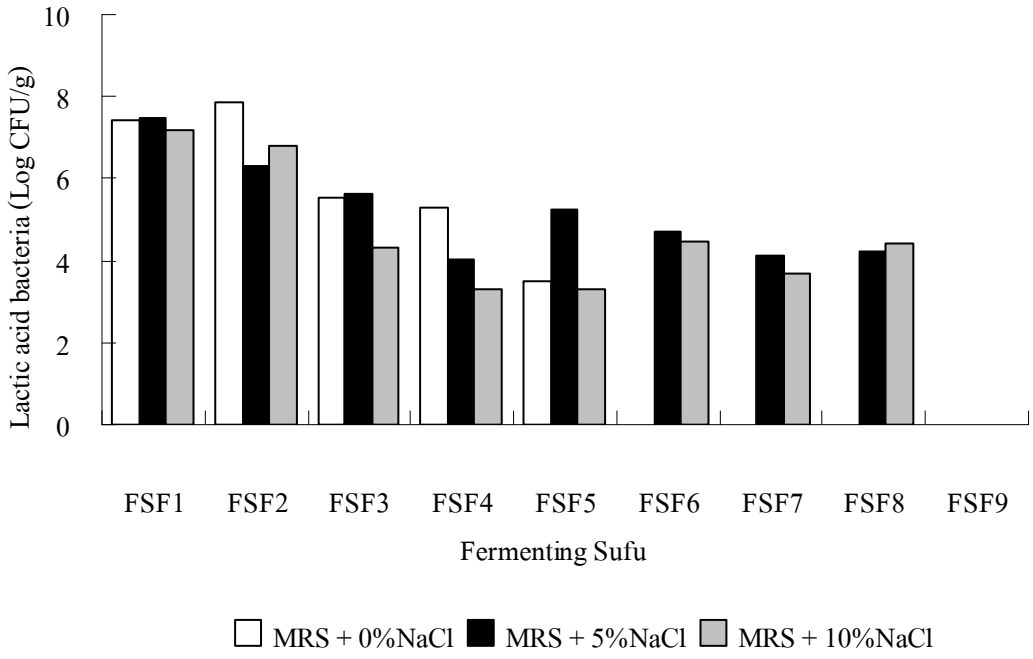
# บทที่ 3

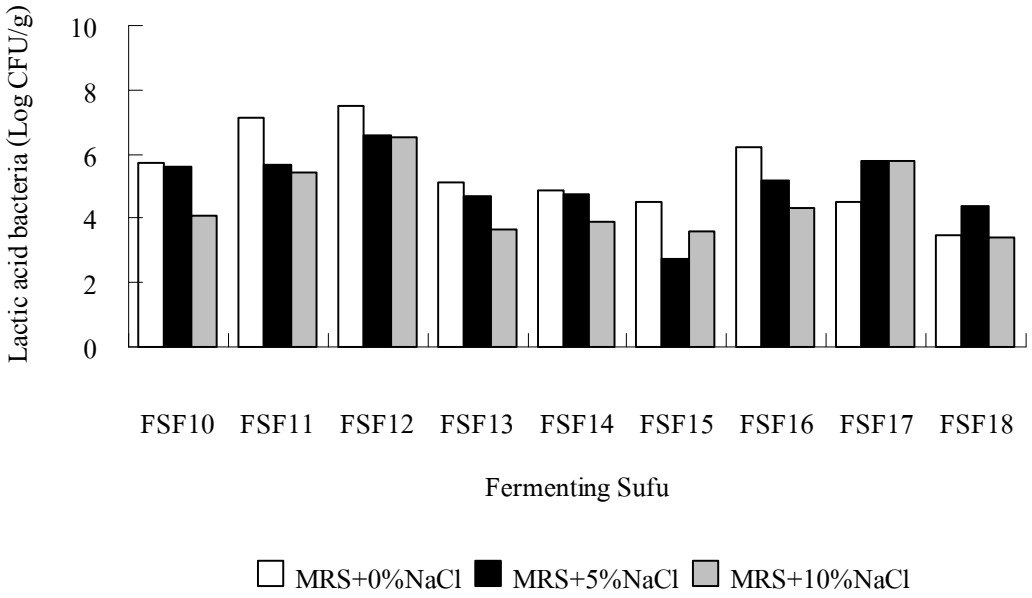
## ผลการทดลอง

### 1. การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

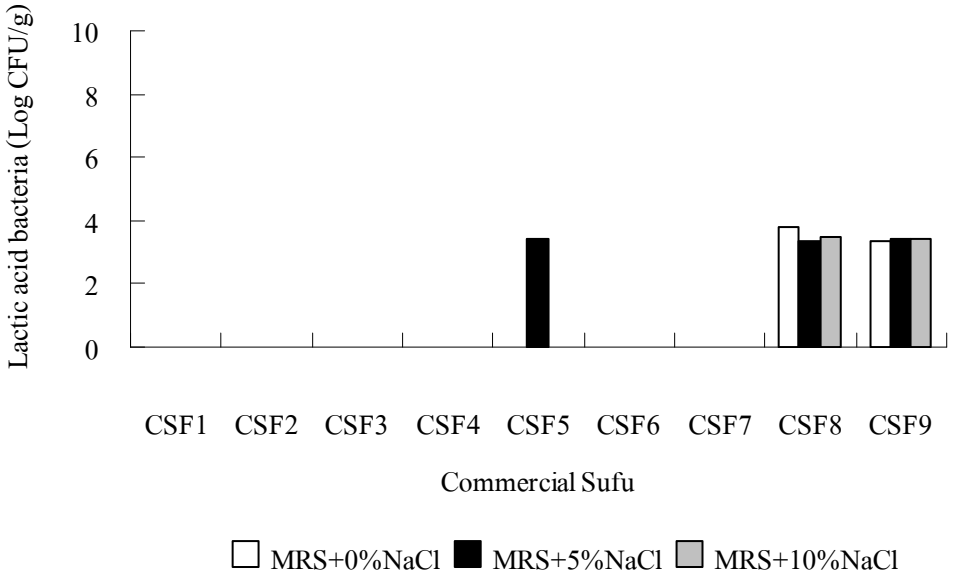
การตรวจหาปริมาณแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก บนอาหาร MRS agar ที่เติม 5 mg% sodium azide, 0.04% bromocresol purple และเติมเกลือ 0%, 5% และ 10% (รูปที่ 6) พบว่าแบคทีเรียแลกติกมีปริมาณระหว่าง $3.0 \times 10^3$ ถึง $7.0 \times 10^7$ CFU/g, $1.1 \times 10^4$ ถึง $3.0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



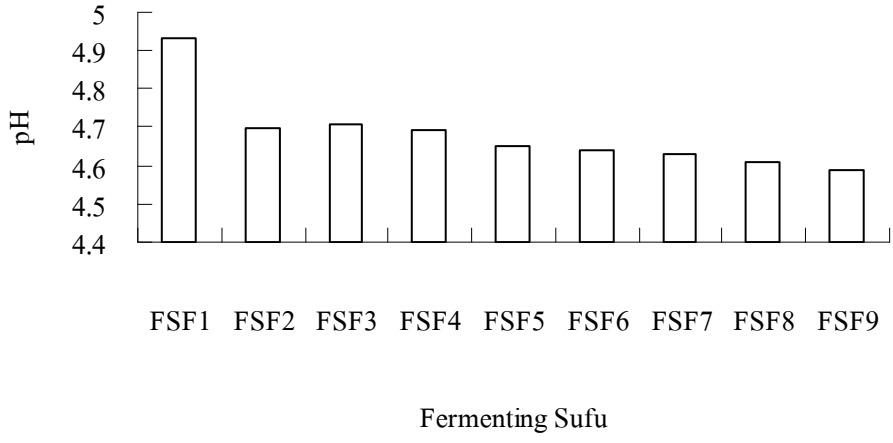

**รูปที่ 6** ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักเดียวกันที่เพาะเลี้ยงบน MRS agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3-5 วัน FSF1 (1 เดือน), FSF2 (2 เดือน), FSF3 (3 เดือน), FSF4 (4 เดือน), FSF5 (5 เดือน), FSF6 (6 เดือน), FSF7 (7 เดือน), FSF8 (8 เดือน) และ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




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



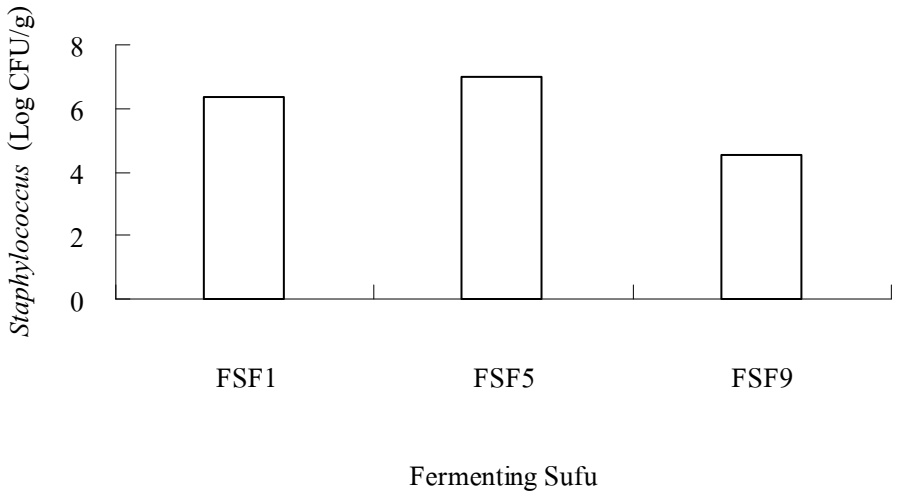

**รูปที่ 8** ปริมาณแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่เพาะเลี้ยงบน MRS agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นต่างๆกัน บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 3-5 วัน CSF1 (เต้าหู้ยี้เหลือง อ. เมือง จ. สงขลา), CSF2 (เต้าหู้ยี้แดง ตราเด็กขี่กิเลน จ. สมุทรสาคร), CSF3 (เต้าหู้ยี้แดง จีน), CSF4 (เต้าหู้ยี้แดง กรุงเทพมหานคร), CSF5 (เต้าหู้ยี้เหลือง ไต้หวัน), CSF6 (เต้าหู้ยี้เหลือง จีน), CSF7 (เต้าหู้ยี้แดง จีน), CSF8 (เต้าหู้ยี้เหลือง ตรา New sun จีน) และ CSF9 (เต้าหู้ยี้เหลือง ไต้หวัน)



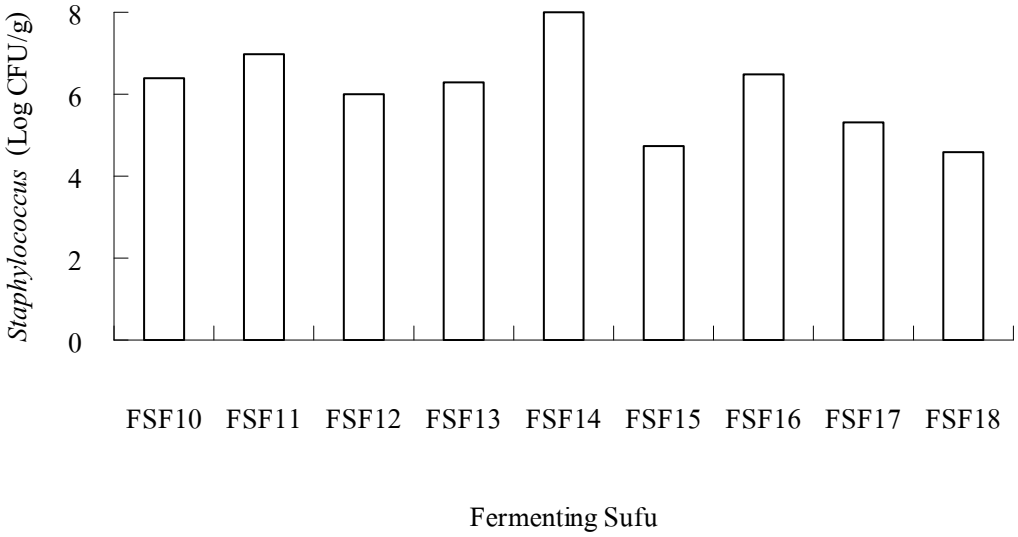

**รูปที่ 9** การเปลี่ยนแปลงของความเป็นกรดด่าง (pH) ของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ ตั้งแต่เริ่มต้นกระบวนการหมักจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมัก

**2. การตรวจหาแบคทีเรียที่อาจก่อโรคในทางเดินอาหาร**

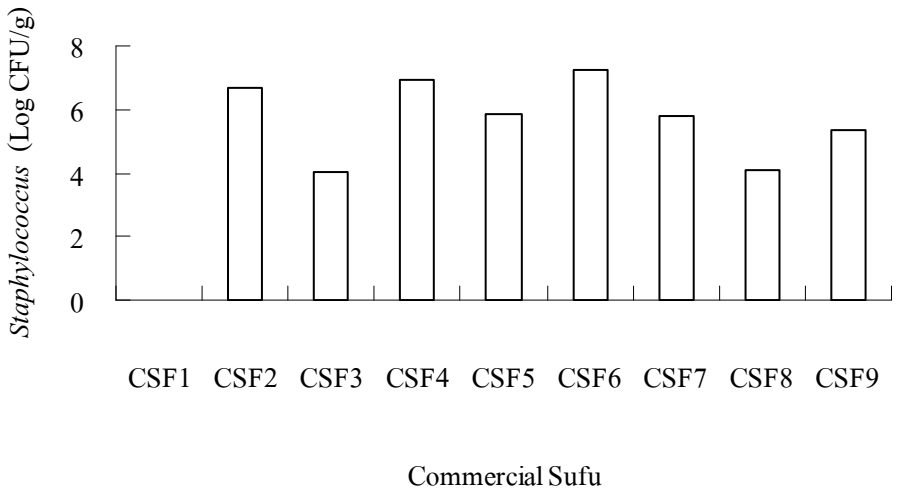
การตรวจหาเชื้อแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหารในตัวอย่างเต้าหู้ยี้พบว่าในกระบวนการหมักตรวจไม่พบ faecal coliform บนอาหาร MacConkey agar และพบว่า ไม่มีหลอดใดให้ก๊าซใน Durham tube (ไม่ได้แสดงข้อมูล) เมื่อตรวจยืนยันด้วยวิธี MPN method (presumptive and confirm test) แต่พบเชื้อ *Staphylococcus* บนอาหาร Mannitol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



