



การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้ผลิตผักดอง
Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria for Pickles Production

ภณิดา เกื้อสุวรรณ
Phanida Kuasuwan

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา
วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of
Master of Science in Microbiology
Prince of Songkla University

2557

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ชื่อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้ผลิตผักดอง
 ผู้เขียน นางสาวภณิดา เกื้อสุวรรณ
 สาขาวิชา จุลชีววิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

คณะกรรมการสอบ

.....
 (รองศาสตราจารย์วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล)

.....ประธานกรรมการ
 (ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปรียานุช บวรเรืองโรจน์)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

.....กรรมการ
 (รองศาสตราจารย์วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล)

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันทโชติ)

.....กรรมการ
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงพร คันทโชติ)

.....กรรมการ
 (ดร.อัจฉรา เพิ่ม)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้
 เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา ตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

.....
 (รองศาสตราจารย์ ดร.ธีระพล ศรีชนะ)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้มาจากการศึกษาวิจัยของนักศึกษาเอง และได้แสดงความขอบคุณบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือแล้ว

ลงชื่อ.....

(รองศาสตราจารย์วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ลงชื่อ.....

(นางสาวภณิดา เกื้อสุวรรณ)

นักศึกษา

ข้าพเจ้าขอรับรองว่า ผลงานวิจัยนี้ไม่เคยเป็นส่วนหนึ่งในการอนุมัติปริญญาในระดับใดมาก่อน และ
ไม่ได้ถูกใช้ในการยื่นขออนุมัติปริญญาในขณะนี้

ลงชื่อ.....

(นางสาวภณิดา เกื้อสุวรรณ)

นักศึกษา

ชื่อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้ผลิตผักดอง
ผู้เขียน	นางสาวภณิดา เกื้อสุวรรณ
สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
ปีการศึกษา	2556

บทคัดย่อ

จากแบคทีเรียแลคติกจำนวน 109 ไอโซเลทที่แยกได้จากผักสดและอาหารหมัก เมื่อนำมาคัดเลือกและประเมินศักยภาพในการเจริญ ความสามารถในการหมัก การเป็นโพรไบโอติกและความปลอดภัยในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้ 6 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 AR36 AR45 AR52 AR71 และ AR72 ซึ่งทุกไอโซเลทมีความสามารถในการเจริญ และการหมักในอาหาร MRS broth ได้ดี มีเปอร์เซ็นต์กรดสูงกว่า 1.0 มีความสามารถในการอยู่รอดในสภาพเลียนแบบกระเพาะอาหารที่มีพีเอช 3 และสภาพที่มีเกลือ น้ำดี 0.3% สามารถเจริญได้ดีทั้งสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella enterica* มากกว่า 2 สายพันธุ์ มีความสามารถในการย่อยโปรตีน และไอโซเลท AR36 และ AR72 มีความสามารถในการย่อยทั้งโปรตีนและแป้ง เมื่อนำเชื้อดังกล่าวมาทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อต่อยา vancomycin, kanamycin, gentamycin, streptomycin และ polymycin เชื้อมีความไวต่อการตอบสนองต่อยา chloramphenicol และ erythromycin ทั้งนี้เชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท ไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไม่มีการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน เมื่อนำไปทดลองหมักผักดอง ซึ่งประกอบด้วยมะละกอ แครอท และพริกชี้ฟ้าสีเขียวและสีแดงในอัตราส่วน 30: 9: 1 และน้ำเกลือที่มีเกลือ 5% และน้ำตาล 2.5% โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่ 10^6 CFU/ml หมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน พบว่าทุกไอโซเลทสามารถหมักได้ดีมีจำนวนเชื้อเพิ่มเป็น $8.16-9.25$ log CFU/ml มีเปอร์เซ็นต์กรด 0.72-1.08% และเชื้อทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถอยู่รอดในผักดองเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน และอุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 วัน โดยมีจำนวนเชื้อสูงกว่า 10^6 CFU/ml และเมื่อตรวจคุณภาพผักดองทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.1168/2549) พบว่าในทุกการทดลองหมัก ไม่พบ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* ในขณะที่จำนวนยีสต์จะเพิ่มสูงขึ้นกว่าเกณฑ์กำหนดของมาตรฐาน มผช. เมื่อเก็บผักดองไว้นานขึ้นจึงทดสอบการยับยั้งยีสต์ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ดังกล่าว พบว่าความสามารถในการยับยั้งยีสต์ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันของแบคทีเรียแลคติก AR45 สามารถยับยั้งได้สูงสุด 91.89% และ AR72 สามารถยับยั้งได้ 77.36% เมื่อนำ

แบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทไปเทียบเคียงสายพันธุ์โดย 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท AR36 AR52 AR72 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* มีค่า % similarity 99% ในขณะที่ไอโซเลท AR71 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* มีค่า % similarity 100% ส่วนไอโซเลท NS302 และ AR45 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus plantarum* มีค่า % similarity 99% และ 100% ตามลำดับ เมื่อคัดเลือก *Lactobacillus fermentum* AR72 เป็นกล้าเชื้อในการหมักผักดอง เพื่อใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัส โดยมีอายุการหมัก 2 และ 3 วัน เปรียบเทียบกับผักดองที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อ พบว่าการยอมรับในด้านสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวมของทุกการหมักไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่พบว่าผักดองที่หมักโดยการใช้กล้าเชื้อจะมีจำนวนยีสต์น้อยกว่าผักดองในชุดควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)

Thesis Title	Selection of Probiotic Lactic Acid Bacteria for Pickles Production
Author	Miss Phanida Kuasuwan
Major Program	Microbiology
Academic Year	2013

ABSTRACT

A total of 109 lactic acid bacteria (LAB) were isolated from fresh vegetables and fermented foods to evaluate their potential probiotics including growth and acid production *in vitro*. The selected LAB 6 isolates; NS302, AR36, AR45, AR52, AR71 and AR72 were able to grow well and to produce total acidity more than 1.00%. They also survived under stimulated gastric juice condition at pH 3, 0.3% bile salt and in conditions of aerobic and anaerobic. They were further investigated for antibacterial activity against the growth of bacterial indicator strains, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 and *Salmonella enterica* and all selected isolates could inhibit more than 2 indicator strains. In addition, they were examined for ability to utilize protein, lipid and starch, and only isolates AR36 and AR72 were able to digest both protein and starch. They were resistant to antibiotics tested as follows; vancomycin, kanamycin, gentamycin, streptomycin and polymycin. However, they were susceptible to chloramphenicol and erythromycin. Six selected isolates were member of γ -haemolysis and no production of biogenic amines. They were used as a single starter culture (10^6 CFU/ml) for producing pickles which consisted of papaya, carrot, cayenne pepper (30: 9: 1) and salt water (5% salt, 2.5% sugar) by fermenting at $30\pm 2^\circ\text{C}$ for 3 days. Each selected isolate produced a rapid growth as viable cells found in a range of 8.16-9.25 log CFU/ml and total acidity was between 0.72-1.08%. After storage at room temperature for 5 days and in a refrigerator ($6\pm 2^\circ\text{C}$) for 15 days, all pickles had viable cells more than 6 log CFU/ml. *S. aureus* and *E. coli* were not detected in all pickles samples; however, yeasts count did not pass Thai standard guideline. Hence, all starter cultures were tested for their ability to inhibit contaminated target yeast by co-cultivation method; it was found

that the isolate AR45 inhibited the target yeast 91.89% while the isolate AR72 inhibited 77.36%. All selected isolates were identified using 16S rRNA gene; the isolates AR36, AR52, AR71 and AR72 were *Lactobacillus fermentum* whereas isolates NS302 and AR45 were *Lactobacillus plantarum*. Finally, the isolate AR72 was used as a starter culture to produce pickles by fermenting for 2 and 3 days and they were used to evaluate sensory test. No significant difference was found ($p>0.05$) for all pickles including the control (unionoculated pickles) in the color, odor, flavor, texture and overall acceptance. In contrast, the inoculated pickles had yeasts count in the acceptable level when compared with the control that exceeded the acceptable level.

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(10)
รายการตาราง	(11)
รายการภาพประกอบ	(13)
สัญลักษณ์คำย่อและตัวย่อ	(16)
บทที่	
1. บทนำ	
บทนำต้นเรื่อง	1
ตรวจเอกสาร	3
วัตถุประสงค์	29
2. วัสดุอุปกรณ์ และวิธีการ	
วัสดุ	30
อุปกรณ์	33
วิธีการ	34
3. ผลการทดลอง	49
4. วิเคราะห์ผลการทดลอง	95
5. สรุปผลการทดลอง	104
เอกสารอ้างอิง	108
ภาคผนวก	126
ก	127
ข	133
ค	137
ง	138
จ	143
ฉ	145
ประวัติผู้เขียน	147

รายการตาราง

ตารางที่	หน้า
1.1	19
2.1	30
3.1	49
3.2	51
3.3	51
3.4	53
3.5	54
3.6	56
3.7	58
3.8	60
3.9	62
3.10	63
3.11	65
3.12	79

รายการตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
3.13	79
ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของน้ำผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ด้วยวิธี Agar spot method	
3.14	81
ตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ผักดองที่หมัก 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) และผักดองที่เก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 7 และ 14 วัน ตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.1168/2549)	
3.15	83
การยับยั้งยีสต์ YP ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ด้วยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 ไอโซเลทด้วยวิธี dual culture assay	
3.16	86
การเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยใช้ 16S rDNA sequencing analysis	
3.17	91
ตรวจคุณภาพผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก <i>Lactobacillus fermentum</i> AR72 ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.1168/2549) หลังการหมัก ณ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)	
3.18	94
ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตได้ภายหลังการหมัก 2 และ 3 วัน	
ฉ.1	145
ตารางมาตรฐานเปรียบเทียบความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญ เพื่อดูปฏิกิริยาของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ	
ฉ.2	146
MPN table for a three-replicate design from FDA's <i>Bacterial Analytical Manual</i>	

รายการภาพประกอบ

รูปที่		หน้า
3.1	การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้	55
3.2	การทดสอบการยับยั้ง <i>Bacillus cereus</i> ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยวิธี Agar spot	57
3.3	การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน (ก) แป้ง (ข) และไขมัน (ค) ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง	58
3.4	ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ ไอโซเลท AR72 โดยยาปฏิชีวนะทั้ง 8 ชนิด	59
3.5	การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Columbia agar ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จัดอยู่ในกลุ่ม Gamma-(γ) hemolysis	61
3.6	การทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีนของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้บน Improved medium	61
3.7	การหมักผักดองโดยใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกไอโซเลท NS302, AR36, AR45, AR52, AR71 และ AR72 และชุดควบคุมที่ไม่เติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก	66
3.8	เปรียบเทียบการหมักผักดองโดยใช้แบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลทหลังหมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	69
3.9	ความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์ผักดองที่การเก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)	71
3.10	ความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์ผักดองที่การเก็บรักษา ณ อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส)	73
3.11	เปรียบเทียบการเก็บรักษาผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก ณ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) นาน 5 วัน	75
3.12	เปรียบเทียบการเก็บรักษาผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก ณ อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส) นาน 15 วัน	76

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.13	การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยน้ำผักดองที่หมักด้วย โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี Agar well diffusion method	77
3.14	การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยน้ำผักดองที่หมักด้วย โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยวิธี Agar spot method	78
3.15	ลักษณะของยีสต์ YP ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ เมื่อดูด้วยกล้อง จุลทรรศน์ขนาดกำลังขยาย 400X	82
3.16	การยับยั้งยีสต์จากผักดองที่หมักได้ โดยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ ด้วยวิธี dual culture assay	82
3.17	ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ในการ ยับยั้งยีสต์รหัส YP ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน	84
3.18	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งยีสต์รหัส YP ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ด้วย แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน	84
3.19	แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท NS302	87
3.20	แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR36	88
3.21	แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR45	88
3.22	แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR52	88
3.23	แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR71	89
3.24	แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR72	89

รายการภาพประกอบ (ต่อ)

รูปที่		หน้า
3.25	เปรียบเทียบการหมักผักดองโดยใช้ <i>Lactobacillus fermentum</i> AR72 กับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อหลังหมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง	90
3.26	ลักษณะของผลิตภัณฑ์ผักดองที่ผลิตได้ที่นำมาทดสอบทางประสาทสัมผัส	92
ข.1	กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร	135

บทที่ 1

บทนำ

บทนำตั้งเรื่อง

ปัจจุบันโลกมีการเปลี่ยนแปลงไป มีวิวัฒนาการใหม่ๆ เกิดขึ้นมากมาย วิธีการดำเนินชีวิตของมนุษย์จึงเปลี่ยนไป ไม่ว่าจะเป็นวัฒนธรรมการบริโภคอาหารที่เปลี่ยนแปลงไป การต้องใช้เวลาอย่างเร่งรีบในชีวิตประจำวัน การเกิดภาวะความเครียดเพิ่มมากขึ้น รวมทั้งมีการใช้ยาปฏิชีวนะที่พร่ำเพรื่อ ส่งผลให้จุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่รักษาสมดุลต่างๆ ภายในร่างกายถูกรบกวน ส่งผลต่อสุขภาพของร่างกาย ด้วยเหตุนี้จึงมีความจำเป็นที่ต้องได้รับจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์เข้าสู่ร่างกาย เพื่อเป็นการรักษาสุขภาพสมดุลของจุลินทรีย์ภายในร่างกาย เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพและช่วยให้ดำรงชีวิตอยู่ได้อย่างปกติ (วิเชียร, 2541) ทำให้ในปัจจุบันผู้บริโภคได้เพิ่มความสนใจในการเลือกที่จะบริโภคผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนช่วยส่งเสริมสุขภาพกันมากขึ้น ซึ่งผลิตภัณฑ์หนึ่งที่มีความสนใจอย่างมากคือผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีแบคทีเรียแลคติก ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (generally recognized as safe bacteria; GRAS status) เป็นแบคทีเรียที่นอกจากมีบทบาทสำคัญในการถนอมอาหาร โดยทำให้เกิดการปรับค่า pH ของวัตถุดิบ ซึ่งเป็นตัวแปรที่สำคัญในการรักษาผลิตภัณฑ์ ช่วยเปลี่ยนแปลงลักษณะรสชาติ เนื้อสัมผัส และคุณค่าทางโภชนาการของผลิตภัณฑ์อาหารแล้ว แบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ยังมีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก ซึ่งมีประโยชน์ต่อมนุษย์และสัตว์ ทำให้เกิดสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร และผลิตสารที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค รวมทั้งประโยชน์อื่นๆอีกมากมาย อาทิ มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน สร้างสารต่อต้านเชื้อโรค และก่อให้เกิดกลไกการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ในร่างกาย นอกเหนือจากกลไกที่เกิดขึ้นจากจุลินทรีย์ประจำถิ่นในร่างกาย (Fuller, 1989) ป้องกันการเกิดโรคและอาการต่างๆ โรคท้องร่วง โรคลำไส้อักเสบ และป้องกันฟันผุ ลดการตอบสนองต่อการอักเสบ ป้องกันมะเร็ง ลดคอเรสเตอรอลในซีรัม ช่วยให้สุขภาพดีขึ้น (Schmid *et al.*, 2006)

ดังนั้นปัจจุบันอาหารจำนวนมากที่จำหน่ายตามท้องตลาดทั่วโลกจึงมีโพรไบโอติกเป็นส่วนประกอบ (Agrawal, 2005) โดยจุลินทรีย์โพรไบโอติกที่นิยมใช้กันอย่างกว้างขวาง ได้แก่

Lactobacillus และ *Bifidobacterium* (O'Sullivan *et al.*, 2006) แต่ผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกส่วนใหญ่ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดมักเป็นผลิตภัณฑ์นม เช่น โยเกิร์ต เนย ไอศกรีม (Bielecka *et al.*, 2007) ซึ่งเป็นข้อจำกัดของผู้บริโภคที่เป็นมังสะวิรัต ผู้ที่แพ้นม หรือผู้ที่ต้องจำกัดคอเรสเตอรอล จึงทำให้เริ่มมีผู้สนใจทดลองผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์นม เช่น ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช (Coda *et al.*, 2012) น้ำผัก ผลไม้ และผักดอง (Sheehan *et al.*, 2007) ซึ่งผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ผลิตจากพืชผักเป็นอาหารที่มีประโยชน์เนื่องจากผักมีสารต้านอนุมูลอิสระ วิตามิน เส้นใยอาหาร และแร่ธาตุสูง แต่สำหรับในทวีปเอเชียรวมทั้งประเทศไทยผลิตภัณฑ์ผักดองยังคงเป็นการหมักแบบธรรมชาติจากจุลินทรีย์ที่อยู่บริเวณผิวภายนอกของพืช โดยอาศัยการควบคุมสภาวะในการหมักให้เหมาะสมเพื่อให้จุลินทรีย์ที่ต้องการเจริญได้ดี ซึ่งเป็นวิธีการยืดอายุการเก็บรักษาผักที่สำคัญ และเป็นวิธีที่ง่าย (Wang *et al.*, 2010) การหมักผักดองแบบนี้เป็นผลมาจากการแข่งขันกันของจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ ที่ปะปนมากับวัตถุดิบ จุลินทรีย์ใดสามารถปรับตัวกับวัตถุดิบและสภาวะในการหมักได้ดีที่สุดก็จะมีบทบาทในกระบวนการหมัก ในการหมักแบบนี้จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการหมักที่ปะปนมาในวัตถุดิบจำเป็นต้องใช้เวลาในการปรับตัวและค่อยๆ เพิ่มจำนวนอย่างช้าๆ จึงทำให้ในช่วงเริ่มต้นของการหมักจำเป็นต้องใช้เวลานาน ทำให้มีโอกาสเสี่ยงต่อความล้มเหลวในการหมัก (Holzapfel, 2002) รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนอยู่ในวัตถุดิบอาจเหลือรอดหลังการหมัก ซึ่งอาจก่อให้เกิดปัญหาความปลอดภัยกับผู้บริโภคอีกด้วย นอกจากนี้จุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับคุณภาพวัตถุดิบ ทำให้การควบคุมคุณภาพของผักดองให้มีความคงที่สม่ำเสมอเป็นไปได้ยาก (Gardner *et al.*, 2001) แต่หากมีการใช้กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก (starter culture) ซึ่งเป็นการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิตจำนวนมากที่ใช้เติมลงไปก็จะช่วยเร่งกระบวนการหมักให้เร็วขึ้น ช่วยลดเวลาในการหมัก (Holzapfel, 1997) รวมทั้งก่อให้เกิดประโยชน์อื่นๆ ร่วมด้วย เช่น สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เน่าเสียเพื่อช่วยยืดอายุการเก็บ ช่วยปรับปรุงคุณภาพกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส เพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ และช่วยยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคเพื่อให้เกิดความปลอดภัยต่อผู้บริโภค เป็นต้น (Hector *et al.*, 2009)

ดังนั้นหากมีการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการหมักที่ดี สามารถยับยั้งเชื้อก่อโรค ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย รวมทั้งมีสมบัติการเป็นโปรไบโอติกอื่นๆ มาทดลองใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักผักดองก็จะช่วยทำให้ผลิตภัณฑ์ผักดองที่ได้มีทั้งคุณภาพ และความปลอดภัยเพิ่มมากขึ้น

ตรวจเอกสาร

1. แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria)

1.1 ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกหมายถึง กลุ่มแบคทีเรียที่มีความสามารถในการหมักน้ำตาลกลูโคส และให้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักในการหมัก (Sneath *et al.*, 1986) เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีลักษณะทั่วไปคือ ติดสีแกรมบวก รูปร่างแท่ง ทรงกลม และกึ่งแท่งกึ่งทรงกลม ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีระบบไซโตโครม ไม่มีเอนไซม์ catalase สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรตได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาล โดยได้จากกระบวนการ substrate-level phosphorylation ต้องการอากาศเพียงเล็กน้อยในการเจริญ บางชนิดสามารถเจริญได้ในที่ไม่มีอากาศ เจริญได้ที่อุณหภูมิแตกต่างกัน และทนกรดได้ (Wood and Hopzapfel, 1995) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วง pH ที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ $pH \leq 5$ อัตราการเจริญลดลง เมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen and Wright, 1993) การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกเป็นพวกที่ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อน และค่อนข้างสมบูรณ์ เชื้อจะเจริญได้ดีในอาหารที่มี growth factor และวิตามินหลายชนิด เช่น biotin และ riboflavin เป็นต้น แบคทีเรียแลคติกมีความต้องการสารอาหารต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต โดยแบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจาก monosaccharide ประเภท pentose เช่น arabinose ribose และ xylose เป็นต้น hexose เช่น fructose และ mannose disaccharide เช่น maltose trisaccharide เป็นต้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตพวก oligosaccharides เช่น raffinose และ fructooligosaccharide เป็นต้น ซึ่งในระบบทางเดินอาหารไม่มีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้ แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารมาก หลายสายพันธุ์ต้องการกรดอะมิโนหลายชนิด และเจริญได้น้อยเมื่อไม่มีแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนที่แบคทีเรียแลคติกต้องการ ได้แก่ serine และ arginine ส่วนวิตามินที่แบคทีเรียแลคติกใช้ในการเจริญ ได้แก่ thiamine (B1), riboflavin (B2), pyridoxine (B6), folic acid (B9), cyanocobalamine (B12) และ nicotinic acid (Salminen and Wright, 1993)

ส่วนใหญ่แบคทีเรียแลคติกเป็นพวกที่ไม่ก่อให้เกิดโรค เชื้อกลุ่มนี้เป็นเชื้อประจำถิ่นพบได้ในร่างกาย เช่น บริเวณเยื่อบุภายในทางเดินอาหาร ช่องฟัน และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ยังพบทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะในอาหารพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์

อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์เนื้อและปลา ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ เครื่องในสัตว์ และเครื่องดื่มต่างๆ เป็นต้น (วิลาวินัย, 2539)

1.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม ตามความสามารถในการหมักน้ำตาล ได้แก่

1. Homofermentative lactic acid bacteria สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอมผ่านวิถีไกลโคลิกซิส (Glycolysis หรือ EMP pathway) โดยมีกระบวนการหมักเป็นแบบ homofermentative ในช่วงแรกกลูโคสจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวท จากนั้นมีเอนไซม์ lactate dehydrogenase เปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นกรดแลกติก 85-95% แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มย่อยคือ พวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียส เรียกว่า streptobacterium และพวกที่ไม่สามารถเจริญที่ 15 องศาเซลเซียส เรียกว่า thermobacterium ตัวอย่างเช่น *Streptococcus*, *Pediococcus* และ *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ (Franz et al., 1999)

2. Heterofermentative lactic acid bacteria สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสหรือน้ำตาลชนิดอื่นผ่านวิถี phosphoketolase (PK pathway) ได้กรดแลกติก 50% และผลิตภัณฑ์ข้างเคียงคือ ethanol, acetate และ CO₂ เป็นต้น ตัวอย่างเช่น *Bifidobacterium*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Oenococcus* และ *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ (Axeleson, 1998)

ในปี ค.ศ. 1919 Orla-Jensen ได้ริเริ่มจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรียแลกติก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิด และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่างๆ สามารถแบ่งแบคทีเรียแลกติกออกเป็น 7 จินัส ได้แก่ *Batabacterium*, *Thermobacterium*, *Streptobacterium*, *Streptococcus*, *Betacoccus*, *Microbacterium* และ *Tetranococcus* (พิเชษฐ์, 2548)

ในปี ค.ศ. 1995 Wood และ Holzapfel ได้จัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกเป็น 9 จินัส ได้แก่ *Batabacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Sporolactobacillus* และในปัจจุบันนี้ได้มีการนำความรู้ทางด้านอนุพันธุศาสตร์เข้ามาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับจินัสและสปีชีส์ โดยพิจารณาความแตกต่างของชนิดกรดนิวคลีอิกบนดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology) และความใกล้เคียงทางสายวิวัฒนาการ (phylogeny) โดยดูจากลำดับเบสบน ribosomal RNA ทำให้การจัดจำแนกมีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น Stiles and Holzapfel (1997) และ Axeleson (1990) ได้จัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกออกเป็น 12 จินัส ดังนี้

1) *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-2 μm เซลล์จัดเรียงตัวเป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่เมื่อเจริญอยู่ในอาหารเหลว ไม่มีการเคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ เป็น Facultative anaerobes ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) ต้องการอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญ มีหลายสปีชีส์ที่ก่อโรคในคนหรือสัตว์ที่อุณหภูมิ 20-41 องศาเซลเซียส มี mol% G+C อยู่ระหว่าง 34-46% ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์ (Hardie and Whilry, 1995)

2) *Vagococcus*

เซลล์รูปร่างเป็นทรงกลม รูปไข่และกึ่งแท่งกึ่งทรงกลม เซลล์อยู่เป็นคู่หรือต่อกันเป็นเส้นสาย บางสายพันธุ์สามารถเคลื่อนที่ได้ เป็น Facultative anaerobes เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-35 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มแบคทีเรียที่แยกออกมาจากจิ้นส์ *Streptococcus* เนื่องจากสามารถเคลื่อนที่ได้ ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Vagococcus fluvialis* และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค มี mol% G+C อยู่ระหว่าง 33-37% (Stiles and Hozapfel, 1997)

3) *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 μm ไม่สร้างสปอร์และไม่เคลื่อนที่จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่ เป็น Facultative anaerobes มักใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตนม มีการหมักแบบ Homofermentative สามารถเจริญได้ที่ 30 องศาเซลเซียส มี mol% G+C ระหว่าง 34-40% (Holt *et al.*, 1994) ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus garvieae*, *L. plantarum*, *L. raffinolactis*, *L. piscium* และ *L. lactis* ซึ่งมี 3 subspecies ได้แก่ subsp. *lactis*, subsp. *cremoris*, subsp. *hordniae* (Teuber, 1995)

4) *Aerococcus*

เป็นกลุ่มแบคทีเรียใน family *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างทรงกลม ขนาด 1.0-2.0 μm เรียงติดกันเป็นคู่หรือ 4 เซลล์ ไม่มีการเคลื่อนที่ มีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อยเป็น Facultative anaerobes มีการหมักแบบ Homofermentative เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และที่ 10 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์มีการสร้างเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติคล้ายเอนไซม์คะตะเลส (pseudocatalase) แบคทีเรียที่พบในจิ้นส์นี้ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* (Williams *et al.*, 1953) และ *A. urinae* (Aguirre and Collins, 1992) และมี mol% G+C ระหว่าง 35-40% (Axelsson, 1998)

5) *Leuconostoc*

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น ในอาหารที่มีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยึดออกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่เมื่อเจริญในน้ำนมเซลล์จะเป็นทรงกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง มีขนาด $0.5-0.7 \times 0.7-1.2 \mu\text{m}$ จัดเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Heterofermentative* สามารถผลิตสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส ช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง สามารถเจริญได้โดยการอาหารที่ซับซ้อน มีปริมาณ mol% G+C ระหว่าง 37-40% ไม่ก่อโรคในคน พืช และสัตว์ (Holt *et al.*, 1994)

6) *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง $0.36-1.43 \mu\text{m}$ สามารถแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งครั้งที่ 2 ในทิศทางตั้งฉากของครั้งแรกทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส ไม่ค่อยพบเซลล์เดี่ยวและสายโซ่ ทนต่อความเข้มข้นเกลือสูง ไม่สร้างเส้นสาย ไม่เคลื่อนที่ มีการหมักแบบ *Homofermentative* ผลิตกรดแลกติกชนิด DL หรือ L(+) บางชนิดสร้างเอนไซม์ *pseudocatalase* ไม่ก่อโรคในคน พืช และสัตว์ บางสปีชีส์ทำให้เกิดการเสื่อมสภาพในเบียร์และไวน์ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 25-40 องศาเซลเซียส มีปริมาณ mol% G+C ระหว่าง 34-42% ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici*, *P. domonosus*, *P. dextranicus*, *P. inopinatus*, *P. parvulus* และ *P. pentosaceus* (Wood and Holzapfel, 1995)

7) *Tetragenococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* สปีชีส์เดิม คือ *P. halophilus* อย่างไรก็ตามได้นำมาจัดจำแนกใหม่ เนื่องจากความสามารถในการเจริญในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18% และมีลำดับเบสบน 16S rRNA ใกล้เคียงกับจิ้นัส *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าจิ้นัสเดิม (Axelsson, 1998)

8) *Oenococcus*

ประกอบด้วยสปีชีส์เดียว คือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenos* ด้วยคุณสมบัติการทนกรดและเอทานอลในปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ DNA hybridization และลำดับเบสของยีน 16s rRNA พบว่าแตกต่างจากสปีชีส์อื่นของ *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Axelsson, 1998)

9) *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด เซลล์รูปร่างแท่ง อาจต่อกันเป็นเส้นสั้นๆ ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ เป็น *Facultative anaerobes* และอาจเป็น *Microaerophile* ต้องการสารอาหารในการเจริญสูง เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส มีความหลากหลายของ

ลักษณะฟีโนไทป์ คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากมีความแตกต่างของปริมาณ mol% G+C ภายในจีโนมสูงคือ 32-53% (Axeleson, 1998)

10) *Carnobacterium*

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างเป็นแท่งตรงขนาดสั้นหรือเป็นแท่งเรียว ซึ่งก่อนหน้านี้นี้เคยจำแนกไว้ในกลุ่ม *Lactobacilli* ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 μm ยาว 1.1-3.0 μm จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ มักไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ มีการหมักแบบ Heterofermentative บางสายพันธุ์สามารถสร้างก๊าซจากการใช้น้ำตาลกลูโคส ไม่สามารถเจริญบนอาหารที่มีอะซิเตท และไม่สร้างกรดโอลิก มีปริมาณ mol% G+C ประมาณ 33.0-37.2% พบได้ตามเนื้อสัตว์ที่บรรจุในสภาพสุญญากาศ ปลา และผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก (Schleifer and Ludwig, 1995) ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Carnobacterium divergens*, *C. piscicola*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. funditum* และ *C. alterfunditum*

11) *Enterococcus*

เซลล์เป็นรูปไข่ พบการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยว เซลล์คู่หรือเป็นสายโซ่สั้นๆ ต้องการอาหารซับซ้อนสำหรับการเจริญ มีการหมักแบบ Homofermentative ผลิต L(+) lactic acid เป็นผลิตภัณฑ์หลัก สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์ pseudocatalase ได้ บางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5% เจริญได้ที่ความเป็นกรดต่าง 9.6 (Holt *et al.*, 1994) ในปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์คือ *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. avium* และ *E. cecorum* มีปริมาณ mol% G+C ประมาณ 37.0-40.0% (Jay, 1986)

12) *Weissella*

แบคทีเรียแลคติกจีโนมเดี่ยวที่มีทั้งรูปร่างแท่งและทรงกลม ซึ่งเดิมจำแนกอยู่ในจีโนม *Leuconostoc* เนื่องจากมีลักษณะคล้ายกัน ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ พบสปีชีส์ใหม่แยกได้จากไส้กรอกหมักคือ *W. hellenica* (Stiles and Holzappel, 1997)

1.3 การสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งได้หลายชนิด ได้แก่

1) กรดแลคติก (lactic acid) โดยกรดแลคติกเป็นกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม อุตสาหกรรมสารเคมีบางชนิดและการผลิตยา (วิเชียร, 2534) การยับยั้งแบคทีเรียของกรดแลคติกเกิดจากการทำให้พีเอชในสภาวะเซลล์ลดต่ำลง และสภาวะที่พีเอชภายนอกเซลล์ต่ำ ทำให้ไซโตพลาสซึมของเซลล์มีสภาพเป็นกรด กรดแลคติกเป็นกรดที่อยู่ในรูป

โมเลกุลไม่แตกตัว ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น lipophilic ทำให้สามารถแพร่ผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรีย และกรดในรูปที่ไม่มีการแตกตัวยังเข้าไปทำลาย electrochemical proton gradient ของเซลล์ และเปลี่ยนแปลงความสามารถในการส่งผ่านสารของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้ระบบขนส่ง substrate ผิดปกติ (Ammor *et al.*, 2006) ซึ่งกรดแลกติกยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก และแกรมลบ แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญโดยกรดแลกติกจากเชื้อแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* และ *Pseudomonas fluorescens* ซึ่งกรดแลกติกดังกล่าวสร้างโดยเชื้อ *Lactobacillus* spp. ที่แยกได้จากโยเกิร์ต เป็นต้น Jin *et al.* (1996) ได้ศึกษา *Lactobacillus* 12 สายพันธุ์ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของ *Salmonella enteritidis* 935/37, *S. pullorum*, *S. typhimurium*, *S. blokley* และ *S. enteritidis* 9/448 รวมทั้ง *E. coli* 3 serotype ได้แก่ *E. coli* O1:K1, *E. coli* O2:K1 และ *E. coli* O78:K80 โดย *Lactobacillus* เหล่านี้จะผลิตกรดอินทรีย์ ข้อสันนิษฐานเกี่ยวกับกลไกการยับยั้งคือ กรดอินทรีย์แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้เพราะสามารถละลายได้ในไขมัน การสะสมของกรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลกติกสร้างขึ้นในระหว่างการเจริญส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเบสในช่วงแรกของการเจริญลดลง และมีผลยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ไม่ทนกรด นอกจากนี้ได้มีนักวิจัยกลุ่มอื่นๆ ให้ข้อเสนอแนะว่าไม่ใช่เป็นเพราะการเคลื่อนย้ายโปรตอน แต่เป็นการสะสมของประจุลบทำให้ลดอัตราการสังเคราะห์สารโมเลกุลใหญ่ และมีผลกระทบต่อ การเคลื่อนย้ายสารบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์เป็นผลให้สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นได้

Hwanhlem *et al.* (2011) ทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจากปลาต้ม (Plasom) ซึ่งเป็นอาหารหมักแบบดั้งเดิมของไทยและผลิตปลาต้มจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้ พบแบคทีเรียแลกติก 138 สายพันธุ์ที่เกิดการยับยั้ง (clear zone) และเจริญบนอาหารแข็ง MRS (de Man, Rogosa and Sharpe) ที่ผสม 0.3% (w/v) CaCO_3 พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแลกติก 14 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้ง *Salmonella* sp. และพบแบคทีเรียแลกติก 7 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้ง *Staphylococcus aureus* พบว่าทุกสายพันธุ์สามารถยับยั้ง *E. coli* พบสายพันธุ์ที่สร้างกรดแลกติกได้ดีที่สุด และลดค่าพีเอชคือ *Streptococcus salivarius* และ *Enterococcus faecalis* อีก 4 สายพันธุ์ ซึ่งใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter culture) ในกระบวนการผลิตปลาต้ม

2) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) เป็นสารประกอบโปรตีนที่สร้างจากแบคทีเรีย ซึ่งมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกัน หรือสามารถยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียสายพันธุ์อื่นที่ไวต่อแบคเทอริโอซิน ปกติแบคทีเรียที่สร้างแบคเทอริโอซินจะมีภูมิคุ้มกันต่อแบคเทอริโอซินที่ตนสร้างออกมา ดังนั้นจึงทำให้ไม่ถูกยับยั้งจากแบคเทอริโอซินของตนเอง การสร้างแบคเทอริโอซินของเชื้อแบคทีเรียเชื่อว่าเกิดจากการปรับตัวเพื่อความอยู่รอดใน

สภาพแวดล้อมที่มีเชื้อหลายชนิดเจริญอยู่ร่วมกัน ทำให้เชื้อที่สร้างแบคทีเรียโอซินสามารถแย่งอาหารและพื้นที่ เพื่อใช้ในการเจริญ ส่วนเชื้อชนิดอื่นที่ไม่สามารถสร้างแบคทีเรียโอซินได้ก็จะตายลงในที่สุด

3) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide: H_2O_2) ที่แบคทีเรียผลิตขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับสารอื่น ทำให้เกิดสารที่มีฤทธิ์ที่อาจยับยั้งจุลินทรีย์ได้ โดยทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate ซึ่งจะเร่งให้เกิดปฏิกิริยาโดย lactoperoxidase เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ intermediary oxidation ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ได้ กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า lactoperoxidase antibacterial (Dasechel and Klaenhammer, 1989) แบคทีเรียแลคติกจะไม่มีการสร้างเอนไซม์คะตะเลสที่ใช้กำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แต่ระบบอื่นซึ่งทำหน้าที่ในการกำจัดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีประสิทธิภาพน้อยกว่า การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็นเหตุให้เกิดการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตาม Foentaine *et al.* (1996) กล่าวว่าในสิ่งมีชีวิตไม่มีการสะสมของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะถูกสลายโดยเอนไซม์ peroxidases, pseudocatalase และ flavoproteins ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สามารถทำลายแบคทีเรียชนิดอื่นได้ เนื่องจากเป็นตัวออกซิไดซ์ที่รุนแรงต่อเซลล์ของแบคทีเรีย โดยจะออกซิไดซ์ส่วนประกอบของเซลล์ที่มีหมู่ sulfhydryl ได้แก่ โปรตีนในเซลล์ และไขมันในเยื่อหุ้มเซลล์ นอกจากนี้ปฏิกิริยาการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะมีการขับออกซิเจนออก ทำให้เกิดสภาวะไร้ออกซิเจนส่งผลให้แบคทีเรียชนิดอื่นๆ ไม่สามารถเจริญได้ (Ouweland and Vesterlund, 2004) สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษานมสดได้โดยไม่ต้องแช่ตู้เย็น

Carmen *et al.* (2006) ศึกษาแบคทีเรียแลคติกที่ได้จากฟาร์มปลาสามารถผลิตสารยับยั้ง *L. monocytogenes* และ *S. aureus* ได้ ซึ่งได้แก่ *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* USC-39, *Enterococcus faecium* USC-46 และ *Enterococcus mundtii* USC-51 พบว่ามีการผลิตแบคทีเรียโอซินมากที่สุด และสามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกรดอินทรีย์ในการยับยั้งได้ พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 3 strains สามารถยับยั้ง *L. monocytogenes* ได้ดี เมื่อมีพีเอชในช่วง 3.5-5.5 และสามารถยับยั้ง *S. aureus* ได้ดี เมื่อมีพีเอชในช่วง 3.5-4.5 และแบคทีเรียโอซินยังมีความสามารถในการยับยั้งได้ เมื่อให้ความร้อนที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที จึงสามารถนำมาประยุกต์ใช้เป็นสารกันเสียในอาหารหมัก และอาหารที่ผ่านความร้อนได้

4) ไดอะซีทิล (diacetyl or 2,3-butanodione) เป็นสารประกอบ aroma เกิดจากแบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ที่สามารถหมักซิเตรทได้ให้กลิ่น butter aroma ในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีคุณสมบัติยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบได้ แต่ต้องใช้ในปริมาณมาก ความเข้มข้นของไดอะซีทิลที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารทั่วไปจะมากกว่า 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ความเข้มข้นของไดอะซีทิลในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไป เช่น ปริมาณ 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และ

แบคทีเรียแกรมลบได้ ปริมาณ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์และแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ ที่ไม่ใช่แบคทีเรียแลคติกได้ เป็นต้น ถึงแม้ว่าไดอะซิโกลจะสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นได้ แต่การนำไปใช้ต้องใช้ในปริมาณค่อนข้างสูง อีกทั้งยังเป็นสารที่ทำให้กลิ่นหอม ดังนั้นจึงไม่นิยมนำไปใช้เป็นสารถนอมอาหาร (food preservative) เพื่อหวังผลในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

5) รูทีริน (reuterin) เป็นสารที่ถูกสร้างขึ้นโดยเชื้อ *Lactobacillus reuteri* (Helander *et al.*, 1997) ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นอยู่ในลำไส้ของมนุษย์ และสัตว์หลายชนิด รูทีรินเป็นสารซึ่งไม่ใช่โปรตีน มีมวลโมเลกุลต่ำ ละลายได้ดีที่พีเอชเป็นกลาง สามารถยับยั้งแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวก และแกรมลบ ยีสต์ รา รวมทั้งโปรโตซัว มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นค่อนข้างกว้าง แบคทีเรียที่ถูกยับยั้งการเจริญ ได้แก่ *Samonella*, *Shigella*, *Clostridium*, *Staphylococcus* และ *Listeria* เป็นต้น กลไกการทำงานของรูทีรินเชื่อว่าเกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บางชนิด เช่น ribonucleotide reductase ทำให้การสังเคราะห์ DNA เสียไป

6) คาร์บอนไดออกไซด์ (carbon dioxide: CO₂) เป็นผลิตภัณฑ์หลักของแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม heterofermentation มีบทบาททำให้เกิดสภาวะไร้อากาศ ซึ่งสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ decarboxylations และเกิดการสะสมของคาร์บอนไดออกไซด์ใน membrane lipid bilayer ทำให้การส่งผ่านสารต่างๆ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ทำงานผิดปกติ คาร์บอนไดออกไซด์สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิด โดยเฉพาะแบคทีเรียแกรมลบพวกที่ชอบอุณหภูมิต่ำ และความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 20-50% (v/v) สามารถยับยั้งเชื้อราได้อย่างสมบูรณ์

1.4 แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

อาหารหมัก (Fermented food) เป็นกระบวนการหนึ่งที่ยอมรับในการถนอมอาหาร เป็นกระบวนการที่ทำให้สารประกอบของอาหารเปลี่ยนแปลงไปคือ เปลี่ยนทั้งสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวไม่ทำให้คุณค่าทางอาหารเสียไป รวมถึงรสชาติ และลักษณะผลิตภัณฑ์ ซึ่งเกิดจากกิจกรรมของเอนไซม์ที่จุลินทรีย์ผลิตขึ้น เช่น อะไมเลส (amylase) ไลเปส (lipase) และโปรติเอส (protease) โดยกระบวนการหมักอาหารทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางคุณลักษณะของวัตถุดิบ เช่น เพิ่มกลิ่น รส เนื้อสัมผัส โปรตีน วิตามิน กรดอะมิโนจำเป็น สามารถเก็บรักษาอาหารได้นานขึ้น และยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค (Holzapfel, 2002)

แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการแปรรูปอาหารด้วยการหมัก เช่น ผลิตภัณฑ์นมหมัก ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากสัตว์ เช่น แหนม ไส้กรอก และปลาซึ่ม ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช เช่น ผัก และผลไม้ดอง ซึ่งบทบาทสำคัญในการหมักอาหารของแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติเป็นโปรไบโอติกก่อให้เกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภคอีกด้วย

1) อาหารหมักจากสัตว์

ผลิตภัณฑ์จากนม ได้แก่ นมเปรี้ยวมักจะมี *Lactobacillus acidophilus* และ *L. bifidus* ในยาคูลท์มักพบ *L. casei* ในโยเกิร์ตมักพบ *Lactobacillus bulgaricus*, *Bifidobacterium* sp., *L. acidophilus* และ *Streptococcus thermophilus* ในเนยแข็งมักพบ *Leuconostoc* sp., *Lactococcus cremoris* และ *Lc. Lactis* (Schrezenminer and de Verse, 2001)

ผลิตภัณฑ์จากเนื้อ ได้แก่ แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว มักจะมีแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum*, *L. brevis* และ *Pediococcus* sp. (Swetwivathana et al., 2009)

ผลิตภัณฑ์จากปลา ได้แก่ ปลาซึ่ม ปลาเจ่า ปลาซึ่มฟัก ไตปลาและปลาทุเค็ม มักจะมีแบคทีเรียแลคติก *Streptococcus* sp., *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc* sp. และ *Pediococcus acidococcus* (Swetwivathana et al., 2009)

2) อาหารหมักจากพืช

ถั่วเหลืองหมัก ได้แก่ เต้าหู้ยี้ ซีอิ๊ว และเต้าเจี้ยว มักพบแบคทีเรียแลคติกคือ *Pediococcus halophilus* และ *Lactobacillus* sp. (ประเสริฐ และคณะ, 2548)

ธัญพืช ได้แก่ ข้าวหมากและขนมจีน พบ *Lactobacillus plantarum* (Oupathumpanont et al., 2009)

ผลิตภัณฑ์ผักดอง (Fermented vegetable product)

ผักดองเป็นวิธีการถนอมอาหารที่ใช้กันมานาน เพื่อชะลอการเน่าเสียของผักและเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้หลายเดือนโดยไม่ต้องอาศัยห้องเย็น ลงทุนน้อย ใช้เครื่องจักรน้อย และไม่ต้องอาศัยเทคโนโลยีขั้นสูงในการผลิต กระบวนการดองเริ่มมีขึ้นจากความต้องการยืดอายุการเก็บอาหาร เพื่อใช้ในระหว่างที่ไม่ใช่ฤดูกาลของผลิตผลนั้นๆ หรือเพื่อไว้บริโภคในระหว่างเดินทางไกล นอกจากเหตุผลในการยืดอายุแล้ว การดองยังทำให้เกิดลักษณะเฉพาะในด้านกลิ่นรสที่เป็นที่ชื่นชอบของผู้บริโภคอีกด้วย เชื่อกันว่าแตงกวาเป็นผลิตภัณฑ์ผักดองชนิดแรกที่ได้มีการผลิตขึ้นเมื่อ 4,500 ปีก่อนในยุคเมโสโปเตเมีย ปัจจุบันการบริโภคผักดองยังคงเป็นที่นิยม ในประเทศสหรัฐอเมริกา ผักดองที่มียอดจำหน่ายสูงสุดได้แก่ แตงกวาดอง ในอังกฤษจะนิยมใช้หัวหอมดองในอาหาร และหัวปืตดองปรุงรสเป็นเครื่องเคียง สำหรับประเทศจีนมีผลิตภัณฑ์ผักดองมากมาย อาทิ หัวผักกาด กะหล่ำปลี พริก แตงกวา ฯลฯ ได้หวันนิยมหัวตอง แตงกวาดอง กะหล่ำปลีตอง และหัวผักกาดดอง

เกาหลีนิยมใช้ผักกาดในการทำกิมจิ ส่วนอินเดียจะนิยมดองผักหลายชนิดร่วมกัน (สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร)

