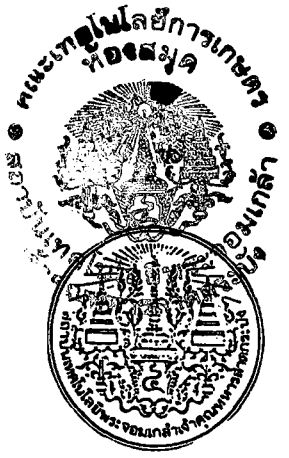


ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

(Preliminary Studies of Lactic Acid Bacteria from Fermented Food)

โดย

นางสาวนงนุช พงษ์เลาหพันธุ์

นางสาวรัตนา จรัสศุภวัฒน์

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

.....วริพัสย์ อารีกุล..... 28/3/38 อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(วริพัสย์ อารีกุล)

ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

.....

(ผศ.ดร.วราวุฒิ ครูส่ง)

หัวหน้าภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร

วันที่ ..... เดือน..... พ.ศ. .....

ACC. NO.....
Date Received 23 พ.ค. 2538
Call No.....

14609
9 ส.ค. 2541

ปก.
ย.13977
2537

14609

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียแลคติคในอาหารหมัก

(Preliminary Studies of Lactic Acid Bacteria from Fermented Food)

นางสาวนงนุช พงษ์เลาหพันธุ์
นางสาวรัตนา จรัสศุภวัฒน์

ปพ.
ฆ1391ก
2538

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....96740
วัน,เดือน,ปี.....- 4 JUN 2539

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาอุตสาหกรรม เกษตร คณะ เทคโนโลยีการ เกษตร
สถาบัน เทคโนโลยีพระจอม เกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ.2538

นงนุช พงษ์เลาหพันธุ์ และ รัตนา จรัสศุภวัฒน์. 2538. : การศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (Preliminary Studies of Lactic Acid Bacteria from Fermented Food). ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อาจารย์ที่ปรึกษา : อาจารย์วริพัสย์ อารีกุล, 59 หน้า.

แบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมักพื้นบ้าน ได้แก่ ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม และน้ำผักกาดดอง สามารถคัดเลือกได้จำนวน 32 สายพันธุ์ จัดเป็น Homofermentation มีรูปร่างเป็นแท่งยาว (bacilli) และรูปกลม (cocci) ในการศึกษาคุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิสม พบว่าแบคทีเรียแลคติคทุกสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลซูโครสได้ ขณะที่สายพันธุ์ L4.6 และ L4.7 ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตส นอกจากคุณสมบัติในการใช้น้ำตาลแล้ว แบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่ยังสามารถใช้ซิเตรทได้ ยกเว้นสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำผักกาดดองตัวอย่างที่ 2 ในส่วนของคุณสมบัติการย่อยสลายเคซีน พบว่าสายพันธุ์ C1.1 เท่านั้นที่มีคุณสมบัติดังกล่าว และเมื่อทำการตรวจสอบผลการหมักน้ำตาลกลูโคส พบว่าแบคทีเรียแลคติคสามารถสร้างกรดแลคติคในช่วง 0.40-1.73 เปอร์เซนต์ ทั้งนี้เกือบทุกสายพันธุ์สามารถสร้างไดอะเซททิลได้ แต่ไม่พบสายพันธุ์ใดที่สร้างกาซคาร์บอนไดออกไซด์ ส่วนการศึกษาผลการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลลิน กานามัยซิน เพนนิซิลลิน และเตตร้าซัยคลิน พบว่าแบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่จะไวต่อสารปฏิชีวนะที่ความเข้มข้น 20, 30, 30 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

นงนุช พงษ์เลาหพันธุ์

รัตนา จรัสศุภวัฒน์

ลายมือชื่อนักศึกษา

วริพัสย์ อารีกุล

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

28 มีนาคม 2538

วัน เดือน ปี

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษเล่มนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี ผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์วริพัสย์ อารีกุล อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ประภาพร ขอไพบูลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และอาจารย์วิไล สนธิเพิ่มพูน กรรมการสอบ ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนะนำ และแก้ไขปัญหาพิเศษให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น และขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้ และให้คำแนะนำอันเป็นประโยชน์ต่อการศึกษาในครั้งนี้

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์วริพัสย์ อารีกุล เป็นอย่างสูงอีกครั้ง ที่คอยดูแล เป็นห่วง ให้ความรู้ และกำลังใจในขณะทำการศึกษาปัญหาพิเศษด้วยดีเสมอมา และขอขอบคุณ ผศ.ดร. วิเชียร สีลาวัชรมาศ แห่งภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่กรุณามอบเครื่องมือที่ใช้ในงานวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ได้เอื้อเฟื้อให้ใช้เครื่อง Spectrophotometer และขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ และห้องธุรการ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร ที่ได้ให้ความสะดวกแก่ผู้จัดทำด้วยดีเสมอมา

ขอขอบคุณ เพื่อน พี่ และน้อง ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรทุกคน ที่คอยช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจให้แก่ผู้จัดทำด้วยดีตลอดมา

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และขอขอบคุณ พี่ และน้องทุกคน ที่คอยให้การช่วยเหลือ สนับสนุน และให้กำลังใจจนประสบความสำเร็จในครั้งนี้

นงนุช พงษ์เลาหพันธุ์
รัตนา จรัสศุภวัฒน์
มีนาคม 2538

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อ ..... ค

กิตติกรรมประกาศ ..... ง

สารบัญตาราง ..... ฉ

สารบัญภาพ ..... ช

บทที่

1. บทนำ 1

2. วารสารปริทัศน์

2.1 เชื้อแบคทีเรียแลคติค 3

2.2 คุณสมบัติทางกระบวนการเมตาบอลิสม 5

2.3 การต้านทานยาปฏิชีวนะ 15

2.4 ประโยชน์ของการใช้แบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 18

3. อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์ 22

3.2 สารเคมี 22

3.3 วิธีการทดลอง 24

4. ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง 27

5. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง 47

5.2 ข้อเสนอแนะ 49

เอกสารอ้างอิง 50

ภาคผนวก 54

ประวัติผู้เขียน 59

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอะมิโนที่ group N streptococci และ *Streptococcus thermophilus* ต้องการใช้ในการเจริญเติบโต	12
2.2	แสดงผลของการใช้รังสีแกมม่า (10,000 rad) และออกซีเตตร้าซัยคลิน (10 ppm) ต่อแบคทีเรียในเนื้อสดที่แช่เย็นที่ 2 องศาเซลเซียส	16
2.3	แสดงขั้นตอนการหมักและการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในผักดอง	20
4.1	แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมัก	28
4.2	แสดงผลการตรวจสอบการใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลแลคโตส	30
4.3	แสดงค่าการดูดกลืนแสง พีเอช และปริมาณกรดแลคติค	33
4.4	แสดงผลการตรวจสอบการสร้างกาซ	35
4.5	แสดงผลการตรวจสอบการย่อยเคซีน	37
4.6	แสดงผลการตรวจสอบการใช้ซิเตรท และการสร้างไดอะเซททิลโดยวิธี Voges-Proskauer test	40
4.7	แสดงผลการตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน	43
4.8	แสดงผลการตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน	44
4.9	แสดงผลการตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน	45
4.10	แสดงผลการตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน	46

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	แสดงการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียแลคติค	7
2.2	แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมน้ำตาลกาแลคโตสของแบคทีเรียแลคติค (A) วิถี tagatose-6-phosphate (B) วิถี Leloir	8
2.3	แสดงตำแหน่งของเอนไซม์โปรตีเนสและเปปติเดส ภายในเซลล์ของแบคทีเรียแลคติค	12
2.4	แสดงวิถีการเมตาบอลิสมไพรูเวทของแบคทีเรียแลคติค	14
2.5	แสดงความสามารถของออกซีเตตร้าซัยคลินที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียในเนื้อบดที่เก็บที่อุณหภูมิ 2, 10 และ 30 องศาเซลเซียส	17

บทที่ 1

บทนำ

แบคทีเรียแลคติคเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นที่ยอมรับในอุตสาหกรรมอาหารหมัก เนื่องจากเป็นเชื้อที่ไม่ก่อให้เกิดโรคต่อมนุษย์และสัตว์ และที่สำคัญคือแบคทีเรียแลคติคมีกระบวนการเมตาบอลิสมในการหมักอาหาร เกิดการสร้างกรดอินทรีย์จำนวนมากอย่างรวดเร็วเป็นผลให้พีเอชของอาหารลดลง กระบวนการหมักดังกล่าวจะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อาหารชนิดใหม่ที่มีกลิ่น รส และเนื้อสัมผัส ที่แตกต่างจากเดิม อีกทั้งยังช่วยป้องกันการเสื่อมเสียของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์หรือเอนไซม์ ทั้งนี้เพราะค่าความเป็นกรดของอาหารที่เพิ่มขึ้นและเมตาบอไลท์อื่น ๆ จากกระบวนการการหมักโดยแบคทีเรียแลคติค เช่น กาซคาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะเซททิล และแบคทีรีโอซิน มีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย ผลการยับยั้งนี้จะเกิดขึ้นกับจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคด้วย ผลิตภัณฑ์อาหารที่ได้จากการหมักโดยแบคทีเรียแลคติคจึงมีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนานขึ้น มีความปลอดภัยในการบริโภค

ปัจจุบันการผลิตอาหารหมักในประเทศส่วนใหญ่จะใช้วิธีการตามธรรมชาติในการหมัก กล่าวคือจะปรับสภาพแวดล้อมต่าง ๆ ให้เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียแลคติค ทำให้แบคทีเรียที่ปะปนมากับวัตถุดิบเจริญเติบโตสร้างลักษณะที่ต้องการในผลิตภัณฑ์ ซึ่งวิธีการนี้ให้ผลการหมักที่ไม่แน่นอน และคุณภาพของผลิตภัณฑ์ไม่สม่ำเสมอ จึงได้มีการพัฒนากรรมวิธีการหมักโดยการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติคขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหมัก ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีสม่ำเสมอ และเกิดการหมักขึ้นอย่างรวดเร็ว การใช้กล้าเชื้อจะทำให้สามารถคาดคะเนการหมักได้อย่างแน่นอน ช่วยลดการสูญเสียประโยชน์ทางเศรษฐศาสตร์ได้ แต่อย่างไรก็ตามคุณภาพของผลิตภัณฑ์ และประสิทธิภาพของการหมักจะดีหรือไม่นั้นขึ้นกับสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติคที่เลือกใช้เป็นกล้าเชื้อ เพราะแต่ละสายพันธุ์มีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ดังนั้นจึงต้องมีการคัดเลือกสายพันธุ์ของกล้าเชื้อให้เหมาะสม ซึ่งปัจจัยสำคัญในการพิจารณาคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติคเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารหมักคือคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียแลคติค ได้แก่ คุณสมบัติที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิสม ลักษณะการหมักน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว การสร้างกรดอินทรีย์ การสร้างเอนไซม์ย่อยสลายโปรตีน การสร้างกลิ่นรส เป็นต้น

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการจำแนกแบคทีเรียแลคติคออกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก
2. เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางกระบวนการเมตาบอลิสม และการต้านทานยาปฏิชีวนะ

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 เชื้อแบคทีเรียแลคติค

แบคทีเรียแลคติคจัดเป็นแบคทีเรียกลุ่มหนึ่งที่มีความสำคัญอย่างยิ่งต่ออุตสาหกรรมอาหารหมัก เนื่องจากมีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติค แบคทีเรียแลคติคเป็นแบคทีเรียแกรมบวก โดยทั่วไปจะไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ไม่สร้างสปอร์ และให้ผลลบต่อปฏิกิริยาของเอนไซม์คะตะเลส คุณลักษณะที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของแบคทีเรียแลคติคคือทนต่อกรด และไม่ต้องการอากาศในการเจริญเติบโต แต่อย่างไรก็ตามแบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถเจริญเติบโตในสภาวะที่มีออกซิเจนได้ดีเท่า ๆ กับในสภาวะไร้อากาศ ด้วยเหตุนี้แบคทีเรียแลคติคจึงจัดเป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศในการเจริญและทนต่อกาซออกซิเจน (aerotolerant anaerobes) (Brock และคณะ, 1984; Ingram, 1975)

แบคทีเรียแลคติคจัดอยู่ในตระกูล Lactobacillaceae ซึ่งแบ่งได้เป็น 4 สกุล คือ Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus และ Lactobacillus (Frazier และ Westhoff, 1988) สามารถจำแนกแบคทีเรียแลคติคตามลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่มีรูปร่างกลม (cocci) และกลุ่มที่มีรูปร่างเป็นแท่ง (rods) หรืออาจจำแนกตามลักษณะการหมักได้เป็นกลุ่ม Homofermentation ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลให้ผลิตภัณฑ์โดยส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติคมากกว่า 85 เปอร์เซนต์ และกลุ่ม Heterofermentation ซึ่งสามารถหมักน้ำตาลให้ผลิตภัณฑ์อื่นนอกเหนือจากกรดแลคติคด้วย ได้แก่ กรดอะซิติค กาซคาร์บอนไดออกไซด์ และเอธานอล (Brock และคณะ, 1984; Dunn และ Prescott, 1959; Ingram, 1975)

1) Streptococci

แบคทีเรียในสกุลนี้จัดอยู่ในกลุ่ม Homofermentation มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเรียงต่อกันเป็นสาย เจริญได้ทั้งในสภาวะที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobes) Streptococci บางชนิดก่อให้เกิดโทษแก่มนุษย์และสัตว์ (pathogenic bacteria)

แบคทีเรียในสกุล Streptococcus ที่มีบทบาทสำคัญในการผลิต buttermilk เนยแข็ง เนยบางชนิด หญ้าหมัก (silage) และผลิตภัณฑ์อาหารหมักอื่น ๆ ได้แก่ *S. thermophilus*, *S. diacetilactis*, *S. lactis* และ *S. cremoris* เป็นต้น (Brock และคณะ, 1984; Frazier และ Westhoff, 1988; George, 1983)

2) Leuconostoc

แบคทีเรียในสกุลนี้มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเรียงต่อกันเป็นสาย มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกับ Streptococci แต่จัดเป็น Heterofermentation สามารถทนต่อความเข้มข้นของเกลือและน้ำตาล เช่น *L. mesenteroides* สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของน้ำตาล 55-60 เปอร์เซนต์ แบคทีเรียชนิดนี้สามารถผลิตสารที่ให้กลิ่นรส ซึ่งประกอบไปด้วย ไดอะเซททิลและอะซิโตอิน และทำให้เกิดปริมาณกรดในผลิตภัณฑ์เพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอื่น ๆ ได้รวดเร็วกว่าแบคทีเรียแลคติคหรือแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องชนิดอื่น ๆ แบคทีเรียในจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโทษ (nonpathogenic bacteria) พบอยู่ตามพื้นผิวของพืช