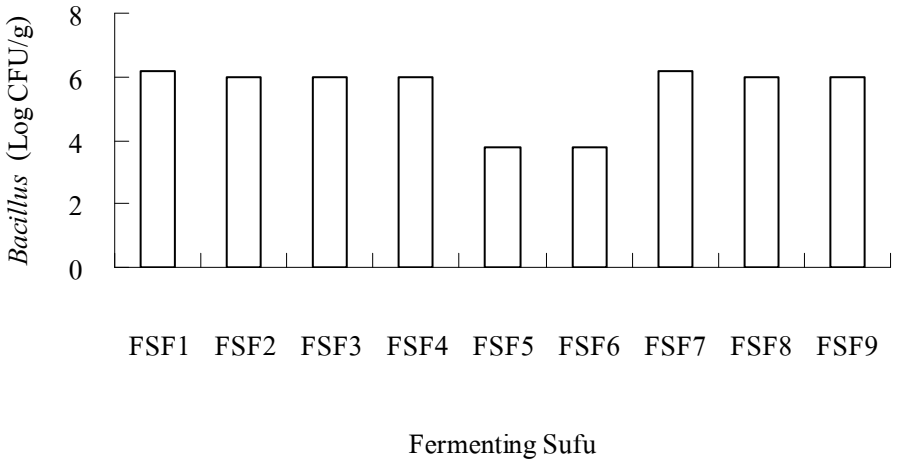

**รูปที่ 10** ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. FSF1 (1 เดือน), FSF5 (5 เดือน) และ FSF9 (9 เดือน)



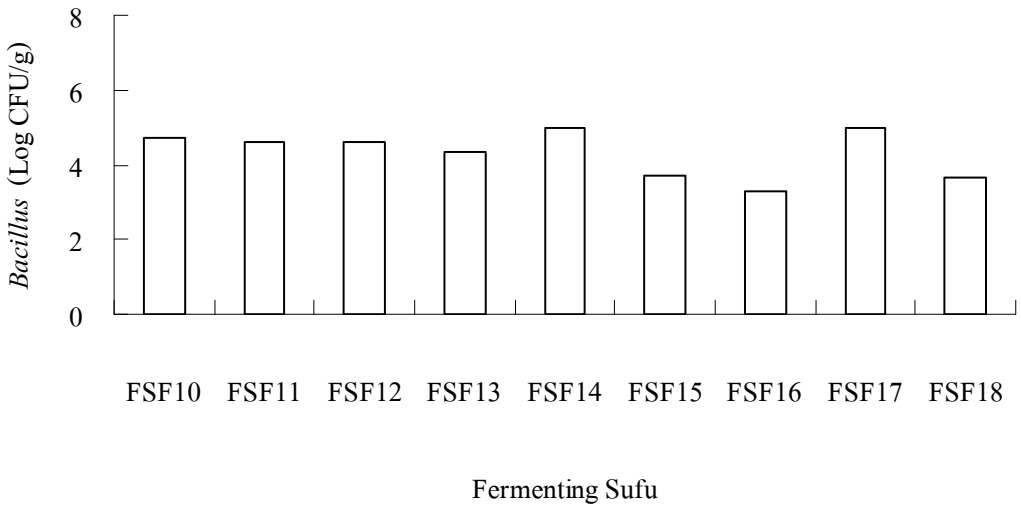

**รูปที่ 11** ปริมาณเชื้อ *Staphylococcus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กันที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



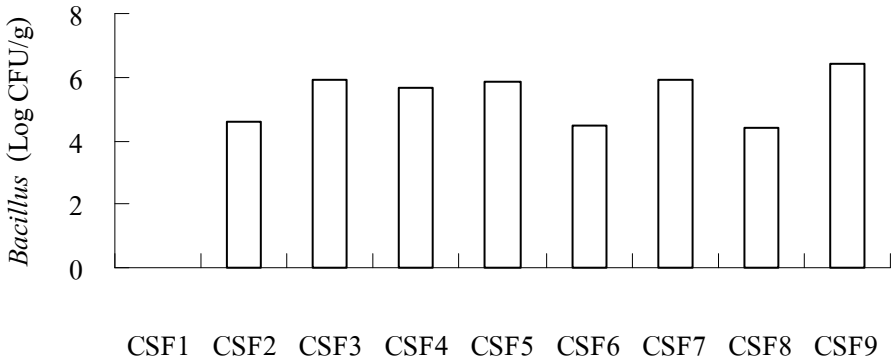

**รูปที่ 12** ปริมาณ *Staphylococcus* ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MSA บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



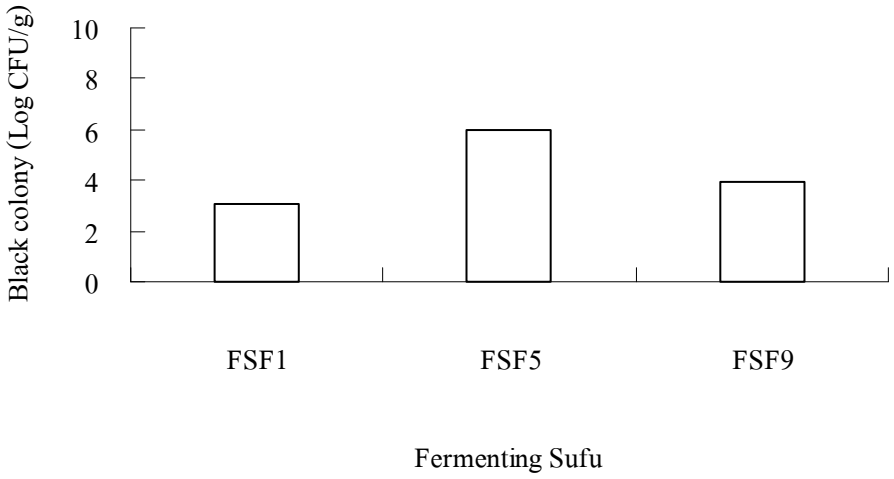

**รูปที่ 13** ปริมาณเชื้อ *Bacillus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MYP agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



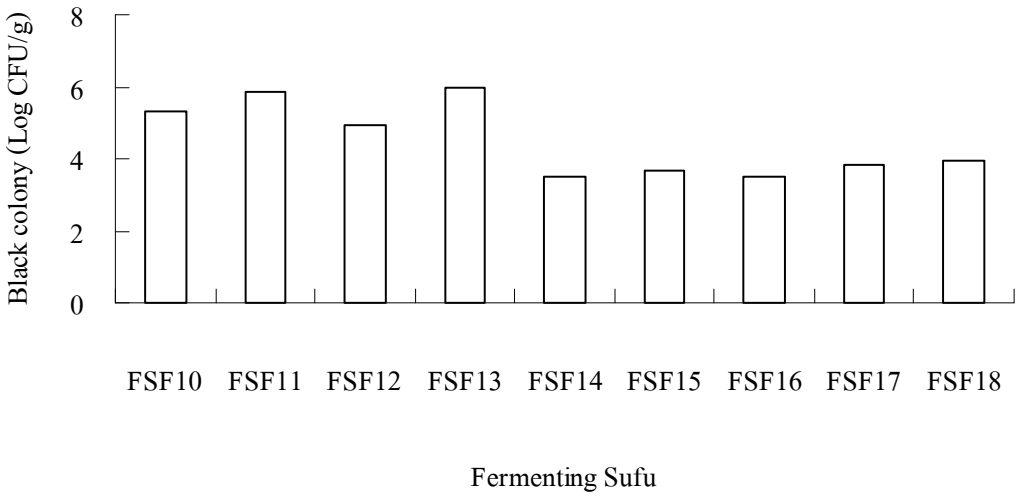

**รูปที่ 14** ปริมาณเชื้อ *Bacillus* ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กันที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MYP agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.



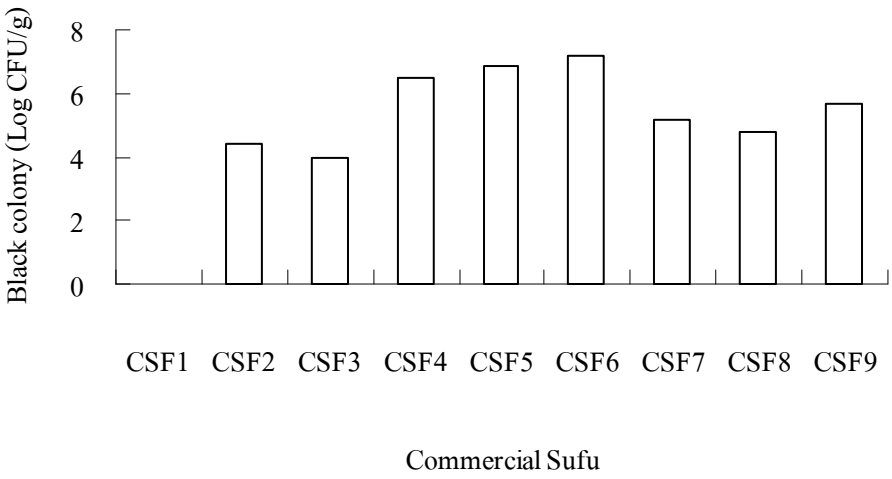

**รูปที่ 15** ปริมาณ *Bacillus* ในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MYP agar ที่เติมเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.




**รูปที่ 16** ปริมาณ Black colony ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Oxford agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม. FSF1 (1 เดือน), FSF5 (5 เดือน) และ FSF9 (9 เดือน)




**รูปที่ 17** ปริมาณ Black colony ในกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้จากถังหมักต่างๆ กันที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร Oxford agar บ่มที่อุณหภูมิ 35°C เป็นเวลา 24-48 ชม.




