บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

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

ส่วนการตรวจหาแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารนั้น ผลปรากฏว่าตรวจไม่พบ faecal coliform ซึ่งแสดงถึงความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์ตามมาตรฐานชุมชนผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้ (ภาคผนวก ค) ที่ระบุว่าปริมาณ coliforms ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม เมื่อตรวจหาด้วย MPN method ส่วน *Staphylococcus* ที่ตรวจพบนั้น เป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทำให้เกิดโรค เนื่องจากให้ผลการทดสอบ coagulase negative อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *Bacillus* เป็นสายพันธุ์ ที่ตรวจพบตลอดกระบวนการหมัก รวมทั้งในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป ปริมาณระหว่าง 10^3-10^6 CFU/กรัม และจากการบ่งชี้โดยใช้ API 50 CHB system (ลุกมาน, 2549) พบว่าเป็น *Bacillus cereus* (73-98% identity) และ *Bacillus laterosporous* (85-86%) ซึ่งจะเห็นได้ว่าการเทียบเคียงความเหมือนกันในระดับ species

ยังให้ความเชื่อมั่นต่ำ จึงควรยืนยันการบ่งชี้ในระดับโมเลกุลโดยตรวจหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene แล้วเทียบเคียง (blast) กับฐานข้อมูลใน Gen bank และควรตรวจหา enterotoxin ของ *B. cereus* และ Staphylococcal enterotoxin โดยวิธี ELISA โดยใช้ชุดทดสอบ TECRA Diagnostic kit (Australia) เพื่อยืนยันผลความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้ต่อไป อย่างไรก็ตาม Han และคณะ (2004) ได้รายงานว่าตรวจพบ *B. subtilis* และ *B. cerues* ในเต้าหู้ยี้ที่ผลิตจากประเทศจีน ปริมาณน้อยกว่า 10^3 CFU/กรัม ซึ่งไม่เกินกำหนดขององค์การอาหารและยา (FDA) ของสหรัฐอเมริกา ซึ่งได้กำหนดผลิตภัณฑ์อาหารเป็นพืชปนเปื้อน *B. cereus* มีปริมาณเชื้อไม่มากกว่า 10^6 CFU/กรัม อย่างไรก็ตาม Shi และFung (2000) ได้รายงานว่าการเติมเชื้อก่อโรคทางเดินอาหาร เช่น *E. coli* O157 : H7, *Salmonella* typhi, *S. aureus* และ *L. monocytogenes* ปริมาณ 5 log CFU/g ลงบนเต้าหู้ตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการทำเต้าหู้ยี้ก่อนใส่เชื้อรา *Actinomucor elegans* พบว่าเชื้อแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเป็น 7-9 log CFU/g ใน 2 วันแรก และเมื่อเติมเกลือ 10-12% NaCl พบว่าปริมาณเชื้อก่อโรคจะค่อยๆ ลดลง และตรวจไม่พบภายใน 1 เดือนของการหมัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเติมเกลือความเข้มข้นระดับปานกลางนี้สามารถควบคุมและยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางอาหารได้ดี

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

พบว่าแบคทีเรียแลกติก ผลิต D-lactic และ acetic acid ซึ่งทำให้เกิดรสเปรี้ยว และปรับลด pH ซึ่งสามารถควบคุมกิจกรรมของแบคทีเรียอื่นๆ ส่วนโปรตีนในกล้ามเนื้อถูกย่อยสลายเป็น peptides ส่วน lipids ถูกย่อยเป็น fatty acids โดย endogeneous enzymes และเอนไซม์จากแบคทีเรีย (Montel *et al*., 1998). นอกจากนี้ยังได้มีการรายงานว่าในเต้าหู้ยี้แดงและเต้าหู้ยี้ขาวที่มีกลิ่นรสที่ดีนั้นประกอบด้วย ester 22 ชนิด, alcohol 18 ชนิด, ketones 7 ชนิด, aldehydes 3 ชนิด, pyrazines 2 ชนิด, phenol 2 ชนิด และ volatile compounds (Hwan and Chou, 1999)

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

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

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

ยับยั้งเชื้อหายไปครึ่งหนึ่งเมื่อทดสอบกับ pepsin และ trypsin (Alvarado *et al.*, 2005), *Leuconostoc mesenteroides* sub sp. *dextranicum* ST 99 ผลิต mesenteriocin ST99 ซึ่งสามารถยับยั้ง *Bacillus subtilis, Enterococcus faecalis, Lactobacillus* spp., *Lactococcus lactis, Listeria innocoa, Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus thermophilus* โดยแบคเทอริโอซินสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อเมื่อทดสอบกับ protease IV และ pronase E แต่ยังคงมีกิจกรรมยับยั้งเชื้อเมื่อทดสอบกับ α-amylase, SDS, Tween 20, Tween 80, urea, Triton X-100,N-laurylsurcosin, EDTA และ phenylmethylsulfonylfluoride (Todorov and Dicks, 2004) *Lactococcus lactis* ที่แยกได้จากน้ำนมของคน ผลิต nisin ที่สามารถยับยั้ง *S. aureus* โดย nisin เป็นแบคเทอริโอซินที่นิยมใช้ในอุตสาหกรรมผลิตอาหารเพื่อป้องกันแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (Heikkila and Saris, 2003) *Lactococcus lactis* ที่แยกจาก Tunisian cheese ผลิต Lactococcin MMT24 ซึ่งสามารถยับยั้งแบคทีเรียแลกติกที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกัน ได้แก่ *Lactobacillus* ssp. และ *Lactobacillus lactis* (Ghrairi *et al.*, 2005) *Lactobacillus salivarius* ผลิตแบคเทอริโอซิน OR-7 ให้โซนยับยั้ง *Campylobacter jejuni* โดยแบคเทอริโอซินสูญเสียความสามารถในการยับยั้งเมื่อทดสอบร่วมกับ β-chymotrypsin, proteinase K และ papain แต่ยังคงให้โซนยับยั้งเมื่อทดสอบกับ lysozyme และ lipase และมีคุณสมบัติทนร้อนได้ถึง 90°C (Stern *et al.*, 2006) และแบคเทอริโอซินของ *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ที่สกัดด้วยอะซิโตน สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งกรัมบวกและกรัมลบ เช่น *Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Pseudomonas* ได้ดี แต่ยับยั้ง *Clostridium perfringens* และ *Vibrio parahaemolyticus* ได้ดีปานกลาง โดยแบคเทอริโอซินที่สกัดได้สูญเสียความสามารถในการยับยั้งเชื้อเมื่อทดสอบกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน (Jamuna and Jeevaratnam, 2004)

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

lactic acid bacteria ซึ่งมีความสามารถในการหมักน้ำตาล แล้วผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลัก แต่ไม่ผลิตคาร์บอนไดออกไซด์

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

แร่ธาตุที่ตรวจพบในตัวอย่างเต้าหู้ยี้เป็นตัวบ่งบอกถึงคุณภาพและแร่ธาตุองค์ประกอบของเต้าหู้ยี้ ซึ่งจากการศึกษาตรวจหาปริมาณแร่ธาตุ 12 ชนิด พบว่าธาตุที่พบจำนวนมากที่สุดคือ Mg และ Ca โดยในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้มีการใช้สาร $MgSO_4$ หรือ $CaSO_4$ เพื่อตกตะกอนโปรตีน และอีกประการหนึ่งคือ ในถั่วเหลืองมีปริมาณ Mg และ Ca จำนวนมาก (Moraghan *et al.*, 2006) ส่วนธาตุที่พบเป็นอันดับ 2 คือ Li, Fe, Cu, Mn, Zn และ Al ซึ่งแร่ธาตุเหล่านี้สามารถบ่งชี้ถึงคุณภาพและการปลอมปนของเต้าหู้ยี้ และถ้าพบเป็นจำนวนมากอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ เช่น Al และ Cu ถ้าได้รับเป็นระยะเวลานานอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงนำไปสู่โรคทางระบบประสาท เช่น Alzheimer, Parkinson และ Prion หรือโรคอีกชนิดหนึ่งที่เกิดจาก Cu คือ Wilson ซึ่งเกิดขึ้นเนื่องจากร่างกายไม่สามารถขับ Cu ออกจากร่างกายได้และจะสะสมไว้ที่เนื้อเยื่อตับ (Battershill, 1995; Campbell *et al.*, 1999; Kitzberger *et al.*, 2005; Carlson *et al.*, 2007) ส่วนธาตุที่พบปริมาณน้อยได้แก่ Ni, As, Pb และCd โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Cd, Pb และ As เป็นธาตุที่

ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและเชื่อมโยงกับห่วงโซ่อาหารซึ่งถ้ารับประทานสะสมจะเป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์ (Yin *et al.*, 2005) อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปยังคงมีคุณภาพที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค เนื่องจากโลหะแร่ธาตุมีปริมาณไม่เกินกำหนดมาตรฐานในอาหาร (ประเภทอาหารทะเล) ของสหภาพยุโรป (commission regulation (EC) No.221/2002) ซึ่งกำหนดค่าสูงสุดของโลหะหนักเพียง 3 ชนิดได้แก่ Pb, Cd และ Hg ดังนี้ 1.5, 0.5 และ 1.0 mg/kg wet weight (http://europa.eu.int/eur-lex/pri/en/oj/dat/2002/l_037/l_03720020207en00040006.pdf, May 4, 2007)

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

ชาคริยา

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

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

สุภลักษณ์, 2549

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

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

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

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

Chou, C.C., Ho, F.M. and Tsai, C.S. 1988. Effects of Temperature and Relative Humidity on the Growth of and Enzyme Production by Actinomucor taiwanensis during Sufu Pehtze Preparation. Appl Environ Microbiol. 54: 688-692.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Makras, L.a.D.V., L. 2006. The in vitro inhibition of Gram-negative pathogenic bacteria by bifidobacteria is caused by the production of organic acids. International Dairy Journal. 16: 1049-1057.

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

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

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

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

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

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

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

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