เชื้อ *Leuconostoc spp.* เช่น *L. mesenteroides* มีความสำคัญต่อผลิตภัณฑ์ผักกะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) และแตงกวาดอง (pickle) นอกจากนี้ *L. dextranicum* และ *L. cremoris* ยังร่วมกับแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ในการสร้างกลิ่นรสที่ดีในผลิตภัณฑ์นมหมักอีกด้วย (Brock และคณะ, 1984; Frazier และ Westhoff, 1988; George, 1983)

3) Pediococci

แบคทีเรียในสกุลนี้จัดเป็น Homofermentation มีรูปร่างกลม จัดเรียงตัวเป็นกลุ่ม ๆ ละ 4 (tetrads) โดยแบ่งเป็น 2 ระนาบ บางครั้งอาจพบเซลล์เดี่ยว เซลล์เรียงกันเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายสั้น ๆ จัดเป็นจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนปริมาณเล็กน้อยในการเจริญเติบโต (microaerophilic bacteria) สามารถเจริญที่ช่วงอุณหภูมิประมาณ 7-45 องศาเซลเซียส แต่เจริญได้ดีที่สุดที่ 25-32 องศาเซลเซียส นอกจากนี้ยังเจริญได้ในน้ำเกลือที่เข้มข้นไม่เกิน 5.5 เปอร์เซนต์ แต่เจริญได้ไม่ดีหรือไม่สามารถเจริญได้ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 6-10 เปอร์เซนต์

Pediococcus มักพบในอาหารหมักประเภทผักผลไม้ หรือในผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ เช่น *P. cerevisiae* เป็นกล้าเชื้อในการผลิตไส้กรอกเปรี้ยว (Frazier และ Westhoff, 1988)

4) Lactobacilli

แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีรูปร่างเป็นแท่งยาว เรียงต่อกันเป็นสายเกือบทุกสายพันธุ์ ต้องการออกซิเจนในการเจริญเติบโตในปริมาณที่น้อยมาก (microaerophilic bacteria) หรือบางชนิดไม่ต้องการออกซิเจนเลย (strict anaerobes) เนื่องจากแบคทีเรียในสกุล Lacto bacillus มีองค์ประกอบของดีเอ็นเอแตกต่างกันมาก แต่ละสายพันธุ์จึงมีคุณสมบัติแตกต่างกัน บางชนิดจัดเป็น Homofermentation และบางชนิดจัดเป็น Heterofermentation Lacto bacilli สามารถทนต่อสภาวะที่เป็นกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ สามารถเจริญได้ดีที่พีเอช ประมาณ 5 ดังนั้นโดยทั่วไปในการหมักแลคติคตามธรรมชาติ Lactobacilli จึงสามารถดำเนินปฏิกิริยาหมักต่อไปเมื่อพีเอชต่ำลงเกินกว่าที่แบคทีเรียแลคติคชนิดอื่นจะเจริญได้ แบคทีเรียในจีนัสนี้ไม่ก่อให้เกิดโทษ พบอยู่ตามพื้นผิวของพืช ปุ๋ยจากมูลสัตว์ และน้ำนม

Lactobacilli ที่มีความสำคัญมากในอุตสาหกรรมอาหารหมักได้แก่ *L. bulgaricus*, *L. acidophilus* และ *L. brevis* เป็นต้น (Brock และคณะ, 1984)

2.2 คุณสมบัติทางกระบวนการเมตาบอลิสม

2.2.1 การใช้น้ำตาล

ความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตเพื่อสร้างกรดแลคติค ถือเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติค โดยเฉพาะขบวนการหมักน้ำตาล

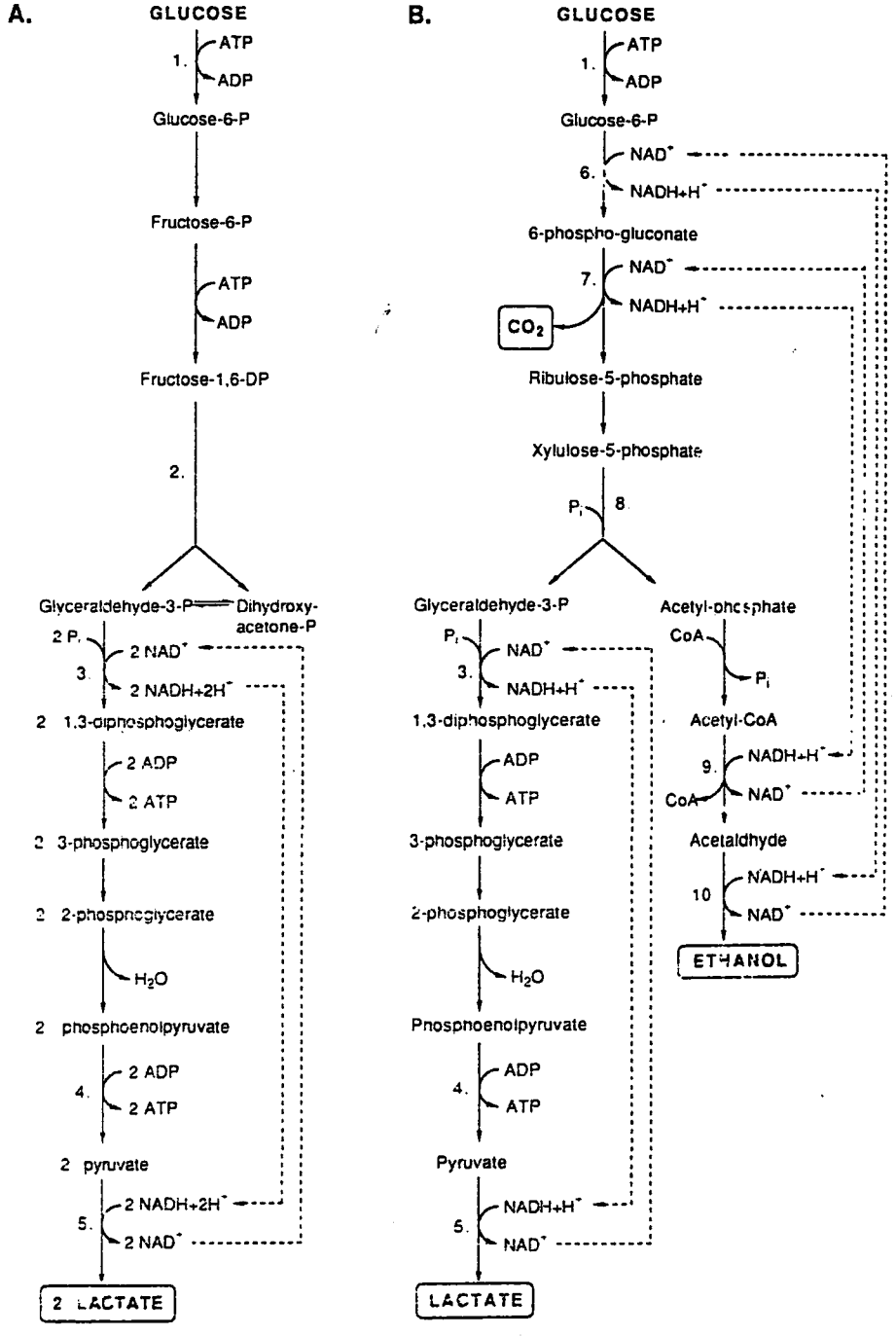
2.2.1.1 การใช้น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว

แบคทีเรียแลคติคมีวิถีการหมักน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม เช่น น้ำตาลกลูโคส แบ่งเป็นหลัก ๆ ได้ 2 วิถี (Axelsson, 1993) คือ โมเลกุลน้ำตาลกลูโคสอิสระจะถูกนำเข้าสู่เซลล์ และเกิดปฏิกิริยา phosphorylation โดยเอนไซม์ glucokinase หรือ phosphoenolpyruvate-sugar phosphotransferase system (PTS) แล้วเข้าสู่การหมักโดยกระบวนการไกลโคไลซิส หรือ Embden-Meyerhof-Parnas (EMP pathway) เพื่อเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็น fructose-1,6-diphosphate ซึ่งจะแตกออกเป็น dihydroxy acetonephosphate (DHAP) และ glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) โดยเอนไซม์ fructose-1,6-diphosphate aldolase หลังจากนั้น GAP และ DHAP ที่เปลี่ยนรูปไปเป็น GAP จะเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวท ซึ่งการเปลี่ยนแปลงนี้เป็นไปตามลำดับขั้นของกระบวนการ

เมตาบอลิสมภายใต้สภาวะปกติทั่ว ๆ ไป คือมีปริมาณน้ำตาลมากเกินพอ และได้รับออกซิเจนในปริมาณจำกัด ไพรูเวทจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นกรดแลคติคโดยเอนไซม์ lactate dehydrogenase ที่อาศัยพลังงานจาก NAD^+ ซึ่งการเมตาบอลิสมในลักษณะนี้คือการหมักแบบ Homofermentative (ภาพที่ 2.1)

วิถีการหมักที่สำคัญอีกวิถีหนึ่งมีชื่อเรียกหลายอย่าง เช่น pentosephosphate pathway, pentose phosphoketolase pathway และ 6-phosphogluconate pathway โดยที่วิถีการหมักเริ่มต้นจากการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็น 6-phosphogluconate ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์แบคทีเรียแลคติคไม่มีเอนไซม์อัลโดเลสในการย่อย hexose diphosphate ให้เป็น triose phosphate จึงออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate ไปเป็น 6-phospho gluconate แทน (Brock และคณะ,1994) ต่อมาจะเกิดปฏิกิริยา decarboxylation ได้ pentose-5-phosphate ซึ่งจะแตกออกเป็น GAP และ acetyl phosphate โดยเอนไซม์ phosphoketolase GAP จะถูกเมตาบอลิสมในวิถีเดียวกันกับกระบวนการไกลโคไลซิส ให้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติค ส่วน acetyl phosphate จะถูกรีดิวซ์เป็นเอธานอล โดยเปลี่ยนรูปไปเป็น acetyl CoA และอะเซททาดีไฮด์ การเมตาบอลิสมในลักษณะนี้จะทำให้เกิดเมตาบอไลท์อื่น ๆ เช่น เอธานอล กาซคาร์บอนไดออกไซด์ จึงจัดเป็น Heterofermentation

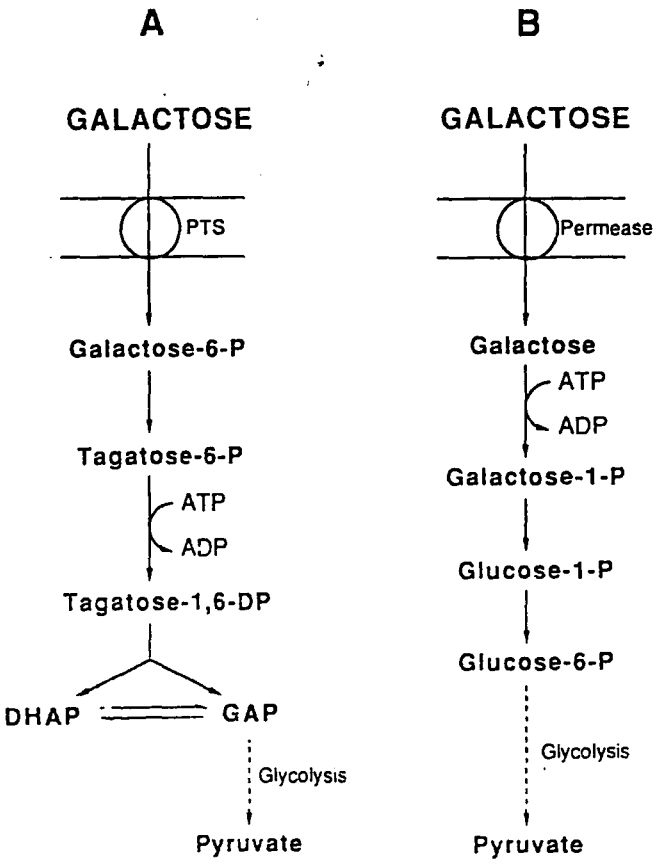
นอกจากการหมักน้ำตาลกลูโคสแล้ว แบคทีเรียแลคติคยังสามารถหมักน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมอื่น ๆ เช่น แมนโนส กาแลคโตส และฟรุคโตสได้เช่นกัน น้ำตาลเหล่านี้จะเข้าสู่วิถีการหมักของ glucose-6-phosphate หรือ fructose-6-phosphate ภายหลังจากผ่านการ isomerization และ/หรือ phosphorylation แล้ว ยกเว้นแต่น้ำตาลกาแลคโตสที่แบคทีเรียแลคติคจะใช้ระบบเอนไซม์ PTS โดยน้ำตาล galactose-6-phosphate ที่สร้างขึ้นจากระบบดังกล่าวจะถูกเมตาบอลิสมด้วยวิถี tagatose-6-phosphate (Bissett และ Anderson, 1974) ซึ่งน้ำตาล tagatose เป็น stereoisomer ของน้ำตาลฟรุคโตส วิถี tagatose จะเกิดขึ้นพร้อม ๆ กับกระบวนการไกลโคไลซิสในขั้นของ GAP นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติคบางสายพันธุ์ยังสามารถนำน้ำตาลกาแลคโตส โดยผ่านเอนไซม์ permease แล้วเปลี่ยนไปเป็น glucose-6-phosphate ด้วยวิถี Loloir ซึ่งจะให้ไพรูเวทได้ (ภาพที่ 2.2) (Thomas และคณะ, 1980; Kandler, 1983; Konings และคณะ, 1989; Fox และคณะ,1990)



ภาพที่ 2.1 แสดงการหมักน้ำตาลกลูโคสของแบคทีเรียแลคติค

ที่มา : Brock และคณะ (1984)

(A) homolactic fermentation (glycolysis, Embden-Meyerhof pathway); (B) heterolactic fermentation (6-phosphogluconate/phosphoketolase pathway). Selected enzymes are numbered: 1. glucokinase; 2. fructose-1,6-diphosphate aldolase; 3. glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; 4. pyruvate kinase; 5. lactate dehydrogenase; 6. glucose-6-phosphate dehydrogenase; 7. 6-phosphogluconate dehydrogenase; 8. phosphoketolase; 9. acetaldehyde dehydrogenase; 10. alcohol dehydrogenase.



