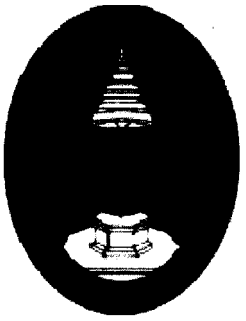


การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกจากไส้อั่วที่จำหน่ายใน จังหวัดปัตตานี

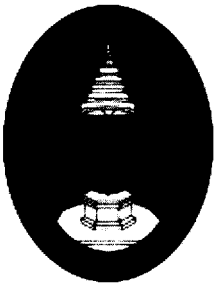
Isolation and Identification of Lactic Acid Bacteria from Sai Aua Available in Pattani Province

สาปียะ อาแว

ฮารีดา เจะเตะ

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา (Microbiology)
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

2558



ใบรับรองงานวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์

ชื่อเรื่องงานวิจัย การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากไส้อั่วที่จำหน่ายในจังหวัดปัตตานี

ชื่อผู้ทำงานวิจัย นางสาวสาปียะ อาแว
นางสาวฮารีดา เจะเตะ

คณะกรรมการสอบโครงการวิจัย

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ดร. นิศากร วิทจิตสมบูรณ์)

.....กรรมการสอบ
(อาจารย์สัลวา ตอปี)

.....กรรมการสอบ
(ดร. อัจฉรา เพิ่ม)

คณะกรรมการประจำสาขาวิชารับรองแล้ว

.....
(ดร. สายใจ วัฒนเสน)
ประธานโปรแกรมวิชา

.....
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทัศนา ศิริโชติ)
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เมื่อวันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ชื่อเรื่อง	การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกจากไส้อั่วที่จำหน่ายในจังหวัดปัตตานี
ชื่อผู้ทำวิจัย	นางสาวสาปียะ อาแว นางสาวฮารีดา เจะเตะ
อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย	ดร.นิศากร วิทจิตสมบูรณ์
ปริญญา	วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา
สถาบัน	มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ปีที่พิมพ์	2558

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างไส้อั่วที่จำหน่ายในจังหวัดปัตตานี โดยนำตัวอย่างไส้อั่วมาทำการเจือจาง จากนั้นนำความเข้มข้นที่ 10^{-2}, 10^{-3} และ 10^{-4} มาเกลี่ยบนอาหาร MRS agar ที่เติม 1% $CaCO_3$ คัดแยกเชื้อแต่ละไอโซเลตที่มีวงใสรอบโคโลนี นำไปศึกษาต่อทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมี จากการคัดแยกพบว่า มีเชื้อที่เจริญบนอาหาร MRS agar และสร้างกรดทั้งหมด 20 ไอโซเลต มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกัน เมื่อนำมาทดสอบเอนไซม์คะตะเลส พบว่าให้ผลลบ 15 ไอโซเลต นำไอโซเลตทุกไอโซเลตที่ให้ผลลบ ไปย้อมสีแกรม และศึกษาลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าทุกไอโซเลตติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน ท่อนสั้น และรี (Coccobacilli) การจัดเรียง-ตัวแบบเดี่ยว คู่ และสายโซ่ และเมื่อทดสอบคุณสมบัติการเคลื่อนที่ การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส การสร้างอินโดล การสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส การรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ และทดสอบการหมักย่อยน้ำตาล พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากไส้อั่วใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus*

คำสำคัญ: ไส้อั่ว แบคทีเรียแลคติก การคัดแยกเชื้อ การจัดจำแนกเชื้อ *Lactobacillus*

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงผ่านไปด้วยดี ต้องขอขอบพระคุณ ดร.นิศากร วิทจิตสมบูรณ์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่กรุณาเสียสละเวลาในการให้คำปรึกษา แนะนำแนวทาง และขั้นตอนการศึกษา ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขงานวิจัยนี้จนมีความถูกต้องสมบูรณ์ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณอาจารย์ประจำวิชาวิจัยเฉพาะทาง และคณาจารย์ในโปรแกรมวิชาจุลชีววิทยาทุกท่านที่ให้คำแนะนำในการแก้ไขจุดบกพร่องต่างๆ

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณ บิดา มารดา และพี่สาว ที่คอยสนับสนุน และเป็นกำลังใจให้เสมอมา ขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ รวมทั้งเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการที่คอยให้คำแนะนำ และเป็นกำลังใจให้ ทั้งยังช่วยอำนวยความสะดวกในการดำเนินงานตลอดมา

สาปียะ อาแว
ฮารีดา เจะเตะ
ธันวาคม2558

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

เลข Bib# 1137093
วันที่ 3 ก.พ. 2559
เลขเรียกหนังสือ วิ ว๗๑.3 ส25ก

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	**(ก)**
กิตติกรรมประกาศ	**(ข)**
สารบัญ	**(ค)**
สารบัญตาราง	**(จ)**
สารบัญภาพ	**(ฉ)**
บทที่ 1 บทนำ	**1**
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
สมมติฐานของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ตัวแปรของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	**4**
ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลกติก	4
อนุกรมวิธานของแบคทีเรียแลกติก	5
ลักษณะและวิธีการที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติก	9
กระบวนการหมักกรดแลกติก	12
ประโยชน์ของแบคทีเรียแลกติกที่มีต่ออาหารหมัก	14
การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียแลกติก	15
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	17
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย	**20**
อุปกรณ์และสารเคมี	20
วิธีการดำเนินการวิจัย	22

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย	**24**
การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก	24
การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส	25
การย้อมสีแกรมและการย้อมเอนโดสปอร์	25
การทดสอบทางชีวเคมี	26
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	**28**
สรุปผลการวิจัย	28
ข้อเสนอแนะ	28
เอกสารอ้างอิง	**29**
ภาคผนวก	**32**
ภาคผนวก ก	33
ภาคผนวก ข	36
ภาคผนวก ค	38
ภาคผนวก ง	40
ภาคผนวก จ	42
ประวัติย่อผู้วิจัย	**48**

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 การแบ่งกลุ่มของสมาชิกในจีนัส *Lactobacillus*	7
2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญบนอาหาร MRS agar ที่เติม 1% $CaCO_3$	24
3 การติดสีแกรม ลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัว และการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียแลคติก ที่คัดแยกได้จากไส้อั่ว จังหวัดปัตตานี	26
4 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของจุลินทรีย์ที่คัดแยกได้	28

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. ลักษณะของแบคทีเรียแลคติก	5
2. กระบวนการหมักแบบ homofermentative	13
3. กระบวนการหมักแบบ heterofermentative	14
4. แนวทางการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกรดแลกติกในการผลิตอาหารหมักชนิดต่างๆ	16
5. จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร MRS agar ที่เติม 1.0% $CaCO_3$	25

บทที่ 1

บทนำ

1.ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันผู้บริโภคให้ความสำคัญอย่างยิ่งในเรื่องความปลอดภัยของอาหาร รวมทั้งมีความสนใจเกี่ยวกับอาหารเพื่อสุขภาพกันมากขึ้น ทำให้ผู้ผลิตอาหารต้องลดปริมาณการใช้สารกันเสียลง แล้วนำวิธีอื่นเข้ามาช่วยในการยืดอายุการเก็บรักษาอาหารแทน หนึ่งในวิธีการยืดอายุเพื่อเก็บรักษาอาหารให้ได้นานขึ้น คือ การหมักโดยการใช้เชื้อจุลินทรีย์ ตัวอย่างอาหารหมัก เช่น โยเกิร์ต ผักดอง ผลไม้ดอง แหนม ไส้กรอก-เปรี้ยว ปลาหมักชนิดต่างๆ หน่อไม้ดอง (ธนากร บำรุงภัคดี และบวรศักดิ์ ลีลานนท์, 2554) รวมทั้งไส้อั่ว ซึ่งไส้อั่ว เป็นอาหารพื้นบ้านทางภาคเหนือที่รู้จักกันดี จัดเป็นไส้กรอกชนิดบดหยาบ จัดเป็นอาหารหลักของงานขันโตกแบบพื้นเมืองล้านนาที่ใช้ต้อนรับแขกเมือง เป็นหนึ่งในบรรดาของฝากที่ขึ้นชื่อ (สุจินดา ศรีวัฒนะ ,ม.ป.ป) และยังเป็นที่นิยมกันอย่างแพร่หลายทางภาคใต้ของประเทศไทย

ไส้อั่วทำมาจากไส้ของสัตว์ที่มีการนำสิ่งของมายัดไว้ในไส้ การทำไส้อั่วนิยมทำกันด้วยเนื้อประเภทต่าง ๆ เช่น เนื้อวัว เนื้อหมู โดยผ่านกระบวนการหมักที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์ปรับสภาวะของอาหารให้เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์ที่ต้องการ แต่ไม่เหมาะสมกับการเจริญและเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์ที่เป็นอันตรายในกระบวนการผลิตไส้อั่วไม่มีการให้ความร้อน แต่ใช้กระบวนการหมักในภาชนะปิดสนิท เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักโดยเชื้อจุลินทรีย์จำพวกแลคติกที่สามารถเจริญได้ดีในสภาวะที่มีความเข้มข้นของโซเดียม-คลอไรด์ (NaCl) สูง และทนต่อสภาวะที่มีความเป็นกรด-เบส (pH) ต่ำกว่า 5 และอุณหภูมิสูงกว่า 37-40 องศาเซลเซียส

แบคทีเรียแลกติก เป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการผลิตอาหารหมักดองแล้ว ยังมีบทบาทอื่น ๆ ที่สำคัญ เช่น ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้แก่ *Bacillus subtilis, Micrococcus pyogenes, Escherichia coli, Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas* sp. เป็นต้น สามารถสร้างกรดแลกติกที่ทำให้ pH ของอาหารลดลง และยังสามารถผลิตสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้ออื่นอีกด้วย ได้แก่ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เป็นสารที่มีสมบัติในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ไดอะซิติล (Diacetyl) เป็นสารที่ให้กลิ่นเฉพาะในผลิตภัณฑ์นมหมัก และยังมีสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์อีกด้วย แบคเทอริโอซิน (Bacteriocin) คือ สารโปรตีนโมเลกุลใหญ่ ซึ่งมีความสามารถในการทำลายแบคทีเรียได้รวดเร็ว รูทีริน (Ruterin) สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ได้หลายชนิด ทั้งแบคทีเรียแกรมบวก แกรมลบ ยีสต์ รา โพรโตซัว และจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคอาหารเป็นพิษ (บุษกร อุตรภิชาต, 2548)

การใช้หัวเชื้อแลคติกมีความสำคัญในกระบวนการหมักอาหาร เนื่องจากสามารถผลิตกรดและสารที่ให้กลิ่นและรสที่ดี สามารถสร้างสารได้หลายชนิด ได้แก่ เอทานอล กรดอินทรีย์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) คาร์บอนไดออกไซด์ และไดอะซิทิล (อุษณีย์ อภิบาลแบ, 2556) เป็นต้น การใช้หัวเชื้อในกระบวนการหมักส่งผลดีให้กระบวนการหมักเกิดได้เร็วขึ้นและให้รสชาติที่ดีขึ้น

เนื่องจากไส้อั่วเป็นอาหารหมักชนิดหนึ่งที่นิยมบริโภคและจำหน่ายในจังหวัดปัตตานี รวมถึงจังหวัดอื่น ๆ ทั่วประเทศไทย แบคทีเรียแลกติกมีคุณสมบัติและประโยชน์มากมาย จึงคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากไส้อั่วในพื้นที่จังหวัดปัตตานี ซึ่งยังไม่มีการรายงานผลการศึกษามาก่อน และผลการศึกษายังสามารถต่อยอดในการผลิตหัวเชื้อในการหมักไส้อั่วในท้องถิ่นได้ต่อไป

2. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากไส้อั่ว

3. สมมติฐาน

พบแบคทีเรียกลุ่มแลคติกจากไส้อั่วในจังหวัดปัตตานี

4. ขอบเขตงานวิจัย

เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง

ตัวอย่างเก็บจาก 2 ตลาด ได้แก่

4.1 ตลาดสะพานบางปู ตำบลบางปู อำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี

4.2 ตลาดหน้าอำเภอยะหริ่ง ตำบลยามู อำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี

สถานที่ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการชีววิทยา ศูนย์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

สามารถคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกได้อย่างน้อย 10 ไอโซเลต

5. ตัวแปร

ตัวแปรต้น	แบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากไส้อั่ว
ตัวแปรตาม	ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณสมบัติทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้
ตัวแปรควบคุม	ระยะเวลาการหมัก อุณหภูมิ และอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกและจัดจำแนกได้ ศึกษาคุณสมบัติการเป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักท้องถิ่นได้ในอนาคต

2. เป็นความรู้พื้นฐานในการนำมาประยุกต์ใช้ในระดับอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การหมักเนื้อประเภทต่างๆ การหมักผักและผลไม้เป็นต้น

