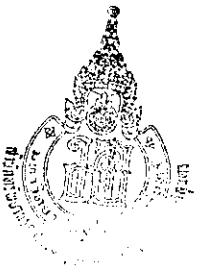


รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

เรื่อง

บทบาทของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้แบบดั้งเดิม

Roles of lactic acid bacteria isolated from traditional fermenting soybean curd (Sufu)

โดย

รศ.ดร.ประเสริฐ สันตินานาเลิศ

หัวหน้าโครงการวิจัย

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

ประจำปีงบประมาณ 2549-2550

1. ชื่อโครงการ

ภาษาไทย: บทบาทของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้แบบดั้งเดิม

ภาษาอังกฤษ: Roles of lactic acid bacteria isolated from traditional fermenting soybean curd (Sufu)

2. ชื่อสถาบันหรือหน่วยงานที่ขอรับทุน

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จ.สงขลา 90112

3. คณะผู้วิจัย

3.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

รศ. ดร. ประเสริฐ สันตินานาเลิศ

3.2 ผู้ร่วมโครงการวิจัย

ดร. อำไพทิพย์ สุขหอม

รศ. ดร. ดวงพร คันธโชติ

นางสาว สุพรรษา อุไรพันธ์

นางสาว ภารดา อุทโท

นางสาว วราภรณ์ บุญประเสริฐ

นางสาว สุวรรณดี เจตต์วราพงศ์

4. ประเภทของการวิจัย การวิจัยระดับพื้นฐานและประยุกต์

5. สาขาวิชาการและกลุ่มวิชาการที่ทำการวิจัย สาขาจุลชีววิทยาอาหาร

6. คำสำคัญ (Key words) ของโครงการวิจัย lactic acid bacteria, soybean curd, sufu

7. ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และ สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ปีงบประมาณ 25549-2550

สารบัญ

สารบัญ	หน้า
รายการตาราง	5
รายการรูป	6
บทคัดย่อ	8
Abstract	10
บทนำ	12
วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ	16
ผลการทดลอง	30
วิจารณ์ผลการทดลอง	69
สรุป	78
เอกสารอ้างอิง	79

รายการตาราง

ตารางที่		หน้า
1	การเติบโตของแบคทีเรียแลกติกบน MRS agar ที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ	40
2	การคัดแยกชนิดของโปรไบโอติกแลกติกแอซิดแบคทีเรีย	42
3	ผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติก	43
4	ผลการทดสอบสารยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ปรับ pH กับ *L. monocytogenes* DMST4553 โดยวิธี agar well diffusion assay	45
5	ผลการทดสอบสารยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ได้ปรับ pH กับ *L. monocytogenes* DMST4553 โดยวิธี agar well diffusion assay	46
6	การจำแนกแบคทีเรียแลกติก 126 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้	51
7	ตัวอย่างการทดสอบทางกายภาพและทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติก	52
8	การหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิดของแบคทีเรียแลกติก	53
9	การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ program computer API Web Stand Alone V. 1.1.0	55
10	ชนิดและปริมาณแร่ธาตุในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป	62
11	การตรวจหา *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป โดยใช้ TECRA BDE VIA	66
12	ปริมาณเชื้อที่หมักน้ำตาลแมนนิทอลและผลการตรวจหา Staphylococcal enterotoxin ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป	68

รายการรูป

รูปที่		หน้า
1	เต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักจากโรงงานเต้าหู้ยี้ใน อ.เมือง จ.สงขลา	18
2	เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปจำนวน 9 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในอำเภอหาดใหญ่ จ.สงขลา	18
3	ชุดทดสอบ TECRA *Bacillus* Dearrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay	27
4	ผลการตรวจหา BDE ของ *Bacillus* โดยใช้ TECRA BDE VIA	28
5	Card color ที่ใช้อ่านผลการตรวจหา BDE ของ *Bacillus*	28
6	TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins card	29
7	ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักเดียวกัน	31
8	ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กัน	32
9	ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป	33
10	การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่าง (pH) ของตัวอย่างเต้าหู้ยี้	33
11	ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้	35
12	ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กัน	35
13	ปริมาณ *Staphylococcus* ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป	36
14	ปริมาณเชื้อ *Bacillus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้	36
15	ปริมาณเชื้อ *Bacillus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กัน	37
16	ปริมาณ *Bacillus* ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป	37
17	ปริมาณ Black colony ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้	38
18	ปริมาณ Black colony ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กัน	38
19	ปริมาณ Black colony ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป	39
20	การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียแลกติก	42
21	ผลการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC25922 ของแบคทีเรียแลกติก	44
22	ผลการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST4553 ของ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก	44
23	การทดสอบสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกกับ *L. monocytogenes* DMST4553 โดยวิธี agar well diffusion	46
24	การทดสอบสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกกับเชื้อ *L. monocytogenes* DMST4553 หลังจากบ่มร่วมกับเอนไซม์	47

รายการรูป (ต่อ)

รูปที่		หน้า
25	การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียแลกติก	48
26	ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแลกติก	50
27	รูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีกรัมของแบคทีเรียแลกติก	50
28	การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ API 50 CHL	56
29	การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีการตรวจหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene	57
30	เปอร์เซ็นต์เกลือในน้ำและเนื้อของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก	59
31	เปอร์เซ็นต์เกลือในน้ำและเนื้อของตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป	60
32	SEM ของก้อนเต้าหู้ยี้	64
33	การตรวจหา Staphylococcal enterotoxins โดยใช้ TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins (SET)	67

บทคัดย่อ

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ บนอาหาร MRS agar ที่เติม 0.04% Bromocersol purple, 5 mg% sodium azide และเกลือ (NaCl) ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง 3.0×10^3 ถึง 7.0×10^7 CFU/กรัม บนอาหารที่ไม่เติมเกลือ โดยพบตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมักจนถึง 5 เดือน และพบแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง 1.1×10^4 ถึง 3.0×10^7 และ 1.9×10^3 ถึง 1.5×10^7 CFU/กรัม บนอาหารที่มีเกลือ 5% และ 10% ตามลำดับ โดยพบตั้งแต่ เริ่มต้นกระบวนการหมักจนถึง 8 เดือน แต่ตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes*

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ทั้งหมดมีจำนวน 126 สายพันธุ์ จัดเป็นแบคทีเรียทนเกลือจำนวน 83 สายพันธุ์ (65.9%) แบคทีเรียชอบเกลือ 43 สายพันธุ์ (34.1%) และแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ 50 สายพันธุ์ (39.7%) มีสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนและพบเพียง 2 สายพันธุ์ (1.6%) ที่สามารถย่อยไขมันได้ นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ยังมีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก โดยสามารถทนกรดและเกลือน้ำดี และมีบทบาทในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* TISTR687 และ *Listeria monocytogenes* DMST4553

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้บ่งชี้เป็นสกุล *Lactobacillus* จำนวน 67 สายพันธุ์ (53.2%) และ *Pediococcus* 59 สายพันธุ์ (46.8%) และเมื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 10 สายพันธุ์ ที่มีศักยภาพเป็นโปรไบโอติกมาบ่งชี้ชนิดโดยการทดสอบทางชีวเคมีโดยใช้ API 50CHL system พบว่าแบคทีเรียแลกติกดังกล่าวเป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus curvatus* (3 สายพันธุ์), *Lactobacillus delbrueckii* (3 สายพันธุ์), *Lactobacillus plantarum* (1 สายพันธุ์) และ *Pediococcus* (3 สายพันธุ์) และเมื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 2 สายพันธุ์ มาบ่งชี้โดยวิธีการตรวจหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene พบว่า *Lactobacillus curvatus* PS1240 บ่งชี้เป็น *Lactobacillus acidipicis* ส่วน *Pediococcus* PS1231 เป็น *Tetragenococcus halophilus* โดย *L. acidipiscis* ที่แยกได้มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *Listeria monocytogenes* DMST4553 ในส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยผลิตกรดแลกติกเป็นผลผลิตสุดท้ายในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค แต่ตรวจไม่พบแบคเทอริโอซิน

ส่วนการตรวจคุณภาพของเต้าหู้ยี้พบว่าตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีปริมาณแร่ธาตุ 12 ชนิด โดยเรียงตามลำดับปริมาณจากมากไปน้อยดังนี้ Mg, Ca, Li, Fe, Cu, Mn, Zn, Al, Ni, As, Pb และ Cd นอกจากนี้ยังได้ศึกษาโครงสร้างของเนื้อเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด SEM พบว่าเนื้อเต้าหู้ยี้หลังหมักมีรูพรุนขนาดใหญ่และจำนวนรูพรุนมากกว่าโครงสร้างของเนื้อเต้าหู้ก่อนหมัก

ส่วนการตรวจหา *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin (BDE) จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป 9 ตัวอย่าง โดยใช้ชุดทดสอบ TECRA *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay พบว่ามี 5 ตัวอย่าง (CSF1, CSF2, CSF6, CSF8 และ CSF9) ที่ตรวจพบ BDE เมื่อตรวจโดยใช้ enriched medium แต่ตรวจไม่พบ BDE โดยวิธี direct assay

ส่วนการตรวจหา Staphylococcal enterotoxin จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป โดยใช้ TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxin พบว่า ในทุกตัวอย่างตรวจไม่พบ Staphylococcal enterotoxin

ABSTRACT

The lactic acid bacteria (LAB) in fermenting soybean curds (sufu) were quantitated on MRS agar added with 0.04% Bromocresol purple, 5 mg% sodium azide and NaCl with varying concentrations. The LAB found during 5 months of fermentation were between 3.0 x 10^3 to 7.0 x 10^7 CFU/g on medium containing 0% NaCl and during 8 months of fermentation were between 1.1 x 10^4 to 3.0 x 10^7 CFU/g and 1.9 x 10^3 to 1.5 x 10^7 CFU/g on medium containing 5% NaCl and 10% NaCl, respectively. In addition, the foodborne bacteria as *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* were not detected

The 126 strains of the isolated LAB were 83 strains (65.9%) halotolerants and 43 strains (34.1%) of halophilic LAB. The 50 isolated strains (39.7%) could produce proteolytic enzymes and only 2 strains (1.6%) had lipolytic activity. The isolated LAB also showed probiotic properties in terms of acid and bile salts tolerance. The roles of the isolated LAB were able to antagonize indicator bacteria as *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* TISTR687 and *Listeria monocytogenes* DMST4553.

The isolated LAB were identified as 67 strains of *Lactobacillus* and 59 strains of *Pediococcus*. The 10 potential probiotic LAB strains were selected and identified biochemically using API 50CHL system as *Lactobacillus curvatus* (3 strains), *Lactobacillus delbrueckii* (3 strains), *Lactobacillus plantarum* (1 strain) and *Pediococcus* (3 strains). Additionally, identification using DNA sequence of 16S rRNA gene, the *Lactobacillus curvatus* PS1240 and *Pediococcus* PS1231 were identified as *Lactobacillus acidipiscis* and *Tetragenococcus halophilus*, respectively. The potential *L. acidipiscis* could produced lactic acid as a major end product but did not produce bacteriocin in the culture supernatant. However, the *L. acidipiscis* was able to inhibit the foodborne pathogen as *Listeria monocytogenes* DMST4553.

In term of quality, there were 12 metal ions found in the commercial sufu from high to low concentrations as follows Mg, Ca, Li, Fe, Cu, Mn, Zn, Al, Ni, As, Pb and Cd. And additionally, the microstructures of tofu and sufu were evaluated by using SEM, which showed many larger hallows in the commercial sufu than the homogeneous tofu.

All commercial sufu were also investigated for *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin (BDE) production by using TECRA *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay. The BDE was

found in five samples of commercial sufu (CSF1, CSF2, CSF6, CSF8 and CSF9) using enriched medium but could not be detected in the non-enriched medium by direct sample assay.

In addition, the Staphylococcal enterotoxin could not be detected by using TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins in all commercial sufu which showed safety from *Staphylococcus* food poisoning.

บทนำ

เต้าหู้ยี้มีต้นกำเนิดมาจากประเทศจีนในบริเวณตอนเหนือและตอนกลาง เป็นอาหารหมักพื้นเมืองของชาวจีนมานานนับศตวรรษและยังบริโภคกันอย่างแพร่หลายในประเทศต่างๆ ในทวีปเอเชีย โดยนำมาบริโภคกับข้าวต้ม หรือเป็นเครื่องปรุงรสในอาหารประเภทสุกี้ เต้าหู้ยี้มีชื่อเรียกหลากหลายตามภาษาท้องถิ่นว่า sufu, furu หรือ doufuru (จีน) และ tofuyo หรือ nyu-fu (ญี่ปุ่น), choa (เวียตนาม), ta-huri (ฟิลิปปินส์), taokaoan (อินโดนีเซีย) และ tao-hu-yi (ไทย) (Han *et al.*, 2001) กระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้มีหลายวิธีซึ่งแตกต่างกันไปตามสูตรของแต่ละโรงงานเนื่องจากได้รับการถ่ายทอดมาในระบบครอบครัว แต่สำหรับการผลิตเต้าหู้ยี้แบบธรรมชาติทำโดยการเตรียมหัวเชื้อราจากข้าวที่หุงสุกแล้วทิ้งให้เย็น เกลี่ยลงบนกระด้ง วางทิ้งไว้ 7-15 วันในห้องเฉพาะซึ่งมีเชื้อราประจำถิ่นอยู่ในห้อง จากนั้นเตรียมเต้าหู้โดยใช้ถั่วเหลืองแช่น้ำ 6 ชม. นำไปบดในโม่หิน ต้มให้เดือดในน้ำ กรองเอาเปลือกออกแล้วใส่ magnesium sulfate วางทิ้งไว้ให้ตกตะกอนในบล็อก เมื่อเต้าหู้แข็งตัวให้ตัดเต้าหู้เป็นชิ้นยาว นำไปแช่น้ำเกลือ แล้วตัดเป็นชิ้นขนาด 3 x 3 x 2.5 ซม. นำเต้าหู้และหัวเชื้อที่เตรียมไว้เรียงใส่โอ่งที่มีฝาปิด โดยวางเรียงสลับกันระหว่างเต้าหู้และหัวเชื้อพร้อมโรยเกลือ หมักทิ้งไว้กลางแดดเป็นเวลา 9 เดือน จะได้เต้าหู้ยี้ที่มีกลิ่นรสชาติที่ดี มีสีเหลือง (ประเสริฐและคณะ, 2548) ส่วนในกรณีการผลิตเต้าหู้ยี้แดง ให้ใส่เชื้อรา *Monascus purpureus* ซึ่งให้สารสีแดงของ monascarubrin แล้วบ่มต่ออีก 40-60 วัน ทำให้เกิดสีแดงน่ารับประทานยิ่งขึ้น ซึ่งทำให้นิยมรับประทานและใส่ในเย็นตาโฟเพื่อเพิ่มรสชาติ จากนั้นนำไปบรรจุขวดและผ่านการต้มในน้ำเดือดหรือพาสเจอร์ไรส์เพื่อฆ่าเชื้อก่อนนำไปจำหน่ายหรือบริโภค (ลัดดาวัลย์, 2536)

การผลิตเต้าหู้ยี้ของโรงงานเต้าหู้ยี้ที่ใช้ศึกษาในครั้งนี้คือ ตัดเต้าหู้แข็งเป็นชิ้นยาว นำไปแช่น้ำเกลือ แล้วหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 3 x 3 x 2.5 ซม. แล้วเตรียมหัวเชื้อโดยใช้ข้าวที่หุงสุก วางทิ้งไว้ให้เย็น แล้วเกลี่ยบนกระด้งวางทิ้งไว้ประมาณ 7-15 วัน เพื่อให้เชื้อราตามธรรมชาติในห้อง เติบโตได้เต็มที่ นำเต้าหู้และหัวเชื้อเรียงใส่โอ่งที่มีฝาปิด โดยให้ข้าวอยู่ชั้นล่าง วางเรียงสลับกับเต้าหู้ หมักทิ้งไว้ 9 เดือน ระหว่างการหมักเปิดฝาขณะมีแสงแดด เติมน้ำที่ผสม น้ำตาลโตนด เป็นระยะ เมื่อครบ 9 เดือน จะได้เต้าหู้ยี้ที่มี กลิ่น รสดี และมีสีเหลือง นำไปบรรจุขวด แล้วนำไปต้มฆ่าเชื้อ ที่อุณหภูมิ 100°C เป็นเวลา 10 นาที

เนื่องจากเต้าหู้ยี้เป็นแหล่งของอาหารโปรตีน การย่อยสลายโปรตีนใช้เวลา 3-9 เดือน เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลใหญ่ของโปรตีนเป็น peptide, amino acids, amines และ ammonia ทำให้เพิ่มปริมาณกลิ่นรส (Han *et al.*, 2003) ปริมาณกรดอะมิโนในเต้าหู้ยี้แต่ละประเภทมีไม่เท่ากัน กรดอะมิโนที่มีมากในเต้าหู้ยี้แดงได้แก่ glutamic acid, aspartic acid, isoleucine, lysine, cystine, phenylalanine และ tyrosine ในขณะที่กรดอะมิโนที่มีปริมาณสูงในเต้าหู้ยี้ชนิดอื่นได้แก่ glutamic

acid, isoleucine, alanine, aspartic acid, phenylalanine, leucine, alanine, aspartic acid, isoleucine และ valine (Han *et al.*, 2001)

คุณค่าทางโภชนาการของเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (รายงานเป็นกรัมหรือมก. ต่อ100 กรัม น้ำหนักเปียก) ประกอบด้วยโปรตีน 12-17 กรัม, ไขมัน 8-12 กรัม, เส้นใย 0.2-1.5 กรัม, คาร์โบไฮเดรต 6-12 กรัม, ขี้เถ้า 4-9 กรัม, calcium 100-230 มก., phosphorus 150-300 มก., iron 7-16 มก. นอกจากนี้ยังมี thiamin (V_{B1}) 0.04-0.09 มก. riboflavin (V_{B2}) 0.13-0.36 มก. niacin 0.5-1.2 มก. vitamin B12 1.7-2.2 มก.

ในระยะช่วง 10 ปีที่ผ่านมานี้ได้มีนักวิจัยให้ความสำคัญเกี่ยวกับการศึกษารายละเอียดของกระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้มากขึ้น ดังบทความปริทัศน์ และบทความวิจัยของ Han และคณะ (2001) (2003) (2004) และ Chung และคณะ.(2005)

Han และคณะ (2001) ได้ศึกษาการผลิตเต้าหู้ยี้ ที่ผลิตในประเทศจีน แล้วได้ทำการแบ่งเต้าหู้ยี้เป็น 3 ประเภทใหญ่ ๆ ตามกระบวนการผลิต สี และกลิ่นรส โดยกระบวนการผลิตสามารถแบ่งเต้าหู้ยี้ได้เป็น เต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักด้วยเชื้อรา เต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักด้วยแบคทีเรีย เต้าหู้ยี้ที่ใช้เอนไซม์ในการทำให้สุก และเต้าหู้ยี้ที่ได้จากการหมักแบบธรรมชาติ ส่วนสีของเต้าหู้ยี้ขึ้นอยู่กับส่วนผสม เช่นเต้าหู้ยี้แดง เต้าหู้ยี้ขาว เต้าหู้ยี้เทา และได้ศึกษากระบวนการผลิตเต้าหู้ยี้ องค์ประกอบทางเคมี กรดอะมิโน และสารที่ให้เกิดกลิ่นรสในเต้าหู้ยี้

Han และคณะ (2001) ได้ศึกษาความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาและคุณภาพของเต้าหู้ยี้ 3 ชนิด จำนวน 23 ตัวอย่าง พบว่าในเต้าหู้ยี้มีปริมาณ NaCl, ethanol, glucose และ fructose ระหว่าง 6.2-14.8%, 0.5-6.3%, 0-6.2% และ 0-4.8% ตามลำดับ พบแบคทีเรียที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางและในสภาวะที่มีออกซิเจน และแบคทีเรียสร้างสร้างสปอร์จำนวนมาก (>10^5 CFU/g) ในตัวอย่างส่วนใหญ่ที่ทำการศึกษา เมื่อบ่งชี้แล้วพบว่า 85% ของแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียกรัมบวก และตรวจพบแบคทีเรียแลกติก 2 ตัวอย่าง จำนวน 10^5 และ 10^7 CFU/g บ่งชี้แล้วเป็นแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* และมี 3 ตัวอย่างที่ตรวจพบ *Bacillus cereus* มากกว่า 10^5 CFU/g และตรวจพบ *Clostridium perfringens* จำนวน <10^3 CFU/g มีเพียง 1 ตัวอย่างเท่านั้นที่ตรวจพบประมาณ 10^5 CFU/g แต่ตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus*, Fungi, *Enterobacteriaceae* และ *Listeria monocytogenes.*

Han และคณะ (2003) ได้ศึกษาผลของ NaCl ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายนอก การย่อยสลายโปรตีน และไขมัน ระหว่างกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ พบว่า NaCl มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างภายนอกของเต้าหู้ยี้ การย่อยสลายโปรตีนและไขมัน โดยเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือเป็นส่วนประกอบ 14% (w/w) มีผลต่อการเพิ่มความแข็ง (+100%) ความยืดหยุ่น (+18%) และลดการเกาะติด (-30%) จากการทำ SDS-PAGE ตรวจไม่พบโปรตีนในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือ 80 และ 100 g/kg แต่

พบหน่วยย่อยของโปรตีนในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือ 140 g/kg ในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือน้อยกว่า 80 g/kg ตรวจพบอัตราส่วนของ free amino nitrogen (FAN) และ ไนโตรเจนทั้งหมด (TN) เท่ากับ 0.4-0.45, กรดอะมิโนอิสระ (FAA) และ crude protein (CP) เท่ากับ 0.24-0.26 และพบว่าในเต้าหู้ยี้ขาวที่มีส่วนผสมของเกลือ และแอลกอฮอล์เพียงอย่างเดียว มีอัตราส่วนของ FAN/TN และ FAA/CP สูงกว่าในเต้าหู้ยี้แดงที่มีส่วนผสมของอังก๊กด้วย

Han และคณะ (2004) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ โดยตรวจพบ total counts of mesophilic aerobic bacteria (TMAB), bacterial endospores, *Bacillus cereus*, lactic acid bacteria (LAB), *Enterobacteriaceae* และ เชื้อราบนก้อนเต้าหู้ (pehtze) (pehtze อ่านว่า pizi) และมีปริมาณเชื้อมากขึ้นบน pehtze แล้วลดลงเมื่อเติมเกลือลงไปกระบวนการหมัก โดยในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือ 8% ถึง 11% พบว่า TMAB และ bacterial endospores ลดลงเหลือประมาณ 10^6 CFU/g ส่วน *B. cereus* ลดลงเหลือประมาณ 10^3 CFU/g และ LAB ลดลงเหลือน้อยกว่า 10^2 CFU/g แต่เพิ่มขึ้นเป็น 10^9 CFU/g ในเต้าหู้ยี้ที่มีเกลือ 5% ส่วน *Enterobacteriaceae* และ fungi ลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบหลังจากการหมักเป็นเวลา 20 และ 30 วัน

Chung และคณะ (2005) ได้ศึกษาองค์ประกอบที่มีผลต่อกลิ่นรสในเต้าหู้ยี้ 3 ชนิด โดยสกัดสารที่เป็นของเหลวแล้วนำไปวิเคราะห์โดย gas chromatography mass spectrometry (GC-Mass spectrometry) พบว่ามีสารประกอบ 83 ชนิด โดยมี 68 ชนิดที่พบได้ในเต้าหู้ยี้ทั้ง 3 ตัวอย่าง สารหลักที่ให้กลิ่นรสประกอบด้วย alcohol 17 ชนิด, acids 15 ชนิด, esters 16 ชนิด และสารประกอบอื่นๆ ได้แก่ aldehydes 17 ชนิด, alkanes 5 ชนิด, ketones 3 ชนิด และ furans 2 ชนิด

เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบในเต้าหู้ยี้ ได้แก่ เชื้อรา *Actinomucor elegans*, *Mucor sufu*, *M. hiemalis*, *M. silvaticus*, *M. subtilissimus* , *A. taiwanensis* (Chou *et al.*, 1988) และ *Rhizopus* sp. (Han *et al.*, 2001) ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจพบ ได้แก่ *Bacillus* และ *Micrococcus* (Han *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2004) และเมื่อเร็ว ๆ นี้ ประเสริฐ และคณะ (2548) ได้รายงานชนิดของจุลินทรีย์ที่ตรวจพบจากกระบวนหมักเต้าหู้ยี้ ได้แก่ *Aspergillus*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Bacillus*, *Pediococcus* และ *Saccharomyces* นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียแลกติกที่ทนเกลือ (NaCl) ความเข้มข้น 5-10% ตลอดระยะเวลาหมักในปริมาณ 10^3 ถึง 10^5 CFU/g จากการตรวจพบแบคทีเรียแลกติกในเต้าหู้ยี้เป็นจำนวนมาก จึงนำมาซึ่งความสนใจที่จะศึกษาบทบาทของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ โดยเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้ตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมักจนถึงได้เป็นผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป แล้วนำมาตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแลกติก ทดสอบคุณสมบัติโปรไบโอติก การยับยั้งเชื้อก่อโรค ตรวจหากรดแลกติก และบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ และนอกจากนี้ยังตรวจปริมาณแร่ธาตุและโครงสร้างของเนื้อเต้าหู้ยี้อีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. ตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้
2. ตรวจหาเชื้อแบคทีเรียที่อาจก่อโรคในอาหาร
3. คัดแยกชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก
4. ตรวจหาแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน
5. บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้
6. ตรวจคุณภาพของเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปในด้านปริมาณแร่ธาตุและโครงสร้างของเต้าหู้ยี้ก่อนและหลังหมัก

ประโยชน์ที่รับจากงานวิจัย

โรงงานผลิตเต้าหู้ยี้ที่ปัจจุบันเป็นโรงงานขนาดเล็กและส่วนใหญ่เป็นอุตสาหกรรมในครัวเรือน สามารถนำข้อมูลวิจัยไปพัฒนากระบวนการผลิต เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพและปราศจากจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหาร

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

วิธีการทดลอง

1. การเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้

เก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้ประมาณ 200 กรัม จากตุ่มหมักเดียวกันของโรงงานเต้าหู้ยี้ อ.เมือง จ.สงขลา โดยเก็บตัวอย่างทุกเดือนตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก เดือน 1-9 (9 ตัวอย่าง) (FSF1- FSF9) (รูปที่ 1) และตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในถังหมักอื่น เพื่อเปรียบเทียบอีก จำนวน 9 ตัวอย่าง (FSF10-FSF18) พร้อมทั้งเก็บตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปอีก 9 ตัวอย่าง (CSF1-CSF9) (รูปที่ 2) ที่วางขายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้าใน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา รวมทั้งหมด 27 ตัวอย่าง โดยมีรหัสตัวอย่างเต้าหู้ยี้ดังนี้

1.1 เต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก เขียนชื่อย่อว่า FSF (Fermenting Sufu)

FSF1 = เต้าหู้ยี้อายุ 1 เดือน
FSF2 = เต้าหู้ยี้อายุ 2 เดือน
FSF3 = เต้าหู้ยี้อายุ 3 เดือน
FSF4 = เต้าหู้ยี้อายุ 4 เดือน
FSF5 = เต้าหู้ยี้อายุ 5 เดือน
FSF6 = เต้าหู้ยี้อายุ 6 เดือน
FSF7 = เต้าหู้ยี้อายุ 7 เดือน
FSF8 = เต้าหู้ยี้อายุ 8 เดือน
FSF9 = เต้าหู้ยี้อายุ 9 เดือน

1.2 เต้าหู้ยี้ในถังหมักอื่น เพื่อเปรียบเทียบ

FSF10 = เต้าหู้ยี้อายุ 1 เดือน
FSF11 = เต้าหู้ยี้อายุ 2 เดือน
FSF12 = เต้าหู้ยี้อายุ 3 เดือน
FSF13 = เต้าหู้ยี้อายุ 4 เดือน
FSF14 = เต้าหู้ยี้อายุ 5 เดือน
FSF15 = เต้าหู้ยี้อายุ 6 เดือน

FSF16 = เต้าหู้ยี้อายุ 7 เดือน

FSF17 = เต้าหู้ยี้อายุ 8 เดือน

FSF18 = เต้าหู้ยี้อายุ 9 เดือน

1.3 เต้าหู้ยี้สำเร็จรูป เขียนชื่อย่อว่า CSF (Commercial Sufu)

CSF1 = เต้าหู้ยี้เหลือง อ. เมือง จ. สงขลา

CSF2 = เต้าหู้ยี้แดง ตราเด็กขี่กิเลน ผลิตโดยบริษัท วิสุอุตสาหกรรม จำกัด อ. เมือง จ. สมุทรสาคร

CSF3 = เต้าหู้ยี้แดง บริษัทปันยุไทฟงฟู้ดสตัฟลิมีเต็ด ประเทศจีน ผู้แทนจำหน่าย โดยบริษัท ที.ซี. วาย. อินเตอร์เทรด จำกัด

CSF4 = เต้าหู้ยี้แดง ตรา อ๊วงโหว ผู้จัดจำหน่าย ห้างหุ้นส่วนจำกัด สมวรณี แขวง บางมด เขตทุ่งครุ กรุงเทพมหานคร

CSF5 = เต้าหู้ยี้เหลือง บริษัท Huang Dah Mu Food Co., Ltd. ไต้หวัน

CSF6 = เต้าหู้ยี้เหลือง บริษัท Hong Kong Long Food Co., Ltd. จีน

CSF7 = เต้าหู้ยี้แดง จีน

CSF8 = เต้าหู้ยี้เหลือง ตรา New sun จีน

CSF9 = เต้าหู้ยี้เหลือง ไต้หวัน

รูปที่ 1 เต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักจากโรงงานเต้าหู้ยี้ใน อ.เมือง จ.สงขลา

รูปที่ 2 เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปจำนวน 9 ตัวอย่าง ที่จำหน่ายในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

2. การแยกแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างเต้าหู้ยี้

การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียแลกติก โดยชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 25 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อ บีบให้เต้าหู้ยี้ละเอียดแล้วเติมอาหาร MRS broth ที่มีเกลือ (NaCl) 5% จำนวน 225 มล. แล้วเจือจาง 10 เท่า เป็นลำดับใน MRS broth ที่เติมเกลือ 5% แล้วดูดมา 0.1 มล. กระจายเชื้อบน MRS agar ที่เติม 0.04% bromocresol purple, 5 mg% sodium azide และเกลือความเข้มข้น 0, 5 และ 10% ตามลำดับ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3-5 วัน ตรวจดูผลทุกวัน คัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน โดยดูจากสีและขนาด และไม่ผลิตเอนไซม์ catalase ทำเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหาร MRS agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นเหมาะสม ตามที่แยกได้ครั้งแรก แล้วเก็บรักษาเชื้อไว้ใน stab MRS agar ที่ 4°C นอกจากนี้วัด pH (ความเป็นกรดด่าง) ของตัวอย่างเต้าหู้ยี้โดยใช้ pH meter และในทุกการทดลองได้ทำซ้ำ 2 ครั้ง แล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

3. การตรวจหาแบคทีเรียที่อาจก่อโรค

การตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคโดยใช้ช้อนปราศจากเชื้อชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 25 กรัม ใส่ในถุงปราศจากเชื้อ บีบให้เต้าหู้ยี้ละเอียดแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB (Tryptic soy broth) จำนวน 225 มล. แล้วเจือจาง 10 เท่าเป็นลำดับ โดยใช้ TSB แล้วดูด 0.1 มล. กระจายเชื้อบน MacConkey agar, MYP (Mannitol-egg yolk-polymyxin agar), MSA (Mannitol salt agar) และ Oxford agar เพื่อตรวจหา *Escherichia coli, Bacillus cereus, Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes* ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. ตรวจนับปริมาณเชื้อแล้วทดสอบทางชีวเคมีบางชนิดเพื่อบ่งชี้สายพันธุ์ในเบื้องต้น นอกจากนี้ยังตรวจหา *E. coli* โดยวิธี MPN methods อีกด้วย

4. คัดแยกชนิดโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก (du Toit *et al.*, 1998)

4.1 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี โดย streak เชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร MRS agar ที่มีเกลือน้ำดี (bile salts) 0.15% และ 0.30% จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจดูผลการทนเกลือน้ำดี

4.2 ทดสอบการทนกรดโดยถ่ายเชื้อใส่ MRS broth ที่มี pH 2, 3 และ 4 ตามลำดับ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นตรวจสอบการทนกรดโดยดูความขุ่นเปรียบเทียบกับอาหารที่ไม่ได้เติมเชื้อ

4.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน

4.3.1 การทดสอบการย่อยโปรตีน

การทดสอบการย่อยโปรตีน ทำโดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน Nutrient agar (NA) + 1% skim milk และ NA+ 1% gelatin และเติม supplements (ภาคผนวก ก 9 และ ก 2) ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งสองชนิด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชม. ตรวจดูการเติบโตโดยเชื้อที่สามารถย่อยโปรตีนได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี วัดความสามารถในการย่อยสลายเป็นดีกรีของการย่อยสลายซึ่งเท่ากับความกว้างของเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใส (มม.) หารด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (มม.)

4.3.2 การทดสอบการย่อยแป้ง

การทดสอบการย่อยแป้ง ทำโดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน NA + 1% corn starch ที่การเติม supplements (ภาคผนวก ก10) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชม. ตรวจดูการเติบโตโดยหยด Lugol's iodine ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเชื้อที่สามารถย่อยแป้งได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี วัดความสามารถในการย่อยสลายเป็นดีกรีของการย่อยสลาย

4.3.3 การทดสอบการย่อยไขมัน

การทดสอบการย่อยไขมันทำได้โดยใช้ไม้จิ้มฟันปราศจากเชื้อป้ายเชื้อที่ต้องการทดสอบ ลงบน NA + 1% tributyrin ที่มีการเติม supplements (ภาคผนวก ก11) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48-72 ชม. โดยเชื้อที่สามารถย่อยไขมันได้จะเกิดวงใสรอบโคโลนี วัดความสามารถในการย่อยสลายเป็นดีกรีของการย่อยสลาย

4.4 การทดสอบความสามารถในการเติบโตในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดย streak เชื้อที่ต้องการทดสอบบนอาหาร MRS agar แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. ภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจนโดยใช้ anaerobic jar

5. คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

5.1 การเตรียมแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (indicator bacteria)

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์สายพันธุ์มาตรฐานที่ใช้เพื่อการทดสอบคุณสมบัติการยับยั้งเชื้อได้แก่ *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Bacillus cereus* TISTR687, และ *Listeria monocytogenes* DMST4553 (กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์) ที่เก็บอยู่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์ นำเชื้อมา ลากลงบน TSA นำไปบ่มในสภาวะที่เหมาะสมกับเชื้อนั้นๆ แล้วเขี่ยเชื้อที่เติบโตเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ นำมาปรับความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland โดยใช้น้ำเกลือ (normal saline) ความเข้มข้น 0.85% ในการปรับความขุ่นจะได้จำนวนเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml ดูดเชื้อ 0.1 มล. (10^7 CFU) มาเติมในอาหาร TSB soft agar (0.7% วุ้น) ปริมาตร 7 มล. ผสมให้เข้ากันสุดท้าย จะได้เชื้ออินดิเคเตอร์ที่มีความเข้มข้นของเซลล์ประมาณ 10^6 CFU/ml นำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

5.2 การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar spot assay (de Carvalho *et al*., 2006)

การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar spot assay ทำได้โดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่เพาะเลี้ยงใหม่ๆ (fresh culture) ใน MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. นำมาปรับให้มีความขุ่นเป็น 0.5 McFarland (10^8 CFU/ml) จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งของเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยใช้ไมโครปิเปตดูดแบคทีเรียแลกติกเริ่มต้นในอาหารเหลว 5 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหาร MRS agar ห่างกันหยดละ 3 ซม. บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำมาเททับผิวหน้าด้วยอาหาร TSB soft agar (0.7% วุ้น) ซึ่งมีจำนวนเชื้ออินดิเคเตอร์ประมาณ 10^6 CFU/ml วางทิ้งไว้ให้แข็งนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับอินดิเคเตอร์แต่ละชนิด เป็นเวลา 24 ชม. วัดผลการยับยั้งโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของขอบวงใส (มม)

5.3 การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar well diffusion assay (Ammor *et al*, 2006)

การทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี Agar well diffusion assay โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลกติก subculture ลงบนอาหาร MRS agar แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 35°C ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่เติบโตเป็นโคโลนีเดี่ยวๆ มา 2 loop เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งของส่วนใส (cell-free supernatant) ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกต่อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยการนำจานอาหาร TSA มาเททับด้วย TSB soft agar (0.7% วุ้น) ปริมาณอาหาร 7 มล. ซึ่งมีอินดิเคเตอร์จำนวนประมาณ 10^6 CFU/ml วางทิ้งไว้ให้แข็ง เจาะหลุมวุ้นด้วย tip ปราศจากเชื้อ (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8.9 มม.) ห่างกันประมาณหลุมละ 3 ซม. เติมส่วนใสที่ปั่นแยกเซลล์ออกแล้วลงไปหลุมละ 80 ไมโครลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. วัดผลการยับยั้งโดยวัดเส้นผ่าศูนย์กลางของขอบวงใส (มม.)

6. การบ่งชี้ชนิดของสารยับยั้ง

การบ่งชี้ชนิดของสารยับยั้งโดยคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ได้จากการทดลอง 5.3 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 48 ชม. ปั่นแยกเซลล์ ที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใส มาปรับ pH 7 และกรองด้วยกระดาษกรอง (millipore) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร และอีกส่วนไม่ต้องปรับ pH แบ่งส่วนใสใส่หลอดนำไปชั่งน้ำหนัก เพิ่มความเข้มข้นโดยแช่แข็งแล้วทำให้แห้ง (lyophilisation) แล้วนำมาชั่งน้ำหนักที่เหลือ ปรับความเข้มข้นให้ได้เป็น 10 เท่า โดยใช้น้ำกลั่นปราศจากเชื้อจากนั้นนำมาทำสอบสารยับยั้งที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลกติกโดยการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ด้วยวิธี agar well diffusion assay (ข้อ 5.3) (de Carvalho *et al*., 2006)

6.1 การทดสอบสารยับยั้งที่เป็นกรด

การทดสอบสารยับยั้งที่เป็นกรดทำได้โดยเติมส่วนใสที่ปรับและไม่ปรับ pH ปริมาตร 80 ไมโครลิตร ลงในหลุม TSA plate ที่ราดด้วย TSB soft agar ซึ่งมีเชื้อ *L. monocytogenes* ผสมอยู่ บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจสารยับยั้งที่เป็นกรดโดยดูจากการหายไปของวงใสของส่วนใสที่ปรับ pH เปรียบเทียบกับวงใสที่เกิดจากกรด

6.2 การทดสอบสารยับยั้งที่เป็น bacteriocin และ H_2O_2

การทดสอบหา bacteriocin โดยการนำส่วนใส ที่ปรับ pH 7 และไม่ปรับ pH มาบ่มร่วมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ (1 mg/ml) เนื่องจากได้มีรายงานว่ามีแบคเทอริโอซินบางชนิดทำงานได้ดีในสภาพ pH ต่ำ เอนไซม์ที่ใช้ได้แก่ pepsin, trypsin, proteinase K, lipase, α - amylase และ catalase โดยดูด ส่วนใส 60 ไมโครลิตร และเอนไซม์ 20 ไมโครลิตร ใส่ใน eppendoff บ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 2 ชม. (Millette *et al.*, 2007) ทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดย agar well diffusion assay โดยใช้เอนไซม์และส่วนใสที่ไม่ได้ทดสอบร่วมกับเอนไซม์เป็น control อ่านผลการทดสอบโดยดูวงใสที่หายไปหรือลดขนาดลงหรือวงใสคงเดิม

7. ตรวจหาปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติก (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์)

คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อก่อโรคมาตรวจหากรดแลกติกและกรดอะซิติก โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกใน MRS broth ปริมาตร 50 มล. บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 และ 48 ชม.จากนั้นทำการเก็บเชื้อปริมาตร 10 มล. แล้วปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 6,000 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที อุณหภูมิ 4°C นำส่วนใสที่ได้มากรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.2 ไมโครลิตร แล้วเติม acetone และ methanol เพื่อเปลี่ยนกรดแลกติกเป็น methylester แล้วฉีดเข้า เครื่อง Gas Chromatography HP 6850 โดยใช้ column HP 6850, inlet temperature 250°C, oven initial temperature 70°C และ detector temperature 300°C, hydrogen flow 30.0 มล./min และ air flow 300 มล./min และใช้ flame ionization detector

8. บ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติก โดยนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มาย้อมสีกรัม การสร้างเอนไซม์ catalase ส่วนการจำแนกแบคทีเรียแลกติกในระดับจีนัส (Axelsson, 1993) โดยอาศัยลักษณะของเซลล์ ได้แก่ รูปร่าง การเรียงตัว และการทดสอบดังต่อไปนี้

8.1 การทดสอบการเติบโตที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C

การทดสอบการเติบโตที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติก

ลงใน MRS broth บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C เป็นเวลา 24-48 ชม. สังเกตการเติบโตโดยดู**ความขุ่นของอาหาร** เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

8.2 การทดสอบการเติบโตในอาหารที่เติมเกลือ (NaCl) 6.5 และ 18 %

การทดสอบการเติบโตในอาหารที่เติมเกลือ โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงใน MRS broth ที่มี เกลือ 6.5% และ 18% บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. สังเกตการเติบโตโดยดูความขุ่นของอาหาร เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

8.3 การทดสอบการเติบโตที่ pH 4.4 และ pH 9.6

การทดสอบการเติบโตในอาหารที่เป็นกรดและด่าง โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงใน MRS broth ที่มีการปรับ pH เป็น 4.4 ด้วย 1N HCl และ pH 9.6 ด้วย 1N NaOH บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. สังเกตการเติบโตโดยดูความขุ่นของอาหาร เปรียบเทียบกับหลอดควบคุมที่ไม่มีการถ่ายเชื้อ

8.4 การตรวจสอบการจัดเรียงตัวของเซลล์ (tetrad formation)

การตรวจสอบการจัดเรียงตัวโดยสังเกตการณ์เรียงตัวของแบคทีเรียแลกติกที่มี 4 เซลล์เรียงติดกันโดยการย้อมสีกรัม

8.5 การทดสอบ salt tolerant

การทดสอบการเติบโตของแบคทีเรียแลกติกในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ โดยป้ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MRS agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 0, 5 และ 10% บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. ตรวจดูผลการเติบโต

8.6 การตรวจสอบความสามารถในการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากการหมักน้ำตาลกลูโคส

การตรวจสอบความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบการใช้น้ำตาล (phenol red broth base) ที่มีการเติมกลูโคส 1% บ่มที่ 35°C เป็นเวลา 18-24 ชม. สังเกตการสร้างกรดโดยอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองให้ผลเป็นบวก ถ้าไม่เปลี่ยนสีให้ผลเป็นลบ และดูการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ใน Durham tube ถ้ามีก๊าซจัดเป็น heterofermentative lactic acid bacteria ถ้าไม่มีก๊าซหรือมีก๊าซเล็กน้อย จัดเป็น homofermentative lactic acid bacteria โดยมีแบคทีเรียแลกติก สายพันธุ์มาตรฐานเพื่อเปรียบเทียบคุณสมบัติของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ดังนี้ *Lactobacillus bulgaricus* TISTR451, *Lactobacillus plantarum* TISTR862, *Lactobacillus lactis* TISTR452 และ *Pediococcus halophilus* TISTR334

8.7 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ identification kit (Lactobacillus API 50 CHL 50300, บริษัท Bio Me'rieux, France) ซึ่งประกอบด้วย API 50 CHL เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่

ใช้ร่วมกับชุดทดสอบ API 50 CH strip ในการศึกษากระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้ ทำการทดสอบได้โดยการเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์จากอาหารแข็ง MRS agar ลงในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 2 มล. โดยปรับให้มีความขุ่นมากกว่า 2 McFarland จากนั้นถ่ายเชื้อใส่ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อปริมาตร 5 มล. ปรับให้ได้ 2 McFarland บันทึกปริมาตรของเชื้อที่ใช้ จากนั้นถ่ายเชื้อจากหลอดปริมาตร 2 มล. ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ API 50 CHL ปริมาตร 10 มล. โดยถ่ายเชื้อปริมาตรเป็น 2 ของหลอด 5 มล. ซึ่งจะได้เชื้อที่มีความขุ่นเท่ากับ 2 McFarland ในอาหาร API 50 CHL ถ่ายเชื้อที่เตรียมประมาณ 120 ไมโครลิตร ลงใน API 50 CH strip บ่มที่อุณหภูมิ 37°C อ่านผลหลังการบ่มเป็นเวลา 24 และ 48 ชม. โดยใช้ *L. plantarum* TISTR 862 เป็นตัวเปรียบเทียบ หลุมแรกจะเป็น negative control ส่วนผลบวกจะเกิดเนื่องจากเชื้อมีการใช้น้ำตาลและผลิตกรดออกมามีผลทำให้ pH ในอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง สังเกตการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ในอาหารจากม่วงเป็นสีเหลือง นำผลที่ได้มาเทียบเคียงชนิดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ API Web Stand Alone V. 1.1.0

8.8 การบ่งชี้สายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกโดยใช้วิธี 16S rRNA gene วิเคราะห์โดยหน่วย MU-OU : CRC คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยเริ่มจากการสกัด genomic DNA จากแบคทีเรียแลกติก แล้วเพิ่มปริมาณชิ้น DNA เฉพาะส่วนที่ต้องการ (ในที่นี้หมายถึงเฉพาะส่วน 16S rDNA) ด้วยเทคนิค Polymerase Chain Reaction (PCR) โดยใช้ genomic DNA ที่สกัดได้เป็นแม่แบบ และใช้ primer 20F (forward primer) และ 563R (reverse primer) แล้วทำการ sequencing reaction ด้วยเทคนิค PCR อ่านลำดับเบสของ DNA โดยนำ DNA product ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Automated DNA Sequencing จากนั้นนำลำดับเบสของ DNA ที่อ่านได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลในอินเทอร์เนต โดยเข้าไปที่เวปไซต์ของ NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, April 23/2007) จากนั้นเลือกที่ BLAST แล้วเลือก Nucleotide-nucleotide BLAST (blast) จะขึ้นหน้าต่างใหม่ให้เราใส่ข้อมูลลำดับเบสลงไป copy ลำดับเบสของตัวอย่างใส่ลงไปในช่อง Search แล้วกดปุ่ม BLAST จะมีหน้าต่างใหม่เปิดขึ้นมา รอสักครู่จนข้อมูลโหลดเสร็จเรียบร้อยดูผลการ Blast ซึ่งลำดับของเชื้อที่ขึ้นในบรรทัดแรกจะมีความใกล้เคียงกับเชื้อที่เรานำมาเทียบที่สุด ความเหมือนกันจะลดลงจากบรรทัดบนลงไปบรรทัดล่างตามลำดับ

9. การตรวจหาปริมาณเกลือในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักและเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (AOAC, 1990)

ตรวจหาปริมาณเกลือในตัวอย่างเต้าหู้ยี้โดยชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้ 0.5 กรัม ใส่ในฟลาส์กขนาด 250 มล. เติม 0.1 N $AgNO_3$ ลงไป 30 มล. ให้ปริมาตรเกินพอในการทำปฏิกิริยากับ NaCl เกิดเป็นตะกอน $AgCl_3$ ได้หมด เขย่าให้เข้ากัน เติม 6 N HNO_3 ลงไป 20 มล. นำไปต้มจนเดือดประมาณ

15 นาที เพื่อให้ตะกอนที่ไม่ใช่ $AgCl_3$ ละลายหมด ทิ้งให้เย็น เติมน้ำกลั่น 50 มล. และสารละลาย Ferric alum ลงไป 5 มล. เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นไตเตรตด้วย 0.1 N NH_4SCN ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ $AgNO_3$ ส่วนที่เหลือจนถึงจุดยุติซึ่งจะมีสีแดงอิฐเกิดขึ้นบันทึกปริมาตร NH_4SCN ที่ใช้ แล้วนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เกลือ (% NaCl) โดยมีสารละลายเกลือ NaCl ความเข้มข้น 5, 10, 15, 20% เป็นตัวควบคุม

10. การตรวจหาชนิดและปริมาณแร่ธาตุ (หน่วยเครื่องมือกลาง คณะวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์)

การตรวจหาชนิดและปริมาณแร่ธาตุที่เป็นองค์ประกอบในเต้าหู้ยี้ โดยชั่งตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป 4 กรัม ใส่ใน Vycor วางบน hot plate ไฟอ่อนๆในตู้ควันจนน้ำระเหยหมดไป เพิ่มความร้อนขึ้นจนตัวอย่างไม่มีควัน (ใช้เวลาไม่น้อยกว่า 5 ชม.) นำ Vycor ไปเข้า Muffle ที่อุณหภูมิ 750°C เวลา 180 นาที (3 ชม.) จนกระทั่งตัวอย่างเปลี่ยนจากสีดำเป็นไม่มีสี หรือสีเทาอ่อน ทิ้งให้เย็นนำมาละลายด้วยกรดไนตริกเข้มข้น 10% กรองด้วยกระดาษกรองแล้วปรับปริมาตรให้ได้ 10 มล. ด้วยน้ำ (deionized water) สารละลายกรดเจือจางที่มีโลหะและแร่ธาตุจะถูกดูดเข้าเครื่อง Inductively Coupled Plasma Atomic Emission Spectrometry เพื่อวิเคราะห์หาชนิดและปริมาณของโลหะ