ภาพที่ 2.2 แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมน้ำตาลกาแลคโตสของแบคทีเรียแลคติค (A) วิถี tagatose-6-phosphate (B) วิถี Leloir

ที่มา : Axelsson (1993)

2.1.1.2 การใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่

น้ำตาลโมเลกุลคู่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้ทั้งในรูปของน้ำตาลโมเลกุลอิสระหรือน้ำตาลฟอสเฟต ซึ่งในกรณีแรก น้ำตาลไดแซคคาไรด์จะถูกย่อยโดยเอนไซม์ไฮโดรเลสที่จำเพาะให้เป็นน้ำตาลโมโนแซคคาไรด์ซึ่งจะเข้าสู่วิถีการหมักดังได้กล่าวมาแล้วในข้อ 2.1.1.1 ส่วนในกรณีที่สองเกิดขึ้นเมื่อมีระบบเอนไซม์ PTS เข้ามาเกี่ยวข้อง กล่าวคือ เอนไซม์ phospho hydrolase ที่จำเพาะจะทำให้น้ำตาลฟอสเฟตโมเลกุลคู่แตกออกเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว และน้ำตาลฟอสเฟตโมเลกุลเดี่ยว (Axelsson, 1993)

แบคทีเรียแลคติคสามารถนำน้ำตาลแลคโตสโดยใช้เอนไซม์ permease เป็นตัวนำเข้าสู่เซลล์ เอนไซม์ β-galactosidase จะย่อยให้เกิดน้ำตาลกลูโคสและกาแลคโตส (Premi และคณะ, 1972; Bhowmik และ Marth, 1990; Fox และคณะ,1990) ซึ่งน้ำตาลทั้ง 2 ชนิดนี้จะเข้าสู่วิถีหลักต่อไป นอกจากเอนไซม์ β-galactosidase แบคทีเรียแลคติคยังใช้เอนไซม์ phospho-β-D-galactosidase ในการย่อยน้ำตาลแลคโตสเข้าสู่ไซโตพลาซึมในรูปของ lactose phosphate ไปเป็นกลูโคส และ galactose-6-phosphate จากนั้นน้ำตาลกลูโคสจะถูก phosphorylation ด้วยเอนไซม์ glucokinase แล้วจึงถูกเมตาบอลิสมผ่านกระบวนการไกลโคไลซิส ในขณะที่ galactose-6-phosphate จะถูกเมตาบอลิสมผ่านวิถี tagatose-6-phosphate (Axelsson, 1993)

การหมักน้ำตาลซูโครสของแบคทีเรียแลคติค อาศัยเอนไซม์ซูโครสไฮโดรเลสย่อยให้เป็นกลูโคสและฟรุคโตส ก่อนจะเข้าสู่วิถีการหมักน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว แต่ในแบคทีเรียแลคติคบางสายพันธุ์จะนำซูโครสเข้าสู่เซลล์ด้วยระบบเอนไซม์ PTS และเอนไซม์ sucrose-6-phosphate hydrolase ที่จำเพาะในการเปลี่ยน sucrose-6-phosphate เป็น glucose-6-phosphate และฟรุคโตส (Thompson และ Chassy, 1981)

2.2.2 การสร้างกรดอินทรีย์

กรดแลคติคเป็นกรดอินทรีย์ส่วนใหญ่ที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นจากกระบวนการหมักน้ำตาล โดยมีไพรูเวทเป็น intermediate ซึ่งนอกจากไพรูเวทจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นกรดแลคติคภายใต้สภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมแล้ว แบคทีเรียแลคติคชนิด Heterofermentation ยังสามารถใช้ไพรูเวทไปในวิถีทางอื่น ๆ ทำให้เกิดเมตาบอไลท์ที่แตกต่างออกไปจากการหมักแบบ Homofermentation ภายใต้สภาวะปกติ ทั้งนี้แบคทีเรียแลคติคต่างสายพันธุ์จะใช้วิถีที่แตกต่างกัน

หรือไม่ขึ้นกับสภาวะการเจริญเติบโต และเอนไซม์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้แบคทีเรียแลคติคสามารถสร้างกรดอินทรีย์ชนิดอื่น เช่น กรดอะซิติค และกรดฟอร์มิก (Kandler, 1983)

กรดอินทรีย์ที่เชื้อแบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นจะมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทั้งนี้เนื่องจากพีเอชมีผลต่อการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ที่พีเอชต่ำเยื่อหุ้มเซลล์จะอิ่มตัวอ้วยอิออนของไฮโดรเจน ทำให้แอนไอออนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตซึมผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ยาก ดังนั้นการเจริญและกิจกรรมต่าง ๆ ภายในเซลล์จึงถูกยับยั้ง นอกจากนี้โมเลกุลของกรดที่อยู่ในสภาพที่ไม่แตกตัว (undissolved molecules) สามารถซึมผ่านผนังเซลล์ของจุลินทรีย์และแตกตัวภายในเซลล์ ทำให้พีเอชภายในเซลล์ลดต่ำลง มีผลในการรบกวนกระบวนการเมตาบอลิสมที่จำเป็นต่อการอยู่รอดของเซลล์ (วริพัสย์, 2536)

2.2.3 การสร้างกาซคาร์บอนไดออกไซด์

แบคทีเรียแลคติคในกลุ่ม Heterofermentation สามารถสร้างกาซคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการ pentose phosphate pathway ได้ โดยจะเกิดขึ้นในระหว่างการ decarboxylation 6-phosphogluconate ไปเป็น pentose-5-phosphate (Axelsson, 1993; Brock และคณะ, 1984) การสร้างกาซนี้จะเกิดขึ้นมากในระหว่างการหมักผลิตภัณฑ์ประเภทผักผลไม้ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการหายใจภายในของเซลล์พืช รวมกับกิจกรรมจากจุลินทรีย์บางสายพันธุ์ กาซคาร์บอนไดออกไซด์จะสามารถยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ได้ เช่น เชื้อราที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียในผักและผลไม้ ทั้งนี้ประสิทธิภาพของการยับยั้งจะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของกาซคาร์บอนไดออกไซด์ และสายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์

กลไกของการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์โดยกาซคาร์บอนไดออกไซด์นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่สันนิษฐานว่าอาจเป็นไปได้ 2 กรณี คือ การยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการ decarboxylation และการสะสมของกาซคาร์บอนไดออกไซด์บริเวณผนังเมมเบรนในส่วนของ lipid bilayer ซึ่งจะทำลายคุณสมบัติการเข้าออกของสารบริเวณผนังเซลล์ (วริพัสย์, 2535)

2.2.4 การสร้างเอนไซม์ที่ย่อยสลายโปรตีน

คุณสมบัติที่เป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรมอาหารหมักของแบคทีเรียแลคติคคือเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzyme) ปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียแลคติคในกระบวนการหมัก (curing) หรือการบ่ม (maturing) จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางกายภาพและกลิ่นรสของอาหาร

กรดอะมิโนเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแลคติค แต่โดยปกติปริมาณกรดอะมิโนที่จำเป็นสำหรับแบคทีเรียในการเจริญเติบโตนั้นไม่เพียงพอต่อความต้องการของแบคทีเรียแลคติค ตัวอย่างเช่น สิวซีน และอาร์จินีนในน้ำนมมีปริมาณเพียง 3 และ 4 เปอร์เซนต์ ของกรดอะมิโนปริมาณน้อยที่สุดที่ *Streptococcus lactis* ต้องการเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (ตารางที่ 2.1) ดังนั้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เอนไซม์ดังกล่าวจะเป็นตัวกลางในการเพิ่มปริมาณกรดอะมิโน โดยการย่อยสลายโปรตีนในอาหาร เพื่อก่อให้เกิดการเจริญเติบโตอย่างสูงสุดของแบคทีเรียแลคติค (Law และ Kolstad, 1983)

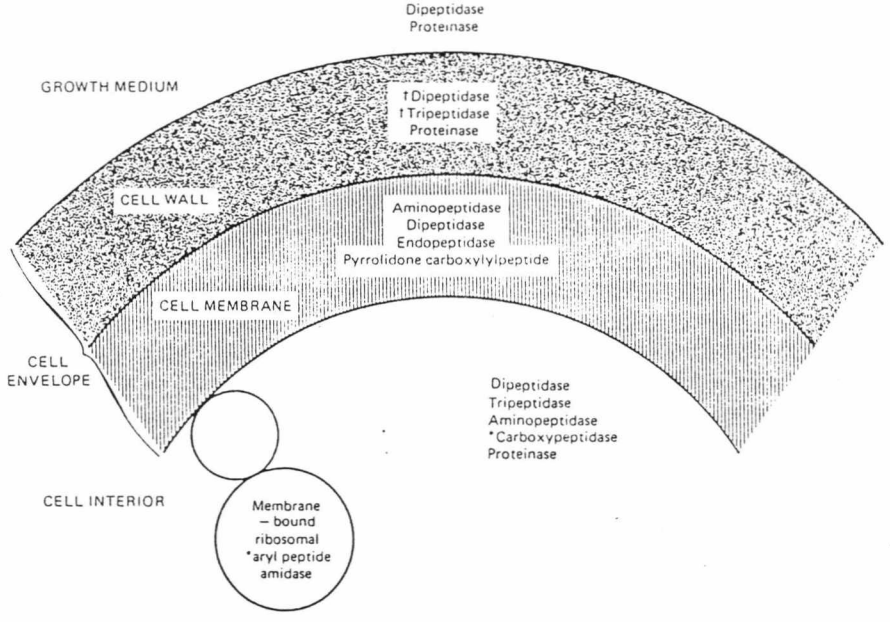
เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายโปรตีนของแบคทีเรียแลคติคมีความซับซ้อนและมีความแตกต่างระหว่างเอนไซม์โปรตีเนสและเปปติเดส รวมทั้งการกระจายตัวของเอนไซม์เหล่านี้ภายในเซลล์ด้วย (ภาพที่ 2.3) ความแตกต่างระหว่างเอนไซม์โปรตีเนสและเปปติเดสนั้นขึ้นกับความสามารถในการย่อยสลายโมเลกุลโปรตีนหรือเปปไทด์ ซึ่งเอนไซม์โปรตีเนสจะใช้ซับสเตรทเป็นโปรตีน ในขณะที่เอนไซม์เปปติเดสจะใช้ซับสเตรทเป็นเปปไทด์หรืออนุพันธุ์ของเปปไทด์ ทั้งนี้ความแตกต่างของตำแหน่งที่อยู่ภายในเซลล์จะเป็นตัวกำหนดซับสเตรทของเอนไซม์ทั้ง 2 ชนิด เอนไซม์โปรตีเนสซึ่งอยู่ที่ผนังเซลล์จะทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ให้เป็นเปปไทด์ที่มีโมเลกุลขนาดเล็กเพียงพอที่จะแพร่ผ่านเข้าสู่ภายในเซลล์ ให้เอนไซม์เปปติเดสที่อยู่ภายในหรือบริเวณผิวของเซลล์เมมเบรนย่อยต่อจนได้กรดอะมิโน (Thomas และ Mills, 1981)

ตารางที่ 2.1 แสดงความเข้มข้นต่ำสุดของกรดอะมิโนที่ group N streptococci และ *Streptococcus thermophilus* ต้องการใช้ในการเจริญเติบโต

	Concentration required in medium for maximum growth (μg/ml)				Concentration of free amino acids in milk
	S. lactis	*S. lactis* subsp. *diacetylactis*	*S. cremoris*	*S. thermophilus*	
Glu	77	87	70	150	35.9
Leu	41	37	32	n.e.	1.2
Ile	33	30	32	n.e.	0.8
Val	27	30	41	n.e.	2.6
Arg	37	36	39	n.e.	1.6
Cys	s[1]	s	27	80	n.d
Pro	n.e.	n.e.	38	n.e.	8.8
His	23	24	14	60	2.8
Phe	21	n.e.	6	n.e.	n.e.
Met	22	21	11	n.e.	n.d.

[1] n.d. = not detected; n.e. = not estimated; s = stimulatory.

ที่มา : Law และ Kolstad (1983)



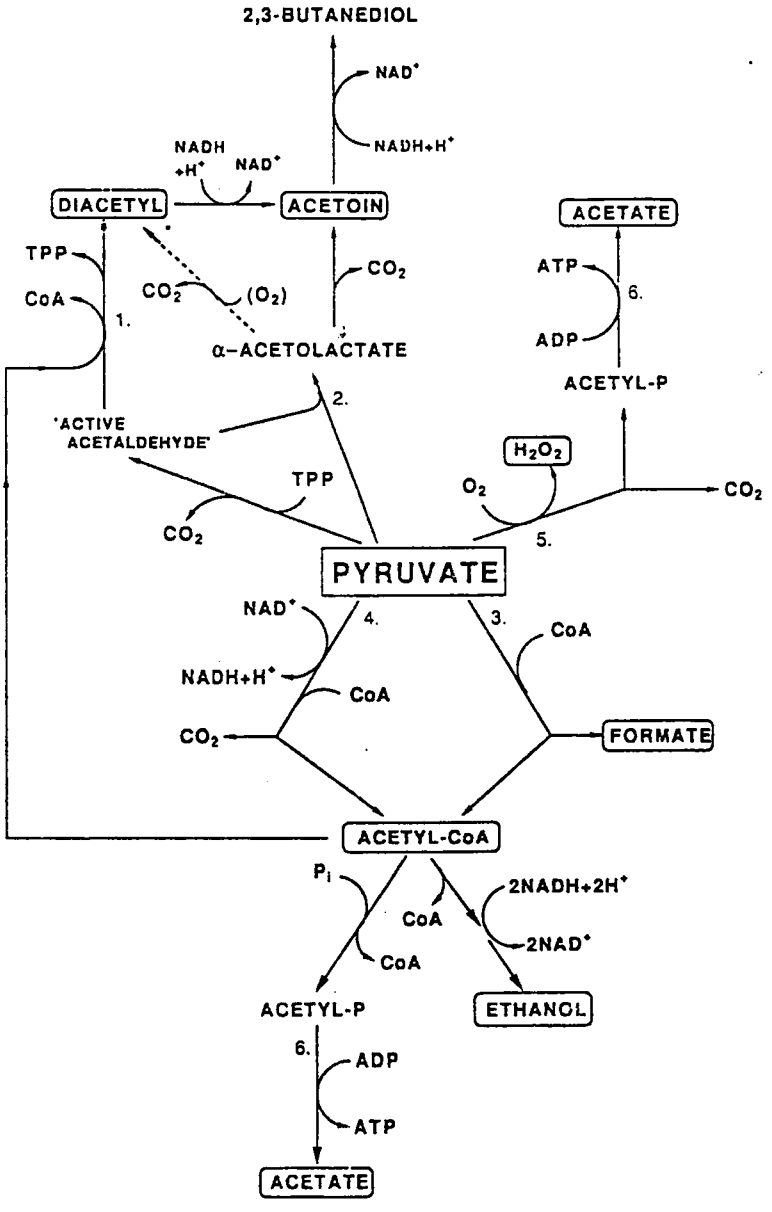
ภาพที่ 2.3 แสดงตำแหน่งของเอนไซม์โปรตีเนสและเปปติเดสภายในเซลล์ของแบคทีเรียแลคติค

