รายงานการวิจัย

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดองท้องถิ่นภาคใต้

Selection and Identification of Lactic acid Bacteria for Pickled Vegetable Starter in the Southern Thailand.

ผู้วิจัย

นางธารหทัย มาลาเวช

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนจากมหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช

สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ปีงบประมาณ 2556

เรื่อง การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดองท้องถิ่นภาคใต้

Selection and Identification of Lactic acid Bacteria for Pickled Vegetable Starter in the Southern Thailand.

ผู้วิจัย นางธารหทัย มาลาเวช

วัน เดือน ปี 1 มีนาคม 2557

บทคัดย่อ

การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดองท้องถิ่นภาคใต้ มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีในผักดองและบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการหมักผักดอง ผลการเก็บตัวอย่างผักดองได้แก่ ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง และสะตอดอง จากตลาดสดอำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช จำนวน 100 ตัวอย่าง นำมาศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีโดยวัดความเป็นกรดเบสพบว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 3.58-3.91 และพบเชื้อแบคทีเรียแลกติกจำนวน 51 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.00 ซึ่งมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง 6.0×10^{6} -7.0×10^{9} CFU/g จากนั้นทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ 55 ไอโซเลต แล้วนำไปทดสอบประสิทธิภาพการหมัก พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างกรดแลคติกสูงและมีปริมาณเชื้อสูงได้ 5 ไอโซเลต ซึ่งได้แก่ไอโซเลต K14, K15, K20, N10 และ N12 โดยมีความเป็นกรดเบสอยู่ระหว่าง 3.56- 3.65 มีปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.68-0.78 และมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกอยู่ระหว่าง 5.8×10^{6}-6.3×10^{7} CFU/g ตามลำดับ จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ โดยการศึกษารูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การติดสีแกรม การเจริญบนอาหาร MRS agar การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส และความสามารถในการเจริญในสภาพความเป็นกรดด่าง 4.4.และ 9.6 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 5 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้ให้ผลเหมือนกันคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง มีการเรียงตัวเป็นสายโซ่สั้นๆ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10°C และ40°C แต่มีความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการเจริญที่ pH

4.4 แต่ไม่สามารถเจริญที่ pH 9.6 จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยใช้ API 50 CHL strip พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลต คือ เชื้อ *Lactobacillus plantarum*

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจทานแก้ไขงานวิจัยฉบับนี้ให้ถูกต้องสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณเจ้าหน้าที่ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์ในการใช้อุปกรณ์เครื่องมือในการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณนักวิทยาศาสตร์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของศูนย์วิทยาศาสตร์ที่คอยช่วยเหลืออำนวยความสะดวกในการทำวิจัยและคอยเป็นกำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จไปด้วยดี

และขอขอบพระคุณบิดามารดา พี่ ๆ น้องๆและครอบครัว ที่คอยให้กำลังใจในการทำงานวิจัยในครั้งนี้มาโดยตลอด

ธารหทัย มาลาเวช

กุมภาพันธ์ 2557

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	3
1.4 ขอบเขตการศึกษาวิจัย	3
1.5 นิยามศัพท์เฉพาะ	3
บทที่ 2 เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 ผักดองและการผลิต	4
2.2 แบคทีเรียแลคติก	24
2.3 การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติก	26
2.4 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	49
บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการวิจัย	40
3.1 วัสดุและอุปกรณ์	54
3.2 วิธีการดำเนินงานวิจัย	54
บทที่ 4 ผลการวิจัย	61
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย	67
บรรณานุกรม	69
ภาคผนวก	79

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1.1	ชนิดผักดองและจุลินทรีย์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์	5
1.2	วิธีการการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์	18
4.1	ค่าเฉลี่ยข้อมูลทางกายภาพ และเคมีของตัวอย่างผักดอง	62
4.2	แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากผักดองที่เก็บตัวอย่างจากอำเภอเมือง จังหวัดนครศรีธรรมราช	63
4.3	ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้	64
4.4	ประสิทธิภาพการหมักของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้	64
4.5	คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียแลคติก	66

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1 ผักกาดดอง (Leaf mustard)	7
2.2 หน่อไม้ดอง	8
2.3 ผักเสี้ยนดอง	10
2.4 สะตอดอง	11
2.5 เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp.	33
2.6 เชื้อแบคทีเรีย *Lactococcus* sp.	33
2.7 เชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus* sp.	34
2.8 เชื้อแบคทีเรีย *Pediococcus* sp.	34
2.9 เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp.	35
2.10 เชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc* sp.	36
2.11 เชื้อแบคทีเรีย *Weissella* sp.	36
2.12 เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp.	37
4.1 ตัวอย่างผักดอง	62
4.2 ผลทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยใช้ API 50	66

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การที่ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญและสนใจเกี่ยวกับอาหารมากขึ้นทั้งด้านการผลิต ความปลอดภัยจากเชื้อโรคและสารเคมีที่นำมาใช้ถนอมอาหาร ทำให้มีการศึกษาและพัฒนาเกี่ยวกับการผลิต และมีการใช้สารถนอมอาหาร (preservative) ที่ได้จากธรรมชาติ กันมากขึ้น ซึ่งวิธีการหนึ่งที่นิยมใช้กันมาก คือ การใช้เชื้อจุลินทรีย์หรือสารยับยั้งที่จุลินทรีย์เหล่านี้สร้างขึ้นเพื่อยืดอายุอาหารให้เก็บได้นานขึ้นและเพิ่มความปลอดภัยให้ผู้บริโภคมากขึ้น แบคทีเรียแลกติกเป็นเชื้อที่ได้รับความสนใจอย่างมาก เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญในอาหารมายาวนาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอาหารหมักพื้นเมือง โดยช่วยให้รสชาติและลักษณะของอาหารหมักดีขึ้น ทั้งยังสามารถผลิตสารยับยั้งแบคทีเรียได้หลายชนิด เช่น กรดอินทรีย์ ไดอะซิทิล ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ และแบคเทอริโอซิน ในบรรดาสารยับยั้งเหล่านี้แบคเทอริโอซินได้รับความสนใจศึกษามาก เนื่องจากมีข้อดีคือ เป็นสารโปรตีนสามารถถูกย่อยได้โดยน้ำย่อยในทางเดินอาหารมนุษย์ ไม่เป็นอันตรายต่อร่างกาย ไม่ทำให้รสชาติของอาหารเปลี่ยนแปลง และใช้ได้ง่าย (Fiorentini *et al.*, 2001)

การนำแบคทีเรียแลกติกมาใช้นั้นอาจทำได้โดยการเติมเชื้อในอาหารขณะที่ทำการผลิตโดยตรง เช่น การหมักผัก ผลไม้ เนื้อ นม หรือนำสารที่เชื้อผลิตได้มาใช้ เช่น การเติมกรดอินทรีย์ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารพวกเนื้อสัตว์เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* O157 : H7 (Cutter and Siragusa, 1994) การใช้ nisin ซึ่งเป็นแบคเทอริโอซินเพียงชนิดเดียวที่ได้รับอนุญาตให้ใช้ในอาหาร จำหน่ายในรูปกึ่งบริสุทธิ์โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin® (Soomro *et al.*, 2002) ในอาหารประเภท ผลิตภัณฑ์นม และ อาหารกระป๋องต่างๆ เนื้อสัตว์ (Flores and Alegre, 2001; Elotmani and Assobhei, 2003) ส่วนแบคเทอริโอซินชนิดอื่นๆ นั้นยังอยู่ในระหว่างการศึกษาและพัฒนา ทั้งด้านการผลิต คุณสมบัติต่างๆ การนำไปใช้ประโยชน์ และการปรับปรุงสายพันธุ์แบคทีเรียที่ผลิต

ปัจจุบันพบว่ามีการนำแบคทีเรียแลกติกในกลุ่ม *Lactobacillus* มาใช้ในอาหารเป็นเวลานานแล้ว โดยส่วนใหญ่ถือได้ว่าเป็น biopreservative ในอาหารซึ่งอาจจะนำตัวเชื้อมาใช้ในลักษณะเป็นเชื้อเริ่มต้นในอาหารหมักต่างๆ หรือนำสารยับยั้งที่เชื้อผลิตได้ไปใช้ในอาหารก็ได้ การนำเชื้อเหล่านี้มาใช้โดยตรงมีความสำคัญมากในอาหารหมักทั้งพืช สัตว์ ผลิตภัณฑ์นมต่างๆ นอกจากจะช่วยให้สามารถเก็บรักษาอาหารได้นานแล้วยังช่วยให้เพิ่มมูลค่าและเพิ่ม รส กลิ่น สี ของอาหารด้วย (McMullen and Stile, 1996) ความสำคัญของแบคทีเรียเหล่านี้ เนื่องจากสามารถผลิตกรดซึ่งทำให้ pH ของสิ่งแวดล้อมลดลง เชื้ออื่นที่เจริญได้เฉพาะใน pH เป็นกลางก็ไม่สามารถเจริญปนเปื้อนได้ นอกจากนี้ยังสร้างสารยับยั้งอื่น ได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไดอะซิทิล และแบคเทอริโอซิน ได้ด้วย

แบคทีเรียแลคติก มีบทบาทสำคัญเป็นอย่างมากในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ทั้งนี้เนื่องจากสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดอินทรีย์ และสารอื่น ๆ ซึ่งมีผลในการปรับปรุงกลิ่น รส เนื้อสัมผัสของอาหารหมักให้ดีขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกหลายชนิดยังมีส่วนสำคัญในการยับยั้งกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย รวมทั้งจุลินทรีย์ก่อโรคที่ปนเปื้อนมาในอาหารหมักอีกด้วย ดังนั้น ถ้ามีการใช้แบคทีเรียแลคติกในกระบวนการหมักอาหารจะทำให้สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคดังกล่าวในการผลิตอาหารหมักได้ จึงนับว่าเป็นการปรับปรุงคุณภาพและเพิ่มความปลอดภัยสำหรับผู้บริโภคอาหารหมักเหล่านั้นอีกทางหนึ่ง (Conway,et al., 1985) โดยชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่พบในผักดองส่วนใหญ่มีอยู่ 5 genus ได้แก่ *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp, *Diplococcus* sp., *Leuconostoc* sp. และ *Lactobacillus* sp. และจากการศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่ผ่านมาสายพันธุ์ที่พบมากสุดจะเป็นกลุ่ม *Lactobacillus* sp. แต่มีการศึกษากันมากแล้ว ส่วนเชื้อ *Pediococcus* และ *Leuconostoc* sp. ก็เป็นกลุ่มที่พบในอาหารหมักเช่นกันซึ่งนอกจากเชื้อจะผลิตกรดแลกติกแล้วยังผลิตสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง นักวิจัยจึงสนใจคัดเลือกเชื้อทั้งสองชนิดนี้ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

โดยกระบวนการผลิตผักดองในปัจจุบันยังเป็นการใช้กระบวนการหมักแบบดั้งเดิม คือ การหมักแบบธรรมชาติที่อาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับวัตถุดิบเป็นตัวช่วยในกระบวนการหมัก ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ และไม่ได้มาตรฐาน ทำให้ไม่สามารถปรับปรุงประสิทธิภาพของกระบวนการหมัก หรือเพิ่มอัตรากำลังการผลิตได้ นอกจากนี้ยังพบว่าในประเทศไทยยังไม่มีการพัฒนาการผลิตกล้าเชื้อสำหรับทำผักดองอย่างจริงจัง จึงทำให้นักวิจัยต้องการศึกษาและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีคุณสมบัติเหมาะสมและมีประสิทธิภาพต่อการผลิตผักดอง เพื่อ

ความสะดวกและลดระยะเวลาในกระบวนการหมัก อีกทั้งยังช่วยให้ได้ผลิตภัณฑ์ผักดองที่มีคุณภาพดี มีความสม่ำเสมอ และเป็นที่ยอมรับแก่ผู้บริโภค

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่มีในผักดอง
2. เพื่อบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่มีประสิทธิภาพต่อการหมักผักดอง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพการหมักดี
2. สามารถควบคุมกระบวนการหมักผักดองที่ได้มาตรฐานมีการผลิตที่คงที่ ช่วยลดระยะเวลาในการหมักผักดอง
3. เป็นเพิ่มมูลค่าของผลผลผิตทางการเกษตร

ขอบเขตของโครงการวิจัย

1. สำรวจเก็บข้อมูลเกี่ยวกับการผลิตผักดอง
2. คัดเลือก และบ่งชี้ชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่มีประสิทธิภาพการหมักสูง
3. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายภาพ เคมี และจุลชีววิทยาของกระบวนการหมักผักดอง

นิยามศัพท์เฉพาะ

ผักดอง หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำผักชนิดต่างๆ ที่บริโภคได้ เช่น แตงกวา ผักกาดหน่อไม้ สะตอ ดองในน้ำเกลือในระยะเวลาที่เหมาะสม อาจเติมส่วนผสมอื่น เช่น น้ำซาวข้าว

กล้าเชื้อ (starter culture) หมายถึง เชื้อบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิต ซึ่งได้ผ่านการคัดเลือกและตรวจสอบแล้วจำนวนหนึ่งชนิดหรือมากกว่าหนึ่งชนิด ใช้เติมลงไปในสูตรการผลิตอย่างน้อย 10^6 โคโลนี/กรัม

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

1. ผักดองและการผลิต

การดองเป็นวิธีการถนอมอาหารที่ใช้กันมานาน เพื่อชะลอการเน่าเสียของผักและเป็นการยืดอายุการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ได้ หลายเดือนโดยไม่ต้องอาศัยห้องเย็น จึงลงทุนน้อย ใช้เครื่องจักรน้อยและ ไม่ต้องอาศัยเทคโนโลยีชั้นสูงในการผลิต กระบวนการดองเริ่มมีขึ้นจากความ ต้องการยืดอายุการเก็บอาหารเพื่อใช้ในระหว่างที่ไม่ใช่ฤดูกาลของผลิตผลนั้นๆ หรือเพื่อไว้บริโภคในระหว่างเดินทางไกล โดยเฉพาะการเดินเรือ นอกจากเหตุผล ในการยืดอายุแล้วการดองยังทำให้เกิดลักษณะเฉพาะในด้านกลิ่นรสที่เป็นที่ชื่น ชอบของผู้บริโภคอีกด้วย เชื่อกันว่าแตงกวาเป็นผลิตภัณฑ์ผักดองชนิดแรกที่ได้มีการ ผลิตขึ้นเมื่อ 4,500 ปีก่อนในเมโสโปเตเมีย โดยคลีโอพัตราเชื่อว่าการบริโภคแตงกวา ดองจะทำให้สวย ในสงครามกองทัพจูเลียส ซีซาร์ และนโปเลียนใช้แตงกวาดองเป็น อาหารของกองทัพ ปัจจุบันการบริโภคผักดองยังคงเป็นที่นิยม ในประเทศสหรัฐอเมริกา ผักดองที่มียอดจำหน่ายสูงสุดได้แก่ แตงกวาดอง ในอังกฤษจะนิยมใช้หัวหอมดองใน อาหารและหัวบีทดองปรุงรสเป็นเครื่องเคียง สำหรับประเทศจีนมีผลิตภัณฑ์ผักดองมากมาย อาทิ หัวผักกาด กะหล่ำปลี พริก แตงกวา ฯลฯ ไต้หวันนิยมท้อดอง แตงกวาดอง กะหล่ำปลีดอง และ หัวผักกาดดอง ญี่ปุ่นนิยม daikon, ท้อ, ดอกกะหล่ำและผักกาดดอง เกาหลีนิยม ใช้กะหล่ำปลีในการทำกิมจิ ส่วนอินเดียจะนิยมดองผักหลายชนิดร่วมกัน

การหมักผักหรือการดองผักเป็นวิธีการถนอมอาหารวิธีหนึ่ง ซึ่งไม่ทราบแหล่งกำเนิดที่แน่นอนว่ามีขึ้นครั้งแรกที่ใด เพียงแต่สันนิษฐานกันว่ามีต้นกำเนิดจากประเทศจีน การดองผักเป็นการนำผักมาหมักในน้ำเกลือ การผลิตในระยะแรก ๆ เป็นการผลิตสำหรับการรับประทานภายในครัวเรือนเท่านั้น ซึ่งกรรมวิธีการทำจะถ่ายทอดจากแม่ไปยังลูกเท่านั้นไม่มีการศึกษาค้นคว้าใด ๆ ในช่วงเวลาต่อมาประมาณปี ค.ศ. 1900 มีผู้เริ่มให้ความสนใจศึกษาส่วนผสมที่สำคัญในการดองผัก ซึ่งได้แก่น้ำเกลือ ต่อมา Pederson และ Albury (1954) ทราบว่าปริมาณเกลือมีความสัมพันธ์กับการเจริญของจุลินทรีย์และการผลิตกรดในผักดอง ซึ่งจุลินทรีย์ที่พบในผักดองมีทั้งยีสต์และแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่มีบทบาททำให้ผักดองเปรี้ยวคือแบคทีเรียชนิดที่ผลิตกรดแลคติคได้ ปัจจุบันมีการ

ผลิตผักดองในหลายประเทศ เช่น ไทย พม่า จีน เกาหลี ฟิลิปปินส์ หรือแม้แต่ในทวีปยุโรปและอเมริกาชนิดผักที่นิยมดอง เช่น กะหล่ำปลี แตงกวา หัวบีท ผักกาด หน่อไม้ และผักเสี้ยน เป็นต้น

ชนิดของผักดอง

1. ผักที่ผ่านการดองเกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ (Processed pickles)

เป็นการดองที่ต้องใช้ระยะเวลาในการดองหลายสัปดาห์ โดยที่ผักที่ดองได้ยังคงมีความกรอบและมีกลิ่นรสเฉพาะตัว ความเข้มข้นของน้ำเกลือที่ใช้จะน้อยกว่า 12% ส่วนมากจะใช้ที่ระดับประมาณ 4-8 % หรือ ? - 1 ถ้วยต่อน้ำ 1 แกลลอน โดยเป็นความ เข้มข้นในระดับที่สูงพอที่จะยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น และเป็นระดับที่พอเหมาะ ให้จุลินทรีย์กลุ่มที่ผลิตกรดแลคติกเจริญได้ดี แต่ระดับความเข้มข้นของน้ำเกลือที่เหมาะสมที่สุด ในการดองจะขึ้นอยู่กับชนิดของผักและผลิตภัณฑ์ที่ต้องการเป็นหลัก การดองด้วยวิธีนี้จะมีเชื้อ จุลินทรีย์พวกที่ใช้ออกซิเจนในการเจริญทำหน้าที่เปลี่ยนน้ำตาลที่อยู่ในผักหรือเติมลงไปให้เป็น กรดแลคติค วิธีการดองแบบนี้จะใช้ได้กับผักหลายชนิด เช่น แตงกวา (Pickles หรือ Saltstock) กะหล่ำปลี (Sauerkraut) ผักกาดดอง กิมจิ เป็นต้น อาหารพวกนี้จะเกิดจากการเปลี่ยนแปลง ด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติค (Lactic acid bacteria) เพียงอย่างเดียว หรือเปลี่ยนแปลงด้วยเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติคและเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ดังแสดงในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ชนิดผักดองและจุลินทรีย์ที่ใช้ในผลิตภัณฑ์

ชนิด	เชื้อที่ร่วม	ผลิตภัณฑ์
ผัก	ยีสต์	Nukamiso pickles
	รา	เทมเป้
ขิง	ยีสต์	Ginger beer
ถั่ว	ยีสต์	Vermicelli

ในการดองด้วยวิธีนี้ควรรักษาอุณหภูมิของน้ำเกลือให้อยู่ที่ 21 ° C และให้ผักจมอยู่ในน้ำเกลือตลอดระยะเวลาที่ดอง หากมีเชื้อราที่ผิวหน้าของน้ำดองควรกำจัด ออกทันที เนื่องจากเชื้อราจะย่อยสลายกรดและสร้างสภาวะที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียเจริญต่อไปได้

2. การหมักดองโดยไม่มีเชื้อจุลินทรีย์เข้ามาเกี่ยวข้อง (Unfermented pickle)

ใช้กับการหมักผักที่มีความเป็นกรดสูง เช่น แตงกวา ดอกกะหล่ำ หัวหอม แครอท หรือพริกโดยจะใช้เกลือที่มีความเข้มข้นสูงถึง 20-25% ในการหมัก การหมักด้วยวิธีนี้มีจุดประสงค์เพื่อเก็บรักษาผักและผลไม้ในน้ำเกลือมากกว่า หรือเป็น ขั้นตอนหนึ่งในการขจัดรสขมและฝาดในการทำผลิตภัณฑ์ผักอบแห้ง เช่น สมอ

3. การดองในน้ำส้มสายชู

วิธีการดองแบบนี้อาจ ใช้ร่วมกับการดองด้วยเกลือทั้งที่ใช้และไม่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ และอาจไม่ผ่านกระบวนการ หมักเลยก็ได้ แต่เป็นการแช่ผักในน้ำส้มสายชูที่ปรุงแต่งรสชาติแล้วด้วยเครื่องเทศ น้ำตาล และเกลือ นับเป็นการดองที่ทำได้ง่ายที่สุด สามารถทำให้เสร็จได้ภายใน 1-2 วัน สิ่งที่สำคัญ ของการดองด้วยวิธีนี้คือ การเลือกใช้น้ำส้มสายชูที่มีคุณภาพดี ใส ไม่มีตะกอนและมีความ เข้มข้นของกรดอะซิติก 5 % ไม่ควรใช้น้ำส้มสายชูที่ผลิตเองในครัวเรือน เนื่องจากมักทำให้สีของผลิตภัณฑ์ที่ดองเสร็จแล้วคล้ำลง

4. การดองในน้ำมัน

ในบางประเทศนิยม เช่น อินเดีย อังกฤษ เป็นต้น การดองในน้ำมัน โดยใช้ turnip กะหล่ำดอก หรือพืชอื่นๆ ที่ผ่านการ ดองในน้ำมันหรือไม่ก็ได้ โดยการคลุกกับเกลือและเครื่องเทศ บรรจุขวด แล้ว ตากแดดไว้ประมาณ 4-8 วัน จากนั้นจึงเติมน้ำมันลงไป จนกระทั่งผสมกัน

ชนิดของผลิตภัณฑ์ผักดอง

ผลิตภัณฑ์ผักดองแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (วิลาวัณย์, 2536) ได้แก่

1) ผลิตภัณฑ์ผักดองที่ไม่ได้เกิดจากการหมักของจุลินทรีย์ ผักดองประเภทนี้ได้จากการปรุงแต่งรสชาติด้วย เกลือ น้ำตาล น้ำส้มสายชู เครื่องเทศ ตามต้องการ เช่น กระเทียม ซีเซ็กฉ่าย แตงกวาสามรส เป็นต้น

2) ผลิตภัณฑ์ผักดองที่เกิดจากการหมักของจุลินทรีย์ ผักดองประเภทนี้ได้จากการเติมเกลือลงไปในผัก เกลือที่เติมลงไปอาจเติมในรูปเกลือป่น (dry salting) หรือ น้ำเกลือ (brine salting) โดยเติมลงในปริมาณที่เหมาะสมกับการเติบโตของจุลินทรีย์ที่ต้องการให้มีบทบาทในการหมัก ใน

ขณะเดียวกันไม่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ ซึ่งจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักดอง ได้แก่ แบคทีเรียแลคติค

ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ผักดอง

ผลิตภัณฑ์ผักดองที่จะกล่าวถึงในที่นี้เป็นผักดองเปรี้ยว ได้แก่ ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง และสะตอดอง ซึ่งผักเหล่านี้เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียแลคติค ที่ติดมาโดยธรรมชาติ (natural fermentation) ในผัก ซึ่งชาวบ้านจะเก็บผักเหล่านี้ไว้ให้มีการเจริญของแบคทีเรียแลคติคในระหว่างการหมัก มีผลทำให้จุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการลดการเจริญลงจึงทำให้การเน่าเสียช้าลง เนื่องจากการผลิตกรดแลคติค กรอินทรีย์อื่นๆ และสารอื่นๆ ที่ทำให้ผักดองมีรสเปรี้ยว และมีกลิ่นรสเฉพาะตัว นอกจากนี้ยังมีผักดองอื่นๆ ได้แก่ หน่อถั่วลิสง ผักบุ้ง หอมแดง เป็นต้น (วิลาวัณย์, 2536) ซึ่งผักดองเหล่านี้มักผลิต และจำหน่ายกันเฉพาะถิ่นที่ผลิตหรือทำไว้เพื่อบริโภคเอง (อรพิน,2526)

ผักกาดดอง

ภาพที่ 2.1 ผักกาดดอง (Leaf mustard)

ผักกาดดอง (Leaf mustard) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Brassica juncea* เป็นพืชในตระกูล Cruciferae การค้นคว้าศึกษาเกี่ยวกับการดองนั้นมีน้อยมาก กรรมวิธีต่างๆ ที่ชาวบ้านทำกันโดย นำผักกาดเขียวปลี มาตัดเอาส่วนเสียหรือไม่ต้องการทิ้งล้างน้ำให้สะอาดนำไปผึ่งแดดบนกะโล่จนผักเหี่ยวไว้ 2-3 ชม. เมื่อผักเหี่ยวบรรจุใส่ภาชนะสำหรับหมัก เติมน้ำเกลือที่มีความเข้มข้น 3-5% ลงไปให้ท่วมผัก จากนั้นใช้ของหนักทับไว้ให้ผักจมใต้น้ำเกลือ หมักทิ้งไว้นาน 1-2 สัปดาห์ หรือทิ้งไว้ 12 ชม. จะมีน้ำออกจากผักเกลือนี้ ทำการเทน้ำผักออกแล้วเติมน้ำตาลลงไป 3% หรือบางครั้งจะใช้ข้าวแทนน้ำตาล ปล่อยให้มีการหมัก เกิดขึ้นที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3-5 วัน

มิ่งขวัญ (2518) ได้ทำการดองผักกาดเขียวโดยใช้ปริมาณเกลือ 50-100 กรัม น้ำตาลหรือข้าว 60 กรัม น้ำ 1-2 ลิตรต่อผัก 1 กิโลกรัม ผลปรากฏว่าผักดองที่จะนำมารับประทานต้องใช้เวลาหมักเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ซึ่งจะมีปริมาณกรดแลคติคเกิดขึ้น 0.7 % ส่วนผักที่ดองด้วยเกลืออย่างเดียวต้องใช้เวลาหมักนานถึง 108 ชั่วโมง โดยพีเอชลดลงจนถึงพีเอช 3-4 ชนิดของจุลินทรีย์ที่พบในการหมักพบว่าเป็นแบคทีเรียแลคติคชนิด Homofermentative และ Heterofementative โดยเมื่อเริ่มหมัก จะพบแบคทีเรียส่วนใหญ่เป็นชนิด Heterofementative rod ได้แก่ *Lactobacillus sp.* และ *L. brevis* การหมักในระยะต่อมาจะพบแบคทีเรีย Homofermentative *cocci.* ได้แก่ *Pediococcus cerevisiae* ส่วนในช่วงหลังของการหมักจะพบ Heterofementative rod ได้แก่ *L. plantarum*

หน่อไม้ดอง

ภาพที่ 2.2 หน่อไม้ดอง

หน่อไม้ดองเป็นผลิตภัณฑ์ผักดองอีกชนิดหนึ่งของไทย ซึ่งได้จากการนำหน่อไม้อ่อนของไผ่สีสุกที่มีชื่อวิทยาศาสตร์ *Bambusa bermanica* หรืออาจใช้ *Bambusa arundinaced*

การผลิตหน่อไม้ดองมี 2 วิธี คือ วิธีแบบชาวบ้าน และวิธีปรับปรุงแล้วดังนี้ (ณรงค์, 2531)

1) วิธีแบบชาวบ้าน การผลิตเริ่มจากการนำหน่อไม้สดมาปอกเปลือก ล้างให้สะอาด แล้วหั่นเป็นชิ้นบางๆ นำไปหมักเกลือ โดยใช้เกลือประมาณร้อยละ 10 ของน้ำหนักหน่อไม้ จากนั้นหมักทิ้งไว้ 1 คืน บีบเอาน้ำออก ในกรณีที่หน่อไม้มีความขมน้อยไม่จำเป็นต้องหมักเกลือทิ้งไว้ 1 คืน 1 สามารถนำหน่อไม้สดมาหมักได้ทันที โดยบีบน้ำออกและใส่เกลือลงไปหมักโดยตรงโดยใช้เกลือร้อยละ 2.5 ของน้ำหนักหน่อไม้ แล้วอัดใส่ลงในภาชนะสำหรับหมัก ใส่แป้งหรือน้ำซาวข้าวประมาณร้อยละ 7 ของน้ำหนักหน่อไม้ลงไปพอท่วม (กรมวิทยาศาสตร์บริการ, 2527) ทับหน่อไม้ให้จมน้ำตลอดเวลา ใช้เวลาหมักประมาณ 10-15 วัน จะได้หน่อไม้ที่มีรสเปรี้ยว นำมารับประทานได้ (พรรณราย, 2530) สำหรับการผลิตหน่อไม้ดองจากหน่อไม้สดมักมีปัญหาอยู่เสมอ บางครั้งพบว่าหน่อไม้ไม่เปรี้ยว โดยเฉพาะหน่อไม้ที่เก็บไว้นานทั้งนี้เนื่องจากคาร์โบไฮเดรต โดยเฉพาะน้ำตาลเหลืออยู่น้อย การเจริญของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการหมักจึงเจริญได้ช้า ทำให้หน่อไม้มีกลิ่นผิดปกติก่อนเกิดกรดแลคติคและมีสีคล้ำ ถึงแม้จะมีน้ำซาวข้าวอยู่ด้วย จุลินทรีย์ไม่สามารถใช้คาร์โบไฮเดรตจากข้าวเป็นอาหารโดยตรง ต้องใช้เวลามากในการปรับตัว อย่างไรก็ตามหน่อไม้ก่อนนำไปหมัก คาร์โบไฮเดรตในหน่อไม้จะเปลี่ยนไปเป็นน้ำตาลมากขึ้น การหมักจะเป็นไปอย่างรวดเร็ว

2) วิธีที่ปรับปรุงแล้ว เริ่มจากการนำหน่อไม้สีสุกมาปอกเปลือก ล้างน้ำให้สะอาด ต้มให้สุก ล้างน้ำหลายๆ ครั้ง หั่นตามขวาง เป็นชิ้นบางๆ หรือสับละเอียดก็ได้ ขึ้นอยู่กับความนิยมของผู้บริโภค นำไปเคล้ากับเกลือโดยใช้เกลือร้อยละ 10 ของหน่อไม้ หมักทิ้งไว้ 2 คืน แล้วนำมาล้าง บีบน้ำออก อัดใส่ภาชนะที่ดองเช่น ขวดปากกว้าง เติมน้ำที่มีแป้งร้อยละ 5 ลงไปพอท่วม กดหน่อไม้ให้จมอยู่ตลอดเวลา หมักไว้ 10 วัน นำมารับประทานได้ หากต้องการรสเปรี้ยวจัดต้องหมักไว้ 15 วัน (จรุงจันทร์ และคณะ, 2510)

Dhavises,G (1972) ได้รายงานว่าความเป็นเป็นกรดด่างในระหว่างการดองหน่อไม้ที่ใช้เกลือ 2 เปอร์เซ็นต์ เริ่มต้นดองจนกระทั่งถึงวันที่ 28 ความเป็นกรดด่างจะเปลี่ยนจาก 5.5 เป็นพีเอช 3.7-3.9 มีกรดแลคติค 0.98-1.16 เปอร์เซ็นต์ ส่วนการดองหน่อไม้ที่ใช้เกลือมากกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ มีกรดแลคติค 3-5 เปอร์เซ็นต์ หากต้องการให้หน่อไม้ดองมีรสเปรี้ยวมากขึ้นจะต้องเพิ่มระยะเวลาในการดอง

มิ่งขวัญ (2518) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการดองหน่อไม้เปรี้ยวมีทั้ง Homofermentatve และ Homofermentative จำนวนและชนิดของแบคทีเรียที่ปรากฏในระยะต่างๆ ของการดองจะแตกต่างจากการดองกะหล่ำปลี (saeurkraut) เล็กน้อย โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการผลิตกรดแลคติคในระยะเริ่มแรกของขบวนการหมักคือ *P. cerevisiae* และ *L. plantarum* ซึ่งพบในช่วงชั่วโมงที่ 6 ของการหมัก ส่วนในระยะสุดท้ายของขบวนการหมักกจะพบ *L. brevis , L. fermenti* และ *L. mesenteriodes.*

ผักเสี้ยนดอง

ภาพที่ 2.3 ผักเสี้ยนดอง

ผักเสี้ยนดองนอกจากจะเป็นอาหารที่รู้จักกันทั่วไปในหมู่คนไทยภาคใต้แล้ว ยังพบว่ายังเป็นที่นิยมรับประทานของชาวมาเลเซีย อินโดนีเซีย และอินเดียด้วย โดยในประเทศมาเลเซียจะเรียกว่า Kerok-mamon ผักเสี้ยนมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า Gynandropsis pentaphylla. การดอง

ผักเสี้ยนจะใช้ระยะเวลาการดองเร็วกว่าการดองผักอื่น โดยใช้เวลาเพียง 36-48 ชั่วโมงเท่านั้น และหากต้องการให้ผักดองที่ได้มีรสเปรี้ยวพอเหมาะต้องนำมาใส่สารยังยั้งการเจริญแบคทีเรียแลคติค เป็นต้น มิเช่นนั้นผักดองจะมีรสเปรี้ยวมากจนไม่สามารถรับประทานได้

กรรมวิธีการดองมีดังนี้ โดยการนำผักเสี้ยนมาเด็ดเอาเฉพาะยอดอ่อน ล้างน้ำให้สะอาด ผึ่งแดด 1-2 ชั่วโมง เมื่อผักเหี่ยวนำมาคลุกกับเกลือ 2-4 เปอร์เซ็นต์ เติมน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจเติมข้าวสาร หรือน้ำซาวข้าว หรือน้ำมะพร้าวลงไป เพื่อเพิ่มแหล่งคาร์บอนให้จุลินทรีย์ เนื่องจากผักเสี้ยนไม่มีสารอาหารคาร์โบไฮเดรตเพียงพอที่จุลินทรีย์จะใช้แปรเปลี่ยนเป็นกรดแลคติค (วิลาวัณย์, 2536) จากนั้นนำมาบรรจุภาชนะสำหรับหมัก จากนั้นใช้ของหนักๆทับไว้ เพื่อให้ผักเสี้ยนจมอยู่ใต้น้ำเกลือ ทำการหมักที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 วัน จะได้ผักเสี้ยนที่เหมาะกับการรับประทานนั้นจะมีพีเอชระหว่าง 3.7-3.95 และเปอร์เซ็นต์ กรดแลคติคไม่เกิน 1.1-1.2 เปอร์เซ็นต์ (Dhavises,1972)

จุลินทรีย์ที่พบในระหว่างการดองผักเสี้ยนนี้พบว่ามีทั้ง และ Homofementative และ Heterofementative bacterai ส่วนใหญ่เป็นจุลินทรีย์ชนิดเดียวกับที่พบในการดองหน่อไม้ (Dhavises, 1972)

สะตอดอง

ภาพที่ 2.4 สะตอดอง

วิธีการดองส่วนใหญ่ไม่แพร่หลายมากนัก จะทำขายหรือรับประทานกันเองในหมู่ชาวบ้านแถบภาคใต้ จากการสอบถามชาวบ้านถึงกรรมวิธีการดองมีดังนี้ คือ นำสะตอที่แกะออกจากฝัก โดยยังมีเยื่อขาว ๆ ติดกับเม็ดสะตอ จากนั้นนำมาล้างให้สะอาด ลวกน้ำร้อนเดือด ๆ 1 ครั้ง นำไปบรรจุใส่ภาชนะหมักให้แน่น ละลายเกลือในน้ำซาวข้าว นำไปเทใส่ในสะตอ พยายามให้สะตอจมน้ำเกลือตลอดเวลา หมักทิ้งไว้ประมาณ 7-10 วันจะได้สะดองดองที่มีรสเปรี้ยว

สำหรับรายงานการทำผักดองในต่างประเทศเช่นยูโกสลาเวีย (Yugoslavia) Pederson และ Albery (1969) ได้เปรียบเทียบการดองกะหล่ำปลีด้วยน้ำเกลือ 2 วิธี โดยวิธีการดองเป็นหัวและเป็นชิ้น พบ *L. mesenteroides* และ *L. brevis* ในกะหล่ำปลีเป็นชิ้นมากกว่ากะหล่ำปลีเป็นหัว

Etchells และคณะ (1968) ทำการศึกษาการดองผลโอลิฟด้วยการใช้เชื้อบริสุทธิ์ของ *L. plantarum* หรือ *L. brevts* หรือ *Pediococcus cerevisiae* หรือ *Leuconostoc* พบว่าเชื้อ *L. plantarum* มีความสามารถในขบวนการหมักมากที่สุด (ระดับสูงสุดของการผลิตกรดคือ 1.0-1.2 เปอร์เซ็นต์)

ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการดอง

เนื่องจากผักสดที่นำมาดองยังคงมีกิจกรรมของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงทางเคมีและทางกายภาพของผักในขณะที่ผักนั้นแก่เต็มที่ (Mature) ระกอบกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนมากับผักจะทำให้ผักเกิดการเน่าเสียได้ อย่างไรก็ดียังมีอีกหลายปัจจัยที่สามารถยับยั้งการเปลี่ยนแปลงอันเนื่องมาจากเอนไซม์หรือการเจริญของจุลินทรีย์ ปัจจัยที่สำคัญ คือ สภาวะแวดล้อมของการดอง เช่น ปริมาณออกซิเจน ปริมาณแกลือ อุณหภูมิ และระยะเวลาในการดอง เป็นต้น (ศิริลักษณ์ สินนชวาลัย, 2525)

1. เกลือ เกลือในทางวิทยาศาสตร์การอาหารนั้น หมายถึง เกลือที่ใช้ในการปรุงอาหาร (Cooking salt หรือ table salt) ซึ่งมีชื่อทางเคมีว่า Sodium chloride (NaCl) เกลือบริสุทธิ์นั้นมีลักษณะสีขาว ผลึกรูปร่างไม่คงที่ แต่จัดว่าเป็นรูปลูกบาศก์ (cubic system) เกลือมีคุณสมบัติในการดูดความชื้น (Hydroscopic) และจะมีคุณสมบัติในการดูดความชื้นมากขึ้นถ้าเกลือนั้นมีการเจือปนของสารอื่น เช่น calcium ion, magnesium ion, ferric ion และ copper ion เป็นต้น (อรวรรณ ชินตระกูล, 2543)

เกลือที่ได้จากแหล่งหรือบริเวณที่ต่างกัน มีสารปนเปื้อน (Impurities) ที่แตกต่างกัน แหล่งของเกลือที่ได้มามีดังนี้

1. เกลือสมุทร (Solar Salt) มีการผลิตในแถบชายฝั่งติดทะเล โดยการปล่อยให้น้ำทะเลไหลเข้านาแล้วกักไว้ ปล่อยให้ความร้อนจากแสงแดดระเหยน้ำจนเกลือตกผลึก
2. เกลือสินเธาว์ (Rock Salt) เป็นการทำเหมืองเกลือจากผลึกเกลือที่จับตัวเป็นก้อนเกลือขนาดใหญ่ตามธรรมชาติที่เรียกว่า ส่าดิน การสกัดผลึกเกลือจากส่าดิน ทำโดยให้น้ำละลายออกมาหรือสกัดเป็นรูปหินและเกลือก็ได้ เกลือนี้มีมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ แต่มีข้อเสียคือ ขาดธาตุไอโอดีน
3. Salt Lacks เป็นลักษณะของทะเลสาบหรือบางส่วนของน้ำทะเลที่ถูกปิดกั้นไว้ และความร้อนจากแสงแดดระเหยน้ำไปเรื่อย ๆ จนความเข้มข้นของเกลือสูง หรือมีเกลือสินเธาว์อยู่สูงตามแนวแถบนั้น และเกิดการชะล้างออกมาสะสมในแหล่งน้ำจนมีความเข้มข้นเกลือสูง และน้ำนี้จะถูกสูบไปสกัดเกลือโดยการระเหยน้ำออก
4. Brinc Wells เป็นการนำเกลือจากใต้พื้นดินที่มีชั้นเกลือสินเธาว์เกาะกัน และฝังตัวอยู่ ซึ่งการนำมาใช้สามารถทำได้โดยการใช้น้ำลงไปละลายแล้วสูบขึ้นมา

บทบาทของเกลือ (Adam and Moss, 2002)

1. เกลือช่วยยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์บางชนิดที่ปนเปื้อนในผักดองตามธรรมชาติ เช่น แบคทีเรียจำพวก Pseudomonad ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ผลิตภัณฑ์เน่าเสีย จึงทำให้แบคทีเรียแลกติกซึ่งทนเกลือเจริญได้ดีขึ้น
2. ความเข้มข้นของเกลือภายนอกที่สูงกว่าภายในผัก ส่งผลให้น้ำ แร่ธาตุ น้ำตาลของผักแร่ออกมาละลายอยู่ในน้ำเกลือซึ่งเป็นอาหารให้แบคทีเรียแลกติกเจริญ สร้างกรดและเกิดการหมัก
3. ช่วยให้ผลิตภัณฑ์กรอบ โดยการยับยั้งเอนไซม์ pectinase และ cellulose ที่จะย่อยสลาย pectin และ cellulose อันจะมีผลทำให้ผลิตภัณฑ์นิ่ม
4. ช่วยให้ผลิตภัณฑ์มีรสชาติดีขึ้น

2. อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยที่สำคัญเนื่องจากอุณหภูมิมีบทบาทต่อการเร่งหรือการยับยั้งการเจริญของจุลินรีย์ เช่น การศึกษาการหมักโคจูจางที่อุณหภูมิ 32 และ 37 องศาแซลเซียส พบว่ายีสต์และจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกที่อุณหภูมิ 37 องศาแซลเซียส มีจำนวนสูงกว่าอุณหภูมิการหมักที่ 32 องศาแซลเซียส (บุษยา บุนนาค, 2532) และอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการดองเปรี้ยวอยู่ระหว่างอุณหภูมิ 20 - 24 องศาแซลเซียส ที่อุณหภูมิที่สูงหรือต่ำกว่านี้แบคทีเรียแลกติกเจริญได้ช้า สร้างกรดน้อย ทำให้ผักดองมีกลิ่นรสที่ผิดปกติผลิตภัณฑ์ที่ได้มีคุณภาพต่ำ (ศิริลักษณ์ สินนชวาลัย, 2525)

3. ระยะเวลาของการหมัก

ระยะเวลาของการหมักนอกจากจะมีผลต่อการเจริญของกแบคทีเรียแลกติกแล้ว ยังมีผลต่อคุณสมบัติของผักดอง ได้แก่ คุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และสารระเหย โยระยะเวลาในการหมักจะขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่น ๆ เช่น ความเข้มข้นของเกลือและอุณหภูมิของการดอง เป็นต้น

4.จุลินทรีย์

ผักและผลไม้ตามธรรมชาติจะมีจุลินทรีย์ปะปนอยู่ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้จะมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการหมัก เช่น แบคทีเรีย ราและยีสต์ จุลินทรีย์ที่มีบทบาทมากที่สุดคือ แบคทีเรียแลกติก แบคทีเรียแลกติกเป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในวงศ์ Lactobacillaceae รูปร่างเซลล์เป็นแท่งหรือกลม พบอยู่เดี่ยว ๆ หรือต่อกันเป็นโซ่ ไม่เคลื่อนที่ ติดสีแกรมบวก เป็น anaerobe หรือ facultative ต้องการสารอาหารที่เป็นสารอินทรีย์ ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการใช้คาร์โบไฮเดรตส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก (Seppo and Atte, 1993)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องในการดอง

ในกระบวนการดองที่ต้องมีการเปลี่ยนแปลงน้ำตาลในผักผลไม้ให้เป็นกรดแลคติกจะเป็นแบคทีเรียที่อยู่ใน family Lactobacteriaceae ซึ่งใน family นี้จะมีอยู่ 5 genus ได้แก่ *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Diplococcus* sp., *Leuconostoc* sp. และ *Lactobacillus* sp.

แบคทีเรียเหล่านี้เป็นแกรมบวก สร้างสปอร์ไม่ได้ ต้องการวิตามินบีรวมและกรดอะมิโนในการเจริญ ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีปริมาณกรดอะซิติกเข้มข้นเกินกว่า 3 - 6 % และหากต้องการให้แบคทีเรียในกลุ่มนี้ทำให้กระบวนการหมักได้รวดเร็วขึ้น สามารถทำได้โดยการเพิ่มปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ในระบบ สามารถแบ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้แก่

1. **Homofermentative** เป็น กลุ่มที่ใช้น้ำตาล 85 - 95 % ในการผลิตกรดแลคติกเพียงอย่างเดียว ส่วนที่เหลือจะนำไปสร้างพลังงาน และสารประกอบที่ระเหยได้ (volatile compound) ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Streptococcus faecalis Pediococcus cerevisiae*

2. **Hermentative** เป็นกลุ่มที่ใช้น้ำตาลประมาณ 50 % ในการผลิตกรดแลคติก อีก 25 % ใช้ในการผลิตกรดอะซิติกและเอธานอล ส่วนที่เหลือจะใช้ผลิตก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างแบคทีเรียในกลุ่มนี้ได้แก่ *Leuconostoc mesenteroides , Leuconostoc fermenti*

อาหารหมักดองจะมีกรด เป็นตัวควบคุมการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการ ปริมาณกรดในการเจริญที่แตกต่างกัน สุดท้ายผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองที่ได้จะ มีเฉพาะแบคทีเรียชนิดที่ทนกรดสูงเท่านั้น จากนั้นสภาวะที่เป็นกรดที่สูงมากขึ้น จะเป็นตัวทำลายตัวเองในภายหลัง จึงมียีสต์และราที่ทนกรดเจริญต่อไป โดยรา จะสามารถใช้กรดได้ ส่วนยีสต์จะผลิตสารที่เป็นด่างทำให้สภาวะ ความเป็นกรดลดลงจนถึงระดับที่แบคทีเรียทำงานต่อไปได้

การเปลี่ยนแปลงทางเคมีในกระบวนการดอง

อาหารหมักดองจะเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้ลักษณะ เนื้อสัมผัส ลักษณะปรากฏ และกลิ่นรสของอาหารเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ผู้บริโภค ยอมรับได้ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอาจเกิดขึ้นเนื่องจากการทำงานของเชื้อจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะใช้เอนไซม์ที่อยู่ในเซลตัวเองย่อยสลายสารอาหารต่างๆ เช่น คาร์โบไฮเดรต โปรตีน และไขมัน จนได้เป็นสารประกอบที่รวมกัน เป็นกลิ่นรสที่ดีและสร้างความแปลกใหม่ให้กับอาหาร

ตัวอย่างการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของอาหารที่เกิดจากจุลินทรีย์ในกระบวนการหมัก

น้ำตาล + *Streptococcus* spp. ⟶ กรดแลกติก (นมเปรี้ยว, ผักผลไม้ดอง)

น้ำตาล + *Saccharomyces* spp. ⟶ (ยีสต์) อัลกอฮอล์ + แก๊ส (ไวน์)

อัลกอฮอล์ + ออกซิเจน + *Acetobacter* spp. ⟶ กรดน้ำส้ม + น้ำ (น้ำส้มสายชู)

ปัจจัยที่ช่วยในการหมักดอง ได้แก่ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจน อุณหภูมิ ปริมาณเกลือ และเชื้อตั้งต้น ซึ่งเมื่อปัจจัยเหล่านี้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม จะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้เต็มที่ และผลิตเอนไซม์ในปริมาณที่พอเพียงใน การทำปฏิกิริยาเคมีกับอาหาร ทำให้การดองดำเนินไปได้อย่างรวดเร็ว จนได้ผลิตภัณฑ์อาหารหมักดองที่มีคุณภาพ เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค

กระบวนการดอง

กระบวนการดองมีสิ่งที่สำคัญในการทำลายยีสต์ เชื้อรา และแบคทีเรียที่จะทำให้ผลิตภัณฑ์เสื่อมเสีย หรือยับยั้งการทำงาน ของเอนไซม์ที่ทำให้เกิดผลต่อสีและกลิ่นรสของผักดอง กระบวนการดองจะแตกต่างกันตามวัตถุดิบที่ใช้ดอง แต่โดยทั่วๆ ไปจะมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

รายละเอียดแต่ละขั้นตอน

1. ผักที่ใช้ในการดองควรมีลักษณะที่เหมาะสมในการดอง เช่น เนื้อแน่น สด สะอาด ปราศจากตำหนิหรือรอยช้ำ รูปร่างขนาดพอเหมาะ ไม่มีร่องรอยของเชื้อรา และไม่เคลือบ wax เนื่องจากน้ำดองไม่สามารถทะลุผ่าน wax จนทำ ให้ผักดองกรอบได้ หากจำเป็นต้องใช้จริงๆ ควรหั่นให้เป็นชิ้นๆ ก่อนการดอง นอกจากนี้หากต้องการให้ผักดองมีคุณภาพดีควรนำผักมาดองมาทำการ ผลิตทันที หรือภายใน 24 ชั่วโมงหลังการเก็บเกี่ยวโดยเก็บรักษา ในห้องเย็นหรือเก็บไว้ในที่เย็นและอากาศถ่ายเทได้ดี

2.การคัดเลือก ควรมีการคัดแยกผักที่เน่า แตก หรือนิ่มและออกเสียก่อน จากนั้นจึงคัดเลือกขนาดที่เหมาะสมในการดองเพิ่มเติม

3.การทำความสะอาด ควรทำความสะอาด เพื่อกำจัดดินที่ติดมากับผัก ซึ่งเป็นแหล่งของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุทำให้ผักดองที่ได้ไม่กรอบ

4. กระบวนการเตรียมวัตถุดิบ นอกเหนือจากการทำความสะอาดแล้ว ผักบางชนิดจะต้องมีการตัดแต่ง และหั่นให้มีรูปร่างตามต้องการก่อนการดอง นอกจากนี้ผักดองบางชนิดที่ต้องการให้มีความกรอบมากกว่าปกติอาจต้องเพิ่มขั้นตอน ในการแช่ผักในปูนขาว ส่วนปูนขาวจะใช้ชนิดที่ใช้สำหรับอาหาร ก่อนแช่ต้องทำให้ ผักเปียกเล็กน้อยเพื่อทำให้กรอบมากขึ้น จากนั้นนำมาแช่ในสารละลายปูนขาว (1/4 – 1/2 ถ้วยต่อน้ำ 1 แกลลอน) ข้ามคืน (สำหรับแตงกวา) จากนั้นล้างน้ำ และแช่ผักผลไม้ในน้ำสะอาด 1 ชั่วโมง ล้างและแช่ซ้ำอีกรอบ เพื่อให้แน่ใจว่า ปริมาณปูนขาวที่เหลืออยู่ในผักไม่เกินกว่าระดับที่เป็นอันตรายต่อร่างกาย

5. บรรจุขวด บรรจุผักในขวดปากกว้างที่ทำจากดิน แก้ว หรือพลาสติกเกรดที่ใช้กับอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ไม่ควรบรรจุในภาชนะที่ทำจาก Aluminum , Copper , Brass , Galvanized หรือ Iron เพราะวัสดุเหล่านี้สามารถ เกิดปฏิกิริยากับกรดหรือเกลือ ทำให้ผลิตภัณฑ์ผักดองมีสีที่ไม่ดี โดยทั่วไปภาชนะ ในการดองขนาด 1 แกลลอนจะสามารถใส่ผักสดได้ประมาณ 5 ปอนด์ การบรรจุ ไม่ควรบรรจุมากเกินไป เนื่องจากจะทำให้น้ำดองล้นออกจากขวดในระหว่างการ ให้ฆ่าเชื้อ ซึ่งจะทำให้เกิดคราบติดที่บริเวณขอบปากขวด ทำให้ปิดขวดไม่สนิท แต่หากบรรจุน้อยเกินไป จะทำให้ไม่สามารถไล่อากาศออกให้หมด

6. เทน้ำดองลงในภาชนะ น้ำดองที่ใช้จะมีส่วนผสมดังนี้

6.1 เกลือ ใช้เม็ดเกลือที่บริสุทธิ์เกรดที่ใช้ในการผลิตอาหาร ควรเป็นเกลือที่ไม่ได้เติมไอโอดีน เพราะไอโอดีนจะยับยั้งกระบวนการหมักของแบคทีเรีย

6.2 น้ำตาลที่ใช้อาจเป็นน้ำตาลจากอ้อยหรือหัวบีท ควรใช้น้ำตาลทรายขาวเพื่อให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีอ่อนใส ส่วนน้ำตาลทรายแดงจะทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีสีคล้ำมาก ขึ้นแต่กลิ่นรสแรง สามารถใช้น้ำผึ้งเป็นสารให้ความหวานได้ แต่เนื่องจากมีความหวานมากกว่าน้ำตาล จึงควรใช้ในปริมาณเพียง 1/4 ของน้ำตาลเท่านั้น

6.3 เครื่องเทศ ใช้ของสด เพื่อกลิ่นรสและคุณภาพที่ดี ไม่ควรใช้เครื่องเทศที่ผ่านการบดละเอียด เนื่องจากจะ ทำให้ผลิตภัณฑ์มีสีคล้ำ จึงควรใช้เครื่องเทศที่เป็นชิ้นๆ บรรจุในถุงผ้าขาวบางผูกปากที่สามารถนำออกก่อนบรรจุน้ำดองใส่ในขวดดองได้

6.4 น้ำ น้ำที่ใช้ต้องสะอาด ไม่เป็นน้ำกระด้าง ปราศจากสิ่งเจือปน โดยเฉพาะสารประกอบของเหล็ก ซึ่งจะทำให้ผักดองมีสีคล้ำ

6.5 สารส้ม ใช้ในการเพิ่มความกรอบ ให้ใช้สารส้ม 1/8 ช้อนชา ต่อโหลขนาด 1 ควอทซ์

6.6 อื่นๆ เช่น กรดซิตริก วัตถุกันเสียพวกโซเดียมเบนโซเอต

น้ำดองที่ได้จะใสไม่มีตะกอน และควรนำไปต้มเดือดที่อุณหภูมิประมาณ 170-180 0 F (76-82.2 ° C) ทิ้งให้อุ่น ก่อนนำมาเทจนท่วมผักผลไม้ประมาณ 1-2 นิ้ว ควรใช้ไม้พลาสติก กวนภายในขวดหลังบรรจุเพื่อไล่ฟองอากาศออก เช็ดปากขวดด้วยผ้าสะอาด ปิดปากขวดด้วยจุกไม้คอร์ก หรือฝาให้สนิท เก็บรักษา ตลอดระยะเวลาการเก็บ จะเกิดการหมักดองอย่าง ค่อยเป็นค่อยไป โดยระยะเวลาในการดองที่เหมาะสมจะขึ้นกับ ชนิดของผัก รวมทั้งความต้องการทางด้านรสชาติของผู้บริโภค

การฆ่าเชื้อ

หลังจากดองได้ที่แล้วจะนำผลิตภัณฑ์มาให้ความร้อน เพื่อหยุดกระบวนการหมักและทำลายแบคทีเรียที่จะทำให้เกิดการเสื่อมเสียของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากผลิตภัณฑ์มีความเป็นกรดสูงจึงใช้ความร้อนในระดับพาสเจอร์ไรซ์เท่านั้น วิธีการทำคือการวางภาชนะบรรจุผักดองในอ่างน้ำร้อนอุณหภูมิ 120-140 F เติมน้ำร้อนในอ่างน้ำร้อนให้มีระดับสูงกว่าระดับของขอบบนภาชนะ 1 นิ้ว เพิ่มอุณหภูมิของน้ำร้อนจนถึง 180-185 F จึงเริ่มจับเวลา ใช้เวลาในการฆ่าเชื้อนาน 30 นาที จึงนำขวดออกจากอ่างน้ำทันที

การให้ความร้อนของผักดองก่อนการบรรจุจะเรียกว่า Hot pack แต่ยังมีอีกวิธีหนึ่งคือการให้ความร้อนหลังบรรจุ โดยการแบ่งบรรจุทั้งผักและน้ำดองในขวดก่อนการฆ่าเชื้อ ซึ่งเรียกว่า Raw pack ระยะเวลาที่ใช้ในการฆ่าเชื้อของทั้งสองวิธีเป็นไปตามตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 วิธีการการฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์

การฆ่าเชื้อผลิตภัณฑ์ในน้ำเดือด

วิธีการบรรจุ	ขนาดของภาชนะบรรจุ	เวลาในการฆ่าเชื้อ (นาที)
Hot pack	Pints	10
	Quarts	15
Raw pack	Pints	20

การเปลี่ยนแปลงอันเนื่องจากจุลินทรีย์ระหว่างการหมัก

สำหรับการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักสามารถสรุปได้เป็น 4 ระยะ (Fleming, 1991)

1. ระยะเริ่มต้น (initiation stage) จุลินทรีย์ที่พบในช่วงนี้ได้แก่ จุลินทรีย์ทั่วไปที่ปนมากับผักและผลไม้ ซึ่งมีทั้งยีสต์ รา และแบคทีเรีย แบคทีเรียมีทั้งพวกแกรมบวกและแกรมลบ แต่จะพบแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติกมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติกมากกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่น ซึ่งแบคทีเรียกลุ่มนี้จะสร้างกรดทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำเกลือลดลงและมีผลในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น
2. ระยะแรก (primary fermentation stage) ขั้นนี้เกี่ยวข้องกับแบคทีเรียกลุ่มที่สร้างกรดแลคติก โดยการหมักจะดำเนินไปจนกระทั่งค่า pH ลดต่ำลงเพียงพอที่จะยับยั้งการเจริญของกลุ่มแบคทีเรียแลคติกเอง
3. ระยะที่สอง (secondary fermentation stage) หลังจากที่แบคทีเรียแลคติกหยุดการเจริญเนื่องจากทนสภาวะกรดสูงไม่ได้ (ซึ่งกรดดังกล่าวเป็นกรดที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้นเองจนค่าพีเอชลดต่ำลงมากเกินไป) ขณะที่คาร์โบไฮเดรตบางส่วนที่ละลายในน้ำเกลือยังเหลืออยู่ ทำให้ fermentative yeast สามารถเจริญมาแทนที่และใช้คาร์โบไฮเดรตที่เหลือเป็นแหล่งพลังงาน รวมทั้งใช้กรดแลคติกที่ถูกสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในช่วงแรกของการหมัก ทำให้ปริมาณกรดลดลง จากการเจริญและสารต่าง ๆ ที่ยีสต์สร้างขึ้นทำให้สี กลิ่น รส และเนื้อสัมผัสของผลิตภัณฑ์มีคุณภาพด้อยลง
4. ระยะหลังการหมักดอง (post-fermentation stage) จะพบจุลินทรีย์ซึ่งรวมทั้งแบคทีเรีย รา และฟิล์มยีสต์ ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการเน่าเสีย โดยยีสต์และราจะเจริญเป็นฝ้าอยู่บนผิวหน้าอาหารหมัก จะพบลักษณะดังกล่าวได้ในการดองผักหรือผลไม้ในถังเปิดเท่านั้น การดองในถังปิดจะไม่พบจุลินทรีย์พวกนี้หรือพบน้อยมาก แบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทในกระบวนการหมัก นอกจากผักและผลไม้ดองแล้ว แบคทีเรียแลคติกยังมีบทบาทในกระบวนการหมักอาหารอื่น ๆ เช่น อาหารประเภทนม เนื้อ และเครื่องดื่ม กระบวนการหมักของแบคทีเรียแลคติกจะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลง

ของกลิ่น รส เนื้อสัมผัส และที่สำคัญทำให้สามารถเก็บผลิตภัณฑ์นั้นได้นานมากขึ้น (มก., 2543)

Kyung Young และคณะ (2004) ได้ศึกษาการหมักน้ำหัวบีทแดง จากแบคทีเรียแลคติก 4 ชนิด คือ *Lactobucillus acidophilus, Lactobacillus casei. Lactobacillus delbrueckii* และ *Lactobacillus plantarum* พบว่า *Lactobacillus delbrueckii* และ *Lactobacillus plantarum* สามรถผลิตกรดแลคติกได้ดีกว่า *Lactobucillus acidophilus* และ *Lactobacillus casei* ที่อุณหภูมิการหมัก 30 องศาเซลเซียสโดยมีค่า pH เริ่มต้นในการหมักเท่ากับ 6.3 จากนั้นค่า pH ลดลงมาที่ 4.5 หลังผ่านการหมักไป 48 ชั่งโมง และเมื่อเก็บรักษาน้ำหมักหัวบีทแดงไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าแบคทีเรียแลคติกมีปริมาณลดลงตลอดระยะเวลาการเก็บ

Chorianopoulos และคณะ (2005) ศึกษาการหมักผลมะกอกโดยใช้ *Lactobacillus plantarum* เป็นหัวเชื้อ โดยเติมน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน คือ เข้มข้นร้อยละ 0.1 , 0.3 , 0.5 และ 1 (w/v) พบว่าการดองที่เติมน้ำตาลกลูโคสเข้มข้นร้อยละ 0.5-1 มีอัตราการสร้างกรดสูง (ร้อยละ 0.35-0.37) และการหมักที่ใส่หัวเชื้อค่า pH จะลดลงมากกว่าชุดที่ไม่ใส่หัวเชื้อ

Dayun และ Xiaolin (2008) ศึกษาการตองผักกาดเขียวปลีที่เกลือเข้มข้นต่าง ๆ กัน คือ ร้อยละ 5,8,10 ที่ไม่มีการใส่หัวเชื้อและที่ความเข้มข้นเกลือร้อยละ 5 ที่มี *Bacillus coagulans* B179 เป็นหัวเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 15-23 องศาเซลเซียส พบว่าการหมักที่เกลือเข้มข้นร้อยละ 5 มีค่า pH ลดลงเร็วและมีปริมาณกรดสูงกว่าที่การหมักเกลือเข้มข้นร้อยละ 8 และ 10 ตามลำดับ และเมื่อเทียบการดองที่เกลือเข้มข้นร้อยละ 5 ที่ใส่หัวเชื้อ พบว่าชุดดองที่ใส่เชื้อจะเกิดการหมักที่เร็วและใช้เวลาน้อยกว่าชุดการดองที่ไม่ใส่หัวเชื้อ ส่งผลให้ค่า pH ต่ำกว่าและมีปริมาณกรดสูงกว่า

2.3 การเก็บรักษา

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์จำเป็นต้องเลือกสภาวะที่เหมาะสมเพื่อให้สามารถเก็บรักษาได้นาน อีกทั้งคงคุณภาพอาหารให้เป็นไปตามที่ต้องการ วิธีการต่าง ๆ ที่ใช้ในการถนอมอาหาร ได้แก่ การรักษาให้ปลอดเชื้อ การขจัดจุลินทรีย์ออกไป การทำให้มีสภาวะไร้ออกซิเจน การใช้ความร้อน การใช้ความเย็น การทำแห้ง การใช้สารเคมี หรือการฉายรังสี เป็นต้น (Chris et al., 2005)

การบรรจุภัณฑ์ปรับสภาพบรรยากาศ หมายถึง การบรรจุผลิตภัณฑ์ในอยู่ภายใต้บรรยากาศที่มีอัตราส่วนของก๊าซแตกต่างไปจากบรรยากาศปกติ (ออกซิเจน 21% , ไนโตรเจน 79% และคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03%) และอัตราส่วนนี้อาจเปลี่ยนแปลงได้ตามระยะเวลา โดยขึ้นกับชนิดของผลิตภัณฑ์บรรจุ อัตราส่วนก๊าซเริ่มแรก วัสดุที่ใช้ และสภาวะการเก็บผลิตภัณฑ์นั้นๆ การใช้บรรจุภัณฑ์ปรับสภาพบรรยากาศนั้นมีเป้าหมายหลักเพื่อชะลอหรือป้องกันการเสื่อมเสียคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหาร (งามทิพย์ ภู่วโรดม, 2537) การเลือกก๊าซในบรรจุภัณฑ์ใต้สภาพปรับบรรยากาศนั้นขึ้นกับชนิดของอาหาร ซึ่งก๊าซที่ใช้กันทั่วไปในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพปรับบรรยากาศ ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน และไนโตรเจน

2.3.1 ปัจจัยที่มีผลต่ออายุการเก็บรักษา

การเก็บรักษาผลิตภัณฑ์ภายใต้สภาพปรับบรรยากาศจำเป็นต้องเลือกสภาวะที่เหมาะสมเพื่อทำหน้าที่ยืดอายุการเก็บรักษาอีกทั้งคงคุณภาพอาหารให้เป็นไปตามที่ต้องการ ปัจจัยที่มีผลต่อการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพปรับบรรยากาศประกอบด้วย

2.3.1.1 สภาพบรรยากาศ

การเลือกก๊าซในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพปรับบรรยากาศนั้นขึ้นกับชนิดของอาหาร ซึ่งก๊าซที่ใช้กันทั่วไปในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพปรับบรรยากาศ ได้แก่ คาร์บอนไดออกไซด์ ออกซิเจน และไนโตรเจน

1) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นก๊าซที่ไม่มีสี มีกลิ่นฉุนเล็กน้อยที่ความเข้มข้นสูง และมีฤทธิ์ในการกัดกร่อนเมื่อละลายน้ำ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ละลายตัวเป็นกรดคาร์บอนิก (H_2CO_3) ซึ่งจะมีผลให้ความเป็นกรดเพิ่มขึ้นและค่า pH ลดลง ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์นี้สามารถละลายได้ในไขมันและสารประกอบอินทรีย์บางชนิด โดยที่การละลายของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะเพิ่มขึ้นเมื่ออุณหภูมิลดลง โดยทั่วไปแล้วอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ใช้ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จะต่ำกว่า 10 องศาเซลเซียส (Coles และคณะ, 2003)

2) ก๊าซออกซิเจน ก๊าซออกซิเจนเป็นก๊าซที่ไม่สีและกลิ่น สามารถละลายน้ำได้เล็กน้อย (0.040 g kg^{-1} ที่ 100kPa, 20°C) ก๊าซออกซิเจนเป็นสาเหตุสำคัญในการเกิดปฏิกิริยาที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียต่าง ๆ เช่น ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมัน ปฏิกิริยาสีน้ำตาล ปฏิกิริยาออกซิเดชันของเม็ดสี อีกทั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียซึ่งต้องการออกซิเจนอันทำให้เกิดอาหารเน่าเสีย ดังนั้นในการลดปริมาณก๊าซออกซิเจนในบรรจุภัณฑ์จะช่วยยืดอายุการเก็บของรักษาของอาหาร (Coles และคณะ, 2003)

3) ก๊าซไนโตรเจน ก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซเฉื่อยต่อปฏิกิริยาเคมี จึงมักนิยมใช้แทนที่ก๊าซออกซิเจน เพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยา และรักษาความดันภายในบรรจุภัณฑ์ไม่ให้ลดต่ำจนเกินไป ลักษณะของก๊าซไนโตรเจนเป็นก๊าซที่ไม่มีสี กลิ่น และรสชาติ มีความหนาแน่นต่ำกว่าอากาศ ไม่ติดไฟ ละลายน้ำน้อยมาก (0.018 g kg^{-1} ที่ 100kPa, 20°C) อีกทั้งก๊าซไนโตรเจนไม่สนับสนุนการเจริญของจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการอากาศ (aerobic bacteria) นอกจากนี้ก๊าซไนโตรเจนสามารถช่วยไม่ได้ผลิตภัณฑ์ยุบตัว เนื่องจากก๊าซชนิดนี้มีคุณสมบัติในการละลายน้ำต่ำ (Coles และคณะ, 2003) ขณะที่แตงกว่าดองที่เก็บในสภาวะที่ไม่ได้ปรับบรรยากาศเก็บได้นานสูงสุดเท่ากับ 10 วัน ที่อุณหภูมิ 7 องศาเซลเซียส

ศรันยา จงอรุณทัพรังสี และอมรรัตน์ สินธุ์เจริญ (2547) ศึกษาการยืดอายุการเก็บของหมูยอย่างโดยใช้การปรับบรรยากาศ คือ 60% CO_2, 80% CO_2 และ 100% CO_2 พบว่าที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส หมูยอย่างมีอายุการเก็บรักษา 2 วัน เมื่อเก็บรักษาภายใต้สภาพบรรยากาศปกติและที่สภาวะ 60% CO_2 ในขณะที่การเก็บหมูยอย่างที่สภาวะ 80% CO_2 และ 100% CO_2 สามารถยืดอายุการเก็บได้นานถึง 16 วัน

Antonios และคณะ (2006) ศึกษาสภาวะการยืดอายุการเก็บ chub mackerel โดยเปรียบเทียบ 3 สภาวะ คือ MAPI (70% CO_2 + 30% N_2) , MAP2 (50% CO_2 + N_2 + 20%O_2) และ vacuum packaging (VP) พบว่า MAP1 เป็นสภาวะที่ยืดอายุ chub mackerel ได้นานที่สุดถึง 20-21 วัน ขณะที่ MAP1 เป็นสภาวะที่ยืดอายุ chub mackerel ได้นานที่สุดถึง 20-21 วัน ขณะที่ MAP2 ยืดอายุการเก็บได้นาน 15-16 วัน และVP สามารถเก็บ chub mackerel ได้นานที่สุด 11 วัน

2.3.1.2 ปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้น

การควบคุมเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นให้มีปริมาณต่ำเป็นสิ่งสำคัญ ซึ่งจะต้องใช้กรรมวิธีการผลิตที่สะอาดและมีสุขลักษณะที่ดี Ooraikul และ Stiles (1991) พบว่าการเก็บรักษาภายใต้สภาพปรับบรรยากาศหากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นมีค่าสูง การเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพปรับบรรยากาศ หากปริมาณเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นมีค่าสูง การเก็บรักษาในบรรจุภัณฑ์ภายใต้สภาพปรับบรรยากาศไม่เกิดประสิทธิภาพ

Hyun-Pa et al. (2004) ศึกษาการยืดอายุการเก็บกิมจิ (Kimchi) ภายใต้การฉายรังสีแกมม่าที่ระดับความเข้มข้น 2.5 , 5 และ 10 kGy จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส พบว่ากิมจิที่ฉายรังสีแกมม่าเข้มข้น 5 และ 10 kGy ตรวจไม่พบยีสต์และราตลอดระยะเวลาการเก็บ 30 วัน แต่ผลทางด้านประสาท สัมผัสพบว่ากิมจิที่ไม่ได้ฉายรังสีแกมม่าหรือฉายที่เข้มข้นต่ำกว่า 5 kGy มีคะแนนการยอมรับสูงกว่ากิมจิที่ผ่านการฉายรังสีที่ความเข้มข้นมากกว่า 5 kGy

2.3.1.3 อุณหภูมิ

อุณหภูมิเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการยืดอายุการเก็บรักษา เช่น การเพิ่มอุณหภูมิขึ้นจาก 5 องศาเซลเซียส เป็น 10 องศาเซลเซียส ในสภาพบรรยากาศที่มีคาร์บอนไดออกไซด์เป็นองค์ประกอบอยู่ร้อยละ 20 จะลดอายุการเก็บรักษาเนื้อวัวสดลงจาก 11 วัน เหลือเพียง 6 วัน (Clark และ Lentz , 1968) นอกจากนี้อุณหภูมิยังมีผลต่อชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญด้วย โดยเนื้อสัตว์ที่บรรจุในบรรจุภัณฑ์ที่มีออกซิเจนต่ำและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -1 องศาเซลเซียส และ 4.4 องศาเซลเซียส จะพบกลุ่มแบคทีเรียที่สามารถสร้างกรดแลคติก แต่เมื่อเพิ่มอุณหภูมิเป็น 10 องศาเซลเซียส เชื้อจุลินทรีย์ที่พบจะเป็นกลุ่ม *Enterobactericeae* และถ้าหากอุณหภูมิในการเก็บสูงกว่า 10 องศาเซลเซียส จุลินทรีย์ที่เจริญมีความหลากหลายมากขึ้น โดยเฉพาะจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (Gill และ Harrison. 1989)

2. แบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria)

ลักษณะโดยทั่วไป

แบคทีเรียแลกติกสามารถย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม หรือเป็นรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์ catalase (Axelson, 1993) สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้าย ในการหมักคาร์โบไฮเดรตได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาล โดยได้จากกระบวนการ substrate – level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามินต่าง ๆ, amino acid, pyrimidine สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน ไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนน้อย อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2- 53 °C อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30- 40 °C ส่วนช่วง pH ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 5.58 – 6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ pH $\leq$ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือเป็นด่าง (Salminen and Wright, 1993)

แหล่งที่พบ

แบคทีเรียแลกติกสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก ทางเดินอาหาร และอวัยวะสืบพันธุ์ (Salminen and Wright, 1993)

ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการอาหารพิเศษหรือเฉพาะในการเจริญเติบโต (Fastidious microorganism) มีความต้องการสารอาหารต่าง ๆ เช่น

คาร์โบไฮเดรต (Salminen and Wright, 1993)

แบคทีเรียแลกติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจาก monosaccharide ประเภท pentose เช่น arabinose, ribose และ xylose เป็นต้น และ hexose เช่น fructose และ mannose disaccharide เช่น maltose trisaccharide เช่น maltotriose polymer เช่น แป้ง

นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตพวก oligosaccharides เช่น raffinose และ fructooligosaccharide เป็นต้น ซึ่งในระบบทางเดินอาหารไม่มีเอนไซม์ย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้

ในกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรตจะได้ผลผลิต 2 แบบ คือ homofermentative ได้กรดแลคติกเพียงอย่างเดียว และ heterofermentative ได้กรดแลคติก กรดอะซิติก หรือ เอทานอล และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ไนโตรเจน (Salminen and Wright, 1993)

แบคทีเรียแลกติกสามารถเติบโตได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารมาก หลายสายพันธุ์ต้องการกรดอะมิโนหลายชนิด และจะเจริญได้น้อยมากหากไม่มีแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโนที่แบคทีเรียแลกติกต้องการ เช่น serine และ arginine เป็นต้น

วิตามิน (Salminen and Wright, 1993)

วิตามินที่แบคทีเรียแลกติกใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ thiamine (B1), riboflavin (B2), pyridoxine (B6), folic acid (B9), cyanocobalamine (B12) และ nicotinic acid โดยที่ *Bifidobacterium infanntis* สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9 และ B12 ได้เป็นจำนวนมาก ส่วน *B. brevis* และ *B. lingum* สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9 และ B12 ได้เป็นจำนวนน้อย และ *B. adolescentis* ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9 และ B12 ได้ นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกบางสายพันธุ์ยังต้องการ nicotinic acid, pantothenic acid, biotin, riboflavin และ folinic acid

ความสำคัญ

Lactobacillus มีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์มาช้านานไม่เพียงแต่ในอาหารเท่านั้นแต่พบว่ายังมีความสำคัญด้านอื่นๆ ด้วย สามารถสรุปความสำคัญได้ดังนี้

1. เพิ่มคุณภาพของอาหารหมัก เพราะความสามารถในการเปลี่ยน lactate ให้เป็น กรดแลกติก จึงเป็นเชื้อที่ช่วยในการหมักพืชผัก ผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และเครื่องดื่มต่างๆ (Tserovska *et al.*, 2002) ทั้งยังสามารถผลิตสารที่ช่วยเพิ่ม กลิ่น รส ให้อาหารหมักได้ด้วย (Hugenholtz *et al.*, 2000)

2. สร้างสารยับยั้งแบคทีเรียอื่นๆ สารยับยั้งได้แก่ กรดอินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ไดอะซิทิล และแบคเทอริโอซิน ซึ่งมีการนำไปใช้ในอาหารอย่างกว้างขวาง (Ko and Ahn, 2000)

3. ควบคุมสมดุลของเชื้อจุลินทรีย์ในระบบทางเดินอาหาร (Suskovic *et al.*, 2001) โดยการ

3.1 ผลิตกรดทำให้ pH ในทางเดินอาหารต่ำลง เชื้อก่อโรคที่ชอบ pH เป็นกลางไม่สามารถเจริญได้ และผลิตสารยับยั้ง ต่างๆ มาทำลายเชื้อในทางเดินอาหารด้วย

3.2 แย่งอาหารจากเชื้อก่อโรค

3.3 แย่งที่จับกับแบคทีเรียก่อโรคบนผนังทางเดินอาหาร

4. กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีรายงานว่า การได้รับแบคทีเรียแลกติกทางปากสามารถกระตุ้นให้ร่างกายผลิต antibody ทั้ง local และ circulatory antibody, gamma interferon, macrophage และ natural killer cells (Herich and Levkut, 2002)

5. ช่วยลดระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือด มีการศึกษาพบว่า คนที่ดื่มนมที่มี *Lactobacillus* ในปริมาณมากระยะหนึ่งพบว่าระดับโคเลสเตอรอลในกระแสเลือดลดลง กลไกการลดอาจเกิดจาก เชื้อมีการใช้โคเลสเตอรอล โคเลสเตอรอลถูกดูดซับอยู่ที่ผนังเซลล์ของ *Lactobacillus* และเชื้อยับยั้งการจับของไขมันกับน้ำดี ทำให้ไขมันถูกย่อยได้น้อยลง (Pereira and Gibson, 2002)

6. ลดความเสี่ยงในการเป็นมะเร็งในลำไส้ ซึ่งยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด แต่อาจเนื่องจากเชื้อไปมีผลในการเปลี่ยนแปลง metabolites ของแบคทีเรียอื่นๆ ในลำไส้ เปลี่ยนแปลงลักษณะทางเคมีและกายภาพของลำไส้ จับและย่อยสลายสารก่อมะเร็งโดยตรง สร้างสารที่ต่อต้านการเกิดก้อนทูมและเซลล์มะเร็ง พร้อมทั้งกระตุ้นให้ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต่อสารก่อมะเร็งเพิ่มมากขึ้น (Rafter, 2002)

3. การจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลกติก

คำนิยามและการจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria : LAB) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะในช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมา ในอดีตนั้นหมายถึงกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้นมเปรี้ยวจากการผลิตกรดซึ่งรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย (Stiles and Holzapfel, 1997) ปัจจุบันถึงแม้ไม่มีนิยามที่ชัดเจนและเป็นเอกฉันท์ แต่พื้นฐานซึ่งยอมรับทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ แบคทีเรียแลกติกจัดอยู่ใน Family Lactobacilaceae เป็นแบคทีเรียแกรม

บวก ไม่สร้างสปอร์ ขาดเอนไซม์คะตะเลส ขาดไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerance) ทนกรด มีทั้งลักษณะรูปร่างกลม ได้แก่ *Lactococcus, Vagococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Tetragenococcos, Streptococcus* และ *Enterococcus* และรูปท่อน ได้แก่ *Lactobacillus, Carnobacterium* และ *Bifidobacterium* แบคทีเรียแลกติกส่วนใหญ่ต้องการออกซิเจนเล็กน้อย (microaerophile) บางชนิดเป็นพวกไม่ต้องการออกซิเจนอย่างยิ่ง (strictly anaerobe) ในการเจริญ ได้พลังงานจากกระบวนการหมัก (fermentation) น้ำตาลชนิดต่าง ๆ โดยเฉพาะน้ำตาลกลูโคสและแล็กโทส มีความต้องการสารอาหารที่สมบูรณ์ (complex medium) ลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียแลกติก คือ ความสามารถในการย่อยน้ำตาลให้เป็นกรดซึ่งทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิด เช่น ผักดอง แหนม เนยแข็ง แบคทีเรียแลกติกโดยเฉพาะในกลุ่ม *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus.* และ *Streptococcus* มีบทบาทในการหมักอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดด้วยกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่าง ๆ ผักและผลไม้ดอง ไส้กรอก และผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่าง ๆ แบคทีเรียกลุ่มนี้ต้องการแหล่งไนโตรเจนในรูปสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ นอกจากนี้ยังต้องการวิตามินและเกลือแร่อีกหลายชนิด ซึ่งความต้องการสารอาหารต่าง ๆ เหล่านี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดและสายพันธุ์ (นภา โล่ทอง, 2534)

Orla – Jensen (1919) เป็นผู้เริ่มจัดอนุกรมวิธานแบคทีเรียแลกติกอย่างเป็นระบบโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ความสามารถในการหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ และชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลกติก โดยแบ่งเป็น 7 สกุลคือ *Betabacterium, Thermobacterium, Streptococcus, Betacoccus Microbacterium* และ *Tetracoccus* ซึ่งต่อมาในปี ค.ศ. 1937 Sherman ได้แยกกลุ่มซึ่งเจริญเฉพาะสภาวะไร้ออกซิเจน (strictly anaerobes) และกลุ่ม pneumococci ออกจากสกุล *Streptococcus* และแบ่งส่วนที่เหลือเป็น 4 กลุ่มคือ pyogenic, viridans, lactic และ enterococci

การจัดจำแนกโดยวิธีข้างต้นมีข้อจำกัด เช่น สภาวะการเจริญ ซึ่งมีผลต่อสัณฐานวิทยาของเซลล์ เช่น *Lactobacillus xylosus* และ *Lb. hordinae* ถูกจัดจำแนกใหม่เป็น *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* และ *Lc. lactis* ssp. *hordiniae* เมื่อใช้ข้อมูลทางพันธุกรรมประกอบ ความ

เปลี่ยนแปลงเมื่อใช้เทคนิคอื่น ๆเช่น ดีเอ็นเอ : อาร์เอ็นเอไฮบริไดเซชั่น การหาลำดับเบสของ 16s และ 23s rRNA

วิธีการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลกติก

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Vuyst และ Vandamme , 1994)

โดยดูรูปร่างเซล การจัดเรียงตัวของเซล ดูการเคลื่อนที่ การย้อมสีแกรม ดูการสร้างแคปซูล แฟลกเจลล่า พบว่าเชื้อจีนัส *Pediococcus, Lactocous, Streptococcus* และ *Enterococcus* พบว่ามีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน สามารถแยกออกจากจีนัสอื่นได้ ในขณะที่เชื้อในจีนัส *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ แต่ *Lactobacillus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยา แตกต่างไปจากเชื้อใจจีนัส *Streptococcus (Lactobacoccus, Enterococcus)* และ *Bifidobacterium* ในทางปฏิบัติพบว่าสภาวะการเจริญและระยะการเจริญของเซล จะมีผลอย่างมากต่อลักษณะรูปร่างของเซล

2. ลักษณะทางสรีระวิทยา (Vuyst และ Vandamme , 1994)

เกี่ยวข้องกับความต้องการออกซิเจน ความเป็นกรดด่าง อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอิออนต่างๆ และ hydrostatic pressure ความแตกต่างระหว่างเชื้อในจีนัส *Lactobacillus* และ *Camobacterium* ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 4.5 หรือบนอาหารแข็งอะซิเตท แต่สามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรดด่าง 9.0 (Hammes และ คณะ,1991) สำหรับการแยกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่มใหญ่ โดยใช้วิธีการทดสอบทางสรีระวิทยาอาจจะไม่เพียงพอ โดยอาจจะต้องใช้การทดสอบอื่นๆ เพิ่มเติม เช่น ดูรูปแบบการหมักคาร์บอนอื่นๆร่วมด้วย

3. รูปแบบการหมักแหล่งคาร์บอน (Vuyst และ Vandamme , 1994)

เป็นวิธีที่ใช้ในการแยกชนิดของแบคทีเรีย โดยแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการใช้สารอาหารแตกต่างกันมาก เราจึงจำแนกเชื้อได้เป็นสายพันธุ์ต่างๆ การศึกษาดูการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่างๆที่ใส่ธาตุอาหารบางอย่างลงไป แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ การเกดกรด การเกิดก๊าซ การเกิดสารบางชนิด เป็นต้น จากวิธีดังกล่าวทำให้สามารถทราบปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซล แต่ละขั้นตอนได้ (Bridge และ Sneath, 1982)

4. Cell Wall Composition (Kandler และ Weiss,1986)

การจำแนกโดยอาศัยลักษณะนี้ จะดูว่ามี หรือไม่มีสาร meso-diaminopimelic acid ในผนังเซล ซึ่งสารตัวนี้ใช้เป็น key characterispic ตรวจสอบได้โดยใช้วิธี thin-alyer chromatography ลักษณะนี้สามารถจำแนกเชื้อจำนวนมากออกเป็นสายพันธุ์ต่างๆได้ (Kandler และ Weiss,1986)

ผนังเซลของแบคทีเรียแกรมบวก ประกอบด้วย peptidoglycan ที่มีกรดอะมีโนชนิดต่างๆ (Schleifre และ Kanbler,1972) และพบว่า peptidoglycan ชนิด Lys-D-Asp จะเป็นลักษณะของเชื้อจีนัส Lacpobacillus ซึ่งองค์ประกอบของ peptidoglycan นี้ ใช้เป็นการที่เร็วที่สุดที่จะจำแนกเชื้อ *L.reuteri* และ *L.fermentum* ออกจากกัน

5. Electrophoretic Mobllity of Lactic Acid Dehydrogenase (Hensel และคณะ, 1977)

วิธี Electrophoretic Mobllity of Lactic Acid Dehydrogenase (LDH) ใน starch gel หรือ polyacrylamide gel (Hensel และคณะ, 1977a) เป็นวิธีที่พบว่ามีประโยชน์ และเชื่อถือได้ในการจำแนกความแตกต่างของสปีซีส์ของเชื้อที่ใกล้เคียงกันมาก เช่น *L.acidophilus, L.gallinarum ,L.gasseir* และ *L.johnsonii* (Fujisawa และคณะ, 1992)

6. SDS-PAGA Of Whole Cell Protein (Pce และคณะ, 1993a)

หลักการของวิธีนี้ คือ เชื้อที่มีสายพันธุ์ต่างกันจะให้รูปแบบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกันทำให้เราสามารถแยกความแตกต่างของแต่ละสายพันธุ์ได้ โดยใช้ sodium dodecylsulpsate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) พบว่าวิธีนี้มีความแน่นอนในระดับสปีชีส์ และ/หรือในระดับ subspecies (Poc และคณะ, 1993a) การจำแนกแลคติกแอซิดแบคทีเรียโดยวิธีนี้สามารถใช้จำแนกเชื้อที่มีปัญหาได้ เช่น *Lactococcus* (Jarris และ Wolff, 1979) L. kefir , L. reuteri (Dicks และ Van Vuren, 1987) และ *Leuconosto* (Barrer และ Wagener, 1990)

การจำแนกเชื้อโดยวิธี SDS-RAGE นี้ จะทำได้ง่าย รวดเร็ว และ เชื่อถือได้ มีประโยชน์ในการจัดกลุ่มของเชื้อที่มีเป็นจำนวนมาก เชื้อที่จำแนกแล้วอาจนำไปทดสอบยืนยันเพิ่มเติมโดยวิธีการทางจีโนไทป์ และฟีโนไทป์ ต่อไปได้

7. Serology (Lancefield, 1993)

เป็นวิธีการที่สำคัญในการแยกและจำแนกเชื้อในจีนัส Streptrococcus Lancefield (1993) ได้จัดแบ่งเป็นกลุ่ม และใช้ตัวอักษรแทนในแต่ละกลุ่มนั้น ๆ กลุ่มแอนติเจนเฉพาะที่มีโพลีแซคคาไรด์อยู่รวมในส่วนของผนังเซลล์ จะเรียกว่า group A, B, C, E, F และ G หรือ ที่มี teichoic acid อยู่ระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์ ผนังเซลล์ชั้นใน (group D และ N) การจำแนกโดยวิธีนี้ ใช้ในการแยกความแตกต่างระหว่าง pathogenic β-haemolytic Streptococci จากโรคติดเชื้อของมนุษย์ และสัตว์ แต่ไม่สามารถใช้ในการจำแนกเชื้อ non-haemolytic หรือ α – haemolytic ชนิดต่างๆ

8. การศึกษา DNA base composition และ DNA : DNA hybridization (Boehringer, 1995)

วิธีนี้มีหลักการ คือ สายดีเอ็นเอที่มีเบสคู่สมกันจะสามารถจับคู่กันได้ โดยดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความเหมือนกัน และสามารถเข้าคู่กันได้ วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะใช้เป็น probe มาติดฉลาก ซึ่งอาจติดโดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive label) หรืออาจใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive label) จากนั้นนำ prob ที่ได้ไปทำ hybridization กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ถ้าสามารถเข้าคู่กันได้จะปรากฏสัญญาณ (signal) ขึ้นมาซึ่งการตรวจสอบจะใช้เครื่องมือที่แตกต่างกันแล้วแต่ชนิดของ prob

DNA base composition และ % ของ DNA similarity ภายหลังการเกิด DNA : DNA hybridization ของ type strain ของแลคติกแอซิตของแบคทีเรีย จะใช้เป็นลักษณะสำคัญในการจำแนกแลคติคแอซิตแบคทีเรียในสปีชีส์ต่างๆ เชื้อที่มี DNA base composition ที่เหมือน ๆ กัน ไม่จำเป็นที่จะต้องมีความใกล้เคียงกัน การจำแนกโดยวิธีนี้ได้มีผู้ประยุกต์ใช้ในการศึกษาการจำแนกแลคติคแอซิตแบคทีเรีย ได้แก่ Simonds และคณะ, 1971 ; Vescovo และคณะ, 1979 ได้ศึกษาใน *Lactobacillus sp.,* Garvie(1976) ได้ศึกษาใน Leuconostoc sp. , Dellaglio และ Torriano (1986) ได้ศึกษาใน *Pediococcus sp.* และ Jarvis และ Jarvis(1981) ; Collins และคณะ, 1984b ได้ศึกษาใน *Lactococcus sp., Enterococcus sp.,* และ *Steptococcus sp.*

9. การศึกษา plasmid profile (Josephson และ Nielsen, 1988)

แลคติคแอซิตแบคทีเรียบางสปีชีส์จะมีพลาสมิดอยู่ในเซลล์ซึ่งควบคุมคุณสมบัติบางอย่างของเชื้อ เช่น การผลิตเมือก การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ต่างๆ เป็นต้น โดยพลาสมิดของเชื้อที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีจำนวน ขนาด และลำดับเบสที่เหมือนกันเมื่อแยกพลาสมิดจากเซลล์แล้วนำมาตัด

โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบตำแหน่งการตัดที่แน่นอน แล้วนำมาทำเจล อิเลคโตรโฟลิซิส จะได้รูปแบบการเคลื่อนที่ของชิ้นส่วนของพลาสมิด ซึ่งสามารถนำรูปแบบที่ได้นี้มาเปรียบเทียบกันได้ โดยถ้าเป็นเชื้อในสปีชีส์เดียวกันจะมีรูปแบบที่เหมือนกันความคลาดเคลื่อน หรือความไม่แน่นอนของคุณสมบัติในการเมตาบอไรท์ และลักษณะทางกายภาพของแลคติคแอซิดแบคทีเรีย สามารถทดสอบยืนยันเพิ่มเติมได้โดยการดูพลาสมิดที่มีอยู่ในเซลล์ จะใช้เป็นลักษณะที่สำคัญสำหรับการกำหนดลักษณะ และใช้จำแนกแลคติคแอซิดแบคทีเรียออกจากกันได้

10. การศึกษา DNA : rRNA hybridization (Garvie และ Farrow , 1981)

วิธี DNA : rRNA hybridization นี้ ใช้จำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการวิเคราะห์ลำดับของ rRNA (rRNA sequence) วิธีเริ่มแรกใช้ในการจำแนกเชื้อ *Streptococus sp.* และใช้เป็นลักษณะสำคัญในการใช้สำหรับการจำแนกเชื้อในจีนัส *Enterococcus sp.* และ *Lactococcus sp.* (Garvie และFarrow,1981) และ NDA : rRNA hybridization นี้ถูกนำมาใช้โดย Garvie (1981) และ Schillinger และคณะ, 1989 ในการศึกษาความสำพันธุ์ระหว่างเชื้อ *Lueconostic sp.* และ *Lactobacillus sp.* บางสายพันธุ์

11. 16S rRNA cataloquing (Vuyst และ Vandamme, 1994 ; Collins และคณะ, 1993)

วิธีนี้ทำได้โดยการตรวจสอบลำดับเบส บนสาย RNA ของไรโบโซมขนาด 16S โดยจะมีบริเวณที่ประกอบด้วยยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมลักษณะพื้นฐานประจำ ซึ่งจะไม่ค่อยมีการเปลี่ยนแปลงไปจากบรรพบุรุษ การตรวจสอบลำดับเบสบริเวณนี้จึงสามารถบอกได้ว่าเชื้อเหล่านี้อยู่ในสปีชีส์เดียวกันหรือไม่

ในการจำแนกเชื้อแลกติคแอซิดแบคทีเรียโดยวิธีนี้จะประสบความสำเร็จอย่างดีต้องใช้การวิเคราะห์ที่ยุ่งยาก และใช้เวลานานมาก แต่ได้มีนักวิจัย 2 ท่านคือ Strackerbrandt และคณะ(1983) ; Ludwig และคณะ (1985) โดยใช้วิธีนี้ในการจำแนกเชื้อ แต่ในเวลาต่อมาได้มีนักวิจัยอื่นได้ใช้วิธีการจำแนกเชื้อโดยใช้ rRNA sequence แทนการจำแนกโดยวิธี 16S rRNA cataloquing นี้

12. Restriction Fragment Length Polymorphism (RFLP) (Hertel และคณะ, 1993)

เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบความแตกต่างในระดับสปีชีส์ โดยนำดีเอ็นเอทั้งจีโนม (genomic DNA) ของเซลล์มาตัดมาตัดย่อยโดยใช้เอนไซม์จะตัดดีเอ็นเอออกเป็นชิ้นที่มีขนาดต่าง ๆ กัน โดยเชื้อที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันดีเอ็นเอจะถูกตัดได้ขนาดชิ้นต่าง ๆ เหมือนกัน การตรวจสอบขนาดชิ้นของดีเอ็นเอที่ได้จากการตัดนี้ทำได้โดยวิธีเจล อิเล็คโตรโฟรีซิส

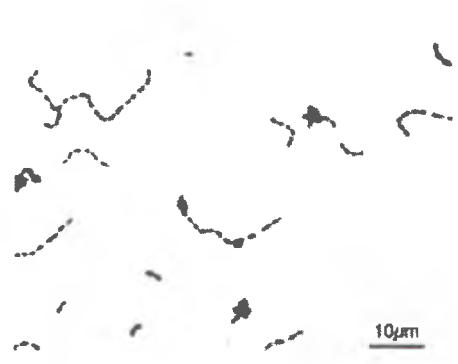
13. Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) (William และคณะ , 1991)

วิธีนี้เป็นการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอแบบสุ่มซึ่งอาศัยปฏิกิริยา PCK แต่วิธีนี้จะใช้ oligonucleotide primer สายสั้น ๆ ที่มีลำดับเบสที่ไม่จำเพาะเจาะจงกับยีนหนึ่งบนสาย DNA template เรียกว่า arbitrary primer และไม่จำเป็นต้องทราบลำดับเบสบนสาย DNA template ก่อน โดย primer นี้ จะเข้าไปสุ่มจับกับสาย DNA template ณ ตำแหน่งต่างๆ ที่เบสสามารถเข้าคู่กันได้ ดังนั้นเชื้อที่อยู่ในสายพันธุ์เดียวกัน จึงใช้วิธีนี้ในการจำแนกสายพันธุ์ของแลคติกแอซิดแบคทีเรียว่าเป็นสายพันธุ์ใด และยังสามารถใช้ในการตรวจตามการถ่ายทอดพันธุกรรมได้อีก

แลคติกแอซิดแบคทีเรียนอกจากจะมีบทบาทที่สำคัญในการผลิตอาหารต่างๆ ดังกล่าวมาแล้ว ยังมีบทบาทอื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น ใช้เป็นจุลชีพทดสอบ (Test organisms) ในการวิเคราะห์วิตามิน (Frazier และ Westhoff , 1979) บางสายพันธุ์ใช้ผสมในอาหารสัตว์แทนการใช้สารปฏิชีวนะ

ปัจจุบันแบคทีเรียแลกติกจำแนกเป็น 12 สกุล (De Vuyst และ Vandamme, 1994) ได้แก่

1) ***Streptococcus*** สกุลนี้เซลล์มีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.8 - 1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่หรือเป็นคู่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L (+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายชนิดเป็นปรสิตในคนหรือสัตว์ และบางชนิดสามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20 - 41 °C ปัจจุบันประกอบด้วย 39 ชนิด มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G + C ระหว่าง 34 – 36 % (Hardie และ Whiley, 1995)



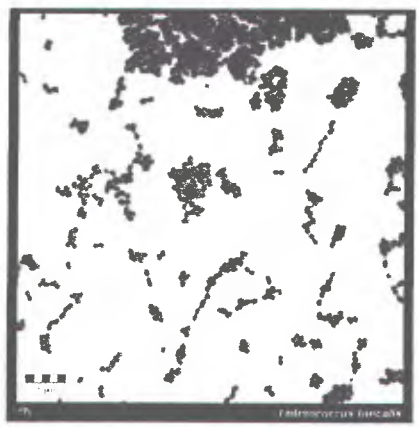
ภาพที่ 2.5 เชื้อแบคทีเรีย *Streptococcus* sp.

2) ***Vagococcus*** เป็นแบคทีเรียแลกติกที่เคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 ชนิด คือ *V. flauvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน Streptococci กลุ่ม N และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค (Stiles และ Holzapfel, 1997)

3) ***Lactococcus*** เซลล์มีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L (+)จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นกล้าเชื้อ (Starter) ในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 °C แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 °C พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 ชนิด ได้แก่ *Lc. lactis* ssp. *lactis* , *Lc. lactis* ssp. *cremoris, Lc. lactis* ssp. *hordniae, Lc. garvieae, Lc. raffinolactis,* และ *Lc. piscium* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G + C ระหว่าง 34 – 43 % (Teuber, 1995)

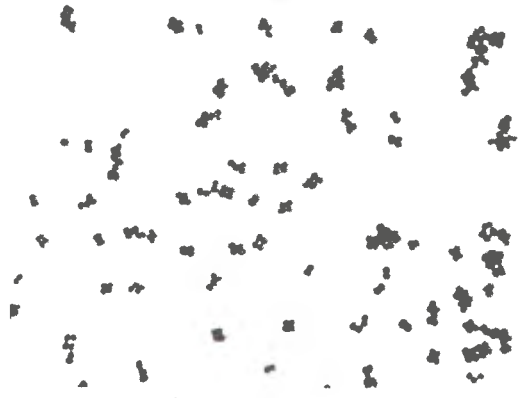
ภาพที่ 2.6 เชื้อแบคทีเรีย *Lactococcus* sp.

4) *Enterococcus* เซลล์มีรูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 - 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือต่อกันเป็นสายโซ่สั้น ๆ ผลิตกรดแลกติกชนิด L (+)เป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญเติบโต สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 °C บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ และบางชนิดทำให้เกิดโรค ปัจจุบันประกอบด้วย 5 ชนิด ได้แก่ *E. faecalis, E. faecium, E. avium, E. galinarum,* และ *E. cecorum* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G + C ระหว่าง 37 – 40 % (Derviese และ Pot, 1995)



ภาพที่ 2.7 เชื้อแบคทีเรีย *Enterococcus* sp.

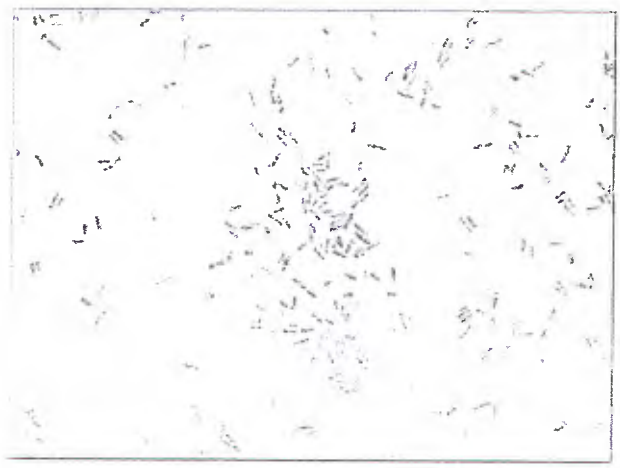
5) *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.36 – 1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไร้อากาศ ผลิตกรดแลกติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส บางชนิดทำให้เบียร์และไวน์เสีย ปัจจุบันประกอบด้วย 6 ชนิด ได้แก่ *P. acidilactici, P. damonosus, P. dextrinicus, P. inopinatus, P. parvulus* และ *P. pentosaceus* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G + C ระหว่าง 34 – 44 % (Simpson และ Taguchi, 1995)



ภาพที่ 2.8 เชื้อแบคทีเรีย *Pediococcus* sp.

6) *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือนสกุล *Pediococcus* เนื่องจากเดิมคือ *P. halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 % และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม (Simpson และ Taguchi, 1995)

7) *Aeromonas* มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือนสกุล *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 ชนิดคือ *A. viridans* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinaeequi* ตามลำดับ โดย *A. viridans* ทำให้กุ้งลอบเตอร์ (lobster) เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในมนุษย์ (Stiles และ Holzapfel, 1997)



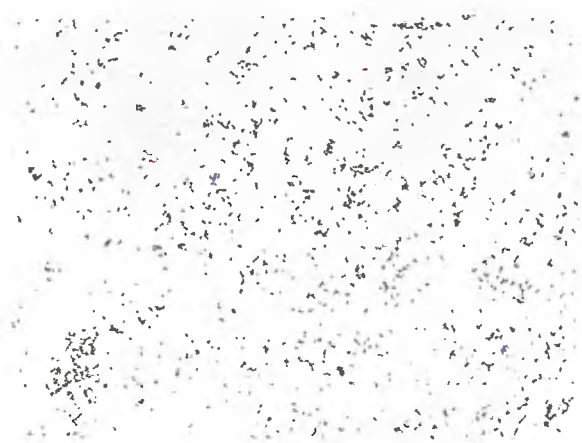
ภาพที่ 2.9 เชื้อแบคทีเรีย *Aeromonas* sp.

8) *Leuconostoc* เซลล์มีสัณฐานวิทยาขึ้นอยู่กับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารซึ่งมีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม lactobacilli แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือต่อกันเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลกติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (Heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญเติบโต ปัจจุบันประกอบด้วย 8 ชนิด ได้แก่ *Leuc. mesenteroides, Leuc. lactis, Leuc. gelidum, Leuc. carmosum, Leuc. citreum, Leuc. pseudomesenteroides, Leuc. argentinum,* และ *Leuc. fallax* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G + C ระหว่าง 37 – 40 % (Dellaglio และคณะ, 1995)

ภาพที่ 2.10 เชื้อแบคทีเรีย *Leuconostoc* sp.

9) *Oenococcus* สกุลนี้มีเพียงชนิดเดียว คือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuc. oenos* ด้วยสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลทางพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ : ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น และลำดับเบสของ 16 s rRNA ต่างจากชนิดอื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio และคณะ, 1995)

10) *Weissella* รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม ซึ่งมีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* (Leuconostoc - like bacteria) เป็นชนิดซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* ปัจจุบันประกอบด้วย 7 ชนิด ได้แก่ *Leuc. paramesenteroides (W. paramesenteroides), Lactobacillus confuses (W. confuses), Lb. halotolerans (W. halotolerans), Lb. kandleri (W. kandleri), Lb. minor (W. minor), Lb. viridescens (W. viridescens)* และชนิดใหม่ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles และ Holzapfel, 1997)



ภาพที่ 2.11 เชื้อแบคทีเรีย *Weissella* sp.

11) *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือท่อนเรียว (slander rod) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 0.7 ไมครอน และยาว 1.1 – 3.1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติกชนิด L (+) คาร์บอนไดออกไซด์ แอซีเทต และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส มีทั้งสิ้น 6 ชนิด คือ *C. divergens, C. piscicola, C. gallinarum, C. mobile, C. funditum.* และ *C. alterfunditum* มีโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G + C ระหว่าง 31.6 – 37.2 % (Stiles และ Holzapfel, 1997)

12) *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ สมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของโมเลกุลเปอร์เซ็นต์ G + C ภายในสูงสุดคือระหว่าง 32 – 53 % (Axelsson, 1998) พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์ พบในสัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บางชนิดเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ (Adam, 1999) เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนกลม (coccobacilli) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 55 ชนิด Stiles และ Holzapfel, 1997)

ภาพที่ 2.12 เชื้อแบคทีเรีย *Lactobacillus* sp.

จุลินทรีย์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักดอง

จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารหมัก มีทั้งแบคทีเรีย ยีสต์และรา แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับอาหารหมักมากที่สุด คือ แบคทีเรียแลคติก ซึ่งมีบทบาทสำคัญในอาหารหมักมากมายหลายประเภท เช่น ผลิตภัณฑ์ นมหมัดก เนย ผักดอง ไส้กรอก อาหารหมักพื้นเมือง เช่น น้ำปลา บูดู ปลาร้า แหนม เป็นต้น แบคทีเรียที่จัดในกลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc,* และ *Streptococcus* sp.

แบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria,LAB) ถูกใช้ในการเตรียมและถนอมอาหารประเภทเนื้อ,นมและผัก มาเป็นเวลานาน และเป็นที่ยอมรับโดยทั่วไปว่ามีความปลอดภัย(generally recognized as safe ; GPRS) ซึ่งแบคทีเรียแลกติกจะผลิตสารต่างๆเช่น กรดอินทรีย์,protease,flavor compound และสารที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอื่นโดยเฉพาะแบคทีเรียที่มีความสัมพันธ์ใกล้ชิด ที่รู้จักดีก็คือ แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) ซึ่งเป็นbactericidal protein (Tagg,et al., 1976) นอกจากนี้ยังมีรายงานของ Yang,et al., 1997 พบว่า Lactobacillus 13 สายพันธุ์ และ*Pediococcus* sp. 5 สายพันธุ์ สามารถสร้างสารยับยั้ง เป็น 2-pyrrodone-5-carboxylic acid (PCA) ซึ่ง PCA จะสามารถยับยั้งแบคทีเรียก่อโรคได้หลายชนิดเช่น *Enterobactor cloaoae* 1575, *Pseudomonas fluorescens* KJLG. และ *P.putida* 1560-2 ผลการยับยั้งของ PCA ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับอุณหภูมิขึ้น แต่จะถูกทำลายเมื่อเติม ammonium hydroxide และ PCA จะมีผลการยับยั้งน้อยกว่ากรดแลคติกเล็กน้อย

แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทสำคัญ ในการถนอมอาหาร และผลิตอาหารที่ดีต่อสุขภาพอนามัย ซึ่งพบได้ทั้งในอาหารหมักดองของพืช เช่น กระหล่ำปลีดอง แตงกวาดอง และประเภทสัตว์ เช่น ปลา กุ้ง เนื้อ การหมักด้วยแบคทีเรียแลคติกเป็นวิธีที่เสียค่าใช้จ่ายน้อย ในการเตรียมอาหารเหล่านี้เพื่อบริโภคอาจผ่านความร้อนเล็กน้อยหรือไม่ก็ได้ถือเป็นการประหยัดพลังงาน และมีข้อดี สามารถยับยั้งเชื้อที่ทำให้อาหารเน่าเสีย หรือสร้างสารพิษใด การสร้างกรดยังทำให้อาหารรสชาติที่จำเพาะและเพิ่มคุณค่าทางอาหารอีกด้วย อาหารหมักที่มีแบคทีเรียแลคติกเกี่ยวข้องจึงเป็นอาหารของประชากรโลกที่พบในทุก ๆ ทวีป

แบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียชนิดที่เติบโตในอาหารสังเคราะห์ที่มีสารอาหารมาก แต่ก็สามารถเติบโตได้ในแหล่งอาหารทั่วๆไป และจะทำให้ PH ของอาหารต่ำลงอย่างรวดเร็วจนถึงจุดที่ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นไม่สามารถเติบโตได้ พบว่า *Leuconostoc* sp. และ *Streptococcus* sp. ที่สร้างกรดแลคติกจะทำให้ PH ต่ำสุดที่ 4-4.5 ส่วน *Lactobaacillus* sp. และ*Pediococcus* sp. บางสายพันธุ์จะทำให้ PH ต่ำประมาณ 3.5 ก่อนจะมีการยับยั้งการเติบโตของตัวเอง (Steinkraus, 1992)

Desai และ Sheth (1997) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากกะหล่ำปลี และผักกาดดองแล้วคัดเลือกเชื้อจำนวน 6 สายพันธุ์ ตามลักษณะการหมักแบบ Homo-และHetero-fermentative การทนเกลือ อัตราการสร้างกรดและใช้เชื้อทั้ง 6 สายพันธุ์เป็นเชื้อตั้งต้นในการดองผักต่าง ๆ พบว่า น้ำดองผักมีความเป็นกรดสูงร้อยละ 0.6-0.7 เมื่อดองผักได้ 4 วัน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียสและเมื่อดองผักด้วยแบคทีเรียแลคติกดังกล่าว โดยใส่เกลือร้อย 4, CaCL2 ร้อยละ 0.1 และกรดซอร์บิกร้อยละ 0.1 พบว่าหลังดองผักไว้ 2 เดือน ที่อุณหภูมิ 28-30 องศาเซลเซียส ผักที่ดองก็ไม่มีการเน่าเสียยังคงสีสดเหมือนธรรมชาติและมีรสชาติเป็นที่ถูกปากอีกด้วย

แบคทีเรียแลคติกสกุล *Pediococcus* sp.

Pediococcus sp. เป็นแบคทีเรียแลคติกเพียงชนิดเดียวที่มีการแบ่งตัวใน 2 ทิศทาง แล้วให้เซลล์สี่เซลล์ติดกัน (tetrad) และ *Pediococcus* sp. ต้องการอาหารซับซ้อนในการเติบโตพบได้ในอาหารหมักจากพืชเติบโตได้ดีที่มีเกลือร้อยละ 5.5 และการเติบโตจะลดลงเมื่อมีเกลือร้อยละ 10 แต่มีบางชนิด เช่น *P. halopillus* เติบโตได้ดีในที่มีเกลือร้อยละ 6-8 และทนเกลือได้สูงกว่าร้อยละ 15 ดังนั้นจะพบในอาหารหมักดองที่มีเกลือสูงๆเช่น ซีอิ๊ว เต้าเจี้ยว น้ำปลา บูดู ปลา เป็นตัวการสำคัญในการทำให้เกิด กลิ่น รส ในอาหารหมักเหล่านี้

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

Pediococcus sp. ทุกสปีชีส์เติบโตได้ที่ 30 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเติบโตคือ 25-40 องศาเซลเซียส เป็นพวกเคโมออร์แกโนโทรฟ เซลล์ต้องการสารอาหารมากเป็นพิเศษ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่มีไซโตโครม แยกออกเป็นสปีชีส์ได้ตามความสามารถในการ

ทนต่ออุณหภูมิ pH และ NaCl ซึ่งทุกสปีชีส์สามารถเติบโตในอาหาร MRS (Sneath,Mair,and Holt, 1986)

จีนัส *Pediococcus* sp. ปัจจุบันสามารถแบ่งออกเป็น 8 สปีชีส์ ในจำนวน 8 สปีชีส์นี้ *P. acidilactici, P. damnosus* และ *P. parvulus* จะมีลักษณะที่สัมพันธ์กันใกล้ชิด (Collin,William and Wallbanks, 1990) สำหรับ *P. acidilactici* และ *P. pentosaceus* มี DNA/DNA homology ใกล้เคียงกัน มีลักษณะที่แตกต่างกันเล็กน้อยคือ *P. acidilactici* จะเติบโตที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และไม่หมักน้ำตาลมอลโตส เซลล์จะตายเมื่ออยู่ในอุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส หมักน้ำตาลมอลโตสได้ และเซลล์จะตายเมื่ออยู่ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 นาที (Kitahara,1974 ; Gravie, 1986)

ลักษณะสัณฐานวิทยาของ *Pediococcus* sp.

เมื่อเป็นเชื้อบริสุทธิ์ *Pediococcus* sp. จะมีรูปร่างกลม และมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36-1.43 ไมโครเมตร (Gunther and White, 1961) เซลล์จะไม่ยาว ซึ่งต่างกับ *Leuconostoc* spp. ซึ่งมักจะมีรูปยาว และจัดเรียงตัวเป็นลูกโซ่

การแบ่งเซลล์ของ *Pediococcus* sp. จะเป็นไปอย่างรวดเร็ว เคยมีการเข้าใจว่าเป็นการแบ่งระนาบเดียว ให้เซลล์เป็นโซ่ยาวแล้วจัดเรียงตัวใหม่เป็นสี่เซลล์ Simpson,1994 ได้เสนอแนวคิดว่าการแบ่งเซลล์เพื่อให้ได้เซลล์ติดกันสี่เซลล์ของ *Pediococcus* sp. จะเกิดขึ้นเป็นสองระนาบโดยจะแบ่งไปในมุมทางด้านขวา

บางครั้ง *Pediococcus* sp. มีการเรียงตัวกันเป็นคู่ มักไม่พบเซลล์เดี่ยวๆผละไม่มีการเรียงตัวเป็นสาย ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และแคปซูล เมื่อเติบโตในอาหารที่มีสารอาหารมาก เช่น de Man, Rogosa,Sharpe (MS) agar โคโลนีมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0-3 มิลลิเมตร ขอบเรียบ กลม สีไม่แตกกัน เมื่อเลี้ยงใน stab culture จะเติบโตตามรอย stab และเติบโตบริเวณผิวอาหารเล็กน้อย ในอาหารเหลวเติบโตสม่ำเสมอทั่วหลอดทดลอง (Nakagawa and Kitahara, 1959)

ลักษณะทางสรีรวิทยาของ *Pediococcus* sp.

- **การหมักคาร์โบไฮเดรท** *Pediococus* sp. สามารถใช้น้ำตาลคาร์โบไฮเดรทได้หลายชนิดในแต่ละสปีชีส์จาก pentose เช่น arabinose, ribose และ xylose เช่น fructoseและmannose disaccharide เช่น maltose trisaccharides เช่น maltotriose polymer เช่น แป้ง (Deibel and Niven, 1960) การหมักคาร์โบไฮเดรทแบบฮอมอแลคติกหมักน้ำตาลได้กรด 0.5-0.9 เปอร์เซ็นต์ ส่วนใหญ่เป็นกรดแลกติก

- **การใช้ไนโตรเจน** *Pediococus* sp. จะเติบโตได้ดีในอาหารที่มีสารอาหารมาก หลายสายพันธุ์ต้องการกรดอะมิโนหลายตัว และจะเติบโตน้อยมากหากไม่มีแหล่งไนโตรเจน

Bhowmik และMargt (1990) ได้ทดสอบการสร้างเอนไซม์ต่างๆของ *Pediococcus* spp.พบว่าทุกสายพันธุ์สร้าง protease, dipeptidase, dipeptidyl-aminopeptidases และ aminopeptidases แต่ไม่สร้าง carboxy-peptidases หรือ endopeptidase

- **วิตามิน,สารอินทรีย์และแร่ธาตุที่ต้องการ** *Pediococcus* spp. ทุกสายพันธุ์ต้องการ nicotinic acid, pantothenic acid และbiotin และต้องการ manganese สำหรับการเติบโต บางสายพันธุ์ต้องการ riboflavin,pyridoxine และfolinic acid (Sakaguchi and Mori,1969; Efhymiou and Joseph, 1972)

- **ปฏิกิริยาต่อออกซิเจน** *Pediococcus* spp. เป็นแฟคัลเททีฟแอนเอโรป โดยทั่วไป ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลสและไม่มีเอนไซม์ superoxide dismutase แต่มีการป้องกันตัวเองจากการทำลายของ อนุภาคออซิเจน (oxygen radicals) โดยใช้ Manganease ที่มีความเข้มข้นสูง *Pediococcus halophillus* บางสายพันธุ์ pseudo-catalase ซึ่งจะให้ผลบวกเมื่อทดสอบด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และพบว่า *P. acidilactici* จะสร้าง catalase เมื่อให้ haemin (Whittenbury, 1964)

การสร้างสารยับยั้งของ *pediococcus* sp. *Pediococcus* spp. เป็นแบคทีเรียแลคติก พวกโฮมอเฟอร์เมนต์เตทีฟ ซึ่งผลิตภัณฑ์สุดท้ายที่ได้จากอาหารหมักของแบคทีเรียแลคติกพวกได้แก่

1) กรดแลคติก แบคทีเรียพวกฮอมอเฟอร์เมนต์เตทีฟ ซึ่งได้แก่ *Lactococcus,' Pediococcus, Streptococcu* และ *Lactobacillus* บางสายพันธุ์ จะย่อยสลายกลูโคสแล้วให้กรดแลคติกโดยการหมักแบบฮอมอเฟอร์เตทีฟ Embden Meyerhof-Parnas pathway โดยเปลี่ยน fructose1,6-diphosphate เป็นน้ำตาล triose phosphate 2 โมเลกุล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงต่อไปเป็น pyruvate และถูกรีดิวส์ต่อไปเป็นกรดแลกติก และจะให้ ATP สุทธิ 2 โมเลกุลต่อการหมักน้ำตาลเฮกโซส (Kandler, 1983) การสะสมของกรดที่เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายนี้

จะส่งผลให้ PH ต่ำลง และมีผลต่อการยับยั้งทั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบได้ (Vuyst and Vandamme, 1994)

2) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H2O2) แบคทีเรียแลคติกจะสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ สภาวะที่มีออกซิเจน ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่สร้างขึ้นจะสะสมในอาหารเลี้ยงเชื้อ เพราะแบคทีเรียแลกติกจะเป็นพวกไม่สร้างเอนไซด์คะเลส (Vuyst and Vandamm, 1994)

Ander,Hogg and Jago (1970) ได้รายงานว่า ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.2 mml/L สามารถยับยั้งการเติบโตของ *Lactobacillus* sp.ได้ร้อยละ 50 และหากความเข้มข้นของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เป็น 1.5 mml/L อาจทำให้เซลล์ตายได้

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

3) แบคเทอริโอซิน (bacteriocin) แบคเทอริโอซิน ที่สร้างจากแบคทีเรียแลคติกเป็น antimicrobial peptides ที่สังเคราะห์จากไรโบโซม ซึ่งการยับยั้งจะจำเพาะโดยตรงต่อแบคทีเรียแกรมบวก ขณะที่ไม่มีผลในการยับยั้งต่อเซลล์ที่สร้างแบคเทรโอซิน (Bruno and Montville,1993)

Pediocin AcH เป็นแบคเทริโอซินที่สร้างจาก *P.acidilactici* หรือสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน จะยับยั้งแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เช่น*pediococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Brochothrix, Propionbacterium, Bacillus, Enterococcus, Staphylococcus, Listeria, Clostridium botulium E* แต่ไมยับยั้ง CL.Botulium AและB และยังมีผลยับยั้งสปอร์ ของ *Clostridium, Bacillus* บางสายพันธุ์ (Kachayanand, 1990; Ray, 1992)

Bhunia, Hohnson,and Ray (1988)ได้เชื้อ *P. acidilactici* ที่สร้าง pediocin AcH โดยใช้ casein ที่ประกอบด้วย casein ร้อยละ 1,,yeast extract ร้อยละ0.5, Glucose ร้อยละ1,Tween 80 ร้อยละ 0.1,Sodium acetate ร้อยละ 0.5, magnesium sulfate ร้อยละ 0.005, disodium phosphate ร้อยละ 0.2 PH 6.8 พบว่าสารละลายส่วนใส่ที่ปราศจากเซลล์ มีความสามารถในการยับยั้งได้น้อย

Spelhaug and Harlander, 1989 ได้ศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรคโดยแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *L. lactis* และ *P. pentosaceus* โดยใช้วิธี agar spot พบว่า แบคเทอริโอซินที่สร้างขึ้นสามารถยับยั้งเชื้อก่อโรคแกรมบวก คือ *Bacillus cereus, Clostridium perfringen, Staphylococcus cereus* แต่จะยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมลบได้เพียงเล็กน้อยเท่านั้น

Nielsen และคณะ (1990)ได้ศึกษาแบคเทอริโอซินที่สร้างจาก *P. acidilactici* พบว่าสามารถยับยั้งและฆ่าเชื้อ *Listeria monocytogenes* ที่มีอยู่ในเนื้อสด เป็นจำนวน 0.5-2.2 log cycle ภายใน 2 นาที ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มของแบคเทอริโอซินที่ใช้ หลังจากที่เก็บเนื้อดังกล่าวไว้ในตู้เย็น เป็นเวลา 28 วัน สารแบคเทอริโอซินก็คงยังสามรถยับยั้งเชื้อ *L. monocytogenes* ได้

Bhunia และคณะ (1991) พบว่าการที่ pediocin AcH มีผลยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้น เพราะพนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมบวกจะมีโมเลกุลของกรด lipotechoic ที่เป็น receptor ของ pediocinAcH ซึ่งในแบคทีเรียแกรมบวก จะไม่พบโมเลกุลของกรด lipotechoic จึงทำให้ไม่สามารถดูดซับ pediocinAcH ได้

Biswas และคณะ (1991)ได้ศึกษาผลของอาหารเลี้ยงเชื้อ PH ของอาหารเวลาและและอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มในถังหมัก พบว่า *P. acidilactici* H สามารถสร้าง pediocinAcH ได้สูง ในอาหารที่ไม่มีเกลือเป็นบัฟเฟอร์ PH เริ่มต้นที่ 6.5 และ PH สุดท้ายที่ 3.6-3.7 และอุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-22 ชั่วโมง

การพัฒนาการผลิตอาหารหมักดองพื้นบ้าน

อาหารหมักดองพื้นบ้านหลายชนิดยังไม่ได้มาตรฐาน เพราะยังขาดความสะอาดของวัตถุดิบ การทำ และขั้นตอนการทำ การป้องกันผลิตภัณฑ์จากการปนเปื้อนและขาดการบรรจุ การปกปิดภาชนะที่ใช้บรรจุ ซึ่งทำให้เสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรคนอกจากนี้ อาหารหมักดองหลายชนิดยังให้พลังงาน โปรตีน และวิตามินน้อย รสสัมผัสของอาหารมีความแตกต่างกันในอาหารหมักชนิดเดียวกันและเก็บไว้ได้นานซึ่งจะทำให้ความสะดวกในการบริโภคลดลง จึงต้องมีการปรับปรุงและพัฒนาอาหารหมักดองพื้นบ้านดังกล่าว ในด้านต่าง ๆ คือ

-ในขั้นตอนการทำ ได้แก่ การเตรียมวัตถุดิบขั้นตอนการทำ การนำออกขายหรือการบรรจุต้องคำนึงถึงการคัดเลือก มาตรฐานความสะอาดปราศจากเชื้อปนเปื้อน การบรรจุ

Lwoha and, 1996 ได้ทำการศึกษาอาหารหมักดองพื้นบ้านของชาวไนจีเรียเกี่ยวกับกระบวนการทำ ปัญหา การพัฒนาและสภาพปัจจุบัน พบว่า ผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ได้ ยังคงมีปัญหาด้านความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและคุณภาพเนื่องจากจุลินทรีย์และคุณค่าทางอาหาร

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

- ความคงตัวของการหมักโดยธรรมชาติ แต่มีการเติมเชื้อให้มากยิ่งขึ้น เพราะข้อดีของการหมักอาศัยเชื้อที่มีอยู่ในธรรมชาติ คือ เชื้อที่หมักจะเหมาะสมกับสภาวะแวดล้อมนั้นๆแต่ข้อเสีย คือ เชื้อที่อยู่ตามธรรมชาติจะควบคุมได้ยากหากมีการนำไปใช้ในการหมักปริมาณมาก เสี่ยงต่อการเน่าเสีย ระยะเวลาในการหมักจะยาวนาน ไม่เพียงพอต่อความต้องการในการขายในตลาดเมือง หรือเกิดการเน่าเสียก่อนเวลาสมควร จึงควรใช้เชื้อเริ่มต้นที่บริสุทธ์ ซึ่งอาจได้จากคัดเลือกจากอาหารหมักดองตามธรรมชาติ หรือพันธุวิศวกรรม แต่พันธุวิศวกรรมจะทำได้ยาก ค่าใช้จ่ายสูง และต้องทำในสภาวะที่ปราศจากเชื้อ วิธีที่ทำได้ง่ายที่สุด คือเติมเชื้อที่คัดเลือกได้จากธรรมชาติในปริมาณมาก

Tamag and Nilkkuni (1996) ได้ทำการคัดเลือกเชื้อเพื่อนำมาใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักถั่วเหลืองซึ่งเป็นอาหารของชาว Himalaya จากตัวอย่างถั่วเหลืองหมัก 9 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวน 10 ใน 45 สายพันธุ์ สามารถนำมาเป็นเชื้อเริ่มต้นได้ดี โดยพิจารณากิจกรรมของเอนไซม์ การใช้วัสดุที่มีลักษณะเล็กละเอียดซึ่งจากการวิเคราะห์ทางชีวเคมีและรสสัมผัส พบว่าเชื้อที่คัดเลือกได้จะเชื้อเริ่มต้นที่น่าจะนำไปพัฒนาเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักอาหาร

- การใช้เชื้อบริสุทธิ์เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักอาหาร

Daeschel, Fleming,and Mc Freeters (1988) ได้ทำการวิจัยโดยใช้เชื้อผสมระหว่าง *L. plantarum* และยีสต์ *S.cerevisiae* ในการหมักน้ำแตงกวา พบว่า PH สุดท้ายของผลิตภัณฑ์จะเพิ่มขึ้น ปริมาณแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้นแต่จะแปรผกผันกับปริมาณ glycerol ซึ่งสร้างจาก *S. cerevisiae*

สำหรับการใช้ *Pediococcus* sp. เป็นเชื้อตั้งต้นในการหมักอาหารในระยะแรกๆนั้นจะใช้ในผลิตภัณฑ์เนื้อ สายพันธ์ที่ใช้คือ *P. acidilactici* เนื่องจากสามารถผลิตกรดได้อย่างรวดเร็วทำให้เนื้อ

มี PH ต่ำลง ต่อมาได้มีการใช้เชื้อ *Pediococcus* sp. เป็นเชื้อเริ่มต้นในการหมักเนื้อมากยิ่งขึ้น และพบว่าทำให้ได้ผลิตภัณฑ์เนื้อที่มีคุณภาพ เนื่องจากสามารถผลิตกรดแลกติคได้ในปริมาณมาก และมีลักษณะที่ต้องการ เหมาะสำหรับทีจะใช้เป็นเชื้อเริ่มต้น เนื่องจาก *Pediococcus* sp. มีคุณสมบัติดังต่อไปนี้คือ

1. ทนเกลือ
2. เติบโตได้เร็วในน้ำหมักที่มีเกลือ 6 %(% เกลือ/ความชื้น คูณด้วย 100)
3. สามารถเติบโตได้ดีในที่มีไนไตรต์ 80 – 100 ppm.
4. เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 32.2 องศาเซลเซียส และสามารถเติบโตได้ที่อุณหภูมิ 26.7 – 43 องศาเซลเซียส
5. เป็นแบคทีเรียพวกโอโมเฟอร์เมนต์เตทีฟผลิตกรดแลกติคเพียงอย่างเดียวจากน้ำตาลเดรกซ์โตส
6. ไม่สร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนและไขมัน
7. ไม่สร้างรสชาติที่ไม่ต้องการในกระบวนการหมัก
8. ไม่เป็นเชื้อก่อโรคกับพืชและสัตว์
9. ถูกยับยั้งที่อุณหภูมิ 57 – 60 องศาเซลเซียส

นอกจาก *Pediococcus* sp. จะใช้สำหรับหมักเนื้อแล้ว ยังสามรถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการหรือเชื้อก่อโรคในอาหาร ซึ่งการยับยั้งนี้อาจเป็นเพราะการสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว ปัจจุบันได้มีการรวบรวมข้อมูลของ *Pediococcus* sp.ในด้านการสร้างสารยับยั้งต่างๆ เช่น การสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์, กรดอินทรีย์, antibiotic หรือ แบคเทอริโอซินที่มีผลต่อการยับยั้ง (Gilliland, 1985)

***Lactobacillus* sp.**

เป็นกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี ละลักษณะทางสรีรวิทยา อันเนื่องมาจากความแตกต่างของ GC content ภายในสกุลค่อนข้างสูง (Hammes and Vogel, 1995) เป็นแบคทีเรียรูปท่อนสั้นถึงยาว มักต่อเป็นสายโซ่ได้ มักไม่เคลื่อนที่ เป็นพวกเฟอร์เมนต์ แต่มักทนอากาศได้ มีบางสายพันธุ์ที่เป็นพวกแอนแอโรบิก ให้ผลกับการทดลอบคาตาเลสเป็นลบ มีทั้ง homofermentative และ heterofermentative ได้กรดแลคติก พบเป็นแซโพรไฟต์ในสัตว์ที่มีกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์จากพืช หรือเป็นปรสิตอยู่ใน

ช่องปาก ช่องคลอด ลำไส้ของคนและสัตว์เลือดอุ่น (นงลักษณ์ และปรีชา, 2544) ประกอบด้วย 56 สปีชีส์ย่อย (Hammes and Vogel, 1995)

Hammes and Vogel (1998) ได้กล่าวถึงการจัดแบ่งแบคทีเรียสกุลนี้โดยพิจารณาจากกระบวนการหมักแบ่งได้ 3 กลุ่มย่อย คือ

1) Group A : Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสได้ผลิตภัณฑ์เป็นกรดแลคติกมากกว่า 85% โดยผ่านวิถี Embden –Meyerhof-Parnas (EMP) สามารถสร้างเอนไซม์ fructose-1,6-bisphosphate-aldolase แต่ไม่สร้างเอนไซม์ phosphodetolase ทำให้ไม่สามารถสร้างน้ำตาลเพนโตสและกลูโคเนทได้

2) Group B : Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสได้เป็นกรดแลคติกผ่านวิถี EMP สามารถสร้างเอนไซม์ aldolase และ phosphoketolase ได้ จึงสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซส เพนโตส และกลูโคเนทได้ ในสภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสจะมีการยับยั้งการสร้างเอนไซม์ในวิถีฟอสโฟกลูโคเนท (phosphogluconate)

3) Group C : Obligately heteroferementative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทได้ผลิตภัณฑ์เป็นแลคเตท กรดอะซิติก เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์

***Leuconostoc* sp.**

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ *Leuconostoc* spp. มีการเจริญแบบ facultative anaerobes ลักษณะเซลล์มีรูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นโซ่ จัดเป็นพวก heterofermentative อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่างการเจริญเติบโตระหว่าง 20-30 องศาเซลเซียส เป็นกลุ่มที่ไม่สร้างคาตาเลส แบคทีเรียสายพันธุ์ *Leuconostoc* มีฟีโนไทป์สัมพันธ์กันกับ *Leuconostoc* และ *Pediococcus* การเจริญของเซลล์ขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีกลูโคส เป็นแบคทีเรียที่พบได้ในผลิตภัณฑ์นมหลายชนิด เครื่องดื่มที่ได้จากการหมักและผักดองหลายชนิด เมื่อเจริญในน้ำนม เซลล์จะมีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ในการหมักน้ำตาลกลูโคสจะมีการผลิตกรดแลกติกชนิด D (-) เอทานอล

คาร์บอนไดออกไซด์ และไดอะซีติล ดังนั้น จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดองได้ (Dellaglio *et al.*, 1995)

กล้าเชื้อแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทในอาหารหมักหลายชนิดด้วยกัน และยังมีกิจกรรมร่วมกับยีสต์ในการหมักเต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว เครื่องดื่มที่มีอัลกอฮอล์ และผลิตภัณฑ์แป้งหมัก แบคทีเรียกลุ่มนี้มีทั้งพวก homofermentative และพวก heterofermentative นอกจากนี้ยังมีเชื้อหลายสายพันธุ์ สามารถย่อยกรดซิตริกหรือเกลือซิเตรท ได้เป็นสรพวกไดอะซิธิล(diacetyl) อะซิโตอิน(acetoin)และบัวธิลลีนไกลคอล (2,3-butylene glycol) ดังนั้นบทบาทที่สำคัญในการหมักอาหารของแบคทีเรียแลคติคจึงได้แก่ การผลิตกรด ทำให้เกิดรสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอมของสารต่างๆและประโยชน์ในด้านต่างกันตามประเภทของผลิตภัณฑ์

คุณสมบัติของกล้าโดยทั่วๆไป

กล้าแบคทีเรียแลคติคที่ดีควรมีคุณสมบัติโดยทั่วๆไปดังนี้

1. สามารถใช้น้ำตาลที่มีอยู่ในวัตถุดิบ และผลิตกรดได้ในระยะเวลาและปริมาณที่เหมาะสมกับผลิตภัณฑ์ชนิดนั้นๆ

2. ผลิตสารที่ให้กลิ่นเฉพาะของอาหารหมักชนิดนั้นๆ

3. อยู่ในสภาพที่เมื่อนำไปไปเป็นกล้า จะเจริญแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้ดี

4.ปลอดจากฝาจก์(phage) ซึ่งสมารถหลีกเลี่ยงปัญหานี้ได้หลายวิธี ได้แก่

4.1 เตรียมกล้าในรูปเชื้อผสม โดยมีเหตุผลว่าในขณะนำไปใช้ หายกเชื้อสายพันธุ์หนึ่งถูกลาย จะยังคงเหลือสายพันธุ์หนึ่งถูกทำลาย จะคงเหลือสายพันธุ์อื่นๆที่ไม่มีความเฉพาะกับฝาจ์กชนิดนั้นพอที่จะดำเนินกิจกรรมการหมัดต่อไปได้

4.2ใช้เชื้อแต่ละสายพันธุ์สลับหมุนเวียนกันไป

4.3 คัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์ที่ต้านทานต่อฝาจ์ก เช่น การใช้สายพันธุ์ผ่าเหล่า (phage resistant mutant)

4.4 เตรียมกล้าโดยเพาะเลี้ยงในอาหารที่ยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของฝาจ์ก

4.5 ในกรณีที่มีการเพิ่มปริมาณกล้าก่อนใช้งาน (bulk starter) ต้องระวังการปนเปื้อนของฝาจ๊ก

ชนิดของกล้าเชื้อ

สามารถแบ่งชนิดของกล้าเชื้อได้ดังนี้

1. กล้าเชื้อที่นำไปใช้ได้เลย โดยไม่ต้องมีการเพิ่มปริมาณเชื้อ (direct set) เช่นกล้าที่ใช้ในการผลิตเนยแข็งเชดดา (cheddar cheese) คอตเตจชีส (cottage cheese) และโยเกิร์ต (yoghurt) ผลิตภัณฑ์เนื้อหมัก ผักและผลไม้ดอง เป็นต้น

2. กล้าเชื้อที่ต้องนำไปเพิ่มปริมาณเชื้อก่อนใช้ (Bulk set) โดยโรงงานอาหารหมักแต่ละแห่งจะต้องนำกล้าไปเพาะเลี้ยงเพื่อเพิ่มปริมาณให้มากพอก่อนนำไปใช้ กล้าที่เพิ่มปริมาณเชื้อแล้วนี้เรียกว่า bulk starter ซึ่งเฉพาะโรงงานอุตสาหกรรมนมหมักเท่านั้นที่นิยมผลิต bulk starter

กล้าเชื้อทั้งสองชนิด มีทั้งแบบที่เป็นกล้าเข็มข้น (concentrate starter) และกล้าที่ไม่เข้มข้น (unconcentrate starter) ในรูปแบบต่างๆ กัน เช่นแช่แข็ง(frozen culture) ไลโอฟีไลส์ (lyophilize) หรือฟรีชดราย (freeze – dried culture) และเชื้อผลแห้ง (dried culture)

กล้าเชื้อผลิตภัณฑ์ผักและผลไม้

การใช้กล้าแบคทีเรียแลคติคหมักผักและผลไม้ ได้รับการพัฒนาหลังจากผลิตภัณฑ์นมและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์ กล่าวคือได้มีการใช้กล้าในการดองแตงกวาและมะละกอในอุตสาหกรรมเป็นครั้งแรกเมื่อประมาณ 20 ปีมานี้ แบคทีเรียที่ใช้เป็นกล้าได้แก่ *L. plantarum* และ *P. pentosaceus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียพวก homofermentative ทั้งในรูปของกล้าไลโอฟีไลส์และกล้ากล้าแช่แข็ง ส่วน *L. brevis* และ *Leuconostoc mesenteroides* นั้นทั้งๆที่มีบทบาทในการหมักดองผักและผลไม้หลายชนิด แต่ยังไม่มีการนำมาใช้เป็นกล้าในผลิตภัณฑ์เหล่านี้ การใช้กล้าในอุตสาหกรรมดองแตงกวาและมะละกอ ทำให้ควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์ให้คงที่และลักษณะตามต้องการได้ง่ายขึ้น และสามารถแตงไส้แตก ซึ่งเป็นผลจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดจาก *L. brevis* ซึ่งเป็นแบคทีเรียกลุ่ม heterofermentative ได้ดี โดยที่ *L. plantarum* ส่วนใหญ่ถึงแม้จะเป็นพวก homofermentative ที่ไม่สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส แต่จะยังสามารถปลดปล่อยก๊าซนี้จากกรดมาลิกด้วยเอนไซด์มาโลแลคติก (L-malate-NAD carboxylase) จึงได้มีการคัดเลือกและปรับปรุงพันธุ์

เพื่อให้ได้สายพันธุ์ที่ปราศจากเอนไซม์นี้ เพื่อเป็นกล้าสำหรับการดองแตงกวา นอกจากนั้นได้มีการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ผลิตเฉพาะกรดแลคติกที่เป็น L+ ไอโซเมอร์ได้ดีกว่ากรดแลคติก D - ไอโซเมอร์ ซึ่งองค์การอนามัยโลกได้กำหนดให้บริโภคกรดแลคติก(D -) ได้ไม่เกิน100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมต่อวัน และห้ามไม่ให้มีกรดดังกล่าวในอาหารทารก ซึ่งประเทศเยอรมันได้พบแลคโตแบซิลัสชนิดใหม่ ได้แก่ *L. bavaricus* ซึ่งผลิตกรด L+ ไอโซเมอร์ชนิดเดียวกัน และได้จดลิขสิทธิ์การใช้กล้าดังกล่าว ในการดองกะหล่ำปลีดอง

4. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Delclos (48) ศึกษาการเติมกล้าเชื้อผสมของแบคทีเรียชนิดhomofermentative (*Lactobacillus pentosus*) และ heterofermentative (Leuconstoc mesenteroides) ในแครอทและกะหล่ำปลีดอง พบว่าในการดองแครอทจะเกิดการดองโดย *Leuconstoc mesenteroides*เท่านั้น ขณะที่การดองกะหล่ำปลีจะพบเชื้อทั้งสองชนิด และได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีเช่นเดียวกับการผลิตที่ใช้เชื้อธรรมชาติ ซึ่งการใช้เชื้อชนิด heterofermentative จะได้เฉพาะกลิ่น รสของผักดอง นอกจากนี้การใช้กล้าเชื้อผสมยัง ทำให้เวลาการดองลดลงจาก 3-4 สัปดาห์ เป็น 7 วัน และพบจุลินทรีย์ *Listeria monocytogens* ในกะหล่ำปลีดองมีอายุสั้นกว่า ซึ่งก็ไม่มีความแตกต่างระหว่างการใช้กล้าเชื้อชนิดเดียวหรือผสม การใช้กล้าเชื้อผสมในปริมาณที่เท่าๆกัน จะเป็นอัตราส่วนที่ดีที่สุด และเมื่อทดลองใช้เกลือเพียง 1 เปอร์เซ็นต์ปรากฏว่าลำดับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ความเป็นกรด ความเป็นกรด – ด่าง ยังเป็นเหมือนเช่นเดิม

Lee และ Kim (78) ศึกษาผลการใช้กล้าเชื้อในกิมจิ โดยแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ใช้เชื้อ *Lactobacillus plantarum* กลุ่มที่ 2 ใช้เชื้อ *L. plantarum* และ *L. brevis* กลุ่มที่ 3 ใช้เชื้อ *L. plantarum, L. brevis* และ *Leuconstoc mesenteroides* กลุ่มที่ 4 ใช้เชื้อ *L. plantarum, L. brevis, L. mesenteroides* และ *Pediococcus cerevisiae* ซึ่งเชื้อทั้ง 4 นี้เป็นเชื้อที่พบในกิมจิ จากการศึกษาพบว่าการใช้กล้าเชื้อผสมให้ผลดีกว่าการใช้กล้าเชื้อชนิดเดียว โดยมีประสิทธิภาพเรียงจากมากไปน้อยคือกลุ่ม 4, 3 และ 2 การใช้กล้าทำให้ลดเวลาการดองได้ประมาณ 24 ชั่วโมง และทำให้กิมจิมีคุณภาพทางประสาทสัมผัสดีขึ้น แต่ขิงซึ่งเป็นส่วนประกอบในกิมจิจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่ากระเทียม (leak) ก็มีสมบัติยับยั้งการเจริญของ *P. cerevisiae* และ *L. plantarum* Lee และ Kim พบว่าในการดองกิมจิแบบดั้งเดิม การดองในระยะเริ่มต้น(1 หรือ 2 วันแรก) จะถูก

ยับยั้งเนื่องจากกระเทียม (garlic) และขิงจะยับยั้งการเจริญของแลคติกแอซิดแบคทีเรีย แต่หลังจากนั้นการเติมกระเทียมจะเร่งกระบวนการดองให้เร็วขึ้น

Sapundzhieva และคณะ ศึกษาระดับอุณหภูมิ(27, 30 และ 37 องศาเซลเซียส) และปริมาณกล้าเชื้อ *L. plantarum* (1, 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์) ที่เหมาะสมในการดองผักเพื่อพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ใหม่ พบว่าแตงกวาดองหั่นมีคุณภาพดี ถ้าดองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง โดยใช้กล้าเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ แครอทควรดองที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง และใช้กล้า 2 เปอร์เซ็นต์ เช่นเดียวดับคื่นฉ่าย แต่คื่นฉ่ายควรใช้เวลาดอง 42 ชั่วโมง ซึ่งผลิตภัณฑ์มีคุณภาพที่ยอมรับได้ดี มีค่าความเป็นกรด 0.8-1.2 เปอร์เซ็นต์ ความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่า 4.1 เมื่อนำผักดองเหล่านี้ปริมาณ 50 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับน้ำมะเขือเทศเข้มข้น เครื่องปรุง และแป้ง (modified tarch) หรือผักดอง 60 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับน้ำส้มสายชู น้ำตาล เครื่องปรุง และแซวนแทนกัม (xanthan gum) ก็จะได้ผลิตภัณฑ์ใหม่ซึ่งมีรสชาติอร่อย

Tamany and Sarkar (1996) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักพื้นเมือง "mesu" ที่ทำจากยอดหน่อไม้ (*Dendrocalamus hamiltonii Nees* และ *Bambusa tulda Roxb.* และ *Dendrocalamus sikkimensis Gamble*) ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองของประเทศอินเดีย โดยพบแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ดังต่อไปนี้ *L. plantrum, L. brevis,* และ *Pediococcus pentosaceus* ซึ่ง *P. pentosaceus* จะพบในช่วงต้นของกระบวนการหมัก และ *L. plantrum* จะพบมากในช่วงสุดท้ายของการหมัก โดย *P. pentosaceus* พบในวันที่ 1-2 ของกระบวนการหมัก มีจำนวนสูงสุดถึง 10^7 CFU/g wet weight ในขณะที่ *L. brevis* พบมากในวันที่ 4 ของการหมัก *P. pentosaceus* จะมีจำนวนค่อยๆ ลดลงในขณะที่ *L. plantarum* จะมีปริมาณเพิ่มขึ้นจนสิ้นสุดการหมักและมีค่า pH ของผลิตภัณฑ์สุดท้ายเท่ากับ 3.8

Tamany *et al.* (2005) สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจาก Gundruk, sinki และ khalpi ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ผักดองในรัฐ Sikkim และ ผลิตภัณฑ์ inziangsang เป็นผลิตภัณฑ์ผักหมักดองของรัฐ Nagaland และ Manipur ของประเทศอินเดีย ทำการจำแนกจีโนไทป์ด้วย RAPD-PCR, repetitive element PCR และ species-species PCR พบ *L. brevis, L. plantarum, Pediococcus pentosaceus, pediococcus acidilactici* และ *Leuconostic fallx*

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบันได้มีนักวิจัยจำนวนมาก ที่ศึกษาวิจัยเกี่ยวกับการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจาผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ซึ่งมีรายงานว่า *L. plantarum* เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดหนึ่งที่มักพบในผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากพืชผักและผลไม้ นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดอื่นด้วย ตัวอย่างเช่น ในผลิตภัณฑ์ผักหมักที่มีจำหน่าย 21 ชนิดในประเทศยุโรปส่วนใหญ่จะเป็นน้ำผักผลไม้หมัก และผลิตภัณฑ์ผักหมักเช่น ผลโอลิฟว์หมัก (fermentations of olives)แตงกวาดอง (pickles)กะหล่ำปลีดอง (sauerkraut, Korean kimchi) ซึ่งผักเหล่านี้มีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักอยู่ในปริมาณสูงในกระบวนการผลิตผักหมักดองเหล่านี้ จะการเติมเกลือลงไปเพื่อทำให้เกิดการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติก ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้จะมีอยู่ในผักสดแต่ในปริมาณที่น้อยคือ 0.5-1.5% ของจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบ ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่นิยมใช้ในการผลิตน้ำผักหมักได้แก่ *L. plantarum L. casei, L. acidophilus, Lactococcus lactis* เป็นต้น (caplice and Fitzgerald,1999)

Tamang *et al.* (2008) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียยกรดแลคติกจาก mesu, soidon,soibum และ soijum ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากยอดหน่อไม้ซึ่งเป็นอาหารพื้นเมืองในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศอินเดีย ด้วยเทคนิค APE และ Biology system ทำการจำแนกจีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติกด้วย RAPD-PCR, rep PCR, species-specific PCR, 16S rRNA gene

Ahmad Faris Mohd Adnan and Tan (2007) ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารพื้นเมืองของประเทศมาเลเซีย ได้แก่ "tapai" ซึ่งผลิตจากมันสำปะหลังหรือสาคูที่ทำจากมันสำปะหลังหมัก (fermented tapioca) และ "tempoyak" ผลิตจากเนื้อของผลทุเรียนหมัก (fermented durian flesh) สามารถแยกแบคทีเรียได้ 126 ไอโซเลต และเมื่อคัดกรองจากคุณสมบัติของเอนไซม์คาตาเลส และคุณสมบัติการติดสีแกรม พบว่า 55 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียกรดแลคติด เมื่อทำการจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลคติกโดย API 50CHL kit พบว่า *Lactococcus lactis, Lactobacillus casei* และ *L. plantarum*

Omar *et al.* (2006) ทำการแยก *L. plantarum* โดยเทคนิค 16s rDNA sequencing จาก bensa alga ซึ่งเป็นอาหารหมักพื้นเมืองผลิตจากข้าวโอ๊ตต้มในน้ำหรือนม และผสม millet (*Pennisetum glaucum*)นิยมใช้เป็นอาหารสำหรับทารกหรือเด็กอ่อน โดยพบว่า *L. plantarum* ที่แยกได้มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคหลายชนิด ได้แก่ *Bacillus cereus, Bacillus licheniformis, Enterococcus faecalis, Listeria innocua, Listeria monocytogenes, Staphylococcus aureus, Escherichia coli* และ *Salmonella enterica*

Botes *et al.* (2007) *Lactobacillus paracasei* subsp.*paracasei,L.pentosus,L. plantarum,L.s brevis, Lactobacillus rhamnasus* และ *L.s fermentum* จาก Boza ซึ่งเป็นเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ต่ำผลิตจาก barley, oats, millet, wheat or rice โดยเทคนิค PCR ที่มี primers เฉพาะและ primers ที่ถูกสร้างขึ้นเพื่อ amplify the D1/D2 domain of 26S rDNA.

Sanni *et al.* (2002) ได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* และ *L.fermentum* ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส จากอาหารพื้นเมืองของประเทศไนจีเรีย (Nigerian traditional fermenter foods) ได้แก่ fufu, burukutu, ogi-baba และ kunu-zakki

Randazzo et al. (2004) ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจาก fermented green olives โดยเทคนิคทางชีวเคมี และ PCR/Restriction Fragments Length Polymorphism(RFLP) ของ 16S rDNA พบว่าสามารถจำแนกได้ *L. brevis* ซึ่งเป็น heterofermentative และ *L. casei* และ *L. plantarum* ซึ่งเป็นhomofermentative นอกจากนี้ยังพบ *Enterococcus faecium* ด้วย

Almeida et al.(2007) ศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มหมัก "cauim"ซึ่งเป็นอาหารหลักสำหรับทารกแรกเกิดจนถึง 2 ปี และสามารถใช้เป็นอาหารสำหรับผู้ใหญ่ได้ทำจากมันสำปะหลัง ข้าว ข้าวโพด และถั่ว พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่พบตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมักจนสิ้นสุดกระบวนการหมัก ได้แก่ *L. plantarum* และ *L.pentosus* นอกจากนี้ยังพบ *Carynebacter xerosis, C. amylocolatum, C. vitarumen, Bacillus cereus, B. licheniformis, B. pumilus, B.circulans* และ *Paenibacillus macerans* ด้วย

Paludan-Muller *et al.* (1999) ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติกจากวัตถุดิบที่ใช้ผลิตส้มฟัก และส้มฟัก ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปาหมักของประเทศไทย (a Thai liw-salt fermented fish product) ทำการจำแนกฟีโนไทป์โดย API 50-CH พบว่า สามารถแยก *Lactococcus lactis subsp. Lactis* และ *Leuconostoc citreum* ได้จากเนื้อปลา (fish fillet) และเนื้อปลาสับ (minced fish) แยก *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* ได้จากข้าวสุก (boiled rice) และ *Weisella confuse* แยกได้จากกระเทียมสับและใบกล้วย นอกจากนี้ยังสามารถแยก *L. plantarum, L. pentosus* และ *Pediococcus pentosaceus* ได้จากวัตถุดิบอีกด้วย โดยพบว่าจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแบบ homofermentative และทำให้เกิดการเปรี้ยวมี 2 ชนดหลักๆ ได้แก่ *L. plantarum* และ *L. pentosus* ซึ่งพบในระหว่างกระบวนการหมักส้มฟัก

Papamanli *et al.* (2003) ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากไส้กรอกหมักใน 4 ระยะของการบ่ม พบว่า 90% ของเชื้อที่แยกได้ทั้งหมดเป็น *Lactobacilli* 4% เป็น *Enterococci* 3% เป็น *Pediococcus sp.* นอกจากนี้ยังพบ *Weissella viridescens, Leuconostoc pseudomesenteroides* และ *Leuconostoc sp.* ด้วย โดยเชื้อในกลุ่ม *Lactobacilli* ที่แยกได้จำแนกเป็นสยพันธุ์ต่างๆ ได้ดังต่อไปนี้ *L. sakei, L. curvatus* และ *L. plantarum* ทุกสายพันธุ์สามาเติบโตได้ในอุณหภูมิ 15°C และเจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ 6.5%

บทที่ 3

วิธีการดำเนินงานวิจัย

แบคทีเรีย เครื่องมือ อุปกรณ์ต่างๆ อาหารเลี้ยงเชื้อ สารเคมี และวิธีการศึกษา

1. แบคทีเรียแลคติค (แยกจากตัวอย่างผักดองที่จำหน่ายในตลาดเขตอำเภอเมืองนครศรีธรรมราช 4 ชนิด ได้แก่ ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง และสะตอดอง จำนวน 100 ตัวอย่าง) { เก็บแบคทีเรียแลคติคที่แยกได้ในอาหารแข็ง GYP agar ที่ใส่แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) 1 เปอร์เซ็นต์ แต่ใช้ glucose 0.5 เปอร์เซ็นต์}
2. เครื่องมือ อุปการณ์เครื่องแก้ว และวัสดุของใช้

- เครื่องวัด O.D. (Spectrophotometer) : Pharmacia รุ่น LKB-Novaspec 2 วิธีการใช้ดูที่ภาคผนวก ค.
- เครื่องปั่น (Vortex mixer) : รุ่น Vortex- 2 genie ยี่ห้อ Selentific industries
- ตู้เพาะเชื้อ (Incubator) : อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส รุ่น WTB ยี่ห้อ Binder
- เครื่องชั่งไฟฟ้า : รุ่น MSE ยี่ห้อ Ainsworth , Oven (ตู้อบอุณหภูมิสูง): ยี่ห้อ Jouan
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำใช้ไฟฟ้า (autoclave) : Model 8 8LL ยี่ห้อ Kokusan
- ตู้อบความชื้น (Hygrometer) : รุ่น Discicator D – Box , ตู้เย็น : ยี่ห้อ Mitsubishi
- Hotplate : รุ่น EGO 11550, กล้องจุลทรรศน์ : ยี่ห้อ Olympus
- จานเพาะเชื้อ : ยี่ห้อ Pyrex , ขวดรูปชมพู่ (Flash) : ขนาด 250 มิลลิลิตร
- หลอด Cuvette , กรวยแก้ว , เทอโมมิเตอร์ , แท่งแก้วงอ , หลอดหยด , ตะเกียงแอลกอฮอล์
- เข็มเขี่ยเชื้อ (needle) , ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop)
- ภาชนะสำหรับเตรียมอาหาร ได้แก่ หม้อ , ทัพพี , ช้อนตักสาร , Spatula , กรวย , หม้อตวงสแตนเลส
- กระดาษชั่งสาร , สำลี , กระดาษชำระ , ไม้ขีดไฟ , ถุงพลาสติกทนความร้อนขนาด 8×12 นิ้ว
- ยางรัดของ , คอขวดพลาสติก , ถาดอลูมิเนียม , ที่วางหลอดทดลอง (Rack)
- ตะกร้าสแตนเลสสำหรับบรรจุหลอดทดลอง , กระบอกสแตนเลสสำหรับบรรจุปิเปต
- กระบอกสแตนเลสสำหรับบรรจุจานเพาะเชื้อ , กระดาษเช็ดเลนส์ , ฟองน้ำสำหรับเช็ดโต๊ะ
- กระดาษวัดพีเอช , แผ่นอลูมิเนียมฟอยด์ , ปากคีบ (foreep) , กระดาษซับสไลด์

- กระดาษตราปลา (Paper dise) : เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 6 มิลลิเมตร ยี่ห้อ Sehleicher & Schueli
- ฟองน้ำล้างแก้ว , น้ำยาล้างจานซันไลต์ , ฝาหลอดทดลอง , กะละมังล้างหลอด , ไม้บรรทัด
- ปากกาเขียนแก้วแบบ Pemanent และ non-Permanent ,

3. อาหารเลี้ยงเชื้อ (ภาคผนวก ก)

plate count agar (PCA)

de Man, Rogasa and shape (MRS) agar

de Man, Rogasa and shape (MRS) Broth

4. น้ำกลั่นและสารเคมี

น้ำมันสน (Ceder oil) , น้ำยาฆ่าเชื้อ (Disinfeentant), แอลกอฮอล์ (95 เปอร์เซ็นต์)

ชุดอุปกรณ์ สำหรับการย้อมสีแกรม ได้แก่ สี Crystal violet สารละลายไอโอดีน Ethyl alcohol และ สี Safranin O, Xylene , น้ำกลั่น , โซเซียมเอไซด์ (Sodium azide) , แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate), โซเดียมคลอไรด์ (Nacl) , $MgSo_4$, $7H_2O$, $MnSO_4$, $7H_2O$, Sodium acetate , bile salt

5. วิธีการดำเนินการทดลอง

5.1 สำรวจเก็บข้อมูลทางกายภาพ เคมี จุลชีววิทยาของตัวอย่างผักดองท้องถิ่นภาคใต้

5.1.1 การเก็บตัวอย่างผักดองในท้องถิ่นภาคใต้ ได้แก่ สะตอดอง ผักเสี้ยนดอง ผักกาดดอง และหน่อไม้ดอง โดยทำการเก็บตัวอย่างผักดอง น้ำผักดอง และเนื้อผักดองในระหว่างกระบวนการผลิต และที่ทำการหมักเสร็จแล้ว ตัวอย่างละประมาณ 500 กรัมบรรจุถุงพลาสติกที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

5.1.2 การวิเคราะห์ทางกายภาพ สังเกตลักษณะความขุ่นใสของน้ำผักดอง

5.1.3 การวิเคราะห์ทางเคมี นำตัวอย่างน้ำผักดองไปวัด pH ด้วย pH meter บันทึกผลการทดลองที่ได้

5.1.4 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา

5.1.4.1 วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด นำตัวอย่างน้ำผักดอง ประมาณ 10 ml. และเนื้อผักดอง (25 กรัม) ใส่ใน 0.1% Peptone water 90 และ 225 ml. ตามลำดับ เขย่าให้เข้ากับแล้วทำการเจือจาง (serial dilution) ให้ได้ประมาณ 10^{-5} จากนั้นใช้สารละลายตัวอย่าง 1.0 ml. แต่ละความเข้มข้นมาทำ pour plate technique ลงในอาหาร plate count agar (PCA) โดยทำตัวอย่างละ

3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชม. นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ได้แล้วบันทึกผลการทดลอง

5.1.4.2 วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผักดองแต่ละชนิด นำตัวอย่างน้ำผักดองแต่ละชนิดที่เจือจางแล้วปริมาณ 1.0 ml. มาทำ pour plate technique ลงในอาหาร MRS agar (de Man, Rogasa and shape) โดยทำตัวอย่างละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 35 °C เป็นเวลา 48 ชม. นับจำนวนโคโลนีทั้งหมดที่ได้แล้วบันทึกผลการทดลอง

5.2 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผักดองแต่ละชนิด

5.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดในผักดองแต่ละชนิด

ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดในผักดองแต่ละชนิด ได้แก่ สะตอดอง ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง และหน่อไม้ดอง โดยนำตัวอย่างผักดองหนัก 25 กรัม ลงในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร ซึ่งบรรจุในถุงพลาสติกชนิดทนร้อน ขนาด 8×12 นิ้ว ที่สวมปากถุงด้วยคอขวดสำหรับเพาะเห็ด อุดจุดสำลีและนึ่งฆ่าเชื้อมาแล้ว ทำการผสมให้ตัวอย่างผักดองและน้ำเกลือผสมกันอย่างดีแล้ว ใช้ปิเปตดูดซัสเพนซัส (suspension) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่บนอาหารแข็ง MRS agar ที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ และโซเดียมเอไซด์ (sodium azide) 0.02 เปอร์เซ็นต์ (ในกรณี spread plate) เกลี่ย suspension ให้ทั่วจานด้วยแท่งแก้วงอซึ่งฆ่าเชื้อโดยจุ่มแอลกอฮอล์ลนไฟ และทิ้งให้เย็นแล้วนำไปบ่มที่อุณภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงหรือมากกว่านั้น เมื่อครบเวลาที่กำหนดแล้วให้เลือกจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีซึ่งมีบริเณใสของการยับยั้ง (clear zone) โดยการแบ่งจานเพาะเชื้อออกเป็น 8 ส่วน เท่า ๆ กัน เก็บเชื้อจากส่วนใดส่วนหนึ่งของจานทุกโคโลนี นำมาทำให้บริสุทธิ์ แล้วเก็บในอาหารแข็ง MRS ที่มี แคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธีแทงเข็มลงในอาหาร (deep tube) เก็บที่อุณหภูมิ 2-5 องศาเซลเซียส ถ่ายเชื้อทุก 1 เดือน

5.2.2 การศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีบางประการ

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.2.1. มาศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีบางประการ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจัดจำแนก

แบคทีเรีย โดยยึดแนวการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 8th edition (Kandler and Wiess, 19986)

5.2.2.1 การติดสีแกรม (Gram stain) ใช้แบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MRS agar อายุ 36-48 ชั่วโมง ไปย้อมสีแกรม ดูรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ ทำได้โดยเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ซึ่งมีหยดน้ำกลั่น 1 หยด สเมียร์เชื้อเป็นวง ปล่อยให้รอยสเมียร์แห้ง และตรึงเซลล์โดยนำแผ่นไสลด์ผ่านเปลวไฟจนแห้ง นำมาย้อมด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเลตเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนเกินทิ้ง ล้างรอยสเมียร์เพื่อกำจัดคริสตัลไวโอเลตส่วนเกินด้วยแอลกอฮอล์ 95 % จากนั้นล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลายซาฟรานิน โอ (Safranin O) เป็นเวลา 1 นาที ล้างสารละลายส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้แผ่นสไลด์แห้ง นำไปศึกษารูปร่างของเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

5.2.2.2 การเจริญบนอาหารแข็ง เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่บนอาหาร MRS agar 48 ชั่วโมง แล้วบันทึกลักษณะโคโลนีของเชื้อโดยดูลักษณะรูปร่าง ขอบ และลักษณะการสร้างสารสี (pigment) ของโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ที่บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชม.

5.2.2.3 การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ใช้เชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MRS agar อายุ 36-48 ชั่วโมง ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ แตะโคโลนีบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้มาขยี้ลงบนแผ่นสไลด์ที่หยดด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3เปอร์เซ็นต์ ประมาณ 1-2 หยด ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าการทดสอบแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดนั้นให้ผลเป็นบวก (positive) หรือสร้างคาตาเลส ถ้าไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าผลเป็นลบ (negative) หรือไม่สร้างคาตาเลส คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียที่ไม่สร้างคาตาเลสไปทดสอบในขั้นต่อไป

5.2.2.4 ความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ โดยเตรียมอาหารเหลว MRS ที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ โดยอบเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่อุณหภูมิที่ 110 % เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง นำไปเติมลงในอาหาร MRS โดยให้มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำอาหารเหลวดังกล่าวไปฆ่าเชื้อ เขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS 24 ชั่วโมง จำนวน 1 ลูป ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ในอาหารเหลว MRS agar ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37°C ตรวจสอบผลการเจริญของเชื้อภายใน 2-3 วัน บันทึกผล

5.2.2.5 ความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิต่าง ๆ ทำได้โดยเขี่ยเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว MRS จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อควบคุมอุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส แล้วตรวจสอบการเจริญที่อายุการบ่ม 24 ชั่วโมงและ 7 วัน บันทึกผลการเจริญของเชื้อ

จากนั้นเลือกเฉพาะเชื้อที่ติดสีแกรมบวก และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยเก็บเชื้อที่คัดเลือกไว้ในอาหาร MRS agar slant เก็บที่อุณหภูมิ 4°C โดยทำการถ่ายเชื้อทุก ๆ 2 สัปดาห์เพื่อเก็บเชื้อไว้ทดสอบต่อไป

5.3 การศึกษาประสิทธิภาพการหมักของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการ

ทดสอบประสิทธิภาพการหมักของแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS broth โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ในข้อ 5.2 มาเลี้ยงใน MRS broth ปริมาตร 100 มล.ในฟลาสก์ 125 มล. ตรวจสอบทุก 24 ชม. เป็นเวลา 3 วัน โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

5.3.1 การวิเคราะห์ทางเคมี เช่น วัด pH และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก

5.3.1.1 วัด pH โดยใช้ pH meter

5.3.1.2 วิเคราะห์ปริมาณกรดทั้งหมด ทำได้โดยนำน้ำผักดอง 10 มล. ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. เติมน้ำ 10 มล. แล้วหยดสาร phenolphthalein ลงไป 3-4 หยดเพื่อใช้เป็น indicator นำไปไตเตรตกับสารละลาย Sodium hydroxide มาตรฐาน 0.1 N บันทึกปริมาณ Sodium hydroxide ที่ใช้ในการไตเตรตจนสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพู นำผลที่ได้มาคำนวณหาปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก โดยใช้สูตร

$$\% \text{ กรดแลคติก} = \frac{\text{มิลลิลิตร NaOH X normality ของ NaOH X 90.08 X 100}}{\text{มิลลิลิตรของตัวอย่าง X 100}}$$

5.3.2 การวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา โดยวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียแลคติกผักดองแต่ละชนิดตามข้อ 5.2 แล้วคัดเลือกเชื้อที่มีการสร้างกรดแลคติกสูง และมีปริมาณเชื้อสูง จากนั้นทำการเก็บเชื้อที่คัดเลือกได้ใน MRS agar slant เพื่อศึกษาในขั้นต่อไป

5.4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

ทำการบ่งชี้ชนิดแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.3 แล้วนำข้อมูลที่ได้ไปเปรียบเทียบกับ Bergey"s Manual of Systemetic Bacteria volume 2. (1986) และ Bergey"s Manual of Determinative Bacteriology. (1996) โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้จากข้อ 5.4 อายุ 24 ชม. ใน MRS agar slant มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ โดยศึกษาดังนี้

5.4.3.1 ศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการ streak เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกบนอาหาร MRS agar แล้วตรวจสอบลักษณะการเจริญของเชื้อ ลักษณะโคโลนี สี ขนาด ความขุ่น/ใส รูปร่าง ความทึบแสง เป็นต้น

5.4.3.2 ศึกษาสัณฐานวิทยาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อศึกษาลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัว

5.4.3.3 ศึกษาความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ในอาหารเหลว MRS agar ที่มีการเติมโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส แล้วบันทึกผลหลังจากวันที่ 3, 5 และ 7

5.4.3.4 ศึกษาความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิต่าง ๆ เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ในอาหารเหลว MRS agar บ่มที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส แล้วบันทึกผลหลังจากวันที่ 1 และ 7

5.4.3.5 ศึกษาการสร้างเอนไซม์คะตะเลสการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ใช้เชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MRS agar อายุ 36-48 ชั่วโมง มาเกลี่ยบนสไลด์ที่สะอาด แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ลงบนเชื้อ ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าผลเป็นบวก เชื้อนั้น

สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้ ถ้าไม่มีฟองก๊าซเกิดขึ้น แสดงว่าผล
เป็นลบ เชื้อนั้นไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสได้

5.4.3.6 การทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยใช้ API 50 CHL strip เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากผักดองและมีประสิทธิภาพการหมักสูง

บทที่ 4

ผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างผักดองได้แก่ สะตอดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดองและผักกาดดองเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง โดยเก็บตัวอย่างจากตลาดสด จำนวน 100 ตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ได้ผลดังนี้

4.1 สำรวจเก็บข้อมูลทางกายภาพ เคมี จุลชีววิทยาของตัวอย่างผักดองท้องถิ่นภาคใต้

จากการเก็บตัวอย่างผักดองในท้องถิ่น ได้แก่ สะตอดอง ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง และหน่อไม้ดอง จำนวนทั้งหมด 100 ตัวอย่าง (ภาพที่ 4.1) ศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีโดยสังเกตลักษณะความขุ่นใสของน้ำผักดอง แล้วนำตัวอย่างน้ำผักดองไปวัด pH ด้วย pH meter ได้ผลดังตารางที่ 4.1 และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา พบแบคทีเรียแลกติกพบจำนวน 51 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.00 และจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มี 55 ไอโซเลต สำหรับจำนวนแบคทีเรียแลกติกในผักดองเมื่อนับจำนวนโดยใช้วิธี plate count technigue ด้วยอาหาร MRS พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง 6.0×10^{6} -7.0×10^{9} CFU/g (ตารางที่ 4.2) ได้ผลดังตารางที่ 4.2

ภาพที่ 4.1 ตัวอย่างผักดอง

ตารางที่ 4.1 ค่าเฉลี่ยข้อมูลทางกายภาพ และเคมีของตัวอย่างผักดอง

ตัวอย่าง	ลักษณะทางกายภาพ	ค่าความเป็นกรดด่าง
สะตอดอง	ลักษณะเม็ดสะตอยังคงสภาพ ไม่เปื่อยเละ สีไม่คล้ำ สีของน้ำดองค่อนข้างขุ่น มีฝ้าเล็กน้อย	3.78
ผักกาดดอง	เนื้อผักกาดแข็ง กรอบ ไม่เปื่อยเละ น้ำผักดองออกสีเหลืองอ่อนและใส	3.65
ผักเสี้ยนดอง	ลักษณะผักดองสีไม่คล้ำ สีของน้ำดองออกสีแดงอ่อนและใส ไม่มีฝ้า	3.91
หน่อไม้ดอง	เนื้อหน่อไม้ดองเป็นชิ้นไม่เละ สีขาวไม่คล้ำ น้ำดองค่อนข้างใส	3.58

ตารางที่ 4.2 แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากผักดองที่เก็บตัวอย่างจากอำเภอเมืองจังหวัดนครศรีธรรมราช

ชนิดผักดอง	จำนวนตัวอย่างทั้งหมด	จำนวนตัวอย่างที่พบเชื้อแบคทีเรียแลกติก	ร้อยละของตัวอย่างทั้งหมดที่แยกได้	จำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่แยกได้	ร้อยละของจำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่แยกได้	จำนวนแบคทีเรียแลกติกที่พบ (CFU/g)
ผักกาดดอง	25	18	72.00	20	36.36	7.0×10^9
ผักเสี้ยนดอง	25	15	60.00	15	27.27	7.0×10^7
สะตอดอง	25	8	32.00	8	14.55	6.0×10^6
หน่อไม้ดอง	25	10	40.00	12	21.82	6.5×10^6
รวม	**100**	**51**		**55**		

4.2 การศึกษาเชื้อแบคทีเรียแลคติกในผักดองแต่ละชนิด

เมื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate technigue บนอาหาร MRS agar ที่มีการเติม calcium carbonate สามารถแยกเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ แตกต่างกัน ได้แก่ โคโลนีที่มีขนาดใหญ่ ขอบเรียบ นูนทึบ โคโลนีที่มีขนาดเล็ก ขอบเรียบ นูนทึบ เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลสให้ผลลบ ย้อมติดสีแกรมบวก มีลักษณะรูปร่าง และการจัดเรียงตัวหลายแบบ (ตารางที่ 4.3) ได้แก่ รูปร่างเป็นแท่ง มีทั้งที่เป็นแท่งสั้นและแท่งยาว การจัดเรียงตัวเป็นโซ่ มีจำนวนเชื้อที่แยกได้ 37 ไอโซเลต รูปร่างกลม เรียงตัวแบบกระจาย จำนวนเชื้อที่แยกได้ 16 ไอโซเลต และรูปร่างกลมสายพันธุ์ที่เรียงตัวกันเป็นคู่ที่เซลล์ติดกันจำนวนเชื้อที่แยกได้ 2 ไอโซเลต

ตารางที่ 4.3 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้

ชนิดผักดอง	การติดสีแกรม	การทดสอบคะตะเลส	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	จำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่แยกได้	ร้อยละของจำนวนไอโซเลตทั้งหมดที่แยกได้
ผักกาดดอง หน่อไม้ดอง	บวก	ลบ	กลม	กระจาย	16	29.09
ผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดองและสะตอดอง	บวก	ลบ	แท่ง	โซ่สั้น ๆ	37	67.27
ผักกาดดอง	บวก	ลบ	กลม	คู่, tetrad	2	3.64
รวม					**55**	**100.00**

4.3 การศึกษาประสิทธิภาพการหมักของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้ในห้องปฏิบัติการ

หลังการทดสอบประสิทธิภาพการหมักของแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS broth โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงใน MRS broth แล้ววัด pH และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก และวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียแลคติกทุก 24 ชม. เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงคัดเลือกเชื้อที่มีการสร้างกรดแลคติกสูง และมีปริมาณเชื้อสูง เพื่อนำไปเทียบเคียงชนิดต่อไป ได้ผลตามตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ประสิทธิภาพการหมักของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

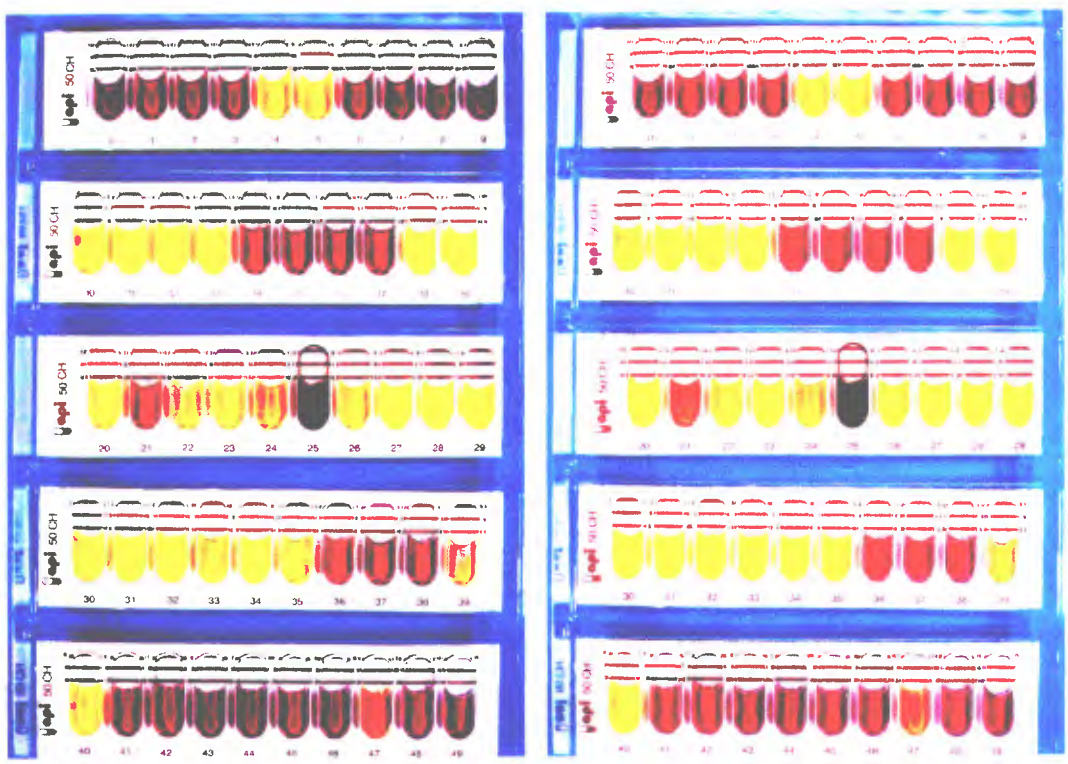
ลำดับ	ไอโซเลต	pH	ปริมาณกรดทั้งหมด	จำนวนแบคทีเรียแลคติก CFU/g
1	K14	3.65	0.68 ± 0.01	6.0×10^6
2	K15	3.64	0.73 ± 0.02	4.8×10^7
3	K20	3.60	0.78 ± 0.05	6.3×10^7
4	N10	3.56	0.68 ± 0.02	5.8×10^6
5	N12	3.58	0.75 ± 0.01	6.0×10^7

4.4. การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้

ทำการเปรียบเทียบเคียงชนิดของแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้ มาเทียบเคียงชนิดตามวิธีการของ Bergey's Manual determinative bacteriology volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และ Lactic acid bacteria (Salminen and Wright, 1993) และทำการศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีบางประการ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรีย โดยยึดแนวการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 8th edition (Kandler and Wiess, 19986) ได้แก่ การศึกษารูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การติดสีแกรม (Gram stain) การเจริญบนอาหารแข็ง MRS agar การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส และความสามารถในการเจริญในสภาพความเป็นกรดด่าง 4.4.และ 9.6 พบว่าแบคทีเรียที่ 5 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้ให้ผลเหมือนกันคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง มีการเรียงตัวเป็นสายโซ่สั้นๆ ไม่พบการจัดเรียงตัวแบบสี่เซลล์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10°C และ40°C แต่มีความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการเจริญที่ pH 4.4 แต่ไม่สามารถเจริญที่ pH 9.6 (ตารางที่ 4.5) จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาทำการทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยใช้ API 50 CHL strip เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากผักดองและมีประสิทธิภาพการหมักสูง พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลตคือเชื้อ *Lactobacillus plantarum* (ภาพที่ 4.2)

ตารางที่ 4.5 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียแลคติก

ลักษณะที่ศึกษา	รหัสแบคทีเรียแลคติก				
	K14	K15	K20	N10	N12
Tetrad formation	-	-	-	-	-
การเจริญที่ 10°C	-	-	-	-	-
การเจริญที่ 40°C	-	-	-	-	-
การเจริญในร้อยละ 6.5 NaCl	+	+	+	+	+
การเจริญในร้อยละ 18 NaCl	+	+	+	+	+
การเจริญที่ pH 4.4	+	+	+	+	+
การเจริญที่ pH 9.6	-	-	-	-	-



ภาพที่ 4.2 ผลทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยใช้ API 50

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างผักดองได้แก่ สะตอดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดองและผักกาดดอง เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง โดยเก็บตัวอย่างจากตลาดสด จำนวน 100 ตัวอย่างมาตรวจวิเคราะห์ได้ผลดังนี้ การศึกษาลักษณะทางกายภาพและเคมีโดยสังเกตลักษณะความขุ่นใสของน้ำผักดองพบว่าผักดองทั้งหมดมีลักษณะสีไม่คล้ำ สีของน้ำดองอ่อนและใส มีความเป็นกรดเบสอยู่ระหว่าง 3.58-3.91 และเมื่อทำการวิเคราะห์ทางจุลชีววิทยา พบว่ามีตัวอย่างผักดองที่พบแบคทีเรียแลกติกจำนวน 51 ตัวอย่าง คิดเป็นร้อยละ 51.00 และจำนวนแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้มี 55 ไอโซเลต สำหรับจำนวนแบคทีเรียแลกติกในผักดองเมื่อนับจำนวนโดยใช้วิธี plate count technigue ด้วยอาหาร MRS พบว่ามีปริมาณแบคทีเรียแลกติกอยู่ระหว่าง 6.0×10^{6} - 7.0×10^{9} CFU/g

เมื่อทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate technigue บนอาหาร MRS agar ที่มีการเติม calcium carbonate สามารถแยกเชื้อโคโลนีเดี่ยว ๆ แตกต่างกัน ได้แก่ โคโลนีที่มีขนาดใหญ่ ขอบเรียบ นูนทึบ โคโลนีที่มีขนาดเล็ก ขอบเรียบ นูนทึบ เมื่อทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลสให้ผลลบ ย้อมติดสีแกรมบวก มีลักษณะรูปร่าง และการจัดเรียงตัวหลายแบบ ได้แก่ รูปร่างเป็นแท่ง มีทั้งที่เป็นแท่งสั้นและแท่งยาว การจัดเรียงตัวเป็นโซ่ มีจำนวนเชื้อที่แยกได้ 37 ไอโซเลต รูปร่างกลม เรียงตัวแบบกระจาย จำนวนเชื้อที่แยกได้ 16 ไอโซเลต และรูปร่างกลมสายพันธุ์ที่เรียงตัวกันเป็นคู่ที่เซลล์ติดกันจำนวนเชื้อที่แยกได้ 2 ไอโซเลต

หลังการทดสอบประสิทธิภาพการหมักของแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS broth โดยนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงใน MRS broth แล้ววัด pH และปริมาณกรดทั้งหมดในรูปกรดแลคติก และวิเคราะห์จำนวนแบคทีเรียแลคติกทุก 24 ชม. เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงคัดเลือกเชื้อที่มีการสร้างกรดแลคติกสูง และมีปริมาณเชื้อสูง เพื่อนำไปเทียบเคียงชนิดต่อไป พบว่าสามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกได้ 5 ไอโซเลต ซึ่งมีการสร้างกรดแลคติกสูง และมีปริมาณเชื้อสูง ได้แก่ไอโซเลต K14, K15, K20, N10 และ N12 โดยมีความเป็นกรดเบสอยู่ในระหว่าง 3.56- 3.65 ปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.68-0.78 และมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลคติกอยู่ระหว่าง 5.8×10^{6}-

6.3×10^7 CFU/g ตามลำดับ จากนั้นทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) แบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้โดยนำมาเทียบเคียงชนิดตามวิธีการของ Bergey's Manual determinative bacteriology volume 2 (Kandler and Weiss, 1986) และ Lactic acid bacteria (Salminen and Wright, 1993) และทำการศึกษาลักษณะการเจริญ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะทางชีวเคมีบางประการ เพื่อใช้เป็นแนวทางในการจัดจำแนกแบคทีเรีย โดยยึดแนวการจัดจำแนกตาม Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 8th edition (Kandler and Wiess, 19986) ได้แก่ การศึกษารูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การติดสีแกรม (Gram stain) การเจริญบนอาหารแข็ง MRS agar การสร้างเอนไซม์คะตะเลส ความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ ความสามารถในการเจริญในอุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส และความสามารถในการเจริญในสภาพความเป็นกรดด่าง 4.4.และ 9.6 พบว่าแบคทีเรียที่ 5 ไอโซเลตที่คัดเลือกได้ให้ผลเหมือนกันคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างเป็นแท่ง มีการเรียงตัวเป็นสายโซ่สั้นๆ ไม่พบการจัดเรียงตัวแบบสี่เซลล์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 10°C และ40°C แต่มีความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ มีความสามารถในการเจริญที่ pH 4.4 แต่ไม่สามารถเจริญที่ pH 9.6 จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้มาทำการทดสอบการย่อยคาร์โบไฮเดรต 49 ชนิด โดยใช้ API 50 CHL strip เพื่อยืนยันชนิดของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกได้จากผักดองและมีประสิทธิภาพการหมักสูง พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 ไอโซเลตคือเชื้อ *Lactobacillus plantarum*

เอกสารอ้างอิง

นภา โล่ทอง, 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุเทพมหานคร : ฟันนี่ พับบลิชชิ่ง.

นภา โล่ทอง. 2535. กล้าเชื้ออาหารหมัก และเทคโนโลยีการหมัก. กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

บุษยา บุนนาค. 2532. "การเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์และองค์ประกอบอาหารหมักเกาหลี "โคจูจาง" เมื่อหมักที่อุณหภูมิ 32°C และ 37°C", การประชุมสัมมนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, ครั้งที่ 12, 20-22 ตุลาคม 2529, กรุงเทพฯ, หน้า 496-497.

พรรณราย ศรีธัญโกศ. 2530. คู่มือการถนอมอาหาร. สถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย, กรุงเทพฯ. หน้า 43.

ภัทรพล จันทราภรณ์. 2543. สภาะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดยเชื้อ *Lactobacillus casei* ssp. *rhamnosus* (SN.11) ที่ถูกตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มัทนา แสงจินดาวงศ์. 2538. คุณภาพและมาตรฐานของผลิตภัณฑ์ประมง. *ใน* จุลชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ประมง. หน้า 86-133. กรุงเทพฯ : ภาควิชาผลิตภัณฑ์ประมง คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

มิ่งขวัญ มิ่งเมือง, 2517, การศึกษาจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นขณะหมักผักกาดเขียวปลี (Brassica junceu, (L.) Czern et coss). วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 1-87.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล, 2536, ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากจุลินทรีย์. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 3-33 น.

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

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. ว. สงขลานครินทร์ 22 : 177-189.

ศิรินาถ หนูเอก. 2540. การคัดเลือกแบคทีเรียแลกติกที่สร้างสารแบคเทอริโอซินจากอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีอาหาร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศิริลักษณ์ สิทธวาลัย. 2546. ทฤษฎีอาหารเล่ม 2 หลักการถนอมอาหารและการควบคุมคุณภาพอาหาร.คณะอุตสาหกรรมการเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

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

อรวรรณ เลาหสินนุรักษ์. 2544. การยืดอายุการเก็บรักษาส้มฟักโดยการฉายรังสี. วิทยานิพนธ์บัณฑิตวิทยาลัย สาขาผลิตภัณฑ์ประมง ภาควิชาประมง. กรุงเทพมหานคร : มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Adam MR. and Moss MO, 1995. The Royal Society of chemistry. Cambridge Food Microbiology : 232-248.

Axelsson, L.T. 1993. Lactic Acid Bacteria : classification and physiology, In Lactic Acid Bacteria. (ed. Salminen, S. and Wright, A.V.) New York : Marcel Dekker. Pp. 1-64.

Axelsson, L. 1998. Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology. Marcel Dekker, Inc. New York.

Axelsson, L. Lactic Acid Bacteria : Classification and Physiology, pp. 1-66. *In* S. Salminen., A. Von Wright. and A. Ouwehand. Lactic Acid Bacteria : Microbiological and Functional Aspects. 3rd. Marcel Dekker, Inc., New York, 2004.

Barefoot, S.F., Chen, Y,R., Hughes, T.A., Bodine, A.B., Shearer, M.Y. and Hughes, M.D. 1994. Identification and purification of a protein that induces production of the Lactobacillus acidophilus bacteriocin lactacin B. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 3522-3528.

Bogovic-Matijasic, B and Rogelj, I. 2000. *Lactobacillus* K7-A new candidate for a probiotic strain. Food technol. biotechnol. 38 : 113-119.

Caridi, A. 2003. Identification and first characterization of lactic acid bacteria isolated from the artisanal ovine cheese Pecorino del Poro. International Journal of Dairy Technology. 56 : 105-110.

Conventry, M. J., Wan, J. Gordon, J. B., Mawson, R. F. and Hickey, M. W. 1996. Production of Brevisin 286 by *Lactobacillus brevis* VB 286 and partial characterization. J. Appl. Bacteriol. 80 : 91-98.

Daeschel, M.A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. J. Food Technol. 24 : 164-166.

Dellagio, F., L.M.T. Dicks and S. Torriani. The genus Leuconostoc, pp. 235-278. *In* B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel, eds. The Lactic Acid Bacteria vol.2: The Genera of Lactic acid Bacteria. Chapmam & Hall, Glasgrow, UK, 1995.

Devriese, L.A. and B. Pot. The genus Enterococcus, pp.237-366. *In* B.J.B Wood and W.H. Holzapfel, eds. The Lactic Acid Bacteria vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman & Hall Glasgow, UK, 1995.

Delgado, A., Brito, C., Fervereiro, P., Peres, C. and Marques, J.F. 2001. Antimicrobial activity of *L. plantarum*, isolated from a traditional lactic acid fermentation of table olives. EDP Science. 81 : 203-215.

De Martinis, E.C.P., Publio, M.R.P., Santarosa, P.R. and Freitas, F.Z. 2001. Antilisterial activity of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed Brazilian meat and meat products. Electronic journal of Braz. J. Microbiol.32 number 1

De vuyst, L and Vandamme, E.J. 1994. Lactic acid bacteria and bacteriocins : their practical importance. In Bacteriocins of lactic acid bacteria microbiology genetics and applications. Oxford : The Alden Press. pp. 1-12.

De Vuyst, L. and Vandamme, E. J. 1994a. Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. *In* Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria Microbiology, Genetics and Applications. (De Vuyst, L. and Vandamme, E.J., eds.) pp. 91-142. New York : Chapman & Hall.

Desai, P. and Sheth, T. 1997. Controlled fermentation of vegetables using mixed inoculum of lactic cultures. J. Food Sci. Technol. 34 : 155-158.

Desmazeaud, M. 1996. Growth inhibitors of lactic acid bacteria. *In* Dairy Starter Cultures.(Kolter, R., ed.) pp. 131-153. New York : VCH Publishers. Inc.

Elotmani, F. and Assobhei, O. 2003. *In vitro* inhibition flora of fish by nisin and lactoperoxidase system. Lett. in App. Microbiol.38 : 60-65.

Enan, G., El-Essawy, A. A., Uyttendaele, M. and Debevere, J. 1996. Antibacterial Activity of *Lactobacillus plantarum* UG1 Isolated from Cheese. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 4381-4387.

Ennahar, S., Aoud-Werner, D., Sorokine, O., Dorsselaer, A.V., Bringel, F., Hubert, J. C. and Hasselmann, C. 1996. Production of pediocin AcH by *Lactobacillus plantarum* WHE 92 isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 1901-1906.

Fiorentini, A.M., Sant'Anna, E.S., Porto, A.C.S., Mazo, J.Z. and Franco,B.D.G.M. 2001. Influence of bacteriocins produced by *Labtocacillus plantarum* BN in the shelf-life of refrigerated bovine meat. Brazillian Journal of Microbiology. 32 : 42-46.

Flores, S. H. and Alegre, R.M., 2001. Nisin production from *Lactococoous lactis* ATCC 7962 using supplemented whey permeate. Biotechnol.Appl.Biochem. 34 : 103-107.

Goncalves, L.M.D., Ramos, A., Almeida, J.S., Xavier, A.M.R.B. and Carrondo, M.J.T. 1997. Elucidation of the mechanism of lactic acid growth inhibition and production in batch cultures of *Lactobacillus rhamnosus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 48 : 346-350.

Gonzalez, B., Arca, P., Mayo, B and Suarez, J.E. 1994. Detection, purification and partial characterization of plantaricin C, a bacteriocin produced by a *Lactobacillus plantarum* strain of dairy origin. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 2158-2163.

Gould, G.W. 1996. Industry perspectives on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. J. Food Prot. 59 : 82-86.

Guerra, N.P. and Castro, L.P. 2003. Enhancement of nisin production by *Lactococcus lactis* in periodically re-alkalized cultured. Biotechnol. Appl. Biochem. 38 : 157-167.

Hammes, W.P., and Vogel, R.F. 1995. The genus *Lactobacillus*. *In* The genera of lactic acid bacteria. (Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H., eds.) pp. 19-49. Glasgow : Blackie Academic & Professional.

Hardie, J.M.And R.A. Whiley. 1995. The genus Streptococcus, pp. 75-124. In B.J. B. Wood and W. H. Holzapfel(eds.). The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman and Hall, Glasgow.

Herich, R. and Levkut, M. 2002. Lactic acid bacteria, probiotics and immune system. Vet.Med.-Czech. 47 : 169-180.

Hoover, D.G, and Harlander, S.K. 1993. Screening method for detecting bacteriocin activity. *In* Bacteriocins of lactic bacteria.(Hoover, G.D. and Steenson L.R., eds.) pp.23-37. New York : Academic press.

Hugenholtz, J., Kleerebezem, M., Starrenburg, M., Delcour, J., de Vos, W. and Hols, P. 2000. *Lactococcus lactis* as a cell factory for high-level diacetyl production. Appl. Environ. Microbiol. 66 : 4112-4114.

Ivanova, I, Kabadjova, P.,Pantev, A., Danova, S. and Dousset, X. 2000. Detection, purification and partial characterization of a novel bacteriocin substance produced by *Lactococcus lactis* subsp.*lactis*. B14 isolated from boza-bulbarian traditional cereal beverage. Biocatalysis-2000 Fundamentals & applications. 41 : 47-53.

Jimenez-Diaz, R., Rios-Sanchez, R.M., Desmazeaud, M., Riuz-Barba, J.L. and Piard, J. C. 1993. Plantaricin S and T, two new bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LPCO10 isolated from a green olive fermentation. Appl. Microbiol. 59 : 1416-1424.

Kandler and Weiss. 1986. Bergey 's manual determinative bacteriology.2 : 1208-1235.

Kimura, H., Nagano, R., Matsusaki, H., Sonomoto, K. and Ishizaki, A. 1997. A bacteriocin of strain *Pediococcus* sp. ISK-1 isolated from *Nukadoko* bed of fermented rice bran. Biosci. Biotech. Biochem. 61 : 1049 – 1051.

Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. FEMS. Microbiol. Reviews. 12 : 39-86.

Ko, S.H and Ahn, C. 2000. Bacteriocin production by *Lactococcus lactis* KCA2386 isolated from white kimchi. Food Sci.Biotechnol. 9: 263-269.

Lee J.Y., C.J. Kim and B. Kunz. "Identification of lactic acid bacteria isolated from Kimchi and studies on thrir suitablility for application as starter culture in the production of fermentedsausages." Meat Science. 72 (2006) : 437-445.

Leroy, F. and De Vuyst, L. 1999. Temperature and pH conditions that prevail during fermentation of sausages are optimal for production of the antimicrobial bacteriocin sakacin K. Appl. Environ. Microbiol.65 : 974-981.

Lewus, C. B. and Montville, T. J. 1992. Futher characterization of bacteriocin plantaticin BN, bavaricin MN and pediocin A. Food Biotechnol. 6 : 153-174.

McMullen, L.M. and Stiles, M.E. 1996. Potential for use of bacteriocin-producing lactic acid bacteria in the preservation meats. 59 : 64-71.

Meghrous, J., Hout, E., Quittelier, M. and Petitdemange, H. 1992. Regulation of nisin biosynthesis by continuous cultures and by resting cells of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis.* Microbiol. 143 : 879-890.

Moretro, T., Aasen, I.M., Storro, I. and Axeisson, L. 2000.Production of sakacin P by *Lactobacillus sakei* in a completely defined medium. J. of Appl. Microbiol. 88 : 356-358.

Niku-Paavola, M.L., Laitila, A., Mattila-Sandholm, T. and Haikara, A. 1999. New types of antimicrobial compounds produced by *Lactobacillus plantarum.* J. of Appl. Microbiol. 86: 29-35.

Ocana, V.S., De Ruizz Holgado, A.P. and Nader – Macfas, M.E. 1999. Selection of vaginal H_2O_2-generating *Lactobacillus* species for probiotic use. Current Microbiol. 38 : 279-284.

Ogunbanwo, S.T., Sanni, A.I. and Onilude, A.A. 2003a. Influence of cultural conditions on the production of bacteriocin by *Lactobacillus brevis* OG1. Afr. J. of Biotechnol. 2 : 179-184.

Omar, N.B., H. Abriouel, R. Lucas, M. Martinez-Canamero, J.P. Guyot and A. Galvez. "Isolattion of bacteriocinogenic Lactobacillus plantarum strains from ben saalga, a

traditional fermented gruel from Burkino Faso." International Journal of food Microbiology. 112 (2006): 44-50.

Parente, E. and Hill. 1992. Characterization of enterocin 1146, a bacteriocin from *Enterococcus faecium* inhibitoty to *Listeria monocytogenes*. J. Food Prot. 55 : 497-502.

Parente, E. and Ricciardi, A. 1999. Production, recovery and purification of bacteriocins from lactic acid bacteria. Appl. Microbiol. Biotechnol. 52 : 628-638.

Papamanli, E., N. Tzanetakis, E. Litopoulou- Tzanetaki and P. Kotzekidou. "Characteristion of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry-fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties." Meat Science. 65 (2003) : 859-867.

Paludan-Muller, C., H.H. Huss and L. Gram. "Characteristion of actic acid bacteria isolated from a Thai low-salt fermented fish product and the role of garlic as substrate for fermentation." International Journal of food Microbiology. 46 (1999) : 219-229.

Pol. I.E., van Arendonk, W.G.C., Mastwijk, H.C., Krommer, J., Smid, E.J. and Moezelaar, R. 2001. Sensitivities of germinating spores and carvaveol-adapted vegetative cells and spored of *Bacillus cereus* to nisin and Pulse-Electric-Field treatment. Appl. Environ. Microbiol. 67 : 1693-1699.

Rekhif, N., Atrih, A. and Lefebvre, G. 1994. Characterization and partial purification of plantaricin LC74, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* LC74. Biotechnol. Lett. : 771-776.

Ryan, M.P., Rea, M.C., Hill, C. and Ross, R.P. 1996. An Application in cheddar cheese manufacture for a strain of *Lactococcus lactis* producing a novel broad – spectrum bacteriocin, lacticin 3147. Appl. Environ. Microbiol. 62 : 612-619.

Ryan, M.P., Meaney, W.J., Ross, R.P. and Hill, C. 1998. Evaluation of lacticin 3147 and a teat seal containing this bacteriocin for inhibition of mastitis pathogens. Appl. Environ. Microbiol. 64 : 2287-2290.

Sarkar, P.K. and Banerjee, S. 1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacterial isolates obtained from natural habitats, J. Food Sci. Technol. 33 : 231-233.

Salminen, S. and Wright, A.V. 1993. Lactic Acid Bacteria. Ist ed. Marcel Dekker Inc. New York.

Salminnen, S. and Wright, A.V. 1998. Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Functional Aspects. Marcel Dekker,Inc., New York, USA.

Simpson, P.J., C. Stanton, G.F. Fitzgerald and R.P. Ross. "Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to hear and oxygen and survival following spay drying and storage." Journal of Applied Microbiology. 99 (2005): 493-501.

Simpson, W.J. and H. Taguchi, H. The genus *Pediococcus*, with notes on the genera *Tetratogenococcus and Aerococcus.* pp. 125-172. In B.J.B Wood and W.H. Holzapfel, eds. The Lactic Acid Bacteria vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman & Hall, Glasgow, UK, 1995.

Stiles, M.E. and W.H. Holzapfe. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." International Journal of Food Microbiology. 36 (1997) : 1-29.

Seppo, S. and Atte, V, W., 1993, Lactic Acid Bacteria, Mareei dekker, INC, New York, pp. 1-23.

Seppo, S., Atte, V, W, and Arthur, O., 2004, Lactic Acid Bacteria Microbiological and Functional Aspects, Mareel Dekker. New York. pp. 1-603.

Schillinger, U. and Lucke, F.K. 1989. Antimicrobial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. Appl. Environ. Microbiol. 55 : 1901-1906.

Scope, R.K. 1978. Techniques of protein purification. *In* Techniques in the Life Sciences :Techniques and Enzymes. Biochemistry. (Kornberg, H.L., Netcakfd, J.C., Northcote, D.H., Pogson, C.I. and Tipton, K.F., eds.) pp. 1-42, New York : Amsterdam, Elesevier, North-Holland Biochemical Press.

Soomro, A.H., Masud, T. and Anwarr, K., 2002. Role of lactic acid bacteria (LAB) in food preservation and human health-a review. Pakistan Journal of Nutrition. 1 : 20-24.

Spelhaug, S.R. and Harlander, S.K. 1989. Inhibition of foof born bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus.* J. Food Prot. 52 : 856-862.

Tahara, T. and Kanatoni, K. 1996. Isolation, partial characterization and mode of action of acidocin J1229, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* JCM 1229. J. Appl. Bacteriol. 81 : 669-677.

Teuber, M. The genus Lactococcus, pp 173-234. In B.J.B Wood and W.H. Holzapfel, eds. The Lactic Acid Bacteria vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria. Chapman & Hall, Glasgow, UK, 1995.

Tserovska, L., Stefanova, S., and Yordanova, T. 2000 - 2002. Identification of lactic acid bacteria isolated from katyk goat's milk and cheese. J. of culture collections. 3 : 48-52.

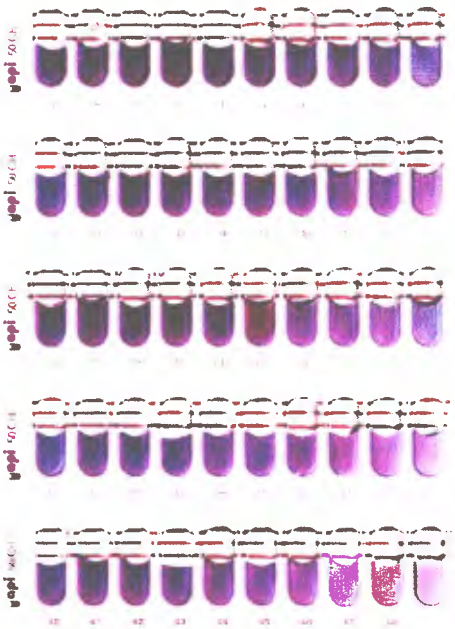
Ugean, P., Hamelin, J., Le Pennec, J.P. 1999. Influence of osmolarity and presence of an osmoprotectant on *Lactococcus lactis* growth and bacteriocin production. Appl. Environ. Microbiol. 65 : 291-293.

Wilderdyke, M.R., Smith, D.A. and Brashears, M.M. 2004. Isolation, identification, and selection of lactic acid bacteria from alfalfa sprouts for competitive inhibition of foodborne pathogens. J. of Food Protection. 67 :947-951.

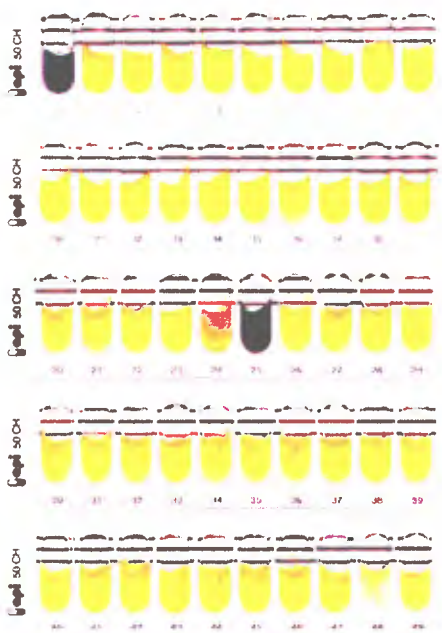
Wilaipan, P., Zendo, T., Sangjindavong, M., Nitisinorasert, S., Leelawatcharamas, V., Nakayama, J. and Sonomoto, K. 2002. Influence of physical factors and various complex media on growth and bacteriocin production of two-synergistic peptide with heat stable bacteriocin producer, *Enterococccus faecium* NKR-5-3, Isolated from Thai fermented fish. Kasetsart J.(Nat.Sci.) 36 : 268-277.

ภาคผนวก

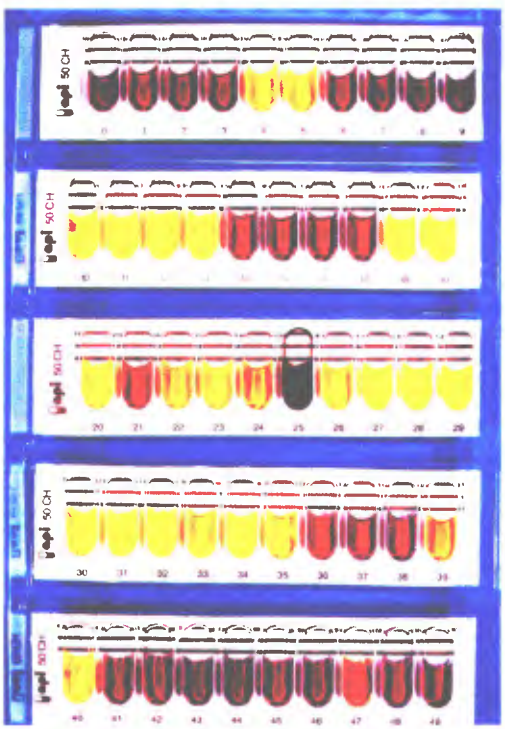
ผลการทดสอบเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่คัดเลือกได้โดยใช้ชุดทอสอบ API 50 CH



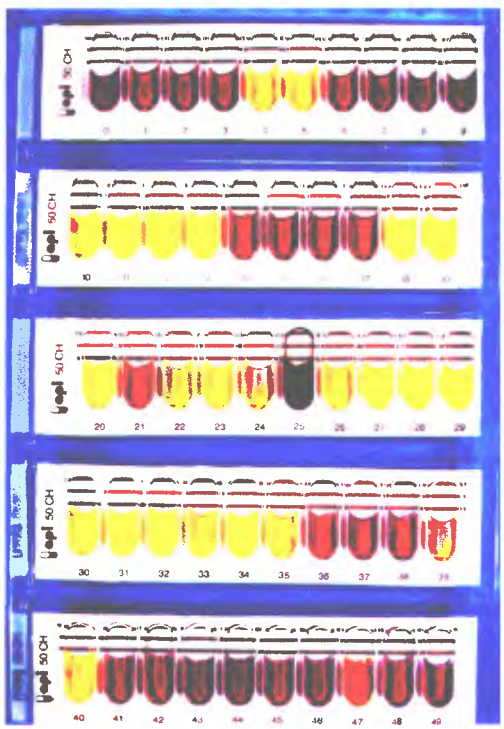
Negative control



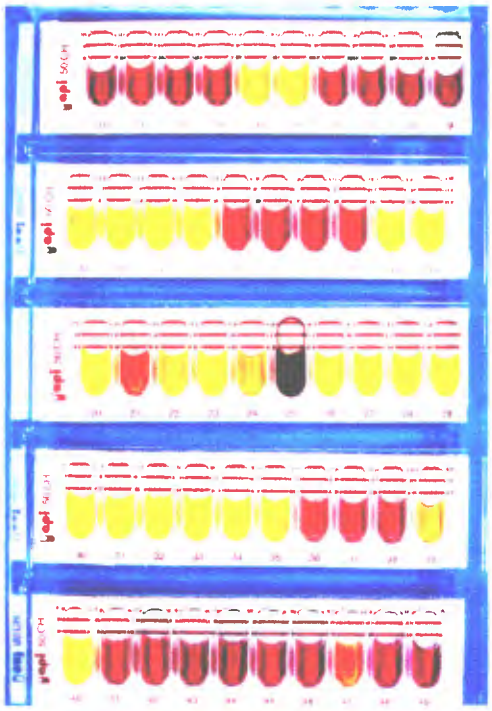
Positive control



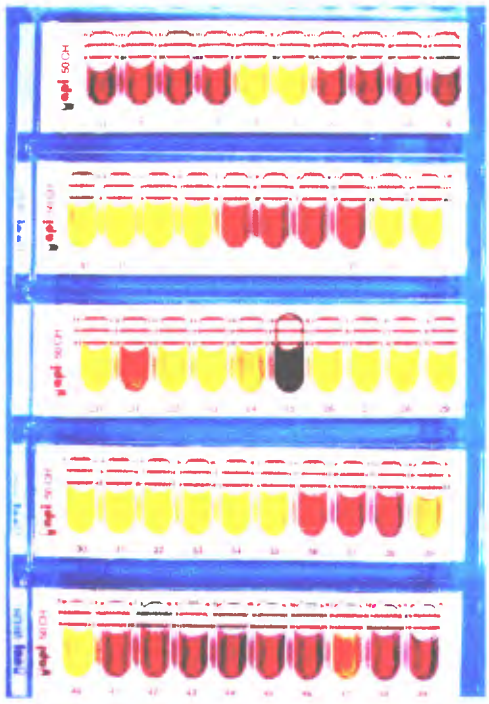
ไอโซเลต K14



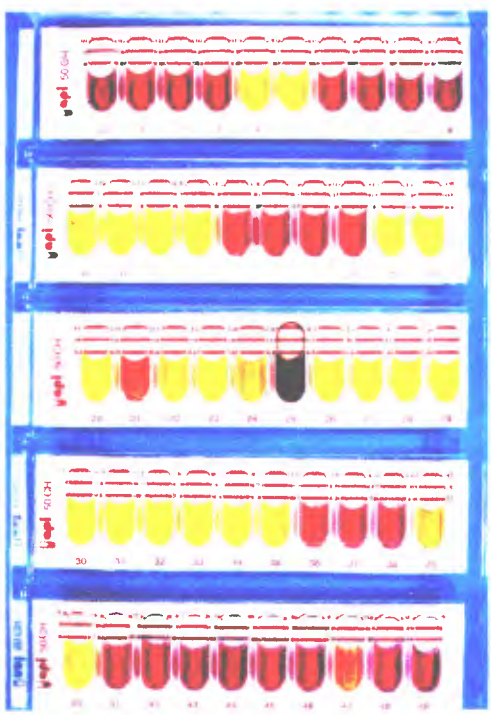
ไอโซเลต K15



ไอโซเลต K20



ไอโซเลต N10



ไอโซเลต N12