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

**3. การเติบโตของแบคทีเรียแลกติกบนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้นต่าง ๆ กัน**

แบคทีเรียแลกติกที่แยกจากตัวอย่างเต้าหู้ยี้มีทั้งหมด 126 สายพันธุ์ โดยการคัดเลือกจากลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันบนอาหาร MRS agar และให้ผลลบกับการทดสอบ catalase และเมื่อนำแบคทีเรียแลกติกไปทดสอบการเติบโตบนอาหาร MRS agar ที่เติมเกลือความเข้มข้น 0, 5 และ 10% (ตารางที่ 3) พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 23 สายพันธุ์ (18.3%) เติบโตได้ดีบนอาหารที่ไม่มีการเติมเกลือและมีเกลือ 5% มี 60 สายพันธุ์ (47.6%) เติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือ 0, 5 และ 10% ซึ่งแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้จัดเป็น Halotolerant และมีแบคทีเรียแลกติกเพียง 43 สายพันธุ์ (34.1%) ที่ไม่สามารถเติบโตได้บนอาหารที่ไม่เติมเกลือ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกเหล่านี้จัดเป็น Halophilic และไม่มีแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ใดที่เติบโตได้เฉพาะบนอาหารที่ไม่เติมเกลือ

**ตารางที่ 3** การเติบโตของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้บน MRS agar ที่มีเกลือความเข้มข้นต่างๆ กัน

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

**4. การคัดแยกชนิดของ probiotic lactic acid bacteria**

4.1 การทนต่อเกลือน้ำดี

การทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดีทำโดยนำแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักและเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปรวม 126 สายพันธุ์ มาเลี้ยงในอาหาร MRS broth เป็นเวลา 24 ชม. แล้วนำมาเพาะเลี้ยง ลงบนอาหาร MRS agar ที่มีการเติมเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.15% และ 0.3% (ตารางที่ 4) จากการทดลองพบว่าแบคทีเรียแลกติกทุกสายพันธุ์ (100%) สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.15% และมี 117 สายพันธุ์ (92.9%) จากทั้งหมด 126 สายพันธุ์ที่สามารถเติบโตได้ในอาหารที่มีเกลือน้ำดีเข้มข้น 0.3%

4.2 การทนกรด

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

4.3 การทดสอบการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

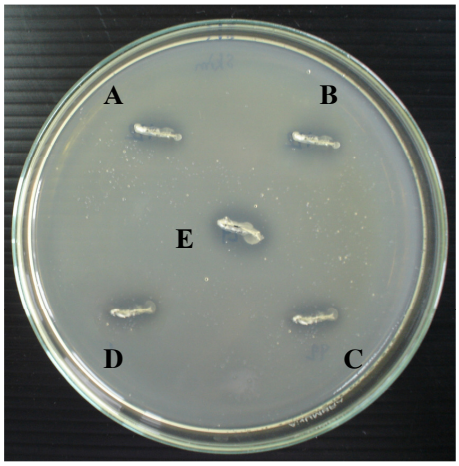
การทดสอบย่อยโปรตีน (ตารางที่ 4) (รูปที่ 19) ไขมัน และแป้ง พบว่า แบคทีเรียแลกติกสามารถย่อย skim milk หรือ gelatin ได้ 50 สายพันธุ์ (39.7%) โดยมี degree of hydrolysis อยู่ระหว่าง 1.3 - 12 ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ (1.6%) สามารถย่อย tributyrin คือ PS1232 และ PS1233 โดยมี degree of hydrolysis เท่ากับ 2.4 และ 2.3 แต่ไม่มีสายพันธุ์ใดที่สามารถย่อยแป้งได้

4.4 การทดสอบการเติบโตในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

แบคทีเรียแลกติกที่แยกทุกสายพันธุ์ที่แยกได้สามารถเติบได้ทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) (ตารางที่ 4)

**ตารางที่ 4** การคัดแยกชนิดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากเต้าหู้ยี้

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




NA + 1% skim milk

**รูปที่ 19** การผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS12102 (A), PS1295 (B) PS1248 (C), PS1244 (D) และ PS1253 (E)

**5. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์**

การทดสอบแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ โดยวิธี Agar spot assay (ตารางที่ 5) (รูปที่ 20) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งแบคทีเรียกรัมบวกและแบคทีเรียกรัมลบ โดยสามารถยับยั้ง *E. coli* ATCC25922 (96.0%), *S. aureus* ATCC25923 (79%), *B. cereus* TISTR687 (91.3%) และ *L .monocytogenes* DMST4553 (88.1%)

ส่วนการนำส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกมาทดสอบการยับยั้ง โดยวิธี Agar well diffusion assay (รูปที่ 21) พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกเพียง 2 สายพันธุ์ ได้แก่ แบคทีเรียแลกติก PS1240 และ PS1243 ที่สามารถยับยั้งการเติบโตของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ *L. monocytogenes* DMST4553 เท่านั้น โดยให้โซนการยับยั้ง 35.5 มม. และ 16.3 มม. ตามลำดับ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 สายพันธุ์นั้นเป็นแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ในเดือนที่ 3 และเป็นแบคทีเรียทนเกลือความเข้มข้น 5%

**ตารางที่ 5** ผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้โดยวิธี Agar spot assay

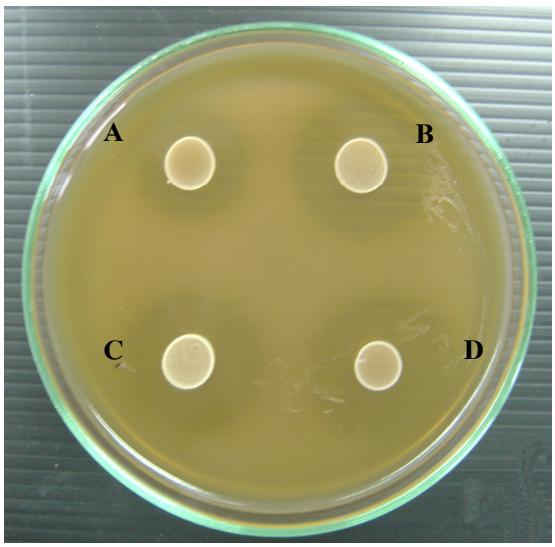
| แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ | จำนวนสายพันธุ์ที่ทดสอบ | จำนวนสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ | | | | %ของสายพันธุ์ที่ยับยั้งได้ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | + | ++ | +++ | ++++ | |
| *E. coli* ATCC25922 | 126 | 36 | 47 | 37 | 1 | 96.0 |
| *S. aureus* ATCC25923 | 126 | 38 | 35 | 25 | 2 | 79.4 |
| *B. cereus*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

\+ คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 10 มม.

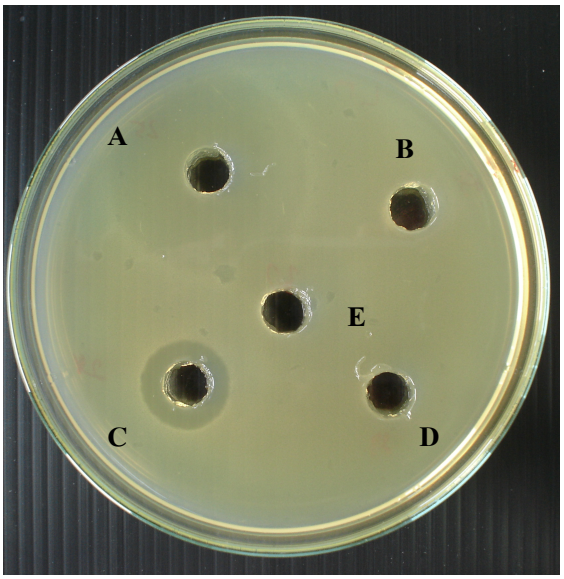
++ คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 20 มม.

+++ คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 30 มม.

++++ คือ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสมากกว่า 40 มม.




**รูปที่ 20** ผลการยับยั้ง *Escherichia coli* ATCC25922 ของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1234 (A), PS1238 (B), PS1240 (C) และ PS1241 (D) โดยวิธีการยับยั้งบนอาหารแข็ง (Agar spot assay)




**รูปที่ 21** ผลการยับยั้ง *Listeria monocytogenes* DMST4553 ของ culture broth ที่ได้จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1240 (A), PS1242 (B), PS1243 (C), PS1253 (D) และ PS1254 (E) โดยวิธี Agar well diffusion assay

**6. การบ่งชี้ชนิดของสารยับยั้ง**

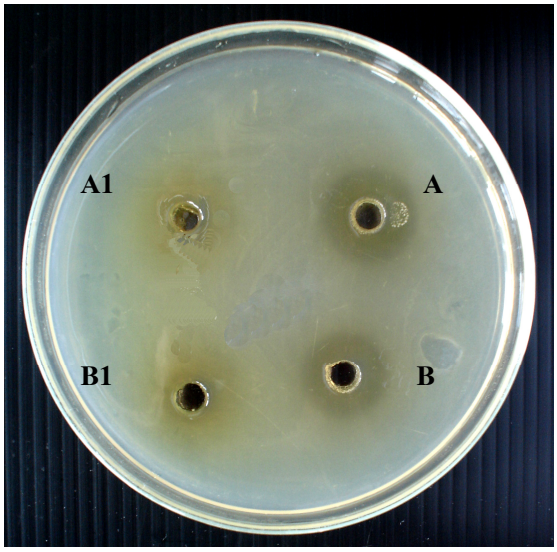
การบ่งชี้ชนิดสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติก PS1240 และ PS1243 โดยการนำส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกทั้ง 2 สายพันธุ์ มาเพิ่มความเข้มข้น 10 เท่า โดยการทำ Lyophilize แล้วนำมาปรับ pH เป็นกลางเพื่อกำจัดสารยับยั้งที่เกิดจากกรดและไม่ปรับ pH มาทดสอบร่วมกับเอนไซม์ย่อยโปรตีน แป้ง และไขมัน แล้วนำมาทดสอบสารยับยั้งที่เหลืออยู่โดยวิธี Agar well diffusion (ตารางที่6) (รูปที่ 22) พบว่าส่วนใสของแบคทีเรียแลกติกทั้งสองสายพันธุ์ไม่เกิดโซนยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST4553 เมื่อปรับ pH ของส่วนใส แสดงว่าฤทธิ์ในการยับยั้งเกิดจากกรด และไม่พบแบคเทอริโอซินและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เมื่อทดสอบส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH กับเอนไซม์ชนิดต่างๆ เนื่องจากโซนยับยั้ง *L. monocytogenes* DMST4553 ของส่วนใสที่บ่มร่วมกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ มีขนาดเท่ากับส่วนใสที่ไม่ได้บ่มร่วมกับเอนไซม์ซึ่งใช้เป็น control (ตารางที่ 7) (รูปที่ 23)

**ตารางที่ 6** ผลการทดสอบสารยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ปรับ pH

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

[a]ชุดควบคุม หมายถึง ส่วนใสที่ปรับ pH และไม่ได้ทดสอบร่วมกับเอนไซม์

[b]ชุดทดสอบ หมายถึง ส่วนใสที่ปรับ pH และทดสอบร่วมกับเอนไซม์



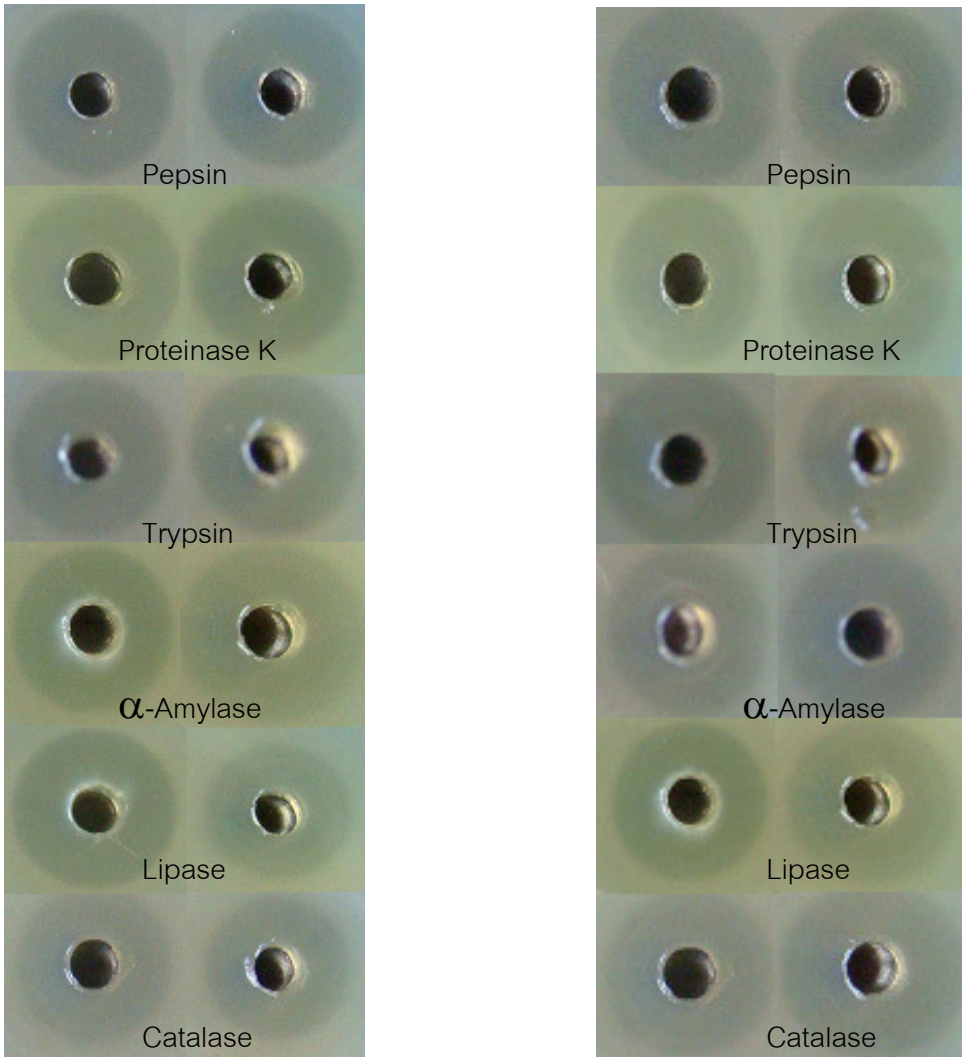

**รูปที่ 22** การทดสอบสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกกับ *L. monocytogenes* DMST4553 โดยวิธี agar well diffusion assay PS1240 A: ก่อนปรับ pH, A1: หลังปรับ pH และสายพันธุ์ PS1243 B: ก่อนปรับ pH และ B1: หลังปรับ pH

**ตารางที่ 7** ผลการทดสอบสารยับยั้งของน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่ไม่ได้ปรับ pH

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

[a]ชุดควบคุม หมายถึง ส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH และไม่ได้ทดสอบร่วมกับเอนไซม์

[b]ชุดทดสอบ หมายถึง ส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH และทดสอบร่วมกับเอนไซม์




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

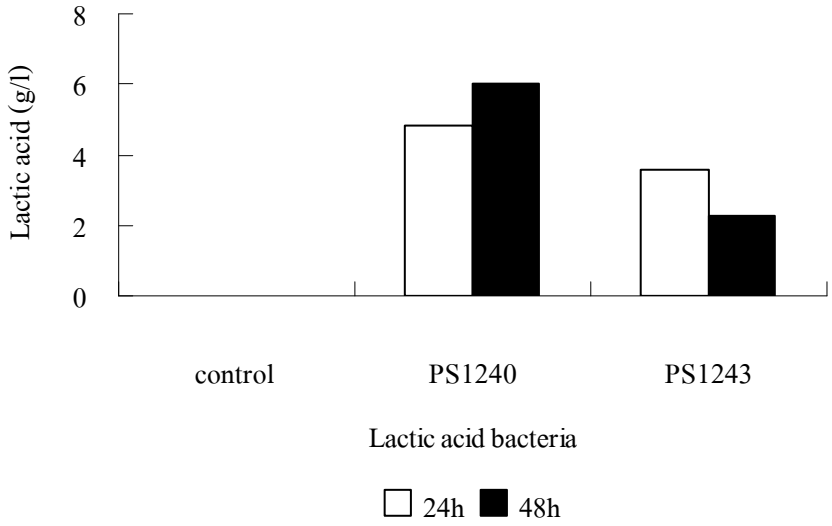
**รูปที่ 23** การทดสอบสารยับยั้งของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1240 (A) และ PS1243 (B) กับเชื้อ *L. monocytogenes* DMST4553 โดยวิธี Agar well diffusion assay หลังจากบ่มร่วมกับเอนไซม์เป็นเวลา 2 ชม.

Test หมายถึง ส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH แล้วทดสอบร่วมกับเอนไซม์

Control หมายถึง ส่วนใสที่ไม่ได้ปรับ pH และไม่ได้ทดสอบร่วมกับเอนไซม์

**7. การตรวจหา organic acid**

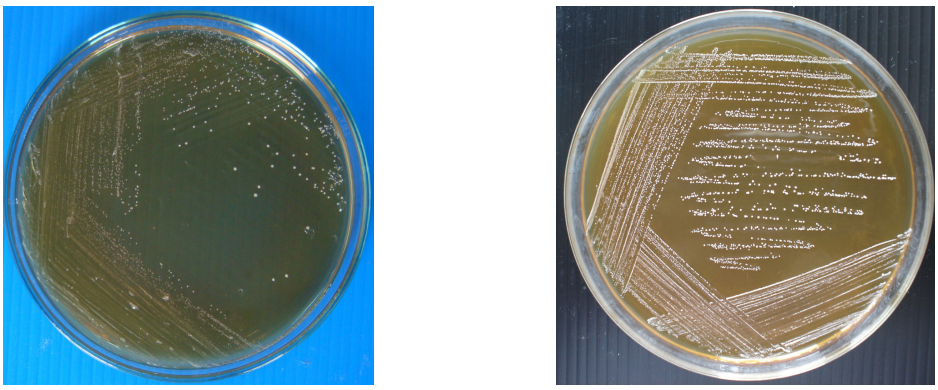
เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1240 และ PS1243 มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 สายพันธุ์ และส่วนใสของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติก สองสายพันธุ์นี้มีสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *L. monocytogenes* DMST4553 จึงนำแบคทีเรียแลกติกทั้งสองสายพันธุ์ มาเลี้ยงใน MRS broth เป็นเวลา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




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

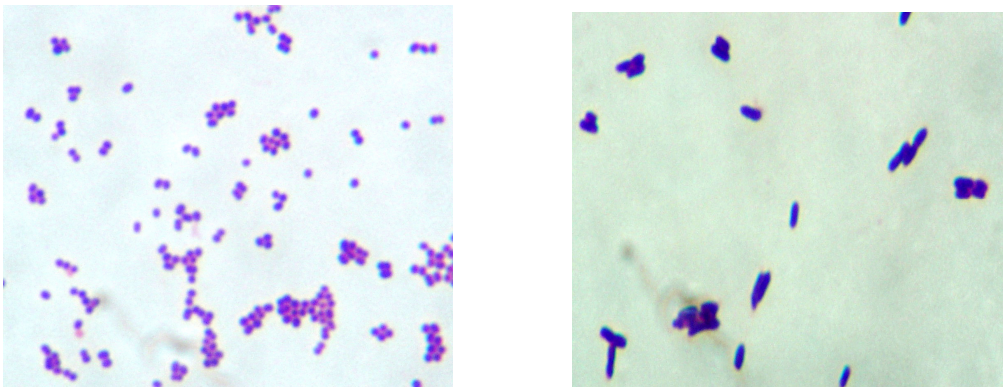
**8. การระบุชนิดแบคทีเรียแลกติก**

การบ่งชี้เพื่อระบุชนิดแบคทีเรียแลกติก ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้จำนวน 126 สายพันธุ์ ทำโดยการทดสอบทางกายภาพและทางชีวเคมี ดูลักษณะโคโลนี (รูปที่ 25) ย้อมติดสีกรัมบวก (รูปที่ 26) ทดสอบการเติบโตที่อุณหภูมิ 10°C และ 45°C ทดสอบการเติบโตในอาหารที่มี pH 4.4 และ pH 9.9 ทดสอบการเติบโตในอาหารที่มีเกลือ 6.5% และ 18% ผลปรากฏว่าสามารถจำแนกเป็นแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus* จำนวน 67 สายพันธุ์ (53.17%) จำแนกเป็น *Lactobacillus* ที่แยกจากกระบวนการหมัก 48 สายพันธุ์ จากก้อนเต้าหู้ (tofu) 9 สายพันธุ์ และจากเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป 10 สายพันธุ์ และจำแนกเป็น *Pediococcus* 59 สายพันธุ์ (46.83%) โดยจำแนกเป็น *Pediococcus* ในกระบวนการหมัก 58 สายพันธุ์ และในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 8) ทุกสายพันธุ์หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแต่ไม่สร้างแก๊สจึงจัดเป็น homofermentative lactic acid bacteria ดังแสดงตัวอย่างการทดสอบของแบคทีเรียแลกติก 10 สายพันธุ์ และเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์มาตรฐาน (ตารางที่ 9) หลักการคัดเลือกแบคทีเรียแลกติก 10 สายพันธุ์ดังกล่าว โดยอาศัยคุณสมบัติ probiotic และมีศักยภาพในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคในทางเดินอาหาร รวมทั้งความสามารถในการผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน หรือย่อยไขมัน เพื่อบ่งชี้ในระดับ species โดยการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรต โดย API 50 CHL test โดยใช้ *Lactobacillus plantarum* TISTR862 เป็นสายพันธุ์มาตรฐานเป็นตัวเปรียบเทียบ (ตารางที่ 9 และ 10) (รูปที่ 27) แล้วนำผลที่ได้ไปเทียบเคียงชนิดโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ API Web Stand Alone V. 1.1.0 (ตารางที่ 11) เป็น *Lactobacillus curvatus* (99.4% identity) 3 สายพันธุ์ (PS1240, PS1241, PS1243) *Lactobacillus delbrueckii* (92.4% identity) 3 สายพันธุ์ (PS1287, PS12102, LPS1203) *Pediococcus* sp. (98.6, 94.5 และ 91.8% identity) 3 สายพันธุ์ (PS1231, PS1270, CPS1210) และ *Lactobacillus plantarum* (99.9% identity) 1 สายพันธุ์ (LPS1203) อย่างไรก็ตามเมื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยวิธีการตรวจหาลำดับเบสของ 16S rRNA (รูปที่ 28) พบว่า *Lactobacillus curvatus* PS1240 (99.4% identity) เป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus acidipiscis* (99% identity) และ *Pediococcus* PS1231 เป็น *Tetragenococcus halophilus* (99% identity)



(A) (B)

**รูปที่ 25** ลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ PS1231 (A) และ PS1243 (B) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหาร MRS agar บ่ม 35°C เป็นเวลา 48 ชม.



(A) (B)

**รูปที่ 26** รูปร่าง การจัดเรียงตัว และการติดสีกรัมของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากกระบวนการหมักเต้าหู้ยี้ (กำลังขยาย 100 เท่า)

A) รูปร่างแบบ cocci, tetrad formation ของเชื้อสายพันธุ์ PS1231

B) รูปร่างแบบ rod ของเชื้อสายพันธุ์ PS1243

**ตารางที่ 8** การจำแนกแบคทีเรียแลกติก 126 สายพันธุ์ที่แยกได้จากตัวอย่างเต้าหู้ยี้

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

**ตารางที่ 9** ตัวอย่างการทดสอบทางกายภาพและทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลกติก 10 สายพันธุ์ และเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

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

หมายเหตุ: + = เติบโต, - = ไม่เติบโต

**ตารางที่ 10** การหมักคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากได้เต้าหู้ยี้

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

**ตารางที่ 10** (ต่อ)

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

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

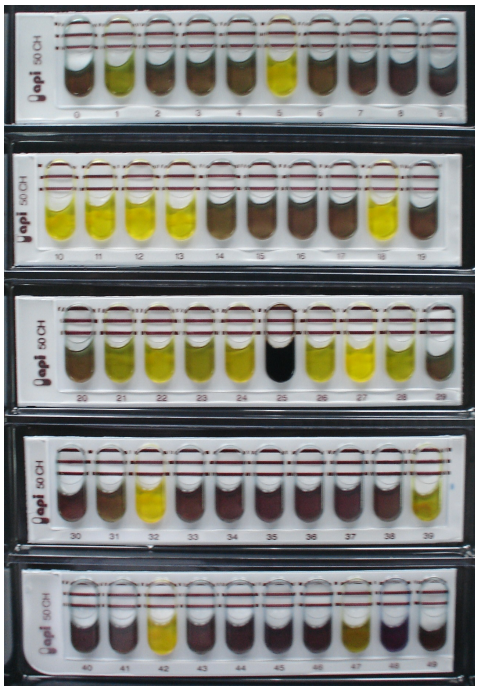
**ตารางที่ 11** เปอร์เซ็นต์การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ program computer API Web Stand Alone V. 1.1.0

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

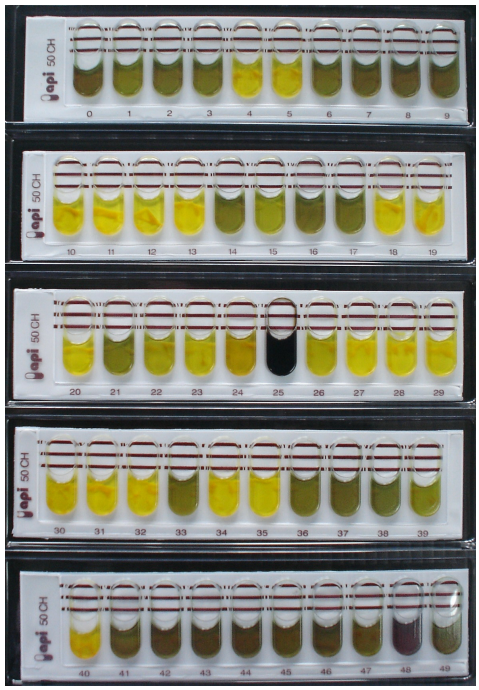
Negative control



Positive control



Test (PS1240)



Test (LPS1203)

**รูปที่ 27** การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกโดยใช้ API 50 CHL

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

dbj|AB236940.1| *Tetragenococcus halophilus* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain:E051627

Length=473

Score = 854 bits (462), Expect = 0.0

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

Strand=Plus/Minus

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

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

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

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

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

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

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

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

(A)

dbj|AB289009.1| *Lactobacillus acidipiscis* gene for 16S rRNA, partial sequence, strain: JCM 10692

Length=680

Score = 808 bits (437), Expect = 0.0

Identities = 442/445 (99%), Gaps = 0/445 (0%)

Strand=Plus/Minus

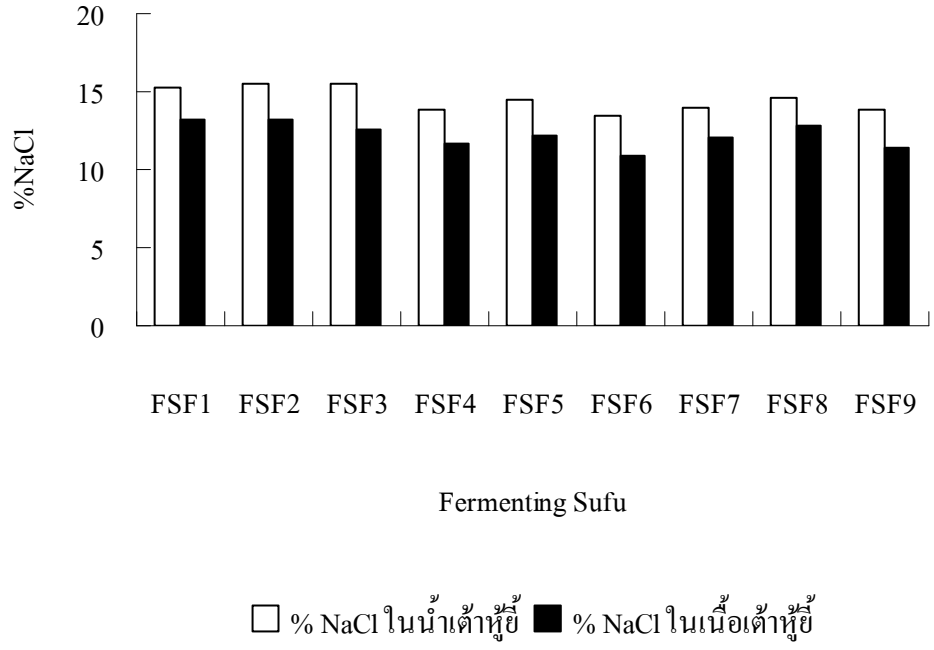
```
Query 1   GTCAGCGCGATAACAGTTACTCTATCACGTGTTCTTCTCTGACAACAGTATTTTACGATC 60
          |||||||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct 445 GTCAGCGCCATAGCAGTTACTCTATCACGTGTTCTTCTCTGACAACAGTATTTTACGATC 386

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

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

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

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

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

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

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

(B)

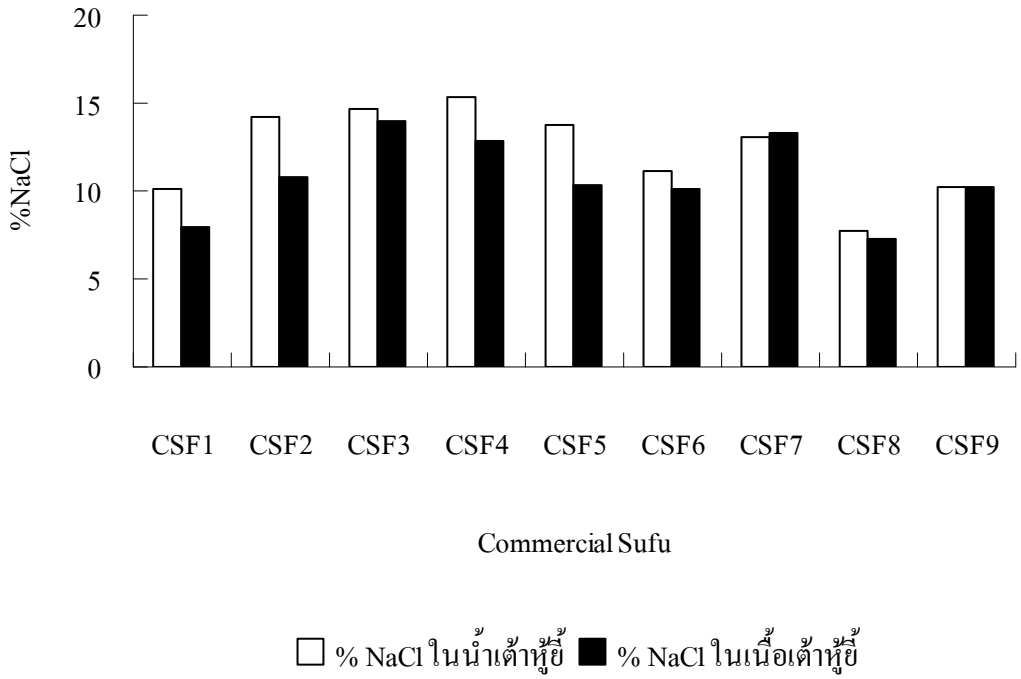
**รูปที่ 28** การบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติก PS1231 (A) และ PS1240 (B) โดยวิธีการตรวจหาลำดับเบสของ 16S rRNA gene

**9. การตรวจหาปริมาณเกลือในตัวอย่างเต้าหู้ยี้**

การตรวจหาปริมาณเกลือในตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก (รูปที่ 29) และเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป (รูปที่ 30) พบว่า เต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมักมีปริมาณเกลือในน้ำเต้าหู้ยี้สูงกว่าในเนื้อ โดยมีปริมาณเกลือเริ่มต้น 15.2% (น้ำ) และ 13.2% (เนื้อ) และปริมาณเกลือลดต่ำลงในเดือนที่ 6 แล้วเพิ่มขึ้นเล็กน้อย โดยมีปริมาณเกลือในเดือนที่ 9 เท่ากับ 13.8% (น้ำ) และ 11.4% (เนื้อ) ตามลำดับ ส่วนปริมาณเกลือในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปพบว่า ในน้ำเต้าหู้ยี้มีปริมาณเกลือสูงกว่าในเนื้อเช่นเดียวกับเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก (FSF1-FSF9) ยกเว้นตัวอย่าง CSF9 ที่มีปริมาณเกลือเท่ากันทั้งในน้ำและเนื้อเต้าหู้ยี้ ส่วนตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่มีปริมาณเกลือในน้ำสูงสุด คือ CSF4 (15.3%) และมีปริมาณเกลือน้อยสุดคือ CSF8 (7.8%) ส่วนตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่มีปริมาณเกลือในเนื้อมากสุด คือ CSF3 (14.0%) และมีปริมาณเกลือน้อยสุด คือ CSF8 (7.3%) เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่ได้จากกระบวนการหมัก CSF1 มีปริมาณเกลือลดลงเท่ากับ 10.1 % (น้ำ) และ 7.9% (เนื้อ) ทั้งนี้เนื่องจากในขั้นตอนบรรจุขวดและฆ่าเชื้อจะมีการเติมน้ำและน้ำตาลโตนด




**รูปที่ 29** เปอร์เซ็นต์เกลือในน้ำและเนื้อของตัวอย่างเต้าหู้ยี้ในกระบวนการหมัก




**รูปที่ 30** เปอร์เซนต์เกลือในน้ำและเนื้อของตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

**10. การตรวจหาปริมาณแร่ธาตุ**

เนื่องจากอาหารแต่ละชนิด จะมีองค์ประกอบของแร่ธาตุต่างๆ แตกต่างกัน ขึ้นกับวัตถุดิบที่นำมาใช้ และจากการตรวจหาปริมาณแร่ธาตุ จำนวน 12 ชนิด ในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป โดยมี CSF1 เป็นเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปที่หมักแบบดั้งเดิมเป็นตัวอย่างควบคุมเพื่อเปรียบเทียบกับเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปอื่นๆ อีก 5 ตัวอย่าง CSF2, CSF3, CSF6, CSF8 และ CSF9 (ตารางที่ 11) ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า สามารถจัดชนิดและปริมาณแร่ธาตุที่มีอยู่ในเต้าหู้ยี้สำเร็จรูปได้ 3 กลุ่ม ดังนี้

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

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

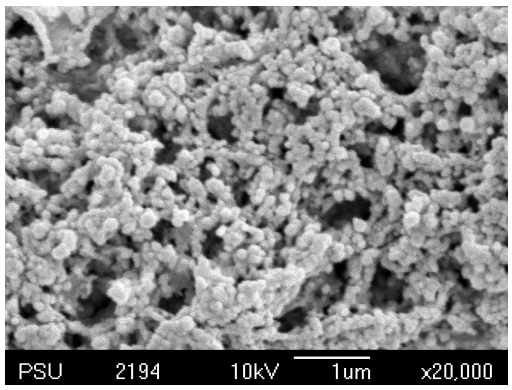
3. กลุ่ม C ได้แก่ Pb, Cd, As และ Ni มีปริมาณ <1mg/kg ซึ่งแสดงถึงการปนเปื้อนสารพิษจากสิ่งแวดล้อม

**ตารางที่ 12** ชนิดและปริมาณแร่ธาตุในตัวอย่างเต้าหู้ยี้สำเร็จรูป

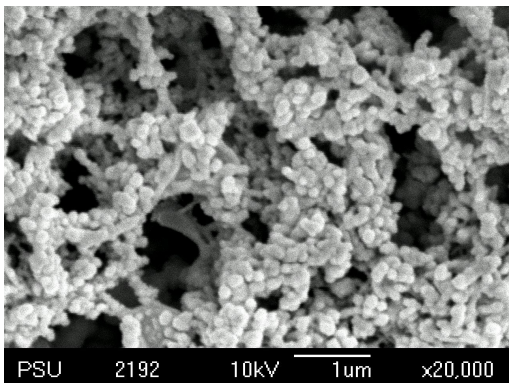
| แร่ธาตุ | ปริมาณแร่ธาตุ (mg/kg) | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | CSF1 | CSF2 | CSF3 | CSF6 | CSF8 | CSF9 |
| Mg | 479.740 | 174.300 | 2295.300 | 551.210 | 141.100 | 185.620 |
| Ca | 153.420 | 174.500 | 334.390 | 202.050 | 132.080 | 1159.680 |
| Li | 23.050 | 1.500 | 29.150 | 30.060 | 1.340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

**11. SEM ของเนื้อเต้าหู้ยี้**

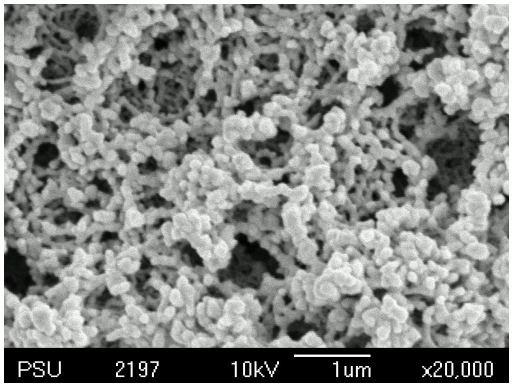
การตรวจโครงสร้างของเนื้อเต้าหู้ (วัตถุดิบ) เต้าหู้ยี้สำเร็จรูปชนิดเหลือง (CSF1) และเต้าหู้ยี้แดง (CSF3) โดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนชนิด scanning electron microscope (SEM) (รูปที่ 31) พบว่าเนื้อเต้าหู้วัตถุดิบก่อนหมัก มีโครงสร้างของเนื้อเต้าหู้หนาแน่นเป็นแบบ filamentous gel structure ซึ่งเกิดจากน้ำนมถั่วเหลืองดิบเป็น native protein ที่ไม่เกาะกลุ่ม (non-aggregated native protein) เมื่อต้มนมถั่วเหลืองโปรตีนจะเกาะกลุ่มเป็นสายยาว (filament formation) และเมื่อเติม $Ca^{++}/Mg^{++}$ ทำให้น้ำเต้าหู้แข็งตัวเป็น soybean curd (filamentous gel structure) โดย $Ca^{++}/Mg^{++}$ เป็นตัวเชื่อมระหว่างสายโปรตีนตรงตำแหน่ง carboxylic group (Kao, 2003) และเมื่อผ่านกระบวนการหมักที่มีเชื้อรา แบคทีเรีย และยีสต์ เป็นเวลา 9 เดือน พบว่า เนื้อเต้าหู้ยี้เหลือง (CSF1) มีรูพรุนขนาดใหญ่และจำนวนมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับเนื้อเต้าหู้ที่ยังไม่ได้หมัก ส่วนเนื้อเต้าหู้ยี้แดง (CSF3) อนุภาคโปรตีนจับกันหนาแน่นกว่าและมีรูพรุนน้อยกว่าเต้าหู้ยี้เหลือง




A




B




C

**รูปที่ 31** SEM ของก้อนเต้าหู้ที่ยังไม่ได้หมัก (A), ก้อนเต้าหู้ยี้เหลืองสำเร็จรูป อ. เมือง จ. สงขลา (B) และก้อนเต้าหู้ยี้แดงสำเร็จรูป จากประเทศจีน (C)