ที่มา : Law และ Kolstad (1983)

2.2.5 การสร้างกลิ่นรส

กระบวนการที่ทำให้เกิดกลิ่นรสหอม (organoleptic compound) ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักเกิดจากแบคทีเรียแลคติคที่สามารถสร้างไพรูเวทภายในเซลล์ ซึ่งแบคทีเรียแลคติคอาจเก็บไพรูเวทที่เกิดขึ้นจากขบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตไว้ และใช้สารประกอบอื่น ๆ เป็นตัวรับอิเลคตรอนแทน หรืออาจสร้างไพรูเวทจากสารอาหารอื่นนอกจากคาร์โบไฮเดรต โดยทั่วไปแบคทีเรียแลคติคจะเปลี่ยนซิเตรทให้เป็นไพรูเวทโดยเอนไซม์ซิเตรทไลเอส เกิดเป็นออกซาโลอะซิเตท จากนั้นออกซาโลอะซิเตทจะถูกดึงเอาคาร์บอนอะตอมออกในรูปคาร์บอนไดออกไซด์ และเกิดเป็นไพรูเวท โดยเอนไซม์ oxaloacetate decarboxylase ดังแสดงในภาพ 2.4 (Harvey และ Collins, 1961) นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติคยังสามารถเปลี่ยนไพรูเวทให้เป็นสารที่มีกลิ่นรสหอม ได้แก่ อะเซททาดีไฮด์ และไดอะเซททิล เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำตาลและพีเอชต่ำ (Axelsson, 1993) ส่วนการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับขบวนการสร้างกลิ่นรสพบว่า ในสภาพการหมักแบบมีอากาศร่วมกับการมีอนุมูลของโลหะบางชนิด เช่น Cu^{2+}, Fe^{2+} และ Fe^{3+} สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างไดอะเซททิลได้มากขึ้น ดังนั้นความสามารถในการใช้ซิเตรทจึงขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติค สภาพแวดล้อม ความเป็นกรดด่าง สารอาหาร ปริมาณออกซิเจน และชนิดของอนุมูลโลหะ แบคทีเรียแลคติคที่สามารถสร้างกลิ่นรสหอมในผลิตภัณฑ์มักพบในกลุ่ม Streptococci และ Leuconostoc การเกิดสารระเหยในปริมาณที่เหมาะสมจะทำให้อาหารหมักมีกลิ่นหอม (aroma) แต่ถ้ามีสารระเหยเกิดขึ้นมากเกินไปจะทำให้เกิดลักษณะที่เรียกว่า off-flavor (Tsutomu และคณะ, 1991)

ไดอะเซททิลเป็นสารประกอบที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้หลายชนิด รวมทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค เช่น *Mycobacterium tuberculosis* จากรายงานของ Jay (1992) พบว่าที่ความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไดอะเซททิลจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ขณะที่ความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จะยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติค และที่ความเข้มข้นมากกว่า 350 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติคได้ ซึ่ง Gupta และคณะ (1973) ได้รายงานผลการทดลองเกี่ยวกับเรื่องนี้ไว้ว่าไดอะเซททิลจะมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ นอกจากนี้ไดอะเซททิลมักมีผลในการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์สูงขึ้นเมื่อพีเอชของอาหารเสี้ยงเชื้อลดลง การเสริมฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ (synergistic effect) ระหว่างพีเอชและไดอะเซททิลจะมีผลต่อแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์มากกว่าแบคทีเรียแกรมบวก แต่แบคทีเรียแลคติค และ *Clostridium botulinum* จะมีความต้านทานต่อผลของการเสริมฤทธิ์ดังกล่าว อย่างไรก็ตามกลไกการยับยั้ง



ภาพที่ 2.4 แสดงวิถีการเมตาบอลิสมไพรูเวทของแบคทีเรียแลคติค

ที่มา : Axelsson (1993)

ของไดอะเซททิลยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด คาดว่าเกิดจากการรบกวนตำแหน่งกรดอะมิโนอาร์จินีน โดยการทำปฏิกิริยากับอาร์จินีนที่เป็นองค์ประกอบในโปรตีน หรือเอนไซม์ของแบคทีเรียแลคติคแกรมลบ (วริพัสย์, 2535) ถึงแม้ว่าไดอะเซททิลจะมีบทบาทในการยับยั้งจุลินทรีย์แต่มักไม่มีความสำคัญมากนักเมื่อเทียบกับสารยับยั้งชนิดอื่น ๆ ที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้น โดยผลส่วนใหญ่ของไดอะเซททิลนั้นมักมุ่งเน้นไปในทางทำให้เกิดกลิ่นรสในอาหารหมักมากกว่า (Axelsson, 1993; Richard, 1992)

2.3 <u>การต้านทานยาปฏิชีวนะ</u>

ในระบบนิเวศน์วิทยามีความเกี่ยวพันระหว่างการใช้ยาปฏิชีวนะผสมในอาหารเลี้ยงสัตว์เพื่อส่งเสริมสุขภาพของสัตว์ ซึ่งส่งผลมาถึงมนุษย์เมื่อยาปฏิชีวนะที่ผสมในอาหารสัตว์นั้นเป็นยาปฏิชีวนะที่ใช้รวมกันกับมนุษย์ ทำให้เกิดอาการดื้อยาในจุลินทรีย์หลายชนิด ในทางธรรมชาติแบคทีเรียแลคติคมีความสำคัญในการเป็นตัวที่บ่งบอกถึงกลไกการป้องกันสุขภาพของมนุษย์ เนื่องจากเป็นจุลินทรีย์ที่พบอยู่ในระบบทางเดินอาหารของคน นอกจากนี้ยังมีการใช้สารปฏิชีวนะเพื่อช่วยในการถนอมรักษาอาหาร สารปฏิชีวนะที่นิยมใช้ได้แก่ คลอโรเตตร้าซัยคลิน (Chlorotetracyclin) ออกซีเตตร้าซัยคลิน (Oxytetracyclin) เตตร้าซัยคลิน (Tetracyclin) เพนนิซิลลิน (Penicillin) และ แอมพลิซิลลิน (Ampicillin) วิธีการใช้สารปฏิชีวนะกับผลิตภัณฑ์เนื้อทำโดยการพ่นหรือจุ่มลงในสารละลายของยาปฏิชีวนะ เพราะการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ส่วนใหญ่อยู่บริเวณผิวหน้า ดังนั้นการใช้สารปฏิชีวนะในลักษณะนี้จะให้ผลดีมาก (วริพัสย์, 2535; Crueger, 1990)

สารปฏิชีวนะแต่ละชนิดมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้แตกต่างกัน เช่น เพนนิซิลลินมีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวก เช่น *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ในช่วงพีเอช 5.0-7.0 ประสิทธิภาพของสารอยู่ได้นานถึง 2 วัน ในอาหารที่มีพีเอช 6.0 อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส สำหรับเตตร้าซัยคลินมีผลต่อแบคทีเรียทั้งแกรมบวกและแกรมลบ ช่วงพีเอช 4.0-7.0 ประสิทธิภาพของสารอยู่ได้นาน 2 อาทิตย์ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นิยมใช้เป็นสารป้องกันหรือสารยืดอายุซากไม่ให้เกิดการเน่าเสียขึ้นภายใน เช่น การเหม็นเปรี้ยว ซึ่งเกิดจากแบคทีเรียแกรมบวก รวมถึงแบคทีเรียที่เจริญได้ดีในที่มีอากาศด้วย

การใช้ออกซีเตตร้าซัยคลินเป็นสารปฏิชีวนะควบคู่กับการฉายรังสีแกมม่า พบว่าสามารถยืดอายุเนื้อสดที่จำหน่ายในรูปแช่เย็นบรรจุในถุงพลาสติกปิดสนิทได้ดี ในขณะที่ใช้รังสีขนาด 10,000 rad ก็เพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์แกรมลบที่เจริญเติบโตได้ดีในห้องเย็น ดังตารางที่ 2.2 (Lawrie, 1979; James, 1992)

ปัญหาที่มักพบในการใช้สารปฏิชีวนะในการถนอมรักษา (เยาวลักษณ์, 2536) คือ

1. สารปฏิชีวนะมีประสิทธิภาพในแง่การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์มากกว่าทำลาย ดังนั้นการใช้จึงมีระยะเวลาที่สารปฏิชีวนะจะมีประสิทธิภาพดีที่สุดแตกต่างกันไปดังภาพที่ 2.5

2. การใช้สารปฏิชีวนะมีผลทำลายแบคทีเรียที่มีอยู่ในผลิตภัณฑ์มากกว่ายีสต์และรา เป็นผลทำให้ยีสต์และราเจริญได้อย่างรวดเร็ว เนื่องจากไม่มีการแข่งขันการเจริญของแบคทีเรียร่วมอยู่ด้วย

3. การที่ร่างกายได้รับสารปฏิชีวนะจากอาหารเป็นเวลานาน ๆ อาจมีผลทำให้ปริมาณจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่มีอยู่ในร่างกายมีจำนวนผิดปกติไป

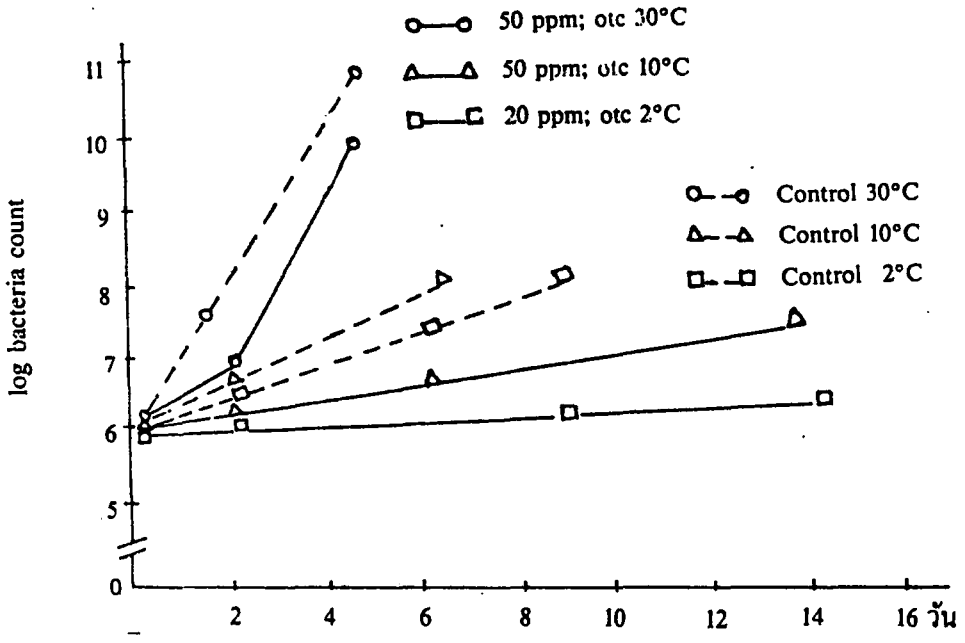
4. สารปฏิชีวนะที่ใช้มีผลทำให้แบคทีเรียเกิดสายพันธุ์ใหม่ที่มีความทนทานต่อสารปฏิชีวนะที่มีประสิทธิภาพสูงยิ่งขึ้น

การใช้สารปฏิชีวนะนิยมใช้ในเนื้อสดเพราะจะไม่มีตกค้างภายหลังจากทำให้สุกแล้ว เนื่องจากสารปฏิชีวนะจะถูกทำลายประสิทธิภาพได้ด้วยความร้อนในขณะแปรรูป

ตารางที่ 2.2 แสดงผลของการใช้รังสีแกมม่า (10,000 rad) และออกซีเตตร้าซัยคลิน (10 ppm) ต่อแบคทีเรียในเนื้อสดที่แช่เย็นที่ 2 องศาเซลเซียส

Treatment	Micro-organisms ($\times 10^3$/g meat) (days)			
	0	8	14	20
Control	90	700,000	4,000,000	—
Irradiated	0·5	100	60,000	800,000
Irradiated + antibiotic	0·05	1	60	2000

ที่มา : Lawrie (1979)



ภาพที่ 2.5 แสดงความสามารถของออกซีเตตร้าซัยคลินที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียในเนื้อบดที่เก็บที่อุณหภูมิ 2, 10 และ 30 องศาเซลเซียส

ที่มา : เยาวลักษณ์ (2536)

96740

2.4 ประโยชน์ของการใช้แบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

2.4.1 ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์

เนื้อสัตว์จัดเป็นอาหารประเภทที่เสื่อมเสียได้ง่าย (perishable foods) เนื่องจากมีสารอาหารและวิตามินอุดมสมบูรณ์ รวมทั้งมีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และความชื้น (a_w) ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสียในเนื้อสัตว์ที่ผ่านขั้นตอนการห่น สับ บด ให้มีขนาดเล็กลง จุลินทรีย์ที่พบในเนื้อสัตว์ ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม phychrotrophic แกรมลบ เช่น *Pseudomonas sp.*, *Acinetobacter sp.* และ *Alcaligenes sp.* จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคที่มักพบปนเปื้อนในเนื้อสดได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Salmonella spp.*, *Clostridium botulinum* และ *Listeria mono cytogenes* (Bacus และ Brown, 1981)