11. การศึกษาโครงสร้างพื้นผิวของเต้าหู้ยี้ (ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์ ม. สงขลานครินทร์)

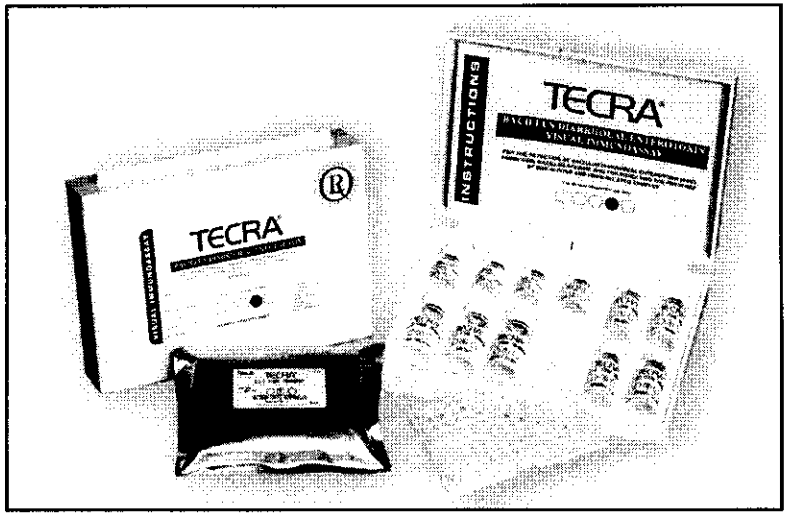
การศึกษาโครงสร้างพื้นผิวโดยนำก้อนเต้าหู้ก่อนหมัก เต้าหู้ยี้เหลือง (CSF1) และเต้าหู้ยี้แดง (CSF3) ตัวอย่างละ 1 ก้อน มา fix ด้วยสารเคมี ซึ่งประกอบด้วย 25% Glutaraldehyde ($C_5H_8O_2$) ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 4% Formaldehyde $(CH_2O)_n$ เป็นเวลา 1-2 ชม. จากนั้นนำตัวอย่างมาล้างด้วย ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2-3 ครั้ง แล้วนำมา fix ครั้งที่ 2 ด้วย 1% OsO_4 เป็นเวลา 1-2 ชม. ขึ้นอยู่กับลักษณะตัวอย่าง ล้างตัวอย่างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง แล้วขจัดน้ำออกจากตัวอย่างโดยใช้ alcohol series หรือ acetone series จากความเข้มข้นต่ำๆ ไปจนถึง absolute คือ 50% Ethanol 15-30 นาที 2 ครั้ง, 70% Ethanol 15-30 นาที 2 ครั้ง, 80% Ethanol 15-30 นาที 2 ครั้ง, 90% Ethanol 15-30 นาที 2 ครั้ง และ100% Ethanol 30 นาที 2 ครั้ง นำตัวอย่างไปทำให้แห้งด้วยวิธี Critical Point Drying ตามวิธีการปฏิบัติงานใช้เครื่อง CPD (WI-RES-CPD-001) แล้วนำมาติดบน Stub โดยใช้เทปกาว 2 หน้า carbon tape น้ำยาทาเล็บ และ carbon paint หรือ silver paint เป็นตัวยึด จากนั้นจึงนำไปฉาบทอง ตามวิธีปฏิบัติงานการใช้เครื่อง Sputter Coater (WI-RES-Coater-001) แล้วนำตัวอย่างไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพื้นผิวด้วย scanning electron microscope

12. การตรวจหา *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin (BDE)

ตรวจหา BDE จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป โดยใช้ชุดทดสอบ TECRA *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay (TECRA BDE VIA) (รูปที่ 3) ซึ่งใช้หลักการของ ELISA ชุดทดสอบ TECRA BDE VIA สามารถจับโปรตีนที่มีโมเลกุลขนาด 40-45 กิโลดาลตัน ของ non-hemolytic enterotoxin (NHE) protein complex ชุดทดสอบนี้จะมีความจำเพาะในการตรวจหา BDE ที่อยู่ในอาหารโดยสามารถตรวจได้ถึงแม้ในตัวอย่างอาหารไม่มีสารพิษ แต่จะมีการสร้างสารพิษจากเชื้อ *Bacillus* เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสม คือสามารถสร้างในช่วงเวลาการเก็บอาหารหรือเมื่ออาหารถูกรับประทานเข้าสู่ร่างกายแล้ว ในการทดสอบครั้งนี้จึงมีวิธีการนำตัวอย่างมาใส่ในอาหารที่มีการเสริมสารปรุงแต่งลงไปเพื่อเพิ่มความ สามารถในการสร้าง enterotoxin ทำให้สามารถถูกตรวจจับได้ด้วยชุดทดสอบนี้ ขอบเขตของความไวของชุดทดสอบสามารถตรวจสารพิษได้ในระดับต่ำสุด 1 นาโนกรัม ของ BDE ต่อ มล. โดยผลที่ได้มีการเปรียบเทียบกับตัวอย่างควบคุม และวิธีการตรวจนี้ได้ทำตามขั้นตอนตามคู่มือที่แนบมากับชุดทดสอบ ดังนี้

12.1 การเตรียมตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป จำนวน 9 ตัวอย่าง (CSF1-CSF9) โดยชั่งเต้าหู้ยี้ 10 กรัม ใส่ใน 90 มล. (BHI + 0.1% glucose (enriched medium) บ่มที่อุณหภูมิ 35-37 °C เป็นเวลา 16-18 ชม. จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 - 3,000 g เป็นเวลา 10 นาที แยกเอาเฉพาะส่วนของ supernatant แล้วนำมาปรับ pH 7-8 ด้วย NaOH ที่ปราศจากเชื้อ โดยเทียบสีบนกระดาษวัด pH

12.2 การตรวจหา BDE โดยใช้ TECRA BDE VIA โดยเติม sample additive ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงใน supernatant ปริมาตร 5 มล. ผสมให้เข้ากัน จากนั้นนำ well ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีต่อ BDE มาล้างด้วย wash solution และแช่ไว้เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เท wash solution แล้วเติมตัวอย่างปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่ 35 °C เป็นเวลา 2 ชม. เทตัวอย่างลงใน sodium hypochlorite แล้วซับ well ด้วยกระดาษ ทิชชู ล้าง well ด้วย wash solution จำนวน 4 ครั้ง เติม conjugate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วปิด well ด้วย parafilm บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชม. ล้าง well ด้วย wash solution จำนวน 5 ครั้ง เติม substrate ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที เขย่า well เบา ๆ เติม stop solution ปริมาตร 20 ไมโครลิตร แล้วนำมาเทียบสีกับการ์ด positive control และ negative control โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและตัวอย่างอาหารที่ปราศจาก enterotoxin ซึ่งในที่นี้ใช้ตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป CSF4 การอ่านผลการทดสอบ (รูปที่ 3 รูปที่ 4 และ รูปที่ 5)



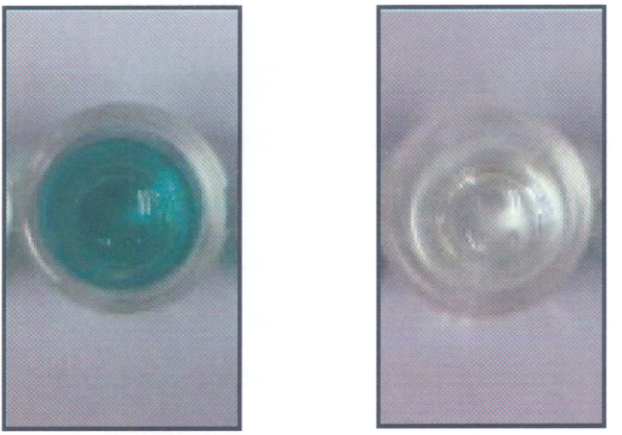
รูปที่ 3 ชุดทดสอบ TECRA *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay

การอ่านผลทำโดยเปรียบเทียบผลที่ได้กับสีของ positive control, negative control และ card color

positive control โดยใช้ BDE (มีให้ในชุดทดสอบ)

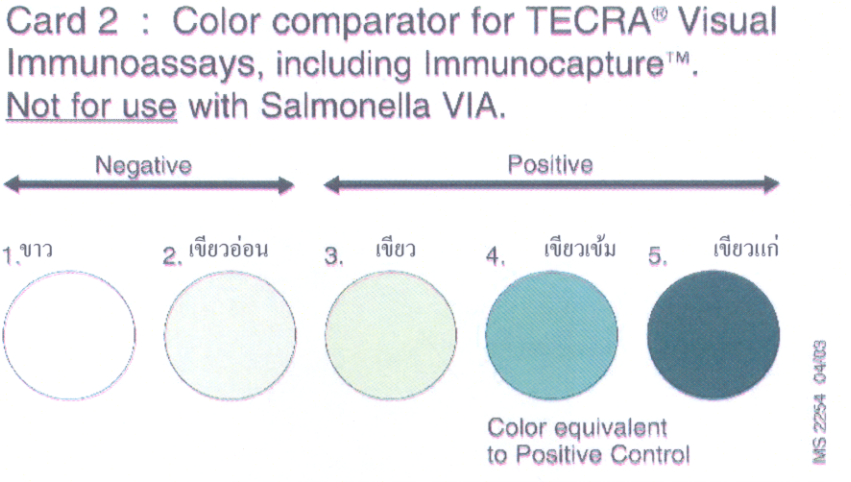
negative control โดยใช้ BHI+0.1%glucose

การใช้ card color เปรียบเทียบสีที่ได้: 1= สีขาว (negative), 2= สีเขียวอ่อน (negative), 3= สีเขียว (positive), 4= สีเขียวเข้ม (positive) และ 5= สีเขียวแก่ (positive)



positive control negative control

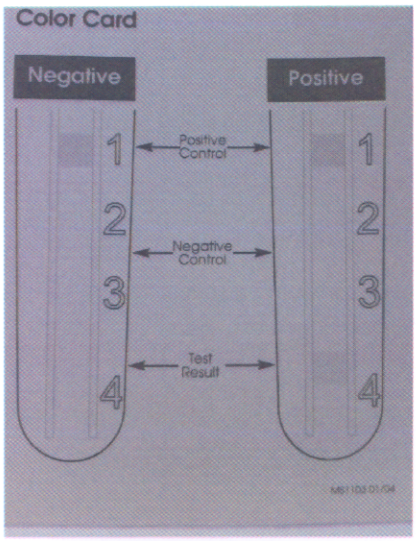
รูปที่ 4 ผลการตรวจหา BDE ของ *Bacillus* โดยใช้ TECRA BDE VIA



รูปที่ 5 Card color ที่ใช้อ่านผลการตรวจหา BDE ของ *Bacillus*

13. การตรวจหา Staphylococcal enterotoxin โดยใช้ TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins

วิธีการตรวจนี้ได้ทำตามขั้นตอนตามคู่มือที่แนบมากับชุดทดสอบ โดยเตรียมตัวอย่างจากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป โดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม ลงใน 90 มล. TSGM นำไปบ่มที่ 35 - 37°C,16-24 hrs. จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 - 3,000 g.10 นาที นำส่วนใสมาทดสอบ (ปรับ pH ประมาณ 7-8 ด้วย NaOH ที่ปราศจากเชื้อ) และการเตรียมตัวอย่างจาก *Staphylococcus* ATCC 25923 เป็น positive control ในครั้งแรก และใช้เชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่สร้างเอนเทอโรทอกซินชนิด A และ B ซึ่งได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เป็น positive control ในครั้งที่ 2 โดย เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงใน TSGM นำไปบ่มที่ 35 - 37°C เป็นเวลา 16-24 ชม. จากนั้นนำตัวอย่างมาปั่นที่ความเร็วรอบ 1,000 - 3,000 g. เป็นเวลา 10 นาที นำส่วนใสมา ทดสอบปรับ pH ประมาณ 7-8 ด้วย NaOH ที่ปราศจากเชื้อ การตรวจหา Staphylococcal enterotoxin โดยใช้ TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins โดยนำส่วนใสของตัวอย่างที่ต้องการทดสอบปริมาตร 1 มล. เติมลงในหลอดที่ 1 ของชุดทดสอบ จากนั้นนำ stick ที่เคลือบด้วยแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ *Staphylococcus* enterotoxin วางในหลอดที่ 1 ยก stick ขึ้นลง 2 ครั้ง บ่มที่ 35°C , 2 ชม. ย้าย stick ใส่หลอดที่ 2 ยกขึ้นลง 5 ครั้ง แช่ 2นาที จากนั้นย้าย stick ใส่หลอดที่ 4 บ่มที่ 35°C , 30-35 นาที ย้าย stick ใส่หลอดที่ 5 ล้าง stick โดยยกขึ้นลง 10 ครั้ง แช่ 5 นาที จากนั้นย้าย stick ใส่หลอดที่ 6 บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที ยก stick ขึ้น อ่านผลภายในเวลา 1 ชม. แล้วนำมาเทียบสีกับการ์ดที่แนบมา โดยอ่านผลดังนี้ positive control จะมีสีม่วงเกิดขึ้นตรงตำแหน่งที่ 1 ของการ์ด ส่วน negative control อยู่ระหว่างตำแหน่งที่ 2 และ 3 ของการ์ด ผลการทดสอบอยู่ระหว่างตำแหน่งที่ 3 และ 4 ของการ์ด (รูปที่ 6)

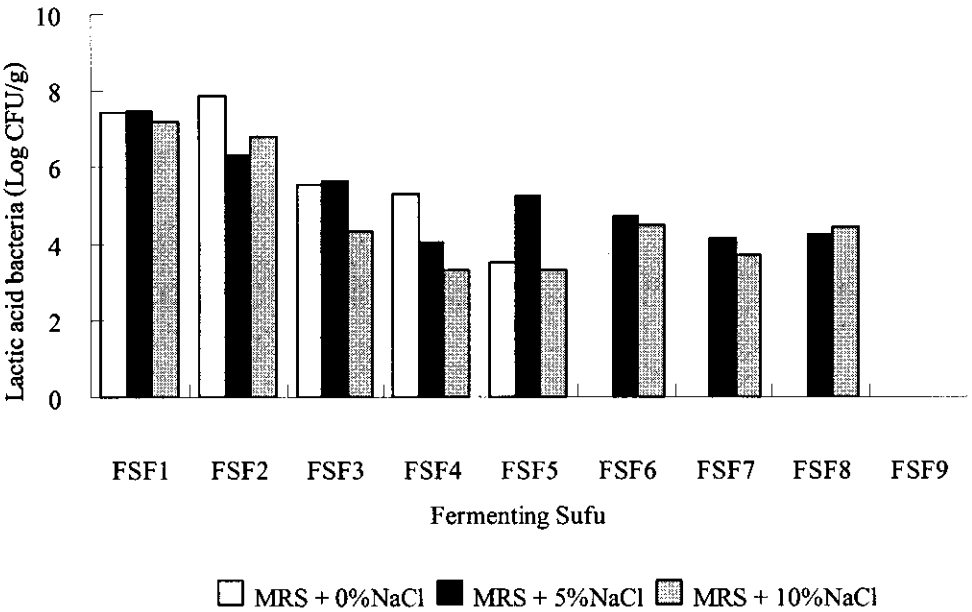


รูปที่ 6 TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins card

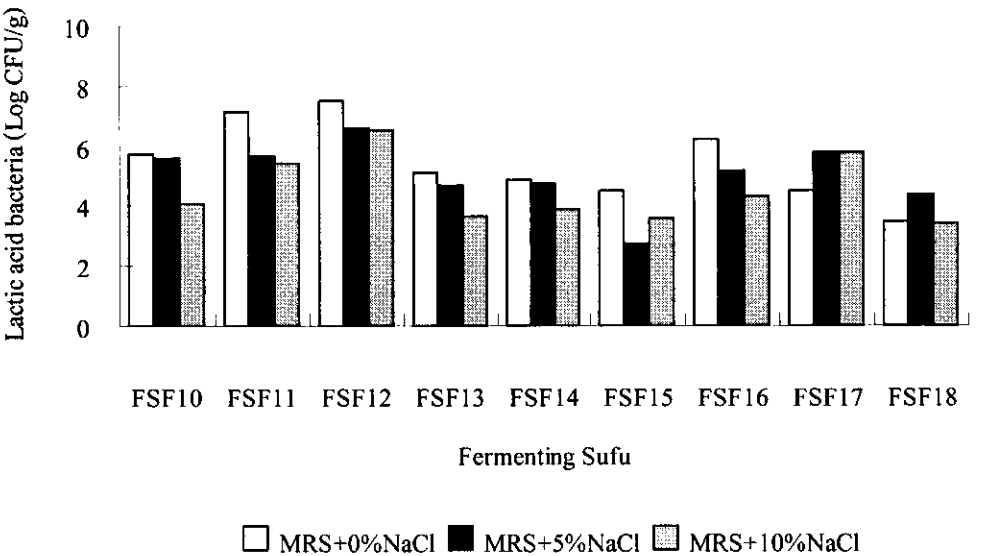
ผลการทดลอง

1. การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

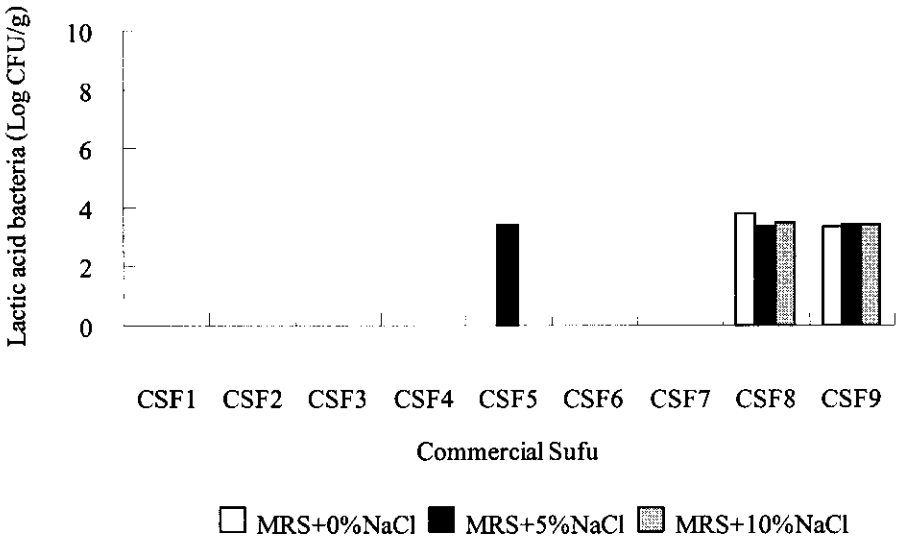
การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก บนอาหาร MRS agar ที่เติม 5 mg% sodium azide, 0.04% bromocresol purple และเติมเกลือ 0%, 5% และ 10% (รูปที่ 7) พบว่าแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณระหว่าง 3.0×10^3 ถึง 7.0×10^7 CFU/g, 1.1×10^4 ถึง 3.0×10^7 CFU /กรัม และ 1.9×10^3 ถึง 1.5×10^7 CFU/g ตามลำดับ โดยบนอาหาร MRS + 0% NaCl มีเชื้อเริ่มต้น 2.7×10^7 CFU/g แล้วเพิ่มขึ้นสูงสุด 7.0×10^7 CFU/g ในเดือนที่ 2 และลดลงเรื่อยๆจนถึงเดือนที่ 5 แล้วไม่พบแบคทีเรียแลกติก ส่วนอาหาร MRS + 5% NaCl มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 3.0×10^7 CFU/g แล้วลดลงจนกระทั่งถึงเดือนที่ 8 ส่วนบนอาหาร MRS+ 10% NaCl มีจำนวนเชื้อเริ่มต้น 1.5×10^7 CFU/g แล้วลดลงจนกระทั่งถึงเดือนที่ 8 เช่นกัน ในเดือนที่ 9 ตรวจไม่พบแบคทีเรียแลกติก ส่วนในถังหมักอื่นๆ (รูปที่ 8) พบแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณใกล้เคียงกับถังหมักที่ทำการศึกษาในครั้งนี้ แต่พบแบคทีเรียแลกติกปริมาณระหว่าง 2.9×10^3 ถึง 1.7×10^6 CFU/g บนอาหาร MRS agar + 0% NaCl ในถังหมักเดือนที่ 6 (FSF15), 7 (FSF16), 8 (FSF17) และ 9 (FSF18) ส่วนตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (รูปที่ 9) พบแบคทีเรียแลกติกถึง 3 ตัวอย่าง ได้แก่ CSF5, CSF8 และ CSF9 โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติก 2.5×10^3, 3.0×10^3 ถึง 6.2×10^3 และ 2.4×10^3 ถึง 2.6×10^3 CFU/g ตามลำดับ ซึ่งเป็นเต้าหู้ยี้เหลืองผลิตจากประเทศไต้หวันและประเทศจีน ส่วนการตรวจวัดความเป็นกรดด่าง (pH) ของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ (รูปที่ 10) พบว่า เต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักมี pH เริ่มต้น 4.93 แล้วลดลงเรื่อยๆจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักมี pH 4.59 แต่ในกรณีเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมี pH 4.85 ทั้งนี้เนื่องจากมีการเติมส่วนผสมอื่นๆ ก่อนการบรรจุขวดนึ่งฆ่าเชื้อ



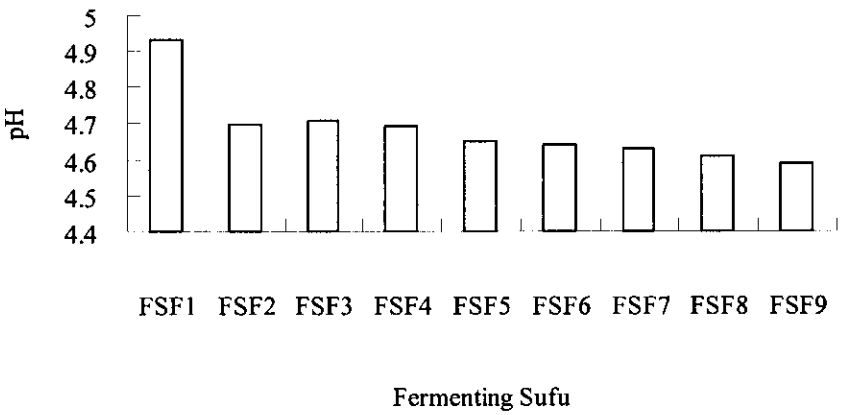
รูปที่ 7 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักเดียวกันที่เพาะเลี้ยงบน MRS agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3-5 วัน FSF1 (1 เดือน), FSF2 (2 เดือน), FSF3 (3 เดือน), FSF4 (4 เดือน), FSF5 (5 เดือน), FSF6 (6 เดือน), FSF7 (7 เดือน), FSF8 (8 เดือน) และ FSF9 (9 เดือน)



รูปที่ 8 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กัน ที่เพาะเลี้ยงบน MRS agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3-5 วัน FSF10 (1 เดือน), FSF11 (2 เดือน), FSF12 (3 เดือน), FSF13 (4 เดือน), FSF14 (5 เดือน), FSF15 (6 เดือน), FSF16 (7 เดือน), FSF17 (8 เดือน) และ FSF18 (9 เดือน)



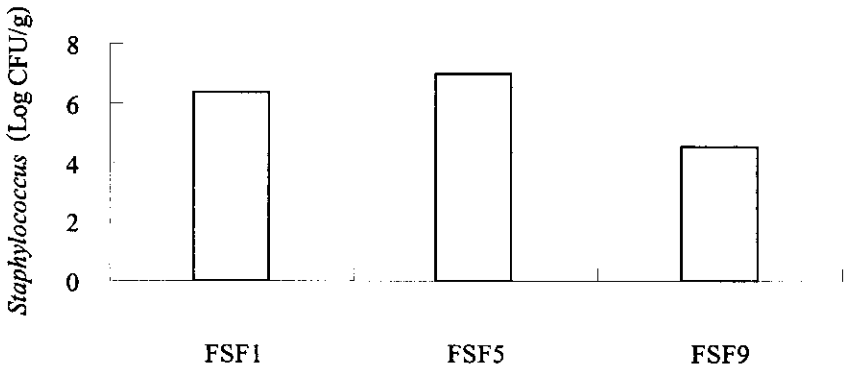
รูปที่ 9 ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่เพาะเลี้ยงบน MRS agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นต่างๆกัน บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3-5 วัน CSF1 (เต้าหู้ยี้เหลือง อ. เมือง จ. สงขลา), CSF2 (เต้าหู้ยี้แดง ตราเด็กขี่กิเลน จ. สมุทรสาคร), CSF3 (เต้าหู้ยี้แดง จีน), CSF4 (เต้าหู้ยี้แดง กรุงเทพมหานคร), CSF5 (เต้าหู้ยี้เหลือง ไต้หวัน), CSF6 (เต้าหู้ยี้เหลือง จีน), CSF7 (เต้าหู้ยี้แดง จีน), CSF8 (เต้าหู้ยี้เหลือง ตรา New sun จีน) และ CSF9 (เต้าหู้ยี้เหลือง ไต้หวัน)