การทำผักดอง เป็นการทำให้ผักสามารถเก็บไว้บริโภคได้นานขึ้น โดยการนำมาแปรรูป ซึ่งในการดองส่วนใหญ่เกิดจากกิจกรรมของแบคทีเรียแลคติก ผักที่นิยมนำมาดองส่วนมากจะเป็นกะหล่ำปลี หอม แตงกวา หน่อไม้ เป็นต้น ปัจจุบันการดองเป็นอุตสาหกรรมการค้าในประเทศไทยที่เป็นที่รู้จักของคนทั่วไป (Steinkraus, 1997)

การดองผักตามความเข้มข้นของเกลือ แบ่งได้เป็น 2 กลุ่มดังนี้

1) การดองผักและผลไม้ โดยใช้เกลือปริมาณต่ำประมาณ 2.5-5% เพื่อให้แบคทีเรียแลคติกที่ติดมากับผลิตผลทางการเกษตรสร้างกรดแลคติกจนได้ความเข้มข้นของกรดแลคติกภายหลังกระบวนการหมักประมาณ 1% ผลิตภัณฑ์บริโภคได้ทันที กรรมวิธีการดองสามารถทำได้โดยใช้น้ำเกลือ เช่น หน่อไม้ดอง ผักกาดดองเปรี้ยว หรือการดองด้วยเกลือแห้ง เช่น กะหล่ำปลีดอง และกิมจิ

2) การดองผักและผลไม้ โดยใช้เกลือเข้มข้นประมาณ 6-12% ทำให้เกิดการหมักด้วยจุลินทรีย์ ผลิตภัณฑ์กลุ่มนี้เรียกว่า salt-stock pickles ก่อนนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ ต้องนำผัก ผลไม้ดองมาแช่น้ำหรือเปลี่ยนน้ำหลายๆ ครั้ง เพื่อชะเกลือออกทำให้ความเค็มลดลง เช่น ผักกาดดอง มะกอกดอง แตงกวาดอง เป็นต้น

Miyashita *et al.* (2012) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมักของประเทศไทย พบแบคทีเรียจำนวน 945 สายพันธุ์จากอาหารหมักทางภาคเหนือ ภาคกลาง และภาคใต้ 114 ตัวอย่าง และระบุสายพันธุ์ด้วย 16S rRNA gene sequences และคัดเลือก 410 สายพันธุ์ที่มีความแตกต่างของลำดับเบส และแหล่งที่มาของอาหารหมักเพื่อศึกษาต่อไป โดยพบว่าจากการวิเคราะห์ด้วย 16S rRNA gene sequences สามารถแบ่งได้เป็น 6 จินัส ได้แก่ *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* และ *Weissella* มีเพียง 1 สายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึงกับจินัส *Aerococcus viridians* 100% มี 4 สายพันธุ์ที่มีความคล้ายคลึง *Tetragenococcus halophilus* 99.9% และจากการศึกษาพบว่าความเข้มข้นของ NaCl ในตัวอย่างอาหารหมักอยู่ในช่วง 0-50% ในตัวอย่างอาหารประเภทพืชหมักพบแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus fermentum* เป็นหลัก มีความเข้มข้นของ NaCl ต่ำกว่า 6% และมีระดับ pH อยู่ในช่วง 4.0-10.0 อย่างไรก็ตามจากตัวอย่างอาหารหมักจากพืชมากกว่าครึ่งพบว่ามีระดับความเข้มข้นของ NaCl ต่ำ

1.5 ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก

แบคทีเรียแลคติกจัดว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัย (Generally recognized as safe, GRAS) ซึ่งมนุษย์สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ โดยนำไปใช้ในการถนอมอาหารและใช้เป็นจุลินทรีย์โปรไบโอติกในอาหารหลายประเภท เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกมีคุณสมบัติที่เหมาะสมหลายประการ สามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคหลายชนิด เช่น แบคทีเรียโอซิน และกรดอินทรีย์ต่างๆ นอกจากนี้ยังสามารถสร้างสารที่จำเพาะที่มีผลต่อลักษณะของกลิ่นรสของอาหาร

1) ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการในกลุ่มของธัญพืช และพบคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นจากกิจกรรมที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต โดยเฉพาะการเพิ่มองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น นอกจากนี้คุณค่าทางด้านโปรตีนในอาหารที่มีส่วนของธัญพืช และถั่วเพิ่มขึ้นอีกด้วย องค์ประกอบของวิตามินในอาหารบางชนิดยังพบได้ในระหว่างการหมัก เพราะจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักสูงกว่าอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก เช่น ในนมแปรรูปจากข้าวสาลีพบว่าปริมาณของไนอะซิน ไบโอฟลาวิน และโทอะมิน ก่อนการหมักเท่ากับ 46.0, 3.2 และ 3.2 ไมโครกรัม/กรัม เพิ่มขึ้นเป็น 135, 3.2 และ 3.2 ไมโครกรัม/กรัม ภายหลังการหมัก โดยส่วนใหญ่จะมีปริมาณของวิตามินเพิ่มขึ้น (Wang and Hesseltein, 1981)

2) การยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ บทบาทของแบคทีเรียแลคติกในอาหาร พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้น ตลอดจนมีการเก็บรักษาให้นานขึ้น โดยหลักที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งคือ การสร้างกรด การลดลงของค่าพีเอช และกรดอินทรีย์ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย ทั้งกรดแลคติก และกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารประกอบอินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่เกิดขึ้น มีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีเรียโอซิน เป็นต้น

3) แบคทีเรียแลคติกมีกิจกรรมในการลดปริมาณคอเรสเตอรอลในกระแสเลือด การบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักจะช่วยในการยับยั้งการเกิดคอเรสเตอรอลในร่างกายได้ นอกจากนี้อาจมีผลในการลดน้ำหนักได้ภายในสัปดาห์จะต้องบริโภคผลิตภัณฑ์พร้อมกับการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ในการทำโยเกิร์ตยังมีองค์ประกอบของสารในการยับยั้งการสังเคราะห์คอเรสเตอรอล ดังนั้นการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งจะช่วยให้คอเรสเตอรอลในเลือดลดลง ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทหนึ่งที่มีผลดีต่อสุขภาพหลายประการ เพราะมีคุณค่าทางโภชนาการหลายอย่าง และยังส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย อีกทั้งทำให้ระบบทางเดินอาหารทำงานได้ดีขึ้น โดยเฉพาะการย่อยแลคโตส (Hertzler and Clancy, 2003)

4) ช่วยในการป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่ การศึกษาการบริโภคอาหารประเภทเนื้อแดง พบว่าทำให้ระดับของเอนไซม์ β -glucuronidase, azoreductase และเอนไซม์ introductase เพิ่มสูงขึ้นกว่าการบริโภคอาหารประเภทผัก ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้เกี่ยวข้องกับการเพิ่มของ procarcinogen ไปเป็น carcinogen ในส่วนปลายของลำไส้ โดยผลของ *L. acidophilus* สามารถยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์เหล่านี้ได้ ทำให้โอกาสเสี่ยงต่อการเกิดมะเร็งของผู้ป่วยลดลง (Adam and Moss, 1995)

5) ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแลคติกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยมีความไวต่อ microphage และ lymphocyte ทำให้เพิ่มระดับของ immunoglobulin (IgA) และผลิต gamma interferon ซึ่งผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อเชื้อโรค (pathogens) และยังมีคุณสมบัติเป็น antitumor โดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* (Adam and Moss, 1995)

2. โพรไบโอติก (Probiotic)

2.1 ความหมายของโพรไบโอติก

ค.ศ.1965 โดย Lilly and Stillwell ได้ให้คำจำกัดความว่าโพรไบโอติกหมายถึง สารที่สามารถกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ ต่อมาได้มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับโพรไบโอติกอย่างกว้างขวาง และสรุปว่าโพรไบโอติกคือ กลุ่มจุลินทรีย์ที่ถูกใช้ในมนุษย์และสัตว์ เพื่อปรับสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นภายในร่างกายให้ร่างกายมีสุขภาพดีขึ้น

Fuller (1989) ได้ให้ความหมายของโพรไบโอติกว่าเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่ใส่เสริมลงไปเพื่อประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยปรับปรุงความสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ในขณะที่โพรไบโอติกตามความหมายของ FAO/WHO (2001) หมายถึงจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ต่อสุขภาพของโฮสต์ เมื่อได้รับในจำนวนที่เหมาะสม อย่างไรก็ตามประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อสุขภาพมนุษย์ประกอบด้วย การยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคทางเดินอาหาร การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน การส่งเสริมกิจกรรม anticarcinogenic และ antimutagenic ลดอาการ lactose intolerance ลดระดับปริมาณคอเรสเตอรอลในเลือด ลดความดันเลือด ป้องกันช่องคลอดอักเสบ (vaginitis) และรักษาภาวะแทรกซ้อนภายหลังการผ่าตัด (Klaenhammer *et al.*, 1999)

2.2 คุณสมบัติของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้

- 1) ความสามารถในการอยู่รอด (viability) บริเวณที่ยึดเกาะในระบบทางเดินอาหาร
- 2) ต้องมีความปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดโรค (นวลจันทร์, 2533) และไม่สร้างสารพิษ
- 3) ความสามารถในการสร้างสาร metabolites ต่างๆ ที่ทำลายจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคทีริโอซิน ไดอะซีทิล รูทีริน
- 4) มีความสามารถในการยึดครอง (colonization) หรือการยึดเกาะ (adhesion) ในระบบทางเดินอาหาร
- 5) ควรเป็นแบคทีเรียแกรมบวก เนื่องจากสามารถทนทานต่อการย่อยของน้ำย่อยในระบบทางเดินอาหารได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ (นวลจันทร์, 2533)
- 6) สามารถทนกรดในกระเพาะอาหารได้ดี (Kontula *et al.*, 1998) เพื่อให้สามารถเดินทางผ่านกระเพาะอาหาร ซึ่งมีสถานะเป็นกรดสูงได้ (นวลจันทร์, 2533)
- 7) มีการรอดชีวิตสูง แม้เก็บไว้เป็นเวลานาน (นวลจันทร์, 2533)
- 8) ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์หรือดีดอยา (กิจการ, 2544)
- 9) สามารถสร้างกรดได้ดี เพื่อช่วยปรับสภาพในทางเดินอาหารให้อยู่ในสภาพที่จุลินทรีย์กลุ่ม coliform เจริญได้ยาก (นวลจันทร์, 2533) นอกจากนี้ยังทำให้กระเพาะอาหารมีสภาพเป็นกรดมากขึ้น เกิดการย่อยและการใช้ประโยชน์จากสารอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น
- 10) สามารถเพิ่มจำนวนได้รวดเร็ว และสามารถมีชีวิตอยู่ในลำไส้ได้นานประมาณ 24 ชั่วโมง (นวลจันทร์, 2533)
- 11) สามารถทนต่อน้ำดีได้ดี (Kontula *et al.*, 1998)
- 12) เป็นตัวแย่งอาหารของแบคทีเรียก่อโรค (Fuller *et al.*, 1993)
- 13) สามารถเจริญได้ในบริเวณที่มีแหล่งอาหารน้อย (กิจการ, 2544)
- 14) สามารถแข่งขันกับเชื้อโรคในการยึดเกาะผนังลำไส้ ซึ่งโดยปกติเชื้อโรคจะเข้าเกาะและต่อต้านการเคลื่อนที่ของลำไส้ที่มีการบีบตัวให้อาหารเคลื่อนที่ในลักษณะของลูกคลื่น (peristalsis) โดยการเกาะเคลือบของโพรไบโอติกที่ผนังของทางเดินอาหารนั้น ทำให้การย่อยอาหารและดูดซึมเป็นไปอย่างปกติ (Fuller *et al.*, 1993)
- 15) มีการกระตุ้นภูมิคุ้มกันสัตว์ พบว่า *Lactobacillus* สามารถกระตุ้นการสร้าง gamma globulin, gamma interferon และส่งเสริมกิจกรรมของ macrophage ซึ่งช่วยในการกำจัดเชื้อโรคออกจากร่างกาย (Fuller *et al.*, 1993)

16) สามารถสร้างเอนไซม์ pectinase, amylase, protease, lactase, cellulase และ β -galactosidase มีผลทำให้การย่อยและการใช้ประโยชน์ของสารอาหารต่างๆ ดีขึ้น (อุทัย, 2535)

17) เมื่อเจริญร่วมกับจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหารสามารถออกฤทธิ์ได้ดีในทางเดินอาหารทุกส่วน (นวลจันทร์, 2533)

18) ไม่ถูกดูดซึมในทางเดินอาหาร (กิจการ, 2544)

19) ไม่หลงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อ (กิจการ, 2544)

20) สามารถสร้างสารต่อต้านเชื้อโรคทั้งที่เป็น primary metabolite เช่น กรดอินทรีย์ และ secondary metabolite เช่น hydrogenperoxide และ bacteriocin เป็นต้น (Fuller *et al.*, 1993)

21) ลดการสังเคราะห์เอมีนที่เป็นพิษในระบบทางเดินอาหาร เพื่อเพิ่มการใช้ประโยชน์ของสารต่างๆในร่างกาย (อุทัย, 2535)

22) ลดความเสี่ยงในการเกิดมะเร็งลำไส้ (colon) โดยไปลดเอนไซม์ที่เป็นสาเหตุของการเกิดโรคมะเร็ง เช่น azoreductase, nitrate reductase และ β -glucuronidase (Kontula *et al.*, 1998)

23) สามารถเจริญได้ในช่วงอุณหภูมิกว้างคือ 20-60 องศาเซลเซียส (กิจการ, 2544)

24) ลดระดับของ cholesterol ในเลือด (กิจการ, 2544)

จากการศึกษาของ Liong and Shah (2005) พบว่าผู้บริโภคมลิตภัณฑ์โปรไบโอติกจะมีระดับคอเรสเตอรอลต่ำ เนื่องจากการผลิตน้ำดีในตับของคน และสัตว์ใช้คอเรสเตอรอลเป็นสารตั้งต้นในการผลิต โปรไบโอติกสามารถผลิตเอนไซม์ย่อยน้ำดี Bile salt hydrolase (BSH) ทำให้เกิด free bile salt และ cholic acid ซึ่งมีความสามารถในการละลายน้ำต่ำ จึงมีการดูดซึมที่ลำไส้ใหญ่ต่ำ ส่งผลให้มีการใช้คอเรสเตอรอล เพื่อสร้าง free bile salt และ cholic acid เพิ่มมากขึ้นในตับ ทำให้ระดับคอเรสเตอรอลในกระแสเลือดลดลง

25) มีความสามารถในการผลิตสารต่างๆ เช่น กรดอะซิติก กรดแลกติก แบคเทอริโอซิน และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ ซึ่งสารดังกล่าวมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มเอนเทอริกแบคทีเรีย (enteric bacteria) เช่น *E. coli* และ *Salmonella* spp. หรือจุลินทรีย์ที่บุกรุก (invasion) แล้วก่อให้เกิดโรคในลำไส้ของสัตว์ได้ (Lin *et al.*, 2005)

2.3 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

โพรไบโอติกส่งผลที่เป็นประโยชน์ต่อเจ้าบ้าน โดยอาจเป็นสื่อกลางในการป้องกันกลุ่มจุลินทรีย์ที่จำเพาะได้โดยตรง เป็นผลให้จำนวนจุลินทรีย์เหล่านี้ลดลง หรือไปมีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสัตว์หรือกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน โพรไบโอติกเป็นจุลินทรีย์ที่ต่อต้านเชื้อก่อโรค โดยผลิตสารต้านจุลินทรีย์และสารต้านแบคทีเรีย เช่น ไซโตไคน์ (cytokines) และกรดบิวทีริก (butyric acid) ลดพีเอชของลำไส้ โดยกระตุ้นการผลิตกรดแลคติกของจุลินทรีย์ประจำถิ่นแข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการแย่งพื้นที่เกาะผนังลำไส้ ปรับปรุงระบบภูมิคุ้มกัน และกระตุ้นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน แข่งขันกับเชื้อก่อโรคในการแย่งสารอาหารและปัจจัยในการส่งเสริมการเจริญหรือผลิตเอนไซม์แลคเตสในการช่วยย่อยน้ำตาลแลคโตส

สภาพปัจจุบันสิ่งมีชีวิตมีสภาวะแวดล้อมที่ไม่เป็นธรรมชาติ ซึ่งมนุษย์ต้องมีการปฏิบัติตนอย่างระมัดระวังหรือมีการดูแลอนามัยที่ดี มีข้อจำกัดมากมายเกี่ยวกับการบริโภค หรือการกินอาหารที่ไม่เป็นธรรมชาติ มีภาวะกดดัน มีโอกาสสัมผัสกับเชื้อก่อโรค หรือมีการเลี้ยงดูของแม่และลูกลดน้อยลง มีภาวะที่มีการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อทำลายจุลินทรีย์ มีภาวะความกดดันรวมทั้งความเครียด ล้วนมีผลต่อจุลินทรีย์ที่มีอยู่ภายในลำไส้ทั้งสิ้น โดยมีผลทั้งทางตรงและทางอ้อมคือ อาจทำให้จุลินทรีย์มีองค์ประกอบที่ผิดแปลกไปจากเดิม มีบางอย่างบกพร่องอันมีผลต่อการแสดงออกถึงความต้านทานโรคลดลง มีความไวต่อการติดเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรค ซึ่งส่งผลต่อการเจริญเติบโตของมนุษย์

การใช้โพรไบโอติกมีจุดมุ่งหมาย เพื่อให้มีการเสริมสร้างหรือซ่อมแซม ฟื้นฟูในส่วนที่บกพร่องต่างๆ เหล่านี้ให้กลับคืนสู่สภาพเดิมเป็นปกติ เพื่อให้ทำหน้าที่ปกป้องและควบคุมจุลินทรีย์อื่นๆ ที่บุกรุกได้อย่างมีประสิทธิภาพดีเช่นเดิม ซึ่งมีความแตกต่างจากการใช้สารปฏิชีวนะที่มุ่งเน้นเพื่อการรักษา และส่งเสริมให้มีการเจริญเติบโตดีขึ้น โดยไม่ได้คำนึงถึงผลข้างเคียงที่ตามมา (ทัศนีย์, 2539)

ประโยชน์ของโพรไบโอติกต่อร่างกายมนุษย์มีดังนี้

1) ส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกัน โดยป้องกันการบุกรุกของเชื้อก่อโรคบริเวณเยื่อบุผิวลำไส้ ในผู้ป่วยโรค Crohn's disease ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการสูญเสียความสามารถในการขัดขวางเชื้อก่อโรค ช่วยกระตุ้นการสร้าง tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ interleukin-6 (IL-6)

2) การป้องกันมะเร็ง สามารถลด mutagenicity ของ mutagen เช่น 1,2-dimethylhydrazine (Salminen *et al.*, 1998)

3) แบคทีเรียแลคติกเกี่ยวข้องกับการลด carcinogenicity ของ carcinogen-activating bacterial enzymes ในระบบทางเดินอาหาร

4) ปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ ซึ่งในระบบทางเดินอาหารมีทั้งจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และเป็นโทษต่อมนุษย์ หากปล่อยให้ร่างกายก่อโรคทำให้ร่างกายเกิดอาการเจ็บป่วยได้ ความสมดุลของจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่เหมาะสมจะต้องมีปริมาณของแบคทีเรียที่เป็นประโยชน์มากกว่าแบคทีเรียก่อโรค โดยที่โปรไบโอติกจะช่วยปรับสมดุลนี้ให้ร่างกายสามารถรักษาสภาพสมดุลไว้ได้

5) ออกฤทธิ์ได้หลายรูปแบบในการช่วยเสริมสร้างสุขภาพ และป้องกันหรือรักษาโรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น กลุ่ม *Lactobacillus* จะสร้างน้ำย่อย β -galactosidase ช่วยลดปริมาณน้ำตาล lactose ในอาหาร ซึ่งเป็นสาเหตุของท้องเสียได้

6) สามารถสร้างสารหลายชนิดที่ช่วยยับยั้งแบคทีเรียก่อโรค เช่น organic acids, free fatty acids, ammonia, hydrogenperoxide และ bacteriocins (Silva *et al.*, 1987) ช่วยกำจัดเชื้อแบคทีเรียที่ปะปนในอาหาร เอนไซม์บางชนิดจากโปรไบโอติกจะช่วยยับยั้งสารพิษจากแบคทีเรีย โดยไปปิดกั้นส่วนที่เป็นพิษก่อนจะเข้าเซลล์ (Pothoulakis *et al.*, 1993)

7) ป้องกันและรักษาภาวะท้องเสีย ภาวะท้องเสียที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัสหรือแบคทีเรีย มักพบได้บ่อยทั้งในเด็กเล็กและผู้สูงอายุ หรือผู้ที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เช่น ในสถานพักฟื้นมีผู้นำเอา *Lactobacillus rhamnosus* strain GG (LGG; L: *Lactobacillus rhamnosus*, GG: Gorbach-Goldin) (Lee *et al.*, 2000) มาใช้ป้องกันภาวะท้องเสียในเด็กขาดอาหาร โดยเฉพาะที่ไม่ได้รับการเลี้ยงดูด้วยนมแม่ ซึ่งพบว่าป้องกันได้ดี (Oberhelman *et al.*, 1999) และ *Lactobacillus* สามารถลดระยะเวลาและความรุนแรงของอาการท้องเสียที่เกิดจากภาวะอาหารเป็นพิษ (Isolauri *et al.*, 1991) และได้ผลดีมากในกลุ่มที่เกิดอาการท้องเสียจาก rotavirus สามารถลดการขับเชื้อ rotavirus ออกมาในอุจจาระผู้ป่วยได้

8) ป้องกันโรคมะเร็งลำไส้ใหญ่ แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่มีส่วนในการก่อให้เกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ โดยการสร้างสารก่อมะเร็งหรือเป็นตัวร่วมในการก่อมะเร็ง โดยเฉพาะเมื่อผู้ป่วยรับประทานอาหารประเภทไขมัน และเนื้อจำนวนมากโดยไม่รับประทานผักและผลไม้ ทำให้เพิ่มสาร *N*-nitroso compounds (NOC) และ heterocyclic aromatic amines ที่เป็นสาเหตุของมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Guarner *et al.*, 2003) กลุ่มของจุลินทรีย์โปรไบโอติกจะช่วยเปลี่ยนสภาพแบคทีเรียในลำไส้ ช่วยป้องกันไม่ให้เกิดสารพิษเหล่านี้ (Wollowski *et al.*, 2001) ทั้ง *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* จะป้องกันการเกิดมะเร็งลำไส้ใหญ่ (Singh *et al.*, 1997)

9) รักษาโรคลำไส้อักเสบเรื้อรัง Inflammatory bowel disease (IBD) ซึ่งโปรไบโอติกโดยเฉพาะ *Lactobacillus rhamnosus* strain GG ช่วยลดภาวะอักเสบของลำไส้ โดยการปรับสภาพภูมิคุ้มกันทำให้มีระดับ IgA ที่ลดลงในช่วงโรคกำเริบกลับสู่ภาวะปกติ (Schultz *et al.*, 1998)

2.4 จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติก

จุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกมักอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก มีการศึกษาถึงความปลอดภัยมาเป็นระยะเวลานาน ส่วนใหญ่พบว่าไม่มีคุณสมบัติก่อโรค และนอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกมีการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมจึงถูกนำมาใช้กันมากขึ้น เพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ เนื้อสัมผัส และกลิ่นรสชาติของผลิตภัณฑ์อาหาร เช่น นม เนยเหลว และโยเกิร์ต เป็นต้น

แบคทีเรียที่มีการนำมาผลิตเป็นโปรไบโอติกที่สำคัญคือ กลุ่ม *Lactobacillus* เช่น *L. rhamnosus* strain GG (GG: Gorbach-Goldin) ซึ่งมีการศึกษาและใช้มากที่สุด และ *L. plantarum* (Bengmark, 1998) และชนิดอื่นๆ ก็มีใช้กันมาก เช่น กลุ่ม *Bifidobacterium* ตัวอย่างจุลินทรีย์ที่จัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติก แสดงดังตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 จุลินทรีย์ที่จัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์โปรไบโอติก (Saad et al., 2013)

<i>Lactobacillus</i>	<i>Bifidobacterium</i>	Other lactic acid bacteria	Other
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> strain Nissle
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Leuconstoc mesenteroides</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. breve</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	
<i>L. delbrueckii</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	
<i>L. farciminis</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>	
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>	
<i>L. gasseri</i>	<i>B. thermophilum</i>		
<i>L. johnsonii</i>			
<i>L. paracasei</i>			
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			

3. การศึกษาเกี่ยวกับการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีสมบัติเป็นโพรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช และผลิตผลิตภัณฑ์ผักดอง

Klaenhammer *et al.* (1999) กล่าวว่าอุตสาหกรรมทางอาหารได้ให้ความสนใจในเรื่องของการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตอาหาร การพัฒนาเทคโนโลยี การพัฒนาและควบคุมโรคที่เกี่ยวข้องกับอาหาร และให้ความสำคัญกับการพัฒนาอาหารเพื่อสุขภาพมากขึ้น ในหัวข้อด้านจุลชีววิทยาทางอาหารที่ได้มีการศึกษาค้นคว้า ได้แก่ ผลิตภัณฑ์อาหารเพื่อสุขภาพ (functional foods) และโพรไบโอติก (probiotics) ซึ่งในปัจจุบันมีรายงานเกณฑ์ในการคัดเลือกคุณสมบัติการเป็นโพรไบโอติกมากมาย โดยส่วนใหญ่มีเกณฑ์พื้นฐาน 4 เกณฑ์ ได้แก่ 1) ความเหมาะสมทางด้านเทคโนโลยีในการนำไปใช้ เช่น สามารถผลิตได้จำนวนมาก (mass production) เก็บรักษาได้ และเจริญได้ มีจำนวนเซลล์ปริมาณสูงระหว่าง 10^6 - 10^8 มีความคงตัวในระหว่างการเก็บรักษา ไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม 2) ความสามารถในการแข่งขัน เช่น สามารถมีชีวิตรอดขยายพันธุ์ และมีกิจกรรมเมตาบอลิซึมในการทดลองทางห้องปฏิบัติการ ทนต่อเกลือ น้ำดี ทนกรด มีความสามารถในการแข่งขันกับเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal microflora) มีประสิทธิภาพในการทนต่อแบคทีริโอซิน (bacteriocins) กรด และสารยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial compounds) รวมทั้งมีความสามารถในการยึดเกาะ 3) มีการแสดงออก เช่น ไม่มีการสร้างสารพิษ (nontoxic) ไม่เป็นสายพันธุ์ก่อโรค (nonpathogenic) และได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS status) เมื่อนำมาใช้ในอาหาร 4) สามารถทำหน้าที่ได้ เช่น มีประโยชน์ต่อสุขภาพ อาทิ ลดการแพ้แลคโตส (lactose tolerance) สามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ อาทิ แบคทีริโอซิน ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ กรดอินทรีย์ มีความสามารถในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulatory) โดยเพิ่มระดับของแอนติบอดี IgA และ IgM (Tannock, 1998) อีกทั้งสามารถผลิตสาร bioactive compounds เช่น เอนไซม์ วัคซีน และเปปไทด์ (peptides)

ขณะที่ Bengmark (2000) ระบุว่าการผลิตโพรไบโอติกให้เป็นประโยชน์ต่อร่างกาย ในลักษณะของ functional food จะต้องให้มีสมบัติตามที่ต้องการ ได้แก่ สามารถคงสภาพสิ่งมีชีวิตที่มีกลิ่นและรสชาติดีหลังการหมัก และคงสภาพกรดอ่อนๆ ตลอดช่วงการเก็บ ซึ่งต้องจัดเก็บอย่างดีและยังคงสภาพเดิมได้ แม้แช่แข็งหรือด้วยวิธีอื่นๆ ที่ทำให้แห้ง และให้ผลลัพธ์ตอบสนองตามปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดย Martins *et al.* (2013) ระบุว่าผู้บริโภคมีความใส่ใจในด้านการดำเนินชีวิตมากขึ้น และมีความกังวลในเรื่องปัญหาสุขภาพ ผู้บริโภคจึงมีความต้องการอาหารที่บำรุงสุขภาพ เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารที่มีส่วนผสมของจุลินทรีย์โพรไบโอติก ซึ่งจะมีประโยชน์ในเรื่องของการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ โพรไบโอติกส่วนใหญ่จะอยู่ในกลุ่มของจีนัส *Lactobacillus* ที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร ในอาหารประเภทนมหมักโดยทั่วไปสามารถพบจุลินทรีย์โพรไบโอติก แต่การ

บริโภคอาหารประเภทนมหมักจำพวกนี้มีข้อจำกัดสำหรับผู้บริโภคอาหารมังสวิรัต และผู้บริโภคที่มีอาการแพ้แลคโตส (lactose intolerant) หรือผู้บริโภคที่ต้องการควบคุมคอเรสเตอรอล ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาอาหารที่ไม่ใช่ผลิตภัณฑ์นม (non-dairy probiotic product) ซึ่งได้แก่ อาหารหมักประเภทผักผลไม้ และธัญพืช ได้รับความสนใจและศึกษากันมากขึ้น โดยศึกษาและประยุกต์ใช้โปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากผัก และพบว่าผักสามารถเป็นตัวพุง (carries) และเป็น substrates ที่เหมาะสมสำหรับแบคทีเรียโปรไบโอติกในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว (Kourkoutas *et al.*, 2006)

Ohmomo *et al.* (1998) แยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิสูงจากหญ้าหมัก และผักดองตามแหล่งต่างๆ ของประเทศไทย ได้ทั้งหมด 80 สายพันธุ์ เมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งด้วยวิธี spot-on-lawn และ paper disc พบว่าสายพันธุ์ K4 ที่แยกได้จากหญ้าหมักสามารถยับยั้งการเจริญของ *Ec. faecium* และ *Ec. faecalis* แบคทีเรียโอซินที่ได้ถูกยับยั้งโดยสมบูรณ์ เมื่อถูกย่อยด้วยเอนไซม์ trypsin และสามารถทนความร้อนได้ถึง 100 องศาเซลเซียส เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค SDS-PAGE electrophoresis พบว่ามีมวลโมเลกุลประมาณ 20,000 ดัลตัน

Maneerat (2000) แยกแบคทีเรียแลคติกได้ทั้งหมด 91 สายพันธุ์จากอาหารหมักของไทย ได้แก่ หน่อไม้ดอง ผักเสี้ยนดอง และอาหารหมักอื่นๆ เมื่อทดสอบการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่า 18 สายพันธุ์สามารถยับยั้งการเจริญของ *Staphylococcus aureus* ซึ่งทั้งหมดอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* นอกจากนี้ยังพบว่า 68 สายพันธุ์จากแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้งหมดสามารถเจริญได้ใน Bile salt medium และ 58 สายพันธุ์เจริญได้ในอาหารที่มีค่าพีเอชต่ำ (pH 1.5, 2.0 และ 3.0) แสดงให้เห็นว่าเชื้อเหล่านี้มีสมบัติที่จะนำไปพัฒนาเป็นโปรไบโอติกได้

Kohajdova and Karovicova (2003) ประเมินผลทางประสาทสัมผัส และทางเคมีของน้ำกะหล่ำปลีที่ผสมน้ำหอมหัวใหญ่ที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติก โดยน้ำกะหล่ำปลีผสมกับน้ำหอมหัวใหญ่ 0.05%, 0.1% และ 0.2% และเติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* CCM 7039 หมัก 168 ชั่วโมงที่ 21 องศาเซลเซียส พบว่าน้ำกะหล่ำปลีที่ผสมน้ำหอมหัวใหญ่ 0.1% จะมีปริมาณกรดแลคติกสูงสุด และพบกรดอะซิติกในน้ำกะหล่ำปลีที่ผสมน้ำหอมหัวใหญ่ 0.2% เมื่อนำมาทดสอบทางประสาทสัมผัสผู้บริโภคยอมรับน้ำกะหล่ำปลีที่ผสมน้ำหอมหัวใหญ่ 0.1% เมื่อวิเคราะห์ทางเคมี ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด และประเมินกลิ่น รสชาติของน้ำกะหล่ำปลีที่ผสมกับน้ำหอมหัวใหญ่ พบว่ามีรสหวาน และรสเผ็ดจากหอมหัวใหญ่

Kohajdova *et al.* (2006) ศึกษาการหมักน้ำผักต่างๆ ได้แก่ กะหล่ำปลี มะเขือเทศ ฟักทอง และบวมด้วยแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* CCM 7039 และวิเคราะห์พารามิเตอร์ต่างๆ ได้แก่ ค่าพีเอช ปริมาณกรดทั้งหมด (%) รวมทั้งทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าน้ำกะหล่ำปลีหมัก และน้ำบวมหมัก มีระดับค่าพีเอชต่ำกว่า 3.6 หลังการหมัก 72 หรือ 48 ชั่วโมง

และมีปริมาณกรดสูง 1.4% และ 1.5% ตามลำดับ ซึ่งน้ำกะหล่ำปลีหมักได้รับการยอมรับสูงสุดในทุกๆ ด้านเมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่ามีรสชาติค่อนข้างเปรี้ยว ซึ่งผู้บริโภครับการยอมรับ 89.3% มีกลิ่นฝักตามธรรมชาติ ซึ่งผู้บริโภครับการยอมรับ 83.5% และได้รับการยอมรับโดยรวม 91.5% ในขณะที่น้ำบวมหมักได้รับการยอมรับจากผู้บริโภครองลงมาคือ ผู้บริโภคให้การยอมรับด้านรสชาติ 84.5% ได้รับการยอมรับด้านกลิ่น 83% และได้รับการยอมรับโดยรวม 85%

Yoon *et al.* (2006) ศึกษาการผลิตน้ำกะหล่ำปลีโปรไบโอติกด้วยแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* C3, *Lactobacillus casei* A4 และ *Lactobacillus delbrueckii* D7 โดยใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกเป็นเชื้อเริ่มต้นบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอช ปริมาณกรดแลคติก ปริมาณน้ำตาล และจำนวนเชื้อเกิดขึ้นในระหว่างการหมักภายใต้การควบคุมสภาวะการหมัก พบว่าเชื้อ *L. plantarum*, *L. casei* และ *L. delbrueckii* สามารถเจริญได้ในน้ำกะหล่ำปลีหมัก (10×10^8 CFU/ml) หลังการหมัก 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส การหมักด้วยเชื้อ *L. casei* มีปริมาณกรดแลคติกเกิดขึ้นน้อยกว่าการหมักด้วยเชื้อ *L. plantarum* หรือ *L. delbrueckii* และหลังการเก็บน้ำกะหล่ำปลีในอุณหภูมิห้องเย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบจำนวนเชื้อ *L. plantarum* 4.1×10^7 CFU/ml, *L. delbrueckii* 4.5×10^5 CFU/ml แต่เชื้อ *L. casei* ไม่สามารถมีชีวิตรอดที่สภาวะการหมักที่มีค่าพีเอชต่ำ และปริมาณกรดสูง อีกทั้งจำนวนเชื้อลดลง หลังการเก็บน้ำกะหล่ำปลีในอุณหภูมิห้องเย็นที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาเพียง 2 สัปดาห์ ซึ่งการหมักน้ำกะหล่ำปลีโปรไบโอติกเหมาะเป็นเครื่องดื่มสุขภาพสำหรับผู้นิยมบริโภคน้ำผัก และผู้บริโภคที่แพ้น้ำตาลแลคโตสได้

Muchoki *et al.* (2007) ศึกษาประสิทธิภาพการหมัก และการเก็บรักษาใบถั่ว (cowpea leaf) โดยศึกษาสารอาหาร และทดสอบทางประสาทสัมผัสของใบถั่วหมัก หลังการล้างทำความสะอาดใบถั่ว นำมาหมักนาน 21 วัน พบว่ามีค่าพีเอช 3.8 มีความชื้น 10% และเมื่อเก็บรักษาไว้นาน 3 เดือนที่อุณหภูมิ 18°C, 22°C - 26°C หรือ 32°C นำมาวิเคราะห์ปริมาณวิตามิน พบว่ามี beta-carotene 91% และ ascorbic acid 15% ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 32°C พบว่าปริมาณของ beta-carotene และ ascorbic acid ลดลงเป็น 23-52% และ 4-7% ตามลำดับ และเมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส พบว่าใบถั่วหมักมีลักษณะเนื้อสัมผัสที่ผู้บริโภครับการยอมรับ

Champagne *et al.* (2008) ประเมินศักยภาพการอยู่รอดของจุลินทรีย์โปรไบโอติก *Lactobacillus* ทั้ง 9 สายพันธุ์ในเครื่องดื่มผลไม้ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 80 วัน โปรไบโอติก *Lactobacillus brevis* LB6, *L. rhamnosus* LB24 และ *L. acidophilus* LB45 มีประสิทธิภาพในการอยู่รอดใกล้เคียงกับ *L. fermentum* LB32, *L. reuteri* LB38 และ *L. plantarum* LB42 โดยที่ *L. rhamnosus* มีประสิทธิภาพการอยู่รอดในระหว่างการเก็บรักษาที่ดีที่สุด มีจำนวนเชื้อมากกว่า 10^7 CFU/ml หลังการเก็บรักษา 80 วัน

Duangjitcharoen *et al.* (2009) ประเมินความปลอดภัยของโปรไบโอติกแบคทีเรีย *L. plantarum* SS2 ที่แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพมะเฟืองที่ผลิตในภาคอีสานตอนล่างของประเทศไทย เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์โปรไบโอติกที่จะนำไปใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้จากพืช โดยศึกษาผลของแบคทีเรียสายพันธุ์นี้ โดยการป้อนในหนูขาวที่ความเข้มข้น 2 ระดับคือ 10^{12} เซลล์ต่อหนู และ 10^9 เซลล์ต่อหนู โดยให้แบคทีเรียเป็นเวลา 14 วัน และตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมสัตว์ทดลอง น้ำหนักตัว น้ำหนักตับและม้าม และเพาะเชื้อจากตัวอย่างเลือด เพื่อประเมินว่าโปรไบโอติกสามารถแพร่เข้าสู่กระแสเลือดหรือไม่ โดยเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับการป้อนแบคทีเรีย *L. plantarum* SS2 ซึ่งหนูกลุ่มที่ถูกป้อนด้วยแบคทีเรียโปรไบโอติกนั้นยังคงมีพฤติกรรม การกินอาหาร การดื่มน้ำ การขับถ่าย การนอนหลับ การอยู่ร่วมกัน และการตอบสนองที่ปกติ รวมทั้งยังคงมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะขน สีของเท้า ที่ปกติเช่นเดิม แต่มีน้ำหนักตัวโดยรวมต่ำกว่าในกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นไปได้ที่โปรไบโอติกจะสามารถช่วยควบคุมน้ำหนักได้ อาจเนื่องจากการช่วยลดการดูดซึมกลูโคสจากลำไส้ หรือช่วยเพิ่มเมแทบอลิซึมของกลูโคส นอกจากนี้ยังตรวจไม่พบแบคทีเรียจากการนำเลือดมาเพาะเชื้อ และไม่พบความแตกต่างของน้ำหนักของตับและม้าม ระหว่างหนูกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้น โปรไบโอติกแบคทีเรียสายพันธุ์นี้จึงมีความปลอดภัย

Charalampopoulos and Pandiella (2010) ศึกษาการรอดชีวิตของเชื้อ *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 ในการเป็นส่วนผสมในธัญพืชหมัก ได้แก่ มอลต์ ข้าวสาลี ข้าวบาร์ลีย์ เพื่อปรับปรุงรสชาติ และน้ำหมัก โดยหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 70 วัน เชื้อโปรไบโอติกดังกล่าวสามารถรอดชีวิตได้ภายใต้สภาวะการเก็บรักษาในตู้เย็น และมีความเข้มข้นของน้ำตาลในปริมาณสูง โดยใช้ส่วนผสมของธัญพืชต่อน้ำในร้อยละ 5, 20 และ 30 (w/w) ภายหลังจากหมักโดยเติมเชื้อ *Lactobacillus plantarum* ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 7 วัน พบว่าช่วงแรกของการเก็บรักษามีกรดแลคติกลดลงอยู่ในช่วง 0.5 g/l-17 g/l และความเข้มข้นของปริมาณน้ำตาลลดลงอยู่ในช่วง 0.8 g/l-6.5 g/l มีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.9-3.4 ซึ่งเชื้อสามารถอยู่รอดได้ในการหมักด้วยมอลต์ดีกว่าการหมักด้วยข้าวสาลี และข้าวบาร์ลีย์ พบว่ามอลต์มีปริมาณกรดแลคติกสูง ซึ่งธัญพืชเหล่านี้เป็นแหล่งที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลสูง อีกทั้งมีสารประกอบอื่นๆ ที่สามารถปกป้องเซลล์แบคทีเรียแลคติกได้

Ranadheera *et al.* (2010) พบแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผักดองมีสมบัติเป็นโปรไบโอติก แนะนำให้ใช้สายพันธุ์โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกในการหมัก และปรับปรุงผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช เช่น มะกอกดอง และสามารถปรับปรุงผลิตภัณฑ์นมหมัก ซึ่งเชื้อแบคทีเรียสามารถอยู่รอดได้ เนื่องจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแลคติกสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่หมัก เช่น ความชื้นลดลง และมีการสร้างสารอินทรีย์ที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ได้

Yang *et al.* (2010) ศึกษาประชากรของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากเศษผักที่หมักเพื่อเป็นอาหารสัตว์ แบคทีเรียแลคติก 52 ไอโซเลทแยกได้จากกะหล่ำปลี ผักกาดขาว และผักกาดแก้ว ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์อะมิเลส สามารถจัดจำแนกตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา และลักษณะทางชีววิทยา ได้เป็น 6 กลุ่ม (A-F) ในกลุ่ม A มีรูปร่างแท่ง ไม่เกิดก๊าซ ในกลุ่ม B และ C เป็น Homofermentative cocci ส่วนกลุ่ม D, E และ F เป็น Heterofermentative cocci จากการวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA gene sequence พบว่ากลุ่ม A-F คือ *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus piscium*, *Lactobacillus lactis*, *Leuconostoc citreum*, *Weissella soli* และ *Leuconostoc gelidum* ตามลำดับ ความหลากหลายของจำนวนประชากรของแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม Homofermentative lactobacilli ประกอบด้วย *Lactobacillus plantarum* (34.6%), *Weissella soli* (19.2%), *Leuconostoc gelidum* (15.4%), *Leuconostoc citreum* (13.5%), *Lactobacillus lactis* (9.6%) และ *Lactobacillus piscium* (7.7%) โดยพบแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* เป็นส่วนใหญ่ในผักทั้ง 3 ชนิด ซึ่งผักทั้ง 3 ชนิดมีระดับของ crude protein คือ 20.2-28.4% โดยน้ำหนักแห้ง จากการศึกษาสามารถปรับปรุงเศษผักที่เหลือโดยการใช้ระบบการหมักที่มีขนาดเล็กลง ค่า pH ต่ำ และมีความเข้มข้นของ lactate สูง แนะนำให้หมักเศษผักด้วยแบคทีเรียแลคติกและเสริมด้วยสารอาหาร เพื่อเป็นแหล่งอาหารที่มีโปรตีนสำหรับการเลี้ยงหรือปศุสัตว์ต่อไป

Di Cagno *et al.* (2011) ศึกษาประสิทธิภาพของแบคทีเรียแลคติกในการหมักลักษณะเนื้อสัมผัส สี และทดสอบทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มสมูตตี้สีแดง และสีเขียว จากการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผลแบล็กเบอร์รี่ ผลลูกพรุน กีวี มะละกอ และผักชีล้อม (fennels) โดย 16S rRNA gene sequence พบเชื้อ *Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus sp.* และ *Lactobacillus pentosus* โดยแต่ละไอโซเลทมาจากผัก และผลไม้ต่างชนิดกัน นำมาศึกษาการเจริญของเชื้อในน้ำผัก และน้ำผลไม้ โดยในกระบวนการผลิต และการเก็บรักษาเครื่องดื่มสมูตตี้สีแดงและสีเขียวย มีการเติมกลูต้ามิโนแบคทีเรียแลคติก โดยพบว่ากลูต้ามิโนแบคทีเรียแลคติกมีการเจริญอยู่ในช่วง 9 log CFU/g ตลอด 30 วันของการเก็บรักษาที่ 4 องศาเซลเซียส ไม่มีการปนเปื้อนของยีสต์ และ *Enterobacteriaceae* และศึกษาระดับของแข็งที่ละลายน้ำได้ ปริมาณกรดทั้งหมด และความหนืดของเครื่องดื่มสมูตตี้สีแดงและสีเขียวยมาเปรียบเทียบกับเครื่องดื่มที่ไม่เติมกลูต้ามิโนแบคทีเรียแลคติก โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงสีจากสีแดงเป็นสีน้ำตาลในเครื่องดื่มสมูตตี้ที่เติมแบคทีเรียแลคติก ทั้งนี้เกิดจากการหมักของแบคทีเรียแลคติก โดยใช้คาร์โบไฮเดรตเพื่อสร้างกรด ซึ่งพบกรดมาลิก (malic acid), สารประกอบ polyphenolic และ ascorbic acid ในระหว่างการเก็บรักษา ซึ่งพบว่าสามารถเก็บรักษาไว้ได้นานกว่าเครื่องดื่มที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก เมื่อวิเคราะห์

ผลทางสถิติพบว่า เครื่องดื่มสมูตตี้ที่มีการเติมกล้ำเชื้อยังมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และการหมักเครื่องดื่มด้วยแบคทีเรียแลคติกสามารถช่วยปรับปรุงลักษณะต่างๆ ทางประสาทสัมผัสของเครื่องดื่มได้

Mousavi *et al.* (2011) ศึกษาการหมักน้ำทับทิมด้วยโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* และ *L. delbrueckii* จุลินทรีย์โพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์สามารถเจริญและอยู่รอดในระหว่างการเก็บรักษา 2 สัปดาห์แรกที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยที่เชื้อมีการสร้างกรดซิตริก citric acid ซึ่งเป็นสารอินทรีย์ที่สามารถพบได้ในน้ำทับทิม ซึ่งให้เห็นว่าน้ำทับทิมเป็นสารตั้งต้นที่ดีในการผลิตเครื่องดื่มโพรไบโอติก

Pereira *et al.* (2011) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำมะม่วงหิมพานต์เข้มข้นด้วย *Lactobacillus casei* NRRL B-442 ได้แก่ ปริมาณเชื้อโพรไบโอติกที่เหมาะสมในการเติมเป็นกล้ำเชื้อ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการหมัก อย่างไรก็ตาม *L. casei* สามารถอยู่รอดได้ในระหว่างการเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง โดยสภาวะที่ pH 6.4 ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสหมักนาน 16 ชั่วโมง และปริมาณกล้ำเชื้อที่เหมาะสมคือ 7.48 log CFU/ml เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการหมักน้ำมะม่วงหิมพานต์ด้วยเชื้อโพรไบโอติก *L. casei* ซึ่งเชื้อสามารถเจริญได้ตลอดการเก็บรักษาในตู้เย็นนาน 42 วัน โดยเชื้อรอดชีวิตได้สูงกว่า 8.00 log CFU/ml และตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาน้ำมะม่วงหิมพานต์เข้มข้นพบว่าการเปลี่ยนแปลงความใสและสีเป็นสีเหลือง และมีระดับสีแดงขึ้นเมื่อมีการหมักเป็นเวลานานขึ้น ซึ่งการหมักน้ำมะม่วงหิมพานต์เข้มข้นด้วย *L. casei* เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพ โดยที่เชื้อยังสามารถทำหน้าที่ได้ดี เช่นเดียวกับการหมักในผลิตภัณฑ์นมหมัก

Lee *et al.* (2011) ประเมินการทำงานของโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกิมจิที่หมักตามธรรมชาติ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืชที่ได้รับความนิยมจากผู้บริโภคสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 12 ไอโซเลทเป็น Heterofermentative *Lactobacillus* ซึ่งมีคุณสมบัติโพรไบโอติกสามารถใช้เป็นกล้ำเชื้อในการผลิตกิมจิ 11 ไอโซเลทคือ *Lactobacillus sakei* และ 1 ไอโซเลทคือ *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเชื้อ *Lactobacillus sakei* ผลิต L (+) lactic acid จากการใช้น้ำตาลกลูโคส ทุกๆ สายพันธุ์สามารถอยู่รอดในสภาวะน้ำย่อยในกระเพาะอาหารและลำไส้เล็ก โดยมีการยึดเกาะ HT-29 cells ได้ดีกว่า *Lactobacillus rhamnosus* GG ที่ใช้เป็นโพรไบโอติกโดยทั่วไป อีกทั้งยังมีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคทางเดินอาหาร ลดระดับคอเรสเตอรอลด้วยกิจกรรมของ BSH (bile salt hydrolytic) จากผลการศึกษาดังกล่าวสามารถใช้เชื้อโพรไบโอติกนี้ในการผลิตกิมจิได้

Rathore *et al.* (2012) ศึกษาการผลิตเครื่องดื่มโพรไบโอติกด้วยการใช้ธัญพืชแบบเดี่ยว และแบบผสมเป็นสารตั้งต้นในการหมักกับเชื้อแบคทีเรียแลคติก และเปรียบเทียบกับสูตรอาหาร ซึ่งเป็นตัวแปรในการหมัก โดยใช้แบ่งจากธัญพืช 3 ชนิดผสมในอาหารหมักคือ มอลต์ บาเลย์ และบาเลย์

ผสมมอลต์ ซึ่งนำมาหมักกับจุลินทรีย์โปรไบโอติก ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* (NCIMB 8826) และ *Lactobacillus acidophilus* (NCIMB 8821) พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีการเจริญในอาหารที่มีมอลต์ เป็นส่วนประกอบ และส่วนใหญ่สร้างกรดแลคติก 0.5-3.5 g/ml มีระดับของจำนวนเซลล์อยู่ระหว่าง 7.9-8.5 log CFU/ml และมีค่าพีเอชต่ำกว่า 4.0 หลังหมัก 6 ชั่วโมง

Argyri *et al.* (2013) ทำการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากมะกอกดอง โดยทดสอบในหลอดทดลอง และประเมินศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากมะกอกดองที่หมักแบบธรรมชาติ และคัดเลือกเพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อในการปรับปรุงกระบวนการหมักแบบดั้งเดิม การผลิตผลิตภัณฑ์ใหม่ que เพิ่มคุณค่าในการเป็นอาหารเพื่อสุขภาพ โดยทดสอบศักยภาพในการเป็นโปรไบโอติกในหลอดทดลอง พบว่าเชื้อ *L. pentosus*, *L. plantarum* และ *L. paracasei* subsp. *paracasei* มีจำนวนเซลล์สุดท้ายสูงสุด (>8 log CFU/ml) หลังบ่มในสภาพที่มีพีเอชต่ำเป็นเวลา 3 ชั่วโมง และเชื้อที่ใช้ทดสอบส่วนใหญ่สามารถทนต่อเกลือ น้ำดี นาน 4 ชั่วโมง ในขณะที่ *L. plantarum* และ *L. pentosus* มีฤทธิ์ในการย่อยเกลือ น้ำดี และพบว่าแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการเกาะติดกับเซลล์เยื่อบุผิวของลำไส้ (Caco-2: human colon carcinoma cells) และความไวต่อยาปฏิชีวนะแตกต่างกัน จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า *L. pentosus*, *L. plantarum* และ *L. paracasei* subsp. *paracasei* มีคุณสมบัติในการเป็นโปรไบโอติก ดังนั้นเชื้อเหล่านี้จึงเป็นตัวแทนที่ดีที่จะนำไปใช้ในการศึกษาต่อไปทั้งในสัตว์ทดลอง เพื่อแสดงให้เห็นถึงศักยภาพการเป็นประโยชน์ต่อสุขภาพและในกระบวนการหมักมะกอก เพื่อประเมินความสามารถในการใช้เป็นก้ำเชื้อโปรไบโอติกชนิดใหม่

Filannino *et al.* (2013) ศึกษาประโยชน์ทางด้านสุขภาพ และทดสอบทางประสาทสัมผัสของน้ำทับทิมที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* POM1, *Lactobacillus plantarum* C2 ซึ่งแยกได้จากมะเขือเทศ และแครอท และเชื้อ *Lactobacillus plantarum* LP09 ซึ่งได้จากทางการค้ามาหมักน้ำทับทิมที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 120 ชั่วโมง และเก็บน้ำทับทิมหมักไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส นาน 30 วัน โดยมีน้ำทับทิมที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรียแลคติกเป็นชุดควบคุม หลังการหมักก้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์เจริญอยู่ในช่วง 9 log CFU/ml โดยที่ *Lactobacillus plantarum* LP09 เชื้อมีปริมาณลดลงในระหว่างการเก็บรักษา และน้ำทับทิมที่หมักด้วยเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกสายพันธุ์ พบว่ามีกรดไขมันอิสระ (free fatty acid) มีสีน้ำตาล มีสารประกอบ polyphenolic และมี antioxidant activity สูงกว่าน้ำทับทิมหมักที่ไม่เติมเชื้อแบคทีเรียแลคติก ทั้งนี้ antioxidant activity ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นก้ำเชื้อ อีกทั้งน้ำทับทิมที่หมักด้วยแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งได้ (K562 tumor cells) เป็นประโยชน์ต่อสุขภาพ และเมื่อทดสอบทางประสาทสัมผัสได้รับการยอมรับมากกว่าชุดควบคุม

Gallego *et al.* (2013) ศึกษาคุณสมบัติโปรไบโอติกของเชื้อ *Lactobacillus* ที่เกี่ยวข้องกับมะกอกดอง จากไอโซเลทจำนวน 111 ไอโซเลทที่แยกได้จากการหมักมะกอกดองในน้ำเกลือ มี 109 ไอโซเลทที่สามารถระบุชนิดด้วย multiplex PCR amplification โดยใช้ *recA* gene 107 ไอโซเลทคือ *Lactobacillus pentosus* และ 2 ไอโซเลทคือ *Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus paraplantarum* จากการทำ DNA fingerprinting (rep-PCR) ด้วย GTG₅ primer แสดงให้เห็นว่าเชื้อ *Lactobacillus pentosus* มีความสามารถในการเจริญสูง โดยส่วนใหญ่เชื้อมีความสามารถในการรวมตัวกัน มีคุณสมบัติเป็นไฮโดรโฟบิก hydrophobicity และมีความสามารถในการอยู่รอดในทางเดินอาหารต่ำ อย่างไรก็ตามเชื้อแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวสร้างแบคเทรียโอซิน มีความสามารถทนเกลือได้ดี ไม่มีการย่อยเม็ดเลือดแดง และจากผล phenotypic test *L. pentosus* มีประสิทธิภาพในการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมที่จะนำไปใช้เป็นก้ำเชื้อเริ่มต้น (starter culture) เพื่อปรับปรุงการหมักมะกอกตามธรรมชาติ และช่วยเพิ่มสารอาหารให้แก่มะกอกดอง

Martins *et al.* (2013) กล่าวว่าผู้บริโภคส่วนใหญ่ได้ให้ความสนใจเรื่องของคุณภาพกันมากขึ้น มีความต้องการอาหารที่บำรุงสุขภาพ เช่น ผลิตภัณฑ์อาหารที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์โปรไบโอติกที่มีประโยชน์ช่วยปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร โดยกลุ่มจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ได้แก่ จินัส *Lactobacillus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่นิยมนำมาใช้เป็นโปรไบโอติกในอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์นมหมัก แต่เนื่องด้วยผลิตภัณฑ์นมหมักมีข้อจำกัดสำหรับผู้บริโภคอาหารมังสวิรัต หรือผู้มีอาการแพ้ นม หรือผู้ที่ต้องการลดระดับคอเรสเตอรอล ดังนั้นจึงได้มีการพัฒนาผลิตภัณฑ์นมหมักที่ประกอบด้วยจุลินทรีย์โปรไบโอติก มีการศึกษาอย่างกว้างขวางในการนำจุลินทรีย์โปรไบโอติกเป็นส่วนประกอบของผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากผัก ผลไม้ และธัญพืช

Blana *et al.* (2014) ศึกษาการหมักมะกอกดองโดยการเติมก้ำเชื้อ (starter cultures) โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก 2 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lactobacillus pentosus* B281 และ *Lactobacillus plantarum* B282 ที่แยกได้จากมะกอกดอง โดยมีการคัดเลือกคุณสมบัติโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นก้ำเชื้อในมะกอกดอง Halkidiki แบบ Spanish style ศึกษาการหมักที่อุณหภูมิห้องด้วยน้ำเกลือความเข้มข้นที่แตกต่างกันคือ 8 และ 10% (w/v) เติมหักเชื้อแบบเดี่ยว และแบบผสม เพื่อบันทึกจำนวนเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่บริเวณผิวหน้าของมะกอกดองที่การหมักนาน 114 วัน และศึกษาการอยู่รอดของก้ำเชื้อด้วยวิธี Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) เชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์มีการเจริญบริเวณผิวหน้าของมะกอกดองมีปริมาณเชื้ออยู่ระหว่าง 6.0-7.0 log CFU/g ตลอดการหมัก จากการวิเคราะห์ด้วย PFGE *Lactobacillus pentosus* B281 มีปริมาณเชื้อเหลือรอดที่สูงที่สุดที่การหมักด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 8% (w/v) เชื้อเหลือรอด 81.2% และที่น้ำเกลือความเข้มข้น 10% (w/v) เชื้อเหลือรอด 93.3% ส่วน

Lactobacillus plantarum B282 เชื้อมีอัตราการรอดสูง 83.3% ที่การหมักด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 8% (w/v) แต่ที่การหมักด้วยน้ำเกลือความเข้มข้น 10% (w/v) เชื้อไม่สามารถเจริญได้ที่ผิวหน้ามะกอกดอง และมี *Lactobacillus pentosus* B281 เป็นส่วนใหญ่ที่ผิวหน้ามะกอกดอง เมื่อทำการหมักโดยใช้กล้าเชื้อแบบผสม

วัตถุประสงค์

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกดิกที่มีคุณสมบัติในการเป็นโพรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ
2. ศึกษาประสิทธิภาพการหมักผักดองของโพรไบโอติกแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกได้
3. เพื่อเทียบเคียงชนิดของโพรไบโอติกแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกได้
4. ผลิตผลิตภัณฑ์ผักดองโพรไบโอติกแบคทีเรียแลกดิก

ขอบเขตการวิจัย

งานวิจัยนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลกดิกที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง ตลอดจนพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์ผักดองที่มีโพรไบโอติกแบคทีเรียแลกดิกในปริมาณที่เพียงพอในการก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้บริโภคผลิตภัณฑ์สุขภาพได้

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. เชื้อจุลินทรีย์

1.1 แบคทีเรียแลกติกที่ได้รับการอนุเคราะห์จากอาจารย์ผ่องผกา เขียวมนตรี สังกัดภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 47 ไอโซเลท แยกจากอาหารหมัก ดังแสดงในตารางที่ 2.1 และจำนวน 1 ไอโซเลทคือ DW12 แยกได้จากน้ำหมักชีวภาพ ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ดวงพร คันธ์โชติ สังกัดภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

ตารางที่ 2.1 แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักที่ได้รับการอนุเคราะห์จากอาจารย์ผ่องผกา เขียวมนตรี ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 47 ไอโซเลท

รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
AR 3	กุ่มส้ม	AR 23	สะอาดอง
AR 4	แป้งแดง	AR 24	สะอาดอง
AR 5	หนาง	AR 25	สะอาดอง
AR 10	หนาง	AR 27	สะอาดอง
AR 11	หนาง	AR 28	สะอาดอง
AR 13	หนาง	AR 32	สะอาดอง
AR 14	ผักกาดดอง	AR 33	สะอาดอง
AR 16	แป้งแดง	AR 34	สะอาดอง
AR 17	แป้งแดง	AR 36	สะอาดอง
AR 19	แป้งแดง	AR 37	แป้งแดง
AR 20	ผักกาดดอง	AR 38	แป้งแดง
AR 21	ผักกาดดอง	AR 39	แป้งแดง

ตารางที่ 2.1 (ต่อ)

รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา	รหัสเชื้อ	แหล่งที่มา
AR 40	แป้งแดง	AR 60	หนาง
AR 42	แป้งแดง	AR 61	ปลาต้ม
AR 43	แป้งแดง	AR 62	ปลาต้ม
AR 44	แป้งแดง	AR 64	ปลาต้ม
AR 45	แป้งแดง	AR 68	ปลาต้ม
AR 46	แป้งแดง	AR 71	ปลาต้ม
AR 47	แป้งแดง	AR 72	ปลาต้ม
AR 52	หนาง	AR 74	ปลาต้ม
AR 53	หนาง	AR 78	ปลาต้ม
AR 54	หนาง	AR 82	ผักกาดทอง
AR 56	หนาง	AR 83	ผักกาดทอง
AR 58	หนาง		

1.2 แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้รับการอนุเคราะห์จากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella enterica*

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

บริษัทผู้ผลิต

Baird-Parker Medium	Merck
Brain Heat Infusion (BHI medium)	Difco
Brilliant Green Lactose Bile Broth (BGLB)	Merck
de Man Rogosa and Sharpe Agar (MRS agar)	Difco
de Man Rogosa and Sharpe Broth (MRS broth)	Difco
Eosin Methylene Blue agar (EMB)	Merck
<i>Escherichia coli</i> Broth (EC broth)	Merck
Lauryl Tryptose Broth (LTB)	Merck
MacConkey agar (MCA)	Difco

Nutrient Agar (NA)	Difco
Plate Count Agar (PCA)	Merck
Potato Dextrose Agar (PDA)	Merck

3. สารเคมี

บริษัทผู้ผลิต

ลีสัย้อมแกรม	LABCHEM
เอนไซม์แพปซิน (Pepsin)	Sigma
เอนไซม์คะตะเลส (Catalase)	Sigma
Absolute ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Merck
Ammonium thiosulfate	Merck
Bromocresol purple (BCP)	LABCHEM
Bile salt	Merck
Crystal violet	LABCHEM
D-Glucose	UNIVAR
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	Merck
Ferric ammonium sulfate TS	Merck
Hydrochloric acid (HCl)	LABSCAN
Hydrogen peroxide (H ₂ O ₂)	Merck
Methanol (CH ₃ OH)	Merck
Nitrobenzene	CARLO ERBA
Nitric acid (HNO ₃)	Merck
Peptone	CRITERION
Phosphate-buffer saline (PBS)	Merck
Phenolphthalein	BHD
Phenol	Merck
Raffinose	Difco
Sliver nitrate (AgNO ₃)	PROLABO
Sodium chloride (NaCl)	LABSCAN
Sodium hydroxide (NaOH)	LABSCAN
Sodium thiosulfate (Na ₂ S ₂ O ₃ •5H ₂ O)	Fluka Chemika

4. ยาปฏิชีวนะ Antibiotic discs ได้แก่ chloramphenicol (30 µg), kanamycin (30 µg), tetracycline (30 µg), vancomycin (30 µg), polymycin (30 µg), streptomycin (10 µg), gentamycin (10 µg) และ erythromycin (15 µg)

5. เครื่องมือและอุปกรณ์

ยี่ห้อ

เครื่องเขย่า (Vortex Mixer)	Scientific
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Thermo Scientific
หม้อนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ (Autoclave)	Tomy
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar air flow carbinet)	Microflow
อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath)	Julabo
เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)	Sorvall Rc 50
เครื่องชั่ง (Electronic balance)	Mettler Toledo
เครื่องให้ความร้อน (Hot plate)	Fishery
ตู้อบเชื้อ (Incubator)	Memmert
กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)	Olympus
เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)	Mettler Toledo
ตู้อบอากาศร้อน (Hot air oven)	Binder
เครื่องตีปั่น (Stomacher Lab-Blender 400)	Seward
เครื่องกวนแม่เหล็ก (Magnetic strrer)	Fishery
เครื่องแก้ว รวมทั้งเข็ม (Needle) และห่วงถ่ายเชื้อ (Loop)	
หลอดทดลองที่มีฝา (Test tube) และ Durham tube	
หลอดเอฟเพนดรอพ (Effpendorf tube)	
โถไร้ออกซิเจน (Anaerobic jar)	
เวอร์เนียร์คาร์ลิปเปอร์ (Vernier caliper)	
ปิเปต (Pipette) & ออโต้ปิเปต (Autopipette)	

วิธีการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากผักสด

1.1 ตัวอย่างผักสดที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติก

ผักสดที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ แตงกวาจำนวน 3 ตัวอย่าง ผักกาดขาวจำนวน 2 ตัวอย่าง กะหล่ำปลีม่วงจำนวน 4 ตัวอย่าง กะหล่ำปลีจำนวน 1 ตัวอย่าง แครอทจำนวน 5 ตัวอย่าง ผักกาดแก้วจำนวน 3 ตัวอย่าง และบร็อคโคลี่จำนวน 1 ตัวอย่าง รวมทั้งสิ้น 19 ตัวอย่าง ตัวอย่างเหล่านี้เก็บจากตลาดสด และห้างสรรพสินค้าในเขตอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา

1.2 วิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

นำผักตัวอย่างมาชนิดละ 10 กรัมผสมกับสารละลาย Sterile sodium chloride (NaCl) 0.85 เปอร์เซ็นต์ปริมาตร 90 มิลลิลิตร ผสมเป็นเนื้อเดียวกันด้วย Stomacher Lab-Blender 400 เป็นเวลา 2 นาที ณ อุณหภูมิห้อง (Di Cagno *et al.*, 2008) นำ Serial dilutions มา pour-plate บนอาหาร de Man, Rogosa and Sharpe (MRS agar ที่เติม Bromocresol purple (BCP) ร้อยละ 0.04) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48-72 ชั่วโมง เกิดโคโลนีของแบคทีเรียเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ นำโคโลนีมา streak บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จนกว่าจะได้เชื้อบริสุทธิ์

2. การตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลกติก (Garbutt, 1997)

นำแบคทีเรียแลกติกที่ได้จากข้อ 1.2 และแบคทีเรียที่ได้รับการอนุเคราะห์จากอาจารย์ผ่องผกา เจริญมนตรี สังกัดภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 47 ไอโซเลท และอีก 1 ไอโซเลทที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ดวงพร คันธโชติ สังกัดภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ มาตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลกติก ดังนี้

2.1 ตรวจสอบการติดสีแกรม

หยดน้ำกลั่นปลอดเชื้อลงบนแผ่นสไลด์ 1 หยด และเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ 1 ลูบ สเมียร์ (smear) ให้เชื้อกระจายบนหยดน้ำกลั่น ทิ้งให้แห้ง นำแผ่นสไลด์ผ่านความร้อน (heat fixed) 2-3 ครั้ง แล้วย้อมสีด้วยสารละลาย Crystal violet เป็นเวลา 1 นาที เทสีทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายไอโอดีนทิ้งไว้ 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นหยด 95% แอลกอฮอล์ เพื่อชะสีส่วนเกินออกไป แล้วล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่นทันที จากนั้นย้อมสีด้วยสารละลาย Safranin ทิ้งไว้ 30 วินาที ล้างสีด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง ซับแผ่นสไลด์ให้แห้ง นำไปตรวจสอบการติดสีแกรม ลักษณะรูปร่างเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเป็นแบคทีเรียแล็กติกจะติดสีแกรมบวก

2.2 ทดสอบคะตะเลส

หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนสไลด์ 1 หยดแล้วใช้ลูบเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ที่ต้องการทดสอบ สเมียร์ลงบนสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ถ้าเป็นแบคทีเรียแล็กติกจะไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส คือ ไม่เกิดฟองก๊าซ

เก็บเชื้อแบคทีเรียแล็กติกที่แยกได้ไว้สำหรับใช้ในทดสอบครั้งต่อไปใน 20 % ของ glycerol ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การทดสอบการเจริญและความสามารถในการหมักของแบคทีเรียแล็กติก (Zhang *et al.*, 2007)

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแล็กติกที่แยกได้จากข้อ 2 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth (ร้อยละ 2 ปริมาตรต่อปริมาตร) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง วัดการเจริญของแบคทีเรียแล็กติกโดยการวัดความขุ่นของเซลล์ด้วยเครื่อง Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร และตรวจสอบค่าความเป็นกรด-ด่างของ Culture broth ด้วยเครื่องวัดพีเอช (pH meter) หาเปอร์เซ็นต์กรดด้วยวิธีการไทเทรตด้วยสารละลาย NaOH 0.1 N โดยใช้สารละลายฟีนอลทาลีน 2-3 หยดเป็นอินดิเคเตอร์

4. การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ

4.1 ทดสอบการทนต่อสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (Wang *et al.*, 2010)

เตรียมสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร โดยใช้สารละลาย Phosphate-buffer saline (PBS) กับ pepsin (0.3%, w/v) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ซึ่งปรับสารละลายบัฟเฟอร์ให้ มีค่า pH 2.0, 3.0 และ 6.2 (Control) ด้วย 1N HCl นำเซลล์แขวนลอยของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากข้อ 2 มีจำนวนเชื้อประมาณ 10^9 CFU/ml ใส่ในสารละลาย pH 2.0, 3.0 และ 6.2 (Control) ผสมกันบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ทดลอง 2 ซ้ำ นับจำนวนเชื้อที่เหลือรอด โดยการเจือจางด้วย 0.85% sterile saline แล้วนำมา spread plate บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง นำผลที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ

4.2 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี (ดัดแปลงจาก Wang *et al.*, 2010)

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.1 มาศึกษาความสามารถในการทนต่อเกลือน้ำดี โดยเตรียมสารละลายเกลือน้ำดีด้วย Bile salt powder ที่มีความเข้มข้น 0.3% ปริมาตร 10 มิลลิลิตร โดยมีน้ำกลั่นที่ไม่เติม Bile salt powder (pH 6.2) เป็นตัวควบคุม เติมเซลล์แขวนลอยของเชื้อประมาณ 10^9 CFU/ml บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 6-12 ชั่วโมง ทดลอง 2 ซ้ำ นับจำนวนเชื้อที่เหลือรอด โดยการ spread plate บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อบนผิวหน้าอาหาร ซึ่งเกิดกิจกรรม bile salt hydrolase (BSH) ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ นำผลที่ได้คำนวณเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเชื้อ

4.3 ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 เลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จนมีอายุ 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงใน MRS broth เชื้อละ 4 หลอดๆ ละ 3 มิลลิลิตร แบ่งเชื้อเป็น 2 ชุดการทดลองคือ ชุดการทดลองที่ 1 เก็บใน Anaerobic jar แล้วนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ชุดการทดลองที่ 2 นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียสภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจน 24

ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้เครื่อง Spectrophotometer ที่มีความยาวคลื่นแสง 660 นาโนเมตร และเปรียบเทียบความสามารถของเชื้อในการเจริญทั้ง 2 สภาวะ

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

ทดสอบการยับยั้งโดยใช้วิธี Agar spot (Spellhaug and Harlander, 1989) ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.3 ลงใน MRS broth บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ปรับให้มีปริมาณเชื้อประมาณ 10^8 CFU/ml หยดเชื้อบนอาหารแข็ง MRS เชื้อละ 5 μ l แต่ละเชื้อห่างกันประมาณ 3 cm จานละ 4 เชื้อ โดยทำซ้ำเชื้อละ 3 ซ้ำ บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเททับด้วยอาหาร Brain heart infusion (BHI) soft agar (วุ้น 0.7%) ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์จำนวนประมาณ 10^6 CFU/ml บ่มจานอาหารที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการยับยั้งด้วยการวัดขนาดวงใสการยับยั้ง (clear zone) โดยวัดจากขอบหยดเชื้อแบคทีเรียแลกติกจนสุดขอบวงใส โดยใช้เวอร์เนียคราลิปเปอร์ (vernier caliper) แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ 1) *Escherichia coli* เนื่องจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.) กำหนดให้ตรวจ *Escherichia coli* ซึ่งสามารถเจริญในอาหารต่างๆ ของมนุษย์ได้ เช่น เนื้อสัตว์ นม สัตว์ปีก และอาหารทะเล เป็นสาเหตุที่ทำให้อาหารประเภทที่มีปริมาณน้ำมากเน่าเสีย ซึ่งจัดอยู่ในประเภทที่มีค่า a_w สูง ได้แก่ อาหารสดทั้งหลาย เช่น อาหารทะเล และผักสด เป็นต้น 2) *Staphylococcus aureus* ATCC25923 เนื่องจากมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.) กำหนดให้ตรวจ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียก่อโรคชนิดหนึ่ง เมื่อ *S. aureus* ปนเปื้อนลงไป ในอาหาร จะสร้างสารพิษที่เรียกว่าเอนเทอโรทอกซินขึ้น ทำให้ผู้บริโภคเกิดอาการเป็นพิษ มักพบเชื้อ *S. aureus* ในมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น โดยเฉพาะในมนุษย์ที่มีผิวหนังผิดปกติ เช่น เป็นฝี แผลอักเสบ และในสัตว์ เช่น สุนัข เป็ด ไก่ สุกร เป็นต้น อีกทั้งเชื้อมีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อมภายนอกได้ดี 3) *Bacillus cereus* พบได้ทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในอากาศ น้ำ ดิน และพืชผักต่างๆ โดยอาจปนเปื้อนลงไป ในอาหารได้ สามารถสร้างสารพิษที่ทนต่อความร้อนได้ เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางในร่างกายนมนุษย์และสัตว์เลือดอุ่น อีกทั้งมักพบในอาหารประเภทธัญพืช หรืออาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ได้แก่ ข้าว ข้าวโพด แป้ง ขนมจีน ซึ่งผักดองที่ผลิตได้นำไปใช้รับประทานร่วมกับขนมจีน และ 4) *Salmonella enterica* พบในอาหารประเภท ไข่ นม ผลิตภัณฑ์นม น้ำสลัด และเนื้อสัตว์ ซึ่งผักดองที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้รับประทานร่วมกับเนื้อ สัตว์ โดยเนื้อสัตว์อาจปนเปื้อน *Salmonella enterica*

4.5 ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.4 ลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตรจนมีอายุครบ 24 ชั่วโมงจากนั้นทำการทดสอบ

4.5.1 ทดสอบการย่อยโปรตีน (Michael and Pelezar, 1995)

หยดเชื้อแบคทีเรียแลกดิกปริมาณ 10 ไมโครลิตร หยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ใช้ Skim milk ความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอนทำ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ้ามีการย่อยโปรตีนจะเกิดวงใสรอบๆ โคลนินของเชื้อ

4.5.2 ทดสอบการย่อยไขมัน (Michael and Pelezar, 1995)

หยดเชื้อแบคทีเรียแลกดิกปริมาณ 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติม 1% Tributyrin ทำ 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ้ามีการใช้ไขมันจะเกิดวงใสรอบๆ โคลนินของเชื้อ

4.5.3 ทดสอบการย่อยแป้ง (Mitidieri *et al.*, 2006)

หยดเชื้อแบคทีเรียแลกดิกปริมาณ 10 ไมโครลิตรลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่ใช้ Soluble starch ที่มีความเข้มข้น 2% เป็นแหล่งคาร์บอนทำ 2 ซ้ำ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ทดสอบการย่อยแป้งโดยการวางเกล็ดไอโอดีนลงบนฝาของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อให้ไอของไอโอดีนระเหยไปสัมผัสกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการทดสอบ ถ้ามีการย่อยแป้งสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่เปลี่ยนเป็นสีน้ำเงิน

4.6 ทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ (Cebeci and Gurakan, 2003)

นำแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.5 มาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญโดยยาปฏิชีวนะด้วยวิธีการ Agar overlay diffusion method นำเชื้อที่เจริญในอาหารเหลว MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมงที่มีปริมาณเชื้อ 10^6 - 10^7 CFU/ml ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เททับลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar และนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 1 ชั่วโมง จากนั้นวาง Antibiotic discs ได้แก่ chloramphenicol (30 µg/disc),

kanamycin (30 µg/disc), tetracycline (30 µg/disc), vancomycin (30 µg/disc), polymycin (30 µg/disc), streptomycin (10 µg/disc), gentamycin (10 µg/disc) และ erythromycin (15 µg/disc) บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง วัดวงใสการยับยั้งเปรียบเทียบกับตารางมาตรฐาน (ตารางภาคผนวก ฉ.1) รายงานผลเป็น resistant (R), moderately susceptible (MS) และ susceptible (S)

4.7 ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (Argyri *et al.*, 2013)

นำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.6 เพาะเลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 3 มิลลิลิตรที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำเชื้อมา streak ลงบนจานอาหาร Columbia agar ที่ผสม human blood ทำการทดลอง 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง สังเกตปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นบนอาหาร แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ กลุ่ม Beta haemolysis มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงแบบสมบูรณ์ เกิดวงใสสีเหลืองรอบโคโลนีของเชื้อ กลุ่ม Alpha haemolysis เกิดวงใสสีเขียวรอบโคโลนีของเชื้อ กลุ่ม Gamma haemolysis โคโลนีของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง

4.8 ทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน (Biogenic amine) (Bover-Cid and Holzapfel, 1999)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.7 ในอาหาร MRS broth บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง ถ่ายเชื้อลงในอาหารเหลว MRS ที่มีฮิสติดีน (histidine) หรือไทโรซีน (tyrosine) 0.1%, โบรโมครีซอลเพอเพิล (Bromocresol purple) 0.004% และไพริโดซอล-5-ฟอสเฟต (pyridoxal-5-phosphate, B₆) 0.005% บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 72 ชั่วโมง นำเชื้อมา streak บนอาหารวุ้น (Improved medium) (Moeller, 1954; Niven *et al.*, 1981; Choudhury *et al.*, 1990) ที่มีฮิสติดีน หรือ ไทโรซีน 1% และไพริโดซอล-5-ฟอสเฟต 0.005% และไม่เติมกรดอะมิโน ทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-10 วัน ตรวจสอบการสร้างไบโอเจนิคเอมีน โดยสังเกตจากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์รอบๆ โคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลกติก โดยเปลี่ยนสีอาหารจากสีเหลืองเป็นสีม่วง สำหรับอาหารวุ้น (Improved medium) ที่มีการเติมไทโรซีนจะเกิดบริเวณใสๆ สีม่วงรอบๆ โคโลนี

5. ศึกษาลักษณะของผักตงที่นิยมบริโภค

เก็บตัวอย่างผักตงตามท้องตลาดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ได้แก่ ผักกาด
ดอง และผักตงรวมที่บริโภคกับขนมจีนอย่างละ 4 ตัวอย่างรวมทั้งสิ้น 8 ตัวอย่าง นำมาวิเคราะห์
ลักษณะต่างๆ ดังนี้

5.1 เปอร์เซ็นต์กรด

นำน้ำผักตงตัวอย่างมาวัดปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) โดยวิธี Titration
method (AOAC, 1990) วิเคราะห์ด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH (ภาคผนวก ข)

5.2 ค่าพีเอช

นำน้ำผักตงตัวอย่างมาวัดค่า pH ด้วย pH meter

5.3 ปริมาณเกลือ (Tenyson *et al.*, 200)

การวิเคราะห์ปริมาณเกลือในตัวอย่างผักตง โดยชั่งผักตงตัวอย่างที่มีน้ำหนัก
แน่นอน 2-3 กรัมใส่ในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร และกรด
ไนตริก 6 นอร์มัล 3 มิลลิลิตร เติมสารละลายมาตรฐานซิลเวอร์ไนเตรท 0.1 นอร์มัล 50 มิลลิลิตร ปิด
จุกเขย่าให้ตกตะกอนเกิดอย่างสมบูรณ์ อุณหภูมิใน water bath นาน 20 นาที และทำให้เย็นที่
อุณหภูมิห้อง เติมนิวโตรเบนซีน 5 มิลลิลิตร ปิดจุกเขย่าให้ Nitrobenzene หุ้มตะกอนไว้หมด เติม
Ferric ammonium sulfate TS 2 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐาน Ammonium
thiosulfate 0.1 นอร์มัล จุดยุติได้สารละลายสีน้ำตาลอ่อนคงตัวถึงไม่มีสี

5.4 ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Dubois *et al.*, 1956)

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมดในตัวอย่างผักตง โดยนำน้ำผักตงตัวอย่างมา
1 มิลลิลิตรผสม 0.85% NaCl ปริมาตร 2 มิลลิลิตรใส่หลอดทดลองแช่แข็ง เติมนิวโตรเบนซีน 5% ปริมาตร
1 มิลลิลิตรเขย่า 2-3 นาทีทิ้งไว้ให้เย็นวางพักที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย sulfuric acid ปริมาตร 5

มิลลิลิตรเขย่าทันทีทิ้งไว้ 10 นาทีและเขย่าต่ออีก 20 นาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD 490 nm จากนั้นนำค่า OD ไปหาค่าปริมาณน้ำตาลจากกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส (ภาคผนวก ข)

6. ศึกษาประสิทธิภาพของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ผักดอง

6.1 ความสามารถในการหมักผักดองของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

6.1.1 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก (Lee and Salminen, 1995)

ถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีค่า OD เท่ากับ 0.3 จำนวน 3 เพอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงใน Erlenmeyer flask ขนาด 250 มิลลิลิตรที่มีอาหาร MRS broth ปริมาตร 150 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยง 15,000×g นาน 15 นาที ล้าง 2 ครั้งด้วย 0.85% NaCl ก่อนนำไปเติมเป็นกล้าเชื้อ

6.1.2 ทดสอบการหมัก

นำผักที่ซื้อมาจากตลาด ได้แก่ แครอท มะละกอ พริกชี้ฟ้าสีเขียวและสีแดง มาล้างด้วยน้ำสะอาดและหั่นผักแต่ละชนิด โดยแครอทและมะละกอขูดเป็นเส้น พริกชี้ฟ้าสีเขียวและสีแดงหั่นตามยาวเป็นเส้น เอาเมล็ดออก ผสมผักทั้ง 3 ชนิด มะละกอ: แครอท: พริกชี้ฟ้าสีเขียวและสีแดง ในอัตราส่วน 30: 9: 1 ซึ่งได้จากการศึกษาอัตราส่วนที่เหมาะสมที่ทำให้ผักดองมีสีสันทนรับประทาน โดยมีปริมาณเนื้อสุทธิ 80 กรัม ใส่ลงในขวดดูแรนขนาด 250 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำเกลือซึ่งมีเกลือและน้ำตาลความเข้มข้น (% (w/v)) ตามค่าเฉลี่ยในผักดองที่นิยมบริโภคตามท้องตลาดที่ได้จากข้อ 5 ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และใส่กล้าเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจากข้อ 6.1.1 โดยใช้เชื้อเริ่มต้นที่มีความเข้มข้นของเชื้อประมาณ 10^6 CFU/ml (Lee and Salminen, 1995) โดยมีชุดควบคุม (Control) คือ หมักผักดองโดยไม่เติมกล้าเชื้อ ทำการทดลอง 2 ซ้ำ หมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

6.1.3 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงระหว่างการผลิตหมักผักดอง

นำผักดองที่เตรียมได้จากข้อ 6.1.2 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) สุ่มเก็บตัวอย่างที่ 0, 24, 48, และ 72 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์ทางเคมี และวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Yoon *et al.*, 2006) ดังต่อไปนี้

6.1.3.1 วัดค่า pH ของน้ำผักดองด้วย pH meter

6.1.3.2 วัดปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) โดยวิธี Titration method (AOAC, 1990) เช่นเดียวกับข้อ 5.1

6.1.3.3 วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี phenol sulfuric acid (Dubios *et al.*, 1956) เช่นเดียวกับข้อ 5.4

6.1.3.4 นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก (CFU/ml) ด้วยการ spread plate บนจานอาหาร MRS agar หลังการบ่ม 48 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Yoon *et al.*, 2006)

6.2 ความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกในผลิตภัณฑ์ผักดองในระหว่างการเก็บรักษา

นำผักดองที่หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง แบ่งการเก็บผักดองเป็น 2 ชุดคือ ชุดที่ 1 เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุกวันเป็นเวลา 5 วัน และชุดที่ 2 เก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 วัน โดยสุ่มเก็บตัวอย่างทุก 3 วัน เพื่อวิเคราะห์ทางเคมี และวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา (Yoon *et al.*, 2006) เช่นเดียวกับข้อ 6.1.3

6.3 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำหมักผักดองที่หมัก 72 ชั่วโมงในการยับยั้งแบคทีเรีย อินดิเคเตอร์

6.3.1 Agar well diffusion method (Kazemipoor *et al*, 2012)

นำแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella enterica* บ่มในอาหาร BHI broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำเซลล์ suspension ปรับให้มีปริมาณเชื้อ 10^6 CFU/ml มา spread บนผิวหน้าของอาหาร Nutrient agar (NA) ทำให้ผิวหน้าอาหารแห้งและเจาะหลุมขนาด 6 มิลลิเมตรในจานอาหาร Nutrient agar (NA) ดังกล่าว สุ่มน้ำผักดองภายหลังการหมัก 72 ชั่วโมง ปริมาตร 1 มิลลิลิตรมาทำการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ $15,000 \times g$ 10 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วนำสารละลายส่วนใสปริมาตร 60 ไมโครลิตร เติมลงในแต่ละหลุม (well) ทำการทดลอง 2 ซ้ำ บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังการบ่มตรวจวัดขนาดของขอบวงใสการยับยั้งรอบหลุม

6.3.2 Agar spot method (ดัดแปลง Spellhaug and Harlender, 1989)

นำน้ำผักดองภายหลังการหมัก 72 ชั่วโมง ปริมาตร 10 ไมโครลิตร มาหยดลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ทำการทดลอง 2 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นเททับด้วยอาหาร Brain heart infusion (BHI) soft agar (วุ้น 0.7%) ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ปริมาณประมาณ 10^6 CFU/ml แบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella enterica* บ่มจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจผลการยับยั้งด้วยการวัดขนาดวงใสการยับยั้ง (clear zone) โดยวัดจากขอบหยดเชื้อแบคทีเรียแลกดิจจนสุดขอบวงใส โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (vernier caliper) และรายงานผลเป็นประสิทธิภาพการยับยั้ง

6.4 ตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผักดองที่ผลิตได้

การตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผักดองที่ผลิตได้ โดยใช้ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนของกะหล่ำปลีชอยดอง (มผช.1168/2549) ซึ่งกำหนดเกณฑ์ทางจุลชีววิทยาไว้เหมือนกัน แดงกวาดอง (มผช.1432/2552) ต้นหอมดอง (มผช.1210/2545) ผักเสี้ยนดอง (มผช.

1213/2549) และผักบุงคอง (มพช.1215/2549) โดยมีการตรวจสอบ *Escherichia coli* และ *Staphylococcus aureus* ราและยีสต์ แต่ไม่ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดเกินกำหนดเกณฑ์มาตรฐาน เนื่องจากผักคองที่ทำการทดลองครั้งนี้ มีการเติมกล้าเชื้อเริ่มต้น

6.4.1 การวิเคราะห์หา *E. coli* (BAM, 2002)

ชั่งตัวอย่างผักคอง 25 กรัมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วย stomacher ความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาทีทำการเจือจางให้เป็น 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ตามลำดับ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์

โดยดูดตัวอย่างในแต่ละความเข้มข้นปริมาตร 1 มิลลิลิตรใส่ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ LST broth ปริมาตร 10 มิลลิลิตรที่มีหลอดดักก๊าซคว่ำในหลอดทดลองความเจือจางละ 3 หลอด เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใส่ตัวอย่างด้วย vortex บ่มหลอดทั้งหมดที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ± 2 ชั่วโมง หากไม่เกิดก๊าซบ่มต่อ 24 ชั่วโมง อ่านผลตรวจดูความขุ่นและก๊าซในหลอดดักก๊าซที่เกิดขึ้นในแต่ละหลอด (Presumptive test) สำหรับ Coliform bacteria หลอดที่มีก๊าซ ผลเป็นบวก ถ้าหลอดเกิดก๊าซนำไปตรวจสอบ โดยเขย่าหลอด LST broth ที่เกิดก๊าซเบาๆ และใช้ loop ถ่ายเชื้อจากหลอด LST broth ที่เกิดก๊าซทุกหลอด ใส่ในอาหาร EC broth หลอดต่อหลอด บ่มหลอด EC broth ใน water bath อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นาน 24 ± 2 ชั่วโมง สังเกตก๊าซภายในหลอดดักก๊าซ ผลเป็นบวก ถ้าไม่เกิดก๊าซบ่มต่อจนครบ 48 ± 2 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อหลอด EC broth ที่เกิดก๊าซทุกหลอด โดยการ streak บนอาหาร Eosin Methylene Blue agar (EMB) บ่มจานอาหาร EMB ที่ 35 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง สังเกตโคโลนีที่น่าเป็น *E. coli* คือตรงกลางโคโลนีสีเข้ม อาจมีหรือไม่มี methallic sheen นำโคโลนีไปทดสอบการย้อมสีแกรมและทดสอบ IMViC test นำผลที่ได้เปิดตาราง MPN โดยดูจากหลอด EC broth ที่ตรวจ confirmed แล้วว่ามี *E. coli* บันทึกผล MPN *E. coli*/กรัม (ตารางภาคผนวก ฉ.2)

6.4.2 การวิเคราะห์หา *Staphylococcus aureus* (BAM, 2002)

ชั่งตัวอย่างผักคอง 25 กรัมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วย stomacher ความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาทีทำการเจือจางให้เป็น 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ตามลำดับ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์และตรวจนับจุลินทรีย์ โดยวิธี spread plate จำนวน 0.3, 0.3 และ 0.4 มิลลิลิตรลงบน Baird-Parker Medium (BP agar) จำนวน 2 ซ้ำ ใช้แท่ง

แก้วปราศจากเชื้อที่เกลี่ยตัวอย่างให้กระจายทั่วจาน บ่มที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบลักษณะโคโลนีเลือกนับโคโลนีที่มีสีดำขอบขาวและแฉวยใสรอบโคโลนีมีบริเวณใส (clear zone) เลือกจานที่เชื้อเจริญ 20-200 โคโลนี ทำเครื่องหมายตำแหน่งของโคโลนีที่มีลักษณะดังกล่าว แล้วนำจานอาหารไปบ่มต่ออีก 18 ชั่วโมง ให้นำโคโลนีที่มีสีดำแฉวยหรือไม่มีขอบขาวและไม่มีบริเวณใสด้วยถ่ายโคโลนีที่คาดว่าจะป็น *S. aureus* ลงใน BHI broth แล้วบ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นดูดตัวอย่างจำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดสอบแล้วเติม Coagulate plasma จำนวน 0.3 มิลลิลิตร ตรวจสอบผลอีกครั้งเมื่อครบเวลา 2 ชั่วโมง บ่มเชื้อที่ 35 องศาเซลเซียส 4 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการแข็งตัวของ plasma ถ้ายังไม่แข็งตัว ให้เก็บหลอดไว้ที่อุณหภูมิห้องแล้วตรวจสอบผลอีกครั้งเมื่อครบ 2 ชั่วโมง

6.4.3 การวิเคราะห์จำนวนยีสต์และรา (BAM, 2002)

ชั่งตัวอย่างผักดอง 25 กรัมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วย stomacher ความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาทีทำการเจือจางให้เป็น 1:10, 1:100 และ 1:1,000 ตามลำดับ โดยใช้สารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ โดยดูดตัวอย่างที่ความเจือจางต่างๆ อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร (ทำ 3 ซ้ำ) ด้วยวิธี spread plate ลงในจานเพาะเชื้ออาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ใช้แท่งแก้วจุ่มแอลกอฮอล์ผ่านเปลวไฟ รอให้เย็นเกลี่ยให้ทั่วผิวหน้าอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส บ่มนาน 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนโคโลนีในจานที่มีจำนวนโคโลนี 10-150 โคโลนี หากไม่มีการเจริญบ่มต่ออีก 48 ชั่วโมง จึงตรวจนับจำนวนผลเป็นจำนวนราและยีสต์ต่อกรัม บันทึกผลเป็น CFU/g โดยใช้ค่าเฉลี่ยจากทั้ง 3 ซ้ำ

6.5 การทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งยีสต์ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่ใช้ในการหมักผักดอง

6.5.1 การแยกเชื้อยีสต์จากผักดองที่หมักได้ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์

นำโคโลนียีสต์บนจานอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) ที่ได้จากการนับจำนวนยีสต์จากข้อ 6.4.3 มา restreak จนได้เชื้อยีสต์บริสุทธิ์ นำไป wet mount เพื่อดูลักษณะของยีสต์ที่แยกได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์

6.5.2 การเตรียมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลกติก

นำแบคทีเรียแลกติกที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักผักดองในหัวข้อ 6.1 มาเตรียมเป็นกล้าเชื้อที่ใช้ทดสอบ โดยถ่ายเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงในอาหาร MRS broth ปริมาตร 4 มิลลิลิตร บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสจนมีอายุครบ 24 ชั่วโมงจากนั้นทำการทดสอบ

6.5.3 ทดสอบการยับยั้งฟิล์มยีสต์ด้วยวิธี dual culture overlay assay (Magnusson *et al.*, 2003)

ขีดเชื้อแบคทีเรียแลกติกลงบนอาหาร MRS agar ขนาด 2 เซนติเมตรจำนวน 2 เส้น และบ่มจานอาหารที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 24 ชั่วโมง หลังการบ่มเททับด้วย 10 มิลลิลิตรของ malt extract soft agar (0.05% malt extract) ที่มีปริมาณของยีสต์ 10^5 cell/ml และบ่มที่ 30 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง ภายหลังจากบ่มวัด inhibition zone (mm) ด้วยเวอร์เนียร์คาลิปเปอร์ (vernier caliper)

6.5.4 ทดสอบการยับยั้งฟิล์มยีสต์ด้วยการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (ดัดแปลงจาก Gonzalez *et al.*, 1983)

นำแบคทีเรียแลกติกที่เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงมาปรับความขุ่น 0.5 McFarland ด้วย Normal saline solution (NSS) ตูตมา 1 มิลลิลิตรผสมกับ 1 มิลลิลิตรของยีสต์ที่เพาะเลี้ยงใน Yeast Mannitol Broth (YM Broth) ที่ 30 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงที่ปรับความขุ่น 0.5 McFarland ด้วย NSS ถ่ายลงใน MRS broth ปริมาตร 8 มิลลิลิตร (ชุดทดลอง) และถ่าย 1 มิลลิลิตรของยีสต์ที่ปรับความขุ่น 0.5 McFarland ลงใน MRS broth ปริมาณ 9 มิลลิลิตร (ชุดควบคุม) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสนาน 12 ชั่วโมง หลังการบ่มนำมา spread plate ลงบนอาหาร YM agar เพื่อตรวจนับจำนวนฟิล์มยีสต์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยใช้สูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้ง} = \frac{\text{จำนวนยีสต์ในชุดควบคุม} - \text{จำนวนยีสต์ในชุดทดลอง}}{\text{จำนวนยีสต์ในชุดควบคุม}} \times 100$$

7. การเทียบเคียงสายพันธุ์ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการคัดเลือกด้วยการบ่งชี้ชนิดโดยใช้ 16S rRNA gene

ตรวจลักษณะทางอนุวิทยาด้วยวิธี 16S rRNA sequence analysis โดยเลือกโคโลนีเดี่ยวๆ ของแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการคัดเลือก ส่งตรวจที่ MACROGEN Advancing through Genomics ประเทศเกาหลี โดยนำผลส่งตรวจหาลำดับเบสของ DNA (DNA sequence) และนำลำดับเบส DNA ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล DNA Databases เพื่อหาชนิดของเชื้อ (Lee *et al.*, 2011)

8. การผลิตผักดองโปรไบโอติกเพื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส

คัดเลือกกล้าเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมต่อการหมักผักดอง โดยดูผลจากการศึกษาเบื้องต้นทั้งหมดมา 1 สายพันธุ์ นำมาหมักผักดองดังวิธีในข้อ 6.1 และเปรียบเทียบกับกรหมักผักดองโดยไม่เติมกล้าเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างผักดองที่มีอายุการหมัก 2 และ 3 วัน ไปตรวจลักษณะต่างๆ ดังนี้

8.1 ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียแลคติกในผักดองที่หมักได้

สุ่มเก็บผักดองโปรไบโอติกมา 25 กรัมลงในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์จำนวน 225 มิลลิลิตร แล้วปั่นด้วย stomacher ความเร็วต่ำเป็นเวลา 1 นาที นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติก (CFU/ml) ด้วยการ spread plate บนจานอาหาร MRS agar หลังการบ่ม 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Yoon *et al.*, 2006) พร้อมวัดปริมาณกรดทั้งหมด (Total acidity) โดยวิธี Titration method (AOAC, 1990) วิเคราะห์ด้วยสารละลาย 0.1 N NaOH และวัดค่าพีเอชด้วย pH meter

8.2 ตรวจคุณภาพผักดองที่หมักได้ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน

นำผักดองที่หมักได้มาตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยา เช่นเดียวกับวิธีข้อ 6.4

8.3 ทดสอบทางประสาทสัมผัสของผลิตภัณฑ์ผักดองโปรโปโอติกที่หมักได้

นำผักดองที่หมักโดยไม่เติมกล้ำเชื้อ และหมักโดยเติมกล้ำเชื้อโปรโปโอติกแบคทีเรีย แลกติกที่มีอายุการหมัก 2 และ 3 วัน ไปทดสอบโดยใช้ผู้ที่นิยมบริโภคผักดองอย่างน้อย 30 คน ให้คะแนนโดยใช้ Hedonic Test scale: 5 scale ได้แก่ 5=ยอมรับมากที่สุด 4=ยอมรับมาก 3=ยอมรับ 2=ยอมรับน้อย 1=ไม่ยอมรับ โดยให้คะแนนสี กลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และลักษณะโดยรวมทั้งหมด (Meilgaard *et al.*, 1999; Lawless and Heymann, 1999) นำข้อมูลที่ได้ทั้งหมดวิเคราะห์โดยใช้ ตารางค่าสถิติ One way Anova โปรแกรม SPSS ในการวิเคราะห์

บทที่ 3

ผลการทดลอง

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากผักสด

จากตัวอย่างผักสด ได้แก่ แดงกวา 3 ตัวอย่าง ผักกาดขาว 2 ตัวอย่าง กะหล่ำปลีม่วง 4 ตัวอย่าง กะหล่ำปลี 1 ตัวอย่าง แครอท 5 ตัวอย่าง ผักกาดแก้ว 3 ตัวอย่าง และบร็อคโคลี่ 1 ตัวอย่าง รวมจำนวน 19 ตัวอย่างสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกได้ 61 ไอโซเลท โดยแยกได้จาก แดงกวา 8 ไอโซเลท ผักกาดขาว 7 ไอโซเลท กะหล่ำปลีม่วง 13 ไอโซเลท กะหล่ำปลี 4 ไอโซเลท แครอท 13 ไอโซเลท ผักกาดแก้ว 14 ไอโซเลท และบร็อคโคลี่ 2 ไอโซเลท (ตารางที่ 3.1)

ตารางที่ 3.1 จำนวนของแบคทีเรียแลกติกที่สามารถคัดแยกได้จากผักสดชนิดต่างๆ

ผักสด	จำนวนตัวอย่าง	จำนวนไอโซเลท
แตงกวา	3	8
ผักกาดขาว	2	7
กะหล่ำปลีม่วง	4	13
กะหล่ำปลี	1	4
แครอท	5	13
ผักกาดแก้ว	3	14
บร็อคโคลี่	1	2
รวม	19	61

2. การตรวจสอบสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียแลกดิก

จากแบคทีเรียแลกดิกจำนวน 61 ไอโซเลทที่แยกได้จากผักสด และแบคทีเรียแลกดิกที่ได้รับการอนุเคราะห์จากอาจารย์ผ่องผกา เขียวมนตรี สังกัดภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ จำนวน 47 ไอโซเลท และอีก 1 ไอโซเลทที่ได้รับการอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ดวงพร คันธ์โชติ สังกัดภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ รวมแบคทีเรียแลกดิก 109 ไอโซเลท เมื่อนำมาทดสอบการย้อมสีแกรม และทดสอบการสร้างเอนไซม์ คีตาเลส พบว่าแบคทีเรียแลกดิกทั้ง 109 ไอโซเลทติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คีตาเลส โดยมีรูปร่างแท่งจำนวน 70 ไอโซเลท และรูปร่างกลมจำนวน 39 ไอโซเลท

3. การทดสอบการเจริญและความสามารถในการหมักของแบคทีเรียแลกดิก

ความสามารถในการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกดิก 109 ไอโซเลทที่คัดแยกได้ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสที่ 24 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวน 52 ไอโซเลทที่มีการเจริญดีมากที่สุดคือ มีค่า OD >1.0-1.5 คิดเป็น 47.71% และที่ 48 ชั่วโมง พบว่ามีจำนวน 54 ไอโซเลทมีการเจริญดีเยี่ยมคือ มีค่า OD >1.5 คิดเป็น 49.54% (ตารางที่ 3.2) โดยการคิดเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไอโซเลทไม่มีความสัมพันธ์เชื่อมโยงกับชนิดของตัวอย่าง แสดงผลเป็นเปอร์เซ็นต์จำนวนไอโซเลทเปรียบเทียบกับจำนวนไอโซเลททั้งหมดที่คัดแยกได้

ภายหลังการหมักที่ 48 ชั่วโมง เชื้อแบคทีเรียแลกดิกส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาล เพื่อสร้างกรดแลกดิกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย จากเชื้อแบคทีเรียแลกดิก 109 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 45 ไอโซเลทมีปริมาณกรด 1.00-1.50% คิดเป็น 41.28% 34 ไอโซเลทมีปริมาณกรด 1.51-2.00% คิดเป็น 31.19% 25 ไอโซเลทมีปริมาณกรด 2.01-2.50% คิดเป็น 22.94% 4 ไอโซเลทมีปริมาณกรด <1.00% คิดเป็น 3.67% (ตารางที่ 3.3) ส่งผลทำให้ค่าพีเอชลดลง โดยมีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 3.96-6.25 และมีค่าพีเอชเฉลี่ย 4.45

ตารางที่ 3.2 การเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่เลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

OD 660 nm	ระดับ การเจริญ	24 ชั่วโมง		48 ชั่วโมง	
		จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ (%)	จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ (%)
>1.5	++++	35	32.11	54	49.54
>1.0-1.5	+++	52	47.71	51	46.79
0.5-1.0	++	14	12.84	4	3.67
<0.5	+	8	7.34	0	0
รวม		109	100	109	100

ตารางที่ 3.3 ปริมาณกรดแลกดิกของเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่แยกได้เมื่อเลี้ยงในอาหาร MRS broth บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ปริมาณกรดแลกดิก (%)	จำนวนไอโซเลท	เปอร์เซ็นต์ (%)
<1.00	4	3.67
1.00-1.50	45	41.28
1.51-2.00	34	31.19
2.01-2.50	25	22.94
2.51-3.00	1	0.92
>3.00	0	0
รวม	109	100

4. การทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ

4.1 ทดสอบการทนต่อสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร

เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้ 109 ไอโซเลทมาศึกษาความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะความเป็นกรดที่ pH 2 พบว่ามีจำนวน 18 ไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดเท่ากับหรือมากกว่า 40% และมีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่า 10^6 CFU/ml โดยพบว่าไอโซเลท HA404 มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 82.61% เช่นเดียวกับที่ pH 3 พบว่ามีจำนวน 45 ไอโซเลทที่มีเปอร์เซ็นต์การรอดเท่ากับหรือมากกว่า 40% และมีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่า 10^6 CFU/ml โดยไอโซเลท HA303 มีอัตราการอยู่รอดสูงสุดคือ 97.96% ดังนั้นจึงคัดเลือกเชื้อทั้ง 45 ไอโซเลทไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป (ตารางที่ 3.4)

4.2 ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี

จากการนำแบคทีเรียแลกติกจำนวน 45 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้มาทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดีร้อยละ 0.30 พบว่ามีแบคทีเรียแลกติกจำนวน 14 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงกว่า 40% และมีจำนวนเชื้อที่เหลือรอดสูงกว่า 10^6 CFU/ml คิดเป็น 33.33% และพบว่าเชื้อ AR25 มีอัตราการรอดสูงสุดคือ 87.89% (ตารางที่ 3.5)

ตารางที่ 3.4 เปอร์เซ็นต์การยู่รอดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จำนวน 45 ไอโซเลทในสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร

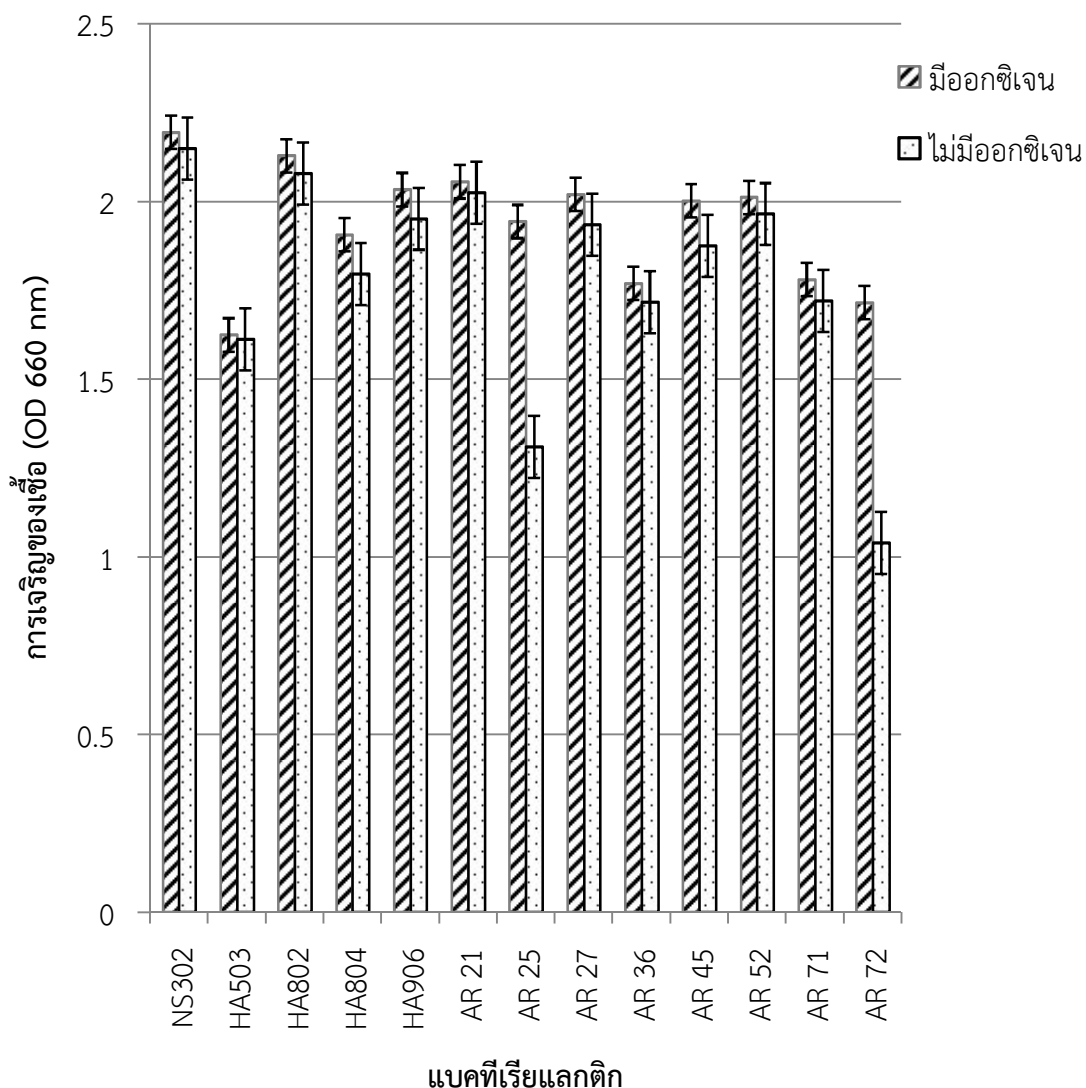
ไอโซเลท	การยู่รอดของเชื้อที่ pH 3 (%)	ไอโซเลท	การยู่รอดของเชื้อที่ pH 3 (%)
NS203	80.00	AR 19	85.83
NS302	61.90	AR 21	64.58
NS402	85.71	AR 23	63.35
NS504	76.05	AR 24	80.00
NS601	95.33	AR 25	91.30
HA207	62.14	AR 27	76.66
HA303	97.96	AR 28	92.36
HA304	45.83	AR 36	79.76
HA305	66.50	AR 39	79.91
HA403	52.38	AR 40	59.29
HA404	91.30	AR 42	52.17
HA503	47.00	AR 45	90.48
HA505	70.09	AR 52	93.91
HA603	66.66	AR 53	76.47
HA704	66.22	AR 54	95.83
HA801	53.47	AR 56	82.35
HA804	40.00	AR 61	91.04
HA806	62.74	AR 68	53.91
HA906	95.35	AR 71	64.29
AR 10	84.18	AR 72	83.64
AR 11	60.69	AR 78	52.43
AR 17	90.85	AR 82	79.16
		DW 12	90.85

ตารางที่ 3.5 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จำนวน 14 ไอโซเลทในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี 0.30 เปอร์เซ็นต์

ไอโซเลท	การอยู่รอดของเชื้อ (%)	ไอโซเลท	การอยู่รอดของเชื้อ (%)
NS302	69.19	AR 25	87.89
HA503	52.30	AR 27	77.94
HA801	53.06	AR 36	50.00
HA804	60.00	AR 45	44.87
HA806	52.90	AR 52	67.78
HA906	48.24	AR 71	58.72
AR 21	55.13	AR 72	40.48

4.3 ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน

จากการนำแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.2 จำนวน 14 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน พบว่ามีแบคทีเรียแลกติก 13 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีทั้ง 2 สภาวะ โดยมีค่า OD 660 nm มากกว่า 1.0 มีแบคทีเรียแลกติก ไอโซเลท HA806 เพียงไอโซเลทเดียวเท่านั้นที่เจริญได้เฉพาะสภาวะที่มีออกซิเจน ไม่สามารถเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (รูปที่ 3.1) จึงคัดเลือกแยกแบคทีเรียแลกติกทั้ง 13 ไอโซเลทไปศึกษาในขั้นตอนต่อไป



รูปที่ 3.1 การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจนของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้

4.4 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

จากการทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ตามข้อ 4.3 จำนวน 13 ไอโซเลท โดยวิธี Agar spot (รูปที่ 3.2) พบว่าแบคทีเรียแลกติกดังกล่าวสามารถยับยั้ง *Escherichia coli* ได้ 9 ไอโซเลทคิดเป็น 69.23% โดยมีขอบวงใสการยับยั้งอยู่ระหว่าง 3.50-15.33 mm สามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ได้ 10 ไอโซเลทคิดเป็น 76.92% มีวงใสการยับยั้งอยู่ระหว่าง 3.98-15.33 mm ยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ได้ 8 ไอโซเลทคิดเป็น 61.54% โดยมีขอบวงใสการยับยั้งอยู่ระหว่าง 3.53-8.42 mm และยับยั้ง *Salmonella enterica*

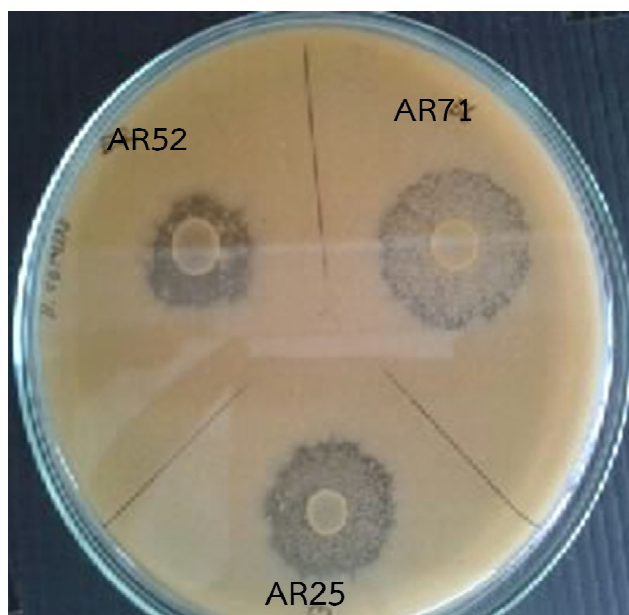
ได้ 7 ไอโซเลทคิดเป็น 53.85% โดยมีขอบวงใสการยับยั้งอยู่ระหว่าง 1.75-6.17 mm จึงได้คัดเลือกแบคทีเรียแลกดิจจำนวน 12 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ โดยมีแบคทีเรียแลกดิจ HA906 เพียงไอโซเลทเดียวที่ไม่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 สายพันธุ์ (ตารางที่ 3.6) เพื่อใช้ในการศึกษาในขั้นต่อไป

ตารางที่ 3.6 การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกดิจที่คัดเลือกได้จำนวน 13 ไอโซเลท โดยวิธี Agar spot

ไอโซเลท	ขนาดของวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (mm)*			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Salmonella enterica</i>
NS302	4.35±0.26	-	7.67±0.16	4.92±0.13
HA503	4.83±0.30	8.17±0.06	6.83±0.02	6.17±0.22
HA802	-	-	8.42±0.02	1.75±0.04
HA804	-	15.33±0.42	5.83±0.14	-
HA906	-	-	-	-
AR 21	3.52±0.20	3.98±0.26	3.63±0.12	2.00±0.03
AR 25	3.50±0.26	7.66±0.06	3.53±0.05	4.05±0.08
AR 27	4.20±0.28	5.83±0.12	-	-
AR 36	15.33±0.09	4.53±0.08	-	-
AR 45	9.70±0.06	6.33±0.14	-	-
AR 52	-	4.27±0.06	-	4.80±0.02
AR 71	4.03±0.21	9.27±0.50	3.83±0.60	4.67±0.04
AR 72	3.58±0.05	4.17±0.04	4.37±0.07	-

หมายเหตุ: (-) คือ ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง

(*) คือ ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 3 ซ้ำ



รูปที่ 3.2 การทดสอบการยับยั้ง *Bacillus cereus* ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้โดยวิธี Agar spot

4.5 ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

จากแบคทีเรียแลกติก 12 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้จากข้อ 4.4 พบว่ามีจำนวน 6 ไอโซเลทคิดเป็น 54.55% ที่มีความสามารถในการย่อยสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่คือ โปรตีน ได้แก่ ไอโซเลท NS302 AR36 AR45 AR52 AR71 และ AR72 และมี 2 ไอโซเลทคิดเป็น 18.18% ที่สามารถย่อยแป้ง ได้แก่ ไอโซเลท AR36 และ AR72 โดยไม่พบไอโซเลทที่สามารถย่อยไขมันได้ (ตารางที่ 3.7 และรูปที่ 3.3)

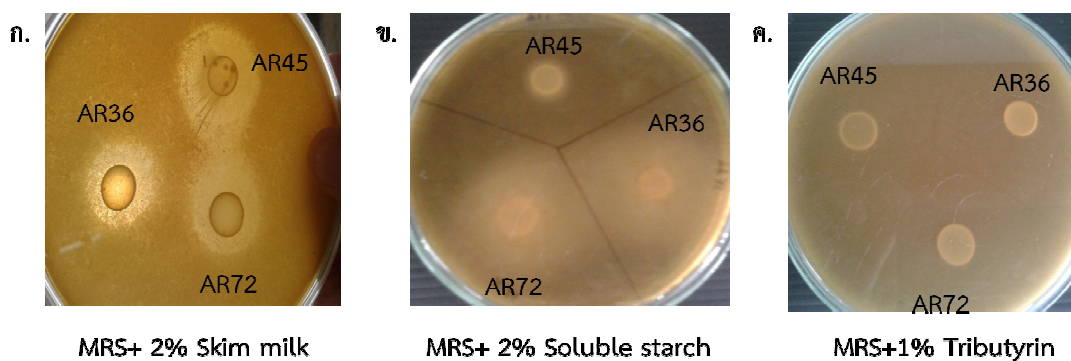
จากสมบัติข้างต้นสามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกได้จำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ ไอโซเลท NS302 AR36 AR45 AR52 AR71 และ AR72 เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาสมบัติอื่นๆ ต่อไป

ตารางที่ 3.7 ความสามารถของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จำนวน 12 ไอโซเลทในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางในการย่อย (mm)*		
	โปรตีน	ไขมัน	แป้ง
NS302	4.25±0.17	-	-
HA503	-	-	-
HA802	-	-	-
HA804	-	-	-
AR 21	-	-	-
AR 25	-	-	-
AR 27	-	-	-
AR 36	10.50±0.18	-	5.50±0.04
AR 45	7.50±0.03	-	-
AR 52	6.25±0.07	-	-
AR 71	8.50±0.16	-	-
AR 72	7.50±0.14	-	2.50±0.06

หมายเหตุ: (-) คือ ไม่ย่อยโปรตีน ไขมันหรือแป้ง

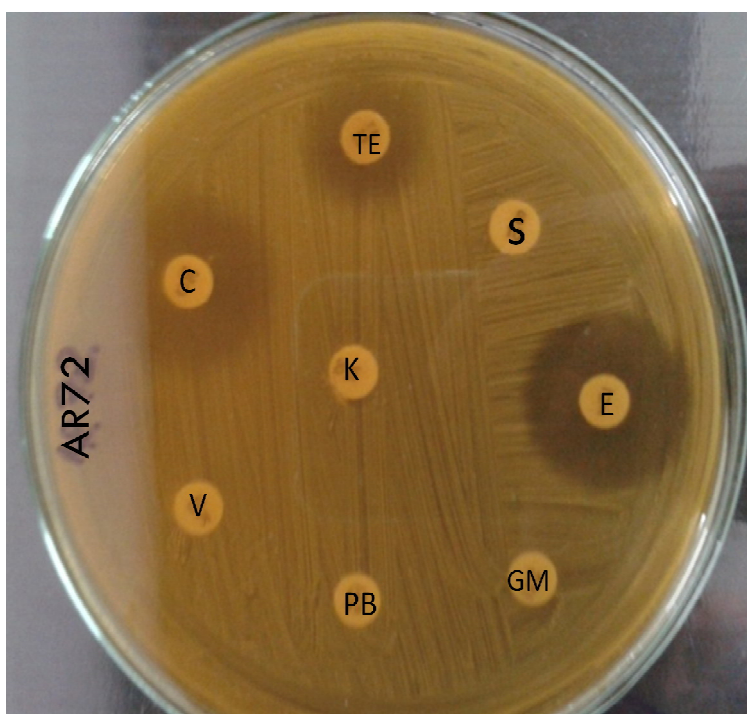
(*) คือ ค่าเฉลี่ยของการทดลอง 2 ซ้ำ



รูปที่ 3.3 การทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน (ก) แป้ง (ข) และไขมัน (ค) ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง

4.6 ทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ

แบคทีเรียแลกดิกที่คัดแยกได้ 6 ไอโซเลทจากข้อ 4.5 เมื่อนำมาทดสอบกับยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด (รูปที่ 3.4) พบว่าดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ vancomycin (100%) ดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ kanamycin (83.33%) gentamycin (100%) streptomycin (100%) และดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ polymycin (100%) นอกจากนี้เชื่อมีความไวต่อการตอบสนองต่อยากลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ chloramphenicol (83.33%) และ erythromycin (66.67%) (ตารางที่ 3.8)



รูปที่ 3.4 ประสิทธิภาพการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกได้ไอโซเลท AR72 โดยยาปฏิชีวนะทั้ง 8 ชนิด C: chloramphenicol (30 µg/disc), K: kanamycin (30 µg/disc), TE: tetracycline (30 µg/disc), V: vancomycin (30 µg/disc), PB: polymycin (30 µg/disc), S: streptomycin (10 µg/disc), GM: gentamycin (10 µg/disc) และ E: erythromycin (15 µg/disc)

ตารางที่ 3.8 ปฏิกริยาของเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกได้จำนวน 6 ไอโซเลทต่อยาปฏิชีวนะ 8 ชนิด

ไอโซเลท	Antibiotic disc / Zone of clearing for various antibiotic							
	C	K	TE	V	PB	S	GM	E
NS302	S	R	R	R	R	R	R	S
AR 36	S	S	MS	R	R	R	R	S
AR 45	MS	R	R	R	R	R	R	MS
AR 52	S	R	R	R	R	R	R	R
AR 71	S	R	MS	R	R	R	R	S
AR 72	S	R	MS	R	R	R	R	S

หมายเหตุ: Antibiotic disc ได้แก่ C: chloramphenicol (30 µg/disc), K: kanamycin (30 µg/disc), TE: tetracycline (30 µg/disc), V: vancomycin (30 µg/disc), PB: polymycin (30 µg/disc), S: streptomycin (10 µg/disc), GM: gentamycin (10 µg/disc), E: erythromycin (15 µg/disc) Zone of clearing for various antibiotic ได้แก่ resistant (R), moderately susceptible (MS) และ susceptible (S) (ตารางภาคผนวก ฉ.1)

4.7 ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง

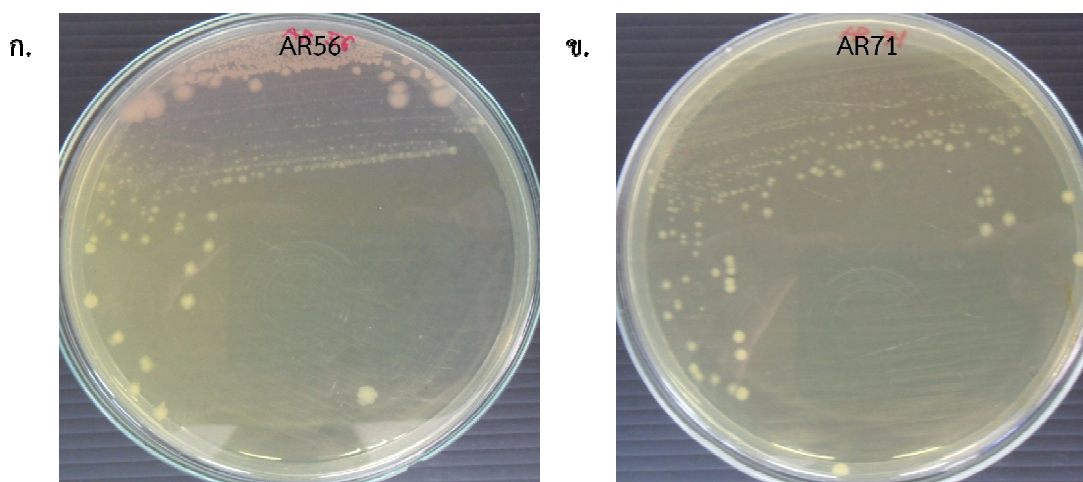
แบคทีเรียแลกดิกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 AR36 AR45 AR52 AR71 และ AR72 พบว่าไม่มีกิจกรรมการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงจัดอยู่ในกลุ่ม Gramma-(γ) hemolysis (รูปที่ 3.5) ซึ่งแสดงให้เห็นถึงสมบัติด้านความปลอดภัยต่อร่างกายมนุษย์



รูปที่ 3.5 การทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดงบนอาหาร Columbia agar ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จัดอยู่ในกลุ่ม Gramma-(γ) hemolysis

4.8 ทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน

แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 AR36 AR45 AR52 AR71 และ AR72 ไม่มีกิจกรรมการสร้างสารไบโอจีนิกเอมีน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงบริเวณรอบโคโลนีของเชื้อบนอาหาร MRS agar ที่ปรับปรุง (Improved medium) (รูปที่ 3.6)



รูปที่ 3.6 การทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีนของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้บน Improved medium (Bover-Cid and Holzapfel, 1999) (ก) Positive (ข) Negative

ดังนั้นจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียแลกติกจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 AR36 AR45 AR52 AR71 และ AR72 ซึ่งไอโซเลท NS302 แยกจากผักกาดขาว AR36 แยกจากสะดออง AR45 แยกจากแป้งแดง AR52 แยกจากหนาง AR71 และ AR72 ซึ่งแยกจากปลาต้ม ทั้ง 6 ไอโซเลทมีความสามารถในการหมักได้ดี โดยให้เปอร์เซ็นต์กรดสูงกว่า 1% เมื่อเพาะเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.9) และมีสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกที่ทดสอบในห้องปฏิบัติการ (ตารางที่ 3.10) โดยทนต่อสภาวะเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ทนต่อเกลือน้ำดี โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกเหลือรอดมากกว่า 10^6 CFU/ml มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella enterica* มากกว่า 2 สายพันธุ์ เจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน มีความสามารถในการย่อยสารชีวโมเลกุล ได้แก่ โปรตีนและแป้ง ไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และไม่สร้างสารไบโอเจนิกเอมีน จึงใช้เป็นเกณฑ์ในการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกดังกล่าว เพื่อใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพการผลิตผลิตภัณฑ์ผักดองต่อไป

ตารางที่ 3.9 ความสามารถในการหมักของแบคทีเรียแลกติก 6 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้ในอาหาร MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ไอโซเลท	แหล่งที่มา	การหมัก	
		ปริมาณกรด (%)	pH
NS302	ผักกาดขาว	1.23±0.05 ^d	4.74±0.03 ^{ab}
AR 36	สะดออง	1.41±0.05 ^{cd}	5.30±0.05 ^a
AR 45	แป้งแดง	3.09±0.73 ^a	4.27±0.05 ^{ab}
AR 52	หนาง	2.16±0.16 ^b	4.17±0.24 ^b
AR 71	ปลาต้ม	1.92±0.05 ^{bc}	4.38±0.28 ^{ab}
AR 72	ปลาต้ม	2.37±0.69 ^b	4.11±0.17 ^b

หมายเหตุ: ตัวอักษรที่ต่างกันบนตัวเลขในแต่ละสดมภ์แสดงถึงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3.10 สมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ในระดับห้องปฏิบัติการทั้ง 6 ไอโซเลท

ไอโซเลท	การทนต่อสภาพเลียนแบบ น้ำย่อยในกระเพาะอาหาร		การทนเกลือน้ำดี		การเจริญ (OD 660 nm)		การย่อยสลาย		
	การอยู่รอด ของเชื้อ (%)	จำนวนเชื้อ (log CFU/ml)	การอยู่รอด ของเชื้อ (%)	จำนวนเชื้อ (log CFU/ml)	ไม่มี ออกซิเจน	มี ออกซิเจน	โปรตีน	แป้ง	ไขมัน
NS302	61.90	6.47±0.07 ^a	69.19	7.20±0.08 ^a	+	+	+	-	-
AR36	79.76	6.15±0.01 ^b	50.00	6.20±0.08 ^c	+	+	+	+	-
AR45	90.48	6.27±0.08 ^{ab}	44.87	6.34±0.01 ^b	+	+	+	-	-
AR52	93.91	6.34±0.16 ^{ab}	67.78	6.19±0.02 ^c	+	+	+	-	-
AR71	64.29	6.20±0.02 ^b	58.72	6.17±0.02 ^c	+	+	+	-	-
AR72	83.64	6.29±0.13 ^{ab}	40.48	6.09±0.04 ^c	+	+	+	+	-

หมายเหตุ: การเจริญของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่สภาวะมีและไม่มีออกซิเจน (-); ไม่มีการเจริญ (+); มีการเจริญ
การย่อยสลายโปรตีน แป้ง และไขมัน (-); ไม่มีการย่อย (+); มีการย่อย
ค่าตัวอักษรภาษาอังกฤษในแต่ละสดมภ์ หมายถึง ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 3.10 (ต่อ)

ไอโซเลข	การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์				การย่อยสลายเม็ดเลือดแดง	การสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน
	แบคทีเรียอินดิเคเตอร์					
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella enterica</i>		
NS302	+	-	+	+	γ-hemolysis	-
AR36	-	+	++	-	γ-hemolysis	-
AR45	-	+	++	-	γ-hemolysis	-
AR52	-	+	-	+	γ-hemolysis	-
AR71	+	+	+	+	γ-hemolysis	-
AR72	+	+	+	-	γ-hemolysis	-

หมายเหตุ: (-): no antimicrobial activity; (+): the inhibition zone is less than 10 mm; (++) : the inhibition zone is from 10 mm to 20 mm
 การสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน (-); ไม่มีการสร้าง (+); มีการสร้าง

5. ศึกษาลักษณะของผักกาดทองและผักทองรวมสำหรับรับประทานกับขนมจีน

เก็บตัวอย่างผักทองจำนวน 8 ตัวอย่างตามท้องตลาดในอำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา ได้แก่ ผักกาดทองจำนวน 4 ตัวอย่าง (รหัส P1-P4) และผักทองรวมสำหรับรับประทานกับขนมจีน ซึ่งเป็นผักทองที่ประกอบด้วย มะละกอ แครอท แตงกวา และถั่วงอก จำนวน 4 ตัวอย่าง (รหัส H1-H4) ดังตารางที่ 3.11 มาวิเคราะห์พบว่าผักทองมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์กรด 1.25% ค่าพีเอชเฉลี่ยเท่ากับ 3.75 มีปริมาณเกลือเฉลี่ยคือ 5.06 กรัมต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร และมีปริมาณน้ำตาลเฉลี่ย 2.39 กรัมต่อปริมาตร 100 มิลลิลิตร

ตารางที่ 3.11 ลักษณะผักกาดทองและผักทองรวมสำหรับรับประทานกับขนมจีน

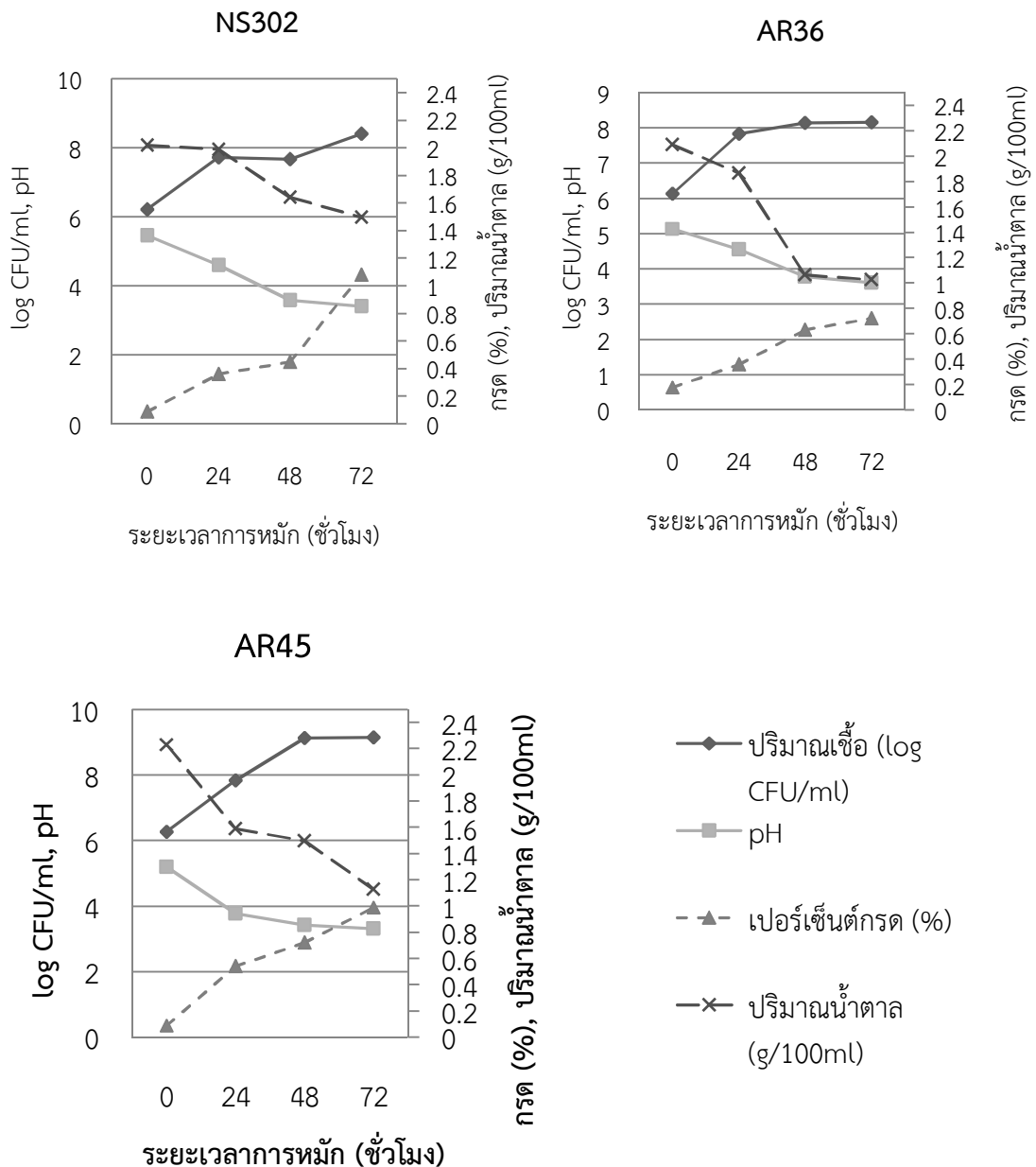
รหัส ตัวอย่าง	ผักทอง	เปอร์เซ็นต์ กรด	ค่าพีเอช	ปริมาณเกลือ (g/100 ml)	ปริมาณน้ำตาล (g/100 ml)
P1	ผักกาดทอง	1.80	3.52	4.67	2.32
P2	ผักกาดทอง	2.16	3.51	4.67	2.47
P3	ผักกาดทอง	0.30	3.76	5.25	2.63
P4	ผักกาดทอง	0.33	3.77	4.85	2.43
H1	ผักทองรวม	1.48	3.78	4.67	2.33
H2	ผักทองรวม	1.62	3.77	6.00	2.44
H3	ผักทองรวม	1.06	3.91	4.50	2.27
H4	ผักทองรวม	1.22	3.97	5.84	2.24
ค่าเฉลี่ย		1.25	3.75	5.06	2.39

6. ศึกษาประสิทธิภาพของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ในการผลิตผลิตภัณฑ์ผักทอง

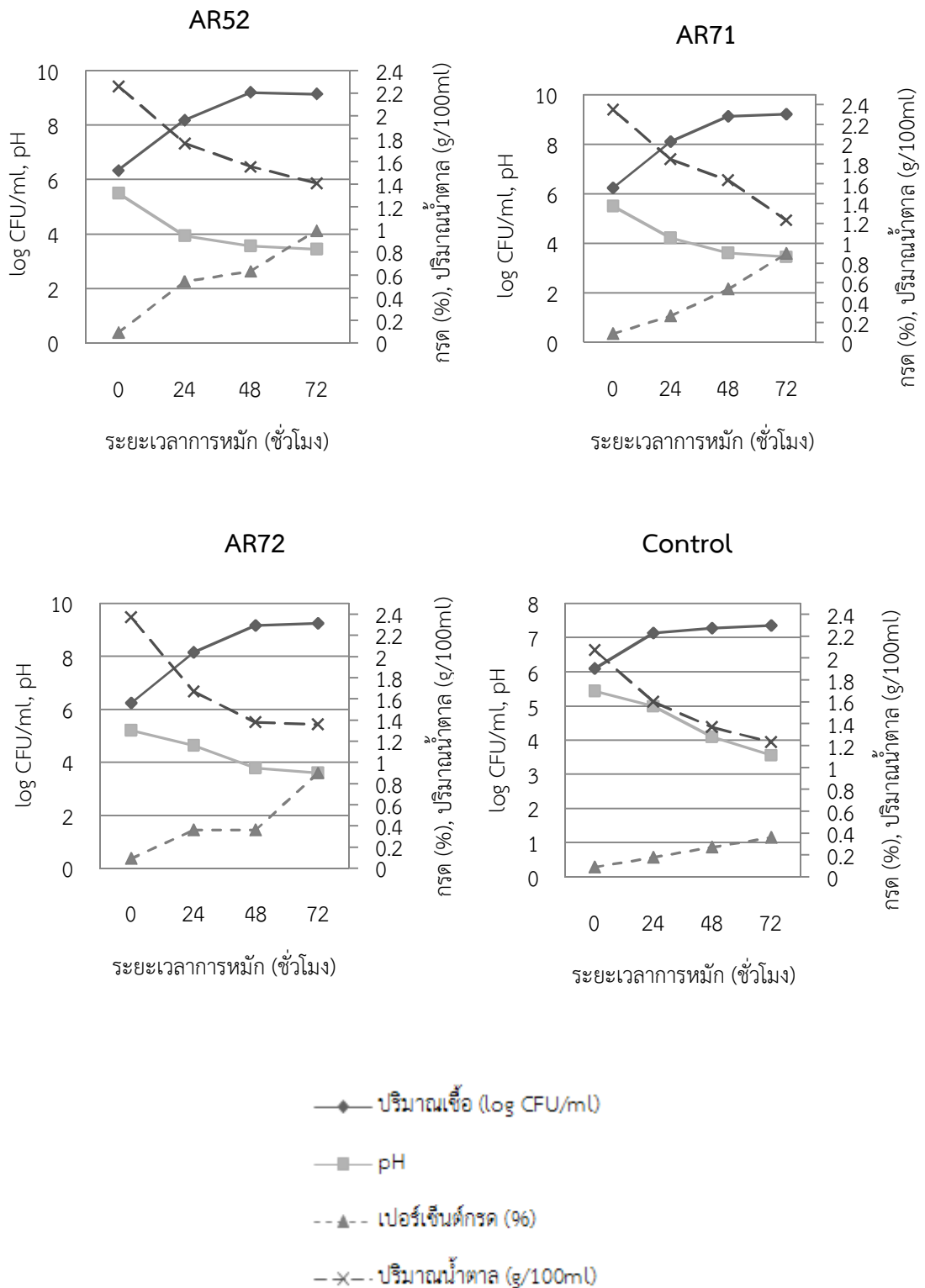
6.1 การหมักผักทองโดยใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก

จากการศึกษาความสามารถในการหมักผักทองของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 ไอโซเลท โดยใช้ผักที่ประกอบด้วย มะละกอ: แครอท: พริกขี้หนูเขียวและสีแดง ในอัตราส่วน 30: 9: 1 หมักในน้ำเกลือที่ประกอบด้วยเกลือ 5% และน้ำตาล 2.5% ซึ่งเป็นความเข้มข้นของเกลือ

และน้ำตาลที่ได้จากการศึกษาผักตบชวที่นิยมบริโภคกับขนมจีนในข้อ 5 โดยใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/ml หมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วันหรือ 72 ชั่วโมง เก็บผลทุกๆ 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทให้ผลไปในทิศทางเดียวกัน จำนวนแบคทีเรียแลคติกจะค่อยๆ เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์กรดแลคติก ในส่วนของปริมาณน้ำตาล และระดับค่าพีเอชจะลดลง ดังแสดงในรูปที่ 3.7



รูปที่ 3.7 การหมักผักตบชวโดยใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ Control, NS302, AR36, AR45, AR52, AR71 และ AR72



รูปที่ 3.7 (ต่อ) การหมักผักดองโดยใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท NS302, AR36, AR45, AR52, AR71 และ AR72 และชุดควบคุมที่ไม่เติมกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติก

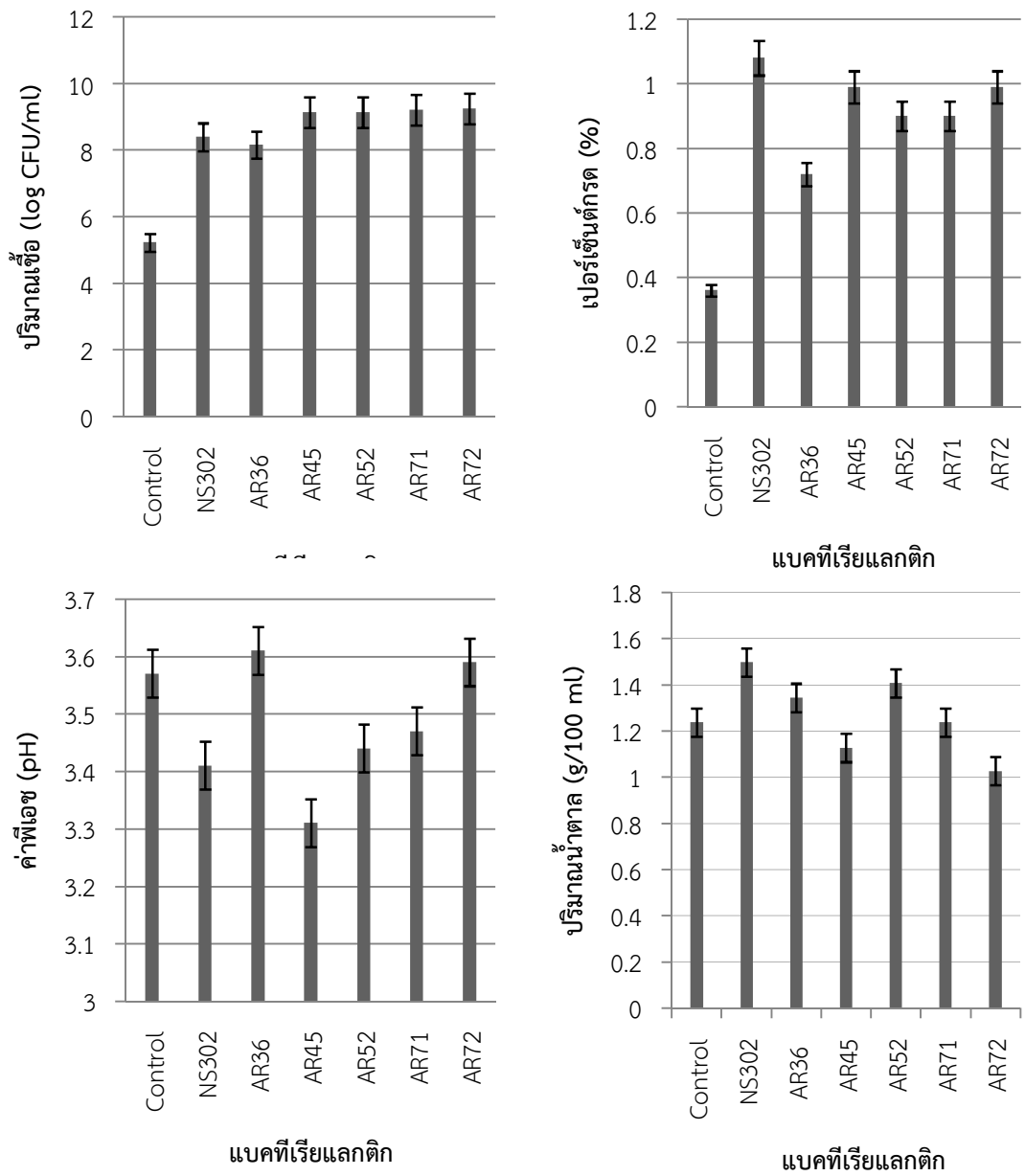
จากการหมักผักดองโดยใช้โปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้หลังหมัก 72 ชั่วโมง พบว่าทุกๆ ไอโซเลทมีการเจริญของเชื้อเพิ่มขึ้นจากเชื้อเริ่มต้นอยู่ระหว่าง 8.16-9.25 log CFU/ml โดยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR72 มีปริมาณเชื้อสูงสุดคือ 9.25 log CFU/ml และพบว่าค่าพีเอชของน้ำหมักอยู่ในช่วง 3.31-3.61 โดยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR45 มีค่าพีเอชต่ำสุดคือ 3.31 และทุกๆ ไอโซเลทมีเปอร์เซ็นต์กรดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ อยู่ในช่วง 0.72-1.08% โดยไอโซเลท NS302 มีเปอร์เซ็นต์กรดสูงสุดคือ 1.08% รองลงมาคือไอโซเลท AR45 และ AR72 ที่มีเปอร์เซ็นต์กรด 0.99% หลังการหมักพบว่าทุกๆ ไอโซเลทมีปริมาณน้ำตาลลดลงอยู่ในช่วง 1.03-1.50 โดยการหมักด้วยไอโซเลท AR72 มีปริมาณน้ำตาลต่ำสุดคือ 1.03 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าที่การหมัก 72 ชั่วโมงด้วยเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกๆ ไอโซเลทมีปริมาณเชื้อและปริมาณกรดมากกว่าชุดควบคุม มีค่าพีเอชต่ำกว่าชุดควบคุมในการหมักด้วยไอโซเลท NS302 AR45 AR52 และ AR71 ดังแสดงในรูปที่ 3.8

6.2 ศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ผักดองในระหว่างการเก็บรักษา

6.2.1 การเก็บรักษาผักดองไว้ที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)

ผลิตภัณฑ์ผักดองที่หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมงนำมาเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) นาน 5 วัน ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทุกวัน พบว่าผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก และชุดควบคุมมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเหลือรอด เปอร์เซ็นต์กรดและปริมาณน้ำตาลลดลง มีค่าพีเอชเพิ่มขึ้นเล็กน้อย (รูปที่ 3.9)

หลังเก็บผักดองไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 วัน พบว่ามีปริมาณเชื้อเหลือรอดอยู่ระหว่าง 6.08-6.45 log CFU/ml โดยผักดองที่หมักด้วยเชื้อไอโซเลท AR72 มีปริมาณเชื้อโปรไบโอติกเหลือรอดสูงสุดคือ 6.45 log CFU/ml ผักดองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 2.91-3.45 โดยผักดองมีค่าพีเอชที่ต่ำกว่าชุดทดลอง (Control) และมีเปอร์เซ็นต์กรดอยู่ระหว่าง 0.72-1.22% โดยผักดองไอโซเลท NS302 และ AR72 มีเปอร์เซ็นต์กรดสูงสุดคือ 1.22% รวมทั้งมีปริมาณน้ำตาลอยู่ในช่วง 1.02-1.30 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.11)

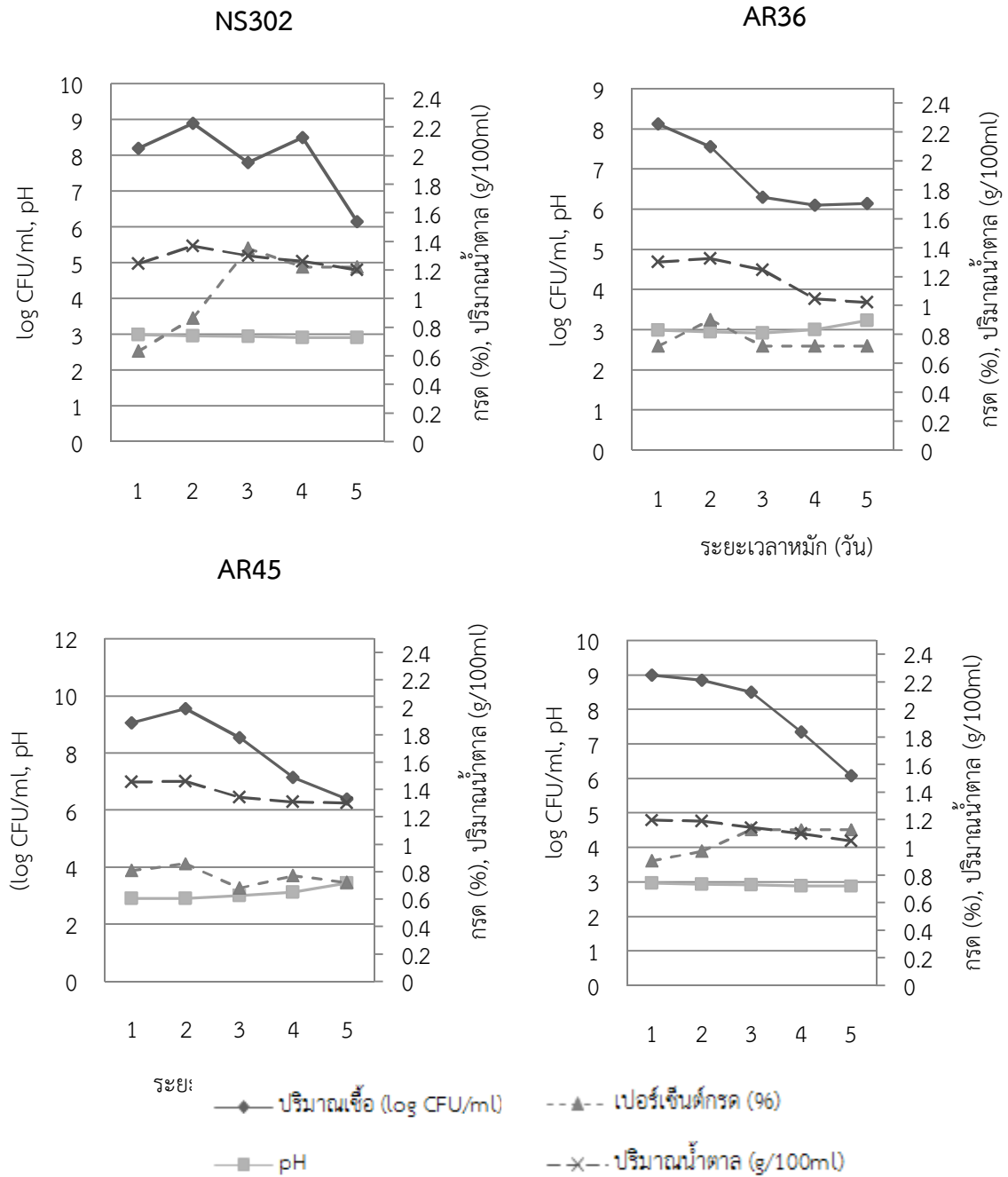


รูปที่ 3.8 เปรียบเทียบการหมักผักดองโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลทหลังหมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

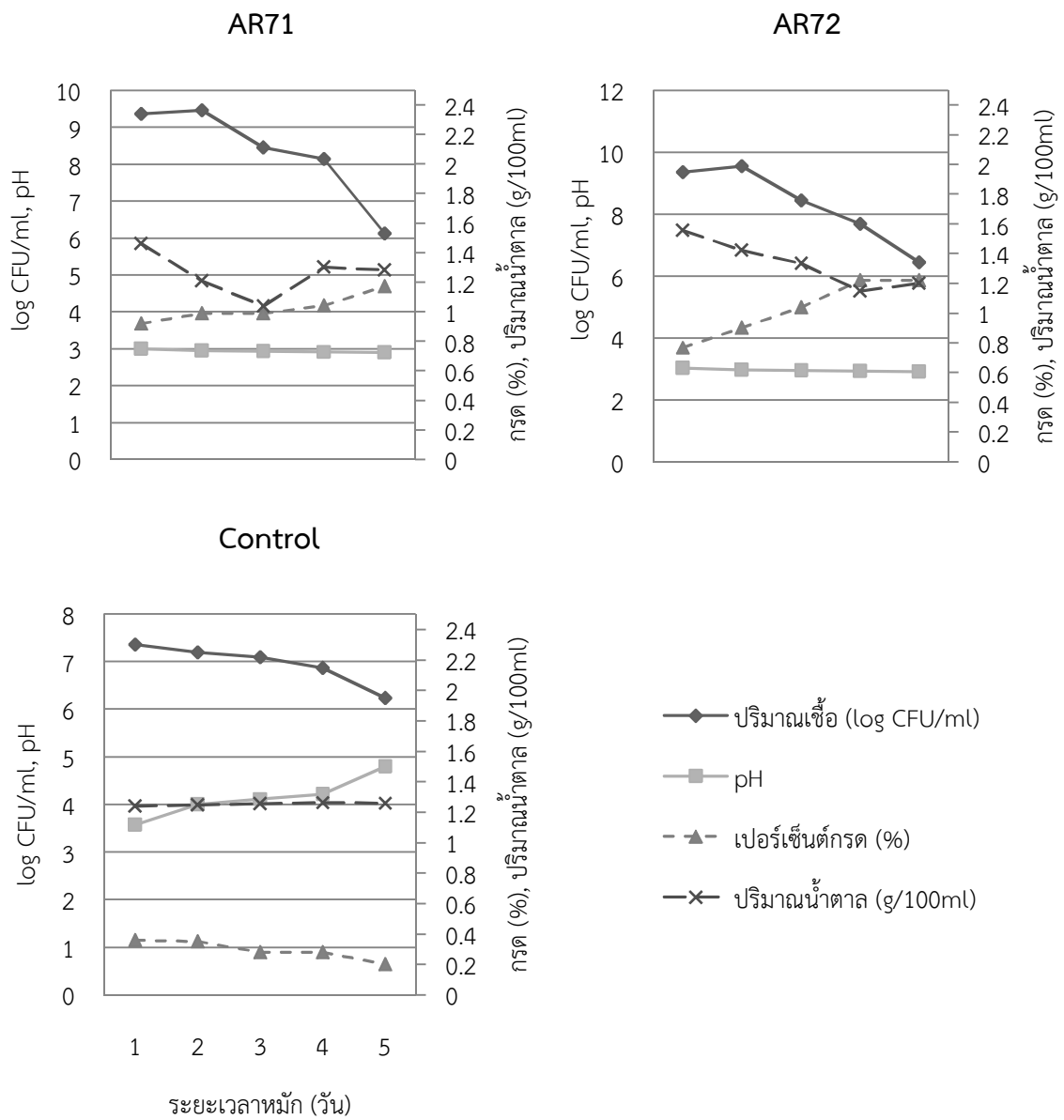
6.2.2 การเก็บรักษาผักดองไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส)

จากการเก็บผลิตภัณฑ์ผักดองที่หมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมงไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส) นาน 15 วัน โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงทุก 3 วัน พบว่าผักดองทุกชุดทดลองมีปริมาณเชื้อเหลือรอด เพอร์เซ็นต์กรดลดลง และมีค่าพีเอชค่อนข้างคงที่ไม่เปลี่ยนแปลง (รูปที่ 3.10)

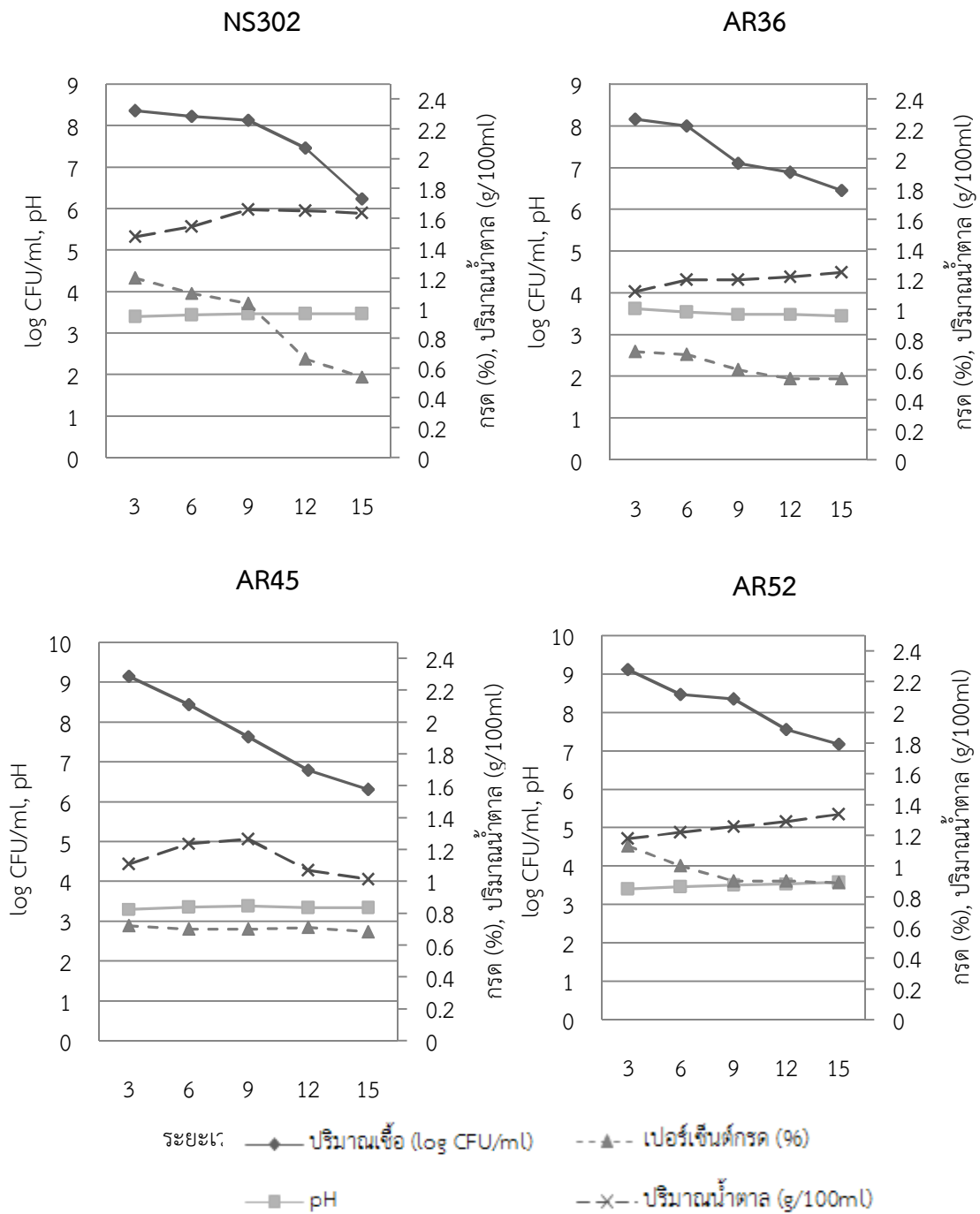
หลังเก็บผักดองไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็นนาน 15 วัน พบว่ามีปริมาณเชื้อเหลือรอดอยู่ระหว่าง 6.23-7.46 log CFU/ml โดยผักดองที่หมักด้วยเชื้อไอโซเลท AR71 มีปริมาณเชื้อโปรไบโอติกเหลือรอดสูงสุดคือ 7.46 log CFU/ml ผักดองมีค่าพีเอชอยู่ในช่วง 3.33-3.75 มีเปอร์เซ็นต์กรดอยู่ระหว่าง 0.54-1.13% ผักดองที่หมักด้วยเชื้อไอโซเลท AR71 มีเปอร์เซ็นต์กรดสูงสุด 1.13% รองลงมาคือ ผักดองที่หมักด้วยเชื้อไอโซเลท AR45 และ AR72 มีเปอร์เซ็นต์กรดสูง 0.89% รวมทั้งมีปริมาณน้ำตาลอยู่ในช่วง 1.01-1.64 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร (รูปที่ 3.12)



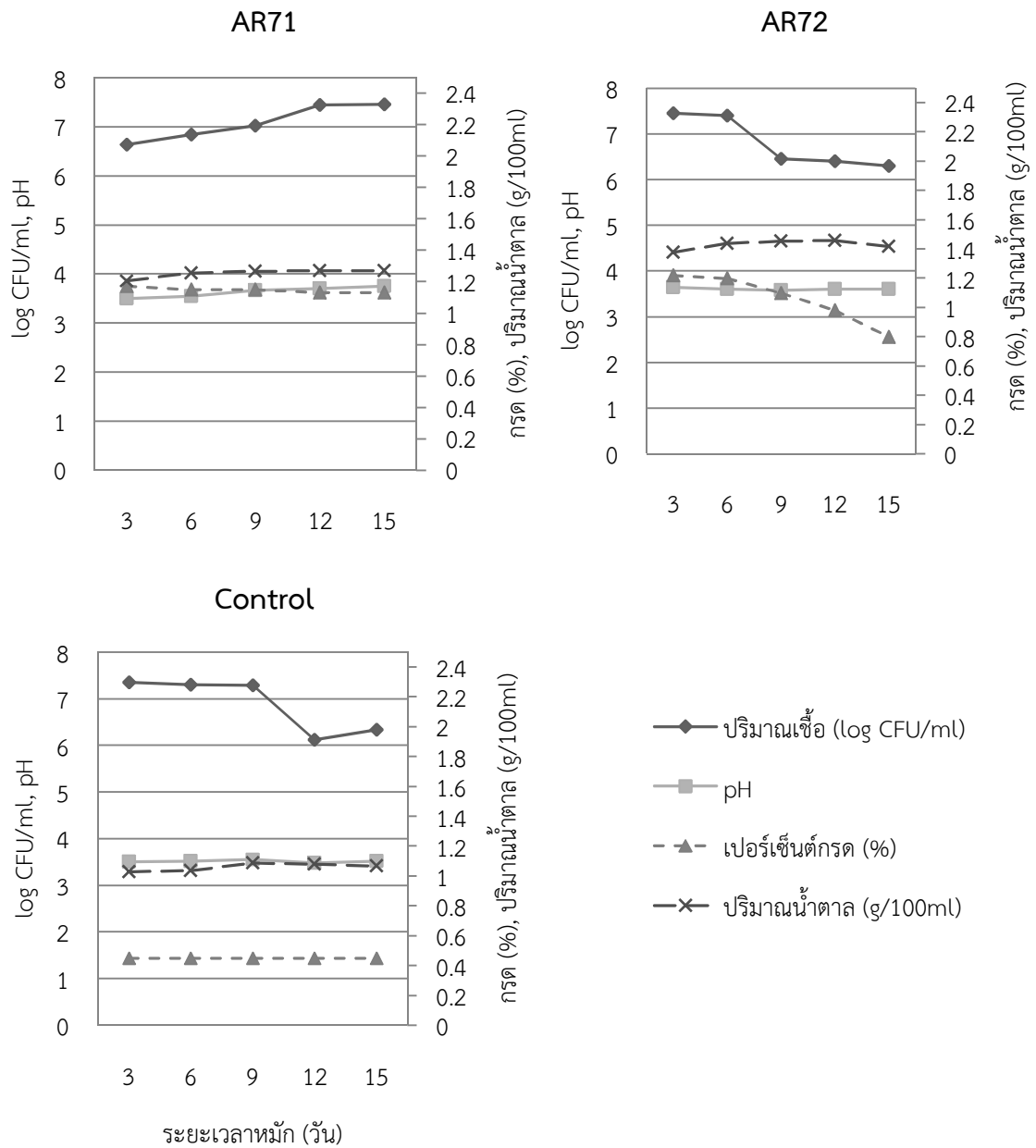
รูปที่ 3.9 ความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ผักดองที่การเก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)



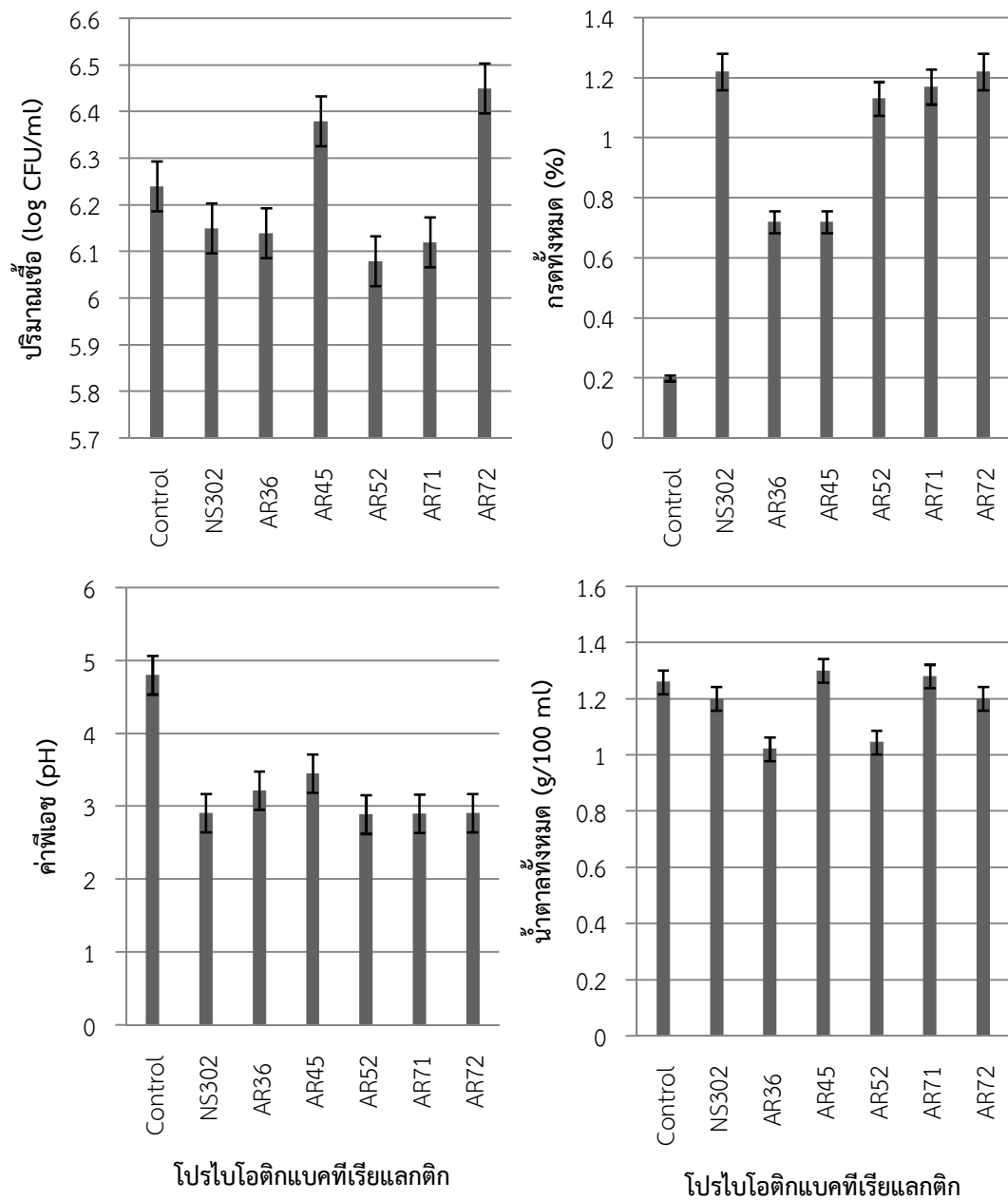
รูปที่ 3.9 (ต่อ) ความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ผักดองที่การเก็บรักษา ณ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส)



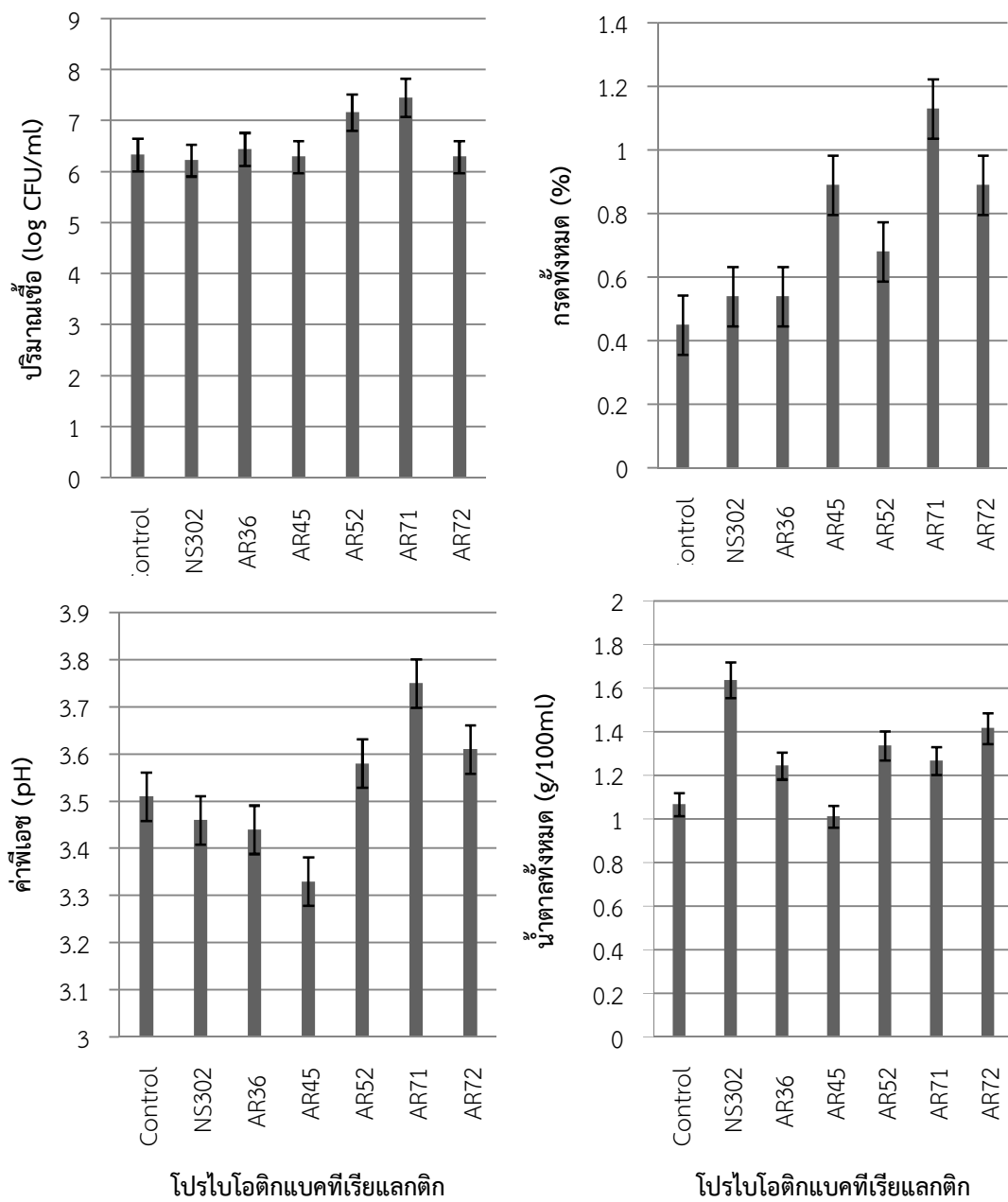
รูปที่ 3.10 ความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ผักดองที่การเก็บรักษา ณ อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 3.10 (ต่อ) ความสามารถในการอยู่รอดของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ผักดองที่การเก็บรักษา ณ อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส)



รูปที่ 3.11 เปรียบเทียบการเก็บรักษาผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกดติก ณ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) นาน 5 วัน

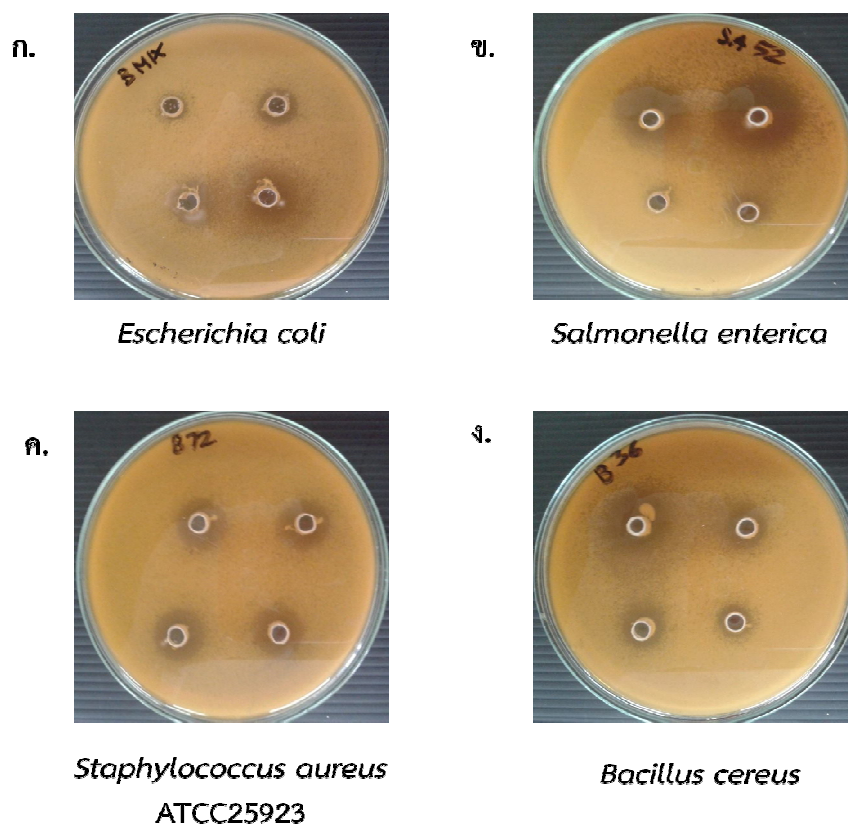


รูปที่ 3.12 เปรียบเทียบการเก็บรักษาผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก ณ อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส) นาน 15 วัน

6.3 ศึกษาประสิทธิภาพของน้ำผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์

6.3.1 Agar well diffusion method

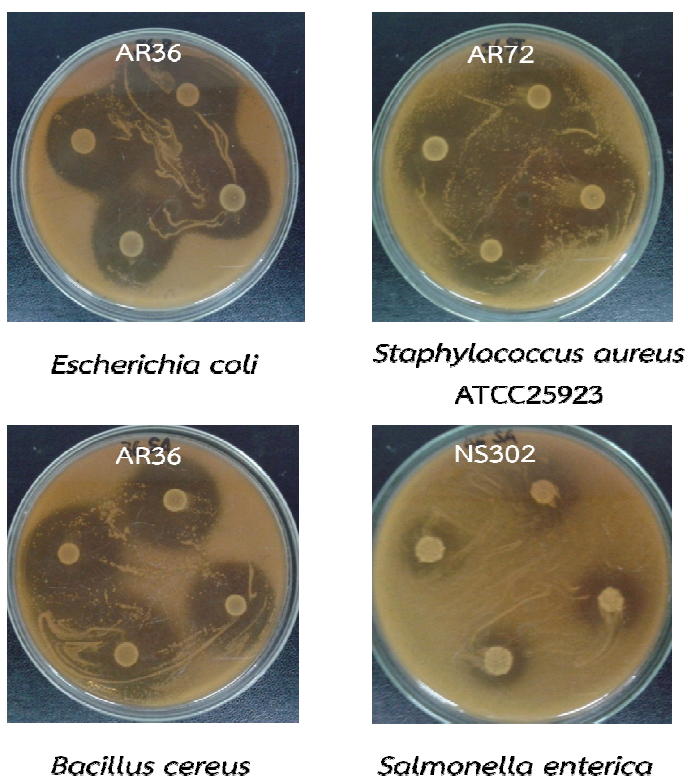
หลังการนำน้ำผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่หมัก 72 ชั่วโมง (รูปที่ 3.13) มาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Agar well diffusion method พบว่าน้ำผักดองโปรไบโอติกไอโซเลท AR72 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้สูงสุดคือ สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* และ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ในขณะที่น้ำผักดองโปรไบโอติกไอโซเลทอื่นๆ สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้เพียง 1 หรือ 2 สายพันธุ์เท่านั้น (ตารางที่ 3.12)



รูปที่ 3.13 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยน้ำผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกด้วยวิธี Agar well diffusion method; (ก) *Escherichia coli*, (ข) *Salmonella enterica*, (ค) *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ (ง) *Bacillus cereus*

6.3.2 Agar spot method

หลังการนำน้ำผักดองไปโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่หมัก 72 ชั่วโมงมาทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี Agar spot method (รูปที่ 3.14) พบว่าน้ำผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ดีมากกว่าหรือเท่ากับ 2 สายพันธุ์ โดยพบว่าไอโซเลท AR36 และ AR72 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Escherichia coli* สูง คือ มีขนาดของ inhibition zone เท่ากับ 10.35 และ 11.62 mm ตามลำดับ ไอโซเลท AR71 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Bacillus cereus* สูงสุดคือ มีขนาดของ inhibition zone เท่ากับ 11.25 mm ในขณะที่ไอโซเลท AR36 AR52 และ AR72 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Bacillus cereus* ปานกลางคือ มีขนาดของ inhibition zone เท่ากับ 7.50, 6.85 และ 6.37 mm ตามลำดับ ไอโซเลท AR72 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ปานกลางคือ มีขนาดของ inhibition zone เท่ากับ 8.50 mm และพบว่าไอโซเลท AR52 และ AR71 มีประสิทธิภาพในการยับยั้ง *Salmonella enterica* ปานกลางคือ มีขนาดของ inhibition zone เท่ากับ 8.06 และ 7.35 mm ตามลำดับ (ตารางที่ 3.13)



รูปที่ 3.14 การทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยน้ำผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกเป็นเวลา 72 ชั่วโมง โดยวิธี Agar spot method

ตารางที่ 3.12 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของน้ำผักดองที่หมักด้วยโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท เป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี Agar well diffusion method

ไอโซเลท	เส้นผ่านศูนย์กลางการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Salmonella enterica</i>
Control	-	-	5.50±0.04	-
NS302	3.85±0.17	-	4.25±0.03	-
AR36	3.13±0.03	3.31±0.05	-	-
AR45	-	3.35±0.03	-	-
AR52	-	6.63±0.12	-	7.80±0.16
AR71	-	2.71±0.20	-	5.25±0.06
AR72	4.50±0.07	3.76±0.03	4.56±0.05	-

หมายเหตุ: (-) คือ ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง

ตารางที่ 3.13 ประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของน้ำผักดองที่หมักด้วยโพรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท เป็นเวลา 72 ชั่วโมงด้วยวิธี Agar spot method

ไอโซเลท	ขอบวงใสการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ (mm)			
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	<i>Salmonella enterica</i>
Control	-	4.50±0.02	-	-
NS302	6.56±0.17	-	3.88±0.04	4.75±0.11
AR36	10.35±0.14	7.50±0.03	-	-
AR45	5.25±0.04	4.15±0.12	-	-
AR52	-	6.85±0.14	-	8.06±0.16
AR71	5.75±0.03	11.25±0.05	3.17±0.07	7.35±0.08
AR72	11.62±0.03	6.37±0.11	8.50±0.15	-

หมายเหตุ: ขอบวงใสการยับยั้ง (clear zone) หมายถึง การวัดจากขอบหยุดเชื้อแบคทีเรียแลคติกจนสุดขอบวงใส, (-) คือ ไม่มีประสิทธิภาพการยับยั้ง

6.4 ตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผักดองที่ผลิตได้

จากผลิตภัณฑ์ผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 7 ชนิดหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ณ อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) พบว่าตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่าง 1 กรัม ไม่มี *Escherichia coli* ในตัวอย่าง 1 กรัม โดยมีค่า MPN/g < 3.0 และมีจำนวนยีสต์และรา (CFU/g) น้อยกว่า 100 (CFU/g) ในผลิตภัณฑ์ผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR45 AR71 และ AR72 ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นมีจำนวนราและยีสต์มากกว่า 100 (CFU/g)

ภายหลังการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผักดองที่ผลิตได้ ณ อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส) นาน 7 วัน พบว่าตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่าง 1 กรัม ไม่มี *Escherichia coli* ในตัวอย่าง 1 กรัม โดยมีค่า MPN/g < 3.0 และทุกชุดการทดลองมีจำนวนยีสต์และรา (CFU/g) มากกว่า 100 (CFU/g) โดยผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR71 มีจำนวนยีสต์และราน้อยสุดคือ 1.2×10^3 (CFU/g)

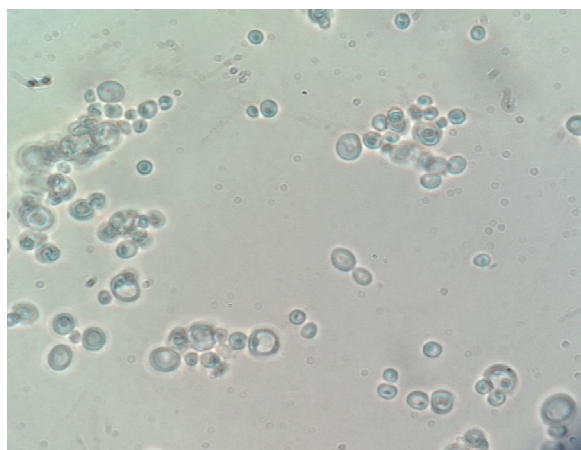
ภายหลังการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผักดองที่ผลิตได้ ณ อุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส) นาน 14 วัน พบว่าตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่าง 1 กรัม ไม่มี *Escherichia coli* ในตัวอย่าง 1 กรัม โดยมีค่า MPN/g < 3.0 และทุกชุดการทดลองมีจำนวนยีสต์และรา (CFU/g) มากกว่า 100 (CFU/g) โดยผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR72 มีจำนวนยีสต์และราน้อยสุดคือ 5.30×10^3 (CFU/g) (ตารางที่ 3.14)

ตารางที่ 3.14 ตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ผักดองที่หมัก 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) และผักดองที่เก็บในตู้เย็นเป็นเวลา 7 และ 14 วัน ตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.1168/2549)

ชนิด ผักดอง	ดัชนีคุณภาพทางจุลชีววิทยา								
	ผักดองหลังหมัก 72 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง			ผักดองเก็บในตู้เย็น 7 วัน			ผักดองเก็บในตู้เย็น 14 วัน		
	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	ยีสต์ รา	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	ยีสต์ รา	<i>Staphylococcus</i>	<i>Escherichia</i>	ยีสต์ รา
	<i>aureus</i>	<i>coli</i>	(CFU/g)	<i>aureus</i>	<i>coli</i>	(CFU/g)	<i>aureus</i>	<i>coli</i>	(CFU/g)
	(<100/g)	(MPN/g)		(<100/g)	(MPN/g)		(<100/g)	(MPN/g)	
Control	<10	<3.0	6.5×10 ³	<10	<3.0	3.4×10 ⁴	<10	<3.0	5.92×10 ⁴
NS302	<10	<3.0	1.0×10 ²	<10	<3.0	1.9×10 ³	<10	<3.0	1.04×10 ⁴
AR36	<10	<3.0	3.2×10 ³	<10	<3.0	3.2×10 ⁴	<10	<3.0	1.87×10 ⁴
AR45	<10	<3.0	<10 ²	<10	<3.0	2.1×10 ³	<10	<3.0	1.25×10 ⁴
AR52	<10	<3.0	2.5×10 ³	<10	<3.0	2.5×10 ⁴	<10	<3.0	4.00×10 ⁴
AR71	<10	<3.0	<10 ²	<10	<3.0	1.2×10 ³	<10	<3.0	7.72×10 ⁴
AR72	<10	<3.0	<10 ²	<10	<3.0	4.7×10 ³	<10	<3.0	5.30×10 ³

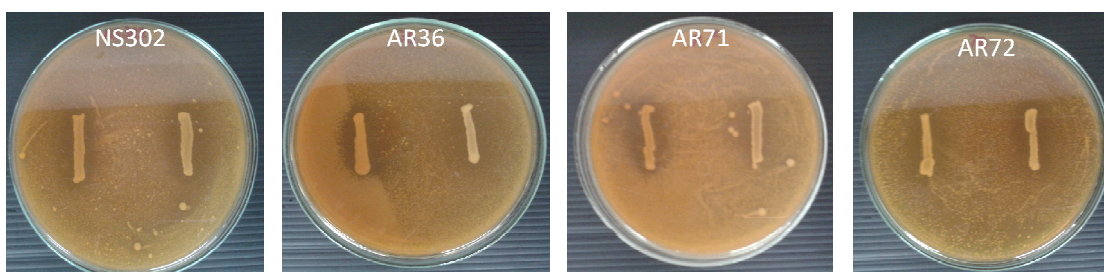
6.5 ทดสอบการยับยั้งยีสต์ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้

จากการแยกยีสต์จากตัวอย่างผักดองที่หมักได้ สามารถแยกยีสต์ได้ 1 สายพันธุ์ เมื่อนำฟิล์มยีสต์ที่แยกได้มาทำ wet mount ดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ พบว่ายีสต์ที่แยกได้รหัส YP มีรูปร่างกลม มีการสืบพันธุ์แบบ Budding (รูปที่ 3.15)



รูปที่ 3.15 ลักษณะของยีสต์ YP ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ เมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ขนาดกำลังขยาย 400X

เมื่อทดสอบการยับยั้งยีสต์ด้วยวิธี dual culture overlay assay (รูปที่ 3.16) พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลท มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 AR36 AR45 และ AR72 ที่สามารถยับยั้งยีสต์ได้ โดยมีระดับการยับยั้งปานกลางมีขนาดของ Inhibition zone อยู่ระหว่าง 3.00-5.50 มิลลิเมตร และอีก 1 ไอโซเลทคือ AR71 ที่สามารถยับยั้งยีสต์ได้ โดยมีระดับการยับยั้งต่ำมีขนาดของ Inhibition zone อยู่ระหว่าง 2.50-2.75 มิลลิเมตร ในขณะที่แบคทีเรียแลกติก ไอโซเลท AR52 ไม่แสดงผลการยับยั้ง (ตารางที่ 3.15)



รูปที่ 3.16 การยับยั้งยีสต์จากผักดองที่หมักได้ โดยแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ด้วยวิธี dual culture assay

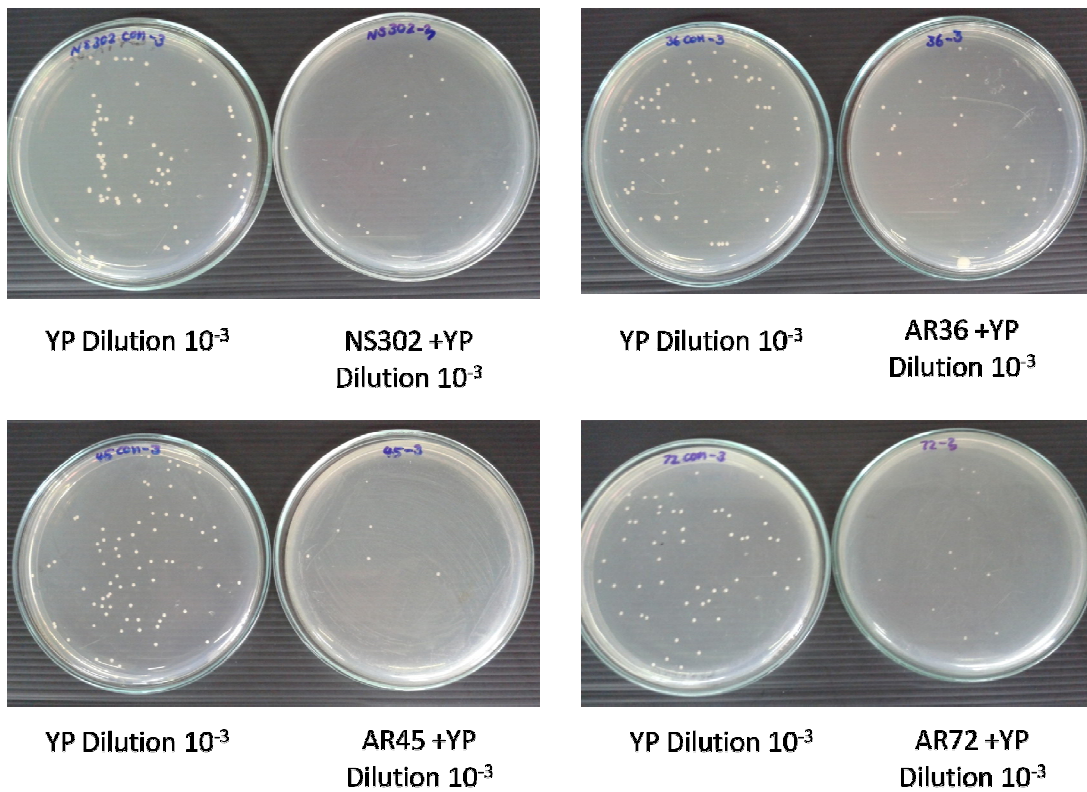
ตารางที่ 3.15 การยับยั้งยีสต์ YP ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ด้วยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 ไอโซเลทด้วยวิธี dual culture assay

รหัสเชื้อ	Inhibition zone	
	(mm)	scale
NS302	5.08 ± 0.52 ^a	++
AR36	4.75 ± 0.50 ^a	++
AR45	3.08 ± 1.44 ^{bc}	++
AR52	-	-
AR71	2.67 ± 1.44 ^c	+
AR72	3.33 ± 0.60 ^b	++

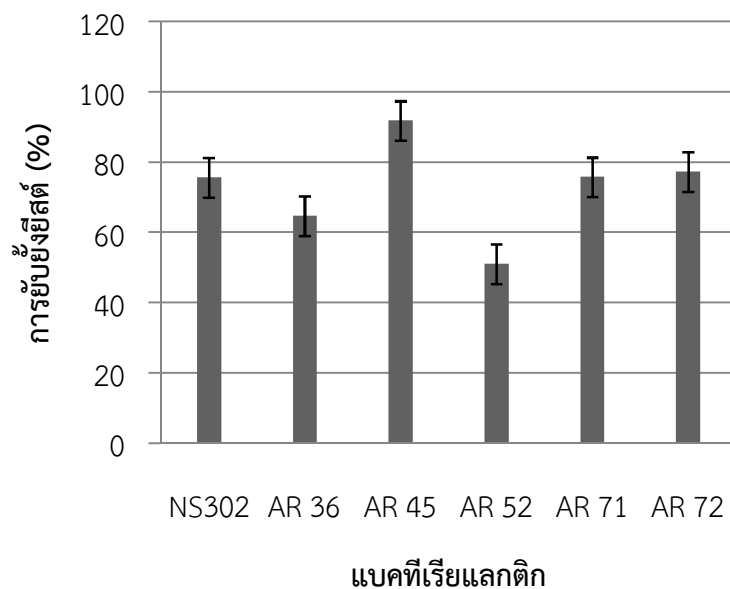
หมายเหตุ: Inhibition zone scales: (-) no visible inhibition
 (+) weak 1-3 mm
 (++) moderate 3-10 mm
 (+++) strong > 10 mm

ค่าตัวอักษรภาษาอังกฤษในแต่ละสดมภ์ หมายถึง ค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยค่า $p < 0.05$

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลทดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งยีสต์รหัส YP โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน (รูปที่ 3.17) เมื่อนำมา Spread plate บนอาหาร YM agar เพื่อนับจำนวนยีสต์เทียบกับชุดควบคุม พบว่ายีสต์รหัส YP ที่แยกได้จากผักดองถูกยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติก NS302 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 75.71% ยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติก AR36 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 64.79% ยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติก AR45 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 91.89% ยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติก AR52 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 51.16% ยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติก AR71 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 75.86% และยับยั้งโดยแบคทีเรียแลคติก AR72 คิดเป็นเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง 77.36% (รูปที่ 3.18)



รูปที่ 3.17 ผลการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ในการยับยั้งยีสต์หีส YP ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน



รูปที่ 3.18 เปอร์เซ็นต์การยับยั้งยีสต์หีส YP ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ด้วยแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ โดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน

7. การเทียบเคียงสายพันธุ์ของโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการคัดเลือก

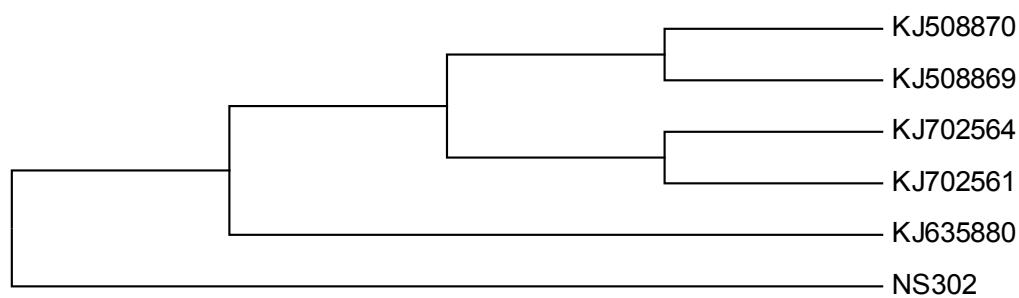
ป่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 AR36 AR45 AR52 AR71 และ AR72 ไปเทียบเคียงลำดับเบสโดย 16S rRNA gene พบว่าไอโซเลท NS302 อยู่ในสกุล *Lactobacillus plantarum* strain T1D มีค่า % similarity เท่ากับ 99% ซึ่งตรงกับ Accession number คือ KJ508870 (รูปที่ 3.19) ไอโซเลท AR36 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain NSN-5 มีค่า % similarity เท่ากับ 99% ซึ่งตรงกับ Accession number คือ KJ542881 (รูปที่ 3.20) ไอโซเลท AR45 อยู่ในสกุล *Lactobacillus plantarum* strain K25 มีค่า % similarity เท่ากับ 100% ซึ่งตรงกับ Accession number คือ GQ461596 (รูปที่ 3.21) ไอโซเลท AR52 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain DISSPA78 มีค่า % similarity เท่ากับ 99% ซึ่งตรงกับ Accession number คือ KJ187163 (รูปที่ 3.22) ไอโซเลท AR71 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain A045 มีค่า % similarity เท่ากับ 100% ซึ่งตรงกับ Accession number คือ KF740712 (รูปที่ 3.23) และไอโซเลท AR72 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain KLF01 มีค่า % similarity เท่ากับ 99% ซึ่งตรงกับ Accession number คือ HM004216 (รูปที่ 3.24) (ตารางที่ 3.16)

ตารางที่ 3.16 การเทียบเคียงเชื้อแบคทีเรียแลกดิก โดยใช้ 16S rDNA sequencing analysis

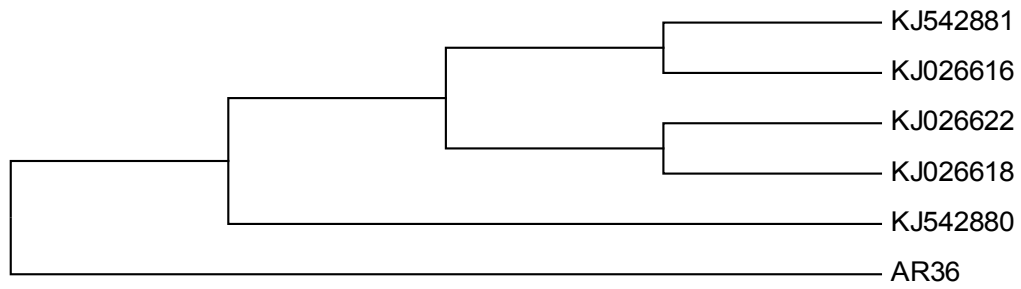
Sample name	Sequence	% similarity	Accession number
NS302	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain T1D Length = 1420 bp Score = 1107 bits(599) Expect = 0.0 Gaps = 1/603(0%) Strand = Plus/Plus	602/603 (99%)	KJ508870
AR36	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain NSN-5 Length = 1487 bp Score = 1157 bits(626) Expect = 0.0 Gaps = 1/630(0%) Strand = Plus/Plus	629/630 (99%)	KJ542881
AR45	<i>Lactobacillus plantarum</i> strain K25 Length = 1470 bp Score = 977 bits (529) Expect = 0.0 Gaps = 0/529 (0%) Strand = Plus/Minus	529/529 (100%)	GQ461596
AR52	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain DISSPA78 Length = 925 bp Score = 881 bits(477) Expect = 0.0 Gaps = 1/481(0%) Strand = Plus/Plus	480/481 (99%)	KJ187163

ตารางที่ 3.16 (ต่อ)

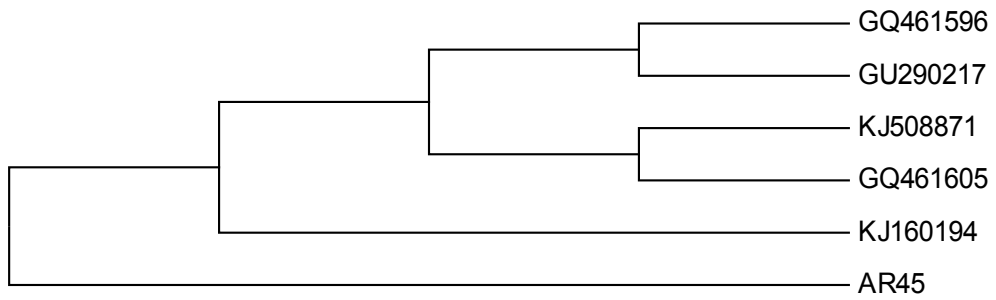
Sample name	Sequence	% similarity	Accession number
AR71	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain A045 Length = 1435 bp Score = 797 bits (431) Expect = 0.0 Gaps = 0/431(0%) Strand = Plus/Plus	431/431 (100%)	KF740712
AR72	<i>Lactobacillus fermentum</i> strain KLF01 Length = 1541 bp Score = 1110 bits (601) Expect = 0.0 Gaps = 0/613 (0%) Strand = Plus/Plus	609/613 (99%)	HM004216



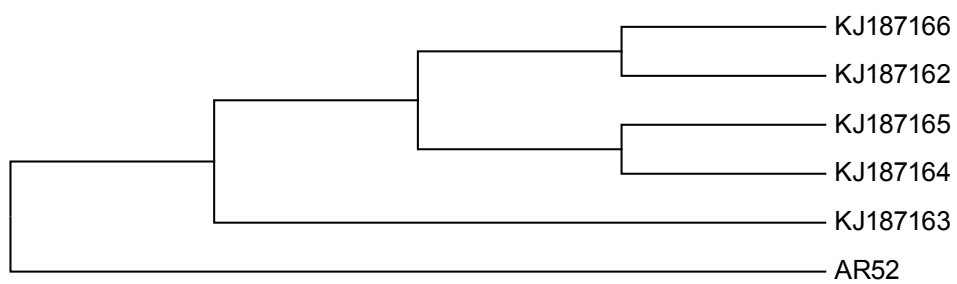
รูปที่ 3.19 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติก ไอโซเลท NS302



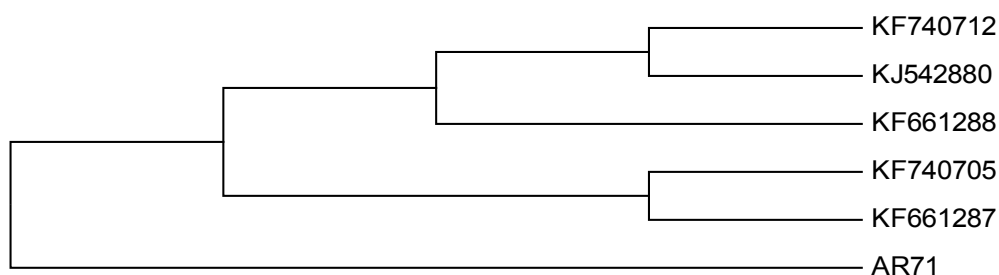
รูปที่ 3.20 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลกติก ไอโซเลท AR36



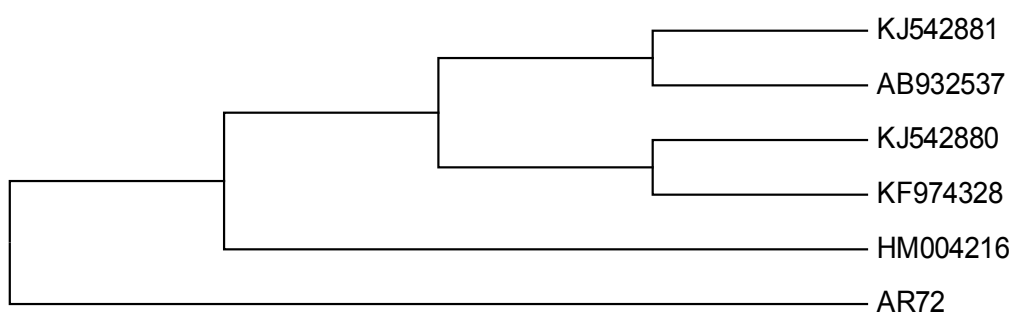
รูปที่ 3.21 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลกติก ไอโซเลท AR45



รูปที่ 3.22 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลกติก ไอโซเลท AR52



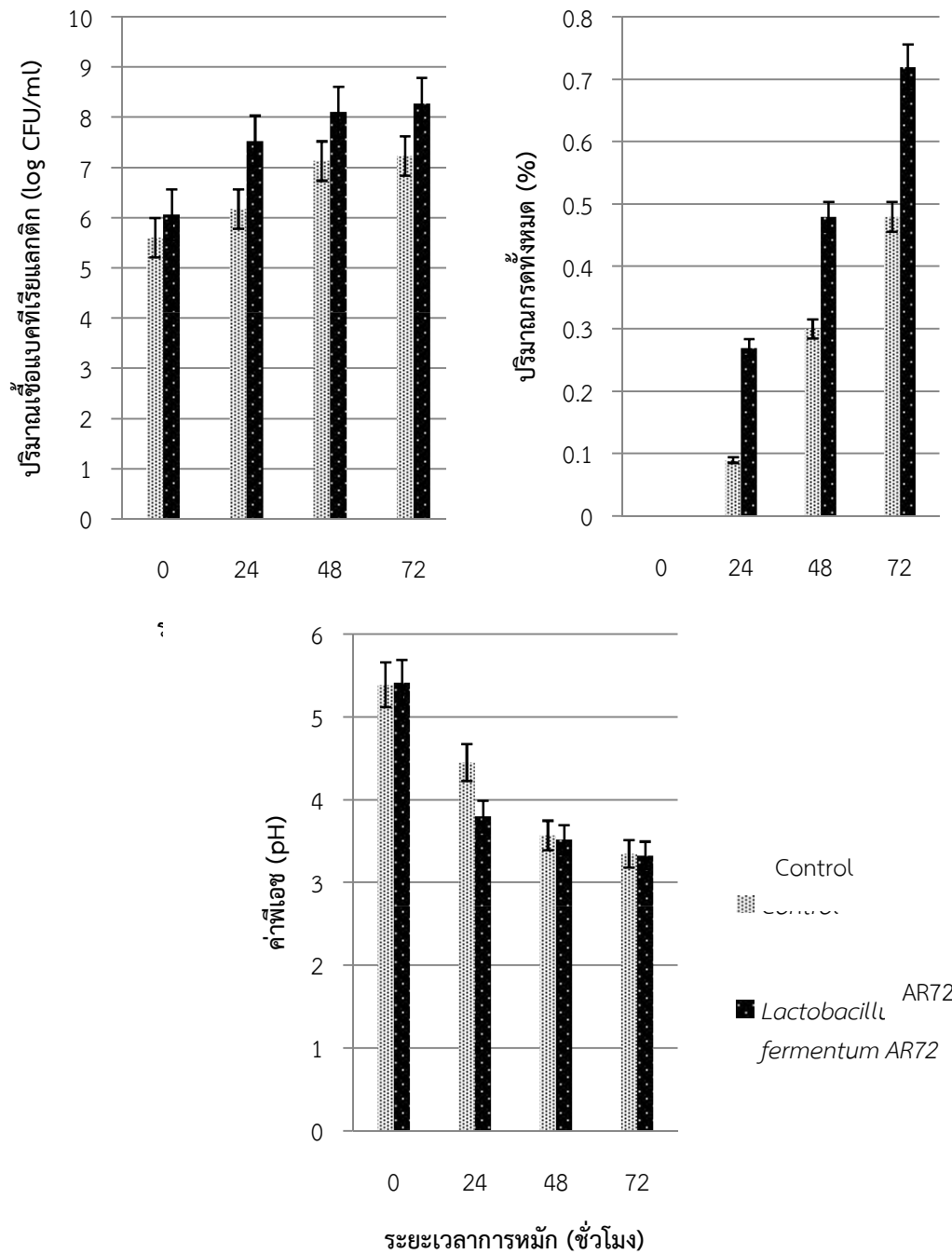
รูปที่ 3.23 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติก ไอโซเลท AR71



รูปที่ 3.24 แผนภูมิต้นไม้ (Phylogenetic tree) จากลำดับเบส 16S rDNA ของแบคทีเรียแลคติก ไอโซเลท AR72

8. การผลิตผักดองโปรไบโอติกเพื่อทดสอบทางประสาทสัมผัส

คัดเลือกกล้าเชื้อโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่เหมาะสมต่อการหมักผักดองมา 1 ไอโซเลทคือ AR72 มาเปรียบเทียบการหมักกับชุดควบคุมที่ไม่เติมกล้าเชื้อที่ระยะเวลาการหมักทุกๆ 24 ชั่วโมงจนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าการหมักผักดองด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus fermentum* AR72 มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกและปริมาณกรดทั้งหมด (%) เพิ่มขึ้น โดยปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพิ่มขึ้นจาก 6.06 เป็น 8.28 log CFU/ml ปริมาณกรดเพิ่มจาก 0.27% เป็น 0.72% และมีค่าพีเอชต่ำลงจาก 5.42 เป็น 3.33 (รูปที่ 3.25)



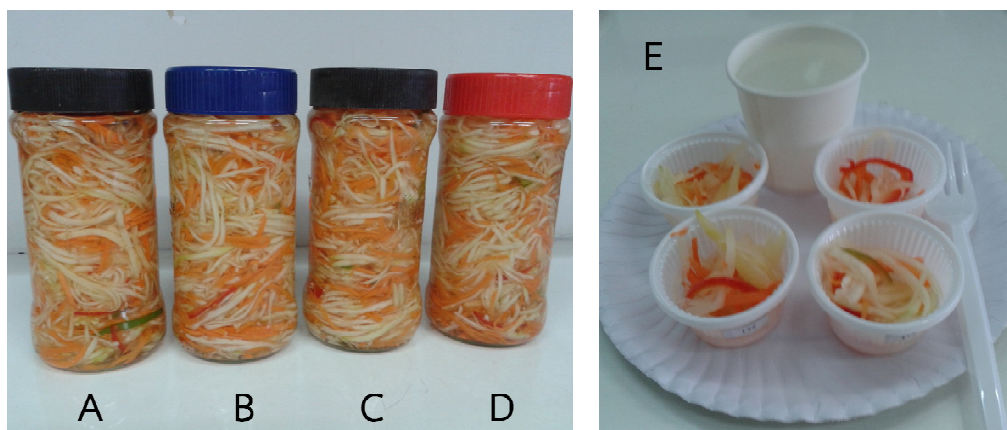
รูปที่ 3.25 เปรียบเทียบการหมักผักดองโดยใช้ *Lactobacillus fermentum* AR72 กับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อหลังหมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

เมื่อนำผักดองที่หมักได้มาตรวจคุณภาพทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.1168/2549) ทุก 24 ชั่วโมงจนครบ 72 ชั่วโมง พบว่าทุกช่วงระยะเวลาตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่าง 1 กรัม ไม่มี *Escherichia coli* ในตัวอย่าง 1 กรัม โดยมีค่า MPN/g <3.0 ในขณะที่มีจำนวนยีสต์น้อยกว่า 100 (CFU/g) ที่การหมักเริ่มต้น 0 ชั่วโมง แต่หลัง 24 ชั่วโมงของการหมัก พบว่าจำนวนยีสต์ค่อยๆ เพิ่มสูงขึ้น โดยในชุดควบคุมมีจำนวนยีสต์มากกว่า 100 (CFU/g) ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ในขณะที่ผักดองที่หมักด้วย *Lactobacillus fermentum* AR72 มีจำนวนยีสต์สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐาน มผช. หลังการหมักไปแล้ว 72 ชั่วโมง (ตารางที่ 3.17)

ตารางที่ 3.17 ตรวจคุณภาพผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus fermentum* AR72 ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.1168/2549) หลังการหมัก ณ อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส)

ระยะเวลา การหมัก (ชั่วโมง)	ชนิดผักดอง	ดัชนีคุณภาพทางจุลชีววิทยา			
		จำนวน จุลินทรีย์ ทั้งหมด (CFU/g)	<i>Staphylococcus aureus</i> (<100/g)	<i>Escherichia coli</i> (MPN/g)	ยีสต์ (CFU/g)
0	Control	3.1×10^6	<10	<3.0	$<10^2$
	LAB AR72	1.2×10^6	<10	<3.0	$<10^2$
24	Control	8.0×10^6	<10	<3.0	8.5×10^2
	LAB AR72	1.3×10^7	<10	<3.0	1.0×10^2
48	Control	2.0×10^7	<10	<3.0	7.0×10^2
	LAB AR72	5.3×10^8	<10	<3.0	1.0×10^2
72	Control	2.4×10^7	<10	<3.0	4.3×10^3
	LAB AR72	7.3×10^8	<10	<3.0	1.7×10^3
เกณฑ์ที่ผ่านมาตรฐาน		ไม่เกิน 1×10^6	<100	<3.0	ไม่เกิน 100

เมื่อนำผักดองชุดควบคุม ซึ่งไม่มีการเติมกล้าเชื้อ และผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus fermentum* AR72 ที่หมักเป็นเวลา 2 และ 3 วันมาทดสอบทางประสาทสัมผัส (รูปที่ 3.26) โดยเตรียมผักดองแต่ละตัวอย่างๆ ละ 10 กรัม จำนวน 4 ถ้วย ทดสอบทางประสาทสัมผัสแบบ Hedonic Test โดยมีผู้ทดสอบ 32 คน ซึ่งเป็นอาจารย์ นักศึกษาระดับปริญญาตรี/โท/เอก และบุคลากรภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อายุระหว่าง 20-55 ปี ให้คะแนนความชอบทั่วไปในด้านสี กลิ่น รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวม โดยให้คะแนนเป็นความแตกต่างแบบ Hedonic Test scale: 5 scale ได้แก่ 5=ยอมรับมากที่สุด 4=ยอมรับมาก 3=ยอมรับ 2=ยอมรับน้อย 1=ไม่ยอมรับ (แบบฟอร์มการทดสอบภาคผนวก ค) แล้วนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way Anova จากนั้นเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างชุดทดสอบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)



รูปที่ 3.26 ลักษณะของผลิตภัณฑ์ผักดองที่ผลิตได้ที่นำมาทดสอบทางประสาทสัมผัส

เมื่อกำหนดให้ ชุด A คือชุดควบคุมไม่เติมกล้าเชื้อ อายุการหมัก 2 วัน
 ชุด B คือชุดเติมกล้าเชื้อ *L. fermentum* AR72 อายุการหมัก 2 วัน
 ชุด C คือชุดควบคุมไม่เติมกล้าเชื้อ อายุการหมัก 3 วัน
 ชุด D คือชุดเติมกล้าเชื้อ *L. fermentum* AR72 อายุการหมัก 3 วัน
 ภาพ E คือ ตัวอย่างถ้วยชิมตัวอย่างผักดองที่ผลิตได้ จำนวน 4 ตัวอย่าง

ผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผักดองที่ผลิตได้จากผู้ประเมินทั้งหมด 32 คน มีดังนี้ (ตารางที่ 3.18)

ด้านกลิ่น กลิ่นของผักดองชุด B และชุด D มีกลิ่นหมัก และมีกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อย ส่วนในผักดองชุด C ที่มีกลิ่นหมักมากกว่าชุด A จากผลการทดสอบพบว่าผักดองชุด C ได้รับคะแนนสูงสุด (3.59) รองลงมาคือ ผักดองชุด A (3.34) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และผักดองชุด B ได้รับคะแนนด้านกลิ่นน้อยที่สุด (3.22) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ด้านรสชาติ รสชาติของผักดองชุด B และชุด D มีรสเปรี้ยวอมหวาน ส่วนผักดองในชุด A มีรสหวานไม่เปรี้ยว ซึ่งแตกต่างจากผักดองชุด C ที่มีรสเปรี้ยวและรสเค็มเล็กน้อย จากผลการทดสอบพบว่าผักดองชุด B และชุด D ได้รับคะแนนสูงสุด (3.34) รองลงมาคือ ผักดองชุด C (3.31) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และผักดองชุด A ได้รับคะแนนด้านรสชาติน้อยที่สุด (3.13) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ด้านเนื้อสัมผัส พบว่าผักดองชุด A และชุด B มีความกรอบใกล้เคียงกัน แตกต่างกันเล็กน้อย ส่วนผักดองชุด C และชุด D มีความกรอบใกล้เคียงกัน พบว่าเนื้อผักมีความชุ่มกว่าเล็กน้อย จากผลการทดสอบพบว่า ผักดองชุด B และชุด C ได้รับคะแนนสูงสุด (3.94) รองลงมาคือ ผักดองชุด A (3.90) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และผักดองชุด D ได้รับคะแนนด้านเนื้อสัมผัสน้อยที่สุด (3.88) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ด้านสี พบว่าผักดองชุด C และชุด D มีสีเหลืองอมส้ม ซึ่งแตกต่างกับสีของผักดองชุด A และชุด B ที่มีสีเหลืองใส จากผลการทดสอบพบว่าผักดองชุด B ได้รับคะแนนสูงสุด (4.31) รองลงมาคือ ผักดองชุด A (4.22) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และผักดองชุด D ได้รับคะแนนด้านสีน้อยที่สุด (4.06) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ด้านการยอมรับโดยรวม เมื่อดูจากการยอมรับโดยรวม ผู้ชิมทั้งหมดให้การยอมรับผักดองชุด A และชุด B ใกล้เคียงกันทั้งด้านกลิ่น รสชาติ เนื้อสัมผัส และสี ส่วนผักดองชุด C ผู้ชิมส่วนใหญ่ให้การยอมรับปานกลางในด้านสี และเนื้อสัมผัส และผักดองชุด D ผู้ชิมส่วนใหญ่ให้การยอมรับน้อยมากในด้านกลิ่น และรสชาติ จากผลการทดลองพบว่าผักดองชุด A และชุด B ได้รับคะแนนการยอมรับโดยรวมสูงสุด (3.78) รองลงมาคือ ผักดองชุด C (3.72) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกันและไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95% และผักดองชุด D ได้รับคะแนนด้านการยอมรับโดยรวมน้อยที่สุด (3.66) แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 3.18 ค่าเฉลี่ยผลการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผักดองโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตได้ภายหลังการหมัก 2 และ 3 วัน

รหัสเชื้อ	ปัจจัย				
	กลิ่น	รสชาติ	เนื้อสัมผัส	สี	การยอมรับโดยรวม
A	3.34±0.97 ^a	3.13±0.83 ^b	3.90±0.78 ^c	4.22±0.79 ^d	3.78±0.94 ^e
B	3.22±1.07 ^a	3.34±0.90 ^b	3.94±0.80 ^c	4.31±0.69 ^d	3.78±0.83 ^e
C	3.59±1.01 ^a	3.31±1.12 ^b	3.94±0.72 ^c	4.09±0.82 ^d	3.72±0.77 ^e
D	3.31±0.97 ^a	3.34±1.21 ^b	3.88±0.87 ^c	4.06±0.80 ^d	3.66±0.87 ^e

หมายเหตุ: ชุด A คือชุดควบคุมไม่เติมกล้าเชื้อ อายุการหมัก 2 วัน
 ชุด B คือชุดเติมกล้าเชื้อ *L. fermentum* AR72 อายุการหมัก 2 วัน
 ชุด C คือชุดควบคุมไม่เติมกล้าเชื้อ อายุการหมัก 3 วัน
 ชุด D คือชุดเติมกล้าเชื้อ *L. fermentum* AR72 อายุการหมัก 3 วัน
 ตัวเลขที่มีตัวอักษรเหมือนกันในแต่ละสดมภ์ หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)
 ผู้ทดลองชิมจำนวน 32 คน

บทที่ 4

วิจารณ์ผลการทดลอง

แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทหลักในผลิตภัณฑ์อาหารหมักทั้งผลิตภัณฑ์จากนม เนื้อสัตว์ และพืชผัก ดังนั้นผลิตภัณฑ์อาหารหมักจึงเป็นแหล่งที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติก (Axelsson, 1998) นอกจากนี้แล้วแบคทีเรียแลคติกอาจพบได้ในแหล่งอื่นๆ รวมทั้งพืชผักสด (Yang *et al.*, 2000) ดังนั้นเพื่อให้มีโอกาสได้เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่มีความหลากหลายมากยิ่งขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงใช้แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก และได้ทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากผักสดชนิดต่างๆ ได้แก่ แตงกวา ผักกาดขาว กะหล่ำปลีม่วง กะหล่ำปลี แครอท ผักกาดแก้ว และบร็อคโคลี่ สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ 61 ไอโซเลท มีทั้งรูปร่างกลม และรูปร่างแท่ง ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาแบคทีเรียแลคติกที่พบในผักสด ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* (Nualkaekul and Charalampopoulos, 2011; Hurtado *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2012; Yoon *et al.*, 2004) *Lactobacillus acidophilus* (Chen and Mustapha, 2012) *Lactobacillus casei* (Yoon *et al.*, 2006) *Lactobacillus paracasei* (De-Bellis *et al.*, 2010)

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผักสด 61 ไอโซเลทดังกล่าว และแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมัก 48 ไอโซเลทรวมทั้งสิ้น 109 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการเจริญ และการหมักในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth พบว่าแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่มีความสามารถในการเจริญดีเยี่ยมคือ มีค่า OD มากกว่า 1.0 และหมักได้ดี โดยหมักให้เปอร์เซ็นต์กรดมากกว่า 1% 105 ไอโซเลท ทั้งนี้เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS broth มีปริมาณน้ำตาล 2% รวมทั้งมีสารอาหารที่สมบูรณ์เหมาะกับการเจริญของแบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่ (วิเชียร, 2534) แบคทีเรียแลคติกส่วนใหญ่สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งของคาร์บอน เพื่อสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย (Axelsson, 1993) ส่งผลทำให้มีค่าพีเอชลดลง โดยพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 6.35 ลดลงเป็น 3.98-6.07 หลังจากการหมัก 24 ชั่วโมง ซึ่งแบคทีเรียแลคติกสามารถทำให้สภาพแวดล้อมที่อาศัยอยู่มีสภาพเป็นกรด มีผลทำให้ระดับพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ลดลง ทำให้สามารถควบคุมกิจกรรมของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ โดยเฉพาะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคซึ่งมักไม่ทนกรดไม่ให้อาจเจริญได้ (Agrawal, 2005)

จากการนำแบคทีเรียแลคติกจากผักสดและอาหารหมักที่มีความสามารถในการเจริญ และมีความสามารถในการหมัก มาทดสอบสมบัติในการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ทดสอบการทนต่อสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ซึ่งเป็นปัจจัยประการหนึ่งในการควบคุม จำนวน และชนิดของแบคทีเรียในระบบทางเดินอาหารเพราะแบคทีเรียส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ดี ในสภาพที่พีเอชต่ำ สภาวะที่เป็นกรดรุนแรงของกระเพาะจะเป็นผลร้ายต่อแบคทีเรีย (Jin *et al.*, 1998) ดังนั้นการนำจุลินทรีย์มาใช้เป็นโปรไบโอติก ควรคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความทนทานต่อสภาวะที่เป็นกรด ตลอดจนถึงมีชีวิตรอดภายใต้สภาวะที่เป็นกรดในกระเพาะอาหาร (Holzapfel *et al.*, 1998) ซึ่งจากการทดสอบพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จำนวน 45 ไอโซเลทสามารถอยู่รอดได้ที่ค่าพีเอช 3 สูงกว่า 40% โดยยังมีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 10^6 - 10^7 CFU/ml ซึ่งเป็นปริมาณที่เพียงพอ ต่อการเกิดผลดีต่อสุขภาพ ทั้งนี้เชื้อที่สามารถเจริญได้ในสภาวะดังกล่าวบ่งบอกถึงความสามารถในการ เจริญรอดชีวิตจากสภาวะในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งผลการศึกษการรอดชีวิตของเชื้อดังกล่าว สอดคล้องกับการศึกษาของ Erkkila and Petaja (2000) ที่ทดสอบการทนต่อกรด โดยทดลองใน สภาวะที่คล้ายกับกระเพาะอาหารโดยใช้สารละลาย phosphate buffer saline ที่มีค่าพีเอช 1-5 พบว่า *Lactobacillus sake* (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถรอดชีวิตได้ สูงสุดที่พีเอช 3 นอกจากนี้พบว่าสายพันธุ์ของเชื้อมีผลต่อการทนกรดด้วย โดย *L. johnsonii* BFE 1058 มีความสามารถในการทนกรดได้ดีกว่าเชื้อ *L. johnsonii* BFE 10589 (Toit *et al.*, 1998) และ สอดคล้องกับการศึกษาของ Gilliland (1979) ซึ่งได้รายงานถึงการทนกรดในกระเพาะอาหารของ แบคทีเรียแลคติกชนิดต่างๆ ได้แก่ *Lactobacillus casei* สามารถทนกรดได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นๆ คือ อยู่รอดอย่างสมบูรณ์ใน 3 ชั่วโมงในสารละลาย gastric juice สักระยะ ซึ่งมีพีเอช 3.0 ที่ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วน *L. acidophilus* และ *L. plantarum* สามารถทนกรดได้ดีเช่นกัน (Erkkila and Petaja, 2000)

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่สามารถรอดชีวิตในสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะ อาหารจำนวน 45 ไอโซเลทดังกล่าว มาทดสอบความสามารถในการอยู่รอดในสภาวะที่มีเกลือน้ำดี ร้อยละ 0.30 เนื่องจากในร่างกายมนุษย์มีความเข้มข้นของเกลือน้ำดีร้อยละ 0.15-0.30 (Erkkila and Petaja, 2000) จากผลการทดลองพบว่ามีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 14 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การรอด สูงกว่า 40% และยังมีปริมาณเชื้อรอดชีวิต 10^6 - 10^7 CFU/ml ทั้งนี้จากการรอดชีวิตของเชื้อแสดงให้เห็นความสัมพันธ์กับการหลังเกลือน้ำดีของลำไส้เล็กในระบบทางเดินอาหาร และเป็นแหล่งที่โปรไบโอติกแบคทีเรียสามารถอาศัยอยู่ได้ ซึ่งได้ผลสอดคล้องกับการศึกษาของ Erkkila and Petaja (2000) ที่ ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี โดยทดลองในสภาวะที่คล้ายกับทางเดินอาหารภายในลำไส้เล็ก ใช้ MRS broth ที่มีค่าพีเอช 4-7 และเกลือน้ำดีที่มีระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.15 และ 0.30 พบว่าเชื้อ

Lactobacillus sake (RM10) และ *Pediococcus acidilactici* (P2) สามารถทนต่อเกลือ น้ำดีที่ระดับความเข้มข้นเกลือ น้ำดีร้อยละ 0.30 ที่พีเอช 6.0 เนื่องจากการที่เชื้อสามารถสร้าง bile salt hydrolase enzyme (BSH) ซึ่งเป็นความสามารถในการรอดชีวิตของจุลินทรีย์ที่ใช้เป็นโปรไบโอติกระหว่างการเดินทางมายังทางเดินอาหารนั้นขึ้นอยู่กับความทนทานต่อน้ำดี (Gilliland *et al.*, 1984) น้ำดีเป็นสารเกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารมีความสำคัญต่อกระบวนการเผาผลาญไขมัน น้ำดีสร้างจากคอเรสเตอรอลในตับ และถูกเก็บไว้ในถุงน้ำดีหลังจากการย่อยสลายไขมันแล้วจึงปลดปล่อยสู่ลำไส้เล็กส่วน duodenum (Erkkila and Petaja, 2000) น้ำดีเป็นสารอันตรายต่อจุลินทรีย์ เนื่องจากเยื่อหุ้มเซลล์ของแบคทีเรียมีส่วนประกอบของไขมัน และกรดไขมัน ทำให้ง่ายต่อการถูกทำลายโดยน้ำดี ดังนั้นความทนทานต่อน้ำดีจึงมีความสำคัญสำหรับการคัดเลือกจุลินทรีย์โปรไบโอติก จากการทดสอบพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้สามารถทนเกลือ น้ำดีได้จำนวน 14 ไอโซเลท มีเปอร์เซ็นต์การรอดสูงกว่า 40% คิดเป็น 33.33% ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gilliland *et al.* (1977) ได้รายงาน ว่า *L. plantarum*, *L. fermentum*, *L. acidophilus* และ *L. casei* เจริญได้ดีในสภาวะที่เลี้ยงเชื้อในอาหาร *Lactobacillus Selection Agar* ที่มีการเติม Oxgall 0.3%

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 14 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน พบว่าเชื้อสามารถเจริญได้ทั้ง 2 สภาวะ โดยมีการเจริญดีมาก มีค่า OD ที่ 660 nm อยู่ในช่วง 1.00-2.20 ทั้งนี้เนื่องจากระบบทางเดินอาหารของมนุษย์ยังลึกลงไปยังมีปริมาณอากาศเบาบางหรือไม่มีอากาศเลย ซึ่งจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ในระบบทางเดินอาหารไม่ต้องการออกซิเจน (Salminen and Wright, 1993) ดังนั้นแบคทีเรียแลคติกที่สามารถเจริญได้ทั้งสภาวะมีและไม่มีอากาศได้ จะเป็นผลดีต่อการรอดชีวิตในระบบทางเดินอาหาร อีกทั้งเชื้อที่สามารถเจริญได้ในสภาวะมีออกซิเจน เพื่อสะดวกในการผลิตเชื้อจำนวนมาก รวมถึงการเก็บรักษาเชื้อ โดยจากการทดสอบพบเชื้อแบคทีเรียแลคติกจำนวน 13 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีทั้ง 2 สภาวะ โดยมีค่า OD ที่ 660 nm มากกว่า 1.0

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้ง 13 ไอโซเลทมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella enterica* พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 สายพันธุ์ได้ดีแตกต่างกัน มีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 12 ไอโซเลทที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ตั้งแต่ 2 สายพันธุ์ขึ้นไป ซึ่งการยับยั้งที่เกิดขึ้นนี้อาจเนื่องจากการที่แบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างกรดอินทรีย์เป็นหลัก เนื่องจากยับยั้งได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบ (Lindgren and Dobrogosz, 1990) ทั้งนี้แม้แบคทีเรีย

แลกดิกหลายสายพันธุ์สามารถสร้างสารแบคทีเรียโอซินได้ แต่แบคทีเรียโอซินส่วนใหญ่จะยับยั้งได้เฉพาะแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกันเท่านั้น (Spellhaug and Harlander, 1989) ดังนั้นสารอินทรีย์จำพวกกรดอินทรีย์ เช่น กรดแลกดิกที่แบคทีเรียแลกดิกผลิตขึ้นจึงมีความสำคัญมากกว่า เนื่องจากมีความสามารถในการยับยั้งได้กว้างกว่า การยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ที่เกิดขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียแลกดิกสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสในอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นกรดอินทรีย์ (กรดแลกดิก) ได้ในปริมาณมาก นอกจากนี้อาจเกิดการยับยั้งเนื่องจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เพราะบ่มในสภาวะที่มีออกซิเจน ก็ทำให้แบคทีเรียแลกดิกสามารถสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้มากขึ้น ซึ่งกรดแลกดิกและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์มีความสามารถในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ โดยมีกลไกการยับยั้งคือ กรดอินทรีย์แพร่เข้าไปในไซโตพลาสซึม ทำให้พีเอชในไซโตพลาสซึมลดลง และมีสภาพเป็นกรด ส่งผลทำให้การทำงานของเซลล์หยุด เนื่องด้วยมีพีเอชที่ไม่เหมาะสมในการทำงานของเอนไซม์ต่างๆ ภายในเซลล์ (Podolak *et al.*, 1996) ซึ่งสอดคล้องกับการใช้แบคทีเรียแลกดิกสายพันธุ์อื่นๆ โดยวิธี Agar spot จากการศึกษาของวิลาวัดน์ และคณะ (2540) มีการใช้แบคทีเรียแลกดิกที่แยกได้จากอาหารหมักของไทยคือ *Lactobacillus plantarum* 16 สายพันธุ์ *L. bavaricus* 3 สายพันธุ์ และ *L. brevis* 1 สายพันธุ์ มายับยั้ง *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *V. parahaemolyticus* และ *S. aureus* พบว่ามีส่วนใสการยับยั้งมากกว่าหรือเท่ากับ 10 มิลลิเมตรต่อแบคทีเรียที่ทดสอบอย่างน้อย 3 ชนิด และมีรายงานว่าแบคทีเรียแลกดิก จำนวนมากมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น *Bacillus subtilis* ATCC9799, *Salmonella typhi*, *Pseudomonas* spp., *Clostridium perfringens* และอื่นๆ รวมทั้งแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาหารเน่าเสีย (อัจฉรา, 2541; Jin *et al.*, 1996)

เมื่อนำแบคทีเรียแลกดิกที่แยกได้ทั้ง 12 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง จากการทดสอบพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกดิกที่แยกได้สามารถย่อยสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่จำพวกโปรตีนและแป้ง โดยมีแบคทีเรียแลกดิกจำนวน 6 ไอโซเลทที่สามารถย่อยโปรตีนได้ มีเพียง 2 ไอโซเลทที่สามารถย่อยแป้งได้ จากผลแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรียแลกดิกสามารถสร้างเอนไซม์ในการย่อยสลายโปรตีน และแป้ง จะช่วยในการส่งเสริมการทำงานของระบบการย่อยอาหาร เพื่อให้ร่างกายสามารถดูดซึมไปใช้ประโยชน์ได้เร็วขึ้น ส่งผลดีต่อร่างกายมนุษย์ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Austin *et al.* (1995)

เมื่อนำแบคทีเรียแลกดิกที่แยกได้ทั้ง 6 ไอโซเลทที่มีความสามารถในการย่อยโปรตีน และแป้ง นำมาทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลกดิกส่วนใหญ่ดื้อต่อยา vancomycin, kanamycin, gentamycin, streptomycin และ polymycin อีกทั้งเชื้อมีความไวต่อ

ยาในกลุ่ม chloramphenicol และ erythromycin ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค โดยขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนของเซลล์แบคทีเรีย และโดยธรรมชาติเชื้อแบคทีเรียแลคติกจำพวก *Lactobacillus* spp. ตีต่อยาอย่างกว้างขวาง แต่การตีต่อยาส่วนใหญ่ของเชื้อ *Lactobacillus* spp. ไม่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม นอกจากนี้พลาสมิดที่เกี่ยวข้องกับการตีต่อยาก็พบได้ยากในเชื้อ *Lactobacillus* spp. จึงมีความปลอดภัยต่อการใช้เป็นเชื้อโพรไบโอติก (Salminen *et al.*, 1998)

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 ไอโซเลทดังกล่าวมาทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน ซึ่งจากการทดลองในห้องปฏิบัติการ พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มีความปลอดภัย เนื่องจากไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และทุกๆ ไอโซเลทไม่มีการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีนที่ทำให้เกิดโทษต่อร่างกายมนุษย์

ดังนั้นจึงได้คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจำนวน 6 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 แยกจากผักกาดขาว AR36 แยกจากสะตอดอง AR45 แยกจากแบ่งแดง AR52 แยกจากหนาง AR71 และ AR72 ซึ่งแยกจากปลาซั่ม ซึ่งทั้ง 6 ไอโซเลทมีความสามารถในการหมักได้ดี โดยให้เปอร์เซ็นต์กรดสูงกว่า 1% เมื่อเพาะเลี้ยงใน MRS broth ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และมีสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโพรไบโอติกที่ทดสอบในห้องปฏิบัติการ มาศึกษาประสิทธิภาพในการผลิตผลิตภัณฑ์ผักดองต่อไป

ซึ่งจากการศึกษาความสามารถในการหมักผักดองของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 ไอโซเลท โดยนำมาหมักกับผักดองที่ประกอบด้วย มะละกอก: แครอท: พริกชี้ฟ้าสีเขียวและสีแดง ที่ผสมในอัตราส่วน 30: 9: 1 ด้วยน้ำเกลือที่ประกอบด้วยเกลือ 5% และน้ำตาล 2.5% โดยใช้เชื้อปริมาณเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/ml หมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน พบว่าเมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ทำให้ค่าพีเอชและปริมาณน้ำตาลลดลง ส่วนจำนวนแบคทีเรียแลคติกจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นอยู่ระหว่าง 8.16-9.25 log CFU/ml ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อที่เหมาะสมสำหรับผลิตภัณฑ์โพรไบโอติก โดย Klaenhammer *et al.* (1999) ระบุไว้ว่าผลิตภัณฑ์โพรไบโอติกควรมีจำนวนเชื้อโพรไบโอติกอยู่ระหว่าง 10^6 - 10^8 CFU/ml และให้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาของ Rathore *et al.* (2012) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ธัญพืชหมัก มีจำนวนเชื้ออยู่ในช่วง 7.9-8.5 log CFU/ml เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์กรดแลคติกที่จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาในการหมัก ทั้งนี้เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกใช้น้ำตาลในน้ำดอง และน้ำตาลที่มีอยู่ในตัววัตถุดิบเป็นสารตั้งต้นในการสร้างกรดแลคติก และสร้างสารยับยั้งตัวอื่นๆ ส่งผลทำให้ค่าพีเอชของน้ำดองมีค่าลดลง มีความเป็นกรดเพิ่มขึ้น ส่งผลให้เปอร์เซ็นต์กรดแลคติกสูงขึ้น และเมื่อศึกษาความสามารถในการอยู่รอดของโพรไบโอติก

แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ผักดองในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน และอุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 วัน พบว่ามีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกไอโซเลทเหลือรอดมากกว่าหรือเท่ากับ 10^6 CFU/ml ซึ่งเป็นปริมาณเชื้อขั้นต่ำที่มีในผลิตภัณฑ์โปรไบโอติกที่จะก่อให้เกิดประโยชน์กับผู้บริโภค (Klaenhammer *et al.*, 1999) ซึ่งการอยู่รอดของแบคทีเรียแลคติกในระหว่างการเก็บรักษาจะแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งจากการศึกษาของ Yoon *et al.* (2006) พบว่าหลังการเก็บน้ำกะหล่ำปลีในอุณหภูมิตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส นาน 4 สัปดาห์ มีจำนวนเชื้อ *L. plantarum* 4.1×10^7 CFU/ml และ *L. delbrueckii* 4.5×10^5 CFU/ml แต่เชื้อ *L. casei* ไม่สามารถมีชีวิตรอดที่สภาวะการหมักที่มีค่าพีเอชต่ำและปริมาณกรดสูง ในขณะที่ Champagne *et al.* (2008) พบว่าการเก็บเครื่องดื่มน้ำผลไม้โปรไบโอติกไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 80 วัน เชื้อ *Lactobacillus brevis* LB6, *L. rhamnosus* LB24 และ *L. acidophilus* LB45 มีประสิทธิภาพในการอยู่รอดใกล้เคียงกับเชื้อ *L. fermentum* LB32, *L. reuteri* LB38 และ *L. plantarum* LB42 โดยที่ *L. rhamnosus* มีประสิทธิภาพการอยู่รอดในระหว่างการเก็บรักษาดีที่สุดใน โดยมีจำนวนเชื้อมากกว่า 10^7 CFU/ml เช่นเดียวกับ Mousavi *et al.* (2011) พบว่าน้ำทับทิมโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* และ *L. delbrueckii* เชื้อสามารถเจริญและอยู่รอดในระหว่างการเก็บรักษา 2 สัปดาห์ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ส่วน Pereira *et al.* (2011) พบว่าเมื่อเก็บน้ำมะม่วงหิมพานต์ที่หมักด้วย *Lactobacillus casei* NRRL B-442 ไว้ในตู้เย็นนาน 42 วันยังมีเชื้อเหลือรอดสูงกว่า $8.00 \log$ CFU/ml

จากการศึกษาประสิทธิภาพของน้ำผักดองที่หมักด้วยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก ในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella enterica* และ *Staphylococcus aureus* ATCC25923 ด้วยวิธี Agar well diffusion method และ Agar spot method พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกยังคงมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ดั้งเดิม โดยวิธี Agar well diffusion method จะแสดงขนาดของวงใสการยับยั้งน้อยกว่าเมื่อเทียบกับวิธี Agar spot method เนื่องจากวิธีการ Agar spot method เป็นการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ และเชื้อยังคงมีชีวิตสามารถเจริญเติบโต สร้างสารยับยั้งต่างๆ ได้ ในขณะที่วิธี Agar well diffusion method ไม่มีเซลล์มีชีวิตของแบคทีเรียแลคติก มีเพียงสารละลายส่วนใสที่อาจมีสารยับยั้ง ซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น และปล่อยออกมา จึงอาจมีในปริมาณน้อย ทำให้แสดงประสิทธิภาพการยับยั้งเกิดขนาดวงใสการยับยั้งน้อยกว่าการเลี้ยงเชื้อในวิธี Agar spot method ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทที่ผ่านการคัดเลือกยังคงสามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้แม้นำไปหมักเป็นก่ำเชื้อในผลิตภัณฑ์ผักดอง

การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผักดองที่ผลิตได้ตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน คุณลักษณะของผักดองที่ดีคือ ต้องตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus* ในตัวอย่าง 1 กรัม ไม่มี *Escherichia coli* ในตัวอย่าง 1 กรัม โดยมีค่า MPN/g <3.0 มีจำนวนยีสต์และรา (CFU/g) น้อยกว่า 100 (CFU/g) และมีปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมดไม่เกิน 1×10^6 โคโลนีต่อกรัมของตัวอย่าง (CFU/g) ซึ่งเป็นตัวดัชนีชี้วัดว่าผลิตภัณฑ์ไม่มีการปนเปื้อนด้วยสิ่งสกปรก เช่น ดิน กรวด รวมถึงอุจจาระของมนุษย์และสัตว์เลื้อยคืบ แต่การตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาของผักดองในครั้งนี้จะไม่ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด เนื่องจากการหมักผักดองครั้งนี้มีการเติมกล้ำเชื้อโพรไบโอติกเริ่มต้นลงไปประมาณ 10^6 CFU/ml อยู่แล้ว ซึ่งจากการตรวจสอบครั้งนี้พบว่า ผักดองที่ผลิตได้ทุกตัวอย่างตรวจไม่พบ *S. aureus* และ *E. coli* ซึ่งนับว่าเป็นผลิตภัณฑ์มีลักษณะของผักดองที่ดีแสดงถึงการควบคุมสภาพการหมักได้ดีคือ จำกัดปริมาณออกซิเจน หรืออากาศให้น้อย และเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นในสภาวะที่มีการเติมน้ำตาลลงไป เพื่อเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับเชื้อ ส่งเสริมการเจริญของเชื้อแบคทีเรียแลคติกแล้วทำให้เกิดสารอินทรีย์ เช่น กรดแลคติก และกรดอะซิติก รวมทั้งเอทานอล ซึ่งผลจากสารประกอบเหล่านี้เป็นการถนอมอาหาร ทำให้ได้ผักดองที่มีรสชาติ กลิ่นที่น่ารับประทาน และความเป็นกรดที่เพิ่มขึ้น ทำให้ผักดองมีรสชาติเปรี้ยว ซึ่งมีปริมาณกรดแลคติกอยู่ในช่วง 0.72-1.08% และมีค่าพีเอชต่ำลง ซึ่งมีผลในการยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดี แต่สำหรับการตรวจปริมาณราและยีสต์ พบว่าในทุกชุดตัวอย่างไม่พบรา แต่หลายชุดตัวอย่างโดยเฉพาะเมื่อเก็บรักษาไว้มีปริมาณยีสต์เพิ่มมากขึ้นจนเกินจำนวนที่มาตรฐาน มผช. กำหนดไว้คือ ไม่เกิน 100 CFU/g ซึ่งการปนเปื้อนของยีสต์นับเป็นปัญหาสำคัญของผลิตภัณฑ์ผักดอง รวมทั้งน้ำหมักชีวภาพจากพืช (Kantachote *et al.*, 2005) ดังนั้นจึงได้ทดลองแยกยีสต์ที่พบในผักดองที่หมักได้ไปทดสอบการยับยั้ง โดยกล้ำเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท

เมื่อทดสอบการยับยั้งยีสต์ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ โดยวิธี dual culture overlay assay และวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน จากการทดสอบพบว่าวิธี dual culture overlay assay แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลท มี 4 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 AR36 AR45 และ AR72 ที่สามารถยับยั้งยีสต์ได้ โดยมีระดับการยับยั้งปานกลางมีขนาดของ Inhibition zone อยู่ระหว่าง 3.00-5.50 มิลลิเมตร และอีก 1 ไอโซเลทคือ AR71 ที่สามารถยับยั้งยีสต์ได้ โดยมีระดับการยับยั้งต่ำมีขนาดของ Inhibition zone อยู่ระหว่าง 2.50-2.75 มิลลิเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Prachyakij *et al.* (2007) ซึ่งพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมัก 72 ไอโซเลทมีกิจกรรมการยับยั้งยีสต์ที่ปนเปื้อนในน้ำหมักชีวภาพได้ด้วยวิธี dual culture overlay assay โดยมี 15 ไอโซเลทให้ผลการยับยั้งดีมาก โดยสามารถยับยั้ง *Rhodotorula* sp. และมีเพียง 3 ไอโซเลท ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* DW1, 3 และ 4 ที่ให้ผลการยับยั้งดีเด่น โดยมีขนาดของ

Inhibition zone คือ 3-10 mm, 3-10 mm และ >10 mm ตามลำดับ แม้การศึกษาการยับยั้งโดยวิธี dual culture overlay assay นั้นสามารถทำได้ง่ายใช้เป็นการทดสอบขั้นต้นได้ แต่การวัดส่วนใสขนาดของ Inhibition zone ทำได้ยาก และใช้ได้กับจุลินทรีย์ชนิดเดียวต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงยากต่อการเปรียบเทียบกับสายพันธุ์อื่นๆ และเมื่อทดสอบความสามารถในการยับยั้งยีสต์ด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกัน พบว่าสอดคล้องกับการทดลองด้วยวิธี dual culture overlay assay คือแบคทีเรียแลคติกที่ให้ผลการยับยั้งได้ดี คือแบคทีเรียแลคติกทั้ง 4 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 AR36 AR45 และ AR72 โดยแสดงผลเปอร์เซ็นต์การยับยั้งยีสต์ได้ในระดับสูงคือ 75.71% 64.79% 91.89% และ 77.36% ตามลำดับ ซึ่งความสามารถในการยับยั้งที่เกิดขึ้นอาจเนื่องจากการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติก ได้แก่ กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน และไดอะอะซิติก (Amnor *et al.*, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Savard (2002) ที่พบว่าสารยับยั้งที่กล้าเชื้อผสมแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* NK712, *P. acidilactici* และ *L. mesenteroides* BLAC สร้างขึ้น ได้แก่ กรดแลคติก กรดอะซิติก และกรดโพรปิโอนิก ในระหว่างการหมักน้ำผักรวม ซึ่งสามารถยับยั้งยีสต์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Saccharomyces bayanus* Y-43 และ *Saccharomyces unisporus* Y-42 ได้ ในขณะที่ Prachyakij *et al.* (2007) พบว่าการยับยั้งยีสต์ของแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus plantarum* strains DW1, 3 และ 4 ที่แยกจากน้ำหมักชีวภาพให้ผลการยับยั้งยีสต์ เช่น *Rhodotorula* sp., *Pichia* sp, *Hansenula* sp., *Saccharomyces* sp. และ *Candida* sp. ได้ดีเด่น โดยแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* DW3 สามารถผลิต antimicrobial compounds ได้แก่ organic acids และ phenyllactic acid (PLA)

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่ผ่านการคัดเลือกไปเทียบเคียงลำดับเบส โดย 16S rDNA sequencing analysis พบว่า 4 ไอโซเลทอยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* ได้แก่ AR36 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain NSN-5, AR52 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain DISSPA78, AR71 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain A045 และ AR72 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain KLF01 และอีก 2 ไอโซเลทอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus plantarum* ได้แก่ NS302 อยู่ในสกุล *Lactobacillus plantarum* strain T1D และ AR45 อยู่ในสกุล *Lactobacillus plantarum* strain K25 ซึ่งแบคทีเรียแลคติกเหล่านี้เป็นแบคทีเรียแลคติกที่พบอาศัยอยู่ในพืชผัก และอาหารหมักประเภทต่างๆ เช่น ในแหนม ไส้กรอก หรืออาหารหมักประเภทปลาจะพบ *L. plantarum* และ *L. brevis* (Swetwivathana *et al.*, 2009) ส่วนขนมจีนจะพบ *L. plantarum* (Oupathum *et al.*, 2009) ในขณะที่ Miyashita *et al.* (2012) ได้ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมักของไทย พบแบคทีเรียแลคติก 6 จินัส ได้แก่ *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* และ

Weissella โดยพบแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus fermentum* เป็นหลักในตัวอย่างอาหารประเภทพืชมัก เช่นเดียวกับ Maneerat (2000) ศึกษาแบคทีเรียแลคติกในอาหารหมักของไทย โดยสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 91 สายพันธุ์ พบว่าทั้งหมดอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* ส่วน Yang *et al.* (2010) ศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากเศษผักที่หมักเพื่อเป็นอาหารสัตว์ โดยแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 52 ไอโซเลท เมื่อนำมาวิเคราะห์ด้วย 16S rDNA gene sequence พบว่าเป็น *Lactobacillus plantarum* (34.6%) *Lactobacillus piscium* (7.7%) *Lactobacillus lactis* (9.6%) *Leuconostoc citreum* (13.5%) *Weissella soli* (19.2%) และ *Leuconostoc gelidum* (15.4%)

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผักดองชุดควบคุมที่หมักโดยไม่ใช้กล้าเชื้อ และผักดองที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus fermentum* AR72 ซึ่งมีอายุการหมัก 2 และ 3 วัน พบว่าผักดองชุด B ซึ่งเป็นผักดองที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus fermentum* AR72 อายุการหมัก 2 วัน ได้รับการยอมรับด้านสี รสชาติ ลักษณะเนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวมด้วยคะแนนมากที่สุด ด้วยมีรสเปรี้ยวอมหวาน ลักษณะเนื้อสัมผัสกรอบ มีสีของเนื้อผักเป็นไปตามธรรมชาติ และน้ำผักดองใส แต่คะแนนด้านกลิ่นได้รับการยอมรับน้อยกว่าผักดองชุดอื่น ทั้งนี้อาจเนื่องจากการหมักมีกลิ่นแอลกอฮอล์เล็กน้อยเพราะ *Lactobacillus fermentum* ที่ใช้เป็นกล้าเชื้อในการหมักเป็นแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม Heterofermentative ที่นอกจากจะหมักน้ำตาลให้กรดแลคติกแล้วยังได้กรดอะซิติก เอทิลแอลกอฮอล์ และคาร์บอนไดออกไซด์ แต่เมื่อวิเคราะห์ทางสถิติแล้วพบว่า การยอมรับทุกด้านในทุกชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) แต่ผักดองที่หมักโดยกล้าเชื้อ *Lactobacillus fermentum* AR72 อายุการหมัก 2 วัน มีข้อดีกว่าผักดองชุดอื่นๆ คือ มีจำนวนยีสต์ 100 CFU/g ซึ่งเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.1168/2549) ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นมีจำนวนยีสต์สูงกว่า 100 CFU/g คือ ชุดควบคุมอายุการหมัก 2 วัน มีจำนวนยีสต์ 7.0×10^2 CFU/g ดังนั้นผักดองดังกล่าวควรจะหมักโดยใช้กล้าเชื้อ และมีระยะเวลาการหมัก 2 วันจะดีที่สุด และควรศึกษาวิธีการหมักที่จะช่วยลดจำนวนยีสต์ในระหว่างการหมัก โดยอาจจะใช้วิธีการหมักตามวิธีของ (Kantachote and Charernjiratakul, 2008) ซึ่งเป็นวิธีการหมักน้ำหมักชีวภาพที่ทำให้อากาศเหลือน้อยตั้งแต่เริ่มต้นการหมัก ซึ่งอาจช่วยลดปัญหาการเพิ่มจำนวนของยีสต์

บทที่ 5

สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

จากการแยกแบคทีเรียแลคติกจากผักสด 19 ตัวอย่างสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกได้ 61 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ และแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากอาหารหมักอีก 48 ไอโซเลทรวม 109 ไอโซเลทไปทดสอบความสามารถในการเจริญ และการหมัก พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด มีการเจริญและการหมักได้ดีในอาหาร MRS broth โดยที่มีเปอร์เซ็นต์กรดมากกว่า 1% และเมื่อนำแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวไปทดสอบคุณสมบัติการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ ทดสอบการทนต่อสภาพเลียนแบบน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร ทดสอบการทนต่อเกลือน้ำดี ทดสอบการเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ทดสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง ทดสอบการต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ ทดสอบการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และทดสอบการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้ 6 ไอโซเลท ได้แก่ NS302 AR36 AR45 AR52 AR71 และ AR72 ซึ่งสามารถอยู่รอดในสภาพเลียนแบบกระเพาะอาหารที่มีพีเอช 3 และในเกลือน้ำดี 0.3% โดยมีจำนวนเชื้อเหลือรอดมากกว่า 10^6 CFU/ml สามารถเจริญได้ดีทั้งในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน โดยมีค่า OD ที่ 660 nm มากกว่า 1.0 สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ ได้แก่ *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25923 และ *Salmonella enterica* ได้มากกว่า 2 สายพันธุ์ โดยไอโซเลท NS302 AR45 AR52 และ AR71 มีความสามารถในการย่อยโปรตีน ในขณะที่ไอโซเลท AR36 และ AR72 มีความสามารถในการย่อยทั้งโปรตีนและแป้ง เมื่อทดสอบความต้านทานต่อยาปฏิชีวนะ พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์ ได้แก่ vancomycin (100%) ดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ kanamycin (83.33%), gentamycin (100%), streptomycin (100%) และดื้อต่อยาในกลุ่มยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์ ได้แก่ polymycin (100%) นอกจากนี้เชื้อมีความไวต่อการตอบสนองต่อยากลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน ได้แก่ chloramphenicol (83.33%) และ erythromycin (66.67%) แบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทไม่ย่อยสลายเม็ดเลือดแดง และไม่มีการสร้างสารไบโอเจนิคเอมีน ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสามารถในการนำไปใช้เป็นก้ำเชื้อ

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทไปทดสอบประสิทธิภาพในการผลิตผักดอง โดยผักที่ใช้ในการหมัก ได้แก่ มะละกอ แครอท พริกชี้ฟ้าสีเขียวสีแดง ในอัตราส่วน 30: 9: 1 ใช้เชื้อเริ่มต้นประมาณ 10^6 CFU/ml หมักที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 3 วัน พบว่าแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทสามารถหมักผักดองได้ดี มีจำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกอยู่ในช่วง $8.16-9.25 \log$ CFU/ml มีเปอร์เซ็นต์กรดอยู่ในช่วง 0.72-1.08% โดยไอโซเลท NS302 มีเปอร์เซ็นต์กรดสูงสุดคือ 1.08% รองลงมาคือไอโซเลท AR45 และ AR72 ที่มีเปอร์เซ็นต์กรด 0.99% และค่าพีเอชของน้ำหมักอยู่ในช่วง 3.31-3.61 โดยโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท AR45 มีค่าพีเอชต่ำสุดคือ 3.31 หลังการหมักพบว่าทุกๆ ไอโซเลทมีปริมาณน้ำตาลลดลงอยู่ในช่วง 1.03-1.50 โดยการหมักด้วยไอโซเลท AR72 มีปริมาณน้ำตาลต่ำสุดคือ 1.03 กรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าที่การหมัก 72 ชั่วโมงด้วยเชื้อแบคทีเรียแลคติกทุกๆ ไอโซเลทมีปริมาณเชื้อและปริมาณกรดมากกว่าชุดควบคุม มีค่าพีเอชต่ำกว่าชุดควบคุมในการหมักด้วยไอโซเลท NS302 AR45 AR52 และ AR71

เมื่อทดสอบความสามารถในการอยู่รอดของเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (30 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 5 วัน และอุณหภูมิตู้เย็น (6 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 วัน เชื้อทั้ง 6 ไอโซเลทยังมีจำนวนเชื้อสูงกว่า 10^6 CFU/ml และเมื่อตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.1168/2549) ของผักดองที่ผลิตได้ พบว่าในทุกชุดการทดลองตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* แต่เมื่อเก็บไว้นานขึ้นจะมีจำนวนยีสต์สูงกว่าเกณฑ์ของ มผช. ที่กำหนดไว้ไม่เกิน 100 CFU/g ซึ่งหากในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืชส่วนใหญ่ มักพบจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย อาจเกิดจากฟิล์มยีสต์ หรือฝ้าขาวที่ผู้บริโภคไม่ยอมรับ ดังนั้นหากเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่ใช้เป็นก้ำเชื้อมีความสามารถในการยับยั้งฟิล์มยีสต์ได้จะช่วยลดการเน่าเสียของอาหารหมัก จึงได้ทดสอบความสามารถในการยับยั้งฟิล์มยีสต์ที่แยกได้จากผักดองที่หมักได้ของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ 6 ไอโซเลท พบว่าเชื้อสามารถให้ผลการยับยั้งฟิล์มยีสต์ได้ดีคือเชื้อแบคทีเรียแลคติกดังกล่าว แสดงผลการยับยั้งฟิล์มยีสต์ที่เกิดในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืช (ผักดอง) โดยวิธี dual culture overlay assay ให้ผลการยับยั้งปานกลางมีขนาดของ Inhibition zone อยู่ระหว่าง 3.25-5.50 มิลลิเมตร และโดยวิธีการเพาะเลี้ยงร่วมกันไอโซเลท AR45 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%) ที่สูงสุดคือ 91.89% รองลงมาคือไอโซเลท AR72 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง (%) คือ 77.36%

และเมื่อทำการบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ทั้ง 6 ไอโซเลทไปเทียบเคียงลำดับเบสโดย 16S rRNA gene พบว่า 4 ไอโซเลทอยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* ได้แก่ AR36 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain NSN-5 มีค่า %

similarity เท่ากับ 99% AR52 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain DISSPA78 มีค่า % similarity เท่ากับ 99% AR71 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain A045 มีค่า % similarity เท่ากับ 100% และ AR72 อยู่ในสกุล *Lactobacillus fermentum* strain KLF01 มีค่า % similarity เท่ากับ 99% และ 2 ไอโซเลทอยู่ในกลุ่ม *Lactobacillus plantarum* ได้แก่ NS302 อยู่ในสกุล *Lactobacillus plantarum* strain T1D มีค่า % similarity เท่ากับ 99% และ AR45 อยู่ในสกุล *Lactobacillus plantarum* strain K25 มีค่า % similarity เท่ากับ 100%

คัดเลือกแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus fermentum* AR72 เพื่อนำไปใช้เติมเป็น กล้าเชื้อ (starter culture) สำหรับการผลิตผลิตภัณฑ์ผักดองที่จะใช้ในการทดสอบทางประสาทสัมผัสต่อไป เนื่องจาก ไอโซเลท AR72 มีความสามารถในการเจริญ และการหมักที่ดี โดยให้เปอร์เซ็นต์กรดสูง มีสมบัติเบื้องต้นในการเป็นโปรไบโอติกในระดับห้องปฏิบัติการ สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ได้ 3 สายพันธุ์ สามารถย่อยโปรตีนและแป้งได้ ไม่มีการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง ไม่มีการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน และสามารถยับยั้งยีสต์ได้ โดยมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูง

จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสของผักดองชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมกล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก และผักดองที่หมักโดยใช้กล้าเชื้อ *Lactobacillus fermentum* AR72 อายุการหมัก 2 และ 3 วัน ที่อุณหภูมิห้อง พบว่าการยอมรับทางด้านกลิ่น สี รสชาติ เนื้อสัมผัส และการยอมรับโดยรวมของทุกชุดการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่เมื่อตรวจสอบคุณภาพทางจุลชีววิทยาตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน (มผช.1168/2549) พบว่าทุกชุดการทดลองตรวจไม่พบ *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* โดยมีเฉพาะผักดองที่หมักด้วย *Lactobacillus fermentum* AR72 อายุการหมัก 2 วัน ที่มีจำนวนยีสต์ไม่เกิน 100 CFU/g ในขณะที่ชุดการทดลองอื่นๆ มีจำนวนยีสต์สูงกว่าเกณฑ์มาตรฐานที่ มผช.1168/2549 กำหนดไว้ ดังนั้นจึงควรที่จะได้ศึกษาวิธีการหมักที่จะช่วยลดการเจริญของยีสต์ต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาระดับที่เหมาะสมของปริมาณเกลือ และปริมาณน้ำตาลที่ผสมในน้ำเกลือ เพื่อรสชาติที่เป็นที่ยอมรับสำหรับผู้บริโภคมากขึ้น
2. ควรมีการศึกษาการเก็บเชื้อ *L. fermentum* AR72 ในรูปเชื้อแห้ง เพื่อประโยชน์ในการใช้งานที่สะดวกขึ้น
3. ควรเพิ่มปริมาณกล้าเชื้อเริ่มต้น (CFU/ml) ที่ใช้ในการหมัก เพื่อให้สามารถหมักได้เร็ว และมีปริมาณกรดเพิ่มขึ้น อีกทั้งเชื้อสามารถอยู่รอดได้ในปริมาณที่เพียงพอที่จะเกิดประโยชน์ต่อผู้บริโภคในระหว่างการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ผักดอง
4. ควรทดสอบทางประสาทสัมผัสของผักดองที่หมักโดยแบคทีเรียแลคติกอีก 5 ไอโซเลทที่เหลือ และเลือกกล้าเชื้อที่ได้รับการยอมรับสูงมาทดลองหมักผักดองแบบเชื้อผสมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- กิจการ ศุภมาตย์. 2544. การฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่องจุลินทรีย์กับการเพาะเลี้ยงกุ้งกุลาดำ วันที่ 25-26 ส.ค. 2544. สงขลา: ศูนย์วิจัยสุขภาพสัตว์น้ำ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา.
- ดวงพร คันธโชติ วิลาวณิชย์ เจริญจิระตระกูล และณรงค์ฤทธิ์ อัครเรืองภิกพ. 2547. ลักษณะน้ำหมักชีวภาพจากพืชในภาคใต้ของประเทศไทยและผลการยับยั้งเชื้อก่อโรคของระบบทางเดินอาหาร. สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ปทุมธานี. หน้า. 141-143.
- ทัศนีย์ เชื้อทอง. 2539. โพรไบโอติก. รายงานประกอบวิชา Advanced in Regulation and Control of Microbial Synthesis. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 68.
- นวลจันทร์ พารักษา. 2533. สารความรู้เกี่ยวกับโพรไบโอติก. สุกรสารสน. 16(53): 6-13.
- ประเสริฐ สันตินานาเลิศ ชาศรียา ฉลาด สิริพร ภูมะธน สุวรรณิ แสงแก้ว และอำไพทิพย์ สุขหอม. 2548. จุลชีววิทยาของเต่าหัวที่หมักแบบดั้งเดิม. วารสารสงขลานครินทร์ วทท. 7(2): 263-375.
- พิเชษฐ์ สุวรรณิ. 2548. การผลิตกรดแลกติกจากโคตินโดยเซลล์ตรึงแบคทีเรียกรดแลกติก. ปริญญา นิพนธ์ วท.ม. (ชีววิทยา). เชียงใหม่: บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- วิเชียร สีลาว์ชรรมาศ. 2534. อาหารจากแลกติกแอสิดแบคทีเรียในประเทศไทย. โพรซีดดิ้งส์แลกติกแอสิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย. ครั้งที่ 1. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน.
- วิเชียร สีลาว์ชรรมาศ. 2541. การคัดเลือกจุลินทรีย์เพื่อใช้เป็นโพรไบโอติก. วารสารจารย์พา. (45) พฤศจิกายน-ธันวาคม.
- วิเชียร สีลาว์ชรรมาศ. 2541. โพรไบโอติกอาหารสุขภาพสำหรับมนุษย์และสัตว์ (ตอนที่ 1). จารย์พา 41: 50-51.
- วิลาวณิชย์ เจริญจิระตระกูล. 2539. จุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้านอาหาร. อุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. หน้า 63-164.
- วิลาวณิชย์ เจริญจิระตระกูล และอุบลวรรณ รอดประดิษฐ์. 2540. การแยกเชื้อ คัดเชื้อและเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 19(2): 181-188.

- สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ฝ่ายเทคโนโลยีอาหาร. โครงการเพิ่มคุณค่าทางอาหาร และความปลอดภัยอาหารแปรรูปไทยสู่ระดับสากล พ.ศ. 2556. เข้าถึงได้จาก: http://www.tistr-foodprocess.net/vegetable_pickle.html (วันที่สืบค้น 8 พฤษภาคม 2557)
- อัจฉรา ลามมาก. 2541. ผลการยับยั้งของแลคติกแอซิดแบคทีเรียที่เจริญดีที่อุณหภูมิสูงต่อการเจริญของ *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* และ *Vibio parahaemolyticus*. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- อุทัย แก้วเอี่ยม. 2549. โปรไบโอติกส์. บทความปริทัศน์. สงขลานครินทร์เวชสารโปรไบโอติกส์. ปีที่ 24. ฉบับที่ 4. ก.ค.-ส.ค. 2549. หน้า 315-325.
- อุทัย คันโธ. 2535. หลักการโปรไบโอติกเชิงอาหารสัตว์. ว.สุกรสาสน์. เม.ย.-มิ.ย. 11-16.
- Adam, M.R. and M.O. Moss. 1995. Food Microbiology. The Royal Society of Chemistry. Cambridge: pp. 232-248.
- Agrawal, R. 2005. Probiotic: An emerging food supplement with health benefits. Food Biotechnol. 19: 227-246.
- Aguirre, M. & Collins, M.D. 1992. Phylogenetic Analysis of Some *Aerococcus*-like Organism of Urinary Tract Infections: Description of *Aerococcus urinae* sp. nov. Journal of General Microbiology. 138: 401-405.
- Alam, M., Midtvedt, T., Uribe, A. 1994. Differential cell kinetics in the ileum and colon of germfree rats. Scand J. Gastroenterol. 29: 445-51.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dofour, E. and Chevalier, I. 2006. Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility: 1. Screening and characterization of the antibacterial compounds. Food Control. 17: 454-461.
- Anadon, A., M.R.M. Larranaga and M.A. Martinez. 2006. Probiotics for animal nutrition in the European Union Regulation and Safety assessment. Regul. Toxicol. Pharm. 45: 91-95.
- AOAC. 1990. Official Method of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists 15th Ed. The Association of Official Analytical Chemists: Virginia.

- Argyri, A.A., Zoumpopoulou, G., Karatzas, K.G., Tsakalidou, E., Nychas, G.E., Panagou, E.Z., Tassou, C.C. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiology*. 33: 282-291.
- Austin, B., L.F. Stuckey, D.A.W. Robertson, I. Effendi And D.R.W. Griffith. 1995. A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J. Fish disc.* 18: 93-96.
- Axelsson, L.T. 1993. Lactic acid bacteria: Classification and physiology. In: Lactic acid bacteria, Ed. Salminen, S., Ed. Von Wright, A., New York: Marcel Dekker. pp. 1-64.
- Axelsson, L.T. 1998. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, Inc. New York. P. 1-72.
- Axelsson, M., Farrell, A.P. and Nilsson, S. 1990. Effect of hypoxia and drugs on the cardiovascular dynamics of the Atlantic hagfish, *Myxine glutinosa*. *J. Exp. Biol.* 151: 297-316.
- BAM. 2002. Food and Drug Administration Bacteriological Analytical Manual. 8th ed., AOAC International. USA.
- Bengmark, S. 1998. Ecological control of the gastrointestinal tract. The role of probiotic flora *Gut*. 42: 2-7.
- Bengmark, S. 2000. Colonic food: pre-and probiotics. *Am J. Gastroenterol.* 95 (Suppl): S5-S7.
- Bengmark, S. 2000. Prospect for a new and rediscovered form of therapy: Probiotics and phage. In: Fighting infection (Eds.: Andrew, P.W., Oystrom, P., Smith, G.L., and StewardTull, D.E.). Blackwells, London, pp. 97-132.
- Bielecka, Maria. 2007. Probiotic in food. Edited by Sikorski, Zozislaw, E. In Chemical and function properties of food component. 3rd ed. Florida. CRC Press. p. 413-426.

- Blana, V.A., Grounta, A., Tassou, C.C., John, G., Nychas, E., Panagou, E.Z. 2014. Inoculated fermentation of green olives with potential probiotic *Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* starter cultures isolated from industrially fermented olives. *Food Microbiology*. 38: 208-218.
- Bover-Cid, Holzapfel. 1999. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology*. 53: 33-41.
- Carmen, A., Rodriguez, O., Calo-Malta, P., Prado, M., Barros-Velazquez, J. 2006. Preliminary characterization of bacteriocins from *Lactococcus lactis*, *Enterococcus faecium* and *Enterococcus mundtii* strains isolated from turbot (*Psetta maxima*). *Food Research International*. 39: 356-364.
- Cagno, R.D., Surico R.F., Angelis M.D. 2008. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*. 127: 220–228.
- Cebeci, A., Gurakan, C. 2003. Properties of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* strains. *Food Microbiology*. 20: 511-8.
- Champagne, C.P., & Gardner, N.J. 2008. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*. 41: 539-543.
- Charalampopoulos, D., Pandiella, S.S. 2010. Survival of human derived *Lactobacillus plantarum* in fermented cereal extracts during refrigerated storage. *LWT-Food Science and Technology*. 43: 431-435.
- Charenjitrakul, W., Kantachote, D. and Vuddhakul, V. 2007. Probiotic lactic acid bacteria for applications in vegetarian food products. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29(4): 981-991.
- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L., Collins, J.K. 1998. Development and application of an *in vivo* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*. 84: 759-68.

- Charteris, W.P., Kelly, P.M., Morelli, L. and Collins, J.K. 1998. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. of Food Prot.* 61(2): 1636-1643.
- Chen, A., & Mustapha, A. 2012. Survival of freeze-dried microcapsules of α -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food Microbiology.* 30: 68-73.
- Choudhury, N., Hansen, W., Engesser, D., Hammes, W.P., Holzapfel, W.H. 1990. Formation of histamine and tyramine by lactic acid bacteria in decarboxylase medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 11: 278-281.
- Coda, R., Lanera, A., Trani, A., Gobetti, M., & Dicagno, R. 2012. Yogurt-like beverages made of a mixture of cereals, soy and grape must: Microbiology, texture, nutritional and sensory properties. *International Journal of Food Microbiology.* 155: 120-127.
- Daniel, J. 2006. Primary sources of probiotic cultures. Edited by Ahmedna, Mohamed., Goktepe, Ipek. And Juneja, Vijay, K. 2006. In *Probiotics in food safety and human health.* Florida. CRC Press. p. 91-108.
- Dasechel, M.A. and Klaenhammer, T.R. 1989. Association of a 13.6 megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiology.* 50: 1538-1541.
- De-Bellis, P., Valrio, F., Sisto, A., Lonigro, S.L., & Lavermicocca, P. 2010. Probiotic table olives: Microbial populations on olives surface in fermentation sets inoculated with the probiotic strain *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 in a industrial plant. *International Journal of Food Microbiology.* 140: 6-13.
- Dellaglio, F., Dick, L.M.T.; & Torriani, S.1995. The Genus *Leconostoc*. In: Wood B.J.B.; Holzapfel, W.H. (Eds.). *The Genera of Lactic Acid Bacteria.* 2nd Ed. London: Blackie Academic & Professional. pp. 235-278.
- De Man Rogosa, J.C., Shape, M.E., 1960. A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J.Appl.Bacteriol.* 23: 130-135.

- Di Cagno, R., Surico, R.F., Siragusa, S., De Angelis, M., Paradiso, A., Minervini, F., De Gara, L., Gobbetti, M. 2008. Selection and use of autochthonous mixed starter for lactic acid fermentation of carrots, French beans or marrows. *International Journal of Food Microbiology*. 127: 220-228.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C.G., Angelis, M.D., Gobbetti, M. 2011. Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*. 28: 1062-1071.
- Duangjitcharoen, Y., Kantachote, D., Ongsakul, M., Poosaran., N., Chaiyasut, C. 2009. Potential use of probiotic *Lactobacillus plantarum* SS2 isolated from a fermented plant beverage: safety assessment and persistence in the murine gastrointestinal tract. *World J. Microbiology Biotechnol.* 25: 315-321.
- Dubios, M., Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Roberts, D.A., Smith, F. 1956. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry*. 28: 350-356.
- Erkkila, S. and Petaja, E. 2000. Screening of commercial meat starter cultures at low pH in the presence of bile salts for potential probiotic use. *J. Meat Science*. 55: 297-300.
- FAO/WHO. 2001. Evaluation of Health and Nutritional Properties of probiotic in Food including Power Milk with Live Lactic Acid Bacteria.
- Filannino, P., Azzi, L., Cavoski, I., Vincentini, O., Rizzello, C.G., Gobbetti, M., Di Cagno, R. 2013. Exploitation of the health-promoting and sensory properties of organic pomegranate (*Punica granatum* L.) juice through lactic acid fermentation. *International Journal of Food Microbiology*. 163: 184-192.
- Foentaine, E.A., E. Claydon and D. Tayler-Robinson. 1996. Lactobacilli from women with or without bacterial vaginosis and observations on the significance of hydrogen peroxide. *Microb. Ecol. Health Dis.* 9: 135-141.
- Franz, C.M.A.P., W.H. Holzapfel and M.E. Styles. 1999. Enterococci at the crossroads of food safety. *Int. J. Food Microbiology*. 47: 1-24.

- Fuller, R. 1993. Probiotic food current use and future developments. *Int. Food Inged.* 3: 23-26.
- Fuller, R. 1989. Probiotic in man and animal. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 365-378.
- Gallego, J.B., Lopez, F.N.A., Rantsiou, K., Jimenez-Diaz, R., Fernandez, A.G., Cocolin, L. 2013. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented table olives with probiotic potential. *Food Research International.* 50: 135-142.
- Garbutt, J. H. 1997. *Essentials of food microbiology.* Int. Food Microbiology. Arnold, London. p. 251.
- Gardner, J.N., Savard, T., Obermeier, P., Caldwell, G. and Champagne, P.C. 2001. Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. J. Food Microbiol.* 64(3): 261-275.
- Gilliland, S.E. 1977. Enumeration and identity of lactobacilli in dietary products. *J. Food Prot.* 40: 760-762.
- Gilliland, S.E. 1979. Beneficial interrelations between certain microorganisms and humans: Candidate microorganisms for use as dietary adjuncts. *J. Food Prot.* 41: 164-167.
- Gilliland, S.E. and M. L. Speck. 1984. Importance of bile tolerance of *Lactobacillus acidophilus* used as dietary adjunct. *J. Dairy Sci.* 67: 3045-3051.
- Gonzalez and S.T. Williams. 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37: 189-216.
- Guarner, F., Malagelada, J-R. 2003. Gut flora in health and disease. 361: 512-9.
- Hardie, J.M. & Whilry, R.A. 1995. The Genus *Streptococcus*. In: Wood, B.J.B. & Holzapfel, W.H. *The Genera of Lactic Acid Bacteria.* 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional. pp. 55-124.
- Hector, R., Jose, A.C., Landete, J.M., Rivas, B.D. 2009. Food phenolics and lactic acid bacteria. *International Journal of Food Microbiology.* 132: 79-90.
- Helander, I.M., Wright, A.V. and Wattial-sandholm, T.M. 1997. Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. *Trends Food Sci. Technol.* 8: 146-150.

- Hertzler, S.R., Clancy, S.M. 2003. Kefir improves lactose digestion and tolerance in adults with lactose mal-digestion. *Journal of the American Dietetic Association*. 103: 582-587.
- Hiraga, K., Ueno, Y. and Oda, K. 2008. Glutamate decarboxylase from *Lactobacillus brevis*: activation by ammonium sulfate. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*. 72: 1299-1306.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath, P.H.A., Staley, J.T. and Williams, S.T. 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th ed. Baltimore, MD: Williams and Williams.
- Holzappel, W.H. 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiology*. 75: 197-212.
- Holzappel, W.H. 1997. Use of starter cultures in fermentation on a household scale. *Food Control*. 8: 241-258.
- Holzappel, W.H., P. Haberer, J. Snel, U. Schillinger and J. Huis. 1998. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiology*. 41: 85-101.
- Hsu, C.A., Yu, R.C., Chou, C.C. 2005. Production of β -galactosidase by *Bifidobacteria* as influenced by various culture conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 104: 197-206.
- Hurtado, A., Reguant, C., Bordons, A., & Rozes, N. 2012. Lactic acid bacteria from fermented table olives. *Food Microbiology*. 31: 1-8.
- Hwanhlem, N., Buradaleng, S., Wattanachant, S., Benjakul, S. 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish (*Plasom*) and production of *Plasom* from selected strains. *Food Control*. 22: 401-407.
- Isolauri, E., Juntunen, M., Rautanen, T., Sillanauke, P., Koivula, T. 1991. A human *Lactobacillus* strain (*Lactobacillus* GG) promotes recovery from acute diarrhea in children. *Pediatrics*. 88: 90-7.
- Jay, J.M. 1986. *Modern Food Microbiology*. New York: Van Nostrand Reinhold.

- Jin, L.Z., Y.W. Ho, M.A. Ali, N. Abdullah, K.B. Ong and S. Jalaludin. 1998. Effects of adherent effects of intestinal *Lactobacillus* culture on growth weight of organs and intestinal microflora and volatile fatty acids in broilers. *Animal Feed Sci. Tech.* 70: 197-209.
- Jin, Y., W.B. Rossow, and D.P. Wylie. 1996. Comparison of the climatologies of high-level clouds from HIRS and ISCCP. *J. Climate*, 9, 2850-2854, doi: 10.1175/1520-0442.
- Joosten, H.M.L.J., Northold, M.D., 1989. Detection, growth and amine-producing capacity of lactobacilli in cheese. *Applied Environmental Microbiology*. 55: 2356–2359.
- Kantachote, D., W. Charernjiratrakul and N. Ausawariangpipop. 2005. Characteristics of fermented plant beverages in South Thailand. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 27(3): 601-615.
- Kantachote, D., M. Ongsakol, W. Charernjiratakul, C. Chaiyasut and N. Poosaran. 2005. Fermented plant beverages and their application. In: *Proceedings of the 1st International Conference on Natural Products for Health and Beauty from Local Wisdom to Global Marketplace*. 17-21 October, MahaSarakham, Thailand.
- Kantachote, D. and Charernjiratakul, W. 2008. Effects of Initial Air Removal Methods on Microorganisms and Characteristics of Fermented Plant Beverages. *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 11(2): 173-180.
- Kazemipoor, M., Jasimah, C.W., Begum, K., Yaze, I. 2012. Screening of antibacterial activity of lactic acid bacteria isolated from fermented vegetables against food born pathogens. *Archives Des Sciences*. Vol.65. No.6.
- Klaenhammer, T.R. and Kullen, M.J. 1999. Selection and design of probiotics. *International Journal of food Microbiology*. 50: 45-57.
- Kohajdova, Z. and Karovicova, J. 2003. Sensory and Chemical Evaluation of Lactic Acid-Fermented Cabbage-Onion Juices. *Chemical and Food Technology*. 59: 55-61.

- Kohajdova, Z. and Karovicova, J., Greifova, M. 2006. Lactic acid fermentation of some vegetable juices. *Journal of Food and Nutrition Research*. Vol.45. No. 3. P: 115-119.
- Kontula, P., Jaskali, J., Nollet, L., Smet, I.D., Wright, A.V., Poutanan, K. and Sandholm, T.M. 1998. The colonization of a simulator of the human intestinal microbial ecosystem by a probiotic strain feed on fermentated oat bran product effect on gastrointestinal microbiota. *J. Appl Microbiol Biotechnol*. 50: 246-252.
- Kourkoutas, Y., Kanellaki, M., Koutinas, A.A. 2006. Apple pieces as immobilization support of various microorganism. *LWT-Food Science and Technology*. 39: 980-986.
- Lawless, H. T. and Heymann, H. 1999. *Sensory Evaluation of Food*. 1st ed. Aspen Publishers, Inc. Maryland.
- Lawson, P.A. 2007. *Vagococcus elongates* sp. nov., Isolated from a Swine-manure Storage Pit. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*.
- Lee, D.J., Drongowski, R.A., Coran, A.G., Harmon, C.M. 2000. Evaluation of probiotic treatment in a neonatal animal model. *Pediatr Surg. Int*.16: 237–242.
- Lee, H., Hongsup, Y., Ji, Y., Kim, H., Park, H., Lee, H.S., Holzapfel, W. 2011. Functional properties of *Lactobacillus* strains isolated from kimchi. *International Journal of Food Microbiology*. 145: 155-161.
- Lee, J.Y., Kim, C.J., Kunz, B. 2006. Identification of lactic acid bacteria isolated from kimchi and studies on their suitability for application as starter culture in the production of fermented sausages. *Meat Sci*. 72: 437–445.
- Lee, J., Yun, H.S., Cho, K.W., Oh, S., Kim, S.H., Chun, T. 2011. Evaluation of probiotic characteristics of newly isolated *Lactobacillus* spp.: Immune modulation and longevity. *International Journal of Food Microbiology*. 148: 80-86.
- Lee, Y.K. and Salminen, S. 1995. The coming of age of probiotic. *Trends. Food Sci. Tech*. 6: 241-245.