นอกจากนี้อุปกรณ์และเครื่องมือ รวมทั้งกระบวนการแปรรูปอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์มากขึ้น กระบวนการในการลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบนั้นอาจทำได้โดยวิธีการต่าง ๆ เช่น การเก็บรักษาไว้ในห้องเย็น หรือการบรรจุลงในถุงสูญญากาศ และการเปลี่ยนแปลงสภาพบรรยากาศภายใน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ในการยืดอายุการเก็บเนื้อสัตว์ โดยอาศัยหลักการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อม และมีผลทำให้เกิดแบคทีเรียแลคติคเจริญขึ้นเป็น dominant ในการถนอมอาหาร เนื่องจากแบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ แต่ถ้าพบลักษณะไม่ดีในผลิตภัณฑ์ เช่น การเกิดกลิ่นเหม็น รสชาติไม่ดี และการเกิดเมือก จะแสดงถึงความล้มเหลวในการใช้แบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์ แบคทีเรียแลคติคที่มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งการเจริญจะสามารถยืดอายุในการเก็บผลิตภัณฑ์ และยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ดังนั้นการคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติคที่ใช้เป็นกล้าเชื้อสำหรับผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์จะต้องสามารถสร้างสารยับยั้งการเจริญต่าง ๆ ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารปฏิชีวนะต่าง ๆ เป็นต้น (วริพัสย์, 2535)

ในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์พื้นบ้านของไทย เช่น แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว กลิ่นและรสชาติจะเปลี่ยนแปลงตามสภาพวัตถุดิบ สภาวะการบ่ม รวมทั้งปัจจัยอื่น ๆ ซึ่งจะมีผลต่อผู้บริโภค ดังนั้นการพัฒนาผลิตภัณฑ์ให้มีคุณภาพคงที่ และเกิดประโยชน์ทางโภชนาการต่อผู้บริโภคมากที่สุด จึงควรมีการปรับปรุงการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติคในกระบวนการผลิตแทนการใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติคที่มีอยู่ในวัตถุดิบ หรือองค์ประกอบอื่น ๆ ในธรรมชาติ ปกติแล้วในการหมักตามธรรมชาติจะ

ตรวจพบแบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก เช่น *Pediococcus cerevisiae*, *Lacto bacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* และ *Lactobacillus leichannii* (Bacus และ Brown, 1980)

การเพิ่มรสชาติในการหมักผลิตภัณฑ์เนื้อทำโดยการเติมเกลือ น้ำตาล ไนเตรท ซึ่งการเติมน้ำตาลจะมีความสำคัญในแง่ของการเพิ่มธาตุอาหารให้เพียงพอต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติค ส่วนการเติมเกลือและไนเตรทจะเป็นการปรับสภาวะและยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย นอกจากนี้ไนเตรทจะถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรท์ แล้วเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์ ซึ่งจะรวมตัวกับไมโอโกลบิน (myoglobin) เปลี่ยนเป็น nitrosomyoglobin และ nitrosohemochrome ในการรักษาสีในเนื้อสัตว์ (Dryden และ Bridsall, 1980) ดังสมการ

$$\text{myoglobin} + NO \xrightarrow{} \underset{\text{(red)}}{\text{nitrosomyoglobin}} \xrightarrow{\text{heat}} \underset{\text{(pink)}}{\text{nitrosohemochrome}}$$

(purplish red)

นอกจากนี้การใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติคยังมีผลต่อการสลายตัวของไนเตรทที่เติมลงในผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ทำให้การสะสมของ nitrosamine ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งลดลง ทั้งนี้เนื่องจากผลิตภัณฑ์ที่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติคในปริมาณมากจะสามารถสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว มีผลทำให้ระดับพีเอชในอาหารหมักลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งจะไปเร่งให้ส่วนที่เหลือของไนไตรท์ (residual nitrite) สลายเป็นไนตรัสออกไซด์ (N_2O) ทำให้ปริมาณไนไตรท์ลดลง การสะสมของ nitrosamine จึงลดลงด้วยเช่นกัน (Andres, 1979; Zaika และคณะ, 1976)

2.4.2 ผลิตภัณฑ์ผัก

คุณภาพของผลิตภัณฑ์ผักดองจะขึ้นอยู่กับลักษณะ กลิ่น และรสชาติ ต้องเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภค ตามปกติในวัตถุดิบหรือผักสดจะมีจุลินทรีย์ที่เป็น epiphytic microflora ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย เช่น *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Achromo bacter*, *Escherichia* และ *Bacillus* แต่จะพบแบคทีเรียแลคติคเป็นจำนวนน้อย ดังนั้นการปรับสภาพการหมักและการส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียแลคติค จึงจำเป็นในการควบคุม

คุณภาพของผลิตภัณฑ์ผักดองให้คงที่ เนื่องจากในการดองส่วนใหญ่จะใช้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ จึงต้องมีการปรับสภาวะแวดล้อมเพื่อให้เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียแลคติค โดยการเติมโซเดียมคลอไรด์ และการปรับสภาพให้ไม่มีอากาศ ซึ่งจะช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ และขณะเดียวกันจะช่วยส่งเสริมการเจริญของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติค อย่างไรก็ตาม ผลของความเข้มข้นของเกลือ อุณหภูมิขณะการหมัก สารยับยั้งจุลินทรีย์จากพืช การเติมสารเคมี การเปิดให้ผิวหน้าของน้ำหมักรับแสงอาทิตย์และอากาศ รวมทั้งปริมาณคาร์โบไฮเดรตที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ และสารอาหารต่าง ๆ จะเป็นปัจจัยที่สำคัญของความสำเร็จในการหมัก แบคทีเรียแลคติคที่พบระหว่างการหมักผักดองได้แก่ *Streptococcus faecalis*, *Leuco nostoc mesenteroids*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* (วริพัสย์, 2535; Carl, 1979; James, 1992)

ตารางที่ 2.3 แสดงขั้นตอนการหมักและการเปลี่ยนแปลงชนิดของจุลินทรีย์ในผักดอง

Stage	Prevalent microorganisms
Initation	Various gram-positive and negative bacteria
Primary fermentation	Lactic acid bacteria, yeasts
Secondary fermentation	Yeasts
Post-fermentation	Open tanks : surface growth of oxidative yeasts, molds and bacteria Anaerobic tank : none

ที่มา : วริพัสย์ (2535)

14609

การหมักผักดองแบ่งเป็น 4 ขั้นตอน (ตารางที่ 2.4) ขั้นตอนแรกเป็นขั้นเริ่มต้นจะพบจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับผักสดเป็นจำนวนมาก และมีความหลากหลายของสายพันธุ์ ขั้นที่ 2 จะเป็นขั้นสำคัญในการหมักโดยเชื้อแบคทีเรียแลคติคจะสามารถสร้างกรดทำให้พีเอชของน้ำหมักลดลง จึงมีผลทำให้จำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนลดลง และแบคทีเรียแลคติคจะเจริญเป็น predominant ขึ้นมาแทน การหมักขั้นต่อมาจะเป็นการเจริญของยีสต์ทำให้เกิดกลิ่นและรสชาติของสารประกอบต่าง ๆ และขั้นสุดท้ายคือ Post fermentation เกิดจากการที่มีการสัมผัสของอากาศบริเวณผิวทำให้ oxidative yeast รา และแบคทีเรีย สามารถเจริญขึ้นมาได้ (วริพัสย์, 2535) ขั้นตอนที่ 1 อาจมีการลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในวัตถุดิบ เช่น การลวก หรือการฉายรังสี ก่อนการเติมน้ำเกลือซึ่งเป็นขั้นตอนที่ 2 ที่มีการปรับสภาพให้เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียแลคติค และเป็นขั้นตอนที่จะแสดงถึงความสำเร็จในการหมัก ขั้นตอนการหมักนี้จะมีการลดลงอย่างรวดเร็วของพีเอช ที่เป็นกลไกสำคัญในการลดกิจกรรมของเอนไซม์ที่ย่อยสลายเพคติน (pectino lytic enzyme) จากแบคทีเรียและยีสต์ มีผลทำให้เกิดการสลายตัวของโปรตีน ไขมัน และสารประกอบอื่น ๆ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของกลิ่นรสและเนื้อสัมผัส รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงสีในผลิตภัณฑ์ ผลการหมักโดยแบคทีเรียแลคติคในสภาพที่เหมาะสมจะทำให้ระดับน้ำตาลต่าง ๆ ลดลง มีการเพิ่มความเป็นกรด (acidity) จนมีค่าประมาณ 2.0-2.5 เปอร์เซนต์ และเกิดการสร้างกาซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจะสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศ นอกจากนี้กาซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้นมีผลต่อการคงตัวของกรดแอสคอร์บิก สามารถยับยั้งปฏิกิริยาการเกิดออกซิเดชัน และการเกิดสีคล้ำในผลิตภัณฑ์ผักดอง (Luh และ Woodroof, 1975; Carl, 1979)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า
เจ้าคุณทหารลาดกระบัง

บทที่ 3

อุปกรณ์ สารเคมี และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์

Autoclave

pH meter

Spectrophotometer

Stomacher

Vortex mixer

Water bath

กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

เครื่องชั่งละเอียด

ตู้บ่มเชื้อ

ตู้เย็น

3.2 สารเคมี

Agar

Ammonium citrate

Ammonium oxalate

Beef extract

Bromocresol purple

Calcium carbonate

Casein hydrolysate peptone

Casitone

Crystal violet

Dextrose

Ethyl alcohol 95 เปอร์เซนต์

Ferric citrate

Glucose

Iodine

Lactose

Magnesium sulfate

Manganese sulfate

∝-Naphthol

Peptone

Phenolphthalein

Potassium dihydrogen phosphate

Potassium ferrocyanide

Potassium hydrogen pthalate

Potassium hydroxide

Potassium iodine

Safranin

Skimmilk

Sodium acetate

Sodium azide

Sodium citrate

β-Sodium glycerophosphate

Sodium hydroxide

Sucrose

Tween 80

Yeast extract

ยาปฏิชีวนะที่ใช้ทดสอบ

Amplicillin

Kanamycin

Penicillin

Tetracyclin

3.3 วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติคและการเก็บเชื้อ

1.1 การแยกเชื้อบริสุทธิ์

1.1.1 นำตัวอย่างผลิตภัณฑ์ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม และน้ำผักกาดดอง ที่จำหน่ายในท้องตลาดมาเจือจางในน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที โดยเจือจางในอัตราส่วนที่เหมาะสม ทำให้ตัวอย่างมีความเจือจางลงตามลำดับ เพาะเลี้ยงเชื้อโดยวิธี dilution plate count บนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก) ที่ประกอบด้วย bromocresol purple 0.004 เปอร์เซนต์ แคลเซียมคาร์บอเนต 1.0 เปอร์เซนต์ และโซเดียมเอไซด์ 0.2 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

1.1.2 นำเชื้อที่แยกได้จากข้อ 1.1.1 โดยเลือกโคโลนีที่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี และเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ มาเขี่ยลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มไว้ที่อุณหภูมิเดิมจนเกิดโคโลนีเดี่ยว แล้วทำซ้ำอีกครั้ง

1.2 การเก็บเชื้อบริสุทธิ์

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงในนมพร่องมันเนย 10 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก) ปริมาตร 5.0 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จนเกิดตะกอนนมหรือเคิร์ด แล้วถ่ายตะกอนนมปริมาตร 3.0 มิลลิลิตร ใส่ขวดที่ปราศจากเชื้อ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2. การตรวจสอบคุณสมบัติทางกระบวนการเมตาบอลิสม

2.1 การตรวจสอบการใช้น้ำตาลซูโครส

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติคมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส 2.0 เปอร์เซนต์ และ bromocresol purple 0.004 เปอร์เซนต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยดูจากการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ และสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 การตรวจสอบการใช้น้ำตาลแลคโตส

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติคมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่ประกอบด้วยน้ำตาลแลคโตส 2.0 เปอร์เซนต์ และ bromocresol purple 0.004 เปอร์เซนต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญโดยดูจากการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ และสังเกตความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติค

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติคมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 660 นาโนเมตร วัดพีเอช และปิเปตตัวอย่าง 1.0 มิลลิลิตร มาเติมน้ำกลั่นที่ต้มไล่กาซคาร์บอนไดออกไซด์ เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 1-2 หยด ทำการไตเตรทด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งถึงจุดยุติ หรือเกิดการเปลี่ยนเป็นสีชมพู คำนวณปริมาณกรดแลคติคโดยสมการ

$$\text{เปอร์เซนต์กรดแลคติค} = (N \star V \star 90.01 \star 100)/1000$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

V = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไตเตรท (มิลลิลิตร)

2.4 การตรวจสอบการสร้างกาซ

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติคมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีหลอดดักกาซ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่ม Heterofermentative bacteria จะพบกาซในหลอดดักกาซ ส่วนแบคทีเรียกลุ่ม Homofermentative bacteria จะไม่พบกาซในหลอดดักกาซ

2.5 การตรวจสอบการย่อยเคซีน

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติคมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Whey permeate medium (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการเจริญ โดยดูจากโคโลนีที่เกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนีของเชื้อ แสดงว่ามีการสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยเคซีน

2.6 การตรวจสอบการใช้ซิเตรท

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติคมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง Kempler McKay (ภาคผนวก ก) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการเจริญโดยโคโลนีที่ให้สีน้ำเงินหรือสีฟ้าจะเป็นโคโลนีที่สามารถใช้ซิเตรทได้ ส่วนโคโลนีสีขาวจะเป็นโคโลนีที่ไม่สามารถใช้ซิเตรทได้

2.7 การตรวจสอบการสร้างไดอะเซททิลโดยวิธี Voges-Proskauer test

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติคมาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Kempler McKay บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำมาหยดสารละลาย ∝-naphthol ความเข้มข้น 5.0 เปอร์เซนต์ จำนวน 2 หยด แล้วเติมสารละลายโพแทสเซียมไฮดรอกไซด์ 40 เปอร์เซนต์ จำนวน 1 หยด ทิ้งไว้ประมาณ 10-30 นาที ตรวจสอบผลโดยเชื้อที่สามารสร้างไดอะเซททิลหรืออะซิโตอินจะทำให้เกิดสีชมพูแดงที่ผิวอาหารเหลว ส่วนเชื้อที่ไม่สามารถสร้างสารดังกล่าวจะไม่เปลี่ยนสีที่ผิวของอาหาร

3. การตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะ

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติคมาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS ที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะต่าง ๆ กัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการเจริญบนอาหาร

บทที่ 4

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 <u>การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติค</u>

ได้ทำการเก็บตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักในท้องตลาด 4 ตัวอย่าง ได้แก่ ไส้กรอกเปรี้ยว แหนม และน้ำผักกาดดอง สุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียแลคติคที่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี และเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์ (ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่เติม bromocresol purple 0.004 เปอร์เซนต์ แคลเซียมคาร์บอเนต 1.0 เปอร์เซนต์ และโซเดียมเอไซด์ 0.2 เปอร์เซนต์) คัดเลือกแบคทีเรียแลคติคแต่ละตัวอย่างมาทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์จำนวนทั้งหมด 22 สายพันธุ์

จากการตรวจสอบทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแกรมเพื่อดูลักษณะรูปร่าง ด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า สามารถแยกเชื้อบริสุทธิ์ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อที่มีรูปร่างกลม (cocci) จำนวน 7 สายพันธุ์ และกลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อที่มีรูปร่างแท่ง (bacilli) จำนวน 15 สายพันธุ์

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากตัวอย่างอาหารหมัก

ตัวอย่างอาหารหมัก	รูปร่าง	แบคทีเรียแลคติค
ไส้กรอกเปรี้ยว	cocci bacilli	1.1, 1.2, 1.4, 1.5 1.3, 1.6
แหนม	cocci bacilli	2.2, 2.3, 2.6 2.1, 2.4, 2.5
น้ำผักกาดดอง ตัวอย่างที่ 1	bacilli	3.1, 3.2, 3.3
น้ำผักกาดดอง ตัวอย่างที่ 2	bacilli	4.1, 4.2, 4.3, 4.4 4.5, 4.6, 4.7

4.2 การตรวจสอบการใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลแลคโตส

แบคทีเรียแลคติคเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่มีความสามารถสูงในการย่อยคาร์โบไฮเดรต และสารประกอบอื่น ๆ โดยการหมักคาร์โบไฮเดรตจะให้พลังงานที่แบคทีเรียต้องการเพื่อใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ทางชีวเคมีภายในเซลล์ ซึ่งแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่สำคัญคือน้ำตาล

ในการศึกษากระบวนการเมตาบอลิสมน้ำตาลไดแซคคาไรด์ของแบคทีเรียแลคติค โดยทั่วไปเป็นการศึกษากระบวนการหมักน้ำตาลซูโครสและแลคโตส ซึ่งทำโดยการเติมน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้คืออาหารเหลว MRS (Deman และคณะ) เป็น basic medium ที่มีอินดิเคเตอร์ bromocresol purple เป็นองค์ประกอบ แบคทีเรียแลคติคที่สามารถใช้น้ำตาลโมเลกุลคู่ 2 ชนิดนี้จะเจริญเติบโตสร้างกรดอินทรีย์ ทำให้อาหารขุ่นและเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ส่วนสายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลซูโครสหรือแลคโตสได้ อาหารเหลว MRS จะยังคงใสและมีสีม่วงดังเดิม ซึ่งจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลคติคทุกสายพันธุ์สามารถย่อยน้ำตาลซูโครส ขณะที่สายพันธุ์ L4.6 และ L4.7 ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้ สาเหตุที่เป็นเช่นนี้อาจเนื่องจากแบคทีเรียแลคติคทั้งหมดมีเอนไซม์ซูโครสไฮโดรเลสที่ใช้ในการย่อยน้ำตาลซูโครส ให้ผลิตภัณฑ์เป็นน้ำตาลกลูโคสและฟรุคโตสเข้าสู่วิถีการหมักน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (Axelsson, 1993) หรือน้ำตาลซูโครสอาจถูกขนส่งเข้าสู่เซลล์ด้วย PTS และเอนไซม์ sucrose-6-phosphate hydrolase ซึ่งจะเปลี่ยน sucrose-6-phosphate ไปเป็น glucose-6-phosphate (Thompson และ Chassy, 1981) ส่วนแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ L4.6 และ L4.7 ที่ไม่สามารถใช้น้ำตาลแลคโตสได้อาจเป็นเพราะไม่มีเอนไซม์ β-galactosidase หรือ phospho-β-D-galactosidase ในการย่อยน้ำตาลแลคโตสเป็นน้ำตาลโมเลกุลดี่ยวอิสระหรือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวในรูปสารประกอบฟอสเฟต (Premi และคณะ, 1972; Fox และคณะ, 1990)

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการตรวจสอบการใช้น้ำตาลซูโครสและน้ำตาลแลคโตส

แบคทีเรียแลคติค	การใช้น้ำตาล		แบคทีเรียแลคติค	การใช้น้ำตาล	
	ซูโครส	แลคโตส		ซูโครส	แลคโตส
C1.1	+	+	L4.2	+	+
C1.2	+	+	L4.3	+	+
L1.3	+	+	L4.4	+	+
C1.4	+	+	L4.5	+	+
C1.5	+	+	L4.6	+	-
L1.6	+	+	L4.7	+	-
L2.1	+	+	A5	+	+
C2.2	+	+	A8	+	+
C2.3	+	+	A11	+	+
L2.4	+	+	C2	+	+
L2.5	+	+	D1	+	+
C2.6	+	+	K1	+	+
L3.1	+	+	M2	+	+
L3.2	+	+	M4	+	+
L3.3	+	+	M7	+	+
L4.1	+	+	T8	+	+

4.3 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติค

กรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์หลักที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นจากกระบวนการหมักน้ำตาล โดยที่ปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้นมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับชนิดสายพันธุ์ รวมทั้งสภาวะแวดล้อมในการเจริญเติบโต ในอาหารที่มีปริมาณน้ำตาลมากเกินพอและได้รับออกซิเจนในปริมาณจำกัด ไพรูเวทจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นกรดแลคติคอันเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในปริมาณมาก จึงจัดได้ว่ากรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์เพียงชนิดเดียวจากกระบวนการไกลโคไลซิสของแบคทีเรียแลคติค (Axelsson, 1993) การวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกรดที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นระหว่างการเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน ทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อที่กำลังมีกิจกรรมสูงในอาหารเหลว MRS ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วไตเตรทน้ำเลี้ยงเชื้อด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ ซึ่งอินดิเคเตอร์ชนิดนี้จะไม่มีสีในสภาวะที่เป็นกรด และจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูในสภาวะที่เป็นด่าง ดังนั้นเมื่อสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ทำปฏิกิริยาพอดีกับกรดแลคติคแล้ว สารละลายด่างปริมาณส่วนที่มากเกินพอจะทำให้ฟีนอล์ฟทาลีนเปลี่ยนเป็นสีชมพูแสดงถึงจุดยุติทันที จึงสามารถคำนวณหาปริมาณกรดแลคติคจากปริมาณสารละลายด่างที่ใช้ในการไตเตรทได้ ซึ่งจากการทดลองพบว่าปริมาณกรดแลคติคที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นอยู่ในช่วง 0.40-1.73 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าพีเอชและค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร ของอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้ออยู่ในช่วง 3.58-4.82 และ 1.86-9.50 ตามลำดับ และสามารถแบ่งแบคทีเรียแลคติคตามปริมาณกรดแลคติคที่สร้างขึ้นได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มที่สร้างกรดได้ต่ำกว่า 0.50 เปอร์เซนต์ จำนวน 5 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 เป็นแบคทีเรียแลคติคที่สร้างกรดอยู่ในช่วง 0.50-1.00 เปอร์เซนต์ จำนวน 11 สายพันธุ์ และกลุ่มสุดท้ายจำนวน 16 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียแลคติคที่สร้างกรดได้มากกว่า 1.00 เปอร์เซนต์ นับว่าแบคทีเรียแลคติคที่ใช้ในการทดลองทั้งหมดสามารถสร้างกรดแลคติคได้ดี ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเป็น Homofermentation ซึ่งแบคทีเรียแลคติคที่สามารถสร้างกรดได้สูงสุดคือ L3.1 คิดเป็น 1.73 เปอร์เซนต์ ส่วนแบคทีเรียแลคติคที่สร้างกรดได้ต่ำสุดคือสายพันธุ์ M7 คิดเป็น 0.40 เปอร์เซนต์ และเมื่อพิจารณาปริมาณกรดร่วมกับค่าพีเอชและค่าการดูดกลืนแสง พบว่าอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียแลคติคที่สร้างกรดได้ในระดับต่ำจะมีค่าพีเอชสูงกว่า และมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่าเชื้อที่สร้างกรดได้ในระดับสูง แสดงว่าแบคทีเรียแลคติคที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงจะสร้างกรดและลดค่าพีเอชของอาหารเหลวได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากค่าการดูดกลืนแสงดังกล่าวเป็นค่าที่บ่งถึงอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ แต่อย่างไรก็ตามค่าการดูดกลืนแสงที่สูงไม่ได้หมายถึงปริมาณกรดที่เชื้อสร้างขึ้นจะสูงตามไปด้วย และ

จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ L3.1 ที่สามารถสร้างกรดได้สูงสุดมีค่าการดูดกลืนแสง 9.28 ในขณะที่สายพันธุ์ L1.3 ซึ่งสร้างกรดได้ 1.60 เปอร์เซนต์ มีค่าการดูดกลืนแสง 9.50 และแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ M7 มีค่าการดูดกลืนแสง 2.79 สูงกว่าสายพันธุ์ C2.2 ที่มีค่าการดูดกลืนแสง 2.09 ทั้ง ๆ ที่แบคทีเรียสายพันธุ์ M7 สร้างกรดเพียง 0.40 เปอร์เซนต์ ในขณะที่ C2.2 สร้างกรดได้ถึง 0.71 เปอร์เซนต์

ตารางที่ 4.3 แสดงค่าการดูดกลืนแสง พีเอช และปริมาณกรดแลคติค

แบคทีเรียแลคติค	OD660	pH	%กรดแลคติค	แบคทีเรียแลคติค	OD660	pH	%กรดแลคติค
C1.1	2.55	4.50	0.62	L4.2	3.84	4.15	0.88
C1.2	4.84	4.06	0.93	L4.3	6.00	3.92	1.29
L1.3	9.50	3.64	1.60	L4.4	2.25	4.46	0.58
C1.4	2.24	4.61	0.44	L4.5	4.03	4.14	0.93
C1.5	1.87	4.82	0.44	L4.6	5.35	3.94	1.20
L1.6	8.39	3.74	1.60	L4.7	5.62	3.92	1.15
L2.1	6.07	3.69	1.51	A5	2.74	4.65	0.49
C2.2	2.09	4.37	0.71	A8	3.12	4.43	0.75
C2.3	3.11	4.50	0.62	A11	8.39	3.64	1.60
L2.4	1.86	4.63	0.44	C2	8.03	3.73	1.60
L2.5	1.90	4.62	0.53	D1	2.53	4.56	0.53
C2.6	7.70	3.74	1.51	K1	7.93	1.55	1.55
L3.1	9.28	3.70	1.73	M2	5.80	3.73	1.51
L3.2	8.89	3.61	1.64	M4	7.32	3.77	1.42
L3.3	8.97	3.68	1.60	M7	2.79	4.63	0.40
L4.1	5.03	4.10	1.02	T8	2.71	4.52	0.67

4.4 การตรวจสอบการสร้างกาซ

กาซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียแลคติคประเภท Heterofermentation ดังนั้นการตรวจสอบการสร้างกาซนิดนี้จะทำให้สามารถจำแนกประเภทของแบคทีเรียแลคติคตามลักษณะการหมักได้ การตรวจสอบดังกล่าวอาศัยคุณสมบัติในการแทนที่น้ำของกาซ ซึ่งสามารถทำได้โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีหลอดดักกาซ (Durham's tube) แบคทีเรียแลคติคที่สามารถสร้างกาซคาร์บอนไดออกไซด์ได้จะพบกาซในหลอดดักกาซ หรือสามารถทำให้เกิดรอยแตกและมีการดันตัวของวุ้น เมื่อทำการแทงเชื้อ (stab) ลงในอาหารแข็ง การทดสอบง่าย ๆ เหล่านี้สามารถใช้ในการจำแนกแบคทีเรียแลคติคดังกล่าวได้ จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลคติคทุกสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างกาซคาร์บอนไดออกไซด์ ซึ่งจัดเป็น Homofermentation ทั้งนี้เนื่องจากทั้ง 32 สายพันธุ์มีเอนไซม์อัลโดเลสในการย่อย hexose diphosphate ให้เป็น triose phosphate จึงไม่เกิดการออกซิไดซ์ glucose-6-phosphate ให้เป็น 6-phosphogluconate ซึ่งจะเปลี่ยนวิถีต่อไปเป็น ribose-5-phosphate และกาซคาร์บอนไดออกไซด์ ดังเช่นในกลุ่ม Heterofermentation (Brock, 1984)

ตารางที่ 4.4 แสดงผลการตรวจสอบการสร้างกาซ

แบคทีเรียแลคติค	การสร้างกาซ	แบคทีเรียแลคติค	การสร้างกาซ
C1.1	-	L4.2	-
C1.2	-	L4.3	-
L1.3	-	L4.4	-
C1.4	-	L4.5	-
C1.5	-	L4.6	-
L1.6	-	L4.7	-
L2.1	-	A5	-
C2.2	-	A8	-
C2.3	-	A11	-
L2.4	-	C2	-
L2.5	-	D1	-
C2.6	-	K1	-
L3.1	-	M2	-
L3.2	-	M4	-
L3.3	-	M7	-
L4.1	-	T8	-

หมายเหตุ กาซที่ตรวจสอบคือกาซคาร์บอนไดออกไซด์

4.5 การตรวจสอบการย่อยเคซีน

การตรวจสอบการย่อยเคซีนทำในอาหารแข็ง Whey permeate (Limsowtin Teqaghi, 1976) โดยใช้หลักการที่แบคทีเรียแลคติคใดสามารถสร้างเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยเคซีนจะทำให้เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี ซึ่งผลจากการทดลองพบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ C1.1 เป็นสายพันธุ์เดียวที่สามารถย่อยสลายเคซีนในอาหารทดสอบ ส่วนสายพันธุ์อื่นไม่สามารถใช้เคซีนได้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะสายพันธุ์เหล่านี้ขาดเอนไซม์โปรตีเนสทำให้ไม่สามารถย่อยโปรตีนโมเลกุลใหญ่ได้ แต่อย่างไรก็ตามคาดว่าแบคทีเรียแลคติคเหล่านี้สามารถใช้เปปไทด์สายสั้น ๆ ในอาหารเป็นแหล่งของกรดอะมิโนที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตโดยอาศัยเอนไซม์เปปติเดสภายในเซลล์ได้ แบคทีเรียแลคติคที่ไม่สามารถย่อยสลายเคซีนได้ จึงยังคงเจริญบนอาหารโดยไม่เกิดบริเวณใสรอบโคโลนี

ตารางที่ 4.5 แสดงผลการตรวจสอบการย่อยเคซีน

แบคทีเรียแลคติค	การย่อยสลายเคซีน	แบคทีเรียแลคติค	การย่อยสลายเคซีน
C1.1	+	L4.2	-
C1.2	-	L4.3	-
L1.3	-	L4.4	-
C1.4	-	L4.5	-
C1.5	-	L4.6	-
L1.6	-	L4.7	-
L2.1	-	A5	-
C2.2	-	A8	-
C2.3	-	A11	-
L2.4	-	C2	-
L2.5	-	D1	-
C2.6	-	K1	-
L3.1	-	M2	-
L3.2	-	M4	-
L3.3	-	M7	-
L4.1	-	T8	-

4.6 การตรวจสอบการใช้ซิเตรท และการสร้างไดอะเซททิลโดยวิธี Voges-Proskauer test

การตรวจสอบการใช้ซิเตรททำในอาหารเลี้ยงเชื้อ Kampler McKay ซึ่งประกอบด้วยเฟอร์ริคซิเตรท และโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ ปฏิกิริยาระหว่างอิออนของเหล็ก และโพแทสเซียมเฟอร์โรไซยาไนด์ ทำให้เกิดสีน้ำเงิน (prussian blue) ซึ่งปฏิกิริยาดังกล่าวนี้ถูกยับยั้งได้ด้วยซิเตรท (Kneteman, 1952) ดังนั้นแบคทีเรียแลคติคที่สามารถใช้ซิเตรทได้จะให้โคโลนีสีน้ำเงิน เนื่องจากขาดซิเตรทในอาหาร ส่วนแบคทีเรียแลคติคที่ไม่สามารถใช้ซิเตรทจะให้โคโลนีสีขาว จากผลการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่สามารถใช้ซิเตรทได้ ยกเว้นสายพันธุ์ C1.2, L1.3, C2.2 และสายพันธุ์ในกลุ่มตัวอย่างที่ 4

การทดสอบโดยวิธี Voges-Proskauer test เป็นการตรวจสอบการสร้างไดอะเซททิลของแบคทีเรียแลคติค โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Kempler McKay พบว่าแบคทีเรียแลคติคที่มีคุณสมบัติดังกล่าวจะให้วงสีชมพูแดงที่ผิวของอาหารเหลว เนื่องจากปฏิกิริยาระหว่างไดอะเซททิลและอะซิโตอินกับสารละลาย α-naphthol ในสภาพที่เป็นด่าง ส่วนแบคทีเรียแลคติคที่ไม่สามารถสร้างไดอะเซททิลจะไม่เปลี่ยนสีที่ผิวของอาหารเหลว จากผลการทดลองพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติคเกือบทุกสายพันธุ์จะสามารถสร้างไดอะเซททิล ยกเว้นสายพันธุ์ C1.1, L1.3, C1.5, C1.6, C2.2, L2.5, L4.6 และ A5

โดยทั่วไปแบคทีเรียแลคติคสามารถเปลี่ยนซิเตรทไปเป็นสารที่ให้กลิ่นรสในผลิตภัณฑ์ (Marshall, 1987; Kandler, 1983) ซึ่งจากผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียแลคติคจำนวน 17 สายพันธุ์เท่านั้นที่มีคุณสมบัติสอดคล้องกับทฤษฎีดังกล่าว ได้แก่ L1.6, L2.1, C2.3, L2.5, C2.6, A8, A11, C2, D1, K1, M2, M4, M7, I8 และสายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างที่ 3 ส่วนแบคทีเรียแลคติคอื่น ๆ ให้ผลการทดลองที่ต่างออกไป โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 เป็นสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกในการตรวจสอบการใช้ซิเตรท แต่ให้ผลลบในการทดสอบ Voges-Proskauer test ซึ่งมีจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ C1.1, C1.4, C1.5, L2.4 และ A5 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการย่อยสลายซิเตรทเป็นไพรูเวทซึ่งเป็น intermediate ที่สามารถเปลี่ยนวิถีไปเป็นกรดแลคติคได้ แบคทีเรียแลคติคกลุ่มนี้จึงไม่สร้างไดอะเซททิล ส่วนแบคทีเรียแลคติคในกลุ่มที่ 2 เป็นสายพันธุ์ที่ไม่สามารถใช้ซิเตรท แต่สามารถสร้างไดอะเซททิลได้ ซึ่งตรงข้ามกับแบคทีเรียแลคติคในกลุ่มแรกกล่าวคือ แบคทีเรียบางสายพันธุ์

สามารถเปลี่ยนวิถีไพรูเวทที่เกิดขึ้นจากการย่อยสลายน้ำตาลกลูโคสไปเป็นไดอะเซททิล ดังนั้น แม้ว่าแบคทีเรียแลคติคกลุ่มนี้จะไม่สามารถใช้ซิเตรทได้แต่ก็สร้างไดอะเซททิล ได้แก่ สายพันธุ์ C1.2, L4.1, L4.2, L4.3, L4.4, L4.5 และ L4.7 ส่วนแบคทีเรียแลคติคที่เหลือจำนวน 3 สายพันธุ์ ไม่สามารถใช้ซิเตรทและสร้างไดอะเซททิล ได้แก่ L1.3, C2.2 และ L4.6

ตารางที่ 4.6 แสดงผลการตรวจสอบการใช้ซิเตรท และการสร้างไดอะเซททิล โดยวิธี Voges-Proskauer test

แบคทีเรียแลคติค	การใช้ซิเตรท	VP test	แบคทีเรียแลคติค	การใช้ซิเตรท	VP test
C1.1	+	-	L4.2	-	+
C1.2	-	+	L4.3	-	+
L1.3	-	-	L4.4	-	+
C1.4	+	-	L4.5	-	+
C1.5	+	-	L4.6	+	-
L1.6	+	+	L4.7	+	+
L2.1	+	+	A5	+	-
C2.2	-	-	A8	+	+
C2.3	+	+	A11	+	+
L2.4	+	-	C2	+	+
L2.5	+	+	D1	+	+
C2.6	+	+	K1	+	+
L3.1	+	+	M2	+	+
L3.2	+	+	M4	+	+
L3.3	+	+	M7	+	+
L4.1	+	+	T8	+	+

4.7 การตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะ

การตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะของแบคทีเรียแลคติคทำโดยการเติมลงในอาหารแข็ง MRS โดยตรง โดยยาปฏิชีวนะและระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบเป็นดังนี้คือ แอมพลิซิลลิน ที่ความเข้มข้น 3, 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กานามัยซิน เพนนิซิลลิน และเตตร้าซัยคลิน ที่ความเข้มข้น 5, 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการทดลองพบว่ายาปฏิชีวนะแอมพลิซิลลินที่ความเข้มข้น 3 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ C1.2, C1.4, L1.6, L2.4, L3.1, L3.3, L4.1, L4.3, L4.4, A5, A11, C2, D1, K1, M2, M4 และ M7 เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของแอมพลิซิลลินในอาหารให้มากขึ้นจะทำให้ความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติคสูงขึ้นด้วย โดยที่ที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่จะถูกยับยั้ง ยกเว้นสายพันธุ์ L2.1, L3.2, L4.5 และ L4.6

ยาปฏิชีวนะกานามัยซินที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ C1.2, C2.2, L2.4, L2.5, C2.6, L4.1, L4.2, L4.4, A5 และ A11 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของกานามัยซินในอาหารเป็น 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติคไม่แตกต่างจากที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งการเจริญ ยกเว้นสายพันธุ์ C1.1, L1.3, L1.6, L2.1, C2.3, L3.1, L3.2, L3.3, L4.5, L4.6, L4.7, C2, D1, K1, M2, M4 และ M7

ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ L1.6, C2.2, L3.3, L4.1, L4.3, A5, A8, A11, C2, D1, K1, M2 และ M7 ซึ่งผลที่ได้นี้ไม่แตกต่างจากการใช้ยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลินที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเพนนิซิลลินในอาหารให้เท่ากับ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติคสูงขึ้น และที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่จะถูกยับยั้งการเจริญ ยกเว้นสายพันธุ์ L1.3, L2.1, C2.3, L2.4, C2.6, L3.2, L4.2, L4.4, L4.5, L4.7 และ T8

ยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลินที่ความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรให้ผลในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติคไม่แตกต่างกัน คือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ L1.3, A5, M7 และ T8 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลินในอาหารเป็น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียแลคติคสูงขึ้น โดยสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ C2.3, L4.1, L4.3 และ L4.7 ได้

จากการทดลองทั้งหมดพบว่า แบคทีเรียแลคติคมีความไวต่อยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดไม่เท่ากัน กล่าวคือ แบคทีเรียแลคติคจะไวต่อแอมพลิซิลลินมากที่สุด รองลงมาคือ เพนนิซิลลิน กานามัยซิน และเตตร้าซัยคลิน ตามลำดับ โดยที่แบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์เนื้อหมักทุกสายพันธุ์จะถูกยับยั้งด้วยแอมพลิซิลลินที่ความเข้มข้น 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสายพันธุ์ L2.1 ส่วนยาปฏิชีวนะกานามัยซินและเพนนิซิลลินที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะยับยั้งแบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่ได้ แต่ยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลินที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ L1.3 และ C2.3 ได้เพียง 2 สายพันธุ์ ส่วนแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากตัวอย่างผลิตภัณฑ์ผักดองทุกสายพันธุ์ไวต่อแอมพลิซิลลิน ยกเว้นสายพันธุ์ L3.2, L4.5 และ L4.6 และแบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่ไวต่อเพนนิซิลลินที่ความเข้มข้น 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ยกเว้นสายพันธุ์ L3.2, L4.2, L4.4 L4.5, L4.7 และ T8 ในขณะที่แบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่ไม่ไวต่อกานามัยซินและเตตร้าซัยคลิน นอกจากนี้จากการทดลองยังพบว่าแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ L2.1, L3.2, และ L4.5 ไม่ถูกยับยั้งด้วยยาปฏิชีวนะชนิดใดเลย

ตารางที่ 4.7 แสดงผลการตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพลิซิลลิน

แบคทีเรียแลคติค	ความเข้มข้น (μg/ml)				แบคทีเรียแลคติค	ความเข้มข้น (μg/ml)			
	3	5	10	20		3	5	10	20
C1.1	R	S	S	S	L4.2	R	R	R	S
C1.2	S	S	S	S	L4.3	S	S	S	S
L1.3	R	R	R	S	L4.4	S	S	S	S
C1.4	S	S	S	S	L4.5	R	R	R	R
C1.5	R	S	S	S	L4.6	R	R	R	R
L1.6	S	S	S	S	L4.7	R	S	S	S
L2.1	R	R	R	R	A5	S	S	S	S
C2.2	R	R	S	S	A8	R	S	R	S
C2.3	R	R	R	S	A11	S	S	S	S
L2.4	S	S	S	S	C2	S	S	S	S
L2.5	R	R	R	S	D1	S	S	S	S
C2.6	R	R	S	S	K1	S	S	S	S
L3.1	S	S	S	S	M2	S	S	S	S
L3.2	R	R	R	R	M4	S	S	S	S
L3.3	S	S	S	S	M7	S	S	S	S
L4.1	S	S	S	S	T8	R	R	R	S

หมายเหตุ R = Resistant

S = Sensitivity

ตารางที่ 4.8 แสดงผลการตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะกานามัยซิน

แบคทีเรียแลคติค	ความเข้มข้น (μg/ml)				แบคทีเรียแลคติค	ความเข้มข้น (μg/ml)			
	5	10	20	30		5	10	20	30
C1.1	R	R	R	R	L4.2	S	S	S	S
C1.2	S	S	S	S	L4.3	R	R	R	S
L1.3	R	R	R	R	L4.4	S	S	S	S
C1.4	R	R	R	S	L4.5	R	R	R	R
C1.5	R	R	S	S	L4.6	R	R	R	R
L1.6	R	R	R	R	L4.7	R	R	R	R
L2.1	R	R	R	R	A5	S	S	S	S
C2.2	S	S	S	S	A8	R	R	R	S
C2.3	R	R	R	R	A11	S	S	S	S
L2.4	S	S	S	S	C2	R	R	R	R
L2.5	S	S	S	S	D1	R	R	R	R
C2.6	S	S	S	S	K1	R	R	R	R
L3.1	R	R	R	R	M2	R	R	R	R
L3.2	R	R	R	R	M4	R	R	R	R
L3.3	R	R	R	R	M7	R	R	R	R
L4.1	S	S	S	S	T8	R	R	R	S

หมายเหตุ R = Resistant

S = Sensitivity

ตารางที่ 4.9 แสดงผลการตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะเพนนิซิลลิน

แบคทีเรียแลคติค	ความเข้มข้น (μg/ml)				แบคทีเรียแลคติค	ความเข้มข้น (μg/ml)			
	5	10	20	30		5	10	20	30
C1.1	R	R	S	S	L4.2	R	R	R	R
C1.2	R	R	R	S	L4.3	S	S	S	S
L1.3	R	R	R	R	L4.4	R	R	R	R
C1.4	R	R	R	S	L4.5	R	R	R	R
C1.5	R	R	R	S	L4.6	R	R	R	S
L1.6	S	S	S	S	L4.7	R	R	R	R
L2.1	R	R	R	R	A5	S	S	S	S
C2.2	S	S	S	S	A8	S	S	S	S
C2.3	R	R	R	R	A11	S	S	S	S
L2.4	R	R	R	R	C2	S	S	S	S
L2.5	R	R	S	S	D1	S	S	S	S
C2.6	R	R	R	R	K1	S	S	S	S
L3.1	R	S	S	S	M2	S	S	S	S
L3.2	R	R	R	R	M4	R	R	S	S
L3.3	S	S	S	S	M7	S	S	S	S
L4.1	S	S	S	S	T8	R	R	R	R

หมายเหตุ R = Resistant

S = Sensitivity

ตารางที่ 4.10 แสดงผลการตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะเตตร้าซัยคลิน

แบคทีเรียแลคติค	ความเข้มข้น (μg/ml)				แบคทีเรียแลคติค	ความเข้มข้น (μg/ml)			
	5	10	20	30		5	10	20	30
C1.1	R	R	R	R	L4.2	R	R	R	R
C1.2	R	R	R	R	L4.3	R	R	R	S
L1.3	S	S	S	S	L4.4	R	R	R	R
C1.4	R	R	R	R	L4.5	R	R	R	R
C1.5	R	R	R	R	L4.6	R	R	R	R
L1.6	R	R	R	R	L4.7	R	R	R	S
L2.1	R	R	R	R	A5	R	S	S	S
C2.2	R	R	R	R	A8	R	R	R	R
C2.3	R	R	R	S	A11	R	R	R	R
L2.4	R	R	R	R	C2	R	R	R	R
L2.5	R	R	R	R	D1	R	R	R	R
C2.6	R	R	R	R	K1	R	R	R	R
L3.1	R	R	R	R	M2	R	R	R	R
L3.2	R	R	R	R	M4	R	R	R	R
L3.3	R	R	R	R	M7	S	S	S	S
L4.1	R	R	R	S	T8	S	S	S	S

หมายเหตุ R = Resistant

S = Sensitivity

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติค

ในการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติคจากตัวอย่างผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้าน ได้แก่ ผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจำนวน 2 ตัวอย่าง และผลิตภัณฑ์ผักดอง 3 ตัวอย่าง สามารถจำแนกได้ 32 สายพันธุ์ มีรูปร่างแท่งยาวและรูปกลม

2. คุณสมบัติทางกระบวนการเมตาบอลิสม

2.1 การใช้น้ำตาลซูโครสและแลคโตส

จากการตรวจสอบความสามารถในการใช้น้ำตาลซูโครสและแลคโตสพบว่าแบคทีเรียแลคติคทุกสายพันธุ์สามารถหมักน้ำตาลซูโครสได้ ขณะที่สายพันธุ์ L4.6 และ L4.7 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์ผักดองไม่สามารถหมักน้ำตาลแลคโตส

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติค

ปริมาณกรดแลคติคที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นอยู่ในช่วง 0.40-1.73 เปอร์เซนต์ โดยที่แบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ L3.1 สามารถสร้างกรดได้สูงสุด ส่วนสายพันธุ์ M7 สร้างกรดได้ต่ำสุด

2.3 การสร้างกาซ

แบคทีเรียแลคติคมีลักษณะเป็น Homofermentative bacteria เนื่องจากไม่มีแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ใดที่สร้างกาซ

2.4 การย่อยเคซีน

เมื่อทำการตรวจสอบคุณสมบัติในการย่อยสลายเคซีนของแบคทีเรียแลคติค พบว่ามีเพียงสายพันธุ์ C1.1 สามารถใช้เคซีนได้ ส่วนแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์อื่น ๆ ไม่สามารถใช้เคซีน

2.5 การใช้ซิเตรทและการสร้างไดอะเซททิล

จากการตรวจสอบการใช้ซิเตรทและการสร้างไดอะเซททิลโดยวิธี VP test พบว่าแบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่สามารถใช้ซิเตรทและสร้างไดอะเซททิล โดยสามารถแบ่งออกได้เป็น 4 กลุ่ม ดังนี้คือ

1) แบคทีเรียแลคติคที่สามารถใช้ซิเตรทและสร้างไดอะเซททิล จำนวน 17 สายพันธุ์
2) แบคทีเรียแลคติคที่สามารถใช้ซิเตรทแต่ไม่สร้างไดอะเซททิล จำนวน 5 สายพันธุ์
3) แบคทีเรียแลคติคที่ไม่สามารถใช้ซิเตรทแต่สร้างไดอะเซททิล จำนวน 7 สายพันธุ์
4) แบคทีเรียแลคติคที่ไม่สามารถใช้ซิเตรทและสร้างไดอะเซททิล จำนวน 3 สายพันธุ์

3. การต้านทานยาปฏิชีวนะ

จากการตรวจสอบการต้านทานยาปฏิชีวนะแอมพิซิลลิน กานามัยซิน และเตตร้าซัยคลิน ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่าแบคทีเรียแลคติคส่วนใหญ่ไวต่อสารปฏิชีวนะดังกล่าวที่ความเข้มข้น 20, 30, 30 และ 30 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

จากการพิจารณาคุณสมบัติทางกระบวนการเมตาบอลิสมพบว่า แบคทีเรียแลคติคทุกสายพันธุ์สามารถใช้น้ำตาลซูโครส และไม่สร้างกาซในระหว่างการหมัก จึงเหมาะที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมัก เนื่องจากสามารถใช้น้ำตาลซูโครสซึ่งหาได้ง่ายและมีราคาถูกเป็นวัตถุดิบในการผลิตได้ และผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียแลคติคเหล่านี้จะมีลักษณะเนื้อสัมผัสดี ไม่มีโพรงอากาศภายใน แต่อย่างไรก็ตามพบว่าแบคทีเรียแลคติคบางสายพันธุ์แม้จะมีคุณสมบัติดังที่กล่าวมา แต่ก็ไม่เหมาะที่จะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมัก เพราะขาดคุณสมบัติที่ดีบางประการ ได้แก่ ความสามารถในการสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว การย่อยสลายเคซีน และการสร้างกลิ่นรส เช่น สายพันธุ์ C1.4, C1.5, L2.4, L4.6 และ A5

แบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติดีเพียงพอสำหรับการจะนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์เนื้อหมักคือ สายพันธุ์ C1.1 ทั้งนี้เนื่องจากสามารถย่อยสลายเคซีนทำให้ได้เปปไทด์สายสั้น ๆ และกรดอะมิโนที่เป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโต ส่วนสายพันธุ์ที่ควรจะนำ

ไปใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผลิตภัณฑ์ผักดองคือ สายพันธุ์ L3.1 เพราะเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว และยังสามารถใช้ซิเตรทสร้างไดอะเซททิลที่เป็นสารให้กลิ่นรสที่ดีแก่ผลิตภัณฑ์อีกด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก พบว่าแบคทีเรียแลคติคบางสายพันธุ์มีคุณสมบัติดีพอสำหรับการนำไปใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารหมัก จึงควรจะทำการศึกษาคุณสมบัติต่าง ๆ เพิ่มเติม เช่น อุณหภูมิและพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ความสามารถในการทนต่อความเข้มข้นของเกลือ การต้านทานต่ออิออนของโลหะหนัก และการต้านทานต่อฟาจก์ เป็นต้น นอกจากนี้ควรที่จะนำแบคทีเรียแลคติคไปทดลองใช้ในการหมักผลิตภัณฑ์อาหาร เพื่อวิเคราะห์หาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดี

เอกสารอ้างอิง

เยาวลักษณ์ สุรพันธพิศิษฐ์. 2536. เทคโนโลยีเนื้อสัตว์และผลิตภัณฑ์. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร:โรงพิมพ์สหมิตรออฟเซต. 135 หน้า.

วริพัสย์ อารีกุล. 2535. บทบาทของแบคทีเรียแลคติคในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักและผลิตภัณฑ์อาหารสัตว์. สัมมนาระดับปริญญาตรี. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วริพัสย์ อารีกุล. 2536. การศึกษาคุณสมบัติพลาสมิดของแบคทีเรียแลคติคในผลิตภัณฑ์นมหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Andres, C. 1979. Starter culture reduces residual nitrite in bacon. Food Processing. 40(5):56-58.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic Acid Bacteria. In:Lactic Acid Bacteria, S. Salminen and A.V. Wright(eds.), pp.20-37,128-130. New York: Marcel Dekker, Inc.

Bacus, J.N., and Brown, W.L. 1981. Use of microbial culture : meat products. Food Technol. 35(1):74-83.

Bhowmik, T., and Marth, E.H. 1990. ε-Galactosidase of *Pediococcus* species:inductioon, purification and partial characterization. Appl. Microbiol. Biotechnol. 33:317-323.

Bissett, D.L., and Anderson, R.L. 1974. Lactose and D-galactose metabolism in group N streptococci : presence of enzymes for both the D-galactose 1-phosphate and D-tagatose 6-phosphate pathways. J.Bacteriol. 117:318v-320.

Brock, T.D., Smith, D.W., and Madigan, M.T. 1984. Biology of Micro organisms. 4th ed. New Jersey:Prentice-Hall, Inc. 847 pp.

Carl, s. 1979. Microbiology of Food Fermentation. 2nd ed. USA: The AVI Publishing Co. Inc. 384 pp.

Crueger, W. and Crueger, A. 1990. Biotechnology. 2nd ed. USA: Science Publishers. 357 pp.

Dryden, F.D., and Bridsall, J.J. 1980. Why nitrite dose not impart color. Food Technol. 34(7):29-42.

Dunn, C.G., and Prescott, S.C. 1959. Industrial Microbiology. 3rd ed. New York: McGraw-Hill Book Company, Inc. 945 pp.

Fox, P.F., Lucey, J.A., and cogan T.M. 1990. Glycolysis and related reactions during cheese manufacture and ripening. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 29:237-253.

Frazier, W.C., and Westhoff, D.C. 1988. Food Microbiology. 4th ed. Singapore: McGraw-Hill Co. 539 pp.

George, J. 1983. Basic Food Microbiology. USA: Saybrook Press, Inc. 781 pp.

Gupta, K.G., Chandiok, L., and Bhatnagar, L. 1973. Antibacterial activity of diacetyl and its influence on the keeping quality of milk. Zentralbl. Bakteriol› Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. 1: Orig. Reihe B. 158:202.

Harvey, R.J., and Collins, E.B. 1961. Role of citratase in acetoin formation by *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. J. Bactiriol. 82:954-959.

Ingram, M. 1975. The Lactic Acid Bacteria-A Broad View. In:Lactic Acid Bacteria in Baverage and Food, J.G. Carr, C.V. Cutting, and G.C. Whiting (eds.), pp. 1-7 London; William Clowes & Sons Limited.

James, M. 1992. Modern Food Microbiology. USA: Van Nostrand Reinhold. 701 pp.

Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl. Env. Microbiol. 44:525.

Kandler, O. 1983. Carbohydrate metabolism in Lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 49:209-224.

Kneteman, A. 1952. Enrichment and isolation of *Streptococcus citrophilus*. J. Microbiol. Serol. 18:275-290.

Konings, W.N., Polman, B., and Driessen, A.J.M. 1989. Bioenergetics and solute transport in Lactococci. Crit. Rev. Microbiol. 16:419-476.

Law, B.A., and Kolstad, J. 1983. Proteolytic systems in Lactic acid bacteria. Antonie van Leeuwenhoek. 49:225-245.

Lawrie, R.A. 1979. Meat Science. 3rd ed. London: William Clowes & Sons Limited. 451 pp.

Luh, B.S., and Woodroof, J.G. 1975. Commercial Vegetable Processing. Westport Conn.: The AVI Publishing Co. Inc. 311 pp.

Marshall, V.M. 1987. Lactic acid bacteria:staters for flavour. FEMS Microbiol. Rev. 46:327-336.

Premi, L., Sandine, W.E., and Elliker, P.R. 1972. Lactose-hydrolyzing enzymes of *Lactobacillus* species. Appl. Microbiol. 24:51-57.

Richard, G. 1992. The antimicrobial action of lactic acid bacteria: natural food Preservation systems. In: The Lactic Acid Bacteria., J.B. Brain, pp.211-225. Cambridge: The University Press.

Thomas, T.D., and Mills, O.E. 1981. Proteolytic enzymes of starter bacteria. Neth. Milk Dairy J. 35:255-273.

Thomas, T.D., Turner, K.W., and Crow, V.L. 1980. Galactose fermentation by *Streptococcus lactis* and *Streptococcus cremoris*:pathways, products and regulation. J. Bacteriol. 144:672-682.

Thomson, J., and Chassy,B.M. 1981. Uptake and metabolism of sucrose by *Streptococcus lactis*. J. Bacteriol. 147:543-551.

Tsutomu, K., Watanabe, Y., and Hideki, S. 1991. Characteristics of diacetyl production. Applied and Environmental Microbiology. 57(10):3040-3042.

Zaika, L.L., Zell, T.E., Smith, J.L., Palumbo, S.A., and Kissinger, J. C. 1976. The role of nitrite in Lebanon balogna, a fermented sausage. J.Food Sci. 41:1457-1460.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำยาเคมี

1. สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 MRS medium (Deman และคณะ)

Beef extract	10.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Glucose	20.0	กรัม
Potassium dihydrogen phosphate	2.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.4	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Tween 80	1.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

1.2 Kempler McKay medium (1980)

ส่วนที่ 1 (basal medium)

Skimmilk	10.0	กรัม
Casein hydrolysate	2.5	กรัม
Dextrose	5.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	920.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

ส่วนที่ 2

Potassium ferrocyanide	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ส่วนที่ 3

Ferric citrate	2.5	กรัม
Sodium citrate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	200.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

ผสมส่วนที่ 2 และ 3 อย่างละ 40 มิลลิลิตร ลงในส่วนที่ 1 920 มิลลิลิตร

1.3 Whey permeate medium (Limsowtin Tezaghi, 1976)

Skimmilk	15.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
Casitone	1.0	กรัม
β-Sodium glycerophosphate	20.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

1.4 Skimmilk

Skimmilk	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 116 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

2. น้ำยาเคมี

2.1 Voges-Proskauer test reagent

สารละลาย A

∝-naphthol	6.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100.0	มิลลิลิตร

สารละลาย B

Potassium hydroxide	16.0	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

2.2 ชุดสีสำหรับย้อมแกรม

Crystal violet

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethyl alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันดีแล้วเติม 1% Ammonium oxalate ในน้ำกลั่น 80 มิลลิลิตร

Gram iodine

Iodine	1.0	กรัม
Potassium iodine	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

Safranin O

Safranin	25.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	75.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข

การตรวจสอบการติดสีแกรม

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์มาเพาะเลี้ยงในอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ ย้อมสีด้วยสารละลาย crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เอียงสไลด์ เทสีทิ้งพร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนนาน 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้งพร้อมทั้งหยดแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซนต์ ล้างสีออกนาน 10-20 วินาที ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่นแล้วจึงย้อมสีด้วยสารละลาย safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจดูลักษณะเซลล์ และการจัดเรียงตัว โดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล	นางสาวนงนุช พงษ์เลาหพันธุ์
ภูมิลำเนา	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
วันเดือนปีเกิด	13 ธันวาคม 2516
ประวัติการศึกษา	สำเร็จชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนสตรีศรีสุริโยทัย เมื่อปี พ.ศ.2534
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปี พ.ศ.2538

ชื่อ-สกุล	นางสาวรัตนา จรัสศุภวัฒน์
ภูมิลำเนา	จังหวัดกรุงเทพมหานคร
วันเดือนปีเกิด	15 มกราคม 2517
ประวัติการศึกษา	สำเร็จชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย จากโรงเรียนมาแตร์เดอีวิทยาลัย เมื่อปี พ.ศ.2534
	สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต (อุตสาหกรรมเกษตร) จากคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง เมื่อปี พ.ศ.2538