รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการผลิตบูดูด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเทคนิค PCR-DGGE

Study of changes in bacteria during production of *Budu* by culturing method and PCR-DGGE technique

ปวีณา ดิกิจ

อธิพันธ์ เสียมไหม

รายงานวิจัยฉบับนี้ได้รับเงินอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน (วช.)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

พ.ศ. 2559

(โครงการต่อเนื่องปีที่ 1)

ชื่องานวิจัย การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการผลิตบูดูด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเทคนิค PCR-DGGE

ผู้วิจัย ปวีณา ดิกิจ และ อทิพันธ์ เสียมไหม

คณะ วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

ปี 2559

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมี (ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณเกลือ) และการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการหมักบูดูโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน (360 วัน) โดยเก็บตัวอย่างน้ำหมักบูดูทุกๆ 15 วัน พบว่าบูดูมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.55 - 6.20, ปริมาณกรดแลกติกอยู่ในช่วง 1.14 - 1.95 % และมีปริมาณเกลือ (NaCl) อยู่ในช่วง 7.6 - 34.0 % ส่วนการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียซึ่งศึกษาทั้งปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด, แบคทีเรียย่อยโปรตีนแบคทีเรียย่อยไขมัน, แบคทีเรียแลกติก และ Enterobacteriaceae โดยการคัดแยกบนอาหาร Plate count agar, Skim milk agar, Tributyrin agar, MRS agar และ MacConkey agar ตามลำดับ พบว่าในระยะ 45 วันแรกของการหมักจะมีการเจริญของแบคทีเรียมากที่สุด และปริมาณแบคทีเรียจะลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการหมัก 360 วัน อย่างไรก็ตามตรวจพบ Enterobacteriaceae เฉพาะในช่วง 7 วันแรกของการหมักเท่านั้น จากการสุ่มเลือกโคโลนีและจัดจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาร่วมกับคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ สามารถรวบรวมเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 42 ไอโซเลต จากการตรวจดูแบคทีเรียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มีบทบาทในช่วง 6 เดือนแรกของการหมักมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมและรูปท่อน ในขณะที่แบคทีเรียที่มีบทบาทในช่วง 6 เดือนหลังจนสิ้นสุดการหมักส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน จากนั้นวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16s rRNA ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 42 ไอโซเลต พบว่าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* จำนวน 28 สายพันธุ์ รองลงมาคือ *staphylococcus* จำนวน 8 สายพันธุ์ นอกจากนี้ยังเจอแบคทีเรีย *Oceanobacillus* 2 สายพันธุ์, *Enterococcus* 2 สายพันธุ์, *Enterobacter* 1 สายพันธุ์ และ *Acinetobacter* อีก 1 สายพันธุ์ ทั้งนี้พบว่าตรวจเจอแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ตลอดระยะเวลาของการหมักบูดู 12 เดือน ส่วนแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* และสกุลอื่นๆ โดยส่วนใหญ่จะตรวจเจอในช่วง 6 เดือนแรกของการหมักบูดู

Research Title Study of changes in bacteria during production of *Budu* by culturing method and PCR-DGGE technique

Researcher Paweena Dikit and Atipan Saimmai

Faculty Science and Technology

Year 2016

ABSTRACT

The chemical (pH, lactic acid content and salt content) and microbiological analysis by culturing method were studied during production of Budu for 12 months (360 days). The samples were taken every 15 days during fermentation. The results showed that pH of Budu samples were in the ranged of 5.55 - 6.20, lactic acid content were in the range of 1.14 - 1.95 %, while the salt (NaCl) content ranged between 7.6 - 34.0 %. The study of changes in bacteria were also studied including total viable count bacteria, lipid degrading bacteria, proteolytic bacteria, lactic acid bacteria and Enterobacteriaceae by isolating on plate count agar, tributyrin agar, skim milk agar, MRS agar and MacConkey agar, respectively. There were high total bacteria count at the early stage of fermentation (0-45 days) then there were gradually decrease until at the end of fermentation (360 days). However, Enterobacteriaceae were found only during the first 7 days of fermentation. A total of 42 isolates of bacteria were isolated and preliminary screening by using morphological and some properties of biochemical characteristics. Observation under light microscopic revealed that both cocci and rod shape were the dominant bacteria in the first 6 months of fermentation, whereas after the last 6 months of fermentation dominated by rod shape bacteria. In addition, all 42 isolates were identified by using 16 s rRNA gene. An identified bacteria in Budu were *Bacillus* 28 strians, *staphylococcus* 8 strains. Moreover, there were *Oceanobacillus* 2 strains, *Enterococcus* 2 strains, *Enterobacter* 1 strain and *Acinetobacter* 1 strain. *Bacillus* were detected thoughout the fermentation period, while *Staphylococcus* and other strains were detected in the first 6 months of fermentation.

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยเรื่องการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการผลิตบูดูด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเทคนิค PCR-DGGE นี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน (วช.) ในปีงบประมาณ 2559 (โครงการต่อเนื่อง 2 ปี) การวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการผลิตบูดูโดยเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักบูดูโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเทคนิค PCR-DGGE ทั้งนี้ในโครงการปีที่ 1 ได้ทำการเก็บตัวอย่างบูดูจากการผลิตจริงในระยะเวลาต่างๆ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในระหว่างการผลิตโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ 16S rRNA gene

รายงานฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่และครอบครัว ที่คอยให้แนะนำ และให้กำลังใจในการทำโครงการวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณพี่ๆ เพื่อนๆ ทุกคน ตลอดจนผู้ช่วยวิจัยและนักวิทยาศาสตร์ ที่คอยให้คำแนะนำ และให้กำลังใจตลอดการทำงานวิจัยครั้งนี้ด้วย

ปวีณา ดิกิจ
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มีนาคม 2560

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
ขอบเขตโครงการวิจัย	2
นิยามศัพท์เฉพาะ	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
บูดู	3
แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมักบูดู	4
เทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ	13
การตรวจติดตามจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารโดยวิธีการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	17
การตรวจติดตามจุลินทรีย์โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)	20
การตรวจติดตามจุลินทรีย์โดยเทคนิค DGGE	26
บทที่ 3 วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	
วัสดุและอุปกรณ์	28
วิธีการทดลอง	
- การตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียในบูดูโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	30
- การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อที่คัดแยกได้	32
- การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้	33
- การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	33
- การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้	34
- การตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียในบูดูด้วยเทคนิค PCR-DGGE	34
- การตรวจสอบ Detection limit ของเทคนิค PCR-DGGE	35

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

		หน้า
บทที่ 4	**ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง**	
	การตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียในบูดูโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ	36
	การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อที่คัดแยกได้	47
	การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้	58
	การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR	59
	การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้	61
บทที่ 5	**บทสรุปและข้อเสนอแนะ**	
	บทสรุป	67
	ข้อเสนอแนะ	68
	ภาคผนวก	
	- ภาคผนวก ก สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหาร	70
	- ภาคผนวก ข การวิเคราะห์ทางเคมี	74
	- ภาคผนวก ค การวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ	76
	- ภาคผนวก ง วิธีการย้อมสีแบบแกรมและน้ำยาที่ใช้ย้อม	78
	- ภาคผนวก จ ผลการทดลอง	80
	- ภาคผนวก ฉ ลักษณะและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์	88
	- ภาคผนวก ช รูปภาพขั้นตอนการหมักบูดู	97
	เอกสารอ้างอิง	100
	ประวัติผู้วิจัย	107

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. PCR primers used for DGGE analysis of DNA from microbial communities directly extracted from food. 22
2. จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือนแรกของการหมัก 51
3. จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือนหลังของการหมัก 52
4. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร Tributyrin agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือนแรกของการหมัก 53
5. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร Skim milk agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือนแรกของหมัก 54
6. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร MRS agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือนแรกของหมัก 55
7. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร tributyrin agar และ skim milk agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือนหลังของการหมักจนสิ้นสุดการหมัก 56
8. เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร MRS agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือนหลังของการหมักจนสิ้นสุดการหมัก 57
9. แสดงผลการเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ทั้งหมด 42 สายพันธุ์ 63
10. การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหารชนิดต่างๆ ตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน 80
11. การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน 81
12. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือนแรกของการหมัก 82
13. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือนหลังจนสิ้นสุดการหมัก 83
14. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียย่อยไขมันที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือนแรกของการหมัก 84

สารบัญตาราง (ต่อ)

หน้า

15. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียย่อยไขมันที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือนหลังจนสิ้นสุดการหมัก 85
16. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือนแรกของการหมัก 86
17. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือนหลังจนสิ้นสุดการหมัก 87
18. ลักษณะสัณฐานวิทยาและรูปร่างเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า 90

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1.	Homolactic fermentation of lactic acid bacteria	11
2.	Heterolactic fermentation of lactic acid bacteria	12
3.	Flow diagram of the application of PCR-DGGE analysis to food samples	24
4.	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำหมักบูดูบนอาหาร Plate Count Agar ตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก	37
5.	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำหมักบูดูบนอาหาร Skim milk agar ตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก	38
6.	การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแบคทีเรียย่อยไขมันในตัวอย่างน้ำหมักบูดูบนอาหาร Tributyrin Agar ตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก	39
7.	เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียย่อยโปรตีนและแบคทีเรียย่อยไขมัน ตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก (a) ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10% (b) ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 15%	40
8.	การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างน้ำหมักบูดูบนอาหาร MRS agar ตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก	42
9.	แสดงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียย่อยโปรตีน แบคทีเรียย่อยไขมัน และปริมาณแบคทีเรียแลกติก ตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน	42
10.	การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก	44
11.	การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก	45
12.	เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน	46
13.	การเปลี่ยนแปลงปริมาณเกลือในตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก	47
14.	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในระยะเวลา 6 เดือนแรกของการหมัก บนอาหาร plate count agar, tributyrin agar, skim milk agar และ MRS agar	48
15.	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในระยะเวลา 6 เดือนหลังของการหมักจนสิ้นสุดการหมัก บนอาหาร plate count agar, tributyrin agar, skim milk agar และ MRS agar	49
16.	genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน	58

สารบัญรูป (ต่อ)

		หน้า
17.	genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน	59
18.	PCR product ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน	60
19.	PCR product ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน	61
20.	แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อทั้ง 42 สายพันธุ์กับเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank	66
21.	ลักษณะโคโลนีและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Plate Count agar (PCA), Skim milk agar และ Tributyrin agar	88
22.	ลักษณะโคโลนีและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร MRS agar	89

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

บูดูเป็นอาหารหมักดั้งเดิมของภาคใต้ตอนล่างทำจากปลาทะเลขนาดเล็กโดยผสมกับเกลือแล้วหมักไว้ตามธรรมชาติประมาณ 12 เดือน จนกระทั่งเนื้อปลาเปื่อยยุ่ยกลายเป็นของเหลวข้นสีเทาอมน้ำตาลแดง ปัจจุบันการผลิตบูดูยังคงอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นและกระบวนการผลิตยังแตกต่างกันไปตามสูตรของแต่ละท้องถิ่น ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่ได้มีรสชาติและกลิ่นรสที่ต่างกัน โดยทั่วไปคุณลักษณะหรือคุณภาพของผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่หมักโดยเชื้อจุลินทรีย์ประจำถิ่นจะขึ้นกับคุณภาพของวัตถุดิบ ส่วนผสม สภาวะในการหมักหรือบ่ม และองค์ประกอบของจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมัก การมีจุลินทรีย์ที่แตกต่างสกุล (genera) หรือสายพันธุ์ (species) หรือแม้แต่ strain ก็ส่งผลให้รสชาติหรือคุณภาพของอาหารหมักแตกต่างกันออกไป (Rantsiou and Cocolin, 2006) ในกระบวนการผลิตบูดูนั้นมีจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักอยู่ 3 กลุ่มหลัก ได้แก่ (1) แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีน แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถผลิตเอนไซม์โปรติเอสเพื่อเปลี่ยนโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ (2) แบคทีเรียที่ย่อยไขมัน แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างเอนไซม์ไลเปสเพื่อย่อยไขมันและน้ำมันให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล และ (3) แบคทีเรียแลกติก เป็นแบคทีเรียที่มีความสำคัญมากที่สุด โดยมีบทบาทหลักในการสร้างกลิ่นรสเฉพาะตัวของผลิตภัณฑ์ เนื่องจากมีการสร้างกรดอินทรีย์และสารให้กลิ่นรสอื่นๆ จากการหมักคาร์โบไฮเดรต (Miambi *et al*., 2003) นอกจากนี้กรดอินทรีย์ที่แบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นมายังช่วยยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียก่อโรคและแบคทีเรียที่ทำให้อาหารเน่าเสียทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัย (Kostinek *et al*., 2005)

ปัจจุบันมีการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารหมักชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง การศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ โดยทั่วไปนิยมใช้วิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจนได้โคโลนีเดี่ยวที่บริสุทธิ์แล้วนำไปจัดจำแนกสายพันธุ์โดยศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและทำการทดสอบทางชีวเคมี วิธีการเหล่านี้เป็นวิธีดั้งเดิมที่มีข้อจำกัดมากมาย ปัจจุบันได้มีการพัฒนาเทคนิคทางชีวโมเลกุล (molecular technique) ที่สามารถศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ถึงระดับยีน โดยการวิเคราะห์ความแตกต่างของลำดับนิวคลีโอไทด์ในอาร์เอ็นเอหรือดีเอ็นเอ และจัดแบ่งความหลากหลายของจุลินทรีย์ออกมาเป็นกลุ่มตามความแตกต่าง (pattern หรือ profile) หรืออาจเรียกว่าเทคนิค DNA fingerprint โดยสามารถใช้เปรียบเทียบจุลินทรีย์ในอาหาร รวมทั้งติดตามการเปลี่ยนแปลงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ในระหว่างกระบวนการหมักที่ระยะเวลาต่างๆ วิธีที่นิยมใช้ คือ เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) ซึ่งเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป สำหรับการตรวจสอบและศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารและสามารถใช้ตรวจสอบกลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรวจพบได้ยากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์หรือสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (unculturable microorganism)

แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักบูดู ได้แก่ กลุ่มแบคทีเรียทนเกลือที่ย่อยสลายไขมันและโปรตีน และกลุ่มแบคทีเรียแลกติกทนเกลือ (ธนุสรา และปราณี, 2533; วรรณา, 2541) แต่แบคทีเรียดังกล่าวได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและวิเคราะห์หรือจัดจำแนกสายพันธุ์โดยการใช้การทดสอบทางชีวเคมี ทำให้มีข้อจำกัดในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในแต่ละช่วงเวลาของการหมักบูดูได้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการหมักบูดูโดยเปรียบเทียบระหว่างวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและการใช้เทคนิค PCR-DGGE

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการผลิตบูดูโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE และการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องในกระบวนการหมักบูดูโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อและเทคนิค PCR-DGGE

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ปีที่ 1 ทราบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญต่อการผลิตบูดูในแต่ละช่วงเวลาเพื่อเป็นแนวทางในการใช้ประโยชน์ในระดับอุตสาหกรรมต่อไป

ปีที่ 2 ทราบชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ไม่สามารถเพาะเลี้ยงได้ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญต่อการผลิตบูดูในแต่ละช่วงเวลาเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการยกระดับมาตรฐานการผลิตบูดู

ขอบเขตของโครงการวิจัย

เก็บตัวอย่างบูดูจากการผลิตจริงในระยะเวลาต่างๆ เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ ในระหว่างการผลิตโดยใช้เทคนิค PCR-DGGE เปรียบเทียบกับการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แยกได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อโดยใช้เทคนิคการวิเคราะห์ 16S rRNA gene

นิยามศัพท์เฉพาะ

บูดู (*Budu*) หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักปลาทะเลกับเกลือในอัตราส่วนที่เหมาะสม ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ปี จนเนื้อปลาเปื่อยหลุดออกจากก้าง นำไปกรองเอาก้างและเกล็ดออก อาจเติมน้ำตาลด้วยก็ได้ เป็นอาหารที่นิยมกันมากในชาวมลายู ชาวไทยมุสลิม และชาวไทยในภาคใต้ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2547)

Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) หมายถึง เทคนิคสำหรับการตรวจสอบและศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารและสามารถใช้ตรวจสอบกลุ่มจุลินทรีย์ที่ตรวจพบได้ยากโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากอาหารเลี้ยงเชื้อมีสารอาหารที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์หรือสภาวะไม่เหมาะสมต่อการเจริญ (unculturable microorganism)

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. บูดู (*Budu*)

บูดู หรือ น้ำบูดู หมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักปลาทะเลกับเกลือในอัตราส่วนที่เหมาะสม ตั้งทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ปี จนเนื้อปลาเปื่อยหลุดออกจากก้าง นำไปกรองเอาก้างและเกล็ดออก อาจเติมน้ำตาลด้วยก็ได้ เป็นอาหารที่นิยมกันมากในชาวมลายู ชาวไทยมุสลิม และชาวไทยในภาคใต้ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2547)

ปัญหาที่พบในการผลิตบูดูโดยส่วนใหญ่เกิดจากกระบวนการผลิต คุณภาพของวัตถุดิบ การปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค การปนเปื้อนของสารพิษ ความสะอาดและการสุขาภิบาล การใช้วัตถุกันเสียและการเกิดกรดแลกติกในระหว่างการหมัก ดังนั้นสำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมจึงได้กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำบูดู เลขที่ 325/2547 เพื่อให้บูดูมีลักษณะที่เหมาะสมต่อการบริโภค โดยคุณลักษณะของบูดูที่เหมาะสมต่อการบริโภคควรมีลักษณะดังนี้ (มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน, 2547)

1. ลักษณะทั่วไป ต้องเป็นของเหลวขุ่น มีตะกอนเมื่อวางทิ้งไว้
2. สี ต้องมีสีที่ดีตามธรรมชาติของน้ำบูดู และไม่มีสีดำคล้ำ
3. กลิ่น ต้องมีกลิ่นที่ดีตามธรรมชาติของน้ำบูดู ปราศจากกลิ่นอื่นที่ไม่พึงประสงค์
4. สิ่งแปลกปลอม ต้องไม่พบสิ่งแปลกปลอมที่ไม่ใช่ส่วนประกอบที่ใช้ เช่น เส้นผม ขนสัตว์ ดิน ทราย กรวด ชิ้นส่วนหรือ สิ่งปฏิกูลจากสัตว์
5. สารปนเปื้อน
    - ตะกั่ว ต้องไม่เกิน 1 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม
    - สารหนู ต้องไม่เกิน 2 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม
    - ปรอท ต้องไม่เกิน 0.5 มิลลิกรัมต่อตัวอย่าง 1 กิโลกรัม
6. วัตถุเจือปนอาหาร ห้ามใช้วัตถุกันเสียและสีสังเคราะห์ทุกชนิด
7. เกลือ ต้องไม่น้อยกว่าร้อยละ 19 โดยน้ำหนัก
8. จุลินทรีย์
    - *Salmonella* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 25 กรัม
    - *Staphylococcus aureus* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.1 กรัม
    - *Clostridium perfringens* ต้องไม่พบในตัวอย่าง 0.01 กรัม
    - รา ต้องไม่เกิน 100 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม
    - ยีสต์ ต้องไม่เกิน 1×10^5 โคโลนีต่อตัวอย่าง 1 กรัม

บูดูเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ใช้ปลาและเกลือเป็นวัตถุดิบหลักในการหมัก วัตถุดิบเหล่านี้อาจเป็นแหล่งของเชื้อโรคที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคได้ เช่น

- *Vibrio parahaemolyticus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ชอบความเค็ม มักจะปนเปื้อนมากับอาหารทะเล (Wong *et al*., 1999) เมื่อเชื้อเข้าสู่ทางเดินอาหารของผู้บริโภคจะสร้างสารพิษที่ทำให้เกิดการทำลายเม็ดเลือดแดง (Lee *et al*., 2002) หากบริโภคอาหารที่มีเชื้อนี้ปนอยู่จะทำให้มีอาการปวดท้องและคลื่นไส้ บางครั้งอาจมีอาการอาเจียนด้วย (Su and Liu, 2007)

- *Bacillus cereus* เป็นแบคทีเรียที่สร้างสปอร์ เจริญทั้งในที่ที่มีและไม่มีอากาศ มักพบในดิน ฝุ่น น้ำ ธัญพืช (โดยเฉพาะข้าวและแป้งข้าวโพด) และผักต่างๆ *B. cereus* จะสร้างสารพิษ 2 ชนิดที่ออกฤทธิ์ต่างกัน คือ ชนิดที่ทำให้เกิดอาการคลื่นไส้และชนิดที่ทำให้เกิดอาการท้องเดิน (Vernam and Evans, 1991) การใช้น้ำซาวข้าวในการหมักบูดูจึงอาจเกิดการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้ได้

นอกจากนั้นสุขลักษณะที่ไม่เหมาะสมในกระบวนการผลิตบูดูยังเป็นสาเหตุหนึ่งที่อาจพบเชื้อก่อโรคได้ โดยส่วนใหญ่มักเกิดจากตัวผู้ผลิตและการใช้อุปกรณ์ที่ไม่สะอาด เชื้อก่อโรคที่พบ เช่น

- *Escherichia coli* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ในลำไส้ของสัตว์เลือกอุ่น ใช้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของอุจจาระ (Tsegaye *et al*., 2004) ผู้ที่บริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้จะมีอาการท้องเดิน อาจถ่ายเป็นมูกเลือด นอกจากนั้นอาจมีอาการปวดท้อง ปวดศีรษะ คลื่นไส้และอาเจียน (Radke and Alocilja, 2005)

- *Staphylococcus aureus* เป็นแบคทีเรียที่มีแหล่งกำเนิดอยู่ตามฝี หนอง สิว ผิวหนัง ในจมูก ลำคอ และบาดแผล ปนเปื้อนกับอาหารโดยการสัมผัส ไอ หรือจาม (Migirov *et al*., 2005) หากผู้ผลิตมีอาการดังกล่าวอาจทำให้เชื้อนี้ปนเปื้อนมากับบูดูได้ เมื่อบริโภคสารพิษที่ผลิตจากเชื้อนี้เข้าสู่ร่างกายจะมีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ปวดท้องและท้องเดิน (Carmo *et al*., 2002)

- *Salmonella* sp. เป็นแบคทีเรียที่อยู่ในตระกูลเดียวกันกับเชื้อ *E. coli* อาศัยอยู่ตามลำไส้ของผู้ผลิต อาจปนเปื้อนมากับอุจจาระ เมื่อบริโภคอาหารที่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดนี้จะมีอาการท้องร่วง อาเจียน มีไข้ และรู้สึกไม่สบายตัว (Lim *et al*., 2005)

2. แบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมักบูดู

มีอยู่ 3 กลุ่มหลัก (ธนุสรา เหล่าเจริญสุข และปราณี ทองคำ, 2533) ได้แก่

- แบคทีเรียที่ย่อยโปรตีน แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างเอนไซม์ออกมาย่อยโปรตีนให้เป็นกรดอะมิโนชนิดต่างๆ ได้แก่ *Bacillus* spp. และ *Micrococcus* spp.

- แบคทีเรียที่ย่อยไขมัน แบคทีเรียหลายชนิดที่สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปส (lipase) ย่อยอาหารพวกไขมัน และน้ำมันให้เป็นกรดไขมัน และกลีเซอรอล (glycerol) ลักษณะการย่อยไขมันอาจเป็นแบบไฮโดรไลซิส (hydrolysis) หรือออกซิเดชัน (oxidation) แบคทีเรียเหล่านี้ ได้แก่ *Lactobacillus* spp., *Bacillus* spp. และ *Achromobacter* spp.

- แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความสำคัญกับอาหารหมักดองต่างๆ แบคทีเรียชนิดนี้จะสร้างกรดแลคติกลงไปในอาหาร ทำให้แบคทีเรียชนิดอื่นที่เป็นอันตรายต่ออาหารและคนเจริญไม่ได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้ ได้แก่ *Lactobacillus* spp. และ *Pediococcus* spp.

ในระหว่างการหมักบูดู ปริมาณแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในวันที่ 3 ถึงวันที่ 10 ปริมาณแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นจะสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของกรดแลคติก ในขณะที่ค่าความเป็นกรด-ด่างจะลดลง การบรรจุปลาที่ผสมเกลือในบ่อบูดูจนแน่นทำให้มีอากาศน้อยเหมาะแก่การเจริญของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก ส่วนแบคทีเรียชนิดอื่นที่ต้องการอากาศ และแบคทีเรียที่ไม่ทนเกลือจะลดลง ในระยะแรกของการหมักช่วงวันที่ 3 ถึงวันที่ 10 แบคทีเรียที่มีบทบาท คือ แบคทีเรียชนิดที่ทนเกลือสูง และสร้างกรด ได้แก่ แบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* มีประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์, แบคทีเรีย *Staphylococcus* spp. มีประมาณ 40 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และ coryneform มีเล็กน้อย เมื่อหมักบูดูเป็นระยะเวลา 60 วัน ปริมาณแบคทีเรียจะลดลงเรื่อยๆ โดยจะมีกรดแลคติกเกิดขึ้น 1.1 ถึง 1.3 เปอร์เซ็นต์ สภาพของอาหารหมักที่เป็นกรดจะไปทำลายแบคทีเรียชนิดที่ไม่ทนกรด ความเป็นกรดจะลดลงอย่างช้าๆ หรือคงที่ เนื่องจากกรดอะมิโนที่เกิดขึ้นในอาหารหมักจะทำหน้าที่เป็นบัพเฟอร์ได้อย่างดี น้ำบูดูที่มีอายุการหมัก 90 วันจะพบแบคทีเรีย *P. halophilus* ประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ และ coryneform ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ (วรรณา ชูฤทธิ์ และคณะ 2541)

แบคทีเรียที่พบในระยะแรกของการหมักอาจเป็นแบคทีเรียที่ติดมากับส่วนต่างๆ ของปลา ซึ่งปริมาณของแบคทีเรียที่ติดมากับปลานี้ไม่เท่ากันขึ้นกับความสดของปลา ขนาดปลา สภาพแวดล้อมที่ปลานั้นอยู่ตลอดจนกระบวนการขนส่งจากท่าเรือจนถึงผู้ผลิตบูดู หรืออาจจะติดมากับเกลือที่ใช้หมัก ซึ่งจะส่งผลต่อคุณภาพของบูดู อย่างไรก็ตามในการหมักบูดูนั้น ความเข้มข้นของเกลือ ความเป็นกรด-เบส อุณหภูมิ และปริมาณอาหารของแบคทีเรียจะมีบทบาทสำคัญกับจำนวนแบคทีเรียแต่ละชนิด ซึ่งแบคทีเรียที่ไม่สามารถทนสภาวะแวดล้อมในบ่อบูดูได้ก็จะตายลง แต่เอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นก่อนหน้าที่แบคทีเรียนั้นตาย ก็ยังสามารถย่อยสลายได้ต่อไป ถ้าสภาวะแวดล้อมนั้นเอื้อต่อการทำงานของเอนไซม์

วรรณา ชูฤทธิ์ (2541) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในกระบวนการหมักบูดูจากแหล่งผลิตต่างๆ จำนวน 35 ตัวอย่าง โดยมีอายุการหมักแตกต่างกันตั้งแต่ 7 วัน ถึง 2 ปี พบว่าแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในระยะ 7 วันแรกของการหมัก ได้แก่ แบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* และ *Staphylococcus epidermidis* ซึ่งพบมากถึง 40 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อทั้งหมด นอกจากนี้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis*, *Bacillus laterosporus* และ coryneform bacteria พบรวมกันถึง 25 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อทั้งหมด แบคทีเรียเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการช่วยย่อยสลายโปรตีนของเนื้อปลา และจะเจริญได้ดีในอาหารที่ไม่มีเกลือ และการเจริญจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่อความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น

แบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในระยะหลัง 7 วันแรกของการหมัก คือ แบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* ซึ่งพบว่าจะมีปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ หลังจากหมักไปแล้ว 7 วัน จนกระทั่งบูดูที่หมักได้ที่จะมีปริมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของเชื้อทั้งหมด จึงมีแนวโน้มว่าเป็นแบคทีเรียทีมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักเกี่ยวกับการสร้างกรดและกลิ่นรสในบูดู แบคทีเรียชนิดนี้เจริญไม่ได้ในอาหารที่ไม่มีเกลือ และการเจริญจะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เมื่ออาหารมีความเข้มข้นของเกลือเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดลองหมักบูดูโดยการเติมเชื้อแบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* บริสุทธิ์เข้าช่วย พบว่าทำให้ได้บูดูที่มีกลิ่นหอมกว่าบูดูที่หมักตาม

ธรรมชาติ จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรีย *P. halophilus* เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในการสร้างกรดและกลิ่นที่ดีในกระบวนการหมักบูดู

อรตรี รอดเจริญ (2542) คัดแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทยจำนวน 12 ชนิด เป็นอาหารหมักดองจากสัตว์ 7 ชนิด และอาหารหมักดองจากพืช 5 ชนิด รวม 192 ตัวอย่าง โดยจากตัวอย่างทั้งหมดมีตัวอย่างกุ้งส้ม 12 ตัวอย่าง พบว่าตัวอย่างกุ้งส้มมีค่าพีเอช 4.22 กรด 1.58 เปอร์เซ็นต์ เกลือ 3.13 เปอร์เซ็นต์ และจำนวนแบคทีเรียแลกติก $1.3x10^5$ CFU/g สามารถคัดแยกเชื้อ *Pediococcus* spp. จากตัวอย่างกุ้งส้มได้ 2 ไอโซเลต คือ *Pediococcus acidilactici* ทั้ง 2 ไอโซเลต และเมื่อทำการศึกษาผลการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ด้วยวิธี agar spot พบว่าเชื้อ *P. acidilactici* สามารถยับยั้ง *Bacillus cereus* ATTC 11778 และ *Staphylococcus aureus* ATTC 29273 ได้ดีกว่า *Escherichia coli* O157:H7 และ *Salmonella* Typhimurium 3230 เมื่อทดสอบการยับยั้งในสภาพที่มีการจำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์น้อยมากและไม่พบการยับยั้ง *E. coli* O157:H7 นอกจากนั้นยังทำการศึกษาการสร้างแบคเทอริโอซินโดยการทดสอบด้วยวิธี well diffusion assay พบว่า *P. acidilactici* ไม่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินได้

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2543) ศึกษาฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทยจำนวน 329 ตัวอย่าง ทำการคัดแยกได้ 212 ไอโซเลต โดยจัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* 198 ไอโซเลต และ *Pediococcus* 14 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียทั้งหมดไปทดสอบการยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 4 ชนิด คือ *B. cereus* ATTC 11778, *S. aureus* ATTC 25923, *E. coli* ATTC 25922 และ *S. Typhimurium* 3230 โดยวิธี agar spot พบว่าการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ของแบคทีเรียแลกติก 193 ไอโซเลตเกิดจากกรดอินทรีย์ เมื่อกำจัดผลการยับยั้งจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลตเท่านั้นที่แสดงผลการยับยั้ง โดย 1 ไอโซเลตจาก 10 ไอโซเลตดังกล่าวแยกได้จากตัวอย่างกุ้งส้ม คือ สายพันธุ์ *L. plantarum*

อัจฉรา หนูเพชร (2546) คัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย 23 ชนิด สามารถทำการคัดแยกแบคทีเรียแลกติกได้ 328 ไอโซเลต ซึ่งมี 48 ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างกุ้งส้มที่มีจำนวนแบคทีเรียแลกติก $5.4x10^6$ CFU/g โดยใช้ตัวอย่างกุ้งส้ม 16 ตัวอย่าง เมื่อนำแบคทีเรียแลกติกทั้ง 328 ไอโซเลตไปทดสอบสมบัติการเป็นโปรไบโอติกสามารถคัดเลือกเชื้อที่มีสมบัติโปรไบโอติกได้ 67 ไอโซเลตและเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 67 ไอโซเลตไปทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียอินดิเคเตอร์โดยวิธี agar spot พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินดิเคเตอร์ 13 สายพันธุ์ คือ *Staphylococcus aureus* ATTC 25923, *Bacillus cereus*, *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*, *Proteus vulgaricus*, *Proteus rettgeri*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Escherichia coli* ATTC 25922, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Thyphi และ *Vibrio parahaemolyticus* โดยไอโซเลต LA6, LA13, LA71, LA102 และ LA198 มีขอบวงใสมากกว่า 10 มิลลิเมตร ซึ่ง LA198 เป็นไอโซเลตที่คัดแยกได้จากกุ้งส้ม เมื่อนำไปเทียบเคียงสายพันธุ์พบว่าเป็น *Lactobacillus delbrueckii*

2.1 แบคทีเรียย่อยโปรตีน

การย่อยสลายโปรตีนโดยแบคทีเรียเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่แบคทีเรียผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์เพื่อใช้ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ให้ได้กรดอะมิโนสำหรับดูดซึมเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Ward, 1983) เอนไซม์เหล่านี้ส่วนใหญ่เป็นเอนไซม์เปปติเดส (peptidase) ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มตามกลไกลการทำงาน คือ

(1) โปรตีเอสซีรีน (serine protease) เอนไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอนโดเปปทีเดส (endopeptidase) ซึ่งจะสลายพันธะเปปไทด์อย่างอิสระภายในสายโปรตีน เอนไซม์ในกลุ่มนี้ถูกยับยั้งโดย diisopropyl-phosphofluoridate (DFP) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับหมู่ไฮดรอกซิล (OH^-) ของหมู่ซิริลในบริเวณเร่ง (active site) ของเอนไซม์และมีหมู่ imidazone อยู่ที่บริเวณเร่ง เอนไซม์ในกลุ่มนี้ประกอบด้วยสกุลที่แตกต่างกัน 2 สกุล คือ chymotrpsin family ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ที่ได้จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammalian enzyme) ได้แก่ chymotrpsin trpsin thrombin และ substilisin family ซึ่งรวมถึงเอนไซม์ที่ได้จากแบคทีเรีย ได้แก่ substilisin โดยโครงสร้างทั้ง 3 มิติของเอนไซม์ทั้ง 2 สกุลมีลักษณะที่แตกต่างกัน แต่มีบริเวณเร่งและกลไกในการเกิดปฏิกิริยา (mechanism reaction) ที่เหมือนกัน (ปฐมารัตน์, 2548)

(2) โปรตีเอสซัลไฟดิล (sulfhydryl protease) หมายถึงกลุ่มเอนไซม์ที่ย่อยสลายพันธะเปปไทด์จากภายในสายของโปรตีนจัดอยู่ในกลุ่มเอนโดเปปทีเดสเอนไซม์อีกตัวหนึ่ง โดยปฏิกิริยาการย่อยสลายโปรตีนของเอนไซม์โปรตีเอสซัลไฟดิลจะถูกยับยั้งโดยสาร sulfhydryl reagent, sulfhydryl group หรือ thaiol group โดยสารเหล่านี้จะทำให้หมู่อนุมูลซัลไฟดริลที่บริเวณเร่งได้รับความเสียหายและสูญเสียความสามารถในการจับกับสารตั้งต้นไปในที่สุด เอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มนี้ได้แก่ papain ficin และ streptococcus protease เป็นต้น

(3) โปรตีเอสโลหะ (metal-containing proteases) เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีอิออนและโลหะรวมอยู่ในโมเลกุลของเอนไซม์หรือเข้าร่วมในปฏิกิริยาการย่อยสลายในลักษณะของโคแฟกเตอร์ (cofactor) คุณสมบัติที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ คือ เป็นการตัดสายโปรตีนจากภายนอกหรือเป็น exopeptidase เกือบทั้งหมดและทำปฏิกิริยาได้ดีที่ช่วงพีเอชเป็นกลางประมาณ 6.5-7.5 ตัวอย่างของเอนไซม์ในกลุ่มนี้ ได้แก่ carboxypeptidase A glycyl-glycine dipeptidase carnosinase และ prolidase เป็นต้น

(4) โปรตีเอสกรด (acid protease) หมายถึงกลุ่มเอนไซม์โปรตีเอสที่มีช่วงพีเอชในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสมอยู่ในช่วงที่เป็นกรด คือ ที่พีเอชต่ำกว่า 7 โดยส่วนใหญ่แล้วเอนไซม์เหล่านี้มีช่วงพีเอชที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยาที่ 2-4 และมีบทบาทของอนุมูลของกรดอะมิโน (amino acid free radical) ในปริเวณทำปฏิกิริยาที่ไม่ชัดเจนรวมทั้งมีหมู่คาร์บอกซิลมากกว่า 1 หมู่ เอนไซม์ในกลุ่มนี้ได้แก่ rennin และ pepsin (ปราณี, 2543)

ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas, Bacillus, Clostridium, Flexibacter, Pseudomonas, Serratia, Staphylococcus, Stenotrophomonas* และ *Streptomyces* (Tan *et al*., 2005)

2.2 แบคทีเรียย่อยไขมัน

แบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันนั้นมีอยู่หลายกลุ่มด้วยกัน โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) โมเลกุลของน้ำมันให้กลายเป็นกรดไขมัน (free fatty acid) โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และกลีเซอรอล (glycerol)

เอนไซม์ไลเปสที่ได้จากแบคทีเรียต่างชนิดกันจะสภาวะที่เหมาะสมในการทำงานที่แตกต่างกัน เช่น เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียในสกุล *Alcaliginaes, Bacillus* และ *Cryptococcus* จะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ในขณะที่เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียในสกุล *Acinetobacter* และ *Pseudomonas* จะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นกลางและเป็นกรด ตามลำดับ (Kok *et al.,* 1995) จากการที่แบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสที่มีคุณสมบัติแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียนั้นๆ ทำให้ต้องมีการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียมาใช้ประโยชน์ให้เหมาะสมกับอุตสาหกรรมต่างๆ

เอนไซม์ไลเปสจากแบคทีเรียสามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อตำแหน่งของบนโมเลกุลของไตรกลีเซอไรด์ คือ

(1) เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะ (Non specific lipase)

เอนไซม์ไลเปสที่ไม่มีความจำเพาะ หมายถึง เอนไซม์ไลเปสที่มีความสามารถในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ทั้งหมดในไตรเอซิลกลีเซอรอลได้ ตัวอย่างของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสประเภทนี้ เช่น *Penicilium expansum* และ *Pseudomonas cepacia* เป็นต้น

(2) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะกับสารตั้งต้น (Substrate specific lipase)

เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้สามารถทำปฏิกิริยาไฮโดรไลซ์ที่พันธะเอสเทอร์ของสารตั้งต้นที่เป็นไตรเอซิลกลีเซอรอล (triacylglycerol) ไดเอซิลกลีเซอรอล (diacylglycerol) โมโนเอซิลกลีเซอรอล (monoacylglycerol) และฟอสโฟลิปิด (phospholipid) แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้ ได้แก่ *Geotrichumcandidum* sp. และ *Geotrichum* sp. เป็นต้น

(3) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อตำแหน่ง (Positional specific lipase)

เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้จะมีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยาต่อพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่งภายนอกของสารตั้งต้นและตำแหน่งภายในของแกนไตรเอซิลกลีเซอไรด์ ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสชนิดนี้ เช่น ไลเปสชนิด 1, 3-regioselective จะย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ที่ตำแหน่ง sn-1 และ sn-3 ได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นโมโนเอซิลกลีเซอรอล โดยเอนไซม์ไลเปสที่จัดเป็นชนิด 1, 3-regioselective ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geobacillus* sp. (Ebrahimpour *et al.,* 2011)

(4) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะต่อกรดไขมัน (Fatty acid specific lipase)

เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้จะมีความจำเพาะต่อชนิดของกรดไขมัน โดยจะย่อยสลายกรดไขมันเหล่านั้นอย่างไม่คำนึงถึงตำแหน่งของพันธะเอสเทอร์ ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสประเภทนี้ ได้แก่ เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Geotrichum candidium* ที่มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด cis-9-

unsaturated fatty acid และ เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Botrytis cinerea* ที่มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิดสายยาว

(5) เอนไซม์ไลเปสที่มีความจำเพาะกับโครงสร้างทางเคมี (Stereospecific lipase)

เอนไซม์ไลเปสในกลุ่มนี้สามารถเลือกทำปฏิกิริยาในการย่อยสลายพันธะเอสเทอร์ระหว่างตำแหน่ง sn-1 หรือ sn-3 ของไตรเอซิลกลีเซอรอล ตัวอย่างของเอนไซม์ไลเปสประเภทนี้ เช่น เอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Hamicola lanuginose* และ *Pseudomonas fluorescences* ที่มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับพันธะเอสเทอร์ตำแหน่ง sn-1 และเอนไซม์ไลเปสจากเชื้อ *Fusarium solani* ที่มีความจำเพาะในการทำปฏิกิริยากับพันธะเอสเทอร์ตำแหน่ง sn-3 เป็นต้น

2.3 แบคทีเรียแลกติก

แบคทีเรียแลกติกย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลมหรือเป็นรูปท่อน ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) สร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต ได้พลังงานจากน้ำตาลและสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลโดยได้จากกระบวนการ substrate-level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน เช่น วิตามินต่างๆ กรดอะมิโนไพริมิดีน (pyrimidine) สามารถเจริญได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน ไม่มีออกซิเจน และมีออกซิเจนน้อย อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ คือ 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปสามารถเจริญได้ที่พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 มีอัตราการเจริญลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen and Wright, 1993)

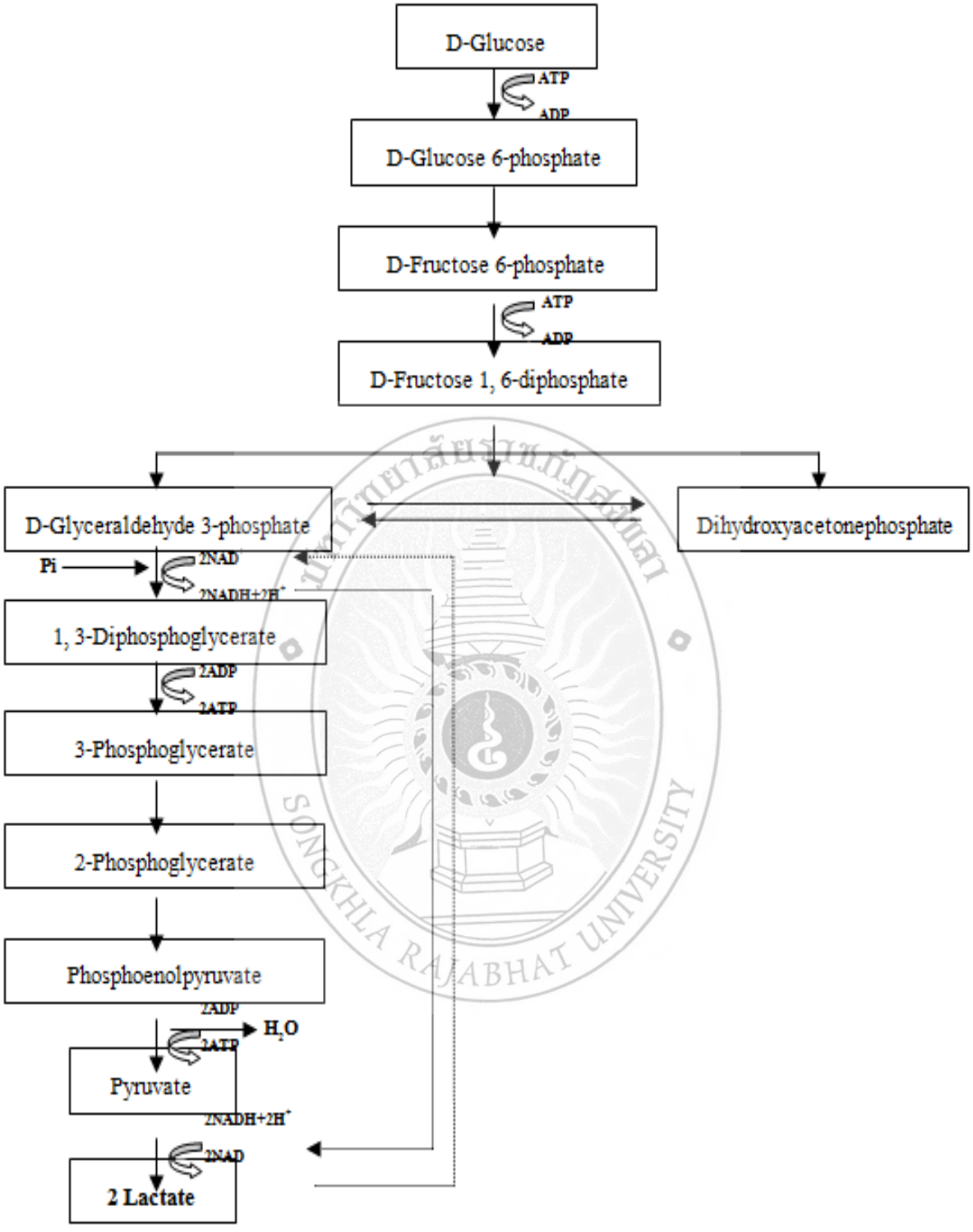
แบคทีเรียแลกติกประกอบด้วยสกุล *Lactobacilus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* และ *Weissella* (Sahdev *et al*., 2008)

แบคทีเรียแลกติกจำแนกตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. Homofermentative เป็นแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคส (hexose) โดยการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวต (pyruvate) อาศัยเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วให้กรดแลกติก มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน glycolysis pathway (Embden-Meyerhof pathway) กระบวนการผลิตกรดแลกติกเกิดขึ้นจากน้ำตาลกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphate) โดยกระบวนการ phosphorylation แล้วเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเป็น fructose 1, 6-diphosphate ซึ่งจะถูกเอนไซม์อัลโดเลสเข้าทำปฏิกิริยา เป็นผลให้โมเลกุลแตกออกเป็น glyceraldehyde 3-phosphate ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่มีคาร์บอน 3 อะตอม จากนั้น glyceraldehyde 3-phosphate จะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวต โดยเกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุลจากการหมักกลูโคส 1 โมเลกุล เนื่องจากมีการเติมฟอสฟอรัสให้กับซับสเตรต (substrate) 2 แห่ง และในขั้นตอนสุดท้ายเป็นการรีดิวซ์ไพรูเวตเป็นแลคเตท (lactate) 2 โมเลกุล โดยในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ทำให้ได้ NAD^+ กลับคืนมาจากที่ใช้ไปในการออกซิเดชัน (oxidation) glyceraldehyde 3-phosphate แสดงดังในรูปที่ 1 แบคทีเรียแลกติกที่จัดอยู่ในประเภทนี้ ได้แก่ แบคทีเรีย

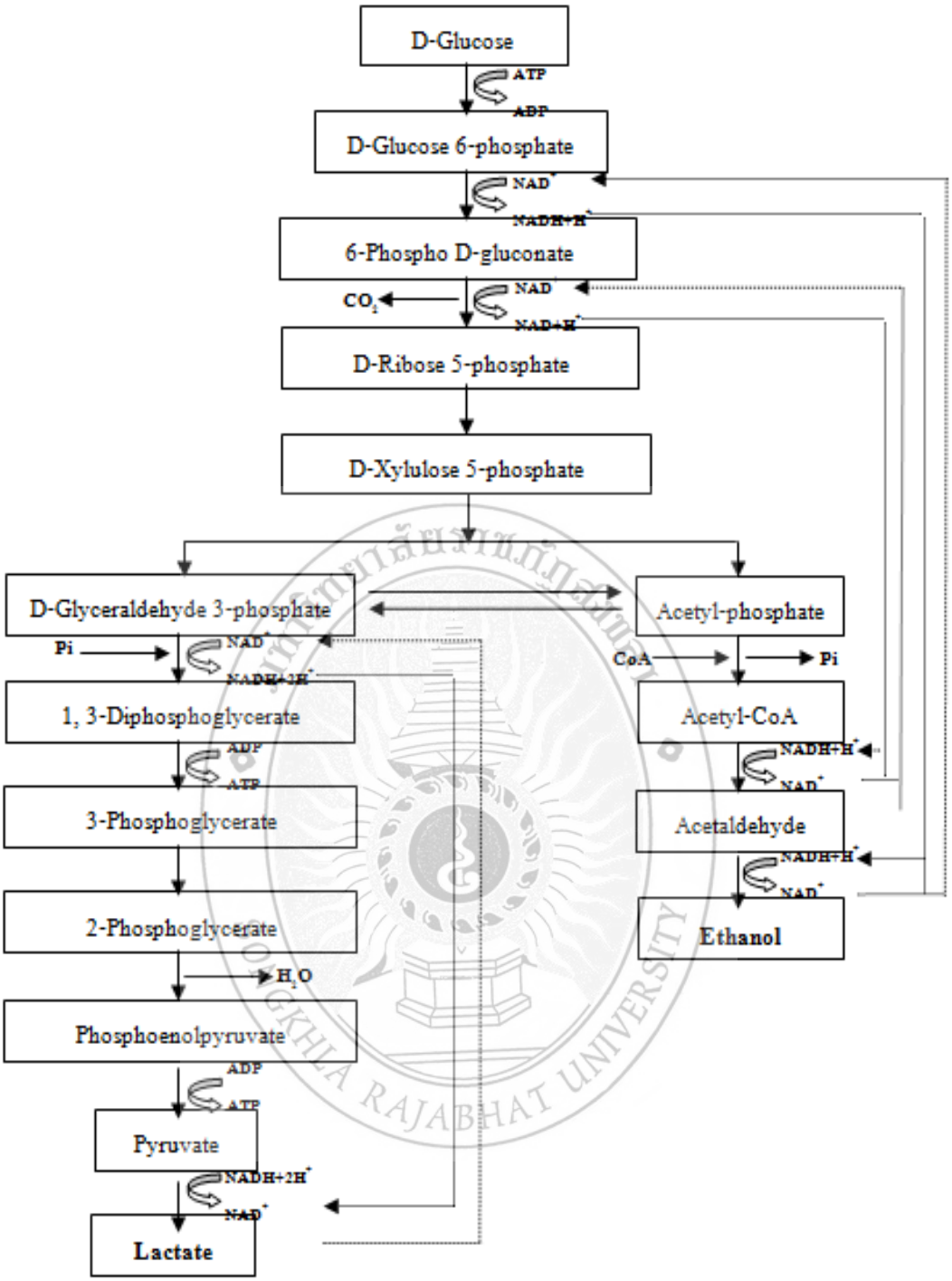
สกุล *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Lactococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* และ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* (Panesar *et al*., 2007)

2. Heterofermentative เป็นแบคทีเรียที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ กรดแลกติก 50 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติกและเอธานอล 20-25 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน phosphoglyconate pathway หรือ phosphoketolase pathway เนื่องจากแบคทีเรียขาดเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) จึงเปลี่ยนรูปน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีคาร์บอน 6 อะตอมไปเป็นน้ำตาลไรโบส (ribose) ที่มีคาร์บอน 5 อะตอม โดยโครงสร้างภายในโมเลกุลจะมีการออกซิเดชันและดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมนี้จะถูกทำให้แตกออกเป็น glyceraldehyde 3-phosphate ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่มีคาร์บอน 3 อะตอมและ acetyl-phosphate โดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) glyceraldehyde 3-phosphate จะถูกเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท เช่นเดียวกับการเกิด glycolysis pathway ในการหมักแบบ homofermentative แต่เนื่องจากการหมักแบบ heterofermentative มี glyceraldehyde 3-phosphate เพียง 1 โมเลกุล จึงเกิด ATP เพียง 1 โมเลกุล ส่วน acetyl-phosphate นั้นในสภาวะที่ขาดตัวรับอิเล็กตรอน acetyl-phosphate จะถูกรีดิวซ์เป็นเอทธานอล และได้ NAD^+ 2 โมเลกุล แสดงดังในรูปที่ 2 แบคทีเรียแลกติกที่จัดอยู่ในประเภทนี้ ได้แก่ แบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus coryneformis*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus kefir* และ *Lactobacillus reuteri* (Panesar *et al*., 2007)



รูปที่ 1 Homolactic fermentation of lactic acid bacteria.

ที่มา: Panesar และคณะ (2007)



รูปที่ 2 Heterolactic fermentation of lactic acid bacteria.

ที่มา: Panesar และคณะ (2007)

3. เทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture Dependent Method)

เทคนิคการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culturing Method) เป็นการกระตุ้นให้จุลินทรีย์ที่ยังมีชีวิตอยู่เจริญขยายพันธุ์เพิ่มจำนวนมากขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวหรือบนอาหารวุ้น

คุณสมบัติที่สำคัญของอาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดควรมีคุณสมบัติดังนี้

1. มีธาตุอาหารที่เหมาะสมกับการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์และมีความเข้มข้นเหมาะสม
2. มีพีเอชที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด
3. ไม่มีสารพิษ
4. ไม่มีสิ่งมีชีวิตใดๆ ปนเปื้อนอยู่ในอาหารนั้น

อาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ที่ต้องการเพาะเลี้ยง ตัวอย่างเช่น

- จุลินทรีย์ทั้งหมดที่มีชีวิตและเจริญในสภาวะที่มีอากาศใช้ Nutrient agar หรือ Plate count agar (Obodai and Dodd, 2006)

- ยีสต์และราใช้ Sabouraud agar (Fontana *et al*., 2005a, b), Wallerstein Laboratory Nutrient agar (WLN agar) ที่มีการเติม chloramphenicol เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (Aquilanti *et al*., 2007), Malt Yeast Peptone Glucose Agar (MYPGA) (Obodai and Dodd, 2006) Malt extract agar (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003) หรือ Potato dextrose agar (Hatzikamari *et al*., 2007) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยปรับให้มีพีเอชประมาณ 3.7-4.7 การปรับกรดหรือการเติมสารปฏิชีวนะบางชนิดเพื่อต้องการที่จะยับยั้งแบคทีเรียไม่ให้เจริญแข่งขันกับราและยีสต์ (Loureiro and Malfeito-Ferreira, 2003)

- แบคทีเรียแลกติกใช้ de Man, Rogosa and Sharpe Agar (MRS) (Aquilanti *et al*., 2007) หรือ M17 agar (Albano *et al*., 2008) อาจมีการเติม cycloheximide และ sodium azide เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการอากาศและรา (Endo *et al*., 2008)

- โคลิฟอร์มใช้ MacConkey agar (Fontana *et al*., 2005a, b) หรือ Coli-ID medium (Aquilanti *et al*., 2007)

อาหารเลี้ยงเชื้อสามารถแบ่งตามวัตถุประสงค์การใช้งาน ได้ดังนี้

1. Enrichment media

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบด้วยสารเคมีที่ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและช่วยส่งเสริมให้มีการเจริญของจุลินทรีย์หรือกลุ่มของจุลินทรีย์ที่ต้องการเจริญได้ดีกว่าจุลินทรีย์อื่นๆ ซึ่งจะทำให้ง่ายต่อการแยกเชื้อที่ต้องการ เช่น selenite broth ที่ใช้สำหรับแยก *Salmonella* spp. ซึ่งประกอบด้วยซีลีไนต์ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก *Salmonella* การเติม blood serum วิตามิน หรือเติมสารสกัดที่ได้จากเนื้อเยื่อพืชหรือเนื้อเยื่อสัตว์ลงไปใน nutrient broth หรือ nutrient agar อาหารชนิดนี้ใช้สำหรับเลี้ยงจุลินทรีย์ก่อโรคต่างๆ (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

2. Selective media

อาหารที่มีการเติมสารเคมีบางอย่างลงใน nutrient agar เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางกลุ่ม โดยที่สารนี้จะไม่ยับยั้งเชื้อกลุ่มที่เราต้องการจะเพาะเลี้ยง (ธีรพร กงบังเกิด, 2546) เช่น

- อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นน้ำตาลมอลโตส (maltose) จะสามารถคัดเลือกแบคทีเรียที่ใช้น้ำตาลมอลโตสให้สามารถเจริญได้ โดยใช้หลักที่ว่าจะคัดเลือกเชื้อที่สามารถใช้สารประกอบอินทรีย์ที่แปลกออกไปได้อย่างง่ายๆ โดยการเติมสารเหล่านี้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแทนสารประกอบคาร์บอนอย่างอื่น

- การปรับพีเอช เช่น การเติมกรดซิตริกในอาหารเพื่อแยกเชื้อรา

- การปรับค่า a_w เช่น การเติมเกลือหรือน้ำตาลเพื่อเชื้อกลุ่ม halophiles หรือกลุ่ม osmophilic

- การจำกัดปริมาณของสารอาหาร เช่น ใช้เพียงไนเตรท (nitrate) เพื่อเป็นแหล่งไนโตรเจน ซึ่งใช้แยกจุลินทรีย์ที่สามารถรีดิวซ์ไนเตรทไปเป็นแอมโมเนียได้

- การเติมสารรีดิวซ์ซึ่งช่วยคัดเลือกกลุ่มที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobes) เช่น เมตาไบซัลไฟต์ (metabisulphite)

- การเติมสารที่ยับยั้งวิถีเมตาบอลิซึมหรือทำลายเซลล์เมมเบรน เช่น sodium azide (Endo *et al*., 2008) thallous acetate, lithium chloride และ potassium tellurite ที่ใช้ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก crystal violet, bile salts และ surfactant บางชนิดที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก

- การเติมสารปฏิชีวนะและสารเคมีบางชนิด เช่น oxytetracycline ในการยับยั้งแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกและวิเคราะห์เชื้อรา (Endo *et al*., 2008) หรือสาร polymyxin ที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียแกรมบวกรูปแท่ง

3. Differential media

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยส่วนผสมที่เกิดการเปลี่ยนแปลงเนื่องจากเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะทำให้มองเห็นได้ชัดเจนในจานเพาะเชื้อ ในหลอดหรือในอาหารเหลวที่จุลินทรีย์เจริญ ทำให้สามารถแยกความแตกต่างระหว่างชนิดหรือกลุ่มของจุลินทรีย์แต่ละชนิดได้ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากกิจกรรมของจุลินทรีย์และสังเกตเห็นด้วยสายตาในอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าว (ธีรพร กงบังเกิด, 2546) เช่น

- การเปลี่ยนแปลงความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ
- การเปลี่ยนแปลงของสีเนื่องจากพีเอชโดยการเติมอินดิเคเตอร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- การใช้สารเคมีที่ทำปฏิกิริยากับสารที่เกิดจากกระบวนการการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์และทำให้โคโลนีหรืออาหารเลี้ยงเชื้อมีสีเปลี่ยนแปลงไป

สารเคมีที่ใช้ทำให้เกิดความแตกต่างซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ได้แก่

- สารตั้งต้น (substrates) ที่ใช้ทดสอบ extracellular enzyme เช่น lecithinase, proteinase, haemolysin และ DNase
- น้ำตาล โดยการเติมอินดิเคเตอร์ที่วัดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช เช่น bromocresol purple หรือ methyl red ที่ใช้ทดสอบการสร้างกรด

- กรดอะมิโน โดยการเติมอินดิเคเตอร์ที่ใช้วัดความเป็นด่างที่เกิดจากการย่อยสลายกรดอะมิโน

- สารเคมีบางชนิดที่ถูกรีดิวซ์จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของจุลินทรีย์ เช่น potassium tellurite ถูกรีดิวซ์ไปเป็นสาร tellurium ซึ่งมีสีดำ หรือปฏิกิริยารีดิวซ์สาร triphenyl tetrazolium chloride ไปเป็น formazan ที่มีสีแดง

- การเติมเกลือของเหล็ก (iron salts) เพื่อตรวจ hydrogen sulfide โดยการเกิดสารสีดำของ iron sulfide

4. Selective / differential media

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้อย่างแพร่หลายในการแยกจุลินทรีย์เฉพาะชนิดและทำให้เกิดความแตกต่างกันโดยจุลินทรีย์อาจอยู่ในกลุ่มเดียวกันหรือมีสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกัน เช่น MacConkey agar ซึ่งประกอบด้วยเปบโตน (peptone) มีการเติมเกลือน้ำดีเพื่อใช้เป็นสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก แต่ยอมให้กลุ่ม Enterobacteriaceae เจริญ (กลุ่มแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Salmonella* spp. และ *Proteus* spp.) โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นเนื่องมาจากการเติมแลกโตส (lactose) และอินดิเคเตอร์ที่มีสีแดง แบคทีเรียที่หมักแลกโตสได้จะให้โคโลนีสีแดง เช่น *Escherichia coli* ขณะที่แบคทีเรียที่หมักแลกโตสไม่ได้ เช่น *Salmonella* spp. จะให้โคโลนีที่ไม่มีสี (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

5. Chemically defined media

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบปริมาณที่แน่นอนของแต่ละองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้อาจเป็น general purpose หรือ selective หรือ differential media ก็ได้ เช่น minerals modified glutamate medium ซึ่งใช้วิเคราะห์ปริมาณโคลิฟอร์มในน้ำ (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

6. Selective media

เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้แยกจุลินทรีย์เฉพาะชนิดที่ต้องการสารอาหารที่พิเศษ โดยการเติมสารเคมีบางชนิดเข้าไปแล้วทำให้เชื้อที่ต้องการแยกเจริญได้ดีขึ้นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้แตกต่างจาก selective medium โดยสารที่เติมเข้าไปเพื่อกระตุ้นการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการและไม่ได้ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ ตัวอย่างเช่น Tomato juice agar ใช้เลี้ยงเชื้อกลุ่ม lactobacilli ที่ประกอบด้วยน้ำมะเขือเทศ เปปโตนและ peptonized milk และมีค่าพีเอช 6.1 โดยน้ำมะเขือเทศดังกล่าวมีองค์ประกอบที่สำคัญ คือ แมกนีเซียมและแมงกานีส ซึ่งกระตุ้นการเจริญของ lactobacilli แต่ไม่ได้เป็นสารที่ยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นๆ (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

7. Assay medium

อาหารที่มีส่วนประกอบที่ใช้ในการตรวจสอบหาวิตามินต่างๆ กรดอะมิโนต่างๆ และยาปฏิชีวนะ (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

8. Media for enumeration of bacteria

อาหารที่มีความจำเพาะเจาะจงเพื่อใช้สำหรับตรวจสอบหาปริมาณของแบคทีเรียในวัตถุอย่างใดอย่างหนึ่ง เช่น นมหรือน้ำนั้นควรจะต้องมีส่วนประกอบเป็นสารที่มีความจำเพาะของเชื้อรวมอยู่ด้วย (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

9. Media for characterization

อาหารที่สามารถใช้จำแนกบอกถึงชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถจะเจริญได้หรือสร้างสารบางอย่างที่ทำให้อาหารเปลี่ยนแปลงไป ทำให้สังเกตเห็นความแตกต่างได้ (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

10. Maintenance media

อาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อและลักษณะทางกายภาพของเชื้อนั้นจะต้องเป็นสารอาหารที่แตกต่างจากอาหารสูตรที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ เพราะอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อนั้นอาจทำให้เชื้อเจริญได้ดีและตายเร็วขึ้น เช่น น้ำตาลกลูโคสที่เป็นส่วนประกอบในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้เชื้อเจริญได้ดีขึ้นและสร้างกรด รวมทั้งเมตาบอไลต์ (metabolite) อย่างอื่น ดังนั้นสูตรอาหารที่ใช้สำหรับเก็บรักษาเชื้อมักจะไม่เติมน้ำตาลกลูโคส หรือเติมในปริมาณต่ำๆ (ธีรพร กงบังเกิด, 2546)

ข้อดีของวิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

- เป็นเทคนิคที่ง่าย
- สามารถตรวจหาแบคทีเรียกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งได้โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเลือกเฉพาะชนิด (selective media) หรืออาหารเลี้ยงเชื้อที่จำแนกความแตกต่าง (differential media)
- สามารถใช้จำแนกและแยกเชื้อโดยวิธีการแยกเชื้อบริสุทธิ์
- สามารถตรวจพบเชื้อได้แม้ในตัวอย่างมีเชื้อปริมาณน้อย เช่น วิธีการ spread plate สามารถตรวจพบเชื้อยีสต์ได้ตั้งแต่มีเชื้อยีสต์ในปริมาณน้อย คือ 10^{1} CFU/g (Aquilanti *et al*., 2007)

ข้อด้อยของวิธีการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ

- ใช้แรงงานมาก
- มีความผันแปรสูง
- ใช้เวลานาน เนื่องจากการตรวจสอบจุลินทรีย์ในผลิตภัณฑ์อาหารด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจะต้องมีการ pre-enrichment และ selective enrichment culture ก่อนที่จะทำการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อทำให้เชื้อที่ได้รับบาดเจ็บจากกระบวนการแปรรูปอาหารฟื้นตัวและเจริญได้อย่างสมบูรณ์ (Giraffa and Neviani, 2001)
- มีจุลินทรีย์ส่วนน้อยที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ ทำให้ตรวจพบจุลินทรีย์ได้ไม่หมด (Giraffa and Neviani, 2001)
- จุลินทรีย์จำนวนมากที่คัดแยกได้ไม่สามารถจำแนกประเภทได้หรือจำแนกประเภทได้อย่างไม่ถูกต้อง (Giraffa and Neviani, 2001)
- อาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ไม่สามารถจำลองสภาวะที่เหมาะสมของจุลินทรีย์ในธรรมชาติได้จริง เช่น พีเอช แหล่งคาร์บอน และความเข้มข้นของสารอาหารที่ใช้ในการเจริญได้จริงทั้งหมด ดังนั้นจึงไม่สามารถเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ได้จำนวนชนิดจริงมากเทียบเท่าจำนวนตามธรรมชาติ

4. การตรวจติดตามจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในอาหารโดยวิธีการเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

4.1 แบคทีเรียทั้งหมด

Dolci และคณะ (2010) ศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม aerobic mesophilic ทั้งหมดที่มีอยู่ในเนยแข็ง Castelmagno PDO ในวันที่ 30, 60, 90 และ 150 ของการบ่ม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin Peptone Agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่มีอยู่ในบริเวณส่วนกลางและผิวหน้าของเนยแข็งที่วันที่ 30 ของการบ่มได้ 6.4 และ 6.3 log_{10}CFU/g ตามลำดับ หลังจากนั้นแบคทีเรียทั้งหมดจะมีจำนวนลดลงจนกระทั่งสิ้นสุดระยะเวลาการบ่ม ซึ่งตรวจตรวจนับได้ 4.3 และ 5.4 log_{10}CFU/g ในบริเวณส่วนกลางและผิวหน้าของเนยแข็งตามลำดับ

Magalhães และคณะ (2010) ศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม mesophilic ทั้งหมดที่มีอยู่ใน sugary Brazilian kefir ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มพื้นเมืองของประเทศบราซิล โดยทำการศึกษาที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมงของการหมักแบบดั้งเดิม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจนับแบคทีเรียเริ่มต้นได้ 5.81 log_{10}CFU/g และมีจำนวนสูงสุดเท่ากับ 8.21 log_{10}CFU/g ในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก

Nguyen และคณะ (2010) ตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดที่มีอยู่ใน *Nem chua* อาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อของประเทศเวียดนาม ที่มีระยะเวลาในการหมัก 3-4 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจนับแบคทีเรียทั้งหมดที่วันที่ 0 ของการหมักได้ 7.6 log_{10}CFU/g และมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 8.9 log_{10}CFU/g ในวันที่ 2 ของการหมัก หลังจากนั้นจะมีจำนวนลดลงเป็น 8.5 log_{10}CFU/g ในวันที่ 4 ของการหมัก

Carraro และคณะ (2011) ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกลุ่ม aerobic mesophilic ทั้งหมดที่มีอยู่ในเนยแข็ง Montasio ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่ม คือ วันที่ 2, 5, 13, 30, 60, 90 และ 150 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Gelatin Sugar-Free Agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่วันที่ 2 ของการบ่มได้ 6 log_{10}CFU/g และมีจำนวนลดลงเรื่อยๆ จนกระทั่งมีจำนวน 4.48 log_{10}CFU/g ในวันที่ 150 ของการบ่มเนยแข็ง

Madoroba และคณะ (2011) ศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม aerobic ทั้งหมดที่มีอยู่ใน *Ting* อาหารหมักพื้นเมืองของประเทศแอฟริกาใต้ที่ได้จากการหมักข้าวฟ่างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหาร Plate Count Agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าที่ชั่วโมงที่ 0 ของหมักแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนน้อย แต่เมื่อระยะเวลาในการหมักเพิ่มขึ้นแบคทีเรียทั้งหมดมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นอย่างต่อเนื่องตลอดระยะเวลาการหมักจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักในชั่วโมงที่ 54 โดยมีจำนวนเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ประมาณ 10^4 CFU/ml

4.2 แบคทีเรียแลกติก

Magalhães และคณะ (2010) ศึกษาแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* ที่มีอยู่ใน sugary Brazilian kefir ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มพื้นเมืองของประเทศบราซิล โดยทำการศึกษาที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมงของการหมักแบบดั้งเดิม โดย

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar, M17 agar, Edwards modified agar และ LUSM agar ในการตรวจหาแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus* และ *Leuconostoc* ตามลำดับ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแลกติกทุกกลุ่มมีจำนวนเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยมีจำนวนสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 ของการหมักในจำนวนใกล้เคียงกัน คือ 10^8 CFU/g และจากการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่พบส่วนใหญ่ในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชนิดนี้ คือ *Lactobacillus paracasei* ซึ่งตรวจพบตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก ส่วนแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์อื่นที่ตรวจพบ ได้แก่ *Lactobacillus parabuchneri* และ *Lactobacillus kefir* (ตรวจพบตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก), *Lactobacillus casei* (ตรวจพบในชั่วโมงที่ 0, 12, 18 และ 24), *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* (ตรวจพบในชั่วโมงที่ 0, 6 และ 24), *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* และ *Lactobacillus buchneri* (ตรวจพบในชั่วโมงที่ 24), *Lactococcus lactis* (ตรวจพบในชั่วโมงที่ 0, 18 และ 24) และ *Leuconostoc citreum* (ตรวจพบในชั่วโมงที่ 12, 18 และ 24)

Nguyen และคณะ (2010) ตรวจหาแบคทีเรียแลกติกทั้งหมดที่มีอยู่ใน *Nem chua* อาหารหมักพื้นเมืองประเภทเนื้อของประเทศเวียดนาม ที่มีระยะเวลาในการหมัก 3-4 วัน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (1% $CaCO_3$) และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบใน *Nem chua* ภายหลังจากการเทียบเคียงสายพันธุ์ คือ *Lactobacillus plantarum*

Carraro และคณะ (2011) ตรวจหาแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม lactobacilli, lactococci และ enterococci ที่มีอยู่ในเนยแข็ง Montasio ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่ม คือ วันที่ 2, 5, 13, 30, 60, 90 และ 150 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ในการตรวจหา lactobacilli โดยบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ M17 agar ในการตรวจหา lactococci บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 และ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Slanetz and Bartley agar ในการตรวจหา enterococci และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้พบว่าเป็น *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus fermentum*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus maltaromicus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus raffinolactis*, *Leuconostoc mesenteroides* spp. *mesenteroides*, *Carnobacterium maltaromaticum*, *Pediococcus acidilactici*, *Pediococcus pentosaceus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, และ *Weissella viridescens*

Madoroba และคณะ (2011) ศึกษาแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม lactobacilli, lactococci และ enterococci ที่มีอยู่ใน *Ting* อาหารหมักพื้นเมืองของประเทศแอฟริกาใต้ที่ได้จากการหมักข้าวฟ่างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหาร MRS-5 agar, M17 agar และ ESA agar สำหรับตรวจนับแบคทีเรียกลุ่ม

lactobacilli, lactococci และ enterococci และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากการศึกษาพบว่าในชั่วโมงที่ 0 ของการหมักตรวจนับแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม lactococci และ enterococci ได้มากกว่ากลุ่ม lactobacilli และเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในชั่วโมงที่ 54 พบว่าแบคทีเรียแลกติกกลุ่ม lactobacilli มีจำนวนเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่ม lactococci และ enterococci ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกกลุ่ม lactococci และ enterococci มีจำนวนลดลง เมื่อทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลกติกที่คัดแยกได้พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบในชั่วโมงที่ 0 ของการหมัก คือ *Enterococcus mundtii* ส่วนแบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบในชั่วโมงที่ 54 ของการหมัก คือ *Enterococcus faecalis*, *Lactobacillus Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus fermentum*, *Weissella cibaria* และ *Lactococcus lactis*

4.3 Enterobacteriaceae

Aquilanti และคณะ (2007) ศึกษาโคลิฟอร์มและ *E. coli* ใน *Ciauscolo* salami ซึ่งเป็นไส้กรอกหมักชนิดหนึ่งของประเทศอิตาลีในวันที่ 0, 1, 3, 10, 20, 30 และ 45 ของกระบวนการหมัก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Coli-ID medium บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจนับจำนวนโคลิฟอร์มในวันที่ 0 ได้ 1.90 log_{10}CFU/g และมีจำนวนลดลงหลังจาก 24 ชั่วโมงของการหมัก และไม่พบโคลิฟอร์มเลยหลังจากวันที่ 20 ของการหมัก