- Leroy, F. and de Vuyst, L. 2004. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Tech.* 15: 67-78.
- Lilly and Stillwell. 1965. Probiotic: growth promoting factors produced by microorganism. *J. of Food. Prot.* 59(1): 41-45.
- Lin, H.C., Su, B.H., Chen, A.C., Lin, T.W., Tsai, C.H., Yeh, T.F. 2005. Oral probiotics reduce the incidence and severity of necrotizing enterocolitis in very low birth weight infants. *Pediatrics.* 115: 1-4.
- Lin, W.H., B. Yu, S.H. Jang and H.Y. Tsen. 2007. Different probiotic properties for *Lactobacillus fermentum* strains isolated from swine and poultry. *Anaerobe.* 13: 107-113.
- Lindgren, S.E. and W.J. Dobrogosz. 1990. Antagonistic activities of lactic acid bacteria in food and feed fermentations. *FEMS Microbiol. Rev.* 87: 149-163.
- Liong, M.T., Shah, N.P. 2005. Acid and bile tolerance and cholesterol removal ability of lactobacilli strain. *J. Dairy Sci.* 88: 55-66.
- Magnusson, J., Strom, K., S., Sjogren, J. and Schnurer, J. 2003. Broad and complex antifungal activity among environmental isolates of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters.* 219: 129-135.
- Maneerat, S. 2000. Exopolysaccharide from Lactic Acid Bacteria. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 22: 397-402.
- Martins, E.M.F., Ramos, A.M., Vanzela, E.S.L., Stringhela, P.C., Pinto, D.L., Martins, J.M. 2013. Product of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International.* 51: 746-770.
- Meilgaard, M., Civille, G. V. and Carr, B. T. 1999. *Sensory Evaluation Techniques.* 3rd ed. CRC Press LLC. Florida.
- Michael, J. and Pelezar, J. 1995. Hydrolysis of polysaccharide protein and lipid. In. *Laboratory exercises in microbiology.* New York: MC GrawHill. p.126-188.
- Michiel, Kleerebezem, Willem, M., Carlos, C. 2003. The prophage sequences of *Lactobacillus plantarum* strain WCFS1. *Virology.* Volume 316. Issue 2. 25: 245-255.

- Mitidieri, S., Martinelli, A. H. S., Schrank, A. and Vainstein, M. H. 2006. Enzymatic detergent formulation containing amylase from *Aspergillus niger*: A comparative study with commercial detergent formulation. *Bioresource Technol.* 97: 1217-1224.
- Miyashita, M., Yukphan, P., Chaipitakchonlatarm, W., Malimas, T., Sugimoto, M., Yoshino, M., Potacharaen, W., Tanasupawat, S., Nakagawa, Y., Kiritikara, K., Tanticharaen, M., Suzuki, K.I. 2012. 16s rDNA gene sequence analysis of lactic acid bacteria isolated from fermented foods in Thailand. *Microbiol. Cult. Coll.* 28 (1): 1-9.
- Moeller, V., 1954. Distribution of amino acid decarboxylase in Enterobacteriaceae. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 35: 259-277.
- Motarjemi, Y. and Nout, M.J.R. 1996. Food fermentation, a safety and nutritional assessment. B. World Health Organization. 74: 553-559.
- Mousavi, Z.E., Mousavi, S.M., Razavi, S.H, Emam-Djomeh, Z., & Kiani, H. 2011. Fermentation of pomegranate juice by lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* 27: 123-128.
- Muchoki, N.C., Imungi, J.K. and Lamuka, P.O. 2007. Changes in Beta-Carotene, Ascorbic Acid and Sensory Properties in Fermented, Solar-Dried and Stored Cowpea Leaf Vegetables. *African Journal of Food Agriculture Nutrition and Development.* Vol. 7. No. 3.
- Mugula, J.K., Narvhus, J.A. and Sorhaug, T. 2003. Use of starter cultures of lactic acid bacteria and yeasts in the preparation of togwa, a Tanzanian fermented food. *Int. J. Food Microbiology.* 83: 307-318.
- Niven, C.F., Jeffery, M.R., Corlett, D.A., 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine producing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 321-322.
- Nualkaekul, S. & Charalampopoulos, D. 2011. Survival of *Lactobacillus plantarum* in modle solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology.* 146: 111-117.

- Oberhelman, R.A., Gilman, R.H., Sheen, P., Taylor, D.N., Black, R.E., Cabrera, L. 1999. A placebo-controlled trial of *Lactobacillus* GG to prevent diarrhea in undernourished Peruvian children. *J Pediatr.* 134: 15-20.
- Ohmono, S., Y. Tozawa and K. Ueda. 1983. Biotransformation of D-Arabitol to D-Xylose by *Gluconobacter suboxydans* immobilized within k-carrageenan. *J. Ferment. Technol.*, 61: 373-378.
- Ohmomo, S., Kobayashi, M., Yajima, M., Budka, P., Suyanandana, P. and Somchai, P. 1998. Screening of thermophilic lactic acid bacteria producing bacteriocins in the Tropics. *Japan Agricultural Research Quarterly.* 33: 125-131.
- Olasupo, N.A., Schillinger, U., Holzappel, W.H. 2001. Studies on some technological properties of predominant lactic acid bacteria isolated from Nigerian fermented foods. *Food Biotechnol.* 15(3): 157-167.
- Orla-Jensen, S. 1919. The lactic acid bacteria. E. Munksgaard, Kobenhavn.
- O'Sullivan, Daniel, J. 2006. Primary sources of probiotic cultures. Edited by Ahmedna, Mohamed., Goktepe, Ipek., and Juneja, Vijay, K. In *Probiotic in food safety and human health.* Florida: CRC Press. p. 91-108.
- Oupathum, O., Chantarapanont, W., Suwonsichon, T., Haruthaithanasan, V. and Chompreede, P. 2009. Screening Lactic acid bacteria for improving the Kanom-jeen process. *Kasetsart J. (Nat. Sci.).* 43: 557-565.
- Oupathumpanont, O., Chantarapanont, W., Suwonsichon, T., Haruthaithanasan, V. and Chompreeda, P. 2009. Screening Lactic Acid Bacteria for Improving the Kanom-jeen Process. *Kasetsart. J. Nat. Sci.* 43: 557-565.
- Ouwehand, A.C. and Vesterlund, S. 2004. Antimicrobial components from lactic acid bacteria. In: Salminen, S., Von Wright, A. and Ouwehand, A. Editors, *Lactic Acid Bacteria- Microbiology and Functional Aspects.* Marcel Dekker, Inc. New York. pp. 375-395.
- Pereira, A.L.F., Tatiane, C., Maciel, S. 2011. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International.* 44: 1276-1283.

- Podolak, P.K., Zayas, J.F., Kastner, C.L. and Fung, D.Y.C. 1996. Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157: H7 on beef by application of organic acids. *J. Food Protect.* 59: 370-373.
- Pothoulakis, C., Kelly, C.P., Joshi, M.A., Gao, N., O'Keane, C.J., Castagliuolo, I. 1993. *Saccharomyces boulardii* inhibits *Clostridium difficile* toxin A binding and enterotoxicity in rat ileum. *Gastroenterology.* 104: 1108-15.
- Prachyakij, P., J. Schnurer, W. Chareunjiratrakul and D. Kantachote 2007. Selection and identification of lactic acid bacteria that inhibit yeast contaminants isolated from fermented plant beverages. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 29: 211-218.
- Ranadheera, R.D.C.S., Baines, S.K. & Adams, M.C. 2010. Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International.* 43: 1-7.
- Rathore, S., Salmeron, I., Pandiella, S. 2012. Probiotic of potentially probiotic beverages using single and mixed cereal substrates fermented with lactic acid bacteria cultures. *Food Microbiology.* 30: 239-244.
- Saad, N., Delattre, C., Urdaci, M., Schmitter, J.M., Bressollier, P. 2013. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. *Food science and Technology.* 50: 1-16.
- Savard, T., Beaulieu, C., Gardner, J.N. and Champagne, PC. 2002. Characterization of spoilage yeasts isolated from fermented vegetables and inhibition by lactic, acetic and propionic acid. *Food Microbiology.* 19: 363-373.
- Salminen, S., von Wright A., Morelli L, Marteau P, Brassart D, de Vos WM, Fonden R, Saxelin M, Collins K, Mogensen G, Birkeland S, Mattila-Sandholm T. 1998. Demonstration of safety of probiotics-a review. *Int. J. Food Micro.* 44: 93-106.
- Salminen, S., Bouley C, Boutron-Ruault MC, Cummings JH, Franck A, Gibson GR. 1998. Functional food science and gastrointestinal physiology and function. *Br J Nutr.* 80 (Suppl): S147-S71.
- Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. *Lactic acid bacteria.* New York: Marcel Dekker Inc. pp. 442.

- Schillinger, U. and Luecke, F.K. 1989. Antibacterial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Nham. Applied and Environmental Microbiology. 55 (8): 1901-1906.
- Schleifer, K.H. & Ludwig, W., 1995. Phylogenetic Relationship of Lactic Acid Bacteria, In: Wood, B.J.B. & Holzapfel, W.H. (Eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. 2nd Ed. Glasgow: Blackie Academic & Professional.
- Schmid, Katja. 2006. Development of probiotic food ingredients. Edited by Ahmedna, Mohamed., Goktepe, Ipek. And Juneja, Vijay, K. In Probiotic in food safety and human health. Florida. CRC Press. p. 35-55.
- Schrezenmijer, J., de Vrese M. 2001. Probiotic, prebiotic and synbiotics-approaching a definition. Am J. Clin. Nutr. 73(2): 361-364.
- Schultz, M., Veltkamp, C., Dieleman, L.A., Grenther, W.B., Wyrick, P.B., Tonkonogy, S.L. 1998. Continuous feeding of *Lactobacillus plantarum* attenuates established colitis in interleukin-10 deficient mice. Gastroenterology. 114: A4426.
- Sheehan, V., M., Rose, P., & Fitzgerald, G.F. 2007. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. Innovative Food Science and Emerging Technologies. 8: 279-284.
- Silva, M., Jacobus, N.V., Deneke, C., Gorbach, S.L. 1987. Antimicrobial substance from a human *lactobacillus* strain. Antimicrob Agents Chemother. 31: 1231-3.
- Singh, J., Rivenson, A., Tomita, M., Shimamura, S., Ishibashi, N., Reddy, B.S. 1997. *Bifidobacterium longum*, a lactic acid producing intestinal bacterium inhibits colon cancer and modulates the intermediate biomarkers of colon carcinogenesis. Carcinogenesis. 18: 833-41.
- Sneath, P. H. A., Mair, N. S., Sharpe, M. E. & Holt, J. G. 1986. Bergey's Manual of Bacteriology. Vol. 2. Baltimore: Williams & Wilkins.
- Spellhaug, S.R. and Halander, S.K. 1989. Inhibition of foodborne bacteria pathogens by bacteriocin from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentasaceus*. J.Food Prot. 52: 856-862.

- Steinkraus, K.H. 1997. Classification of fermented foods: worldwide review of household fermentation techniques. *Food Control*. 8: 311-317.
- Stiles, W.B. 1996. Stability of the verbal exchange structure of medical consultations. *Psychology and Health* 11, 773-786.
- Stiles, M.E. & Holzapfel, W.H., 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology*. 36: 1-29.
- Stiles, M.E. & Hastings, J.W., 1991. Bacteriocin production by lactic acid bacteria: potential for use in meat preservation. *Trends in Food Science & Technology*. 2: 247-251.
- Swetwivathana, A., Pilasombut, K. and Selthakul, J. 2009. An *in vitro* screening of isolates bacteriocin-producing lactic acid bacteria from Thai fermented meat for probiotic prospect. In the 3rd International Conference on Fermentation Technology for value Added Agriculture Products. 26-28 August 2009. Khon Kean, Thailand.
- Takahashi, N., Xiao, J.Z., Miyaii, K., Yaeshiima, T., Hiramatsu, A., Iwatsuki, K., Kokubo, S., Hosono, A. 2004. Selection of acid tolerant *bifidobacteria* and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. *Journal of Dairy Research*. 71: 340-345.
- Tamminen, M., Joutsjoki, T., Sjoblom, M., Joutsren, M., Palva, A., Ryhanen, E-L. 2004. Screening of lactic acid bacteria from fermented vegetables by carbohydrate profiling and PCR-ELISA. *Letters in Applied Microbiology*. 39: 439-444.
- Tannock, R. 1998. Attention Deficit Hyperactivity Disorder: Advances in cognitive, neurobiological and genetic research. *Journal of Child Psychology and Psychiatry*. 39: 65-99.
- Tenyson, J.S. Winlers, R.S. 2000. Fish and other marine products: salt (chlorine as sodium chloride) in seafood. In : Horwitz W, editor. *Official Methods of Analysis of AOAC International*; 14th ed Gaithersburg, MD: AOAC International; Official Method Chapter 35.937.09: p.9.

- Teuber, M. 1995. The Genus *Lactococcus*, In: Wood, B.J.B. & Holzapfel, W.H. The Genera of Lactic Acid Bacteria. 2nd Ed. London: Blackie Academic & Professional. pp. 173-234.
- Teuber, M., Geis, A., Neve, H. 1995. The genus *Lactococcus*. In. The Prokaryotes. Balows, A., Truber, H.G., Dworkin, Harder, M.W., Schleifer, K.H., editors. Vol. II. 2nd. Springer Verlag, New York. pp. 1482-501.
- Toit, M., Franz, C.M.A., Dick, L.M.T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F. and Holzapfel, W.H. 1998. Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels, faeces pH and faeces moisture content. J. Food Microbiol. 40: 93-104.
- Uchimura, T., W., Daaensubha., S., Okada., Y., Nimura., N., Ohara and M. Kuzazki. 1988. Microorganisms and its role on fermented rice noodle (Kka-nom-jeen) of Thailand. In. JSPS-NRCT Symposium at CheingMai University, November. Cheingmai, Thailand. 98p.
- Wang, C.Y., Lin, P.R., Chang-Chai, N.g., Shyu, Y.T. 2010. Probiotic properties of *Lactobacillus* strains isolated from the feces of breast-fed infants and Taiwanese pickled cabbage. Clinical Microbiology. Anaerobe. 16: 578-585.
- Wang, H.L. and C.W. Hesseltn. 1981. Use of microbial culture: Legume and cereal products. Food Technol. 35(1): 79-83.
- Williams, R.E.O., Hirsch, A. & Cowan, S.T., 1953. *Aerococcus*, a New Bacteria Genus. Journal of General Microbiology 8: 475-480.
- Wollowski, I., Rechkemmer, G., Pool-Zobel, B.L. 2001. Protective role of probiotics and prebiotics in colon cancer. Am J Clin Nutr. 73(Suppl): S451-S5.
- Wood, B.J.B & Holzapfel, W.H., 1995. The Genera of Lactic Acid Bacteria. London: Chapman & Hall. pp. 161-162.
- Wood, B.J.B. and W.H. Holzapfel. 1997. The Lactic bacteria: The Genera of lactic acid bacteria. Blackie Academic & Professional, New York. pp. 7-15.

- Yang, C.H., Crowley, D.E., Borneman, J., Keen, N.T. 2000. Microbiology phyllosphere population are more complex than previously realized. *Microbiology Ecology*. 98: 3889-3894.
- Yang, J., Cao, Y., Cai, Y., Terada, F. 2010. Natural population of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *J. Dairy. Sci.* 93(7): 3136-45.
- Yoon, K.Y., Edward, E., Woodams, Hang, Y.D. 2004. Probiotication of tomato juice by lactic bacteria. *The Journal of Microbiology*. 42: 315-318.
- Yoon, K.Y., Edward, E., Woodams, Hang, Y.D. 2006. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*. 97: 1427–1430.
- Yu, Z.H., Zhang, X., Li, S.Y., Li, C.Y., Li, D. & Yang, Z.N. 2012. *In vitro* evaluation of probiotic properties of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from Chinese Sauerkraut. *African Journal of Biotechnology*. 11: 4868-4875.
- Zhang, J.H., Tatsumi, E., Fan, J.F., Li, L.T. 2007. Chemical components of *Aspergillus*-type *douchi*, a Chinese traditional fermented soybean product, change during the fermentation process. *Int. J. Food Sci.Technol.* 42(3): 263-268.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Brain heat infusion (BHI) soft agar (0.7%)

Calf brain, infusion form	200.0	g
Beef heart, infusion form	250.0	g
Disodium phosphate	2.5	g
Sodium chloride	5.0	g
Bacto proteose peptone	10.0	g
Bacto dextrose	2.0	g
Agar	0.11	g
Distilled water	1,000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.4 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

2. Brain heat infusion (BHI) broth

ละลายส่วนผสมของ BHI 37 กรัม (ไม่เติมวุ้น) ด้วยน้ำกลั่น 1,000 ml นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

3. Baird Parker agar (BP)

Peptone	10.0	g
Meat extract	5.0	g
Yeast extract	1.0	g
Sodium pyruvate	10.0	g

Glycine	12.0	g
Lithium chloride	5.0	g
Agar	15.0	g

ละลายอาหารเลี้ยงเชื้อ BP 63.0 กรัมในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

4. MacConkey agar (MCA)

Peptone	17.0	g
Proteose peptone	3.0	g
Lactose	10.0	g
Bile salt NO ₃	1.5	g
Agar	13.5	g
Neutral red	0.03	g
Crystal violet	0.001	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.1

นำส่วนผสมทั้งหมดละลายด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

5. MRS (de Man Rogosa and sharpe) broth

Bacto peptone	10.0	g
Bacto beef extract	10.0	g
Bacto yeast extract	5.0	g
Glucose	20.0	g
Sorbitan monoleate complex	1.0	g
Ammonium citrate	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g

Magnesium sulfate	0.2	g
Manganese sulfate	0.05	g
Potassium phosphate, dibasic	2.0	g
Distilled water	1,000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

6. MRS (de Man Rogosa and sharpe) agar

Bacto peptone	10.0	g
Bacto beef extract	10.0	g
Bacto yeast extract	5.0	g
Glucose	20.0	g
Sorbitan monoleate complex	1.0	g
Ammonium citrate	2.0	g
Sodium acetate	5.0	g
Magnesium sulfate	0.2	g
Manganese sulfate	0.05	g
Potassium phosphate, dibasic	2.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 6.5 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

7. Nutrient agar (NA)

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.2-7.4

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี
นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

8. PDA (Potato Dextrose Agar)

Potato starch	4.0	g
Dextrose	20.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี
ปรับพีเอชให้เท่ากับ 5.6 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15
นาที

9. PCA (Plate Count Agar)

Pancreatic Digest of Casein	5.0	g
Yeast extract	2.5	g
Dextrose	1.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี
ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15
นาที

10. Salmonella-Shigella agar (SS agar)

Beef extract	5.0	g
Proteose peptone	5.0	g
Lactose	10.0	g
Bile salt NO ₃	8.5	g
Sodium citrate	8.5	g
Sodium thiosulfate	8.5	g
Ferric citrate	1.0	g
Brilliant green	1.0	g
Neutral red	0.33	mg
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml
pH 7.0		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่นให้เข้ากันดี นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

11. Starch agar

Beef extract	3.0	g
Peptone	5.0	g
Yeast extract	10.0	g
Soluble starch	2.0	g
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml
pH 7.2		

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี ปรับพีเอชให้เท่ากับ 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

12. Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS)

Yeast extract	5.0	g
Proteose peptone NO ₃	5.0	g
Oxgall	5.0	g
Bromthymol blue	0.04	g
Agar	15.0	g
Saccharose	20.0	g
Ferric citrate	10.0	g
Sodium citrate	10.0	g
Sodium thiosulfate	10.0	g
Sodium chloride	10.0	g
Thymol blue	0.04	g
Distilled water	1,000	ml

pH 8.6

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น นำไปตั้งไฟอ่อนๆ จนส่วนผสมละลายเข้ากันดี

นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

13. Tributyrin agar

Peptone	5.0	g
Beef extract	3.0	g
Tributyrin	10.0	ml
Agar	15.0	g
Distilled water	1,000	ml

pH 7.4

ละลายส่วนผสมทั้งหมดด้วยน้ำกลั่น ยกเว้น Tributyrin นำไปตั้งไฟอ่อนจนส่วนผสมละลายเข้ากันดี แล้วทำให้เย็นลงประมาณ 50°C ปรับ pH เป็น 7.4 แล้วใส่ Tributyrin ปั่นใน blender 10 นาที นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วเป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

สารเคมี และวิธีการวิเคราะห์

1. การวิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแล็กติก (AOAC, 1990)

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอล์ฟทาลีนความเข้มข้น 1% (ละลายในเอทานอล)
2. สารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N

วิธีการ

1. ดูดตัวอย่างปริมาตร 1 ml ผสมน้ำกลั่น 10 ml ใส่ในฟลาสก์ขนาด 125 ml
2. เติมสารละลายฟีนอล์ฟทาลีน 2-3 หยด
3. ไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 N จนได้จุดยุติเป็นสีชมพู

การคำนวณ

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแล็กติก} = \frac{\text{โซเดียมไฮดรอกไซด์ (ml)} \times N \times 90.09 \times 100}{\text{ปริมาณตัวอย่าง (ml)} \times 1,000}$$

โดยที่ N = นอร์มอลของต่างที่ใช้

2. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด (Total sugar) โดยวิธี Phenol sulfuric method (Dubois *et al.*, 1956)

สารเคมี

1. สารละลายซัลฟูริกเข้มข้น
2. สารละลาย Phenol 5%

วิธีการ

1. แห่หลอดทดสอบในน้ำแข็ง ดูดสารตัวอย่าง 2 มิลลิลิตรใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย Phenol 5% 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วนำหลอดทดสอบออกจากน้ำแข็งที่แช่มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. เติมกรดซัลฟิวริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วเขย่าอีกวางไว้ไม่เกิน 20 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร เอาค่าที่ได้ Plot curve ระหว่างค่า OD กับปริมาณน้ำตาล

การทำกราฟมาตรฐานน้ำตาลกลูโคส

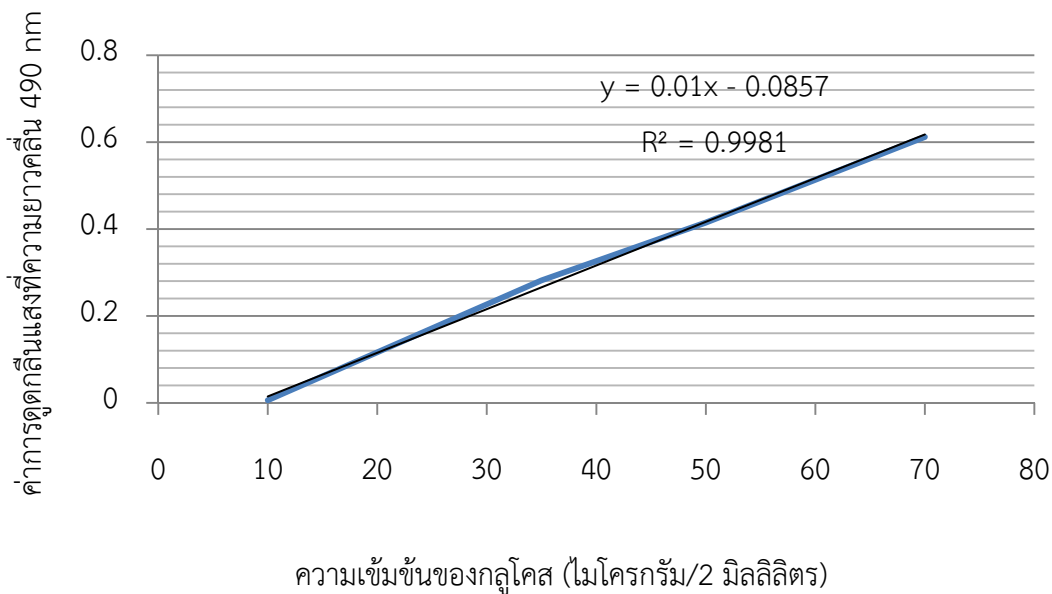
1. สารละลายกลูโคสมาตรฐาน เตรียมโดยชั่งกลูโคส 0.35 กรัม ปรับน้ำกลั่นให้ครบ 100 มิลลิลิตร เจือจางสารละลายกลูโคสให้มีระดับความเข้มข้น 10, 35, 50, 70 ไมโครกรัมต่อ 2 มิลลิลิตร โดยดูดสารละลายกลูโคสมา 1, 5, 5, 2 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 6, 5, 2, 0 มิลลิลิตร ตามลำดับ

2. ดูดสารละลายที่เจือจางแล้ว 2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองที่แช่ในน้ำแข็ง เติมสารละลาย Phenol 5% 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ 2-3 นาที แล้วนำหลอดทดลองออกจากน้ำแข็งที่แช่มาวางไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3. เติมกรดซัลฟิวริก 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันทันที ทิ้งไว้ประมาณ 10 นาที แล้วเขย่าอีกวางไว้ไม่เกิน 20 นาที นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

4. นำค่า OD ที่ได้มาเขียนกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสง
ที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร



รูปที่ ข.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลูโคสกับค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

3. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide; NaOH) ความเข้มข้น 0.1 โมลาร์

ชั่ง NaOH 8 กรัมด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง ละลายด้วยน้ำกลั่น ปรับปริมาตรครบ 2,000 มิลลิลิตรในขวดปรับปริมาตร

4. Peptone water

ใช้ Peptone 0.1% มาใส่หลอดทดลอง หลอดละ 9 มิลลิลิตร ปิดจุกนำไป Autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 1 ชั่วโมง 15 นาที

5. ฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) ความเข้มข้น 1%

ชั่ง Phenolphthalein 1 กรัมใส่ในปิ๊กเกอร์ เติม ethanol 95% จำนวน 80 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากัน ปรับปริมาตรให้ครบ 100 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น

6. น้ำยาทดสอบคะตะเลส (ร้อยละ 3 H₂O₂)

ร้อยละ 35 H ₂ O ₂	8.6	ml
Distilled water	1,000	ml

เมื่อเตรียมเสร็จแล้วเก็บไว้ในขวดสีชาแล้วแช่ตู้เย็น

สารเคมีที่ใช้ในการย้อมสีแกรม

7. Crystal violet

สารละลาย A: ละลาย Crystal violet 2.0 g ในร้อยละ 95 ethyl alcohol ปริมาตร 20 ml

สารละลาย B: ละลาย ammonium oxalate 0.8 g ในน้ำกลั่นปริมาตร 80 ml

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง กรองผ่านกระดาษกรองได้ เป็น crystal violet staining reagent

8. ร้อยละ 95 ethyl alcohol

Decolorizing solvent

9. Gram iodine (mordant)

Mordant: บดไอโอดีน 1.0 g และ potassium iodide 2.0 g เข้าด้วยกันค่อยๆ เติมน้ำกลั่นลงไปบดผสม จนกระทั่งไอโอดีนละลาย ใช้น้ำกลั่นปริมาตร 300 ml เก็บไว้ในขวดสีชา

10. Safranin (counterstain)

Counterstain: ละลาย safranin O ร้อยละ 2.5 (น้ำหนัก/ปริมาตร) ในร้อยละ 95 ethyl alcohol ปริมาตร 10 ml แล้วเติมน้ำกลั่นปริมาตร 100 ml

11. สารละลายไอโอดีน

Iodine	1.0	g
Potassium iodine	20.0	g
Distilled water	100	ml

ใช้น้ำเพียงเล็กน้อยละลายไอโอดีน และ Potassium iodine จนหมดจึงเติมน้ำที่เหลือลงไป

ภาคผนวก ค

แบบทดสอบคุณภาพทางประสาทสัมผัส

Hedonic-5-scale

ผลิตภัณฑ์ผักดอง

ชื่อผู้ทดลอง..... วันที่..... เวลา.....

คำแนะนำ กรุณาสังเกตและทดสอบตัวอย่าง แล้วให้คะแนนความชอบตัวอย่างแต่ละปัจจัยที่ใกล้เคียงกับความรู้สึกท่านมากที่สุด โดยกำหนดให้

5= ยอมรับมากที่สุด

4= ยอมรับมาก

3= ยอมรับ

2= ยอมรับน้อย

1= ไม่ยอมรับ

ปัจจัย	รหัสตัวอย่าง			
	101	201	302	402
กลิ่น				
รสชาติ				
ลักษณะเนื้อสัมผัส				
สี				
การยอมรับโดยรวม				

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

ภาคผนวก ง

มพช.1168/2549

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน กะหล่ำปลีชอยดอง

1. ขอบข่าย

1.1 มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ครอบคลุมเฉพาะกะหล่ำปลีดองที่อยู่ในลักษณะเป็นเส้นขนาดเล็กบรรจุในภาชนะบรรจุ

2. บทนิยาม

ความหมายของคำที่ใช้ในมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้ มีดังต่อไปนี้

2.1 กะหล่ำปลีชอยดอง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำกะหล่ำปลีที่ผ่านการตัดแต่งเอาใบที่แก่และเสียออกแล้วมาล้างให้สะอาด ชอยเป็นเส้นขนาดเล็ก คลุกเคล้ากับเกลือ อาจเติมส่วนประกอบอื่น เช่น สมุนไพร น้ำส้มสายชู มัสตาร์ด นำมาดองอัดให้แน่นในภาชนะบรรจุที่เหมาะสมจนมีน้ำเกลือออกมาดองไว้ในระยะเวลาที่เหมาะสม

3. คุณลักษณะที่ต้องการ

3.1 ลักษณะทั่วไป

ต้องยังคงสภาพเป็นเส้นเล็กๆ ไม่มีฝัาขาวหรือฟองอันเนื่องมาจากการดองและมีสัดส่วนของกะหล่ำปลีและส่วนที่เป็นน้ำที่เหมาะสม

3.2 สี

ต้องมีสีที่ติดตามธรรมชาติของกะหล่ำปลีชอยดอง

3.3 กลิ่นรส

ต้องมีกลิ่นรสที่ติดตามธรรมชาติของกะหล่ำปลีชอยดองปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์

3.4 ลักษณะเนื้อสัมผัส

ต้องไม่เละ

เมื่อตรวจสอบโดยวิธีให้คะแนนตามข้อ 8.1 แล้ว ต้องได้คะแนนเฉลี่ยของแต่ละลักษณะจากผู้ตรวจสอบทุกคนไม่น้อยกว่า 3 คะแนน และไม่มีลักษณะใดได้ 1 คะแนน จากผู้ตรวจสอบคนใดคนหนึ่ง

3.5 สิ่งแปลกปลอม

ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือสิ่งปฏิกูลจากสัตว์

3.6 วัตถุเจือปนอาหาร

3.6.1 ห้ามใช้สีสังเคราะห์ทุกชนิด

3.6.2 หากมีการใช้วัตถุกันเสีย ให้ใช้ตามชนิดและปริมาณที่กฎหมายกำหนด

3.7 ความเป็นกรด-ด่าง

ต้องไม่เกิน 4.0

3.8 จุลินทรีย์

3.8.1 จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด ต้องน้อยกว่า 1×10^6 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.8.2 สตาฟีโลค็อกคัส ออเรียส ต้องน้อยกว่า 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.8.3 เอสเชอริเชีย โคลิ โดยวิธีเอ็มพีเอ็น ต้องน้อยกว่า 3 ต่อตัวอย่าง 1 กรัม

3.8.4 ยีสต์และรา ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

4. สุขลักษณะ

4.1 สุขลักษณะในการทำกะหล่ำปลีชอยดอง ให้เป็นไปตามคำแนะนำตามภาคผนวก จ.

5. การบรรจุ

5.1 ให้บรรจุกะหล่ำปลีชอยดองในภาชนะบรรจุที่สะอาด ปิดได้สนิท และสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากสิ่งสกปรกภายนอกได้

5.2 น้ำหนักสุทธิของกะหล่ำปลีชอยดองในแต่ละภาชนะบรรจุ ต้องไม่น้อยกว่าที่ระบุไว้ที่ฉลาก

6. เครื่องหมายและฉลาก

6.1 ที่ภาชนะบรรจุกะหล่ำปลีชอยดองทุกหน่วย อย่างน้อยต้องมีเลข อักษร หรือเครื่องหมายแจ้งรายละเอียดต่อไปนี้ให้เห็นได้ง่าย ชัดเจน

- (1) ชื่อเรียกผลิตภัณฑ์ เช่น กะหล่ำปลีชอยดอง ชาวเออร์เครา ชาวเครา
- (2) ส่วนประกอบที่สำคัญ
- (3) ชนิดและปริมาณวัตถุดิบอาหาร (ถ้ามี)
- (4) น้ำหนักสุทธิ
- (5) วัน เดือน ปีที่ทำ และวัน เดือน ปีที่หมดอายุ หรือข้อความว่า “ควรบริโภคก่อน (วัน เดือน ปี)”
- (6) ข้อเสนอแนะในการบริโภคและการเก็บรักษา
- (7) ชื่อผู้ทำหรือสถานที่ทำ พร้อมสถานที่ตั้ง หรือเครื่องหมายการค้าที่จดทะเบียน ในกรณีที่ใช้ภาษาต่างประเทศ ต้องมีความหมายตรงกับภาษาไทยที่กำหนดไว้ข้างต้น

7. การชักตัวอย่างและเกณฑ์ตัดสิน

7.1 รุ่น ในที่นี้ หมายถึง กะหล่ำปลีชอยดองที่มีส่วนประกอบเดียวกัน ทำในระยะเวลาเดียวกัน

7.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ ให้เป็นไปตามแผนการชักตัวอย่างที่กำหนดต่อไปนี้

7.2.1 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบสิ่งแปลกปลอม การบรรจุ และเครื่องหมายและฉลากให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วทุกตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.5 ข้อ 5. และข้อ 6. จึงจะถือว่ากะหล่ำปลีชอยดองรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.2.2 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัส ให้ใช้ตัวอย่างที่ผ่านการทดสอบตามข้อ 7.2.1 แล้ว จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.1 ถึงข้อ 3.4 จึงถือว่ากะหล่ำปลีชอยดองรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.2.3 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบวัตถุดิบอาหารและความเป็นกรด-ด่าง ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกัน จำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เพื่อทำเป็นตัวอย่างรวมโดยมีน้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า 300 กรัม กรณีตัวอย่างไม่พอให้ชักตัวอย่างเพิ่มโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันให้ได้ตัวอย่างที่มีน้ำหนักรวมตามที่กำหนด เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.6 และข้อ 3.7 จึงจะถือว่ากะหล่ำปลีชอยดองรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.2.4 การชักตัวอย่างและการยอมรับ สำหรับการทดสอบจุลินทรีย์ ให้ชักตัวอย่างโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันจำนวน 3 หน่วยภาชนะบรรจุ เพื่อทำเป็นตัวอย่างรวม โดยมีน้ำหนักรวมไม่น้อยกว่า 200 กรัม กรณีตัวอย่างไม่พอให้ชักตัวอย่างเพิ่มโดยวิธีสุ่มจากรุ่นเดียวกันให้ได้ตัวอย่างที่มี

น้ำหนักรวมตามที่กำหนด เมื่อตรวจสอบแล้วตัวอย่างต้องเป็นไปตามข้อ 3.8 จึงจะถือว่ากะหล่ำปลีชอยดองรุ่นนั้นเป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด

7.3 เกณฑ์ตัดสิน

ตัวอย่างกะหล่ำปลีชอยดองต้องเป็นไปตามข้อ 7.2.1 ข้อ 7.2.2 ข้อ 7.2.3 และข้อ 7.2.4 ทุกข้อ จึงจะถือว่ากะหล่ำปลีชอยดองรุ่นนั้นเป็นไปตามมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนนี้

8.การทดสอบ

8.1 การทดสอบลักษณะทั่วไป สี กลิ่นรส และลักษณะเนื้อสัมผัส

8.1.1 ให้แต่งตั้งคณะผู้ตรวจสอบ ประกอบด้วยผู้ที่มีความชำนาญในการตรวจสอบกะหล่ำปลีชอยดองอย่างน้อย 5 คน แต่ละคนจะแยกกันตรวจและให้คะแนนโดยอิสระ

8.1.2 เติตัวอย่างกะหล่ำปลีชอยดองลงในจานกระเบื้องสีขาว ตรวจสอบโดยการตรวจพินิจและชิม

8.1.3 หลักเกณฑ์การให้คะแนน ให้เป็นไปตามตารางที่ 1

ตารางที่ 1 หลักเกณฑ์การให้คะแนน

(ข้อ 8.1.3)

ลักษณะที่ตรวจสอบ	เกณฑ์ที่กำหนด	ระดับการตัดสิน (คะแนน)			
		ดีมาก	ดี	พอใช้	ต้องปรับปรุง
ลักษณะทั่วไป	ต้องยังคงสภาพเป็นเส้นเล็กๆ ไม่มีฝ้าขาวหรือฟองอันเนื่องมาจากการดองและมีสัดส่วนของกะหล่ำปลีและส่วนที่เป็นน้ำที่เหมาะสม	4	3	2	1
สี	ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของกะหล่ำปลีชอยดอง	4	3	2	1
กลิ่นรส	ต้องมีกลิ่นรสที่ดีตามธรรมชาติของกะหล่ำปลีชอยดองปราศจากกลิ่นรสอื่นที่ไม่พึงประสงค์	4	3	2	1
ลักษณะเนื้อสัมผัส	ต้องไม่เละ	4	3	2	1

8.2 การทดสอบสิ่งแปลกปลอม ภาชนะบรรจุ และเครื่องหมายและฉลาก
ให้ตรวจพินิจ

8.3 การทดสอบวัตถุเจือปนอาหาร

ให้ใช้วิธีการทดสอบตาม AOAC หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

8.4 การทดสอบความเป็นกรด-ด่าง

ให้วัดความเป็นกรด-ด่างด้วยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง

8.5 การทดสอบจุลินทรีย์

ให้ใช้วิธีการทดสอบตาม AOAC หรือ BAM หรือวิธีทดสอบอื่นที่เป็นที่ยอมรับ

8.6 การทดสอบน้ำหนักสุทธิ

ให้ใช้เครื่องชั่งที่เหมาะสม

ภาคผนวก จ

สัญลักษณ์

(ข้อ 4.1)

ก.1 สถานที่ตั้งและอาคารที่ทำ

ก.1.1 สถานที่ตั้งตัวอาคารและที่ใกล้เคียง อยู่ในที่ที่จะไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย โดย

ก.1.1.1 สถานที่ตั้งตัวอาคารและบริเวณโดยรอบ สะอาด ไม่มีน้ำขังแฉะและสกปรก

ก.1.1.2 อยู่ห่างจากบริเวณหรือสถานที่ที่มีฝุ่น เขม่า ควัน มากผิดปกติ

ก.1.1.3 ไม่อยู่ใกล้เคียงกับสถานที่น่ารังเกียจ เช่น บริเวณเพาะเลี้ยงสัตว์ แหล่งเก็บหรือกำจัดขยะ

ก.1.2 อาคารที่ทำมีขนาดเหมาะสม มีการออกแบบและก่อสร้างในลักษณะที่ง่ายแก่การบำรุงรักษา การทำความสะอาด และสะดวกในการปฏิบัติงาน โดย

ก.1.2.1 พื้น ฝาผนัง และเพดานของอาคารที่ทำ ก่อสร้างด้วยวัสดุที่คงทน เรียบ ทำความสะอาด และซ่อมแซมให้อยู่ในสภาพที่ดีตลอดเวลา

ก.1.2.2 แยกบริเวณที่ทำออกเป็นสัดส่วน ไม่อยู่ใกล้ห้องสุขา ไม่มีสิ่งของที่ไม่ใช้แล้วหรือไม่เกี่ยวข้องกับการทำอยู่ในบริเวณที่ทำ

ก.1.2.3 พื้นปฏิบัติงานไม่แออัด มีแสงสว่างเพียงพอ และมีการระบายอากาศที่เหมาะสม

ก.2 เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ทำ

ก.2.1 ภาชนะหรืออุปกรณ์ในการทำที่สัมผัสกับผลิตภัณฑ์ ทำจากวัสดุผิวเรียบ ไม่เป็นสนิม ล้างทำความสะอาดได้ง่าย

ก.2.2 เครื่องมือ เครื่องจักร และอุปกรณ์ที่ใช้ สะอาด เหมาะสมกับการใช้งาน ไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนติดตั้งได้ง่าย มีปริมาณเพียงพอ รวมทั้งสามารถทำความสะอาดได้ง่ายและทั่วถึง

ก.3 การควบคุมกระบวนการทำ

ก.3.1 วัตถุดิบและส่วนผสมในการทำ สะอาด มีคุณภาพดี มีการล้างหรือทำความสะอาดก่อนนำไปใช้

ก.3.2 การทำ การเก็บรักษา การขนย้าย และการขนส่ง ให้มีการป้องกันการปนเปื้อนและการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์

ก.4 การสุขาภิบาล การบำรุงรักษา และการทำความสะอาด

ก.4.1 น้ำที่ใช้ล้างทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องจักร อุปกรณ์ และมือของผู้ทำ เป็นน้ำสะอาดและมีปริมาณเพียงพอ

ก.4.2 มีวิธีการป้องกันและกำจัดสัตว์นำเชื้อ แมลงและฝุ่นผง ไม่ให้เข้าไปในบริเวณที่ทำตามความเหมาะสม

ก.4.3 มีการกำจัดขยะ สิ่งสกปรก และน้ำทิ้ง อย่างเหมาะสม เพื่อไม่ก่อให้เกิดการปนเปื้อนกลับลงสู่ผลิตภัณฑ์

ก.4.4 สารเคมีที่ใช้ล้างทำความสะอาด และใช้กำจัดสัตว์นำเชื้อและแมลง และใช้ในปริมาณที่เหมาะสม และเก็บแยกจากบริเวณที่ทำ เพื่อไม่ให้เกิดการปนเปื้อนลงสู่ผลิตภัณฑ์ได้

ก.5 บุคลากรและสุขลักษณะของผู้ทำ

ผู้ทำทุกคน ต้องรักษาความสะอาดส่วนบุคคลให้ดี เช่น สวมเสื้อผ้าที่สะอาด มีผ้าคลุมผมเพื่อป้องกันไม่ให้เส้นผมหล่นลงในผลิตภัณฑ์ ไม่ไว้เล็บยาว ล้างมือให้สะอาดทุกครั้งก่อนปฏิบัติงาน หลังการใช้ห้องสุขาและเมื่อมือสกปรก

ภาคผนวก ฉ

ตาราง ฉ.1 ตารางมาตรฐานเปรียบเทียบความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณที่เกิดการยับยั้งการเจริญ เพื่อดูปฏิกิริยาของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะ (Charteris *et al.*, 1998)

กลุ่มยา	ชื่อยาปฏิชีวนะ	ความเข้มข้น ของยา ปฏิชีวนะ ($\mu\text{g}/\text{disc}$)	ความยาว (mm)		
			resistant (R)	susceptible (MS)	susceptible (S)
1. กลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์					
Cephalosporins	Vancomycin (V)	(30 $\mu\text{g}/\text{disc}$)	≤ 14	15-16	≥ 17
2. กลุ่มยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน					
Aminoglycosides	Kanamycin (K)	(30 $\mu\text{g}/\text{disc}$)	≤ 13	14-17	≥ 18
	Gentamycin (GM)	(10 $\mu\text{g}/\text{disc}$)	≤ 12	-	≥ 13
	Streptomycin (S)	(10 $\mu\text{g}/\text{disc}$)	≤ 11	12-14	≥ 18
Tetracycline	Tetracycline (TE)	(30 $\mu\text{g}/\text{disc}$)	≤ 14	15-18	≥ 19
Single antibiotic	Chloramphenicol (C)	(30 $\mu\text{g}/\text{disc}$)	≤ 13	14-17	≥ 18
Macrolide	Erythromycin (E)	(15 $\mu\text{g}/\text{disc}$)	≤ 13	14-17	≥ 18
3. กลุ่มยับยั้งการทำหน้าที่ของเยื่อหุ้มเซลล์					
	Polymycin (PB)	(30 $\mu\text{g}/\text{disc}$)	≤ 8	9-11	≥ 12

ตาราง ฉ.2 MPN table for a three-replicate design from FDA's *Bacterial Analytical Manual*. For 3 tubes each at 0.1, 0.01, and 0.001 g inocula, the MPNs per gram and 95 percent confidence intervals. (BAM, 2002)

Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.		Pos. tubes			MPN/g	Conf. lim.	
0.10	0.01	0.001		Low	High	0.10	0.01	0.001		Low	High
0	0	0	<3.0	–	9.5	2	2	0	21	4.5	42
0	0	1	3.0	0.15	9.6	2	2	1	28	8.7	94
0	1	0	3.0	0.15	11	2	2	2	35	8.7	94
0	1	1	6.1	1.2	18	2	3	0	29	8.7	94
0	2	0	6.2	1.2	18	2	3	1	36	8.7	94
0	3	0	9.4	3.6	38	3	0	0	23	4.6	94
1	0	0	3.6	0.17	18	3	0	1	38	8.7	110
1	0	1	7.2	1.3	18	3	0	2	64	17	180
1	0	2	11	3.6	38	3	1	0	43	9	180
1	1	0	7.4	1.3	20	3	1	1	75	17	200
1	1	1	11	3.6	38	3	1	2	120	37	420
1	2	0	11	3.6	42	3	1	3	160	40	420
1	2	1	15	4.5	42	3	2	0	93	18	420
1	3	0	16	4.5	42	3	2	1	150	37	420
2	0	0	9.2	1.4	38	3	2	2	210	40	430
2	0	1	14	3.6	42	3	2	3	290	90	1,000
2	0	2	20	4.5	42	3	3	0	240	42	1,000
2	1	0	15	3.7	42	3	3	1	460	90	2,000
2	1	1	20	4.5	42	3	3	2	1100	180	4,100
2	1	2	27	8.7	94	3	3	3	>1100	420	–