเซียส) พีเอช เอนไซม์ย่อยโปรตีน (pretease, pepsin, trypsin และ α -chymotrypsin) และ เอนไซม์ย่อยแป้ง (α -amylase) แต่กิจกรรมของสารแบคทีเรียโอซินยังคงอยู่เมื่อนำมาทรีตด้วย เอนไซม์ย่อยไขมัน (lipase)

จากการศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติดังที่กล่าวมาข้างต้น สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการใช้เป็นกล้าเชื้ออาหารหมักได้ ทั้งหมด 2 ไอโซเลต ได้แก่ IIS11 และ 4IS17 จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 ไอโซเลต มา จำแนกลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมีและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ปรากฏว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต IIS11 มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *Enterococcus faecium* IIS11 และ ไอโซเลต 4IS17 มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* 4IS17

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดในหมกปลา ระหว่างกระบวนการหมักทั้งหมกปลาที่เติมกล้าเชื้อเดี่ยวและผสมและหมกปลาที่ไม่เติมกล้าเชื้อ (ชุดควบคุม) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกในหมกปลาที่เติมกล้าเชื้อส่วนใหญ่มีการเจริญสูงสุด ภายในเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นหมกปลาที่เติมกล้าเชื้อผสมทั้ง 4 ชนิด (*Ent. faecium* IIS11, *Ent. faecalis* 4IS17, *P. pentosaceus* และ *Lc. lactis*) มีการเพิ่มจำนวนสูงสุดหลังหมักเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งเพิ่มขึ้นถึง 1.23 log unit การลดลงของพีเอชในหมกปลาระหว่างการหมักมีความสัมพันธ์กับปริมาณกรดทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นโดยพีเอชของหมกปลาทุกชุดลดลงอย่างรวดเร็ว โดยหมกปลาที่เติมกล้าเชื้อเดี่ยวของ *Ent. faecium* IIS11 มีพีเอชต่ำที่สุด (พีเอช 4.34) ปริมาณกรด ทั้งหมดเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 48 ชั่วโมงแรกของการหมัก (เพิ่มขึ้นจากร้อยละ 0.26 ถึง 0.32) เป็นร้อยละ 0.81 ถึง 0.86 และเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมักโดยเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมัก (96 ชั่วโมง) หมกปลาที่เติมกล้าเชื้อผสมของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณกรดทั้งหมดสูงที่สุด (ร้อยละ 1.21) สำหรับการเปลี่ยนแปลงของน้ำหมักที่สูญหายพบว่าเพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับปริมาณน้ำที่ ปลดปล่อยที่เพิ่มขึ้นและค่า a_w ที่ลดลงหลังจากหมักเป็นเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งหมกปลาที่เติมกล้าเชื้อ

ผสมของแบคทีเรีย 3 ชนิด ได้แก่ *Ent. faecium* 1IS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *Lc. lactis* และแทนมปลาที่เดิมกล้าเชื้อผสมของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีปริมาณน้ำที่อุกปลดปล่อยสูงซึ่งสัมพันธ์กับค่า a_w ที่ลดลงมากที่สุด (0.972 ถึง 0.973 ไปเป็น 0.953) จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงสีของแทนมปลาในระหว่างกระบวนการหมักพบว่าค่า L^* เพิ่มขึ้น ค่า a^* ลดลง และค่า b^* เพิ่มขึ้น เมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นแต่ไม่พบความแตกต่างระหว่างค่าดังกล่าวของแทนมปลาแต่ละชุด ส่วนการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแทนมปลาที่หมักด้วยกล้าเชื้อและหมักด้วยวิธีธรรมชาติพบว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่ชอบสีของแทนมปลาปานกลางถึงชอบเล็กน้อยโดยแทนมปลาชุดที่เดิมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 1IS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17 ผู้บริโภคชอบมากที่สุด โดยให้คะแนนความชอบอยู่ในระดับ 7.20 ส่วนในด้านกลิ่นรส เนื้อสัมผัส ความเปรี้ยว ความเค็มและความชอบโดยรวม ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบอยู่ในเกณฑ์ชอบเล็กน้อย โดยผู้บริโภคให้คะแนนความชอบด้านเนื้อสัมผัส ความเค็มของแทนมปลาที่เดิมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 1IS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17 มากกว่าแทนมปลาชุดควบคุมและแทนมปลาที่เดิมกล้าเชื้อชุดอื่นๆ แต่ผู้บริโภคให้คะแนนความชอบด้านกลิ่นรสและความเปรี้ยวของแทนมปลาชุดควบคุมมากกว่าแทนมปลาที่เดิมกล้าเชื้อ แต่อย่างไรก็ตามผู้บริโภคมักมีความชอบโดยรวมในแทนมปลาชุดที่เดิมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 1IS11, *Ent. faecalis* 4IS17 และ *P. pentosaceus* มากที่สุด โดยให้คะแนนความชอบในระดับ 6.94 ส่วนแทนมปลาที่เดิมกล้าเชื้อผสมของ *Ent. faecium* 1IS11 และ *Ent. faecalis* 4IS17 ได้คะแนนความชอบลำดับรองลงมา แต่อย่างไรก็ตามแทนมปลาที่เดิมกล้าเชื้อไม่แตกต่างจากแทนมปลาที่หมักด้วยวิธีธรรมชาติ

ในการทดลองขั้นต่อไปอาจต้องมีการปรับปรุงในด้านความเข้มข้นของกล้าเชื้อและอัตราส่วนของกล้าเชื้อที่นำมาทดสอบการหมักแทนมปลาเพื่อพัฒนาให้กล้าเชื้อมีคุณสมบัติในการหมักได้รวดเร็วและปรับปรุงคุณภาพทางด้านประสาทสัมผัสของแทนมปลาให้มีเนื้อสัมผัส สี กลิ่น และรสชาติที่ดีขึ้น ซึ่งอาจช่วยพัฒนาผลิตภัณฑ์ปลาหมักให้มีคุณภาพมากขึ้น

บรรณานุกรม

- นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพมหานคร : ฟีนี ฟับบลิชซิ่ง.
- นิระชา ศรีวงษ์. 2550. “การคัดเลือกและการพัฒนาดักเชื้อโพรไบโอติกสำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ปลาหมัก.” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นวรรตน์ โพธิราช และ ประทุม แสนมา. 2549. “การแยกเชื้อและจำแนกชนิดของ *Vibrio parahaemolyticus* จากอาหารทะเลและการศึกษาการยับยั้งการเจริญด้วยความร้อน.” ปรินญาณิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ปิ่นมณี ขวัญเมือง. 2547. “แบคทีเรียกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักดอง.” วารสารครูศาสตร์อุตสาหกรรม. 3(1) : 62-68.
- พัชรี ตรีบรรณกุล และ สุนิสา กิตติศรีโสภิต. 2550. “การคัดเลือกและศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเนื้อหมูสดและไส้กรอกหมักของไทย.” ปรินญาณิพนธ์วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยาอุตสาหกรรม บัณฑิตวิทยาลัย, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- ศิริพร เรียบร้อย สุทรวัดน์ และ วรณพ วิเศษสงวน. ม.ป.ป. การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และคุณภาพทางประสาทสัมผัส. [Online]. Available : www.lanna-netinfo/thaiscience/Article
- อดิศร เสวตวิวัฒน์. 2539. “เปรียบเทียบการเจริญของกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทางการค้าบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่บ่มในสภาพบรรยากาศต่างๆ.” วารสารเกษตรพระจอมเกล้าลาดกระบัง. 16(2) : 15-22.
- เสาวนีย์ ธรรมสถิต. 2547. แบคทีเรียทางเทคโนโลยีชีวภาพเซลล์และผลิตภัณฑ์ของเซลล์. นครปฐม : โรงพิมพ์ สถาบันพัฒนาสาธาณสุขอาเซียน.

- Abee, T., Kruckel, L. and Hill, C. 1995. "Bacteriocins : modes of action and potentials in food preservative and control of food poisoning." **International Journal of Food Microbiology**. 28 (2) : 169-185.
- Adam, M.R. and Moss, M.O. 1995. **Food Microbiology**. Cambridge : The Royal Society of Chemistry.
- Adman, A.F.M. and Tan, I.R.K. 2007. "Isolation of lactic acid bacteria from malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential". **Bioresource Technology**. 98 : 1380-1385.
- Aly, S., Ouattara C.A.T., Bassole I.H.N. and Alfred, S. 2006. "Bacteriocins and lactic acid bacteria a minireview." **African Journal of Biotechnology**. 5(9) : 678-683.
- Ammor, S., Dufour, E., Zagorec, M., Chaillou, S. and Chevallier, I. 2005. "Characterization and selection of *Lactobacillus sakei* strains isolated from traditional dry sausage for their potential use as starter cultures." **Food Microbiology**. 22 : 529-538.
- Ammor, M.S. and Mayo, B. 2007. "Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production : update." **Meat Science**. 76 : 138-146.
- Asiedu, M. and Sanni, A.I. 2002. "Chemical composition and microbiological changes during spontaneous and starter culture fermentation of enam ne-setaakye, a west African fermented fish-carbohydrate." **Europe Food Science Research Technology**. 215 : 8-12.
- Axelsson, L. 2004. **Lactic Acid Bacteria**. 3rd ed. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Baliarda, A., Robert, H., Jebbar, M., Blanco, C., Deschamps, A., Marrec, C.L. 2003. "Potential osmoprotectant for the lactic acid bacteria *Pediococcus pentosaceus* and *Tetragenococcus halophilus*." **International Journal of Food Microbiology**. 84 : 13-20.
- Bartholomew, D.T. and Blumer, T.N. 1997. "The use of commercial *Pediococcus cerevisiae* starter culture in the production of country-style hams." **Journal of Food Science**. 42 : 494-497.

- Bover-Cid, S. and Holzapfel, W.H. 1999. "Improve screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria." **International Journal of Food Microbiology**. 53 : 33- 41.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C. 2001. "Effectiveness of a *Lactobacillus sakei* starter culture in the reduction of biogenic amine accumulation as a function of the raw material quality." **Journal of Food Protection**. 64 : 367-373.
- Buckenhüskes, H.J. 1993. "Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as starters for various food commodities." **FEMS Microbiology Reviews**. 12 : 253-257.
- Buntin, N., Chanthachum, S. and Hongpattarakere, T. 2008. "Screening of lactic acid bacteria from gastrointestinal tracts of marine fish for their potential use as probiotics." **Songklanakarin Journal Science Technology**. 30 (1) : 141-148.
- Campos, C.A., Rodríguez, Ó., Calo-Mata, P., Prado, M. and Welázquez, J.B. 2006. "Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*)." **Food Research International**. 39 : 356-364.
- Caplice, E. and Fitzgerald, G.F. 1999. "Food fermentation : role of microbiology in food production and preservation." **International Journal of Food Microbiology**. 50 : 131-149.
- Chaillou, S., Champomier-Verges, M.C., Cornet, M., Crutz-Le Coq, A.M., Dudez, A.M. and Martin, V. 2005. "The complete genome sequence of the meat-borne lactic acid bacterium *Lactobacillus sakei* 23K." **Nature Biotechnology**. 23 : 1527-1533.
- Chung, H.S., Kim, Y.B., Chun, S.L. and Ji, G.E. 1999. "Screening and selection of acid and bile resistant bifidobacteria." **International Journal of Food Microbiology**. 49 : 25-32.
- Cobb, B.F., Vanderzanant, C., Hanna, M.O. and Yeh, C.P.S. 1971. "Biochemical changes in shrimp inoculated with *Pseudomonas*, *Bacillus* and a coryneform bacterium." **Journal of Milk and Food Technology**. 34 : 533.

- Cook, D.W. 1991. "Microbiology of Bivalve Molluscan Shellfish." 19-35. in Ward, F and Hackney, C. **Microbiology of Marine Food Products**. New York : Van Nostrand Reinhold.
- Cook, G.M. and Russel, J.B. 1994. "The effect of extracellular pH and lactic acid on pH homeostasis in *Lactococcus lactis* and *Streptococcus bovis*." **Current Microbiology**. 28 : 165-168.
- Cook, P.E. 1995. "Fungal Ripened Meats and Meat Products." 110-129. in Camobell-Platt, G. and Cook, P.E. **Fermented Meats**. London : Chapman and Hall.
- Csonka, L.N. 1989. "Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress." **Microbiological Reviews**. 53(1) : 121-147.
- Dalgaard, P., Vancanneyt, M., Vilalta, N.E., Swings, J., Fruekilde, P and Leisner, J.J. 2003. "Identification of lactic acid bacteria from spoilage associations of cooked and brined shrimps stored under modified atmosphere between 0°C and 25 °C." **Journal of Applied Microbiology**. 94 : 80-89.
- De Carvalho, A.A.T., de Paulo, R.A., Mantovani, H.C. and de Moraes, C.A. 2006. "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by a lactic acid bacterium isolated from Italian salami." **Food Microbiology**. 23 : 213-219.
- De Martinis, E.C.P. and Franco, B.D. 1998. "Inhibition of *Listeria monocytogenes* in pork product by *Lactobacillus sakei* strains." **International Journal of Food Microbiology**. 42 : 119-126.
- Devriese, L.A. and Pot, B. 1995. "The Genus *Enterococcus*." 327-367. in Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Glasgow : Blackie Academic & Professional.
- De Vuyst, L. and Vandamme, E.J. 1994. **Bacteriocin of lactic acid bacteria microbiology, genetics and applications**. New York. : Blackie Academic and Professional.
- De Vuyst, L. 2000. "Technology aspects related to the application of functional starter cultures." **Food Technology and Biotechnology**. 38(2) : 105-112.

- Ennahar, S., Deschamps, N. and Richard, J. 2001. "Natural variation in susceptibility of *Listeria* strains to class IIa bacteriocins." **Current Microbiology**. 41 : 1-4.
- Enger, E.D. and Ross, F.C. 2000. **Concept in Biology**. 9th ed. Boston : Mc Graw Hill.
- Erkkilä, S. and Petäjä, E. 2000. "Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salt for potential probiotic use." **Meat Science**. 55 : 297-300.
- Fadda, S., Vignolo, G. And Oliver, G. 2001. "Tyramine degradation and tyramine/histamine production by lactic acid bacteria and *Kocuria* strains." **Biotechnology Letters**. 23 : 2015-2019.
- Fuller, R. 1989. "Probiotics in man and animals." **Journal of Applied Bacteriology**. 66 : 365-378.
- Glaasker, E., Konings, W.N. and Poolman, B. 1996b. "Osmotic regulation of intracellular solute pools in *Lactobacillus plantarum*." **Journal of Bacteriology**. 180 : 575-582.
- Glaasker, E., Heuberger, E.H., Konings, W.N. and Poolman, B. 1998a. "Mechanism of osmotic activation of the quaternary ammonium compound transporter (Qact) of *Lactobacillus plantarum*." **Journal of Bacteriology**. 180 : 5540-5546.
- Gatesoupe, F.J. 1999. "The use of probiotics in aquaculture." **Aquaculture**. 180 : 147-165.
- Gibson, D.M. 1995. "Hygiene and Safety a Seafood." 243-260. in Ruitter, A. **Fish and Fishery Products**. Wallingford : CAB International.
- Girgis, H.S., Smith, J., Luchansky, J.B., Klaenhammer, T.R., Yousef, A.E. and Juneja, V.K. 2003. **Microbial Stress Adaption and Food Safety**. Florida : CRC Press.
- Goldin, B.R. and Gorbach S.L. 1992. "Probiotics for Humans." 356-376. in Fuller, R. **Probiotics the Scientific Basis**. London : Chapman and Hall.
- Hammes, W.P., Bantleon, A. and Min, S. 1990. "Lactic acid bacteria in meat fermentation." **FEMS Microbiology Letters**. 87 : 165-173.
- Hammes, W.P. and Hertel, C. 1998. "New development in meat starter cultures." **Meat Science**. 49 : S125-S128.

- Harrigan, W.F. 1998. **Laboratory Method in Food and Dairy Microbiology**. 3rd ed. Great Britain : WBC Book.
- Holzappel, W.H., Geisen, R. and Schillinger, U. 1995. "Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes." **International Journal of Food Microbiology**. 24 : 343-362.
- Hugas, M and Monfort, J.M. 1997. "Bacterial starter cultures for meat fermentation." **Food Chemistry**. 59 : 547-554.
- Hutkins, R.W. 2006. **Microbiology and Technology of Fermented Foods**. Iowa : Blackwell publishing.
- Janes, M.E., Nannapaneni, R. and Johnson, M.G. 1999. "Identification and characterization of two bacteriocins-producing bacteria isolated from garlic and ginger root." **Journal of Food Protection**. 62(8) : 899-904.
- Jimenez-Diaz, R., Rio-sanchez, R.M., Desmazeaud, M., Ruiz-Barba, J.L. and Piard, J.G. 1993. "Plantaricin S and T two new bacteriocins produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolate from a green olive fermentation." **Applied and Environmental Microbiology**. 59 : 1416-1424.
- Joosten, H.M.L.J. and Northolt, M.D. 1999. "Detection, growth, and amine-producing capacity of Lactobacilli in cheese." **Applied and Environmental Microbiology**. 55(9) : 2356-2359.
- Kaletta, C., Entian, K.D., Kellner, R., Jung, G., Reis, M. and Sahl, H. G. 1989. "Pep5, a new lantibiotic: structural gene isolation and prepeptide sequence." **Archives of Microbiology**. 152 : 16-19.
- Kashket, I.R. 1987. "Bioenergetics of lactic acid bacteria : cytoplasmic pH and osmotolerance." **FEMS Microbiology Reviews**. 46 : 233-244.
- Kleeman, E.C. and Klaenhammer, T.R. 1982. "Adherence of *Lactobacillus* species to human intestinal cells." **Journal of Dairy Science**. 65 : 2063-2069.
- Leroy, F. and De Vuyst, L. 2004. "Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry." **Trends in Food Science and Technology**. 15 : 67-78.

- Lilly, D.M. and Stillwell, R.H. 1965. "Probiotics : Growth promoting factors produced by microorganisms." **Science**. 147 : 747-748.
- Lingren, S.E. and Dobrogosz, W.L. 1990. "Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentation." **FEMS Microbiology Reviews**. 7 : 149-163.
- Liston, J. 1980. "Microbiology in Fishery Science." 138-157. in Connell J.J. and staff of Torry research station. **Advances in Fish Science and Technology**. Farnham, Surrey : Fishing news books limited.
- Lopez, S. and Mayo, B. 1997. "Identification and characterization of homofermentative mesophilic *Lactobacillus* strains isolated from artisan starter-free cheeses." **Letter in Applied Microbiology**. 25 : 233-238.
- Löcke, F.K. and Hechelmann, H. 1987. "Starter cultures for dry sausages and raw ham composition and effect." **Fleischwirtschaft**. 67 : 307-314.
- Maijala, R., Eerola, S., Aho, M. and Him, J. 1993. "The effect of GDL-induced pH decrease on the formation of biogenic amines in meat." **Journal of Food Protection**. 56 : 125-129.
- Marceau, A., Zagorec, M., Chaillou, S., Mera, T. and Campomier-Verges, M.C. 2004. "Evidence for involvement of at least six proteins in adaption of *Lactobacillus sakei* to cold temperatures and addition of NaCl." **Applied and Environmental Microbiology**. 70 : 7260-7268.
- Marth, E.M. and Steele J.L. 2001. **Applied Dairy Microbiology**. 2nded. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Mattila-Sandholm, T., Myllärinen P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fondén, R. and Saarela, M. 2002. "Technological challenges for future probiotic food." **International Dairy Journal**. 12 : 173-182.
- Metchnikoff, E. 1908. **The Prolongation of Life Optimistic Studies**. New York : Putman's.
- Mitsuoka, T., Emeritus, P. and Wood, B.J.B. 1992. **The Lactic Acid Bacteria**. London : Elsevier Science Publishers Ltd.

- Molly, K., Demeyer, D., Johansson, G., Raemaekers, M., Ghistelinck, M. and Geenen, I. 1997. "The importance of meat enzymes in ripening and flavor generation in dry fermented sausages." **Food Chemistry**. 59 : 539-545.
- Montel, M.C. 1999. "Fermentation Meat Products." 744-753. in Batt, C.A. and Patel, P.D. **Encyclopedia of Food Microbiology : Fermented Foods**. London : Academic press.
- Moon, N.J., Beuchat, L.R., Kinkaid, D.T. and Hays E.R. 1982. "Evaluation of lactic acid bacteria for extending the shelf life of shrimp." **Journal of Food Science**. 47 : 897-900.
- Moser, S.A. and Savage, D.C. 2001. "Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjugated are unrelated properties in lactobacilli." **Applied and Environmental Microbiology**. 67(8) : 3476-3480.
- Nair, P.S. and Surendran, P.K. 2004. "Biochemical characterization of lactic acid bacteria from fish and prawn." **Journal of Culture Collections**. 4 : 48-52.
- Nes, I.F. 1992. "Non-nisin like bacteriocins in lactic acid bacteria." **Paper Presented at Biotieteentäivät**. Finland : Helsinki.
- Noonpakdee, W., Sitthimonchai, S., Panyim, S. and Lertsiri, S. 2004. "Expression of the catalase gene katA in starter culture *Lactobacillus plantarum* TISTR 850 tolerates oxidative stress and reduces lipid oxidation in fermented meat product." **International Journal of Food Microbiology**. 95 : 127-135.
- Olasupo, N.A., Schillinger, U., Franz, C.M.A.P. and Holzapfel, W.H. 1994. "Bacteriocin production by *Enterococcus faecium* NA01 from "wara" a fermented skimmed cow milk product from west African." **Letters in Applied Microbiology**. 19 : 438-441.
- Ordóñez, J.A., Hierro, E.M., Bruna, J.M. and de la Hoz, L. 1999. "Changes in the components of dry fermented sausage during ripening." **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 39 : 329-367.

- Paludan-Müller, C., Huss, H.H. and Gram, L. 1999. "Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substance for fermentation." **International Journal of Food Microbiology**. 46 : 219-229.
- Paludan-Müller, C., Madsen, M., Sophanodora, P., Gram, L. and Møller, P.L. 2002. "Fermentation and microflora of plaasom, a Thai fermented fish product prepared with different salt concentrations." **International Journal of Food Microbiology**. 73 : 61-70.
- Paul, S. 1999. **Bacteria in Biology Biotech and Medicine**. Chichester : John Wiley.
- Pereira, C.I., Barreto Crespo, M.T. and San Romão, M.V. 2001. "Evidence for proteolytic and biogenic amines production in *Lactobacillus curvatus* and *L. homohiochii*." **International Journal of Food Microbiology**. 68 : 211-216.
- Podolak, P.K., Zayas, J.F., Kastner, C.L. and Fung, D.Y.C. 1996. "Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 : H7 on beef by application of organic acids." **Journal of Food Protection**. 59 : 370-373.
- Parker, R.B. 1974. "Probiotic the other half of the antibiotic story." **Animal Nutrition Health**. 29 : 4-8.
- Raccach, M. and Baker, R.C. 1987. "Formation of hydrogen peroxide by meat starter cultures." **Journal of Food Protection**. 41 : 798-799.
- Rattanachaiakunsopon, P., Saito, T. and Nitisinprasert, S. 2003. "Detection and partial characterization of bacteriocin produced by *Leuconostoc* isolated from Thai fermented food." **Journal of Science Technology and Humanities**. 1(2) : 149-158.
- Ricke, S.C. and Keeton, J.J. 1997. "Fermented Meat, Poultry and Fish Products." 610-628. in Doyle, M.P., Beuchat, L.R. and Montville, T.J. **Food Microbiology Fundamentals and Frontiers**. Washington D.C. : ASM press.
- Riebroy, S., Benjakul, S., Visessanguan, W., Kijrongrojana, K. and Tanaka, M. 2004. "Some characteristics of commercial som-fug produced in Thailand." **Food Chemistry**. 88 : 527-535.

- Riebroy, S., Benjakul, S., Visessanguan, W and Tanaka, M. 2006. "Changes during fermentation and properties of som-fug produced from different marine fish." **Journal of Food Processing and Preservation**. 31 : 751-770.
- Riebroy, S. and Benjakul, S. 2008. "Properties and acceptability of som-fug, a Thai fermented fish mince, inoculated with lactic acid bacteria starters." **LWT Food Science and Technology**. 41 : 569-580.
- Sakhare, P.Z. and Narasimha-Rao, D. 2003. "Microbial profiles during lactic fermentation of meat by combined starter cultures at high temperatures." **Food Control**. 14 : 1-5.
- Sandholm, T.M., Myllarinen, P., Crittenden, R., Mogensen, G., Fonden, R. and Saarela, M. 2002. "Technological challenges for future probiotic foods." **International Dairy Journal**. 12 : 173-182.
- Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Bassole, I.H.N and Traore, A.S. 2004. "Antimicrobial activities of lactic acid bacteria strains isolated from Burkina faso fermented milk." **Pakistan Journal of Nutrition**. 3(3) : 174-179.
- Schillinger, U. and Lücke F.K. 1989. "Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat." **Applied and Environmental Microbiology**. 55(8) : 1901-1906.
- Shalaby, A.R. 1996. "Significant of biogenic amines to food industry and human health." **Food Research International** . 29 (7) : 675-690
- Shewan, J.M. 1977. "The Bacteriology of Fresh and Spoiling Fish and the Biochemical Changes Induced by Bacteria Action." 55-66. in **Handing Processing and Marketing of Tropical Fish**. London : Tropical product institute.
- Shiflett, M. A., Lee, J. S. and Sinnhuber, R. O. 1966 . "Microbial flora of irradiated dungeness crabmeat and pacific oysters." **Applied and Environmental Microbiology**. 14(3) : 411-415
- Smith, J.L. and Palumbo, S.A. 1983. "Use of starter culture in meat." **Journal of Food Protection**. 46 (11) : 997-1006.

- Snijders, J.M., van Logtestijn, J.G., Mossel, D.A. and Smulders, F.J. 1985. "Lactic acid as a decontaminant in slaughter and processing procedures." **Veterinary Quarterly**. 7 : 277-282.
- Stevens, K.A., Sheldon, B.W., Klapes, N.A and Klaenhammer, T.R. 1991. "Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria." **Applied and Environmental Microbiology**. 57 : 3613-3615.
- Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." **International Journal of Food Microbiology**. 36 : 1-29.
- Suzzi, G. and Gardini, F. 2003. "Biogenic amines in dry fermented sausages : a review." **International Journal of Food Microbiology**. 88 : 41-54.
- Swetwathana, A., Leutz, U. and Fischer, A. 1999. "Role of garlic on growth and lactic acid production of starter cultures." **Starter Culture**. 1 : 26-29.
- Tagg, J.R., Dajani, A.S. and Wannamaker, L.W. 1976. "Bacteriocin of gram positive bacteria." **Bacteriological Reviews**. 40(3) : 722-756.
- Tanaka, N., Traisman, E., Lee, M.H., Cassens, R.G. and Forster, E.M. 1980. "Inhibition of botulinum toxin formation in bacon by acid development." **Journal of Food Protection**. 43 : 450-457.
- Tanasupawat, S., Okada, S. and Komagato, K. 1998. "Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand." **The Journal of General Applied Microbiology**. 44 : 193-200.
- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S and Kazuo, K. 2000. "*Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand." **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**. 50 : 1479-1485.
- Teixido, N., Cañamás, T.P., Usall, J., Torres, R., Magan, N. and Viñas, I. 2005. "Accumulation of the compatible solutes, glycine-betaine and ectoine, in osmotic stress adaption and heat shock cross-protection in the biocontrol agent *Pantoea agglomerans* CPA-2". **Letters in Applied Microbiology**. 41 : 248-252.

- Thapa, N., Pal, J. and Tamang, J.P. 2006. "Phenotypic identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from traditionally processed fish products of the Eastern Himalayans." **International Journal of Food Microbiology**. 107 : 33-38.
- Toldrá, F., Sanz, Y and Flores, M. 2001. "Meat Fermentation Technology." 537-561. in Hui, Y.H., Nip, W.K., Rogers, R.W and Yong, Q.A (eds). **Meat Science and Applications**. New York : Marcel Dekker, Inc.
- Työppönen, S., Petaja, E. and Sandholm, T.M. 2003. "Bioprotectives and probiotics for dry sausages." **International Journal of Food Microbiology**. 83 : 233-244.
- Vasseur, C., Baverel, L., Hébraud, M. and Labadie, L. 1999. "Effect of osmotic, alkaline, acid or thermal stresses on growth and inhibition of *Listeria monocytogenes*." **Journal of Applied Microbiology**. 86 : 469-476.
- Varnam, A.H. and Sutherland, J.P. 1995. **Meat and Meat Products : Technology, Chemistry and Microbiology**. London : Chapman and Hall.
- Visessanguan, W., Benjakul, S and Riebroy, S and Thepkasikul, P. 2004. "Changes in composition and functional properties of proteins and their contributions to nham characteristics." **Meat Science**. 66 : 579-588.
- Visessanguan, W., Benjakul, S., Smitinont, T., Kittikun, C., Thepkasikul, P. and Panya, A. 2006. "Change in microbiological, biochemical and physic-chemical properties of nham inoculated with different inoculums levels of *Lactobacillus curvatus*." **LWT Food Science and Technology**. 39 : 814-826.
- Weisbrodt, N.W. 2007. "Bile secretion and gallbladder function." 97-126. in Johnson, L.R. **Gastrointestinal Physiology**. 7th ed. Philadelphia : Mosby Elsevier.
- Wolf, G., Arendt, E.K., Pfahler, U. and Hammes, W.P. 1990. "Heme-dependent and heme-independent nitrite reduction by lactic acid bacteria results in different N-containing products." **International Journal of Food Microbiology**. 10 : 323-329.

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและการเตรียมสารเคมี

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 สูตรอาหาร Tryptic Soy Yeast Extract Soft Agar (TSYE Soft Agar) ประกอบด้วย

Tryptic soy broth	30	กรัม
ยีสต์สกัด	6	กรัม
ผงวุ้น	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

1.2 สูตรอาหาร Gibson Semi Solid Tomato Juice Medium

ยีสต์สกัด	2.5	กรัม
กลูโคส	50	กรัม
หางนมผง	80	กรัม (ร้อยละ 10)
Nutrient agar (NA)	200	มิลลิลิตร
MnSO ₄ · 4H ₂ O	10	มิลลิลิตร (ร้อยละ 0.4)
น้ำกลั่น	800	มิลลิลิตร

ผสมสารละลายแมงกานีสซัลเฟต หางนมผง ยีสต์สกัด กลูโคสและน้ำกลั่นเข้าด้วยกัน จากนั้นนำอาหารแข็ง NA ที่หลอมละลายแล้วเติมผสมลงไป ปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร จากนั้นฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เป็นเวลา 3 วัน

1.3 สูตรอาหาร Luria-Bertani Agar (LB Agar)

เปปโตน	10	กรัม
ยีสต์สกัด	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	10	กรัม
ผงวุ้น	15	กรัม

น้ำกลั่น

1,000 มิลลิลิตร

ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.4 นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. การเตรียมสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

2.1 สารเคมีที่ใช้สำหรับปรับพีเอช

ก) สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 โมลาร์

การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 5 โมลาร์ทำได้โดย ตวงกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้นร้อยละ 37 มาปริมาตร 418 มิลลิลิตร จากนั้นเทลงในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1,000 มิลลิลิตร ซึ่งสามารถคำนวณปริมาณกรดที่ใช้ได้โดยใช้สูตรดังนี้

$$V = \frac{(100) (MW) (\text{mole})}{Pd}$$

V	คือ ปริมาตรกรดเข้มข้นที่ต้องใช้ (มิลลิลิตร)
mole	คือ ความเข้มข้นของสารที่เตรียมในหน่วยโมล
P	คือ เปอร์เซ็นต์กรดไฮโดรคลอริก (ร้อยละ 37)
d	คือ ความถ่วงจำเพาะของกรดไฮโดรคลอริก (1.18)
MW	คือ มวลโมเลกุลของกรดไฮโดรคลอริก (36.5)

ข) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 1 โมลาร์ ทำได้โดยชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ (MW = 40) ปริมาณ 4 กรัม จากนั้นนำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

ค) สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ความเข้มข้น 5 โมลาร์ ทำได้โดยชั่งโซเดียมคลอไรด์ (MW = 40) ปริมาณ 20 กรัม จากนั้นนำมาละลายในน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

2.2 สารเคมีสำหรับเจือจางเอนไซม์และการเตรียมสารละลายเอนไซม์

ก) สารละลายกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล

การเตรียมกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล ทำได้โดยปิเปตกรดไฮโดรคลอริกมาปริมาตร 0.8 มิลลิลิตร จากนั้นปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ได้ 500 มิลลิลิตร

ข) การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์

stock A เตรียมโดยชั่ง dipotassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4) ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 136.09 มาปริมาณ 13.61 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร

stock B เตรียมโดยชั่ง disodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4) ซึ่งมีมวลโมเลกุลเท่ากับ 141.96 มาปริมาณ 14.20 กรัม ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรให้ได้ 500 มิลลิลิตร ซึ่งการเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ที่ระดับพีเอชต่างๆ กัน แสดงในตารางที่ ก1

ตารางที่ ก1 การเตรียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่ระดับพีเอชต่างๆกัน

พีเอช	stock A	stock B
	KH_2PO_4 (ml)	Na_2HPO_4 (ml)
6.0	26.31	3.69
7.5	4.8	25.2
7.6	3.9	26.1
8.0	1.59	28.41

ค) การเตรียม stock ของเอนไซม์แต่ละชนิด

การเตรียม stock ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยชั่งเอนไซม์แต่ละชนิด (lipase, trypsin และ α -amylase) ปริมาณ 0.5 กรัม จากนั้นละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์โดยดูจากตารางที่ ก2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

การเตรียม stock ของเอนไซม์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ทำได้โดยชั่งเอนไซม์แต่ละชนิด (α -chymotrypsin และ protease) ปริมาณ 0.1 กรัม จากนั้นละลายในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.2 โมลาร์ (โดยใช้ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ที่มีพีเอชเหมาะสมกับการทำงานของเอนไซม์โดยดูจากตารางที่ ก2) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร สำหรับเอนไซม์ pepsin ชั่ง 0.1 กรัม และละลายในกรดไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 0.002 นอร์มอล ปริมาตร 10 มิลลิลิตร

ตารางที่ ก2 สภาวะที่เหมาะสมต่อการทำงานของเอนไซม์แต่ละชนิด

เอนไซม์	activity (u/mg)	พีเอชที่เหมาะสม	อุณหภูมิที่เหมาะสม (°C)
α -amylase	36.0	6.0	25
α -chymotrypsin	350	8.0	25
lipase	27.4	8.0	37
pepsin	655	2.0	37
protease	4.7	7.5	37
trypsin	93.9	7.6	25

ภาคผนวก ข

รายละเอียดเกี่ยวกับการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก

1. การเตรียม Competent cell สำหรับการ Transformation

1.1 การเตรียมสารสำหรับทำ Competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5 α

ก) สารละลาย RF1

การเตรียม RF1 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรทำได้โดยชั่งโพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.0745 กรัม แมงกานีสคลอไรด์ ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$) 0.9895 กรัม โพแทสเซียมอะซิเตรท (KOAc) 0.2944 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 0.1570 กรัม และกลีเซอรอล 15 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นปรับพีเอชให้ได้ 5.8 ด้วยกรดอะซิติก แล้วกรองผ่านตัวกรอง

ข) สารละลาย RF2

การเตรียม RF2 ปริมาตร 100 มิลลิลิตรทำได้โดยชั่ง KOPs 0.2092 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 0.744 กรัม แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2$) 1.1026 กรัม และกลีเซอรอล 15 กรัม ใส่ในน้ำกลั่น จากนั้นกรองผ่านตัวกรอง

ค) การเตรียมอาหาร SOB Medium

การเตรียมอาหาร SOB Medium ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ทำได้โดยชั่งทริปโตน 20 กรัม ยีสต์สกัด 5 กรัม โซเดียมคลอไรด์ 0.5 กรัม เติมน้ำกลั่น ปรับพีเอชให้ได้ 7.5 จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ง) อาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanamycin

การเตรียมอาหาร LB ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ใช้สูตรเดียวกับภาคผนวก ก โดยปรับพีเอชให้ได้ 7.4 และนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดันไอ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นทิ้งอาหารไว้ให้อุ่นแล้วเติมยาปฏิชีวนะ kanamycin ปริมาตร 1,000 ไมโครลิตร (จาก stock ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร

1.2 การทำ Competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5 α

การทำ Competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5 α ทำได้โดยวิธีการดังนี้ เพาะเลี้ยงเชื้อ *E. coli* DH5 α ในอาหารเหลว LB ปริมาตร 6 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืนโดยเขย่าที่ 250 รอบต่อนาที จากนั้นเปิดเชื้อ *E. coli* DH5 α ที่ได้เพาะเลี้ยงมาปริมาตร 0.04 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหาร SOB ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ให้มีอัตราส่วน 1 ต่อ 250) และนำไปบ่มที่สภาวะเดียวกับข้างต้นประมาณ 3 ถึง 4 ชั่วโมง และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ให้ได้ค่าการดูดกลืนแสงประมาณ 0.2 ถึง 0.4 จากนั้นนำสารแขวนลอยเซลล์ของเชื้อใส่ในหลอดเซนตริฟิวส์ แช่ในน้ำแข็งทันที 15 นาที และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3500 รอบต่อนาที อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเบาๆ ด้วยสารละลาย RF1 (โดยใช้สารละลาย RF1 ปริมาตร 1 ใน 3 ของปริมาตร SOB) แช่ในน้ำแข็ง 15 นาที เซนตริฟิวส์อีกครั้งเป็นเวลา 15 นาที ละลายตะกอนเบาๆ ด้วย RF2 (โดยใช้ RF2 ปริมาตร 1 ใน 25 ของปริมาตร SOB) จากนั้นแบ่ง Competent cell ที่ได้ใส่ในหลอด microcentrifuge tube หลอดละ 100 ไมโครลิตร และเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

1.3 การทดสอบประสิทธิภาพของ Competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5 α โดยการ Transformation

การทดสอบประสิทธิภาพของ Competent cell ของเชื้อ *E. coli* DH5 α โดยการ Transformation ทำได้ตามวิธีการดังนี้คือ แบ่ง Competent cell ใส่ในหลอดละ 100 ไมโครลิตร จำนวน 2 หลอด จากนั้นเปิด plasmid TMV ใส่ลงใน Competent cell หลอดที่ 1 ปริมาตร 1 ไมโครลิตร แช่ในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที และย้ายมาใส่ใน water bath ที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 90 วินาที จากนั้นนำมาแช่ในน้ำแข็งต่ออีกอย่างน้อย 2 นาที จากนั้นเติมอาหารเหลว LB ลงใน Competent cell หลอดที่ 1 ปริมาตร 900 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และเขย่าที่ความเร็ว 250 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นนำ Competent cell แต่ละหลอดมา spread บนจานเพาะเชื้อที่มีอาหาร LB ที่เติม kanamycin โดยหลอดที่ 1 คือหลอดที่ไม่ใส่ plasmid TMV (ต้องไม่มีโคลนีนขึ้น) หลอดที่ 2 คือหลอดที่ใส่ plasmid TMV (หลอดที่ 3 หลอดที่ใส่ plasmid TMV และทำการเจือจางตัวอย่างก่อน spread ในอัตราส่วนของพลาสมิดและอาหาร อัตราส่วน 1 ต่อ 10 จากนั้นนำงานเพาะเชื้อที่ได้ไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ข้ามคืน

2. คุณสมบัติที่แตกต่างกันทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติก
 ตารางที่ ข1 คุณสมบัติที่แตกต่างกันทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติก

Character	Rods										Cocci					
	Carnob.	Lactob.	Lactoc.			Leucon.			Pedioc.	Streptoc.	Tetragenoc.	Weissella ^a				
			Aeroc.	Enteroc.	Vagoc.	Oenoc.										
Tetrad formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
CO ₂ from glucose ^b	- ^c	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Growth 10 °C	+	±	+	+	+	+	+	±	±	±	±	±	±	±	±	+
Growth 45 °C	-	±	-	+	+	-	-	-	±	±	±	±	±	±	±	-
Growth in 6.5% NaCl	ND ^d	±	+	+	-	-	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Growth in 18 % NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.4	ND	±	-	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Growth at pH 9.6	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactic acid ^e	L	D, L, DL ^f	L	L	L	L	L	L	L, DL ^f	L	L	L	L	L	L	D, DL ^f

+ , positive ; - negative; ± , response varies between species ; ND, not determined., ^a *Weissella* strains may also be rod - shaped, ^b Test for homo- or heterofermentation of glyucose ;negative and positive denotes homofermentative and heterofermentative, respectively, ^c Small amounts of CO₂ can be produced, depending on media, ^d No growth in 8% NaCl has been reported, ^e Configuration of lactic acid produced from glucose.