Dolci และคณะ (2010) ตรวจนับโคลิฟอร์มในเนยแข็ง Castelmagno PDO ในวันที่ 30, 60, 90 และ 150 ของการบ่ม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Violet red bile lactose agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าตลอดระยะเวลาการบ่มโคลิฟอร์มมีจำนวนลดลงจนกระทั่งตรวจไม่พบในวันที่ 150 ของการบ่ม

Carraro และคณะ (2011) ศึกษาโคลิฟอร์ม และแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่มีอยู่ในเนยแข็ง Montasio ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่ม คือ วันที่ 2, 5, 13, 30, 60, 90 และ 150 โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ ColiID Medium ในการตรวจหาโคลิฟอร์ม และอาหารเลี้ยงเชื้อ Violet Red Bile Glucose Agar ในการตรวจหา Enterobacteriaceae บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าโคลิฟอร์มและแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae มีปริมาณลดลงหลังจากวันที่ 2 ของการบ่มและตรวจไม่พบตั้งแต่วันที่ 30 ของการบ่มเนยแข็ง

Madoroba และคณะ (2011) ศึกษาแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae ที่มีอยู่ใน *Ting* อาหารหมักพื้นเมืองของประเทศแอฟริกาใต้ที่ได้จากการหมักข้าวฟ่างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยใช้อาหาร Violet Red Bile Agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากการศึกษาตรวจพบว่าเมื่อสิ้นสุดกระบวนการหมักในชั่วโมงที่ 54 มีการปนเปื้อนของ Enterobacteriaceae ในอาหารหมักชนิดนี้

4.4 ยีสต์และรา

Dolci และคณะ (2010) ตรวจนับยีสต์ในเนยแข็ง Castelmagno PDO ในวันที่ 30, 60, 90 และ 150 ของการบ่ม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Malt Agar ที่มีการเติม tetracycline ตรวจพบยีสต์มากที่บริเวณ

ผิวหน้าของเนยแข็งที่วันที่ 30 ของการบ่ม โดยตรวจนับได้ 5.5 $\log_{10}$CFU/g แต่เมื่อระยะเวลาการบ่มนานขึ้น ยีสต์ที่ตรวจพบจะมีจำนวนลดลง โดยเนยแข็งที่มีระยะเวลาการบ่ม 150 วันตรวจนับยีสต์ในบริเวณส่วนกลางและผิวหน้าของเนยแข็งได้ประมาณ 2 $\log_{10}$CFU/g

Magalhães และคณะ (2010) ศึกษายีสต์ที่มีอยู่ใน sugary Brazilian kefir ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มพื้นเมืองของประเทศบราซิล โดยทำการศึกษาที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมงของการหมักแบบดั้งเดิม โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MYGP agar ที่เติม chloramphenicol 100 มิลลิกรัม และ chlortetracycline 50 มิลลิกรัม เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากการศึกษาพบว่าที่ชั่วโมงที่ 0 ยีสต์มีจำนวนน้อยกว่า 6 $\log_{10}$CFU/g และมีจำนวนเพิ่มขึ้นตลอดระยะเวลาการหมัก โดยที่ชั่วโมงที่ 24 จะมีจำนวนเพิ่มขึ้นเป็น 7.31 $\log_{10}$CFU/g และจากการเทียบเคียงสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้จากการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ายีสต์ที่พบเป็นส่วนมากในผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มชนิดนี้ คือ *Saccharomyces cerevisiae* ซึ่งตรวจพบตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก รองลงมา คือ *Kluyveromyces lactis* ที่ตรวจพบในชั่วโมงที่ 0, 6, 18 และ 24

Wu และคณะ (2012) ศึกษาความหลากหลายของยีสต์ในน้ำส้มสายชูของประเทศจีน โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ YPD agar และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จากการเทียบเคียงสายพันธุ์ของยีสต์ที่คัดแยกได้ พบว่ายีสต์ที่ตรวจพบส่วนใหญ่คือ *Saccharomyces cerevisiae* เนื่องจากสามารถเพิ่มจำนวนได้รวดเร็วกว่ายีสต์ชนิดอื่น อีกทั้งน้ำส้มสายชูมีสภาวะในการหมักที่เหมาะสมต่อการเจริญของยีสต์ชนิดนี้ ส่วนยีสต์ที่ตรวจพบในปริมาณน้อยในตัวอย่างน้ำส้มสายชู คือ *Pichia anomala*

5. การตรวจติดตามจุลินทรีย์โดยวิธี Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE)

ปัจจุบันวิธีทางชีวโมเลกุลที่นิยมใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรีย คือ เทคนิค Polymerase Chain Reaction-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) ซึ่งเป็นวิธีการทางอิเล็คโทรโฟเรซิสที่สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากัน แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์แตกต่างกัน เนื่องจากชิ้นส่วนดีเอ็นเอสามารถแยกใน denaturing gradient gel โดยอาศัยหลักการการเสียสภาพของดีเอ็นเอที่แตกต่างกัน โดยในอะคริลาไมด์เจล (acrylamide gel) สภาวะที่ทำให้ดีเอ็นเอเสียสภาพ คือ ยูเรีย (urea) และฟอร์มาไมด์ (formamide) ซึ่งสารละลาย denaturant 100% ประกอบด้วย 7M urea และ 40% formamide ในน้ำ อุณหภูมิที่ใช้ในการทำอิเล็คโทรโฟเรซิสต้องคงที่ระหว่าง 55-66 องศาเซลเซียส โดยส่วนใหญ่จะใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส (Ercolini, 2004)

เทคนิค PCR-DGGE ประกอบด้วยขั้นตอนที่สำคัญ 2 ขั้นตอน คือ การเพิ่มจำนวนยีนของกลุ่มจุลินทรีย์ที่ encode ส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิคการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอหรือที่เรียกกันทั่วไปว่าเทคนิค PCR (Polymerase Chain Reaction) และการแยกชิ้นของยีน 16S rRNA โดยวิธีการแยกสารด้วยไฟฟ้า (electrophoresis) บนแผ่นเจล โดยการแยกจะอาศัยหลักการการเสียสภาพที่เพิ่มขึ้นของดีเอ็นเอสายคู่ โดยการเพิ่มความเข้มข้นของ denaturant และทำให้บางส่วนของดีเอ็นเอสายคู่แยกออกจากกันในบริเวณที่เรียกว่า “melting domains” เมื่อถึงจุดนี้การเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอบนเจลจะลดลง ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีลำดับ

นิวคลีโอไทด์แตกต่างกันจะมีค่าอุณหภูมิในการหลอม (melting temperature, T_m) ต่างกัน ทำให้ชิ้นส่วนของดีเอ็นเอเคลื่อนที่ไปบนเจลในระยะทางที่แตกต่างกัน ชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความยาวเท่ากัน แต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันสามารถแยกออกได้ด้วยเทคนิค DGGE โดยชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความยาวเท่ากันแต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันจะมีอุณหภูมิในการหลอมที่ไม่เท่ากัน ดังนั้นดีเอ็นเอที่ได้จากการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR จะวิ่งไปบน DGGE gel ในระยะทางที่ไม่เท่ากัน (Ercolini, 2004)

ขั้นตอนทั่วไปของการวิเคราะห์กลุ่มจุลินทรีย์โดยวิธี PCR-DGGE ประกอบด้วย (Muyzer and Smalla, 1998)

1. การสกัดดีเอ็นเอหรืออาร์เอ็นอ
2. การเพิ่มจำนวนยีนที่ encode ส่วนของยีน 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ (primer) ที่เหมาะสม (ตารางที่ 1)
3. การวิเคราะห์ยีนที่เพิ่มจำนวนขึ้นจากเทคนิค PCR ด้วยการใช้เทคนิค genetic fingerprint เช่น DGGE หรือ Temporal Temperature Gradient Electrophoresis (TTGE)

มีการนำเทคนิค PCR-DGGE มาใช้ทั่วไปเพื่อศึกษากลุ่มจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมหรืออาหาร เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ให้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ภายหลังการสกัดดีเอ็นเอของกลุ่มจุลินทรีย์ในตัวอย่างที่แตกต่างกัน ตัวอย่างที่มีอยู่ในสิ่งแวดล้อม เช่น นำตัวอย่างอาหารมาสกัดดีเอ็นเอทำให้ได้ดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งอยู่รวมกันในตัวอย่างอาหาร แล้วใช้ดีเอ็นเอเหล่านี้เป็น template สำหรับการเพิ่มปริมาณผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product ของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ โดยผลผลิตดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ที่ได้จะมีขนาดเท่ากันแต่มีลำดับนิวคลีโอไทด์ที่แตกต่างกันซึ่งสามารถแยกได้โดยเทคนิค DGGE ทำให้ได้ลายพิมพ์ดีเอ็นเอที่ประกอบด้วยดีเอ็นเอหลายแถบ band ซึ่งมีความสัมพันธ์กับจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ที่มีอยู่ในตัวอย่าง การตรวจสอบสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ ทำได้โดยการนำแถบ band ดีเอ็นเอที่ปรากฏมาทำให้บริสุทธิ์และนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของดีเอ็นเอดังรูปที่ 3 (Ercolini, 2004)

จากเหตุผลที่เทคนิค DGGE สามารถนำมาใช้วิเคราะห์องค์ประกอบ ชนิดหรือประชาคม (community) ของแบคทีเรียในธรรมชาติได้เป็นอย่างดี จึงมีการนำเทคนิค DGGE มาใช้ในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ พบว่าการใช้เทคนิค PCR-DGGE สามารถจำแนกจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ เนื่องจากเทคนิคการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะสามารถตรวจสอบจุลินทรีย์ได้เฉพาะสายพันธุ์ที่สามารถเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เลือกนำมาใช้ตรวจสอบได้ เทคนิคทางชีวโมเลกุลโดยเฉพาะอย่างยิ่งการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA จึงช่วยทำให้การวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียในสิ่งแวดล้อมหรืออาหารมีความถูกต้องมากขึ้น (Giraffa and Neviani, 2001; Ercolini, 2004)

ตารางที่ 1 PCR primers used for DGGE analysis of DNA from microbial communities directly extracted from food.

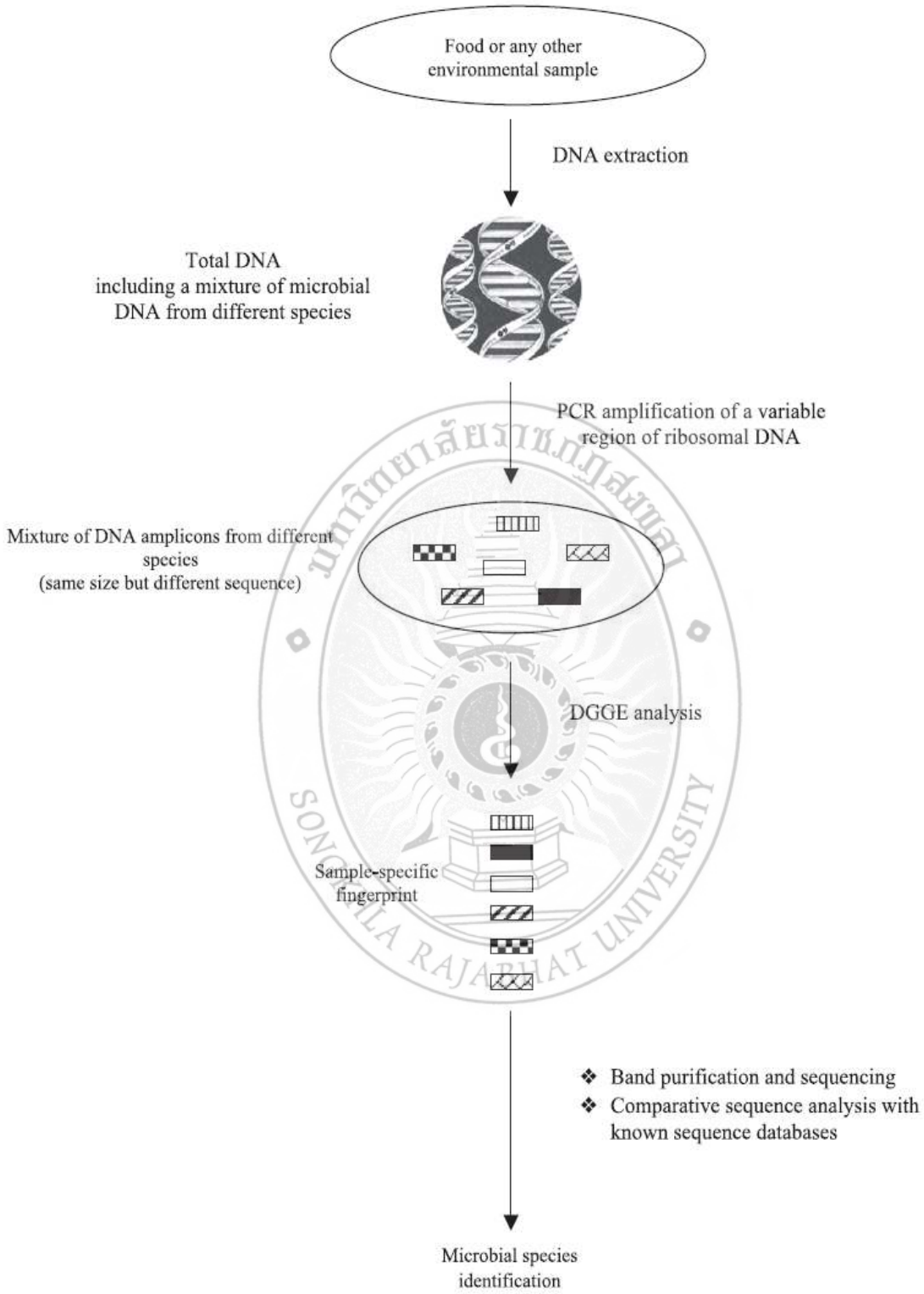
Primer (5'-3')	Region	Target	Applications to food products
HDA1 (ACTCCTACGGG AGGCAGCAG) and HDA2 (GTATTACCG CGGCTGCTGGCAC)	16S V3	Bacteria	Whisky, fermented sausages and yoghurt
P3 (GGAATCTTCCACA ATGGGCG) and P4 (ATCTACGCATTTC ACCGCTAC)	16S V3	Bacteria	Fermented sausages
357f (TACGGGAGGCA GCAG) and 518r (ATTACCGCGGC TGCTGG)	16S V3	Bacteria	Yoghurt
L1 (CAGCAGTAGGGA ATCTTCC) and HDA2 (GTATTACC GCGGCTGCTGGCAC	16S V3	*Lactobacillus Pediococcus, Leuconostoc, Weissella*	Sourdough
Lac1 (AGCAGTAGGGA ATCTTCCA) and Lac2 (ATTYCACCGCT ACACATG)	16S V3-V4	*Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Weissella*	Sourdough
Com1 (CAGCAGCCGCG TAATAC) and Com2-Ph (CCGTCAATTCCTTTG AGTTT)	16S V4-V5	Bacteria	Dairy products
HDA4 (GCGGTGGAGCATGTG GTTTA) and HDA5		16S V6	Whisky

ตารางที่ 1 (ต่อ)

Primer (5'-3')	Region	Target	Applications to food products
(CCTTCCTCCGGTTTGT CACC)			
U968 (AACGCGAAGAA CCTTAC) and L1401 (GCGTGTGT ACAAGACCC)	16S V6-V8	Bacteria	Dairy products and fermented sausages
Ec1055 (ATGGCTGTCG TCAGCT) and Ec1392 (ACGGGCGGTG TGTAC)	16S V9	Bacteria	Fermented sausages
Euk1427f (TCTGTGATG CCCTTAGAT) and Euk1616r (GCGGTGTGT ACAAAGGGCAGGG)	18S	Eukaryote	Cassava and pozol
NL1 (GCCATATCAATA AGCGGAGGAAAAG) and LS2 (ATTCCCAAACAA CTCGACTC)	26S	Eukaryote	Milk and wine

ที่มา : Ercolini (2004)

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY



รูปที่ 3 Flow diagram of the application of PCR-DGGE analysis to food samples.

ที่มา : Ercolini (2004)

ข้อดีของเทคนิค DGGE

- ใช้ศึกษาวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิตและความหลากหลายของจุลินทรีย์โดยไม่ต้องทำการแยกจุลินทรีย์ (Giraffa and Neviani, 2001)

- ใช้ศึกษาปรากฏการณ์และพฤติกรรมของจุลินทรีย์ เช่น ในระยะ viable but non-cultivable (VNC) state หรือการได้รับบาดเจ็บของจุลินทรีย์ (Giraffa and Neviani, 2001)

- ได้รับข้อมูลทางด้าน phylogenetic ของกลุ่มประชากรโดยตรง (Giraffa and Neviani, 2001)

- มีความรวดเร็วและมีประสิทธิภาพ (Giraffa and Neviani, 2001)

- สามารถตรวจสอบเชื้อยีสต์ได้หลากหลายกว่าเทคนิคการแยกเชื้อจุลินทรีย์ (Aquilanti *et al*., 2007)

ข้อด้อยของ PCR-DGGE

- อาจเกิดความผิดพลาดจากการเทคนิค PCR เช่น เกิดการปนเปื้อนของดีเอ็นเอที่ไม่ต้องการ ทำให้เกิดการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ปนเปื้อนเป็นผลให้เกิดผลบวกปลอม (false positive) โดยการปนเปื้อนอาจเกิดจากขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอ มือ และผิวหนังของผู้ทำการทดลอง (Giraffa and Neviani, 2001)

- มีการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเซลล์ในตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์ที่ตายแล้ว (Giraffa and Neviani, 2001)

- แม้ว่าเทคนิค DGGE จะสามารถบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในตัวอย่างอาหารได้ โดยการดูการมีอยู่ (appearance) หรือหายไป (disappearance) ของแถบดีเอ็นเอบนเจล แต่ DGGE pattern ไม่สามารถบ่งบอกได้โดยตรงถึงจำนวนที่แท้จริงของจุลินทรีย์ที่มีอยู่ เพราะข้อมูลที่ได้รับนั้นได้มาจากการเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิค PCR และเป็นข้อมูลที่เปรียบเทียบกับข้อมูลในฐานข้อมูลหรือ Database (Giraffa and Neviani, 2001)

- มีความเสี่ยงในการรบกวนหรือเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจุลินทรีย์ในขั้นตอนการสกัดดีเอ็นเอของจุลินทรีย์จากตัวอย่างอาหาร (Giraffa and Neviani, 2001)

- การปรากฏ multiple copies ของยีน 16S rRNA ของจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ เป็นปัญหาในการศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ที่ใช้เทคนิค DGGE เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์จะมีแถบ band ดีเอ็นเอที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วย DGGE เกิดขึ้นได้หลายแถบ band ถ้านำยีน 16S rRNA มาวิเคราะห์ DGGE โดยตรง (Fontana *et al*., 2005b)

- การวิเคราะห์ตัวอย่างดีเอ็นเอที่มีจุลินทรีย์หลายสายพันธุ์รวมกันอยู่ด้วยเทคนิค PCR-DGGE อาจเกิด heteroduplex ในขั้นตอนการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยสายดีเอ็นเอของจุลินทรีย์สายพันธุ์หนึ่งจะไปจับกับสายดีเอ็นเอของจุลินทรีย์อีกสายพันธุ์หนึ่ง (Aquilanti *et al*., 2007)

- การเกิด chimeric molecules ซึ่งสามารถแก้ไขได้โดยการปรับปรุงสภาวะการทำ PCR เช่น การเพิ่มระยะเวลาของ elongation time ในกระบวนการทำ PCR และการลดจำนวนรอบในการทำ PCR (Aquilanti *et al*., 2007)

- สามารถตรวจวิเคราะห์จุลินทรีย์ได้เมื่อมีปริมาณจุลินทรีย์ตั้งแต่ 10^4 CFU/g โดยขึ้นอยู่กับ สปีชีส์และสายพันธ์ของจุลินทรีย์ ประสิทธิภาพในการสกัดดีเอ็นเอและการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR เนื่องจากมีการแย่งจับกันระหว่างตัวอย่างดีเอ็นเอในขั้นตอนการทำ PCR (Fontana *et al*., 2005b)

- ไม่สามารถแยกชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่มีความยาวมากกว่า 500 bp ได้ (Giraffa and Neviani, 2001)

6. การตรวจติดตามจุลินทรีย์โดยเทคนิค DGGE

Dolci และคณะ (2010) ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในเนยแข็ง Castelmagno PDO โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างเนยแข็งในวันที่ 60 และ 150 ของการบ่ม แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 338f-GC และ 518r ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียตรงตำแหน่ง V3 ในส่วนของยีน 16S rRNA จากนั้นทำการแยกแถบดีเอ็นเอของผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product ด้วยเทคนิค DGGE แล้วทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ จากการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแลกติกที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการบ่มเนยแข็ง Castelmagno PDO คือ *Lactococcus lactis* โดยเนยแข็งที่มีระยะเวลาการบ่ม 60 วันตรวจพบเชื้อ *Lactobacillus helveticus*, *Streptococcus agalactiae* และ *Sphingomonas* sp. ส่วนเนยแข็งที่มีระยะเวลาการบ่ม 150 วัน ตรวจพบเชื้อ *Strep. agalactiae*, *L. lactis* subsp. *cremoris* และ *L. lactis*

Magalhaes และคณะ (2010) ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ใน sugary Brazilian kefir ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มพื้นเมืองที่มีกระบวนการหมักแบบดั้งเดิมของประเทศบราซิล โดยทำการเก็บตัวอย่างที่ระยะเวลา 0, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมงของการหมัก นำมาสกัดดีเอ็นเอของเชื้อจุลินทรีย์จากตัวอย่างและเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ 338f-GC และ 518r ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียตรงตำแหน่ง V3 ในส่วนของยีน 16S rRNA และใช้ไพรเมอร์ NS3-GC และ YM951r สำหรับเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีสต์ในส่วนของยีน 18S rRNA จากนั้นทำการแยกแถบดีเอ็นเอของผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product ด้วยเทคนิค DGGE แล้วทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ จากการศึกษาตรวจพบแบคทีเรียแลกติกสายพันธุ์ *Lact. paracasei*, *Lact. parabuchneri*, *Lact. kefiri*, *L. lactis*, *Lact. casei*, *Lact. paracasei* subsp. *paracasei* และ *Leu. citreum* ส่วนยีสต์ที่ตรวจพบ คือ *Sac. cerevisiae* และ *Kluy. lactis* โดยแบคทีเรียและยีสต์ที่ตรวจพบทั้งหมดนี้ตรวจพบที่ตลอดระยะเวลาการหมัก

Madoroba และคณะ (2011) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียใน *Ting* อาหารหมักพื้นเมืองของประเทศแอฟริกาใต้ที่ได้จากการหมักข้าวฟ่างที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่าง *Ting* ในชั่วโมงที่ 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36 ,42, 48 และ 54 ของการหมัก แล้วเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่สกัดได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ไพรเมอร์ F357-GC และ 518R ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียตรงตำแหน่ง V3 ในส่วนของยีน 16S rRNA จากนั้นทำการแยกแถบดีเอ็นเอของผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product ด้วยเทคนิค DGGE แล้วทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบในอาหารหมักชนิดนี้ที่ระยะเวลาต่างๆ ของการบ่ม ได้แก่ *Ec. mundii* (ตรวจพบในชั่วโมงที่ 0), *W. cibaria* และ *L. lactis* (ตรวจพบตลอดระยะเวลาการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 18), *Lact. curvatus* (ตรวจพบตลอด

ระยะเวลาการหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12), *Ec. faecalis*, *Lact. plantarum*, *Lact. fermentum* และ *Lact. rhamnosus* (ตรวจพบที่ชั่วโมงที่ 54) นอกจากนี้ยังตรวจพบ Enterobacteriaceae ตลอดระยะเวลาการหมัก ภายหลังจากชั่วโมงที่ 6 ของการหมัก

Xu และคณะ (2011) ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์ในน้ำส้มสายชู Zhenjiang ของประเทศจีน โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างน้ำส้มสายชูที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมัก คือ วันที่ 1, 5, 7, 10, 15 และ 20 โดยใช้ไพรเมอร์ P2 และ P3-GC ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของแบคทีเรียตรงตำแหน่ง V3 ในส่วนของยีน 16S rRNA ไพรเมอร์ N3-GC และ YM951r ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของยีสต์ในส่วนของยีน 18S rRNA จากนั้นทำการแยกแถบดีเอ็นเอของผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product ด้วยเทคนิค DGGE แล้วทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ พบว่าแบคทีเรียที่ตรวจพบในน้ำส้มสายชูตลอดระยะเวลาของการหมัก ได้แก่ *S. gallinarum*, *Lact. acetotolerans*, *Lact. gallinarum*, *Lact. crispatus*, *Flavobacterium* sp., *Lact. panis*, *S. kloosii*, *Lact. pontis*, *A. pomorum* และ *A. pasteurianus* ส่วนยีสต์ที่ตรวจพบในน้ำส้มสายชูตลอดระยะเวลาการหมัก ได้แก่ *Sac. cariocanus*, *Sac. paradoxus* และ *Sac. bayanus* นอกจากนี้ยังตรวจพบ *Sac. cerevisiae* ในน้ำส้มสายชูในวันที่ 15 และ 20 ของการหมัก

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

วัสดุและอุปกรณ์

1. ตัวอย่างบูดู

   เป็นบูดูที่หมักในช่วงเวลาต่างๆ ซึ่งทำการหมักโดยกลุ่มแม่บ้านในอำเภอสายบุรี จังหวัดปัตตานี

2. อาหารเลี้ยงเชื้อ

   - Casein agar บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
   - Plate count agar บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
   - MRS agar (de Man Rogosa and Sharp) บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
   - MacConkey agar บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
   - Potato dextrose agar บริษัท HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., India
   - อาหาร basal medium ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม): tryptone 1.0; yeast extract 1.0; K_2HPO_4 2.0; KH_2PO_4 1.0; $(NH_4)_2SO_4$ 1.0; $MgSO_4.7H_2O$ 0.2 และ $Nacl_2$ 200 พีเอช 7.0 ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (สำหรับ basal medium agar เติม agar 15 กรัม)
   - Nutrient Broth (NB) ใน 1 ลิตร ประกอบด้วย (กรัม): beef extract 3; peptone 5; ปรับปริมาตรให้ได้ 1 ลิตรด้วยน้ำกลั่น (สำหรับ nutrient agar เติม agar 15 กรัม)

3. สารเคมี

   - สารเคมีสำหรับย้อมแกรม ประกอบด้วย crystal violet, gram iodine, แอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ และ safranin
   - Absolute ethanol ยี่ห้อ Bio Basic บริษัท Bio Basic Inc., Canada
   - Acrylamide ยี่ห้อ Bio Basic บริษัท Bio Basic Inc., Canada
   - Ammonium persulphate ยี่ห้อ BioChemica บริษัท AppliChem Inc., Germany
   - Bis-acrylamide ยี่ห้อ Amresco® บริษัท Amresco Inc., USA
   - Cycloheximide บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
   - EDTA บริษัท Ajax Finechem Pty. Ltd., Australia
   - EmeraldAmp®GT PCR Master Mix ยี่ห้อ EmeraldAmp® บริษัท Takara Biotechnology (Dalian) Co., Ltd., Japan
   - Formamide ยี่ห้อ Amresco® บริษัท Amresco Inc., USA
   - Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) ยี่ห้อ Geneaid บริษัท Geneaid Biotech Ltd., Taiwan

- Glacial acetic acid บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- HCl บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- NaCl บริษัท Labscan Asia Co., Ltd., Thailand
- NaOH บริษัท Ajax Finechem Pty. Ltd., Australia
- PCR purification kit ยี่ห้อ QIAquick บริษัท QIAGEN Inc., USA
- Primer U968f และ L1378r บริษัท AITbiotech Pte. Ltd., Singapore
- Sodium azide บริษัท Ajax Finechem Pty. Ltd., Australia
- SYBR Gold ยี่ห้อ SYBR® บริษัท Invitrogen, USA
- TEMED ยี่ห้อ BIO-RAD บริษัท Bio-Rad Laboratories Ltd., England
- Tris-base ยี่ห้อ Bio Basic บริษัท Bio Basic Inc., Canada
- Urea ยี่ห้อ Amresco® บริษัท Amresco Inc., USA

4. เอนไซม์
   - Protenase K ยี่ห้อ Bio Basic บริษัท Bio Basic Inc., Canada
   - Lysozyme ยี่ห้อ Fluka บริษัท Sigma-Aldrich Co. Llc., USA
   - RNaseA ยี่ห้อ Vivantis บริษัท Vivantis Technologies Sdn. Bhd., Malaysia

5. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
   - เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH-meter) ยี่ห้อ Mettler Toledo รุ่น MP320U บริษัท Mettler-Toledo International Inc., Thailand
   - หม้อนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) รุ่น SS-325 บริษัท Tomy Seiko Co., Ltd., Japan
   - ไมโครปิเปต (ขนาด 10-100 ไมโครลิตร) ยี่ห้อ Labmate บริษัท Pacific Science Co., Ltd., Thailand
   - เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง ยี่ห้อ Scout™Pro รุ่น SPS402F PT. บริษัท Sumber Arum Abadi, Indonesia
   - เครื่องหมุนเหวี่ยงชนิดควบคุมอุณหภูมิ (refrigerated centrifuge) ยี่ห้อ Eppendorf รุ่น 5415 R บริษัท Eppendorf, Germany
   - เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) รุ่น U-2000 บริษัท Technical Cooperation
   - เครื่องเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอ (Polymerase chain reactor) ยี่ห้อ Techne รุ่น TC-512 บริษัท Barloworld Scientific Ltd., England

- Vortex mixer ยี่ห้อ WiseMix® รุ่น VM-10 บริษัท Interlab Ltd., New Zealand
- Bio-Rad Dcode™ Universal Mutation Detection System apparatus ยี่ห้อ BIO-RAD บริษัท Bio-Rad Laboratories Ltd., England
- UV transillumination บริษัท ATTO Corporation, Japan
- Gel Documentation ยี่ห้อ UVITEC รุ่น Essential V2 บริษัท UVItec Limited, England
- ชุด Gel electrophoresis ยี่ห้อ MyRun^nc บริษัท Cosmo Bio Co., Ltd., Japan
- Power supply ยี่ห้อ peqPOWER รุ่น E300 บริษัท PEQLAB Biotechnologie GmbH, Germany
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ยี่ห้อ WiseBath รุ่น WB-11 บริษัท Witeg Labortechnik GmbH, Germany
- ตู้อบลมร้อน (hot air oven) ยี่ห้อ Sanyo รุ่น Mov212
- ตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) ยี่ห้อ Hotpack รุ่น 527044
- กล้องจุลทรรศน์ ยี่ห้อ Nikon รุ่น YS2H
- ห่วงเขี่ยเชื้อและอุปกรณ์เครื่องแก้วสำหรับวิเคราะห์

วิธีการทดลอง

1. การตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียในบูดูโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

เก็บตัวอย่างน้ำหมักบูดูทุกๆ 15 วันของการหมักจนถึง 12 เดือน ตัวอย่างละ 25 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 225 มิลลิลิตร แล้วเจือจางต่อแบบ ten-fold serial dilution ให้มีจำนวนเชื้อที่เหมาะสมจากนั้นทำการตรวจสอบหา

1.1 จำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด

Pour plate ตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยอาหาร plate count agar เกลือความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดต่อตัวอย่างในหน่วย CFU/ml (Obodai and Dodd, 2006) สุ่มตัวอย่างเชื้อที่มีขนาดและลักษณะของโคโลนีแตกต่างกัน plate ละ 5-15 โคโลนี มา streak ลงบนอาหาร plate count agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเก็บไว้ในอาหาร nutrient broth ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.2 จำนวนเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีน

Pour plate ตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยอาหาร casein agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มี clear zone รอบโคโลนีเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดต่อตัวอย่างในหน่วย CFU/ml (Apibalbae, 2009) สุ่มตัวอย่างเชื้อที่มีขนาดและลักษณะของโคโลนีแตกต่างกัน plate ละ 5-15 โคโลนี มา streak ลงบนอาหาร casein agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเก็บไว้ในอาหาร nutrient broth ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.3 จำนวนเชื้อแบคทีเรียย่อยไขมัน

Pour plate ตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยอาหาร basal medium ที่มีไตรบิวไทริน 1 เปอร์เซ็นต์ และเกลือความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มี clear zone รอบโคโลนีเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณจำนวนเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดต่อตัวอย่างในหน่วย CFU/ml (Apibalbae, 2009) สุ่มตัวอย่างเชื้อที่มีขนาดและลักษณะของโคโลนีแตกต่างกัน plate ละ 5-15 โคโลนี มา streak ลงบนอาหาร basal medium agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเก็บไว้ในอาหาร nutrient broth ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.4 จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลกติก

Pour plate ตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.01 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเกลือความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) ระดับความเจือจางละ 3 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะไร้อากาศ เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อที่เปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี แล้วคำนวณในหน่วย CFU/ml (Endo *et al*., 2008) สุ่มตัวอย่างเชื้อที่เปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเหลืองที่มีขนาดและลักษณะของโคโลนีแตกต่างกัน plate ละ 5-15 โคโลนี มา streak ลงบนอาหาร MRS agar ที่มี bromocresol purple 0.01 เปอร์เซ็นต์ (w/v) และเกลือความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทดสอบว่าเป็นแบคทีเรียแลกติกหรือไม่โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส โดยแบคทีเรียแลกติกไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส (Axelsson, 1993) และย้อมสีแบบแกรมตามวิธีการของ Hucker staining method (Murray *et al*., 1994) แบคทีเรียแลกติกต้องติดสีแกรมบวก (Axelsson, 1993) เลือกโคโลนีที่เป็นแบคทีเรียแลกติกมาเก็บไว้ในอาหาร nutrient broth ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.5 จำนวนเชื้อ Enterobacteriaceae

Pour plate ตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมด้วยอาหาร MacConkey agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่มีโคโลนีสีแดงหรือชมพูแล้วคำนวณในหน่วย CFU/ml (Fontana *et al*., 2005a, b) สุ่มตัวอย่างเชื้อที่มีขนาดและลักษณะของโคโลนีแตกต่างกัน plate ละ 5-15 โคโลนี มา streak ลงบนอาหาร MacConkey agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ (w/v) เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาเก็บไว้ในอาหาร nutrient broth ที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

1.6 วัดพีเอชของตัวอย่างบูดูด้วยเครื่อง pH meter

นำตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่วันต่างๆ ของการหมัก ตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตรมาวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่อง pH meter

1.7 การหาปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบเป็นกรดแลกติก

นำตัวอย่างน้ำหมักบูดู 30 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสใสในฟลาสก์ขนาด 150 มิลลิลิตร หยดฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด (ฟีนอฟทาลีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในเอธิลแอลกอฮอล์) แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้จุดยุติเป็นสีชมพู (AOAC, 2000)

$$\text{ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบเป็นกรดแลกติก (\%)} = \frac{\text{โซเดียมไฮดรอกไซด์ (มล.)} \times \text{นอร์มอล} \times 90.09 \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)} \times 1000}$$

1.8 การหาปริมาณเกลือทั้งหมด (A.O.A.C, 1960)

ปิเปตสารละลายตัวอย่างน้ำบูดูมา 10 มิลลิลิตร ใส่ลงใน flask ขนาด 100 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นเติม 5% K_2CrO_4 0.5 มิลลิลิตร แล้วไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน $AgNO_3$ จนกระทั่งได้สีแดงอิฐของ Ag_2CrO_4 บันทึกปริมาตรของ $AgNO_3$ ที่ใช้ ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง คำนวณหาปริมาณของคลอไรด์ในสารตัวอย่างน้ำบูดู (ดังวิธีการในภาคผนวก ก)

2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อที่คัดแยกได้

นำเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่แยกได้ทุกไอโซเลทมาศึกษาลักษณะต่างๆดังนี้

2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ย้อมสีแบคทีเรียเพื่อดูการติดสีแกรมตามวิธีการของ Hucker staining method (Murray *et al*., 1994) พร้อมทั้งศึกษาขนาด รูปร่าง การจัดเรียงตัวของแบคทีเรีย ตรวจสอบการสร้างสปอร์ (spore formation) ของแบคทีเรีย โดยการย้อมสีสปอร์ (ดังวิธีการในภาคผนวก ข)

2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ (ดังวิธีการในภาคผนวก ข)

- การสร้างเอนไซม์คะตาเลส
- การสร้างสารอะซิโตอิน (Acetoin) ได้แก่ MR-VP medium
- การสร้างกรดจากน้ำตาล ได้แก่ น้ำตาล glucose, fructose, lactose, sucrose, arabinose, xylose และ mannitol

3. การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

ถ่ายเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดที่คัดแยกได้ทั้งหมด 5 เปอร์เซ็นต์ ที่เก็บไว้ในอาหารแต่ละชนิดที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์ ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อเชื้อแต่ละชนิดปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง หมุนเหวี่ยงเชื้อที่ได้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้ Genomic DNA Mini Kit (TIANamp Bacteria DNA Kit) ตรวจสอบ genomic DNA ที่สกัดได้ด้วยเทคนิคอิเล็คโทรโฟเรซิส (electrophoresis) โดยใช้ genomic DNA ปริมาตร 5 ไมโครลิตร load ลงใน 1% agarose gel ที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1x TAE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที ย้อม agarose gel ด้วย SYBR Gold solution เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปตรวจสอบภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation เก็บตัวอย่าง genomic DNA ที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

4. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่สกัดได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียที่สกัดได้จากข้อ 3 เป็น template และไพรเมอร์ที่นำมาใช้เป็น universal primer คือ 27F (5'-AGA GTT TGA TCA TGG CTC AG-3') และ 1492R (5'-GGT ACC TTG TTA CGA CTT-3') ในส่วนของยีน 16S rRNA เติมสารสำหรับทำ PCR ในหลอดทดลองให้ได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ดังนี้ 2X Tag PCR Master Mix 25 ไมโครลิตร primer ทั้งสองชนิด ชนิดละ 10 μM ปริมาตร 1 ไมโครลิตร $MgCl_2$ (50 mM) ปริมาตร 0.5 ไมโครลิตร ดีเอ็นเอ template ที่สกัดจากตัวอย่างปริมาตร 1 ไมโครลิตร และ dH_2O (Milli Q water) ปริมาตร 21.5 ไมโครลิตร ทำการ denaturation ครั้งแรกที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นทำ PCR 25 รอบ อุณหภูมิที่ใช้ต่อรอบ คือ denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 วินาที annealing ที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที และ elongation ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 วินาที เมื่อครบ 25 รอบแล้วจึงทำการ elongation ครั้งสุดท้ายที่อุณหภูมิ 72

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (ดัดแปลงจาก Lu *et al.*, 2010) ตรวจสอบผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product ที่ได้ด้วยเทคนิคอิเล็คโทรโฟเรซิส โดยใช้ PCR product ปริมาตร 5 ไมโครลิตร load ลงใน 1.2% agarose gel ที่แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ 1x TAE ใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 26 นาที ย้อม agarose gel ด้วย SYBR Gold solution เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำไปตรวจสอบ PCR product ภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation

5. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้

นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit ก่อนส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง DNA sequencer โดยบริษัท Ward Medic Ltd., Thailand แล้วเทียบเคียงข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank (BLAST search ที่ http://www.ncbi.nlm.gov/) (ดัดแปลงจาก Lee *et al*., 2005)

6. การตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียในบูดูด้วยเทคนิค PCR-DGGE

6.1 การสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างบูดู

นำตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระยะเวลาต่างๆ ของการหมักตามข้อที่ 1 ตัวอย่างละ 10 มิลลิลิตร มาหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอทางการค้า Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) เก็บตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6.2 การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

เพิ่มจำนวนดีเอ็นเอของตัวอย่างที่สกัดได้ด้วยเทคนิค PCR โดยใช้ตัวอย่างดีเอ็นเอที่สกัดได้จากน้ำหมักบูดูเป็น template แล้วใช้ไพรเมอร์และสภาวะต่างๆ เช่นเดียวกับวิธีการในข้อ 3

6.3 การแยกแถบดีเอ็นเอด้วยเทคนิค DGGE

นำผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product ที่ได้จากข้อ 6.2 ปริมาณ 30 ไมโครกรัม ไปวิเคราะห์ด้วยการทำ DGGE โดยใช้ 0.8 mM polyacrylamide gel (8% [w/v] acrylamide:bisacrylamide 37.5:1) ที่ระดับความเข้มข้นของ denaturant คือ 30-65% urea-formamide denaturing gradients (denaturing acrylamide 100% ประกอบด้วย 7 M urea และ 40% [w/v] formamide) และทำการวิเคราะห์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ใช้กระแสไฟฟ้า 20 โวลต์ เป็นเวลา 10 นาที ตามด้วยกระแสไฟฟ้า 85 โวลต์ เป็นเวลา 14 ชั่วโมง ย้อมแถบดีเอ็นเอที่ได้บนแผ่นเจลด้วย SYBR Gold solution เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปส่องดูแถบดีเอ็นเอภายใต้แสง UV ด้วยเครื่อง UV transilluminator และบันทึกภาพโดยใช้ Gel Documentation (ดัดแปลงจาก Rantsiou *et al.*, 2004)

6.4 การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์จาก DGGE fragments

ตัดแต่ละแถบดีเอ็นเอบนแผ่นเจลในตำแหน่งที่แตกต่างกันจากการวิเคราะห์ DGGE ด้วยมีดใบเล็กที่ปลอดเชื้อ แยกดีเอ็นเอออกจากเจลโดยการแช่แถบดีเอ็นเอในน้ำ Milli Q water 20 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิ 4

องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 คืน นำดีเอ็นเอที่แยกได้มาทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอตามวิธีการข้อ 4 แต่ไม่มีการใช้ GC-clamp (Spano *et al*., 2007) และทำการ annealing ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส นำ PCR product มาทำให้บริสุทธิ์ด้วย PCR purification kit ก่อนส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง DNA sequencer โดยบริษัท Ward Medic Ltd., Thailand แล้วเทียบเคียงข้อมูลของลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้กับฐานข้อมูลใน GenBank (BLAST search ที่ http://www.ncbi.nlm.gov/) (ดัดแปลงจาก Lee *et al*., 2005)

7. การตรวจสอบ Detection limit ของเทคนิค PCR-DGGE

เลือกเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียจากข้อ 1 มาชนิดละ 1 สายพันธุ์ ถ่ายเชื้อแบคทีเรีย 5 เปอร์เซ็นต์ที่เก็บไว้ในอาหารที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดที่มีกลีเซอรอลความเข้มข้น 25 เปอร์เซ็นต์จากข้อ 1 ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเชื้อแต่ละชนิดปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางเชื้อแบบ ten-fold serial dilution ให้มีจำนวนเชื้อจาก 10^1 - 10^8 CFU/ml นำแต่ละ dilution ที่มีจำนวนเชื้อ 10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, 10^6, 10^7 และ 10^8 CFU/ml ไปตรวจสอบ detection limit (ดัดแปลงจาก Fasoli *et al*., 2003) โดยนำเชื้อจากแต่ละ dilution ปริมาตร 2 มิลลิลิตรไปหมุนเหวี่ยงที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียโดยใช้ Genomic DNA Mini Kit (Blood/Cultured Cell) นำดีเอ็นเอที่สกัดได้มาเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ตามวิธีการในข้อ 3ตรวจวัดปริมาณผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product โดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงของดีเอ็นเอที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร และตรวจสอบ detection limit ของเทคนิค PCR-DGGE โดยนำผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product ปริมาตรทั้งหมด มา run gel โดยใช้ 1.2% agarose gel กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 26 นาที เพื่อดูความสามารถในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่แต่ละ dilution ซึ่งมีจำนวนเชื้อในปริมาณที่แตกต่างกันด้วยเทคนิค PCR

บทที่ 4
ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

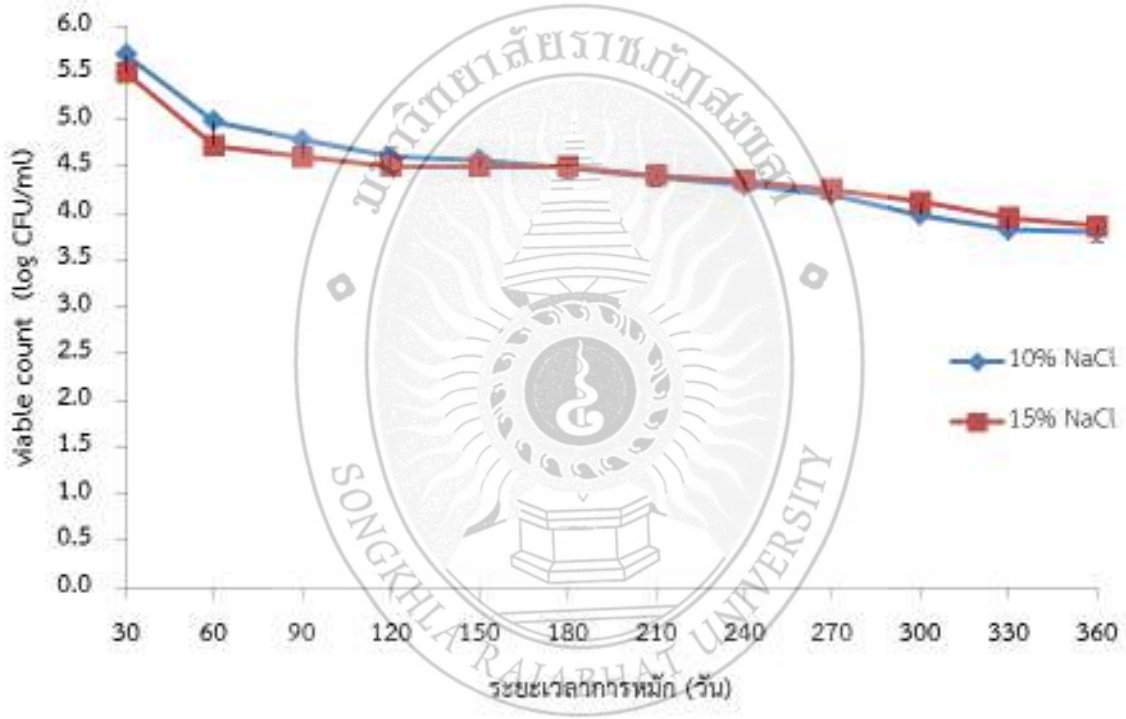
1. การตรวจติดตามเชื้อแบคทีเรียในบูดูโดยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการหมักบูดูด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยเก็บตัวอย่างน้ำบูดูทุกๆ 15 วันของการหมักจนครบ 12 เดือน จากนั้นนำตัวอย่างน้ำบูดูมาเพาะเลี้ยงเพื่อหาจำนวนแบคทีเรีย โดยตรวจหาจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดบนอาหาร plate count agar (PCA), จำนวนแบคทีเรียย่อยโปรตีนบนอาหาร casein agar, จำนวนแบคทีเรียย่อยไขมันบนอาหาร basal medium, จำนวนแบคทีเรียแลกติกบนอาหาร MRS agar และจำนวน enterobacteriaceae บนอาหาร MacConkey agar พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียในแต่ละกลุ่มดังนี้

1.1 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการหมักบูดูโดยนำตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Pour plate บนอาหาร Plate count agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี ทั้งนี้พบว่าสามารถตรวจเจอแบคทีเรียได้เฉพาะบนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ส่วนบนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ตรวจไม่เจอแบคทีเรีย อาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมักบูดูไม่สามารถเพาะเลี้ยงบนอาหารที่มีความเข้มข้นเกลือสูงๆได้ ซึ่งผลการทดลองในระยะแรกของการหมักจะมีการเจริญของแบคทีเรียมากที่สุด และปริมาณแบคทีเรียจะลดลงเรื่อยๆจนถึงช่วงสุดท้ายของการหมัก โดยปริมาณแบคทีเรียจะมากในช่วงวันที่ 15 - 45 วันแรกของการหมัก โดยมีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ 5.98 - 5.54 log CFU/ml และ 5.74 - 5.00 log CFU/ml ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจาก 45 วันของการหมักปริมาณแบคทีเรียจะลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการหมักในวันที่ 360 ของการหมัก มีปริมาณแบคทีเรียอยู่ในช่วง 5.54 - 3.80 log CFU/ml และ 5.00 - 3.86 log CFU/ml ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (รูปที่ 4) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ พงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) และธนุสรา เหล่าเจริญสุข และคณะ (2533) ซึ่งตรวจพบว่าปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในระหว่างการหมักจะเพิ่มขึ้นมากในช่วงแรกของการหมัก และจะลดลงในช่วงสุดท้ายของการหมัก ทั้งนี้แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในช่วงแรกอาจปนเปื้อนมาจากตัวปลา เกลือหรือสถานที่ที่ใช้หมัก ซึ่งแบคทีเรียพวกที่ปนเปื้อนนี้มีทั้งกลุ่มที่ชอบเกลือและไม่ชอบเกลือ กลุ่มที่ไม่ชอบเกลือเมื่อถูกเกลือจะตายอย่างรวดเร็ว เนื่องจากเกลือมีผลต่อเซลล์แบคทีเรีย (Frazier, 1958 อ้างถึงโดยธนุสรา และคณะ, 2533) จากนั้นเมื่อหมักบูดูนานขึ้นปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดจะลดลง น่าจะเป็นผลมาจากเมื่อหมักบูดูนานขึ้นสภาวะการหมักเป็นกรดและมีความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้น ส่งผลให้กลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ทนกรดและไม่ทนเกลือถูกทำลายไป เหลือเฉพาะแบคทีเรียพวกทนกรดและพวกที่ชอบเกลือหรือทนเกลือได้เท่านั้น จากผล

การทดลองดังกล่าวแสดงว่าบูดูเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีปริมาณเกลือสูงมากผลิตภัณฑ์หนึ่ง ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญได้จึงเป็นแบคทีเรียที่ทนเกลือหรือชอบเกลือ ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดต่างจากรายงานของวรรณา ชูฤทธิ์ (2541) ซึ่งทำการหมักบูดูไว้กลางแจ้งเป็นเวลา 200 วัน โดยใช้ปลาซาร์ดีนผสมกับเกลือในอัตราส่วนปลาต่อเกลือเท่ากับ 3:1 โดยน้ำหนัก ตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียทั้งหมดในช่วง 10 - 50 วันแรกมีปริมาณแบคทีเรีย log 7.88 - log 4.53 ต่อกรัม ในช่วงที่สอง 70 - 200 วันของการหมักมีแบคทีเรียในช่วง log 5.40 - log 7.13 ต่อกรัม ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงลักษณะดังกล่าวนี้น่าจะเป็นผลมาจากแบคทีเรียมีการแทนที่ของ 2 กลุ่ม คือ ในช่วงแรกแบคทีเรียพวกที่สร้างเอนไซม์ย่อยสารโมเลกุลใหญ่ได้จะเจริญ จากนั้นเมื่อสารอาหารที่ต้องการมีปริมาณลดลงการเจริญจึงน้อยลงและถูกแทนที่โดยแบคทีเรียกลุ่มที่สองซึ่งเป็นกลุ่มที่เจริญจนสิ้นสุดการทดลอง

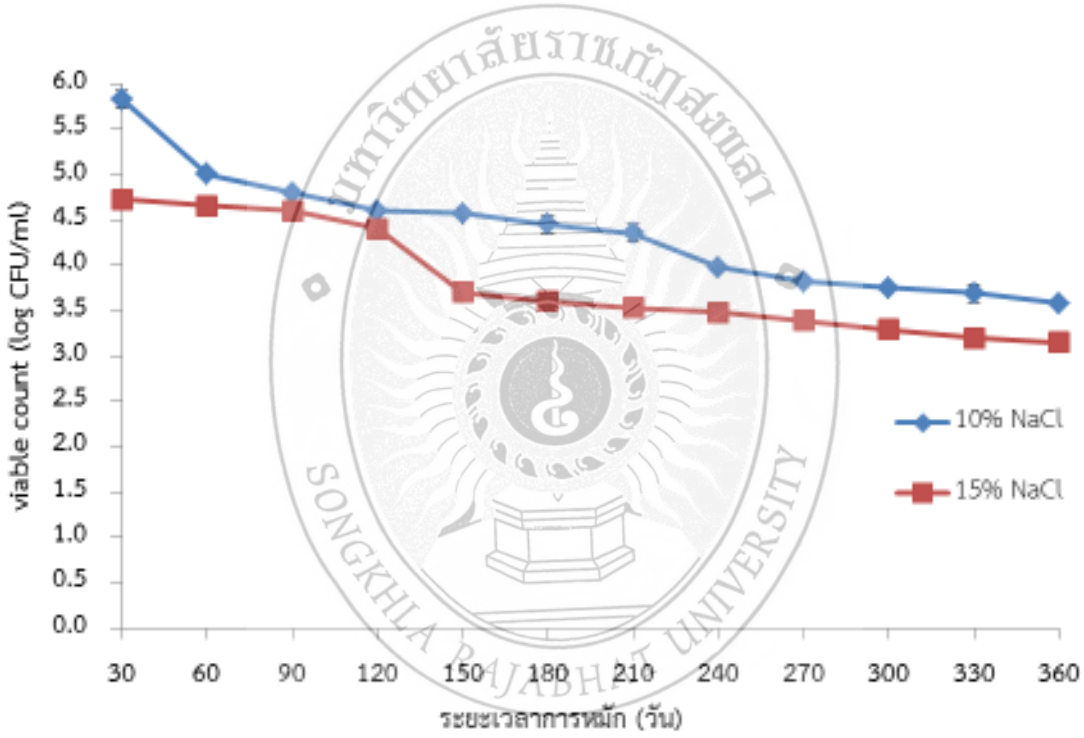


รูปที่ 4: การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในตัวอย่างน้ำหมักบูดูบนอาหาร Plate Count Agar ตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก

1.2 จำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยโปรตีน

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยโปรตีนโดยนำตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Pour plate บนอาหาร Skim milk agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนแบคทีเรียที่มี Clear zone รอบโคโลนีบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี จากการทดลองพบว่าปริมาณแบคทีเรียที่ย่อยโปรตีนมีการเจริญรวดเร็วในช่วงแรกๆของการหมักในช่วง 15 - 30 วันแรกของการหมักปริมาณแบคทีเรียย่อยโปรตีนจะเพิ่มขึ้น โดยมีปริมาณแบคทีเรียเท่ากับ

4.98 - 5.83 log CFU/ml และ 4.63 - 4.73 log CFU/ml ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ หลังจาก 45 วันของการหมักเป็นต้นไปปริมาณแบคทีเรียจะลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการหมัก โดยมีปริมาณแบคทีเรียในช่วง 45 - 360 วันของการหมักเท่ากับ 5.55 - 3.58 log CFU/ml และ 4.72 - 3.15 log CFU/ml ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังแสดงในรูปที่ 5 ทั้งนี้การย่อยสลายโปรตีนโดยแบคทีเรียเกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ย่อยโปรตีนที่แบคทีเรียผลิตและหลั่งออกมาภายนอกเซลล์เพื่อใช้ย่อยโปรตีนชนิดต่างๆ ที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ให้ได้กรดอะมิโนสำหรับดูดซึมเพื่อใช้ในการเจริญเติบโต (Ward, 1983) ตัวอย่างของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายโปรตีน ได้แก่ เชื้อแบคทีเรียในสกุล *Aeromonas, Bacillus, Clostridium, Flexibacter, Pseudomonas, Serratia, Staphylococcus, Stenotrophomonas* และ *Streptomyces* (Tan *et al*., 2005)

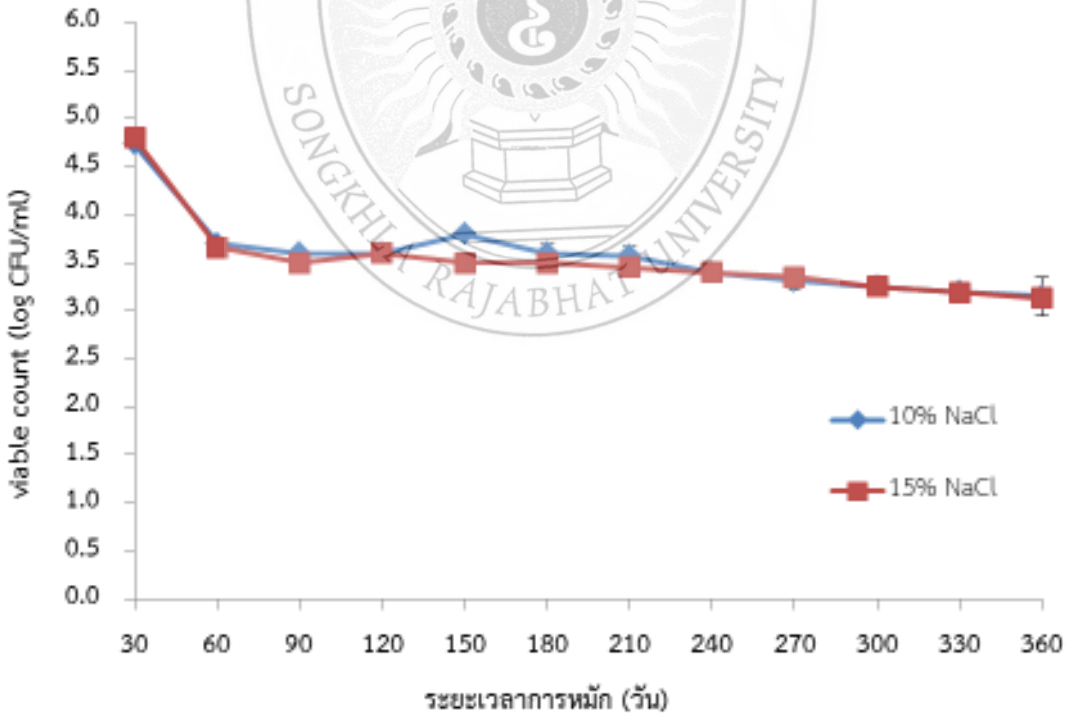


รูปที่ 5: การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียในตัวอย่างน้ำหมักบูดูบนอาหาร Skim milk agar ตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก

1.3 จำนวนเชื้อแบคทีเรียย่อยไขมัน

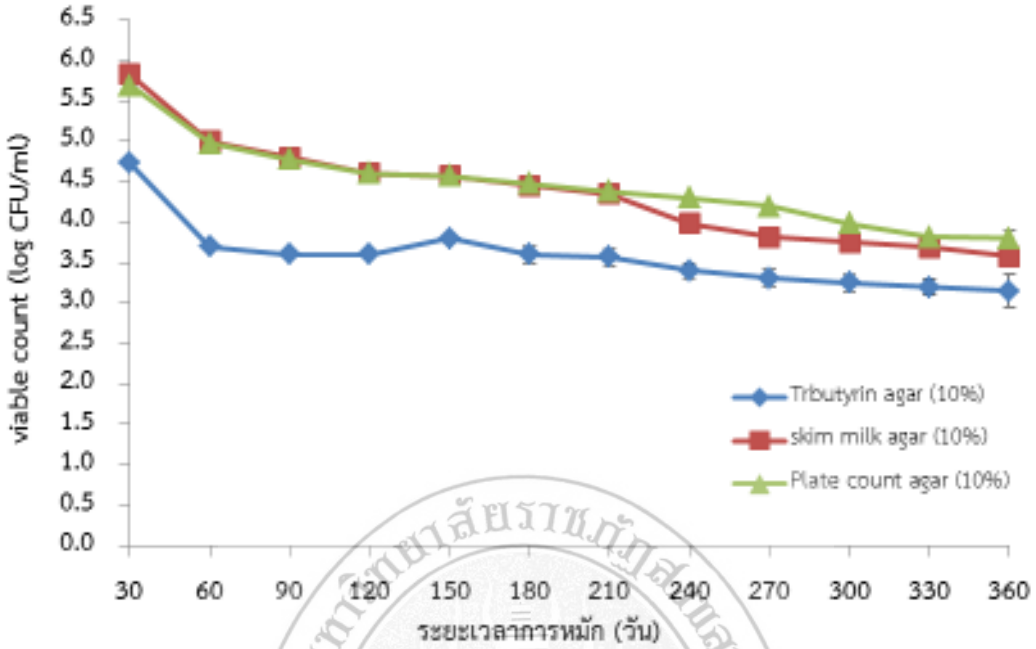
จากการศึกษาปริมาณการเปลี่ยนแปลงเชื้อแบคทีเรียที่ย่อยไขมันโดยนำตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Pour plate บนอาหาร Tributyrin agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนแบคทีเรียที่มี Clear zone รอบโคโลนีบนอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง

30 - 300 โคโลนี จากการทดลองพบว่าปริมาณแบคทีเรียย่อยไขมันในน้ำหมักบูดูจะมากในช่วงแรกของการหมัก จากนั้นปริมาณแบคทีเรียย่อยไขมันจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 15 - 60 วันของการหมัก โดยมีปริมาณแบคทีเรียในช่วง 5.03 - 3.70 log CFU/ml และ 5.58 - 3.66 log CFU/ml ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ หลังจากนั้นปริมาณแบคทีเรียย่อยไขมันค่อนข้างจะคงที่ในช่วง 75 - 180 วันของการหมัก โดยมีปริมาณแบคทีเรียในช่วง 3.60 - 3.60 log CFU/ml และ 3.66 - 3.50 log CFU/ml ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ส่วนในช่วงสุดท้ายของการหมักในระหว่างวันที่ 195 - 360 วันของการหมัก ปริมาณแบคทีเรียจะลดลงอย่างช้าๆ จนสิ้นสุดการหมัก โดยมีแบคทีเรียอยู่ในช่วง 3.59 - 3.15 log CFU/ml และ 3.46 - 3.13 log CFU/ml ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ดังรูปที่ 6) ซึ่งแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยสลายไขมันนั้นมีอยู่หลายกลุ่มด้วยกัน โดยแบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ไลเปสซึ่งทำหน้าที่ในการไฮโดรไลซ์ (hydrolyzed) โมเลกุลของน้ำมันให้กลายเป็นกรดไขมัน (free fatty acid) โมโนกลีเซอไรด์ (monoglyceride) ไดกลีเซอไรด์ (diglyceride) และกลีเซอรอล (glycerol) ตัวอย่างแบคทีเรียที่มีความสามารถในการย่อยไขมัน ได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Alcaliginaes, Bacillus, Cryptococcus, Acinetobacter* และ *Pseudomonas* (Kok *et al.*, 1995) ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียย่อยโปรตีน และแบคทีเรียย่อยไขมันมีการเปลี่ยนแปลงในรูปแบบเดียวกัน คือ ปริมาณแบคทีเรียจะมากในช่วงแรก และจะลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการหมัก ดังแสดงในรูปที่ 7

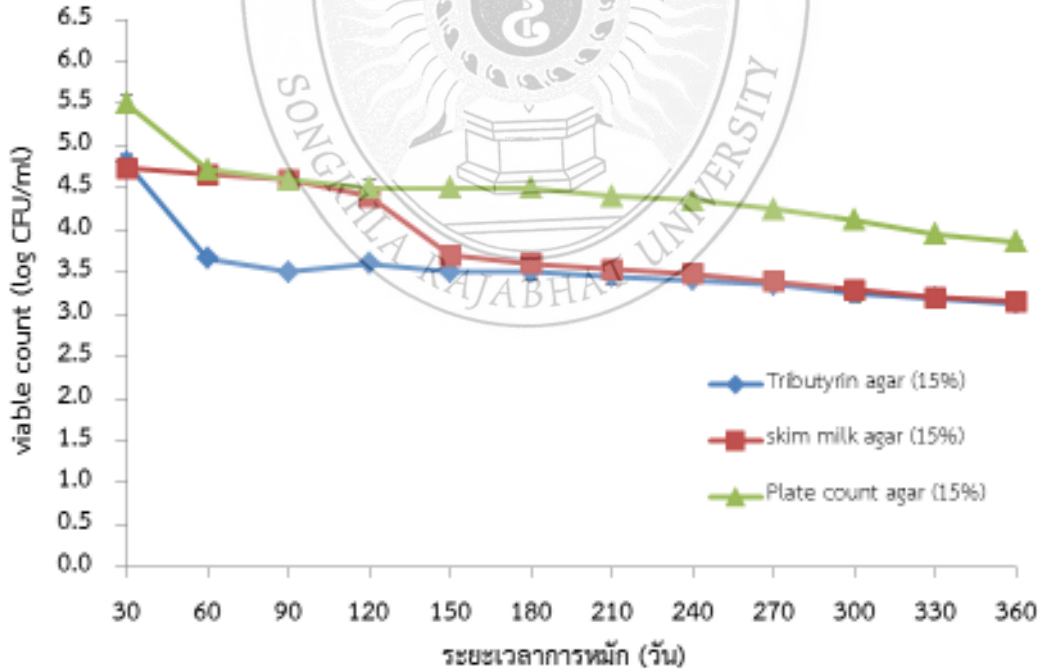


รูปที่ 6: การเปลี่ยนแปลงของปริมาณของแบคทีเรียย่อยไขมันในตัวอย่างน้ำหมักบูดูบนอาหาร Tributyrin Agar ตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก

(a)



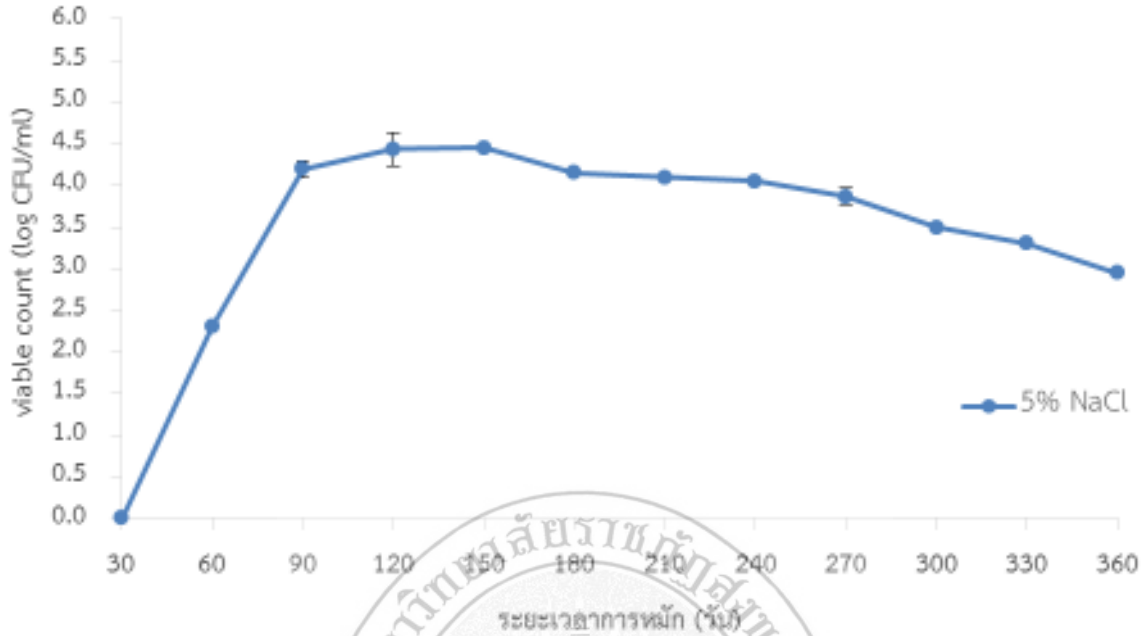
(b)



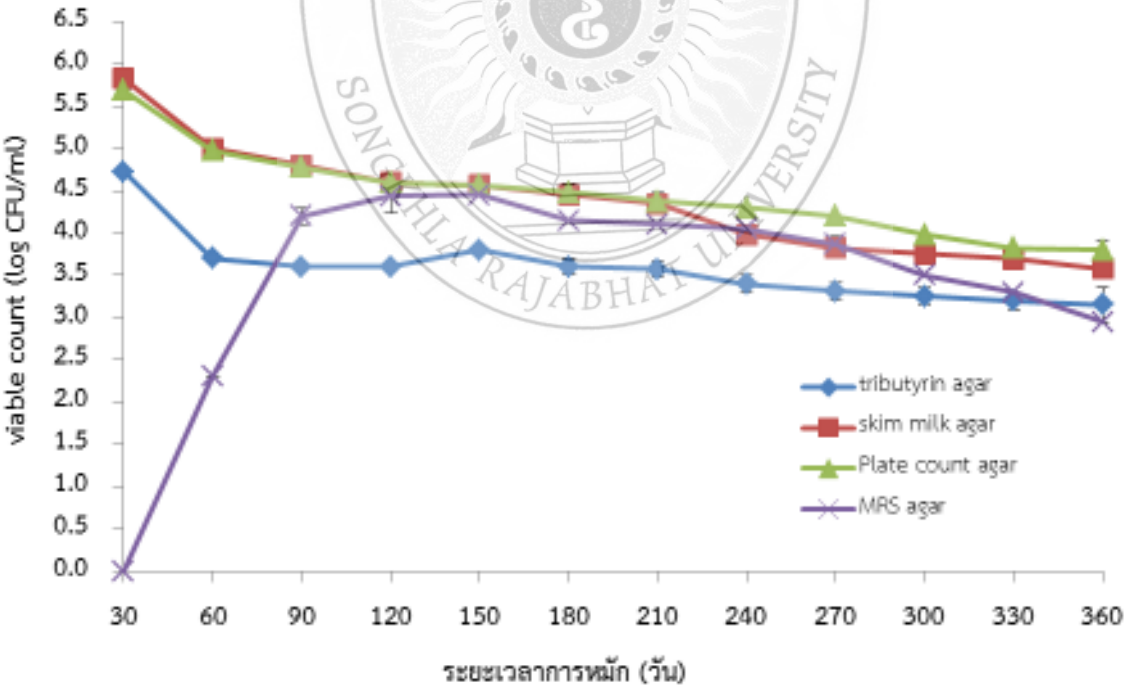
รูปที่ 7: เปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียย่อยโปรตีนและแบคทีเรียย่อยไขมันตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก (a) ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10% (b) ในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 15%

1.4 จำนวนแบคทีเรียแลกติก

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติก โดยนำตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Pour plate บนอาหาร MRS agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 5, 10, 15 และ 20 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 72 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนแบคทีเรียที่เปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลืองเฉพาะจานเพาะเชื้อที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30 - 300 โคโลนี จากการทดลองสามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกได้เฉพาะในอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากบูดูเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีเกลือสูง เกลือจะเป็นตัวคัดเลือกกลุ่มเชื้อที่มีผลต่อการหมัก ซึ่งการตรวจติดตามการเปลี่ยนแปลงจุลินทรีย์ในอาหารหมักที่ใช้เกลือปริมาณสูงๆ จุลินทรีย์อยู่ภายใต้สภาวะกดดัน สามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่อาจจะไม่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (nonculturable) จึงส่งผลให้ตรวจไม่เจอเชื้อจากการคัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ปริมาณเกลืออาจมีผลต่อสายพันธุ์แบคทีเรียในการเจริญหรือทำหน้าที่การหมักอาหาร เพราะฉะนั้นปริมาณเกลือมากจึงมีผลทำให้แบคทีเรียไม่เจริญขึ้นมาเลย (นรภัทร หวันเหล็ม, 2551) ซึ่งในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีเกลือสูง ส่วนใหญ่จะใช้อาหาร MRS ที่มีส่วนผสมของ NaCl ที่ระดับความเข้มข้นแตกต่างกันไป เช่น จากรายงานของอุษณีย์ อภิบาลแบ และคณะ (2556) สามารถคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักที่มีความเข้มข้นเกลือสูง ได้แก่ บูดู ปลาจิ้งจั้ง และไตปลา โดยใช้อาหาร MRS agar ที่มี NaCl 3% และ 6% ที่เติม $CaCO_3$ 1% เท่านั้น จากการทดลองตรวจไม่พบแบคทีเรียแลกติกในช่วง 30 วันแรกของการหมัก แต่หลังจากวันที่ 30 ของการหมักเป็นต้นไป จะมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติกในช่วงวันที่ 45 - 150 ของการหมักอยู่ในช่วง 1.74 - 4.45 log CFU/ml และหลังจากวันที่ 165 ของการหมักเป็นต้นไปปริมาณแบคทีเรียแลกติกจะลดลงเรื่อยๆจนสิ้นสุดการหมัก โดยมีปริมาณแบคทีเรียแลกติก 2.95 log CFU/ml เมื่อสิ้นสุดการหมัก (ดังแสดงในรูปที่ 8) ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากเมื่อแบคทีเรียแลกติกเจริญเติบโตขึ้นมาหลังจากวันที่ 30 ของการหมัก ทำให้ปริมาณกรดแลกติกที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งส่งผลต่อปริมาณของแบคทีเรียทั้งหมดซึ่งเป็นกลุ่มที่ไม่ทนกรดลดปริมาณลง ซึ่งจะเห็นได้จากปริมาณเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจะลดลงหลังจาก 45 วันของการหมักเป็นต้นไป (ดังแสดงในรูปที่ 9) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของพงษ์เทพ เกิดเนตร (2533) ที่พบว่าแบคทีเรียทั้งหมดเพิ่มขึ้นในช่วง 15 วันแรกของการหมัก จากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วจนถึงวันที่ 40 และคงที่จนถึงวันที่ 110 ของการหมัก และลดลงอีกครั้งจนสิ้นสุดการหมัก ส่วนการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลกติกจะเพิ่มขึ้นในวันที่ 30 ของการหมัก และเปลี่ยนแปลงเล็กน้อยจากวันที่ 30 ของการหมักจนสิ้นสุดการหมัก



รูปที่ 8: การเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียแลกติกในตัวอย่างน้ำหมักบูดูบนอาหาร MRS agar ตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก



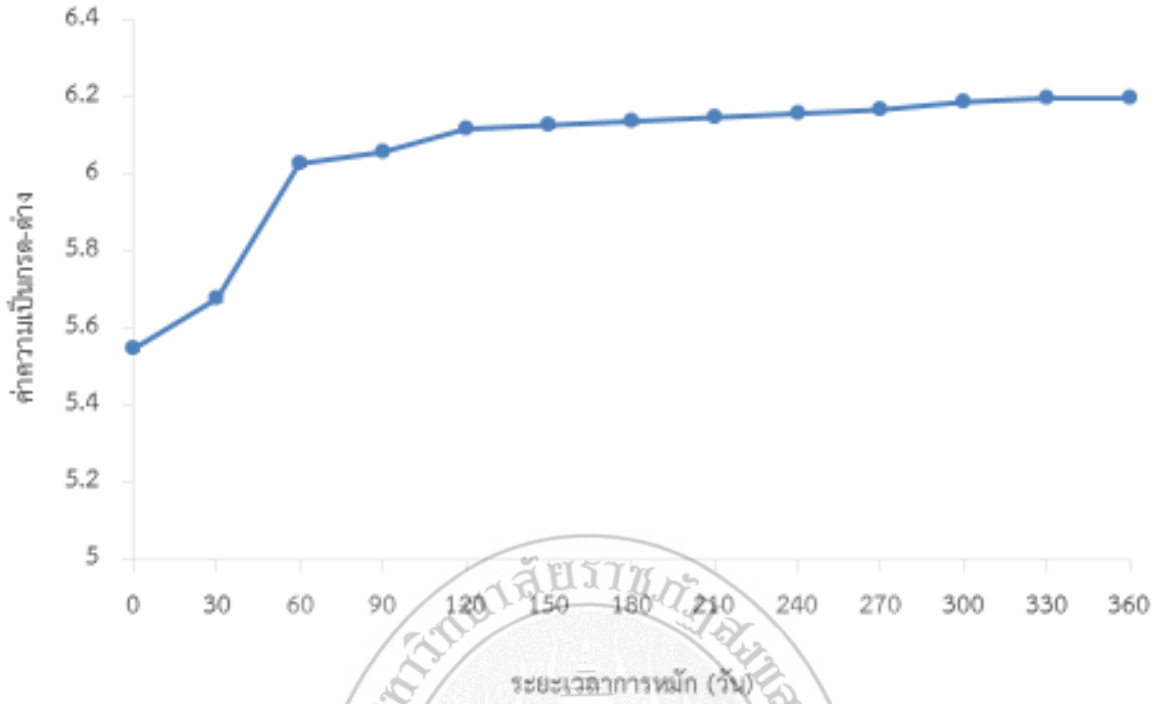
รูปที่ 9: แสดงความสัมพันธ์ของการเปลี่ยนแปลงปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียย่อยโปรตีน แบคทีเรียย่อยไขมัน และปริมาณแบคทีเรียแลกติก ตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน

1.5 จำนวนเชื้อ Enterobacteriaceae

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อ Enterobacteriaceae โดยนำตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่ระดับความเจือจางที่เหมาะสมมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี Pour plate บนอาหาร Macconkey agar ที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมด จากการทดลองพบว่า เชื้อ Enterobacteriaceae จะเจริญช่วงระยะเวลาการหมักวันที่ 0 - 7 เนื่องจากอาจเกิดจากการปนเปื้อนระหว่างการหมัก หลังจาก 15 วันของการหมักไม่พบเชื้อ Enterobacteriaceae แสดงให้เห็นว่าการหมักบูดูไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค และไม่พบการปนเปื้อนของสารพิษ เนื่องจากความเข้มข้นของเกลือที่สูงขึ้น ทำให้จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้ทนความเข้มข้นเกลือสูงๆไม่ได้ ดังนั้นจึงไม่เจอเชื้อ Enterobacteriaceae หลังจากวันที่ 7 ของการหมัก ทั้งนี้อาจเป็นผลมาจากปริมาณกรดแลกติกที่เกิดขึ้นระหว่างการหมักมีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อกลุ่ม “Enterobacteriaceae” ได้ (Alvarado et al., 2006)

1.6 การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำหมักบูดู

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลา 360 วันหรือ 12 เดือนของการหมัก โดยการเก็บตัวอย่างทุกๆ 15 วัน แล้วนำตัวอย่างมาวัดเพื่อวิเคราะห์ดูการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่าง พบว่าตลอดระยะเวลาการหมัก 360 วัน ค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำบูดูมีค่าเป็นกลางค่อนมาทางกรดเล็กน้อย โดยมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.57 - 6.20 ทั้งนี้พบว่าในช่วง 30 - 60 วันของการหมักเป็นช่วงที่ค่าความเป็นกรด-ด่างค่อนข้างเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วกว่าช่วงเวลาอื่นของการหมัก หลังจากวันที่ 60 ของการหมักเป็นต้นไปจนสิ้นสุดการหมักค่าพีเอชค่าเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆหรือแทบจะคงที่ไม่ค่อยเปลี่ยนแปลง (ดังแสดงในรูปที่ 10) โดยค่าพีเอชที่ได้จากการวิจัยสอดคล้องกับรวีวรรณ วงษาพรมและอับดุลกอยยูม ซี (2557) กล่าวว่าค่าความเป็นกรด-ด่างของน้ำบูดูที่ทำการหมักเป็นระยะเวลา 12 เดือน จะมีค่าความเป็นกรด-ด่างระหว่าง 5.05 - 6.50 และสอดคล้องกับรายงานของวรรณา ชูฤทธิ์ และคณะ (2541) ซึ่งทำการหมักบูดูกลางแจ้งเป็นระยะเวลา 200 วัน พบว่าบูดูมีความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.81 - 6.27 ถึงแม้ว่าค่า pH ไม่เป็นสัดส่วนกับปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้จากรายงานของอุษณีย์ อภิบาลแบและคณะ (2556) ศึกษาผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านที่มีปริมาณเกลือสูง เช่น บูดู ปลาจิ้งจั้ง และไตปลา โดยเก็บตัวอย่างบูดูในช่วงอายุการหมักต่างๆกัน พบว่าตัวอย่างบูดูที่หมักนาน 1 - 3 เดือนค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.26 - 5.91 ตัวอย่างบูดูที่หมักนาน 4 - 6 เดือนมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.33 - 5.77 ตัวอย่างบูดูที่หมักนาน 7 - 10 เดือนมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.24 - 5.72 และตัวอย่างผลิตภัณฑ์บูดูมีค่าความเป็นกรด-ด่างในช่วง 5.73 - 6.19 ทั้งนี้เนื่องจากบูดูเป็นอาหารหมักประเภทโปรตีนสูง และมีค่าความเข้มข้นเกลือสูง กรดอะมิโนในอาหารหมักที่เกิดจากการย่อยโปรตีนในเนื้อปลาจะทำหน้าที่เป็น buffer ได้เป็นอย่างดี จึงช่วยให้พีเอชของบูดูหลังวันที่ 60 ของการหมักค่อนข้างจะคงที่ (Adnan and Tan, 2007)



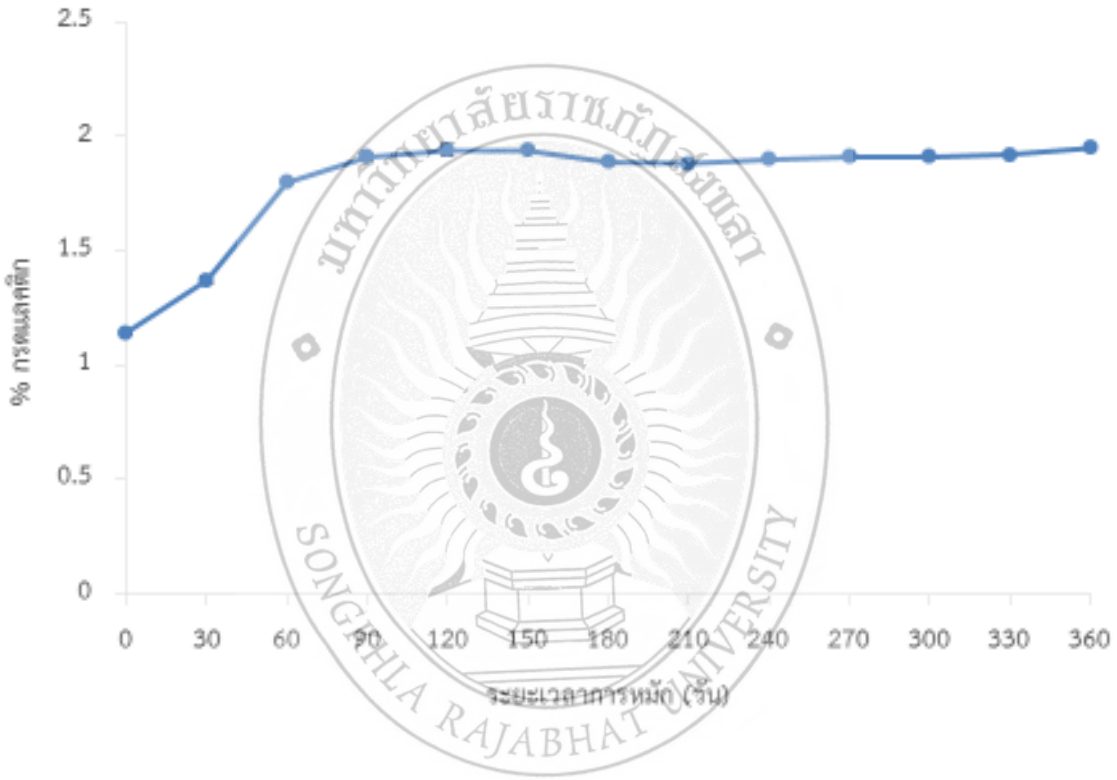
รูปที่ 10: การเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก

1.7 การหาปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบเป็นกรดแลกติก

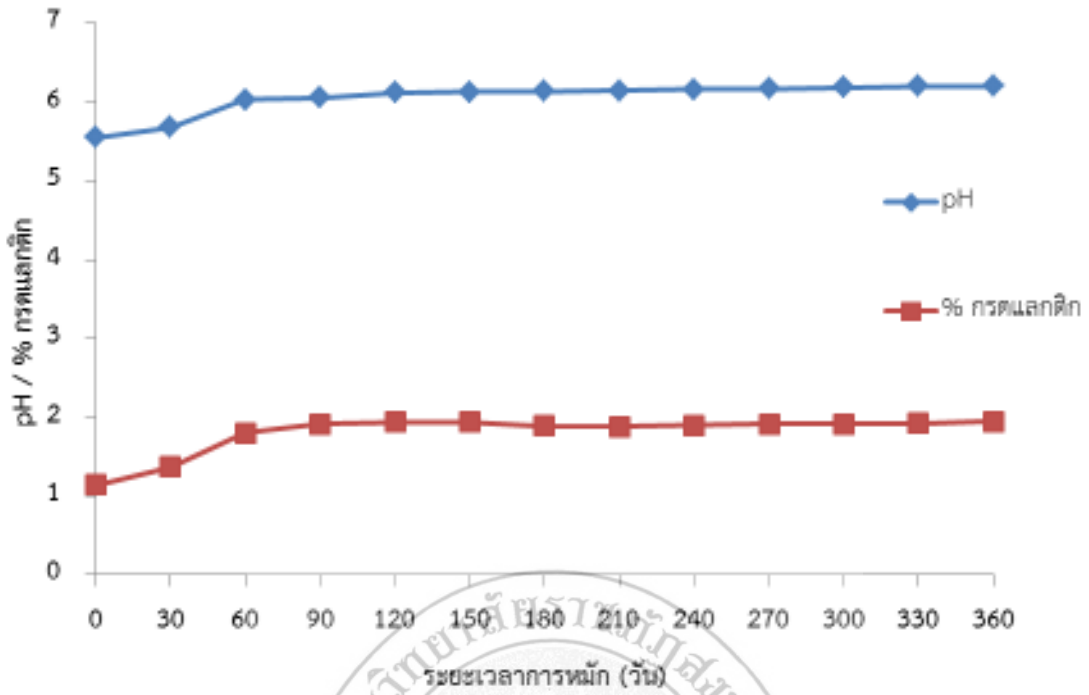
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดระหว่างการหมักน้ำบูดูตลอดระยะเวลา 360 วันหรือ 12 เดือนของการหมัก เก็บตัวอย่างทุกๆ 15 วัน แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณกรด พบว่าตลอดระยะเวลาการหมัก 360 วัน การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดอยู่ในช่วง 1.14 - 1.95 % ทั้งนี้การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 60 วันแรกของการหมัก โดยในช่วง 15 - 60 วันของการหมักมีปริมาณกรดอยู่ในช่วง 1.33 - 1.80 % หลังจากหมักบูดูเป็นระยะเวลา 60 วันเป็นต้นไป ปริมาณกรดเพิ่มขึ้นเล็กน้อยหรือค่อนข้างจะคงที่จนสิ้นสุดการหมัก (ดังแสดงในรูปที่ 11) โดยพบว่ามีปริมาณกรด 1.95 % ในวันสุดท้ายของการหมัก ซึ่งกรดแลกติกนี้ผลิตจากการเจริญของแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณแบคทีเรียแลกติกที่ตรวจพบ โดยในช่วงวันแรกจนถึงวันที่ 30 ของการหมักตรวจไม่พบแบคทีเรียกลุ่มนี้ ซึ่งแบคทีเรียแลกติกจะตรวจเจอตั้งแต่วันที่ 30 ของการหมักเป็นต้นไป โดยจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆจนกระทั่งวันที่ 360 ของการหมัก

จากการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดตลอดระยะเวลาการหมัก พบว่า ค่าความเป็นกรด-ด่างไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณกรด โดยในช่วง 60 วันแรกของการหมักปริมาณกรดเพิ่มขึ้น ในขณะเดียวกันค่าความเป็นกรด-ด่างก็เพิ่มขึ้น (ดังแสดงในรูปที่ 12) ซึ่งในทางทฤษฎีเมื่อ

กรดมีปริมาณมากขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างควรจะลดลง ทั้งนี้ในระยะแรกของการหมักเป็นบทบาทของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับตัวปลา เกลือ หรือสถานที่ที่ใช้หมัก รวมทั้งแบคทีเรียย่อยโปรตีนและแบคทีเรียย่อยไขมันเป็นหลัก ซึ่งในระยะแรกของการหมักยังตรวจไม่เจอแบคทีเรียแลกติก โดยตรวจเจอแบคทีเรียแลกติกหลังจาก 30 วันของการหมักเป็นต้นไป จึงส่งผลให้ช่วง 30 วันแรกของการหมักมีการความเป็นกรด-ด่างเพิ่มขึ้น หลังจากวันที่ 30 ของการหมักเป็นต้นไป แบคทีเรียที่ปนเปื้อนมากับตัวปลา เกลือหรือสถานที่ที่ใช้หมัก ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ทนเกลือตายไป กลุ่มที่ทนเกลือ คือ กลุ่มของแบคทีเรียแลกติกเริ่มมีบทบาทเจริญขึ้นมา ส่งผลให้ปริมาณกรดเพิ่มสูงขึ้น



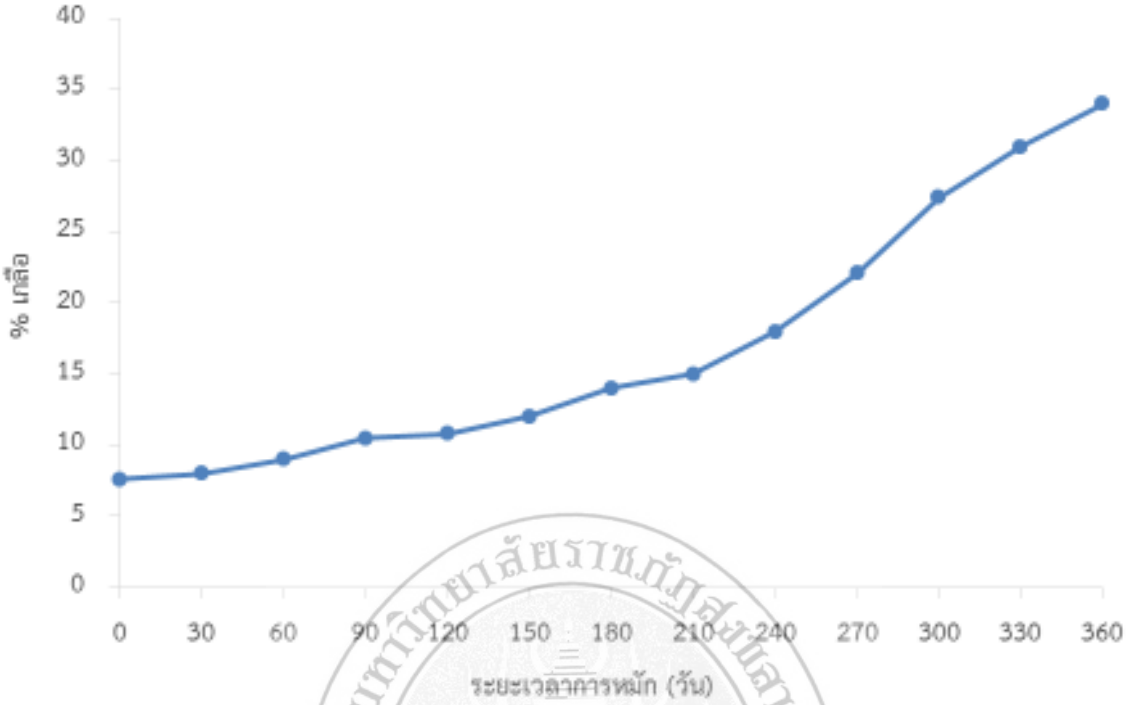
รูปที่ 11: การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดทั้งหมดในตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก



รูปที่ 12: เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณกรดตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน

1.8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณเกลือในตัวอย่างน้ำหมักบูดู

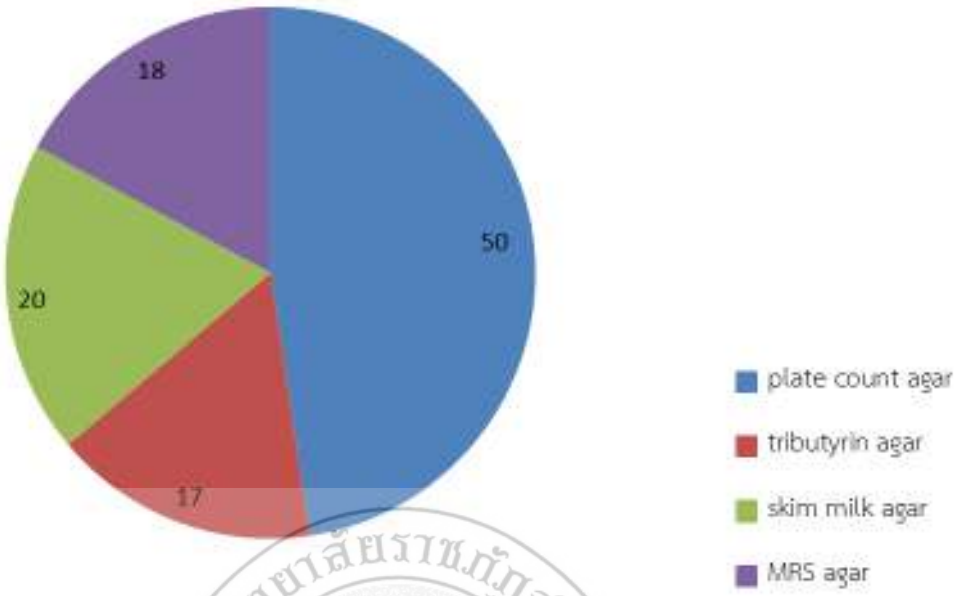
จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณเกลือระหว่างการหมักน้ำบูดูตลอดระยะเวลา 360 วันหรือ 12 เดือนของการหมัก ทำการเก็บตัวอย่างทุกๆ 15 วัน แล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณเกลือในตัวอย่างน้ำหมักบูดู พบว่าปริมาณเกลือตลอดระยะเวลาการหมัก 360 วันมีปริมาณเกลือในช่วง 7.6 - 34 % (ดังแสดงในรูปที่ 13) โดยเมื่อระยะเวลาการหมักเพิ่มขึ้นปริมาณเกลือก็จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทั้งนี้เนื่องจากการหมักบูดูใช้ระยะเวลาในการหมักค่อนข้างนาน คือ ตั้งแต่ 3 - 18 เดือน ย่อมทำให้เปอร์เซ็นต์เกลือสูงขึ้นเรื่อยๆ เพราะน้ำหมักปลาจะระเหยไป จากรายงานของอุษณี อภิบาลแบ และคณะ (2556) เก็บตัวอย่างบูดูในช่วงอายุการหมักต่างๆกัน จำนวนทั้งหมด 67 ตัวอย่าง วัดความเข้มข้น NaCl พบว่าตัวอย่างบูดูที่หมักนาน 1 - 3 เดือนมีความเข้มข้น NaCl อยู่ในช่วง 17.3 - 23.4 % ตัวอย่างบูดูที่หมักนาน 4 - 6 เดือนมีความเข้มข้น NaCl อยู่ในช่วง 21.8 - 27.1 % ตัวอย่างบูดูที่หมักนาน 7 - 10 เดือนมีความเข้มข้น NaCl อยู่ในช่วง 18.0 - 22.4 % และตัวอย่างผลิตภัณฑ์บูดูมีความเข้มข้น NaCl อยู่ในช่วง 21.2 - 26.6 % และนอกจากนี้จากรายงานของ Mohamed และคณะ (2012) ตรวจสอบบูดูทางการค้าของมาเลเซียจำนวน 4 ยี่ห้อ พบว่ามีปริมาณเกลืออยู่ในช่วง 11.80 - 22.50 % ทั้งนี้ปริมาณเกลือมีความสำคัญที่ต้องพิจารณาเนื่องจากมีผลต่อคุณภาพของบูดู เพราะบูดูที่มีเกลือความเข้มข้นสูงๆสามารถฆ่าจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (spoilage microorganisms) และจุลินทรีย์ก่อโรค (pathogenic microorganisms) ได้ ได้แก่ *Escherichai coli*, *Coliform*, *Vibrio parahaemolyticus* และ *Vibrio chloera*



รูปที่ 13: การเปลี่ยนแปลงปริมาณเกลือในตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลา 12 เดือนของการหมัก

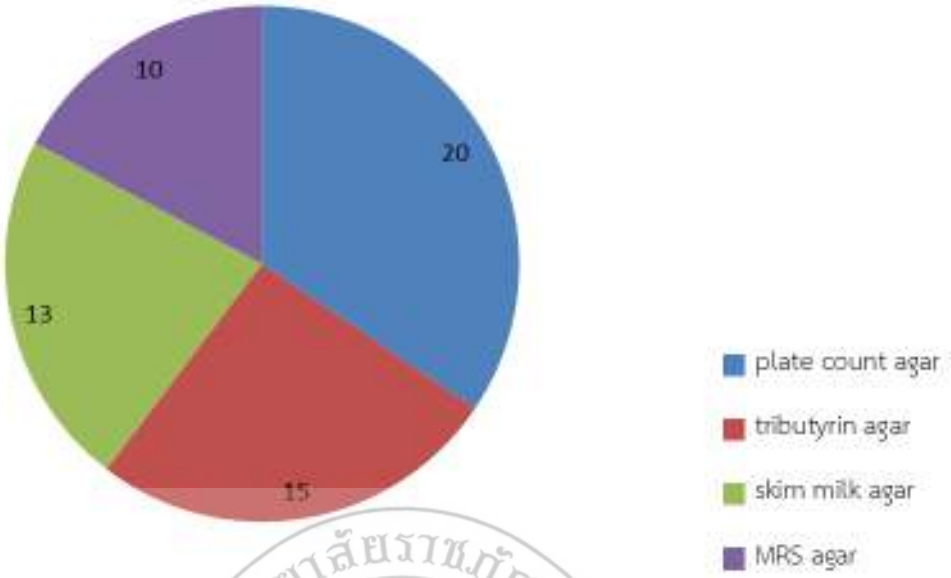
2. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อที่คัดแยกได้

จากการสุ่มเลือกเก็บเชื้อแบคทีเรียจากโคโลนีเดี่ยวๆบนจานเลี้ยงเชื้อ จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูทุกๆ 15 วันของการหมัก จนเสร็จสิ้นการหมักเป็นเวลา 12 เดือน จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาแยกให้บริสุทธิ์ แล้วนำแบคทีเรียทุกไอโซเลตมาศึกษาลักษณะต่างๆดังนี้ ลักษณะการเจริญ รูปร่าง สี และขนาดโคโลนี จากการสุ่มเลือกโคโลนีที่มีความแตกต่างกันเป็นเกณฑ์ ใน 6 เดือนแรกของการหมักสามารถรวบรวมแบคทีเรียได้ทั้งหมด 302 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากอาหาร Plate Count agar จำนวน 102 ไอโซเลต อาหาร Skim milk agar จำนวน 93 ไอโซเลต อาหาร Tributyrin agar จำนวน 70 ไอโซเลต และอาหาร MRS agar จำนวน 37 ไอโซเลต (ตารางที่ 2) เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียทั้งหมดตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์ คือ การติดสีแกรมและการจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถรวบรวมแบคทีเรียได้ทั้งหมด 105 ไอโซเลต ดังนี้ คือ แบคทีเรียทั้งหมดจากอาหาร Plate Count agar จำนวน 50 ไอโซเลต แบคทีเรียย่อยไขมันจากอาหาร Tributyrin agar จำนวน 17 ไอโซเลต แบคทีเรียย่อยโปรตีนจากอาหาร Skim milk agar จำนวน 20 ไอโซเลต และแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกจากอาหาร MRS agar จำนวน 18 ไอโซเลต (รูปที่ 14) เมื่อพิจารณารูปร่างเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกจากอาหาร tributyrin agar, skim milk agar และ MRS agar ในช่วง 6 เดือนแรกของการหมักจะพบทั้งแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อนและรูปกลมปะปนกันไป โดยจะพบแบคทีเรียรูปท่อนมากกว่ารูปกลมบนอาหาร tributyrin agar และ MRS agar ในขณะที่อาหาร skim milk agar จะพบแบคทีเรียรูปกลมมากกว่ารูปท่อน



ภาพที่ 14: จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในระยะเวลา 6 เดือน**แรก**ของการหมัก บนอาหาร plate count agar, tributyrin agar, skim milk agar และ MRS agar

ส่วนในระยะเวลา 6 เดือนหลังจนสิ้นสุดการหมัก จากการสุ่มเลือกโคโลนีที่มีความแตกต่างกันเป็นเกณฑ์ สามารถรวบรวมแบคทีเรียได้ทั้งหมด 162 ไอโซเลต ซึ่งแยกได้จากอาหาร Plate Count agar จำนวน 47 ไอโซเลต อาหาร Skim milk agar จำนวน 44 ไอโซเลต อาหาร Tributyrin agar จำนวน 42 ไอโซเลต และอาหาร MRS agar จำนวน 29 ไอโซเลต (ตารางที่ 3) เมื่อจัดจำแนกแบคทีเรียทั้งหมดตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์ คือ การติดสีแกรมและการจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถรวบรวมแบคทีเรียได้ทั้งหมด 58 ไอโซเลต ดังนี้ คือ แบคทีเรียทั้งหมดจากอาหาร Plate Count agar จำนวน 20 ไอโซเลต แบคทีเรียย่อยไขมันจากอาหาร Tributyrin agar จำนวน 15 ไอโซเลต แบคทีเรียย่อยโปรตีนจากอาหาร Skim milk agar จำนวน 13 ไอโซเลต และแบคทีเรียสร้างกรดแลกติกจากอาหาร MRS agar จำนวน 10 ไอโซเลต (รูปที่ 15) ทั้งนี้ในช่วงระยะเวลา 6 เดือนหลังจนสิ้นสุดการหมักเมื่อพิจารณารูปร่างเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกจากอาหาร tributyrin agar, skim milk agar และ MRS agar ส่วนใหญ่จะพบเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อนเป็นหลัก สุดท้ายจากการจัดจำแนกแบคทีเรียทั้งหมดตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์ตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน สามารถรวบรวมแบคทีเรียได้ทั้งหมด 163 ไอโซเลต โดยพบว่าแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทุกๆอาหารเลี้ยงเชื้อในช่วง 6 เดือนแรกของการหมักจะตรวจพบทั้งแบคทีเรียรูปร่างกลมและท่อน แต่หลังจากการหมักในช่วง 6 เดือนหลังเป็นต้นไปจนสิ้นสุดการหมัก 12 เดือน จะตรวจพบแบคทีเรียรูปท่อนเป็นหลัก



รูปที่ 15: จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในระยะเวลา 6 เดือน**หลัง**ของการหมักจนสิ้นสุดการหมัก บนอาหาร plate count agar, tributyrin agar, skim milk agar และ MRS agar

จากนั้นนำแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกได้จำนวน 163 ไอโซเลต ตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน มาศึกษาคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ เพื่อจัดจำแนกแบคทีเรียออกเป็นสกุล และลดจำนวนเชื้อให้น้อยลง โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาร่วมกับลักษณะทางชีวเคมีบางประการ ทำให้สามารถรวบรวมปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเหลือเพียง 42 ไอโซเลต โดยเป็นไอโซเลตที่แยกได้ในช่วง 6 เดือน**แรก**ของการหมักจำนวน 28 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากอาหาร Tributyrin agar จำนวน 8 ไอโซเลต (ตารางที่ 4) แบคทีเรียที่คัดเลือกจากอาหาร Skim milk agar จำนวน 9 ไอโซเลต (ตารางที่ 5) และแบคทีเรียที่คัดเลือกจากอาหาร MRS agar จำนวน 11 ไอโซเลต (ตารางที่ 6) เมื่อพิจารณารูปร่างเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดที่คัดเลือกจากอาหาร tributyrin agar และ skim milk agar ในช่วง 6 เดือน**แรก**ของการหมักจะพบทั้งแบคทีเรียแกรมบวก รูปท่อนและรูปกลม ในขณะที่แบคทีเรียสร้างกรดแลกติกที่คัดแยกจากอาหาร MRS agar จะเริ่มตรวจเจอหลังจากวันที่ 30 ของการหมักเป็นต้นไป ซึ่งในช่วงระยะเวลา 30 - 45 วันของการหมักโดยส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรียแกรมบวก รูปกลม และในช่วงระยะเวลา 45 - 180 วันของการหมักส่วนใหญ่จะเจอแบคทีเรียรูปท่อนมากกว่ารูปกลม ส่วนไอโซเลตที่แยกได้ในช่วง 6 เดือน**หลัง**ของการหมักคัดเลือกได้จำนวน 14 ไอโซเลต โดยเป็นแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากอาหาร Tributyrin agar จำนวน 4 ไอโซเลต แบคทีเรียที่คัดเลือกจากอาหาร Skim milk agar จำนวน 4 ไอโซเลต (ตารางที่ 7) และแบคทีเรียที่คัดเลือกจากอาหาร MRS agar จำนวน 6 ไอโซเลต (ตารางที่ 8) ที่แตกต่างกัน ทั้งนี้รูปร่างแบคทีเรียในช่วง 6 เดือน**หลัง**ของการหมักโดยส่วนใหญ่จะมีรูปร่างเป็นท่อนทั้งบนอาหาร tributyrin agar, skim milk agar และ MRS agar จากผลการทดลอง

อาจจะเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียที่มีบทบาทเฉพาะในช่วงแรกๆของการหมัก คือ แบคทีเรียที่รูปร่างกลม และแบคทีเรียที่มีบทบาทตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน คือ แบคทีเรียที่มีรูปร่างเป็นท่อน จากรายงานของ Adnan and Tan (2008) พบว่าการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียแลกติกในอาหารหมักในระยะแรกของการหมักส่วนใหญ่จะพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม และเมื่อหมักนานขึ้นจะพบแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อนสั้นและท่อนมากขึ้น เนื่องจากแบคทีเรียแลกติกรูปร่างกลมผลิตกรดได้เร็วแต่ทนกรดได้ไม่ค่อยดี แบคทีเรียแลกติกรูปแท่งสามารถทนกรดได้ดีกว่ารูปร่างกลม ทำให้แบคทีเรียรูปกลมลดจำนวนลง แบคทีเรียรูปแท่งจะเพิ่มขึ้นมาแทนเมื่อระยะเวลาการหมักนานขึ้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 2: จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือน**แรก**ของการหมัก

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	จำนวนไอโซเลต				
	Plate Count Agar	Skim milk Agar	Tributyrin Agar	MRS Agar	Macconkey Agar
15	15	13	12	0	0
30	12	12	10	0	0
45	12	11	8	5	0
60	12	10	7	5	0
75	10	9	7	4	0
90	10	9	5	4	0
105	8	8	4	4	0
120	7	5	4	3	0
135	5	5	4	3	0
150	4	4	3	3	0
165	4	4	3	3	0
180	3	3	3	3	0
รวม	102	93	70	37	0
	302				

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 3: จำนวนไอโซเลตของแบคทีเรียทั้งหมดที่คัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือน**หลัง**ของการหมัก

ระยะเวลาการหมัก (วัน)	จำนวนไอโซเลต				
	Plate Count Agar	Skim milk Agar	Tributyrin Agar	MRS Agar	Macconkey Agar
195	5	4	3	3	0
210	5	4	3	3	0
225	5	4	3	3	0
240	5	4	3	3	0
255	4	4	3	3	0
270	4	4	3	2	0
285	4	4	3	2	0
300	3	4	3	2	0
315	3	3	4	2	0
330	3	3	5	2	0
345	3	3	5	2	0
360	3	3	4	2	0
รวม	47	44	42	29	0
			162		

ตารางที่ 4: เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร Tributyrin agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือน**แรก**ของการหมัก

	Tr02A	Tr15B	Tr08C	Tr12D	Tr02F	Tr03G	Tr21H	Tr05I
รูปร่าง	ท่อน	กลม	ท่อน	ท่อน	ท่อน	กลม	ท่อน	กลม
สีของโคโลนี	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองอ่อน	สีขาวขุ่น	สีเหลืองอ่อน	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น
การติดสีแกรม	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
การสร้างสปอร์	สร้าง	ไม่สร้าง	สร้าง	สร้าง	สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
Mannital	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Xylose	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Arabinose	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Motility	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Imdole	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Lysine	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
MR	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
VP	ลบ	บวก	ลบ	ลบ	ลบ	บวก	บวก	บวก
Catalase	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก

ตารางที่ 5: เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร Skim milk agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือน**แรก**ของหมัก

	Sk01A	Sk08B	Sk06C	Sk12D	Sk09F	Sk03G	Sk10H	Sk05I	Sk04J
รูปร่าง	ท่อน	กลม	กลม	ท่อน	กลม	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน
สีของโคโลนี	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองอ่อน	สีขาวขุ่น	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองอ่อน	สีชมพู	สีเหลืองอ่อน
การติดสีแกรม	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
การสร้างสปอร์	สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	สร้าง	ไม่สร้าง	สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
Mannital	ลบ	บวก	บวก	ลบ	บวก	บวก	ลบ	บวก	บวก
Xylose	บวก	ลบ	ลบ	บวก	ลบ	บวก	บวก	บวก	บวก
Arabinose	บวก	ลบ	ลบ	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Motility	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Imdole	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ
Lysine	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
MR	บวก	ลบ	ลบ	บวก	ลบ	บวก	บวก	ลบ	ลบ
VP	ลบ	บวก	บวก	ลบ	บวก	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ
Catalase	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก

ตารางที่ 6: เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร MRS agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือน**แรก**ของหมัก

	Lac01C	Lac02C	Lac03C	Lac04D	Lac05D	Lac06D	Lac07D	Lac10D	Lac19F	Lac31G	Lac34G
รูปร่าง	กลม	กลม	กลม	ท่อน	กลม	ท่อน	กลม	ท่อน	ท่อน	ท่อน	กลม
สีของโคโลนี	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น
การติดสีแกรม	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
fermentation	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	สร้างก๊าซ	ไม่สร้าง	สร้างก๊าซ	ไม่สร้าง	สร้างก๊าซ	สร้างก๊าซ	สร้างก๊าซ	สร้างก๊าซ
Catalase	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ
Fructose	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	ลบ	บวก
Lactose	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ
Sucrose	บวก	บวก	ลบ	บวก	บวก	บวก	บวก	ลบ	บวก	บวก	บวก
Glucose	บวก	บวก	ลบ	บวก	บวก	บวก	บวก	ลบ	บวก	บวก	บวก
Xylose	ลบ	ลบ	บวก	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	บวก	บวก	ลบ	ลบ

ตารางที่ 7: เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร tributyrin agar และ skim milk agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือน**<u>หลัง</u>**ของการหมักจนสิ้นสุดการหมัก

	Tr02M	Tr01Q	Tr01T	Tr02X	Sk03P	Sk03V	Sk01W	Sk02X
รูปร่าง	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	กลม
สีของโคโลนี	สีขาวขุ่น	สีเหลืองอ่อน	สีเหลืองอ่อน	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีชมพู	สีเหลืองอ่อน
การติดสีแกรม	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
การสร้างสปอร์	สร้าง	สร้าง	สร้าง	ไม่สร้าง	สร้าง	สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง
Mannital	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Xylose	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	ลบ	บวก	บวก
Arabinose	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Motility	บวก	ลบ	ลบ	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Imdole	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	ลบ	บวก	ลบ
Lysine	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
MR	บวก	บวก	บวก	บวก	ลบ	ลบ	ลบ	บวก
VP	บวก	ลบ	ลบ	บวก	ลบ	บวก	ลบ	ลบ
Catalase	ลบ	บวก	บวก	ลบ	บวก	บวก	บวก	บวก

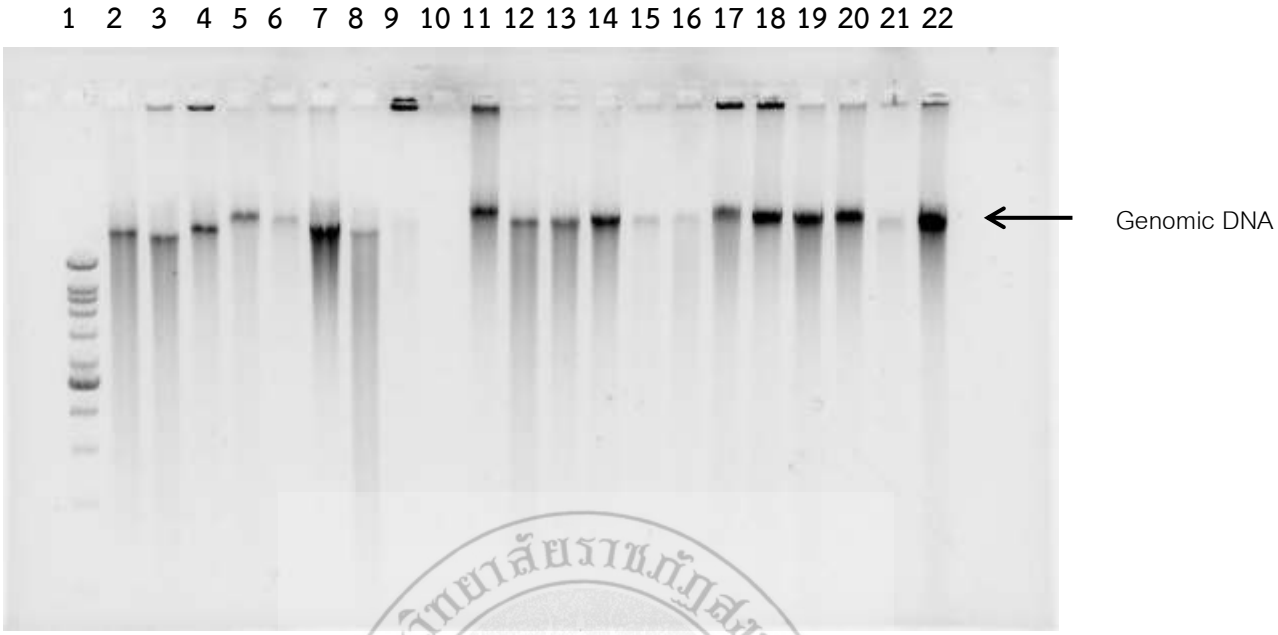
ตารางที่ 8: เปรียบเทียบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียที่คัดเลือกบนอาหาร MRS agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูในช่วง 6 เดือน**หลัง**ของการหมักจนสิ้นสุดการหมัก

	Lac02M	Lac02P	Lac02T	Lac01U	Lac01V	Lac02W
รูปร่าง	ท่อน	ท่อน	ท่อน	ท่อน	กลม	ท่อน
สีของโคโลนี	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น
การติดสีแกรม	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Fermentation	สร้างก๊าซ	สร้างก๊าซ	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	ไม่สร้าง	สร้าง
Catalase	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ
Fructose	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Lactose	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ	ลบ
Sucrose	ลบ	บวก	บวก	บวก	ลบ	บวก
Glucose	ลบ	บวก	บวก	บวก	บวก	บวก
Xylose	บวก	บวก	ลบ	ลบ	ลบ	บวก

3. การสกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของเชื้อที่คัดแยกได้ สามารถรวบรวมเชื้อได้ทั้งหมด 42 ไอโซเลต จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดมาสกัดดีเอ็นเอ โดยทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่แยกได้โดยใช้ Genomic DNA Mini Kit (TIANamp Bacteria DNA Kit) ซึ่งแสดงในรูปที่ 16 และ 17 เพื่อนำ genomic DNA ที่สกัดได้มาใช้เป็นดีเอ็นเอแม่แบบสำหรับการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR ในขั้นตอนต่อไป

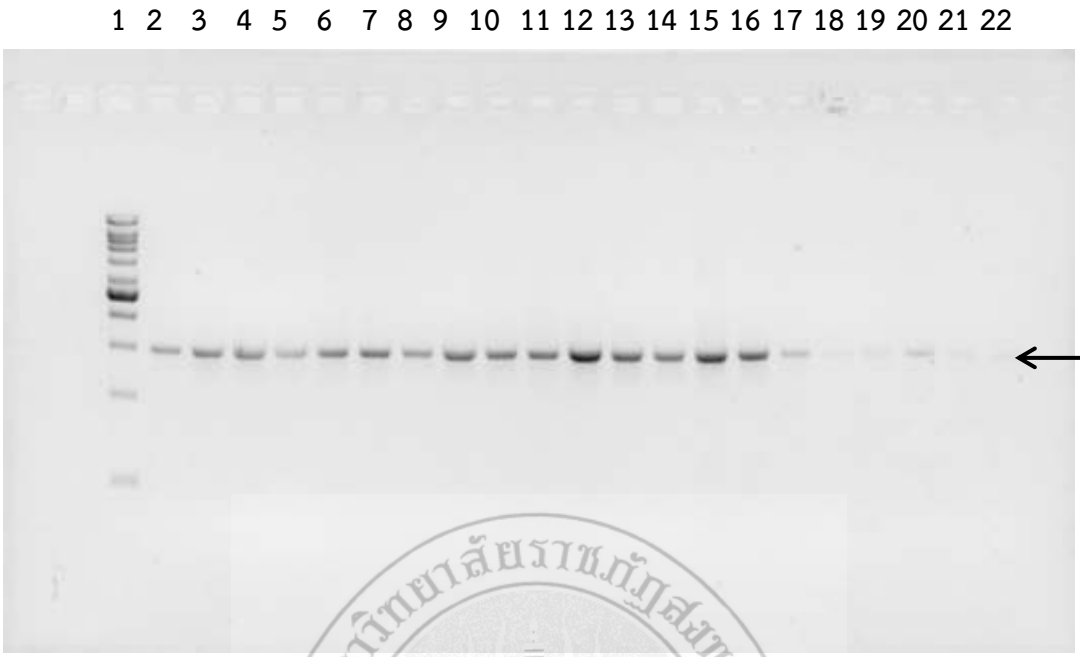
รูปที่ 16: genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน lane 1: marker 1 kb, lane 2: isolate Tr02A, lane 3: isolate Tr15B, lane 4: Tr08C, lane 5: Tr12D, lane 6: Tr02F, lane 7: Tr03G, lane 8: Tr21H, lane 9: Tr05I, lane 10: Tr02M, lane 11: Tr01Q, lane 12: Tr01T, lane 13: Tr02X, lane 14: Sk01A, lane 15: Sk08B, lane 16: Sk06C, lane 17: Sk12D, lane 18: Sk09F, lane 19: Sk03G, lane 20: Sk10H, lane 21: Sk05I, lane 22: isolate Sk04J



รูปที่ 17: genomic DNA ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน lane 1: marker 1 kb, lane 2: isolate Sk03P, lane 3: isolate Sk03V, lane 4: isolate Sk01W, lane 5: isolate Sk02Y, lane 6: isolate Lac01C, lane 7: isolate Lac02C, lane 8: isolate Lac03C, lane 9: isolate Lac04D, lane 10: isolate Lac05D, lane 11: isolate Lac06D, lane 12: isolate Lac07D, lane 13: isolate Lac10D, lane 14: isolate Lac19F, lane 15: isolate Lac31G, lane 16: isolate Lac34G, lane 17: isolate Lac02M, lane 18: isolate Lac02P, lane 19: isolate Lac02T, lane 20: isolate Lac01U, lane 21: isolate Lac01V, lane 22: isolate Lac02W

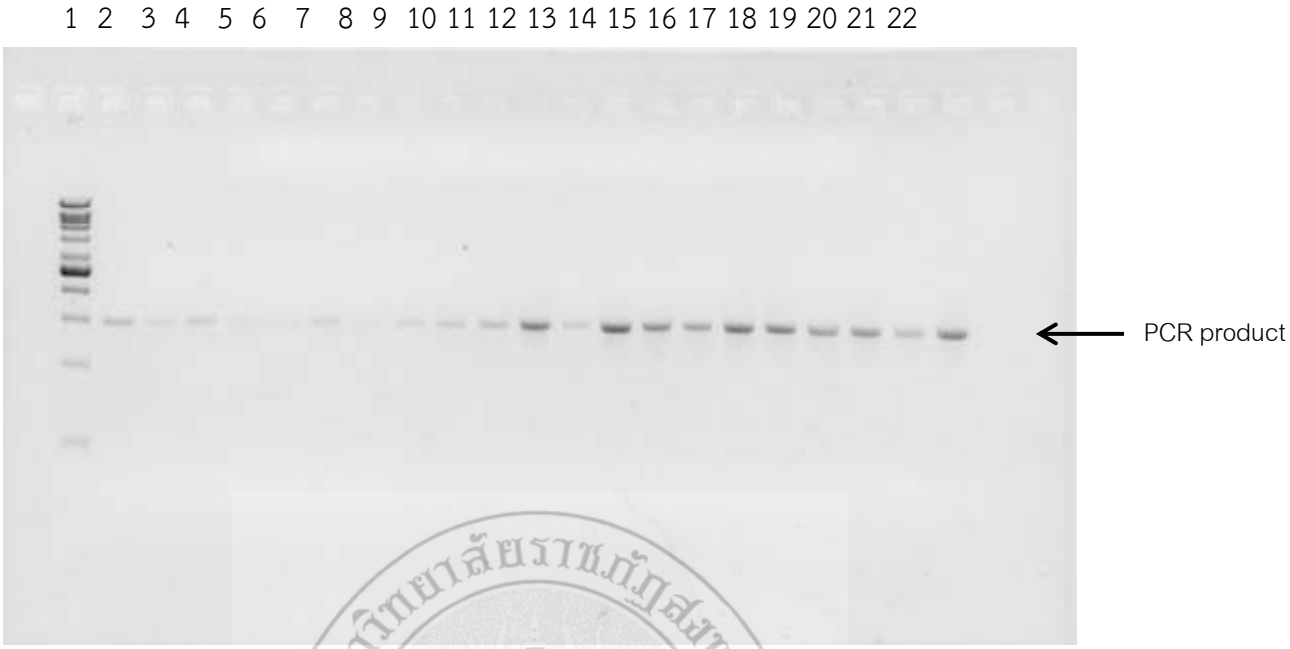
4. การเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR

ภายหลังจากการสกัดดีเอ็นเอจากเชื้อแบคทีเรียที่ได้จากการเก็บเชื้อแบบสุ่มจากตัวอย่างน้ำหมักบูดูทั้ง 42 ไอโซเลต แล้วทำการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอด้วยเทคนิค PCR โดยการ amplify ในส่วนของยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์ 27F และ 1492R พบว่าผลผลิตดีเอ็นเอหรือ PCR product ของแบคทีเรียที่ได้มีขนาดประมาณ 1,500 bp (รูปที่ 18 และ 19) ไพรเมอร์ที่ใช้ในการเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอทั้งสองชุดนี้เป็น universal primer ทั้งนี้ PCR product ที่เกิดขึ้นนี้จะถูกนำไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยเครื่อง DNA sequencer เพื่อบ่งบอกว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ใดต่อไป



รูปที่ 18: PCR product ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน lane 1: marker 1 kb, lane 2: isolate Tr02A, lane 3: isolate Tr15B, lane 4: Tr08C, lane 5: Tr12D, lane 6: Tr02F, lane 7: Tr03G, lane 8: Tr21H, lane 9: Tr05I, lane 10: Tr02M, lane 11: Tr01Q, lane 12: Tr01T, lane 13: Tr02X, lane 14: Sk01A, lane 15: Sk08B, lane 16: Sk06C, lane 17: Sk12D, lane 18: Sk09F, lane 19: Sk03G, lane 20: Sk10H, lane 21: Sk05I, lane 22: Sk04J

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY



รูปที่ 19: PCR product ของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้งหมดจากตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน lane 1: marker 1 kb, lane 2: isolate Sk03P, lane 3: isolate Sk03V, lane 4: isolate Sk01W, lane 5: isolate Sk02Y, lane 6: isolate Lac01C, lane 7: isolate Lac02C, lane 8: isolate Lac03C, lane 9: isolate Lac04D, lane 10: isolate Lac05D, lane 11: isolate Lac06D, lane 12: isolate Lac07D, lane 13: isolate Lac10D, lane 14: isolate Lac19F, lane 15: isolate Lac31G, lane 16: isolate Lac34G, lane 17: isolate Lac02M, lane 18: isolate Lac02P, lane 19: isolate Lac02T, lane 20: isolate Lac01U, lane 21: isolate Lac01V, lane 22: isolate Lac02W

5. การเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดแยกได้

จากการนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากทั้งหมด 42 ไอโซเลต มาศึกษาเพื่อเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA โดยเลี้ยงเชื้อในอาหาร NB ที่อุณหภูมิห้อง (30±3°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ Genomic DNA Mini Kit (TIANamp Bacteria DNA Kit) เพิ่มปริมาณของชิ้นส่วนยีนบริเวณ 16S rRNA โดยวิธี polymerase chain reaction (PCR) โดยใช้ Universal primers ในช่วง 27F และ 1492R แล้วทำบริสุทธิ์ชิ้นส่วนยีนที่เพิ่มจำนวนแล้วด้วย PCR purification kits (QIAGEN, Inc.) ตามวิธีการของบริษัท จากนั้นนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่ผ่านการทำบริสุทธิ์ไปวิเคราะห์ด้วย gel electrophoresis จากนั้นนำไปหาลำดับเบสด้วยเครื่อง DNA sequencer แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับเบสในฐานข้อมูลของ GenBank (http://www. ncbi. nlm. nih. gov) โดยใช้โปรแกรม BLAST (http://www. ncbi. nlm.nim.gov) และดำเนินการขอ accession number จากการฝากข้อมูลลำดับ 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 42 สายพันธุ์ไว้ใน GenBank นำข้อมูลที่ได้มาสร้างแผนภูมิต้นไม้วงศ์

วานวิวัฒนาการ (phylogenetic tree) ผลของการเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank (ตารางที่ 9) และแผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 42 สายพันธุ์กับเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank ดังแสดงในรูปที่ 20 พบว่าจีนัสของเชื้อแบคทีเรียที่จำแนกได้ในการศึกษาครั้งนี้โดยส่วนใหญ่ คือ *Bacillus* รองลงมา คือ *staphylococcus* โดยพบแบคทีเรีย *Bacillus* จำนวน 28 สายพันธุ์ ในจีนัสนี้ตรวจพบสปีชีส์ *B. cereus* จำนวน 9 สายพันธุ์, *B. amyloliquefaciens* จำนวน 5 สายพันธุ์, *B. subtilis* จำนวน 5 สายพันธุ์, *B. methylotrophicus* จำนวน 4 สายพันธุ์, *B. anthracis* จำนวน 2 สายพันธุ์, *B. pseudomycoides* 1 สายพันธุ์, *B. thuringiensis* จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *B. fusiformis* 1 สายพันธุ์ พบแบคทีเรีย *Staphylococcus* จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยในจีนัสนี้ตรวจพบสปีชีส์ *S. cohnii* 5 สายพันธุ์, *S. xylosus* 1 สายพันธุ์, *S. sciuri* 1 สายพันธุ์ และ *S. arlettae* 1 สายพันธุ์ และนอกจากนี้ยังเจอแบคทีเรีย *Oceanobacillus* 2 สายพันธุ์ คือ สปีชีส์ *O. sojae* 1 สายพันธุ์ และ *O. iheyensis* 1 สายพันธุ์, *Enterococcus* 2 สายพันธุ์ คือ สปีชีส์ *E. faecalis* 1 สายพันธุ์ และ *E. pseudoavium* 1 สายพันธุ์, และยังตรวจพบ *Enterobacter cloacae* 1 สายพันธุ์ และ *Acinetobacter baumannii* อีก 1 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 9 จากแบคทีเรียทั้งหมดที่จัดจำแนกจะพบว่าตลอดระยะเวลาการหมักบูดู 12 เดือนจะตรวจเจอแบคทีเรียจีนัส *Bacillus* ตลอดระยะเวลาการหมักทั้ง 12 เดือน ส่วนแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* และจีนัสอื่นๆ โดยส่วนใหญ่จะตรวจเจอในช่วง 6 เดือนแรกของการหมักบูดู โดยทั้งแบคทีเรียจีนัส *Staphylococcus* และ *Bacillus* จะเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดระเหยได้ (volatile acid) เช่น คีโตน และแอลดีไฮด์ ซึ่งมีผลต่อการสร้างกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์ (Saisithi และคณะ, 1966 อ้างถึงโดย Udomsil, 2008) ทั้งนี้ผลการทดลองสอดคล้องกับรายงานของ Chihara และคณะ (2002) ซึ่งตรวจเจอแบคทีเรีย *Bacillus* จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *B. lichenniformis, B. cereus, B. megaterium, B. pumilis* และ *B. subtilis* และตรวจเจอแบคทีเรีย *Staphylococcus* 2 สายพันธุ์ คือ *S. xylosus* และ *S. cohnii* ในตัวอย่างบูดูของมาเลเซีย นอกจากนี้จากรายงานของ วรรณา ชูฤทธิ์และคณะ (2541) จัดจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้จากบูดูที่หมักกลางแจ้งนาน 200 วัน พบแบคทีเรียสายพันธุ์ *Staphylococcus* 98 สายพันธุ์ และ *Bacillus* 1 สายพันธุ์เท่านั้น ทั้งนี้จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่ตรวจเจอจะขึ้นอยู่กับวิธีการคัดเลือกเชื้อ ซึ่งจะจำกัดสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ที่จะเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Giorgia, 2004) จุลินทรีย์ที่มีบทบาทในผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีเกลือสูงนอกเหนือจากบูดู เช่น น้ำปลา พบว่าแบคทีเรียตัวเด่นๆที่แยกได้จากน้ำปลา คือ กลุ่มของแบคทีเรียชอบเกลือ (halophilic bacteria) และกลุ่มแบคทีเรียทนเกลือ (halotolerant bacteria) โดยแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับการหมักน้ำปลาแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ แบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์ย่อยโปรตีน (proteolytic bacteria) ได้แก่ *Bacillus* sp., *Pseudomonas* sp., *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., *Halococcus* sp. และ *Halobacterium* sp. เป็นต้น และแบคทีเรียที่สร้างกลิ่นรส ได้แก่ *Staphylococcus* sp. และ *pediococcus* sp. เป็นต้น (Zaman และคณะ, 2009)

ตารางที่ 9: แสดงผลการเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ทั้งหมด 42 สายพันธุ์

Isolates no.	**Strain code**	**16S rRNA gene sequence** Nearest relative in GenBank	**Sequence identity (%)**
1	Tr02A	*Bacillus amyloliquefaciens* DYJK6-1 (HQ843837)	99
2	Tr15B	*Staphylococcus cohnii* M1E8 (JX501706)	99
3	Tr08C	*Bacillus cereus* BFE 5400 (GU2504442)	98
4	Tr12D	*Bacillus cereus* Z2 (GU201872)	97
5	Tr02F	*Bacillus fusiformis* p227 (AM062692)	99
7	Tr03G	*Staphylococcus xylosus* LN29 (KC790245)	99
8	Tr21H	*Bacillus subtilis* IBFCBF-1 (KX467568)	99
10	Tr05I	*Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* CK27 (NR037046)	99
12	Tr02M	*Bacillus methylotrophicus* zzx25 (KJ009400)	99
13	Tr01Q	*Bacillus subtilis* S12 (KU206485)	99
15	Tr01T	*Oceanobacillus sojae* (LK021110)	99
16	Tr02X	*Bacillus cereus* BA6-7 (FJ696631)	97
18	Sk01A	*Bacillus subtilis* U1PB1 (JQ308580)	99
19	Sk08B	*Enterobacter cloacea* T137 (KC764978)	99
20	Sk06C	*Staphylococcus sciuri* ISB2 (KJ507203)	99
23	Sk12D	*Bacillus cereus* 770 (EU430093)	98
24	Sk09F	*Staphylococcus cohnii* DRLL14 (KU550180)	100
26	Sk03G	*Bacillus cereus* (AB996598)	98

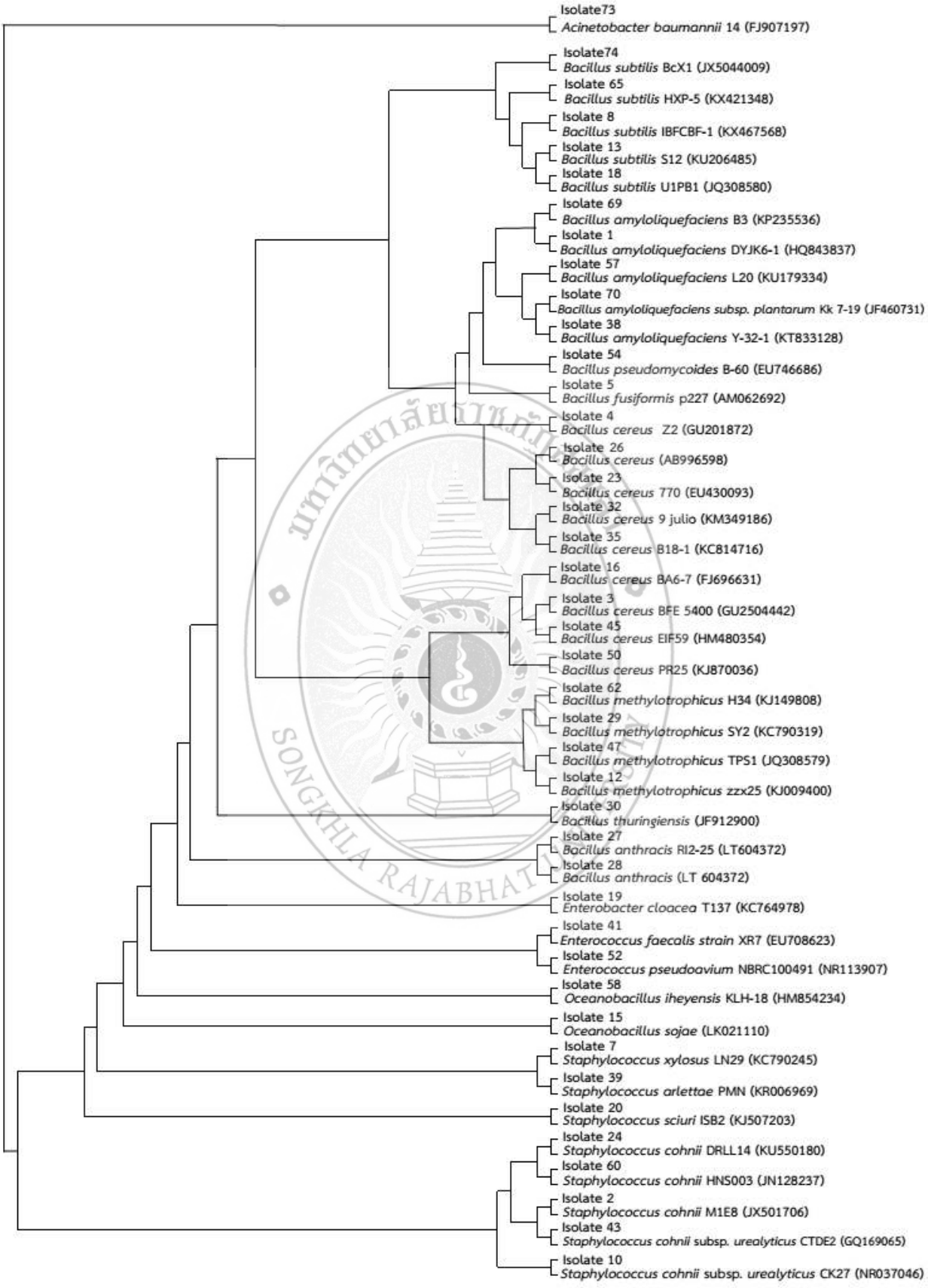
ตารางที่ 9 (ต่อ): แสดงผลการเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ทั้งหมด 42 สายพันธุ์

Isolates no.	Strain code	16S rRNA gene sequence Nearest relative in GenBank	Sequence identity (%)
27	Sk10H	*Bacillus anthracis* RI2-25 (LT604372)	98
28	Sk05I	*Bacillus anthracis* (LT 604372)	99
29	Sk04J	*Bacillus methylotrophicus* SY2 (KC790319)	99
30	Sk03P	*Bacillus thuringiensis* (JF912900)	97
32	Sk03V	*Bacillus cereus* 9 julio (KM349186)	99
35	Sk01W	*Bacillus cereus* B18-1 (KC814716)	98
38	Sk02X	*Bacillus amyloliquefaciens* Y-32-1 (KT833128)	99
39	Lac01C	*Staphylococcus arlettae* PMN (KR006969)	99
41	Lac02C	*Enterococcus faecalis* strain XR7 (EU708623)	99
43	Lac03C	*Staphylococcus cohnii* subsp. *urealyticus* CTDE2 (GQ169065)	100
45	Lac04D	*Bacillus cereus* EIF59 (HM480354)	98
47	Lac05D	*Bacillus methylotrophicus* TPS1 (JQ308579)	99
50	Lac06D	*Bacillus cereus* PR25 (KJ870036)	99
52	Lac07D	*Enterococcus pseudoavium* NBRC100491 (NR113907)	99
54	Lac10D	*Bacillus pseudomycoides* B-60 (EU746686)	98
57	Lac19F	*Bacillus amyloliquefaciens* L20 (KU179334)	99
58	Lac31G	*Oceanobacillus iheyensis* KLH-18 (HM854234)	99
60	Lac34G	*Staphylococcus cohnii* HNS003 (JN128237)	94

ตารางที่ 9 (ต่อ): แสดงผลการเทียบเคียงสายพันธุ์โดยการวิเคราะห์ลำดับเบสของชิ้นส่วนยีน 16S rRNA เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank ทั้งหมด 42 สายพันธุ์

Isolates No.	Strain code	16S rRNA gene sequence Nearest relative in GenBank	Sequence identity (%)
62	Lac02M	*Bacillus methylotrophicus* H34 (KJ149808)	99
65	Lac02P	*Bacillus subtilis* HXP-5 (KX421348)	99
69	Lac02T	*Bacillus amyloliquefaciens* B3 (KP235536)	99
70	Lac01U	*Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* Kk 7-19 (JF460731)	99
73	Lac01V	*Acinetobacter baumannii* 14 (FJ907197)	99
74	Lac02W	*Bacillus subtilis* BcX1 (JX5044009)	99

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY



รูปที่ 20: แผนภูมิต้นไม้วงศ์วานวิวัฒนาการของเชื้อทั้ง 42 สายพันธุ์กับเชื้อแบคทีเรียที่ใกล้เคียงที่สุดจากฐานข้อมูลใน GenBank

บทที่ 5
บทสรุปและข้อเสนอแนะ

บทสรุป

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางเคมีและการการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียโดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อตลอดระยะเวลาการหมักบูดู 360 วัน (12 เดือน) โดยใช้อัตราส่วนปลาต่อเกลือเท่ากับ 3:1 โดยน้ำหนัก ทำการเก็บตัวอย่างน้ำหมักบูดูทุกๆ 15 วันของการหมัก พบว่า

การศึกษาคุณสมบัติทางเคมี (ค่าความเป็นกรด-ด่าง, ปริมาณกรดแลกติก และปริมาณเกลือ) พบว่าบูดูมีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 5.55 - 6.20, ปริมาณกรดแลกติกอยู่ในช่วง 1.14 - 1.95 % ส่วนปริมาณเกลือ (NaCl) อยู่ในช่วง 7.6 - 34.0 %

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียซึ่งมีการศึกษาทั้งปริมาณแบคทีเรียทั้งหมด, แบคทีเรียย่อยโปรตีน, แบคทีเรียย่อยไขมัน, แบคทีเรียแลกติก และ Enterobacteriaceae โดยการคัดแยกบนอาหาร Plate count agar, Skim milk agar, Tributyrin agar, MRS agar และ MacConkey agar ตามลำดับ ซึ่งทำการคัดแยกบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15% พบว่าในระยะแรกของการหมักจะมีการเจริญของแบคทีเรียมากที่สุด และปริมาณแบคทีเรียจะลดลงเรื่อยๆจนถึงช่วงสุดท้ายของการหมัก สามารถตรวจพบปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดอยู่ในช่วง log 5.98 - log 3.80 CFU/ml และ log 5.74 - log 3.86 CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียย่อยโปรตีนอยู่ในช่วง log 4.98 - log 3.58 CFU/ml และ log 4.63 - log 3.15 CFU/ml ปริมาณแบคทีเรียย่อยไขมันอยู่ในช่วง log 5.03 - log 3.15 CFU/ml และ log 5.58 - log 3.13 CFU/ml บนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 10 และ 15% ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียแลกติกสามารถคัดแยกได้บนอาหารที่มีเกลือความเข้มข้น 5% เท่านั้น โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรียแลกติกอยู่ในช่วง log 1.74 - log 2.95 CFU/ml อย่างไรก็ตามตรวจพบ Enterobacteriaceae เฉพาะในช่วง 7 วันแรกของการหมักเท่านั้น

จากการสุ่มเลือกโคโลนีและจัดจำแนกแบคทีเรียทั้งหมดตามคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกันเป็นเกณฑ์ คือ การติดสีแกรมและการจัดเรียงตัวภายใต้กล้องจุลทรรศน์จากตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน สามารถรวบรวมแบคทีเรียได้ทั้งหมด 163 ไอโซเลต จากนั้นจัดจำแนกแบคทีเรียออกเป็นสกุลและลดจำนวนเชื้อให้น้อยลงโดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาร่วมกับคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ สามารถรวบรวมเชื้อแบคทีเรียเหลือเพียง 42 ไอโซเลต ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่มีบทบาทในช่วง 6 เดือนแรกของการหมักมีทั้งแบคทีเรียแกรมบวกรูปกลมและรูปท่อน ในขณะที่แบคทีเรียที่มีบทบาทในช่วง 6 เดือนหลังจนสิ้นสุดการหมักโดยส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปท่อน

เมื่อทำการเทียบเคียงสายพันธุ์แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ทั้ง 42 ไอโซเลต โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ของชิ้นส่วนยีน 16s rRNA พบว่าส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* รองลงมา คือ *staphylococcus* โดยพบแบคทีเรีย *Bacillus* จำนวน 28 สายพันธุ์ ในสกุลนี้ตรวจพบสปีชีส์ *B. cereus* จำนวน 9 สายพันธุ์, *B. amyloliquefaciens* จำนวน 5 สายพันธุ์, *B. subtilis* จำนวน 5 สายพันธุ์, *B. methylotrophicus* จำนวน 4 สายพันธุ์, *B. anthracis* จำนวน 2 สายพันธุ์, *B. pseudomycoides*

1 สายพันธุ์, *B. thuringiensis* จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *B. fusiformis* 1 สายพันธุ์ พบแบคทีเรีย *Staphylococcus* จำนวน 8 สายพันธุ์ โดยในสกุลนี้ตรวจพบสปีชีส์ *S. cohnii* 5 สายพันธุ์, *S. xylosus* 1 สายพันธุ์, *S. sciuri* 1 สายพันธุ์ และ *S. arlettae* 1 สายพันธุ์ และนอกจากนี้ยังเจอแบคทีเรีย *Oceanobacillus* 2 สายพันธุ์ คือ สปีชีส์ *O. sojae* 1 สายพันธุ์ และ *O. iheyensis* 1 สายพันธุ์, *Enterococcus* 2 สายพันธุ์ คือ สปีชีส์ *E. faecalis* 1 สายพันธุ์ และ *E. pseudoavium* 1 สายพันธุ์, และยังตรวจพบ *Enterobacter cloacae* 1 สายพันธุ์ และ *Acinetobacter baumannii* อีก 1 สายพันธุ์ ทั้งนี้พบว่าตรวจเจอแบคทีเรียสกุล *Bacillus* ตลอดระยะเวลาการหมักบูดู 12 เดือน ส่วนแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* และสกุลอื่นๆ โดยส่วนใหญ่จะตรวจเจอในช่วง 6 เดือนแรกของการหมักบูดู

ข้อเสนอแนะ

1. บูดูเป็นผลิตภัณฑ์อาหารหมักที่มีปริมาณเกลือสูง ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณความเข้มข้นเกลือที่ใช้การการคัดแยกมีผลต่อการเจริญโดยเฉพาะกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก

2. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นการสุ่มเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแล้วนำมาทำการเทียบเคียงสายพันธุ์ ซึ่งอาจจะสุ่มไม่ได้เชื้อบางสายพันธุ์ที่มีลักษณะคล้ายหรือเหมือนกันบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
สูตรอาหารและวิธีการเตรียมอาหาร

1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกเชื้อแบคทีเรีย ประกอบไปด้วย

1.1 อาหาร Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15	กรัม

การเตรียมอาหาร plate count agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ชั่งอาหาร plate count agar 10.10 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 430 มิลลิลิตร และชั่งเกลือบริสุทธิ์ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ ละลายอาหารให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อ

1.2 อาหาร Skim milk agar

Agar	20	กรัม
Sodium citrate	3	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Vitamin-assay casamino acid	7.5	กรัม
Skim milk	8	กรัม
NaCl	250	กรัม
KCl	2	กรัม
$MgSO_4$ $7H_2O$	20	กรัม
$FeSO_4$ $7H_2O$	0.05	กรัม

การเตรียมอาหาร Skim milk agar ในน้ำ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ชั่งอาหาร Skim milk agar 2.15 g ละลายในกลั่นปริมาตร 215 มิลลิลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และ ชั่ง Nutrient agar 6.02 g และชั่งเกลือบริสุทธิ์ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 215 มิลลิลิตรละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อนำอาหาร Skim milk agar และ Nutrient agar มาผสมให้เข้ากัน เพื่อป้องกันวุ้นแข็งและทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อ

1.3 อาหาร Plate Count Agar (PCA)

Tryptone	5.0	กรัม
Yeast extract	2.5	กรัม
Glucose	1.0	กรัม
Agar	15	กรัม

การเตรียมอาหาร plate count agar ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ชั่งอาหาร plate count agar 10.10 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 430 มิลลิลิตร และชั่งเกลือบริสุทธิ์ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ ละลายอาหารให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อ

1.4 อาหาร Skim milk agar

Agar	20	กรัม
Sodium citrate	3	กรัม
Yeast extract	10	กรัม
Vitamin-assay casamino acid	7.5	กรัม
Skim milk	8	กรัม
NaCl	250	กรัม
KCl	2	กรัม
$MgSO_4$ $7H_2O$	20	กรัม
$FeSO_4$ $7H_2O$	0.05	กรัม

การเตรียมอาหาร Skim milk agar ในน้ำ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ชั่งอาหาร Skim milk agar 2.15 g ละลายในกลั่นปริมาตร 215 มิลลิลิตร ผสมอาหารให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 5 นาที และ ชั่ง Nutrient agar 6.02 g และชั่งเกลือบริสุทธิ์ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 215 มิลลิลิตรละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที หลังจากฆ่าเชื้อนำอาหาร Skim milk agar และ Nutrient agar มาผสมให้เข้ากัน เพื่อป้องกันวุ้นแข็งและทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อ

1.5 อาหาร Tributyrin agar

Peptone	5	กรัม
Yeast extract	3	กรัม
Tributyrin (glycerol tributyrate)	10	กรัม
Agar	15	กรัม

การเตรียมอาหาร Tributyrin agar ในน้ำ ปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ชั่งอาหาร Tributyrin agar 9.98 g และชั่งเกลือบริสุทธิ์ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 430 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน หลังจากนั้นดูด Nlyeary tributyrate 4.34 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันด้วยเครื่องตีปั่น นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อ

1.6 อาหาร MRS agar

Bromocresol purple	0.4	กรัม
Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
K_2HPO_4	2	กรัม
Tween 80	1	กรัม
Sodium acetate.$3H_2O$	5	กรัม
Diammonia citrate	2	กรัม
$MgSO_4.7H_2O$	0.2	กรัม
$MgSO_4.4H_2O$	0.05	กรัม
Agar	15	กรัม

การเตรียม MRS agar ในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ชั่งอาหาร MRS agar 28.878 g และชั่งเกลือบริสุทธิ์ลงไป 10% เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 430 มิลลิลิตร และเติม bromocresol purple 0.043 g ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อ

1.7 อาหาร MacConkey agar

Peptone	17.0	กรัม
Proteose	3.0	กรัม
Lactose	10.0	กรัม
Bile Salt No.3	1.5	กรัม
Neutral Red	0.03	กรัม
Crystal violet	0.001	กรัม
Agar	13.5	กรัม

การเตรียม MacConkey agar ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ชั่งอาหาร MacConkey agar 22.1579 g และชั่งเกลือบริสุทธิ์ลงไป 10 เปอร์เซ็นต์ ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 430 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อ

1.8 อาหาร Nutrient broth

Peptone from meat	5.0	กรัม
Meat extract	3.0	กรัม

การเตรียม Nutrient broth ในน้ำ 1,000 มิลลิลิตร ชั่งอาหาร Nutrient broth 2.99 g ละลายในน้ำกลั่นปริมาตร 230 มิลลิลิตร ละลายให้เข้ากัน นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงเหลือประมาณ 45-50 องศาเซลเซียส ก่อนเทลงบนจานเพาะเชื้อ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ข
การวิเคราะห์ทางเคมี

1. วัดพีเอชของตัวอย่างบูดูด้วยเครื่อง pH meter

นำตัวอย่างน้ำหมักบูดูที่วันต่างๆ ของการหมัก ตัวอย่างละ 20 มิลลิลิตรมาวัดค่าพีเอชโดยใช้เครื่อง pH meter

2. การหาปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบเป็นกรดแลกติก

นำตัวอย่างน้ำหมักบูดู 30 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 30 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วนำไปกรองด้วยผ้าขาวบาง จากนั้นนำไปเหวี่ยงแยกความเร็ว 10,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เทส่วนใสใส่ในฟลาสก์ขนาด 150 มิลลิลิตร หยดฟีนอฟทาลีน 2-3 หยด (ฟีนอฟทาลีนเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ในเอธิลแอลกอฮอล์) แล้วไทเทรตด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 0.1 นอร์มอล จนได้จุดยุติเป็นสีชมพู (AOAC, 2000)

$$\text{ปริมาณทั้งหมดคิดเทียบเป็นกรดแลกติก} = \frac{\text{โซเดียมไฮดรอกไซด์ (มล.)} \times \text{นอร์มอล} \times 90.09 \times 100}{\text{น้ำหนักของตัวอย่าง (กรัม)} \times 1000}$$

3. การหาปริมาณคลอไรด์ โดย Mohr's Method (A.O.A.C, 1960)

ตอนที่ 1 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน และการทำมาตรฐาน (Standardization) สารละลายมาตรฐาน $AgNO_3$ ด้วย Mohr's method ชั่ง $AgNO_3$ มาประมาณ 0.16 g ละลายในน้ำประมาณ 100 ml และเก็บสารละลายที่ได้ในขวดสีชา เก็บไว้ในที่มืด หมายเหตุ เมื่อทำการไทเทรตโดยใช้ $AgNO_3$ ทุกครั้ง ควรทำมาตรฐาน (Standardization) ก่อนทุกครั้ง เพราะเมื่อทิ้งไว้ความเข้มข้นอาจเปลี่ยนไปเนื่องจากถูก oxidize จากนั้นเตรียมสารละลายมาตรฐาน 0.01 M NaCl โดยชั่ง A.R. NaCl (ผ่านการอบที่ 250 °C - 350 °C เป็นเวลา 1-2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นใน Desicator) ประมาณ 0.06 g ละลายด้วยน้ำกลั่นแล้วปรับปริมาตรเป็น 100.0 ml ในขวดวัดปริมาตร คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย NaCl ที่เตรียมขึ้น ปิเปตสารละลายมาตรฐาน NaCl 10.00 ml ใน conical flask เติม 5 % K_2CrO_4 0.5 ml แล้วไทเทรตด้วยสารละลาย $AgNO_3$ จากบิวเรต เขย่าสารละลายเสมอจนกว่าจะเห็นตะกอนสีแดงอิฐของ Ag_2CrO_4 ที่เกิดขึ้น บันทึกปริมาตรของ $AgNO_3$ ที่ใช้ทำการทดลองซ้ำอีก 1 ครั้ง ทำ Blank Titration โดยปิเปตน้ำกลั่นปริมาตร 10.00 ml แล้วเติม 5% K_2CrO_4 0.5 ml ไทเทรตด้วยสารละลาย $AgNO_3$ จนถึงจุดยุติได้สีเหมือนกับการไทเทรต ทำการทดลองซ้ำอีกครั้ง บันทึก ปริมาตรของ $AgNO_3$ ที่ใช้ หาปริมาณ $AgNO_3$ ที่ทำปฏิกิริยากับ NaCl จริงๆ คำนวณหาความเข้มข้นที่แน่นอนของสารละลาย $AgNO_3$

ตอนที่ 2 การหาปริมาณคลอไรด์โดย Mohr's Method

ปิเปตสารละลายตัวอย่างคลอไรด์มา 10.00 ml ใส่ลงใน Volumetric flask ขนาด 100.00 ml เติมน้ำจนถึงขีดปริมาตร ปิเปตสารละลายที่เตรียมได้จากข้อ 1. มา 10 ml ใส่ใน Conical flask ขนาด 250 ml เติม 5% K_2CrO_4 0.5 ml แล้วไทเทรตกับสารละลายมาตรฐาน $AgNO_3$ จนกระทั่งได้สีแดงอิฐของ Ag_2CrO_4 บันทึกปริมาตรของ $AgNO_3$ ที่ใช้ทำการทดลองซ้ำอีก 2 ครั้ง คำนวณหาปริมาณของคลอไรด์ในสารตัวอย่างเป็นเปอร์เซนต์

ภาคผนวก ค
การวิเคราะห์คุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

1. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ 3 %

วิธีการ

1. ปลูกเชื้อลงในอาหาร Nutrient agar บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
2. เติม 1 มิลลิลิตร ของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

บันทึกผล

ผลบวก : เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ : ไม่เกิดฟองแก๊ส

2. การทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรต

Beef extract	3 กรัม
Peptone	5 กรัม
น้ำตาล	10 กรัม
Bromthymol blue	4 มิลลิลิตร

เติมอาหารที่มีน้ำตาลแต่ละชนิดในหลอดทดลองที่มีหลอดดักแก๊ส ฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 110°C นาน 10 นาที เสร็จแล้วรีบยกออกมาแช่น้ำ

วิธีการ

1. ปลูกเชื้อที่ต้องการทดสอบในอาหาร
2. บ่มที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 24 ชั่วโมง

บันทึกผล

ผลบวก : อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองแต่ไม่มีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อไม่สร้างแก๊สแต่หมักน้ำตาลได้หรืออาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองและมีแก๊สในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าเชื้อหมักน้ำตาลและสร้างแก๊สได้

ผลลบ : อาหารไม่เปลี่ยนสี แสดงว่าเชื้อหมักน้ำตาลไม่ได้

3. การสร้างอะซิโตอิน (acetoin)

MR-VP medium

Buffered peptone	7 กรัม
NaCl	5 กรัม
Bacto dextrose	5 กรัม

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ละลายส่วนผสมทั้งหมดเข้าด้วยกันในน้ำกลั่น ปรับ pH 7 ± 0.2 เติมน้ำกลั่นจนครบ 1 ลิตร นำไปต้มให้เดือด ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

วิธีการทดลอง

1. ปลูกเชื้อในอาหารบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง
2. ถ่ายเชื้อจากข้อ 1 มา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดสอบที่สะอาด
3. เติมสาร A 0.6 มิลลิลิตร
4. เติมสาร B 0.2 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน

บันทึกผล

ผลบวก *:* สีแดงภายใน *5* นาที

ผลลบ *:* สีเหลือง

ภาคผนวก ง
วิธีการย้อมสีแบบแกรมและน้ำยาที่ใช้ย้อม

1. การย้อมสีแกรม

1.1 ทำความสะอาดแผ่นสไลด์ให้สะอาดและเช็ดให้แห้ง

1.2 ทำการสเมียร์เชื้อลงบนแผ่นสไลด์รอให้แห้งและนำไปตรึงเซลล์ด้วยความร้อน

1.3 หยดสี Crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที

1.4 นำไปผ่านน้ำ แล้วหยดสารละลายไอโอดีนให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที

1.5 เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง และหยดแอลกอฮอล์95% ให้ทั่วรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 10 วินาที เมื่อครบเวลานำไปผ่านน้ำเบาๆ

1.6 หยดสี Safranin o ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้ 1 นาที

1.7 เทสีทิ้ง นำไปผ่านน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง

1.8 นำไปดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

แบคทีเรียที่เป็นแกรมบวกจะติดสีม่วง หรือสีน้ำเงิน Crystal violet

แบคทีเรียที่เป็นแกรมลบ จะติดสีแดง หรือสีชมพู่ Safranin O

2. น้ำยาที่ใช้ย้อมสีแกรม

2.1 Crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet (85% dry)	20 กรัม
Ethyl alcohol 98%	20 มิลลิลิตร

ทำการละลายในแอลกอฮอล์จนกระทั่งสีละลายหมด

สารละลาย B

Ammoniom oxalate	0.8 กรัม
น้ำกลั่น	80 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับสารละลาย B ถ้ามีตะกอนกรองก่อนใช้ และถ้าสีเข้มเกินไปอาจเจือจางสารละลาย A เป็น 1: 10 ก่อนผสมกับสารละลาย B

2.2 Safranin O counterstain (stock solution)

Safranin O	2.5 กรัม
Ethyl alcohol 95 %	100 กรัม

ถ้าจะใช้ในการย้อมเจือจางเป็น 1:10 (Stock O 10 มิลลลิตร ผสมกับน้ำกลั่น 90 มิลลิลิตร) ถ้ามีตะกอนกรองทุกครั้งก่อนใช้งาน

2.3 Gram's iodine solution (mordant)

Iodine (crystal)	1 กรัม
Potassium iodine (KI)	2 กรัม
น้ำกลั่น	300 มิลิลิตร

ละลาย Iodine KI ในน้ำกลั่นปริมาณน้อยๆ ก่อนแล้วเติมน้ำให้ครบ แล้วเก็บในขวดสีชา

2.4 Alcohol 95%

Ethyl alcohol	95 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	5 มิลลิลิตร

ภาคผนวก จ

ผลการทดลอง

ตารางที่ 10: การเปลี่ยนแปลงปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้บนอาหารชนิดต่างๆ ตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน

วัน	ปริมาณเชื้อแบคทีเรียบนอาหารชนิดต่างๆ (log CFU/ml)						
	Tributyrin agar		Skim milk agar		Plate count agar		MRS agar
	10% NaCl	15% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	10% NaCl	15% NaCl	5% NaCl
15	5.03±0.0	5.58±0.1	4.98±0.0	4.63±0.1	5.98±0.0	5.74±0.1	0.00±0.0
30	4.73±0.0	4.80±0.1	5.83±0.1	4.73±0.1	5.69±0.0	5.50±0.1	0.00±0.0
45	4.55±0.0	4.30±0.1	5.55±0.1	4.72±0.1	5.54±0.1	5.00±0.1	1.74±0.0
60	3.70±0.0	3.66±0.0	5.00±0.0	4.66±0.0	4.98±0.0	4.72±0.0	2.30±0.1
75	3.60±0.0	3.60±0.0	4.70±0.1	4.60±0.1	4.80±0.0	4.70±0.0	3.19±0.0
90	3.60±0.1	3.50±0.0	4.80±0.0	4.60±0.1	4.78±0.0	4.60±0.0	4.20±0.2
105	3.50±0.0	3.50±0.0	4.70±0.1	4.50±0.0	4.75±0.0	4.60±0.1	4.32±0.0
120	3.60±0.1	3.60±0.0	4.60±0.0	4.40±0.0	4.60±0.1	4.50±0.1	4.44±0.0
135	3.70±0.0	3.50±0.0	4.62±0.0	4.00±0.1	4.57±0.0	4.50±0.0	4.45±0.1
150	3.80±0.1	3.50±0.0	4.57±0.1	3.70±0.1	4.57±0.0	4.50±0.0	4.45±0.0
165	3.80±0.1	3.50±0.1	4.50±0.0	3.50±0.0	4.50±0.0	4.50±0.0	4.20±0.0
180	3.60±0.1	3.50±0.1	4.45±0.0	3.60±0.1	4.48±0.1	4.50±0.0	4.15±0.0
195	3.59±0.01	3.46±0.01	4.39±0.0	3.58±0.0	4.40±0.0	4.42±0.0	4.12±0.0
210	3.57±0.00	3.45±0.01	4.35±0.1	3.53±0.0	4.38±0.1	4.40±0.0	4.10±0.0
225	3.45±0.00	3.42±0.01	4.20±0.0	3.51±0.0	4.35±0.0	4.38±0.0	4.08±0.0
240	3.40±0.00	3.40±0.00	3.98±0.0	3.48±0.0	4.30±0.0	4.35±0.0	4.05±0.1
255	3.35±0.00	3.37±0.00	3.96±0.0	3.45±0.0	4.25±0.0	4.30±0.0	3.98±0.0
270	3.31±0.01	3.35±0.00	3.82±0.0	3.39±0.0	4.20±0.0	4.25±0.0	3.87±0.0
285	3.28±0.00	3.31±0.00	3.80±0.0	3.30±0.0	4.10±0.0	4.20±0.0	3.62±0.0
300	3.25±0.02	3.25±0.01	3.75±0.0	3.29±0.0	3.98±0.1	4.12±0.0	3.50±0.0
315	3.20±0.00	3.22±0.00	3.71±0.0	3.25±0.0	3.87±0.0	4.05±0.0	3.40±0.0
330	3.20±0.01	3.19±0.00	3.69±0.0	3.20±0.0	3.82±0.0	3.95±0.0	3.30±0.0
345	3.19±0.01	3.17±0.01	3.62±0.0	3.15±0.0	3.80±0.0	3.91±0.0	3.00±0.0
360	3.15±0.02	3.13±0.01	3.58±0.0	3.15±0.0	3.80±0.1	3.86±0.0	2.95±0.0

ตารางที่ 11: การเปลี่ยนแปลงทางเคมีของตัวอย่างน้ำหมักบูดูตลอดระยะเวลาการหมัก 12 เดือน

วัน	การเปลี่ยนแปลงทางเคมี		
	pH	Lactic acid (%)	NaCl (%)
0	5.55 ±0.01	1.14 ±0.01	7.6 ±0.1
15	5.57 ±0.02	1.33 ±0.02	7.8 ±0.3
30	5.68 ±0.01	1.37 ±0.02	8.0 ±0.0
45	5.69 ±0.01	1.44 ±0.03	8.8 ±0.0
60	6.03 ±0.01	1.80 ±0.01	9.0 ±0.0
75	6.06 ±0.01	1.84 ±0.01	10.2 ±0.2
90	6.06 ±0.01	1.91 ±0.02	10.5 ±0.2
105	6.09 ±0.01	1.92 ±0.02	10.6 ±0.1
120	6.12 ±0.01	1.94 ±0.03	10.8 ±0.1
135	6.12 ±0.00	1.94 ±0.01	11.6 ±0.1
150	6.13 ±0.01	1.94 ±0.01	12.0 ±0.0
165	6.13 ±0.01	1.84 ±0.02	13.5 ±0.0
180	6.14 ±0.01	1.89 ±0.00	14.0 ±0.0
195	6.15 ±0.00	1.88 ±0.00	14.8 ±0.0
210	6.15 ±0.00	1.88 ±0.00	15.0 ±0.2
225	6.16 ±0.00	1.89 ±0.00	16.0 ±0.3
240	6.16 ±0.00	1.90 ±0.00	18.0 ±0.1
255	6.17 ±0.00	1.90 ±0.00	20.0 ±0.1
270	6.17 ±0.00	1.91 ±0.00	22.1 ±0.1
285	6.18 ±0.00	1.91 ±0.00	25.0 ±0.1
300	6.19 ±0.00	1.91 ±0.00	27.4 ±0.1
315	6.20 ±0.00	1.92 ±0.00	29.0 ±0.5
330	6.20 ±0.00	1.92 ±0.00	31.0 ±0.2
345	6.20 ±0.00	1.94 ±0.00	32.0 ±0.2
360	6.20 ±0.00	1.95 ±0.00	34.0 ±0.0

ตารางที่ 12: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือน**แรก**ของการหมัก

Cell morphology			
Isolate	**gram Staining**	**Shape**	**Color and Opacity**
Sk01A	+	Rod	Yellow Opaque
Sk05A	+	Rod	Yellow Opaque
Sk08B	+	Coccus	White Opaque
Sk12B	+	Coccus	White Opaque
Sk06C	+	Coccus	Yellow Opaque
Sk10C	+	Coccus	Yellow Opaque
Sk02D	+	Coccus	Yellow Opaque
Sk12D	+	Coccus	Yellow Opaque
Sk04E	+	Coccus	Yellow Opaque
Sk06E	+	Coccus	Yellow Opaque
Sk09F	+	Coccus	White Opaque
Sk12F	+	Coccus	White Opaque
Sk03G	+	Rod	Yellow Opaque
Sk10H	+	Rod	Yellow Opaque
Sk12H	+	Rod	Yellow Opaque
Sk05I	+	Rod	White Opaque
Sk04J	+	Rod	Yellow Opaque
Sk03K	+	Coccus	White Opaque
Sk05K	+	Coccus	White Opaque
Sk04L	+	Coccus	White Opaque

ตารางที่ 13: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียย่อยโปรตีนที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือน**หลัง**จนสิ้นสุดการหมัก

	Cell morphology		
Isolate	**gram Staining**	**Shape**	**Color and Opacity**
Sk02M	+	Rod	Yellow Opaque
Sk05M	+	Rod	Yellow Opaque
Sk07M	+	Rod	Yellow Opaque
Sk09M	+	Rod	Yellow Opaque
Sk11M	+	Rod	Yellow Opaque
Sk03N	+	Rod	Yellow Opaque
Sk05N	+	Rod	Yellow Opaque
Sk03P	+	Coccus	White Opaque
Sk04P	+	Coccus	White Opaque
Sk03V	+	Coccus	White Opaque
Sk01W	+	Rod	Yellow Opaque
Sk02W	+	Rod	Yellow Opaque
Sk02X	+	Coccus	Yellow Opaque

ตารางที่ 14: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียย่อยไขมันที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือน**แรก**ของการหมัก

	Cell morphology		
Isolate	**gram Staining**	**Shape**	**Color and Opacity**
Tr02A	+	Rod	Yellow Opaque
Tr05A	+	Rod	Yellow Opaque
Tr10A	+	Rod	Yellow Opaque
Tr15B	+	Coccus	Yellow Opaque
Tr08C	+	Rod	Yellow Opaque
Tr12C	+	Rod	Yellow Opaque
Tr12D	+	Rod	White Opaque
Tr12E	+	Coccus	White Opaque
Tr02F	+	Coccus	Yellow Opaque
Tr03G	+	Coccus	White Opaque
Tr10G	+	Coccus	White Opaque
Tr15H	+	Rod	White Opaque
Tr21H	+	Rod	White Opaque
Tr05I	+	Coccus	White Opaque
Tr03J	+	Coccus	White Opaque
Tr02L	+	Rod	White Opaque
Tr04L	+	Rod	White Opaque

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 15: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียย่อยไขมันที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tributyrin agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือน**หลัง**จนสิ้นสุดการหมัก

	Cell morphology		
Isolate	**gram Staining**	**Shape**	**Color and Opacity**
Tr02M	+	Rod	White Opaque
Tr04M	+	Rod	White Opaque
Tr02N	+	Rod	White Opaque
Tr03N	+	Rod	White Opaque
Tr04N	+	Rob	White Opaque
Tr01Q	+	Rod	Yellow Opaque
Tr02Q	+	Rod	Yellow Opaque
Tr03Q	+	Rod	Yellow Opaque
Tr04Q	+	Rod	Yellow Opaque
Tr01T	+	Rod	Yellow Opaque
Tr03T	+	Rod	Yellow Opaque
Tr05T	+	Rod	Yellow Opaque
Tr02X	+	Rod	White Opaque
Tr03X	+	Rod	White Opaque
Tr05X	+	Rod	White Opaque

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 16 : ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือน**แรก**ของการหมัก

Cell morphology			
Isolate	**gram Staining**	**Shape**	**Color and Opacity**
Lac01C	+	Coccus	White Opaque
Lac02C	+	Coccus	White Opaque
Lac03C	+	Coccus	White Opaque
Lac04D	+	rod	White Opaque
Lac05D	+	Coccus	White Opaque
Lac06D	+	rod	White Opaque
Lac07D	+	Coccus	White Opaque
Lac10D	+	rod	White Opaque
Lac12D	+	rod	White Opaque
Lac13E	+	Coccus	White Opaque
Lac15E	+	rod	White Opaque
Lac19F	+	rod	White Opaque
Lac23I	+	Coccus	White Opaque
Lac25I	+	Coccus	White Opaque
Lac28I	+	Coccus	White Opaque
Lac31G	+	rod	White Opaque
Lac34G	+	Coccus	White Opaque
Lac02L	+	Rod	White Opaque

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

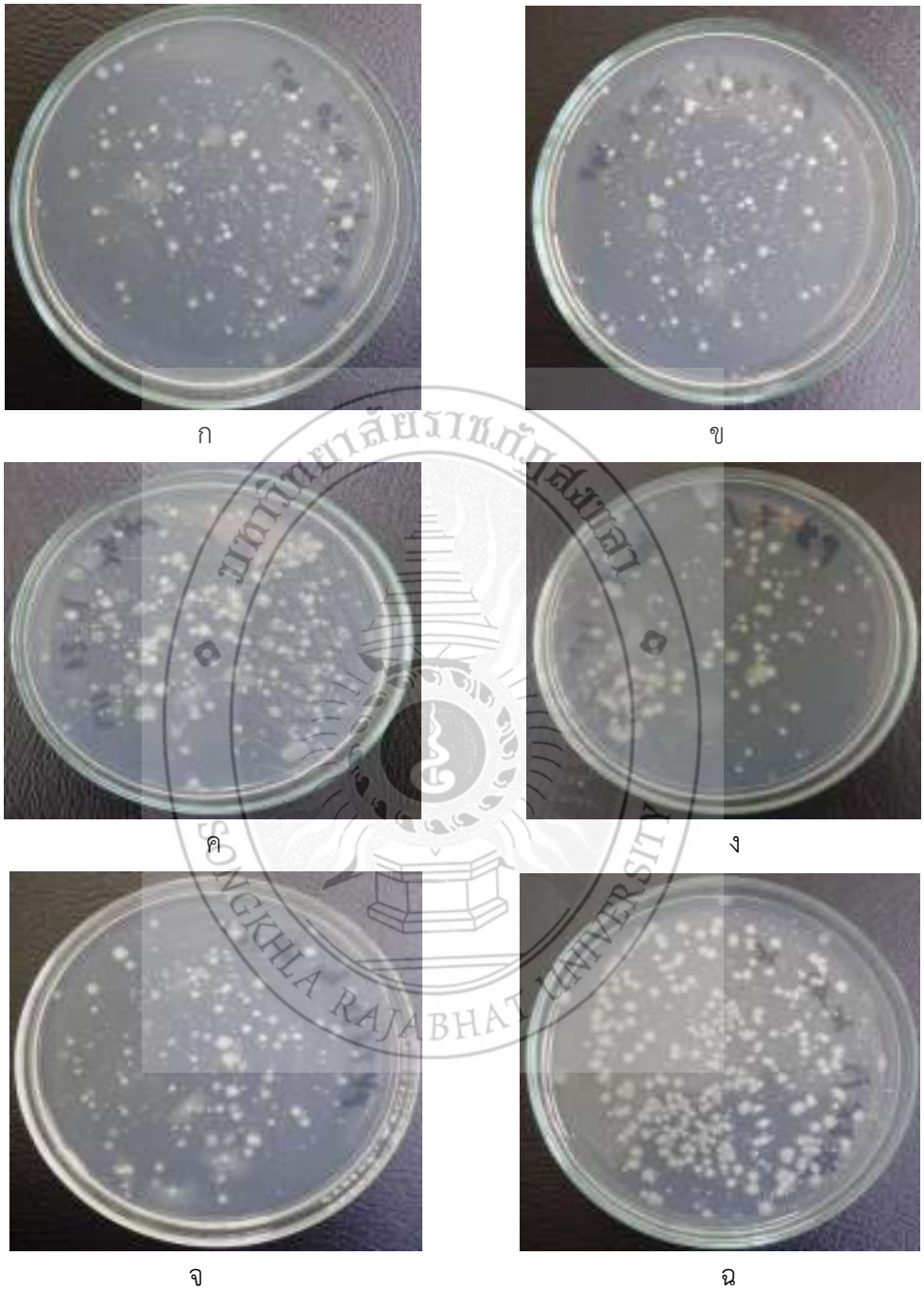
ตารางที่ 17: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียแลกติกที่คัดเลือกบนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar จากตัวอย่างน้ำหมักบูดู 6 เดือน**<u>หลัง</u>**จนสิ้นสุดการหมัก

Cell morphology			
Isolate	**gram Staining**	**Shape**	**Color and Opacity**
Lac02M	+	Rod	White Opaque
Lac05M	+	Rod	White Opaque
Lac02N	+	Rod	White Opaque
Lac02P	+	Rod	White Opaque
Lac03P	+	Rod	White Opaque
Lac02T	+	Rod	White Opaque
Lac01U	+	Rod	White Opaque
Lac01V	+	Coccus	White Opaque
Lac02V	+	Coccus	White Opaque
Lac02W	+	Coccus	White Opaque

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ฉ

ลักษณะและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อและภายใต้กล้องจุลทรรศน์



ก ข

ค ง

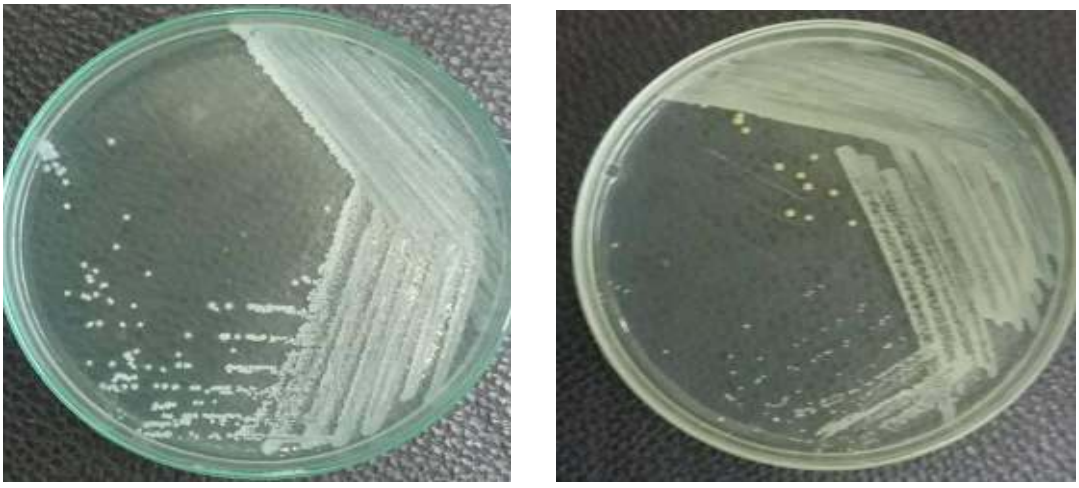
จ ฉ

รูปที่ 21: ลักษณะโคโลนีและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Plate Count agar (PCA) Skim milk agar และ Tributyrin agar

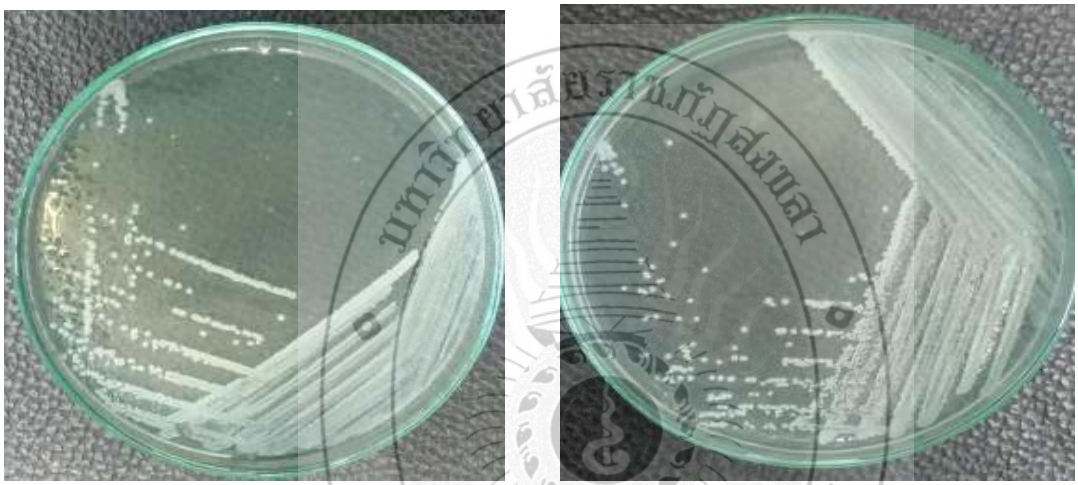
ก และ ข เชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Skim milk agar

ค และ ง เชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Tributyrin agar

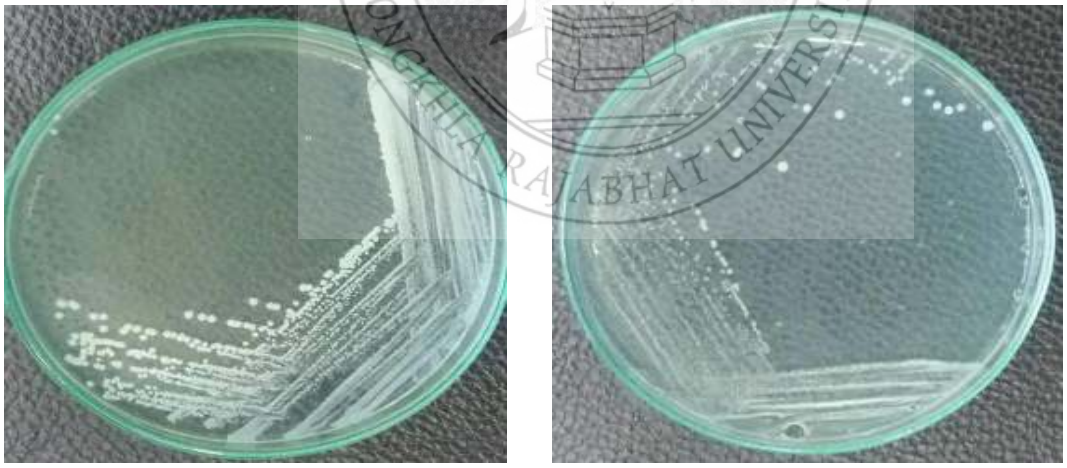
จ และ ฉ เชื้อแบคทีเรียบนอาหาร Plate Count Agar (PCA)



ก ข



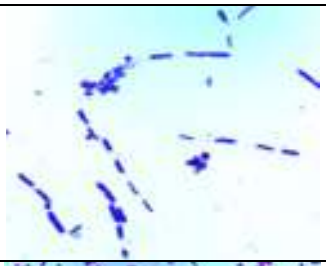
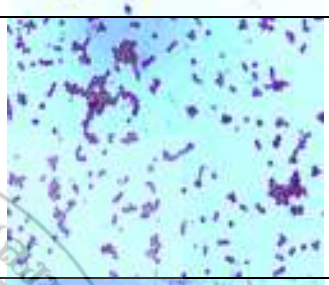
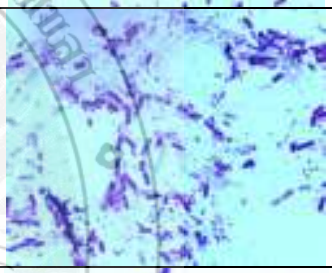
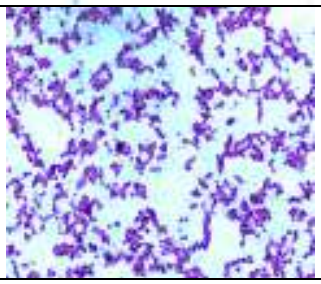
ค ง

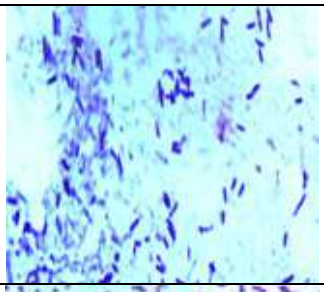
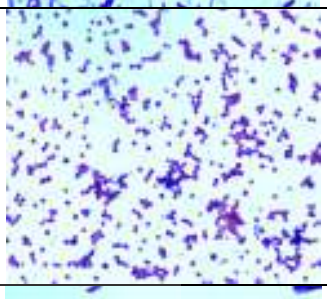
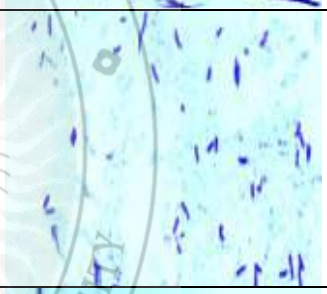
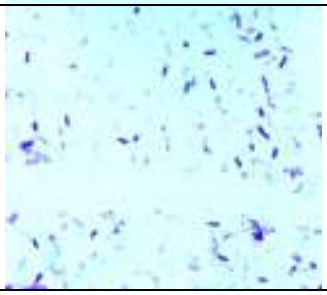


จ ฉ

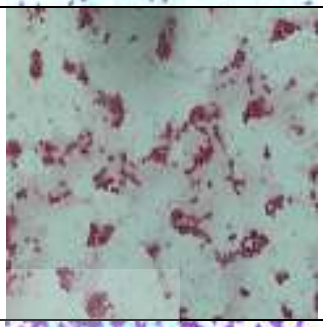
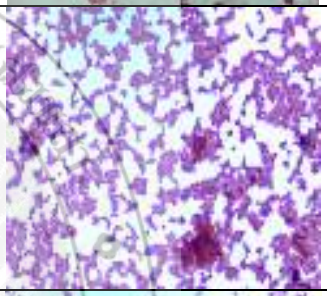
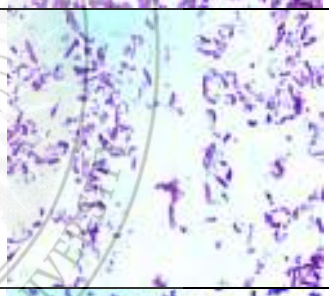
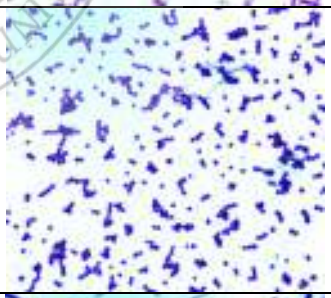
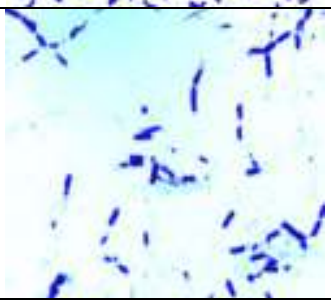
รูปที่ 22: ลักษณะโคโลนีและรูปร่างของเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร MRS agar

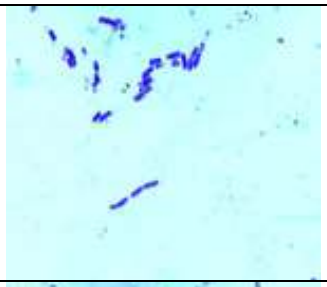
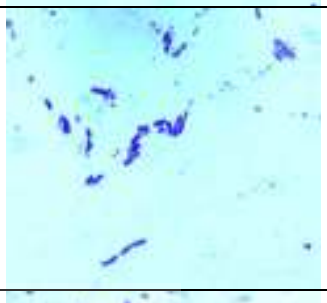
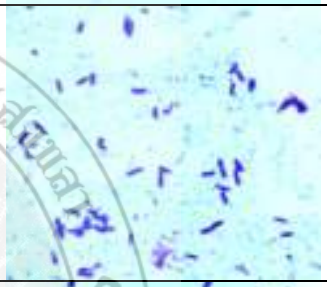
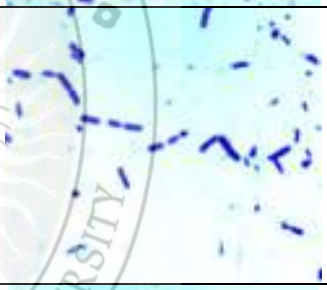
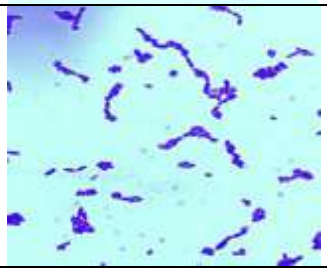
ตารางที่ 18: ลักษณะสัณฐานวิทยาและรูปร่างเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า

ลำดับ	โอโซเลต	ลักษณะสัณฐานวิทยา	รูปร่างเชื้อภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า
1	Tr02A	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว	
2	Tr15B	แกรมบวก รูปร่างกลม	
3	Tr08C	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว สร้างสปอร์	
4	Tr12D	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว ต่อกันเป็นสาย	
5	Tr02F	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาวเรียว	
6	Tr03G	แกรมบวก รูปร่างกลมจัดเรียงเป็นกลุ่ม	

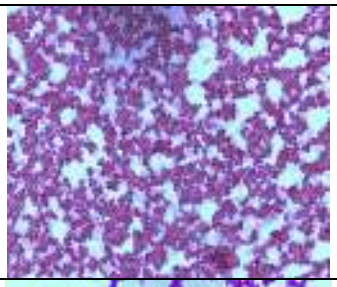
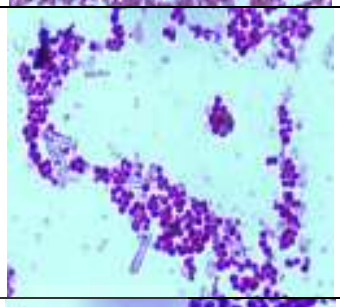
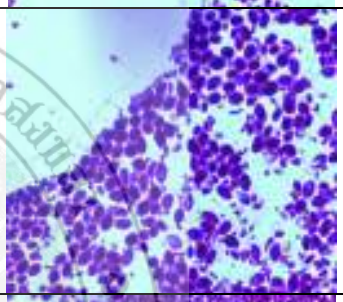
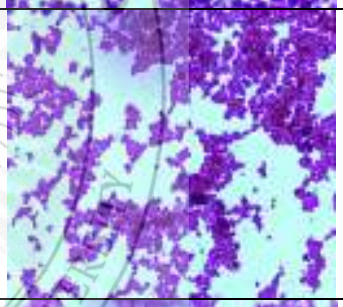
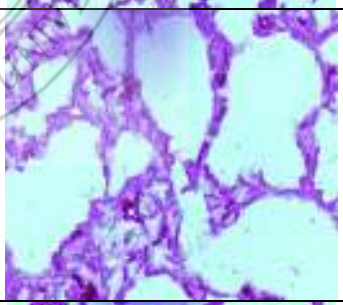
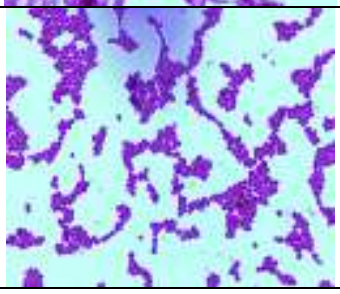
7	Tr21H	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น สร้างสปอร์	
8	Tr05I	แกรมบวก รูปร่างกลม	
9	Tr02M	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว ต่อกันเป็นสาย	
10	Tr01Q	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น สร้างสปอร์	
11	Tr01T	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว	
12	Tr02X	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น สร้างสปอร์	

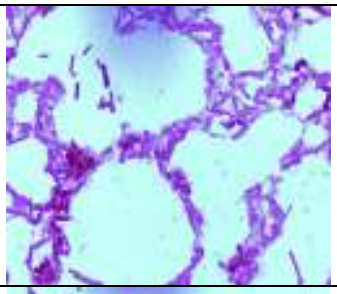
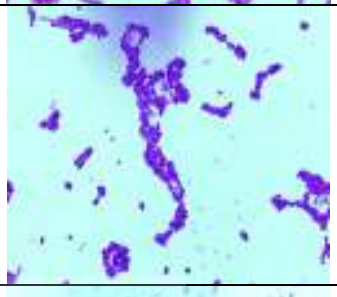
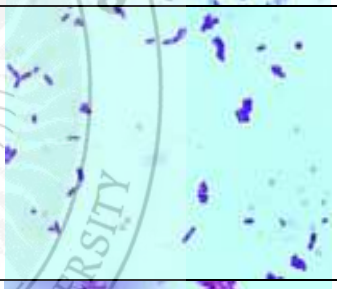
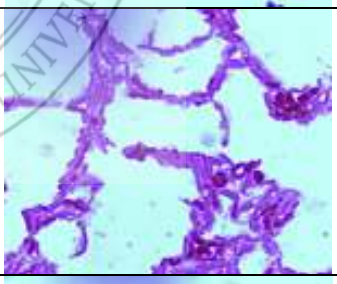
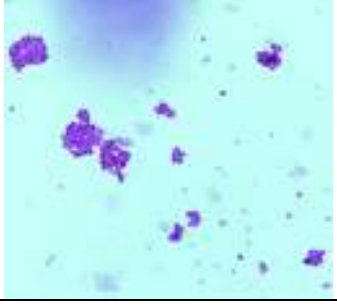
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

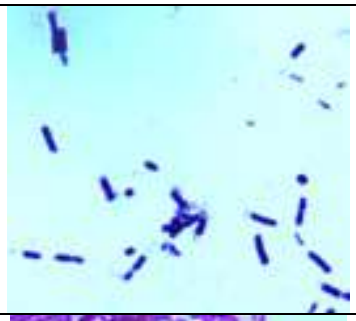
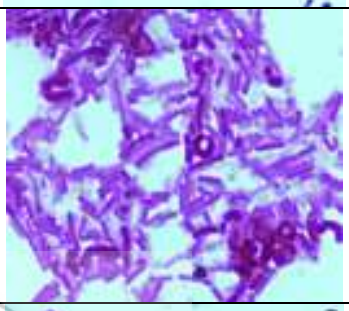
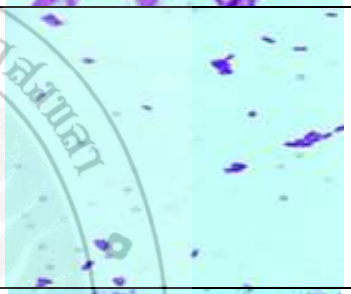
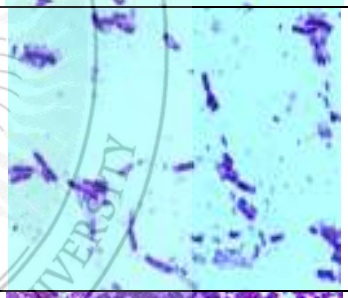
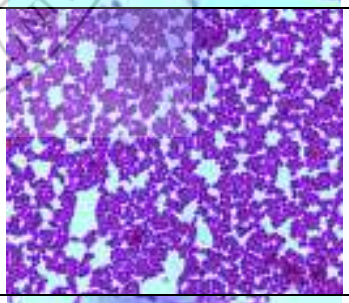
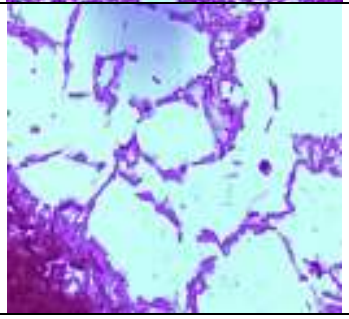
13	Sk01A	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น	
14	Sk08B	แกรมบวก รูปร่างกลม	
15	Sk06C	แกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงเป็นกลุ่ม	
16	Sk12D	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น สร้างสปอร์	
17	Sk09F	แกรมบวก รูปร่างกลมเล็ก	
18	Sk03G	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว	

19	Sk10H	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว สร้างสปอร์	
20	Sk05I	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น	
21	Sk04J	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น สร้างสปอร์	
22	Sk03P	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น	
23	Sk03V	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว	
24	Sk01W	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น	

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

25	Sk02X	แกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงเป็นกลุ่ม	
26	Lac01C	แกรมบวก รูปร่างกลม ใหญ่	
27	Lac02C	แกรมบวก รูปร่างกลมรี คล้ายรูปไข่	
28	Lac03C	แกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงเป็นกลุ่ม	
29	Lac04D	แกรมบวก รูปร่างเป็น ท่อนยาว จัดเรียงเป็น กลุ่ม	
30	Lac05D	แกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงเป็นกลุ่ม	

31	Lac06D	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว จัดเรียงเป็นกลุ่ม	
32	Lac07D	แกรมบวก รูปร่างกลมเล็ก เป็นกลุ่ม	
33	Lac10D	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น สร้างสปอร์	
34	Lac19F	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น สร้างสปอร์	
35	Lac31G	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว ต่อกันเป็นสาย	
36	Lac34G	แกรมบวก รูปร่างเป็นกลมเล็ก จัดเรียงเป็นกลุ่ม	

37	Lac02M	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว	
38	Lac02P	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว จัดเรียงเป็นกลุ่ม	
39	Lac02T	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น สร้างสปอร์	
40	Lac01U	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนสั้น สร้างสปอร์	
41	Lac01V	แกรมบวก รูปร่างกลม จัดเรียงเป็นกลุ่ม	
42	Lac02W	แกรมบวก รูปร่างเป็นท่อนยาว	

ภาคผนวก ช
รูปภาพขั้นตอนการหมักบูดู

1. ขั้นตอนการหมักบูดู

1.1 ปลากะตักสดที่ใช้ในการหมัก

เริ่มจากการนำปลากะตักสดมาล้างให้สะอาดอาจจะใช้ปลาชนิดใดก็ได้แต่ส่วนใหญ่ใช้ปลากะตักจึงจะให้น้ำบูดูที่มีกลิ่นหอมและรสชาติดี

1.2 กระบวนการหมัก

นำปลากะตักที่ได้ใส่ภาชนะที่เตรียมไว้ โดยใช้อัตตราส่วนปลาต่อเกลือ 3 ต่อ 1 โดยน้ำหนัก

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

1.3 นำเกลือใส่ลงไปในอัตราส่วนที่เตรียมไว้

1.4 หลังจากนั้นคลุกปลากะตักกับเกลือให้เข้ากัน

1.5 หลังจากคลุกปลาให้เข้ากันได้ที่แล้ว ก็นำไปใส่ในไห แล้วปิดปากไหด้วยถุงพลาสติก 2 ถึง 3 ชั้น มัดด้วยยางและเชือกฟางให้แน่น เพื่อไม่ให้อากาศเข้าไปข้างในภาชนะหมัก หมักทิ้งไว้ประมาณ 4 เดือน เก็บตัวอย่างมาวิเคราะห์ทุกๆ15 วันของการหมัก

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

เอกสารอ้างอิง

ธนุสรา เหล่าเจริญสุข และปราณี ทองคำ. 2533. รายงานการวิจัยเรื่องการพัฒนาผลิตภัณฑ์ท้องถิ่นบาง ชนิดจากอ่าวปัตตานี : บูดู. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

ธีรพร กงบังเกิด. 2546. อาหารของจุลินทรีย์และการเพาะเลี้ยง. *ใน* จุลชีววิทยาอาหาร. หน้า 43-56. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร คณะเกษตรศาสตร์ ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยนเรศวร.

นรภัทร หวันเหล็ม. 2551. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกจากกุ้งส้มและการผลิตกุ้งส้มจากสายพันธุ์ที่คัดเลือกได้. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปฐมารัตน์ รัตนช่วย. 2548. ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญและการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนของแบคทีเรียที่คัดเลือกจากนากุ้ง.วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ปราณี อ่านเปรื่อง. 2533. เอนไซม์ทางอาหาร. กรุงเทพฯ. คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พงษ์เทพ เกิดเนตร. 2533. การศึกษาผลของชนิดปลาและกรรมวิธีต่อการผลิตและคุณภาพของน้ำบูดู. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชน. 2547. มาตรฐานผลิตภัณฑ์ชุมชนน้ำบูดู เลขที่ เลขที่ 325/2547. สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม.

รวีวรรณ วงษาพรมและอับดุลกอยยูม ซี. 2557. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของแบคทีเรียในระหว่างการผลิตบูดูด้วยวิธีการเพาะเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ. ปัญหาพิเศษ. มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต.

วรรณา ชูฤทธิ์ พูนสุข ประเสริฐสรรพ์ และเสาวลักษณ์ จิตรบรรเจิดกูล. 2541. การประยุกต์ใชเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารหมักดั้งเดิม บูดู : การเปลี่ยนแแปลงของจุลินทรีย์ในระหว่างการหมักบูดู. คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22: 177-189.

อรตรี รอดเจริญ. 2542. การแยกเชื้อและลักษณะของเชื้อ *Pediococcus* spp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านภาคใต้ของไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อัจฉรา หนูเพชร. 2546. การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกจากอาหารหมักของไทย. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

อุษณีย์ อภิบาลแบ, สมพร ประเสริฐสิ่งสกุล, อภิชัย บัวชูก้าน และสมรักษ์ พันธ์ผล. 2556. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกจากอาหารหมักที่มีความเข้มข้นเกลือสูงและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย. งานประชุมหาดใหญ่วิชาการครั้งที่ 4 ณ มหาวิทยาลัยหาดใหญ่.

Adnan, A. F. M. and Tan, I. K. P. 2007. Isolation of lactic acid bacteria from Malaysian foods and assessment of the isolates for industrial potential. Bioresource Technol. 98: 1380-1385.

Albano, H., Henriques, I., Correia, A., Hogg, T. and Teixeira, P. 2008. Characterization of microbial population of Alheira (a traditional Portuguese fermented sausage) by PCR-DGGE and traditional cultural microbiological methods. J. Appl. Microbiol. 105: 2187-2194.

Apibalbae, P. 2009 Screening and optimization of lipase production by bacteria isolated from wastes of canned fish factory and application Masters thesis, Prince of Songkla University, Thailand.

Aquilanti, L., Santarelli, S., Silvestri, G., Osimani, A., Petruzzelli, A. and Clementi, F. 2007. The microbial ecology of a typical Italian salami during its natural fermentation. Int. J. Food Microbiol. 120: 136-145.

Alvarado, C., Garcia, A. B. E., Martin, S. E. and Regalado, C. 2006. Food-associated lactic acid bacteria with antimicrobial potential from traditional Mexican foods. Rev. Lat. Am. Microbiol. 48: 260-268.

Carmo, L. S. D., Dias, R. S., Linardi, V. R., Sena, M. J. D., Santos, D. A. D., Faria, M. E. D., Pena, E. C., Jett, M. and Heneine, L. G. 2002. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of

Staphylococcus present in Minas cheese and raw milk in Brazil. Food Microbiol. 19: 9-14.

Carraro, L., Maifreni, M., Bartolomeoli, I., Martino, M. E., Novelli, E., Frigo, F., Marino, M. and Cardazzo, B. 2011. Comparison of culture-dependent and -independent methods for bacterial community monitoring during Montasio cheese manufacturing. Res. Microbiol. 162: 231-239.

Chihara, R., Sumino, T. and Yamada, K. 2002. Various compounds and bacteria of Budu produced in Malaysia. J. Interg. Study. Dietary Habits. 13: 62 -68.

Dolci, P., Alessandria, V., Rantsiou, K., Bertolino, M. and Cocolin, L. 2010. Microbial diversity, dynamics and activity throughout manufacturing and ripeninig of Castelmagno PDO cheese. Int. J. Food Microbiol. 143: 71-75.

Ebrahimpour, S., Mohammad Zadeh, H., Naderi, E., Azar Paykan, A. 2011. Assessing eutrophication of lakes using geographic information system (GIS): case study Lake Zribar. In 16th Symposium of Geological Society of Iran, Shiraz University, 31 (In persian)

Endo, A., Mizuno, H. and Okada, S. 2008. Monitoring the bacterial community during fermentation of sunki, an unsalted, fermented vegetable traditional to the Kiso area of Japan. Lett. Appl. Microbiol. 47: 221-226.

Ercolini, D. 2004. PCR-DGGE fingerprinting: novel strategies for detection of microbes in food. J. Microbiol. Meth. 56: 297-314.

Fontana, C., Cocconcelli, P. S. and Vignolo, G. 2005a. Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. Int. J. Food Microbiol. 103: 131-142.

Fontana, C., Vignolo, G. and Cocconcelli, P. S. 2005b. PCR-DGGE analysis for the identification of microbial populations from Argentinean dry fermented sausages. J. Microbiol. Meth. 63: 254 - 263.

Giorgio, G. 2004. Studying the dynamics of microbial populations during food fermentation. *FEMS* Microbiology Reviews. 28(2): 251 - 260.

Giraffa, G. and Neviani, E. 2001. Review DNA-based, culture-independent strategies for evaluating microbial communities in food-associated ecosystems. Int. J. Food Microbiol. 67: 19-34.

Hatzikamari, M., Yiangou, M., Tzanetakis, N. and Tzanetaki, L. E. 2007. Changes in numbers and kinds of bacteria during a chickpea submerged fermentation used as a leavening agent for bread production. Int. J. Food Microbiol. 116: 37-43.

Kok, R.G., van Thor, J.J., Nugteren-Roodzant, I.M., Brouwer, M.B., Egmond, M.R., Nudel, C.B., Vosman, B. and Hellingwerf, K.J. 1995. Characterization of the extracellular lipase, LipA, of *Acinetobacter calcoaceticus* BD413 and sequence analysis of the cloned structural gene. Mol. Microbiol. 15: 803-818.

Kostinek, M., Specht, I., Edward, V. A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W. H. and Franz, C. M. A. P. 2005. Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. Syst. Appl. Microbiol. 28: 527-540.

Lee, C. Y., Cheng, M. F., Yu, M. S. and Pan, M. J. 2002. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*. FEMS Microbiol. Lett. 209: 31-37.

Lim, H., Lee, K. H., Hong, C. H., Bahk, G. J. and Choi, W. S. 2005. Comparison of four molecular typing methods for the differentiation of *Salmonella* spp. Int. J. Food Microbiol. 105: 411-418.

Loureiro, V. and Malfeito-Ferreira, M. 2003. Spoilage yeasts in the wine industry. Int. J. Food Microbiol. 86: 23-50.

Madoroba, E., Steenkamp, E. T., Theron, J., Scheirlinck, I., Cloete, T. E. and Huys, G. 2011. Diversity and dynamics of bacterial populations during spontaneous sorghum fermentations used to produce *ting*, a South African food. Syst. Appl. Microbiol. 34: 227-234.

Magalhães, K. T., Pereira, G. V. D. M., Dias, D. R. and Schwan, R. F. 2010. Microbial communities and chemical changes during fermentation of sugary Brazilian kefir. World. J. Microbiol. Biotechnol. 26:1241-1250.

Miambi, E., Guyot, J. P. and Ampe, F. 2003. Identification, isolation and quantification of representative bacteria from fermented cassava dough using an intergrated approach of culture-dependent and culture-independent methods. Int. J. Food Microbiol. 82: 111-120.

Migirov, L., Yakirevitch, A. and Kronenberg, J. 2005. Mastoid subperiosteal abscess: A review of 51 cases. Int. J. Pediatr. Otorhi. 69: 1529-1533.

Mohamed, H. N., Man, Y. C., Mustafa, S. and Manap, Y. A. 2012. Tentative identification of volatile flavor compound in Commercial Budu, a Malaysian fish sauce, using GC-MS. Molecules. 17: 5062 – 5080.

Muyzer, G. and Smalla, K. 1998. Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. Antonie Van Leeuwenhoek. 73: 127-141.

Nguyen, H. T. H., Elegado, F. B., Basilio, N. T. L., Mabesa, R.C. and Dizon, E.I. 2010. Isolation and characterisation of selected lactic acid bacteria for improved processing of *Nem chua*, a traditional fermented meat from Vietnam. Beneficial Microbes. 1: 67-74.

Obodai, M. and Dodd, C. E. R. 2006. Characterization of dominant microbiota of a Ghanaian fermented milk product, nyarmie, by culture- and nonculture-based methods. J. Appl. Microbiol. 100: 1355-1363.

Panesar, P. S., Kennedy, J. F., Gandhi, D. N. and Bunko, K. 2007. Bioutilisation of whey for lactic acid production. Food Chem. 105: 1-14.

Radke, S. M. and Alocilja, E. C. 2005. A high density microelectrode array biosensor for detection of *E. coli* O157:H7. Biosens. Bioelectron. 20: 1662-1667.

Rantsiou, K. and Cocolin, L. 2006. New developments in the study of the microbiota of naturally fermented sausages as determined by molecular methods. Int. J. Food Microbiol. 108: 255-267.

Reddy, G., Altaf, M., Naveena, B. J., Venkateshwar, M. and Kumar, E. V. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation. Biotechnol. Adv. 26: 22-34.

Sahdev, S. Khattar, K. S. and Saini, S. K. 2008. Production of active eukaryotic proteins through bacterial expression systems: a review of the existing biotechnology strategies. Molecular and Cellular Biochemistry. 307: 249-264.

Salminen, S. and Wright, A. V. 1993. Lactic Acid Bacteria. 442 pp. Marcel Dekker Inc., New York.

Su, Y. C. and Liu, C. 2007. *Vibrio parahaemolyticus*: A concern of seafood safety. Food Microbiol. 24: 549-558.

Tsegaye, M., Ephraim, E. and Ashenafi, M. 2004. Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 during the fermentation of Datta and Awaze, traditional Ethiopian fermented condiments, and during product storage at ambient and refrigeration temperature. Food Microbiol. 21: 743-751.

Udomsil, N. 2008. Role of lactic acid bacteria on chemical compositions of fish sauce. Thesis Master of Science in Food Technology. Saranaree University of Technology.

Vernam, A. H. and Evans, M. G. 1991. *Bacillus. In* Foodborne Pathogens an Illustrated Text. 1st ed. p. 267-288. Wolfe Publishing Ltd. Aylesbury.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

Ward, O. P. 1983. Protease in microbial enzyme and biotechnology. Forgarty, M. M. eds. London Applied Publishers. London. 251-371.

Wong, H. C., Chen, M. C., Liu, S. H. and Liu, D. P. 1999. Incidence of highly genetically diversified *Vibrio parahaemolyticus* in seafood imported from Asian countries. Int. J. Food Microbiol. 52: 181-188.

Wu, J.J., Ma, Y. K., Zhang, F. F., Chen. F. H. 2011. Biodiversity of yeasts, lactic acid bacteria and acetic acid bacteria in the fermentation of “Shanxi aged vinegar”, a traditional Chinese vinegar. Food Microbiology. 30: 289-297.

Xu, W., Huang, Z., Zhang, X., Li, Q., Lu, Z., Shi, J., Xu, Z. and Ma, Y. 2011. Monitoring the microbial community during solid-state acetic acid fermentation of Zhenjiang aromatic vinegar. Food Microbiol. 28: 1175-11.

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ประวัติผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ชื่อ (ภาษาไทย) นางสาวปวีณา ดิกิจ
ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Miss Paweena Dikit
ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)
โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
ตรี	วท.บ.	เทคโนโลยีชีวภาพ (เกียรตินิยมอันดับ 1)	ม.สงขลานครินทร์	ไทย
เอก	ปร.ด.	เทคโนโลยีชีวภาพ	ม.สงขลานครินทร์	ไทย

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาหรือทุนวิจัย	แหล่งทุน
2544	ทุนมหาดไทย	กระทรวงมหาดไทย
2548	อุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2549	ทุนโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา	สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ประวัติการทำงาน

สิงหาคม 2553 - ปัจจุบัน: อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)
โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์เผยแพร่

1. Maneerat, S. and **Dikit, P**. 2007. Characterization of cell-associated bioemulsifier from *Myroides* sp. SM1, a marine bacterium. Songklanakarin J. Sci. Technol. 29: 769-779.

2. **Dikit, P**., Maneerat, S. and H-Kittikun, A. 2010. Mannoprotein from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation: extraction and characterization. J. Food Process Eng. Accepted.

3. **Dikit, P**., Maneerat, S., Musikasang, H. and H-Kittikun, A. 2010. Bioemulsifier from isolated yeast obtained from Thai traditional liquor distillation: extraction and characterization. ScienceAsia. 36: 312-318.

4. **Dikit, P**., Methacanon, P., Visessanguan, W., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2010. Characterization of an unexpected bioemulsifier from spent yeast obtained from Thai traditional liquor distillation. Int. J. Biol. Macromol. 47: 465-470.

5. วิชุดา กล้าเวช, ฮายาตี เจ๊ะตาเห, ศิริพร เจ้ยทองศรี และ **ปวีณา ดิกิจ.** 2557. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและยับยั้งเอนไซม์แอลฟากลูโคซิเดสจากสารสกัดผักพื้นบ้านในจังหวัดพัทลุง. วารสารวิชาการและวิจัย มทร. พระนคร ฉบับพิเศษ สาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี.

6. **Dikit, P**., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2015. Survival of encapsulated potentially probiotic *Lactobacillus plantarum* D6SM3 with bioemulsifier derived from spent yeast in simulated gastrointestinal conditions. Songklanakarin J. Sci. Technol. Accepted.

การนำเสนอผลงานวิชาการ

1. **Dikit, P**., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2007. Extraction and purification of mannoprotein from spent yeast obtained from traditional liquor distillation. The 7th National Graduate Research Conference. Prince of Songkla University, Surat Thani Campus, Surat Thani, Thailand. 4-5 April 2007.

2. **Dikit, P.,** H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2008. The emulsification property of mannoprotein from spent yeast obtained from traditional liquor distillation. Commission on Higher Education Congress I. University staff Development Consortium. Ambassador City Jomtien, Pattaya, Chonburi, Thailand. 5-7 September 2008.

3. Maneerat, S., **Dikit, P**., Musikasang, H. and H-Kittikun, A. 2009. Mannoprotein from *Saccharomyces cerevisiae* KA01 obtained from Thai traditional liquor distillation: Extraction and characterization. The 9th Annual Meeting of the Thailand Research Fund. Holiday Inn Resort Reagent Beach, Cha-am, Petchburi, Thailand. 15-17 October 2009.

4. **Dikit, P**., H-Kittikun, A. and Maneerat, S. 2010. Survival of encapsulated probiotic *Lactobacillus plantarum* D6SM3 with bioemulsifier derived from spent yeast in simulated gastrointestinal conditions. The 22nd Annual Meeting of the Thai Society for Biotechnology. International Conference on Biotechnology for Healthy Living. Prince of Songkla University, Trang Campus, Thailand. 20-22 October 2010.

5. ฮายาตี เจ๊ะตาเห, ศิญาพร เจ้ยทองศรี, **ปวีณา ดิกิจ** และวิชุดา เกตุใหม่. 2555. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบจากผลมะเดื่อ. การประชุมวิชาการระดับชาติมหาวิทยาลัยทักษิณ ครั้งที่ 22. วิถีไทย วิถีอาเซียน วิถีแห่งความร่วมมือ. ณ ศูนย์ประชุมนานาชาติฉลองสิริราชสมบัติครบ 60 ปี. หาดใหญ่. สงขลา. 23-26 พฤษภาคม 2555.

6. **ปวีณา ดิกิจ**, มทิรา อวะภาค, วาสนา มู่สา และ อรนุช สุขอนันต์. 2556. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลจากน้ำตาลโตนดสด. การประชุมวิชาการระดับชาติ ครั้งที่ 5 “ฐานการวิจัยมหาวิทยาลัยกับการพัฒนาท้องถิ่น. ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา. 17-18 กรกฎาคม 2556.

7. Saimmai A, Petmeaun S, **Dikit P** and Maneerat S, 2013. Isolation and screening of exopolysaccharide-producing bacteria from mangrove sediment by using palm oil mill effluent as a substrate. TSB International Forum 2013. August 28-30, 2013. BITEC Bang Na, Bangkok, Thailand pp. 48-51.

8. Saimmai A, Petmeaun S, **Dikit P** and Maneerat S, 2013. Diversity of exopolysaccharide producing-bacteria from mangrove sediment in south of Thailand. TSB International Forum 2013. August 28-30, 2013. BITEC Bang Na, Bangkok, Thailand pp. 40-43.

9. **Dikit, P**., Riansa-ngawong, W., Chookaew, T., Maneerat, S., Hwanhlem, N., Kamcharoen, A. and Saimmai, A. 2015. Production and antimicrobial activity of biosurfactant from mangrove isolated *Rubrimonas Cliftonensis* NA 1. 8th TSAE International conference 17-19 March 2015. Bangkok International Trade and Exhibition centre, Bangkok, Thailand.

10. **Dikit, P**., Riansa-ngawong, W., Chookaew, T., Maneerat, S., Hwanhlem, N., Kamcharoen, A. and Saimmai, A. 2015. Production and characterization of biosurfactant produced by Ochrobactrum anthropi 2/3 using Durian seed powder as a novel substrate. 8th TSAE International conference 17-19 March 2015. Bangkok International Trade and Exhibition centre, Bangkok, Thailand.

11. **ปวีณา ดิกิจ**, เพ็ญทิพย์ แก้วจันทร์ และรัชฎา เหร็มอะ. 2558. สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการห่อหุ้มแบคทีเรียโปรไบโอติก Lactobacillus plantarum D6SM3 โดยเทคนิคเอกซ์ทรูชั่น. การประชุมวิชาการระดับชาติ ราชภัฏวิจัยครั้งที่ 3 “สหวิทยาการ งานวิจัย และนวัตกรรมอุดมศึกษาเพื่อการพัฒนาท้องถิ่นไทยก้าวไกลสู่อาเซียน”. ณ มหาวิทยาลัยราชภัฏนครศรีธรรมราช. 20-22 พฤษภาคม 2558.

ผู้ร่วมวิจัย

ชื่อ (ภาษาไทย) นายอทิพันธ์ เสียมไหม

ชื่อ (ภาษาอังกฤษ) Mr. Atipan Saimmai

ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ (พนักงานมหาวิทยาลัย)
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

ประวัติการศึกษา

ระดับปริญญา	อักษรย่อ	สาขาวิชา	ชื่อสถาบัน	ประเทศ
ตรี	วท.บ.	อุตสาหกรรมเกษตร (เกียรตินิยมอันดับ 2)	ม.สงขลานครินทร์	ไทย
เอก	ปร.ด.	เทคโนโลยีชีวภาพ	ม.สงขลานครินทร์	ไทย

ทุนการศึกษาและทุนวิจัยที่เคยได้รับ

ปี พ.ศ.	ทุนการศึกษาหรือทุนวิจัย	แหล่งทุน
2549	โครงงานสำหรับนักศึกษาปริญญาตรี (IRPUS)	สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
2551	อุตสาหกรรมเกษตรสู่ความเป็นเลิศ	มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
2551	ทุนโครงการเครือข่ายเชิงกลยุทธ์เพื่อการผลิตและพัฒนาอาจารย์ในสถาบันอุดมศึกษา	สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

ประวัติการทำงาน

ธันวาคม 2554 - ปัจจุบัน: อาจารย์สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร
คณะเทคโนโลยีการเกษตร
มหาวิทยาลัยราชภัฏภูเก็ต

การตีพิมพ์เผยแพร่ผลงาน

1. **Saimmai A**, Sobhon V, Maneerat S. 2011. Molasses a whole medium for biosurfactants production by *Bacillus* strains and their application. Applied Biochemistry and Biotechnology. 165(10): 315-335 (ISI impact factor 1.943).

2. **Saimmai A**, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Production of biosurfactant from a new and promising strain of *Leucobacter komagatae* 183. Annals of Microbiology. 62(1): 391-402 (ISI impact factor 1.549).

3. **Saimmai A**, Tani A, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Mangrove sediment, a new source of potential biosurfactant producing bacteria. Annals of Microbiology. 62(4): 1669-1679 (ISI impact factor 1.549).

4. **Saimmai A**, Kaewrueng J, Maneerat S. 2012. Used lubricating oil degradation and biosurfactant production by SC-9 consortia obtained from oil contaminated soil. Annals of Microbiology. 62(4): 1757-1767 (ISI impact factor 1.549).

5. **Saimmai A**, Rukadee O, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Biosurfactants production by *Bacillus subtilis* TD4 and *Pseudomonas aeruginosa* SU7 grown on crude glycerol obtained from biodiesel production plant as a sole carbon source. Journal of Sciencetific and Industrial Research. 71(6): 396-406 (ISI impact factor 0.505).

6. **Saimmai A**, Rukadee O, Onlamool T, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Isolation and functional characterization of a biosurfactant produced by a new and promising strain of *Oleomonas sagaranensis* AT18. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 28(10): 2973-2986 (ISI impact factor 1.262).
7. **Saimmai A**, Rukadee O, Onlamool T, Sobhon V, Maneerat S. 2012. Characterization and phylogenetic analysis of microbial surface active compounds-producing bacteria. Applied Biochemistry and Biotechnology. 168(5): 1003-1018 (ISI impact factor 1.893).

8. **Saimmai A**, Onlamool T, Sobhon V, Maneerat S. 2013. An efficient biosurfactant-producing bacterium *Selenomonas ruminantium* CT2, isolated from mangrove sediment

in south of Thailand. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 29(1): 87-102 (ISI impact factor 1.262) (Corresponding author).

9. **Saimmai A**, Udomsilp S, Maneerat S. 2013. Production and characterization of biosurfactant from marine bacterium of *Inquilinus limosus* KB3 grown on low-cost raw materials. Annals of Microbiology. 63(4): 1327-1339 (ISI impact factor 1.549). (Corresponding author).

10. Chooklin CC, Petmeaun S, Cheirsilp B, Maneerat S, **Saimmai A**. 2013. Utilization of palm oil mill effluent as a novel substrate for biosurfactant production by *Nevskia ramosa* NA3. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 35(2): 167-176 (SJR H-index 8) (Corresponding author).

11. Saisa-ard K, Maneerat S, **Saimmai A**. 2013. Isolation and characterization of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil industry and evaluation for biosurfactants production using low-cost substrates. Biotechnologia: Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology. 94(3): 275-284 (SJR H-index 4) (Corresponding author).

12. Noparat P, Maneerat S, **Saimmai A**. 2014. Utilization of palm oil decanter cake as a novel substrate for biosurfactant production from a new and promising strain of *Ochrobactrum anthropi* 2/3. World Journal of Microbiology and Biotechnology. Mar. 30(3): 865-877 (ISI impact factor 1.262) (Corresponding author).

13. Chooklin CC, Petmeaun S, Maneerat S, **Saimmai A**. 2014. Isolation and characterization of a biosurfactant from *Deinococcus caeni* PO5 by using jackfruit seed powder as a substrate. Annals of Microbiology. Sep. 64(3): 1007-1020 (ISI impact factor 1.549) (Corresponding author).

14. Noparat P, Maneerat S, **Saimmai A**. 2014. Application of biosurfactant from *Sphingobacterium spiritivorum* AS43 in the biodegradation of used lubricating oil. Applied Biochemistry and Biotechnology. Apr. 172(8): 3949-3963 (ISI impact factor 1.943) (Corresponding author).

15. Chooklin CC, Maneerat S, **Saimmai A**. 2014. Utilization of banana peel as a novel substrate for biosurfactant production by *Halobacteriaceae archaeon* AS65. Applied Biochemistry and Biotechnology. May. 173(2):624-645 (ISI impact factor 1.943). (Corresponding author).

16. Saisa-ard K, **Saimmai A**, Maneerat S. 2014. Characterization and phylogenetic analysis of biosurfactant-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils. Songklanakarin Journal of Science and Technology. Mar. - Apr. 36 (2): 163-175 (SJR H-index 8) (Corresponding author).

17. Chooklin CC, Petmeaun S, Maneerat S, **Saimmai A**. 2015. Diversity of biosurfactants-producing bacteria isolated from palm oil contaminated soils in palm oil industry. Indian Journal of Biotechnology. Article in press (ISI impact factor 0.477) (Corresponding author).

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY