การแยกเชื้อและลักษณะของเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

Isolation and Characterization of *Pediococcus* spp. from Southern Thailand Traditional Fermented Foods

อรตรี รอดเจริญ

Oratree Roadcharern

Order Key 25809
BIB Key 17-0924

เลขหมู่ QR191.043 อรต
เลขทะเบียน ม.2
20 ต.ค. 2543

วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

Master of Science Thesis in Biological Science

Prince of Songkla University

2542

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกเชื้อและลักษณะของเชื้อ *Pediococcus* spp.จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

ผู้เขียน นางอรตรี รอดเจริญ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

คณะกรรมการที่ปรึกษา

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ)

คณะกรรมการสอบ

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ)

..... กรรมการ
(ดร.วิไลลักษณ์ ภู่มา)

..... กรรมการ
(ดร.สุกัญญา จันทะชุม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ก้าน จันทร์พรหมมา)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อวิทยานิพนธ์ การแยกเชื้อและลักษณะของเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

ผู้เขียน นางอรตรี รอดเจริญ

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์ชีวภาพ

ปีการศึกษา 2542

บทคัดย่อ

อาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย จำนวน 12 ชนิด เป็นอาหารหมักดองจากสัตว์ 7 ชนิดและอาหารหมักดองจากพืช 5 ชนิด รวม 192 ตัวอย่าง พบว่า มี pH อยู่ในช่วง 3.36 – 5.54 มีเปอร์เซนต์กรดอยู่ในช่วง 0.43 – 1.95 เปอร์เซนต์เกลืออยู่ในช่วง 1.90 – 12.77 และมีจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก $1.48 \times 10^4 - 9.3 \times 10^7$ CFU/g

เมื่อนำตัวอย่างอาหารหมักดองมาแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. พบว่า สามารถแยกได้ 43 ไอโซเลต โดยแยกได้จากอาหารหมักดองจากสัตว์ 31 ไอโซเลต และแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืช 12 ไอโซเลต *Pediococcus* spp. ทุกไอโซเลต สามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 25 – 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MRS ที่มี pH 4.2 – 8.5 (ยกเว้นสายพันธุ์ P7 ซึ่งไม่เติบโตที่ pH 4.2) และสามารถเติบโตในที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 4 – 8 แต่ไม่พบว่าสายพันธุ์ใดสามารถเติบโตที่มีเกลือเข้มข้นร้อยละ 15 เมื่อนำไปเทียบเคียงชนิด พบว่า เป็น *Pediococcus acidilactici* 28 สายพันธุ์, *Pediococcus pentosaceus* 14 สายพันธุ์ และ *Pediococcus urinae-equi* 1 สายพันธุ์

ผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ โดยวิธี agar spot พบว่า สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29273 ได้ดีกว่า *Escherichia coli* O157 : H7 และ *Salmonella typhimurium* 3230 การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เมื่อเลี้ยง *Pediococcus* spp. ในสภาพที่มีการจำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์น้อยมากและไม่พบการยับยั้ง *Escherichia coli* O157 : H7

เมื่อศึกษาการสร้างสารแบคเทอริโอซิน โดยทดสอบด้วยวิธี well diffusion assay ไม่พบ *Pediococcus* spp. สายพันธุ์ใดสามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน

เมื่อนำ *Pediococcus* spp. สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดได้สูงที่สุดใน 3 อันดับแรก มาเพาะเลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ พบว่า *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC 29273 ได้ดี คิดเป็นร้อยละ 96.75 – 98.47 และสามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ATCC 11778 ได้ 94.30 – 96.89 ส่วน *Salmonella typhimurium* 3230 และ *Escherichia coli* O157 : H7 ถูกยับยั้งได้น้อยกว่า โดยคิดเป็นร้อยละ 82.05 – 84.55 และ 82.05 – 84.55 ตามลำดับ

Thesis Title Isolation and Characterization of *Pediococcus* spp. from Southern Thailand Fermented Foods

Author Missis Oratree Roadcharern

Major Program Biological Science

Academic Year 1999

Abstract

A total of 192 samples of Southern Thailand traditional fermented foods were selected from 12 kinds of fermented foods, 7 from meat and fish products and 5 from vegetable products. Their chemical and microbiological properties were studied. The pH, percent acid and percent salt were from 3.36 to 5.54, 0.43 to 1.95, and 1.90 to 12.77, respectively, while the viable cell counts of lactic acid bacteria were from 4.8×10^4 to 9.3×10^7 colony forming units per gram.

Forty - three strains of *Pediococcus* spp. were isolated in which 31 strains were from fermented meat and fermented fish and 12 strains from fermented vegetable. All isolates were able to grow at 25 to 40 $^{\circ}$C in modified MRS medium pH 4.2 to 8.5 (except strain P7 was unable to grow in pH 4.2) and in the presence of 4 to 8 percent salt, but unable to grow in the presence of 15 percent salt. Twenty - eight were identified as *Pediococcus acidilactici* , *Pediococcus pentosaceus* were 14 strains, and one as *Pediococcus urinae-equi.*

All strains showed antibacterial activity against 4 indicator bacteria including *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Staphylococcus aureus* ATCC 29273, *Escherichia coli* O157 : H7, and *Salmonella typhimurium* 3230. The antibacterial activity against *Bacillus cereus* ATCC 11778 and

Staphylococcus aureus ATCC 29273 was higher than *Escherichia coli* O157 : H7 and *Salmonella typhimurium* 3230.

Agar spot method demonstrated a low Inhibitory activity against indicator bacteria under conditions that limit the production of hydrogen peroxide and organic acid. None of the isolates revealed no the inhibitory activity when tested by well diffusion assay. None of the 43 strains can produce bacteriocin.

Three isolates of *Pediococcus* spp. with high inhibitory activity were grown in associative cultures with individual indicator bacteria. The percentage of inhibition of *Staphylococcus aureus* ATCC 29273 was from 96.75 to 98.47, *Bacillus cereus* ATCC 11778 from 94.30 to 96.86, *Escherichia coli* O157 : H7 from 82.05 to 84.55 and *Salmonella typhimurium* 3230 from 81.88 to 85.84, respectively.

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ รศ.วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ประธานกรรมการที่ปรึกษา ที่กรุณาให้คำแนะนำในการทำวิจัย การค้นคว้า และการเขียนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เยาวลักษณ์ ดิสระ กรรมการที่ปรึกษาร่วมที่ให้คำแนะนำต่าง ๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ดร.วิไลลักษณ์ ภู่มา กรรมการผู้แทนคณะวิทยาศาสตร์ และ ดร.สุกัญญา จันทะซุม กรรมการผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย ที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ บัณฑิตวิทยาลัยและคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนทุนในการศึกษาและวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ใหญ่และคณะอาจารย์โรงเรียนพนมศึกษา ที่ให้โอกาสในการลาศึกษาต่อ

ขอขอบพระคุณ คุณยาย คุณพ่อ คุณแม่ และญาติ ๆ ทุกคนด้วยความเคารพยิ่ง ที่คอยให้กำลังใจในการศึกษาและการทำวิจัยมาโดยตลอด

ขอขอบคุณ พี่ ๆ น้อง ๆ และเจ้าหน้าที่คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาชีววิทยา ตลอดจนทุก ๆ ท่านที่มิได้กล่าวมา ณ ที่นี้ ที่มีส่วนช่วยให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ด้วยดี

อรตรี รอดเจริญ

สารบาญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(3)
Abstract	(5)
กิตติกรรมประกาศ	(7)
สารบาญ	(8)
รายการตาราง	(9)
รายการภาพประกอบ	(10)
บทที่	
1. บทนำ	1
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	25
ขอบเขตของการวิจัย	25
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	26
วัสดุ	26
อุปกรณ์	27
วิธีการ	28
3. ผลและวิจารณ์	36
4. สรุป	69
ข้อเสนอแนะ	72
บรรณานุกรม	73
ภาคผนวก	88
ประวัติผู้เขียน	96

รายการตาราง

ตาราง	หน้า
1. อาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยที่มีแบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้อง	7
2. การทดสอบสารยับยั้งของ Pediocin AcH ต่อเชื้อก่อโรคที่ทำให้อ่อนแอลงโดยการแช่แข็ง	17
3. วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการตรวจหาและทดสอบสารแบคเทอริโอซิน	18
4. ชนิดและจำนวนอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยที่นำมาแยกเชื้อ *Pediococcus* spp.	39
5. สมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยาของอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย	42
6. ผลการแยก *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย	44
7. ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย	47
8. ผลการเทียบเคียงชนิด *Pediococcus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย	49
9. การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของ *Pediococcus* spp. ที่แยกโดยวิธี agar spot	53
10. การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารละลายส่วนใสของ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้เมื่อทดสอบตามวิธี well diffusion assay	59
11– 12. ความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนของสารในสารละลายส่วนใสของ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้	62-63
13. ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดย *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้	67

รายการภาพประกอบ

ภาพประกอบ	หน้า
1. ลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นสี่เซลล์ (tetrad) ของ *Pediococcus pentosaceus* BSO347 ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด, Scaning Electron Microscope	9
2. การแบ่งเซลล์ใน 2 ทิศทางระนาบเดียวของ Pediococcus เพื่อให้ได้เซลล์สี่เซลล์ (tetrad)	11
3. การหมักคาร์โบไฮเดรตของแบคทีเรียแลกติกแบบฮอมอเฟอร์เมนต์เตทีฟ	13
4. อาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยที่นำมาแยกเชื้อ *Pediococcus* spp.	37
5. การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Vancomycin ของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้	43
6. รูปร่างและการจัดเรียงตัวของ *Pediococcus* spp. เมื่อย้อมสีแกรม	43
7. การทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้โดยวิธี agar spot	52
8. การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน pepsin ในสารละลายส่วนใสของ *Pediococcus acidilactici* (P16) โดยวิธี well diffusion assay	61
9. การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน	66
10. ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดย *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน	68

บทที่ 1

บทนำ

บทนำต้นเรื่อง

การหมักดองอาหารเป็นวิธีที่เก่าแก่ที่ใช้ในการถนอมอาหาร ประวัติการหมักดองอาหารถูกบันทึกครั้งแรกในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้และแอฟริกา (Hesseltine, 1981) ในประเทศกำลังพัฒนาหลายประเทศ อาหารหมักดองพื้นบ้านจัดเป็นศิลปะพื้นบ้านอย่างหนึ่งที่มีการถ่ายทอดต่อ ๆ กันมา ต้องอาศัยเทคนิคและเคล็ดลับ เพื่อให้ได้อาหารหมักดองที่มีลักษณะที่ต้องการ อาหารหมักดองเป็นการหมักโดยธรรมชาติอาจมีการปนเปื้อนจากวัตถุดิบหรือเครื่องมือได้ ถ้าไม่ระมัดระวังเรื่องความสะอาด ซึ่งเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค แต่หากได้แนะนำอาหารหมักดองพื้นบ้านที่เตรียมอย่างถูกหลักอนามัย ย่อมจะทำให้อาหารหมักดองมีคุณภาพดีขึ้นและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคมากขึ้น ซึ่งจะเป็นการเพิ่มความต้องการอาหารหมักดองพื้นบ้านและทำให้อาหารหมักดองมีมูลค่าเพิ่มขึ้นด้วย

คนไทยรู้จักเทคนิคการถนอมอาหารด้วยแบคทีเรียแลกติก มาเป็นเวลาหลายร้อยปีมาแล้ว เช่น การทำปลาร้า การดองหน่อไม้ การดองผัก เป็นต้น ซึ่งมีแบคทีเรียแลกติกเข้ามาเกี่ยวข้องกับอาหารหมักดองของไทยทุกภาค โดยเฉพาะภาคใต้ของไทยมีอาหารหมักดองจากแบคทีเรียแลกติกมากที่สุด ประมาณ 21 ชนิด และน้อยที่สุดในภาคเหนือมี 9 ชนิด (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534)

ความสำคัญของแบคทีเรียแลกติกคือ จะเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์และสารอื่น ๆ มีผลในการปรับปรุงกลิ่น รส เนื้อสัมผัสของอาหารหมัก (Gonzalez, *et al.*,1994) นอกจากนี้ ยังใช้แบคทีเรียแลกติกและผลผลิตจากกระบวนการชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติกในการถนอมอาหารอย่างกว้างขวาง แบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์เป็น

probiotic สำหรับสัตว์และมนุษย์ เนื่องจากสามารถผลิตสารยับยั้งต่าง ๆ เช่น bacteriocin, aldehyde, peroxides และกรดอินทรีย์ (Daeachel, 1989) ดังนั้นการใช้แบคทีเรียแลกติกที่สามารถสร้างสารยับยั้งดังกล่าวเป็น เชื้อเริ่มต้น (starter culture) ในการผลิตอาหารหมัก นอกจากจะช่วยยืดอายุในการเก็บอาหารแล้วยังเป็นการเพิ่มความปลอดภัยแก่ผู้บริโภค และเพิ่มคุณภาพของอาหารหมักดองอีกด้วย

การผลิตอาหารหมัก เช่น เนย, เบียร์, ขนมปัง และ ไวน์ ได้มีการพัฒนาความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเป็นอย่างดี แต่การศึกษาเกี่ยวกับอาหารหมักดองพื้นบ้านยังมีไม่มากนัก ซึ่งโดยทั่วไปการหมักดองอาหารพื้นบ้านมักจะอาศัยเชื้อดั้งเดิมหรือที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ไม่ได้อาศัยเชื้อที่จำเพาะ ดังนั้นการแยกเชื้อและศึกษาลักษณะของเชื้อที่หมักจึงเป็นสิ่งสำคัญ ควรมีการเก็บข้อมูลเกี่ยวกับอาหารหมักพื้นบ้าน ทั้งที่รู้จักกันดี และที่ยังไม่เป็นที่รู้จักกันมากนัก และในการแยกเชื้อไม่ควรจำกัดเพียงเชื้อที่มีปริมาณมาก เพราะเชื้ออื่น ๆ ที่พบในปริมาณน้อยก็อาจจะมีบทบาทสำคัญในการหมักได้ ควรศึกษาบทบาทของเชื้อแต่ละชนิดที่จำแนกได้ด้วย ดังนั้นจึงต้องมีการวิจัยพื้นฐาน เพื่อให้มีความรู้ทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในการเตรียมและผลิตอาหารหมักดองพื้นบ้าน เพราะเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้และความเข้าใจในบทบาทของเชื้อจะเป็นตัวควบคุมคุณภาพของอาหารหมักดองที่สำคัญ (Office of International Affair National Research Council , 1992) งานวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อ *Pediococcus* spp.ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลกติกชนิดหนึ่งจากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย เพื่อนำมาศึกษาลักษณะต่าง ๆ ได้แก่ ความสามารถในการเติบโตที่อุณหภูมิและ pH ระดับต่าง ๆ การเติบโตในที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ และการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอื่น รวมทั้งการศึกษาถึงลักษณะบางประการ ของสารยับยั้งที่ *Pediococcus* spp. สร้างขึ้น เพื่อเป็นแนวทางในการนำเชื้อ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้ ไปใช้ในการปรับปรุงคุณภาพ , เพิ่มความปลอดภัยของอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย และประโยชน์อื่น ๆ ต่อไป

ตรวจเอกสาร

1. อาหารหมักดอง

อาหารหมักดองแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ อาหารหมักดองจากพืชซึ่งประกอบด้วยผัก ผลไม้ โก้โก้ และกาแฟ และอาหารหมักดองจากสัตว์ ซึ่งประกอบด้วยผลิตภัณฑ์จากนม ผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ผลิตภัณฑ์จากปลา การหมักอาหารเป็นการเปลี่ยนวัตถุดิบเป็นผลิตภัณฑ์ โ ดยอาศัยการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ จะมีทั้งในระดับอุตสาหกรรม และทำเพื่อบริโภคกันในครัวเรือน ในประเทศกำลังพัฒนาหลายประเทศมีวิธีการหมักดองซึ่งเป็นศิลปะพื้นบ้านและอาศัยเทคนิคเก่าแก่ ซึ่งอาหารหมักดองพื้นบ้านจะพบได้ในทุกทวีปทั่วโลก เช่น ผักดอง (kimchi) ของชาวเกาหลี, กุ้งหมัก (balao balao) ของชาวฟิลิปปินส์, นมผสมกับข้าวสาลีหมัก (Kishk) ของชาวอียิปต์, ซอสถั่วเหลือง (miso) ของชาวญี่ปุ่น, นมผสมธัญญาพืชหมัก (ogi) ของชาวไนจีเรีย, แป้งหมัก (idli และ dosa) ของชาวอินเดีย, เนื้อหมัก (แหนม) ของชาวไทย เป็นต้น

2. อาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย (สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์, 2529)

การรู้จักถนอมอาหารเป็นเครื่องแสดงถึงความเจริญขั้นหนึ่งของมนุษย์ เพราะก่อให้เกิดการสรรหาวิธีการจัดการ รู้จักถ่ายทอดความรู้สู่กันและกัน วิธีการถนอมอาหารช่วยให้สามารถเก็บอาหารไว้บริโภคได้นาน สามารถบริโภคอาหารบางประเภทนอกฤดูกาล และเป็นการช่วยอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติได้ทางหนึ่ง

กลุ่มชนแต่ละกลุ่มมีวิธีการถนอมอาหารคล้ายคลึงกัน แต่มีลักษณะปลีกย่อยแตกต่างกันไป ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวัฒนธรรมการกินที่แตกต่างกัน และขึ้นอยู่กับความแตกต่างของทรัพยากรในท้องถิ่น ซึ่งอาจมีอยู่หรืออาจหาได้ยากง่ายต่างกัน การถนอมอาหารโดยวิธีทำเค็มและหมักดองของชาวภาคใต้ มีกรรมวิธีแตกต่างกันไป

ชาวไทยภาคใต้มีวิธีการถนอมอาหารหลายวิธี ทั้งประเภทอาหารดิบ อาหารสุก อาหารคาว และหวาน การถนอมอาหารโดยวิธีทำเค็ม หรือหมักดองมีกรรมวิธีแตกต่างกันไปมากมาย นับตั้งแต่กรรมวิธีง่าย ๆ โดยปล่อยให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในอาหารเองไปจนถึงกรรมวิธีที่สลับซับซ้อนโดยอาศัยจุลินทรีย์เข้าช่วย โดยวิธีเหล่านี้

นอกจากทำให้เก็บถนอมอาหารไว้บริโภคได้นานแล้ว ยังช่วยให้ได้อาหารที่มีกลิ่นและรสแปลกไปจากเดิม ทำให้เกิดอาหารชนิดใหม่ นอกจากนี้ยังทำให้พืชผลบางอย่างที่ขมจัด เปรี้ยวจัดสามารถลดความขมและความเปรี้ยวลง จนกลายเป็นสิ่งมีรสชาติอร่อยชวนรับประทาน ชาวใต้มีวิธีการถนอมอาหารโดยการหมักดองหลากหลาย เช่น การทำหนาง การทำแป้งแดง ทำบูดู กุ้งส้ม เป็นต้น สารประกอบบางอย่างที่ชาวใต้นิยมเติมลงไปเพื่อช่วยในการเร่งปฏิกิริยาให้เกิดการหมักดอง ได้แก่ เกลือ น้ำตาล น้ำซาวข้าว ข้าวสุก ตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ ได้แก่

จิ้งจัง ใช้ปลาใส้ตันที่ยังสด นำมาคลุกเกลือ เติมน้ำตาลปีบ คลุกเคล้าให้เข้ากันดี นำไปบรรจุไห ปิดฝาให้มิดชิด หมักทิ้งไว้ นำออกตากแดดเป็นครั้งคราว หมักไว้ประมาณ 3 สัปดาห์ ถึง 1 เดือน

หนาง นิยมทำกันมากด้วยเนื้อหมูหรือเนื้อวัว วิธีหมักส่วนมากนิยมเอาเศษเนื้อที่ติดกระดูก หรือเนื้อที่เลาะจากส่วนหัว หั่นเป็นชิ้น ๆ ขนาดประมาณ 1x1/2 นิ้ว แล้วหั่นหยวกกล้วยอ่อน นำเนื้อและหยวกกล้วยคลุกเคล้าให้เข้ากันดี แล้วใส่เกลือน้ำตาลปีบ หมักไว้จนกระทั่งหยวกกล้วยอ่อนตัว แล้วนำไปบรรจุไหพะเนียงหรือขวดโหล ปิดฝาให้มิดชิด จนหนางมีกลิ่นหอมเปรี้ยว

หอยส้ม ทำโดยเอาหอยแครง หอยคราง หอยเม็ดขนุน หรือหอยแครงลิง มาแกะเนื้อออกล้างน้ำจนสะอาดแล้วคลุกเกลือป่นหรือเกลือเม็ด หอย 1 กิโลกรัมต่อเกลือ ประมาณ 20 ช้อนแกง หมักเกลือไว้ประมาณ 12-14 ชั่วโมง แล้วเอาใส่ภาชนะที่มีฝาปิดเติมน้ำตาลเหลวลงประมาณ 2 แก้ว คนน้ำตาลเหลวให้กระจายทั่วปิดฝาภาชนะดองประมาณวันที่ 10 เปรี้ยวเต็มที่และจะรักษารสเปรี้ยวอยู่ได้นานเป็นเดือนๆ

บูดู เป็นอาหารคาวมี 2 ชนิด คือ บูดูแบบเค็ม สำหรับปรุง แล้วใช้ผักจิ้มรับประทานกับข้าวสวยและบูดูแบบหวานสำหรับคลุกกับข้าวยำปักษ์ใต้ บูดูทั้ง 2 ชนิดนี้ได้จากการหมักปลาโดยนำปลาทะเลสด มาล้างให้สะอาดผสมกับเกลือเม็ดบรรจุไหปิดฝาให้มิด ผนึกด้วยปูนขาว วางให้ถูกแดดในที่โล่งประมาณ 2-3 เดือน จนเนื้อปลาเหลวหมักต่อไปอีกประมาณ 1 ปี เนื้อปลาจะเปื่อยและหลุดออกจากก้างนำไปกรองเพื่อแยกเอาก้างทิ้ง เอาน้ำที่มีเนื้อปลาละลายปนอยู่มาบรรจุขวด จะได้น้ำบูดูอย่างเค็มเพื่อใช้ปรุงเป็นอาหารต่อไป

ปลาส้ม เป็นอาหารประเภทหมักดองทำจากปลาน้ำจืดเกือบทุกชนิด แต่ที่นิยมทำกัน ได้แก่ ปลาขี้ขม ปลาตะเพียน ปลากระดี่ ทำโดยนำปลามาขอดเกล็ด ผ่าท้องเอาไส้ออก ล้างให้สะอาด แล้วนำไปหมักเกลือ 2 - 3 วัน โดยใช้อัตราส่วนเกลือ 3 กิโลกรัมต่อปลา 10 กิโลกรัม เมื่อหมักเกลือได้ที่แล้ว นำปลาออกล้างแล้ว ตากให้สะเด็ดน้ำ นำไปซุบกับข้าวคั่วป่นและน้ำตาลปึกจัดเรียงลงในกระปุก เก็บทิ้งไว้ประมาณ 10 วัน

แป้งแดง เป็นอาหารพื้นเมืองประเภทอาหารคาว มีเครื่องจิ้ม แป้งแดง มี 2 ชนิด คือ แป้งแดงปลา และ แป้งแดงหมู การหมักต้องอาศัยข้าวคั่วช่วย และเมื่อปรุงเสร็จแล้วจะมีลักษณะข้นและมีสีแดงอมชมพู จึงเรียกว่าแป้งแดง วิธีหมักเตรียมเนื้อหมูหรือปลาสด ถ้าเป็นปลาตัวเล็ก ๆ ก็ใช้ทั้งตัว ถ้าเป็นปลาตัวใหญ่หรือเนื้อหมู ควรหั่นเป็นชิ้นขนาดประมาณ 1.5x 2 นิ้ว ล้างให้สะอาดใส่ตะแกรงพักให้สะเด็ดน้ำ ใช้เนื้อที่เตรียมไว้คลุกกับเกลือให้ทั่ว หมักทิ้งไว้ 1 คืน ล้างน้ำเกลือออกให้หมด นำข้าวคั่วป่นพอหยาบ ๆ และใช้น้ำตาลปีบคลุกเข้าด้วยกัน เติมดินปะสิวป่นละเอียดเล็กน้อยและใส่สีพองาม คลุกให้เข้ากันแล้วใช้ภาชนะเดิมใส่ปิดฝาให้มิดชิด หมักทิ้งไว้ 4-6 วัน

สะตอดอง เป็นการถนอมอาหาร และ ทำให้สะตอมีรสชาติแปลกออกไปอีกแบบ มีวิธีการดองคือเอาสะตอมาลวก หรือต้มเสียก่อนให้พอสุกแล้วพักไว้แล้ว ใส่ลงไปในภาชนะที่มีน้ำเกลือต้ม อาจผสมน้ำซาวข้าวและน้ำตาลลงไปด้วย เพราะจะช่วยให้สะตอดองได้ผลเร็วขึ้นและมีรสเปรี้ยวอมหวานด้วย สะตอดองนอกจากจะเป็นอาหารที่ให้รสชาติที่แปลกออกไปแล้วยังเป็นอาหารที่สามารถเก็บไว้กินได้นาน ๆ แม้จะผ่านพ้นฤดูกาลที่สะตอออกผลแล้วก็ตาม

ผักเสี้ยน เป็นพืชในวงศ์ Cleomaceae ผักเสี้ยนผี ซึ่งมีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Gynandropsis pentaphylla* DC. ชาวบ้านจะนำช่ออ่อนมาดองเป็นอาหาร วิธีดองทำโดยนำมาหั่นเป็นท่อนขนาดพอคำ นำไปตากแดดพอหมาด ๆ เพื่อขจัดกลิ่นเหม็นเขียว เสร็จแล้วเอาข้าวเย็น 1 กำมือต่อผักเสี้ยน 5 ถ้วยแกงขยำกับเกลือให้มีรสเค็มเล็กน้อย แล้วละลายน้ำ 5 ถ้วยแกง กรองเอาเฉพาะน้ำ แล้วนำผักเสี้ยนที่เตรียมไว้ใส่ลงไป ใส่น้ำตาลโตนด 5 ช้อนแกง คลุกเคล้าให้เข้ากันดี ปิดฝาภาชนะตั้งไว้ในที่ร่ม 3-4 คืน ผักเสี้ยนก็จะมีรสเปรี้ยวนำมารับประทานได้

3. จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักดอง

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมัก มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักมากที่สุด คือ แบคทีเรียแลกติก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักมากมายหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก เนย ผักดอง ไส้กรอกหมัก อาหารหมักพื้นเมือง เช่น น้ำปลา บูดู ปลาร้า แหนม เป็นต้น แบคทีเรียที่จัดในกลุ่มนี้ ได้แก่ Lactobacillus , Pediococcus , Leuconostoc และ Streptococcus (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

แบคทีเรียแลกติก (lactic acid bacteria , LAB) ถูกใช้ในการเตรียมและถนอมอาหารประเภทเนื้อ , นม และ ผัก มาเป็นเวลานาน และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัย (gernerally recognized as safe ; GRAS)ซึ่งแบคทีเรียแลกติกจะผลิตสารต่าง ๆ เช่น กรดอินทรีย์ , protease , flavor compound และสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ โดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ที่รู้จักดีก็คือแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็น bactericidal proteins (Tagg, *et al* ., 1976) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Yang, *et al* ., 1997 พบว่า Lactobacillus 13 สายพันธุ์ และ Pediococcus 5 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้ง เป็น 2- pyrrolidone -5 - carboxylic acid (PCA) ซึ่ง PCA จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิด เช่น *Enterobactor cloaoae* 1575 , *Pseudomonas fluorescens* KJL G . และ *P. putida* 1560-2 ผลการยับยั้งของ PCA ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับอุณหภูมิสูงขึ้น แต่จะถูกทำลายเมื่อเติม ammonium hydroxide และ PCA จะมีผลการยับยั้งน้อยกว่ากรดแลกติกเล็กน้อย

แบคทีเรียแลกติกมีบทบาทสำคัญ ในการถนอมอาหาร และผลิตอาหารที่ดีต่อสุขภาพอนามัย ซึ่งพบได้ทั้งในอาหารหมักดองประเภทพืช เช่น กระหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง และประเภทสัตว์ เช่น ปลา กุ้ง เนื้อ การหมักด้วยแบคทีเรียแลกติกเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย ในการเตรียมอาหารเหล่านี้เพื่อบริโภคอาจผ่านความร้อนเล็กน้อยหรือไม่ก็ได้ถือเป็นการประหยัดพลังงาน และมีข้อดีคือ สามารถยับยั้งเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือสร้างสารพิษใด การสร้างกรดยังทำให้อาหารรสชาติที่จำเพาะและ

เพิ่มคุณค่าทางอาหารอีกด้วย อาหารหมักที่มีแบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้องจึงเป็นอาหารของประชากรโลกที่พบได้ในทุก ๆ ทวีป

แบคทีเรียแลกติกเข้ามาเกี่ยวข้องกับอาหารหมักดองของไทยทั่วทุกภาค โดยเฉพาะภาคใต้มีอาหารหมักดองจากแบคทีเรียแลกติกมากที่สุดประมาณ 21 ชนิด และน้อยที่สุดในภาคเหนือมี 9 ชนิด (วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534) ตัวอย่างอาหารหมักดองที่พบในภาคต่าง ๆ ของประเทศไทยพอสรุปได้ดังตาราง 1

ตาราง 1 อาหารหมักดองทั่วทุกภาคของไทยที่มีแบคทีเรียแลกติกเกี่ยวข้อง

ภาค	อาหารหมักดอง	
	พืช	สัตว์
เหนือ	ขนมจีน ใบเมี่ยง ผักและผลไม้ดอง	ปลาร้า ปลาจ่อม -ปลาส้ม ปลาเจ่า น้ำปลา แหนม
ใต้	ขนมจีน ก๊งฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว ผักและผลไม้ดอง	หมูอวน หอยดอง น้ำบูดู น้ำเคย น้ำปลา กุ้งส้ม ปลาส้ม ปลาแป้งแดง ปลาแป้งข้าวหมาก ปลาหมัก
ตะวันออก	ขนมจีน ก๊งฉ่าย เกี้ยมฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ผักและผลไม้ดอง	หอยดอง ปลาจ่อม - ปลาส้ม น้ำปลา
อีสาน	ขนมจีน ผักและผลไม้ดอง	ส้มฟัก กุ้งจ่อม - กุ้งส้ม น้ำปลา ปลาจ่อม-ปลาส้ม ปลาร้า แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ปลาเจ่า
กลาง	ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว ขนมจีน ก๊งฉ่าย เกี้ยมฉ่าย ซีเซ็กฉ่าย ตั้งฉ่าย ผักและผลไม้ดอง	กุ้งจ่อม-กุ้งส้ม ปลาเจ่า-ปลาส้ม ปลาร้า หอยดอง น้ำปลา นม เปรี้ยว โยเกิร์ต

ที่มา : วิเชียร ลีลาวัชรมาศ, 2534

แบคทีเรียแลกติก เป็นแบคทีเรียชนิดที่เติบโตในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารอาหารมาก แต่ก็สามารถเติบโตได้ในแหล่งอาหารทั่วๆ ไป และจะทำให้ pH ของอาหารต่ำลงอย่างรวดเร็วจนถึงจุดที่ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถเติบโตได้ พบว่า Leuconostoc และ Streptococcus ที่สร้างกรดแลกติกจะทำให้มี pH ต่ำสุดที่ 4 - 4.5 ส่วน Lactobacillus และ Pediococcus บางสายพันธุ์ จะทำให้มี pH ต่ำประมาณ 3.5 ก่อนจะมีการยับยั้งการเติบโตของตัวเอง (Steinkraus,1992)

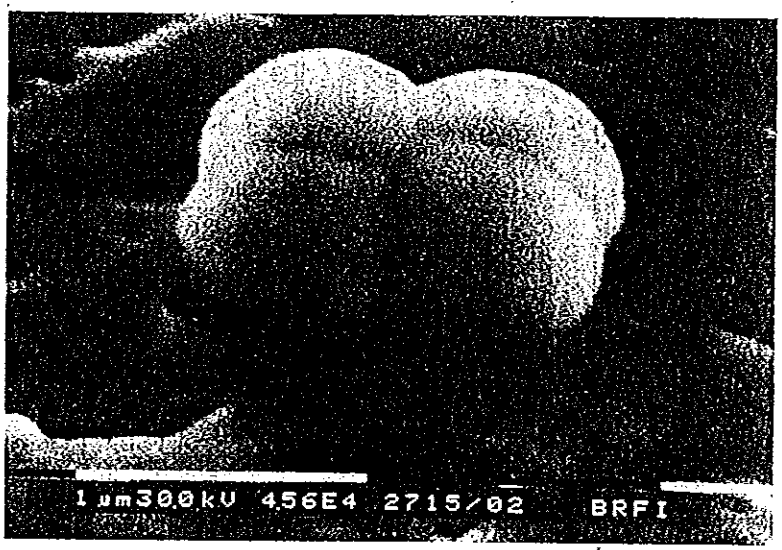
มาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) ได้ศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง : บูดู จำนวน 35 ตัวอย่าง พบว่า ค่า pH อยู่ในช่วง 5.3 -6.6 ปริมาณกรดแลกติกเป็นร้อยละ 0.22 - 1.29 และมีปริมาณแบคทีเรีย 1.08×10^{2} - 3.6×10^{6} เซลล์ / กรัม และพบว่า *P. halophillus* ในบูดูจะเพิ่มมากขึ้นหลังการหมักได้ 7 วัน จนกระทั่งบูดูหมักได้ที่จะพบเชื้อ *P. halophillus* มากถึงร้อยละ 90 ของเชื้อทั้งหมด จึงมีแนวโน้มว่าจะเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในขบวนการหมัก เกี่ยวกับการสร้างกรดและกลิ่นที่ดีในบูดู

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ อุบลวรรณ รอดประดิษฐ์ (2540) ได้แยกเชื้อ คัดเชื้อ และเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลกติก จากอาหารหมักของไทย จำนวน 52 ตัวอย่างได้ 80 สายพันธุ์ เมื่อนำมาเทียบเคียงชนิด พบว่า เป็น *L. plantarum* 16 สายพันธุ์, *L, bavaricus* 3 สายพันธุ์ และ *L. brevis* 1 สายพันธุ์

Desai และ Sheth (1997) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติก จากกะหล่ำปลีและผักกาดดอง แล้วคัดเลือกเชื้อจำนวน 6 สายพันธุ์ ตามลักษณะการหมักแบบ Homo- และ Hetero - fermentative การทนเกลือ อัตราการสร้างกรด และใช้เชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์เป็นเชื้อตั้งต้นในการดองผักต่าง ๆ พบว่า น้ำดองผักมีความเป็นกรดสูงถึงร้อยละ 0.6 - 0.7 เมื่อดองผักได้ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส และเมื่อดองผักด้วยแบคทีเรียแลกติกดังกล่าว โดยใส่เกลือร้อยละ 4 , $CaCl_2$ ร้อยละ 0.1 และกรดซอร์บิก ร้อยละ 0.1 พบว่า หลังดองผักไว้ 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 28 -30 องศาเซลเซียส ผักที่ดองก็ไม่มีการเน่าเสีย ยังคงสีสดเหมือนธรรมชาติ และมีรสชาติเป็นที่ถูกปากอีกด้วย

4. แบคทีเรียแลกติกสกุล Pediococcus

Pediococcus เป็นแบคทีเรียแลกติกเพียงชนิดเดียวที่มีการแบ่งตัวใน 2 ทิศทาง แล้วให้เซลล์สี่เซลล์ติดกัน (tatrad) ดังภาพประกอบ 1



ภาพประกอบ 1 ลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นสี่เซลล์ (tatrad) ของ *Pediococcus pentosaceus* BSO347ที่ถ่ายด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องราด, Scanning Electron Microscope

ที่มา : Simson and Taguchi, 1995

Pediococcus ต้องการอาหารซับซ้อนในการเติบโตพบทั่วไปในอาหารหมักจากพืชเติบโตได้ดีที่มีเกลือร้อยละ 5.5 และการเติบโตจะลดลงเมื่อมีเกลือร้อยละ 10 แต่มีบางชนิด เช่น *P. halophillus* เติบโตได้ดีในที่มีเกลือร้อยละ 6 - 8 และทนเกลือได้สูงกว่าร้อยละ 15 ดังนั้นจะพบในอาหารหมักดองที่มีเกลือสูง ๆ เช่น ซีอิ้ว เต้าเจี้ยว น้ำปลา บูดู ปลาร้า เป็นตัวการสำคัญในการทำให้เกิดกรด กลิ่น รส ในอาหารหมักเหล่านี้ (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2539)

Roeling and Van - Verseveld (1997) พบว่า Pediococcus บางสปีชีส์ (*P. inopinatus* , *P. parvulus*) ทนต่อเอธานอล จึงสามารถเติบโตในเครื่องดื่ม

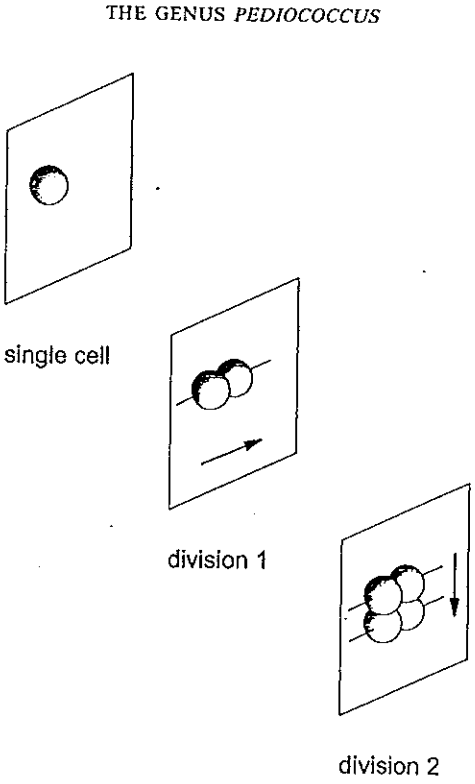
Pediococcus ทุกสปีชีส์เติบโตที่ 30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 25 - 40 องศาเซลเซียส เป็นพวกเคโมออร์แกโนโทรฟ เซลล์ต้องการสารอาหารมากเป็นพิเศษ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่มีไซโตโครม แยกออกเป็นสปีชีส์ได้ตามความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิ pH และ NaCl ซึ่งทุกสปีชีส์สามารถเติบโตในอาหาร MRS (Sneath, Mair, and Holt, 1986)

จีนัส Pediococcus ปัจจุบันสามารถแบ่งออกเป็น 8 สปีชีส์ ใน 8 สปีชีส์นี้ *P. acidilactici* ,*P. pentosaceus* , *P. damnosus* และ *P. parvulus* จะมีลักษณะที่สัมพันธ์ใกล้ชิด (Collin, William and Wallbanks, 1990) สำหรับ *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* มี DNA / DNA homology ใกล้เคียงกัน มีลักษณะที่แตกต่างกันเล็กน้อยคือ *P. acidilactici* จะเติบโตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และไม่หมักน้ำตาลมอลโตส เซลล์จะตายเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที ขณะที่*P. pentosaceus* จะไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส หมักน้ำตาลมอลโตสได้และเซลล์จะตายเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที (Kitahara,1974 ; Gravie,1986)

4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ Pediococcus

เมื่อเป็นเชื้อบริสุทธิ์ Pediococcus จะมีรูปร่างกลม และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36 - 1.43 ไมโครเมตร (Gunther and White , 1961) เซลล์จะไม่ยาว ซึ่งต่างกับ *Leuconostoc* spp. ซึ่งมักจะเป็นรูปยาว และมีการจัดเรียงตัวเป็นลูกโซ่

การแบ่งเซลล์ของ Pediococcus จะเป็นไปอย่างรวดเร็ว เคยมีการเข้าใจว่าเป็นการแบ่งระนาบเดียว ให้เซลล์เป็นโซ่ยาวแล้วจัดเรียงตัวใหม่เป็นสี่เซลล์ Simpson,1994 ได้เสนอแนวคิดว่า การแบ่งเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ติดกันสี่เซลล์ของ Pediococcus จะเกิดขึ้นเป็นสองระนาบโดยจะแบ่งไปในมุมทางด้านขวา ดังภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 การแบ่งเซลล์ใน 2 ทิศทาง ระนาบเดียวของ Pediococcus เพื่อให้ได้เซลล์สี่เซลล์ (tatrad)

ที่มา : Simpson and Taguchi, 1995

บางครั้ง Pediococcus มีการเรียงตัวกันเป็นคู่ มักไม่พบเซลล์เดี่ยว ๆ และไม่มีการจัดเรียงตัวเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และแคปซูล เมื่อเติบโตในอาหารที่มีสารอาหารมาก เช่น de Man , Rogosa , Sharpe (MRS) agar โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 - 3 มิลลิเมตร ขอบเรียบ กลม สีไม่แตกกัน เมื่อเลี้ยงใน stab culture จะเติบโตตามรอย stab และเติบโตบริเวณผิวอาหารเล็กน้อย ในอาหารเหลวเติบโตสม่ำเสมอทั่วหลอดทดลอง (Nakagawa and Kitahara , 1959)

4.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาของ Pediococcus

4.2.1 การหมักคาร์โบไฮเดรท

Pediococcus สามารถใช้น้ำตาลคาร์โบไฮเดรทได้หลายชนิดในแต่ละสปีชีส์ จาก pentose เช่น arabinose , ribose และ xylose hexose เช่น fructose และ mannose disaccharide เช่น maltose trisaccharides เช่น maltotriose polymer เช่น แป้ง (Deibel and Niven , 1960) การหมักคาร์โบไฮเดรทแบบฮอมอแลกติก หมักน้ำตาลได้กรด 0.5 - 0.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก (วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล , 2539)

4.2.2 การใช้ ไนโตรเจน

Pediococcus จะเติบโตได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารมาก หลายสายพันธุ์ ต้องการกรดอะมิโนหลายตัว และจะเติบโตได้น้อยมากหากไม่มีแหล่งไนโตรเจน

Bhowmik และ Margt (1990) ได้ทดสอบการสร้างเอนไซม์ต่าง ๆ ของ *Pediococcus* spp. พบว่าทุกสายพันธุ์สร้าง protease , dipeptidase , dipeptidyl - aminopeptidases และ aminopeptidases แต่ไม่สร้าง carboxy - peptidases หรือ endopeptidase

4.2.3 วิตามิน , สารอินทรีย์และแร่ธาตุ ที่ต้องการ

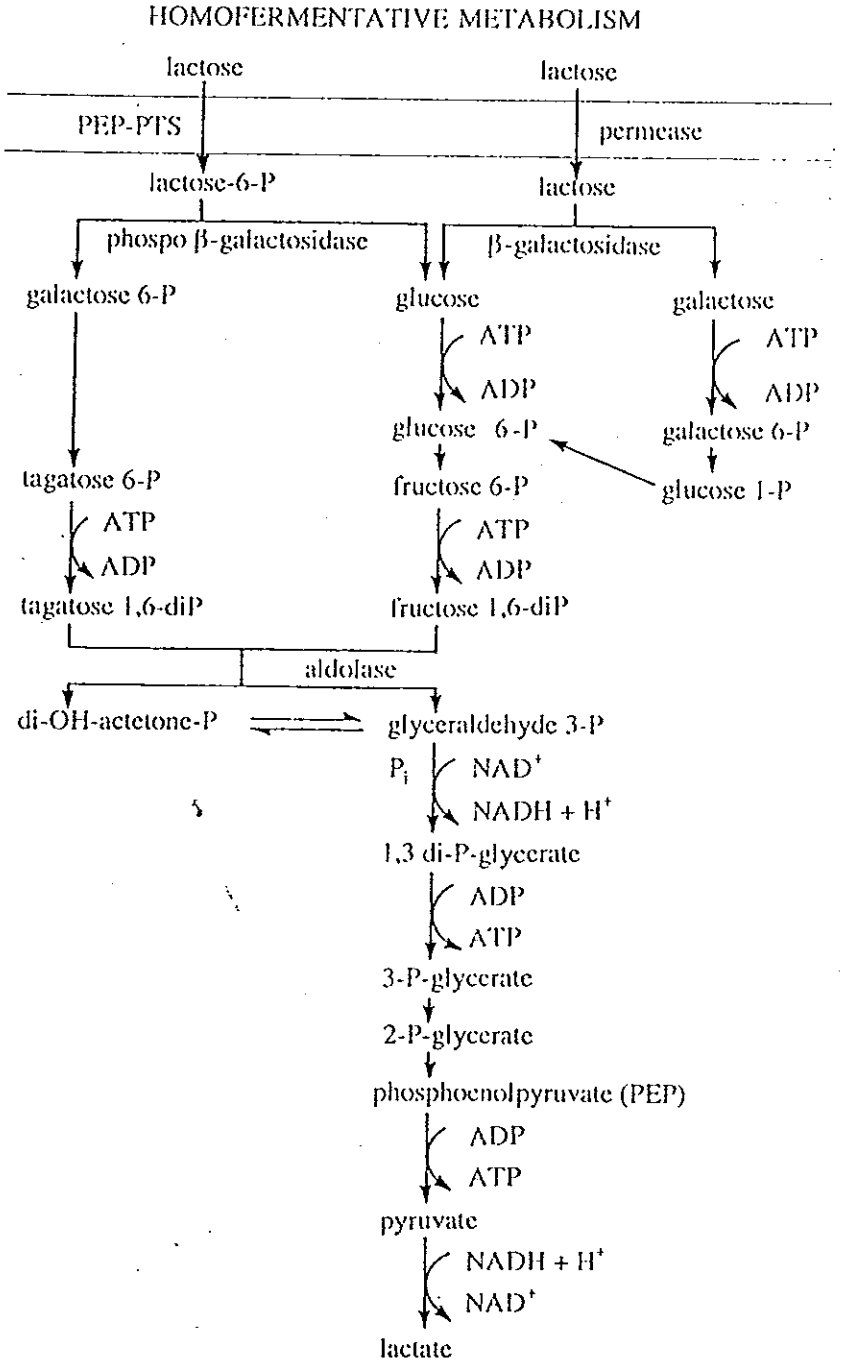
Pediococcus spp. ทุกสายพันธุ์ต้องการ nicotinic acid, pantothenic acid และ biotin และต้องการ manganese สำหรับการเติบโต บางสายพันธุ์ต้องการ riboflavin , pyridoxine และ folinic acid (Sakaguchi and Mori , 1969 ; Efhymiou and Joseph , 1972)

4.2.4 ปฏิกิริยาต่อออกซิเจน

Pediococcus เป็น แฟคัลเททีฟแอนแอโรป โดยทั่วไป ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส และไม่มี เอนไซม์ superoxide dismutase แต่มีการป้องกันตัวเองจากการทำลาย ของ อนุภาคออกซิเจน (oxygen radicals) โดยใช้ Manganease ที่มีความเข้มข้นสูง *Pediococcus halophillus* บางสายพันธุ์สร้าง pseudo - catalase ซึ่งจะให้ผลบวก เมื่อทดสอบด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และ และพบว่า *P. acidilactici* จะสร้าง catalase เมื่อให้ haemin (Whittenbury, 1964)

5. การสร้างสารยับยั้งของ Pediococcus

Pediococcus spp. เป็นแบคทีเรียแลกติก พวกฮอมอเฟอร์เมนต์เตทีฟ ซึ่งผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากการหมักของแบคทีเรียแลกติกพวกนี้ ได้แก่



ภาพประกอบ 3 การหมักคาร์โบไฮเดรทของแบคทีเรียแลกติกแบบฮอมอเฟอร์เมนต์เตทีฟ

ที่มา : Vuyst and Vandamme, 1994

5.1 กรดแลกติก

แบคทีเรียพวกฮอมอเฟอร์เมนต์เตทีฟ ซึ่งได้แก่ Lactococcus , Pediococcus, Streptococcus และ Lactobacillus บางสายพันธุ์ จะย่อยสลายกลูโคสแล้วให้กรดแลกติก โดยการหมักแบบฮอมอเฟอร์เมนต์เตทีฟ Embden Meyerhof-Parnas pathway ดังภาพประกอบ 3 โดยเปลี่ยน fructose 1 , 6 - diphosphate เป็นน้ำตาล triose phosphate 2 โมเลกุล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น pyruvate และถูกรีดิวส์ต่อไปเป็นกรดแลกติก และจะให้ ATP สุทธิ 2 โมเลกุล ต่อการหมักน้ำตาลเฮกโซส (Kandler, 1983) การสะสมของกรดที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายนี้จะส่งผลให้ pH ต่ำลง และมีผลต่อการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (Vuyst and Vandamme,1994)

5.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)

แบคทีเรียแลกติกจะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นจะสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะแบคทีเรียแลกติกจะเป็นพวกไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (Vuyst and Vandamm,1994)

Anders, Hogg, and Jago (1970) ได้รายงานว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.2 mmol / L สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Lactococcus* ได้ร้อยละ 50 และหากความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็น 1.5 mmol / L อาจทำให้เซลล์ตายได้

Gilliland and Speck (1977) พบว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่สร้างจาก *L. acidophillus* สามารถยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียได้

5.3 แบคเทอริโอซิน (bacteriocin)

แบคเทอริโอซิน ที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกเป็น antimicrobial peptides ที่สังเคราะห์จากไรโบโซม ซึ่งการยับยั้งจะจำเพาะโดยตรงต่อแบคทีเรียแกรมบวก ขณะที่ไม่มีผลในการยับยั้งต่อเซลล์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน (Bruno and Montville , 1993) Pediocin AcH เป็นแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *P. acidilactici* หรือสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน จะยับยั้งแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น Pediococcus,

Lactobacillus, Leuconostoc, Brochothrix, Propionibacterium, Bacillus, Enterococcus, Staphylococcus , Listeria, *Clostridium botulinum* E แต่ไม่ยับยั้ง *Cl. Botulinum* Aและ B และยังมีผลยับยั้งสปอร์ ของ Clostridium , Bacillus บางสายพันธุ์ (Kachayanand, 1990 ; Ray, 1992)

Bhunia, Hohnson, and Ray (1988) ได้ใช้เชื้อ *P. acidilactici* ที่สร้าง pediocin AcH โดยใช้ casein glucose broth ที่ประกอบด้วย casein ร้อยละ 1, yeast extract ร้อยละ 0.5, glucose ร้อยละ 1, Tween 80 ร้อยละ 0.1, Sodium acetate ร้อยละ 0.5, Magnesium sulfate ร้อยละ 0.01, magnesium sulfate ร้อยละ 0.005, disodium phosphate ร้อยละ 0.2 pH 6.8 พบว่าสารละลายส่วนใส ที่ปราศจากเซลล์ มีความสามารถในการยับยั้งได้น้อย

Spelhaug and Harlander , 1989 ได้ศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย ก่อโรคโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *L. lactis* และ *P. pentosaceus* โดยใช้วิธี agar spot พบว่า แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคแกรมบวก คือ *Bacillus cereus* , *Clostridium perfringen* , *Staphylococcus cereus* แต่จะ ยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

Nielsen และคณะ (1990) ได้ศึกษาแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *P. acidilactici* พบว่าสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่มีอยู่ในเนื้อสด เป็น จำนวน 0.5 - 2.2 log cycle ภายใน 2 นาที ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของ แบคเทอริโอซินที่ใช้ หลังจากที่เก็บเนื้อดังกล่าวไว้ในตู้เย็น เป็นเวลา 28 วัน สาร แบคเทอริโอซินก็ยังคงสามารถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้

Bhunia และคณะ (1991) พบว่าการที่ pediocin AcH มีผลยับยั้งแบคทีเรีย แกรมบวกนั้น เพราะผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีโมเลกุลของกรด lipoteichoic ที่เป็น receptor ของ pediocin AcH ซึ่งในแบคทีเรียแกรมลบ จะไม่พบ โมเลกุลของกรด lipoteichoic จึงทำให้ไม่สามารถดูดซับ pediocin AcH ได้

✓Ray (1992) พบว่า การที่แบคเทอริโอซินมีผลต่อการยับยั้งเฉพาะแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากการจับของ pediocin AcH อาจทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างสามมิติบริเวณผนังเซลล์ ส่งผลทำให้ขาดคุณสมบัติการควบคุมสารเข้าออกจากเซลล์ การเปลี่ยนแปลงนี้ทำให้โมเลกุลของ pediocin AcH เคลื่อนผ่านผนังเซลล์เข้าไปจับกับ cytoplamic membrane ต่อไป

Biswas และคณะ (1991) ได้ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ pH ของอาหาร เวลาและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในถังหมัก พบว่า *P. acidilactici* H สามารถสร้าง Pediocin AcHได้สูง ในอาหารที่ไม่มีเกลือที่เป็นบัฟเฟอร์ pH เริ่มต้นที่ 6.5 และ pH สุดท้ายที่ 3.6 - 3.7 และที่อุณหภูมิ 30 - 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18 -22 ชั่วโมง

✓ Lewus และคณะ (1991) ได้ศึกษาแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคเทอริโอซินที่แยกได้จากเนื้อที่ตัดแบ่งเพื่อขายปลีกจำนวน 10 สายพันธุ์ โดยทดสอบการยับยั้งเชื้อก่อโรคที่ชอบอุณหภูมิต่ำ ได้แก่ *Listeria monocytogenes* จำนวน 4 สายพันธุ์ *Aeromonas hydrophila* จำนวน 2 สายพันธุ์ และ *Staphylococcus aureus* จำนวน 2 สายพันธุ์ พบว่าแบคทีเรียแลกติก 8 สายพันธุ์ที่แยกได้ มีผลในการยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ทั้ง 4 สายพันธุ์ และมีผลยับยั้ง *A. hydrophila* และ *S. aureus* ได้ด้วยเช่นกัน

Degnan และคณะ (1992) ได้ทำการทดลองโดยนำเชื้อ *P. acidilactici* JBL1095 ซึ่งสร้าง pediocin AcH และเชื้อ *P. acidilactici* LB 42 ซึ่งไม่สร้างสารแบคเทอริโอซินมาใช้ในการควบคุมเชื้อ *L. monocytogenes* ในไส้กรอกเนื้อ พบว่าเมื่อถ่ายเชื้อทั้ง 3 ลงในไส้กรอกและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 วัน ตรวจพบว่าจำนวนเชื้อ *L. monocytogenes* จะลดลง แต่ไม่ตรวจพบการยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Klaenhammer (1988) พบว่า แบคเทอริโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกหลายชนิดมีผลในการยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์หรือสปีชีส์ ที่มีความสัมพันธ์กัน

ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบของ Pediocin AcH คล้ายกับแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียแลกติกทั่วไป ที่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ แต่มีการศึกษาโดยนำแบคทีเรียแกรมลบไปแช่แข็งหรือทำให้ไม่สามารถทำให้เกิดอันตรายได้ พบว่าแบคทีเรียแกรมลบเหล่านี้ ถูกยับยั้งด้วย Pediocin AcH ดังในตาราง 2

ตาราง 2 แสดงการทดสอบสารยับยั้งของ Pediocin AcH ต่อเชื้อก่อโรคที่ถูกทำให้อ่อนแอลงโดยการแช่แข็ง

ชนิดของแบคทีเรีย	การตรวจสอบ [a]	ปริมาณเชื้อ (CFU/mL)
Aeromonas hydrophila H1	ชุดควบคุม	50×10^2
	แช่แข็ง	16×10^2
	แช่แข็งและใส่ pediocin AcH	$<1 \times 10^2$
Escherichia coli EDL-931	ชุดควบคุม	50×10^3
	แช่แข็ง	90×10^2
	แช่แข็งและใส่ pediocin AcH	60×10^1
Salmonella typhimuyrium T1	ชุดควบคุม	90×10^3
	แช่แข็ง	60×10^2
	แช่แข็งและใส่ pediocin AcH	12×10^2

a : เซลล์แช่แข็งที่ - 20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง Pediocin AcH เตรียมได้โดยการตกตะกอนด้วย ammonium- sulfate มีความเข้มข้นประมาณ 4, 000 AU/ ml

CFU : วัดโดยวิธี pour plate บนอาหาร tryptic soy agar

ที่มา : Ray, 1992 ; Kalchayanand , 1990

การศึกษาการสร้างสารแบคเทอริโอซิน เริ่มด้วยการศึกษาการยับยั้งบนอาหารแข็ง (มักศึกษาโดยเททับด้วยเซลล์ของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ บนเชื้อที่ spot) อย่างไรก็ตาม ลักษณะของแบคทีเรียแลกติก คือ สร้างกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกติก, กรดอะซิติก หรือ antimicrobials อื่น ๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่สามารถ

ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วย ได้มีการปรับเปลี่ยนวิธีเพื่อกำจัดการ
กรด โดยการเติมบัฟเฟอร์ ในอาหารแข็ง หรือ ลดการหมักคาร์โบไฮเดร
หรือใช้แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ไม่ถูกยับยั้งด้วยกรด และกำจัดการยับยั้งที่เ
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการเติมเอนไซม์คะตาเลสลงในอาหารแข็งด้วย (M
and Luchansky, 1993) นอกจากนี้ ยังมีวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบการส
แบคเทอริโอซินได้อีกหลายวิธี เช่น cross - streak bacteria, agar well di
flip plate method และอื่น ๆ ดังแสดงไว้ในตาราง 3

ตาราง 3 วิธีการตรวจสอบการสร้างสารแบคเทอริโอซิน

ส่วนที่ใช้ทดสอบ	วิธีการ	วิธีการดำเนินการ	เ
สารละลายส่วนใส	1. Spot – on – lawn	หยดส่วนของสารละลาย	T
	test (Spot test)	ส่วนใสที่มีการปรับ pH	1
		และกรองแล้วลงบนจาน	
		เพาะเลี้ยงเชื้อที่มีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	
	2. Agar well	ใส่ส่วนของสารละลายส่วน	T
	Diffusion	ใสที่มีการปรับ pH และ	M
		กรองแล้วลงในหลุมของจาน	
		เพาะเชื้อที่มีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	
	3. Activity assay	หยดส่วนของสารละลายส่วน	M
		ใสที่มีความเข้มข้นแตกต่าง	e
		กัน ลงบนจานเพาะเชื้อที่มี	
		แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	
โคโลนีของเชื้อ	1. Flip plate	เลี้ยงเชื้อบนจานอาหารแข็ง	K
	Method	แล้วพลิกกลับอาหารให้ไปอยู่	P
		ด้านฝาจาน แล้วราดทับด้วย	
		แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	
	2. Sandwich	เลี้ยงเชื้อในจานอาหารให้มี	M
	overlay	ความเข้มข้นเชื้อระดับต่าง ๆ	*et*
		ราดทับด้วยอาหาร บ่มเชื้อจน	
		เห็นเชื้อเติบโต แล้วราดทับ	
		ด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	

ตาราง 3 (ต่อ)

ส่วนที่ใช้ทดสอบ	วิธีการ	วิธีการดำเนินการ	เอกสารอ้างอิง
	3. Lutri - Plates	เลี้ยงเชื้อบนจานอาหาร ด้านหนึ่ง ส่วนอีกด้านราดทับ ด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์	Lutri – Plates ™

ที่มา : Muriana and Luchansky , 1993

6. แบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร

สุมาลี เหลืองสกุล (2535) ได้แบ่งกลุ่มโรค ที่เกิดจากการบริโภคอาหารที่มีแบคทีเรียเป็นสาเหตุเป็น 2 กลุ่ม คือ โรคที่เกิดจากการกินอาหารที่มีแบคทีเรียเข้าไป (foodborne disease) และโรคที่เกิดจากการได้รับสารพิษของแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร (food poisoning)

สำหรับในที่นี้จะขอกล่าวถึงแบคทีเรียที่ก่อโรคติดต่อทางอาหาร ที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ ซึ่งพอสรุปได้คือ

6.1 *Bacillus cereus* (Baird – Parker, *et al.*, 1996)

Bacillus cereus แยกเชื้อได้และทำการศึกษาลักษณะของเชื้อในปี คศ. 1887 จัดเป็นเชื้อที่เป็นสาเหตุของโรคติดต่อทางอาหาร อาการของโรคจะถ่ายเป็นน้ำ เกิดหลังจากการได้รับเชื้อ 8 – 16 ชั่วโมง และ ในปี คศ. 1971 มีรายงานการระบาดของโรคหลังจากการรับประทานข้าวผัด 1 – 5 ชั่วโมงจะมีอาการคลื่นไส้และอาเจียน

Smith *et al*, 1952 ได้แบ่ง Bacillus เป็น 3 กลุ่ม โดยอาศัยลักษณะสปอร์และ sporangium โดย *Bacillus cereus* จัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 มีรูป sporangium ที่ไม่โป่งพอง มีเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ $\geq$ 0.9 ไมโครเมตร ซึ่งพิษที่เกิดจาก *Bacillus cereus* จะเกิดเมื่อได้รับอาหาร ซึ่งเชื้อจะเติบโตและสร้างพิษขึ้น พิษที่เกิดขึ้นมี 2 ชนิด คือ ชนิดแรก ทำให้มีอาการอุจจาระร่วงภายใน 8 – 24 ชั่วโมงหลังจากได้รับอาหารที่มีเชื้อ หรือสารพิษในปริมาณมาก สามารถพบเชื้อ *Bacillus cereus*

Central Library
Prince of Songkla University

ในตัวอย่างอุจจาระในปริมาณมากหลังจากได้รับเชื้อ 1 – 2 วัน ชนิดที่สองจะเกิดในระยะเวลาอันสั้นประมาณ 1 – 6 ชั่วโมง หลังได้รับเชื้อหรือสารพิษ

การแยกเชื้อ *Bacillus cereus* จะเติบโตบนอาหารที่มี egg - yolk - polymixin เป็นส่วนประกอบ *Bacillus cereus* แพร่กระจายทั่วไปในธรรมชาติ สามารถแยกได้จาก ดิน, ฝุ่น,ธัญพืช , ผัก, ขนสัตว์และน้ำดื่ม (Kramer and Gilbert , 1989) นอกจากนี้ยังพบ *Bacillus cereus* ในอาหารสดจากการเกษตรเกือบทุกชนิด

Nygrey (1962) ได้ตรวจหา *Bacillus cereus* ในอาหารพบว่า ร้อยละ 52 ของ 431 ตัวอย่างเนื้อและผักมีการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus*

6.2 *Escherichia coli*

ปัจจุบันพบว่ามี *E. coli* 4 ชนิด ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับโรคติดต่อทางเดินอาหาร คือ enteropathogenic (EPEC) , enterotoxigenic (ETEC) , enteroinvasive (EIEC) และ enterohaemorrhagic *E. coli* (*E. coli* O157: H7 ; EHEC)

E. coli O157: H7 แยกได้ครั้งแรกในปี คศ.1982 ซึ่งเป็นเชื้อที่เกี่ยวข้องกับโรคอุจจาระร่วงและลำไส้อักเสบ (Riley , et al., 1982) ในทวีปเอเชียมีรายงานการแยกเชื้อ *E. coli* O157: H7 ได้ในประเทศญี่ปุ่น อินเดียและจีน (Baird – Parker *et al.*, 1996)

Griffin,1995 quoted in Radu, *et al.*, 1998 ตรวจหาเชื้อ *E. coli* O157: H7 จากตัวอย่างเนื้อ 25 ตัวอย่าง ที่วางขายทั่วไปตามห้องตลาดในประเทศมาเลเซีย พบเชื้อ *E. coli* O157: H7 12 สายพันธุ์จากตัวอย่างเนื้อ 9 ตัวอย่าง

ปัจจุบัน *E. coli* O157: H7 เป็นสาเหตุให้มนุษย์เจ็บป่วยมากขึ้น โดยเฉพาะการบริโภคอาหารประเภทเนื้อสัตว์ เช่น เนื้อไก่สดและเนื้อไก่ที่ไม่สะอาด เนื้อวัว เนื้อหมู ซึ่งเป็นแหล่งที่จะทำให้มีการติดเชื้อ *E.coli* O157: H7 ได้ (Doyle, *et al.*, 1987 quoted in Byun, *et al.*, 1998)

6.3 *Salmonella typhimurium* (Bryan , 1976 ; Baird – Parker *et al.*, 1996)

จีนัส Salmonella จะพบใน family Enterobacteriaceae เป็นแบคทีเรียแกรมลบ , ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่โดยอาศัย Flagella แบบ peritrichous, สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

Salmonella จะมีส่วนที่เป็น antigen ได้ 3 ชนิด คือ K (แคปซูล), O (ตัวเซลล์) และ H (flagella)

Salmonella ทำให้เกิดอาการของโรคได้ 3 อย่าง คือ

Gastroenteritis มีระยะพักตัวจาก 5 ชั่วโมง – 5 วัน โดยทั่วไปมักอยู่ในช่วง 12 – 36 ชั่วโมง หลังจากรับประทานอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อ จะมีอาการอุจจาระร่วง, อาเจียน , ปวดท้อง มีไข้ และหนาวสั่น

Enteric fever มีระยะพักตัว 7 – 28 วัน (ขึ้นอยู่กับปริมาณเชื้อที่ได้รับ) โดยทั่วไปมักอยู่ในช่วง 14 วัน มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดหัว มีไข้ ปวดท้อง ร่างกายอ่อนเพลีย บางครั้งอาจมีจุดสีชมพูขึ้นบริเวณหลังและอก

Bacteraemia , septicaemia เกิดขึ้นเนื่องจากมีเชื้อ Salmonella ในเลือด จะมีอาการปวดหลัง ท้อง และหน้าอก มีไข้สูง คลื่นไส้ อาเจียน น้ำหนักลด (Smith, *et al.*, 1993 quoted in Baird – Parker , *et al.*, 1996)

6.4 *Staphylococcus aureus* (Bryan, 1976 ; Baird-Parker, *et al.*,1996)

S. aureus เป็นเชื้อแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ รูปร่างกลม (เส้นผ่านศูนย์กลาง < 1 ไมโครเมตร) สร้างเอนไซม์และสารพิษหลายชนิด เป็นพวก enterotoxin ชนิด A,B,C,D หรือ E สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส ลักษณะรูปร่างคล้ายกับจีนัส Micrococcus แต่สามารถเติบโตในที่ไม่มีออกซิเจนได้

อาการที่เกิดโรคอาหารเป็นพิษจะเกิดในช่วง 1 - 7 ชั่วโมง หลังจากได้รับอาหารที่มีพิษ จะคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน และอุจจาระร่วง บางรายปวดหัวและอ่อนเพลีย อาการจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว มักเกิดภายใน 2 วัน

การตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* โดยทั่วไปมักใช้อยู่ 2 วิธี คือ coagulase test และ thermostable nuclease test

7. การพัฒนาการผลิตอาหารหมักดองพื้นบ้าน

อาหารหมักดองพื้นบ้านหลายชนิดยังไม่ได้มาตรฐาน เพราะยังขาดความสะอาดของวัตถุดิบ การทำ และขั้นตอนการทำ การป้องกันผลิตภัณฑ์จากการปนเปื้อนและขาดการบรรจุ การปกปิดภาชนะที่ใช้บรรจุ ซึ่งทำให้เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของ

เชื้อก่อโรคนอกจากนี้ อาหารหมักดองหลายชนิดยังให้พลังงาน โปรตีน และวิตามินน้อย รสสัมผัสของอาหารมีความแตกต่างกันในอาหารหมักชนิดเดียวกันและเก็บไว้ได้ไม่นาน ซึ่งจะทำให้ความสะดวกในการบริโภคลดลง จึงต้องมีการปรับปรุงและพัฒนาอาหารหมักดองพื้นบ้านดังกล่าว ในด้านต่าง ๆ คือ

7.1 ในขั้นตอนการทำ ได้แก่ การเตรียมวัตถุดิบขั้นตอนการทำ การนำออกขายหรือการบรรจุ ต้องคำนึงถึง การคัดเลือก, มาตรฐาน, ความสะอาด ปราศจากเชื้อปนเปื้อน, การบรรจุ

Iwoha and Eke,1996 ได้ทำการศึกษาอาหารหมักดองพื้นบ้านของชาวไนจีเรีย เกี่ยวกับกระบวนการทำ ปัญหา การพัฒนาและสภาพปัจจุบัน พบว่า ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้ ยังคงมีปัญหาด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและคุณภาพเนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์ และคุณค่าทางอาหาร

7.2 คุณค่าทางอาหาร Onofiok, *et al.*, (1996) ได้ศึกษาถึงสารอาหารที่ได้รับจากอาหารหมักดองในประเทศไนจีเรีย ซึ่งมีการบริโภคอาหารหมักดองกันในทุกเพศทุกวัย พบว่า ในอาหารหมักดองให้สารอาหาร คือ พลังงาน โปรตีน แคลเซียม เหล็ก ไทอะมีนและกรดแอสคอร์บิก ในปริมาณที่ต่ำกว่าที่ FAO ได้กำหนดไว้

7.3 ความคงตัวของการหมักโดยธรรมชาติ แต่มีการเติมเชื้อให้มากยิ่งขึ้น เพราะข้อดีของการหมักอาศัยเชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติ คือ เชื้อที่หมักจะเหมาะกับสภาวะแวดล้อมนั้น ๆ แต่ข้อเสีย คือ เชื้อที่มีอยู่ตามธรรมชาติจะควบคุมยากหากมีการนำไปใช้ในการหมักในปริมาณมาก เสี่ยงต่อการเน่าเสีย ระยะเวลาในการหมักจะยาวนาน ไม่เพียงพอกับความต้องการในการขายในตลาดในเมือง หรือเกิดการเน่าเสียก่อนเวลาสมควร จึงควรใช้เชื้อเริ่มต้นที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งอาจได้จากการคัดเลือกจากอาหารหมักดองตามธรรมชาติ หรือพันธุวิศวกรรม แต่พันธุวิศวกรรมจะทำได้ยาก ค่าใช้จ่ายจะสูง และต้องทำในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ วิธีที่ทำได้ง่ายที่สุด คือ เติมเชื้อที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติในปริมาณมาก

Tamang and Nilkkuni (1996) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อเพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักถั่วเหลืองซึ่งเป็นอาหารของชาว Himalaya จากตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก 9 ตัวอย่าง พบว่า 10 ใน 45 สายพันธุ์ สามารถนำมาเป็นเชื้อเริ่มต้น

ได้ดี โดยพิจารณาจากกิจกรรมของเอนไซม์ การใช้วัสดุที่มีลักษณะเล็กละเอียด ซึ่งจากการวิเคราะห์ทางชีวเคมีและรสสัมผัส พบว่าเชื้อที่คัดเลือกได้จะเป็นเชื้อเริ่มต้นที่น่าจะนำไปพัฒนาเพื่อใช้หมักถั่วเหลืองต่อไป

7.4 การใช้เชื้อบริสุทธิ์เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักอาหาร

ศุภศิลป์ มณีรัตน์ (2541) ได้นำเชื้อ *L. plantarum P. cerevisiae* และ *Micrococcus varians* มาผลิตเชื้อผงสำหรับผลิตแหนม พบว่าเมื่อเปรียบเทียบการผลิตแหนมที่ใช้กล้าเชื้อผง และกล้าเชื้อสด กับ แหนมที่ผลิตโดยวิธีดั้งเดิม มีค่า pH 3.64 , 3.64 และ 4.64 ตามลำดับ และค่าร้อยละของกรดแลกติกเป็น 1.32 ,1.33 และ 0.97 ตามลำดับ และพบว่า การเก็บกล้าเชื้อทั้ง 3 ชนิดในถุงที่มีการปิดผนึกแบบสูญญากาศ และการปิดผนึกแบบธรรมดา มีจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตไม่แตกต่างกัน

พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์ (2538) ได้ใช้แบคทีเรียแลกติกร่วมกัน 2 สายพันธุ์ คือ *L. plantarum* 3409 และ *P. pentosaceus* 2205 ในการหมักไส้กรอก พบว่า ไส้กรอกที่หมักด้วยแบคทีเรียแลกติก 2 สายพันธุ์รวมกัน มีคะแนนความแน่นแข็งสูงกว่าไส้กรอกที่หมักด้วยแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์เดียวอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($p< 0.01$) และมีคะแนนยอมรับรวมใกล้เคียงกับคะแนนในอุดมคติมากที่สุด

Daeschel, Fleming, and Mc Feeters (1988) ได้ทำการวิจัยโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *L. plantarum* และยีสต์ *S. cerevisiae* ในการหมักน้ำแตงกวา พบว่า pH สุดท้ายของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มขึ้น ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นด้วยแต่จะแปรผกผันกับปริมาณ glycerol ซึ่งสร้างจาก *S. cerevisiae*

สำหรับการใช้ Pediococcus เป็นเชื้อตั้งต้นในการหมักอาหารในระยะแรก ๆ นั้น จะใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ สายพันธ์ที่ใช้คือ *P. acidilactici* เนื่องจากสามารถผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วทำให้เนื้อมี pH ต่ำลง ต่อมาได้มีการใช้ Pediococcus เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักเนื้อมากยิ่งขึ้น และพบว่าทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีคุณภาพ . เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลกติกได้ในปริมาณมาก และมีลักษณะที่ต้องการ เหมาะสำหรับที่จะใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น เนื่องจาก Pediococcus มีคุณสมบัติดังต่อไปนี้คือ

(1) ทนเกลือ

(2) เติบโตได้เร็วในน้ำหมักที่มีเกลือ 6 % (% เกลือ / ความชื้น x 100)

(3) สามารถเติบโตได้ดีในที่มีไนไตรต์ 80 – 100 ppm

(4) เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 32.2 องศาเซลเซียส และสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 26.7 – 43 องศาเซลเซียส

(5) เป็นแบคทีเรียพวกโอโมเฟอร์เมนต์เตทีฟ ผลิตกรดแลกติกเพียงอย่างเดียวจากน้ำตาลเดรกซ์โตส

(6) ไม่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไขมัน

(7) ไม่สร้างรสชาติที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมัก

(8) ไม่เป็นเชื้อก่อโรคกับพืชและสัตว์

(9) ถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 57 – 60 องศาเซลเซียส

นอกจาก Pediococcus จะใช้สำหรับหมักเนื้อแล้ว ยังสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการหรือเชื้อก่อโรคในอาหาร ซึ่งการยับยั้งนี้อาจเป็นเพราะการสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว ปัจจุบันได้มีการรวบรวมข้อมูลของ Pediococcus ในด้านการสร้างสารยับยั้งต่าง ๆ เช่น การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ , กรดอินทรีย์ , antibiotic หรือ แบคเทอริโอซินที่มีผลต่อการยับยั้ง (Gilliland, 1985)

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาลักษณะทั่วไปของอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย
2. เพื่อแยก *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย
3. ศึกษาลักษณะบางประการของ *Pediococcus* spp.ที่แยกได้ ได้แก่ การเติบโตที่อุณหภูมิ และ pH ระดับต่าง ๆ การเติบโตที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอื่น และเทียบเคียงชนิด
4. คัดเลือก *Pediococcus* spp. ที่มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้
5. ศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้สร้างขึ้น
6. ศึกษาเปอร์เซนต์การยับยั้งแบคทีเรียอื่นเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้

ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาลักษณะทั่วไปของอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย แยกเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองดังกล่าวให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ศึกษาลักษณะต่าง ๆ ของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ แล้วเทียบเคียงชนิด คัดเลือก *Pediococcus* spp. ที่มีความสามารถในการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นได้สูง ศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ *Pediococcus* spp. ดังกล่าวสร้างขึ้นรวมถึงศึกษาเปอร์เซนต์การยับยั้งแบคทีเรียอื่น เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ

1. อาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทยจำนวน 12 ชนิด ได้แก่ กุ้งส้ม จิ้งจัง ไตปลา ปลาส้ม ปลาแป้งแดง หอยดอง หนาง ผักเสี้ยนดอง ผักหนามดอง สะตอดอง หน่อถั่วดอง เหรียงดอง รวม 192 ตัวอย่าง

2. จุลินทรีย์ที่ใช้ทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้ง และสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ *Pediococcus* spp. สร้างขึ้น (Indicator Organism)

Escherichia coli 0157:H7ได้รับจากงานวิจัยของ รศ.ดร.วราภรณ์ วุฒมทะกุลและคณะ

Salmonella typhymurium 3230 ได้รับจากโรงพยาบาลสงขลานครินทร์

Staphylococcus aureus ATCC 29273 ได้รับจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สงขลา

Bacillus cereus ATCC 11778 ได้รับจากศูนย์วิทยาศาสตร์การแพทย์สงขลา

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ

3.1 BHI (Brain Heart Infusion ,Difco) broth และ soft agar (0.7% agar) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus* spp. และ แบคทีเรียอินดิเคเตอร์

3.2 Mac.(MacConkey Agar, Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Escherichia coli* 0157 :H7

3.3 MRS (de Man Rogosa and Shap , บริษัท Difco) agar และ broth สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus* spp.

3.4 MSA (Mannitol Salt Agar , Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Staphylococcus aureus* ATCC 29273

3.5 MYP (Mannitol-Egg-Yolk-polymyxin Agar, Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Bacillus cereus* ATCC 11778

3.6 SS (Salmonella - Shigella Agar,Difco) สำหรับเลี้ยงเชื้อ *Salmonella typhymurium* 3230

4. วัสดุ และ สารเคมีสำหรับการทดสอบทางชีวเคมี

4.1 สารเคมีในการย้อมสีแกรม

4.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ร้อยละ 3 ใช้ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส

4.3 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดในรูปของกรดแลกติก

4.4 สารเคมีที่ใช้ในการวิเคราะห์ปริมาณร้อยละของเกลือ

4.5 Gas pack และอินดิเคเตอร์ สำหรับทดสอบการเติบโตในสภาพไร้ออกซิเจน

5. เอนไซม์

5.1 trypsin บริษัท Sigma

5.2 protease บริษัท Sigma

5.3 pepsin บริษัท Sigma

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์สำหรับวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา ประกอบด้วย

1.1 กระดาษกรอง (membrane filter) ขนาด 0.45 ไมโครเมตร ของบริษัท Scheicher & Schuell

1.2 กระบอกฉีดยา (Syringe) ขนาด 10 มิลลิลิตร

1.3 กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Olympus บริษัท Olympus Optical Co ., Ltd

1.4 เครื่องเขย่า (Vortex mixer) รุ่น 1297 บริษัท Lab Line Instrument

1.5 เครื่องชั่ง (Electronic Balance) Sartorius , Germany

1.6 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectronic 21) บริษัท Milton Roy

1.7 เครื่องวัดความเป็นกรด - ด่าง (pH meter) ยี่ห้อ Backman รุ่น Ø32

1.8 เครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge) Hermel Z 200 A

1.9 เครื่อง megnetic stirrer ยี่ห้อ Framo - Gerateltechnik

1.10 ตู้บ่มเชื้อ (incubator) Typ : B 5100E รุ่น D-6450 Hanau

1.11 ตู้อบฆ่าเชื้อ (hot air oven) Haraeus GMbH , Germany

1.12 เตาแม่เหล็ก (hot plate) Thermolyne Barnstead Thermolyn Cooreration , USA

1.13 ไมโครปิเปต และ tip พลาสติก

1.14 ปิเปตและบิวเรต

1.15 อ่างควบคุมอุณหภูมิ (water bath) บริษัท Memmert typ : W 760

1.16 อุปกรณ์เขี่ยเชื้อ (loop and needle)

1.17 Vernier caliper

1.18 Autoclave รุ่น SS- 325 บริษัท Tomy Seiko Co ., Ltd.

2. เครื่องแก้วสำหรับการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

วิธีการ

วิธีการในการวิจัยประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ

1. การเก็บตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

2. ศึกษาลักษณะทั่วไปของอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

3. การแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

4. การศึกษาลักษณะของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้

1. การเก็บตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

เก็บตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย รวม 12 ชนิด ได้แก่ กุ้งส้ม จิ้งจัง ไตปลา ปลาส้ม ปลาแป้งแดง หนาง หอยดอง ผักเสี้ยนดอง ผักหนามดอง สะตอดอง หน่อถั่วดอง เหรียงดอง จากตลาดสดหรือร้านค้าของจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้ของไทย รวม 192 ตัวอย่าง

2. ศึกษาลักษณะทั่วไปของอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

2.1 การวิเคราะห์ค่าความเป็นกรด-ด่าง ตามวิธีของ A.O.A.C.,1990

2.1.1 ชั่งตัวอย่างอาหารหมักดอง 10 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น pH 7 ปริมาณ 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer

2.1.2 วัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่อง pH meter

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณร้อยละของกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติก ที่มีอยู่ในอาหารหมักดอง ตามวิธีของ A.O.A.C.,1990

2.2.1. ชั่งตัวอย่าง 5 กรัม ใส่ในบีกเกอร์ขนาด 150 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่อง magnetic stirrer

2.2.2 เติมสารละลายฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด

2.2.3 ไตเตรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N จนได้จุดยุติเป็นสีชมพู

2.2.4. คำนวณร้อยละของกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติกจากสูตร

$$\text{ร้อยละของกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติก} = \frac{\text{NaOH(มิลลิลิตร) xNormality ของ NaOH x 90.09 x100}}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม) x 1000}}$$

2.3 การวัดปริมาณร้อยละของเกลือในอาหารหมักดอง ตามวิธีของ A.O.A.C,1975

โดยชั่งตัวอย่างอาหารหมักดองที่บดเป็นเนื้อเดียวกันหนัก 1 กรัม เติม $AgNO_3$ เข้มข้น 0.1 N ลงไปปริมาตร 50 มิลลิลิตร เขย่าแล้วเติม 6 N HNO_3 ปริมาตร 20 มิลลิลิตรลงไป เพื่อป้องกัน $AgNO_3$ ไปทำปฏิกิริยากับแอนอิออนชนิดอื่นที่อาจปะปนมากับอาหารหมักนอกจากคลอไรด์อิออน นำไปตั้งไฟอ่อน ๆ จนเดือด เพื่อให้ตะกอนอื่น ๆ ที่ไม่ใช่ AgCl ละลาย ใช้เวลาประมาณ 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น หยด ferric alum ลงไป 3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วไตเตรตด้วย KSCN มาตรฐาน 0.1 N จนถึงจุดยุติ ได้สารสีแดงอิฐ คำนวณหาร้อยละของเกลือจากสูตร

$$\text{ร้อยละของเกลือ} = \frac{0.0058443\ (Y-X)\ x100}{\text{ปริมาณตัวอย่างที่ใช้ (กรัม)}}$$

Y = จำนวนมิลลิลิตรของ $AgNO_3$ 0.1 N ที่ใช้ในการไตเตรต

X = จำนวนมิลลิลิตรของ KSCN 0.1 N ที่ใช้ในการไตเตรต

2.4 การตรวจนับแบคทีเรียแลกติก

ชั่งตัวอย่างอาหารหมักปริมาณ 10 กรัม ในขวดแก้วขนาด 250 มิลลิลิตร ซึ่งภายในบรรจุสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ปริมาณ 90 มิลลิลิตรที่ปราศจากเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน ดูดตัวอย่างที่เจือจาง 1 : 10 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดขนาด 16 x 150 มิลลลิตร ซึ่งมีสารละลายเปปโตนร้อยละ 0.1 ที่ปราศจากเชื้อ ปริมาณ 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixer จะได้ตัวอย่างเจือจางเป็น 1 : 100 ทำเช่นเดียวกันจนได้สารละลาย $1 : 10^8$ แล้วตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลกติกด้วยวิธีการ pour plate ในอาหาร MRS agar ที่เติมสารละลาย โซเดียมเอไซด์ เข้มข้นร้อยละ 0.01 กรัม / มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการเติบโตของยีสต์

3. การแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยมาแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. โดยวิธี streak plate บน MRS agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.3) ใช้ bromocresol purple blue เป็น indicator แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นำ colony ที่เปลี่ยนสี bromocresol purple blueใ นอาหารเป็นสีเหลือง ไป restreak เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ นำไปย้อมสีแกรม (ภาคผนวก ก หมายเลข 2.1)แยกเชื้อ *Pediococcus* spp. โดยมีลักษณะติดสีแกรมบวก เซลล์จะมีรูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นสี่เซลล์ติดกัน (tetrad) หรือ เป็นคู่ หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วไม่เกิดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในหลอดดักก๊าซ (durham tube) เป็นพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative) เมื่อนำไปทดสอบคะตาเลสตามวิธีของ Feddin, 1976 (ภาคผนวก ก หมายเลข 2.2) จะให้ผลลบ และเมื่อทดสอบกับยาปฏิชีวนะ Vancomycin จะให้ผลดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Vancomycin นำเชื้อที่แยกได้เก็บไว้ในหลอดอาหารแข็ง MRS โดยวิธี stab เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 สัปดาห์

4. การศึกษาลักษณะของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้

4.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

4.1.1 การเติบโตที่อุณหภูมิต่าง ๆ

โดยนำ *Pediococcus* spp. มา subculture 2 ครั้ง ก่อนที่จะนำมาเขี่ยลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม bromocresol purple blue นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25, 35, 40 และองศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple blueในหลอดจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

4.1.2 การเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีระดับ pH ต่าง ๆ

โดยนำ *Pediococcus* spp. มา subculture 2 ครั้งก่อนที่จะนำมาเขี่ยลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการปรับ pH ด้วย NaOH 1 N และ HCl 1 N ให้มี pH เป็น 3.2, 3.5, 4.2, 6.5, 7.5 และ 8.5 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเติบโตของเชื้อจากความขุ่นในหลอดอาหาร

4.1.3 การเติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน

โดยนำ *Pediococcus* spp. มา subculture 2 ครั้งก่อนที่จะนำมาเขี่ยลงในอาหารเหลว MRS ที่มีการเติม NaCl ที่ความเข้มข้น 4%, 6.5 %, 8 %,10 %,12,15% และ 18 % และเติม bromocresol purple blue นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนสีของ bromocresol purple blue ในหลอดจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

4.2 การเทียบเคียงชนิดของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้

เทียบเคียงชนิดของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้จากลักษณะการเติบโตที่อุณหภูมิ , pH และความเข้มข้นของเกลือในระดับต่าง ๆ ที่ได้จากการศึกษาข้อ 4.1 และศึกษาการใช้น้ำตาลมอลโตสโดยเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus* spp. ในอาหารเหลว MRS ที่เตรียมโดยใช้น้ำตาลมอลโตสแทนน้ำตาลกลูโคส นำลักษณะที่ได้มาเทียบเคียงชนิดตามลักษณะใน Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Sneath, Mair and Holt, 1986) (ภาคผนวก ข)

4.3 การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอื่น และสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ *Pediococcus* spp. สร้างขึ้น

4.3.1. ทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งบนอาหารแข็ง โดยวิธี agar spot (ดัดแปลงจาก Spelhaug and Harlander,1989)

4.3.1.1. การยับยั้งบนอาหาร MRS agar ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 ในสภาวะที่มีออกซิเจน

โดยนำเชื้อ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.4) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ใช้เชื้อจำนวนประมาณ 10^7 เซลล์ / มิลลิลิตร) ดูดเชื้อมา 5 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารแข็ง MRS โดยแต่ละจานหยดได้มากที่สุด 4 เชื้อ โดยแต่ละเชื้อหยดให้ห่างกัน ประมาณ 3 เซนติเมตร แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้น ราดทับด้วยอาหาร BHI soft agar (0.7% agar) จำนวน 7 มิลลิลิตร ที่มี

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้แก่ *Escherichia coli 0157: H7, Salr*
3230, *Staphylococcus aureus* ATCC 29273 , *Bacillus cer*
ประมาณ10^5 เซลล์ / มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แข็ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ ...
เป็นเวลา 18-20 ชั่วโมง วัดความกว้างของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone)
จากขอบของเชื้อถึงขอบของวงใสด้วย vernier caliper เปรียบเทียบความ
บริเวณยับยั้งของแต่ละเชื้อเพื่อคัดเลือกเชื้อ *Pediococcus* spp. ที่มีความ
การยับยั้งสูง

4.3.1.2 การยับยั้งบนอาหาร MRS agar ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้
ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน

ทำการทดลองในลักษณะเดียวกับข้อ 4.5.1.1. แต่อาหารที่ใช้เป็น M
ปริมาณน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 0.2 เพื่อจำกัดผลการยับยั้งจากกรด และหลั
เชื้อและราดทับด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ บ่มใน anaerobic jar ที่อุ
องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อจำกัดผลการยับยั้งจากไฮโดรเจนเป
แล้ววัดความกว้างของบริเวณยับยั้งเช่นเดียวกัน คัดเลือกเชื้อที่เกิดวงใสไป
ขั้นต่อไป

4.3.2.ทดสอบการสร้างสาร bacteriocin โดยวิธี well diffusion ass
แปลงจาก Schillinger and Lucke,1989)

4 .3.2.1 ทดสอบโดยวิธีการ ปรับ pH และใส่เอนไซม์คะตาเลสใน
ส่วนใส

นำจานอาหาร MRS agar ราดทับด้วย BHI soft agar ปริมาตร 7 มิ
แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้แก่ *Escherichia coli 0157: H7, Salmonella typ*
3230, *Staphylococcus aureus* ATCC 29273 , *Bacillus cereus* AT
จำนวนประมาณ 10^5 เซลล์ / มิลลิลิตร ทิ้งไว้ให้แข็ง เจาะหลุมเป็นวงกลมเส้
กลางขนาด 5 มิลลิเมตร จำนวน 4 หลุมต่อจาน โดยแต่ละหลุมห่าง กัน
เซนตริเมตร ใส่สารละลายส่วนใส (supernatant) ของ *Pediococcus* spp.

ได้ลงไปในหลุม 100 ไมโครลิตร โดยสารละลายส่วนใสเตรียมได้จากการเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus* spp. ในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที แบ่งส่วนใสที่ได้เป็น 2 ส่วน โดยส่วนหนึ่งนำไปปรับ pH เป็น 6.5 ด้วย NaOH 1 N และกำจัดการยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการเติมเอนไซม์คะตาเลส 5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร กรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร อีกส่วนหนึ่งใช้เป็นชุดควบคุม ไม่ต้องปรับ pHหรือใส่สารใด ๆ นำจานที่ใส่สารละลายส่วนใสในหลุมแล้วบ่มที่ อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววัดบริเวณยับยั้ง จำนวน 3 ซ้ำ

4.3.2.2. ทดสอบโดยการใส่เอนไซม์ย่อยโปรตีนลงไปในสารละลายส่วนใส

ทดสอบด้วยวิธี well diffusion assay เช่นเดียวกับข้อ 4.3.2.1. โดยใช้ส่วนใสของ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้ มาผสมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ pepsin protease trypsin ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร กรองด้วยกระดาษกรองขนาด 0.45 ไมโครเมตร นำส่วนใสที่ได้ไปหยดลงในหลุม บ่มไว้และวัดผลเช่นเดียวกับข้อ 4.3.2.1. เปรียบเทียบบริเวณยับยั้งกับชุดควบคุมซึ่งเป็นส่วนใสที่ไม่ได้ผสมกับเอนไซม์ จำนวน 3 ซ้ำ นำค่าเฉลี่ยของบริเวณยับยั้งของสารละลายส่วนใสจากทั้งสองส่วน ไปวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยโดยใช้การทดสอบค่า t (t- test) (ชูศรี วงศ์รัตนะ, 2525 ; กัลยา วานิชย์บัญชา, 2541)

4.3.3. ศึกษาเปอร์เซนต์การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้

ทำการศึกษาเปอร์เซนต์การยับยั้ง ตามวิธีของ Gilliland and Speck, 1977 และ Gonzalez, *at al.*, 1993 โดยการเตรียมเชื้อแบคทีเรีย 4 ชนิด คือ *E. coli* 0157: H7, *S. typhimurium* 3230 , *S. aureus* ATCC 29273 และ *B. cereus* ATCC 11778 ให้มีจำนวนเชื้อ $1x\ 10^{4}$ CFU / ml ในอาหารเหลว MRS และเตรียมเชื้อ Pediococcus ที่คัดเลือกได้ให้มีจำนวนเชื้อประมาณ $1x10^{7}$ CFU / ml ในอาหารเหลว MRS นำเชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2 มิลลิลิตร มาเพาะเลี้ยงรวมกัน ส่วนชุดควบคุมจะไม่มีการเติมเชื้อ Pediococcus โดยทำการทดลองชุดละ 2 ซ้ำ หลังจากบ่มเชื้อไว้

ใน water bath ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง นำชุดทดสอบทั้งหมดมาตรวจนับจำนวนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ด้วยวิธี pour plate ความเจือจางละสองซ้ำ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม ได้แก่ Mac Conkey Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.2) สำหรับ *E. coli* 0157 : H7, Mannitol Salt Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.5) สำหรับ *S. aureus* ATCC 29273 ,Salmonella Shigella Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข1.7) สำหรับ *S. typhimurium* 3230 และ Manitol-Egg-Yolk-polymixin Agar (ภาคผนวก ก หมายเลข 1.6) สำหรับ *B. cereus* ATCC11778 แล้วหาเปอร์เซนต์การยับยั้งโดยใช้สูตรตาม Gilliland and Speck, 1977

$$\% \text{ inhibition} = \frac{100\,(\text{CFU / ml in control} - \text{CFU / ml in assosiative culture})}{\text{CFU / ml in control}}$$

บทที่ 3

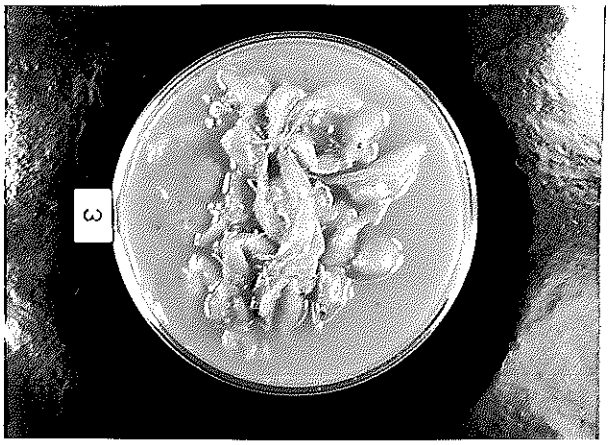
ผลและวิจารณ์

1. การเก็บตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

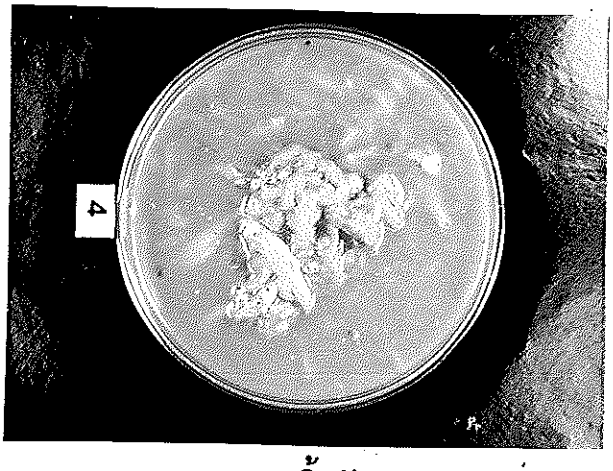
ตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยที่นำมาแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. มีจำนวน 12 ชนิด (ภาพประกอบ 4) แบ่งเป็น อาหารหมักดองจากสัตว์ 7 ชนิด ได้แก่ กุ้งส้ม จิ้งจัง ไตปลา ปลาส้ม ปลาแป้งแดง หนาง หอยดอง และอาหารหมักดองจากพืช 5 ชนิด ได้แก่ ผักเสี้ยนดอง ผักหนามดอง สะตอดอง หน่อถั่วดอง เหรียงดอง ที่ซื้อจากตลาดสดหรือร้านค้าของจังหวัดต่าง ๆ ในภาคใต้ของไทย รวม 192 ตัวอย่าง (ตาราง 4) ซึ่งจำนวนตัวอย่างอาหารหมักที่นำมาทำการวิจัยนี้จะไม่เท่ากัน ในแต่ละจังหวัด ทั้งชนิดและจำนวน ขึ้นอยู่กับอาหารหมักดองของจังหวัดนั้น ๆ มีมากน้อยและแตกต่างกัน ในการศึกษาในครั้งนี้มีจำนวนตัวอย่างไตปลา ผักเสี้ยนดอง และสะตอดองมากที่สุด คือ 48, 34 และ 20 ตัวอย่าง ตามลำดับ และที่น้อยที่สุดคือ หอยดอง และหน่อถั่วดอง มีจำนวนชนิดละ 6 ตัวอย่าง ส่วนบูดู จัดเป็นอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยที่นิยมบริโภคกันในภาคใต้ตอนล่าง แต่ไม่ได้นำมาทำการวิจัยในครั้งนี้ เป็นเพราะได้มีการวิจัยโดยศึกษาจุลชีววิทยาของบูดูและแยกเชื้อจากบูดูแล้ว โดย นางสาวมาลี อมรทิพย์รัตน์ (2522) ซึ่งพบ เชื้อ *Pediococcus halophillus* และเป็นเชื้อที่พบมากในบูดู ถึงร้อยละ 90 เป็นเชื้อที่เติบโตได้ในอาหาร MRS ที่มีการเติมเกลือเพิ่มอย่างน้อยร้อยละ 5 จึงเป็นการซ้ำซ้อนหากนำบูดูมาทำการศึกษาอีก

2. การศึกษาลักษณะทั่วไปของอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

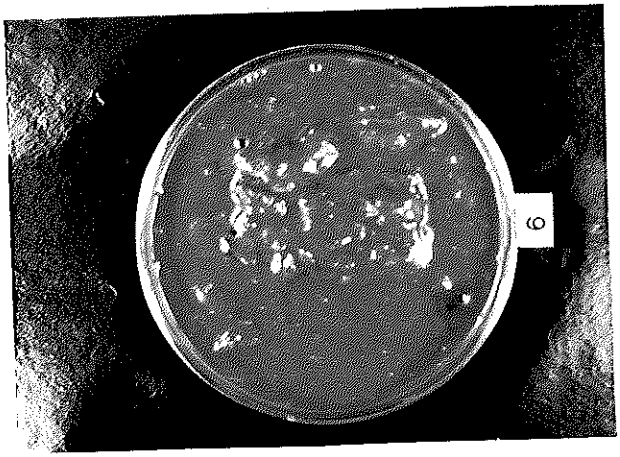
เมื่อนำตัว อย่างอาหารหมักดอง มาทำการศึกษาลักษณะทั่วไป คือสมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยา โดยการวัด pH วิเคราะห์เปอร์เซนต์กรด เปอร์เซนต์เกลือ และตรวจหาจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกของอาหารหมักดองที่นำมาศึกษา ชนิดละ 3 ตัวอย่าง



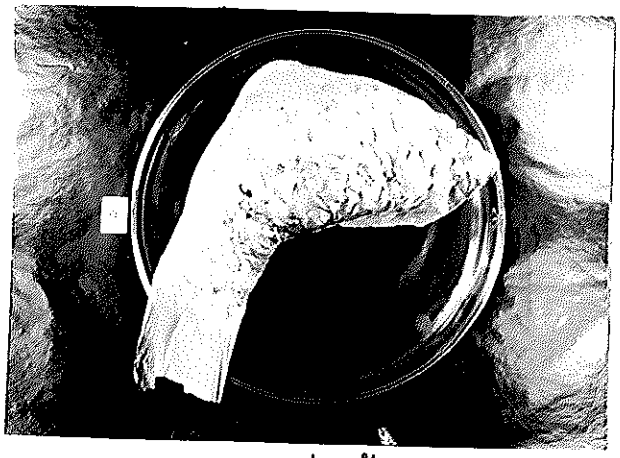
กุ้งส้ม



จิ้งจัง



ไตปลา

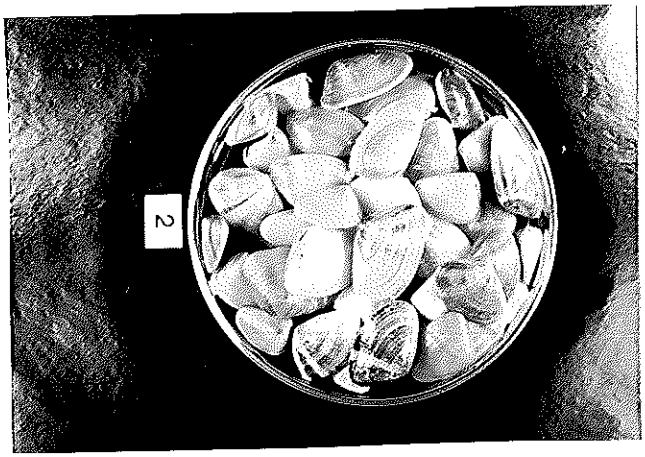


ปลาส้ม

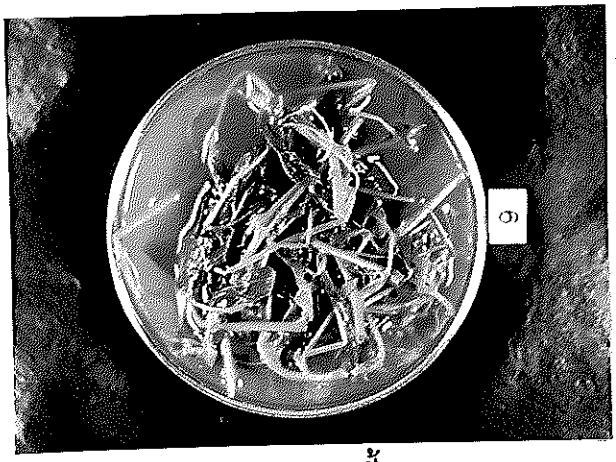
ปลาแป้งแดง

หนาง

ภาพประกอบ 4 อาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยที่นำมาแยกเชื้อ *Pediococcus* spp.

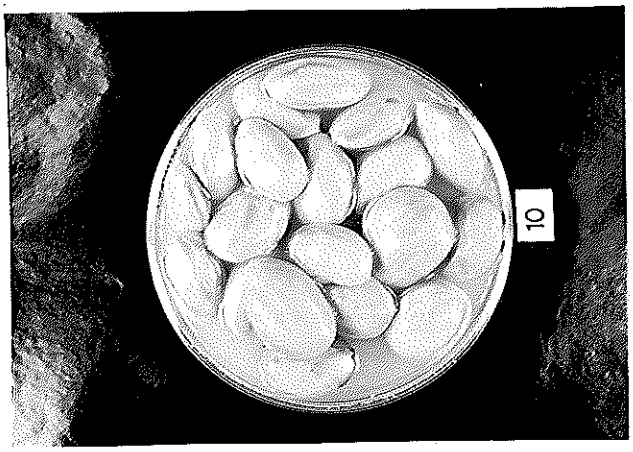


หอยดอง

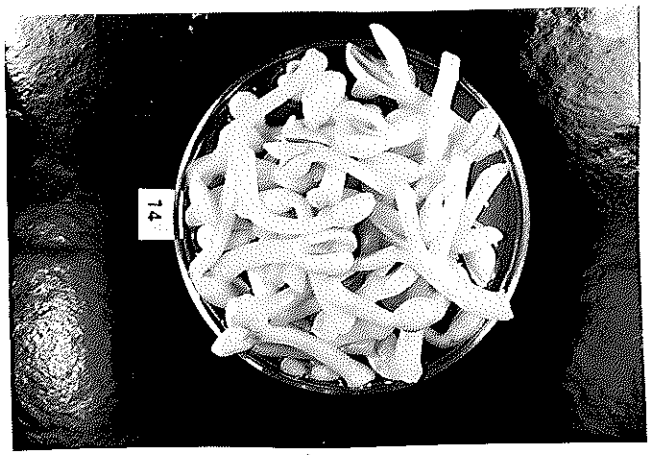


ผักเสี้ยนดอง

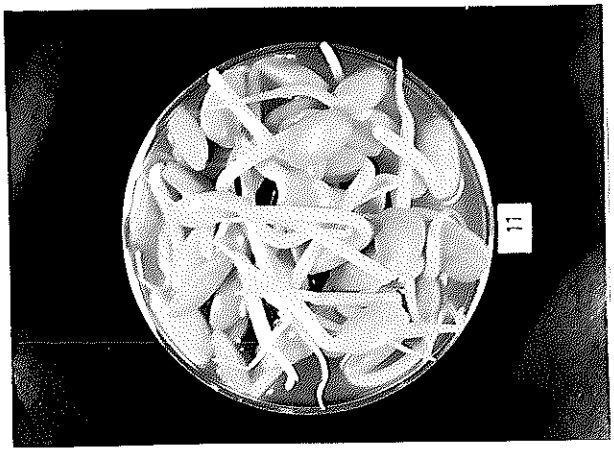
ผักหนามดอง



สะตอดอง



หน่อถั่วดอง



เหรียงดอง

ภาพประกอบ 4 (ต่อ)

ตาราง 4 ชนิดและจำนวนอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยที่นำมาแยกเชื้อ *Pediococcus spp.*

ชนิดของอาหารหมักดอง	จำนวนตัวอย่างในแต่ละจังหวัด														
	ปัตตานี	ยะลา	นราธิวาส	สงขลา	พัทลุง	ตรัง	กระบี่	พังงา	ภูเก็ต	ระนอง	ชุมพร	สุราษฎร์ธานี	นครศรีธรรมราช	รวม
อาหารหมักดองจากสัตว์														
กุ้งส้ม	1		1				2				4	2	3	13
จิ้งจัง							4	1			4			9
ไตปลา		3	5	5	2		4	3	2	3	10	6	5	48
ปลาแป้งแดง	2			2	2		2				4	2	1	15
ปลาส้ม	1				2	2	1		3				1	10
หนาง			3	3	2	1	1		2				1	13
หอยดอง					1						2		3	6
อาหารหมักดองจากพืช														
ผักเสี้ยนดอง	4	2	5	1	2	5	1	3	1			2	2	6	34
ผักหนามดอง		2					3		2					1	8
สะตอดอง	1	3		3	2	1	1	3		2		2		2	20
หน่อถั่ว							2		4						6
เหรียงดอง		2					2							6	10
	9	12	13	15	13	9	13	16	16	4	3	28	12	29	192

พบว่า pH ของอาหารหมักดอง อยู่ในช่วง 3.36 - 5.54 (ตาราง 5) โดย pH ของอาหารหมักดองจากสัตว์ อยู่ในช่วง 3.96 – 5.54 และ pH ของอาหารหมักดองจากพืชอยู่ในช่วง 3.36 – 3.84 ซึ่งเห็นได้ว่ามีค่า pH ของอาหารหมักดองจากพืชน้อยกว่าและไม่แตกต่างกันมากนักเมื่อเทียบกับอาหารหมักดองจากสัตว์ เมื่อนำมาวิเคราะห์ปริมาณร้อยละของกรดทั้งหมดในรูปกรดแลกติก ในตัวอย่างอาหารหมักดองอยู่ในช่วง 0.43 - 1.95 โดยเปอร์เซนต์กรดของอาหารหมักดองจากสัตว์ อยู่ในช่วง 1.27 – 1.95 ส่วนเปอร์เซนต์กรดของอาหารหมักดองจากพืช อยู่ในช่วง 0.43 - 1.16 ซึ่งน้อยกว่าอาหารหมักดองจากสัตว์ อาจเป็นเพราะอาหารหมักดองจากสัตว์มีสมบัติในการเป็นบัฟเฟอร์ที่ดีกว่า เมื่อนำมาวิเคราะห์ร้อยละของเกลือในอาหารหมักดองอยู่ระหว่าง 1.61- 12.77 อาหารหมักดองจากสัตว์มีเปอร์เซนต์เกลืออยู่ในช่วง 1.90- 12. 77 สูงที่สุดคือ ไตปลา และต่ำสุดคือ หนาง ส่วนอาหารหมักดองจากพืชจะมีเปอร์เซนต์เกลือน้อยกว่า อยู่ในช่วง 1.61 – 2.86 สูงที่สุดคือ หน่อถั่วดอง ต่ำสุดคือ เหรียงดองและสะตอดอง และ เมื่อนำอาหารหมักดองตัวอย่างมาตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก โดยวิธี plate count technique บนจานอาหาร MRS ที่มีการเติมโซเดียมเอไซด์(NaN_3) เพื่อยับยั้งการเติบโตของยีสต์ พบว่า มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง$1.48 \times 10^4 - 9.3 \times 10^7$ CFU / g พบน้อยที่สุดในไตปลา อาจเป็นเพราะในไตปลามีเปอร์เซนต์เกลือค่อนข้างสูง (ร้อยละ 12.77) ซึ่งไม่เหมาะต่อการเติบโตของแบคทีเรียแลกติก ส่วนจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติกของอาหารหมักดองชนิดอื่น ไม่แตกต่างกันมากนัก ลักษณะทั่วไปของอาหารหมักดองที่ศึกษาได้นี้เป็นอาหารหมักดองที่หมักเสร็จสิ้นแล้วและจำหน่ายในท้องตลาด ซึ่งไม่ทราบอายุการหมักที่แท้จริง

3. การแยกเชื้อ *Pedococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

ในการแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. จะศึกษาและทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส การสร้างก๊าซจากกลูโคส ความไวต่อยาปฏิชีวนะ Vancomycin และการย้อมสีแกรม ซึ่ง *Pediococcus* spp.จะไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส หมักน้ำตาลกลูโคสเกิดกรดแต่ไม่ให้ก๊าซ ดื้อต่อยาปฏิชีวนะ Vancomycin (ภาพประกอบ 5)

และย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างของเซลล์เป็นรูปกลม มีการจัดเรียงเซลล์เป็นสี่เซลล์ติดกัน (tetrad) (ภาพประกอบ 6)

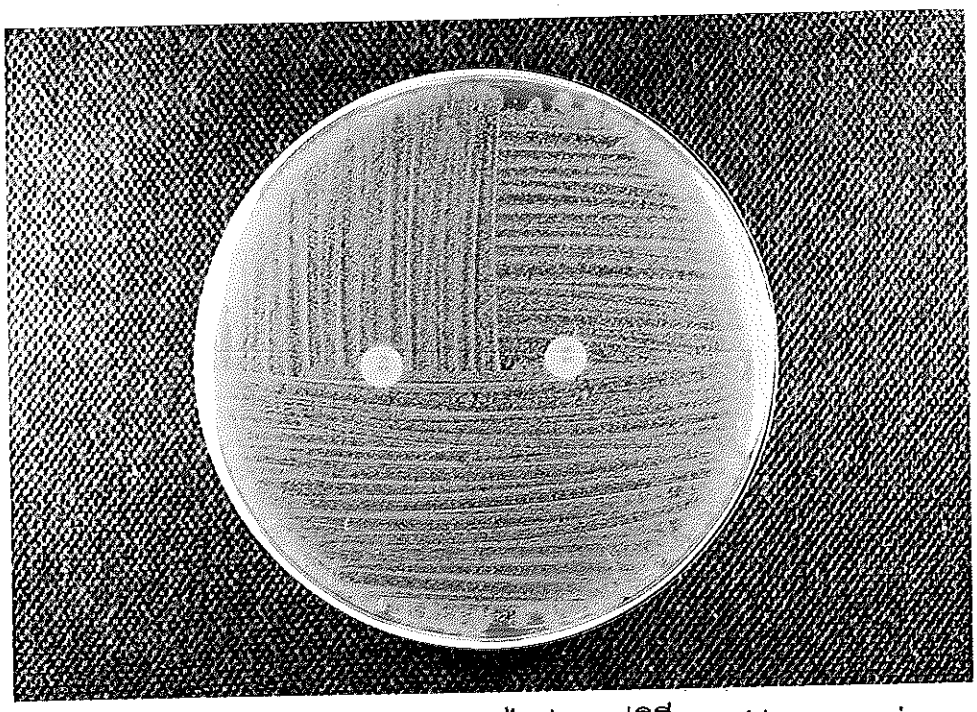
จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักจำนวน 12 ชนิด รวม 192 ตัวอย่าง สามารถแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. ได้ 43 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 18.23 (ตาราง 6) พบว่า *Pediococcus* spp.ที่แยกได้จากอาหารหมักดองจากสัตว์ จำนวน 114 ตัวอย่าง ได้ 31 ไอโซเลต จากจำนวนตัวอย่างอาหารหมัก 23 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 20.17 ของตัวอย่างที่พบเชื้อ และที่แยกได้จากอาหารหมักดองจากพืช จำนวน 78 ตัวอย่าง ได้ 12 ไอโซเลต จากจำนวนอาหารหมัก 12 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 15.38 ของตัวอย่างที่พบเชื้อ สำหรับตัวอย่างอาหารหมักที่ไม่สามารถตรวจพบเชื้อ *Pediococcus* spp. มี 5 ชนิด ได้แก่ ปลาแป้งแดง หนาง ผักหนามดอง สะตอดอง และหน่อถั่วดอง อาจเป็นเพราะในขั้นตอนการหมักอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย เป็นการหมักดองที่อาศัยเชื้อตามธรรมชาติ โดยเชื้อที่ทำให้เกิดกระบวนการหมัก เป็นเชื้อที่มีในสิ่งแวดล้อมนั้น ๆ จึงอาจไม่พบเชื้อ *Pediococcus* spp. แต่จะมีแบคทีเรียแลกติกชนิดอื่น ๆ หรือยีสต์ โดยเฉพาะในปลาแป้งแดง จะพบยีสต์จำนวนมาก อาจเป็นเพราะในปลาแป้งแดง มีร้อยละของเกลือน้อยและมีแป้งเป็นส่วนประกอบ ซึ่งเหมาะแก่การเติบโตของยีสต์ สอดคล้องกับงานวิจัยการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่สามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของ ศิรินาถ หนูเอก (2540) พบว่า ในปลาแป้งแดง นมเปรี้ยว และ โยเกิร์ต อาจเป็นเพราะผลิตภัณฑ์มีอายุการหมักนาน ทำให้ตรวจไม่พบแบคทีเรียแลกติก แต่จะพบยีสต์แทน โดยเฉพาะปลาแป้งแดง ตรวจพบยีสต์จำนวนมากขึ้น เนื่องจากมีแป้งและข้าวหมากในส่วนผสม

นอกจากนี้ จากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่พบในอาหารหมักดองโดยทั่วไปเป็นพวก *Lactobacillus* spp. มากกว่า *Pediococcus* spp. ดังรายงานของของ Santos, *et al.*, (1997) ได้คัดเลือกและศึกษาลักษณะของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้านของสเปน ซึ่งแยกได้ 516 สายพันธุ์ แบ่งเป็น *L. sake* 335 สายพันธุ์ (68.8 %) , *L. curvatus* 85 สายพันธุ์ (16.5 %) และมี*Pediococcus* spp เพียง 32 สายพันธุ์ (6.2 %) และจากการรายงานของ

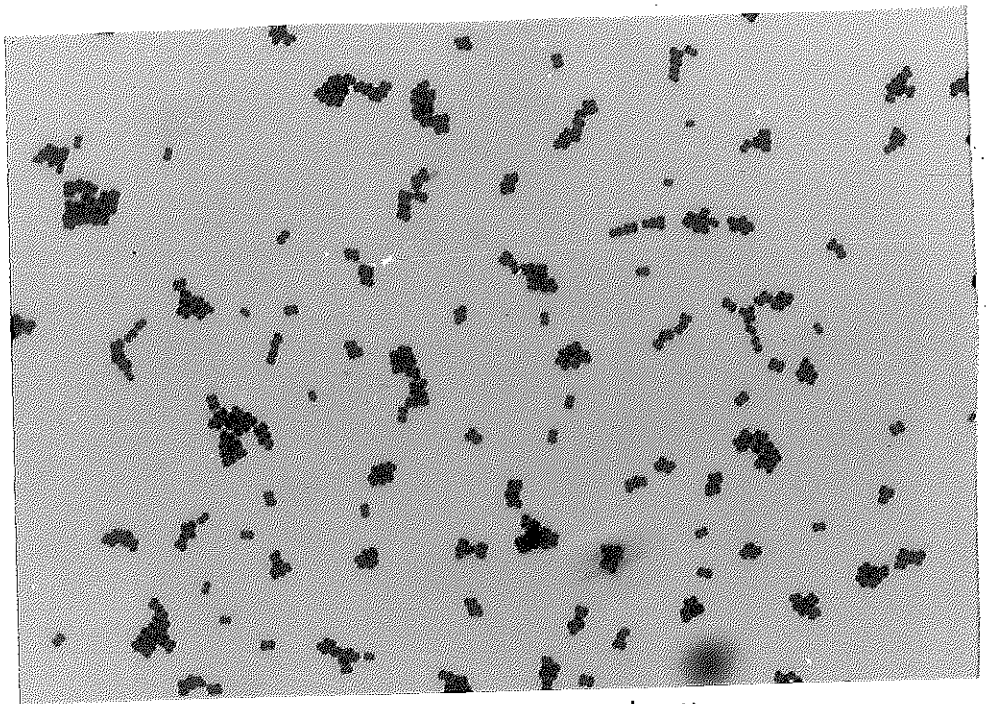
ตาราง 5 สมบัติทางเคมีและจุลชีววิทยาของอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

อาหารหมักดอง	pH	เปอร์เซ็นต์กรด	เปอร์เซ็นต์เกลือ	จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก (CFU / g)
อาหารหมักดองจากสัตว์				
กุ้งส้ม	4.22	1.58	3.13	1.3×10^5
จิ้งจัง	5.02	1.28	10.90	4.7×10^5
ไตปลา	5.54	1.27	12.77	1.48×10^4
ปลาแป้งแดง	3.96	1.42	3.89	4.0×10^6
ปลาส้ม	4.90	1.44	5.18	7.5×10^7
หนาง	3.99	1.41	1.90	9.3×10^7
หอยดอง	4.34	1.95	6.85	5.1×10^7
อาหารหมักดองจากพืช				
ผักเสี้ยนดอง	3.84	0.88	1.85	4.3×10^6
ผักหนามดอง	3.55	1.16	2.23	5.3×10^5
สะตอดอง	3.74	0.69	1.61	5.6×10^5
หน่อถั่ว	3.36	0.76	2.86	8.5×10^7
เหรียงดอง	3.59	0.43	1.61	1.6×10^6

หมายเหตุ : ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากอาหารหมักดองจำนวน 3 ตัวอย่าง



ภาพประกอบ 5 การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ Vancomycin ของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้



ภาพประกอบ 6 รูปร่างของเซลล์และการจัดเรียงตัวของ *Pedioccoccus* spp. เมื่อย้อมสีแกรม

Tamang and Sarkar (1996) ได้ศึกษาจุลชีววิทยาของหน่อไม้ดอง ได้แยกแบคทีเรียแลกติกจากหน่อไม้ดอง 30 ตัวอย่าง ได้ 327 สายพันธุ์ โดยส่วนมากจะเป็น *Lactobacillus plantarum* และ *L. brevis* ส่วน *P. pentosaceus* แยกได้น้อยมาก และจากรายงานการศึกษา ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากแหล่งธรรมชาติของ Sarkar, Sharmintha and Banerjee (1996) พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ จากผัก, เนื้อและปลาที่เน่าเสียตามตลาดในท้องถิ่นของประเทศอินเดีย 171 ไอโซเลต เป็น Lactobacillus 106 ไอโซเลต Lactococcus 53 ไอโซเลต ส่วน Leuconostoc และ Pediococcus แยกได้เพียงอย่างละ 6 ไอโซเลต และจากรายงานของ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2542) ซึ่งสามารถแยกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ 329 ตัวอย่าง ได้ 212 ไอโซเลต จัดอยู่ในสกุล Lactobacillus 198 ไอโซเลต และ Pediococcus เพียง 14 ไอโซเลต

4. การศึกษาลักษณะของเชื้อ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้

4.1 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เมื่อนำ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ทั้ง 43 ไอโซเลต มาทำการ ศึกษาลักษณะการเติบโตที่อุณหภูมิต่าง ๆ การเติบโตที่อาหารเหลว MRS ที่มี pH ต่าง ๆ และการเติบโตในอาหารเหลว MRS มีเติมเกลือความเข้มข้นต่างๆ พบว่าการเติบโตของเชื้อ *Pediococcus* spp. ทุกไอโซเลตจะเติบโตที่อุณหภูมิ 25 - 40 องศาเซลเซียส (ตาราง 7) ซึ่ง *Pediococcus* spp. จะเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 32.2 องศาเซลเซียส และสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 26.7 - 43 องศาเซลเซียส (Gilliland, 1985) และพบว่า *Pediococcus* spp อีก 27 ไอโซเลต ที่สามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส การเติบโตในอาหารที่มี pHแตกต่างกัน ระหว่าง 3.2 - 8.5 พบว่า *Pediococcus* spp. ที่แยกได้สามารถเติบโตได้ในอาหาร MRS ที่มี pH 4.2 - 8.5 ทุกไอโซเลต ยกเว้นไอโซเลตเดียวที่ไม่สามารถเติบโตได้ คือ P7 ซึ่งแยกได้จากไตปลา ที่ไม่สามารถเติบโตที่อาหาร pH 4.2 ได้ ส่วนที่ pH 3.5 มีเพียง 5 ไอโซเลต คือ P3 , P7, P8, P35, P 41 ที่ไม่สามารถเติบโตได้ ซึ่งจะเป็นเชื้อที่แยกได้จากไตปลา และจิ้งจัง ซึ่งจากการศึกษาสมบัติทางชีวเคมีจะเห็นว่าอาหารหมักดองทั้งสอง มี pH 5.54 ซึ่งเป็น pH

ที่สูงที่สุดของอาหารหมักดองที่นำมาศึกษา และรองลงมาคือ จิ้งจัง ซึ่งมี pH 5.02 จึงอาจเป็นสาเหตุให้เชื้อที่แยกได้จากไตปลาและจิ้งจัง ไม่สามารถเติบโตได้ในอาหารเหลว MRS ที่มี pH 3.5 และ 3.2 ได้

ส่วนการเติบโตที่อาหารมีเกลือร้อยละ 4 - 18 พบว่า เชื้อ *Pediococcus* spp. ทุกไอโซเลต สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีการเติมเกลือร้อยละ 4 - 8 แต่ที่อาหารมีเกลือร้อยละ 10- 12 มีเชื้อ *Pediococcus* spp สามารถเติบโตได้ 25 และ 19 ไอโซเลตตามลำดับ ซึ่งส่วนมากจะเป็นเชื้อที่แยกได้จากไตปลาและจิ้งจัง ที่มีเปอร์เซนต์เกลือสูง คือ 12.77 และ 10.9 ตามลำดับ แต่ในอาหารที่มีเกลือร้อยละ 15 – 18 ไม่มีเชื้อ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ไม่สามารถเติบโตได้ และเมื่อศึกษาถึงการหมักน้ำตาลมอลโตส *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ 43 ไอโซเลต ไม่สามารถหมักน้ำตาลมอลโตสได้ 28 ไอโซเลต และสามารถหมักน้ำตาลมอลโตสได้ 15 ไอโซเลต ซึ่งจากผลการศึกษาสังเกตได้ว่า เชื้อ *Pediococcus* spp. ที่สามารถหมักน้ำตาลมอลโตสได้จะสามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ซึ่งข้อมูลที่ได้จะใช้ประโยชน์ในการเทียบเคียงชนิดของ *Pediococcus* spp. ต่อไป

4.2 การเทียบเคียงชนิด *Pediococcus* spp.

เมื่อนำลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่ศึกษาได้ มาใช้ในการเทียบเคียงชนิดของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ ตามลักษณะใน Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (ภาคผนวก ข) พบว่า *Pediococcus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย 43 ไอโซเลต ประกอบด้วย *Pediococcus acidilactici* 28 สายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* 14 สายพันธุ์ และ *Pediococcus urinae-equi* 1 สายพันธุ์ (ตาราง 8) ซึ่ง *Pediococcus acidilactici* จะเติบโตได้ที่ 50 องศาเซลเซียส แต่จะไม่หมักน้ำตาลมอลโตส ส่วน *Pediococcus pentosaceus* จะทนต่อความร้อนได้น้อยกว่า *Pediococcus acidilactici* แต่สามารถหมักน้ำตาลมอลโตสได้ ส่วนลักษณะของ *Pediococcus urinae-equi* คล้ายกับ *Pediococcus pentosaceus* คือไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส แต่ต่างต่างกันตรง *Pediococcus urinae-equi* ไม่สามารถเติบโต

ตาราง 7 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

รหัสเชื้อ	การเติบโตที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)				การเติบโตที่อาหาร pH					การเติบโตที่อาหารมีเกลือ (%)							การหมักน้ำตาลมอลโตส
	25	35	40	50	3.2	3.5	4.2	7.5	8.5	4	6.5	8	10	12	15	18	
P1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P2	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P3	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
P4	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
P5	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P6	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P7	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
P8	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
P9	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P10	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
P11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P12	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P13	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P14	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P16	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
P17	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P18	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P19	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
P20	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+

ตาราง 7 (ต่อ)

ลำดับเชื้อ	การเติบโตที่อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)				การเติบโตที่อาหาร pH					การเติบโตที่อาหารมีเกลือ (%)							การหมักน้ำตาลมอลโตส
	25	35	40	50	3.2	3.5	4.2	7.5	8.5	4	6.5	8	10	12	15	18	
P21	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
P22	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
P23	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
P24	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
P25	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P26	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P27	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P28	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P29	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
P30	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
P31	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P32	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+
P33	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P34	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P35	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P36	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P37	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P38	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
P39	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
P40	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
P41	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
P42	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
P43	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

ตาราง 8 ผลการเทียบเคียงชนิด *Pediococcus spp* .ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย

อาหารหมักดอง	ชนิดของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้		
	P. acidilactici	*P. pentosaceus*	*P. urinae-equi*
อาหารหมักดองจากสัตว์			
กุ้งส้ม	2 (P1,P2)	-	-
จิ้งจัง	5(P3,P5,P6,P34,P35)	1(P4)	-
ไตปลา	5(P9,P31,P33,P38, P43)	3(P8,P10,P32)	1(P7)
ปลาส้ม	8(P11,P12,P13,P14, P15,P16,P17,P18)	-	-
หอยดอง	6(P25,P26,P27,P28, P39,P40)		-
อาหารหมักดองจากพืช			
ผักเสี้ยนดอง	1(P37)	8(P19,P20,P21,P22, P23,P24,P41,P42)	-
เหรียงดอง	1(P36)	2(P29,P30)	-
รวม	28	14	1

ได้ที่ pH 4.2 และพบว่าทั้ง *Pediococcus acidilactici* และ *Pediococcus pentosaceus* สามารถแยกได้จากอาหารหมักดองจากสัตว์และพืช ซึ่ง Garvie, 1986 กล่าวว่า *Pediococcus acidilactici* และ *Pediococcus pentosaceus* เป็นเชื้อที่อยู่ตามธรรมชาติ ในผัก เมล็ดพืช และผลิตภัณฑ์นม ซึ่งมีส่วนในการควบคุมการหมักดองผักและเนื้อโดยธรรมชาติ ส่วนรายงานการแยกเชื้อ *Pediococcus urinae-equi* มีน้อยมาก เคยมีรายงาน การแยกได้จากน้ำปัสสาวะของม้า, มูลกระต่าย และผักกาดดองของไทย (Tanasupawat and Daengsubha,1989 quoted in Simson and Haguchi, 1995) นอกจากนี้ รายงานการวิจัยของ ทองคำ คิมหะมานนท์ (2538) ที่ศึกษาเกี่ยวกับ การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตปลาหมัก (ส้มฟัก) พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ 13 ชนิด โดยส่วนใหญ่เป็น Pediococcus และ Lactobacillus ซึ่ง *P. urinae-equi* และ *P. dextrinicus* พบตลอดช่วงของการหมัก

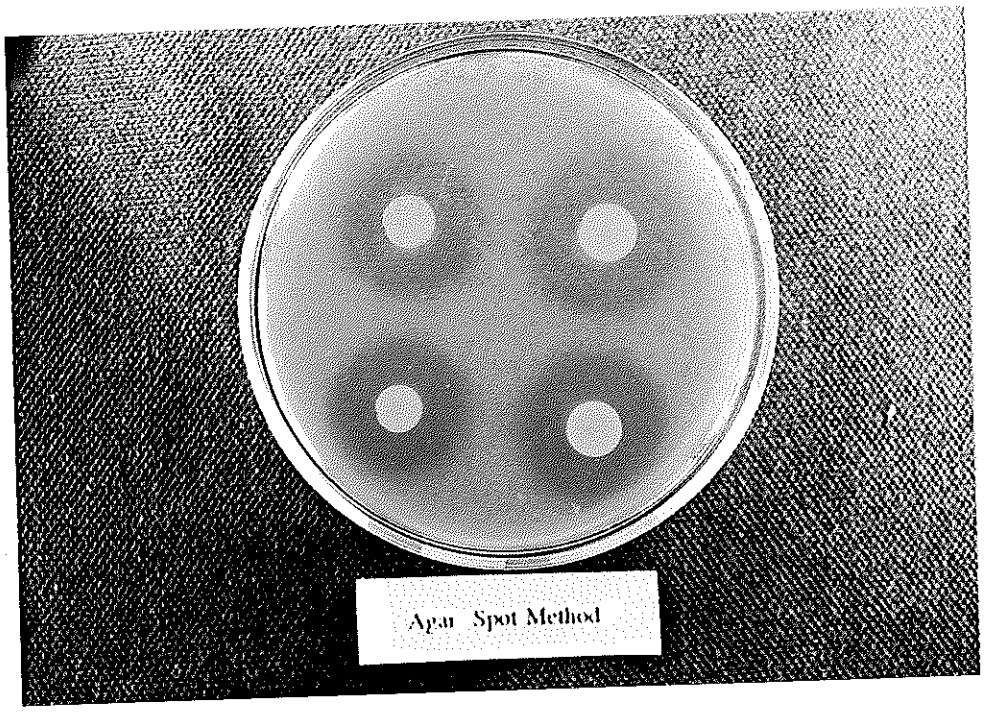
4.3 การสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นและสมบัติบางประการของสารยับยั้งที่ *Pediococcus* spp.สร้างขึ้น

4.3.1 การทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งบนอาหารแข็ง โดยวิธี agar spot (ดัดแปลงจาก Spelhaug and Harlander ,1989)

นำเชื้อ *Pediococcus* spp. ที่เทียบเคียงทั้ง 43 ไอโซเลต มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอื่นโดยวิธี agar spot (ภาพประกอบ 7) โดยนำเชื้อที่แยกได้มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ดูดเชื้อมา 5 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วราดทับด้วย BHI soft agar ที่มีแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Bacillus cereus* ATCC 11778 , *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* 3230 และ *Staphylococcus aureus* ATCC 29273 อยู่ประมาณ 10^5 cell / ml บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 - 20 ชั่วโมง นำมาวัดความกว้างของวงใส พบว่า *Pediococcus* s สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิด (ตาราง 9) โดยสามารถยับยั้ง *S. areus* ATCC 29273 ได้ดีที่สุด และสามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 ได้ดีกว่า

S. typhimurium 3230 และ *E. coli* 0157: H7 คือมี Pediococcus ถึง 32 ไอโซเลต ที่สามารถยับยั้ง *S. areus* ATCC 29273 โดยมีวงใสการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร และพบว่า *P. pentosaceus* (P23) สามารถยับยั้งเชื้อ *S. areus* ATCC 29273 ได้สูงที่สุด คือมีวงใสการยับยั้ง 16 มิลลิเมตร และมี Pediococcus 5 ไอโซเลต คือ P31, P33, P34, P36 และ P38 ที่สามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC11778 ได้สูง โดยมีวงใสการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร และพบว่า *Pediococcus acidilactici* (P34) สามารถยับยั้งเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 ได้สูงที่สุด คือมีวงใสการยับยั้ง 12.25 มิลลิเมตร ในขณะที่ไม่มี Pediococcus ไอโซเลตใดสามารถยับยั้ง *S. typhimurium* 3230 และ *E. coli* 0157: H7 โดยมีวงใสการยับยั้งมากกว่า 10 มิลลิเมตร มี Pediococcus ที่สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* 3230 และ *E. coli* 0157: H7 ได้สูงสุด คือ P39 และ P41 โดยมีวงใสการยับยั้งเป็น 8.5 และ 8.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ จากผลการทดลองจะสังเกตเห็นว่า Pediococcus สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ สอดคล้องกับผลงานของ ทองคำ คิมหะมานนท์ (2538) พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากปลาหมัก (ส้มฟัก) ทั้ง 8 ชนิด ยับยั้งการเจริญของเชื้อ *S. aureus* ได้ดี ส่วน *V. parahaemolyticus* , *Salmonella* sp. และ *E. coli* ถูกยับยั้งได้เล็กน้อย และจากผลการทดลองของ Fleming, *et al.*, (1975) พบว่า *Pediococcus* spp. 16 สายพันธุ์ที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ เมื่อทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอื่นโดยวิธี agar spot test ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกทั่วไป แต่มี 4 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ได้

การที่ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ทุกไอโซเลต แสดงผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 4 ชนิดนั้น เนื่องจาก การทดสอบการยับยั้งในขั้นตอนนี้ เอื้ออำนวยต่อการสร้างสารยับยั้งทุกประเภท เช่น กรดอินทรีย์ , ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และสารอื่น ๆ ซึ่งผลการทดลอง สอดคล้องกับรายงานของ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2542) ถึงฤทธิ์ต้านแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ พบว่าเมื่อทำการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด คือ *B. cereus* ATCC 11778,



ภาพประกอบ 7 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ โดยวิธี agar spot

ตาราง 9 การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้โดยวิธี agar spot

รหัสเชื้อ	เชื้อ	Inhibition Zone (m.m.)[a]							
		อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน
		B. cereus ATCC11778		*S. aureus ATCC 29273*		*E. coli 0157 : H7*		*S. typhimurium 3230*	
P1	*P. acidilactici*	6.40	0.00	13.00	2.50	6.25	0.00	5.60	0.00
P2	*P. acidilactici*	6.30	0.00	10.90	1.50	4.90	0.00	5.25	0.00
P3	*P. acidilactici*	6.40	0.00	10.70	1.00	7.50	0.00	6.50	0.00
P4	*P. pentosaceus*	8.75	1.00	10.40	1.00	6.75	0.00	6.90	0.00
P5	*P. acidilactici*	6.40	0.00	10.40	1.00	6.00	0.00	6.10	0.00
P6	*P. acidilactici*	6.20	0.00	12.00	1.00	5.60	0.00	5.40	0.00
P7	*P. urinaeequi*	4.03	0.00	6.40	0.00	3.70	0.00	3.25	0.00
P8	*P. pentosaceus*	4.25	0.00	8.10	0.00	3.25	0.00	2.90	0.00
P9	*P. acidilactici*	6.00	0.00	11.50	2.00	5.10	0.00	6.50	0.00
P10	*P. pentosaceus*	6.40	0.00	9.50	0.00	6.25	0.00	5.60	0.00
P11	*P. acidilactici*	5.70	0,00	11.75	2.00	5.60	0.00	6.00	0.00
P12	*P. acidilactici*	6.50	0.00	9.50	0.00	5.55	0.00	5.55	0.00
P13	*P. acidilactici*	6.00	0.00	10.10	1.00	5.60	0.00	5.57	0.00
P14	*P. acidilactici*	6.25	0.00	10.40	1.00	6.10	0.00	5.50	0.00
P15	*P. acidilactici*	6.25	0.00	10.60	1.50	6.30	0.00	4.50	0.00
P16	*P. acidilactici*	7.25	0.00	10.10	1.00	6.50	0.00	6.10	0.00
P17	*P. acidilactici*	6.90	0.00	9.90	0.00	5.90	0.00	5.25	0.00
P18	*P. acidilactici*	5.70	0.00	10.30	1.00	5.90	0.00	4.90	0.00
P19	*P. pentosaceus*	6.90	0.00	11.40	2.00	6.10	0.00	5.60	0.00
P20	*P. pentosaceus*	7.40	0.00	11.00	1.00	5.50	0.00	5.90	0.00

ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อ	Inhibition Zone (m.m.)[a]							
		อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน
		B. cereus ATCC11778		*S. aureus ATCC 29273*		*E. coli 0157 : H7*		*S. typhimurium 3230*	
P21	*P. pentosaceus*	5.90	0.00	11.50	0.00	5.40	0.00	5.30	0.00
P22	*P. pentosaceus*	7.60	0.00	11.90	2.20	6.50	0.00	4.60	0.00
P23	*P. pentosaceus*	6.40	0.00	16.00	2.75	6.70	0.00	6.40	0.00
P24	*P. pentosaceus*	6.90	0.00	13.50	2.20	6.90	0.00	5.50	0.00
P25	*P. acidilactici*	6.30	0.00	8.40	0.00	5.00	0.00	5.40	0.00
P26	*P. acidilactici*	6.90	0.00	11.25	2.00	5.40	0.00	4.90	0.00
P27	*P. acidilactici*	6.25	0.00	10.20	1.00	5.25	0.00	4.10	0.00
P28	*P. acidilactici*	6.10	0.00	12.50	2.50	4.00	0.00	3.40	0.00
P29	*P. acidilactici*	6.75	0.00	12.10	2.00	6.90	0.00	5.75	0.00
P30	*P. pentosaceus*	7.10	0.00	11.00	1.50	7.10	0.00	5.90	0.00
P31	*P. acidilactici*	11.30	1.50	10.75	1.20	6.50	0.00	5.75	0.00
P32	*P. pentosaceus*	7.80	0.00	9.75	0.75	4.25	0.00	3.80	0.00
P33	*P. acidilactici*	11.50	2.00	9.50	1.00	6.60	0.00	6.25	0.00
P34	*P. acidilactici*	12.25	2.50	11.00	1.20	6.75	0.00	7.50	0.00
P35	*P. acidilactici*	9.80	0.00	11.25	1.00	5.75	0.00	6.50	0.00
P36	*P. acidilactici*	10.60	1.20	14.00	1.25	7.50	0.00	6.25	0.00
P37	*P. acidilactici*	9.25	1.00	10.75	0.75	6.75	0.00	5.80	0.00
P38	*P. acidilactici*	11.60	2.00	12.60	1.75	6.75	0.00	6.80	0.00
P39	*P. acidilactici*	6.00	1.50	9.00	0.00	7.50	0.00	8.50	1.50
P40	*P. acidilactici*	7.00	0.00	9.00	0.00	7.75	0.00	8.00	1.00

ตาราง 9 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อ	Inhibition Zone (m.m.)[a]							
		อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่ไม่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน	อาหารเหลว MRS 0.2% กลูโคส สภาวะที่มีออกซิเจน
		B. cereus ATCC11778		*S. aureus ATCC 29273*		*E. coli 0157 : H7*		*S. typhimurium 3230*	
P41	*P. pentosaceus*	6.00	0.00	9.00	0.00	8.30	0.00	7.75	0.00
P42	*P. pentosaceus*	7.00	0.00	11.00	1.00	7.60	0.00	7.25	0.00
P43	*P. acidilactici*	9.10	0.00	11.25	1.50	6.25	0.00	6.50	0.00

a : วัดระยะจากขอบเชื้อที่ spot จนถึงขอบของวงใสการยับยั้ง

S. aureus ATCC25923 , *E. coli* ATCC 25922 และ *S. typhimurium* 3230 โดยวิธี agar spot โดยใช้อาหารแข็ง MRS และ สภาพที่มีออกซิเจน พบว่า แบคทีเรียแลกติกทั้ง 193 ไอโซเลต สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ทั้ง 4 ชนิด และจากรายงานของ อรัญญา สังขศรี (2542) เกี่ยวกับการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นเมืองของไทย ทั้งหมด 88 สายพันธุ์ เมื่อนำมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน 12 สายพันธุ์ โดยวิธี agar spot พบว่า *Lactobacillus* spp. ทุก ๆ สายพันธุ์ สามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหาร และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานได้

แต่เมื่อนำ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ทั้ง 43 ไอโซเลต มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ด้วยวิธีเดียวกัน แต่เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 0.2 เพื่อจำกัดผลที่เกิดจากกรดแลกติก และบ่มในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เพื่อจำกัดผลที่เกิดจาก ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าไม่มี *Pediococcus* spp. สายพันธุ์ใดที่แสดงผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้ง 4 ชนิด และไม่มีไอโซเลตใดที่แสดงผลการยับยั้ง *E. coli* O157 : H7 มี *Pediococcus* spp. 33 ไอโซเลต ที่แสดงผลการยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29273 , 8 ไอโซเลต แสดงผลการยับยั้ง *B. cereus* ATCC 1177 และ 2 ไอโซเลต แสดงผลการยับยั้ง *S. typhimurium* 3230 แต่ขนาดของวงใสการยับยั้ง มีขนาดเล็กกว่าการทดสอบในครั้งแรกมากคือมีวงใสการยับยั้งสูงสุดเพียง 2.75 มิลลิเมตร โดย *P. pentosaceus* (P23) ในขณะที่การทดสอบครั้งแรกมีขนาดวงใสการยับยั้งสูงสุดถึง 16 มิลลิเมตร โดย *P. pentosaceus* (P23) เช่นเดียวกัน ซึ่งแตกต่างกันมาก ทั้งนี้อาจเป็นเพราะการทดสอบการยับยั้งในขั้นตอนนี้ ได้จำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรด และ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงให้เห็นว่า สารยับยั้งที่ *Pediococcus* spp. ที่แยกได้เป็นสารประเภทกรดอินทรีย์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ให้ผลเช่นเดียวกับการรายงานการวิจัยของ อรัญญา สังขศรี (2542) ที่ทดสอบความสามารถในการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ Lactobacillus 16 สายพันธุ์ที่คัดเลือกได้โดยวิธี agar spot ในสภาพที่จำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์ โดยใช้อาหารเหลว MRS ที่ลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสเหลือร้อยละ 0.2

และจำกัดสารยับยั้งที่เกิดจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยการบ่
ออกซิเจน เมื่อพิจารณา Lactobacillus ทั้ง 16 สายพันธุ์ พบว่า ขอบวงใสที่เกิดขึน
ขนาดเล็กกว่าการยับยั้งที่ทดสอบ ในสภาพที่ไม่จำกัดกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออ
มาก คือมีขนาดวงใสการยับยั้ง ไม่เกิน 5.23 มิลลิเมตร และจากการวิจัย
วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2542) พบว่า แบคทีเรียแลกติก 193 ไอโซเลต สาม
ยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ทั้ง 4 ชนิดได้ แต่เมื่อทำการทดสอบเช่นเดียวกันในส
จำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์ และจำกัดผลการยับยั้ง
ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่า มีแบคทีเรียแลกติกเพียง 10 ไอโซเลตเท่านั้น ที่แ
ผลการยับยั้งซึ่งวัดวงใสการยับยั้งได้สูงสุดเพียง 4 มิลลิเมตร

4.3.2 การทดสอบการสร้างสาร bacteriocin โดยวิธี well diffusion assay
แปลงจาก Schillinger and Lucke, 1989)

เมื่อนำ *Pediococcus* spp. ที่มีผลการยับยั้งสูง โดยมีวงใสการยับยั้งมากก
มิลลิเมตร จากการทดสอบขั้นตอนแรก โดยวิธี agar spot มาศึกษาการสร้า
ยับยั้งพวกแบคเทอริโอซิน โดยวิธี well diffusion assay โดยการเลี้ยงเชื้อในอ
เหลว MRS ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลา
ไปปั่นเหวี่ยง นำสารละลายส่วนใสที่ได้แบ่งเป็นสองส่วน ส่วนหนึ่งใช้เป็นส่วนค
อีกส่วนนำไปปรับ pH เป็น 6.5 และใส่เอนไซม์คะตาเลส 5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร
สารละลายส่วนใสแต่ละส่วนหยดลงในหลุมที่เจาะไว้ในจานอาหารแข็ง MRS ที่ร
ด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ช
พบว่าไม่มีวงใสของการยับยั้งเกิดขึ้นในหลุมที่ใส่สารละลายส่วนใสที่มีการปรับ pH
ใส่เอนไซม์คะตาเลส (ตาราง 10) ในขณะที่หลุมที่ควบคุมซึ่งเป็นส่วนของสารล
ส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH และไม่ได้เติมเอนไซม์คะตาเลส แสดงผลการยับยั้งต่อแบค
อินดิเคเตอร์ทุกไอโซเลตที่ทดสอบ และเมื่อนำ *Pediococcus* spp. ดังกล
ทดสอบความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน เพื่อทดสอบว่ามีสารยับยั้งแบคเทอ
หรือไม่ ซึ่งแบคเทอริโอซินเป็นสารพวกโปรตีน จะถูกทำลายได้โดยเอนไซ
โปรตีน (Tagg, *et al.*, 1976) โดยใช้เอนไซม์ 3 ชนิด คือ trpsin , proteas
pepsin ทำการทดสอบด้วยวิธี well diffusion assay โดยนำสารละลายส่วน

Pediococcus spp. ที่มีผลการยับยั้งมากกว่า 5 มิลลิเมตร จากการทดสอบด้วยวิธี well diffusion asaay ในส่วนควบคุม ที่ไม่ได้ปรับ pH และ ไม่ใส่เอนไซม์คะตาเลส นำสารละลายส่วนใส แบ่งเป็น 2 ส่วน ส่วนหนึ่งเป็นส่วนควบคุม อีกส่วนหนึ่งผสมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร นำส่วนใสที่ได้แต่ละส่วนไปหยดลงในหลุมของจานเพาะเชื้อ ที่ราดทับด้วยแบคทีเรียอินดิเคเตอร์เช่นเดียวกัน บ่มไว้และวัดผลการยับยั้ง เปรียบเทียบความกว้างของวงใสการยับยั้งเปรียบเทียบส่วนควบคุมที่ไม่ได้ใส่เอนไซม์ย่อยโปรตีน กับส่วนที่ใส่เอนไซม์ย่อยโปรตีน (ภาพประกอบ 8) พบว่าความกว้างของวงใสการยับยั้งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 เมื่อทดสอบกับเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778 (ตาราง 11) และเมื่อทดสอบกับเชื้อ *S. aureus* ATCC 29273 (ตาราง 12) จากผลการทดลองข้างต้น แสดงให้เห็นว่าไม่มี Pediococcus ไอโซเลตใดที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยสามารถสร้างสารยับยั้งพวกแบคเทอริโอซิน ซึ่ง Graham and McKay (1985) รายงานว่า *Pediococcus* spp. ที่กำลังศึกษาอยู่มีเพียงสายพันธุ์เดียวที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน คือ *P. pentosaceus* FBB-63

ดังนั้นจึงได้คัดเลือก *Pediococcus* spp. ที่สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละละชนิดได้ดี 3 อันดับแรก จากการทดสอบด้วยวิธี agar spot บนอาหารแข็ง MRS ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 2 และเลี้ยงในสภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งเป็นสภาวะที่เอื้ออำนวยต่อการสร้างสารยับยั้งทุกประเภทไปใช้ในการทดสอบขั้นต่อไป

4.3.3 ศึกษาเปอร์เซนต์การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้

เมื่อนำเชื้อ *Pediococcus* spp. ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดได้สูง เมื่อเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคส ร้อยละ 2 ในสภาวะที่มีออกซิเจน โดยคัดเลือกเชื้อที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์แต่ละชนิดได้สูงใน 3 อันดับแรกมาเพาะเลี้ยงร่วมกันกับเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ตามวิธีของ Gilliland and Speck, 1977 และ Gonzalez, *et al.*, 1993 โดยเลี้ยงเชื้อ *P. acidilactici* (P33), *P. acidilactici* (P34) และ *P. acidilactici* (P38) ร่วมกับเชื้อ *B. cereus* ATCC 11778, เลี้ยงเชื้อ *P. pentosaceus* (P32) , *P. pentosaceus* (P24), *P. acidilactici*

ตาราง 10 การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของสารละลายส่วนใสของ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้เมื่อทดสอบตามวิธี well diffusion assay

รหัสเชื้อ	เชื้อ	Inhibition zone (mm.)[a]								pH เดิมของ Suppernatant
		B. cereus ATCC 11778		*S. aureus ATCC 29273*		*E. coli 0157 : H7*		*S. typhimurium 3230*		
		ควบคุม	ปรับ pH	ควบคุม	ปรับ pH	ควบคุม	ปรับ pH	ควบคุม	ปรับ pH	
P1	*P. acidilactici*	4.40	0.00	8.00	0.00	4.00	0.00	ND	ND	4.41
P2	*P. acidilactici*	4.20	0.00	7.50	0.00	ND	ND	ND	ND	4.46
P3	*P. acidilactici*	4.50	0.00	7.20	0.00	4.75	0.00	4.40	0.00	4.29
P4	*P. pentosaceus*	5.70	0.00	7.00	0.00	4.25	0.00	4.65	0.00	4.32
P5	*P. acidilactici*	4.75	0.00	6.80	0.00	3.50	0.00	4.30	0.00	4.23
P6	*P. acidilactici*	4.70	0.00	7.75	0.00	ND	ND	ND	ND	4.30
P7	*P. urinaeequi*	ND	ND	4.30	0.00	ND	ND	ND	ND	5.01
P8	*P. pentosaceus*	ND	ND	5.50	0.00	ND	ND	ND	ND	4.94
P9	*P. acidilactici*	4.95	0.00	7.75	0.00	ND	ND	4.50	0.00	4.17
P10	*P. pentosaceus*	4.90	0.00	7.10	0.00	4.00	0.00	ND	ND	4.24
P11	*P. acidilactici*	ND	ND	7.30	0.00	ND	ND	4.00	0.00	4.27
P12	*P. acidilactici*	4.40	0.00	7.00	0.00	ND	ND	ND	ND	4.28
P13	*P. acidilactici*	3.90	0.00	6.80	0.00	ND	ND	ND	ND	4.26
P14	*P. acidilactici*	4.75	0.00	6.90	0.00	4.20	0.00	ND	ND	4.30
P15	*P. acidilactici*	5.00	0.00	7.25	0.00	4.50	ND	ND	ND	4.28
P16	*P. acidilactici*	5.50	0.00	7.00	0.00	4.50	0.00	4.20	0.00	4.07
P17	*P. acidilactici*	5.00	0.00	7.00	0.00	ND	ND	ND	ND	4.15
P18	*P. acidilactici*	ND	ND	7.30	0.00	ND	ND	ND	ND	4.20
P19	*P. pentosaceus*	5.00	0.00	7.80	0.00	3.75	0.00	ND	ND	4.19
P20	*P. pentosaceus*	4.90	0.00	7.75	0.00	ND	ND	ND	ND	4.09

ตาราง 10 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	เชื้อ	Inhibition zone (mm.)[a]								pH เดิมของ Supernatant
		B. cereus ATCC 11778		*S. aureus ATCC 29273*		*E. coli 0157 : H7*		*S. typhimurium 3230*		
		ควบคุม	ปรับ pH	ควบคุม	ปรับ pH	ควบคุม	ปรับ pH	ควบคุม	ปรับ pH	
P21	*P. pentosaceus*	ND	ND	7.80	0.00	ND	ND	ND	ND	4.15
P22	*P. pentosaceus*	4.90	0.00	7.90	0.00	4.20	0.00	ND	ND	4.11
P23	*P. pentosaceus*	3.90	0.00	10.20	0.00	4.50	0.00	4.40	0.00	4.11
P24	*P. pentosaceus*	4.60	0.00	9.90	0.00	4.65	0.00	ND	ND	4.08
P25	*P. acidilactici*	4.60	0.00	5.50	0.00	ND	ND	ND	ND	4.32
P26	*P. acidilactici*	4.60	0.00	7.25	0.00	ND	ND	ND	ND	4.19
P27	*P. acidilactici*	4.20	0.00	7.20	0.00	ND	ND	ND	ND	4.95
P28	*P. acidilactici*	3.90	0.00	8.00	0.00	ND	ND	ND	ND	4.19
P29	*P. acidilactici*	4.00	0.00	8.10	0.00	4.75	0.00	ND	ND	4.17
P30	*P. pentosaceus*	5.20	0.00	7.00	0.00	5.00	0.00	ND	ND	4.03
P31	*P. acidilactici*	7.30	0.00	6.70	0.00	4.50	0.00	ND	ND	4.09
P32	*P. pentosaceus*	5.50	0.00	6.55	0.00	ND	ND	ND	ND	4.06
P33	*P. acidilactici*	7.50	0.00	6.20	0.00	4.20	0.00	4.25	0.00	4.03
P34	*P. acidilactici*	7.80	0.00	7.00	0.00	4.50	0.00	5.50	0.00	4.12
P35	*P. acidilactici*	6.80	0.00	7.25	0.00	ND	ND	4.30	0.00	4.08
P36	*P. acidilactici*	7.20	0.00	10.00	0.00	5.25	0.00	4.15	0.00	4.15
P37	*P. acidilactici*	6.50	0.00	7.00	0.00	4.90	0.00	ND	ND	4.02
P38	*P. acidilactici*	7.75	0.00	8.90	0.00	4.50	0.00	4.75	0.00	4.17
P39	*P. acidilactici*	3.50	0.00	6.00	0.00	5.00	0.00	6.25	0.00	4.11
P40	*P. acidilactici*	4.50	0.00	6.20	0.00	5.25	0.00	6.00	0.00	4.1
P41	*P. pentosaceus*	3.20	0.00	5.80	0.00	5.75	0.00	5.50	0.00	3.98
P42	*P. pentosaceus*	4.75	0.00	7.00	0.00	5.30	0.00	5.30	0.00	4
P43	*P. acidilactici*	6.25	0.00	7.25	0.00	4.10	0.00	4.30	0.00	4.15

a : วัดระยะจากขอบหลุมจนถึงขอบของวงใสการยับยั้ง

ND : ไม่ได้ทำการทดสอบ

ภาพประกอบ 8 การทดสอบความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน pepsin ของสารละลายส่วนใสของ *Pediococcus acidilactici* (P16) โดยวิธี well diffusion assay

A = สารละลายส่วนใสชุดควบคุม

B = สารละลายส่วนใสชุดทดลอง (ใส่เอนไซม์ย่อยโปรตีน pepsin)

ตาราง 11 ความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนของสารในสารละลายส่วนใสของ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้

รหัสเชื้อ	เชื้อ	inhibition zone (mm.)					
		B. cereus ATCC 11778					
		trypsin		protease		pepsin	
		ควบคุม	ใส่เอนไซม์	ควบคุม	ใส่เอนไซม์	ควบคุม	ใส่เอนไซม์
P4	*P. pentosaceus*	5.70^{a}	5.75^{a}	5.60^{a}	5.65^{a}	5.75^{a}	5.60^{a}
P15	*P. acidilactici*	4.90^{a}	5.00^{a}	5.10^{a}	5.00^{a}	5.00^{a}	4.95^{a}
P16	*P. acidilactici*	5.50^{a}	5.20^{a}	5.45^{a}	5.35^{a}	5.60^{a}	5.7a
P17	*P. acidilactici*	5.10^{a}	4.80^{a}	4.90^{a}	5.00^{a}	5.00^{a}	5.00^{a}
P19	*P. pentosaceus*	5.00^{a}	5.10^{a}	4.90^{a}	4.90^{a}	4.90^{a}	5.10^{a}
P30	*P. pentosaceus*	5.15^{a}	5.20^{a}	5.30^{a}	4.95^{a}	4.90^{a}	4.90^{a}
P31	*P. acidilactici*	7.25^{b}	7.30^{b}	7.20^{b}	7.25^{b}	7.10^{b}	7.00^{b}
P32	*P. pentosaceus*	5.45^{a}	5.30^{a}	5.25^{a}	5.30^{a}	5.50^{a}	5.50^{a}
P33	*P. acidilactici*	7.50^{b}	7.45^{b}	7.60^{b}	7.45^{b}	7.50^{b}	7.30^{b}
P34	*P. acidilactici*	7.80^{b}	7.70^{b}	7.75^{b}	7.80^{b}	7.75^{b}	7.70^{b}
P35	*P. acidilactici*	6.75^{c}	6.50^{c}	6.80^{c}	6.70^{c}	6.75^{c}	6.70^{c}
P36	*P. acidilactici*	7.25^{b}	7.10^{b}	7.30^{b}	7.25^{b}	7.20^{b}	7.15^{b}
P37	*P. acidilactici*	6.60^{c}	6.65^{c}	6.40^{c}	6.70^{c}	6.50^{c}	6.40^{c}
P38	*P. acidilactici*	7.90^{b}	7.85^{b}	7.70^{b}	7.80^{b}	7.80^{b}	7.65^{b}
P43	*P. acidilactici*	6.00^{c}	5.50^{a}	5.70^{a}	5.50^{a}	6.25^{c}	6.25^{c}

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

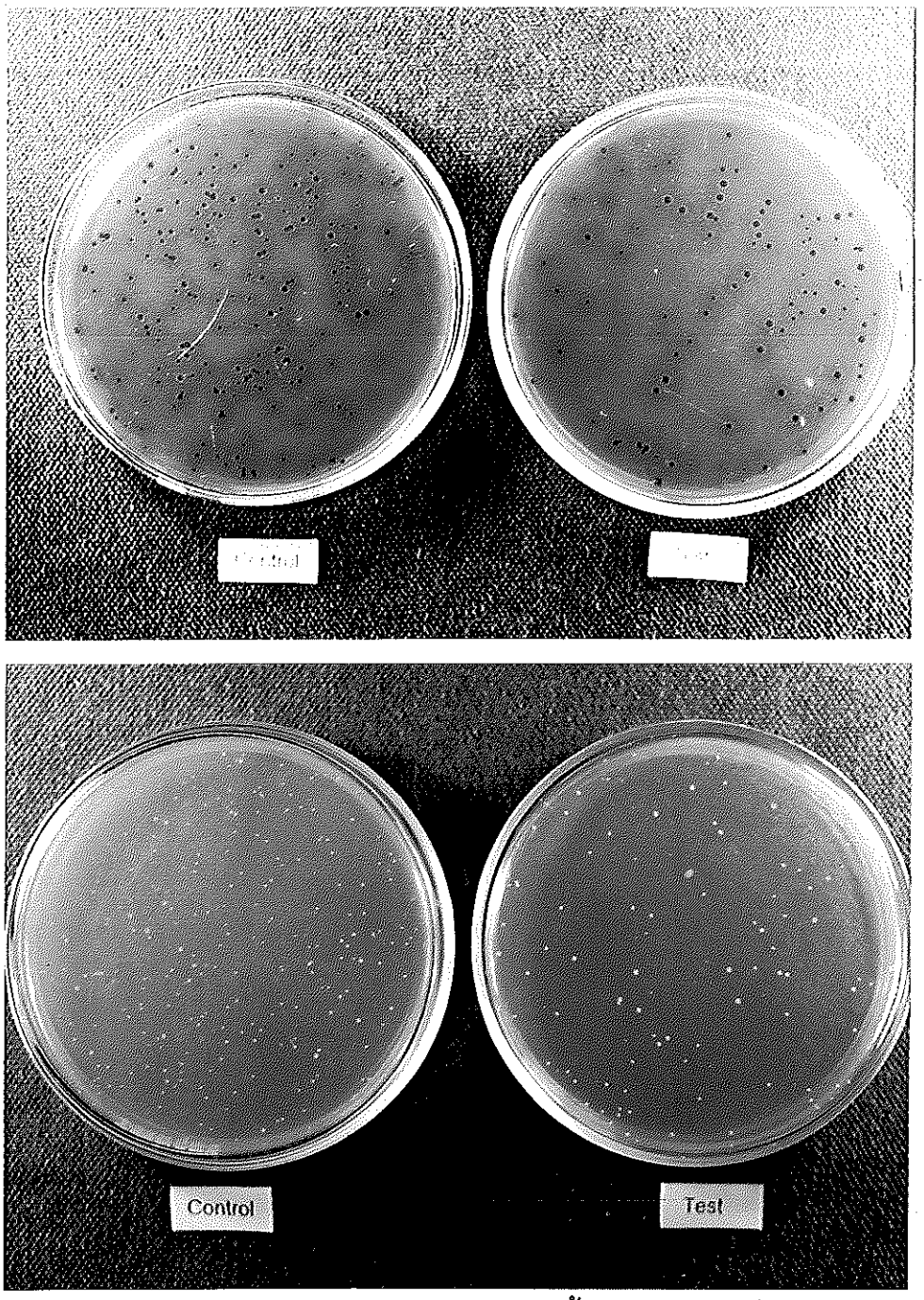
ตาราง 12 ความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีนของสารในสารละลายส่วนใสของ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้

รหัสเชื้อ	เชื้อ	inhibition zone (mm.)					
		S. aureus ATCC 29273					
		trypsin		protease		pepsin	
		ควบคุม	ใส่เอนไซม์	ควบคุม	ใส่เอนไซม์	ควบคุม	ใส่เอนไซม์
P1	*P. acidilactici*	7.70[a]	7.75[a]	8.00[a]	7.50[a]	8.15[a]	8.00[a]
P2	*P. acidilactici*	7.55[a]	7.30[a]	7.50[a]	7.25[a]	7.90[a]	8.10[a]
P6	*P. acidilactici*	7.80[a]	7.85[a]	8.00[a]	7.75[a]	7.90[a]	7.80[a]
P9	*P. acidilactici*	7.75[a]	7.80[a]	8.00[a]	7.75[a]	7.90[a]	7.85[a]
P19	*P. pentosaceus*	7.80[a]	7.75[a]	7.90[a]	7.85[a]	7.90[a]	8.00[a]
P20	*P. pentosaceus*	7.65[a]	7.70[a]	7.75[a]	7.50[a]	7.70[a]	7.65[a]
P21	*P. pentosaceus*	7.85[a]	7.80[a]	7.75[a]	8.00[a]	8.15[a]	8.00[a]
P22	*P. pentosaceus*	8.00[a]	7.95[a]	7.90[a]	8.00[a]	8.15[a]	8.20[a]
P23	*P. pentosaceus*	10.50[b]	10.20[b]	10.50[b]	10.15[b]	10.25[b]	10.25[b]
P24	*P. pentosaceus*	10.00[b]	10.00[b]	10.00[b]	9.80[b]	10.20[b]	10.10[b]
P28	*P. acidilactici*	8.00[a]	8.00[a]	8.75[a]	8.00[a]	7.95[a]	8.20[a]
P29	*P. pentosaceus*	8.15[a]	8.20[a]	8.10[a]	8.00[a]	8.30[a]	8.25[a]
P36	*P. acidilactici*	10.50[b]	10.60[b]	10.30[b]	10.10[b]	10.25[b]	10.30[b]
P38	*P. acidilactici*	9.00[c]	8.90[c]	9.20[c]	9.30[c]	9.10[c]	8.75[c]

ตัวอักษรในแนวนอนที่เหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

(P36) ร่วมกับ *S. aureus* ATCC 29273, เลี้ยงเชื้อ *P. acidilactici* (P40), *P. pentosaceus* (P41) , *P. pentosaceus* (P42) ร่วมกับ *E. coli* O157 : H7, เลี้ยงเชื้อ *P. acidilactici* (P34), *P. acidilactici* (P39), *P. acidilactici* (P40) ร่วมกับ *S. typhimurium* 2330 ในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้วตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้ใส่เชื้อ Pediococcus (ภาพประกอบ 9) พบว่า *Pediococcus* spp. ที่แยกได้จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยสามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 ได้ร้อยละ 94.30 – 96.89 ยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29273 ได้ร้อยละ 96.75 - 98.47 ยับยั้ง *E. coli* O157 : H7 ได้ร้อยละ 82.05 – 84.55 และ ยับยั้ง *S. typhimurium* 2330 ได้ 81.88 – 85.84 (ตาราง 13) เมื่อนำผลการทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดย *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้ มาเขียนเป็นกราฟ (ภาพประกอบ 10) พบว่า *P. pentos*aceus (P23) สามารถยับยั้ง *S. aureus* ATCC 29273 ได้ดีที่สุด คิดเป็นร้อยละ 98.47 ในขณะที่ *P. acidilactici* (P34) สามารถยับยั้ง *S. typhimurium* 2330 ได้น้อยที่สุดคือร้อยละ 81.88 โดยผลการทดลองในครั้งนี้ มีค่าต่ำกว่าการทดลองของศิรินาถ หนูเอก (2540) และอรัญญา สังขศรี (2542) เล็กน้อยคือ ศิรินาถ หนูเอก (2540) พบว่า แบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ที่สร้างสารแบคเทอริโอซิน สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ร้อยละ 97- 99 ยกเว้น *S. lactis* SN48 ที่สามารถยับยั้ง *E. coli* และ *E. coli* O157 : H7 ได้เพียงร้อยละ 93.85 และร้อยละ 89.82 ตามลำดับ ขณะที่อรัญญา สังขศรี (2542) พบว่า *L. plantarum* A49a สามารถยับยั้ง *B. cereus*, *S. enteritidis* และ *S. typhimurium* 3299 ได้อย่างสมบูรณ์ คือร้อยละ 100 และสามารถยับยั้ง *E. coli* 1189 และ *S. aureus* ATCC 29213 ได้ใกล้เคียงมากคือร้อยละ 98.78 และ 97.13 ตามลำดับ สำหรับ *E. coli* O157 : H7 จะถูกยับยั้งได้ต่ำสุดเพียงแค่ร้อยละ 88.78 ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียที่ใช้ในการศึกษาของศิรินาถ หนูเอก (2540) และอรัญญา สังขศรี (2542) นั้นมีการสร้างสารยับยั้งที่มีทั้งกรดอินทรีย์ และแบคเทอริโอซิน ในขณะที่ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้ในการทดลองในครั้งนี้ สารยับยั้งที่สร้างขึ้นส่วนใหญ่จะมาจากกรดอินทรีย์ ซึ่งสังเกตได้จาก

ค่า pH ของอาหารที่ลดลงมาก หลังเลี้ยงเชื้อเหล่านี้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง คืออยู่ในช่วง 3.98 – 5.01 (ตาราง 10) และจากการทดสอบข้างต้น ไม่พบการยับยั้งที่เกิดเนื่องจากสารแบคเทอริโอซินใน Pediococcus ไอโซเลตใด ซึ่งจากการรายงานประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยแบคทีเรียแลกติก ไม่ได้ขึ้นอยู่กับ pH หรือความเป็นกรดเพียงอย่างเดียว เพราะจากการเติมกรดอินทรีย์ต่าง ๆ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อไม่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งหมด (Gonzalez, *et al.*,1993) แต่ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัยร่วมกัน คือ กรดอินทรีย์ , ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ , lactoperoxidase และ diacetyl (Daeschel, 1989) และแบคทีเรียบางสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคเทอริโอซิน (Klaenhammer, 1988) แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดสอบร้อยละการยับยั้งในครั้งนี้ มีผลใกล้เคียงกับการศึกษาของ Gilliland and Speck (1977) ซึ่งพบว่า *L. acidofilus* NCFM สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่า *S. typhimurium* และ *E. coli* คือมีร้อยละการยับยั้งเป็น 98.2 86.5 และ 87.0 ตามลำดับ และจากรายงานของ Gonzalez, *et al.*, (1993) พบว่า *L. casei* สามารถยับยั้ง *E.coli* และ *S. typhimurium* ได้ร้อยละ 86.4 $\pm$ 3.9 และ 77.4 $\pm$ 2.3 ตามลำดับ และผลการทดสอบครั้งนี้สูงกว่าผลการยับยั้งที่ศึกษาโดย วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, เมตตา องค์สกุล และผกาพรรณ สิงห์ชัย (2540) ซึ่งพบว่า Lactobacillus ทั้ง 5 สายพันธุ์ที่แยกได้จากนมเปรี้ยว 5 ยี่ห้อ สามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดีกว่า *S. typhimurium* และ *E. coli* คือมีร้อยละการยับยั้งอยู่ระหว่างร้อยละ 61.1 – 75.3 ในขณะที่ยับยั้ง *S. typhimurium* และ *E. coli* มีร้อยละการยับยั้งอยู่ระหว่างร้อยละ 40.5 - 62.1 และ 47.9 – 53.0 ตามลำดับ



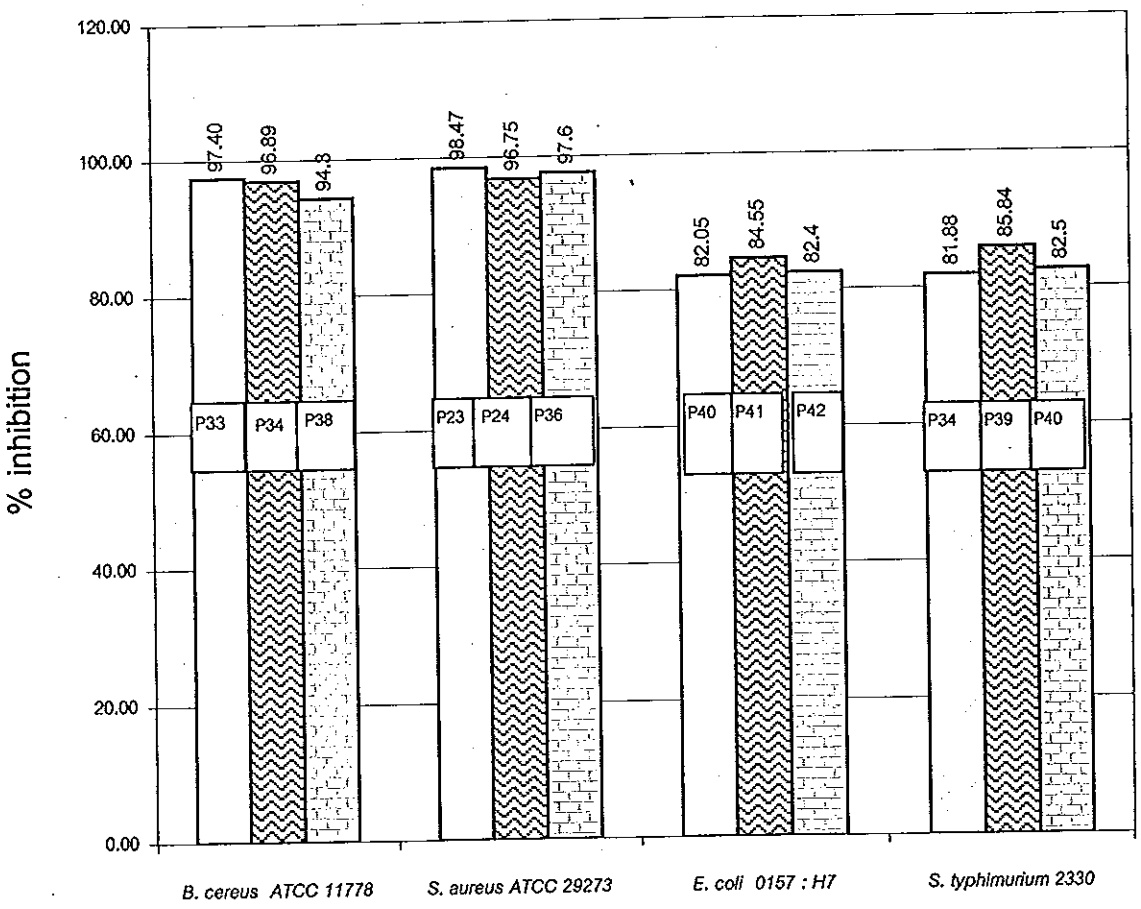
ภาพประกอบ 9 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

ภาพบน การเพาะเลี้ยง *S.typhimurium* 2330 ร่วมกับ *P. acidilactici* (P39)

ภาพล่าง การเพาะเลี้ยง *B. cereus* ATCC 11778 ร่วมกับ *P. acidilactici* (P33)

ตาราง 13 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดย *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้

แบคทีเรียอินดิเคเตอร์	*Pediococcus*	จำนวนแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (CFU / ml)		ร้อยละการยับยั้ง
		ชุดควบคุม	ชุดเพาะเลี้ยงร่วมกัน	
B. cereus ATCC 11778	*P. acidilactici* (P33)	1.58×10^{8}	5.5×10^{6}	96.51
	P. acidilactici (P34)		4.9×10^{6}	96.89
	P. acidilactici (P38)		9.0×10^{6}	94.30
S. aureus ATCC29273	*P. pentosaceus* (P23)	1.45×10^{8}	2.21×10^{6}	98.47
	P. pentosaceus (P24)		4.70×10^{6}	96.75
	P. acidilactici (P36)		3.50×10^{6}	97.58
E. coli 0157 : H7	*P. acidilactici* (P40)	1.12×10^{8}	2.01×10^{7}	82.05
	P. pentosaceus (P41)		1.73×10^{7}	84.55
	P. pentosaceus (P42)		1.97×10^{7}	82.41
S. typhimurium 2330	*P. acidilactici* (P34)	1.06×10^{8}	1.92×10^{7}	81.88
	P. acidilactici (P39)		1.50×10^{7}	85.84
	P. acidilactici (P40)		1.85×10^{7}	82.54



ภาพประกอบ 10 ร้อยละการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดย *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้

บทที่ 4

สรุป

ในการเก็บตัวอย่างอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย เพื่อนำมาแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. ใช้ตัวอย่างอาหารหมักดอง 12 ชนิด เป็นอาหารหมักดองจากสัตว์ 7 ชนิด อาหารหมักดองจากพืช 5 ชนิด รวม 192 ตัวอย่าง

ทำการศึกษาสมบัติทางเคมี พบว่า pH ของอาหารหมักดอง อยู่ในช่วง 3.36 – 5.54 มีเปอร์เซนต์กรดอยู่ในช่วง 0.43 – 1.95 เปอร์เซนต์เกลืออยู่ในช่วง 1.61 – 12.77 และเมื่อศึกษาสมบัติทางจุลชีววิทยา พบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง $1.48 \times 10^{4} - 9.3 \times 10^{7}$ CFU / g

เมื่อนำตัวอย่างอาหารหมักดองมาแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. โดยอาศัยการศึกษาและทดสอบการสร้างก๊าซจากกลูโคส การสร้างเอนไซม์คะตาเลส ความไวต่อยาปฏิชีวนะ Vancomycin และการย้อมสีแกรม ประกอบร่วมกัน พบว่าสามารถแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. ได้ 43 ไอโซเลต คิดเป็นร้อยละ 18.23 ของตัวอย่างที่พบเชื้อ โดยแยกได้จากอาหารหมักดองจากสัตว์ 31 ไอโซเลต และแยกได้จากอาหารหมักดองจากพืช 12 ไอโซเลต

ผลการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของ *Pediococcus* spp.ที่แยกได้ทั้ง 43 ไอโซเลต พบว่า *Pediococcus* spp. ทุกไอโซเลต สามารถเติบโตที่อุณหภูมิ 25 – 40 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MRS ที่มี pH 4.2 – 8.5 (ยกเว้นสายพันธุ์ P7 ซึ่งไม่เติบโตที่ pH 4.2) และสามารถเติบโตในอาหารเหลว MRS ที่เติมเกลือร้อยละ 4 – 8 และพบว่า *Pediococcus* spp. ที่ไม่สามารถเติบโตในอาหารที่มี pH ต่ำแต่เติบโตได้ในอาหารที่เติมเกลือร้อยละ 10 – 12 เป็น *Pediococcus* spp. ที่แยกได้จากไตปลาและจิ้งจัง และเมื่อนำ *Pediococcus* spp . ที่แยกได้มาทดสอบการหมักน้ำตาลมอลโตส พบว่า ไม่สามารถหมักน้ำตาลมอลโตส 28 ไอโซเลต และสามารถหมักน้ำตาลมอลโตสได้ 15 ไอโซเลต

นำผลที่ได้จากการทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่ได้ ประกอ
พบว่า *Pediococcus* spp. ที่แยกได้ 43 ไอโซเลต เป็น *Pediococc*
28 สายพันธุ์ และ *Pediococcus pentosaceus* 14 สายพันธุ์ ซึ่งแยกได้จาก
หมักดองทั้งจากพืชและสัตว์ และ *Pediococcus urinae- equi* 1 สายพันธุ์ ซึ่งแ
จากไตปลา

เมื่อทดสอบความสามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่น ด้วยวิธี agar spot โด
ในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 ในสภาวะที่มีออกซิเจน
Pediococcus spp. ที่แยกได้ สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *S. a*
ATCC 29273 ได้ดีที่สุด และสามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 ไ
แบคทีเรียแกรมลบคือ *E. coli* O157: H7 และ *S. typhimurium* 2330 โดย
การยับยั้งที่สูงที่สุดเป็น 16, 12.25, 8.5 และ 8.3 มิลลิเมตร ตามลำดับ

ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี
spot ในสภาพที่มีการจำกัดผลของกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
Pediococcus spp. ที่แยกได้ สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้น้
การยับยั้ง ที่ทดสอบในสภาพที่ไม่จำกัดกรดอินทรีย์ และไฮโดรเจนเปอร์ออกไ
และไม่มี *Pediococcus* spp. สายพันธุ์ใดแสดงผลการยับยั้ง *E. coli* O157: H7
สายพันธุ์ดังกล่าวมาศึกษาการสร้างสารแบคเทอริโอซิน โดยวิธี agar well di
โดยการจำกัดผลการยับยั้งจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์
ไม่มี *Pediococcus* spp. สายพันธุ์ใดสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอินดิเค
และเมื่อนำไปทดสอบความไวต่อเอนไซม์ย่อยโปรตีน เพื่อทดสอบว่ามีการส
ยับยั้งพวกแบคเทอริโอซินหรือไม่ โดยใส่เอนไซม์ย่อยโปรตีน ได้แก่ trypsin p
และpepsin พบว่า ความกว้างของวงใสในการยับยั้งในส่วนควบคุม แล
ใส่เอนไซม์ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดง
Pediococcus spp. สายพันธุ์ใดที่สามารถสร้างสารยับยั้งพวกแบคเทอริโอซิน

การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยการเพาะเลี้ยงร่ว
Pediococcus spp. ที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ แต่ละชนิดได้ดี
แรก การทดสอบโดยวิธี agar spot ในสภาพไม่กำจัดผลการยับยั้งจากกรดอิน

ไฮโดรเจนเปอร์ไซด์ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ ดังกล่าว สามารถยับยั้ง *S. aureus* ACCT 29273 ได้ดี โดยคิดเป็นร้อยละ 96.75 – 98.47 และ สามารถยับยั้ง *B. cereus* ATCC 11778 ได้ร้อยละ 94.30 – 96.89 ในขณะที่ ยับยั้ง *E. coli* O157: H7 และ *S. typhimurium* 2330 ได้น้อยกว่า คิดเป็นร้อยละ 82.05 – 84.55 และ 81.88 – 85.84 ตามลำดับ

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงสูตรอาหาร ค่าความเป็นกรด – ด่างของอาหาร อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเติบโตของเชื้อ และ ปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างสารยับยั้งของเชื้อ *Pediococcus* spp. ที่คัดเลือกได้
2. ศึกษาการใช้เชื้อที่คัดเลือกได้ โดยนำไปใช้ในการหมักดองอาหารพื้นบ้านภาคใต้ของไทย และทดสอบการเปรียบเทียบคุณภาพของอาหารหมักดองที่ได้ กับอาหารหมักดองที่หมักโดยวิธีตามธรรมชาติ
3. ศึกษาการใช้แบคทีเรียแลกติกที่สร้างกรดและสารยับยั้งอื่น ร่วมกันมากกว่า 2 ชนิด ที่มีทั้งแบคทีเรียแลกติก ที่มีการหมักแบบ ฮอมอเฟอร์เมนต์เตทีฟ และ แบบ เฮเทอโรเฟอร์เมนต์เตทีฟ เพื่อปรับปรุงคุณภาพและความปลอดภัยต่อผู้บริโภค อาหารหมักดองพื้นบ้าน

บรรณานุกรม

กัลยา วานิชย์บัญชา. 2541. การทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับผลต่างระหว่าค่าเฉลี่ยของสองประชากรแบบจับคู่. ใน หลักสถิติ. หน้า 230 - 234. กรุงเทพ ฯ : คณะพาณิชยศาสตร์และการบัญชี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ชูศรี วงศ์รัตนะ. 2525. การทดสอบเกี่ยวกับค่าเฉลี่ย. ใน เทคนิคการใช้สถิติเพื่อการวิจัย. หน้า 97 - 140. กรุงเทพฯ : คณะศึกษาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

ทองคำ คิมหะมานนท์. 2538. การเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการผลิตปลาหมัก (ส้มฟัก). วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

พัชรินทร์ สอาดสิทธิศักดิ์. 2538. การคัดเลือกจุลินทรีย์สำหรับการผลิตไส้กรอกหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มาลี อมรทิพย์รัตน์. 2522. การศึกษาจุลชีววิทยาของอาหารหมักพื้นเมือง : ปูดู วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. 2534. โปรซีดดิงส์แลกติกแอสิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. ใน ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์ . หน้า 3 –33. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. ใน จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. หน้า 48 - 91. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2542. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้. รายงานการวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, เมตตา องค์สกุล และผกาพรรณ สิงห์ชัย. 2539. การยับยั้งของ Lactobacillus จากนมเปรี้ยวพร้อมดื่มที่มีต่อ *Staphylococcus aureus Salmonella typhimurium* และ *E. coli* เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกัน. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 3 : 301 – 305 .

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล และ อุบลวรรณ รอดประดิษฐ์. 2540. การแยกเชื้อ คัดเชื้อ และเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 19 : 181-198.

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุภศิลป์ มณีรัตน์. 2541. การเตรียมกล้าเชื้อผงสำหรับผลิตแหนม. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์. 2529. "การถนอมอาหารของชาวใต้", สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้. 1 , 163 – 165.

สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์. 2529. "จิ้งจัง", สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้. 2, 764 – 765.

สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์. 2529. " บูดู " , สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้. 5 , 1904.

สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์. 2529." ปลาส้ม " , สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้. 5 , 2042

สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์. 2529. " แป้งแดง ", สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้. 5, 2125 –2126.

สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์. 2529. " ผักเสี้ยน ", สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้. 5, 2133.

สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์. 2529. " สะตอ ", สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้. 9, 3727 –3728.

สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์. 2529. " หนาง " , สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้. 10 , 3950.

สุทธิวงศ์ พงศ์ไพบูลย์. 2529. "หอยส้ม " , สารานุกรมวัฒนธรรมภาคใต้.10 , 4043.

สุมาลี เหลืองสกุล. 2535. การติดเชื้อและการเป็นพิษของอาหารที่มีแบคทีเรียเป็นสาเหตุ. ใน จุลชีววิทยาทางอาหาร. หน้า 220 – 227. กรุงเทพ ฯ : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประสานมิตร.

อรัญญา สังขศรี. 2542. การยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคติดต่อทางอาหารของ *Lactobacillus* spp. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

A.O.A.C. 1975. Official Method of Analysis of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. 12 th ed. Horwitz, W., Senzel, H. and Park, D. L., eds. Washington, D. C. : The Assosiation of Official Analytical Chemists, Inc.

A.O.A.C. 1990. Official Method of Analysis of Analysis of The Association of Official Analytical Chemists. 15 th ed. Washington, D. C. : The Assosiation of Official Analytical Chemists, Inc.

Anders, R. F., Hogg, D. M. and Jago, G.R. 1970. Formation of Hydrogen Peroxide by Group N Streptococci and Its Effect on Their Growth and Metabolism of *Lactobacillus plantarum*. Int. Journal Food Microbiol. 149-160. J. Food Prot. 52 : 614-617.

Arihara, K., Ota. H., Itoh, M., Kondo, Y., Sameshima, T., Yamanaka, H., Akimoto, M., Samai, S., and Miki. 1998. *Lactobacillus acidophillus* Group Lactic Acid Bacteria Applied to Meat Fermentation. J. Food Science. 63 : 544- 547.

Bacus, J. N. and Brown, W. L. 1981. Use of Microbial Culture ; Meat Products. Food Technology. 35 : 74 – 78.

Baird – Parker, A. C., Bryan, F. A., Buchanan, R. L., Busta, F. F., Cristain, J. H.B., Doyle, M. P., Farkar, J., Grau, F. H., Hobbs, B. C. and Van Schothorst, M. 1996. Intestinally Pathohenic Escherichia. In Micro Organism in Foods, P. 126 – 138. Robert T.A. , Baird – Parker A.C. and Tompkin R. B., eds. London : Blackie Academic and Professional.

Baird – Parker, A. C., Bryan, F. A., Buchanan, R. L., Busta, F. F., Cristain, J. H.B., Doyle, M. P., Farkar, J., Grau, F. H., Hobbs, B. C. and Van Schothorst, M. 1996. *Bacillus cereus*. In Micro Organism in Foods, P. 20 - 35. Robert T.A. , Baird – Parker A.C. and Tompkin R. B., eds. London : Blackie Academic and Professional.

Baird – Parker, A. C., Bryan, F. A., Buchanan, R. L., Busta, F. F., Cristain, J. H.B., Doyle, M. P., Farkar, J., Grau, F. H., Hobbs, B. C. and Van Schothorst, M. 1996. *Staphylococcus aureus*. In Micro Organism in Foods, P. 199 – 333. Robert T.A. , Baird – Parker A.C. and Tompkin R. B., eds. London : Blackie Academic and Professional.

Baird – Parker, A. C., Bryan, F. A., Buchanan, R. L., Busta, F. F., Cristain, J. H.B., Doyle, M. P., Farkar, J., Grau, F. H., Hobbs, B. C. and Van Schothorst, M. 1996. *Salmonella*. In Micro Organism in Foods, P. 217 – 264. Robert T.A. , Baird – Parker A.C. and Tompkin R. B., eds. London : Blackie Academic and Professional.

Bhunia, A. K., Johnson, M. C. and Ray, B. 1988. Purification, Characterization and Antimicrobial Spectrum of a Bacteriocin, Pediocin AcH , by *Pediococcus acidilactici* . J. Appl. Bacteriol., 65 : 261 - 268.

Bhunia, A. K., Johnson, M.C., Ray, B. and Kalchayanand, N. 1991. Mode of Action of Pediocin AcH from *Pediococus acidilactici* H on Sensitive Bacterial Strains. J. Appl. Bacteriol., 70 : 25 - 33.

Bhowmik, T. and Marht, E. H. 1990. Peptide - Hydrolysis Enzymes of Pediococcus Species. Microbios, 62 : 197 -211.

Biswas, S.R. , Ray, P., Hohnson, M.C. and Ray, B. 1991. Influence of Growth Conditions on the Production of a Bacteriocin , Pediocin AcH , by *Pediococcus acidilactici* H. Appl. Envinron. Microbiol , 57 : 1265 - 1267.

Bruno, M. E. C., and Montville, T. J. 1993. Common Mechanistic Action of Bacteriocin from Lactic Acid Bacteria. Appl. Environ. Microbiol. 59 : 3003-3010.

Bryan, L. F. 1976. *Staphylococcus aureus.* In Food Microbiology : Public Health and Spoilage Aspects, 12 – 100 . Mario. D. Dedigueiredo and Don F. Splittsto, eds. U.S.A. : the Avi Publishing Company, Inc.

Byun, M. W. Kwon, O. J., Yook, H. S. and Kim, K. S. 1998. Gamma Irradiation And Ozone Treatment for Inactivation of *Escherichia coli* 0157 : H7 In Culture Media. J. Food Protection. 61 : 728 - 730.

Collins, M. D., Williams, A. M. and Wallbanks, S. 1990. The Phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as Determined by 16s rRNA Sequence Analysis : Discription of Tetragenococcus. FEMS Microbiol Lett. 70 : 255-262.

Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives. Food Technology. 43 : 164-167.

Daeschel, M. A., Fleming, H.P. and Mc Feeters R.F. 1988. Mixed Culture Fermentation of Cucumber Juice with *Lactobacillus plantarum* and Yeast. J. Food. Sci. 53 : 862 – 864.

Davis, C. R., Wibowo, D., Fleet, G.H. and Lee, H.T. 1988. Properties of Wine Lactic Acid Bacteria : Their Potential Enological Significance. Ameri. J. Enol. and Biocult., 39 : 137 –142.

Degnan, A. J., Yousef, A. E., and Luchasky, J. B. 1992. Use of *Pediococcus acidilactici* to Control *Listeria monocytogenes* in Temperature - Abused Vacuum - Packged Wieners. J. Food. prot., 55 : 98 - 103.

Deibel, R. H. and Niven Jr, C. F. 1960. Comparative Study of *Gaffka homari* , *Aerococcus veridans*, Tetrad Forming Cocci from Meat Curing Brines, and the Genus Pediococcus. J. Bact. , 79 : 175 - 189.

Desai, P. and Sheth, T. 1997. Controlled Fermentation of Vegetables Using Mixed Inoculum of Lactic Cultures. J. Food. Sci. Technol. , 34 : 155-158.

Doyle, M. P. and Schoeni, J. L. 1987. Isolation of Escherichia coli 0157 : H7 from Retail Fresh Meats and Poultry. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 2394 – 2396.

Efthymiou, C. J. and Joseph, S. W. 1972. Difference Between Manganese Ion Requirements of Pedioccocci and Enterococci. J. Bact.,112 : 627 - 628.

Feddin, J. F. M. 1976. Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria. Baltimore : William & Wilkins.

Fleming, H. P., Etchells J. L. and Costilow R. N. 1975. Microbial Inhibition by an Isolate of Pediococcus from Cucumber Brines. Appl. Microbiol., 30 : 1040 – 1042.

Garham, D. C. and McKay, L. L. 1985. Plasmid DNA in Strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococcus pentosaceus*. Appl. Environ. Microbiol. 53 : 2534-2538.

Garvie, E. I. 1986. Genus Pediococcus Claussen 1903. In Bergey ' s Manual of Systematic Bacteriology ,1075 - 1079. Sneath, P.H.A. ed. Baltimore : Williams & Wilkins.

Graham, D. C. and McKay, L. L. 1985. Plasmid DNA in Strains of *Pediococcus cerevisiae* and *Pediococus pentosaceus*. Appl. Environ. Microbio., 50 : 532 – 534.

Gilliland, S. E. 1985. Bacterial Starter Cultures for Foods. U.S.A. : CRC Press, Inc.

Gilliland, S. E. and Speck, M. L. 1977. Antagonistic Action of *Lactobacillus acidophillus* Toward Intestinal And Foodborne Pathogens in Associative Culture. J. Food Prot. 40 : 820 - 823.

Gonalez, B., Arca, P., Mayo, B. and Suarez, J. E. 1994. Detection,Purification and Partial Charecterization of Plantaricin C a Bacteriocin Produced by a *Lactobacillus plantarum* Strain of Dairy Origin. Appl. Environ. Microbiol., 60 : 2158-2163.

Gonzalez, S. N., Apella, M. C., Romero, N. C., De Macias, M. E. and Oliver, G. Inhibition of Enteropathogens by Lactobacilli Strains Used in Fermented Milk. J. Food. Prot., 56 : 773-776.

Griffin, P. M. 1995. *Escherichia coli* O157 : H7 and Other Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. In Infections of Gastrointestinal Tract. M. J. Blaser, P.D. Smith, J. I. Ravdin, H. B. Greenberg and R. L. Guerrant., eds. New York : Raven Press, Ltd.

Gunther, H. L. and White, H. R. 1961. The Cultural and Physiological Characters of the Pediococci. Journal of General Microbiology, 26 : 185 - 197.

Hesseltine, C. W. 1981. Future of Fermented Foods. Process Biochem. 16 : 2 - 13.

Horwitz, W. A., Senzel, H., Reynolds and Park, P.L. 1975. Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists, 12 th ed. Washington, D. C. : Association of official Analytical Chemists Benjarmin Frandlin Station.

Kandler, O. 1983. Carbohydrate Metabolism in Lactic Acid Bacteria. Antonie van Leuwenhoek. 49 : 209-224.

Kitahara, K. 1974. Genus Pediococcus. In Bergey's Manual of Determinative Bacteriology . Buchanan R. E. and Gibbons N. E. eds. 8 th edition. pp. 512-515. Baltimore : Wiliams & Wilkins.

Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. Biochimie, 70 : 337 - 349.

Kalchayanand, N. 1990. Extension of Shelf - Life of Vacuum - Packaged Refrigerated Fresh Beef By Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria. PhD Thesis, University of Wyoming, Laramie, WY.

Kramer, J. M. and Gilbert, R. J. 1989. *Bacillus cereus* and Other Bacillus Species. In Food Borne Bacterial Pathogens. 21 – 70. M. P. Doyle ed. New YolK : Marcel Dekker.

Iwuoha, C. T., and Eke, O. S. 1996. Nigerian Indigenous Fermented Foods ; Their Traditional Process Operation, Inherent Problems, Improvements and Current Status. Food Research International. 29 : 527 – 540.

Lewus, C. B., Kaiser, A. and Montville, T. J. 1991. Inhibition of Food Born Bacterial Pathogens by Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria Isolated from Meat. Appl. Environ. Microbiol. 57 : 1683-1688.

Man, J. C. de, Rogosa, M. and Sharpe , M. E. 1960. A Medium for the Cultivation of Lactobacilli, J. Appl. Bacteriol., 23 : 130 -135.

Muriana, M. P. and Luchansky, B. J. 1993. Biochemical Methods for Purification of Bacteriocin. In Bacteriocin of Lactic Acid Bacteria. p. 41 –56. Hoover, G. D. and Stennson, R. L. eds. Carlifornia : Academic press, Inc.

Nakagawa, A. and Kitahara , K. 1959. Taxonomic Studies on the Genus Pediococcus. J. Gen. and Appl. Microbiol., 5 : 95 - 126.

Nielsen, J. W., Dickson, J. S., and Crouse, J. D. 1990. Use of Bacteriocin Produced by *Pediococcus acidilactici* To Inhibit *Listeria monocytogenes* Associated with Fresh Meat. Appl. Environ. Microbiol. 56 : 2142-2145.

Nygrey, B. 1962. Phospholipase C- Producing Bacteria and Food Poisoning. Acta Pathologica Microbiologyca. Scand Suppl. 160 : 1 – 89.

Office of International Affair National Research Council. 1992. Research Priorities in Traditional Fermented Foods, In Application of Biotechnology to Traditional Fermented Foods, pp 3 - 7. Elmer, L., Garden, Jr., Mpoko Bokngа , Susan Harlander Clifford, W. Hesseltine Keith, H. Steinkraus eds. Washington, D.C. : National Academy Press.

Onofiok, N., Nnanyelugo, D. O. and Ukwondi, B. E. 1996. Usage Patterns and Contribution of Fermented Foods to the Nutrient Intakes of Low Income Households in Emene, Nigeria. Plant Foods for Human Nutrition. 49 : 199 – 211.

Radu, S., Mutalib, S. A., Ahmad, Z., Morgaki, T., Asai, N., Kim, Y. B., Okuda, J. And Nishibuchi, M. 1998. Detection of *Escherichai coli* O157 : H 7 In the Beef Marketed in Malaysia. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 1153 – 1156.

Ray, B. 1992. Bacteriocins of Starter Culture Bacteria as Food Preservatives. In Food Biopreservative of Microbial Origin. pp. 177 - 205. Ray, B and Daeschel, M. eds., USA : CRC Press.

Riley, L. W., Remis, R. S., Heigerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., abert, R. J., Olcott, E. S., Johnson, L. M., and Cohen, M. L. 1982. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* Serotype. New England J. Med. 308 : 681 – 685.

Roeling, W. F. M., Van- Verseveld. H. W. 1997. Growth, Maintenance and Fermentation Pattern of the Salt- Tolerant Lactic Acid Bacterium *Tetragenococcus halophila* in Anaerobic Glucose Limited Retention Cultures. Antonie – Van – Leewenhoek. 72 : 239 – 243.

Sakaguchi, K. and Mori, H. 1969. Comparative Study on *Pediococcus halophillus, P. Soyae, P. homari, P. urinae - equi* and Related Species. J. Gen and Appl. Microbiol. 15 : 159 - 167.

Santos, E. M. Gonzalez – Fernandez, C., Jaine, E. Rovira, J. 1997. Identification and Characterization of Lactic Acid Bacteria Isolated from Traditional Charrizo Made in Castilla – Leon. Food. Sci. Technol. Int. 3 : 21 – 29.

Sarkar, P. K., Sharmintha , B. and Banerjee, S. 1996. Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacterial Isolates Obtained from Natural Habitats. J.Food. Sci. and Technol. 33 : 231 – 233.

Schillinger, U. and Lucke, F. K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. Appl. Environ. Microbiol., 55 : 1901-1906.

Simpson, W. J. 1994. Comments on the Mode of Division of *Pediococcus* spp. Letter in Appl. Microbiol., 18 : 69 - 70.

Simpson, W. J. and Taguchi, H. 1995. The Genus Pediococcus with on the Genera Tetragenococcus and Aerococcus. In The genera of Lactic Acid Bacteria, p.125 -164. Wood, B. J. B. and Holzapfek, W.H., eds. Glasgow, U.K. : Blackie Academic And Professional.

Smith, R. R., Gordon, R. E. and Clark, F. E. 1952. Aerobic Spore Forming Bacteria. USDA Monograph. No 6.

Smith, J. L., Palumbo, S. A. and Walls, I. 1993. Relationships Between Foodborne Bacterial Pathens and Raactive Arthritides. J. Food . Safety., 13 : 209 - 230

Sneath, P. H. A., Mair,N. S. and Holt, J. H. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 2. Baltimore : Williams & Wilkins.

Spelhaug, S. R. and Harlander, S. K. 1989. Inhibition of Food Born Bacterial Pathogens by Bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. J. Food Prot. 52 : 856-812.

Steinkrus, H. K. 1992. Lactic Acid Fermentation. In Applications of Biotechonology to Traditional Fermented Foods. (ed. Gaden, E. L., Bokanga, M. Harlander, S. and Hesseltine, G. W.). pp. 43 - 51. Washington, D.C. : National Academy Press.

Tagg, J. R., Dahani, A. S., and Wannamaker, L. W. 1976. Bacteriocins of Gram - Positive. Bactriol Rev. 40 : 722 -756.

Tamang, J. P. and Nikkuni, S. 1996. Selection of Starter Culture for the Production of Kinema, a Fermented Soybean Food of the Himalaya. World J. Microbiol and Biotechnol., 12 : 629 – 635.

Tamang, J. P.and Sarkar, P. K. 1996. Microbiology of Meso a Traditional Fermented Bamboo Shoot Product . Int. J. Food. Microbiol. 29 : 49 – 58.

Vuyst, L. D. and Vandamme, E.J. 1994. Fermentation End - Products. In Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology. pp. 91-107. Belgium : Laboratory of Industrial Microbiology and Biocatalyst.

Whittenbury, R. 1964. Hydrogen Peroxide Formation and Catalase Activity in the Lactic Acid Bacteria. J. Gen. Microbiol., 35 : 13 - 26.

Yang, Z. , Suomalainen, T. Maeyrae – Maekinen, A. , Huttunen, E. 1997. Antimicrobial Activity of 2 – Pyrolidone – 5 – Carboxylic Acid Produce by Lactic Acid Bacteria , J. Appl. Environ. Microbiol., 60 : 786- 790.

ภาคผนวก ก

อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ อาหารทดสอบเชื้อ และวิธีการทดสอบ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ

1.1 BHI (Brain Heeart Infusion)

ประกอบด้วย

Calf Brains , Infusion from	200.0	กรัม
Beef Heart, Infusion form	250.0	กรัม
Bacto Heart , Infusion form	10.0	กรัม
Bacto Proteose Peptone	10.0	กรัม
Bactgo Dextrose	2.0	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม
Disodium Phosphate	2.5	กรัม

วิธีการ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 37 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ประมาณ 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 4 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ละลายให้สมบูรณ์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 120 -124 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.2 Mac. (Mac Conkey Agar)

ประกอบด้วย

Bacto Peptone	17.0	กรัม
Bacto Proteose Peptone	3.0	กรัม
Bacto Lactose	10.0	กรัม
Bacto Bile Salts No.3	1.5	กรัม
Sodium Chloride	5.0	กรัม

Bacto Agar	13.5	กรัม
Neutral Red	0.03	กรัม
Bacto Crytal Violet	0.001	กรัม

วิธีการ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ประมาณ 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.1 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นหลอมละลายสมบูรณ์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ 120 - 124 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.3 MRS Agar (De, Man Rogasa and Sharpe)

ประกอบด้วย

Bacto Beef Extract No.3	10 .0	กรัม
Bacto Beef Extract	10.0	กรัม
Bacto Yeast Extract	5 .0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Sobitan Monoleate Complex	1.0	กรัม
Ammonium Citrate	2 .0	กรัม
Sodium Acetate	5.0	กรัม
Magnesium Sulfate	2.0	กรัม
Mangannese Sulfate	0.05	กรัม
Potassium Phosphate , Dibasic	2.0	กรัม
Bacto Agar	15.0	กรัม

วิธีการ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 70 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ประมาณ 900 มิลลิลิตร ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นหลอมละลายสมบูรณ์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ 120-124 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.4 MRS broth (De, Man Rogasa and Sharpe) ประกอบด้วย

Bacto Beef Extract No.3	10 .0	กรัม
Bacto Beef Extract	10.0	กรัม
Bacto Yeast Extract	5.0	กรัม
Bacto Dextrose	20.0	กรัม
Tween 80	1.0	กรัม
Ammonium Citrate	2 .0	กรัม
Sodium Acetate	5.0	กรัม
Magnesium Sulfate	2.0	กรัม
Mangannese Sulfate	0.05	กรัม
Dipotassium Phosphate	2.0	กรัม

วิธีการ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 55 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ประมาณ 950 มิลลิลิตร ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.5 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตรละลายให้สมบูรณ์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันที่ 120-124 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.5 MSA (Mannitol Salt Agar)

ประกอบด้วย

Beef extract	1.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม

Sodium Chloride	75.0	กรัม
Mannitol	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Phenol Red	0.025	กรัม
Distilled Water	1.0	ลิตร

วิธีการ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 50 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ประมาณ 950 มิลลิลิตร ปรับ pH องอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.1 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นหลอมละลายสมบูรณ์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน ที่ 120-124 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

1.6 MYP (Mannitol Egg-York Polymyxin Agar)

ประกอบด้วย

Base

Beef extract	1.0	กรัม
Peptone	10.0	กรัม
Mannitol	10.0	กรัม
NaCl	10.0	กรัม
Phenol red	0.025	กรัม
Agar	15.0	กรัม
Distilled water	900	มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งหมด ต้มให้เดือด ปรับพีเอชให้ได้ 7.2 ± 0.2 แล้วแบ่งใส่ขวดขนาด 500 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อที่ 15 ปอนด์ / ตารางนิ้ว 121 องศาเซลเซียส เวลา 15 นาที

Polymyxin B solution 0.1 %

ละลายยา polymixin B sulfate ที่ 500 ,000 units ในน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ 50 มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ขวดขนาด 85 มิลลิลิตร ที่ 4 องศาเซลเซียส

Egg Yolk emulsion 50 %

ล้างไข่ให้สะเด็ดน้ำ แล้วนำไปแช่ 0.1 $HgCl_2$ 1 เสร็จแล้วนำไปแช่ใน 70 % ethanol 30 นาที แล้วทุบไข่เอาเฉพาะไข่แดงโดยใช้วิธีปราศจากเชื้อ นำไข่แดงไปใส่ 0.85 % Saline แล้วเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ควรใช้ภายใน 48 ชั่วโมง เมื่อต้องการใช้ นำ base ที่อุณหภูมิต่ำกว่า 50 องศาเซลเซียส จำนวน 225 มิลลิลิตร เติม polymyxin B solution 2.5 มิลลิลิตร และ egg yolk 12.5 มิลลิลิตร โดยวิธีปราศจากเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน แล้วเทใส่จานเลี้ยงเชื้อที่ปราศจาก เชื้อ 18 มิลลิลิตร ทิ้งให้แห้ง

1.7 SS Agar (Salmonella - Shigella Agar)

ประกอบด้วย

Bacto Beef Extract	5.0	กรัม
Bacto Proteose Peptone	5.0	กรัม
Bacto Lactose	10.0	กรัม
Bacto Bile Salts No: 3	8.5	กรัม
Sodium citrate	8.5	กรัม
Sodium thiosulfate	8.5	กรัม
Ferric Citrate	1.0	กรัม
Brilliant Green	0.33	มิลลิกรัม
Neutral red	0.025	กรัม
Bacto Agar	13.5	กรัม

วิธีการ

ชั่งอาหารเลี้ยงเชื้อ 60 กรัม ละลายในน้ำกลั่น ประมาณ 930 มิลลิลิตร ปรับ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 7.0 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส ปรับปริมาตรเป็น 1 ลิตร ให้ความร้อนจนวุ้นหลอมละลายสมบูรณ์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน

2. วิธีการทดสอบและสารเคมีที่ใช้ทดสอบ

2.1 การย้อมแกรม (gram staining)

สารเคมี

2.1.1 คริสตัลไวโอเลต (crystal violet)

ชั่งผลคริสตัลไวโอเลต 2 กรัม ละลายในเอทธานอลร้อยละ 9.5 ปริมาณ 20 มิลลิลิตร ละลายสารผสมให้เข้ากัน แล้วเติมสารละลายแอมโมเนียมออกซาเลต ร้อยละ1 ลงไป 80 มิลลิลิตร

2.1.2 สารละลายไอโอดีน (iodine)

ชั่งผงไอโอดีน 1 กรัม โปรตัสเซียมไอโอไดด์ 2 กรัม น้ำกลั่น 300 มิลลิลิตร ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา

2.1.3 สารละลายซาฟานีน (safranin)

สารละลายซาฟานีน 10 มิลลิลิตร (เตรียมโดยชั่งซาฟานีน 2.5 กรัม ในเอทธานอลร้อยละ 95 ปริมาณ 100 มิลลิลิตร) ผสมกับน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร

2.1.4 เอทธานอลร้อยละ 95

วิธีการ

(1) เกลี่ยเชื้อ (smear)บนสไลด์ที่แห้งและสะอาด ทิ้งไว้ให้แห้

(2) ยึดเชื้อ (fix) ด้วยการลนเปลวไฟ

(3) หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ย ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างน้ำ 2 - 3 วินาที เทน้ำออกให้หมด

(4) หยดสารละลายไอโอดีน ทิ้งไว้ 30 วินาที แล้วล้างน้ำ

(5) หยดเอทธานอลร้อยละ 95 เป็นเวลา 30 วินาที แล้วล้างน้ำ

(6) หยดสารละลายซาฟานีน 15 วินาที แล้วล้างน้ำ

(7) ซับน้ำบนสไลด์ให้แห้งก่อนดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ใช้ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส)

สารเคมี

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2)	3	กรัม
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิกรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากัน บรรจุขวดสีชาเก็บในตู้เย็น

วิธีการ

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 3 ลงบนโคโลนีที่มีอายุ 24 ชั่วโมง ที่เจริญบนอาหาร MRS agar ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้น แสดงว่าให้ผลบวก มีการสร้างเอนไซม์ คะตาเลส

ภาคผนวก ข

ตาราง 1 การเทียบเคียงแบคทีเรียแลกติก สกุล *Pediococcus* spp. ตาม Bergey 's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Sneath, Mair and Holt,1986)

Characteristics	1. *P. damnosus*	2. *P. parvulus*	3. *P. inopinatus*	4. *P. dextrinicus*	5. *P. pentosaceus*	6. *P. acidilactici*	7. *P. halophilus*	8. *P. urinaeequi*
Growth at								
35°C	−	+	+	+	+	+	+	+
40°C	−	−	−	+	+	+	−	+
50°C	−	−	−	−	−	+	−	−
Growth at								
pH 4.2	+	+	−	−	+	+	−	−
pH 7.5	−	+	d	+	+	+	+	+
pH 8.5	−	−	−	−	d	d	+	+
Growth in								
4% NaCl	−	+	+	+	+	+	d	+
6.5% NaCl	−	+	d	−	+	+	+	+
18% NaCl	−	−	−	−	−	−	+	−

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ นางอรตรี รอดเจริญ

วัน เดือน ปีเกิด 25 พฤศจิกายน 2515

วุฒิการศึกษา

วุฒิ	ชื่อสถาบัน	ปีการศึกษา
วิทยาศาสตรบัณฑิต(ศึกษาศาสตร์)	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตปัตตานี	2536

ทุนการศึกษา (ที่ได้รับระหว่างการศึกษา)

ทุนผู้ช่วยสอน