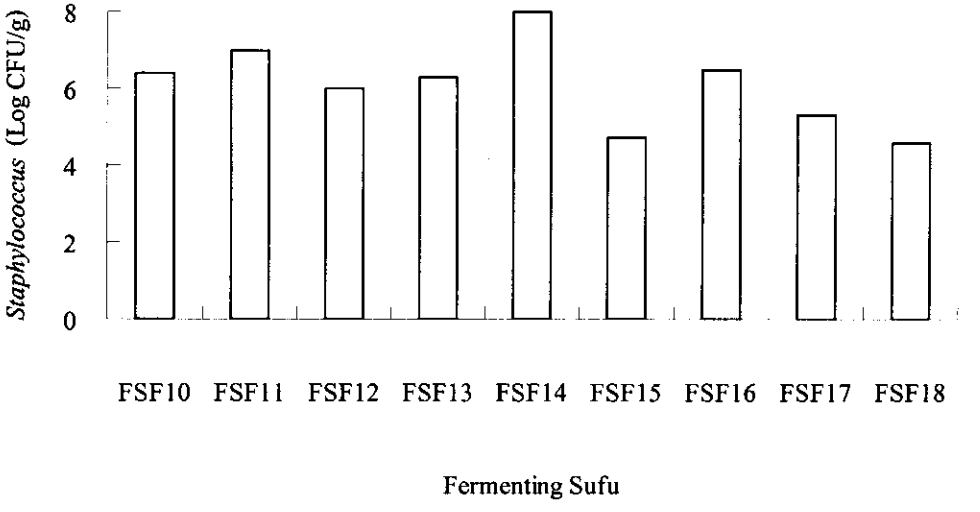
รูปที่ 10 การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่าง (pH) ของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ ตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมักจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก

2. การตรวจหาแบคทีเรียที่อาจก่อโรคในทางเดินอาหาร

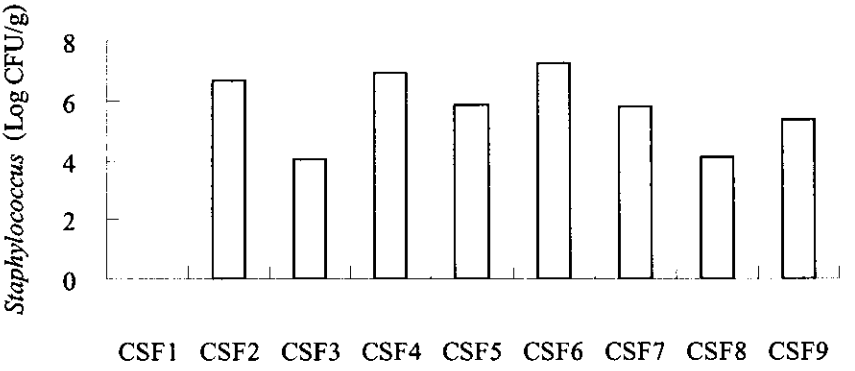
การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารในตัวอย่างเต้าหู้ยี้พบว่าในกระบวนการหมักตรวจไม่พบ faecal coliform บนอาหาร MacConkey agar และพบว่า ไม่มีหลอดใดให้ก๊าซใน Durham tube (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อตรวจยืนยันด้วยวิธี MPN method (presumptive and confirm test) แต่พบเชื้อ *Staphylococcus* บนอาหาร Mannitol Salt Agar (MSA) ที่ ferment mannitol จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก (รูปที่ 11) ซึ่งมีปริมาณระหว่าง 3.3×10^4 ถึง 1.1×10^7 CFU/g และตรวจพบเช่นเดียวกันกับตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในถังหมักต่างๆ กัน (รูปที่ 12) โดยพบเชื้ออยู่ระหว่าง 4.0×10^4 ถึง 1.1×10^8 CFU/g และตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (รูปที่ 13) ซึ่งตรวจพบเกือบทุกตัวอย่าง ยกเว้น CSF1 โดยมีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง 1.1×10^4 ถึง 1.9×10^7 CFU/g และพบเชื้อ *Bacillus* บนอาหาร Mannitol Egg-Yolk Polymyxin agar (MYP) ที่สามารถผลิต lecithinase ย่อย egg yolk แล้วทำให้เกิดความขุ่นรอบโคโลนี และไม่ ferment mannitol ทำให้โคโลนีมีสีชมพู *Bacillus* ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก (รูปที่ 14) มีปริมาณอยู่ระหว่าง 5.7×10^3 ถึง 1.5×10^6 CFU/g ซึ่งพบตั้งแต่เริ่มต้นจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก และตรวจพบเช่นเดียวกันกับตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในถังหมักต่างๆ กัน (รูปที่ 15) โดยพบเชื้ออยู่ระหว่าง 2.0×10^3 ถึง 1.5×10^5 CFU/g และตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (รูปที่ 16) พบเชื้ออยู่ระหว่าง 2.5×10^4 ถึง 2.6×10^6 CFU/g และพบเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง บนอาหาร Oxford agar ที่ให้โคโลนีสีดำ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียที่สามารถย่อย esculin ในอาหารเกิด esculitin ซึ่งทำปฏิกิริยากับ ferric ion (ferric ammonium citrate) เห็นเป็นโคโลนีสีดำ ซึ่งในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ (รูปที่ 17) สามารถพบโคโลนีสีดำบนอาหารนี้มีปริมาณระหว่าง 1.1×10^3 ถึง 1.0×10^6 CFU/g ส่วนตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในถังหมักต่างๆ กัน (รูปที่ 18) พบโคโลนีสีดำระหว่าง 3.0×10^3 ถึง 1.0×10^6 CFU/g และในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (รูปที่ 19) พบโคโลนีสีดำระหว่าง 0 ถึง 1.4×10^7 CFU/g แต่ลักษณะโคโลนีของเชื้อที่แยกได้ไม่ใช่ลักษณะเฉพาะของ *L. monocytogenes* บน Oxford agar ซึ่งมีขนาดเล็ก สีเทาดำ และมีปุ่มตรงกลางโคโลนี เมื่อบ่มเกิน 48 ชม. และได้ทดสอบทางชีวเคมีของที่แยกได้ในเบื้องต้น พร้อมกับสายพันธุ์มาตรฐาน พบว่าเชื้อที่แยกได้ไม่ใช่เชื้อ *L. monocytogenes*



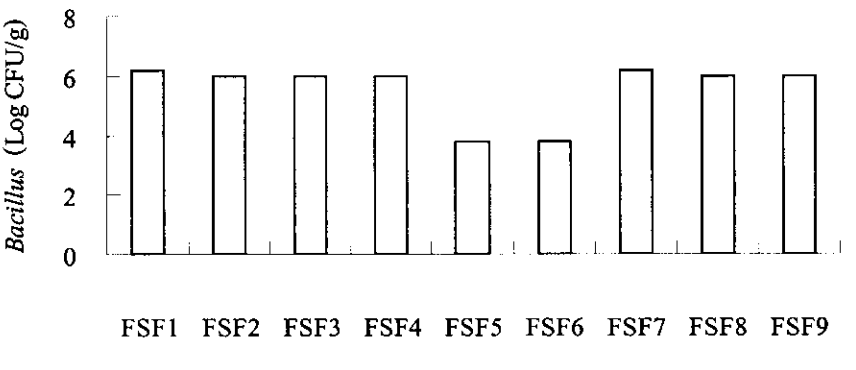
รูปที่ 11 ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. FSF1 (1 เดือน), FSF5 (5 เดือน) และ FSF9 (9 เดือน)



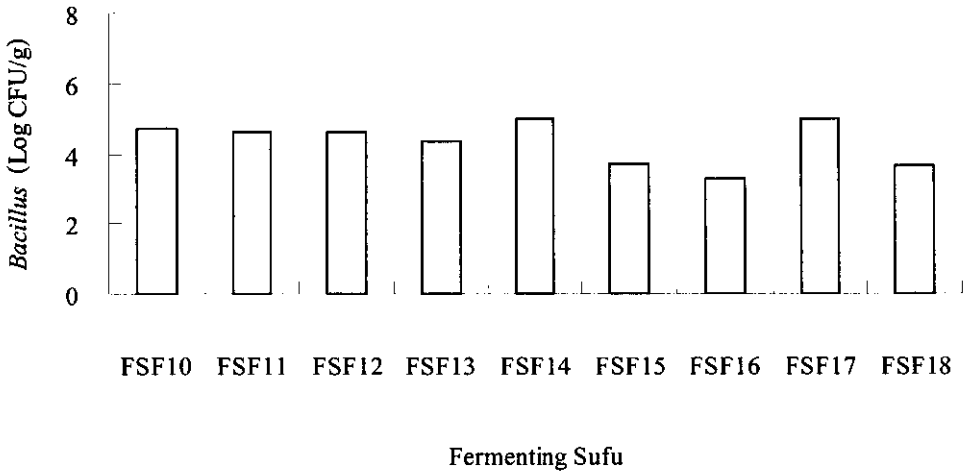
รูปที่ 12 ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กันที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



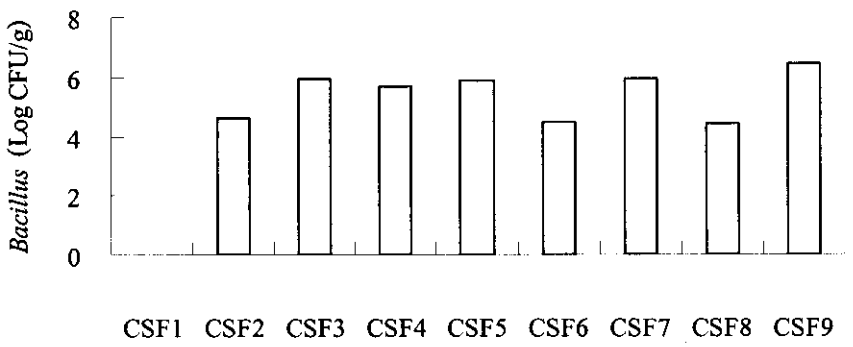
รูปที่ 13 ปริมาณ *Staphylococcus* ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



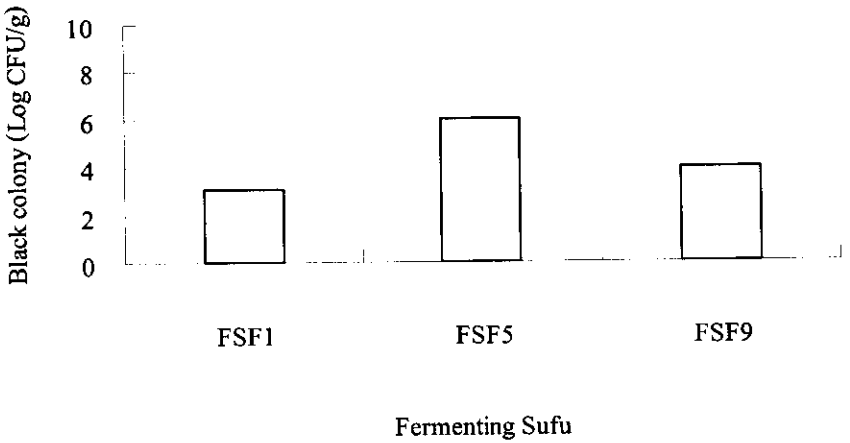
รูปที่ 14 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MYP agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



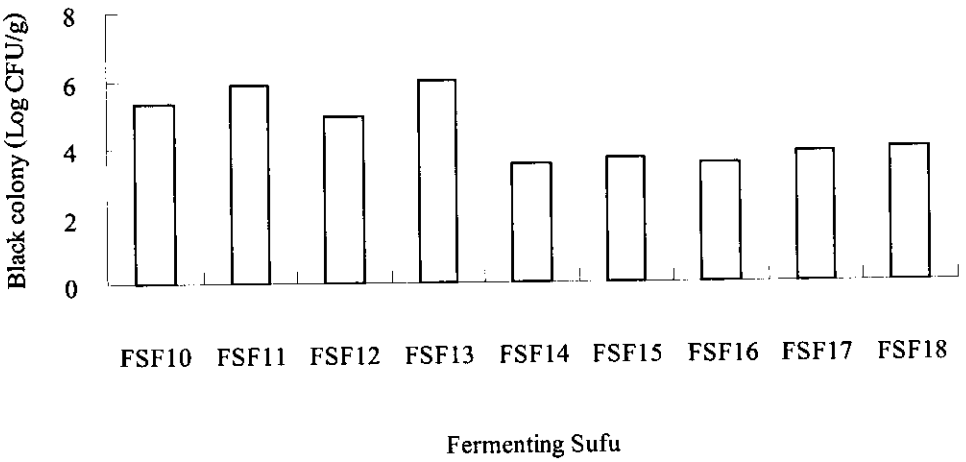
รูปที่ 15 ปริมาณเชื้อ *Bacillus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กันที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MYP agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



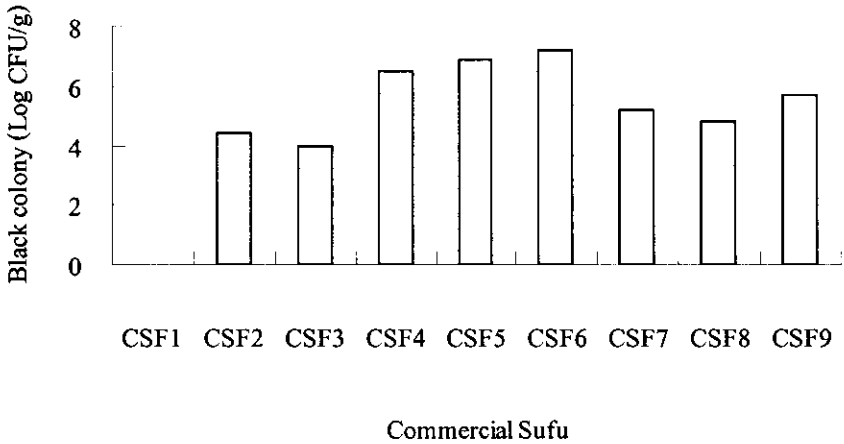
รูปที่ 16 ปริมาณ *Bacillus* ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MYP agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



รูปที่ 17 ปริมาณ Black colony ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Oxford agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. FSF1 (1 เดือน), FSF5 (5 เดือน) และ FSF9 (9 เดือน)



รูปที่ 18 ปริมาณ Black colony ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กันที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Oxford agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



รูปที่ 19 ปริมาณ Black colony ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Oxford agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.

3. การเติบโตของแบคทีเรียแลกติกบนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

แบคทีเรียแลกติกที่แยกจากตัวอย่างเต้าหู้ยี้มีทั้งหมด 126 สายพันธุ์ โดยการคัดเลือกจากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหาร MRS agar และให้ผลลบกับการทดสอบ catalase และเมื่อนำแบคทีเรียแลกติกไปทดสอบการเติบโตบนอาหาร MRS agar ที่เติมเกลือความเข้มข้น 0, 5 และ 10% (ตารางที่ 1) พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 23 สายพันธุ์ (18.3%) เติบโตได้ดีบนอาหารที่ไม่มีการเติมเกลือและมีเกลือ 5% มี 60 สายพันธุ์ (47.6%) เติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือ 0, 5 และ 10% ซึ่งแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้จัดเป็น Halotolerant และมีแบคทีเรียแลกติกเพียง 43 สายพันธุ์ (34.1%) ที่ไม่สามารถเติบโตได้บนอาหารที่ไม่เติมเกลือ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้จัดเป็น Halophilic และไม่มีแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ใดที่เติบโตได้เฉพาะบนอาหารที่ไม่เติมเกลือ

ตารางที่ 1 การเติบโตของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้บน MRS agar ที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน

	Growth on MRS agar added with salt			จำนวน isolates	%ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ
	0%	5%	10%		
Non halophilic LAB	+	-	-	0	0
Halotolerant LAB 1	+	+	-	23	18.3
Halotolerant LAB 2	+	+	+	60	47.6
Halophilic LAB 1	-	+	-	1	0.8
Halophilic LAB 2	-	-	+	1	0.8
Halophilic LAB 3	-	+	+	41	32.5
Total				126	100.0

4. การคัดแยกชนิดของ probiotic lactic acid bacteria

4.1 การทนต่อเกลือน้ำดี

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีทำโดยนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักและเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปรวม 126 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำมาเพาะเลี้ยง ลงบนอาหาร MRS agar ที่มีการเติมเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.15% และ 0.3% (ตารางที่ 2) จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ (100%) สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.15% และมี 117 สายพันธุ์ (92.9%) จากทั้งหมด 126 สายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.3%

4.2 การทนกรด

การทดสอบการทนกรด ทำโดยนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ มาทดสอบการเติบโตบนอาหาร MRS broth ภายใต้สภาวะที่เป็นกรด pH 2, pH3 และ pH4 (ตารางที่ 2) พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกทั้งหมด 126 สายพันธุ์ มีจำนวน 110 สายพันธุ์ (87.3%) ที่สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มี pH 4 แต่ไม่สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มี pH 2 และ pH 3

4.3 การทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

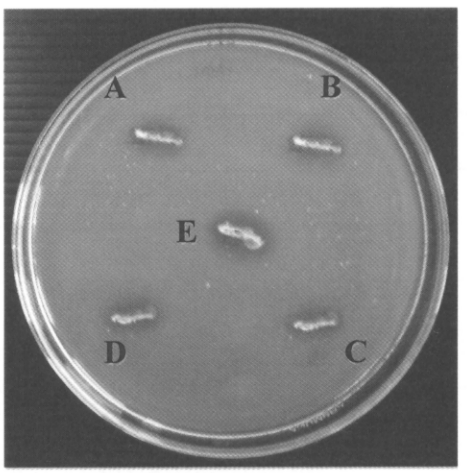
การทดสอบย่อยโปรตีน (ตารางที่ 2) (รูปที่ 20) ไขมัน และแป้ง พบว่า แบคทีเรียแลกติกสามารถย่อย skim milk หรือ gelatin ได้ 50 สายพันธุ์ (39.7%) โดยมี degree of hydrolysis อยู่ระหว่าง 1.3 - 12 ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ (1.6%) สามารถย่อย tributyrin คือ PS1232 และ PS1233 โดยมี degree of hydrolysis เท่ากับ 2.4 และ 2.3 แต่ไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถย่อยแป้งได้

4.4 การทดสอบการเติบโตในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

แบคทีเรียแลกติกที่แยกทุกสายพันธุ์ที่แยกได้สามารถเติบได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 การคัดแยกชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากเต้าหู้ยี้

สมบัติการเป็นโปรไบโอติก	จำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้	% ของจำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ
การทนต่อเกลือน้ำดี 0.15%	126	126	100
การทนต่อเกลือน้ำดี 0.30%	126	117	92.9
การทนกรด	126	110	87.3
การย่อย skim milk หรือ gelatin	126	50	39.7
การย่อย tributyrin	126	2	1.6
การย่อย corn starch	126	0	0
การเติบโตในสภาพที่มีและไม่มีออกซิเจน	126	126	100



NA + 1% skim milk

รูปที่ 20 การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS12102 (A), PS1295 (B) PS1248 (C), PS1244 (D) และ PS1253 (E)

5. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

การทดสอบแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี Agar spot assay (ตารางที่ 3) (รูปที่ 21) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งแบคทีเรียกรัมบวกและแบคทีเรียกรัมลบ โดยสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC25922 (96.0%), *S. aureus* ATCC25923 (79%), *B. cereus* TISTR687 (91.3%) และ *L .monocytogenes* DMST4553 (88.1%)

ส่วนการนำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกมาทดสอบการยับยั้ง โดยวิธี Agar well diffusion assay (รูปที่ 22) พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกเพียง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก PS1240 และ PS1243 ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *L. monocytogenes* DMST4553 เท่านั้น โดยให้โซนการยับยั้ง 35.5 มม. และ 16.3 มม. ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นเป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ในเดือนที่ 3 และเป็นแบคทีเรียทนเกลือความเข้มข้น 5%

ตารางที่ 3 ผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้โดยวิธี Agar spot assay

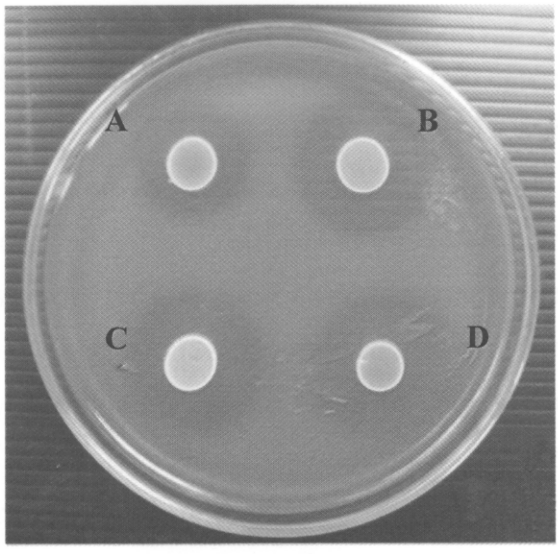
แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	จำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ	จำนวนสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้				%ของสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้
		+	++	+++	++++	
E. coli ATCC25922	126	36	47	37	1	96.0
S. aureus ATCC25923	126	38	35	25	2	79.4
B. cereus TISTR687	126	50	38	27	0	91.3
L. monocytogenes DMST4553	126	38	48	23	2	88.1

\+ คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 10 มม.

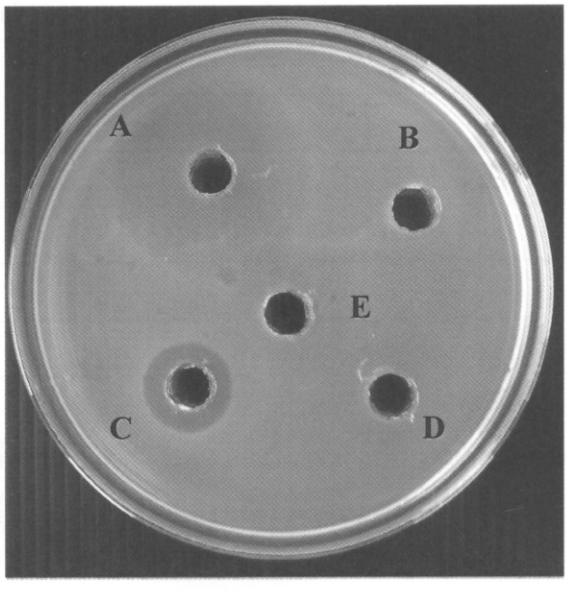
++ คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 20 มม.

+++ คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 30 มม.

++++ คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 40 มม.



รูปที่ 21 ผลการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC25922 ของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1234 (A), PS1238 (B), PS1240 (C) และ PS1241 (D) โดยวิธีการยับยั้งบนอาหารแข็ง (Agar spot assay)



รูปที่ 22 ผลการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST4553 ของ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1240 (A), PS1242 (B), PS1243 (C), PS1253 (D) และ PS1254 (E) โดยวิธี Agar well diffusion assay

6. การบ่งชี้ชนิดของสารยับยั้ง

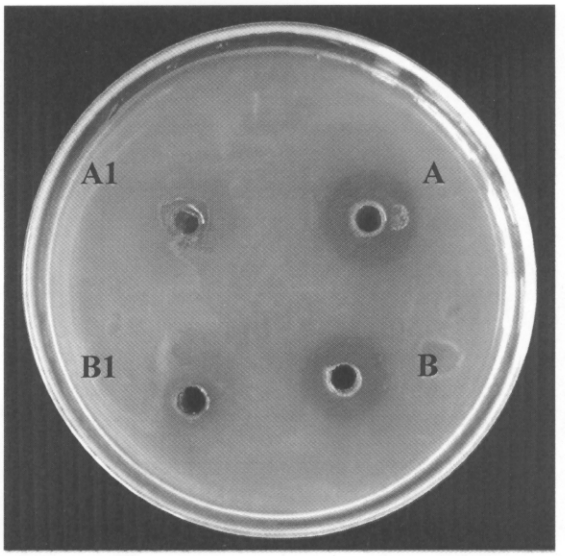
การบ่งชี้ชนิดสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก PS1240 และ PS1243 โดยการนำส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มาเพิ่มความเข้มข้น 10 เท่า โดยการทำ Lyophilize แล้วนำมาปรับ pH เป็นกลางเพื่อกำจัดสารยับยั้งที่เกิดจากกรดและไม่ปรับ pH มาทดสอบร่วมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน แล้วนำมาทดสอบสารยับยั้งที่เหลืออยู่โดยวิธี Agar well diffusion (ตารางที่ 4) (รูปที่ 23) พบว่าส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกทั้งสองสายพันธุ์ไม่เกิดโซนยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST4553 เมื่อปรับ pH ของส่วนใส แสดงว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเกิดจากกรด และไม่พบแบคเทอริโอซินและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อทดสอบส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH กับเอนไซม์ชนิดต่างๆ เนื่องจากโซนยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST4553 ของส่วนใสที่บ่มร่วมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ มีขนาดเท่ากับส่วนใสที่ไม่ได้บ่มร่วมกับเอนไซม์ซึ่งใช้เป็น control (ตารางที่ 5) (รูปที่ 24)

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบสารยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ปรับ pH กับ *L. monocytogenes* DMST4553 โดยวิธี agar well diffusion assay

ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ	โซนการยับยั้ง (มม.)			
	PS1240		PS1243	
	ชุดควบคุม[a]	ชุดทดสอบ[b]	ชุดควบคุม[a]	ชุดทดสอบ[b]
Pepsin	0	0	0	0
Proteinase K	0	0	0	0
Trypsin	0	0	0	0
Lipase	0	0	0	0
α-amylase	0	0	0	0
Catalase	0	0	0	0

[a]ชุดควบคุม หมายถึง ส่วนใสที่ปรับ pH และไม่ได้ทดสอบร่วมกับเอนไซม์

[b]ชุดทดสอบ หมายถึง ส่วนใสที่ปรับ pH และทดสอบร่วมกับเอนไซม์



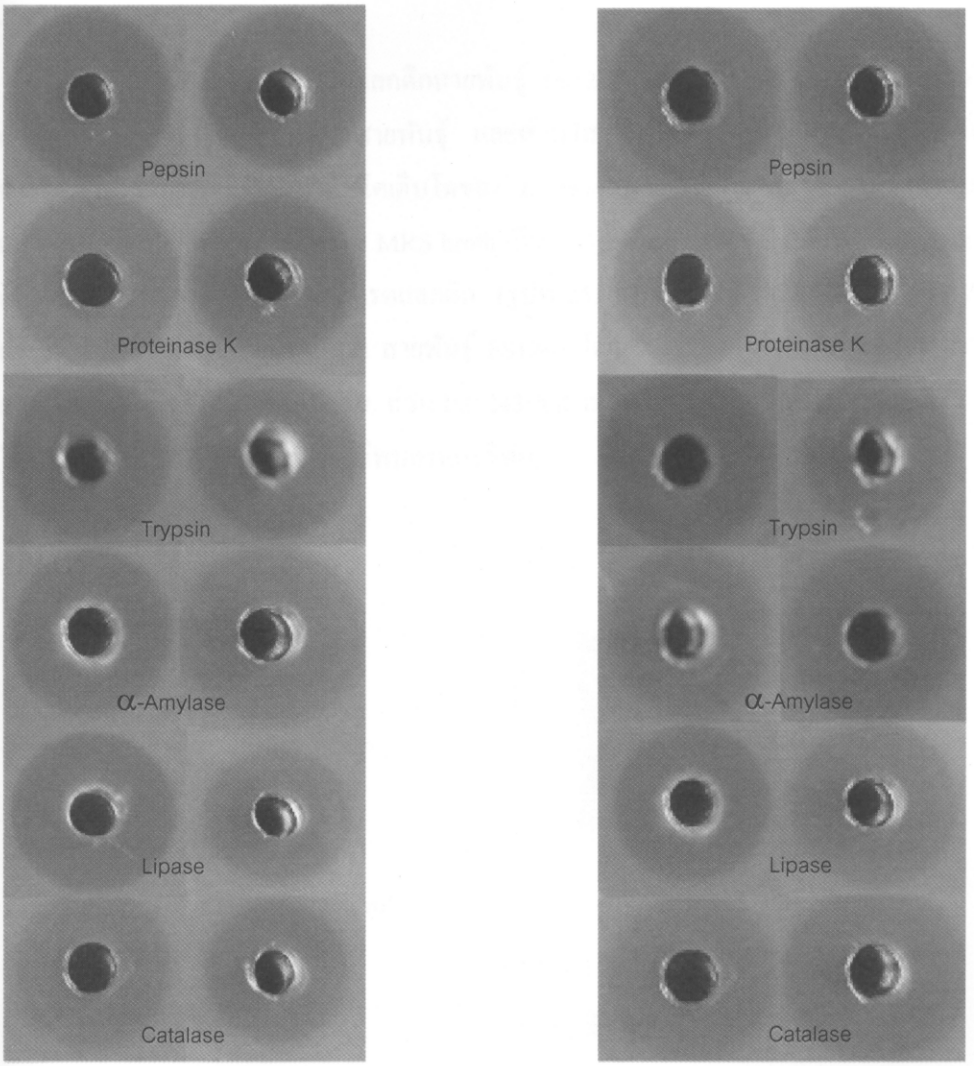
รูปที่ 23 การทดสอบสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกกับ *L. monocytogenes* DMST4553 โดยวิธี agar well diffusion assay PS1240 A: ก่อนปรับ pH, A1: หลังปรับ pH และสายพันธุ์ PS1243 B: ก่อนปรับ pH และ B1: หลังปรับ pH

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบสารยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ได้ปรับ pH กับเชื้อ *L. monocytogenes* DMST4553 โดยวิธี agar well diffusion assay

ชนิดของเอนไซม์ที่ใช้ทดสอบ	โซนการยับยั้ง (มม.)			
	PS1240		PS1243	
	ชุดควบคุม[a]	ชุดทดสอบ[b]	ชุดควบคุม[a]	ชุดทดสอบ[b]
Pepsin	17.2	18.2	16.6	16.5
Proteinase K	16.5	16.0	16.6	15.9
Trypsin	16.2	16.8	17.3	17.3
Lipase	14.8	17.0	17.3	17.3
α-amylase	17.9	17.8	17.5	17.5
Catalase	16.5	16.7	16.5	16.5

[a]ชุดควบคุม หมายถึง ส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH และไม่ได้ทดสอบร่วมกับเอนไซม์

[b]ชุดทดสอบ หมายถึง ส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH และทดสอบร่วมกับเอนไซม์



Test (A) Control (A) Test (B) Control (B)

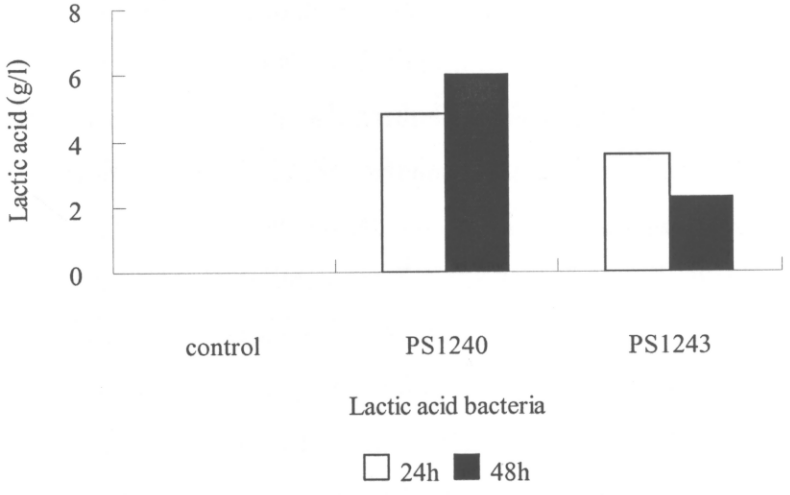
รูปที่ 24 การทดสอบสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1240 (A) และ PS1243 (B) กับเชื้อ *L. monocytogenes* DMST4553 โดยวิธี Agar well diffusion assay หลังจากบ่มร่วมกับเอนไซม์เป็นเวลา 2 ชม.

Test หมายถึง ส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH แล้วทดสอบร่วมกับเอนไซม์

Control หมายถึง ส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH และไม่ได้ทดสอบร่วมกับเอนไซม์

7. การตรวจหา organic acid

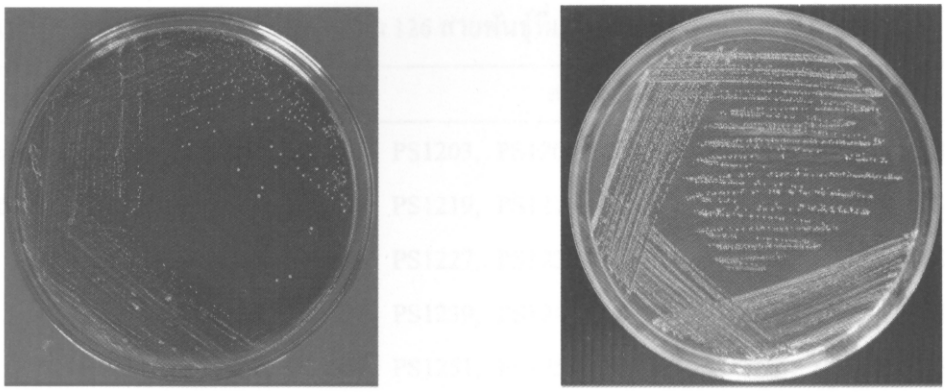
เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1240 และ PS1243 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 สายพันธุ์ และส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก สองสายพันธุ์นี้มีสามารถยับยั้งการเติบโตเติบโตของ *L. monocytogenes* DMST4553 จึงนำแบคทีเรียแลกติกทั้งสองสายพันธุ์ มาเลี้ยงใน MRS broth เป็นเวลา 24 และ 48 ชม. แล้วนำ culture broth มาตรวจหาปริมาณกรดอะซิติก และกรดแลกติก (รูปที่ 25) พบว่าแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1240 ผลิตปริมาณกรดแลกติกได้มากกว่า สายพันธุ์ PS1243 โดย PS 1240 ผลิตกรดแลกติก ปริมาณ 4.9 และ 5.9 g/l ในเวลา 24 และ 48 ชม. ส่วน PS1243 สามารถผลิตกรดแลกติกปริมาณ 3.6 และ 2.3 g/l ในเวลา 24 และ 48 ชม. แต่ตรวจไม่พบกรดอะซิติก



รูปที่ 25 การผลิตกรดแลกติกของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1240 และ PS1243 ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24 และ 48 ชม. (control คือ MRS broth)

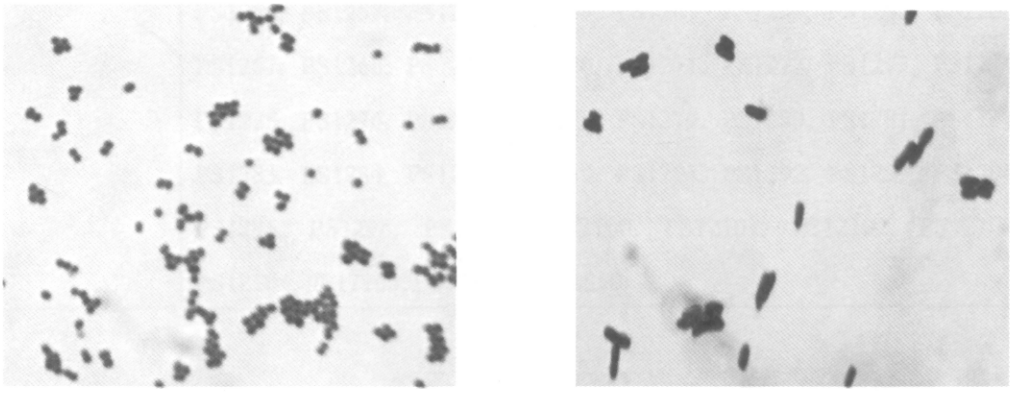
8. การระบุชนิดแบคทีเรียแลกติก

การบ่งชี้เพื่อระบุชนิดแบคทีเรียแลกติก ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้จำนวน 126 สายพันธุ์ ทำโดยการทดสอบทางกายภาพและทางชีวเคมี ดูลักษณะโคโลนี (รูปที่ 26) ย้อมติดสีกรัมบวก (รูปที่ 27) ทดสอบการเติบโตที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C ทดสอบการเติบโตในอาหารที่มี pH 4.4 และ pH 9.9 ทดสอบการเติบโตในอาหารที่มีเกลือ 6.5% และ 18% ผลปรากฏว่าสามารถจำแนกเป็นแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus* จำนวน 67 สายพันธุ์ (53.17%) จำแนกเป็น *Lactobacillus* ที่แยกจากกระบวนการหมัก 48 สายพันธุ์ จากก้อนเต้าหู้ (tofu) 9 สายพันธุ์ และจากเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป 10 สายพันธุ์ และจำแนกเป็น *Pediococcus* 59 สายพันธุ์ (46.83%) โดยจำแนกเป็น *Pediococcus* ในกระบวนการหมัก 58 สายพันธุ์ และในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6) ทุกสายพันธุ์หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊สจึงจัดเป็น homofermentative lactic acid bacteria ดังแสดงตัวอย่างการทดสอบของแบคทีเรียแลกติก 10 สายพันธุ์ และเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์มาตรฐาน (ตารางที่ 7) หลักการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 10 สายพันธุ์ดังกล่าว โดยอาศัยคุณสมบัติ probiotic และมีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร รวมทั้งความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน หรือย่อยไขมัน เพื่อบ่งชี้ในระดับ species โดยการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต โดย API 50 CHL test โดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR862 เป็นสายพันธุ์มาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ (ตารางที่ 7 และ ตารางที่ 8) (รูปที่ 28) แล้วนำผลที่ได้ไปเทียบเคียงชนิดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ API Web Stand Alone V. 1.1.0 (ตารางที่ 9) เป็น *Lactobacillus curvatus* (99.4% identity) 3 สายพันธุ์ (PS1240, PS1241, PS1243) *Lactobacillus delbrueckii* (92.4% identity) 3 สายพันธุ์ (PS1287, PS12102, LPS1203) *Pediococcus* sp. (98.6, 94.5 และ 91.8% identity) 3 สายพันธุ์ (PS1231, PS1270, CPS1210) และ *Lactobacillus plantarum* (99.9% identity) 1 สายพันธุ์ (LPS1203) อย่างไรก็ตามเมื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีการตรวจหาลำดับเบสของ 16S rRNA (รูปที่ 29) พบว่า *Lactobacillus curvatus* PS1240 (99.4% identity) เป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus acidipiscis* (99% identity) และ *Pediococcus* PS1231 เป็น *Tetragenococcus halophilus* (99% identity)



(A) (B)

รูปที่ 26 ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1231 (A) และ PS1243 (B) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar บ่ม 35°C เป็นเวลา 48 ชม.



(A) (B)

รูปที่ 27 รูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีกรัมของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ (กำลังขยาย 100 เท่า)

A) รูปร่างแบบ cocci, tetrad formation ของเชื้อสายพันธุ์ PS1231

B) รูปร่างแบบ rod ของเชื้อสายพันธุ์ PS1243

ตารางที่ 6 การจำแนกแบคทีเรียแลกติก 126 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

Genus	สายพันธุ์
Lactobacillus 67 สายพันธุ์	PS1201, PS1202, PS1203, PS1204, PS1205, PS1206, PS1207, PS1208, PS1209, PS1218, PS1219, PS1220, PS1221, PS1222, PS1223, PS1224, PS1225, PS1226, PS1227, PS1228, PS1229, PS1234, PS1235, PS1236, PS1237, PS1238, PS1239, PS1240, PS1241, PS1242, PS1243, PS1248, PS1249, PS1250, PS1251, PS1252, PS1253, PS1254, PS1255, PS1260, PS1262, PS1263, PS1286, PS1287, PS1288, PS1290, PS1298, PS1299, LPS1201, LPS1202, LPS1203, LPS1204, LPS1205, LPS1206, LPS1207, LPS1208, LPS1209, CPS1201, CPS1202, CPS1203, CPS1204, CPS1205, CPS1206, CPS1207, CPS1208, CPS1209, CPS1211
Pediococcus 59 สายพันธุ์	PS1210, PS1211, PS1212, PS1213, PS1214, PS1215, PS1216, PS1217, PS1230, PS1231, PS1232, PS1233, PS1244, PS1245, PS1246, PS1247, PS1256, PS1257, PS1258, PS1259, PS1261, PS1264, PS1265, PS1266, PS1267, PS1268, PS1269, PS1270, PS1271, PS1272, PS1273, PS1274, PS1275, PS1276, PS1277, PS1278, PS1279, PS1280, PS1281, PS1282, PS1283, PS1284, PS1285, PS1289, PS1291, PS1292, PS1293, PS1294, PS1295, PS1296, PS1297, PS12100, PS12101, PS12102, PS12103, PS12104, PS12105, PS12106, CPS1210

ตารางที่ 7 ตัวอย่างการทดสอบทางกายภาพและทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติก 10 สายพันธุ์ และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

Strains	Shape	Tetrad formation	CO_2 from glucose	Growth at		Growth in NaCl		Growth at pH		Enzyme production		
				10 °C	45 °C	6.5%	18%	4.4	9.6	protease	amylase	lipase
Pediococcus (PS1231)	cocci	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Lactobacillus (PS1240)	rod	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
Lactobacillus (PS1241)	rod	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Lactobacillus (PS1243)	rod	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-
Pediococcus (PS1270)	cocci	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+
Lactobacillus (PS1287)	rod	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
Lactobacillus (PS12102)	rod	-	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-
LPS1203 *(Lactobacillus)*	rod	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
Lactobacillus (LPS1207)	rod	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-
Pediococcus (CPS1210)	cocci	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-
L. plantarum TISTR862	rod	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-
L. bulgaricus TISTR451	rod	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
P. halophilus TISTR334	cocci	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
L. lactis TISTR1401	rod	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-

หมายเหตุ: + = เติบโต, - = ไม่เติบโต

ตารางที่ 8 การหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากได้เต้าหู้ยี้

Tube	Test	*Pediococcus*			*Lactobacillus*							
		PS1231	PS1244	CPS1210	PS1240	PS1241	PS1243	PS1287	PS12102	LPS1203	LPS1207	*L. plantarum*
0	CONTROL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1	Glycerol	-	d	-	d	-	d	d	-	-	d	-
2	Erytritol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	D-Arabinos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-
4	L-Arabinose	-	+	+	-	-	-	-	-	+	d	+
5	D-Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	D-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-
7	L-Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	A-Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	Methyl-βD-Xylopyranoside	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	D-Galactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
11	D-Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
12	D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13	D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
14	L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-
15	L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	d	-	-
16	Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	D-Mannitol	-	d	-	+	+	+	-	-	+	-	+
19	D-Sorbitol	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
20	Methyl-αD-Mannopyranoside	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
21	Methyl-αD-Glucopyranoside	d	-	d	d	-	d	-	-	-	-	-
22	N-Acetylglucosamine	+	+	+	d	+	+	d	-	d	d	+
23	Amygdalin	d	d	d	d	-	d	-	-	+	-	+

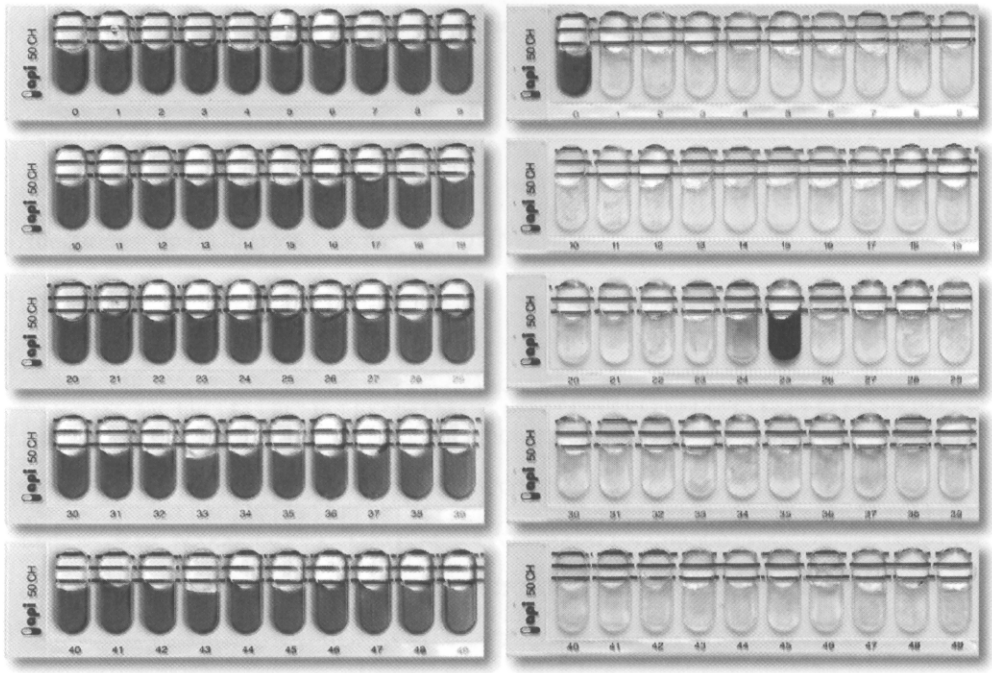
ตารางที่ 8 (ต่อ)

Tube	Test	*Pediococcus*			*Lactobacillus*							
		PS1231	PS1244	CPS1210	PS1240	PS1241	PS1243	PS1287	PS12102	LPS1203	LPS1207	*L. plantarum*
24	Arbutin	+	+	d	d	-	d	-	-	+	-	+
25	Esculin ferric citrate	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
26	Salicin	+	d	d	d	d	d	-	-	d	-	+
27	D-Celibiose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
28	D-Maltose	+	+	d	d	d	d	-	-	+	-	+
29	D-Lactose (bovine origin)	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
30	D-Melibiose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
31	D-Saccharose	+	+	-	-	-	d	-	-	+	-	+
32	D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
33	Inulin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34	D-Melezitose	d	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
35	D-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+
36	Amidon (strach)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
39	Gentiobiose	+	+	+	d	+	-	-	-	d	-	-
40	D-Turanose	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
41	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	D-Tagatose	-	-	-	+	+	d	d	-	-	d	-
43	D-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
44	L-Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
47	Potassium Gluconate	-	-	-	d	-	-	-	-	d	-	-
48	Potassium 2-ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	Potassium 5-ketogluconate	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-

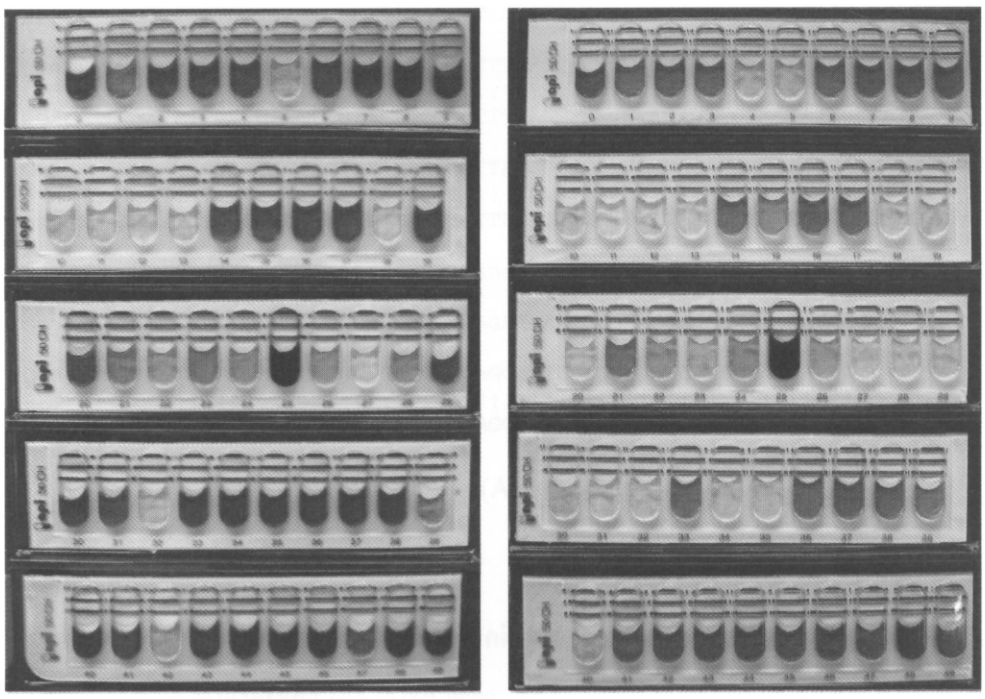
+ : positive, - : negative, d : delay reaction

ตารางที่ 9 เปอร์เซ็นต์การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ program computer API Web Stand Alone V. 1.1.0

รหัสแบคทีเรียแลกติก	แหล่งที่มา	ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่บ่งชี้ได้	%Identity
PS1231	FSF2	*Pediococcus* sp.	91.8
PS1240	FSF3	*Lactobacillus curvatus*	99.4
PS1241	FSF3	*Lactobacillus curvatus*	99.4
PS1243	FSF3	*Lactobacillus curvatus*	99.4
PS1270	FSF3	*Pediococcus* sp.	94.5
PS1287	FSF7	*Lactobacillus delbrueckii*	92.4
PS12102	FSF8	*Lactobacillus delbrueckii*	92.4
LPS1203	ก้อนเต้าหู้ (tofu)	*Lactobacillus plantarum*	99.9
LPS1207	ก้อนเต้าหู้ (tofu)	*Lactobacillus delbrueckii*	92.4
CPS1210	CSF9	*Pediococcus* sp.	98.6
L. plantarum TISTR 862	สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย	*Lactobacillus plantarum*	99.9



Negative control Positive control



Test (PS1240) Test (LPS1203)

รูปที่ 28 การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ API 50 CHL

Negative control หมายถึง แบคทีเรียแลกติกไม่ผลิตกรดออกมาเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ (สีม่วง) Positive control หมายถึง แบคทีเรียติกสามารถใช้น้ำตาลแล้วผลิตกรดออกมาเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ (สีเหลือง)

dbj|AB236940.1| *Tetragenococcus halophilus* gene for 16S rRNA, partial sequence,

strain:E051627

Length=473

Score = 854 bits (462), Expect = 0.0

Identities = 467/470 (99%), Gaps = 1/470 (0%)

Strand=Plus/Minus

```
Query  28   CCTCTTTCTCCTGTTCTTTGCTGACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTC  87
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  473  CCTCTTTCTCCTGTTCTTTGCTGACAACAGAGCTTTACGATCCGAAAACCTTCTTCACTC  414

Query  88   ACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTGCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC  147
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  413  ACGCGGCGTTGCTCGGTCAGACTTGCGTCCATTGCCGAAGATTCCCTACTGCTGCCTCCC  354

Query  148  GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTAT  207
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  353  GTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAGTGTGGCCGATCACCCTCTCAGGTCGGCTAT  294

Query  208  GCATCGTTGCTTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTGGCTAATGCACCGCGGGACCAGCC  267
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  293  GCATCGTTGCTTTGGTGAGCCGTTACCTCACCAACTGGCTAATGCACCGCGGGACCAGCC  234

Query  268  ATCAGTGACGCTGTAAAGCGCCTTTGAGCTTTCTTTCAGGTGaaaaaaaGCCNTATGCGG  327
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  233  ATCAGTGACGCTGTAAAGCGCCTTTGAGCTTTCTTTCAGGTGAAAAAAAGCCATATGCGG  174

Query  328  TATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCGCTGATGGATAGGTTCCCCACGTGTTACT  387
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  173  TATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCGCTGATGGATAGGTTCCCCACGTGTTACT  11

Query  388  CACCCGTCCGCCACTCCGCTTaanaaaaaaCCGAAGTTTCTTCTTAAGCAGCGTTCGACT  447
            |||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  113  CACCCGTCCGCCACTCCGCTTAAGAAAAAACCGAAGTTTCTTCTTAAGCAGCGTTCGACT  54

Query  448  TGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCAGGGATCAAAC  497
            |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||
Sbjct  53   TGCATGTATTAGGCACGCCGCCAGCGTTCGTCCTGAGCCA-GGATCAAAC  5
```

(A)

รูปที่ 29 (A) การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติก PS1231 โดยวิธีการตรวจหา ลำดับเบสของ 16S rRNA gene

dbj|AB289009.1| *Lactobacillus acidipiscis* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 10692
Length=680
Score = 808 bits (437), Expect = 0.0
Identities = 442/445 (99%), Gaps = 0/445 (0%)
Strand=Plus/Minus

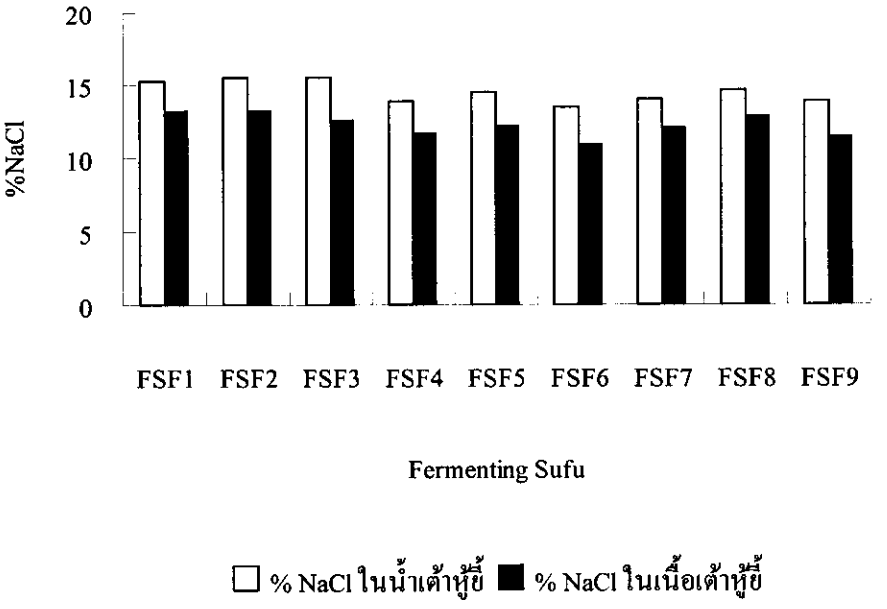
```
Query 1   GTCAGCGCGATAACAGTTACTCTATCACGTGTTCTTCTCTGACAACAGTATTTTACGATC 60
          |||||||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 445 GTCAGCGCCATAGCAGTTACTCTATCACGTGTTCTTCTCTGACAACAGTATTTTACGATC 386

Query 61  CGAAGACCTTCTTCATACACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGAT 120
          ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 385 CGAAGACCTTCTTCATACACGCGGCGTTGCTCCATCAGACTTGCGTCCATTGTGGAAGAT 326

Query 121 TCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCA 180
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 325 TCCCTACTGCTGCCTCCCGTAGGAGTTTGGGCCGTGTCTCAGTCCCAATGTGGCCGATCA 266

Query 181 ACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGTTAA 240
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 265 ACCTCTCAGTTCGGCTACGTATCATCACCTTGGTAAGCCGTTACCTTACCAACTAGTTAA 206

Query 241 TACGCCGCGGGCTCATCCAAAAGCGACAGCTGACGCCGTCTTTGCCCGGCCGACCATGCG 300
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 205 TACGCCGCGGGCTCATCCAAAAGCGACAGCTGACGCCGTCTTTGCCCGGCCGACCATGCG 146

Query 301 GTCAGCCGGTTGATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCACTTTNGGGCA 360
           |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||
Sbjct 145 GTCAGCCGGTTGATGCGGTATTAGCACCTGTTTCCAAGTGTTATCCCCCACTTTTGGGCA 86

Query 361 GATTGCCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCACTCGCACTTTGACCGCTGAGTGCAAGCAC 420
           ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 85  GATTGCCCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCACTCGCACTTTGACCGCTGAGTGCAAGCAC 26

Query 421 TCATTAGTCAAAGATTGCGTTCGAC 445
           |||||||||||||||||||||||||
Sbjct 25  TCATTAGTCAAAGATTGCGTTCGAC 1
```

(B)

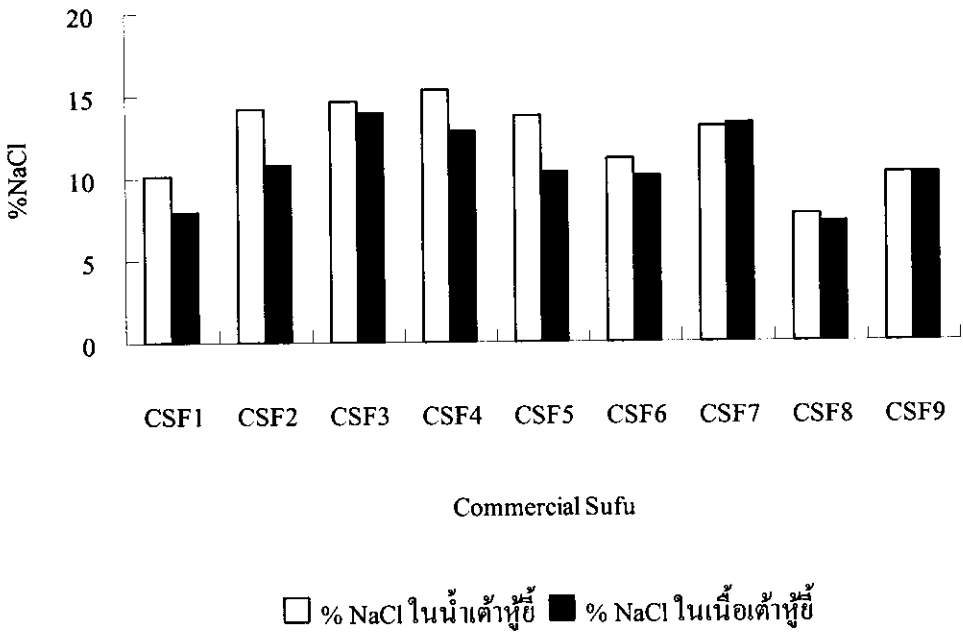
รูปที่ 29 (ต่อ) (B) การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติก PS1240 โดยวิธีการตรวจหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene

9. การตรวจหาปริมาณเกลือในตัวอย่างเต้าหู้ยี้

การตรวจหาปริมาณเกลือในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก (รูปที่ 30) และเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (รูปที่ 31) พบว่า เต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักมีปริมาณเกลือในน้ำเต้าหู้ยี้สูงกว่าในเนื้อ โดยมีปริมาณเกลือเริ่มต้น 15.2% (น้ำ) และ 13.2% (เนื้อ) และปริมาณเกลือลดต่ำลงในเดือนที่ 6 แล้วเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีปริมาณเกลือในเดือนที่ 9 เท่ากับ 13.8% (น้ำ) และ 11.4% (เนื้อ) ตามลำดับ ส่วนปริมาณเกลือในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปพบว่า ในน้ำเต้าหู้ยี้มีปริมาณเกลือสูงกว่าในเนื้อเช่นเดียวกับเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก (FSF1-FSF9) ยกเว้นตัวอย่าง CSF9 ที่มีปริมาณเกลือเท่ากันทั้งในน้ำและเนื้อเต้าหู้ยี้ ส่วนตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่มีปริมาณเกลือในน้ำสูงสุด คือ CSF4 (15.3%) และมีปริมาณเกลือน้อยสุดคือ CSF8 (7.8%) ส่วนตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่มีปริมาณเกลือในเนื้อมากสุด คือ CSF3 (14.0%) และมีปริมาณเกลือน้อยสุด คือ CSF8 (7.3%) เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่ได้จากกระบวนการหมัก CSF1 มีปริมาณเกลือลดลงเท่ากับ 10.1 % (น้ำ) และ 7.9% (เนื้อ) ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนบรรจุขวดและฆ่าเชื้อจะมีการเติมน้ำและน้ำตาลโตนด



รูปที่ 30 เปอร์เซ็นต์เกลือในน้ำและเนื้อของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก



รูปที่ 31 เปอร์เซนต์เกลือในน้ำและเนื้อของตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

10. การตรวจหาปริมาณแร่ธาตุ

เนื่องจากอาหารแต่ละชนิด จะมีองค์ประกอบของแร่ธาตุต่างๆ แตกต่างกัน ขึ้นกับวัตถุดิบที่นำมาใช้ และจากการตรวจหาปริมาณแร่ธาตุ จำนวน 12 ชนิด ในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป โดยมี CSF1 เป็นเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่หมักแบบดั้งเดิมเป็นตัวอย่างควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปอื่นๆ อีก 5 ตัวอย่าง CSF2, CSF3, CSF6, CSF8 และ CSF9 (ตารางที่ 10) ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า สามารถจัดชนิดและปริมาณแร่ธาตุที่มีอยู่ในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

1. กลุ่ม A ได้แก่ Mg และ Ca ที่มีปริมาณมากเป็นอันดับที่ 1 โดย CSF1 มีปริมาณ Mg และ Ca เท่ากับ 479.74 และ 153.42 mg/kg ตามลำดับ

2. กลุ่ม B ได้แก่ Li, Fe, Cu, Mn, Zn และ Al มีปริมาณมากอันดับ 2 (<30 mg/kg) โดยมีแร่ธาตุ 3 ชนิด ที่เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของเต้าหู้ยี้ ได้แก่ Fe, Zn, และ Al โดยตัวอย่างควบคุม CSF1 มีปริมาณ Fe, Zn และ Al เท่ากับ 7.21, 1.93 และ 1.87 mg/kg ตามลำดับ แต่ CSF2 มีปริมาณ Fe (23.88 mg/kg), Zn (7.35 mg/kg), และ Al (10.40 mg/kg) ซึ่งมากกว่าปริมาณที่มีใน CSF1 3.21 เท่า, 3.81 เท่า และ 5.56 เท่า ตามลำดับ ส่วน CSF3 มีปริมาณ Fe และ Al มากกว่า CSF1 2.19 เท่า และ 2.66 เท่า ตามลำดับ และตัวอย่าง CSF8 มีปริมาณ Zn และ Al มากกว่า CSF1 2.46 เท่า และ 3.28 เท่า

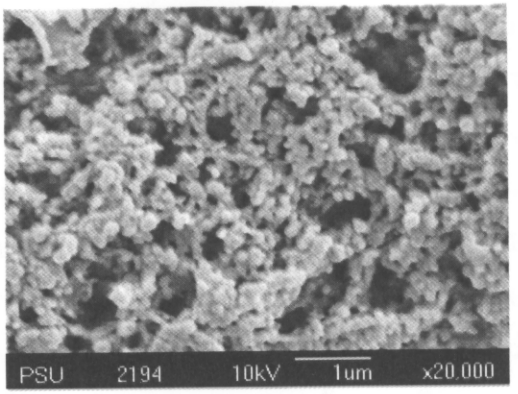
3. กลุ่ม C ได้แก่ Pb, Cd, As และ Ni มีปริมาณ <1mg/kg ซึ่งแสดงถึงการปนเปื้อนสารพิษจากสิ่งแวดล้อม

ตารางที่ 10 ชนิดและปริมาณแร่ธาตุในตัวอย่างเต้าหู้ขี้สำเร็จรูป

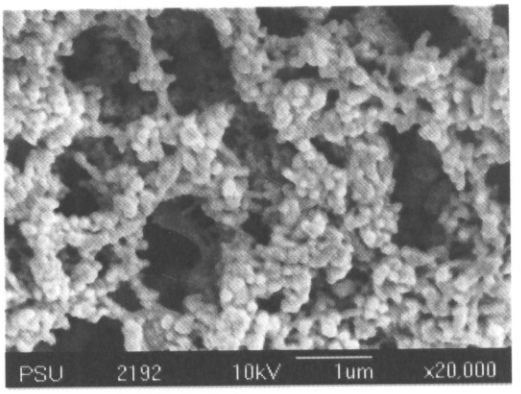
แร่ธาตุ	ปริมาณแร่ธาตุ (mg/kg)					
	CSF1	CSF2	CSF3	CSF6	CSF8	CSF9
Mg	479.740	174.300	2295.300	551.210	141.100	185.620
Ca	153.420	174.500	334.390	202.050	132.080	1159.680
Li	23.050	1.500	29.150	30.060	1.340	12.460
Fe	7.210	23.880	15.770	7.250	8.970	8.600
Cu	2.840	0.880	2.850	2.990	0.430	2.750
Mn	2.310	5.000	2.810	3.660	3.260	3.360
Zn	1.930	7.350	2.350	2.360	4.750	1.950
Al	1.870	10.400	4.970	2.040	6.140	3.220
Ni	0.100	0.120	0.100	0.240	0.090	0.160
As	0.050	0.010	0.090	0.040	0.001	0.007
Pb	0.020	0.040	0.020	0.020	0.030	0.002
Cd	0.010	0.020	0.010	0.010	0.020	0.002

11. SEM ของเนื้อเต้าหู้ยี้

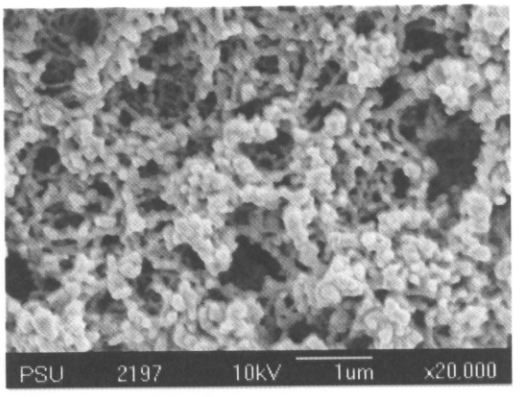
การตรวจโครงสร้างของเนื้อเต้าหู้ (วัตถุดิบ) เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปชนิดเหลือง (CSF1) และเต้าหู้ยี้แดง (CSF3) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิด scanning electron microscope (SEM) (รูปที่ 32) พบว่าเนื้อเต้าหู้วัตถุดิบก่อนหมัก มีโครงสร้างของเนื้อเต้าหู้หนาแน่นเป็นแบบ filamentous gel structure ซึ่งเกิดจากน้ำนมถั่วเหลืองดิบเป็น native protein ที่ไม่เกาะกลุ่ม (non-aggregated native protein) เมื่อต้มนมถั่วเหลืองโปรตีนจะเกาะกลุ่มเป็นสายยาว (filament formation) และเมื่อเติม Ca^{++}/Mg^{++} ทำให้น้ำเต้าหู้แข็งตัวเป็น soybean curd (filamentous gel structure) โดย Ca^{++}/Mg^{++} เป็นตัวเชื่อมระหว่างสายโปรตีนตรงตำแหน่ง carboxylic group (Kao, 2003) และเมื่อผ่านกระบวนการหมักที่มีเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ เป็นเวลา 9 เดือน พบว่า เนื้อเต้าหู้ยี้เหลือง (CSF1) มีรูพรุนขนาดใหญ่และจำนวนมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเต้าหู้ที่ยังไม่ได้หมัก ส่วนเนื้อเต้าหู้ยี้แดง (CSF3) อนุภาคโปรตีนจับกันหนาแน่นกว่าและมีรูพรุนน้อยกว่าเต้าหู้ยี้เหลือง



A



B



C

รูปที่ 32 SEM ของก้อนเต้าหู้ที่ยังไม่ได้หมัก (A), ก้อนเต้าหู้ยี้เหลืองสำเร็จรูป อ. เมือง จ. สงขลา (B) และก้อนเต้าหู้ยี้แดงสำเร็จรูป จากประเทศจีน (C)

12. การตรวจหา *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin (BDE) ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

ผลจากการทดสอบหา BDE จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปยี่ห้อต่างๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง (CSF1-CSF9) โดยทำการเปรียบเทียบผลที่ได้กับ positive control, negative control และ card color พบว่าตัวอย่างเต้าหู้ยี้ใส่ใน BHI+0.1%glucose (enriched medium) เพื่อเพิ่มความสามารถในการสร้าง enterotoxin และบ่มไว้ 18 ชม. พบว่าตัวอย่างเต้าหู้ยี้ที่ตรวจพบ BDE มี 5 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่าง ได้แก่ CSF1, CSF2, CSF6, CSF8 และ CSF9 คิดเป็น 56% โดยที่เมื่อไม่มีการบ่มตัวอย่างเต้าหู้ยี้ใน BHI+0.1%glucose (non-enriched medium) (direct assay) พบว่าตัวอย่างทั้งหมดตรวจไม่พบ BDE คิดเป็น 100% ที่ปลอดภัยจาก BDE แสดงผลดัง ตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การตรวจหา *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป โดยใช้ TECRA BDE VIA

Sample	*Bacillus* (log CFU/g)	Card color	Enterotoxin* (Enriched)	Enterotoxin** (non-enriched) (Direct assay)
CSF1	3.6	4	+	-
CSF2	3.0	4	+	-
CSF3	5.6	2	-	ND
CSF4	5.7	2	-	ND
CSF5	4.6	2	-	ND
CSF6	6.9	5	+	-
CSF7	5.3	2	-	ND
CSF8	4.9	4	+	-
CSF9	5.1	4	+	-
positive control	ND	4	+	ND
negative control	ND	1	-	ND
negative food control	ND	1	-	ND

positive control = BDE

negative control = BHI+0.1%glucose

negative food control = Sufu (ตัวอย่างเต้าหู้ยี้ CSF4)

ND = Not determined, + = positive, - = negative

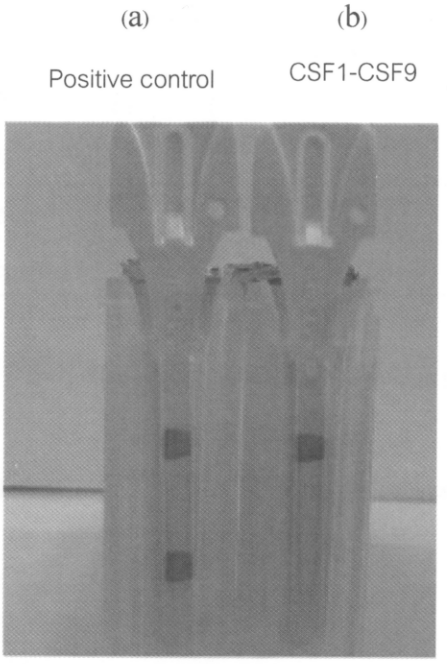
card color: 1= สีขาว (negative), 2= สีเขียวอ่อน (negative), 3= สีเขียว (positive), 4= สีเขียวเข้ม (positive) และ 5= สีเขียวแก่ (positive)

* ตรวจพบ Enterotoxin เมื่อใส่ตัวอย่างในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI+0.1%glucose (enriched medium)

** ตรวจไม่พบ Enterotoxin เมื่อตรวจตัวอย่างโดยตรงโดยไม่ได้ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI+0.1%glucose (non-enriched medium)

13. ผลการตรวจหา Staphylococcal enterotoxin

การตรวจหา Staphylococcal enterotoxin โดยใช้ TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins (SET) ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปจำนวน 9 ตัวอย่าง และเชื้อ *Staphylococcus aureus* 2 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC 25923 และ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ เมื่อนำผลที่ได้ไปเทียบกับการ์ดพบว่าตรวจไม่พบ Staphylococcal enterotoxin ในทุกตัวอย่าง และเชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC 25923 ไม่สร้าง Enterotoxin ส่วน *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ได้จากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ตรวจพบเอนเทอโรทอกซิน ดังรูปที่ 33 และตารางที่ 12



รูปที่ 33 การตรวจหา Staphylococcal enterotoxins โดยใช้ TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins (SET)

(a) *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ที่ได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ (Positive control)

(b) ตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (CSF 1 – CSF9)

ตารางที่ 12 ปริมาณเชื้อที่หมักน้ำตาลแมนนิทอล และผลการตรวจหา Staphylococcal enterotoxin ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

Sample	ปริมาณเชื้อ (log CFU/g)	Enterotoxin
CSF1	7.29	-
CSF2	6.91	-
CSF3	6.38	-
CSF4	3.44	-
CSF5	7.14	-
CSF6	6.25	-
CSF7	6.76	-
CSF8	6.14	-
CSF9	6.68	-
Staphylococcus aureus ATCC 25923		-
Positive control		+
Negative control		-

Positive control = *Staphylococcus aureus* ที่ได้มาจากกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

Negative control = TECRA Staphylococcus growth medium

วิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ในการทดลองนี้มีรูปแบบของปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกแตกต่างจากการายงานของ ประเสริฐ และคณะ (2548) เนื่องจากการทดลองนี้ได้เติม sodium azide ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (ดารุณี, 2548) เพื่อยับยั้งยีสต์และรา เนื่องจากในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้มีปริมาณยีสต์ที่สามารถตรวจพบตลอดระยะเวลาการหมัก และยีสต์สามารถเติบโตได้ดี บนอาหาร MRS agar (pH 6.5) ที่ใช้เป็น selective medium สำหรับแบคทีเรียแลกติก ซึ่งถ้าไม่เติม sodium azide ในอาหาร MRS จะทำให้ยีสต์เติบโตเร็วกว่า และเติบโตทับแบคทีเรียแลกติก และการที่ปริมาณแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณลดน้อยลงในระหว่างกระบวนการหมัก และในบางเดือนตรวจไม่พบแบคทีเรียแลกติกทนเกลือ แต่ยังคงตรวจพบแบคทีเรียแลกติกชอบเกลือ อาจเป็นเพราะสภาวะอากาศและสภาพแวดล้อมในแต่ละเดือนของการเก็บตัวอย่าง เนื่องจากวางถังหมักในบริเวณโล่งแจ้งและมีการเปิดเพื่อให้เต้าหู้ยี้สัมผัสกับแสงแดดในวันที่มีอากาศแจ่มใส ส่วนในถังหมักอื่นๆ ที่มีอายุการหมักแตกต่างกันพบแบคทีเรียแลกติกในจำนวนที่ใกล้เคียงกับถังหมักที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งในแต่ละเดือนหรือในแต่ละถังหมักอาจมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกแตกต่างกันบ้างทั้งนี้อาจขึ้นอยู่กับการปนเปื้อนของแบคทีเรียแลกติกในวัตถุดิบที่ใช้หรือการปนเปื้อนที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการหมัก นอกจากนี้สิ่งที่น่าสนใจประการหนึ่ง คือ สามารถตรวจพบแบคทีเรียแลกติกในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป จำนวน 3 ตัวอย่าง จาก 9 ตัวอย่าง ทั้งนี้อาจเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียเหลือรอดจากกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อก่อนออกจำหน่าย หรืออาจไม่มีการผ่านความร้อนหรือใช้ความร้อนต่ำมาก

ส่วนการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารนั้น ผลปรากฏว่าตรวจไม่พบ faecal coliform ซึ่งแสดงถึงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานชุมชนผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้ (ภาคผนวก ค) ที่ระบุว่าปริมาณ coliforms ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม เมื่อตรวจหาด้วย MPN method ส่วน *Staphylococcus* ที่ตรวจพบนั้น เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค เนื่องจากให้ผลการทดสอบ coagulase negative อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *Bacillus* เป็นสายพันธุ์ ที่ตรวจพบตลอดกระบวนการหมัก รวมทั้งในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป ปริมาณระหว่าง 10^3-10^6 CFU/กรัม และจากการบ่งชี้โดยใช้ API 50 CHB system (ลุกมาน, 2549) พบว่าเป็น *Bacillus cereus* (73-98% identity) และ *Bacillus laterosporous* (85-86%) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเทียบเคียงความเหมือนกันในระดับ species ยังให้ความเชื่อมั่นต่ำ จึงควรยืนยันการบ่งชี้ในระดับโมเลกุลโดยตรวจหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene แล้วเทียบเคียง (blast) กับฐานข้อมูลใน Gen bank และควรตรวจหา enterotoxin ของ *B. cereus* และ Staphylococcal enterotoxin โดยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบ TECRA Diagnostic kit

(Australia) เพื่อยืนยันผลความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้ต่อไป อย่างไรก็ตาม Han และคณะ (2004) ได้รายงานว่าตรวจพบ *B. subtilis* และ *B. cerues* ในเต้าหู้ยี้ที่ผลิตจากประเทศจีน ปริมาณน้อยกว่า 10^3 CFU/กรัม ซึ่งไม่เกินกำหนดขององค์การอาหารและยา (FDA) ของสหรัฐอเมริกา ซึ่งได้กำหนดผลิตภัณฑ์อาหารเป็นพืชปนเปื้อน *B. cereus* มีปริมาณเชื้อไม่มากกว่า 10^6 CFU/กรัม อย่างไรก็ตาม Shi และFung (2000) ได้รายงานว่าการเติมเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร เช่น *E. coli* O157 : H7, *Salmonella* typhi, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ปริมาณ 5 log CFU/g ลงบนเต้าหู้ตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการทำเต้าหู้ยี้ก่อนใส่เชื้อรา *Actinomucor elegans* พบว่าเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 7-9 log CFU/g ใน 2 วันแรก และเมื่อเติมเกลือ 10-12% NaCl พบว่าปริมาณเชื้อก่อโรคจะค่อยๆ ลดลง และตรวจไม่พบภายใน 1 เดือนของการหมัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมเกลือความเข้มข้นระดับปานกลางนี้สามารถควบคุมและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารได้ดี

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ทั้งหมด 126 สายพันธุ์เป็นแบคทีเรียทนเกลือ (haloterorant) (65.9%) และแบคทีเรียชอบเกลือ (halophilic) (43.1%) ซึ่งเติบโตได้ในอาหารที่ไม่มีการเติมเกลือและเติมเกลืออย่างน้อย 5% และเป็น facultative anaerobe นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ จำนวน 50 สายพันธุ์ (39.7%) ยังมีบทบาทในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน skim milk (โดยมี casein เป็นองค์ประกอบโปรตีน) และ gelatin ซึ่งน่าจะมีบทบาทการย่อยสลายโปรตีนในกระบวนการหมักร่วมกับแบคทีเรียในกลุ่ม *Bacillus* ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมันได้ดี ส่วนเชื้อราที่เป็นเชื้อเริ่มต้น มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนและแป้งในระยะ 2 เดือนแรกของการหมักเนื่องจากเชื้อราไม่สามารถเติบโตในสภาวะที่มีเกลือ 10% (ประเสริฐ และคณะ, 2548) การย่อยสลายโปรตีนของเต้าหู้ยี้ เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลใหญ่ของโปรตีนเป็น peptide, amino acids, amines และ ammonia ทำให้เพิ่มปริมาณกลิ่นรส (Han *et al.*, 2003) และในการย่อยสลายเต้าหู้ให้เป็นโปรตีนที่มีขนาดเล็กลงและกรดอะมิโนเพื่อใช้เป็น substrate ของเชื้อแบคทีเรียในการนำไปใช้เป็นอาหารสำหรับการดำรงชีพ ปริมาณกรดอะมิโนในเต้าหู้ยี้แต่ละประเภทมีไม่เท่ากัน กรดอะมิโนที่มีมากในเต้าหู้ยี้แดงได้แก่ glutamic acid, aspartic acid, isoleucine, lysine, cystine, phenylalanine และ tyrosine ในขณะที่กรดอะมิโนที่มีในเต้าหู้ยี้ชนิดอื่นได้แก่ glutamic acid, isoleucine, alanine, aspartic acid, phenylalanine, leucine และ valine (Han *et al.*, 2001) ซึ่งกรดอะมิโนจะมีส่วนที่ทำให้เกิดกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์อาหาร (Montel *et al.*, 1998) นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังมีบทบาทในการผลิตสารประกอบ non volatile และ volatile ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ พบว่าแบคทีเรียแลกติก ผลิต D-lactic และ acetic acid ซึ่งทำให้เกิดรสเปรี้ยว และปรับลด pH ซึ่งสามารถควบคุมกิจกรรมของแบคทีเรียอื่นๆ ส่วนโปรตีนในกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายเป็น peptides ส่วน lipids ถูกย่อยเป็น fatty acids โดย endogeneous enzymes และเอนไซม์จากแบคทีเรีย (Montel

et al., 1998). นอกจากนี้ยังได้มีการรายงานว่าในเต้าหู้ยี้แดงและเต้าหู้ยี้ขาวที่มีกลิ่นรสที่ดีนั้นประกอบด้วย ester 22 ชนิด, alcohol 18 ชนิด, ketones 7 ชนิด, aldehydes 3 ชนิด, pyrazines 2 ชนิด, phenol 2 ชนิด และ volatile compounds (Hwan and Chou, 1999)

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้มีคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติก คือ สามารถทนกรดและเกลือน้ำดี ความสามารถในการทนกรดของแบคทีเรียแลกติกเป็นคุณสมบัติที่ทำให้สามารถมีชีวิตรอดในกระเพาะอาหารได้ โดยกระเพาะอาหารเป็นด่านแรกในการทำลายสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาโดยการกิน (Dunne *et al.*, 2001) กระเพาะอาหารมีความเป็น pH อยู่ในช่วง 1.5 ถึง 4.5 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับอาหารที่บริโภค ซึ่งอาหารมีผลต่อ pH ในกระเพาะอาหาร และช่วยป้องกันแบคทีเรียแลกติกจากการถูกทำลายด้วยเอนไซม์และกรด (Lin *et al.*, 2006) นอกจากนี้หน้าที่หลักของแบคทีเรียแลกติกในลำไส้ คือ ทำให้เกิดสมดุลของแบคทีเรียในลำไส้ใหญ่ (Parvez *et al.*, 2006) ดังนั้นแบคทีเรียแลกติกต้องทนและมีชีวิตรอดจากกระเพาะอาหารและน้ำดีจากลำไส้เล็ก โดยน้ำดีถูกผลิตขึ้นที่ตับจากคอเรสเตอรอล แล้วถูกหลั่งไปยังลำไส้เล็กตอนบน และน้ำดียังมีฤทธิ์ ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียกรัมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียกรัมลบ (Dunne *et al.*, 2001) ดังนั้นการทนต่อน้ำดี มีความสำคัญสำหรับแบคทีเรียแลกติกในการเติบโตและอยู่รอดในส่วนลำไส้เล็กตอนบน (du Toit *et al.*, 1998) อย่างไรก็ตามความหวังใหม่ในการคัดเลือก probiotic LAB โดยใช้วิธีการทางชีววิทยาระดับโมเลกุล การตรวจหาลำดับเบส 16S rDNA หรือ DNA/DNA hybridization ของ probiotic LAB (Gueimonde and Salminen, 2006) เช่น ที่มี site specific action เพื่อตรวจหาคุณสมบัติ การเกาะติดเซลล์บุลำไส้, การผลิต cytokines เพื่อลดการอักเสบ, การจับกับสารพิษ เช่น mycotoxin และ การจับกับโลหะหนัก เป็นต้น

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ยังแสดงบทบาทในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่นำมาศึกษาได้แก่ *E. coli* ATCC25922 (96.0%), *S. aureus* ATCC25923 (79%), *B. cereus* TISTR687 (91.3%) และ *L. monocytogenes* DMST4553 (88.1%) ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาล ให้เป็นกรดแลกติก เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อจะผลิตกรดทำให้ pH ของอาหารลดลงอยู่ในช่วง 4.1 – 4.9 ซึ่งช่วง pH ดังกล่าวสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้ทั้งกรัมบวกและกรัมลบ (Lin *et al.*, 2006) กรดที่ไม่แตกตัวสามารถผ่านเข้าไปยัง cytoplasm ของแบคทีเรียก่อโรคและไม่สามารถกำจัดออกนอกเซลล์ได้ทำให้ภายในเซลล์มีสภาพเป็นกรดแล้วทำให้เกิดการตายของแบคทีเรียก่อโรค (Russell and Diez-Gonzalez, 1998; Makras, 2006) ทำให้เกิดความล้มเหลวในการแลกเปลี่ยนโปรตอน หรือทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สูญเสียความสามารถในการควบคุมการเข้าออกของสาร (Ammor *et al.*, 2006) กรดอินทรีย์ไม่เพียงแต่เป็นเครื่องกีดขวางที่มีผลทำลายแบคทีเรียก่อโรค แต่ยังมีบทบาทสำคัญในการบำรุงรักษา

สภาพภายในลำไส้ (Cook and Sellin, 1998) ซึ่งจากการศึกษาการยับยั้งเชื้อของแบคทีเรียแลกติก พบว่าการทดสอบโดยวิธี Agar spot test ให้ผลการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าวิธี Agar well diffusion assay ซึ่งมีแบคทีเรียแลกติกเพียง 2 สายพันธุ์ ที่ให้ผลยับยั้งเชื้อก่อโรค ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับ Corsetti และคณะ (1996) และ Todorov และคณะ (1999) และจากการศึกษาของ Simsek และคณะ (2006) ซึ่งได้แยกแบคทีเรียแลกติกจากหัวเชื้อขนมปัง แล้วนำมาทดสอบกิจกรรมในการยับยั้งเชื้อ พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 20 สายพันธุ์ จาก 250 สายพันธุ์ ให้ผลยับยั้งเชื้อก่อโรคโดยวิธี Agar spot assay ทั้งนี้เป็นเพราะว่าการทดสอบด้วยวิธี Agar spot ใช้เชื้อที่มีชีวิตในการทดสอบแต่ Agar well diffusion assay ใช้ส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ หรืออาจเป็นเพราะว่าความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงเชื้อไม่เพียงพอในการยับยั้งเชื้อก่อโรค (Toure *et al.*, 2003) นอกจากนี้พบว่า แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1240 และ PS1243 ที่มีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์นั้น ตรวจไม่พบว่าผลิตแบคเทอริโอซินและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากการทดสอบโดยนำส่วนใสของน้ำเลี้ยงเชื้อมาปรับ pH เป็น 7.0 แล้วไม่พบวงใสหลังจากทำ Agar well diffusion assay ส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่ได้ปรับ pH เมื่อนำมาตรวจหาแบคเทอริโอซิน เนื่องจากมีแบคเทอริโอซินบางชนิดทำงานได้ดีที่ pH ต่ำ (Chou *et al.*, 1988) พบว่าไม่มีการหายไปของวงใสของนำน้ำเลี้ยงเชื้อที่ทดสอบร่วมกับเอนไซม์ แสดงว่าสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *L. monocytogenes* คือ กรด ซึ่งให้ผลการทดสอบเช่นเดียวกับ Makras and Vuyst (2006) โดยพบว่า *Bifidobacterium* ผลิต กรดแลกติก และกรดอะซิติก ในการยับยั้ง *Salmonella enterica* นอกจากนี้ Tome และคณะ (2006) พบว่า supernatant ของแบคทีเรียแลกติก 6 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* แต่เมื่อปรับ pH เป็น 6.5 พบว่า มีแบคทีเรียแลกติก 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* เป็นไปได้ว่าการยับยั้งที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากกรด นอกจากนี้ยังคล้ายคลึงกับการรายงานของ Aslim และคณะ (2005) ซึ่งได้ทดสอบ supernatant ของ *Lactobacillus* spp. 19 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม พบว่าความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ของ *Lactobacillus* spp. จำนวน 15 สายพันธุ์ หายไปเมื่อปรับ pH ของ supernatant เป็นกลาง แต่อย่างไรก็ตามได้มีรายงานชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่ผลิตแบคเทอริโอซิน ได้แก่ *Pediococcus acidilactici* และ *Pediococcus pentosaceus* ผลิต pediocin ที่สามารถยับยั้ง *Lactobacillus lactis* NCDO 176 (Gurira and Buys, 2005), *Enterococcus faecium* OQ31 ผลิต enterocin ที่สามารถลดการเติบโตของ *L. monocytogenes* ใน culture broth และพบว่ากิจกรรมยับยั้งเชื้อหายไป 100% เมื่อทดสอบกับ α-chymotrypsin ในขณะที่กิจกรรมยับยั้งเชื้อหายไปครึ่งหนึ่งเมื่อทดสอบกับ pepsin และ trypsin (Alvarado *et al.*, 2005), *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *dextranicum* ST 99 ผลิต mesenteriocin ST99 ซึ่งสามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis, Listeria innocoa,*

Staphylococcus aureus และ *Streptococcus thermophilus* โดยแบคเทอริโอซินสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อเมื่อทดสอบกับ protease IV และ pronase E แต่ยังคงมีกิจกรรมยับยั้งเชื้อเมื่อทดสอบกับ α-amylase, SDS, Tween 20, Tween 80, urea, Triton X-100,N-laurylsurcosin, EDTA และ phenylmethylsulfonylfluoride (Todorov and Dicks, 2004) *Lactococcus lactis* ที่แยกได้จากน้ำนมของคน ผลิต nisin ที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* โดย nisin เป็นแบคเทอริโอซินที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารเพื่อป้องกันแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Heikkila and Saris, 2003) *Lactococcus lactis* ที่แยกจาก Tunisian cheese ผลิต Lactococcin MMT24 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแลกติกที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ได้แก่ *Lactobacillus* ssp. และ *Lactobacillus lactis* (Ghrairi *et al.*, 2005) *Lactobacillus salivarius* ผลิตแบคเทอริโอซิน OR-7 ให้โซนยับยั้ง *Campylobacter jejuni* โดยแบคเทอริโอซินสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเมื่อทดสอบร่วมกับ β-chymotrypsin, proteinase K และ papain แต่ยังคงให้โซนยับยั้งเมื่อทดสอบกับ lysozyme และ lipase และมีคุณสมบัติทนร้อนได้ถึง 90°C (Stern *et al.*, 2006) และแบคเทอริโอซินของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ที่สกัดด้วยอะซิโตน สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งกรัมบวกและกรัมลบ เช่น *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas* ได้ดี แต่ยับยั้ง *Clostridium perfringens* และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีปานกลาง โดยแบคเทอริโอซินที่สกัดได้สูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อเมื่อทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Jamuna and Jeevaratnam, 2004)

แบคทีเรียแลกติกมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรด โดยชนิดและปริมาณของกรด ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียแลกติก ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียแลกติกออกเป็น 2 กลุ่ม ตามวิถีในการเปลี่ยนน้ำตาลไปเป็นกรด ได้แก่ Heterofermentative lactic acid bacteria แบคทีเรีย แลกติกที่อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น *Leuconostoc, Oenococcus* และ *Lactococcus* ซึ่งมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลผ่าน phosphoketolase pathway แล้วได้ lactic acid, acetic acid, carbon dioxide และ ethanol (Zaunmuller *et al.*, 2006) ส่วน Homofermentative lactic acid bacteria แบคทีเรียแลกติกที่ อยู่ในกลุ่มนี้ เช่น *Lactobacillus* และ *Pediococcus* ซึ่งมีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลผ่าน Embden-Meyerhof Parnas pathway แล้วได้ lactic acid เป็นผลิตภัณฑ์หลัก (Filya, 2003; Holzer *et al.*, 2003)ซึ่งแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จัดอยู่ในกลุ่ม homofermentative lactic acid bacteria ซึ่งมีความสามารถในการหมักน้ำตาล แล้วผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แต่ไม่ผลิตคาร์บอนไดออกไซด์

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ในการศึกษาครั้งนี้ สามารถบ่งชี้เบื้องต้นในระดับ genus เป็นสายพันธุ์ *Pediococcus* และ *Lactobacillus* ซึ่งให้ผลสอดคล้องกับการรายงานก่อนหน้านี้ที่ตรวจ

พบ *Pediococcus* (ชาคริยา, 2544) และ *Lactobacillus* (สุภลักษณ์, 2549) และได้บ่งชี้แบคทีเรียแลกติกในระดับ species โดยคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่มีศักยภาพในการเป็น probiotic ที่ทนกรด ทนเกลือน้ำดี มีความสามารถในการหมักสับสเตรทและสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ จำนวน 10 สายพันธุ์ โดยนำมาทดสอบการหมักน้ำตาลโดย API 50CHL system แล้วนำผลที่ได้ไปเทียบกับโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ปรากฏว่าสามารถจัดแบคทีเรียแลกติกเป็น *Lactobacillus curvatus, Lactobacillus delbrueckii, Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus* sp. แต่เมื่อนำ *Lactobacillus curvatus* (PS1240) ที่บ่งชี้ชนิดโดย API 50CHL มายืนยันการบ่งชี้โดยการตรวจลำดับเบสของ 16S rRNA gene แล้วเทียบเคียง (Blast) กับฐานข้อมูลที่มีใน Genbank ของแบคทีเรียแลกติกเป็น *Lactobacillus acidipiscis* (99% identity) ซึ่งผลการบ่งชี้ระหว่าง API และ 16S rRNA gene ไม่ตรงกัน อาจเนื่องมาจากฐานข้อมูลของ website API ยังไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับการใช้คาร์โบไฮเดรตของ *L. acidipiscis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ใหม่ที่เพิ่งค้นพบ โดยตรวจพบครั้งแรกในปลาร้า (Tanasupawat *et al.*, 2000) และเพิ่งบรรจุในฐานข้อมูล GenBank ในปี ค.ศ. 2007 ส่วน *Pediococcus* (PS1231) ที่ได้จากการบ่งชี้ชนิดโดย API เมื่อนำมาตรวจยืนยันโดย 16S rRNA gene ปรากฏว่าเป็นสายพันธุ์เดียวกัน แต่มีการเปลี่ยนชื่อใหม่เป็น *Tetragenococcus halophilus* (99% identity)

แร่ธาตุที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้เป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพและแร่ธาตุองค์ประกอบของเต้าหู้ยี้ ซึ่งจากการศึกษาตรวจหาปริมาณแร่ธาตุ 12 ชนิด พบว่าธาตุที่พบจำนวนมากที่สุดคือ Mg และ Ca โดยในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้มีการใช้สาร $MgSO_4$ หรือ $CaSO_4$ เพื่อตกตะกอนโปรตีน และอีกประการหนึ่งคือ ในถั่วเหลืองมีปริมาณ Mg และ Ca จำนวนมาก (Moraghan *et al.*, 2006) ส่วนธาตุที่พบเป็นอันดับ 2 คือ Li, Fe, Cu, Mn, Zn และ Al ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพและการปลอมปนของเต้าหู้ยี้ และถ้าพบเป็นจำนวนมากอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ เช่น Al และ Cu ถ้าได้รับเป็นระยะเวลานานอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงนำไปสู่โรคทางระบบประสาท เช่น Alzheimer, Parkinson และ Prion หรือโรคอีกชนิดหนึ่งที่เกิดจาก Cu คือ Wilson ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากร่างกายไม่สามารถขับ Cu ออกจากร่างกายได้และจะสะสมไว้ที่เนื้อเยื่อตับ (Battershill, 1995; Campbell *et al.*, 1999; Kitzberger *et al.*, 2005; Carlson *et al.*, 2007) ส่วนธาตุที่พบปริมาณน้อยได้แก่ Ni, As, Pb และCd โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Cd, Pb และ As เป็นธาตุที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและเชื่อมโยงกับห่วงโซ่อาหารซึ่งถ้ารับประทานสะสมจะเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (Yin *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปยังคงมีคุณภาพที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค เนื่องจากโลหะแร่ธาตุมีปริมาณไม่เกินกำหนดมาตรฐานในอาหาร (ประเภทอาหารทะเล) ของสหภาพยุโรป (commission regulation (EC) No.221/2002) ซึ่งกำหนดค่าสูงสุดของ

โลหะหนักเพียง 3 ชนิดได้แก่ Pb, Cd และ Hg ดังนี้ 1.5, 0.5 และ 1.0 mg/kg wet weight (http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2002/l_037/l_03720020207en00040006.pdf, May 4, 2007)

ส่วนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างพื้นผิวของก้อนเต้าหู้ยี้ เมื่อศึกษาโดยใช้ SEM พบว่าก้อนเต้าหู้ยี้ที่ยังไม่ได้หมักมีการจับกันของอนุภาคโปรตีนอย่างหนาแน่นเมื่อใส่ $CaSO_4.2H_2O$ ความเข้มข้น 0.4% ซึ่งทำให้เต้าหู้มีการแข็งตัวสม่ำเสมอ มีสายโปรตีนขนาดใหญ่ (High Molecular weight protein; HMW) จับตัวล้อมรอบโปรตีนขนาดเล็ก (Low Molecular weight; LMW) และน้ำอยู่ภายในโครงข่าย (metrix) (Kao *et al.*, 2003) นอกจากนี้ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ยังมีเกลือความเข้มข้นประมาณ 10% เป็นองค์ประกอบหลัก โดยก้อนเต้าหู้ที่มีเชื้อราขึ้น (pehtze) เมื่อผสมกับเกลือแล้วก้อนเต้าหู้จะดูดเกลือเข้าไป ซึ่งคุณสมบัติของเกลือความเข้มข้นปานกลางนี้ สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย และส่งเสริมการเติบโตของจุลินทรีย์ชอบเกลือและจุลินทรีย์ทนเกลือที่มีบทบาทในการหมัก ดังที่กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของเกลืออีกประการหนึ่ง คือ เกลือทำให้โครงสร้างของเต้าหู้ยี้เปลี่ยนแปลงได้ ในการเพิ่มความแข็ง (hardness) (+100%), เพิ่มความยืดหยุ่น (elasticity) (+18%) แต่ลดการเกาะติดของโครงสร้าง (adhesiveness) (-30%) (Dunne *et al.*, 2001)

จากการตรวจหา BDE จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปยี่ห้อต่างๆ จำนวน 9 ตัวอย่าง (CSF1-CSF9) พบว่าตัวอย่างเต้าหู้ยี้ที่บ่มใน enriched medium (BHI+0.1%glucose) จะเพิ่มความสามารถในการสร้าง enterotoxin โดยพบว่าตัวอย่างเต้าหู้ยี้ที่ตรวจพบ BDE มี 5 ตัวอย่างจาก 9 ตัวอย่าง คิดเป็น 56% แต่เมื่อไม่มีการบ่มตัวอย่างเต้าหู้ยี้ใน BHI+0.1%glucose พบว่าตัวอย่างทั้งหมดตรวจไม่พบ BDE คิดเป็น 100% ที่ปลอดภัยจาก BDE จึงอาจกล่าวได้ว่าเชื้อ *B. cereus* จะสามารถสร้างสารพิษได้เมื่ออยู่ในสภาวะที่เหมาะสมคือเชื้อจะเติบโตและสร้างทอกซินในระยะ log phase (อลิสรา, 2547) และจากการตรวจหา BDE จากเชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมี *Bacillus* ที่ตรวจพบ enterotoxin คิดเป็น 69 % ซึ่งเชื้อที่ตรวจพบ BDE เป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่ตรวจพบ BDE ทุกเชื้อ ส่วน *Bacillus* ที่แยกได้จากเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก ตรวจพบ BDE จำนวน 5 สายพันธุ์ คิดเป็น 63 % ซึ่งเชื้อ *Bacillus* ที่แยกได้บน MYP agar ที่ผลิต lecitinase ย่อย egg yolk ให้ความขุ่นรอบโคโลนีนั้น มีหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *B. cereus, B. thuringiensis, B. mycoides* และ *B. anthracis* แต่แตกต่างกันที่สายพันธุ์ที่เป็น *B. cereus* นั้นสามารถผลิต enterotoxin ได้ ดังนั้นสายพันธุ์ที่ให้ผลบวกต่อการทดสอบ BDE จึงน่าจะเป็น *B. cereus* แต่อย่างไรก็ตามปริมาณของ *B. cereus* ที่แยกได้มีปริมาณอยู่ระหว่าง 3.0 ถึง 6.9 log CFU/g และ 3.5 ถึง 4.6 log CFU/g สำหรับเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปและเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก ตามลำดับ ซึ่งปริมาณเชื้อ *B. cereus* นี้มีปริมาณที่ไม่

ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ เนื่องจากการทำให้เกิดอาหารเป็นพิษเสี่ยงที่จะเกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค เมื่อมีการปนเปื้อนของเชื้อ *B. cereus* มีปริมาณเชื้อมากกว่า 5 log CFU/g (Han *at el.*, 2004) ยกเว้นตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป 2 ตัวอย่าง คือ CSF6 และ CSF9 ที่มีปริมาณเชื้อ *B. cereus* 6.9 และ 5.1 log CFU/g ตามลำดับ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่ตรวจพบ BDE และปริมาณเชื้ออยู่ในระดับที่สามารถทำให้เกิดอาหารเป็นพิษได้ ถึงแม้ว่าเต้าหู้ยี้ส่วนใหญ่จะมีปริมาณเกลือที่สูง (5-15%) และปริมาณ ethanol (1-7%) ซึ่งสามารถยับยั้งการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อโรคได้ แต่จุลินทรีย์กลุ่มที่สร้างสปอร์รูปร่างแท่ง เช่น *Bacillus* และ *Clostridium* จะมีความสามารถในการทนเกลือ ซึ่งสภาวะแบบนี้จะทำให้ในอุตสาหกรรมอาหารยากที่จะป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์กลุ่มนี้มาปนเปื้อนกับผลผลิต (Han *at el.*, 2001) เช่นเดียวกับผลจากการศึกษาจุลินทรีย์ที่มีผลต่อความปลอดภัยและคุณภาพของผลผลิตของเต้าหู้ยี้ที่จำหน่ายทางการค้าของ Han และคณะ (2001) ซึ่งมีการตรวจพบ *B. cereus* ในทุกตัวอย่างที่นำมาทดสอบ และพบว่า บางสายพันธุ์ของเชื้อ *Bacillus* มีความสามารถในการก่อให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษเมื่อบริโภคโดยไม่ได้ทำผลิตภัณฑ์ให้ร้อนก่อนบริโภคโดยที่ จำนวนของเชื้อ *B. cereus* มากกว่า 5 log CFU/g มีความเสี่ยงที่จะเกิดอันตรายกับผู้บริโภค ซึ่งบางครั้งที่จำนวนของเชื้อ *B. cereus* ในเต้าหู้ยี้มีมากกว่า 5 log CFU/g ดังนั้นการผลิตระดับอุตสาหกรรมจึงควรมีการเอาใจใส่ในการผลิต (Han *at el.*, 2004) ซึ่งตามข้อกำหนดขององค์กรอาหารและยา (FDA) ของสหรัฐอเมริกา ได้กำหนดผลิตภัณฑ์อาหารเป็นพิษที่เกิดจากการปนเปื้อน *B. cereus* มีปริมาณเชื้อมากกว่า 6 log CFU/g ชุดทดสอบ TECRA *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay นอกจากจะสามารถตรวจหา BDE ในตัวอย่างอาหาร และจากเชื้อ *B. cereus* แล้วยังสามารถตรวจหา BDE จากตัวอย่างอุจจาระของผู้ป่วยที่มีอาการของโรคอาหารเป็นพิษ เพื่อเป็นการหาสาเหตุของการเกิดโรคอาหารเป็นพิษว่าเกิดจาก BDE หรือไม่ (Tan *et al.*, 1997)

ส่วนการตรวจหา *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ที่วางขายตามท้องตลาดและห้างสรรพสินค้า ใน อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา และจากโรงงานเต้าหู้ยี้ อ.เมือง จ.สงขลา ตรวจไม่พบเชื้อ *S. aureus* เช่นเดียวกับ การศึกษาความปลอดภัยทางจุลชีววิทยาและคุณภาพของเต้าหู้ยี้ โดย Han และคณะ (2001) ซึ่งตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus* อาจเนื่องมาจากเต้าหู้ยี้ที่ได้จากกระบวนการหมัก และเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปมีปริมาณเกลือค่อนข้างสูง ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ *S. aureus* ซึ่ง *S. aureus* ส่วนใหญ่เจริญได้ที่มีความเข้มข้นเกลือประมาณ 10 % และเต้าหู้ยี้ได้ผ่านกระบวนการนึ่งฆ่าเชื้อซึ่งทำให้ทำลายเชื้อ *S. aureus* ซึ่งถูกทำลายได้ด้วยความร้อนที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 83 นาที ส่วนการตรวจไม่พบ Staphylococcal enterotoxins จากเชื้อสายพันธุ์มาตรฐาน *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ซึ่งให้ผลการทดสอบโคแอกกูเลสเป็นบวกแต่ตรวจไม่พบเอนเทอโรทอกซิน อาจเนื่องมาจาก การขาดยีนส์บางส่วนในการสร้าง enterotoxins ที่

อาจถูกควบคุมด้วยโครโมโซมหรือพลาสมิดแล้วแต่ชนิดของ Staphylococcal enterotoxins ซึ่ง *S. aureus* ที่ผลิตเอนเทอโรทอกซินมักเป็นพวกที่สังเคราะห์เอ็นไซม์โคแอกกูเลสได้ (สุมาลี ,2527) และการผลิต coagulase มีความสัมพันธ์กับการสร้าง enterotoxin ถึงร้อยละ 93 – 100 เมื่อรับประทานอาหารที่มี enterotoxin ประมาณ 1 – 25 ไมโครกรัม (10^6 CFU/g) หลังจาก 1 – 6 ชม.จะเกิดอาหารคลื่นไส้ อาเจียน และอุจจาระร่วงเป็นน้ำ (กนกรัตน์, 2537) และ TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins (Unit) สามารถตรวจหาทอกซินได้ต่ำสุดในปริมาณ 0.25 นาโนกรัม ซึ่งอาจใช้วิธี Latex agglutination test ซึ่งสามารถตรวจหาทอกซินในปริมาณน้อยเพียง 0.1 – 1.0 นาโนกรัมที่สกัดจากอาหาร

สรุป

แบคทีเรียแลกติกสามารถตรวจพบได้ตลอดระยะเวลา 8 เดือนของกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ และสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 126 สายพันธุ์ ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียทนเกลือ 83 สายพันธุ์ (65.9%) และแบคทีเรียชอบเกลือ 43 สายพันธุ์ (34.1%) ซึ่งมีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนจากเต้าหู้ในกระบวนการหมัก แต่มีบทบาทน้อยในการย่อยสลายแป้งและไขมัน โดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติก ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์และแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารที่นำมาทดสอบ และตรวจไม่พบแบคทีเรียก่อโรค *Escherichia coli, Staphylococcus aureus* และ *Listeria monocytogenes*

แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จำแนกเป็นสกุล *Lactobacillus* จำนวน 67 สายพันธุ์ (53.2%) และ *Pediococcus* จำนวน 59 สายพันธุ์ (46.8%) เป็นแบคทีเรียทนเกลือและชอบเกลือ ซึ่งสามารถเติบโตบนเกลือความเข้มข้น 5-10% เมื่อคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus* PS1240 และ PS1243 ซึ่งมีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค *L. monocytogenes* DMST4553 โดยการผลิตกรดแลกติก และเมื่อทำการบ่งชี้แบคทีเรียแลกติกดังกล่าวจัดเป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus acidipiscis* ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ทำให้เข้าใจบทบาทของแบคทีเรียแลกติก และสามารถนำไปใช้ประโยชน์เพื่อการพัฒนากระบวนการผลิตโดยนำมาทำเป็นกล้าเชื้อในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ต่อไป

จากการตรวจหา BDE โดยใช้ชุดทดสอบ TECRA *Bacillus* Diarrhoeal Enterotoxin Visual Immunoassay เมื่อทำใน enriched medium พบว่า ตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป ตรวจพบ BDE จำนวน 5 ตัวอย่าง (CSF1, CSF2, CSF6, CSF8 และ CSF9) คิดเป็น 56 % แต่ตรวจไม่พบ Staphylococcal enterotoxins เมื่อตรวจด้วยชุดทดสอบ TECRA UNIQUE Staphylococcal enterotoxins

เอกสารอ้างอิง

กนกรัตน์ ศิริพานิชกร. 2537. โรคติดเชื้อ. 444 หน้า. เชียงใหม่ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะสาธารณสุขศาสตร์. มหาวิทยาลัยมหิดล.

ชาคริยา ฉลาด. 2544. จุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยามหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. หน้า 1-47.

ดารุนี หะแว. 2548. การพัฒนาอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สำหรับแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติก. โครงงานทางจุลชีววิทยาภาควิชาจุลชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ. 2547. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับโรค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 400 หน้า.

ประเสริฐ สายสิทธิ์. 2527. ถั่วเหลืองและการใช้ประโยชน์ในประเทศไทย. กรุงเทพฯ: สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 123-136.

ประเสริฐ สันตินานาเลิศ, ชาคริยา ฉลาด, สิริพร ภูมะธน, สุวรรณี แสงแก้ว และ อำไพทิพย์ สุขหอม. 2548. จุลชีววิทยาของเต้าหู้ยี้ที่หมักแบบดั้งเดิม. ว.สงขลานครินทร์. 27: 363-375.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2543. เอนไซม์ทางอาหาร. ภาควิชาเทคโนโลยีทางอาหาร คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย. หน้า 149.

ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. 2536. จุลินทรีย์กับอุตสาหกรรมอาหาร. ชลบุรี: มหาวิทยาลัยบูรพา. หน้า 237- 242.

ลุกมาน อาแซดอยิ. 2549. การแยกเชื้อ *Bacillus* จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้. โครงงานทางจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. 1-42.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. โพรซีดดิงส์แลกติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: คณะอุตสหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. กรุงเทพฯ: โอเดียนสโตร์.

สุภลักษณ์ ปานบุตร. 2549. การตรวจนับจุลินทรีย์ทั้งหมดและการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกทนเกลือจากตัวอย่างเต้าหู้ยี้. โครงงานทางจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ : หน้า 3-6: 37-38.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2527. จุลชีววิทยาทางอาหาร. 416 หน้า. กรุงเทพฯ. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

สุมณฑา วัฒนสินธุ์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. กรุงเทพ : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.454 หน้า.

Alvarado, C., Garcia-Almendarez, B.E., Martin, S.E. and Regalado, C. 2005. Anti-Listeria monocytogenes bacteriocin-like inhibitory substances from *Enterococcus faecium* UQ31 isolated from artisan Mexican-style cheese. Curr Microbiol. 51: 110-115.

Ammor, S., Tauveron, G., Dufour, E. and Chevallier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility1—Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control. 17: 454–461.

AOAC. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemist. 15th edition, Verginia. The Association of Official Analytical Chemist, Inc. USA.

Aslima, B., Yuksekdaga, Z.N., Sarikayab, E. and Beyatlia, Y. 2005. Determination of the bacteriocin-like substances produced by some lactic acid bacteria isolated from Turkish dairy products. LWT. 38: 691-694.

Axelsson, L.T., 1993. Lactic acid bacteria. New York, Marcell Dekker. pp.1-17.

Battershill, J.H. 1995. Aluminum and Alzheimer's disease. Cmaj. 152: 467.

Buttris, J.1997. Nutritional propreties of fermented milk products. Int J. Dairy Technology. 50; 21-27.

Byczkowski, J.Z. and Gessner, T. 1988. Biological role of superoxide ion-radical. Int J. Biochem. 20: 569-580.

Campbell, A., Prasad, K.N. and Bondy, S.C. 1999. Aluminum-induced oxidative events in cell lines: glioma are more responsive than neuroblastoma. Free Radic Biol Med. 26: 1166-1171.

Campos, C.A., Rodrı´guez, O., Calo-Mata, P., Prado, M. and Barros-Vela´zquez, J. 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.

Carlson, D., Beattie, J.H. and Poulsen, H.D. 2007. Assessment of zinc and copper status in weaned piglets in relation to dietary zinc and copper supply. J. Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 91: 19-28.

Chen, H. and Hoover, D.G. 2003. Bacteriocins and their Food Applications. Comprehensive reviews in food science and food safety. 2: 82-100.

Chou, C.C., Ho, F.M. and Tsai, C.S. 1988. Effects of temperature and relative humidity on the growth of and enzyme production by *Actinomucor taiwanensis* during sufu pehtze preparation. Appl Environ Microbiol. 54: 688-692.

Chung, H.Y., Fung, P.K. and Kim, J.S. 2005. Aroma impact components in commercial plain sufu. J. Agric Food Chem. 53: 1684-1691.

Chung, H.J., Bang, W. and Drake, M.A. 2006. Stress Response of *Escherichia coli* comprehensive reviews in food science and food safety. 5: 52-64.

Cook, S.I. and Sellin, J.H. 1998. Review article: short chain fatty acids in health and disease. Aliment Pharmacol Ther. 12: 499-507.

Corsetti, A., Gobbetti, M. and Smacchi, E. 1999 Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. Food Microbiol. 13: 447-456.

David, B. 2002. Commission regulation (EC) amending Regulation (EC) No 466/2001 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. (Online). Available: http://europa.eu.int/eurlex/pri/en/oj/dat/2002/l_037/l_03720020207en00040006. [Accessed May 4, 2007].

de Carvalho, A.A., de Paula, 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 Microbiol. 23; 213-219.

Deegan, L.H., Cotter, P.D., Hill, C. and Ross, P. 2006. Bacteriocins: Biological tools for bio-preservation and shelf-life extension. J. Int Dairy. 16: 1058-1071.

Donohue, D.C. and Salminen, S. 1996. Safety of probiotic bacteria. Asia Pacific. J. Clin Nutr. 5: 25-28.

du Toit, M., Franz, C.M., Dicks, L.M., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F. and Holzapfel, W.H. 1998. Characterisation and selection of probiotic *lactobacilli* for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. Int J. Food Microbiol. 40: 93-104.

Dunne, C., O'Mahony, L., Murphy, L., Thornton, G., Morrissey, D., O'Halloran, S., Feeney, M.,

Flynn, S., Fitzgerald, G., Daly, C., Kiely, B., O'Sullivan, G.C., Shanahan, F. and Collins, J.K. 2001. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings. Am J. Clin Nutr. 73: 386S-392S.

Filya, I. 2003. The effect of *Lactobacillus buchneri*, with or without homofermentative lactic acid bacteria, on the fermentation, aerobic stability and ruminal degradability of wheat, sorghum and maize silages. J. Appl Microbiol. 95: 1080-1086.

Ghrairi, T., Frere, J., Berjeaud, J.M. and Manai, M. 2005. Lactococcin MMT24, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* isolated from rigouta cheese. Int J. Food Microbiol. 105: 389-398.

Gilliland, S.E. and Speck, M.L. 1977. Deconjugation of bile acids by intestinal *lactobacilli*. Appl Environ Microbiol. 33: 15-18.

Gueimonde, M. and Salminen, S. 2006. New methods for selecting and evaluating probiotics. Dig Liver Dis. 38 Suppl. 2: S242-247.

Gurira, O.Z. and Buys, E.M. 2005. Characterization and antimicrobial activity of *Pediococcus* species isolated from South African farm-style cheese. Food Microbiol. 22: 159-168.

Han, B.Z., Beumer, R.R., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2001. Microbiological safety and quality of commercial sufu-a Chinese fermented soybean food. Food Control. 17: 541-547.

Han, B.Z., Rombouts, F.M. and Nout, M.J. 2001. A Chinese fermented soybean food. Int J. Food Microbiol. 65: 1-10.

Han, B.Z., Beumer, R.R., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2001. Microbiological safety and quality of commercial sufu-a chinese fermented soybean food. Food Control. 17: 541-547.

Han, B.Z., Wang, J.H., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2003. Effect of NaCl on textural changes and protein and lipid degradation during the ripening stage of sufu, a chinese fermented soybean food. J. Sci Food Agric. 83: 899-904.

Han, B.Z., Cao, C.F., Rombouts, F.M. and Nout, M.J.R. 2004. Microbial changes during the production of Sufu-a Chinese fermented soybean food. Food Control. 15: 265-270.

Heikkila, M.P. and Saris, P.E. 2003. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by the commensal bacteria of human milk. J. Appl Microbiol. 95: 471-478.

Holzapfel, W.H., Haberer, P., Geisen, R., Bjorkroth, J. and Schillinger, U. 2001. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. Am J. Clin Nutr. 73: 365S-373S.

Holzer, M., Mayrhuber, E., Danner, H. and Braun, R. 2003. The role of *Lactobacillus buchneri* in forage preservation. Trends Biotechnol. 21: 282-287.

Hwan, C.H. and Chou, C.C. 1999. Volatile components of the Chinese fermented soybean curd as affected by the addition of ethanol in aging solution. J.Sci. Food Agric. 79: 243-248.

Jamuna, M. and Jeevaratnam, K. 2004. Isolation and characterization of *lactobacilli* from some traditional fermented foods and evaluation of the bacteriocins. J. Gen Appl Microbiol. 50: 79-90.

Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. Appl Environ Microbiol. 44: 525-532.

Kao, F.J., Su, N.W. and Lee, M.H. 2003. Effect of calcium sulfate concentration in soymilk on the microstructure of firm tofu and the protein constitutions in tofu whey. J. Agric Food Chem. 51:6211-6216.

Kitzberger, R., Madl, C. and Ferenci, P. 2005. Wilson disease. Metab Brain Dis. 20: 295-302.

Klaenhammer, T., Altermann, E., Arigoni, F., Bolotin, A., Breidt, F., Broadbent, J., Cano, R., Chaillou, S., Deutscher, J., Gasson, M., van de Guchte, M., Guzzo, J., Hartke, A., Hawkins, T., Hols, P., Hutkins, R., Kleerebezem, M., Kok, J., Kuipers, O., Lubbers, M., Maguin, E., McKay, L., Mills, D., Nauta, A., Overbeek, R., Pel, H., Pridmore, D., Saier, M., van Sinderen, D., Sorokin, A., Steele, J., O'Sullivan, D., de Vos, W., Weimer, B., Zagorec, M. and Siezen, R. 2002. Discovering lactic acid bacteria by genomics. Antonie Van Leeuwenhoek. 82: 29-58.

Konings, W.N., Kok, J., Kuipers, O.P. and Poolman, B. 2000. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. Curr Opin Microbiol. 3: 276-282.

Lin, W.-H., Hwang, C.-F., Chen, L.-W. and Tsen, H.-Y. 2006. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. Food Microbiology 23: 74-81.

Lindgren, S.E. and Dobrogosz, W.J. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. FEMS Microbiol Rev. 7: 149-163.

Ljungh, A. and Wadström, T. 2006. Lactic acid bacteria as probiotics. Curr. Issues Intestinal Microbiol. 7: 73-90.

Makras, L. and Vuyst, L.D. 2006. The in vitro inhibition of gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. J. Int Dairy. 16: 1049-1057.

Millette, M., Dupont, C., Archambault, D. and Lacroix, M. 2007. Partial characterization of bacteriocins produced by human *Lactococcus lactis* and *Pediococccus acidilactici* isolates. J. Appl Microbiol. 102: 274-282.

Montel, M.C., Masson, F. and Talon, R. 1998. Bacterial Role in Flavour Development. Meat Science. 49: S111-S123.

Moraghan, J.T., Etchevers.J.D. and Padilla, J. 2006 Contrasting accumulations of calcium and magnesium in seed coats and embryos of common bean and soybean. Food Chem. 95: 554–561.

Morelli, L. 2000. In vitro selection of probiotic *lactobacilli*: a critical appraisal. Curr Issues Intest Microbiol. 1: 59-67.

O'Sullivan, L., Ross, R.P. and Hill, C. 2002. Potential of bacteriocin-producing lactic acid bacteria for improvements in food safety and quality. Biochimie. 84: 593-604.

Ouwehand, A.C., Salminen, S. and Isolauri, E. 2002. Probiotics: an overview of beneficial effects. Antonie Van Leeuwenhoek. 82: 279-289.

Parvez, S., Malik, K.A., Ah Kang, S. and Kim, H.Y. 2006. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. J. Appl Microbiol. 100: 1171-1185.

Pederson, C.S. and Albury, M.N. 1969. The Sauerkraut Fermentation.Tech. Boll. Bulletin. 824 pp.

Reiter, B. And Oram, J.D. 1982. Nutritional Studies on Cheese Starter Vitamin and Amino Acid Requirements of Single Strain Starters. J. Dairy Res. 29:63-68.

Russell, J.B. and Diez-Gonzalez, F. 1998. The effects of fermentation acids on bacterial growth. Adv Microb Physiol. 39: 205-234.

Salminen, S and Wright, A .V. 1993. Lactic acid bacteria. New York: Marcel Dekker Inc. 442 pp.

Salminen, S. 2001. Human studies on probiotics: Aspects of scientific documentation. Scand J. Nutr. 45: 8-12.

Shi, X. and Fung, D.Y. 2000. Control of foodborne pathogens during sufu fermentation and aging. Crit Rev Food Sci Nutr. 40: 399-425.

Simsek, O., Con, A.H. and Tulumoglu, S. 2006. Isolating lactic starter cultures with antimicrobial activity for sourdough processes. Food Control 17: 263-270.

Soomro, A.H., Masud, T. and Anwaar, K. 2002. Role of Lactic Acid Bacteria (LAB) in Food Preservation and Human Health – A Review. Pakistan. J. Nutr. 1: 20-24.

Stern, N.J., Svetoch, E.A., Eruslanov, B.V., Perelygin, V.V., Mitsevich, E.V., Mitsevich, I.P., Pokhilenko, V.D., Levchuk, V.P., Svetoch, O.E. and Seal, B.S. 2006. Isolation of a *Lactobacillus salivarius* strain and purification of its bacteriocin, which is inhibitory to Campylobacter jejuni in the chicken gastrointestinal system. Antimicrob Agents Chemother. 50: 3111-3116.

Tan, A., Heaton, S., Farr, L. and Bates, J. 1997. The use of *Bacillus* diarrhoeal enterotoxin (BDE) detection using an ELISA technique in the confirmation of the aetiology of *Bacillus*-mediated diarrhea. Journal of Applied Microbiology. 82: 677-682.

Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S. and Komagata, K. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. Int J. Syst Evol Microbiol. 50 Pt 4: 1479-1485.

Todorov, S., Onno, B., Sorokine, O., Chobert, J.M., Ivanova, I. and Dousset , X. 1999. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by *Lactobacillus plantarum* ST 31 isolated from sourdough. Int J. Food Microbiol. 48: 167-177.

Todorov, S.D. and Dicks, L.M. 2004. Characterization of mesentericin ST99, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* ST99 isolated from boza. J. Ind Microbiol Biotechnol. 31: 323-329.

Tome, E., Teixeira, P. and Gibbs, P.A. 2006. Anti-listerial inhibitory lactic acid bacteria isolated from commercial cold smoked salmon. Food Microbiol. 23: 399-405.

Toure, R., Kheadr, E., Lacroix, C., Moroni, O. and Fliss, I. 2003. Production of antibacterial substances by *bifidobacterial* isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. J. Appl Microbiol. 95: 1058-1069.

Yang, D. and Woes, C.R. 1989. Phylogenetic structure of the *Leuconostocs* and interesting case of a rapidly evolving organism. System Appl. Microbiol. 12:145-149.

Yin, L.J., Li, L.T., Liu, H., Saito, M. and Tatsumi, E. 2005. Effects of fermentation temperature on the content and composition of isoflavones and beta-glucosidase activity in sufu Biosci Biotechnol Biochem. 69: 267-272.

Zaunmuller, T., Eichert, M., Richter, H. and Unden, G. 2006. Variations in the energy metabolism of biotechnologically relevant heterofermentative lactic acid bacteria during growth on sugars and organic acids. Appl Microbiol Biotechnol. 72: 421-429.