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (lactic acid bacteria : LAB) จัดอยู่ใน family Lactobacillaceae ย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลมและรูปท่อน มีการจัดเรียงตัวแบบคู่ คู่สี่ และโซ่ยาว เป็นต้น ไม่สามารถสร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต จะได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาล โดยได้จากกระบวนการ substrare-level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน (fastidious microorganism) เช่น วิตามิน (vitamin) กรดอะมิโน (amino acid) ไพริมิดีน (pyrimidine) เพปโตน (peptone) อะซเตต (acetate) และทวีน80 (tween 80) เป็นต้น

แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) และมีออกซิเจนน้อย ๆ (microaerophilic) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงพีเอช (pH) ที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่พีเอชน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง

แบคทีเรียแลคติกแต่ละสปีชีส์สามารถปรับตัวเพื่อการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน จึงทำให้พบเชื้อกลุ่มนี้กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในคน และสัตว์ โดยเฉพาะบริเวณช่องปาก ลำไส้ พบในแมลง และในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ (อัจฉรา เพิ่ม, 2549)

แบคทีเรียแลคติก เป็นแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ส่วนใหญ่ผ่านการคัดเลือกว่ามีความปลอดภัย (GRAS =Generally Recognized As Safe) และมีการใช้เป็นกล้าเชื้อในอุตสาหกรรมอาหารหมักต่าง ๆ เช่น เนย แข็ง โยเกิร์ต แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว ผักผลไม้ดอง เป็นต้น แบคทีเรียแลคติกมีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมัก โดยกิจกรรมการหมักก่อให้เกิดสารเมแทบอลิสม เช่น กรดอินทรีย์ (organic acid) เอทานอล (ethanol) ไดแอซีทิล (diacetyl) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) และแบคเทอริโอซิน (bacteriocin) และยังสามารถย่อยน้ำตาลให้เป็นกรด ทำให้เกิดรสชาติที่ต้องการในผลิตภัณฑ์อาหารหมักหลายชนิด แบคทีเรียกรดแลคติกโดยเฉพาะในกลุ่ม *Lactococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* มีบทบาทในการหมักอาหารและเครื่องดื่มหลายชนิดด้วยกัน เช่น นมเปรี้ยว เนยชนิดต่าง ๆ ผัก ผลไม้ดอง และผลิตภัณฑ์เนื้อหมักชนิดต่าง ๆ และมีคุณสมบัติในการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคอาหารเป็นพิษที่อาจปนเปื้อนในระหว่างกระบวนการผลิตได้ เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Escherichia coli* เป็นต้น (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

ภาพที่ 1 ลักษณะของแบคทีเรียแลคติก

A : ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

B : ลักษณะของแบคทีเรียแลคติกภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ที่มา: A : http://gsbooks.gs.kku.ac.th/54/grc12/files/bmp15.pdf

B : https://it.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_sakei

นอกเหนือจากความสามารถในการผลิตอาหารหมักที่มีรสเปรี้ยวหลายชนิดแล้ว สามารถใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นเชื้อมาตรฐานในการวิเคราะห์วิตามินบางชนิด เช่น วิตามินบี 12 บางสายพันธุ์ของเชื้อกลุ่มนี้ยังสามารถใช้เป็นอาหารเสริมสัตว์แทนยาปฏิชีวนะ โดยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น ๆ ได้ เช่น *Bacillus subtilis, Brochothrix thermosphacta, Clostridium botulinum, C. pefringens, C. sporogenes, Escherichia coli, Klebsiella* spp., *Listeria monocytogenes, Micrococcus pyogenes, Proteus* spp., *Salmonella* spp., *Shigella sonnei, Staphylococcus aureus* และ *Yersinia pseudotuberculosis* เป็นต้น (บุษกร อุตรภิชาต, 2548)

2. อนุกรมวิธานของแบคทีเรียแลคติก

การนิยามและการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก (Lactic acid bacteria; LAB) มีการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่องโดยเฉพาะช่วง 10-20 ปีที่ผ่านมา ในอดีตนั้น หมายถึงกลุ่มแบคทีเรียที่ทำให้น้ำนมเปรี้ยวจากการผลิตกรด ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบ กลุ่มโคลิฟอร์มด้วย ปัจจุบัน แม้ไม่มีนิยามที่ชัดเจนและเป็นเอกฉันท์ แต่ลักษณะพื้นฐานซึ่งยอมรับทั่วไปของแบคทีเรียกลุ่มนี้ คือ เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สามารถผลิตไซโตโครม ทนต่อสภาวะที่มีอากาศ (aerotolereant) ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญเติบโต และผลิตกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์หลังจากการหมักน้ำตาล อย่างไรก็ตามแบคทีเรียกลุ่มนี้ บางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์คะตะเลสเทียม (pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่มพอร์ไฟริน (porphyrin group) และในสภาวะจำกัดอาหารกลุ่ม *Streptococci* เช่น *Streptococcus bovis* มีการผลิตกรดแลคติกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

แบคทีเรียแลคติกสามารถจำแนกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่

2.1 *Lactobacillus*

เป็นแบคทีเรียแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟีโนไทป์ คุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีระ เนื่องจากความแตกต่างของ mol % G+C ภายในสูง คือ ระหว่าง 32-53 % พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น เยื่อเมือกของมนุษย์และสัตว์ พืชและน้ำทิ้ง เป็นต้น บางสปีชีส์เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน หรือทรงรี (coccobacilli) ต้องการอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ดังตารางที่ 1

กลุ่ม A Obligately homofermentative lactobacilli แบคทีเรียในกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสได้เป็นกรดแลคติกผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ได้มากกว่า 85% เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้มีเอนไซม์ FDP aldolase แต่ไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตได้ เนื่องจากขาดเอนไซม์ phosphoketlase ประกอบด้วย 17 สปีชีส์

กลุ่ม B Facultative homofermentative lactobacilli แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสได้ปีนกรดแลคติกผ่านวิธี EMP และสามารถผลิตเอนไซม์ FDP aldolase และ phosphoketlase จึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสและกลูโคเนตเป็นกรดแลคติกและกรดอะซิติกได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

กลุ่ม C Obligately heterofermentative lactobacilli แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถี phospholuconate ได้เป็นกรดแลคติกกรดอะซิติก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้แบคทีเรียยังสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสผ่านวิถีนี้ได้เช่นกัน (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

2.2 *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 – 1.2 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ หรือคู่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายสปีชีส์เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์ และบางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20–41 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มี mol% G+C ระหว่าง 34 – 46%

ตารางที่ 1 การแบ่งกลุ่มของสมาชิกในจีนัส ***Lactobacillus***

คุณสมบัติของ *Lactobacillus*	**กลุ่ม A**	**กลุ่ม B**	**กลุ่ม C**
หมักเพนโทส	-	+	+
สร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส	-	-	+
สร้างคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคเนต	-	+	+
สร้าง FDP aldolase	+	+	-
สร้าง phoshoketolase	-	+	+
ตัวอย่างเชื้อ	*Lb. acidophilus*	*Lb. casei*	*Lb. brevis*
	Lb. delbruckii	*Lb. curvatus*	*Lb. buchneri*
	Lb. helviticus	*Lb. plantarum*	*Lb. fermentum*
	Lb. salivarius	*Lb. sake*	*Lb. ruteri*

ที่มา : Axelsson (1998)

2.3 *Vagococcus*

เป็นแบคทีเรียแลคติกซึ่งเคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธ์) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Vogococcud fluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน *Streptococci* กลุ่ม N และ *V. salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอนที่เป็นโรค

2.4 *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 – 1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส หมักใช้เป็นกล้าเชื้อ (starter) ในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45องศาเซลเซียส พบได้ในแหล่งต่าง ๆ เช่น ผักกาด ถั่ว หญ้า มันฝรั่ง น้ำนมดิบ ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lc. lactis ssp. lactic, Lc. lactisssp. cremoris, Lc. lactis ssp. hordniae, Lc. garvieae, Lc. plantarum, Lc. Raffinolactis* และ*Lc.Piscium* มี mol% G+C ระหว่าง 34 – 43%

2.5 *Enterococcuc*

เซลล์มีรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้น ๆ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญที่ 10 หรือ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์คะตะเลสเทียมได้ และบางสปีชีส์ทำให้เกิดโรค ปัจจุบัน

ประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Enterococcus faecalis, Ent. Avium, Ent. Gallinarum* และ*Ent. Cecorum* มี mol% G+C ระหว่าง 37 - 40%

2.6 *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36 – 1.43 ไมครอน แบ่งตัวลักษณะ 2 ทิศทางในระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็น 4 เซลล์ติดกันคล้ายจัตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไม่มีอากาศ ผลิตกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการหมักกลูโคส บางสปีชีส์ทำให้เบียร์และไวน์เสีย ปัจจุบันประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก่ *Pediococcus acidilactici, P. damonosus, P. dextrinicus, P. inopinatus, P. parvulus, P. pentosaceus* มี mol% G+C ระหว่าง 34 - 44%

2.7 *Tetragenococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิม คือ สปีชีส์ *P. halaphilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหาร ซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18% และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ*Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม

2.8 *Aerococcus*

มีลักษณะการแบ่งตัวเหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homori* และ *P. urinae-equi* ตามลำดับโดย *A . viridians* ทำให้กุ้งลอบสเตอร์เกิดโรคและเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในคน

2.9 *Leuconostoc*

เซลล์มีสัณฐานขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารซึ่งมีกลูโคส เซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายกลุ่ม *lactobacilli* แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่ หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติกชนิด D (-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง ปัจจุบันประกอบด้วย 8 สปีชีส์ *Leuconostoc mesenteroides, Leuc. lactis, Leuc. Gelidum, Leuc. carnosum, Leuc. pseudomesenteroides, Leuc. citreum, Leuc. Argentinum* และ *Leuc. Fallax* มี mol% G+C ระหว่าง 37 – 40%

2.10 *Oenococcus*

ประกอบด้วยสปีชีส์เดียว คือ *Oenococcusoeni* ซึ่งเปลี่ยนจาก *Leuc. Oenos* ด้วยคุณสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ : ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น และลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน

2.11 *Weissella*

ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งมีลักษณะคล้าย *Leuconostoc* (leuconostoclike bacteria) รูปร่างเป็นแท่งและกลม มีสปีชีส์ซึ่งเดิมอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Leuc. Paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*) *Lactobacillus confuses* (*W. confusus*) *Lb. halotolerans* (*W. halotoleran*) *Lb. kandleri* (*W. kandleri*) *Lb. minor* (*W. minor*) *Lb. viridescens* (*W. viridescen*) และสปีชีส์ใหม่ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica*

2.12 *Carnobacterium*

เซลล์มีรูปร่างท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลาง หรือท่อนเรียว (slender rod) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 – 0.7 ไมครอน และยาว 1.1 – 3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการจัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติก ชนิด L(+) คาร์บอนไดออกไซด์ อะซีเตด และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ ได้แก *Carnobacterium divergen, C. piscicola, C. mobile, C. funditum* และ*C. Alterfunditum* มีmol % G+C ระหว่าง 31.6 - 37.2 %

3. ลักษณะและวิธีการที่ใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก

3.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (Mophology)

พิจารณาจากรูปร่างเซลล์ การจัดเรียงตัว การเคลื่อนที่ การย้อมติดสีแกรม การสร้างแคปซูล พบว่า จีนัส *Pidiococcus, Lactococcus, Steptococcus* และ *Enterococcus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่ใกล้เคียงกัน สามารถแยกได้จากจีนัสอื่นได้ ในขณะที่จีนัส *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* ไม่สามารถแยกออกจากกันได้ *Lactobacillus* มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างออกไปจากกลุ่ม *Bifidobacterium* และแบคทีเรียแลคติกจีนัส *Streptococci* (*Lactococcus, Enterococcus* และ *Steptococcus*) อย่างชัดเจน อย่างไรก็ตาม สภาวะการเจริญและระยะเวลาในการเจริญของเซลล์ อาจมีผลต่อลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.2 ลักษณะทางสรีระวิทยา (Physiology)

เกี่ยวข้องกับความต้องการออกซิเจน อุณหภูมิ ความเข้มข้นของอิออน pH และ Hydrostatic pressure ใช้แยกความแตกต่างระหว่าง *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* โดย *Carnobacterium* ไม่สมารถเจริญได้ที่ pH 4.5 หรือบนอาหารแข็งแอซีเทต แต่สามารถเจริญได้ที่ pH 9.0 สำหรับการแยกความแตกต่างของเชื้อในกลุ่มใหญ่ โดยวิธีการทดสอบทางสรีระวิทยาอาจไม่เพียงพอ อาจต้องใช้วิธีการทดสอบอื่น ๆ เพิ่มเติม (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.3 การหมักคาร์บอน (Carbohydrate fermentation)