^f Production of D-, L-, or DL-lactic acid varies between species.

ที่มา : Axelsson. 2004

3. องค์ประกอบของสารคาร์โบไฮเดรตใน API 50 CH strips สำหรับการหมักคาร์โบไฮเดรตด้วยชุดทดสอบ API 50 CH

ตารางที่ ข2 องค์ประกอบของสารคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH strips) ทั้ง 50 ชนิด

หลอดที่	อักษรย่อ	สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	QTY (mg/cup.)
0	หลอดควบคุม(control)	ไม่มีคาร์โบไฮเดรต	-
1	GLY	glycerol	1.64
2	ERY	erythritol	1.44
3	DARA	D-arabinose	1.4
4	LARA	L-arabinose	1.4
5	RIB	D-ribose	1.4
6	DXYL	D-xylose	1.4
7	LXYL	L-xylose	1.4
8	ADO	D-adonital	1.36
9	MDX	methyl-βD- xylopyranoside	1.28
10	GAL	D-galactose	1.4
11	GLU	D-glucose	1.56
12	FRU	D-fructose	1.4
13	MNE	D-mannose	1.4
14	SBE	L-sorbose	1.4
15	RHA	L-rhamnose	1.36
16	DUL	dulcitol	1.36
17	INO	inositol	1.4
18	MAN	D-mannitol	1.36
19	SOR	D-sorbitol	1.36
20	MDM	methyl-αD-mannopyranoside	1.28
21	MDG	methyl-αD- glucopyranoside	1.28
22	NAG	N-acetylglucosamine	1.28
23	AMY	amyldalin	1.08
24	ARB	arbutin	1.08

ตารางที่ ข2 (ต่อ) องค์ประกอบของสารคาร์โบไฮเดรต (API 50 CH strips) ทั้ง 50 ชนิด

หลอดที่	อักษรย่อ	สารประกอบคาร์โบไฮเดรต	QTY (mg/cup.)
25	ESC	esuculin	1.16
		ferric citrate	0.152
26	SAL	salicin	1.04
27	CEL	D-celobiose	1.32
28	MAL	D-maltose	1.4
29	LAC	D-lactose (bovine origin)	1.4
30	MEL	D-melibiose	1.32
31	SAG	D-saccharose (sucrose)	1.32
32	TRE	D-trehalose	1.32
33	INU	inulin	1.28
34	MLZ	D-melizitose	1.32
35	RAF	D-raffinose	1.56
36	AMD	amidon (starch)	1.28
37	GLYG	glycogen	1.28
38	XLT	xylitol	1.4
39	GEN	genitiobiose	0.5
40	TUR	D-turanose	1.32
41	LYX	D-lyxose	1.4
42	TAG	D-tagatose	1.4
43	DFUC	D-fucose	1.28
44	LFUC	L-fucose	1.28
45	DARL	D-arabitol	1.4
46	LARL	L-arabitol	1.4
47	GNT	potassium gluconate	1.84
48	2KG	potassium 2-ketogluconate	2.12
49	5KG	potassium 5-ketogluconate	1.8

ที่มา : คู่มือการใช้ชุดทดสอบ API 50 CH

ภาคผนวก ค

แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก

1. ผลการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก

ตารางที่ ค1 การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย กรดแลคติกทั้งหมด (โคโลนีต่อกรัม)	จำนวนไอโซเลต ที่คัดเลือก (ไอโซเลต)
1	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดหน้าค่าย จ.ปราจีนบุรี	2.4×10^6	20
2	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดหน้าค่าย จ.ปราจีนบุรี	-	-
3	กุ้งสด	ตลาดหน้าค่าย จ.ปราจีนบุรี	3.0×10^5	17
4	กุ้งจ่อม	ตลาดหน้าค่าย จ.ปราจีนบุรี	9.3×10^7	23
5	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดบ้านแพ จ.ระยอง	-	-
6	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดประสิทธิ์ จ. ปราจีนบุรี	2.0×10^5	20
7	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดคลองถม จ. ปราจีนบุรี	-	-
8	กุ้งจ่อม	ตลาดคลองถม จ. ปราจีนบุรี	-	-
9	ปลาจ่อม	ตลาดหน้าค่าย จ.ปราจีนบุรี	3.5×10^7	10
10	ปลาจ่อม	ตลาดประสิทธิ์ จ. ปราจีนบุรี	3.4×10^8	10
11	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดวัดหลวงพ้อโสธร จ. ฉะเชิงเทรา	-	-
12	กุ้งจ่อม	ตลาดวัดหลวงพ้อโสธร จ. ฉะเชิงเทรา	9.2×10^7	9
13	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดนัดวันพุธ จ.ปราจีนบุรี	-	-
14	กุ้งจ่อม	ตลาด จ. ราชบุรี	6.8×10^5	4
15	หอยแมลงภู่มัด	ตลาด จ. นูร์รัมย์	3.2×10^3	3
16	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดบ้านแพ จ.ระยอง	1.2×10^4	3
17	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดนัดเรือนไทยหัวตะเข้ จ. กรุงเทพฯ	9.5×10^3	4
18	ปลาจ่อม	ตลาดนัดเรือนไทยหัวตะเข้ จ. กรุงเทพฯ	5.1×10^5	6
19	ปลาจ่อม	ตลาดสด จ. ตราด	3.0×10^3	3
20	หอยแมลงภู่มัด	ตลาดสด จ. ตราด	-	-
21	กุ้งจ่อม	ตลาด อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	7.8×10^6	7
22	กุ้งจ่อม	ตลาด อ. คลองใหญ่ จ. ตราด	7.6×10^6	6
23	กุ้งจ่อม	ตลาด อ. บ้านสร้าง จ. ปราจีนบุรี	1.2×10^5	2
24	กุ้งจ่อม	ตลาดรังสิต จ. ปทุมธานี	1.3×10^5	5

ตารางที่ ค1 (ต่อ) การวิเคราะห์หาจำนวนแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารทะเลสดและอาหารทะเลหมัก

ตัวอย่างที่	ชนิดของตัวอย่าง	สถานที่เก็บตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย กรดแลคติกทั้งหมด (โคโลนีต่อกรัม)	จำนวนไอโซเลต ที่คัดเลือก (ไอโซเลต)
25	กุ้งจ่อม	ตลาด จ. บุรีรัมย์	-	-
26	กุ้งจ่อม	ตลาดรังสิต จ. ปทุมธานี	3.7×10^6	9
27	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดรังสิต จ. ปทุมธานี	-	-
28	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดปากเกร็ด จ. นนทบุรี	-	-
29	ปลาจ่อม	ตลาดปากเกร็ด จ. นนทบุรี	-	-
30	ปลาจ่อม	ตลาดปากเกร็ด จ. นนทบุรี	-	-
31	ปลาจ่อม	ตลาดประสิทธิ์ จ.ปราจีนบุรี	-	-
32	ปลาจ่อม	ตลาดหน้าค่าย จ.ปราจีนบุรี	-	-
33	ปลาจ่อม	ตลาดสด จ. ราชบุรี	4.6×10^7	5
34	กุ้งสด	ตลาดหน้าค่าย จ. ปราจีนบุรี	4.2×10^4	2
35	กุ้งสด	ตลาดนัดวันพุธ จ. ปราจีนบุรี	2.9×10^5	5
36	กุ้งสด	ตลาดนัดวันเสาร์ จ. ปราจีนบุรี	6.0×10^4	2
37	กุ้งสด	ตลาดประสิทธิ์ จ.ปราจีนบุรี	1.7×10^5	2
38	กุ้งสด	ตลาดบ้านสร้าง จ.ปราจีนบุรี	1.5×10^5	2
39	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดหน้าค่าย จ. ปราจีนบุรี	9.1×10^5	5
40	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดนัดวันพุธ จ. ปราจีนบุรี	-	-
41	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดนัดวันเสาร์ จ. ปราจีนบุรี	3.0×10^6	5
42	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดประสิทธิ์ จ.ปราจีนบุรี	4.2×10^6	4
43	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดบ้านสร้าง จ.ปราจีนบุรี	9.4×10^5	3
44	ปลาจ่อม	ตลาดวันอังคาร จ. ปราจีนบุรี	4.3×10^4	2
45	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดดงขี้เหล็ก จ. ปราจีนบุรี	3.0×10^4	4
46	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดดงพระราม จ. ปราจีนบุรี	5.2×10^4	3
47	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดนัดวันอังคาร จ. ปราจีนบุรี	2.3×10^6	3
48	หอยแมลงภู่ม้วน	ตลาดสามแยก จ. ปราจีนบุรี	-	-
49	กุ้งสด	ตลาดดงขี้เหล็ก จ. ปราจีนบุรี	5.2×10^4	5
50	กุ้งสด	ตลาดดงพระราม จ. ปราจีนบุรี	1.2×10^5	4
51	กุ้งสด	ตลาดวันอังคาร จ. ปราจีนบุรี	-	-
52	กุ้งสด	ตลาดสามแยกถนนเรศวร จ.ปราจีนบุรี	3.8×10^4	5
รวม				222

2. ผลการทดสอบแบบที่เรียกรวดแลคติกที่มีกิจกรรมการต่อต้านจุลินทรีย์ชนิดอื่น

ตารางที่ ค2 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลหมักที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

แหล่งของ ไอโซเลต	เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ทดสอบ											
	<i>E.coli</i> DMST 4212	<i>L. bulgaricus</i> TISTR 541	<i>L. monocytogenes</i> DMST 11256	<i>P. acidilactici</i> TISTR 051	<i>Ps. fluorescens</i> DMST 20076	<i>S. Typhimurium</i> DMST 0562	<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>V. parahaemolyticus</i> SH1				
หอมแมลงภู่อุต	+++	+++	-	+	-	++	-	+++	-	+	+	+
ไอโซเลต	+++	++	-	+++	-	-	-	-	-	+	+	-
1IS2	+++	+++	-	+	-	++	-	-	-	+	+	+
1IS3	+++	++	-	+++	-	-	-	-	-	-	+	-
1IS11	+	++	++	-	-	+	-	-	-	+	-	+
39IS5	+	-	++	-	-	++	-	-	-	-	-	-
41IS5	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+
42IS3	+	-	++	-	-	++	-	-	-	+	+	-
45IS3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45IS4	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46IS2	++	+++	++	+++	-	++	-	++	-	++	+	++
47IS1	-	+	-	-	-	++	-	++	-	++	+	+
3IS1	-	+	++	-	+	-	-	-	-	+	-	-
3IS17	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+++
35IS3	-	-	++	-	-	++	-	++	-	++	-	-
37IS1	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49IS1	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
49IS2	++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49IS3	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49IS5	-	-	++	-	-	-	-	++	-	++	-	-
50IS3	-	-	++	-	-	++	-	-	-	-	+	+

กึ่งสด

ตารางที่ ค2 (ต่อ) คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากอาหารทะเลหมักที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

แหล่งของ ไอโซเลต	เชื้ออินดิเคเตอร์ที่ทดสอบ										
	<i>E.coli</i> DMST 4212	<i>L. bulgaricus</i> TISTR 541	<i>L. monocytogenes</i> DMST 11256	<i>P. acidilactici</i> TISTR 051	<i>Ps. fluorescens</i> DMST 20076	<i>S. Typhimurium</i> DMST 0562	<i>S. aureus</i> TISTR 118	<i>V. parahaemolyticus</i> SH1			
4IS9	++	-	-	+	-	+++	-	+			
4IS10	+	++	-	++	-	-	+	-			
4IS11	+	+++	+	++	-	++	+	++			
4IS12	+	++	-	++	-	++	-	++			
4IS13	+	-	-	-	-	-	-	++			
4IS14	+	-	-	-	-	++	-	++			
4IS16	+	-	-	-	-	-	++	++			
4IS17	++	+++	++	+	-	+	++	++			
4IS18	++	+++	++	++	-	-	+	++			
4IS19	+	++	++	-	-	++	-	++			
4IS20	+	+++	++	+++	-	++	-	++			
4IS21	+	++	+	++	-	++	++	++			
4IS22	+	++	-	++	-	-	+	+			
4IS23	+	++	+++	-	-	-	-	++			

หมายเหตุ - หมายถึง ไม่มีผลการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์

+ หมายถึง ผลการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์อยู่ระหว่าง 0.2 ถึง 0.5 เซนติเมตร

++ หมายถึง ผลการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์อยู่ระหว่าง 0.5 ถึง 1.0 เซนติเมตร

+++ หมายถึง ผลการยับยั้งเชื้ออินดิเคเตอร์มากกว่า 1.0 เซนติเมตร

ภาคผนวก ง

การจำแนกชนิดโดยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุลของแบคทีเรียกรดแลคติก

P0805

1. การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก

ไอโซเลต P0805

วัตถุประสงค์

เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติก P0805 โดยวิธีการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์และวิธีการทดลองที่ใช้ในการทำการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ใช้วิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.8

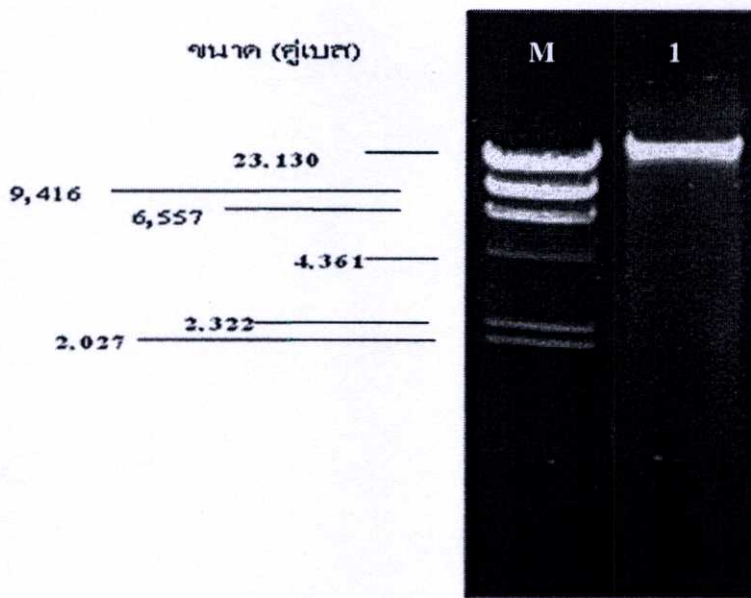
ผลการทดลอง

ผลการสกัดจีโนมิกดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส

การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0805 ทำวิธีการวิเคราะห์เช่นเดียวกับไอโซเลต IIS11 และ 4IS17 ซึ่งไอโซเลต P0805 พบแถบจีโนมิกดีเอ็นเอเพียง 1 แถบ (ภาพที่ ง1) มีขนาดประมาณ 23.1 กิโลเบส โดยเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind* III จากนั้นนำจีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้ไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16s rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรสในขั้นตอนต่อไป

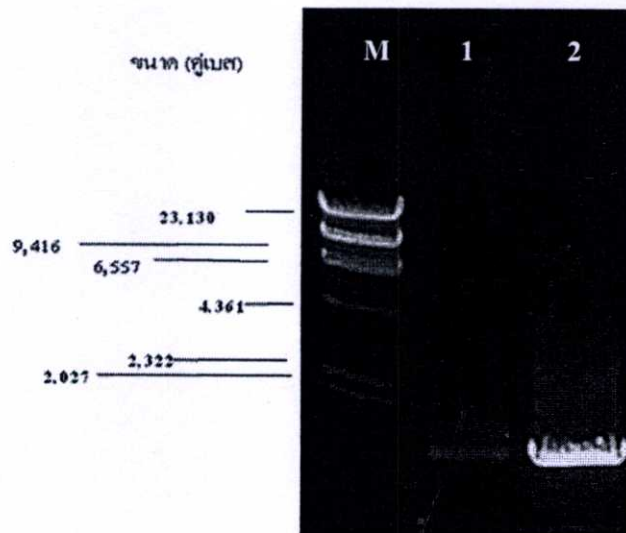
ผลการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส

จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ทำได้โดยนำจีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต P0805 มาทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีน 16S rDNA ด้วยเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์ PCR ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสซึ่งพบแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR เพียง 1 แถบ และเมื่อเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดาพบว่ามีความยาวประมาณ 1,500 กิโลเบส (ภาพที่ ง2) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ได้จากการเพิ่มปริมาณไปทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ในขั้นตอนต่อไป



ภาพที่ ง1 จีโนมิกดีเอ็นเอที่สกัดได้จากแบคทีเรียกรดแลคติก P0805

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
 เลนที่ 1 คือ จีโนมิกดีเอ็นเอของไอโซเลต P0805

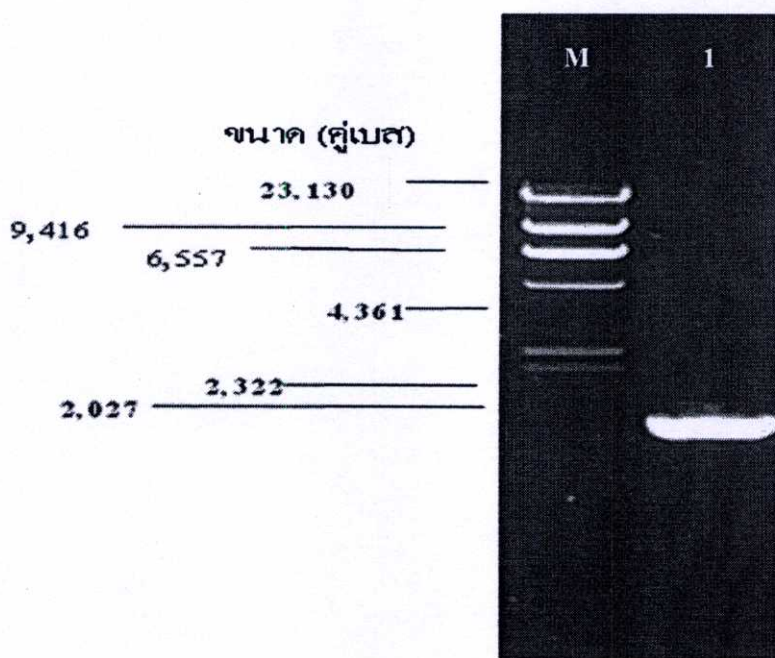


ภาพที่ ง2 ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
 เลนที่ 1 คือ negative control
 เลนที่ 2 คือ ผลิตรหัส PCR ของยีน 16S rDNA ของไอโซเลต P0805

ผลการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ การเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอและการ Transformation

การทำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการเพิ่มปริมาณให้บริสุทธิ์ทำได้ด้วยชุด QIA quick PCR purification kit พบว่าแถบดีเอ็นเอของผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มีขนาดประมาณ 1,500 คู่เบส และมีปริมาณ 70 นาโนกรัม (ภาพที่ 3) จากนั้นนำผลิตภัณฑ์ PCR ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์มาทำการเชื่อมต่อสายดีเอ็นเอ (ligation) เข้ากับเวกเตอร์ pDrive ที่มีขนาด 3,850 คู่เบส ปริมาณ 50 นาโนกรัมและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 16 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จะได้พลาสมิด pDrive ที่มีผลิตภัณฑ์ PCR ขนาดประมาณ 1,500 คู่เบสอยู่ หลังจากนั้นทำการถ่ายโอนพลาสมิดที่มีผลิตภัณฑ์ PCR เข้าสู่เซลล์ของ *E.coli* DH5 α และคัดเลือกโคโลนีที่มีสีขาวบนอาหาร LB ที่เติม kanamycin (ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) X-gal (ความเข้มข้นสุดท้าย 80 ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร) และ IPTG (ความเข้มข้นสุดท้าย 0.5 มิลลิโมลาร์) ซึ่งการที่โคโลนีของ *E. coli* DH5 α มีสีขาวบนอาหาร LB แสดงว่ามีผลิตภัณฑ์ PCR ของแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ จากนั้นนำโคโลนีสีขาวมาเพาะเลี้ยงในอาหาร LB ที่มียาปฏิชีวนะ kanomycin ความเข้มข้นสุดท้าย 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอต่อไป

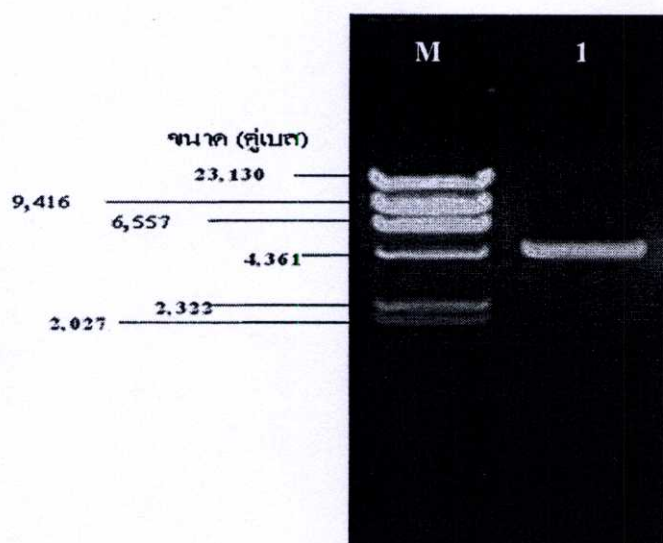


ภาพที่ 3 ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์

M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hind*III
 เเลนที่ 1 คือ ดีเอ็นเอที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ของไอโซเลต P0805

ผลการสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของพลาสมิดดีเอ็นเอของ ยีน 16S rDNA

จากการคัดเลือกโคโลนีสีขาวซึ่งผ่านการถ่ายโอนยีนแล้วนำมาสกัดพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยชุด QIA prep[®] Spin Miniprep kit และนำมาวิเคราะห์ปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอด้วยวิธีอะกาโรส เจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าไอโซเลต P0805 ปรากฏแถบพลาสมิดดีเอ็นเอไอโซเลตละ 1 แถบ ซึ่งทั้งสองไอโซเลตมีขนาดประมาณ 4.36 กิโลเบส (ดังภาพที่ 4) และมีปริมาณพลาสมิดดีเอ็นเอ นาโนกรัมต่อไมโครลิตร



ภาพที่ 44 พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก P0805

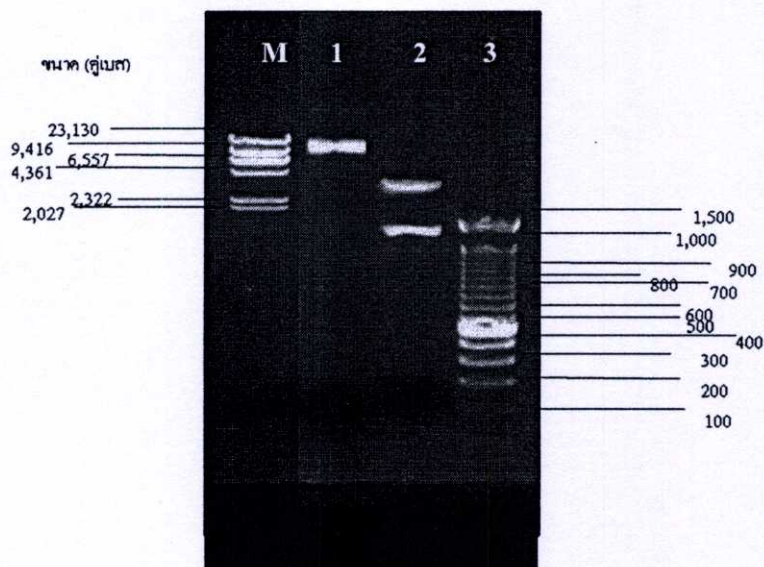
M คือ พลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก

เลขที่ 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอของไอโซเลต P0805

การตรวจสอบพลาสมิดดีเอ็นเอโดยการตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ

นำพลาสมิดดีเอ็นเอที่สกัดได้มาตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI* เพื่อทดสอบว่าดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกถูกถ่ายโอนเข้าสู่พลาสมิดจริง โดยเปรียบเทียบกับดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) และดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder ด้วยวิธีอะกาโรสเจลอิเล็กโทรโฟรีซิส พบว่าพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่ P0805 ปรากฏแถบพลาสมิดดีเอ็นเอไอโซเลตละ 2 แถบ โดยแถบที่ 1 มีขนาดประมาณ 3,800 คู่เบส ส่วนแถบที่ 2 และ 1,500 คู่เบส (ดังภาพที่ 45) จากผลการทดสอบการจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0805 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA และนำผลการวิเคราะห์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับลำดับ

นิวคลีโอไทด์ของสิ่งมีชีวิตอื่นที่ได้รายงานไว้ในธนาคารยีน พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลต P0805 มีความคล้ายคลึงกับสายพันธุ์ ร้อยละ 100 ทำให้ทราบได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลตที่ P0805 เป็น *Pediococcus pentosaceus* (ตารางที่ ง1)



ภาพที่ ง5 การตัดพลาสมิดดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก P0805 ด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
 M คือ ดีเอ็นเอมาตรฐานฟาจแลมบ์ดา (λ) ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *HindIII*
 1 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอของไอโซเลตที่ P0805
 2 คือ พลาสมิดดีเอ็นเอของไอโซเลตที่ P0805 ที่ตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *EcoRI*
 3 คือ ดีเอ็นเอมาตรฐาน 100 bp ladder

ตารางที่ ง1 ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลต P0805 เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rDNA ของสิ่งมีชีวิตอื่นในธนาคารยีน

สายพันธุ์ของแบคทีเรีย	ความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ของไอโซเลต P0805 (ร้อยละ)
<i>Pediococcus pentosaceus</i> ATCC 25745 (CP000422.1)	99
<i>Pediococcus pentosaceus</i> LM2632 (AY675245.1)	99
<i>Pediococcus pentosaceus</i> SL4 (AY 675243.1)	99
<i>Pediococcus pentosaceus</i> NGRI 0305 (AB362987.1)	99

ภาคผนวก จ

การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นกล้าเชื้อในการหมักแหนมปลา

1. การศึกษาผลของเกลือ กระเทียมที่มีต่อพีเอชและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลา

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาผลของความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมที่ระดับต่างๆกันต่อพีเอชและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลา

วิธีการทดลอง

ก) การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสำหรับการหมักแหนมปลา

ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละชนิดที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อการใช้เป็นกล้าเชื้อ ได้แก่ 1) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมชนิดที่ 1 คือ *Ent. faecium* 11S11 ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองข้างต้น 2) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมชนิดที่ 2 คือ *Ent. faecalis* 41S17 ซึ่งคัดเลือกได้จากการทดลองข้างต้น 3) แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการรีดิวส์ไนเตรทและไนไตรต์ คือ *Pediococcus pentosaceus* P0805 แยกได้จากเนื้อหมูสด (Treebavonkusol และคณะ. 2007) และแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก คือ *Lactococcus lactis* 131S3 แยกได้จากเนื้อปลาทู (นิระชา ศรีวงษ์. 2550) ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาเตรียมสารแขวนลอยเซลล์ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ 3.2.2 โดยให้ปรับความขุ่นของสารแขวนลอยเซลล์เท่ากับความขุ่นของ McFarland Standard เบอร์ 5 จะได้ความเข้มข้นของเซลล์เท่ากับ 10^8 CFUต่อมิลลิลิตร ซึ่งจะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับเติมลงในแหนมปลาในขั้นต่อไป

ข) กระบวนการผลิตแหนมปลา

ในการทดลองนี้ได้ทำการศึกษาผลของเกลือ กระเทียมต่อพีเอชและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลาเบื้องต้น โดยใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเดี่ยวทั้งหมด 4 ชนิด ดังกล่าวข้างต้นในการผลิตแหนมปลาซึ่งทำการเติมเกลือ (ร้อยละ 1.5, 2.0, 2.5 และ 3.0) และกระเทียม (ร้อยละ 2, 3, 4 และ 5) โดยเปรียบเทียบคุณภาพของแหนมปลาทั้งหมด 64 ทริตเมนต์ ในการทดลองได้

เตรียมแหวนปลาที่มีความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมระดับต่างๆกันทำให้ได้แหวนปลาที่มีความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่างกันทั้งหมด 16 ชุด ได้แก่ ชุดที่ 1) กระเทียมร้อยละ 2 และเกลือร้อยละ 1.5 ชุดที่ 2) กระเทียมร้อยละ 2 และเกลือร้อยละ 2.0 ชุดที่ 3) กระเทียมร้อยละ 2 และเกลือร้อยละ 2.5 ชุดที่ 4) กระเทียมร้อยละ 2 และเกลือร้อยละ 3.0 ชุดที่ 5) กระเทียมร้อยละ 3 และเกลือร้อยละ 1.5 ชุดที่ 6) กระเทียมร้อยละ 3 และเกลือร้อยละ 2.0 ชุดที่ 7) กระเทียมร้อยละ 3 และเกลือร้อยละ 2.5 ชุดที่ 8) กระเทียมร้อยละ 3 และเกลือร้อยละ 3.0 ชุดที่ 9) กระเทียมร้อยละ 4 และเกลือร้อยละ 1.5 ชุดที่ 10) กระเทียมร้อยละ 4 และเกลือร้อยละ 2.0 ชุดที่ 11) กระเทียมร้อยละ 4 และเกลือร้อยละ 2.5 ชุดที่ 12) กระเทียมร้อยละ 4 และเกลือร้อยละ 3.0 ชุดที่ 13) กระเทียมร้อยละ 5 และเกลือร้อยละ 1.5 ชุดที่ 14) กระเทียมร้อยละ 5 และเกลือร้อยละ 2.0 ชุดที่ 15) กระเทียมร้อยละ 5 และเกลือร้อยละ 2.5 และชุดที่ 16) กระเทียมร้อยละ 5 และเกลือร้อยละ 3.0 ในการผลิตได้ผสมเกลือและกระเทียมสำหรับการผลิตแหวนปลาแต่ละชุดเข้ากับเนื้อปลาช่อนบด (ถ้าส่วนผสมของแหวนปลาทั้งหมด 100 กรัม ปริมาณเนื้อปลาที่ใช้คือหักลบออกจากปริมาณกระเทียม เกลือและข้าวสุก) และข้าวสุกร้อยละ 12 (โดยน้ำหนักต่อน้ำหนัก) ให้เข้ากันและแบ่งส่วนผสมของแหวนปลาแต่ละชุดที่ผสมเข้ากันดีแล้วออกเป็น 4 ส่วน เท่า ๆ กันจากนั้นนำแต่ละส่วนมาเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกเดี่ยวแต่ละชนิดลงไปให้มีความเข้มข้นของเซลล์สุดท้ายเท่ากับ 10^6 เซลล์ต่อกรัม ผสมให้เข้ากันและนำมาบรรจุใส่ในถุงพลาสติก ถุงละ 10 กรัม มัดให้แน่น นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวัดพีเอชด้วยเครื่องวัดพีเอช Testo 205 และประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหวนปลาโดยการดมกลิ่น ดูสี สังเกตลักษณะปรากฏ และชิมแหวนปลาที่ผ่านการนึ่งจนสุก

ผลการทดลอง

ก) ค่าพีเอชและคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหวนปลาที่ความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมระดับต่าง ๆ

จากผลการทดลองศึกษาเกลือและกระเทียมที่ระดับความเข้มข้นต่างๆกัน ที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของแหวนปลาที่เติมกล้าเชื้อแต่ละชนิด พบว่าแหวนปลาที่เติมเกลือที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และกระเทียมที่ความเข้มข้นร้อยละ 2 มีค่าพีเอชลดลงอย่างรวดเร็วจนถึง 4.47-4.8 ในทุกกล้าเชื้อ (ดังแสดงในตารางที่ จ2) และจากการประเมินคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหวนปลาในแต่ละชุด (ตารางที่ จ3) พบว่า แหวนปลาที่เติมเกลือและกระเทียมที่ความเข้มข้นเดียวกันจาก

ที่กล่าวมาข้างต้น และแผนมปลาที่เดิมกระเทียมที่ความเข้มข้นร้อยละ 5 และเกลือที่ความเข้มข้น ร้อยละ 2.0, 2.5 และ 3.0 มีกลิ่นของแผนม รสชาติเค็มและเปรี้ยว มีลักษณะเนื้อสัมผัสยืดหยุ่น ซึ่ง น่าจะนำความเข้มข้นของกระเทียมและเกลือที่ระดับดังกล่าวไปทำการทดลองหมักแผนมปลาต่อไป ส่วนการหมักแผนมปลาที่ความเข้มข้นของกระเทียมร้อยละ 2, 3 และ 4 ร่วมกับเกลือที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 1.5, 2.0 และ 2.5 ไม่เหมาะสมต่อการผลิตแผนมซึ่งจากการทดลองหมักแผนมปลาที่ได้มีกลิ่นเน่าเสียและเนื้อละเอียด

ตารางที่ จ1 ผลของความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่อค่าพีเอชของแผนมปลา

แผนมปลาที่เดิมเกลือและกระเทียมที่ระดับความเข้มข้น ต่างกัน (ชุดที่)	ค่าพีเอช (หลังหมักเป็นเวลา 24 h)			
	กล้าเชื้อจุลินทรีย์			
	IIS11	4IS17	P0805	13IS3
1. กระเทียมร้อยละ 2 และ เกลือร้อยละ 1.5	6.05	5.81	5.77	6.12
2. กระเทียมร้อยละ 2 และ เกลือร้อยละ 2.0	5.66	5.80	5.76	5.89
3. กระเทียมร้อยละ 2 และ เกลือร้อยละ 2.5	5.66	6.17	5.68	5.70
4. กระเทียมร้อยละ 2 และ เกลือร้อยละ 3.0	5.64	5.35	5.49	5.47
5. กระเทียมร้อยละ 3 และ เกลือร้อยละ 1.5	5.32	5.51	5.33	5.35
6. กระเทียมร้อยละ 3 และ เกลือร้อยละ 2.0	5.66	5.99	5.97	5.81
7. กระเทียมร้อยละ 3 และ เกลือร้อยละ 2.5	5.57	5.65	5.90	5.72
8. กระเทียมร้อยละ 3 และ เกลือร้อยละ 3.0	6.08	5.96	5.86	6.24
9. กระเทียมร้อยละ 4 และ เกลือร้อยละ 1.5	5.29	5.88	5.82	5.75
10. กระเทียมร้อยละ 4 และ เกลือร้อยละ 2.0	5.90	5.75	5.76	5.88
11. กระเทียมร้อยละ 4 และ เกลือร้อยละ 2.5	5.59	5.82	5.71	5.89
12. กระเทียมร้อยละ 4 และ เกลือร้อยละ 3.0	5.31	5.64	5.39	5.55
13. กระเทียมร้อยละ 5 และ เกลือร้อยละ 1.5	4.85	4.91	4.95	5.24
14. กระเทียมร้อยละ 5 และ เกลือร้อยละ 2.0	4.67	4.80	4.74	4.47
15. กระเทียมร้อยละ 5 และ เกลือร้อยละ 2.5	4.84	6.03	5.51	4.88
16. กระเทียมร้อยละ 5 และ เกลือร้อยละ 3.0	4.89	5.29	5.12	5.62

ตารางที่ จ2 ผลของความเข้มข้นของเกลือและกระเทียมต่อคุณภาพทางประสาทสัมผัสของแหนมปลา

ชุดที่	ลักษณะทางประสาทสัมผัสของแหนมปลา			
	กล้าเชื้อจุลินทรีย์			
	11S11	4IS17	P0805	13IS3
1	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
2	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
3	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
4	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
5	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
6	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
7	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
8	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
9	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
10	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
11	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย	แหนมปลาน้ำเสีย
12	กลิ้นใช้ได้ เนื้อสัมผัสแข็ง รสชาติเหมือนแหนม	กลิ้นดี เนื้อสัมผัส แข็งและร่วน ไม่ร่อย	กลิ้นเหม็นเน่า	กลิ้นเหมือนแหนม รสชาติดี
13	มีกลิ้นคาวปลา เนื้อสัมผัส แข็ง รสชาติจืด ไม่ร่อย	กลิ้นคาวแรง เนื้อ ร่วน เค็มอม เปรี้ยว	กลิ้นหอมกระเทียมแต่ จืดเนื้อร่วนเหมือนเน่า	กลิ้นเน่าและจืด เนื้อสัมผัสแข็ง
14	กลิ้นใช้ได้ รสชาติไม่เปรี้ยว จืด เนื้อสัมผัสดี	กลิ้นไม่เหมือน แหนม มีกลิ้นคาว ปลา รสชาติไม่ ร่อย	กลิ้นพอใช้ได้แต่เนื้อ สัมผัสไม่เป็นเนื้อ เดียวกัน รสชาติพอใช้ได้	กลิ้นยังไม่เหมือน แหนมกลิ้นดีกว่า 4IS17 แต่รสชาติยัง ไม่ร่อย
15	กลิ้นแรง เนื้อแน่นและ มีความยืดหยุ่น	กลิ้นเหมือนหมู ยอ รสชาติเค็มไป นิด แต่ร่อย	กลิ้นเน่า เนื้อสัมผัสไม่ เป็นเนื้อเดียวกัน	เค็มมากแต่ไม่เปรี้ยว เนื้อสัมผัสไม่เป็น เนื้อเดียวกัน
16	รสชาติเค็มและเปรี้ยว มี กลิ้นกระเทียม เนื้อร่วน	เหมือนแหนมเน่า	กลิ้นดี รสชาติเค็มแต่ ไม่เปรี้ยว เนื้อแข็ง	กลิ้นเหมือนน้ำปลา เนื้อและ ๆ เค็ม

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์แหนมปลา

แบบทดสอบทางประสาทสัมผัส
ประเภทการทดสอบการให้อัตราความชอบ

ผลิตภัณฑ์ แหนมปลา

ชื่อผู้ทดสอบชิม.....วันที่.....ผู้ทดสอบชิมคนที่.....

คำแนะนำ : โปรดทำการทดสอบชิมผลิตภัณฑ์ตัวอย่างดังต่อไปนี้ และให้ระดับคะแนนความชอบ / ไม่ชอบต่อผลิตภัณฑ์ดังกล่าว คำนวณหลังจากแต่ละผลิตภัณฑ์ถูกทดสอบแล้ว

1 = ไม่ชอบมากที่สุด

2 = ไม่ชอบมาก

3 = ไม่ชอบปานกลาง

4 = ไม่ชอบเล็กน้อย

5 = บอกไม่ได้ว่าชอบหรือไม่ชอบ

6 = ชอบเล็กน้อย

7 = ชอบปานกลาง

8 = ชอบมาก

9 = ชอบมากที่สุด

คุณลักษณะ	รหัสตัวอย่าง						
สี (colour)							
กลิ่นรส (favour)							
ลักษณะเนื้อสัมผัส (texture)							
ความเปรี้ยว (sourness)							
ความเค็ม (saltiness)							
ความชอบโดยรวม (acceptance)							

ข้อเสนอแนะ.....

.....

.....

.....

ขอบคุณค่ะ

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ – นามสกุล	นางสาว จูติรัตน์ ใจฉลาด
วัน เดือน ปีเกิด	21 พฤศจิกายน 2525
สถานที่เกิด	จังหวัดปราจีนบุรี
ประวัติการศึกษา	
ระดับมัธยมศึกษาตอนต้น	สำเร็จการศึกษาจาก โรงเรียนมารีวิทยา
ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย	สำเร็จการศึกษาจาก โรงเรียนปราจีนราษฎรบำรุง ปีการศึกษา 2542
ระดับปริญญาตรี	เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาตรีเมื่อปีการศึกษา 2543 ที่ สถาบันเทคโนโลยีราชมงคลคณะเกษตรศาสตร์บางพระ จ. ชลบุรี ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ และสำเร็จการศึกษาเมื่อปีการศึกษา 2546
ระดับปริญญาโท	เข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา ประยุกต์ สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพตั้งแต่ปีการศึกษา 2548 จนถึงปี 2551