อาศัยความสามารถของแบคทีเรียแลคติกแต่ละชนิดในการใช้สารอาหารและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากแมเทบอลิสึม โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้น และรูปแบบการหมักสารประเภท

คาร์โบไฮเดรตจากการเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ในอาหารเพาะเชื้อที่ใส่ธาตุอาหารบางอย่างลงไป แล้วสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในอาหารเพาะเชื้อ เช่น การเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเพาะเชื้อ การเกิดกรด การเกิดก๊าซ และการเกิดสารบางชนิด เป็นต้น (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.4 ส่วนประกอบของผนังเซลล์ (Cell wall composition)

อาศัยลักษณะการมีหรือไม่มีผนังเซลล์ เช่น meso-diaminoopimelicacid สามารถตรวจสอบโดยใช้วิธี thin-layer chromatography ซึ่งเหมาะสำหรับกรณีในจีนัสที่มีสายพันธุ์อยู่เป็นจำนวนมาก เช่น ลักษณะเด่นของผนังเซลล์จีนัส *Lactobacillus* มีการจัดเรียงตัวของกรดอะมิโนแบบ lysine-denylalanine-aspartate (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.5 Electrophoretic mobility of lactate dehydrogenase

ในกระบวนการหมัก แบคทีเรียแลคติกสามารถผลิตกรดแลคติกได้ชนิด D,L หรือทั้ง 2 ชนิด ทั้งนี้ขึ้นกับการมีเอนไซม์ NAD^+ -dependent lactate dehydrogenase (nLDX) ชนิด D-nLDH หรือ L-nLDH ซึ่งแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีรูปแบบของเอนไซม์แต่ละชนิดต่างกัน (Axelsson, 1998) ดังนั้น จึงสามารถจำแนกแบคทีเรียได้ โดยอาศัยหลักของวิธี gelelectrophoresis เพื่อจำแนกเอนไซม์ lactate dehydrogenase (LDH) บน starch gel หรือ polyacrylamine gel ใช้จำแนกความแตกต่างของเชื้อที่มีสายพันธุ์ใกล้เคียงกันมาก เช่น *Lb. crispatus, Lb. gallinarum, Lb. gasseri* และ *Lb. johnsonii.* (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.6 SDS-PAGE of wholen cell protein

อาศัยหลักการเชื้อที่มีสายพันธุ์ที่ต่างกันจะให้รูปแบบของโปรตีนที่ไม่เหมือนกัน โดยการเปรียบเทียบลักษณะของโปรตีนทั้งภายในเซลล์ ซึ่งใช้ sodium dodecyl sulphatepolyacrylamine gel electrophoresis (SDS-PAGE) สามารถทำได้ง่าย รวดเร็ว ให้ผลถูกต้องแม่นยำ ในระดับสปีชีส์และสับสปีชีส์ สามารถช่วยในการจำแนกเชื้อที่มีปัญหาในการแบ่งหมวดหมู่ได้ เช่น *Lactobacillus kefir, Lb. ruteri, Leuconostoc* และ *Lactococcus* (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.7 การศึกษาเบสองค์ประกอบของดีเอ็นเอ (DNA base composition/ DNA-DNA hybridization)

เป็นการศึกษาลักษณะทางพันธุกรรมของแบคทีเรีย โดยการเปรียบเทียบเบส องค์ประกอบของดีเอ็นเอ ซึ่งแสดงในรูปของ mol% G+C พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ในสปีชีส์เดียวกันจะมีค่าmol% G+C ใกล้เคียงกัน แต่บางครั้งแบคทีเรียที่ไม่สัมพันธ์กันอาจมีค่า mol% G+C ใกล้เคียงกันได้ ดังนั้นวิธีการจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่ถูกต้องและแม่นยำกว่า คือ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ โดยการศึกษาดีเอ็นเอที่สามารถเข้าคู่กันได้ (DNA-DNA hybridization) อาศัยหลักการคือ ดีเอ็นเอจากสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันจะมีความเหมือนกันและสามารถเข้าคู่กันได้ วิธีนี้ทำโดยนำชิ้นส่วนดีเอ็นเอที่จะใช้เป็น probe มาติดฉลาก ซึ่งอาจติดโดยใช้สารกัมมันตรังสี (radioactive label) หรือสามารถใช้สารปลอดรังสี (non-radioactive label) จากนั้นนำ probe ที่ได้ไปทำ hybridization กับดีเอ็นเอตัวอย่างที่ต้องการตรวจสอบ ถ้าสามารถเข้าคู่กันได้

จะปรากฏสัญญาณ (signal) ขึ้นมาและวัดเปอร์เซ็นต์ความเหมือนหรือคล้ายกัน (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.8 การศึกษาวิเคราะห์ลำดับเบสของ rRNA (rRNA sequence)

วิธีนี้ใช้จำแนกเชื้อในระดับสปีชีส์ โดยการวิเคราะห์ลำดับของ rRNA (rRNA sequence) มีการนำมาใช้หลายรูปแบบ เช่น การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนส์ 16S rRNA และ235 rRNA นอกจากนี้ได้ศึกษาความสัมพันธุ์ระหว่าง *Leuconostoc* sp. และ *Lactobacillus* sp. บางสายพันธุ์โดยวิธีนี้เช่นกัน (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.9 ปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (Polymerase Chain Reaction; PCR)

วิธีนี้นิยมใช้กันในปัจจุบัน โดยอาศัยการเพิ่มปริมาณ DNA ที่มีอยู่ให้มีปริมาณเพิ่มขึ้น รวมทั้งสารพันธุกรรมชนิดอื่น ๆ ด้วย ปัจจุบันได้มีการพัฒนาวิธีการ PCR ให้มีประสิทธิภาพมากยิ่งขึ้น เช่น การใช้เอนไซม์ reverse transcriptase เพื่อเปลี่ยน RNA ให้เป็น DNA ก่อนการเข้าสู่ขั้นตอน PCR นอกจากนี้ วิธี Randomly Amplified Polymorphic DNA (RADP) เป็นอีกรูปแบบหนึ่งที่มีการใช้ ไพรเมอร์เดี่ยวแบบอิสระเพื่อจับกับสาย DNA template ที่ตำแหน่งใดก็ได้ที่สามารถเข้าคู่กันได้ และเพิ่มจำนวน DNA ได้ทันที ทำให้เกิดแบบแผนของ DNA ที่เกิดขึ้น (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.10 เซรุ่มวิทยา (serology)

เป็นวิธีการสำคัญในการแยกและจำแนกเชื้อในจีนัส *Streptococcus* ที่ก่อให้เกิดโรคในมนุษย์และสัตว์ โดยอาศัยคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนที่จำเพาะของผนังเซลล์ที่แตกต่างกัน ซึ่งทำให้แบ่งเป็นกลุ่ม ซึ่งขึ้นอยู่กับคุณสมบัติการเป็นแอนติเจนขององค์ประกอบของเซลล์แบคทีเรีย เช่น การมีแอนติเจนที่เป็นสารประกอบพอลิแซคคาไรด์ที่ผนังเซลล์ จัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม A และ G หรือการมีกรดไทโคอิกระหว่างชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ และผนังเซลล์ชั้นในจัดจำแนกได้เป็นกลุ่ม D เช่น *Streptococcus pyrogenes* เป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดอาการเจ็บคอ จัดอยู่ในกลุ่ม A ส่วน *S. faecalis* เป็นเชื้อที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในทางเดินปัสสาวะ จัดอยู่ในกลุ่ม D ส่วน *Lactobacillus* เมื่อใช้ลักษณะทางเซรุ่มวิทยา สามารถแบ่งกลุ่มได้ 7 กลุ่ม ตั้งแต่ A-G ตามชนิดของแอนติเจน (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.11 การศึกษารูปแบบพลาสมิด (plasmid profile)

แบคทีเรียแลคติกบางชนิดจะมีพลาสมิดอยู่ในเซลล์ ซึ่งจะควบคุมคุณสมบัติพิเศษบางอย่างของเชื้อ เช่น การผลิตเมือก การผลิตสารยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น โดยพลาสมิดของเชื้อชนิดเดียวกันจะมีจำนวน ขนาด และลำดับเบสที่เหมือนกัน เมื่อแยกพลาสมิดออกจากเซลล์นำมาตัด โดยใช้เอนไซม์ตัดจำเพาะที่ทราบการตัดตำแหน่งที่แน่นอน จึงนำมาทำเจลอิเล็กโทรโฟลิซิส (gel electrophoresis) โดยถ้าเป็นเชื้อชนิดเดียวกันจะมีรูปแบบการเคลื่อนที่ที่เหมือนกัน ความหลากหลายของจำนวนและขนาดของพลาสมิดของแบคทีเรียแลคติกในชนิดเดียวกันจะใช้เป็นลักษณะสำคัญสำหรับการกำหนดลักษณะ และใช้จำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกออกจากกัน (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

3.12 Chemotaxonomic markers

การจัดจำแนกด้วยวิธีนี้ พิจารณาจากการสร้างสารเคมีที่จำเพาะ เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ ได้แก่ สาร quinine เช่น menauinones และ ubiquinones ซึ่งจะตรวจสอบปริมาณของสารชนิดนี้โดยวิธี High Pressure Liquid-Chromatography (HPLC) และการวิเคราะห์ Fatty Acid Methyl Ester (FAME) โดยวิธี Gas-liquid Chromatography (GC) (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548)

4.กระบวนการหมักกรดแลคติก (Lactic fermentation)

แบคทีเรียแลคติกสร้างพลังงานจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เกิดกรดแลคติกจากปฏิกิริยา 2 วิถี คือ วิถีที่ได้แลคเตทเพียงอย่างเดียว เรียกว่า โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) และวิถีที่ได้แลคเตทร่วมกับสารอื่นในปริมาณที่ใกล้เคียงกัน เรียกว่า เฮทเทนโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative)

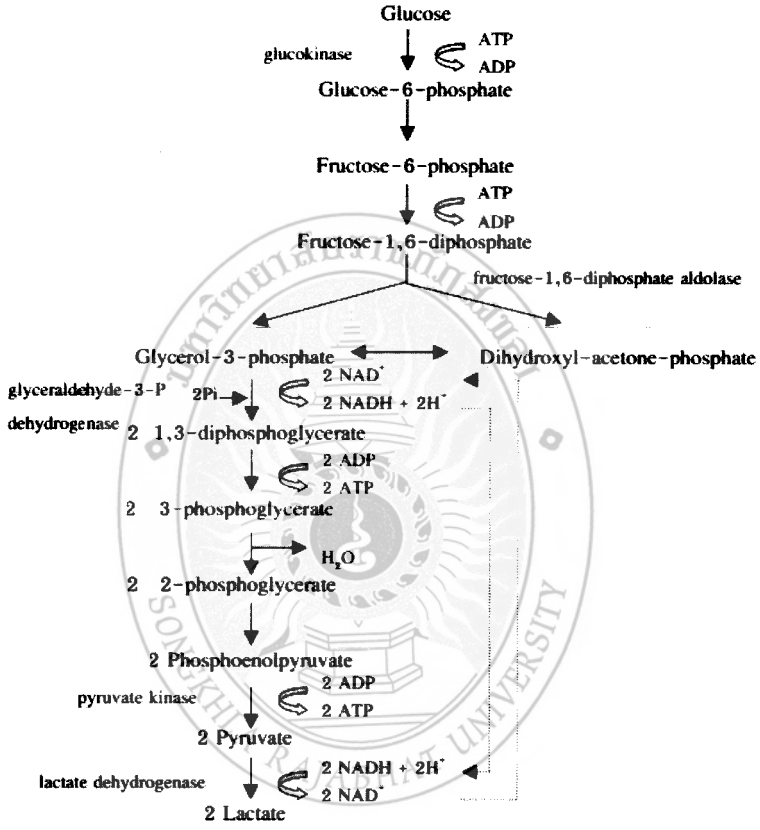
4.1 การหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative)

เป็นการหมักที่ได้แลคเตทอย่างเดียวเป็นผลผลิตสำคัญผ่านกระบวนการไกลโคไลซีส (Emden-Meyerhof-Parnasglycoytic pathway) หรือ EMP pathway เริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม (C-6) ถูกเติมฟอสฟอรัสและเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเกิดขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) จะเข้าทำปฏิกิริยาเป็นผลให้โมเลกุลกลูโคสแตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนไปเป็นไพรูเวทโดยเกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุลจากการหมักกลูโคส 1 โมเลกุล (เนื่องจากมีการเติมฟอสฟอรัสให้กับซับสเตรต 2 แห่ง) ในขั้นสุดท้ายเป็นการริดิวซ์ไพรูเวทเป็นแลคเตท ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้ NAD^+ กลับคืนมาจากที่ใช้ไปในการออกซิเดชันกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต (ดังภาพที่ 1) แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มที่มีเมแทบอลิสมแบบ homofermentative ได้แก่ *Enterococcus, Streptococcus, Lactococcus, Vagococcus, Tetranococcus* และบางกลุ่มของ *Lactobacillus* ได้แก่ *Lb. plantarum* เป็นต้น

4.2 การหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative)

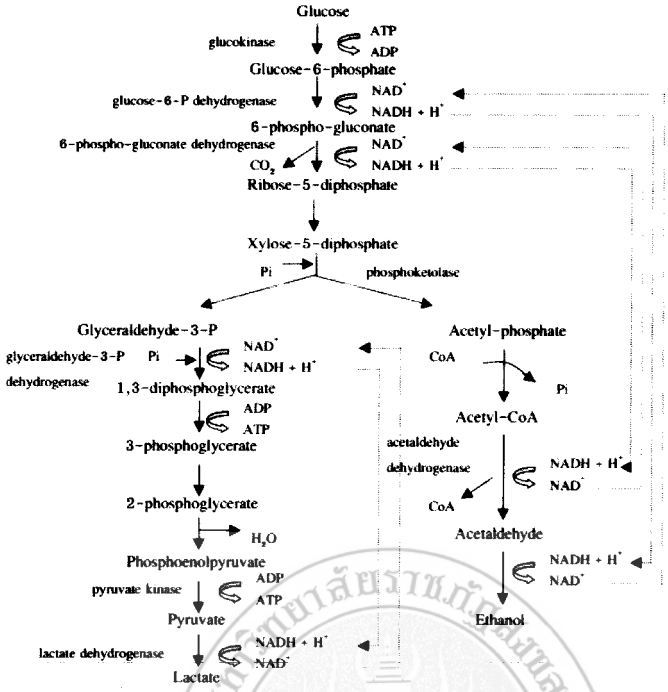
เป็นการหมักที่ได้แลคเตท เอทธานอล หรืออะซิเตทและคาร์บอนไดออกไซด์จากกลูโคส เนื่องจากแบคทีเรียขาดเอนไซม์อัลโดเลส จึงเปลี่ยนรูปจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ไปเป็นเพนโตส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการสร้างโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชันและดีคาร์บอกซิเลชันร่วมด้วยน้ำตาลที่มี 5 อะตอมนี้จะถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟต (ซึ่งเป็นสารประกอบฟอสเฟตที่มีคาร์บอน 3 อะตอม) และอะเซทติลฟอสเฟต โดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase) กลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตจะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท เช่นเดียวกับการเกิดไกลโคไลซีสในการหมักโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (แต่เนื่องจากการหมักแบบเฮทเทอโรเฟอร์เมนเททีฟมีกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1 โมเลกุลจึงเกิด ATP เพียง 1 โมเลกุล) ส่วนอนาคตของอะเซทติลฟอสเฟตนั้น ขึ้นอยู่กับว่าจะมีสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ด้วยหรือไม่ ในสภาวะที่ขาดตัวรับอิเล็กตรอนอะเซทติลฟอสเฟตจะทำหน้าที่นี้เสียเอง ทำให้ถูกรีดิวซ์เป็นเอทานอลและได้ NAD^+ ขึ้นมาใหม่ 2 โมเลกุลจากเอนไซม์ NADH แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน NAD^+ สามารถสร้างขึ้นใหม่จากเอนไซม์ NADH oxidases และ peroxidases ปล่อยให้อะเซทติลฟอสเฟตมีมากพอสำหรับการเปลี่ยนให้เป็นอะซิลเตท จึงเท่ากับเป็นการเติมฟอสเฟตให้กับซับสเตรตอีกทางหนึ่งเป็นผลให้ได้ ATP เพิ่มขึ้นมาอีก 1 โมเลกุลเป็น 2 โมเลกุลจากกลูโคส 1 โมเลกุล เช่นเดียวกับการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมน

เททิฟ ในกรณีที่มีการเพิ่มขึ้นของ ATP สะท้อนให้เห็นได้จากอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ผลเช่นเดียวกันนี้สามารถเกิดขึ้นกับตัวรับออกซิเจนอื่น ๆ ด้วย เช่น ฟรุกโตส ซึ่งจะถูกรีดิวซ์ไปเป็นแมนนิตอล (อังคณา ชมพูมิ่ง และคณะ, 2553) แบคทีเรียแลคติกกลุ่มที่มีเมแทบอลิสมแบบ heterofermentative เช่น *Leuconostoc, Oenococcus, Weissella* และบางกลุ่มของ *Lactobacillus* ได้แก่ *Lb. bulgaricus*และ*Lb. Casei* เป็นต้น (ดังภาพที่2)



ภาพที่ 2 กระบวนการหมักแบบ homofermentative

ที่มา : Axelsson (1998)



ภาพที่ 3 กระบวนการหมักแบบ heterofermentative

ที่มา : Axelsson (1998)

5. ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติกที่มีต่ออาหารหมัก

5.1 ช่วยเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการ ในกลุ่มของธัญพืชและพบคุณค่าทางอาหารของผลิตภัณฑ์ที่เพิ่มขึ้นที่มาจากกิจกรรมที่เกิดขึ้นในระหว่างกระบวนการผลิต โดยเฉพาะการเพิ่มองค์ประกอบของกรดอะมิโนที่จำเป็น นอกจากนั้นยังมีคุณค่าทางด้านโปรตีนในอาหารที่มีส่วนของธัญพืชและถั่วที่เพิ่มขึ้นอีกด้วย องค์ประกอบของวิตามินในอาหารบางชนิดยังพบได้ในระหว่างการหมัก เพราะจุลินทรีย์บางชนิดสังเคราะห์วิตามินที่จำเป็นต่อการเจริญ จึงทำให้องค์ประกอบของวิตามินในอาหารที่ผ่านกระบวนการหมักสูงกว่าอาหารที่ไม่ผ่านกระบวนการหมัก เช่น ในเทมเปจากข้าวสาลี พบว่าปริมาณของไนอะซิน ไรโบฟลาวิน และไทอะมิน ก่อนการหมักเท่ากับ 46.0 , 3.2 และ 3.2 ไมโครกรัม/กรัม เพิ่มเป็น 135 , 3.2 และ 3.2 ไมโครกรัม/กรัม ภายหลังการหมัก โดยส่วนใหญ่จะมีปริมาณของวิตามินเพิ่มขึ้น

5.2 บทบาทของแบคทีเรียแลคติกและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารหมักที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ทำให้ก่อโรค ทำให้ผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูงขึ้นตลอดจนมีการเก็บรักษาให้ได้นานขึ้น โดยปัจจัยหลักเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง คือ การสร้างกรด และการลดลงของค่าความเป็นกรด – ด่าง กรดอินทรีย์ที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมของแบคทีเรียแลคติกและกรดอะซิติก นอกจากนี้ยังมีสารประกอบอื่น ๆ ที่เกิดขึ้นและมีการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ ที่เกิดขึ้น และยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แบคเทอริโอซิน ซึ่งเป็น

สารอินทรีย์ประเภทพอลีเปปไทด์ โครงสร้างทางเคมีเกิดจากการเรียงตัวของกรดอะมิโนเป็นสายยาว และยังมีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียกลุ่มนี้ที่ใกล้เคียงกัน โดยแบคทีเรียแลคติกแต่ละสายพันธุ์จะให้คุณสมบัติของแบคเทอริโอซินที่แตกต่างกันไป ทั้งคุณสมบัติในการยับยั้งของแบคทีเรียชนิดอื่น โครงสร้างโมเลกุลสมบัติทางพันธุกรรมและสมบัติทางชีวเคมี

5.3 แบคทีเรียแลคติกมีกิจกรรมในการลดปริมาณคอเลสเตอรอลในกระแสเลือด การบริโภคผลิตภัณฑ์นมมหมักจะช่วยในการยับยั้งการเกิดคอเลสเตอรอลในร่างกายได้ นอกจากนี้อาจมีผลในการลดน้ำหนักได้ ภายในสัปดาห์จะต้องบริโภคผลิตภัณฑ์พร้อมกับการออกกำลังกายอย่างสม่ำเสมอ นอกจากนี้ในการทำโยเกิร์ตยังมีองค์ประกอบของสารในการยับยั้งการสังเคราะห์คอเลสเตอรอล ดังนั้นการบริโภคผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีเชื้อ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งจะช่วยให้คอเลสเตอรอลในเลือดลดลง ในการบริโภคคีเฟอร์ ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์นมหมักประเภทหนึ่งที่มีผลดีต่อสุขภาพหลายประการเพราะมีคุณค่าทางโภชนาการหลายอย่างและยังส่งเสริมระบบภูมิคุ้มกันให้กับร่างกายทำให้ระบบอาหารดีขึ้นโดยเฉพาะการย่อยแลคโตส

5.4 ช่วยในการป้องกันการเกิดมะเร็ง โดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกับมะเร็งในลำไส้ใหญ่ ในการศึกษาการบริโภคอาหารประเภทเนื้อแดง พบว่าระดับของเอนไซม์เบต้า– l ucuroniase, Azoreductaseและเอนไซม์ Introreductase เพิ่มสูงกว่าการบริโภคอาหารประเภทผัก และเอนไซม์เหล่านี้ยังมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการเปลี่ยนแปลงของ Procacinogenไปเป็น Carcinogen ในส่วนปลายของลำไส้สิ่งเหล่านี้มีโอกาสในการเกิดโรคมะเร็งของผู้บริโภคลดลง

5.5 ช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกัน มีการศึกษาพบว่าแบคทีเรียแลคติกเป็นตัวกระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยมีความไวต่อ Microphage lymcocyte ทำให้เพิ่มระดับของ Immunogiobulin (lgA) และผลิต Gamma interferon ซึ่งผลดังกล่าวทำให้มีความต้านทานต่อการให้เกิดโรค (Pathogens) และยังมีคุณสมบัติเป็น Antitumorโดยเฉพาะ *Lactobacillus acidophilus* (อังคณา ชมพูมิ่ง และคณะ, 2553)

6. การใช้ประโยชน์ของแบคทีเรียแลคติก

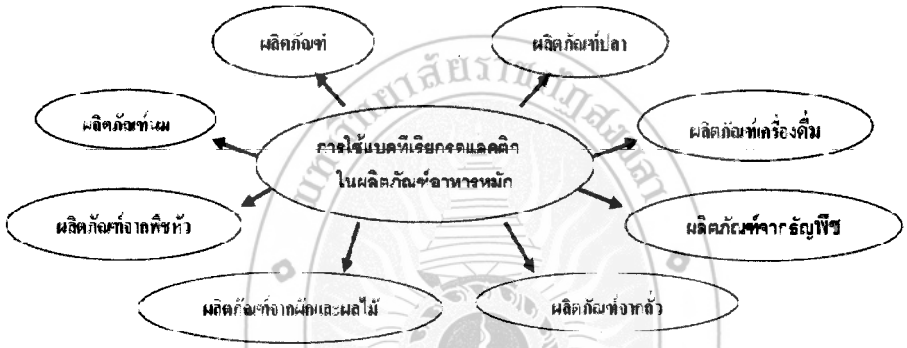
6.1 การใช้แบคทีเรียแลคติกเป็น Probiotic

คำว่าโปรไบโอติก (Probiotic) ถูกนำมาใช้เป็นครั้งแรกในรายงานการวิจัยทางวิทยาศาสตร์ของ Lilly และ Stillwell ในปี พ.ศ.2508 เพื่อกล่าวถึงสารที่จุลินทรีย์ชนิดหนึ่งขับออกมาและช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่ง ซึ่งเป็นการทำงานที่ตรงข้ามกับการทำงานของยาปฏิชีวนะ (antibiotic) ที่จะทำลายจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด ในปี พ.ศ. 2517 Parker ได้ให้คำจำกัดความว่า โปรไบโอติก คือ สิ่งมีชีวิตและสารเคมีที่มีผลต่อสมดุลของจุลินทรีย์ในลำไส้ คำจำกัดความล่าสุดซึ่งเสนอโดย Fuller ในปี

พ.ศ. 2532 อธิบายคำว่า โปรไบโอติก คืออาหารเสริมซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิตสามารถก่อประโยชน์ต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่มันอาศัยอยู่โดยการปรับสมดุลของจุลินทรีย์ในร่างกาย

6.2 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกในอุตสาหกรรมอาหาร

สมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติก (LAB) ผลิตภัณฑ์อาหารหลายชนิดที่ได้จากการหมักกรดแลคติก เช่น นมเปรี้ยว ผัก ผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อและอาหารทะเลหมัก สามารถเก็บไว้ได้นานและปลอดภัยเมื่อนำไปบริโภค ทั้งนี้เป็นเพราะ LAB มีสมบัติการยับยั้งจุลินทรีย์ ดังนี้ทำให้ pH ของอาหารลดลงเกิดกรดอินทรีย์ เกิดแบคเทอริโอซิน เกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เกิดเอทานอล โดยตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกแสดงไว้ในภาพที่ 4



ภาพที่4 แนวทางการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียกรดแลคติกในการผลิตอาหารหมักชนิดต่าง ๆ

ที่มา : ปิ่นมณี ขวัญเมือง (2546)

6.3 การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกผลิตกรดแลคติกและนำไปใช้ประโยชน์

6.3.1 ด้านอาหารและเครื่องดื่ม

มีการนำกรดแลคติกมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารมากกว่าร้อยละ 50 ของปริมาณกรดแลคติกทั้งหมด ส่วนใหญ่จะใช้กรดแลคติกเป็นส่วนประกอบในอาหารโดยตรง (food ingredient) ใช้ปรับสภาพความเป็นกรดเพื่อให้เกิดรสเปรี้ยวตามต้องการและมีการใช้กรดแลคติกร่วมกับกรดซิตริกและพรอพาโนอิกเพื่อทำให้เกิดรสเปรี้ยวในอาหารแต่อาจมีความจำเป็นต้องใช้กรดแลคติกเพียงชนิดเดียว สำหรับผลิตภัณฑ์ที่ต้องการกลิ่นและรสชาติที่จำเพาะกรดแลคติกที่อยู่ในรูปของ stearoyl-2 lactylate (SSL) โดยที่ CSL ใช้เป็นตัวปรับสภาวะแป้งหมัก (dough conditioner) ซึ่งรวมตัวกับกลูเตนในแป้งหมักทำให้สามารถทนต่อสภาวะการกวนและสภาวะต่าง ๆ ในระหว่างกรรมวิธีการผลิตขนมอบได้ดีขึ้นปกติใช้ CSL เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ขนมอบ ส่วน SSL มีคุณสมบัติเป็นอิมัลซิไฟเออร์ (emulsifier) ได้ดี และสามารถยืดอายุการเก็บรักษาของผลิตภัณฑ์ขนมอบได้ กรดแลคติกยังเป็นส่วนประกอบในเนยแข็งชนิดต่าง ๆใน

ผลิตภัณฑ์บางชนิด เช่น Salami ก็มีกรดแลคติกเป็นองค์ประกอบ นอกจากนั้นยังมีการนำกรดแลคติกไปใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องดื่มแทนกรดซิตริกฟอสฟอริกและกรดอื่น ๆ สำหรับอุตสาหกรมมเบียร์และการผลิตขนมหวานก็มีการใช้กรดแลคติกในการปรับความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำที่ใช้ในการผลิต

6.3.2 ด้านการเกษตรเช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามช่วงเวลาที่กำหนด

6.3.3 ด้านบรรจุภัณฑ์เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษ

6.3.4 ด้านเส้นใยและแผ่นผ้าแบบ non-woven เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุเครื่องนอน

6.3.5 ด้านยานยนต์เช่น อุปกรณ์ลดแรงกระแทก (bumpers) แผ่นรองพื้น (floor mats) และอุปกรณ์ตกแต่งภายใน

6.3.6 ด้านการแพทย์เนื่องจาก PLA เป็นพอลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) สามารถเข้ากับเนื้อเยื่อ (biocompatible) และสามารถถูกดูดซึม (bioresorbable) ได้โดยระบบชีวภาพ (biological system) ในร่างกายจึงทำให้ PLA เป็นวัสดุที่มีศักยภาพสูงสำหรับงานทางการแพทย์ และถูกนำมาใช้ทางด้านนี้มานานกว่า 2 ทศวรรษ เช่น ไหมเย็บแผล (sutures) ตัวเย็บแผล (staples) วัสดุปิดแผล (wound dressinh) อุปกรณ์ฝังในร่างกาย (surgicalimplants) อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก (orthopedic fixation devices) วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยตัวยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ

6.3.7 ด้านอื่น ๆคือ การนำกรดแลคติกไปใช้เป็นสารตั้งต้นสำหรับการผลิตพอลิแลคเตท ซึ่งเป็นพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่อใช้แทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเคมี

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ (2557) ศึกษาการคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติก เพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดองเพื่อคัดเลือกและประเมินศักยภาพการเป็นโปรไบโอติกแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากผักสดและอาหารหมัก โดยทดสอบความสามารถในการหมักและทดสอบสมบัติโปรไบโอติกในหลอดทดลอง ได้แก่ ทดสอบการเจริญ การทนน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร การเจริญในสภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน ทดสอบฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ก่อโรค การทนเกลือน้ำดี ความสามารถในการย่อยโปรตีน ไขมัน และแป้ง การทดสอบความไวต่อยาปฏิชีวนะ อีกทั้งทดสอบคุณสมบัติด้านความปลอดภัย ได้แก่ การย่อยสลายเม็ดเลือด

แดงและการสร้างสารไบโอเจนิกเอมีน พบว่า สามารถคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกได้จำนวน 6 ไอโซเลต ที่มีความสามารถในการหมักที่ดีมีความปลอดภัยและมีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกในกระบวนการหมักผักดอง

อุษณีย์ อภิบาลแบ และคณะ (2556) ศึกษาการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักที่มีความเข้มข้นเกลือสูงและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์อาหารหมักพื้นบ้านที่มีปริมาณเกลือสูง เช่น บูดูในช่วงอายุการหมักต่าง ๆ ปลาจิ้งจั้ง และไตปลา ซึ่งเก็บจากพื้นที่ผลิตและตลาดในจังหวัดปัตตานี นำมาใช้เป็นแหล่งคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่มี Nacl 3% และ 6% และมี $CaCO_3$ ความเข้มข้น 1% ได้แบคทีเรียแลคติกจำนวน 110 ไอโซเลต ทดสอบการยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* DMST 8840 ด้วยวิธี agar spot พบว่ามีจำนวน 12 ไอโซเลต (10.9%) มีฤทธิ์ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลต มีฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรียจากการทดสอบในขั้นต้นมาศึกษาฤทธิ์ยับยั้ง *S. aureus* DMST 8840 และ *Listeria monocytogenes* DMST 17303 ด้วยวิธี agarwell diffusion พบว่า สารละลายใสที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 12 ไอโซเลต ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่ได้ทดสอบ

ธนากร บำรุงภักดี และบวรศักดิ์ (2554) ศึกษาการแยกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากหน่อไม้ดองที่จำหน่ายในจังหวัดขอนแก่นและที่ผลิตบริโภคในครัวเรือนโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ผสม Bromocresol purple (BCP) 0.04 % และแคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$) 1% เริ่มจากการคัดเลือกโคโลนีที่มีบริเวณใสโดยรอบและเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง พบว่าสามารถแยกแบคทีเรียได้ทั้งหมด 83 ไอโซเลต จากนั้นนำมาศึกษาคุณลักษณะทางด้านสรีระวิทยา สัณฐานวิทยาและชีวเคมีโดยใช้ชุดทดสอบระบบ API 50 CH เพื่อใช้จำแนกในระดับสกุลและสปีชีส์ พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากหน่อไม้ดองมี 2 สายพันธุ์คือ *Lactobacillus pentosus* และ *Lactobacillus plantarum*

จินตนา ต๊ะย่วน (2553) ศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์และการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าเมื่อนำส่วนใสจากการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS มาทดลองการสร้างสารยับยั้งการเจริญของเชื้อทดสอบด้วยวิธี agar well diffsion พบว่ามี 20 และ 8 ไอโซเลตที่สามารถสร้างสารยับยั้ง *Staphylococcus aureus* DSMZ 799 และ *Bacillus cereus* ATCC 11778 ตามลำดับ แต่ไม่มีไอโซเลตใดสร้างสารยับยั้ง *Escherichia coli* DSMZ 682 จากการศึกษาสมบัติเบื้องต้นของสารยับยั้งจุลินทรีย์ พบว่าเมื่อกำจัดฤทธิ์ของกรดอินทรีย์มีแบคทีเรียกรดแลคติก 4 ไอโซเลต ได้แก่ SSB 09-02 , SSB 09-01 , NHB 05-01 ที่ให้ผลดีในการยับยั้งแบคทีเรียทดสอบฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์จากไอโซ-เลต NHB 05-01 เป็นสารกลุ่มแบคเทอริโอซินซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้ในด้านความปลอดภัยของอาหารและการเก็บรักษา

เบญจรัตน์ ยิ้มมิ่ง และปณิชา ปั่นสุ่น (2553) ศึกษาการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากลำไส้ไก่ จากการทดสอบตัวอย่างทั้งหมด 41 ไอโซเลต พบว่า 37 ไอโซเลต มี

คุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อ *Salmonella Typhimurium* 292 , *Pseudomonas fluorescens* TISTR 118 จากนั้นนำทั้ง 37 ไอโซเลต มาศึกษาการทนกรด-ด่าง , ox-bile salt และ NaCl ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่ามีเพียง 6 ไอโซเลต จากทั้งหมด 37 ไอโซเลต คือ C120 , C129 , C132 , C133 , C136 และ C140 พบว่าเชื้อดังกล่าวสามารถเจริญได้ที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง ระหว่าง 2-10 สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีเกลือโซเดียมคลอไรด์ถึง 5% และสามารถทนต่อ ox-bile ที่ความเข้มข้น 3% , 6% , 9% และ bile-salt ที่ความเข้มข้น 0.3% , 0.6% และ 0.9%

สิริโชค วงศ์ศรีไพศาล และคณะ (ม.ป.ป) ศึกษาคุณภาพของแหนมปลาที่หมักโดยใช้เชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสมเปรียบเทียบกับแหนมปลาที่ไม่ใช้เชื้อบริสุทธิ์โดยเชื้อบริสุทธิ์ที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คัดแยกได้จากปลาส้มหรือส้มฟัก ประกอบด้วยแบคทีเรียแลคติกกลุ่ม Homofermentative ได้แก่ *Pediococcus pentosaceus* TISTR 423 , *Lactobacillus pentosus* TISTR 853 และ *L. plantarum* TISTR 854 แบคทีเรียแลคติกกลุ่ม Heterofermentative ได้แก่ *L. fermentum* TISTR 937 และยีสต์ *Candida sake* (IFRPD) จากการศึกษาความสามารถในการสร้างกรดและค่า pH ที่เปลี่ยนแปลงไปของแหนมปลาที่เติม *L.plantarum*มีค่า pH ที่ต่ำและปริมาณกรดที่สูงกว่าแหนมปลาที่เติมเชื้ออื่น ๆ ที่ระยะเวลาการหมักที่เท่ากัน ($p \leq 0.05$) ดังนั้นจึงคัดเลือก *L. plantarum* เพื่อนำไปศึกษาคุณภาพของแหนมปลาที่เติมเชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสมเปรียบเทียบกับแหนมปลาที่ไม่เติมเชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าแหนมปลาที่เติม *L. plantarum* สายพันธุ์เดี่ยวและสายพันธุ์ผสมระหว่าง *L. plantarum* กับ *L. fermentum* และ *L. plantarum* กับ *C. sake* มีค่าความแข็งและความสว่างมากกว่า แต่มีค่าความเป็นสีแดง/เขียว ที่ต่ำกว่าแหนมปลาที่ไม่เติมเชื้อบริสุทธิ์ ($p \leq 0.05$) แหนมที่เติมเชื้อบริสุทธิ์ ($p \leq 0.05$) แต่ก็ไม่แตกต่างจากแหนมปลาที่เติมเชื้อผสม ($p > 0.05$) ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่จะใช้เชื้อบริสุทธิ์สายพันธุ์เดี่ยวหรือสายพันธุ์ผสมของ *L. plantarum* เพื่อช่วยลดระยะเวลาในการหมักและปรับปรุงคุณภาพแหนมปลา

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

1. อุปกรณ์และสารเคมี

1.1 อุปกรณ์

1.1.1 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow)

1.1.2 ตู้บ่มเชื้อ (incubator)

1.1.3 เครื่องชั่งสาร (balance)

1.1.4 กล้องจุลทรรศน์ (microscope)

1.1.5 หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)

1.1.6 ตู้อบลมร้อน (hot air oven)

1.1.7 ไมโครเวฟ (microwave)

1.1.8 จานเพาะเชื้อ (petri dish)

1.1.9 สไลด์ (slide)

1.1.10 ขวดรูปชมพู่ (flask)

1.1.11 ปีเปต(pipett)

1.1.12 ตะแกรงวางหลอดทดลอง

1.1.13 กระบอกแพลต

1.1.14 กระบอกปีเปต

1.1.15 กระบอกตวง (cylinder)

1.1.16 หลอดทดลอง (test tube)

1.1.17 บีกเกอร์(beaker)

1.1.18 ห่วงถ่ายเชื้อ (loop)

1.1.19 เข็มเขี่ยเชื้อ (needle)

1.1.20 แท่งแก้วคน

1.1.21 แท่งแก้วงอ (spreader)

1.1.22 ช้อนตักสาร (spatula)

1.1.23 ตะเกียงแอลกอฮอล์ (burner)

1.1.24 กระดาษทิชชู

1.1.25 สำลี

1.1.26 ถุงพลาสติก

1.1.27 water bath

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

1.1.28 กล้องถ่ายรูป

1.1.29 แผ่นทดสอบออกซิเดซ

1.1.30 เครื่อง stomacher

1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1.2.1 lactobacilli MRS agar

1.2.2 MIL-medium

1.2.3 nitrate broth

1.2.4 urea agar

1.2.5 nutrient broth (NB)

1.2.6 D-glucose

1.2.7 lactose

1.2.8 sucrose

1.2.9 mannital

1.2.10 xylose

1.2.11 NaCl

1.2.12 $CaCO_3$

1.2.13 H_2O_2

1.2.14 crystal violet

1.2.15 iodine

1.2.16 alcohol

1.2.17 safranin O

1.2.18 malachite green

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ตารางที่ 3 การติดสีแกรม ลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัว และการสร้างสปอร์ของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากไส้อั่ว จังหวัดปัตตานี

ไอโซเลต	ติดสีแกรม	รูปร่าง	การจัดเรียงตัว	การสร้างสปอร์
2	+	Shot rod	couple	-
3	+	rod	single and couple	-
5	+	long rod	single and couple	-
6	+	coccobacilli	single	-
7	+	shot rod	chain	-
8	+	shot rod	couple	-
9	+	coccobacilli	single	-
10	+	shot rod	chainand couple	-
12	+	shot rod	chain	-
13	+	coccobacilli	single	-
14	+	shot rod	couple	-
15	+	long rod	single and couple	-
16	+	shot rod	single and couple	-
17	+	shot rod	single,couple,chain	-
18	+	shot rod	chainand couple	-

หมายเหตุ : + = ติดสีแกรมบวก - = ไม่สร้างสปอร์

4. การทดสอบทางชีวเคมี

นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ มาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม โดยทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส พบว่าให้ผลบวกและผลลบ โดยไอโซเลตที่ให้ผลบวก คือ ไอโซเลตที่ 3 , 5 , 6 , 9 , 13 และ 15 และไอโซเลตที่ให้ผลลบ คือ 1 , 7 , 8 , 10 , 12 , 14 , 16 , 17 และ 18 ทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility) พบว่าทุกไอโซเลตให้ผลบวก การทดสอบการสร้างอินโดล (Indole) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส (Urease test) การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ พบว่าให้ผลลบทุกไอโซเลต และการทดสอบการหมักน้ำตาล กลูโคสและซูโครส พบว่าทุกไอโซเลตหมักย่อยน้ำตาลทั้งสองชนิดได้ (ดังตารางที่ 4) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ จุฑามาศ เทพมาลี และคณะ (2555) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากกากกระเทียมหมักให้ผลลบกับการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส และให้ผลบวกกับการหมักน้ำตาลกลูโคส

1.2.19 Kovac'sreagen

1.2.20 nitrate A, nitrate B

1.2.21 methyl red

1.2.22 phenol red

1.2.23 zinc

2. วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก

1. ชั่งตัวอย่างไส้อั่วจำนวน 25 กรัมใส่ในถุงพลาสติก เติมสารละลาย NaCl 0.85% 225 มิลลิลิตร จากนั้นนำเข้าเครื่อง stomacher บดให้เข้ากันจากนั้นทำการเจือจางสารแขวนลอยไส้อั่วด้วย วิธี dilution method ที่ระดับความเจือจาง 10^{-2},10^{-3}และ 10^{-4} นำมาเกลี่ยบนอาหาร MRS agar ที่เติม 1.0% $CaCO_3$และนำไปบ่มแบบออกซิเจนน้อยๆ ด้วย candle jar นาน 24-48 ชั่วโมง

2. เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีบริเวณใสรอบโคโลนี นำไป streak บนอาหาร MRS agar เพื่อให้ได้เชื้อบริสุทธิ์นำไปบ่มแบบออกซิเจนน้อยๆ ด้วย candle jar นาน 24-48 ชั่วโมง

2.2 การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติก (นันทนาอรุณฤกธิ์, 2534)

2.2.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

1. หยด hydrogen peroxide (H_2O_2) 3% ลงบนสไลด์ 1 หยด
2. เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปผสม
3. สังเกตการเกิดฟอง

2.2.2การย้อมสีแกรม

1. เตรียมรอยสเมียร์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน
2. หยดสี crystal violet ให้ท่วมรอยสเมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที
3. เทสีที่เหลือค้างบนสไลด์ออก แล้วชะล้างด้วยสารละลายไอโอดีน หลังจากนั้นหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมรอยสเมียร์ และทิ้งไว้นาน 1 นาที
4. เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง แล้วชะล้างด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ 95% หรือแอลกอฮอล์อาซีโตน จนกระทั่งไม่มีสีม่วงละลายออกมา แต่อย่าให้เกิน 20 วินาที แล้วล้างน้ำทันที โดยให้น้ำผ่านเบาๆ
5. ซับด้วยกระดาษซับ แล้วย้อมทับด้วยการหยดสี safranin O ให้ท่วมรอยส-

เมียร์ ทิ้งไว้นาน 1 นาที

6. เทสีทิ้ง ล้างด้วยน้ำ แล้วซับด้วยกระดาษซับ วางทิ้งไว้ให้แห้ง แล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

2.2.3 การย้อมเอนโดสปอร์

1. เตรียมรอยสเมียร์และตรึงเซลล์ด้วยความร้อน

2. หยดสี malachite green ให้ท่วมรอยสเมีย ใช้ไฟลนใต้สไลด์ให้ร้อนเป็นไอ นาน 10 นาที คอยเติมสี ระวังอย่าให้สีเดือดหรือแห้งติดสไลด์

3. ล้างด้วยน้ำแล้วย้อมทับด้วยsafranin O นาน 15 ถึง 30 วินาที รินสีที่เหลือออก ล้างน้ำ และซับให้แห้ง

2.2.4 การทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical tests) (นันทนา อรุณฤกธิ์ม, 2534)

นำเชื้อที่คัดแยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ มาทดสอบลักษณะทางชีวเคมีบางประการเพิ่มเติม ดังนี้ Oxidase test, Motilitytest, Indole test, Urea test, Nitrate test และการหมักน้ำตาล (Carbohydrate fermentation test) โดยใช้ basal medium ที่มีคาร์โบไฮเดรต 2 ชนิด คือ กลูโคส ซูโครส

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่4

ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเมื่อทำการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างไส้อั่ว โดยใช้อาหาร MRS agar ที่เติม 1% $CaCO_3$และบ่มแบบที่มีออกซิเจน (O_2) น้อยๆ ด้วย candle jar นาน 24 – 48 ชั่วโมง คัดเลือกโคโลนีที่แตกต่างกัน Streak บนอาหาร MRS agar และศึกษาลักษณะโคโลนี พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีลักษณะรูปร่าง สี ลักษณะขอบ ขนาด ความนูน ผิวหน้า และลักษณะโคโลนีแตกต่างกันในแต่ละไอโซเลต ดังตารางที่ 2 การศึกษาวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ ธิดา ไชยวังศรี (2557) จากการคัดแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากอาหารหมักดอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาที่แตกต่างกัน โดยมีลักษณะโคโลนีสีขาว สีครีม ขอบเรียบ หรือหยัก

ตารางที่ 2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร MRS agar ที่เติม 1% $CaCO_3$

ไอโซเลต	สีโคโลนี	รูปร่างของโคโลนี	ขอบของโคโลนี	ขนาด	ระดับความนูน	ลักษณะผิวหน้า	ลักษณะเกี่ยวกับแสง
1	ขาว	Irregular	Undulate	ใหญ่	Effuse	Rugose	opaque
2	ครีม	Circular	Entire	เล็ก	Flat	Smooth	opaque
3	ขาว	Circular	Entire	เล็ก	Flat	Smooth	opaque
4	ขาว	Circular	Entire	ใหญ่	Effuse	Rugose	opaque
5	ใส	Circular	Entire	เล็ก	Effuse	Smooth	translucent
6	ขาว	Circular	Entire	กลาง	Convex	Smooth	opaque
7	ขาว	Circular	Entire	กลาง	Flat	Rough	opaque
8	ใส	Irregular	Entire	ใหญ่	Effuse	Smooth	translucent
9	ขาว	Circular	Entire	เล็ก	Convex	Smooth	opaque
10	ขาว	Circular	Erose	เล็ก	Flat	Smooth	opaque
11	ครีม	Irregular	Entire	เล็ก	Effuse	Rugose	opaque
12	ครีม	Circular	Entire	เล็ก	Convex	Smooth	opaque
13	ขาว	Circular	Entire	กลาง	Convex	Smooth	opaque
14	ขวา	Circular	Entire	เล็ก	Effuse	Smooth	opaque
15	ครีม	Circular	Entire	เล็ก	Effuse	Smooth	opaque

สำนักวิทยบริการและเทคโนโลยีสารสนเทศ
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ไอโซเลต	สีโคโลนี	รูปร่างโคโลนี	ขอบของโคโลนี	ขนาด	ระดับความนูน	ลักษณะผิวหน้า	ลักษณะเกี่ยวกับแสง
16	ใส	Circular	Entire	ใหญ่	Effuse	Smooth	translucent
17	ครีม	Circular	Entire	เล็ก	Effuse	Smooth	opaque
18	ใส	Circular	Entire	กลาง	Flat	Smooth	translucent
19	ขาว	Irregular	Undulate	กลาง	Flat	Rugose	opaque
20	ขาว	Circular	Erose	ใหญ่	Flat	Rugose	opaque

ภาพที่ 5 จุลินทรีย์ทั้งหมดที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร MRS agarที่เติม 1.0% $CaCO_3$

2. การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

นำเชื้อแบคทีเรียแลคติกบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะ-ตะเลส เพื่อคัดเลือกไอโซเลตที่ไม่เกิดฟอง พบว่าทุกไอโซเลตให้ผลลบ ยกเว้นไอโซเลตที่ 1 , 4 , 11 , 19 และ 20 ให้ผลบวก ซึ่งใกล้เคียงกับงานวิจัยของ อุษณีย์ อภิบาลแบ และคณะ (2556) นำตัวอย่างบูดูปลาจิ้งจั้ง บูดูและไตปลา คัดเลือกโคโลนีที่มีวงใสรอบ ๆ แล้วนำมาคัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ และนำมาศึกษาทางชีวเคมีเบื้องต้น โดยการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ผลการทดสอบพบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกให้ผลเป็นลบ

3. การย้อมสีแกรมและการย้อมเอนโดสปอร์

นำเชื้อแบคทีเรียที่ให้ผลลบในการทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลสทั้งหมด 15 ไอโซเลต จาก 20 ไอโซเลต มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน และรีการจัดเรียงตัวเป็นคู่ เดี่ยว และสายโซ่ และไม่มีการสร้างสปอร์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ ธิดา ไชยวังศรี (2557) ซึ่งศึกษาเกี่ยวกับ การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากอาหารหมักดอง รายละเอียดผลการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ดังตารางที่ 3

5719.3
ส 25 ก

3 ก.พ. 2559

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้จากไส้อั่ว จังหวัดปัตตานี

ไอโซเลต	2	3	5	6	7	8	9	10	12	13	14	15	16	17	18	*Lacto-bacillus*
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidase	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Urea	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

หมายเหตุ + = ผลบวก, - = ผลลบ

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าผลการศึกษาสอดคล้องกับลักษณะและคุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน การจัดเรียงตัวแบบเดียว คู่ และโซ่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส สร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต ซึ่งใกล้เคียงกับจีนัส *Lactobacillus* ดังตารางที่ 4 (Roert S. Breed et al. 1957) ผลการทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส สรุปได้ว่า ไอโซเลตที่ให้ผลการสร้างเอนไซม์ออกซิเดสเป็นบวก ได้แก่ ไอโซเลตที่ 3 , 5 , 6 , 9 ,13 และ 15 เป็นกลุ่ม Microaerophie ซึ่งมีบทบาทในการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส หรือมีการปนเปื้อนห่วงถ่ายเชื้อ (Loop) ในระหว่างการทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส การใช้ Loop ที่ทำจากลวดนิโครมอาจได้ผลบวกปลอม เนื่องจากธาตุเหล็กของลวดสามารถกระตุ้นให้เกิดออกซิเดชั่นของน้ำยาทดสอบออกซิเดส (สุวลี นิลชน, 2556)

แบคทีเรียแลคติกสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารและเครื่องดื่ม ได้แก่ นมเปรี้ยว ผักและผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์เนื้อและอาหารทะเลหมัก นอกจากนี้ยังสามารถนำแบคทีเรียแลคติกมาใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักพื้นบ้าน เช่น ใช้เป็นหัวเชื้อในการหมักแหนมปลา (สิริโชค วงศ์ศรีไพศาล และคณะ, ม.ป.ป) การหมักกากกระเทียม (จุฑามาศ เทพมาลี และคณะ, 2556) ใช้ในการผลิตหน่อไม้ดอง (ธนากร บำรุงภัคดี และบวรศักดิ์ ลีนานนท์, 2554) ผลิตผักดอง (ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ, 2557) ผลิตแหนม (ปิ่นมณี ขวัญเมือง, 2546) ผลิตขนมจีน (สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, 2548) เป็นต้น

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การคัดแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างไส้อั่วที่จำหน่ายในจังหวัดปัตตานี 25 กรัม ทำการเจือจางด้วยวิธี 10 Fold Dilution Method จากนั้นนำมาเกลี่ยบนอาหาร MRS agar ที่เติม 1% $CaCO_3$ และคัดเลือกโคโลนีที่มีวงใสรอบโคโลนีที่มีลักษณะแตกต่างกัน มา Streak บนอาหาร MRS agar พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียเจริญทั้งหมด 20 ไอ-โซเลต มีลักษณะแตกต่างกัน จากนั้นทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต ให้ผลเป็นลบจำนวน 15 ไอโซเลต จากนั้นศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน และรีการจัดเรียงตัวแบบเดี่ยว คู่ สายโซ่ และไม่สร้างสปอร์ เมื่อนำมาทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเพิ่มเติม ได้แก่ การทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส การทดสอบการเคลื่อนที่ (Motility) การทดสอบการสร้างอินโดล (Indol test) การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส (Urea test) การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์ และการทดสอบการหมักน้ำตาลกลูโคส ซูโครส พบว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 15 ไอโซ-เลตที่แยกได้จากไส้อั่วใกล้เคียงกับเชื้อกลุ่ม *Lactobacillus*

ข้อเสนอแนะ

1.นำแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ศึกษาต่อในระดับสปีชีส์

2.ควรศึกษาคุณสมบัติการเป็นหัวเชื้อในการหมักผลิตภัณฑ์อื่นๆ

เอกสารอ้างอิง

กัญจนา ธีระกุล และคณะ. (2547). **จุลชีววิทยาปฏิบัติการ.** พิมพ์ครั้งที่ 5. กรุงเทพฯ .

จุฑาทิพย์ บุญเกิดและวิเชียรลีลาวัชรมาศ. (2549).**การคัดเลือกและจำแนกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำนมข้าว เพื่อผลิตโยเกิร์ต.**การประชุมวิชาการมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่44 สาขาอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

จุฑามาศ เทพมาลีและคณะ. (2556).**การหมักกากกระเทียมโดยใช้หัวเชื้อจากน้ำกระเทียมดอง. วารสารนเรศวร.**

จินตนา ต๊ะย่วน. (2553).**การศึกษาการยับยั้งจุลินทรีย์และการสร้างแบคเทอริโอซินของแบคทีเรียกรดแลคติก**.สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตเฉลิมพระเกียรติ จังหวัดสกลนคร.

ธิดา ไชยวังศรี. (2557). **การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตเบต้ากลูโคซิเดสจากอาหารหมักดอง.** วารสารนเรศวรพะเยา ปีที่ 7 ฉบับที่ 1 มกราคม – เมษายน.

ธนากร บำรุงภัคดี และบวรศักดิ์ ลีนานนท์.(2554).**การแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียแลกติกจากหนอ-ไม้ดองเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นผสมในการหมัก.**สาขาเทคโนโลยีการอาหาร คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยขอนแก่น.

นันทนา อรุณฤกษ์. (2537).**การจำแนกแบคทีเรียกลุ่มแอโรป.**พิมพ์ครั้งที่1. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา.

บุษกร อุตรภิชาต.(2548).**มารู้จัก"แบคทีเรียแลกติก"กันเถอะ.**วารสารวิทยาศาสตร์ทักษิณ ปีที่2 ฉบับที่ 2กรกฎาคม-ธันวาคม .

เบญจรัตน์ ยิ้มมิ่ง และปณิชา ปั่นสุ่น.(2553).**การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติเป็นโปรไบโอติกจากลำไส้ไก่.**ภาควิชาเทคโนโลยีการผลิตสัตว์คณะเทคโนโลยีการเกษตรสถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

ปิ่นมณี ขวัญเมือง. (2546). **การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากตัวอย่างแหนมของประเทศไทยเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อ**.วิทยานิพนธ์ปริญญาเอก. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภณิดา เกื้อสุวรรณ และคณะ.(2557).**การคัดเลือกโปรไบโอติกแบคทีเรียแลกติกเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อในการผลิตผักดอง**.สาขาวิชาจุลชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศุภยางค์ วรวุฒิคุณชัย. (2547). **การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ.** พิมพ์ครั้งที่1. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

สมใจ ศิริโภค และคณะ.(2550).**การคัดเลือกและการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแบคทีริโอซินได้จากอาหารหมัก และการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตได้.**วารสารวิทยาศาสตร์ มศว ปีที่23ฉบับที่2 .

สิริโชค วงศ์ศรีไพศาล และคณะ.(ม.ป.ป).**การศึกษาคุณภาพของแหนมปลาที่ใช้เชื้อบริสุทธิ์ในการผลิต.** ภาควิชาพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

สุจินดา ศรีวัฒนะ.(ม.ป.ป).**ไส้อั่วสูตรลดไขมันนวัตกรรมพื้นบ้านรูปแบบใหม่.**สาขาวิชาเทคโนโลยีการพัฒนาผลิตภัณฑ์ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง. (2548).**การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กทิกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อขนมจีนแป้งหมัก**.ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การอาหาร) สาขาวิทยาศาสตร์การอาหาร ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุมาลี เหลืองสกุล.(2540).**คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยาทางอาหาร.**กรุงเทพฯ :ชัยเจริญ.

อังคณา ชมพูมิ่ง และคณะ. (2553). **การปรับปรุงคุณภาพผลิตภัณฑ์ปลาส้มด้วยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ : กรณีศึกษาพื้นที่จังหวัดแพร่และจังหวัดพะเยา.**มหาวิทยาลัยแม่โจ้แพร่.

อัจฉรา เพิ่ม.(2549).**แบคทีเรียแลคติก**.คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา.

อุษณีย์ อภิบาลแบ และคณะ.(2556).**การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากอาหารหมักที่มีความเข้มข้นเกลือสูงและศึกษาฤทธิ์การยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย**.วันที่ 10 พฤษภาคม 2556 (115).การประชุมหาดใหญ่วิชาการครั้งที่4 .

Axelsson, L. (1998). Lactic acid bacteria : classification and physiology, pp. 1-72. In Salminen, S. and A. Wright.**Lactic acid bacteria: microbiology and functional espects**. Marcel Dekker, Inc., New York.617 p.

Robert S. Breed et al. (1957). **BERGEY'S MANUAL OF DETER MINATIVE BACTERIOLOGY.** U.S.A

Wood,B.J.B. and W.H.Holzapfel. (1997).**The Lactic bacteria:The Genera of lactic acid bacteria**.Blackie Academic & Professional, New York.pp.7-15.

http://gsbooks.gs.kku.ac.th/54/grc12/files/bmp15.pdf (ออนไลน์).สืบค้นวันที่ 13 ธันวาคม 2558.

https://it.wikipedia.org/wiki/Lactobacillus_sakei(ออนไลน์).สืบค้นวันที่ 13 ธันวาคม 2558.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

การทดสอบคะตาเลส(catalase test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอมไซม์คะตาเลส (catalase enzyme) ได้หรือไม่ catalase enzyme เป็น haemprotein ที่มีอยู่ในระบบไซโทโครม (cytochrome system) ของแบคทีเรียกลุ่ม aerobe และ facultative anaerobe

วิธีทดสอบ

1. หยด hydrogen peroxide (H_2O_2) 3% ลงบนสไลด์ 1 หยด
2. ใช้ loop เขี่ยเชื้อที่ต้องการทดสอบลงไปผสม

การอ่านผล

ผลบวก – เกิดฟองแก๊ส

ผลลบ – ไม่เกิดฟองแก๊ส

การทดสอบออกซิเดส (Oxidase test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถผลิตไซโทโครมออกซิเดส (cytochrome oxidase) ซึ่งเป็น enzyme ตัวสุดท้ายในระบบ cytochrome ซึ่งพบในแบคทีเรียกลุ่ม aerobe และ facultative anaerobe รวมทั้งพวก microaerophie จะให้ผลบวกในการทดสอบ ส่วนพวก obligate anaerobe ไม่มี cytochrome oxidase จึงไม่สามารถเจริญในที่มีออกซิเจน และให้ผลลบในการทดสอบ

การทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียโดยใช้ media (Motility test medium)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรีย motile ได้หรือไม่ โดยดูจากการ motile ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมี agar ผสมอยู่ 0.5% (semisolid agar) มีประโยชน์มากในการแยก Genus หรือ species ของ Gram – negative bacteria

วิธีการทดสอบ

1. ใช้เข็มแทงเชื้อ (inoculating needle) แทง (stab) ลงไปเป็นแนวตรงในเนื้อวุ้น
2. เพาะเลี้ยงเชื้อ (incubate) ในตู้อบเลี้ยงเชื้อ (incubator) ที่ 35 °c นาน 24 ชั่วโมง

การอ่านผล

ผลบวก – แบคทีเรียที่ motile จะขึ้นกระจายรอบๆรอยที่แทง semisolid agar จะขุ่น

ผลลบ – แบคทีเรียที่ nonmotile จะเจริญเฉพาะตามแนวที่แทงเชื้อ ดังนั้น semisolid agar จะใส สำหรับเชื้อที่ motile ได้ไม่ดี ให้เลี้ยงเชื้อต่อที่ 21 ถึง 25 °c นาน 5 วัน

การทดสอบอินโดน (Indole test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถเปลี่ยนทริปโตเฟน (tryptohan) เป็น indole ได้หรือไม่ โดยเลี้ยงใน media ที่มี tryptohan เช่น casein ทดสอบการสร้าง indole โดยเติมพาราไดเมทิลอะมิโนเบนซาลดีไฮด์ (para-dimethyaminobenzaldehyde, Kovac's reagent) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับ indole ให้สีแดง

วิธีทดสอบ

1. Inoculate เชื้อใน peptone broth 1%
2. Incubate ที่ 35°c นาน 24 ถึง 48 ชั่วโมง
3. หยด Kovac's reagent ประมาณ 5 หยด เขย่าหลอดเบาๆ 2 ถึง 3 ครั้ง

การอ่านผล

ผลบวก – วงสีแดงที่ผิวของอาหาร

ผลลบ – สีเหลืองของ Kovac's reagent ที่ผิวของอาหาร

การทดสอบยูรีเอส (Urease test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียมี urease enzyme หรือไม่ แบคทีเรียที่มี urease enzyme สามารถย่อยสลาย urea ให้เป็นแอมโมเนีย ซึ่งจะเปลี่ยนสีของ phenol red ให้เป็นสีชมพูบานเย็น

วิธีทดสอบ

1. Streak เชื้อบน urea agar แบบถี่ๆ
2. Incubate ที่35°c นาน 1 ถึง 6 วัน

การอ่านผล

ผลบวก – อาหารจะเป็นสีชมพูบานเย็น

ผลลบ – อาหารไม่เปลี่ยนสี

การทดสอบไนเตรด (Nitrate test)

เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการที่จะรีดิวส์ไนเตรดให้เป็นไนไตรด์ หรือก๊าซไนโตรเจน แบคทีเรียที่สามารถหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจน และใช้สารอนินทรีย์ เช่น ไนเตรดเป็นตัวรับอิเลคตรอนแทนออกซิเจน แบคทีเรียบางชนิดสามารถรีดิวส์ไนเตรดไปเป็นไนไตรด์ และสามารถรีดิวส์จากไนเตรดไปเป็นแอมโมเนียก็มี

วิธีทดสอบ

1. เพาะเชื้อที่ต้องการทดสอบลงบน Nitrate agar slant
2. บ่มเชื้อไว้ที่ 37°c นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง
3. นำมาเติม Nitrate A, Nitrate B reagent อย่างละ 5หยด

การอ่านผล

ผลบวก – มีสีแดงเกิดขึ้น หรือไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในตอนแรก และเมื่อเติมผงสังกะสีลงไปก็ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ผลลบ – ไม่มีสีแดงเกิดขึ้นในขั้นตอนแรก และจะมีสีแดงเกิดขึ้น เมื่อเติมผงสังกะสีลงไป

การทดสอบการหมักน้ำตาล (Carbohydrate fermentation test)

เป็นการทดสอบว่าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลชนิดนั้นๆ ได้หรือไม่ และผลิตกรดอย่างเดียว หรือผลิตกรดและแก๊สหลังกระบวนการหมัก อาหารที่ใช้ทดสอบประกอบด้วย broth base ผสมกับน้ำตาลที่ต้องการทดสอบ เช่น glucose, sucrose รวมทั้งใส่หลอดดักแก๊ส (Durham tube) เพื่อที่จะเก็บแก๊สที่แบคทีเรียสร้างและเติม indicator เพื่อที่จะบอกสภาวะความเป็นกรดด่าง

วิธีทดสอบ

1. ลงเชื้อในอาหาร
2. Incubate ที่ 35°c นาน 18 ถึง 24 ชั่วโมง
3. ดูการเปลี่ยนสีของอาหาร เช่น ถ้าใช้ phenol red เป็น indicator เมื่อมีกรดเกิดขึ้นจาก fermentation ก็จะเปลี่ยนจากสีส้มแดงเป็นสีเหลือง

การอ่านผล

ผลบวก - มีกรดทำให้อาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลือง (และอาจมีแก๊ส)

ผลลบ - อาหารเป็นสีชมพูแดง

ภาคผนวก ข

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Lactobacilli MRS agar (สูตรจาก doMan, Rogosa, Sharpe)

Proteose peptone	10.0	กรัม
Beff extract	10.0	กรัม
Yeast extract	5.0	กรัม
Dextrose	20.0	กรัม
Sorbitanmonooleate complex	1.0	กรัม
Ammonium citrate	2.0	กรัม
Sodium acetate	5.0	กรัม
Magnesium sulfate	0.1	กรัม
Manganese sulfate	0.05	กรัม
Potassium phosphate, dibasic	2.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Motility indole lysine medium

Peptone	10.0	กรัม
Tryptone	10.0	กรัม
Yeast extract	3.0	กรัม
L- lysine hydrochloride	10.0	กรัม
Dextrose	1.0	กรัม
Ferric ammonium citrate	0.5	กรัม
Brom cresol purple	0.02	กรัม
Agar	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Nitrate broth

KNO_3	5.0	กรัม
Glucose	5.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

$CaCl_2.2H_2O$	0.5	กรัม
$MgCO_3$	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Nutrient broth

Beef extract	3.0	กรัม
Peptone	5.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

Urea broth

Urea	30.0	กรัม
K_2HPO_4	0.5	กรัม
Calcium citrate	10.0	กรัม
น้ำกลั่น	1.0	ลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก ค

สีและน้ำยาที่ใช้ย้อม

สีย้อมแกรมและย้อมเอนโดสปอร์

1. Crystal violet

สารละลาย A

Crystal violet	2.0	กรัม
Ethel alcohol 95%	20.0	มิลลิลิตร

ละลายสีจนละลายหมด

สารละลาย B

Ammonium oxalate	0.8	กรัม
น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A กับ B เข้าด้วยกันแล้วกรอง

2. Safranin O counterstain (stock solution)

Safranin O	2.5	กรัม
Ethyl alcohol 95%	100	มิลลิลิตร

ละลายสีแล้วกรอง เมื่อจะใช้ให้เจือจางเป็น 1 : 10

3. Gram's iodine solution (mordant)

Iodine (crystal)	1.0	กรัม
Potassium iodide	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ละลาย iodine และ potassium iodide ในน้ำกลั่นปริมาณเล็กน้อยก่อน แล้วเติมน้ำให้ครบ เก็บไว้ในขวดสีชา

4. Alcohol-acetone

Ethyl alcohol 95%	250.0	มิลลิลิตร

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

	Acetone	250.0	มิลลิลิตร
5.	Malachite green		
	Malachite green	5.0	กรัม
	น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

น้ำยาทดสอบ

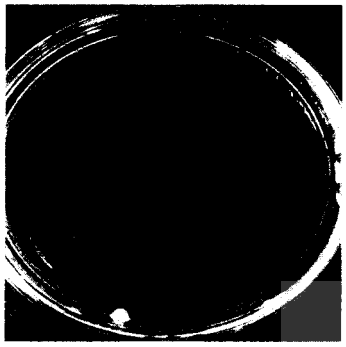
1. **Kovac's reagent**

Amyl หรือ isoamyl alcohol	150.0	มิลลิลิตร
p-diamethylaminobenzaldehyde	10.0	กรัม
HCl (conc.)	50.0	มิลลิลิตร

ภาคผนวก ง

ลักษณะการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี

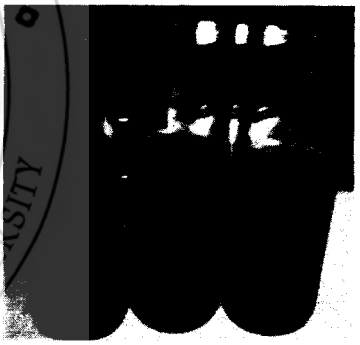
(Isolate 8)



ภาพที่ 1 ลักษณะโคโลนีบนอาหาร MRS agar ที่เติม 1% $CaCO_3$

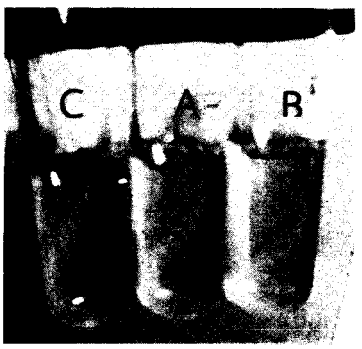
ภาพที่ 2 ลักษณะการติดสีย้อมแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ภาพที่ 3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส



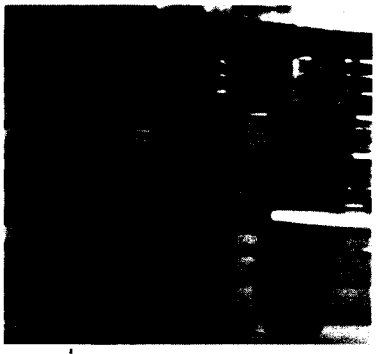
ภาพที่ 4 การทดสอบการสร้างอินโดล
A = ซ้ำที่ 1, B = ซ้ำที่ 2, C = ควบคุม

ภาพที่ 5 การทดสอบการสร้างเอนไซม์ยูเรียเอส
A = ซ้ำที่ 1, B = ซ้ำที่ 2, C = ควบคุม



ภาพที่ 6 การทอสอบการรีดิวซ์ไนเตรตให้เป็นไนไตรต์
A = ซ้ำที่ 1, B = ซ้ำที่ 2, C = ควบคุม

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY



ภาพที่ 7 การทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลกลูโคส (glucose)
A = ซ้ำที่ 1, B = ซ้ำที่ 2, C = ควบคุม

ภาพที่ 8 การทดสอบการหมักย่อยน้ำตาลซูโครส (sucrose)
A = ซ้ำที่ 1, B = ซ้ำที่ 2, C = ควบคุม

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก จ

คำศัพท์ที่ใช้ในการอธิบายลักษณะการเจริญของแบคทีเรีย (กัญจนา ธีระกุล และคณะ, 2547)

โคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าอาหาร (Surface colonies plate culture)

Form (รูปร่างโคโลนี)

Punctiform	ขนาดของโคโลนีที่เล็กมาก แต่ยังเห็นได้ด้วยตาเปล่ามีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 1 มิลลิเมตร
Circular	โคโลนีรูปร่างกลม
Irregular	โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน
Filamentous	โคโลนีเจริญออกไปในลักษณะคล้ายเส้นใยของรา รูปร่างมักจะไม่แน่นอน
Rhizoid	โคโลนีเจริญเป็นเส้นหยาบกว่าพวก filamentous แผ่ออกคล้ายรากต้นไม้

Elevation (ระดับความนูนของโคโลนี)

Effuse	โคโลนีแผ่บางๆบนผิวหน้าของอาหารมักจะไม่สู้เจริญให้เห็นชัด
Flat	โคโลนีที่เจริญกว่า effuse แต่ก็ยังแบนราบบนผิวหน้าอาหาร
Raised	โคโลนีค่อนข้างหนา เจริญสูงขึ้นจากผิวอาหาร แต่ส่วนบนจะเรียบ และด้านริมจะลาดทำมุมกับผิววุ้น
Convex	โคโลนีนูนโค้งจากผิวหน้าอาหาร โคโลนีรูปร่างกลม แต่จะไม่สูงกว่าผิวหน้าอาหารเท่าใดนัก
Pulvinate	โคโลนีรูปกลม นูนโค้งจากผิวหน้าอาหารมากจนเกือบจะเป็นรูปครึ่งวงกลม

Surface (ลักษณะผิวหน้าของโคโลนี)

Smooth	เกลี้ยงเกลา
Rough	ขรุขระ

มหาวิทยาลัยราชภัฏสกลนคร SAKHON NAKHON RAJABHAT UNIVERSITY

Concentrically ringed	มีลักษณะเป็นวงแหวนซ้อนกันหลายๆชั้น
Contoured	ผิวหน้าเกลี้ยง แต่เป็นคลื่น ลักษณะคลื่นไม่แน่นอน
Radiately ridged	มีสันนูนเป็นรัศมีออกจากศูนย์กลาง คล้ายซี่ลวดของล้อรถ
Rugose	ผิวหน้าเป็นรอยย่น

Edge (ริมของโคโลนี)

Entire	เกลี้ยงไม่มีรอยหักเว้า
Undulate	ริมเป็นคลื่น มีโค้งและเว้าเพียงเล็กน้อย
Lobate	เป็นคลื่นที่แหว่งเว้ามาก หรือเรียกเป็น lacerate
Erose	ริมหยักเป็นฟันที่ไม่สม่ำเสมอ
Filamentous	ริมเป็นเส้นๆ คล้ายเส้นใยของรา
Curled	เป็นเส้นซ้อนๆ กัน และหยิกไปมา รูปร่างไม่แน่นอน

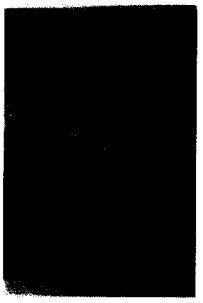
Optical character (ลักษณะเกี่ยวกับแสง)

Opaque	ทึบไม่ให้แสงผ่าน
Translucent	โปร่งแสงพอประมาณ คล้ายกระจกฝ้า
Opalescent	สีคล้าย opal เหลืองขุ่น
Iridescent	สะท้อนแสงเป็นสีเหลืองคล้ายสีรุ้ง
Dull	สีขุ่น ไม่ขึ้นเงา
Glistening	สะท้อนแสงเป็นเงา ไม่ขุ่นมัว
Photogenic	เรือนแสง ให้แสงในที่มืด (photorecent)
Fluorescent	ส่องแสงสีม่วงได้ เมื่อได้รับแสงจากที่อื่นๆ

Consistency (เนื้อโคโลนี)

Butyrous	เละคล้ายเนยเหลว
Viscid	เป็นเมือกเหนียว ถ้าใช้เข็มแตะแล้วยกขึ้นจะติดปลายเข็มเป็นสาย
Membranous	โคโลนีบาง เป็นแผ่นคล้ายเยื่อ
Brittel	แห้งแข็ง เปราะแตกง่าย เมื่อใช้เข็มกด

ประวัติย่อของผู้ทำวิจัย



ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล นางสาว สาปียะ อาแว

วันเดือนปีเกิด 1 มกราคม 2534

สถานที่อยู่ปัจจุบัน 52 หมู่ 5 ตำบลบางเขา อำเภอหนองจิก จังหวัดปัตตานี 94170

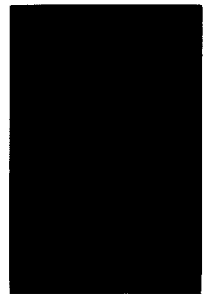
ประวัติการศึกษา พ.ศ 2546 ชั้นประถมศึกษา โรงเรียนบ้านดอนนา

พ.ศ 2549 ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนศาสน์สามัคคี

พ.ศ 2552 ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย มูลนิธิเพื่อการศึกษาโรงเรียนศาสน์สามัคคี

พ.ศ 2558 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY



ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ-สกุล	นางสาว ฮารีดา เจะเตะ
วันเดือนปีเกิด	11 สิงหาคม 2534
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	94 หมู่ 3 ตำบลบางปู อำเภอยะหริ่ง จังหวัดปัตตานี 94150
ประวัติการศึกษา	พ.ศ 2547 ชั้นประถมศึกษา โรงเรียนบ้านบางปู
	พ.ศ 2550 ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสตรีพัฒนศึกษา
	พ.ศ 2553 ชั้นมัธยมตอนปลาย โรงเรียนสตรีพัฒนศึกษา
	พ.ศ 2558 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY