การใช้ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Tetragenococcus* species ที่แยกได้จากการหมักน้ำปลา

นางสาว จารุวรรณ ทองสนิท

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ภาควิชาจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2542

ISBN 974-334-610-4

ลิขสิทธิ์ของ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

DNA-DNA HYBRIDIZATION IN THE IDENTIFICATION OF *Tetragenococcus* SPECIES ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION

Miss Jaruwan Thongsanit

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Industrial Microbiology
Department of Microbiology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 1999

ISBN 974-334-610-4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การใช้ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Tetragenococcus* species ที่แยกได้จากการหมักน้ำปลา
โดย	นางสาว จารุวรรณ ทองสนิท
ภาควิชา	จุลชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ สุชาดา จาติกวนิช
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ ดร. วันชัย โพธิ์พิจิตร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ สุชาดา จาติกวนิช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จารุวรรณ ทองสนิท : การใช้ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Tetragenococcus* species ที่แยกได้จากการหมักน้ำปลา. (DNA-DNA HYBRIDIZATION IN THE IDENTIFICATION OF *Tetragenococcus* SPECIES ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION) อ. ที่ปรึกษา : รศ. สุชาดา จาติกวนิช , อ. ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ , 169 หน้า. ISBN 974-334-610-4 .

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มในกระบวนการหมักน้ำปลาตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก (0-18 เดือน) ในโรงงาน A B และ C โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ พบจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมด ของโรงงาน A อยู่ในช่วง 6.50x10-8.25x10^{5} CFU/ml โรงงาน B อยู่ในช่วง 0-2.40x10^{4} CFU/ml และโรงงาน C อยู่ในช่วง 0-9.90x10^{4} CFU/ml แยกได้แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มทั้งหมด 389 สายพันธุ์ จากโรงงาน A 266 สายพันธุ์ โรงงาน B 100 สายพันธุ์ และโรงงาน C 23 สายพันธุ์ ผลการวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีของตัวอย่างน้ำปลาจากโรงงาน A B และ C พบว่ามีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 4.99-6.31 , 5.06-5.69 และ 4.78-6.30 ปริมาณกรดแลคติคอยู่ระหว่าง 0.76-2.92 , 0.90-3.70 และ 0.20-3.74 เปอร์เซนต์ และปริมาณโซเดียมคลอไรด์อยู่ระหว่าง 18.25-23.62 , 19.25-31.00 และ 22.00-32.50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ

จากการศึกษารูปแบบการหมักน้ำตาล 6 ชนิด คือ เมลซิโทส อะราบิโนส มอลโทส กาแลคโทส ไซโลส และไรโบส เพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม พบว่าแบคทีเรีย 389 สายพันธุ์ จากโรงงาน A B และ C มีรูปแบบการหมักน้ำตาล 24 รูปแบบ คัดเลือกตัวแทนแบคทีเรียจาก 24 รูปแบบของการหมักน้ำตาลรวม 174 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ พบว่าสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียได้เป็น *Tetragenococcus* sp. 172 สายพันธุ์ และอีก 2 สายพันธุ์ ไม่สามารถจัดจำแนกได้ จัดกลุ่มแบคทีเรีย 174 สายพันธุ์ โดยใช้รูปแบบของฟีโนไทป์เป็น 6 กลุ่ม และคัดเลือกตัวแทน 80 สายพันธุ์ เพื่อศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลตโดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยไฟโตไบโอติน พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียทั้ง 80 สายพันธุ์ ได้เป็น 3 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 มี 40 สายพันธุ์ มีเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับแบคทีเรีย *T. halophilus* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33315^{T} เท่ากับ 70.03-109.05 เปอร์เซนต์ จึงจัดเป็นแบคทีเรีย *T. halophilus* กลุ่มที่ 2 มี 38 สายพันธุ์มีเปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับ *T. muriaticus* สายพันธุ์มาตรฐาน JCM 10006^{T} เท่ากับ 70.94-105.60 เปอร์เซนต์ จึงจัดเป็น *T. muriaticus* กลุ่มที่ 3 มี 2 สายพันธุ์ ไม่มีความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับ *T. halophilus* ATCC 33315^{T} , *T. muriaticus* JCM 10006^{T} และ *Aerococcus viridans* TISTS 393^{T} เท่ากับ 3.69-16.30 เปอร์เซ็นต์ จึงไม่สามารถระบุสปีชีส์ได้

คัดเลือกตัวแทนของ *Tetragenococcus* sp. เพื่อศึกษาการสร้างฮีสตามีน , ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค และองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์ พบว่าแบคทีเรียสามารถสร้างฮีสตามีนได้ปริมาณ 0.036 - 52.29 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหาร ไอโซเมอร์ของกรดแลคติคเป็นชนิด แอล และมีองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์ชนิด C18:1 เป็นองค์ประกอบหลัก จากการศึกษาอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่ลดปริมาณกลูโคสเป็น 0.5 เปอร์เซนต์ เหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรียในกลุ่ม *Tetragenococcus* sp. อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ เหมาะสำหรับการเจริญของ *T. halophilus* และที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ เหมาะสำหรับการเจริญของ *T. muriaticus* นอกจากนี้ในงานวิจัยนี้ยังได้ทำการทดลองเบื้องต้นในการเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ พบว่า การเก็บเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อปลาป่นผสมกับรำข้าวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นวิธีที่ให้เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มได้มากที่สุด

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

3970263923 : MICROBIOLOGY

KEYWORD : *Tetragenococcus* sp. / DNA-DNA HYBRIDIZATION / FISH SAUCE

JARUWAN THONGSANIT : DNA-DNA HYBRIDIZATION IN THE IDENTIFICATION OF *Tetragenococcus* SPECIES ISOLATED FROM FISH SAUCE FERMENTATION . THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SUCHADA JATIKAVANICH , THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. SOMBOON TANASUPAWAT , Ph.D. , 169 pp. ISBN 947-334-610-4 .

Halophilic lactic acid bacteria were studied in fermented fish sauce collected from 0 to 18 month products of factories A , B and C using 5 % NaCl-MRS agar. A total halotolerant and halophilic bacterial count ranged from 6.50x10-8.25 x 10^3 , 0-2.40x10^4 and 0-9.90x10^4 CFU/ml for A , B and C , respectively. A total 389 strains of halophilic lactic acid bacteria were isolated 266 ,100 and 23 strains from A , B and C , respectively. Chemical characteristics of samples from A , B and C revealed that they had a pH of 4.99-6.31 , 5.06-5.69 and 4.78-6.30 , lactic acid concentration 0.76-2.92 , 0.90-3.70 and 0.20-3.74 percent and sodium chloride concentration 18.25-23.62 , 19.25-31.00 and 22.00-32.50 percent , respectively. The fermentation of six carbohydrates (melezitose , arabinose , maltose , galactose , xylose and ribose) of 389 isolates was totally 24 patterns.

Based on the phenotypic characteristics studied , 172 isolates selected from 24 patterns were belonged to genus *Tetragenococcus* and 2 isolates were unidentified. Eighty strains selected from 6 groups of phenotypic characteristics were studied for DNA relatedness using photobiotin labelling DNA-DNA hybridization in microplate wells. The bacteria could be catagorized into three groups. Group 1 (40 strains) showed high degree (70.03-109.05 %) of DNA-DNA homologies with *T. halophilus* ATCC 33315^T. Then they were identified as *T. halophilus*. Group 2 (38 strains) showed high degree (70.94-105.60 %) of DNA-DNA homologies with *T. muriaticus* JCM 10006^T. Then they were identified as *T. muriaticus* . Group 3 (2 strains) showed low degree (3.69-16.30 %) of DNA-DNA homologies with *T. halophilus* ATCC 33315^T , *T. muriaticus* JCM 10006^T and *Aerococcus viridans* TISTR 393^T. Then they were left unidentified .

Tetragenococcus sp. strains were selected for study of histamine production , isomer of lactic acid and cellular fatty acid composition. The selected strains could produce histamine ranged from 0.036-52.29 mg/100 ml , L-lactic acid from glucose and the main cellular fatty acids composition of C18:1. MRS medium containing 0.5 % glucose is useful for cultivation of *Tetragenococcus* strains. *T. halophilus* strains could grow well in 5 % NaCl-MRS medium while *T. muriaticus* strains grow well in 10 % NaCl-MRS medium. The preliminary study of starter cultures of selected strains was showed that the bacterial preservation in medium containing fish meal and rice bran kept at 4° C gave highest viability of cells.

ภาควิชา จุลชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา จุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....

ปีการศึกษา 2542 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ลงได้ โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ สุชาดา จาติกวนิช อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุวิมล กีรติพิบูล ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา อัครจรัลญา ที่กรุณาเป็นประธานกรรมการในการสอบและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ คุณอนันต์ นิธิปิติกาญจน์ กรรมการผู้จัดการบริษัทโรงงานน้ำปลาไทย (ตราปลาหมึก) จำกัด และคุณพิรุณ รัตนประสิทธิ์ กรรมการผู้จัดการบริษัทน้ำปลาพิไชย จำกัด ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างน้ำปลา และขอกราบขอบพระคุณ ดร. พรรณทิพย์ สุวรรณสาครกุล สถาบันวิจัยและพัฒนาอุตสาหกรรมสัตว์น้ำ กรมประมง ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการวิเคราะห์ฮีสตามีน

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ รวมทั้งเพื่อน ๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณโครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์ ทบวงมหาวิทยาลัย และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ได้มีส่วนในการสนับสนุนทุนการศึกษาและทุนอุดหนุนการวิจัยให้กับข้าพเจ้า

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ พี่น้อง ที่ได้ให้กำลังใจช่วยเหลือสนับสนุนในการทำวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ
คำย่อ.....ฎ
บทที่
1. บทนำ.....1
2. วารสารปริทัศน์.....4
3. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....36
4. ผลการทดลอง.....62
5. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....98
รายการอ้างอิง.....112
ภาคผนวก
ก.....121
ข.....127
ค.....136
ประวัติผู้เขียน.....169

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	คุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำปลาชั้นคุณภาพที่ 1 และชั้นคุณภาพที่ 2	6
2	ปริมาณและมูลค่าการส่งออกน้ำปลา ในช่วงปี พ.ศ. 2538 ถึง 2541	8
3	กรรมวิธีการผลิตน้ำปลาของประเทศต่าง ๆ	10
4	คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติค	20
5	คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ *Pediococcus* species	23
6	คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Pediococcus* species	24
7	คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมีของ *Tetragenococcus* species	25
8	องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ	59
9	การปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส	60
10	ลักษณะของตัวอย่างน้ำปลาของโรงงาน A B และ C	63
11	ปริมาณแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มในตัวอย่างน้ำปลาของโรงงาน A B และ C	65
12	รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มจากโรงงาน A	71
13	รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มจากโรงงาน B	72
14	รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มจากโรงงาน C	72
15	ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากโรงงาน A B และ C เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน	74

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
16	การจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันบางอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน	77
17	ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ที่แยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน	78
18	ปริมาณฮีสตามีนที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มซึ่งแยกได้จากน้ำปลาสร้างขึ้น เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน	84
19	ไอโซเมอร์ของกรดแลคติคที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มซึ่งแยกได้จากน้ำปลา สร้างขึ้น เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน	87
20	องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มซึ่งแยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน	88
21	การรอดชีวิตของแบคทีเรียสายพันธุ์ K1-35 เปรียบเทียบระหว่างการทำหัวเชื้อโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งและไม่ทำแห้ง	95
22	การรอดชีวิตของแบคทีเรียสายพันธุ์ K5-37 เปรียบเทียบระหว่างการทำหัวเชื้อโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งและไม่ทำแห้ง	96
23	การรอดชีวิตของแบคทีเรียสายพันธุ์ PM-8 เปรียบเทียบระหว่างการทำหัวเชื้อโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งและไม่ทำแห้ง	97
24	รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม	102
25	ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CO-1 และ CO-2 ที่แยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน	106
26	ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรีย *T. halophilus* และ *T. muriaticus*	107

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

1 กรรมวิธีการผลิตน้ำปลา.....9

2 การทำดีเอ็นเอสายเดี่ยวและจับคู่กันของสายดีเอ็นเอ.....30

3 การตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสม จากการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น.....30

4 วิธีการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น.....31

5 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมด ในกระบวนการหมักน้ำปลาของโรงงาน A B และ C.....66

6. การเปลี่ยนแปลงพีเอชในกระบวนการหมักน้ำปลา ของโรงงาน A B และ C.....67

7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติคในกระบวนการหมักน้ำปลา ของโรงงาน A B และ C.....68

8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในกระบวนการหมักน้ำปลา ของโรงงาน A B และ C.....69

9 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มภายใต้กล้องจุลทรรศน์ อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (a) สายพันธุ์ PM-8 (b) สายพันธุ์ K3-26 และ (c) สายพันธุ์ CO-1.....73

10 การเจริญของ *T. halophilus* ATCC 33315^{T} และสายพันธุ์ P7-23 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ.....91

11 การเจริญของ *T. muriaticus* JCM 10006^{T} และสายพันธุ์ K5-37 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ.....92

12 การเจริญของ *T. halophilus* ATCC 33315^{T} และสายพันธุ์ P7-23 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่ปรับสูตร.....93

13 การเจริญของ *T. muriaticus* JCM 10006^{T} และสายพันธุ์ K5-37 ใน อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่ปรับสูตร.....94

สัญลักษณ์และคำย่อ

CFU/ml	=	โคโลนีต่อมิลลิลิตร
ATCC	=	American Type Culture Collection , USA.
JCM	=	Japan Collection of Microorganisms , Japan
TISTR	=	Thailand Institute of Scientific and Technological Research , Thailand
$^{\circ}C$	=	องศาเซลเซียส
%	=	เปอร์เซนต์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

น้ำปลาเป็นสารปรุงรสที่นิยมบริโภคในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจและด้านโภชนาการ น้ำปลาเกิดจากการย่อยสลายของเนื้อปลาโดยเอนไซม์ที่ได้จากทั้งในตัวปลาและจากแบคทีเรีย ชนิดและการทำงานของเอนไซม์จะถูกควบคุมโดยเกลือเพื่อให้ย่อยเนื้อปลาจนกลายเป็นน้ำปลา โปรตีนของเนื้อปลาและไขมันปลาจะถูกย่อยเป็นกรดอะมิโนและกรดไขมันซึ่งทำให้เกิดรสของน้ำปลา บางส่วนของกรดอะมิโนจะถูกใช้ไปทำให้เกิดสีน้ำตาลในน้ำปลาบางส่วนจะกลายเป็นอาหารของแบคทีเรีย โดยเฉพาะแบคทีเรีย "*Pediococcus halophilus*" ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่มีส่วนในการสร้างกรดอินทรีย์ ที่เป็นผลต่อกลิ่นและรสของน้ำปลา (ประเสริฐ , 2511) ดังนั้นจากกิจกรรมของจุลินทรีย์จะทำให้ผลิตภัณฑ์น้ำปลามีรสและกลิ่นของน้ำปลา รวมทั้งมีพีเอชต่ำ เนื่องจากผลิตกรดแลคติคทำให้มีรสและความกลมกล่อม นอกจากนี้ยังมีแบคทีเรียอื่น ๆ เกี่ยวข้อง ได้แก่ *Halobacterium salinarium* , *Staphylococcus* spp.. , *Bacillus* spp. , *Micrococcus* spp. , *Sarcina* sp. และ *Halobacillus thailandensis* เป็นต้น (Chaiyanan และคณะ , 1989 ; Thongthai และคณะ , 1992 ; Phithakpol และคณะ , 1995 ; Chaiyanan และคณะ , 1999)

ปัจจุบัน "*P. halophilus*" จัดอยู่ในสกุล *Tetragenococcus halophilus* โดย Collins และคณะ (1990) ทำการศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA ของ "*P. halophilus*" และแบคทีเรียกรดแลคติคสกุลอื่น ๆ พบว่า "*P. halophilus*" มีลำดับเบสของ 16S rRNA ที่คล้ายหรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียในกลุ่ม enterococci และ carnobacterium มากกว่าแบคทีเรียในกลุ่ม pediococci จึงจัด "*P. halophilus*" ไว้ในสกุล *Tetragenococcus* อย่างเป็นทางการใน Validation list ของ International Journal of Systematic Bacteriology สายพิณและสิทธิพันธุ์ (2526) ทดสอบความสามารถในการให้กลิ่นของ "*P. halophilus*" พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มนี้สามารถให้กลิ่นคล้ายน้ำปลา Chaiyanan และ คณะ (1989) ได้ศึกษาการผลิตน้ำปลาที่ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้น โดยการใช้เชื้อตั้งต้น คือ "*P. halophilus*" ร่วมกับเชื้ออื่น ๆ และทำการหมักในถังหมักที่มีระบบหมุนเวียน ทำให้ได้น้ำปลามีปริมาณไนโตรเจนทั้งหมดและกรดอะมิโนไนโตรเจนสูง รวมทั้งน้ำปลามีสีเข้มและเกิดกลิ่นหอมของน้ำปลาเร็วขึ้น Itoh และคณะ (1985a) ศึกษาส่วนประกอบที่เป็นกรดอินทรีย์ในน้ำปลาพบว่ามีกรดแลคติคมากที่สุด ซึ่งเกิดจากกิจกรรม

ในการหมักกรดแลคติคของจุลินทรีย์ในน้ำปลา และ Thitiwan (1996) พบแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *T. halophilus* ในกระบวนการหมักซีอิ๊วของไทย ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก ซึ่ง Kenbe และ Uchida (1987) ได้นำ "*P. halophilus*" เป็นหัวเชื้อร่วมในการหมักซีอิ๊วญี่ปุ่น แต่ยังไม่มีการใช้ *T. halophilus* เป็นหัวเชื้อร่วมในกระบวนการหมักน้ำปลาไทย

Tetragenococcus halophilus เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่มีบทบาทสำคัญในการผลิตน้ำปลาและซีอิ๊ว เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปร่างกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ (tetrad) สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์ Nakagawa และ Kitahara (1959) จัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคในสกุล *Pediococcus* โดยใช้คุณสมบัติการทนเค็มที่แตกต่างจากเชื้อสปีชีส์อื่น ๆ และในการจัดจำแนก "*P. halophilus*" ปัจจุบันได้มีการนำเอาเทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น (DNA-DNA hybridization) มาใช้ในการจัดจำแนกสปีชีส์ของ *Pediococcus* โดย Dellaglio และคณะ (1981) ได้จัดจำแนก *Pediococcus* 60 สายพันธุ์ เทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานของ *Pediococcus* 8 สปีชีส์ ได้ใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น พบว่าจัดจำแนกเชื้อได้ 7 สปีชีส์ (> 78 เปอร์เซนต์โฮโมโลยี) ซึ่งในระบบสากลกำหนดให้เปอร์เซนต์โฮโมโลยีกับโพรบ (probe) มากกว่า 70 เปอร์เซนต์ จึงจะยอมรับว่ามีความสัมพันธ์ทางไฟโลเจนนี (phylogeny) ในระดับสปีชีส์ (Wayne และคณะ , 1987)

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อจะศึกษาการแยกและการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ที่มีบทบาทสำคัญในการหมักน้ำปลา ซึ่งยังมีการศึกษากันน้อยมาก โดยพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ควบคู่กับการวิเคราะห์ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับสายพันธุ์มาตรฐาน เนื่องจากในประเทศไทยยังไม่มีผู้ใดทำการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียนี้ถึงระดับนี้มาก่อน รวมทั้งการศึกษาเบื้องต้นซึ่งจะเป็นประโยชน์สำหรับการเตรียมเชื้อตั้งต้นต่อไป

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มในกระบวนการหมักน้ำปลา พร้อมทั้งศึกษาสมบัติบางประการของน้ำปลา

2. เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ พร้อมทั้งศึกษาการสร้างฮีสตามีน ชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติคและองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์

3. เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์โดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลตโดยติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยไฟโตไบโอติน

4. เพื่อศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มและทดลองเบื้องต้นเพื่อเตรียมหัวเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มในการหมักน้ำปลา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

น้ำปลา

น้ำปลาเป็นอาหารหมักพื้นเมืองในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ใช้สำหรับปรุงรสอาหาร แต่ละประเทศมีชื่อเรียกน้ำปลาหรือของเหลวซึ่งผลิตโดยวิธีการคล้ายคลึงกับน้ำปลาแตกต่างกัน เช่น พม่า เรียกว่า Ngapi กัมพูชาและเวียดนาม เรียกว่า Nuoc-mam อินโดนิเซีย เรียกว่า Ketjap-Ikan ฟิลิปปินส์และมาเลเซียเรียกว่า Patis และ Budu ตามลำดับ ญี่ปุ่น เรียกว่า Shottsuru และ ไทย เรียกว่า Nam-pla (Beddows , 1998)

น้ำปลาหมายถึง ผลิตภัณฑ์ที่เป็นของเหลวรสเค็มใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสของอาหาร ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 118 พ.ศ. 2532 ได้แบ่งน้ำปลาในประเทศไทยเป็น 3 ประเภท คือ

1. น้ำปลาแท้ หมายถึง น้ำปลาที่ได้จากการหมักหรือย่อยปลาหรือส่วนของปลา หรือกากปลาที่เหลือจากการหมัก ตามกรรมวิธีการผลิตน้ำปลา
2. น้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น หมายถึง น้ำปลาที่ได้จากการหมักหรือย่อยสัตว์อื่นซึ่งมิใช่ปลา หรือส่วนของสัตว์อื่น หรือกากของสัตว์อื่นที่เหลือจากการหมัก ตามกรรมวิธีการผลิตน้ำปลา และให้หมายความรวมถึงน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่นที่มีน้ำปลาแท้ผสมอยู่ด้วย

น้ำปลาแท้และน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่นต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐาน ดังต่อไปนี้

1. มีสี กลิ่นและรส ของน้ำปลาแท้ หรือน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่นแล้วแต่กรณี
2. ใส ไม่มีตะกอน เว้นแต่ตะกอนอันเกิดขึ้นตามธรรมชาติไม่เกิน 0.1 กรัม ต่อน้ำปลา 1 ลิตร
3. มีแกลือโซเดียมคลอไรด์ ไม่น้อยกว่า 200 กรัม ต่อน้ำปลา 1 ลิตร
4. มีไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 9 กรัม ต่อน้ำปลา 1 ลิตร
5. มีไนโตรเจนจากกรดอะมิโนไม่น้อยกว่าร้อยละ 40 และไม่เกินร้อยละ 60 ของไนโตรเจนทั้งหมด
6. มีกรดกลูตามิคต่อไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 0.4 แต่ต้องไม่เกิน 0.6
7. ไม่ใส่สี เว้นแต่สีน้ำตาลเคี่ยวไหม้หรือสีคาราเมล
8. ไม่ใช้วัตถุที่ให้ความหวานแทนน้ำตาล

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. น้ำปลาผสม หมายถึง น้ำปลาแท้ หรือน้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่น ที่มีสิ่งอื่นที่ไม่เป็นอันตรายแก่ผู้บริโภคเจือปน หรือเจือจาง หรือปรุงแต่งกลิ่นรส

น้ำปลาผสม ต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานดังต่อไปนี้

1 มีสี กลิ่น และรสของน้ำปลาผสม

ข้อ 2. และ 3. เหมือนน้ำปลาแท้

4. มีไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 4 กรัมต่อน้ำปลา 1 ลิตร

5. มีกรดกลูตามิคต่อไนโตรเจนทั้งหมดไม่น้อยกว่า 0.4 และ ต้องไม่เกิน 1.3

ข้อ 7. และ 8. เหมือนน้ำปลาแท้

ทั้งนี้น้ำปลายังมีความหมาย รวมถึงน้ำปลาแท้ น้ำปลาที่ทำจากสัตว์อื่นหรือน้ำปลาผสมที่ได้ระเหยน้ำออกด้วย และต้องมีคุณภาพหรือมาตรฐานตามชนิดของน้ำปลานั้น แล้วแต่กรณีเมื่อทำให้คืนรูปแล้ว

นอกจากนี้ประกาศกระทรวงอุตสาหกรรม ฉบับที่ 678 (พ.ศ.2526) เรื่องมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำปลาพื้นเมือง ให้ความหมายของน้ำปลา คือ ของเหลวที่ได้จากการหมักปลาหรือส่วนของปลากับเกลือ หรือกากปลาที่เหลือจากการหมักกับน้ำเกลือตามกรรมวิธีการทำน้ำปลา เพื่อยกระดับมาตรฐานและคุณภาพของน้ำปลา โดยกำหนดว่าน้ำปลาต้องมีลักษณะใสปราศจากตะกอนยกเว้น ผลึกซึ่งเกิดจากเกลือโซเดียมคลอไรด์ และได้แบ่งน้ำปลาออกเป็น 2 ชั้นคุณภาพ คือ ชั้นคุณภาพที่ 1 และชั้นคุณภาพที่ 2 โดยมีคุณลักษณะทางกายภาพและเคมีดังตารางที่ 1

คุณค่าด้านโภชนาการของน้ำปลา

น้ำปลาเป็นส่วนประกอบสำคัญในการปรุงอาหารใช้กันมากโดยเฉพาะทางแถบเอเชีย คนไทยนิยมใช้น้ำปลาสำหรับปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารมาเป็นเวลานาน ประโยชน์ของน้ำปลานอกจากจะใช้ปรุงแต่งกลิ่นรสอาหารแล้ว ยังให้คุณค่าอาหารอีกด้วย เพราะน้ำปลาที่ผลิตโดยกรรมวิธีที่ถูกต้องจะมีปริมาณไนโตรเจนซึ่งเป็นองค์ประกอบของโปรตีนไม่น้อยกว่า 20 กรัมต่อลิตรและ 10 กรัมต่อลิตรของปริมาณกรดอะมิโนไนโตรเจน ซึ่งจัดเป็นน้ำปลาแท้ หรือที่เรียกกันว่าน้ำปลาชั้นหนึ่ง เมื่อบริโภคน้ำปลา 40 มิลลิลิตร น้ำปลาจะให้โปรตีนคิดเป็นร้อยละ 7.5 เปอร์เซนต์ ของปริมาณโปรตีนทั้งหมดที่ควรจะได้รับในแต่ละวัน (Dougan และ Howard , 1975)

ตารางที่ 1 คุณลักษณะทางกายภาพและทางเคมีของน้ำปลาชั้นคุณภาพที่ 1 และชั้นคุณภาพที่ 2

ลำดับ	คุณลักษณะที่ต้องการ	ชั้นคุณภาพที่	
--		1	2
1	ความหนาแน่นสัมพัทธ์ที่อุณหภูมิ 27/27 องศาเซลเซียส ไม่น้อยกว่า	1.2	1.2
2	พีเอช (pH)	5.0 – 6.0	5.0 – 6.0
3	โซเดียมคลอไรด์ กรัมต่อ ลูกบาศก์เดซิเมตร ไม่น้อยกว่า	230	230
4	ไนโตรเจนทั้งหมด กรัมต่อ ลูกบาศก์เดซิเมตร ไม่น้อยกว่า	20	20
5	อัตราส่วนของกรดกลูตามิคต่อ ไนโตรเจนทั้งหมด	0.4 – 0.6	0.4 – 0.6
6	ไนโตรเจนจากกรดอะมิโน กรัมต่อ ลูกบาศก์เดซิเมตรไม่น้อยกว่า	10	7.5

(ที่มา : มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำปลาพื้นเมือง , 2526)

กรดอะมิโนที่พบในน้ำปลา คือ ทริปโตแฟน (Tryptophan) ไลซีน(Lysine) กรดแอสปาร์ติค (Aspartic acid) กรดกลูตามิค (Glutamic acid) ไกลซีน (Glycine) อะลานีน (Alanine) เซอรีน (Serine) ทรีโอนีน (Threonine) ฮีสติดีน (Histidine) วาลีน (Valine) ลูซีน (Leucine) ไอโซลูซีน (Isoleucine) และ ฟีนิลอะลานีน (Phenylalanine) ปริมาณของกรดอะมิโนจำเป็น เช่น ไลซีน ซึ่งมีปริมาณสูงพอที่จะทดแทนการขาดไลซีนในคนที่รับประทานข้าวเป็นหลัก น้ำปลาเป็นแหล่งเกลือแร่ ได้แก่ โซเดียม แคลเซียม ฟอสฟอรัส เหล็ก และ ไอโอดีน รวมทั้งวิตามินบี 12 ในน้ำปลาจะสูงมากกว่า 10 เท่าของปริมาณวิตามินนี้ในซีอิ๊ว และยังพบแพนโธทินิค (ระเบียบ , 2512 ; รายงานกิจกรรมของกรมวิทยาศาสตร์ , 2516-2517 ; วิมล , 2521 ; วิไลลักษณ์ , 2538 ; Abe , 1999) และกรดโฟลิค ซึ่งช่วยป้องกันโรคโลหิตจาง (รายงานกิจกรรมของกรมวิทยาศาสตร์ , 2517-2519)

เศรษฐกิจของน้ำปลา

น้ำปลาเป็นเครื่องปรุงรสที่เป็นที่นิยมของครอบครัวไทยมาก ดังจะเห็นได้จากค่าใช้จ่ายของน้ำปลาจะมากกว่าเครื่องปรุงรสชนิดอื่น ๆ กล่าวคือในปี พ.ศ. 2529 ค่าใช้จ่ายน้ำปลาโดยเฉลี่ยทั้งประเทศในระยะหนึ่งสัปดาห์ เป็นจำนวนเงิน 3.40 บาท หรือ ร้อยละ 37 ของค่าใช้จ่ายเกี่ยวกับเครื่องปรุงรสโดยเฉลี่ยทั้งประเทศในระยะหนึ่งสัปดาห์ จากความนิยมบริโภคน้ำปลาของประชาชนประกอบกับการเพิ่มขึ้นของประชากรย่อมทำให้อุตสาหกรรมน้ำปลามีความสำคัญขึ้นเป็นลำดับ และจากการสำรวจพบว่า ในแต่ละวันชาวไทยบริโภคน้ำปลาโดยเฉลี่ยอย่างน้อยคนละ 20 มิลลิลิตร ดังนั้นจากจำนวนประชากรทั้งประเทศย่อมทำให้การบริโภคน้ำปลาถึงวันละ 1,340,000 ขวด (มณฑิรา , 2529) แหล่งผลิตน้ำปลาที่สำคัญกระจายอยู่ในบริเวณภาคตะวันออกของไทย ได้แก่ จังหวัดระยอง สมุทรสงคราม สมุทรปราการ และ ชลบุรี (ฉาดยา , 2535) นอกจากนี้น้ำปลายังเป็นสินค้าออกที่กำลังมีความสำคัญเพิ่มขึ้นจาก 25,241,834 กิโลกรัมในปี พ.ศ. 2538 ถึง 31,745,321 กิโลกรัมในปี พ.ศ 2541 ส่วนมูลค่าการส่งออกนั้นเพิ่มจาก 472.91 ล้านบาท ในปี พ.ศ. 2538 เป็น 637.57 ล้านบาท ในปีพ.ศ. 2541 โดยมีประเทศสหรัฐอเมริกา เป็นผู้นำเข้าน้ำปลาที่สำคัญของไทย รองลงมาคือประเทศ ญี่ปุ่น ฮ่องกง และฝรั่งเศส เป็นต้น (กรมศุลกากร , 2538 ; 2539 ; 2540 ; 2541) ดังแสดงในตารางที่ 2

กรรมวิธีการผลิตน้ำปลา (Beddows , 1998 ; Phithakpol และ คณะ , 1995)

น้ำปลาที่ผลิตในประเทศไทย โดยทั่วไปทำจากปลากะตัก (*Stolephorus* spp.) ปลากุแล (*Sardinella* spp.) ปลาทู (*Rastrelliger* spp.) และปลาสร้อย (*Cirrhinus* spp.) ปลา 3 ชนิดแรกเป็นปลาน้ำเค็ม โดยมากจะใช้ในการผลิตน้ำปลาในโรงงานตามแถบชายฝั่งทะเล ปลาสร้อยเป็นปลาน้ำจืดที่ใช้ในการผลิตน้ำปลาแต่พบเป็นจำนวนน้อยกว่า โดยมากโรงงานตั้งอยู่บริเวณภาคกลางซึ่งไม่ติดชายฝั่งทะเล

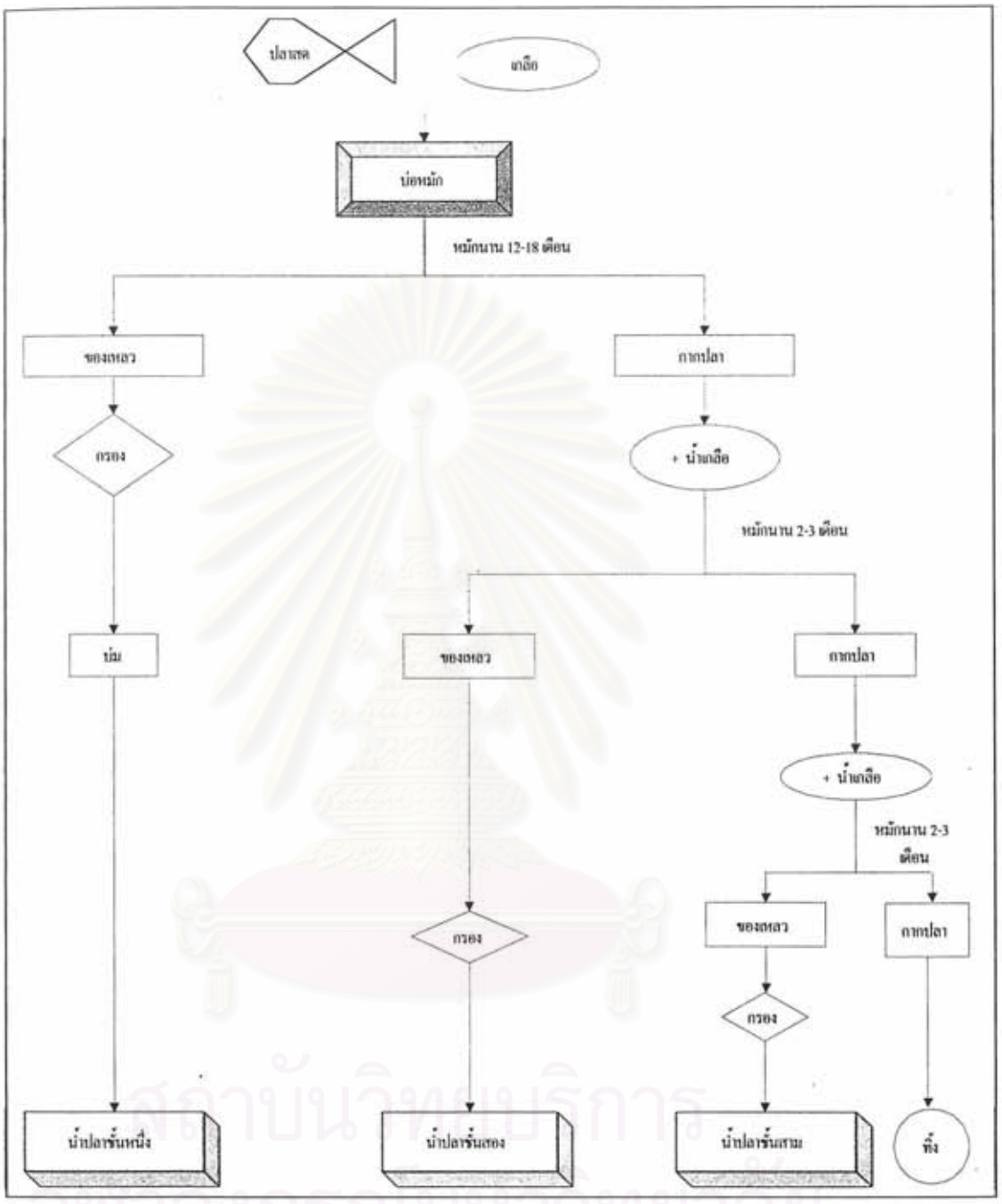
กรรมวิธีการผลิตน้ำปลามีดังนี้ นำปลามาคลุกเคล้ากับเกลือโดยใช้อัตราส่วน ปลา 3 ส่วน ต่อเกลือ 1 ส่วน หรือ ปลา 4 ส่วน ต่อเกลือ 1 ส่วน คลุกเคล้าปลากับเกลือเข้ากันดีแล้ว จึงนำไปบรรจุในภาชนะซึ่งอาจเป็นบ่อซีเมนต์ ที่มีการใส่เกลือจำนวนหนึ่งรองอยู่ก่อนแล้ว เพราะเมื่อปลาถูกเกลือจะเริ่มคายน้ำออกมา และถ้าน้ำที่ออกมาไม่เค็มพอจะทำให้ปลาที่อยู่ใกล้กับน้ำที่ไม่เค็มมีสีดำคล้ำ ซึ่งอาจทำให้ปลาเกิดการเน่าเสียได้ เมื่อบรรจุส่วนผสมของปลาและเกลือแล้วต้องเทเกลือทับชั้นบนอีกครั้ง เพื่อป้องกันไม่ให้ปลาชั้นบนเน่าเสีย จากนั้นนำเสื่อลำแพน หรือ ไม้ไผ่ขัดลำและก้อนหิน วางทับชั้นบน เพื่อป้องกันการลอยตัวของปลาพ้นจากน้ำเกลือขึ้นมา หมักปลาประมาณ 12-18 เดือน น้ำปลาที่ได้ในครั้งแรกจะมีสีน้ำตาลแดง ข้น และมีกลิ่นคาว เรียกว่า

หัวน้ำปลาหรือน้ำปลาชั้นหนึ่ง ซึ่งไม่นิยมนำไปขายแต่จะเก็บไว้ใช้สำหรับผสมกับน้ำปลาชั้นสองหรือชั้นอื่น ๆ เพื่อขายเป็นน้ำปลาต่อไป โดยน้ำปลาชั้นสองหรือชั้นอื่น ๆ จะได้จากกากปลาที่เหลือจากการทำน้ำปลาชั้นหนึ่ง นำไปหมักกับน้ำเกลือเข้มข้นอีก 2 - 3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้เวลาประมาณ 2 – 3 เดือน จะได้น้ำปลาชั้นที่สอง และ สาม ซึ่งมีคุณภาพลดหลั่นกันตามลำดับ (รูปที่ 1) น้ำปลาที่ได้จากการหมักนี้จะต้องผ่านเครื่องกรองกากปลา แล้วนำไปปรุงรสด้วยน้ำตาลประมาณ 2 เปอร์เซนต์ และผงชูรส 0.01 เปอร์เซนต์ กรรมวิธีการผลิตน้ำปลาของประเทศอื่น ๆ ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 2 ปริมาณและมูลค่าการส่งออกน้ำปลา ในช่วงปี พ.ศ. 2538 ถึง 2541

ประเทศ	2538 (ล้านบาท)	2539 (ล้านบาท)	2540 (ล้านบาท)	2541 (ล้านบาท)
สหรัฐอเมริกา	166.52	155.70	212.23	233.94
ญี่ปุ่น	44.28	60.77	75.29	72.44
ฮ่องกง	46.57	53.07	62.83	71.17
ฝรั่งเศส	40.27	36.15	47.29	39.89
แคนาดา	28.39	11.47	30.50	26.20
ออสเตรเลีย	32.63	36.62	41.16	47.36
ลาว	16.13	20.25	24.69	18.81
สิงคโปร์	14.16	13.87	14.24	15.58
เนเธอร์แลนด์	10.37	10.54	16.24	18.46
ไต้หวัน	13.15	12.06	16.10	14.37
รวม	472.91	466.44	606.22	637.57

(ที่มา : กรมศุลกากร 2538 , 2539 , 2540 , 2541)



รูปที่ 1 กรรมวิธีการผลิตน้ำปลา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 กรรมวิธีการผลิตน้ำปลาของประเทศต่าง ๆ

ประเทศ	ชื่อเรียก	วัตถุดิบ	อัตราส่วนของปลาต่อเกลือ และระยะเวลาของการหมัก
ญี่ปุ่น	โชทชึรุ (Shottsuru)	ปลาหลังเขียว ปลาตาแหงนและ ปลาหมึกกล้วย	5 : 1 (เติมข้าวมอลต์และโคจิ) หมัก 6 เดือน
เวียดนามและ กัมพูชา	นอกมาม (Nouc mam)	ปลาไส้ตัน ปลาทู ปลากะตัก ปลาทูแขก ปลาตะเพียนน้ำเค็ม	3 : 1 ถึง 3 : 2 หมัก 3-12 เดือน
ไทย	น้ำปลา (Nam-pla)	ปลาไส้ตัน ปลาทู ปลาหลังเขียว ปลากระตัก ปลาสร้อย	2 : 1 ถึง 3 : 1 หมัก 12-18 เดือน
มาเลเซีย	บูดู (Budu)	ปลาไส้ตัน	5 : 1 ถึง 3 : 1 (เติมน้ำตาลและ มะขาม) หมัก 3-12 เดือน
ฟิลิปปินส์	ปาติส (Patis)	ปลาไส้ตัน ปลาหลังเขียว ปลาทูแขก	4 : 1 ถึง 3 : 1 หมัก 3-12 เดือน
อินโดนิเซีย	เคทแจปอิคาน (Ketjab-ikan)	ปลาแป้นและปลาน้ำจืด บางชนิด	6 : 1 หมัก 6 เดือน
อินเดียและ ปากีสถาน	โคลัมโบเคอร์ (Colombocure)	ปลาทู ปลาหลังเขียว ปลาอินทรี	6 : 1 (ใช้ปลาเอาไส้ออก เติม มะขาม) หมัก > 12 เดือน
ฮ่องกง	-	ปลากะตัก ปลาหลังเขียว ปลาหางแข็งปลาขี้ตังเป็ด	4 : 1 หมัก 3-12 เดือน
ฝรั่งเศส	แอนโชวี Anchovy	ปลากะตัก	2 :1 (ใช้ปลาเอาไส้ออก) หมัก 6-7 เดือน

(ที่มา : Beddows , 1998)

องค์ประกอบของน้ำปลา

Saisithi (1966) วิเคราะห์องค์ประกอบในน้ำปลาตั้งแต่เริ่มหมักจนสิ้นสุดการหมัก (1-12 เดือน) พบว่ามีพีเอช 6.2-6.6 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 27.9-30.3 เปอร์เซนต์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 49-140 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร และแอมโมเนียไนโตรเจน 8-15 มิลลิโมลต่อมิลลิลิตร

Phithakpol และคณะ (1995) วิเคราะห์น้ำปลาชั้น 1 และน้ำปลาทั่วไป พบว่าน้ำปลาชั้น 1 ประกอบด้วย ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 28.15 เปอร์เซนต์ ปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด 1.92 เปอร์เซนต์ ปริมาณฟอร์มาลดีไฮด์ไนโตรเจน (formaldehyde nitrogen) 1.13 เปอร์เซนต์ อินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen) 1.64 เปอร์เซนต์ อะมิโนไนโตรเจน (amino nitrogen) 0.85 เปอร์เซนต์ มีค่าพีเอช เท่ากับ 5.3 – 6.6 และน้ำปลาทั่วไป ประกอบด้วยโปรตีน 1.8-2.2 เปอร์เซนต์ ไขมัน 0.7- 4.7 เปอร์เซนต์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 22.8 - 26.2 เปอร์เซนต์ และมีค่าพีเอช เท่ากับ 5.7- 6.0

Dougan และ Howard (1975) พบว่ากลิ่นของน้ำปลาเกิดจากสารประกอบ 3 กลุ่มคือ

1. กลิ่นแอมโมเนีย เกิดจากก๊าซแอมโมเนียและ ไทรเมทิลเอมีน(trimethylamine)
2. กลิ่นเนย จากกรดไขมันระเหย (volatile fatty acid)
3. กลิ่นเนื้อ จากคีโตน (ketone) และ คีโตนแอซิด (ketone acid)

Itoh และคณะ (1985b) พบว่ากรดแลคติค กรดอะซิติค และ กรดไพโรกลูตามิค (pyroglutamic acid) มีปริมาณมากในน้ำปลา

Sanceda และคณะ (1986) ศึกษาสารระเหยในน้ำปลาของญี่ปุ่น เวียดนาม และไทย พบสารระเหยในน้ำปลาทั้งหมด 50 44 และ 49 ชนิด ตามลำดับ ซึ่งประกอบด้วยสารประกอบดังนี้ กรด แอลกอฮอล์ สารประกอบไนโตรเจน สารประกอบซัลเฟอร์ แลคโตน เอสเทอร์ ฟีนอล คาร์บอนิล และ ไฮโดรคาร์บอน

จีรพันธ์ (2538) พิสูจน์พบสารระเหยให้กลิ่นเป็นกรด 12 ชนิด คาร์บอนิล 2 ชนิด ไฮโดรคาร์บอน 4 ชนิด แอลกอฮอล์ 10 ชนิด ไนโตรเจน 2 ชนิด เอสเทอร์ 6 ชนิด ฟีนอล และไดออกเซน สารระเหยให้กลิ่นที่ตรวจพบได้ในน้ำปลาทุกตัวอย่าง คือ กรดบิวทาโนอิค (butanoic) กรดฟีนิลอะซีติค (phenylacetic) กรดโพรพิโอนิค (propionic) กรดไอโซเพนทาโนอิค

(isopentanoic) กรดเบนโซอิค (benzoic) และ อินโดล (indole) ดังนั้นสารเหล่านี้อาจเป็นสารระเหยให้กลิ่นที่สำคัญที่มีบทบาทมากในการทำให้เกิดกลิ่นที่ดีของน้ำปลาไทย ส่วนสารระเหยที่พบเฉพาะน้ำปลาไทยเท่านั้นคือ กรดไพวาลิค (pivalic)

Shimoda และคณะ (1996) วิเคราะห์สารระเหยจากน้ำปลาโดยวิธีก๊าซโครมาโทรกราฟี และ ก๊าซโครมาโทรกราฟี แบบแมสสเปคโทรเมทรี (GC–mass spectrometry) พบสารระเหย 124 ชนิด ประกอบด้วย สารประกอบไนโตรเจนและสารประกอบซัลเฟอร์ที่พบมากที่สุด คือ ไทรเมทิลเอมีน (trimethylamine) และ ไดเมทิลไดซัลไฟด์ (dimethyl disulfide)

จุลินทรีย์ในน้ำปลา

น้ำปลาเกิดจากการเปลี่ยนแปลงสภาพทางกายภาพและทางชีวภาพของปลา โดยเอนไซม์จากระบบทางเดินอาหารของปลา หรือเอนไซม์ที่ผลิตจากจุลินทรีย์ที่ติดมากับตัวปลา เกลือที่ใช้ทำน้ำปลา เครื่องมือเครื่องใช้ หรือสถานที่ในการผลิตน้ำปลา จุลินทรีย์ที่สำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักน้ำปลา คือแบคทีเรียชอบเค็มและไม่ชอบเค็ม ในระยะแรกของกระบวนการหมักแบคทีเรียไม่ชอบเค็มจะตายและลดจำนวนลงอย่างรวดเร็ว ส่วนแบคทีเรียชอบเค็มจะสามารถเพิ่มจำนวนได้ (สายพิณ , 2528)

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักน้ำปลาต้องอยู่ในสภาวะที่มีเกลืออยู่มาก ซึ่งอาจจัดแบคทีเรียที่สามารถเจริญในสภาวะที่มีเกลืออยู่ด้วยออกเป็น 2 กลุ่ม (Gibbons, 1969) คือ

1. <u>แบคทีเรียทนเค็ม</u> (halotolerant bacteria) ซึ่งสามารถเจริญได้ทั้งในสภาวะที่ไม่มีเกลือหรือมีเกลืออยู่เกินกว่า 5 เปอร์เซนต์ ส่วนใหญ่พบว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียทำให้เกิดการเน่าเสีย เช่น *Staphylococcus aureus* , *Clostridium perfringens* , *Cl. botulinum* , *Bacillus* sp. , *Micrococcus* sp. และ แบคทีเรียในกลุ่ม Corynebacteria

2. <u>แบคทีเรียชอบเค็ม</u> (halophilic bacteria) ซึ่งสามารถเจริญได้เฉพาะในสภาวะที่มีเกลืออยู่ด้วยเท่านั้น ได้จำแนกแบคทีเรียกลุ่มนี้ตามปริมาณเกลือที่ต้องการในการเจริญออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

2.1 แบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง (moderately halophilic bacteria) เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ 3-15 เปอร์เซนต์ เช่น *Micrococcus halodenitrifican* และ *Halobacillus thailandensis* (Chaiyanan และคณะ , 1999)

2.2 แบคทีเรียชอบเค็มมาก (extremely halophilic bacteria) เจริญได้ในสภาวะที่มีเกลือ 15-30 เปอร์เซนต์ เช่น แบคทีเรียในสกุล *Halococcus* และ *Halobacterium* โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้จะมีโคโลนีสีแดงหรือชมพูและมีการเจริญช้ามากถึงแม้จะอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมก็ตาม แบคทีเรียพวกนี้พบมากในเกลือทะเล

Saisithi และคณะ (1966) แยกแบคทีเรียจากน้ำปลา พบแบคทีเรีย *Bacillus* spp. , กลุ่ม coryneform , *Streptococcus* spp. , *Staphylococcus* sp. และ *Micrococcus* sp.

ประเสริฐ (2511) ศึกษาเรื่องการทำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลาโดยแบคทีเรีย พบว่ากลิ่นที่เกิดขึ้นเนื่องจากแบคทีเรียแบ่งได้เป็น 3 ชนิดด้วยกัน คือ

1. กลิ่นหอมคล้ายกุหลาบ เกิดจากแบคทีเรียรูปแท่ง ติดสีแกรมบวก เป็นแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนในการเจริญ (obligate anaerobes) และในอาหารที่ใช้เลี้ยงจะต้องมีโซเดียมคลอไรด์อยู่ด้วยไม่น้อยกว่า 10 เปอร์เซนต์
2. กลิ่นเนื้อ แบคทีเรียรูปแท่งสั้นและมน ติดสีแกรมลบ ไม่เคลื่อนที่
3. กลิ่นกรด ซึ่งใกล้เคียงกลิ่นของน้ำปลามาก กลิ่นนี้ได้จากแบคทีเรียรูปกลมอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม สร้างกรดแลคติค ที่พบในน้ำปลา คือ "*P. halophilus*"

Crisan และ Sands (1975) , สายสมร (2518) และ สิทธิพันธุ์ (2522) พบ *Bacillus* spp. , *Micrococcus* sp., *Staphylococcus* sp., กลุ่ม coryneform , *Sarcina* sp. , *Lactobacillus* sp. , *Streptococcus* sp. , "*P. halophilus*" , *Pseudomonas* sp. , ยีสต์และราเล็กน้อยในน้ำปลา

สายพิณ และ สิทธิพันธุ์ (2526) ศึกษาแบคทีเรียที่พบในน้ำปลา ทั้งจากน้ำปลาที่ผลิตจากปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม คือ "*P. halophilus*" และ *Bacillus* spp. โดย "*P. halophilus*" พบเป็นส่วนใหญ่ และมีคุณสมบัติเจริญได้ในอาหารที่เป็นกรดเล็กน้อย และมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ถึง 20 เปอร์เซนต์ สามารถสร้างกรดแลคติคในอาหารเลี้ยงเชื้อ ส่วน *Bacillus* spp. พบเป็นส่วนน้อย เจริญได้ในภาวะที่เป็นกรดเล็กน้อย แต่เจริญได้ในอาหารที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูงสุด 15 เปอร์เซนต์ ไม่สามารถสร้างกรดแลคติคในอาหารเลี้ยงเชื้อ และนอกจากนี้ผู้วิจัยยังทดสอบความสามารถในการทำให้เกิดกลิ่นในอาหารเบรนฮาร์ทอินฟิวชั่น (brain heart infusion) และฟิชมีลไฮโดรไลเสต (fish meal hydrolysate) พบว่า "*P. halophilus*" ทำให้เกิดกลิ่นคล้ายน้ำปลา

มัทนา และ สุรศักดิ์ (2527) , Tanasupawat และ Daengsubha (1983) และ Itoh และคณะ (1985b) ศึกษาแบคทีเรียจากน้ำปลาพบแบคทีเรีย *Micrococcus* spp. , *P. cerevisiae* , "*P. halophilus*" , *Bacillus* spp. , *Aerococcus haloviridans* , *Staphylococcus saprophyticus* , *Peptococcus anaerobius* , *Paracoccus halodenitrificans* , *Streptococcus* sp. , *Lactobacillus* sp. , *Pseudomonas* sp. , กลุ่ม coryneform , *Halobacterium* sp. และ *Halococcus* sp.

กฤษดา (2529) ทำการแยกแบคทีเรียจากน้ำปลา และจำแนกแบคทีเรียตามความต้องการเกลือสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ทนเค็มและชอบเค็มปานกลางโดยสามารถเจริญในอาหารที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 0-20 เปอร์เซนต์ คือ *Staphylococcus* sp. , *Staphylococcus saprophyticus* , *Micrococcus varian* , *Micrococcus luteus* , *Bacillus circulan* , *Bacillus brevis* , กลุ่ม coryneforms และแบคทีเรียรูปท่อน ติดสีแกรมลบ ส่วนกลุ่มที่ชอบเค็มมากสามารถเจริญได้ที่ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 20-30 เปอร์เซนต์ คือ *Halococcus morrhuae* และ *Halobacterium salinarium* และได้นำ *Halobacterium salinarium* มาทดลองหมักน้ำปลา พบว่าให้กลิ่นหอมของน้ำปลามากภายใน 28 วัน เหมือนกับน้ำปลาหมักตามธรรมชาติ

สาโรจน์ (2531) ศิริเพ็ญ (2533) และ วรรณา (2533) ได้คัดเลือกแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มที่สร้างเอนไซม์โปรติเอสได้ดีที่สุดในน้ำปลา คือ *Halococcus morrhuae* , *Halobacterium* sp. และ *Bacillus* sp. ตามลำดับ

พงษ์เทพ (2533) ศึกษาแบคทีเรียทนเค็มที่สร้างเอนไซม์ไลเปสในน้ำปลา พบแบคทีเรียในสกุล *Clostridium* ซึ่งมีคุณสมบัติพิเศษ คือ สามารถเจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 29 เปอร์เซนต์

ศิริเพ็ญ (2534) ศึกษาสภาวะภายในบ่อหมักน้ำปลาซึ่งมีสภาพที่มีออกซิเจนต่ำ เนื่องจากการทับถมของปลา เกลือและของเหลวที่ออกจากตัวปลา พบว่า 5 วันแรกชนิดของแบคทีเรียที่พบจะเป็นแบคทีเรียทนเค็ม หมายถึง แบคทีเรียที่ไม่ต้องการโซเดียมคลอไรด์สำหรับการเจริญ แต่อาจเจริญได้ในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 10 เปอร์เซนต์หรือมากกว่า และแบคทีเรียชอบเค็มปานกลาง ซึ่งเจริญในสภาวะที่มีโซเดียมคลอไรด์ 3-15 เปอร์เซนต์ ได้แก่ *Staphylococcus* spp. , *Micrococcus* spp. , *Bacillus* spp. และแบคทีเรียกลุ่ม coryneform ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวก ที่ใช้ออกซิเจน เคลื่อนที่ไม่ได้และมีเซลล์รูปแท่ง เช่น *Arthrobacter* sp. แบคทีเรียเหล่านี้จะ

ลดจำนวนลงเรื่อย ๆ หลังจากการหมักไปแล้ว 11 วัน การหมักภายใน 5-15 วันแรก จะพบแบคทีเรียชอบเค็มมาก ซึ่งหมายถึง แบคทีเรียที่เจริญได้ดีในสภาวะที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 15 เปอร์เซนต์ขึ้นไป ได้แก่ *Halobacterium* spp. และ *Halococcus* sp. ซึ่งจะเพิ่มจำนวนขึ้นเรื่อย ๆ ในระยะเวลา 20-50 วันหลังการหมัก จากนั้นจะเริ่มลดจำนวนจนกระทั่ง 165 วันหลังจากการหมักจึงไม่พบแบคทีเรียกลุ่มหลังนี้อีก

Tanasupawat และคณะ (1992) พบแบคทีเรียในสกุล *Staphylococcus* สปีชีส์ใหม่ในน้ำบูดูปลาร้า และ ปลาจ่อม ของประเทศไทย คือ *Staphylococcus piscifermentans*

Thongthai และคณะ (1992) พบ *Halobacterium salinarium* ในน้ำปลา ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์สลายโปรตีนของเนื้อปลา

Ijong (1996) ศึกษาแบคทีเรียในน้ำปลาอินโดนิเซีย พบ *Enterobacter* sp. , *Morexella* sp. , *Pseudomonas* sp. , *Lactobacillus* sp. , *Staphylococcus* sp. , *Micrococcus* sp. , *Streptococcus* sp. และ *Pediococcus* sp. สำหรับแบคทีเรียที่พบมากที่สุดคือ *Pediococcus* sp. , *Micrococcus* sp. และ *Streptococcus* sp.

วิไลลักษณ์ (2538) แยกแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างกรดและการย่อยไขมัน คือ *Staphylococcus saprophyticus* ส่วนแบคทีเรียที่มีความสามารถย่อยแป้งและโปรตีนคือ *Bacillus pantothenticus* และ *Halobacterium salinarium* และได้ทำการทดลองหมักน้ำปลาโดยใช้แบคทีเรียที่แยกได้นี้ พบว่าเชื้อผสมทั้ง 3 เชื้อนี้ ให้ค่าเฉลี่ยโปรตีนละลายน้ำ (soluble protein) สูง

Phithakpol และคณะ (1995) รายงานว่าแบคทีเรียที่พบในน้ำปลา คือ *Bacillus* sp. , *Micrococcus* sp. , *Pediococcus* sp. , *Staphylococcus* sp. และ *Sarcina* sp.

Chaiyanan และ Chaiyanan (1999) พบแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ คือ *Halobacillus thailandensis* ซึ่งแยกได้จากน้ำปลาไทย

แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ในกระบวนการหมักน้ำปลา ซีอิ๊ว และอาหารหมักดอง

สุทธิ์สักดิ์ (2520) แยกแบคทีเรีย "*P. halophilus*" จากน้ำหมักซีอิ๊ว ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบมากที่สุดในระยะ 5 วัน ถึง 20-25 วันของการหมักซีอิ๊ว และคัดเลือกแบคทีเรียที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการหมักซีอิ๊ว โดยมีคุณสมบัติในการทนโซเดียมคลอไรด์ได้สูง เจริญได้ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ผลิตกรดและทำให้พีเอชต่ำลงและสร้างกลิ่นในอาหารซอยบีนกลูโคสยีสต์ (soybean glucose yeast) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์ แบคทีเรียที่มีคุณสมบัติดังกล่าวคือ "*P. halophilus*" และทดลองนำเชื้อนี้ไปหมักซีอิ๊วร่วมกับ *Saccharomyces rouxii* พบว่าพีเอชของน้ำหมักซีอิ๊วประมาณ 4.55-4.65 ปริมาณกรดแลคติค เท่ากับ 1.24-1.34 เปอร์เซนต์ และให้กลิ่น รส และความกลมกล่อมของน้ำหมักที่คล้ายกับซีอิ๊ว

สิทธิพันธุ์ (2522) แยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม "*P. halophilus*" จากน้ำปลาที่ผลิตจากปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม พบว่าเป็นแบคทีเรียที่สามารถเจริญได้ในอาหารที่เป็นกรดเล็กน้อย เจริญได้ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 20 เปอร์เซนต์ ผลิตกรดแลคติคในอาหารเลี้ยงเชื้อ และให้กลิ่นที่คล้ายน้ำปลามาก ซึ่งทำให้ "*P. halophilus*" มีบทบาทมากในกระบวนการผลิตกลิ่นในขั้นสุดท้ายของน้ำปลา

ยงยศ (2522) พบว่า "*P. halophilus*" มีบทบาทสำคัญในการทำให้เกิดกลิ่นของน้ำปลา และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม "*P. halophilus*" พบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญ คืออุณหภูมิ 30-32 องศาเซลเซียส พีเอช 6.5 และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 2-5 เปอร์เซนต์

Noda และคณะ (1980) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม "*P. halophilus*" ผลิตกรดแลคติคและกรดอะซิติคที่สามารถยับยั้งการเจริญของยีสต์ในกระบวนการหมักซีอิ๊ว

Uchida (1982) ศึกษาบทบาทของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มในกระบวนการหมักซีอิ๊ว พบว่าในระยะการหมักน้ำแกลือ (moromi) แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มทำให้พีเอชของน้ำหมักซีอิ๊วลดลงเหลือ 5.0 ซึ่งเป็นพีเอชที่เหมาะสมในการเจริญของยีสต์ที่มีบทบาทในการหมักแอลกอฮอล์ในซีอิ๊ว

Tanasupawat และ Daengsubha (1983) พบ "*P. halophilus*" ทั้งหมด 29 สายพันธุ์จากอาหารหมักดองพื้นเมืองในประเทศไทย ได้แก่ หอยแมลงภู่ กุ้งจ่อม ปลาจ่อม ปลาร้า น้ำปลา น้ำบูดู เป็นต้น แต่ละสายพันธุ์สามารถเจริญได้ที่ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์

Ho และคณะ (1984) แยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม "*P. halophilus*" จากน้ำหมักซีอิ๊วของมาเลเซีย พบว่าแบคทีเรียสามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 3.42 โมลลาร์ และอุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

สายพิณ (2528) พบว่าจุลินทรีย์ที่ปะปนมากับปลามีทั้งชนิดทนเค็มได้และไม่ชอบเค็ม ส่วนใหญ่พวกที่ทนเค็มได้จะเป็นพวกที่มีบทบาทในการทำอาหารหมัก คือสามารถผลิตกรดอินทรีย์ชนิดหนึ่งที่เรียกว่า กรดแลคติค ซึ่งจะทำให้อาหารนั้นไม่เสีย

Itoh และคณะ (1985a) พบว่าในน้ำปลาญี่ปุ่น ไทย และ ฟิลิปปินส์ มีปริมาณกรดแลคติค และกรดอะซิติคสูงเนื่องจากแบคทีเรียมีการหมักได้กรดแลคติค ทำให้น้ำปลามีกลิ่นเปรี้ยวและพีเอชต่ำ และได้แยกแบคทีเรียในน้ำปลาที่ผลิตกรดแลคติค คือ "*P. halophilus*"

Villar และคณะ (1985) แยกแบคทีเรีย "*P. halophilus*" จากปลาหมัก (salted anchovy) พบว่าแบคทีเรียเจริญได้น้อยมากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่เติมโซเดียมคลอไรด์ และสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส

Osaki และคณะ (1985) ทดลองผลิตซีอิ๊วโดยใช้ถังหมักต่อเนื่องแบบคอลัมน์ต่อกัน 2 ถัง ซึ่งภายในถังหมักที่ 1 ได้ตรึงเซลล์แบคทีเรีย "*P. halophilus*" เพื่อการหมักกรดแลคติค (lactic acid fermentation) และถังหมักที่ 2 ตรึงเซลล์ยีสต์ *Saccharomyces rouxii* และ *Torulopsis versatilis* เพื่อหมักแอลกอฮอล์ (alcohol fermentation) พบว่าใช้ระยะเวลาในการหมัก 80 วัน จึงได้ซีอิ๊วที่มีกลิ่นและรสใกล้เคียงกับซีอิ๊วที่มีการหมักแบบธรรมชาติ ซึ่งใช้เวลาประมาณ 4-5 เดือน

Chaiyanan และ คณะ (1989) ศึกษาการหมักน้ำปลาที่ใช้ระยะเวลาในการหมักสั้นลง ในถังหมักแบบหมุนเวียน และใช้เชื้อตั้งต้นเป็นเชื้อบริสุทธิ์ คือ "*P. halophilus*" ซึ่งเป็นแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่ให้กลิ่นในน้ำปลา ผสมกับแบคทีเรียในกลุ่ม coryneform และ *Micrococcus*

sp. พบว่าน้ำปลาที่หมักนี้ใช้เวลา 30 วัน จึงได้น้ำปลาที่มีสี กลิ่น พีเอช และ เปอร์เซนต์โปรตีน คล้ายกับน้ำปลาที่ใช้วิธีผลิตแบบดั้งเดิม ซึ่งใช้เวลาประมาณ 1 ปี

Hamada และคณะ (1991) ได้ศึกษาการหมักซีอิ๊วในถังหมักแบบต่อเนื่อง 3 ถัง ที่ตรึงเอนไซม์กลูตามิเนส (glutaminase) ตรึงเซลล์ "*P. halophilus*" ตรึงเซลล์ยีสต์ *Zygosaccharomyces rouxii* และ *Candida versatilis* ในถังหมักแต่ละถังหมักตามลำดับ และได้ผลิตภัณฑ์ซีอิ๊วที่ใช้เวลาในการหมักน้อยกว่าแบบดั้งเดิมถึง 10 เท่า โดยมีส่วนประกอบทางเคมีและคุณภาพกลิ่นของซีอิ๊วเหมือนซีอิ๊วที่หมักแบบธรรมชาติ

Roling และคณะ (1996) ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่พบในกระบวนการหมักซีอิ๊วอินโดนีเซีย ซึ่งมีการผลิตซีอิ๊ว 2 แบบ คือ การผลิตแบบจีนซึ่งใช้ถั่วเหลืองและการผลิตแบบญี่ปุ่นซึ่งใช้ถั่วเหลืองและข้าวสาลี พบว่าจากการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยวิธีศึกษารูปแบบของโปรตีน (protein fingerprinting) สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียเป็น *T. halophila* และแบคทีเรียที่แยกได้มีรูปแบบการหมักน้ำตาลแตกต่างกันในแต่ละสายพันธุ์

Thitiwan (1996) ศึกษาการแยกและจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *T. halophilus* จากซีอิ๊ว ที่พบได้ตลอดระยะเวลาของการหมักซีอิ๊ว จากนั้นทดลองทำหัวเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี สเปรย์ดราย (spray dry)

Gurtler (1998) ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *T. halophilus* ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการทำเป็นหัวเชื้อตั้งต้นสำหรับอาหารหมักประเภทเนื้อ คือ มีคุณสมบัติการทนเกลือสูง สร้างเอนไซม์คาตาเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฮีมาติน (hematin) สร้างเอนไซม์โปรติเอส ไม่สามารถใช้ไนเทรต และไม่สามารถผลิตสารเอมีนจากกรดอะมิโนซึ่งเป็นพิษต่อผู้บริโภค ได้แก่ ฮีสตามีน (histamine) คาดาเวอรีน (cadaverine) พูเทรสซีน (putrescine) 2-ฟีนิลเอทิลลามีน (2-phenylethylamine) และ ไทรามีน (tyramine)

การศึกษาทางอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus*

แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปกลม ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส และไม่สามารถรีดิวส์ไนเทรตได้ เป็นแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนท์เททีฟ และปัจจุบันแบคเรียกรดแลคติคมีทั้งหมด 11 สกุล คือ *Carnobacterium* , *Enterococcus* ,

Lactobacillus , *Lactococcus* , *Leuconostoc* , *Oneococcus* , *Pediococcus* , *Streptococcus* , *Tetragenococcus* , *Vagococcus* และ *Weissella* (Stiles และ Holzapfel , 1997)

ปัจจุบันการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *Tetragenococcus* ในระดับสกุล โดยศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ ได้แก่ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา คือ รูปร่างของเซลล์เป็นสี่เซลล์ คุณสมบัติทางชีวเคมี คือ รูปแบบการหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นโฮโมเฟอร์เมนท์เททีฟ และคุณสมบัติทางสรีรวิทยา คือ สามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์ และผลิตกรดแลคติคไอโซเมอร์แบบแอล (L) ดังแสดงในตารางที่ 4 (Axelsson , 1993)

Nakagawa และ Kitahara (1959) ศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus* และได้อธิบายลักษณะของ "*P. halophilus*" สายพันธุ์ของ Mees (1934) หรือ "*Tetracoccus*" No. 1 สายพันธุ์ของ Orla-Jensen (1919) ไว้ดังนี้ เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่สามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 18–20 เปอร์เซนต์หรือมากกว่า พีเอช 9.0 หมักน้ำตาลมอลโทส และแอลฟา-เมทิลกลูโคซายด์ได้ พบแบคทีเรียนี้ทั่วไปในอาหารจำพวกปลาหมักและซีอิ๊ว นอกจากนั้นยังได้ศึกษา " *P. soyae*" สายพันธุ์ของ Yamasato และ Sakaguchi (1958) พบว่ามีคุณสมบัติทางอนุกรมวิธานต่าง ๆ ใกล้เคียงกับ " *P. halophilus*" จึงพิจารณาจัดให้ "*P. soyae*" อยู่ในสปีชีส์ของ "*P. halophilus*" Nakagawa และ Kitahara ยังได้สร้างกุญแจสำหรับการจัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus* ออกเป็น 5 สปีชีส์ โดยแบ่งได้เป็นกลุ่มใหญ่ ๆ 2 กลุ่ม ดังนี้

I. เจริญได้ที่พีเอช 5.0 แต่ไม่เจริญที่พีเอช 9.0 มี 3 สปีชีส์ คือ
   1. ไม่เจริญที่พีเอช 7.0 หรือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ไม่ชอบออกซิเจน จัดเป็น "*P. cerevisiae*"
   2. เจริญได้ที่พีเอช 7.0 หรือที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ชอบออกซิเจนเล็กน้อย ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 สปีชีส์
      2.1 สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จัดเป็น *P. acidilactici*
      2.2 ไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส จัดเป็น *P. pentosaceus*

II. ไม่เจริญที่พีเอช 5.0 แต่สามารถเจริญที่พีเอช 9.0
   1. ชอบเกลือ จัดเป็น "*P. halophilus*"
   2. ไม่ชอบเกลือ จัดเป็น *P. urinae-equi*

ตารางที่ 4 คุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติค

	แท่ง		แท่ง/กลม	กลม							
คุณสมบัติ	*Carnob.*	*Lactob.*	*Weiss*[a].	*Aeroc.*	*Entero.*	*Lactoc. Vagoc.*	*Leucon.*	*Pedioc.*	*Streptoc.*	*Tetragenoc.*	*Oenoco*[b].
รูปร่างสี่เซลล์	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-
สร้างก๊าซCO_2จากกลูโคส	-	+/-	+	-	-	-	+	-	-	-	+
เจริญที่อุณหภูมิ 10 ° C	+	+/-	ND	+	+	+	+	+/-	-	+	ND
เจริญที่อุณหภูมิ 45° C	-	+/-	+/-	-	+	-	-	+/-	+/-	-	ND
เจริญที่ 6.5 % NaCl	ND	+/-	ND	+	+	-	+/-	+/-	-	+	ND
เจริญที่ 18 % NaCl	-	-	ND	-	-	-	-	-	-	+	-
เจริญที่พีเอช 4.4	ND	+/-	+	-	+	+/-	+/-	+	-	-	+
เจริญที่พีเอช 9.6	-	-	ND	+	+	-	-	-	-	+	ND
ไอโซเมอร์กรดแลคติค	L	D,L,DL	D,DL	L	L	L	D	L,DL	L	L	D

+ , ผลบวก - , ผลลบ +/- , แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ ND , ไม่มีข้อมูล [a] , ข้อมูลจาก Collins และคณะ (1993) [b] , ข้อมูลจาก Dicks และคณะ (1995)
(ที่มา : Axelsson , 1993)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Gunther และ White (1961) และ Coster และ White (1964) ศึกษาคุณสมบัติทางการเจริญ สรีรวิทยา และ เซรุ่มวิทยา ของแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus* พบว่า "*P. halophilus*" เจริญได้ช้าในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์เท่ากับ 1 , 2 , 3 , 4 , 15 และ 20 เปอร์เซนต์ และเจริญได้ดีในโซเดียมคลอไรด์ 7 และ 10 เปอร์เซนต์ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10-40 องศาเซลเซียส และสามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 8.6 แต่ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีพีเอชเริ่มต้น 4.4 ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลสและไม่สามารถย่อยอาร์จีนีนได้

Whittenbury (1965) อาศัยหลักการทางฟีโนไทป์ของ Nakagawa และ Kitahara (1959) จัดจำแนกแบคทีเรียในสกุล *Pediococcus* ได้ 4 สปีชีส์ คือ "*P. cerevisiae*" , *P. acidilactici* , *P. pentosaceus* และ "*P. halophilus*" และจัด *P. urinae-equi* ไว้ในแบคทีเรียสกุล *A. viridans*

Sakaguchi และ Mori (1969) จัดแบคทีเรีย "*P. halophilus*" , "*P. soyae*" และ *P. homari* ซึ่งมีความเหมือนกันทางคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และลักษณะความต้องการธาตุอาหาร ตลอดจนค่าเปอร์เซนต์โมลของกัวนีนและไซโตซีนของดีเอ็นเอ ไว้ในกลุ่มเดียวกัน

Weiss (1992) จัดจำแนกแบคทีกรดแลคติคสกุล *Pediococcus* โดยการศึกษาคุณสมบัติทางสรีรวิทยา คือการเจริญได้ที่อุณหภูมิ พีเอช และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ และคุณสมบัติทางชีวเคมี คือการหมักน้ำตาล การย่อยอาร์จีนีน และไอโซเมอร์ของกรดแลคติคที่แบคทีเรียสร้างขึ้น และได้สร้างกุญแจสำหรับจัดจำแนกแบคทีเรียสกุล *Pediococcus* ไว้ดังนี้

I	a) หมักน้ำตาลไรโบส ย่อยอาร์จีนีน	II
	b) ไม่หมักน้ำตาลไรโบส ไม่ย่อยอาร์จีนีน	IV
II	a) เจริญที่ 15 % NaCl ผลิตกรดแลคติคแบบ L	"*P. halophilus*"
	b) ไม่เจริญที่ 15 % NaCl ผลิตกรดแลคติคแบบ DL	III
III	a) เจริญที่อุณหภูมิ 50 °C ไม่หมักน้ำตาลมอลโทส	*P. acidilactici*
	b) ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 50 °C หมักน้ำตาลมอลโทส	*P. pentosaceus*

IV	a) หมักแป้ง ผลิตกรดแลคติคแบบ L	*P. dextrinicus*
	b) ไม่หมักแป้ง ผลิตกรดแลคติคแบบ DL	V
V	a) เจริญที่อุณหภูมิ 35 ° C	VI
	b) ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 35 ° C	*P. damnosus*
VI	a) หมักน้ำตาลแลคโทส	*P. inopinatus*
	b) ไม่หมักน้ำตาลแลคโทส	*P. parvulus*

ปัจจุบัน "*P. halophilus*" จัดอยู่ในสกุล *Tetragenococcus halophilus* โดย Collins และคณะ (1990) ได้ทำการศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA ของ "*P. halophilus*" และแบคทีเรียกรดแลคติคสกุลอื่น ๆ พบว่า "*P. halophilus*" มีลำดับเบสของ 16S rRNA ที่คล้ายหรือมีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับแบคทีเรียในกลุ่ม enterococci และ carnobacterium มากกว่าแบคทีเรียในกลุ่ม pediococci จึงจัด "*P. halophilus*" ไว้ในสกุล *Tetragenococcus* และยอมรับอย่างเป็นทางการปรากฏใน Validation list ของ International Journal of Systematic Bacteriology (Validation , 1994)

ใน Bergey ' s Manual of Systematic Bacteriology (1986) แสดงคุณสมบัติของแบคทีเรีย *Pediococcus halophilus* ไว้ดังนี้

คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปกลม จัดเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ เซลล์คู่หรือเป็นเซลล์เดี่ยว ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์

คุณสมบัติทางการเจริญ (cultural characteristics) เจริญได้ช้าบนอาหารแข็ง โคโลนีทรงกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 มิลลิเมตร ผิวของโคโลนีเรียบ (smooth) และมีสีขาว และใช้เวลา 4-5 วัน สำหรับการเจริญในอาหารเหลว

คุณสมบัติทางสรีรวิทยา (physiological characteristics) พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญคือ 7.0 และ 8.0 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 30-35 องศาเซลเซียส สามารถเจริญได้ในปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์ และปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 20-26 เปอร์เซนต์ ดังตารางที่ 5

คุณสมบัติทางชีวเคมี (biochemical characteristics) ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่สามารถย่อยอาร์จีนีน สามารถหมักน้ำตาล อะราบิโนส ไรโบส มอลโทส เมลซิโทส ซูโครส ทรีฮาโลส มอลโทไทรโอส กลีเซอรอล และ แอลฟา-เมทิลกลูโคซายด์ ผลิตกรด

แลคติคไอโซเมอร์แบบแอล และมีค่าเปอร์เซนต์โมลของกัวนีนและไซโตซีน 34-36 เปอร์เซนต์ โดยใช้ *T. halophilus* ATCC 33315 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน (type strain) ในการเปรียบเทียบ ดังตารางที่ 6

ตารางที่ 5 คุณสมบัติทางสรีรวิทยาของ *Pediococcus* species

คุณสมบัติ	*P. damnosus*	*P. parvulus*	*P. inopinatus*	*P. dextrinicus*	*P. pentosaceus*	*P. acidilactici*	*"P. halophilus"*	*P. urinae-equi*
1. เจริญที่อุณหภูมิ								
35 °C	-	+	+	+	+	+	+	+
40 °C	-	-	-	+	+	+	-	+
50 °C	-	-	-	-	-	+	-	-
2. เจริญที่พีเอช								
4.2	+	+	-	-	+	+	-	-
7.5	-	+	d	+	+	+	+	+
8.5	-	-	-	-	d	d	+	+
3. เจริญในโซเดียมคลอไรด์								
4 %	-	+	+	+	+	+	d	+
6.5 %	-	+	d	-	+	+	+	+
18 %	-	-	-	-	-	-	+	-

(ที่มา : Garvie , 1986)

+ , 90 เปอร์เซนต์หรือมากกว่าของสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

- , 90 เปอร์เซนต์หรือมากกว่าของสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

d , 11-89 เปอร์เซนต์ของสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 คุณสมบัติทางชีวเคมีของ *Pediococcus* species

คุณสมบัติ	*P. damnosus*	*P. parvulus*	*P. inopinatus*	*P. dextrinicus*	*P. pentosaceus*	*P. acidilactici*	*"P. halophilus"*	*P. urinae-equi*
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	-	-	ND	-	+	+	-	-
การย่อยอาร์จีนีน	-	-	-	-	+	+	-	-
การหมักน้ำตาล :								
อะราบิโนส	-	-	-	-	+	d	+	d
ไรโบส	-	-	-	-	+	+	+	ND
ไซโลส	-	-	-	-	d	+	-	d
แลคโทส	-	-	+	d	d	d	-	d
มอลโทส	d	+	+	+	+	-	+	+
เมเลซิโทส	d	-	-	-	-	-	+	-
ซูโครส	d	-	d	d	-	-	+	+
ทรีฮาโลส	+	d	+	-	+	d	+	+
เดกซทริน	-	-	d	+	-	-	-	+
แป้ง	-	-	-	+	-	-	-	-
กลีเซอรอล	-	-	-	-	-	-	+	-
แมนนิทอล	-	-	-	-	-	-	-	d
ซอรบิทอล	-	-	-	-	-	-	-	-
ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค	DL	DL	DL	L	DL	DL	L	L

(ที่มา : Weiss , 1992)

+ , 90 เปอร์เซนต์หรือมากกว่าของสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

- , 90 เปอร์เซนต์หรือมากกว่าของสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

d , 11-89 เปอร์เซนต์ของสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

ND คือ ไม่มีข้อมูล

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Satomi และคณะ (1997) ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มในน้ำปลาปลาหมึก (squid liver sauce) ของญี่ปุ่น ทั้งหมด 11 สายพันธุ์ พบว่าจากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ คือ ความสามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความสามารถย่อยอาร์จีนีน การหมักน้ำตาล แมนโนส อะราบิโนส และซูโครส และการสร้างฮีสตามีน และการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอจากเทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น รวมทั้งการศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA พบว่าไม่สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียที่แยกได้เป็น *T. halophilus* จึงเสนอเป็นสปีชีส์ใหม่ คือ *T. muriaticus* ซึ่งมีคุณสมบัติดังนี้

เป็นแบคทีเรียติดสีแกรมบวก รูปกลม เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.8 ไมโครเมตร เรียงตัวเป็นสี่เซลล์หรือเป็นคู่ เคลื่อนที่ไม่ได้ โคโลนีสีขาว ขอบเรียบ โค้งนูน เส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี 1.5 มิลลิเมตร เจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 1–25 เปอร์เซนต์ ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ที่เหมาะสม คือ 7-10 เปอร์เซนต์ เจริญได้ที่อุณหภูมิ 15–40 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่อุณหภูมิเหมาะสม 25–30 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่พีเอช 5.0-9.0 แต่เจริญได้เหมาะสมที่พีเอช 7.5–8.0 เป็นแบคทีเรียที่ไม่ชอบออกซิเจน (facultatively anaerobe) ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส ไม่ย่อยอาร์จีนีน ไม่รีดิวส์ไนเทรต สร้างฮีสตามีน และหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ได้ ดังตารางที่ 7 โดยมี *T. muriaticus* JCM 10006 เป็นสายพันธุ์มาตรฐาน

ตารางที่ 7 คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมีของ *Tetragenococcus* species

คุณสมบัติ	*T. halophilus*[a] ATCC 33315[T]	*T. muriaticus*[b] JCM 10006 [T]
<u>ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ</u>		
ติดสีแกรม	+	+
การสร้างสปอร์	-	-
การเคลื่อนที่	-	-

ตารางที่ 7 (ต่อ) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี ของ *Tetragenococcus* species

คุณสมบัติ	*T. halophilus*[a] ATCC 33315[T]	*T. muriaticus*[b] JCM 10006[T]
การจัดเรียงตัวของเซลล์	เดี่ยว /คู่/สี่เซลล์	เดี่ยว/คู่/สี่เซลล์
ขนาดของเซลล์ (μm)	1.0-2.0	0.5-0.8
ลักษณะโคโลนี	กลม ขอบเรียบ สีขาว	กลม ขอบเรียบ สีขาว
<u>ลักษณะทางสรีรวิทยา</u>		
การเจริญที่พีเอช		
4.2	-	-
5.0	ND	+
7.5	+	+
8.5	+	+
9.0	+	+
9.6	ND	+
การเจริญที่อุณหภูมิ		
10 องศาเซลเซียส	ND	-
15 องศาเซลเซียส	+	+
35 องศาเซลเซียส	+	+
40 องศาเซลเซียส	-	+
45 องศาเซลเซียส	-	-
การเจริญในโซเดียมคลอไรด์		
0 เปอร์เซนต์	ND	-
1 เปอร์เซนต์	ND	+
4 เปอร์เซนต์	d	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี ของ *Tetragenococcus* species

คุณสมบัติ	*T. halophilus*[a] ATCC 33315[T]	*T. muriaticus*[b] JCM 10006[T]
การเจริญในโซเดียมคลอไรด์		
6.5 เปอร์เซนต์	+	+
10 เปอร์เซนต์	+	+
18 เปอร์เซนต์	+	+
25 เปอร์เซนต์	ND	+
ลักษณะทางชีวเคมี		
การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	-	-
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	-	-
โฮโมเฟอร์เมนท์เททีฟ	+	+
การย่อยอาร์จีนีน	-	-
การสร้างฮีสตามีน	ND	+
การรีดิวส์ไนเทรต	-	-
ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค	L	L
การหมักน้ำตาล ;		
อะราบิโนส	+	-
ฟรุกโทส	+	+
ไรโบส	+	+
ทรีฮาโลส	+	+
ซูโครส	+	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 (ต่อ) คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี ของ *Tetragenococcus* species

คุณสมบัติ	*T. halophilus*[a] ATCC 33315[T]	*T. muriaticus*[b] JCM 10006[T]
แมนนิทอล	-	+
กลูโคเนต	ND	-
ไซโลส	-	-
แลคโทส	-	-
ซอลบิทอล	-	-
เดกซทริน	-	-
แป้ง	-	-
แมนโนส	+	+
ราฟฟีโนส	-	-

[a] , ข้อมูลจาก Garvie , 1986 และ Weiss , 1992

[b] , ข้อมูลจาก Satomi และคณะ , 1997

[T] , แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

+ , 90 เปอร์เซนต์หรือมากกว่าของสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

- , 90 เปอร์เซนต์หรือมากกว่าของสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

d , 11-89 เปอร์เซนต์ของสายพันธุ์แบคทีเรีย ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

ND , ไม่มีข้อมูล

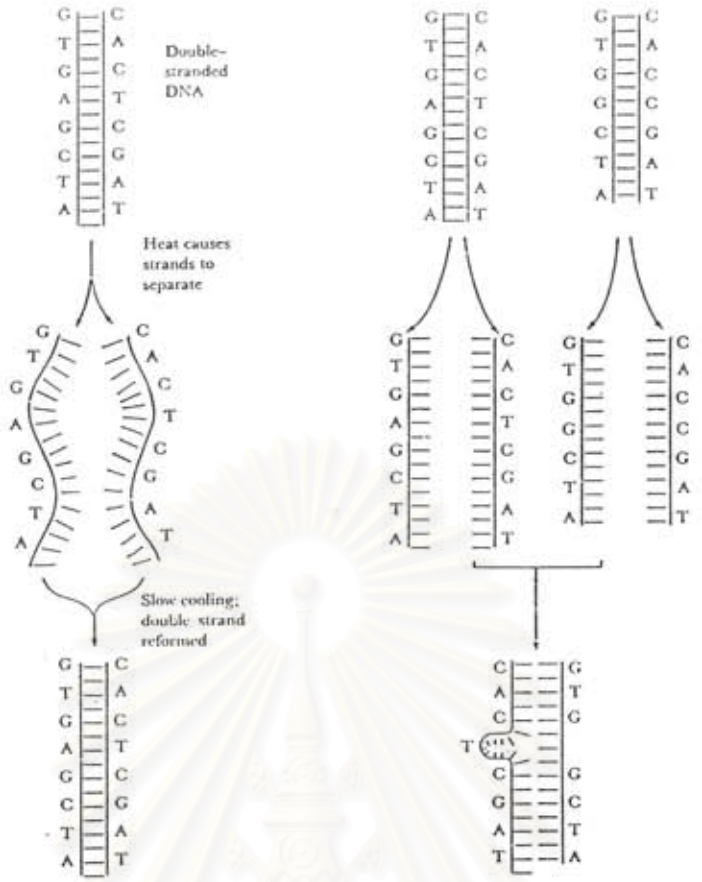
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในการศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย

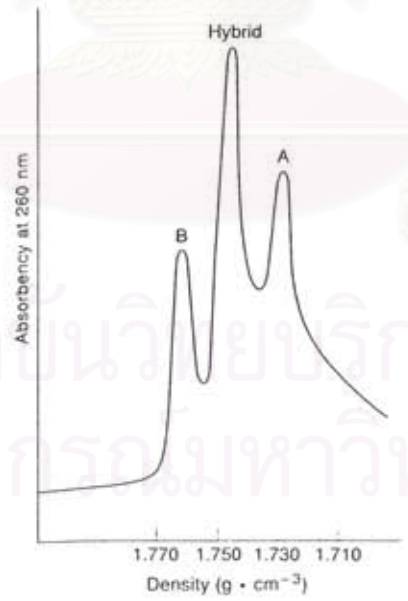
การศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียโดยใช้คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา ชีวเคมี และเซรุ่มวิทยา รวมถึงองค์ประกอบของผนังเซลล์ (cell wall composition) องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์ (cellular fatty acid) ไอโซพรีนอยด์ควิโนน (isoprenoid quinones) โปรตีนทั้งหมดในเซลล์ (whole-cell protein analysis) การสร้างโพลีเอมีน (polyamines) และคุณสมบัติอื่น ๆ ของเซลล์ ซึ่งเป็นลักษณะทางฟีโนไทป์ ไม่สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติคบางกลุ่มได้ถึงระดับสปีชีส์ และอาจเกิดปัญหาเนื่องจากคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียบางสปีชีส์มีลักษณะคล้ายกันมากจนไม่สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้ถูกต้อง จึงได้มีการนำเทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น ซึ่งเป็นลักษณะทางจีโนไทป์มาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีหลายสปีชีส์ (Axelsson , 1993 ; Yaeshima , 1996 ; Stiles และ Holzapfel , 1997)

วิธีการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นสำหรับการจัดอนุกรมวิธานของแบคทีเรีย มีหลักการดังนี้ คือ แยกดีเอ็นเอสายคู่ให้เป็นสายเดี่ยวโดยใช้ความร้อน หลังจากนั้นทำให้เย็นลงอย่างช้า ๆ ดีเอ็นเอสายเดี่ยวจะกลับมาจับคู่กันอีก (annealing) การจับคู่กันมักเป็นแบบสุ่ม โดยส่วนที่รวมกันจะมีความคงตัวเรียกว่า การจับคู่ที่คงทน (stable duplex) รูปที่ 2 ทดลองผสมดีเอ็นเอสายเดี่ยวของแบคทีเรียสองสายพันธุ์ที่มีความสัมพันธ์กัน พบว่ามีดีเอ็นเอสายผสม (hybrid) ของทั้งสองสายพันธุ์เกิดขึ้น วิธีการตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอสายผสมนี้ทำได้โดยเลี้ยงแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่ง (B) ในอาหารที่มีดิวเทอเรียม (D_2O) และ $N^{15}H_4Cl$ จะทำให้ดีเอ็นเอมีน้ำหนักหนักมากขึ้น เนื่องจากดิวเทอเรียมและ N^{15} เข้าไปรวมอยู่ ส่วนอีกสายพันธุ์หนึ่ง (A) เลี้ยงในอาหารปกติจึงมีน้ำหนักของดีเอ็นเอเบากว่า หลังจากนั้นทำให้ดีเอ็นเอทั้งสองสายพันธุ์เป็นสายเดี่ยวแล้วนำมาผสมกัน ทำให้เกิดการผสมกันเป็นดีเอ็นเอสายผสม ตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสมโดยการปั่นส่วนผสมในซีเซียมคลอไรด์ (CsCl gradient) ดีเอ็นเอสายผสมจะอยู่ที่แถบกลางระหว่างแถบหนักและเบา ดังรูปที่ 3 (Stanier และคณะ ,1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



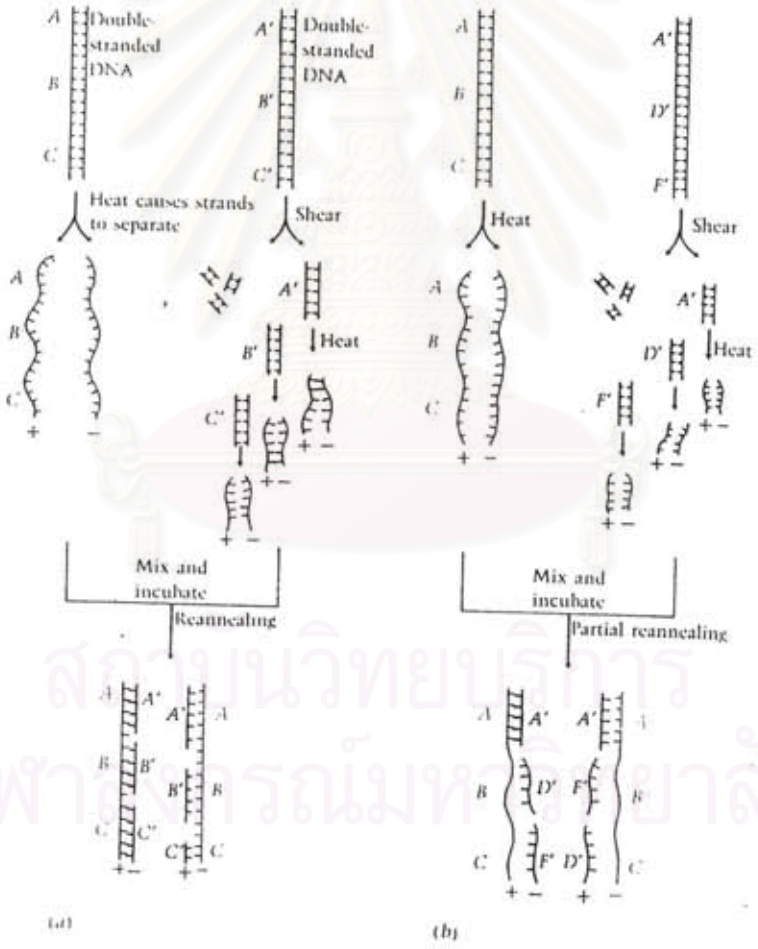
รูปที่ 2 การทำดีเอ็นเอสายเดี่ยวและการจับคู่กันของสายดีเอ็นเอ



รูปที่ 3 การตรวจสอบดีเอ็นเอสายผสม จากการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นเป็นการตรวจสอบความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ ดังรูปที่ 4 ทำดีเอ็นเอสายคู่ของแบคทีเรียสายพันธุ์ที่ต้องการตรวจสอบให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว ตรวจสอบความคล้ายคลึงกับดีเอ็นเอสายพันธุ์มาตรฐาน โดยทำให้ดีเอ็นเอสายพันธุ์มาตรฐานให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และแยกให้เป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว หลังจากนั้นติดฉลากดีเอ็นเอสายเดี่ยวชิ้นเล็กนี้จะได้เป็นโพรบดีเอ็นเอ นำไปผสมกับดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ต้องการตรวจสอบ หากดีเอ็นเอมีความคล้ายคลึงกันจะสามารถจับกันได้ วัดเปอร์เซนต์การจับคู่ก็จะสามารถบอกความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอได้ (รูปที่ 4 a) หากเปอร์เซนต์การจับคู่ต่ำแสดงว่าเป็นแบคทีเรียคนละสายพันธุ์ (รูปที่ 4 b) (Brock , 1974)



รูปที่ 4 วิธีการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น

McCarthy และ Bolton (1963 , อ้างถึงใน Johnson , 1984) ทำการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวไว้ในแผ่นเจลอากาโรส และทำให้แผ่นเจลเป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นนำไปรวมกับโพรบดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (radioisotope) เกิดเป็นดีเอ็นเอสายผสมที่ติดอยู่ในแผ่นเจลหลังจากล้างเพื่อกำจัดสารกัมมันตภาพรังสีส่วนเกินออกไปแล้ว นำไปวัดและคำนวณหาปริมาณของสารกัมมันตภาพรังสีในแผ่นเจล Denhardt (1966 , อ้างถึงใน Johnson , 1984) ศึกษาเทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น โดยทำการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวไว้บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose) ผสมกับโพรบดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี และตรวจวัดปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีที่เกิดจากดีเอ็นเอสายผสม คำนวณหาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (เปอร์เซนต์โฮโมโลยี) จากปริมาณการเกิดดีเอ็นเอสายผสมจากดีเอ็นเอสายเดี่ยวของแต่ละสายพันธุ์ (heterologous duplex) หารด้วยปริมาณการเกิดดีเอ็นเอสายผสมจากดีเอ็นเอสายเดี่ยวของแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกัน (homologous duplex) ซึ่งปัจจุบัน Wayne และคณะ (1987) ได้กำหนดค่าความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอในระดับสปีชีส์ของแบคทีเรีย ว่าต้องมีค่าความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอตั้งแต่ 70 เปอร์เซนต์ขึ้นไป จึงจะจัดเป็นสปีชีส์เดียวกัน

Dellaglio และคณะ (1981) ได้ศึกษาการใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยใช้สารกัมมันตภาพรังสีในการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียกรดแลคติคสกุล *Pediococcus* ทั้งหมด 60 สายพันธุ์และมี 8 สายพันธุ์ที่เป็นสายพันธุ์อ้างอิง (reference strains) คือ *P. pentosaceus* , *P. acidilactici* , *P. damnosus* , "*P. soyae*" , "*P. halophilus*" , *P. parvulus* , *P. urinae-equi* และ *P. homari* พบว่าในแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม "*P. halophilus*" NISL 7129 (*Tetracoccus* No. 1 สายพันธุ์ของ Orla-Jensen , 1919) และ *P. soyae* ATCC 13625 (สายพันธุ์ของ Sakaguchi ,1958) ที่แยกได้จากซีอิ๊ว มีความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ กับ "*P. halophilus*" และ "*P. soyae*" สายพันธุ์อื่น ๆ (85-100 และ 81-100 เปอร์เซนต์โฮโมโลยีตามลำดับ) ดังนั้นจึงยืนยันว่า "*P. soyae*" เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันกับ "*P. halophilus*"

การศึกษาดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นมีหลายวิธีที่นิยมศึกษา ได้แก่ วิธีไฮดรอกซีอะพาไทต์ (hydroxyapatite) ของ Brenner และคณะ (1969) วิธีเอนไซม์ S_1 นิวคลีเอส (S_1 nuclease) ของ Crosa และคณะ (1973) และ Grimont และ คณะ (1980) วิธีการทำไฮบริไดเซชั่นบนแผ่นเมมเบรน ของ Denhardt (1966) และวิธีอินิเทียล รีเนเจอร์เรชั่น (initial renaturation) ของ De Ley และคณะ (1970) และ Huss และคณะ (1983) (อ้างถึงใน Goris , 1998)

ปัจจุบันการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น ทำได้โดยตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวลงในไมโครเพลต ทำให้เกิดดีเอ็นเอสายผสมด้วยโพรบดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยโฟโตไบโอติน และตรวจสอบการเกิดดีเอ็นเอสายผสมได้จากปฏิกิริยาของไบโอตินกับสเทรปทาวิดิน (streptavidin) ที่เชื่อมติดกับเอนไซม์ แล้วจึงทำให้สารตั้งต้นของเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงที่สามารถตรวจสอบได้ วิธีนี้สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้อย่างรวดเร็ว (Goris , 1998) การทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นมีวิธีการดังนี้ (Nagata ,1985)

1. ตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวลงในไมโครเพลต
2. ไฮบริไดเซชั่น ด้วยโพรบดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอติน
3. ปฏิกิริยาระหว่างโพรบดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไบโอตินกับสเทรปทาวิดินที่เชื่อมติดกับเอนไซม์
4. วิเคราะห์หากิจกรรมของเอนไซม์

วิธีการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอตินมีความเหมาะสมกว่าการติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี เนื่องจาก สารกัมมันตภาพรังสีมีช่วงครึ่งชีวิตสั้น (I^{125} มีครึ่งชีวิต ประมาณ 60 วัน) จึงไม่สามารถนำมาทำเป็นคิท (kit) ของโพรบดีเอ็นเอได้ สารกัมมันตภาพรังสีมีความเสี่ยงและเป็นอันตรายต่อร่างกายสูง และการกำจัดสารกัมมันตภาพรังสีที่ใช้แล้วทำได้ยาก ปัจจุบันนิยมใช้การติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยสารที่ไม่ใช่สารกัมมันตภาพรังสี (nonradioisotope) ได้แก่ โฟโตไบโอติน (Kricka , 1992)

Ezaki และคณะ (1988) ศึกษาการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยใช้วิธีคัลเลอร์ริเมทริคดอต ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น (colorimetric dot DNA hybridization) บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส กับวิธีฟลูออโรเมทริคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น (fluorometric DNA hybridization) ในไมโครเพลต สำหรับจัดจำแนกแบคทีเรีย streptococci ทั้ง 2 วิธีนี้ใช้โฟโตไบโอตินติดฉลากกับโพรบดีเอ็นเอแทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี ถ้าเป็นวิธีคัลเลอร์ลิเมทริคดอตดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น จะตรวจสอบดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นจากปฏิกิริยาของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase) ที่เชื่อมติดกับสเทรปทาวิดิน วิเคราะห์สีจากเครื่องวิเคราะห์สี (color graph analyzer) บนแผ่นไนโตรเซลลูโลส ส่วนวิธีฟลูออโรเมทริคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลต จะตรวจสอบดีเอ็นไฮบริไดเซชั่นจากปฏิกิริยาของเอมไซม์เบต้าดีกาแลคโตซิเดส (β-D-galactosidase) ที่เชื่อมติดกับสเทรปทาวิดิน และใช้สารเรืองแสงเมทิลลัมบีลิฟีริลเบต้าดีกาแลคโทซายด์ (4-methylumbeliferyl -β-D-galactoside) อ่านผลด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต

Ezaki และคณะ (1989) ใช้วิธีฟลูออโรเมทริคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลต โดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน แทนการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นบนแผ่นเมมเบรน ในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่ก่อโรคในมนุษย์ ซึ่งทำได้อย่างรวดเร็ว คือ สามารถนำดีเอ็นเอสายเดี่ยวของแบคทีเรียก่อโรคสายพันธุ์อ้างอิงตรึงไว้ในไมโครเพลต และเก็บไว้ในภาชนะดูดความชื้นที่อุณหภูมิห้อง เมื่อต้องการจัดจำแนกแบคทีเรียก่อโรคที่แยกได้จากผู้ป่วย จึงทำการสกัดดีเอ็นเอของแบคทีเรียและใช้เป็นโพรบดีเอ็นเอ การใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นนี้จะใช้เวลาน้อยกว่าการจัดจำแนกแบคทีเรียโดยอาศัยหลักการทางฟีโนไทป์

วิธีการนี้นำไปประยุกต์ใช้กับแบคทีเรียที่เจริญได้ยากในอาหารเลี้ยงเชื้อ คือ *Mycobacterium* ซึ่งใช้เวลาในการจัดจำแนกแบคทีเรียถึงระดับสปีชีส์โดยลักษณะทางฟีโนไทป์นานประมาณ 1 เดือน จึงไม่สะดวกในการรักษาผู้ป่วย เพื่อความรวดเร็วจึงใช้เทคนิคฟลูออโรเมทริคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลตโดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน ในการจัดจำแนกแบคทีเรีย *Mycobacterium* ซึ่งใช้เวลา 3-4 ชั่วโมง (Kusunoki และคณะ , 1991 ; Aoki และ Yamada , 1994)

Sugita และคณะ (1993) ประยุกต์ใช้เทคนิคคัลเลอร์ริเมทริคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลต โดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน ในการศึกษาระบบนิเวศน์วิทยาของแบคทีเรีย *Plesiomonas shigelloides* ที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วง ซึ่งพบในลำไส้ของปลาน้ำจืดและน้ำจืด วิธีนี้สามารถลดระยะเวลาและแรงงานในการจัดจำแนกแบคทีเรียที่มีจำนวนมากโดยลักษณะทางฟีโนไทป์

Sugita และคณะ (1994) และ Kazowski และคณะ (1995) ใช้เทคนิคคัลเลอร์ริเมทริคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น โดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน ในการจัดจำแนกแบคทีเรียสกุล *Aeromonas* sp. ในปลาน้ำจืด

Suzuki และคณะ (1996) จัดจำแนกแบคทีเรียสกุลใหม่คือ *Agromyces mediolanus* ซึ่งเดิมเป็นแบคทีเรียในสกุล *Corynebacterium mediolanum* โดยใช้เทคนิคฟลูออโรเมทริคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลต โดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน

Satomi และคณะ (1997) ศึกษาอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากน้ำปลาจากปลาหมึก โดยศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอด้วยเทคนิคคัลเลอร์ริเมทริคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลต ที่ติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้ 11 สายพันธุ์ ไม่มีความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *T. halophilus* IAM 1676^{T} (15-49 เปอร์เซนต์โฮโมโลยี) และจากการศึกษาลำดับเบสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียที่แยกได้ พบว่ามีความคล้ายคลึงกับแบคทีเรีย *T. halophilus* IAM 1676^{T} (เปอร์เซนต์ความคล้ายคลึงเท่ากับ 93.4 เปอร์เซนต์) แสดงว่าแบคทีเรีย 11 สายพันธุ์ที่แยกได้นี้ จัดอยู่ในสกุล *Tetragenococcus* แต่ไม่ใช่สปีชีส์ *T. halophilus* จึงจัดเป็นเป็นแบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ คือ *Tetragenococcus muriaticus*

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น UV-160 ของบริษัท Shimadzu , Japan
2. เครื่องวัดพีเอช (pH meter) รุ่น Φ 43 ของบริษัท Beckman , USA.
3. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) ของบริษัท Hitachi , Japan
4. เครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น 2K15 ของบริษัท Sigma , USA.
5. กล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Microscope) รุ่น CH-CO1-764604 ของบริษัท Olympus , Japan
6. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ รุ่น CK2 ของบริษัท Olympus , Japan
7. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น HA-36 ของบริษัท Hirayama , Japan
8. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น 1941X ของบริษัท Wisconsin Aluminum Foundry , USA.
9. ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส (Deep freezer) รุ่น CFM209P6WO ของบริษัท White Consol Idated , USA.
10. อ่างน้ำปรับอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น 84 ของบริษัท Precision Scientific , USA.
11. เครื่องผสมสาร (Vortex mixer) รุ่น vortex-genieของบริษัท Scientific Industries , USA.
12. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส (Incubator) รุ่น 6 ของบริษัท Precision Scientific , USA.
13. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Incubator) รุ่น B6 ของบริษัท Memmert , Western Germany
14. ตู้บ่มเชื้ออุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Incubator) รุ่น UM 100 ของบริษัท Memmert , Western Germany

15. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น T5010E ของบริษัท Heraeus , Western Germany
16. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven) รุ่น 28208 ของบริษัท Elektro-Helios , Sweden
17. เครื่องอ่านไมโครเพลต (Microplate reader) รุ่น 3550 ของบริษัท Bio-Rad , USA.
19. ตู้เขี่ยเชื้อแบบลามินาร์โฟล รุ่น BV-126 ของบริษัท International Scientific Supply , Thailand
20. เครื่องชั่งหยาบ รุ่น 1518 ของบริษัท Sartorius , Germany
21. เครื่องชั่งละเอียด รุ่น 1602MP8-1 ของบริษัท Satrorius , Germany
22. เครื่องสั่นโดยใช้เสียง (sonication) รุ่น TP 690 ของบริษัท Elma , Germany
23. เครื่องวัดฟลูออโรสเปคโทรมิเตอร์ (Fluorospectrometer) รุ่น PTL-3965 ของบริษัท Jasco Corporation , Japan
24. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (Lyophilizer) ของบริษัท Dura-dry , USA.
25. เครื่องนับจำนวนโคโลนี (Quebec colony counter) รุ่น CC560 ของบริษัท Wisan , Taiwan

อาหารเลี้ยงเชื้อและน้ำตาล

1. เปปโทน (peptone) ของบริษัท Oxoid , England
2. ทริปโทน (tryptone) ของบริษัท Difco , USA.
3. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Oxoid , England
4. ผงสกัดจากเนื้อ (meat extract) ของบริษัท Merck , Germany
5. กลูโคส (glucose) ของบริษัท Difco , USA.
6. อาหารเลี้ยงเชื้อทีเอสไอ (Triple iron agar) ของบริษัท Difco , USA.
7. เจลาติน (galatin) ของบริษัท Difco , USA.
8. สกิมมิลค์ (skim milk) ของบริษัท Difco , USA.
6. ซูโครส (sucrose) ของบริษัท Merck , Germany
7. ซอลบิทอล (sorbitol) ของบริษัท BDH , England
8. แป้งแบบละลายน้ำได้ (soluble starch) ของบริษัท Merck , Germany
9. ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ของบริษัท Merck , Germany
10. กลีเซอรอล (glycerol) ของบริษัท Carlo , USA.
11. ดี-ไซโลส (D-xylose) ของบริษัท Sigma , USA.

12. ดี-แมนโนส (D-mannose) ของบริษัท Fluka , Swizerland
13. แอลฟา-เมธิลดี-กลูโคซายด์ (α-methyl D-glucoside) ของบริษัท Sigma , USA.
14. ดี-เมเลซิโทส (D-melezitose) ของบริษัท Fluka , Swizerland
15. แรมโนส (rhamnose) ของบริษัท Difco , USA.
16. แอล-ซอรโบส (L-sorbose) ของบริษัท Sigma , USA.
17. ซาลิซิน (salicin) ของบริษัท Sigma , USA.
18. ดี-ฟรุกโทส (D-fructose) ของบริษัท Fluka , Swizerland
19. ดี-ไรโบส (D-ribose) ของบริษัท Fluka , Swizerland
20. แอล- อะราบิโนส (L-arabinose) ของบริษัท Difco , USA.
21. ราฟฟิโนส (raffinose) ของบริษัท Difco , USA.
22. ดี-กาแลคโทส (D-galactose) ของบริษัท Fluka , Swizerland
23. มอลโทส (maltose) ของบริษัท Sigma , USA.
24. ดี-ทรีฮาโลส (D-trehalose) ของบริษัท Cica Kanto , Japan
25. เมลิไบโอส (melibiose) ของบริษัท Wako , Japan
26. ดี-อะมิกดาลิน (D-amygdalin) ของบริษัท Sigma , USA.
27. ดี-เซลลิไบโอส (D-cellibiose) ของบริษัท Sigma , USA.
28. เดกซทริน (dextrin) ของบริษัท Difco , USA.
30. แลคโทส (lactose) ของบริษัท Difco , USA.
31. เอสคูลิน (esculin) ของบริษัท Sigma , USA.

สารเคมีและเอนไซม์

1. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนออโทฟอสฟาเทต (di-Potassium hydrogen orthophosphatate , K_2HPO_4) ของบริษัท Carlo , USA.
2. โซเดียมอะซิเทตไทรไฮเดรต (Sodium acetate trihydrate , $CH_3OONa . 3H_2O$) ของบริษัท Merck , Germany
3. ทวีน 80 (Tween 80) ของบริษัท Ajax , Australia
4. แอมโมเนียมซิเทรตไดเบสิค (Ammonium citrate dibasic , $(NH_4)_2HC_6H_5O_7$) ของบริษัท Sigma , USA.

5. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate , $MgSO_4. 7H_2O$) ของบริษัท Carlo , USA.

6. แมกกานีสซัลเฟตโมโนไฮเดรต(Manganese sulphate monohydrate,$MnSO_4.4H_2O$) ของบริษัท Carlo , USA.

7. โซเดียมคลอไรด์ (sodiumchloride , NaCl) ของบริษัท Carlo , USA.

8. ไกลซีน (glycine) ของบริษัท Ajax , Australia

9. ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (disodium hydrogen phosphate , Na_2HPO_4) ของบริษัท M&B , England

10. แอล-อาร์จีนีนโมโนไฮโดรคลอไรด์ (L-arginine monohydrochloride) ของบริษัท Fluka , Swizerland

11. เอ็น,เอ็น,เอ็น',เอ็น'-เททราเมทิล-หนึ่ง,สี่-ฟีนิลีนไดอะมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (N,N,N',N'-tetramethyl-1,4-phenylene diamine dihydrochloride) ของบริษัท Fluka , Swizerland

12. ไทรบิวไทริน (tributyrin) ของบริษัท Fluka , Swizerland

13. โปแทสเซียมคลอไรด์ (potassiumchloride , KCl) ของบริษัท Carlo , USA.

14. โซเดียมไทโอไกลโคลเลต (sodiumthioglycollate) ของบริษัท Difco , USA.

15. โซเดียมซัลเฟต (sodiumsulphate) ของบริษัท M&B , England

16. โปแทสเซียมไนเทรต (potassiumnitrate , KNO_3) ของบริษัท M&B , England

17. โซเดียมไบคาร์บอเนต (sodiumbicarbonate , $NaHCO_3$) ของบริษัท Wako , Japan

18. ฮีมาทิน (hematin) ของบริษัท Sigma , USA.

19. ซิลเวอร์ไนเทรต (silver nitrate) ของบริษัท Merck , Germany

20. กรดซัลฟูริค (sulfuric acid) ของบริษัท Mallinckrodt , USA.

22. กรดไฮโดรคลอริค (hydrochloric acid) ของบริษัท Merck , Germany

23. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogenperoxide) ของบริษัท Carlo , USA.

24. เอธานอล (ethanol) ของบริษัท Carlo , USA.

25. เมธานอล (methanol) ของบริษัท J.T. Baker , USA.

26. ฟีนอฟทาลีน (phenolphthalein) ของบริษัท Merck , Germany

27. คริสตัลไวโอเลต (crystal violet) ของบริษัท Fluka , Swizerland

28. ซาฟรานิน (safranin) ของบริษัท Fluka , Swizerland

29. ฟีนอลเรด (phenol red) ของบริษัท M&B , England

30. บรอมครีซอลเพอร์เพิล (bromcresol purple) ของบริษัท M&B , England

31. ฟีนอล (phenol) ของบริษัท Carlo , USA.

32. ฟอร์มามายด์ (formamide) ของบริษัท Carlo , USA.

33. เอ็น-เอ็น-ไดเมทิลฟอร์มามายด์ (N,N-dimethylformamide) ของบริษัท Ajax , Australia

34. แมกนีเซียมคลอไรด์ (magnesiumchloride , $MgCl_2$) ของบริษัท Sigma , USA.

35. โพลีไวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone) ของบริษัท Fluka , Swizerland

36. ไทรทอนเอ็กซ์ 100 (triton X-100) ของบริษัท J.T. Baker , USA.

37. ฟิคอลล์ (ficoll type 400) ของบริษัท Sigma , USA.

38. อัลบูมินโบวีน (albumin bovine fraction V) ของบริษัท Sigma , USA.

39. ดีออกซีไรโบนิวคลีอิคแอซิค จากคาล์ฟไทมัส (deoxyribonucleic acid sodium salt from calf thymus) ของบริษัท Sigma , USA.

40. ดีออกซีไรโบนิวคลีอิคแอซิค จากซาลมอนสเปอร์ม (deoxyribonucleic acid sodium salt fibrous from salmon spermary) ของบริษัท Wako , Japan

41. โฟโตไบโอติน (photobiotin) ของบริษัท Vector , USA.

42. เดกซแทรนซัลเฟต (dextran sulphate) ของบริษัท Sigma , USA.

43. ไทรโซเดียมซิเทรตไดไฮเดรต (trisodium citrate dihydrate) ของบริษัท Cica Kanto , Japan

44. ไดโซเดียมไดไฮโดรเจนเอทิลีนไดเอมีนเททราอะซิเทตไดไฮเดรต (EDTA) ของบริษัท Cica Kanto , Japan

45. ทริส (tris) ของบริษัท Wako , Japan

46. คลอโรฟอร์ม (chloroform) ของบริษัท Mallinckrodt , USA.

47. เททราเมทิลเบนซิดีน (3,3′,5,5′ - tetramethylbenzidine) Wako , Japan

48. กรดซิตริค (citric acid) ของบริษัท Ajax , Australia

49. ดีแอล-แลคติคแอซิค (DL-lactic acid) ของบริษัท Fluka , Swizerland

50. ฮีสตามีนไดไฮโดรคลอไรด์ (histamine dihydrochloride) ของบริษัท Fluka , Swizerland

51. กรดฟอสโฟริค (H_3PO_4) ของบริษัท J.T. Baker , USA.

52. พาทาลไดอัลดีไฮด์ (phthaldialdehyde) ของบริษัท Fluka , Swizerland

53. ไลโซซายม์ (lysozyme) ของบริษัท Wako , Japan

54. สเทรปทาวิดินเชื่อมติดกับแอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (streptavidin-peroxidase) ของบริษัท Boehringer Mannheim , Germany

55. ดี-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (D-lactate dehydrogenase) ของบริษัท Boehringer Mannheim , Germany

56. แอล-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (L-lactate dehydrogenase) ของบริษัท Boehringer Mannheim , Germany

57. เอ็นเอดี (NAD) ของบริษัท Boehringer Mannheim , Germany

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

1. *Tetragenococcus halophilus* ATCC 33315^{T}
2. *Tetragenococcus muriaticus* JCM 10006^{T}
3. *Aerococcus viridans* TISTR 393^{T}

วิธีการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในระยะต่าง ๆ ของกระบวนการหมักน้ำปลา และการศึกษาสมบัติบางประการของน้ำปลา

1.1 <u>การเก็บตัวอย่างน้ำปลา การแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม และการนับจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมด</u>

เก็บตัวอย่างน้ำปลาจากบ่อหมักโรงงานน้ำปลาไทย อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรสงคราม (โรงงาน A) โรงงานสินธุ์สมุทร อำเภอบางบ่อ จังหวัดสมุทรปราการ (โรงงาน B) และโรงงานน้ำปลาพิไชย อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี (โรงงาน C) โรงงาน A และ โรงงาน B มีลักษณะการหมักน้ำปลาในโรงเรือน ส่วนโรงงาน C หมักน้ำปลากลางแจ้ง โดยเก็บจากบ่อหมักที่มีอายุตั้งแต่เริ่มต้นการหมักไปทุก ๆ 1 เดือน จนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักเป็นเวลา 12 หรือ 18 เดือน โดยใช้ภาชนะปลอดเชื้อขนาด 250 มิลลิลิตร ตักตัวอย่างน้ำปลาจากบริเวณผิวบ่อหมักและบริเวณก้นบ่อหมัก เก็บตัวอย่างโดยการดูดตัวอย่างน้ำปลาด้วยเครื่องสูบน้ำ สูบตัวอย่างน้ำปลาทิ้งเป็นเวลา 3 นาที ก่อนจึงทำการเก็บตัวอย่างด้วยภาชนะปลอดเชื้อดังกล่าว โรงงาน C

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำปลา โดยกระบอกเก็บตัวอย่าง ทั้งบริเวณผิวบ่อหมักและก้นบ่อหมัก บรรจุใส่ขวดปลอดเชื้อ ปิดฝาให้สนิท นำตัวอย่างน้ำปลาทั้งหมดแช่น้ำแข็ง จนถึงห้องปฏิบัติการจึงเก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

จากตัวอย่างน้ำหมักน้ำปลาที่มีอายุต่าง ๆ กันที่เก็บมาได้ นำมาแยกและนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี pour plate โดยใช้ 5 เปอร์เซนต์น้ำเกลือในการทำเจือจาง ในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส (De Man และคณะ , 1960) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 1) โดยบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นนับจำนวนโคโลนีทั้งหมด และคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลม สีขาวขุ่นฝังอยู่ในอาหารวุ้นเป็นเกณฑ์ นำไปเลี้ยงในอาหารเหลวเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวน ทำให้เชื้อบริสุทธิ์โดยวิธี streak ลงบนอาหารวุ้นเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน คัดเลือกโคโลนีเดี่ยว เพื่อมาทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลสเพื่อเป็นการแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *Tetragenococcus* sp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส เก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหารเหลวเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ และกลูโคส 1 เปอร์เซนต์ ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นเชื้อทดสอบ หรือเก็บเชื้อระยะยาวในกลีเซอรอล 30 เปอร์เซนต์ และโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ โดยเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หรือโดยการทำไลโอฟิลไลส์ (สมบูรณ์ , 2539)

1.2 <u>การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในระยะต่าง ๆ ของกระบวนการหมักน้ำปลา</u>

จากการนับจำนวนแบคทีเรียทั้งหมดข้อ 1.1 นำมาเขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดและระยะเวลาของการหมัก

1.3 <u>การศึกษาสมบัติบางประการของน้ำปลา</u>

1.3.1 พีเอช (pH) วัดพีเอชของตัวอย่างน้ำหมักน้ำปลา เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำปลาตลอดระยะเวลาของการหมัก โดยการกรองตัวอย่างด้วยกระดาษวัทแมน (whatman) เบอร์ 1 วัดพีเอชโดยใช้เครื่อง ของ Beckman รุ่น Φ 43

1.3.2 ปริมาณกรดแลคติค (AOAC ,1975) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติค (%) ในน้ำปลาตลอดระยะเวลาของการหมัก โดยใช้ตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วต้มจนเดือด เพื่อไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ หลังจากเย็นลง ไทเทรตด้วย 0.1 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) มาตรฐาน (ภาคผนวก ข. หมายเลข 1) โดยใช้ฟีนอฟทาลีน (phenolphthalein) เป็นตัวบ่งชี้ (indicator) คำนวณหาเปอร์เซนต์กรดในรูปของกรดแลคติค

1.3.3 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (AOAC , 1995) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในน้ำปลา (%) โดยใช้ตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร และเจือจางด้วยน้ำกลั่น เติมโปแทสเซียมไดโครเมต (K_2CrO_4) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เป็นตัวบ่งชี้ ไทเทรตด้วย 0.0141 นอร์มอล ของซิลเวอร์ไนเทรต ($AgNO_3$) มาตรฐาน (ภาคผนวก ข. หมายเลข 2) คำนวณหาเปอร์เซนต์โซเดียมคลอไรด์

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Tetragenococcus* sp. โดยอาศัยหลักฟีโนไทป์

2.1 <u>การจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้</u> (Garvie,1986 และ Weiss ,1992)

นำแบคทีเรียที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้จากข้อ 1.1 มาจัดกลุ่มโดยทดสอบการรีดิวส์ไนเทรต โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารทดสอบการรีดิวส์ไนเทรต (ภาคผนวก ก หมายเลข 2) บ่มที่ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำอาหารทดสอบการรีดิวส์ไนเทรตมาทดสอบหาไนไตรต์ ด้วยสารละลาย A (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) 3 หยด และเติมสารละลาย B (ภาคผนวก ข หมายเลข 4) 2 หยด ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ามีไนไตรต์ และถ้าการทดสอบไม่เกิดสีแดงให้เติมผงสังกะสีลงไปในอาหารทดสอบเล็กน้อย ภายหลัง 2-3 นาที ให้เติมสารละลาย A และ B ตามลำดับ ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่ามีไนไตรต์ซึ่งเกิดจากการรีดิวส์ไนเทรตด้วยผงสังกะสี ทำให้สรุปได้ว่าแบคทีเรียไม่สามารถรีดิวส์ไนเทรตได้ และทดสอบความสามารถในการหมักน้ำตาล (carbohydrate fermentation) คือ เมลซิโทส (melezitose) อะราบิโนส (arabinose) มอลโทส (maltose) กาแลคโทส (galactose) ไซโลส (xylose) และ ไรโบส (ribose) จัดกลุ่มแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการหมักน้ำตาลเหมือนกันให้อยู่ในกลุ่มเดียวกัน

2.2 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม โดยอาศัยหลักการทางฟีโนไทป์

เลือกตัวแทนเชื้อบริสุทธิ์ของแต่ละกลุ่มจากข้อ 2.1 ไปศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี ซึ่งจะยึดแนวทางการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ Garvie (1986) เป็นหลักสำคัญร่วมกับแนวทางของ Tanasupawat และ Daengsubha (1983) และ Barrow และ Feltham (1993) ซึ่งมีวิธีดำเนินการดังนี้

2.2.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญ

ศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยการย้อมสีแบบแกรม (ภาคผนวก ข. หมายเลข 3) และคัดเลือกแบคทีเรียตัวแทนไปศึกษาลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด ศึกษาลักษณะของโคโลนีและการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ หลังจากบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

2.2.2 ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

2.2.2.1 การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส (Barrow และ Feltham , 1993)

ใช้ลูปพลาทินัมหรือแท่งแก้วขนาดเล็กเขี่ยแบคทีเรียอายุ 5 วัน ขีดลงบนกระดาษกรองที่เปียกชุ่มด้วยสารละลาย เททรามทิลพาราฟีนิลีนไดอะมีนไดไฮโดรคลอไรด์ (tetramethyl paraphenylenediamine dihydrochoride) เข้มข้น 1 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 5) สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นหลังจากทิ้งไว้ 1 นาที ถ้ามีสีม่วงเกิดขึ้นตามแนวที่ขีดเชื้อ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นสามารถสร้างเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสได้

2.2.2.2 การสร้างเอนไซม์คาตาเลสในอาหารที่มีฮีมาทิน (hematin) (Gurtler และคณะ ,1998)

เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ และเติมฮีมาทินในอัตราส่วน 20 มิลลิกรัมต่อลิตร (ภาคผนวก ก. หมายเลข 3) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน หลังจากนั้นเติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลาย

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 6) ต่ออาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิลิตร ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้

2.2.2.3 <u>การย่อยอาร์จีนีน</u> (Tanasupawat และ Daengsubha , 1983)

เพาะเชื้อแบบปักตรง (stab inoculation) ตลอดความลึกของอาหารเลี้ยงเชื้ออาร์จีนีนแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 4) ซึ่งมีฟีนอลเรดเป็นตัวบ่งชี้ เทพาราฟินที่ปลอดเชื้อปิดทับผิวหน้าอาหารในหลอดหนา 1 นิ้ว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจผลทุกวัน ถ้าแบคทีเรียสามารถย่อยสลายอาร์จีนีนได้จะทำให้เกิดก๊าซแอมโมเนียในอาหาร สีของอาหารจะเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีบานเย็น

2.2.2.4 <u>การย่อยเคซีน</u> (Barrow และ Feltham , 1993)

ลากเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเคซีน ซึ่งประกอบด้วยเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ และสกิมมิลค์ 1 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 5) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจดูบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเคซีน (เคซีนเนส) ได้

2.2.2.5 <u>การย่อยเจลาติน</u> (Tanasupawat และ Daengsubha , 1983)

เพาะเชื้อแบบปักตรงตลอดความลึกของอาหารเลี้ยงเชื้อเจลาตินแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 6) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 14 วัน ตรวจสอบการย่อยเจลาตินโดยนำหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อแช่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลาครึ่งชั่วโมง แล้วทดสอบทันทีโดยทำการเอียงหลอดทดลอง ถ้าอาหารเลี้ยงเชื้อยังคงเป็นของเหลว แสดงว่าเจลาตินถูกย่อยเนื่องจากเอนไซม์ย่อยเจลาตินที่แบคทีเรียสร้างขึ้น (เจลาติเนส)

2.2.2.6 <u>การย่อยแป้ง</u> (Tanasupawat และ Daengsubha , 1983)

ลากเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ ดัดแปลงโดยใช้แป้งแทนกลูโคส (ภาคผนวก ก. หมายเลข 7) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการย่อยแป้ง โดยราดน้ำยาแกรมไอโอดีน (ภาคผนวก ข.

หมายเลข 3) ให้ทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ถ้าเกิดบริเวณใส รอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยแป้ง (อะมิเลส) ได้

2.2.2.7 การย่อยไทรบิวไทรีน (Tanasupawat และ Daengsubha , 1983)

ลากเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งสำหรับทดสอบการย่อยไทรบิวไทรีน ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 8) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ถ้าตรวจพบบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยไทรบิวไทรีนได้ (ไลเปส)

2.2.2.8 การใช้เมธิลเรดตรวจสอบการสร้างกรด (Barrow และ Feltham , 1993)

เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์วีพี (MR-VP) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลทุก ๆ 3 วัน โดยแบ่งอาหารประมาณ 2-3 มิลลิลิตร เติมน้ำยาเมธิลเรด (ภาคผนวก ข. หมายเลข 7) ลงไป 2-3 หยด ถ้าเกิดสีแดงในอาหาร แสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างกรดปริมาณมาก ๆ จากน้ำตาลกลูโคส จึงทำให้พีเอชลดลง

2.2.2.9 การทดสอบตรวจสอบการสร้างอะซีธิลเมธิลคาร์บินอล (Barrow และ Feltham , 1993)

เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์วีพี (MR-VP) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 9) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจผลทุก ๆ 3 วัน โดยแบ่งอาหารประมาณ 2-3 มิลลิลิตร เติมสารละลาย A และสารละลาย B (ภาคผนวก ข. หมายเลข 8) ลงไป 2-3 หยด ถ้าอาหารมีสีชมพูเกิดขึ้นภายใน 10 นาที แสดงว่าแบคทีเรียสามารถผลิตอะซีธิลเมธิลคาร์บินอลซึ่งเป็นสารตัวกลางในการผลิตบิวไทลีนไกลคอล (butylene glycol)

2.2.2.10 การทดสอบออกซิเดทีฟ-เฟอร์เมนท์เททีฟ (Tanasupawat และ Daengsubha , 1983)

เพาะเชื้อแบบปักตรงในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อออกซิเดทีฟเฟอร์เมนท์เททีฟแบบกึ่งแข็งกึ่งเหลว ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก . หมายเลข 10) 2 หลอด

เทพาราฟินเหลวที่ปลอดเชื้อปิดทับ 1 หลอด สูงประมาณ 1 นิ้ว บ่มหลอดทั้งสองที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน แบคทีเรียที่เป็นเฟอร์เมนท์เททีฟจะสร้างกรดในอาหารทั้งสองหลอด หรือเฉพาะหลอดที่เทพาราฟินปิดทับ ส่วนแบคทีเรียที่เป็นออกซิเดทีฟจะให้กรดเฉพาะหลอดที่ไม่มีพาราฟินปิดทับ สังเกตการเกิดกรดได้จากการเปลี่ยนสีของบรอมครีซอลเพอร์เพิล (ภาคผนวก ข. หมายเลข 9) จากสีม่วงเป็นสีเหลืองเพื่อตรวจสอบการใช้น้ำตาลในสภาวะที่มีออกซิเจนและไม่มีออกซิเจน

2.2.2.11 <u>การสร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์</u> (Barrow และ Feltham , 1993)

เพาะเชื้อแบบปักตรงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งทีเอสไอ (TSI) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 11) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีดำแสดงว่าเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จากกระบวนการรีดักชั่นของไทโอซัลเฟต ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเฟอร์ริคซัลเฟตที่เป็นตัวบ่งชี้ โดยเมื่อก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์รวมตัวกับเฟอร์ริคไอออน จะเกิดตะกอนสีดำ

2.2.2.12 <u>ความสามารถในการหมักน้ำตาล</u> (Tanasupawat และ Daengsubha , 1983)

เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับทดสอบการหมักน้ำตาล ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (ภาคผนวก ก. หมายเลข 12) น้ำตาลที่ใช้ทดสอบ คือ 0.5 เปอร์เซนต์ของ อะมิกดาลิน (amygdalin) เซลโลไบโอส (cellobiose) เดกซทริน (dextrin) เอสคูลิน (esculin) ฟรุคโทส (fructose) กลีเซอรอล (glycerol) แลคโทส (lactose) แมนนิทอล (mannitol) แมนโนส (mannose) เมลิไบโอส (melibiose) แอลฟา-เมทิลกลูโคซายด์ (α - methyl-glucoside) ราฟฟีโนส (raffinose) ซาลิซิน (salicin) ซอลบิทอล (sorbitol) ซอรโบส (sorbose) ซูโครส (sucrose) ทรีฮาโลส (trehalose) และ ไซโลส (xylose) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ตรวจผลการสร้างกรดภายใน 7 วัน ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลได้จะสร้างกรดขึ้นมา ทำให้บรอมครีซอล-เพอร์เพิลในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ เปลี่ยนสีจากสีม่วงเป็นสีเหลือง

2.2.2.13 <u>ความสามารถในการเจริญของแบคทีเรียที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส</u> (Tanasupawat และ Daengsubha , 1983)

เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอส ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 40 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการเจริญ

ของแบคทีเรียโดยการสังเกตความขุ่น โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมซึ่งบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

2.2.2.14 ความสามารถในการเจริญที่พีเอชต่าง ๆ (Tanasupawat และ Daengsubha , 1983)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ พีเอช 4.2 5.0 6.5 8.0 และ 9.0 จากนั้นเพาะเชื้อลงในอาหารดังกล่าว บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียโดยการสังเกตความขุ่น โดยเปรียบเทียบกับหลอดควบคุมซึ่งมีพีเอชเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0

2.2.2.15 ความสามารถในการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ 0 , 10 , 15 , 20 , และ 25 เปอร์เซนต์ (Tanasupawat และ Daengsubha , 1983)

เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอส ซึ่งแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ต่าง ๆ คือ 0 , 10 , 15 , 20 และ 25 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจดูการเจริญของแบคทีเรียโดยการสังเกตความขุ่น

2.3 การจัดกลุ่ม *Tetragenococcus* ที่จัดจำแนกได้โดยลักษณะทางฟีโนไทป์และเลือกตัวแทนกลุ่ม

จากลักษณะทางฟีโนไทป์ที่ได้ตรวจสอบในข้อ 2.2 สามารถพิสูจน์ได้ว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงงานน้ำปลาเป็น *Tetragenococcus* sp. แต่จะมีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันหลายกลุ่มจึงทำการจัดกลุ่มและเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่ม เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

3. การศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของ *Tetragenococcus* sp.

จากตัวแทนเชื้อที่คัดเลือกได้จากข้อ 2.3 และแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสายพันธุ์มาตรฐาน (*T. halophilus* ATCC 33315^T และ *T. muriaticus* JCM 10006^T) นำมาศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอโดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลต โดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน ดังนี้

3.1 การแยกและการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์ (Marmur , 1961 และ Tomaoka , 1994)

3.1.1 เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเอ็มอาร์เอส ปริมาตร 800 มิลลิลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ และ ไกลซีน (Glycine) 0.5 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-4 วัน

3.1.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายซาลีนอีดีทีเอ พีเอช 8.0 (ภาคผนวก ข. หมายเลข 10)

3.1.3 ทำให้เซลล์แตกด้วยเอนไซม์ไลโซซายม์ (lysozyme) 10 มิลลิกรัม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่า 30 นาที จนกว่าสารละลายจะมีลักษณะหนืดข้น

3.1.4 เติม 1 มิลลิลิตร ของทริสเอสดีเอส (ภาคผนวก ข. หมายเลข 11) และ 6-8 มิลลิลิตร ของทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 9.0 (ภาคผนวก ข. หมายเลข 12) เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

3.1.5 เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม (ภาคผนวก ข. หมายเลข 13) 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.1.6 สารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างคือสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม ส่วนชั้นบนคือสารละลายดีเอ็นเอ ให้ดูดสารละลายส่วนบนย้ายไปลงในหลอดใหม่ เติมสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม 5-10 มิลลิลิตร ลงไปซ้ำอีกครั้งเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

3.1.7 ดูดสารละลายดีเอ็นเอส่วนบน มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอธานอล (แช่เย็น) 95 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และพันสายดีเอ็นเอที่ตกตะกอนด้วยแท่งแก้ว

3.1.8 ล้างสายดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซนต์และ 95 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ปล่อยให้สายดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง

3.1.9 ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต (0.1xSSC) (ภาคผนวก ข. หมายเลข 14) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

3.1.10 ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอาร์เอนเอ (RNA) ด้วยเอนไซม์อาร์เอนเอส เอ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 15) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.1.11 เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต (10xSSC) และ 5 มิลลิลิตร ของสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จึงปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็นที่ 12,000 รอบต่อนาที

3.1.12 นำสารละลายดีเอ็นเอชั้นบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยเอธานอล (แช่เย็น) 95 เปอร์เซนต์ และพันสายดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้ว

3.1.13 ล้างดีเอ็นเอด้วยเอธานอล 70 และ 95 เปอร์เซนต์ ทำให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต (0.1xSSC)

3.1.14 นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของดีเอ็นเอ หากดีเอ็นเอยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำซ้ำ (ข้อ 3.1.10 – 3.1.13)

3.2 <u>ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน</u> (Ezaki และคณะ , 1989)

ขั้นตอนการทำดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลต เป็นดังนี้

3.2.1 การตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวลงในไมโครเพลต

3.2.1.1 นำ 10 ไมโครกรัม ของสารละลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ต้องการพิสูจน์เอกลักษณ์ (DNA unknown) สารละลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) และสารละลายดีเอ็นเอของคาล์ฟไทมัส (calf thymus) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอควบคุม ใส่ในหลอด eppendorf

3.2.1.2 นำดีเอ็นเอไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และทำให้เย็นทันทีเพื่อทำให้เกิดดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่สมบูรณ์

3.2.1.3 เติมสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (ภาคผนวก ข. หมายเลข 16) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร และ 0.1 โมลลาร์ ของแมกนีเซียมคลอไรด์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 17) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ

3.2.1.4 ดูด 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายดีเอ็นเอสายเดี่ยว ใส่ในไมโครเพลต (2 ซ้ำ) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

3.2.1.5 เทสารละลายในหลุมไมโครเพลตทิ้งไปและทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.1.6 นำดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ตรึงในไมโครเพลตไปใช้ในขั้นตอนการทำไฮบริไดเซชั่นต่อไป (ข้อ 3.3.3) หรือสามารถเก็บไว้ในภาชนะดูดความชื้น

3.2.2 การติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยไฟโตไบโอติน

3.2.2.1 นำ 1 ไมโครกรัม ของสารละลายดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานลงในหลอด eppendorf เติมสารละลายไฟโตไบโอติน (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร) ในอัตราส่วนดีเอ็นเอต่อไฟโตไบโอติน เท่ากับ 1 : 1.5

3.2.2.2 นำไปฉายแสง โดยนำหลอด eppendorf ที่มีสารละลายดีเอ็นเอและไฟโตไบโอตินแช่ในอ่างน้ำแข็ง และฉายแสงด้วย Sunlamp เป็นเวลา 25 นาที

3.2.2.3 เติมทริสไฮโดรคลอริคบัฟเฟอร์ พีเอช 9.0 (ภาคผนวก ข. หมายเลข 18) ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

3.2.2.4 กำจัดไฟโตไบโอตินที่เหลือด้วยบิวธานอล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็นที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทำ 2 ครั้ง)

3.2.2.5 ดูดสารละลายส่วนบนทิ้ง นำสารละลายส่วนล่าง คือสารละลายดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยไฟโตไบโอติน (biotinylated DNA) ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง

3.2.2.6 นำไปผ่านเครื่องสั้นโดยใช้เสียง เป็นเวลา 3 นาที เพื่อทำให้ดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็ก (200-800 เบส)

3.2.2.7 หลังจากนั้นนำไปใส่ในสารละลายไฮบริไดเซชั่น (ภาคผนวก ข. หมายเลข 20) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการไฮบริไดเซชั่นในข้อ 3.2.3 ต่อไป

3.2.3 การไฮบริไดเซชั่น

3.2.3.1 นำไมโครเพลตที่ทำการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยว จากข้อ 3.2.1 มาเติม 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายพรีไฮบริไดเซชั่น (ภาคผนวก ข. หมายเลข 19) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

3.2.3.2 เทสารละลายในไมโครเพลตทิ้ง และเติม 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายไฮบริไดเซชั่น (โพรบดีเอ็นเอ) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

3.2.4 การตรวจสอบไฮบริไดเซชั่น

3.2.4.1 เทสารละลายไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลต ทิ้งไปและล้างแต่ละหลุมด้วย 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต (0.2xSSC) (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

3.2.4.2 เติม 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายอัลบูมินโบวีน (ภาคผนวก ข. หมายเลข 21) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

3.2.4.3 เทสารละลายอัลบูมินโบวีนที่อยู่ในไมโครเพลตทิ้ง และเติม 0.1 มิลลิลิตรของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เชื่อมติดกับสเทรปทาวิดิน (ภาคผนวก ข. หมายเลข 22) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

3.2.4.4 เทสารละลายเอนไซม์ทิ้ง และล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

3.2.4.5 เติม 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายเททราเมทิลเบนซิดีน-ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (ภาคผนวก ข. หมายเลข 23) ทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

3.2.4.6 หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 นอร์มอล ของกรดซัลฟุริค (H_2SO_4) และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต (microplate reader , Biorad รุ่น 3550)

4. การศึกษาการวิเคราะห์ฮีสตามีน ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค และองค์ประกอบไขมันของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus*

4.1 การวิเคราะห์ฮีสตามีนโดยวิธีฟลูออโรสเปคโทรมิเตอร์ (AOAC , 1990)

คัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของ *Tetragenococcus* sp. ทั้ง 2 สปีชีส์ มาทำการวิเคราะห์ฮีสตามีนดังนี้

4.1.1 การสกัดฮีสตามีน

4.1.1.1 เพาะเชื้อลงใน 20 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวสำหรับทดสอบสีสตามีน (ภาคผนวก ก. หมายเลข 13) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

4.1.1.2 นำ 10 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 0.5 มาปั่นแยกเซลล์ที่ 7,000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น

4.1.1.3 เทส่วนน้ำใสลงในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จากนั้นเติมเมธานอล 50 มิลลิลิตร ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันเป็นเวลา 2 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็น แล้วปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตรด้วยเมธานอล

4.1.1.4 กรองสารละลายผ่านกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1 ได้เป็นสารละลายตัวอย่าง นำสารละลายตัวอย่างปริมาตร 5 มิลลิลิตร มาทำการระเหยเมธานอลด้วยเครื่องทำระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ให้เหลือปริมาตรของสารละลายตัวอย่าง 1 มิลลิลิตร

4.1.2 การเตรียมคอลัมน์

4.1.2.1 ชั่งเรซินโดเวกซ์ (Dowex 1X8) 2 กรัมลงในบีกเกอร์

4.1.2.2 เติม 2 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 30 มิลลิลิตร คนให้เข้ากันและทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที เทโซเดียมไฮดรอกไซด์ทิ้ง (ทำซ้ำ 2 ครั้ง)

4.1.2.3 ล้างเรซินด้วยน้ำกลั่นจนหมดด่าง ทดสอบด้วยกระดาษวัดพีเอชจนได้พีเอชเท่ากับ 4.0-5.0

4.1.2.4 บรรจุเรซินลงในคอลัมน์ขนาด 20x7 เซนติเมตร (ความยาวxเส้นผ่านศูนย์กลาง) โดยให้เรซินสูง 8 เซนติเมตร

4.1.3 การวัดปริมาณสีสตามีน

4.1.3.1 ใส่สารละลายตัวอย่าง (จากข้อ 4.1.1) 1 มิลลิลิตร ลงในคอลัมน์

4.1.3.2 ปล่อยให้สารละลายผ่านคอลัมน์ลงในขวดกำหนดปริมาตร ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่บรรจุ 1 นอร์มอล ของกรดไฮโดรคลอริค ปริมาตร 5 มิลลิลิตร เมื่อสารละลายอยู่เหนือเรซินประมาณ 2 มิลลิเมตร เติมน้ำกลั่นลงในคอลัมน์จนกระทั่งสารละลายในขวดกำหนดปริมาตรมีปริมาตรเป็น 50 มิลลิลิตร

4.1.3.3 ปิเปตสารละลายที่ได้จากข้อ 4.1.3.2 ปริมาตร 5 มิลลิลิตร และ 0.1 นอร์มอลของกรดไฮโดรคลอริค ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 125 มิลลิลิตร และเติม 1 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันเป็นเวลา 5 นาที

4.1.34 เติมสารละลาย 0.1 เปอร์เซนต์ ของพาทาลไดอัลดีไฮด์ (phthaldialdehyde) ที่ละลายในเมธานอล (ภาคผนวก ข. หมายเลข 24) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเขย่าทันที ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 4 นาที จึงเติม 3.57 นอร์มอล ของกรดฟอสโฟลิค (H_3PO_4) ปริมาตร 3 มิลลิลิตร เขย่าทันที

4.1.3.5 นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องฟลูออโรสเปคโทรมิเตอร์ (Fluorospectrometer) ภายในเวลา 90 นาที ที่ความยาวคลื่น 350 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่กระตุ้นการเรืองแสง และ ความยาวคลื่น 444 นาโนเมตร ซึ่งเป็นความยาวคลื่นที่วัดการปล่อยแสงจากกราฟมาตรฐานของฮีสตามีน คำนวณหาปริมาณฮีสตามีนที่สร้างได้ (มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตรของอาหารเลี้ยงเชื้อ)

4.1.4 การเตรียมกราฟมาตรฐานของฮีสตามีน

4.1.4.1 เตรียมสารละลายฮีสตามีน A (1 มิลลิกรัม ต่อ มิลลิลิตร) โดยชั่งฮีสตามีนไดไฮโดรคลอริค (histamine . 2HCl) 169.1 มิลลิกรัม ใส่ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ละลายด้วย 0.1 นอร์มอล ของกรดไฮโดรคลอริค ปริมาตร 100 มิลลิลิตร (ต้องเตรียมใหม่ทุก ๆ สัปดาห์)

4.1.4.2 เตรียมสารละลายฮีสตามีน B (10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยปิเปต 1 มิลลิลิตรของสารละลายฮีสตามีน A แล้วเจือจางด้วย 0.1 นอร์มอล ของกรดไฮโดรคลอริค ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.1.4.3 เตรียมสารละลายฮีสตามีน C (0.5 , 1.0 , 1.5 , 2.5 และ 3.0 ไมโครกรัมต่อ 5 มิลลิลิตร) โดยปิเปตสารละลายฮีสตามีน B ปริมาตร 1 , 2 , 3 , 5 และ 6 มิลลิลิตร ตามลำดับ แล้วเจือจางด้วย 0.1 นอร์มอล ของกรดไฮโดรคลอริค ปรับปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร

4.1.4.4 นำสารละลายฮีสตามีน C ไปวิเคราะห์หาปริมาณฮีสตามีนตามวิธีในข้อ 4.1.3

4.2 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค (Okada , 1978)

คัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของ *Tetragenococcus* sp. ทั้ง 2 สปีชีส์ มาทำการวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค ดังนี้

4.2.1 การสกัดกรดแลคติค

4.2.1.1 เพาะเชื้อลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอส (ที่ไม่ใส่โซเดียมอะซิเทต) ปริมาตร 200 มิลลิลิตร ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน

4.2.1.2 นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็นที่ 7,000 รอบต่อนาที นำส่วนน้ำใสมาปรับพีเอชให้เท่ากับ 2.0 และเติมผงแอคติเวเทดคาร์บอน ลงไปให้มากพอเพื่อกำจัดเอ็นเอดี (NAD)

4.2.1.3 นำส่วนผสมที่ได้จากข้อ 4.2.1.2 ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วกรองผงแอคติเวเทดคาร์บอนออก

4.2.1.4 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 4.2.1.3 ไปทำให้แห้งโดยวิธีไลโอฟิลไลส์ แล้วหยด 1 นอร์มอล ของกรดไฮโดรคลอริค 1 หยด และเติมไดเอทิลอีเทอร์ ปริมาตร 40 มิลลิลิตร ปั่นผสมและเก็บไว้ค้างคืน

4.2.1.5 นำชั้นของไดเอทิลอีเทอร์ใส่ในหลอดทดลองและระเหยไดเอทิลอีเทอร์โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที

4.2.1.6 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง สารละลายนี้คือ สารละลายกรดแลคติค

4.2.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมแลคเทต

4.2.2.1 ไทเทรต 1 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดแลคติค (จากข้อ 4.2.1.6) ด้วย 0.01 นอร์มอล ของโซเดียมไฮโดรดรอกไซด์ โดยใช้ฟีนอฟทาลีนเป็นตัวบ่งชี้ คำนวณปริมาณกรดแลคติค

4.2.2.2 นำสารละลายจากข้อ 4.2.1.6 ที่มีกรดแลคติคประมาณ 8-12 มิลลิกรัม มาปรับพีเอชเป็น 7.5 ด้วย 0.01 นอร์มอล ของโซเดียมไฮโดรดรอกไซด์

4.2.2.3 เจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโซเดียมแลคเทต ที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ดี-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (D-lactate dehydrogenase , D-LDH) และเอนไซม์แอล-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (L-lactate dehydrogenase , L- LDH)

4.2.2.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมแลคเทต (DL-lactate) เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น

4.2.3 ปฏิกิริยาเอนไซม์

4.2.3.1 นำสารตั้งต้น (สารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน) คือสารละลายโซเดียมแลคเทต แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร รวม 3 หลอด

หลอดที่ 1 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเอ็นเอดี (ภาคผนวก ข. หมายเลข 25) ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เพื่อเป็นหลอดควบคุม

หลอดที่ 2 เติมทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.1 (ภาคผนวก ข. หมายเลข 26) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเอ็นเอดี ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ดี-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (100 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

หลอดที่ 3 เติมทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 (ภาคผนวก ข. หมายเลข 26) ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเอ็นเอดี ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์แอล-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (100 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

4.2.3.2 ปล่อยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเอ็นเอดีเอชที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ด้วยเครื่องสเปคโทรโฟโทรมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

4.2.3.3 หาค่าอัตราส่วน D/L ของกรดแลคติค โดยคำนวณจากค่าปฏิกิริยาของกรดแลคติคกับเอนไซม์ดี-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และ กรดแลคติคกับเอนไซม์แอล-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส อัตราส่วนระหว่าง D/L ของกรดแลคติคที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เรียกว่า S_R (sample ratio) และอัตราส่วนระหว่าง D/L ของกรดแลคติคมาตรฐาน (DL-แลคเทต) เรียกว่า B_R (basic ratio) นำค่าต่าง ๆ ที่ได้จากปฏิกริยาของเอนไซม์มาแทนค่าในสูตร

$$[E] = 1 - S_R / B_R$$

การตัดสินว่ากรดแลคติคที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเป็นไอโซเมอร์ใดทำตามข้อกำหนดดังนี้ (Kozaki , 1992)

+1.00	≥ [E]	≥ +0.92	: L	L	
+0.92	≥ [E]	≥ +0.54	: L+DL		
+0.54	> [E]	≥ +0.05	: DL + L	DL	
+0.05	> [E]	≥ -0.15	: DL		
-0.15	≥ [E]	> -1.00	: DL+D		
-1.00	≥ [E]	> -16.00	: D+DL	D	
-16.00	≥ [E]		: D		

4.3 <u>การศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์</u> (Ikemoto , และคณะ 1978 ; Tanasupawat และคณะ , 1992)

คัดเลือกแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของ *Tetragenococcus* sp. 2 สปีชีส์ นำมาศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์ ดังนี้

4.3.1 นำเซลล์แห้ง (lyophilized cells) 40 มิลลิกรัม นำมาไฮโดรไลส์ด้วยสารละลายเมธานอลิคไฮโดรคลอริค 5 เปอร์เซนต์ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

4.3.2 เติมน้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร และสกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์ ปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น 3,000 รอบต่อนาที นำชั้นปิโตรเลียมอีเทอร์มาใส่ในหลอดทดลองใหม่ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

4.3.3 เติมน้ำกลั่นปริมาตรประมาณ 1ใน 3 ส่วนของปริมาตรของปิโตรเลียมอีเทอร์

4.3.4 ใส่ผงโซเดียมซัลเฟต 0.5 กรัม ลงในปิโตรเลียมอีเทอร์เพื่อกำจัดน้ำที่เหลือออก เป็นเวลา 1-3 ชั่วโมง

4.3.5 นำสารละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ ไปทำระเหยด้วยเครื่องทำระเหยแบบหมุนจนเหลือปริมาตร 1 มิลลิลิตร

4.3.6 เป่าสารละลายปิโตรเลียมอีเทอร์ด้วยไนโตรเจนเหลว จนแห้งในหลอดทดลอง

4.3.7 นำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทรกราฟี

5. การปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมสำหรับ *Tetragenococcus* sp.

5.1 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

ศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Tetragenococcus* sp. ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ *T. halophilus* ATCC 33315^{T} และสายพันธุ์ตัวแทน P7-23 และ *T. muriaticus* JCM 10006^{T} และสายพันธุ์ตัวแทน K5-37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว 3 ชนิด คือ เอ็มอาร์เอส (ภาคผนวก ก หมายเลข 1) พีเอที (ภาคผนวก ก. หมายเลข 14) และ ทีวายเอ็ม (ภาคผนวก ก. หมายเลข 15) ซึ่งมีองค์ประกอบของอาหารแต่ละชนิด (ตารางที่ 8) โดยแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซนต์ ควบคุมปริมาณเชื้อตั้งต้นให้มีค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เท่ากับ 1.0 ใส่เชื้อตั้งต้นดังกล่าวลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เปอร์เซนต์ จากนั้นวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารแต่ละชนิดเพื่อนำไปศึกษาการปรับสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อไป

5.2 การปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็มอาร์เอส

ศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *Tetragenococcus* sp. ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ *T. halophilus* ATCC.33315^{T} และสายพันธุ์ P7-23 และ *T. muriaticus* JCM 10006^{T} และสายพันธุ์ K5-37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอส รวมทั้งหมด 6 สูตร คือ อาหารเอ็มอาร์เอส (MRS) อาหารเอ็มอาร์เอสที่ลดส่วนประกอบลงครึ่งหนึ่ง (MRS/2) อาหารเอ็มอาร์เอสที่ลดแหล่งคาร์บอนเหลือ 1 เปอร์เซนต์ (MRS-C1) อาหารเอ็มอาร์เอสที่ลดแหล่งคาร์บอนเหลือ 0.5 เปอร์เซนต์ (MRS-C2) อาหารเอ็มอาร์เอสที่ลดแหล่งไนโตรเจน (MRS-N) และอาหารเอ็มอาร์เอสที่ลดทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน (MRS-C-N) ดังแสดงในตารางที่ 9 โดยแปรความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 5 เปอร์เซนต์ สำหรับ *T. halophilus* และ 10 เปอร์เซนต์ สำหรับ *T. muriaticus* วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน และเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตร

ตารางที่ 8 องค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อ

ส่วนประกอบ (%)	เอ็มอาร์เอส (MRS)	พีเอที (PAT)	ทีวายเอ็ม (TYM)
เปปโทน	1	1	-
ทริปโทน	-	-	0.1
ผงสกัดจากเนื้อ	1	-	-
ผงสกัดจากยีสต์	0.1	0.3	0.1
กลูโคส	2	1	-
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจน-ออร์โทฟอสเฟต	0.2	0.5	-
ทวีน 80	0.1	-	-
โซเดียมอะซิเทตไทรไฮเดรต	0.5	0.33	-
ไดแอมโมเนียมซิเทรตไดเบสิค	0.2	-	-
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	-	0.63
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	-	-
ไทโอไกลโคเลต	-	0.1	-
แมกนีเซียมคลอไรด์	-	-	0.46
แคลเซียมคลอไรด์	-	-	0.12
โพแทสเซียมคลอไรด์	-	-	0.07
โซเดียมคาร์บอเนต	-	-	0.02

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 การปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส

ส่วนประกอบ (เปอร์เซนต์)	สูตรอาหาร					
	MRS	MRS/2	MRS-C 1	MRS-C 2	MRS-N	MRS-C-N
เปปโทน	1	**0.5**	1	1	**0.5**	**0.5**
ผงสกัดจากเนื้อ	1	**0.5**	1	1	**0.5**	**0.5**
ผงสกัดจากยีสต์	0.5	**0.25**	0.5	0.5	**0.25**	**0.25**
กลูโคส	2	**1**	**1**	**0.5**	2	**1**
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจน ออร์โทฟอสเฟต	0.2	**0.1**	0.2	0.2	0.2	0.2
ทวีน 80	0.1	**0.05**	0.1	0.1	0.1	0.1
โซเดียมอะซิเทตไทรไฮเดรต	0.5	**0.25**	0.5	0.5	0.5	0.5
ไดแอมโมเนียมซิเทรตไดเบสิค	0.2	**0.1**	0.2	0.2	0.2	0.2
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2	**0.1**	0.05	0.05	0.05	0.05
แมงกานีสซัลเฟต	0.05	**0.025**	0.02	0.02	0.02	0.02

6. การทำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของ *Tetragenococcus* sp.

คัดเลือกเชื้อ *Tetragenococcus* sp. 3 สายพันธุ์ คือ *T. halophilus* สายพันธุ์ PM-8 *T. muriaticus* สายพันธุ์ K1-35 และ สายพันธุ์ K5-37 ที่มีความเหมาะสมโดยพิจารณาจากความสามารถในการย่อยเคซีน และหมักน้ำตาลได้หลายชนิด นำเชื้อที่คัดเลือกแล้วมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อปลาป่น (ภาคผนวก ก. หมายเลข 16) และปลาป่นผสมรำข้าว (ภาคผนวก ก. หมายเลข 17) ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ โดยใส่เชื้อตั้งต้นลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เปอร์เซนต์ และนับจำนวนแบคทีเรีย *Tetragenococcus* sp. ทั้งหมดทันที โดยวิธี pour plate จึงนำหัวเชื้อตั้งต้น

ไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน แล้วจึงนับจำนวนแบคทีเรีย *Tetragenococcus* sp. ทั้งหมดอีกครั้งหนึ่ง หลังจากนั้นแบ่งหัวเชื้อเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 นำไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) และส่วนที่ 2 เป็นหัวเชื้อที่ไม่ทำแห้ง เปรียบเทียบจำนวนแบคทีเรีย *Tetragenococcus* sp. ทั้งหมดที่รอดชีวิตหลังจากเก็บหัวเชื้อทั้ง 2 ส่วนนี้ไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2 เดือน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลอง

1. ผลการแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในระยะต่าง ๆ ของกระบวนการหมักน้ำปลา และการศึกษาสมบัติบางประการของน้ำปลา

1.1 ผลการเก็บตัวอย่างน้ำปลา การแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม และการนับจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมด

เก็บตัวอย่างน้ำปลาจากโรงงาน A B และ C รวม 28 , 26 และ 26 ตัวอย่าง ตามลำดับ รวมตัวอย่างน้ำปลาทั้งหมด 80 ตัวอย่าง ในการเก็บจะเก็บจากบ่อหมักตั้งแต่เริ่มต้นการหมัก คือ ปลาที่คลุกเกลือแล้วเตรียมบรรจุลงบ่อหมัก ซึ่งจะมีลักษณะเป็นตัวปลาผสมกับน้ำคาวปลาสีขาวขุ่น ตัวอย่างน้ำปลาในระยะแรกของการหมัก (1-4 เดือน) จะมีลักษณะเป็นตัวปลาผสมกับเกลือและมีน้ำคาวปลาเล็กน้อยในบริเวณผิวบ่อ ส่วนบริเวณก้นบ่อจะมีลักษณะเป็นของเหลวขุ่นตัวอย่างน้ำปลา ในระยะกลางและระยะท้ายของการหมัก (5-18 เดือน) ที่บริเวณผิวบ่อมีลักษณะเป็นของเหลวสีน้ำตาลคล้ายน้ำปลา ส่วนบริเวณก้นบ่อตัวอย่างน้ำปลามีลักษณะเป็นสีน้ำตาลขุ่น มีเนื้อปลาชิ้นเล็ก ๆ ผสมอยู่ ดังตารางที่ 10

จากตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมักต่าง ๆ ที่เก็บมาได้ นำมาแยกและนับจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดโดยวิธี pour plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ พบว่าแบคทีเรียที่เจริญได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวแบ่งได้เป็น 3 ลักษณะดังนี้ กลุ่มแรกคือแบคทีเรียที่มีลักษณะเป็นเมือก กลุ่มที่ 2 คือ แบคทีเรียที่มีโคโลนีฝังอยู่ในอาหารวุ้นมีลักษณะเป็นแฉกคล้ายคาว และกลุ่มสุดท้ายเป็นแบคทีเรียที่มีโคโลนีเป็นทรงกลมฝังอยู่ในอาหารวุ้น ทำการนับจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมด

คัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม โดยคัดเลือกโคโลนีที่มีลักษณะกลมและมีสีขาวขุ่นฝังอยู่ในอาหารวุ้น และนำเชื้อมาเพิ่มจำนวนโดยเลี้ยงในอาหารเหลวเอ็มอาร์เอส ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ และแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยวิธี streak plate นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มาทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลสเพื่อแยกแบคทีเรียในกลุ่ม staphylococci ซึ่งสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ออกจากแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่ไม่สามารถสร้าง

เอนไซม์คาตาเลส ผลการคัดเลือก ได้แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มจากตัวอย่างน้ำปลาของโรงงาน A B และ C จำนวน 266 100 และ 23 สายพันธุ์ ตามลำดับ รวมทั้งสิ้น 389 สายพันธุ์ ซึ่งจะได้นำไปใช้ในการจัดกลุ่มต่อไป

ตารางที่ 10 ลักษณะของตัวอย่างน้ำปลาของโรงงาน A B และ C

เดือน	โรงงาน A		โรงงาน B		โรงงาน C	
	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ
0	ขุ่นขาว		ขุ่นขาว		เหลือง,ขุ่น	แดง,ขุ่น
1	ขุ่นขาว	ขุ่นขาว	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	เหลือง,ใส	เหลือง,ขุ่น
2	ขุ่นขาว	ขุ่นขาว	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	เหลือง,ใส	เหลือง,ขุ่น
3	ขุ่นขาว	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	เหลือง,อ่อน	เหลือง,ขุ่น
4	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	เหลือง,อ่อน	เหลือง,ขุ่น
5	น้ำตาล	น้ำตาล,ขุ่น	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	เขียว,อ่อน	เหลือง,ขุ่น
6	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	เหลือง,เข้ม	น้ำตาล
7	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล,ขุ่น
8	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล,ขุ่น
9	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล,ขุ่น
10	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล,ขุ่น
11	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล,ขุ่น
12	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล	น้ำตาล,ขุ่น
18	น้ำตาล	น้ำตาล,ส้ม	-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.2 ผลการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในระยะต่าง ๆ ของกระบวนการหมักน้ำปลา

ปริมาณแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในตัวอย่างน้ำปลาจากโรงงานA B และ C ทั้งบริเวณผิวบ่อและก้นบ่อตั้งแต่ 0-18 เดือน (ตารางที่ 11) พบว่า โรงงาน A มีปริมาณแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดมากที่สุดที่บริเวณผิวของบ่อหมัก โดยในระยะ 1 เดือนมีแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดที่บริเวณผิวบ่อเท่ากับ 8.25×10^5 CFU/ml โรงงาน B พบปริมาณแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดมากที่สุดที่บริเวณผิวบ่อในระยะการหมัก 3 เดือน โดยจะมีปริมาณแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมด 2.40×10^4 CFU/ml โรงงาน C พบปริมาณแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดมากที่สุดที่บริเวณก้นบ่อจำนวน 9.9×10^4 CFU/ml ในตัวอย่างน้ำปลาที่เริ่มกระบวนการหมัก (0 เดือน) ดังแสดงในรูปที่ 5

1.3 ผลการศึกษาสมบัติบางประการของน้ำปลา

1.3.1 พีเอช (pH)

จากการวัดพีเอชของตัวอย่างน้ำปลาจากโรงงาน A B และ C ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่าพีเอชของน้ำปลามีค่าอยู่ระหว่าง 4.99 - 6.31 , 5.06 -5.69 และ 4.78 - 6.30 ตามลำดับ (ภาคผนวก ค.) ดังแสดงรูปที่ 6

1.3.2 ปริมาณกรดแลคติค

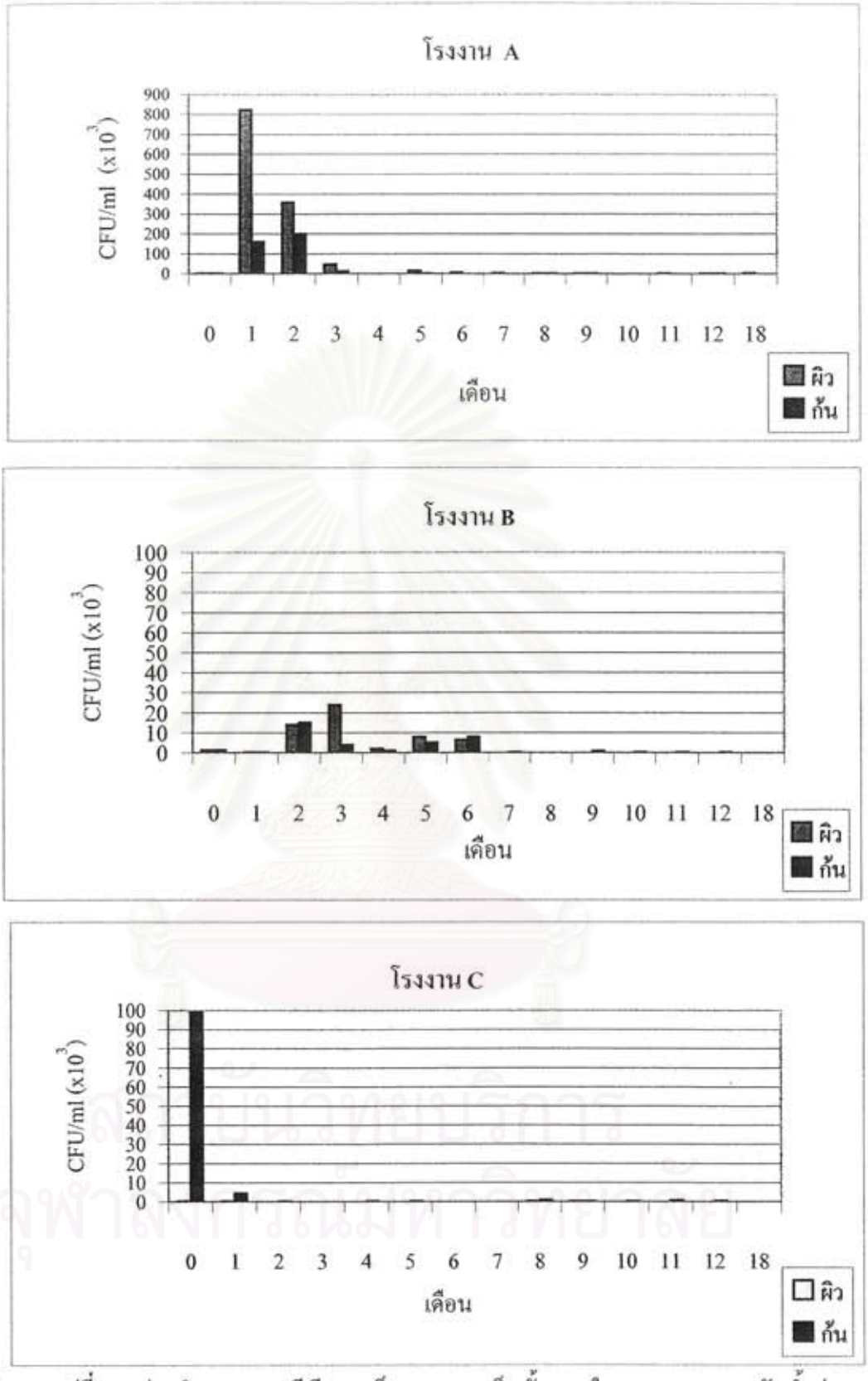
จากการศึกษาปริมาณกรดแลคติค (%) ของตัวอย่างน้ำปลาจากโรงงาน A B และ C ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่าโรงงาน A มีปริมาณกรดแลคติคที่บริเวณผิวบ่อและก้นบ่อ อยู่ระหว่าง 0.76-2.31 เปอร์เซนต์ และ 0.85-2.92 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ โรงงาน B และ C มีปริมาณกรดแลคติคที่บริเวณผิวบ่อและก้นบ่อ 0.90-3.00 , 0.90-3.70 และ 0.20-2.47 , 0.74-3.74 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ค.) ดังแสดงรูปที่ 7

1.3.3 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์

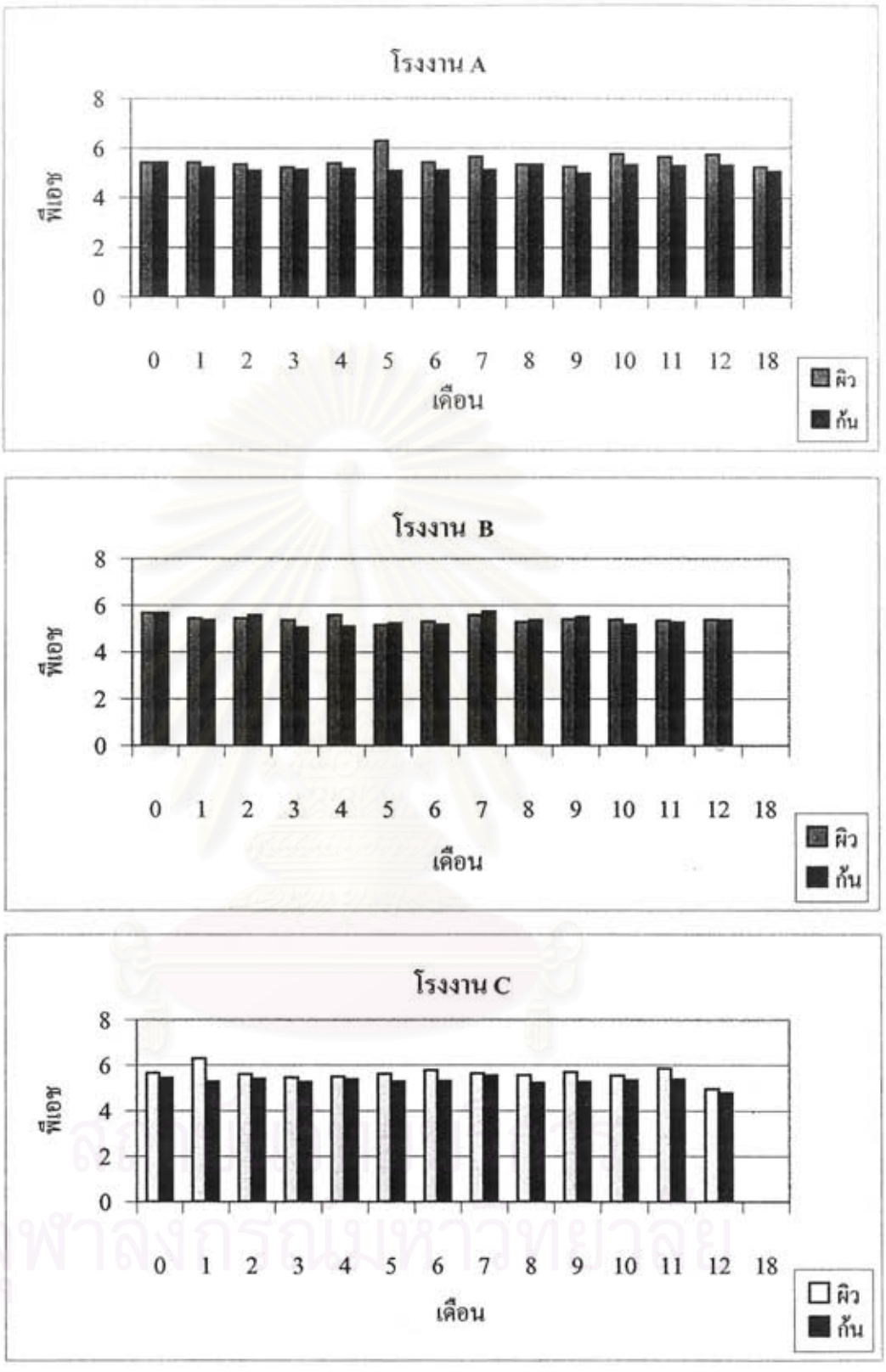
จากการวัดปริมาณโซเดียมคลอไรด์ ของตัวอย่างน้ำปลาจากโรงงาน A B และ C ตั้งแต่เริ่มต้นจนกระทั่งสิ้นสุดกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่าแต่ละโรงงานมีปริมาณโซเดียมคลอไรด์อยู่ระหว่าง 18.25-23.62 , 19.25-31.00 และ 22.00-32.50 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ (ภาคผนวก ค.) ดังแสดงรูปที่ 8

ตารางที่ 11 ปริมาณแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มในตัวอย่างน้ำปลา ของโรงงาน A B และ C

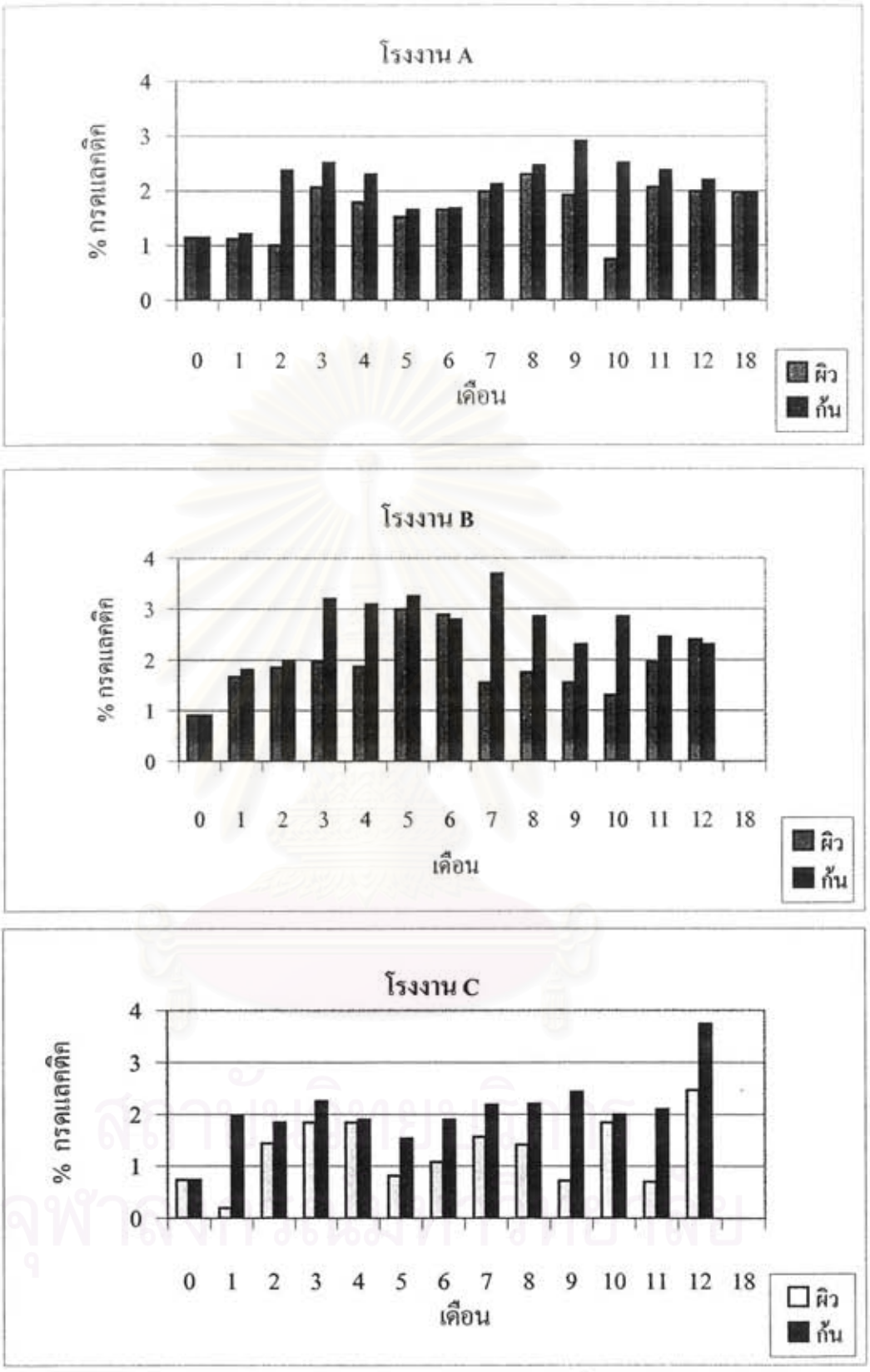
เดือน	โรงงาน A (CFU/ml)		โรงงาน B (CFU/ml)		โรงงาน C (CFU/ml)	
	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ
0	$1.41x10^3$	$1.41 x10^3$	$1.30 x10^3$	$1.3 0x10^3$	$2.80 x10^2$	$9.90 x10^4$
1	$8.25x10^5$	$1.61 x10^5$	$3.00 x10^2$	$2.10 x10^2$	$2.60 x10^2$	$4.50 x10^3$
2	$3.58 x10^5$	$2.00 x10^5$	$1.40 x10^4$	$1.50 x10^4$	7.40 x10	$2.90 x10^2$
3	$4.75x10^4$	$1.4 x10^3$	$2.40 x10^4$	$4.00 x10^2$	0.40 x10	1.30 x10
4	$2.80x10^2$	$1.36 x10^2$	$2 .00x10^3$	$1.20 x10^3$	0.90 x10	$2.30 x10^2$
5	$1.54 x10^4$	$1.47 x10^3$	$4.00 x10^3$	$5.00 x10^2$	0.13 x10	$3.25 x10^2$
6	$7.05 x10^3$	$1.70 x10^2$	$6.5 x10^3$	$8.00 x10^3$	0.28 x10	1.30 x10
7	$5.3 x10^3$	$2.60 x10^1$	$6.70 x10^0$	$2.10 x10^2$	0.20 x10	0
8	$2.35 x10^3$	$1.16 x10^3$	0	0	2.80 x10	$1.00 x10^3$
9	$2.52 x10^3$	$2.82 x10^3$	0	$7.80 x10^2$	$3.00 x10^2$	$1.20 x10^2$
10	$8.02 x10^2$	$1.30 x10^2$	0	$2.50 x10^2$	$1.10 x10^2$	2.4 x10
11	$1.31 x10^3$	$2.03 x10^2$	0	$3.30 x10^2$	3.42 x10	$7.90 x10^2$
12	$1.85x10^3$	$1.14 x10^3$	0	$1.35 x10^2$	4.00 x10	$5.00 x10^2$
18	$3.55 x10^3$	$6.50x10^0$	-	-	-	-



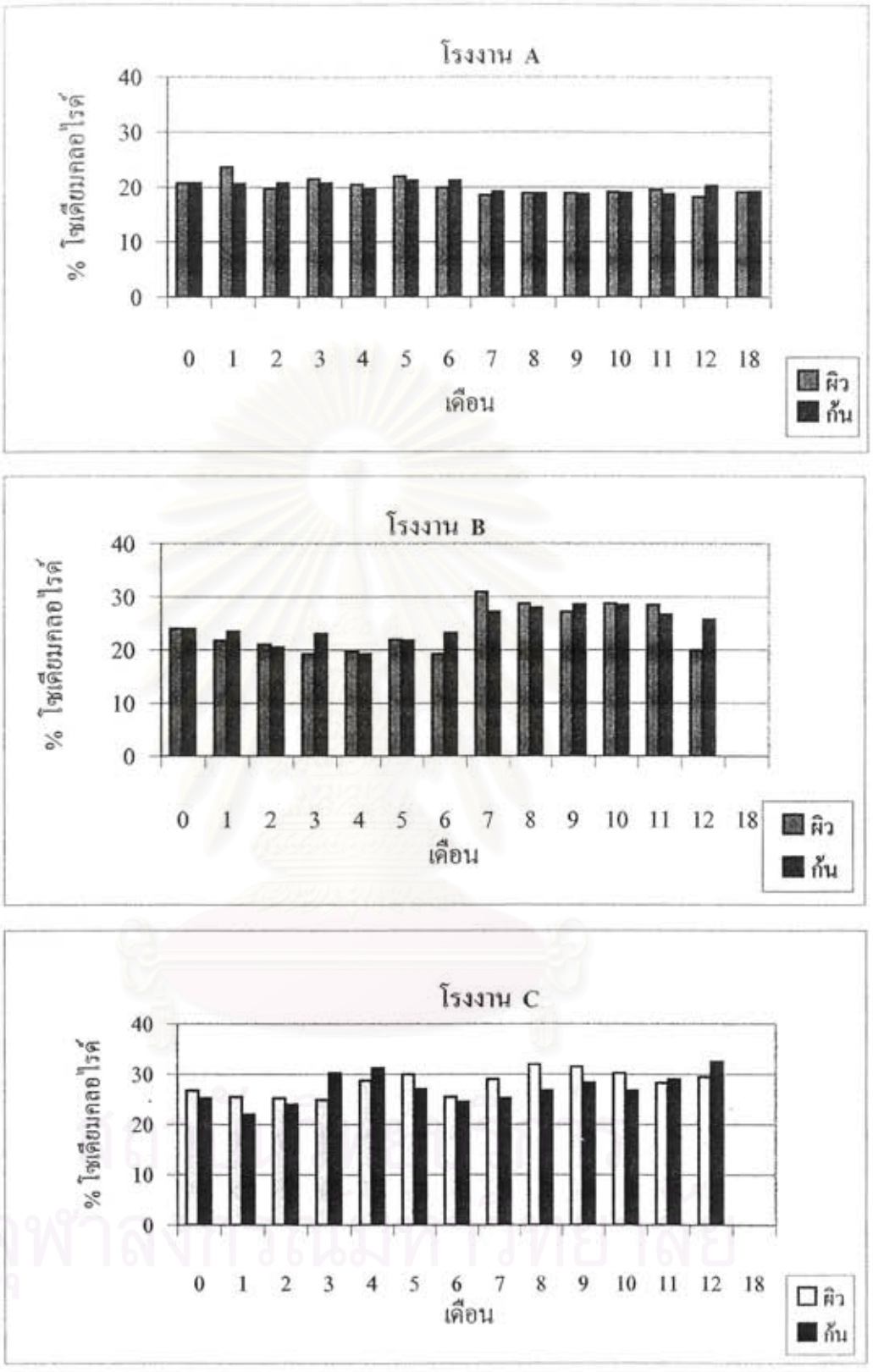
รูปที่ 5 การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในกระบวนการหมักน้ำปลา ของโรงงาน A B และC



รูปที่ 6 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในกระบวนการหมักน้ำปลาของโรงงาน A B และ C



รูปที่ 7 การเปลี่ยนแปลงปริมาณกรดแลคติคในกระบวนการหมักน้ำปลาของโรงงาน A B และ C



รูปที่ 8 การเปลี่ยนแปลงปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในกระบวนการหมักน้ำปลาของโรงงาน A B และ C

2. ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของ *Tetragenococcus* sp. โดยอาศัยหลักฟีโนไทป์

2.1 ผลการจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้

จากกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้ซึ่งไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส (398 สายพันธุ์ จากโรงงาน A B และ C 266 100 และ 23 สายพันธุ์) นำมาทดสอบการรีดิวส์ไนเทรต และการหมักน้ำตาลแมลซิโทส อะราบิโนส มอลโทส กาแลคโทส ไซโลส และ ไรโบส พบว่าทุกสายพันธุ์ที่แยกได้ไม่สามารถรีดิวส์ไนเทรต และมีรูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากโรงงาน A B และ C เป็น 20 16 และ 3 แบบ ตามลำดับ (ภาคผนวก ค.) นอกจากนี้ยังพบว่าความสามารถในการหมักน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 12 13 และ 14

2.2 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม โดยอาศัยหลักการทางฟีโนไทป์

ทำการคัดเลือกเชื้อตัวแทนของแบคทีเรียกรดแลคติคที่มีรูปแบบการหมักน้ำตาลแตกต่างกัน จำนวน 104 47 และ 23 สายพันธุ์ ของโรงงาน A B และ C ตามลำดับ รวมทั้งหมด 174 สายพันธุ์ นำมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ ชีวเคมี และสรีรวิทยา เพื่อเป็นการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรีย พบว่าทุกสายพันธุ์มีลักษณะเซลล์กลม เรียงตัวเป็นสี่เซลล์ จากการศึกษาลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบแสง และกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (รูปที่ 9) แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มทุกสายพันธุ์ สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีฮีมาทิน สร้างกรดตรวจสอบด้วยเมธิลเรด เป็นแบคทีเรียเฟอร์เมนท์เททีฟ เจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เจริญที่พีเอช 6.5 8.0 และ 9.0 และเจริญในปริมาณโซเดียมคลอไรด์ 10 และ 15 เปอร์เซนต์ ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ออกซิเดส ไม่ย่อยเจลาติน ไม่ย่อยไทรบิวไทรีน ไม่ย่อยแป้ง ไม่สร้างอะซีทิลเมธิลคาร์บินอล ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่พีเอช 4.2 และพบว่าบางสายพันธุ์สามารถย่อยอาร์จีนีน ย่อยเคซีน การหมักน้ำตาลได้หลายชนิด เจริญได้ที่พีเอช 5.0 และเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์ ดังแสดงผลสรุปผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียที่แยกได้จากโรงงาน A B และ C เทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *T. halophilus* ATCC 33315^T และ *T. muriaticus* JCM 10006^T ในตารางที่ 15 จากการศึกษาการ

พิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากน้ำปลานี้ สามารถจัดจำแนกเป็นแบคทีเรียสกุล *Tetragenococcus* ทั้งหมด 172 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะการจัดเรียงเซลล์เป็นสี่เซลล์ และสามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์ หรือมากกว่า และพบว่ามีเพียง 2 สายพันธุ์ ที่ไม่สามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์มากกว่า 15 เปอร์เซนต์

2.3 ผลการจัดกลุ่ม *Tetragenococcus* ที่จัดจำแนกได้ โดยลักษณะทางฟีโนไทป์และเลือกตัวแทนกลุ่ม

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยหลักการทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มทั้งหมด 174 สายพันธุ์ (จากข้อ 2.2) พบว่าลักษณะทางชีวเคมี คือ การย่อยอาร์จีนีนและย่อยเคซีน และลักษณะทางสรีรวิทยา คือการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์ ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานทั้ง 2 สปีชีส์ มีความแตกต่างกัน จึงทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ทั้ง 3 ดังกล่าวมาเป็นเกณฑ์ในการจัดกลุ่ม ซึ่งพบว่าสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม เป็น 6 กลุ่ม ดังตารางที่ 16 หลังจากนั้นทำการคัดเลือกตัวแทนของแต่ละกลุ่มเพื่อนำไปศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอต่อไป

ตารางที่ 12 รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม จากโรงงาน A

น้ำตาล	รูปแบบการหมักน้ำตาล																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
เมเลซิโทส	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
อะราบิโนส	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
มอลโทส	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-
กาแลคโทส	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	-	+
ไซโลส	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
ไรโบส	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
สายพันธุ์	67	46	6	3	5	23	1	1	10	1	2	2	47	17	3	3	1	22	1	5

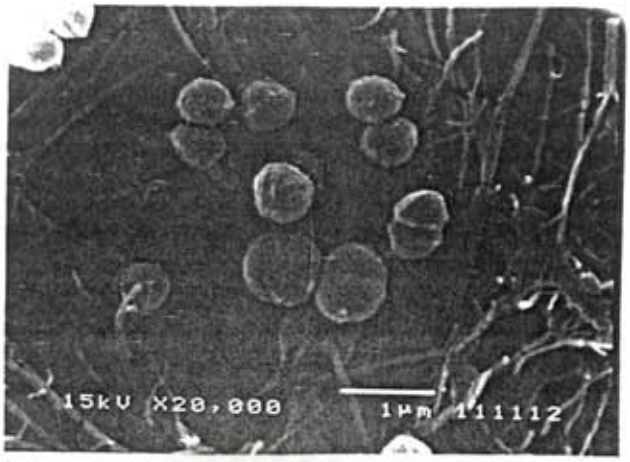
ตารางที่ 13 รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม จากโรงงาน B

น้ำตาล	รูปแบบการหมักน้ำตาล															
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
เมเลซิโทส	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
อะราบิโนส	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
มอลโทส	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	+	-
กาแลคโตส	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+
ไซโลส	+	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	+	-	+
ไรโบส	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
สายพันธุ์	55	9	12	5	1	1	1	2	1	1	2	4	1	3	1	1

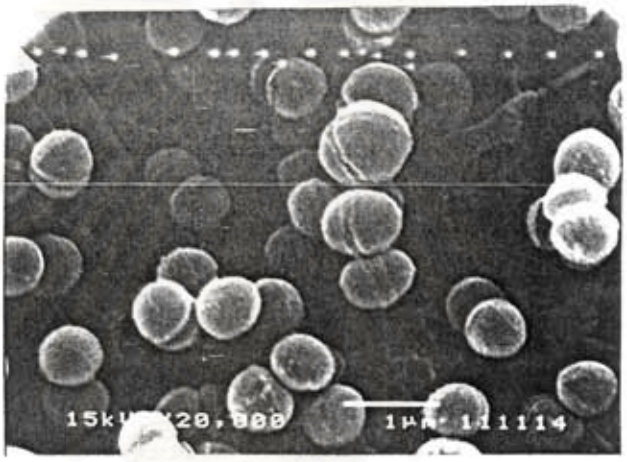
ตารางที่ 14 รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม จากโรงงาน C

น้ำตาล	รูปแบบการหมักน้ำตาล		
	1	2	3
เมเลซิโทส	+	-	-
อะราบิโนส	+	+	-
มอลโทส	+	+	-
กาแลคโทส	+	+	-
ไซโลส	+	+	-
ไรโบส	+	+	-
สายพันธุ์	19	3	1

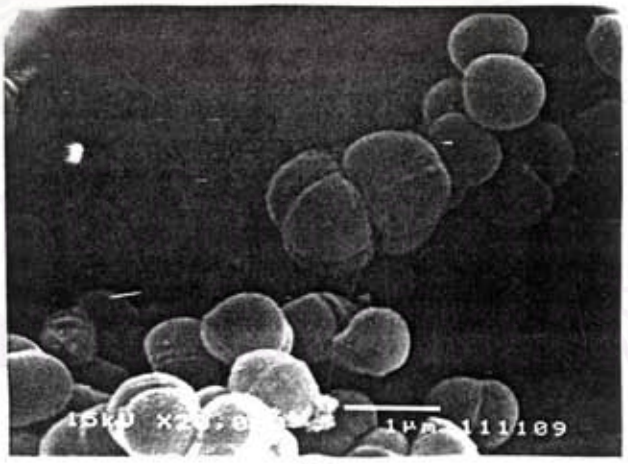
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



(a)



(b)



(c)

รูปที่ 9 ลักษณะเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนแบบส่องกราด (a) สายพันธุ์ PM-8 (b) สายพันธุ์ K3-26 (c) สายพันธุ์ CO-1

ตารางที่ 15 ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากโรงงาน A B และ C เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

คุณสมบัติ	*T. halophilus* ATCC 33315^T	*T. muriaticus* JCM 10006^T	โรงงาน A (104 สายพันธุ์)	โรงงานB (47สายพันธุ์)	โรงงานC (23 สายพันธุ์)
รูปร่างเซลล์	.....ทรงกลม.....				
ขนาดเซลล์ (μm)	.....0.6-1.0				
การจัดเรียงตัวของเซลล์	.....เซลล์เดี่ยว คู่ และสี่เซลล์.....				
ลักษณะโคโลนี	..... สีขาว ทรงกลม ขอบเรียบ โค้งนูน.....				
การสร้างเอนไซม์					
ออกซิเดส	-	-	-	-	-
การสร้างเอนไซม์					
คาตาเลสที่มีฮีมาทิน	+	+	+	+	+
ย่อยอาร์จีนีน	+	-	+(-10)*	+	+
ย่อยเคซีน	-	+	+(-40)	-(+20)**	-(+1)
ย่อยเจลาติน	-	-	-	-	-
ย่อยไทรบิวไทรีน	-	-	-	-	-
ย่อยแป้ง	-	-	-	-	-
การผลิตกรด (MR)	+	+	+	+	+
การผลิตอะซีธิลเมธิล-					
คาร์บินอล	-	-	-	-	-
ออกซิเดทีฟ-					
เฟอร์เมนท์เททีฟ	F	F	F	F	F
การสร้างก๊าซ H_2S	-	-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 (ต่อ) ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากโรงงาน A B และ C เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

คุณสมบัติ	*T. halophilus* ATCC 33315^T	*T. muriaticus* JCM 10006^T	โรงงาน A (104 สายพันธุ์)	โรงงานB (47สายพันธุ์)	โรงงานC (23 สายพันธุ์)
การหมักน้ำตาล ;					
อะมิกดาลิน	+	+	+(-25)	+(-1)	+(-1)
แอล-อะราบิโนส	-	+	+(-35)	+(-14)	+(-1)
ดี-เซลลิไบโอส	+	-	+(-10)	+(-15)	+(-1)
เดกซทริน	-	+	+(-41)	+(-23)	+(-5)
เอสคูลิน	+	+	+(-15)	+(-6)	+
ดี-ฟรุกโทส	+	+	+(-1)	+	+
ดี-กาแลคโทส	+	+	+(-26)	+(-9)	+
กลีเซอรอล	+	-	+(-51)	-(+21)	+(-5)
แลคโทส	-	-	-(+16)	-(+10)	+(-6)
มอลโทส	+	+	+(-41)	+(11)	+
ดี-แมนนิทอล	-	+	+(-24)	+(-13)	+(-5)
ดี-แมนโนส	+	+	+(-6)	+	+
ดี-เมลิไบโอส	-	+	+(-41)	+(-23)	+(-5)
ดี-เมเลซิโทส	+	-	-(26)	-(+14)	+(-4)
แอลฟา-เมธิล กลูโคซายด์	+	+	-(+40)	+(-21)	+(-3)
แอล-ราฟฟิโนส	-	-	-(+9)	-(+4)	+(-7)
แอล-แรมโนส	-	+	-(+17)	-(+13)	+(-6)
ไรโบส	+	+	+(-2)	+(-2)	+
ซาลิซิน	+	+	+(-12)	+(-7)	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 15 (ต่อ) ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากโรงงาน A B และ C เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

คุณสมบัติ	*T. halophilus* ATCC 33315^T	*T. muriaticus* JCM 10006^T	โรงงาน A (104 สายพันธุ์)	โรงงานB (47สายพันธุ์)	โรงงานC (23 สายพันธุ์)
ดี-ซอลบิทอล	-	+	+(-44)	+(-16)	+
ซอรโบส	+	+	+(-46)	+(-16)	+(-4)
ซูโครส	+	-	-(+33)	-(+21)	+(-3)
ดี-ทรีฮาโลส	+	+	+(-39)	+(-20)	+(-1)
ดี-ไซโลส	+	+	+(-25)	+(-9)	+(-1)
การเจริญที่อุณหภูมิ					
40 องศาเซลเซียส	-	+	+	+	+
50 องศาเซลเซียส	-	-	-	-	-
การเจริญที่พีเอช					
4.2	-	-	-	-	-
5.0	+	+	+(-47)	+(-17)	+(-1)
6.5	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+
การเจริญในโซเดียมคลอไรด์					
0 %	+	-	-(+31)	+(-20)	+(-1)
10 %	+	+	+	+	+
15 %	+	+	+	+	+
20 %	+	+	+	+	+(-2)
25%	+	+	+	+	+(-2)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

+ , ให้ผลการทดสอบเป็นบวก

- , ให้ผลการทดสอบเป็นลบ

* , แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม 104 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากโรงงาน A ให้ผลการย่อยอาร์จีนีนเป็นบวก ยกเว้น 10 สายพันธุ์ที่ให้ผลการย่อยอาร์จีนีนเป็นลบ

** , แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม 47 สายพันธุ์ ที่แยกได้จากโรงงาน B ให้ผลการย่อยเคซีนเป็นลบ ยกเว้น 20 สายพันธุ์ให้ผลการย่อยเคซีนเป็นบวก

F , เฟอร์เมนท์เททีฟ

ตารางที่ 16 การจัดกลุ่มโดยใช้ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันบางอย่างของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากน้ำปลาเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

กลุ่มที่	คุณสมบัติ			จำนวนแบคทีเรียทั้งหมด	จำนวนแบคทีเรียตัวแทน
	ย่อยอาร์จีนีน	ย่อยเคซีน	เจริญได้ใน 0% NaCl		
T. halophilus ATCC 33315^T	+	-	+	-	-
T. muriaticus JCM 10006^T	-	+	-	-	-
1	+	+	+	9	6
2	+	+	-	68	24
3	+	-	-	16	7
4	+	-	+	71	36
5	-	+	-	8	6
6	-	-	-	2	1
รวม				174 สายพันธุ์	80 สายพันธุ์

3. ผลการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของ *Tetragenococcus* sp.

จากสายพันธุ์ที่เป็นตัวแทนของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ทั้ง 6 กลุ่ม (ข้อ 2.3) จำนวน 80 สายพันธุ์ นำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียจากการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นในไมโครเพลต โดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน ซึ่งใช้แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานเป็นดีเอ็นเออ้างอิง (*T. halophilus* ATCC 33315^T และ *T. muriaticus* JCM 10006^T) พบว่าสามารถจำแนกเป็นแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ 1 คือ *T. halophilus* ทั้งหมด 40 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 คือ *T. muriaticus* ทั้งหมด 38 สายพันธุ์ และกลุ่มที่ 3 คือ แบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ (CO-1 และ CO-2) ซึ่งไม่มีความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับแบคทีเรีย *T. halophilus* ATCC 33315^T และ *T. muriaticus* JCM 10006^T ดังแสดงในตารางที่ 17

ตารางที่ 17 ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ที่แยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

		ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%)		
ลำดับที่	สายพันธุ์	*T. halophilus* ATCC 33315^T	*T. muriaticus* JCM 10006^T	K3-26
กลุ่มที่ 1				
1	PM-8	94.59	27.16	16.81
2	PM-10	74.64	18.89	15.10
3	PW-7	73.04	17.06	29.39
4	PW-13	73.55	10.64	26.72
5	PB30-1	77.87	10.64	19.56
6	PB30-3	70.03	8.25	19.56
7	PS60-2	109.05	16.26	28.60
8	PS60-6	76.30	6.71	14.62

ตารางที่ 17 (ต่อ) ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ที่แยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

		ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%)		
ลำดับที่	สายพันธุ์	*T. halophilus* ATCC 33315 ^{T}	*T. muriaticus* JCM 10006 ^{T}	K3-26
9	PB60-2	79.61	11.96	20.64
10	P3-1	87.37	45.58	45.9
11	P3-2	80.52	46.28	43.75
12	P3-3	97.79	56.78	36.60
13	P3-4	81.60	40.20	37.38
14	P3-5	89.70	43.20	43.02
15	P7-2	92.40	64.78	42.26
16	P7-7	74.95	8.96	ND
17	P7-27	89.93	11.64	9.68
88	P7-26	83.19	29.06	ND
19	P7-23	80.53	18.70	5.88
20	K0-2	83.62	16.38	28.87
21	K2-32	85.02	24.72	22.44
22	K2-34	70.81	14.64	14.59
23	K2-44	78.56	18.79	43.84
24	K4-2	90.75	1.53	29.29
25	K4-16	76.89	18.92	31.99
26	K4-40	77.56	15.00	10.06
27	K4-47	99.46	ND	45.13
28	K5-51	91.33	51.43	51.75
29	K6-32	86.32	18.4	14.48

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 (ต่อ) ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ที่แยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

		ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%)		
ลำดับที่	สายพันธุ์	*T. halophilus* ATCC 33315 ^{T}	*T. muriaticus* JCM 10006 ^{T}	K3-26
30	K6-35	93.59	53.54	36.84
31	C1-1	74.57	12.58	29.55
32	C1-2	77.39	28.12	36.48
33	C1-5	89.48	4.65	8.89
34	C1-6	79.04	11.18	35.70
35	C1-8	87.93	16.52	28.58
36	C1-9	71.68	17.06	20.74
37	C1-12	79.11	29.49	39.21
38	C1-14	72.02	15.83	29.24
39	C1-17	86.49	27.13	29.24
40	C1-19	86.16	16.14	24.73
กลุ่มที่ 2				
41	PW-8	17.93	72.72	87.12
42	PW-15	31.28	91.39	83.57
43	P4-3	27.31	89.91	102.55
44	P4-5	58.56	92.87	86.47
45	P4-6	47.58	90.56	ND
46	P5-1	32.88	93.82	80.35
47	P5-2	63.55	103.33	100.43
48	P5-3	22.78	70.94	86.60

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 (ต่อ) ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ที่แยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

		ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%)		
ลำดับที่	สายพันธุ์	*T. halophilus* ATCC 33315 ^{T}	*T. muriaticus* JCM 10006 ^{T}	K3-26
49	P6-1	28.72	79.76	95.51
50	P6-3	11.76	94.41	94.20
51	P6-4	19.83	95.47	97.23
52	P7-18	10.53	99.63	96.53
53	P7-37	35.89	92.61	80.38
54	K1-10	27.87	73.20	85.16
55	K1-31	34.47	94.21	101.83
56	K1-35	42.4	93.51	94.36
57	K1-46	28.57	98.68	97.20
58	K2-9	36.06	92.25	107.45
59	K2-17	44.30	93.61	103.01
60	K2-29	56.20	87.61	88.33
62	K3-6	20.40	73.39	70.91
63	K3-26	24.91	89.46	100
64	K3-29	24.59	70.68	75.36
65	K3-40	27.49	93.20	74.96
65	K3-46	23.75	79.90	89.14
66	K5-37	35.51	93.91	94.98
57	K5-55	24.52	78.02	87.68
68	K6-29	26.66	76.92	100.40
69	K6-50	22.12	101.22	99.76

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 17 (ต่อ) ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ที่แยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

ลำดับที่	สายพันธุ์	ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%)		
		T. halophilus ATCC 33315 ^{T}	*T. muriaticus* JCM 10006 ^{T}	K3-26
70	K8-1	16.02	73.74	77.52
71	K8-5	27.48	85.81	103.73
72	K8-13	19.18	105.60	89.90
33	K9-1	23.17	103.69	87.15
74	K9-2	41.28	91.38	94.60
75	K18-1	23.67	82.61	99.37
76	K18-6	29.25	88.22	98.13
77	K18-12	8.80	71.15	71.53
78	C2-1	29.00	93.21	108.45
กลุ่มที่ 3				
79	C0-1	3.86	4.13	4.88
80	C0-2	3.69	3.81	3.98
81	*T. halophilus* ATCC 33315^{T}	100	16.71	24.05
82	*T. muriaticus* JCM 10006^{T}	25.99	100	106.62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. การศึกษาการวิเคราะห์ฮีสตามีน ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค และองค์ประกอบไขมันของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus*

4.1 ผลการวิเคราะห์ฮีสตามีนโดยวิธีฟลูออโรสเปคโทรมิเตอร์

ผลการวิเคราะห์ฮีสตามีนที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* สร้างขึ้น โดยวิธีฟลูออโรสเปคโทรเมทรี ทั้งหมด 38 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 คือ *T. halophilus* 13 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 คือ *T. muriaticus* 25 สายพันธุ์ และกลุ่มที่ 3 รวม 2 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสายพันธุ์มาตรฐาน (*T. halophilus* ATCC 33315^T และ *T. muriaticus* JCM 10006^T) (ตารางที่ 18)

4.2 ผลการวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค

ผลการวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติคที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ผลิตขึ้น โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีหรือแอล-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส ทั้งหมด 18 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 คือ *T. halophilus* 11 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 คือ *T. muriaticus* 6 สายพันธุ์ และกลุ่มที่ 3 รวม 1 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสายพันธุ์มาตรฐาน (*T. halophilus* ATCC 33315^T และ *T. muriaticus* JCM 10006^T) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากน้ำปลาทุกสายพันธุ์สามารถผลิตกรดแลคติคไอโซเมอร์แบบ L (ดังตารางที่ 19)

4.3 ผลการศึกษาองค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ด้วยเครื่องก๊าซโครมาโทรกราฟี ทั้งหมด 12 สายพันธุ์ โดยคัดเลือกตัวแทนของแบคทีเรียกลุ่มที่ 1 คือ *T. halophilus* 4 สายพันธุ์ กลุ่มที่ 2 คือ *T. muriaticus* 6 สายพันธุ์ และกลุ่มที่ 3 รวม 2 สายพันธุ์ เปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสายพันธุ์มาตรฐาน (*T. halophilus* ATCC 33315^T และ *T. muriaticus* JCM 10006^T) และแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานของสกุล *Aerococcus* คือ *A. viridans* TISTR 393^T พบว่า

แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากน้ำปลาทุกสายพันธุ์มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวชนิด C18:1 เป็นองค์ประกอบหลัก ดังแสดงในตารางที่ 20

ตารางที่ 18 ปริมาณฮีสตามีนที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มซึ่งแยกได้จากน้ำปลาสร้างขึ้น เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

	สายพันธุ์	ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัม / 100 มิลลิลตร)
กลุ่มที่ 1		
1	PM-8	0.416
2	PW-7	2.316
3	PM-10	0.048
4	PM-13	0.146
5	P7-23	0.698
6	P7-27	0.450
7	K2-34	0.190
8	K2-44	1.888
9	K4-2	3.464
10	K4-16	4.458
11	K4-40	0.100
12	K6-32	3.274
13	C1-6	0.124

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 (ต่อ) ปริมาณฮีสตามีนที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มซึ่งแยกได้จากน้ำปลาสร้างขึ้นเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

	สายพันธุ์	ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัม / 100 มิลลิลตร)
กลุ่มที่ 2		
14	PW-8	44.22
15	PW-15	13.11
16	P7-18	44.00
17	P7-37	0.196
18	K1-10	0.100
19	K1-31	29.27
20	K1-46	6.822
21	K1-35	1.144
22	K2-9	0.118
23	K2-29	29.16
24	K3-26	38.84
25	K3-6	52.29
26	K3-40	23.99
27	K3-46	30.52
28	K5-37	0.036
29	K5-55	26.65
30	K6-29	43.39
31	K8-1	17.79
32	K8-5	24.87
33	K8-13	8.37

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 18 (ต่อ) ปริมาณฮีสตามีนที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มซึ่งแยกได้จากน้ำปลาสร้างขึ้น เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

	สายพันธุ์	ปริมาณฮีสตามีน (มิลลิกรัม / 100 มิลลิลตร)
34	K9-1	32.39
35	K9-2	50.24
36	K18-1	17.79
37	K18-6	39.87
38	K18-12	15.29
กลุ่มที่ 3		
39	C0-1	42.81
40	C0-2	22.87
41	*T. halophilus* ATCC 33315 ^{T}	0.046
42	*T. muriaticus* JCM 10006^{T}	44.03

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 19 ไอโซเมอร์ของกรดแลคติคที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มซึ่งแยกได้จากน้ำปลาสร้างขึ้น เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

	OD_{340}		D/L		
สายพันธุ์	D-LDH	L-LDH	(S_R)	[E]	Type
PM-8	0.048	0.092	0.52	0.83	L+DL
PM-10	0.041	0.131	0.31	0.90	L+DL
P7-27	0.013	0.055	0.24	0.92	L
P7-25	0.031	0.119	0.26	0.91	L+DL
P7-23	0.033	0.110	0.26	0.90	L+DL
K4-2	0.017	0.072	0.24	0.92	L
K2-32	0.057	0.081	0.70	0.92	L
K5-51	0.074	0.158	0.47	0.84	L+DL
K6-35	0.042	0.119	0.35	0.88	L+DL
C1-5	0.039	0.127	0.31	0.90	L+DL
C1-14	0.015	0.079	0.19	0.94	L
PW-8	0.023	0.075	0.31	0.90	L+DL
P7-37	0.018	0.045	0.40	0.87	L+DL
K1-31	0.010	0.038	0.26	0.91	L+DL
K3-26	0.041	0.095	0.43	0.86	L+DL
P7-18	0.064	0.099	0.65	0.79	L+DL
C2-1	0.082	0.095	0.86	0.72	L+DL
C0-1	0.039	0.117	0.33	0.89	L+DL
T. halophilus					
ATCC 33315^T	0.049	0.090	0.54	0.82	L+DL
T. muriaticus					
JCM 10006^T	0.042	0.081	0.52	0.83	L+DL

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 20 องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มซึ่งแยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน

สายพันธุ์	C14:1	C14:0	C16:1	C16:0	C18:1	C18:0	Δ19	C20:1	% unknown (no.of peak)
PM-8	2.8	5.9	3.9	16.2	23.9	8.1	8.4	15.1	15.5(7)
P7-23	3.6	8.1	5.8	13.1	19.6	8.6	9.3	14.0	18.0(7)
K2-44	3.6	7.7	9.1	11.3	35.7	4.2	6.0	7.7	14.5(7)
K4-16	4.9	7.7	6.7	12.3	32.0	3.9	5.6	9.5	17.2(7)
P7-18	3.0	6.7	7.1	16.9	37.3	5.3	4.9	8.7	10.0(6)
K1-31	2.9	7.6	8.9	17.6	40.9	2.5	3.8	5.5	10.3(7)
K3-26	5.0	7.6	9.0	13.0	44.4	4.2	3.3	4.4	9.0(3)
K5-37	4.3	7.5	8.4	11.5	43.7	2.6	2.0	4.4	15.6(10)
K18-1	4.4	9.7	7.1	13.7	41.8	3.7	2.9	4.9	11.8(7)
C2-1	3.4	7.7	8.9	11.0	41.9	3.9	4.3	6.2	12.7(7)
T. halophilus									
ATCC 33315^T	2.5	5.1	2.5	12.9	10.9	10.6	12.6	20.5	22.3(6)
T. muriaticus									
JCM 10006^T	5.1	6.0	3.1	13.4	11.0	10.2	11.1	19.2	20.7(6)
A. viridans[a]	5.0	8.0	31.0	20.0	22.0	2.0	0	7.0	4.0
CO-1	4.1	17.9	4.7	15.8	40.6	1.9	-	2.5	12.4(5)
CO-2	3.8	17.0	6.5	13.9	37.2	0.8	-	2.4	18.4(9)

[a] , ข้อมูลจาก O' Leary และ Wikinson (1988)

Δ , Cyclopropane acid

5. ผลการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมสำหรับ *Tetragenococcus* sp.

5.1 ผลการศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการศึกษา คือ เอ็มอาร์เอส พีเอที และ ทีวายเอ็ม ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 และ 10 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ ศึกษาการเจริญของแบคทีเรียโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 4 ชั่วโมง เป็นเวลา 3 วัน พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรีย *Tetragenococcus* sp. ทั้ง 4 สายพันธุ์ คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส สำหรับแบคทีเรีย *T. halophilus* ATCC 33315^{T} และ สายพันธุ์ P7-23 ที่แยกได้จากน้ำปลา เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 10) และสำหรับแบคทีเรีย *T. muriaticus* JCM 10006^{T} และ สายพันธุ์ K5-37 เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 11)

5.2 ผลการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็มอาร์เอส

จากการศึกษาการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสให้เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* sp. ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ *T. halophilus* ATCC 33315^{T} และสายพันธุ์ตัวแทน P7-23 และ *T. muriaticus* JCM 10006^{T} และสายพันธุ์ตัวแทน K5-37 โดยทำการปรับปริมาณส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสไว้ดังนี้

MRS คือ อาหารเอ็มอาร์เอสปกติ

MRS/2 คืออาหารเอ็มอาร์เอสลดปริมาณส่วนประกอบทั้งหมดลงครึ่งหนึ่ง

MRS-C1 คืออาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่ลดปริมาณแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส ให้เหลือ 1 เปอร์เซนต์

MRS-C2 คืออาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่ลดปริมาณแหล่งคาร์บอน คือ กลูโคส ให้เหลือ 0.5 เปอร์เซนต์

MRS-N คืออาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่ลดปริมาณแหล่งไนโตรเจน คือ เปปโทน และผงสกัดจากเนื้อ ให้เหลือ 0.5 เปอร์เซนต์ และผงสกัดจากยีสต์ ให้เหลือ 0.25 เปอร์เซนต์

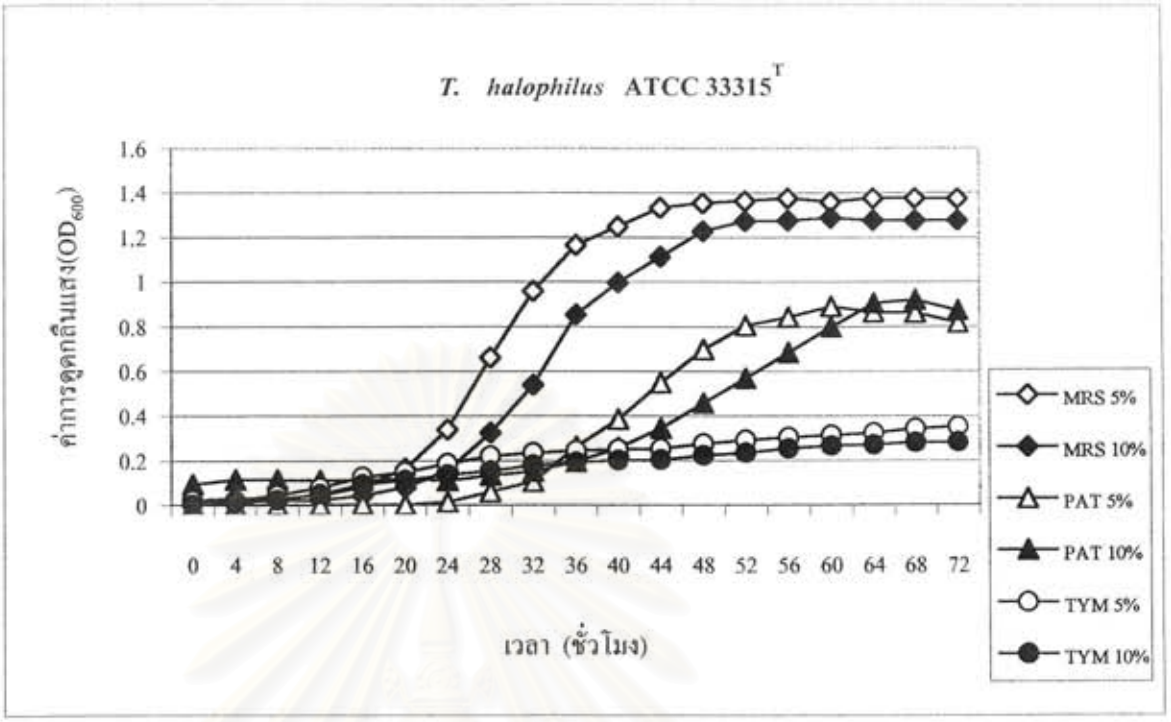
MRS-N-C คืออาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่ลดทั้งปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนลงครึ่งหนึ่ง

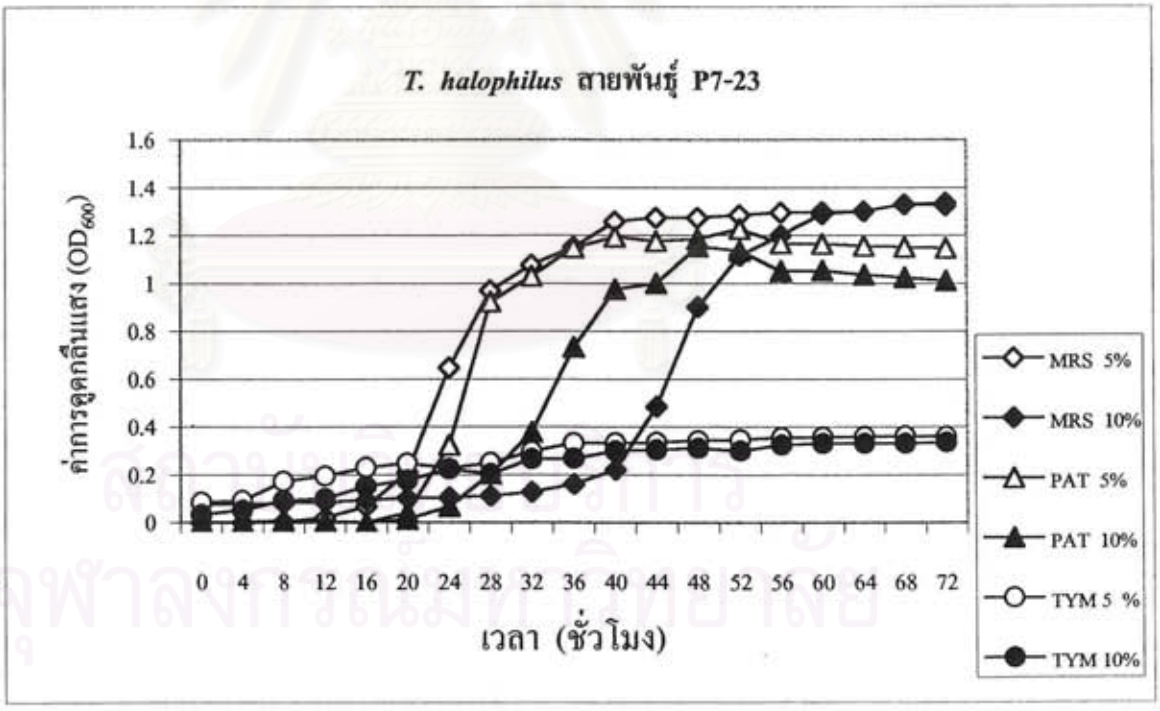
เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ สำหรับแบคทีเรีย *T. halophilus* และเติมโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ สำหรับแบคทีเรีย *T. muriaticus* โดยศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละสูตรอาหาร เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสสูตรปกติ จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร ทุก ๆ 4 ชั่วโมง จากการศึกษาการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส พบว่า แบคทีเรีย *T. halophilus* ATCC 33315 และสายพันธุ์ตัวแทน P7-23 และแบคทีเรีย *T. muriaticus* JCM 10006 และสายพันธุ์ K5-37 37 พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม 4 สายพันธุ์ เจริญได้ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสปรับสูตรที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 12 และ13)

6. ผลการทำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของ *Tetragenococcus* sp.

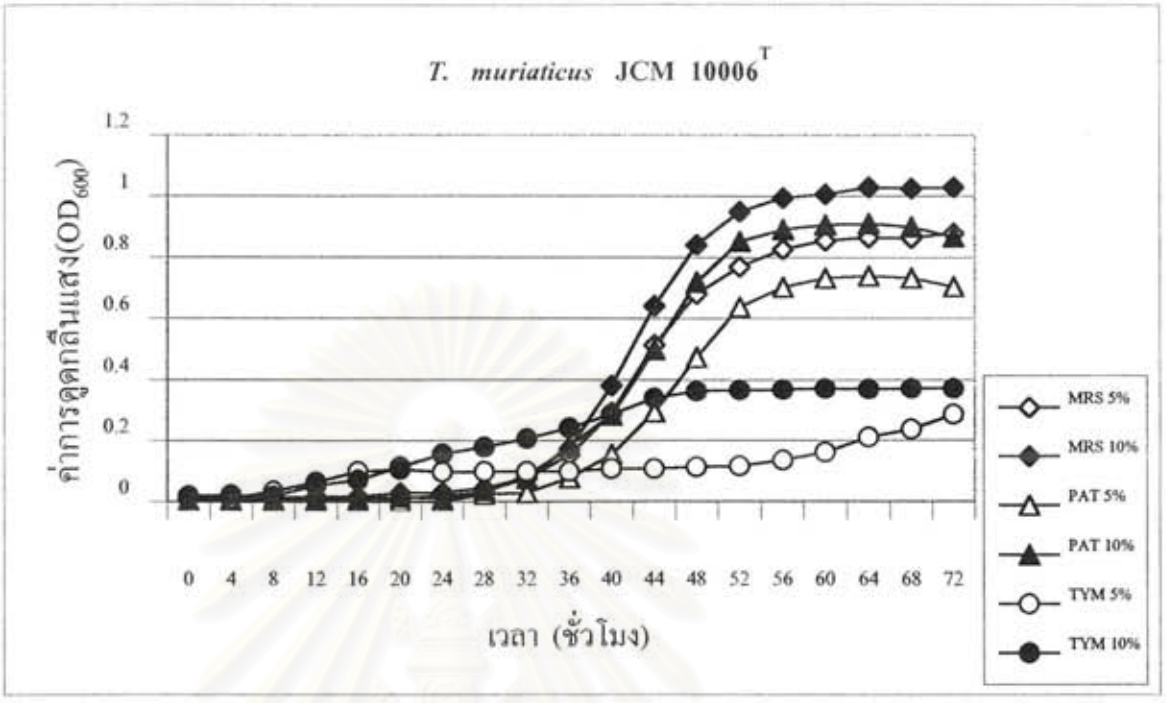
คัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมของ *Tetragenococcus* sp. ที่แยกได้จากน้ำปลา คือ สายพันธุ์ K1-35 K5-37 และ PM-8 มาศึกษาการทำหัวเชื้อบริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อปลาป่น และอาหารเลี้ยงเชื้อปลาป่นผสมรำข้าว ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ บ่มเชื้อให้เจริญในอาหารดังกล่าวแล้วจึงนำหัวเชื้อไปทำแห้งแบบเยือกแข็ง เปรียบเทียบกับหัวเชื้อที่ไม่ทำแห้ง โดยเก็บหัวเชื้อทั้ง 2 ชนิดนี้ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ ที่อุณหภูมิห้อง เปรียบเทียบการรอดชีวิตของเซลล์ในเวลา 2 เดือน พบว่าการทำหัวเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีไม่ทำแห้งและเก็บหัวเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย *Tetragenococcus* sp. มากที่สุด ในแบคทีเรียสายพันธุ์ K5-37 และสายพันธุ์ PM-8 สำหรับแบคทีเรียสายพันธุ์ K1-35 พบว่าการทำหัวเชื้อโดยวิธีทำแห้งและเก็บหัวเชื้อที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส มีเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรีย *Tetragenococcus* sp. มากที่สุด (ตารางที่ 21 , 22 และ 23)

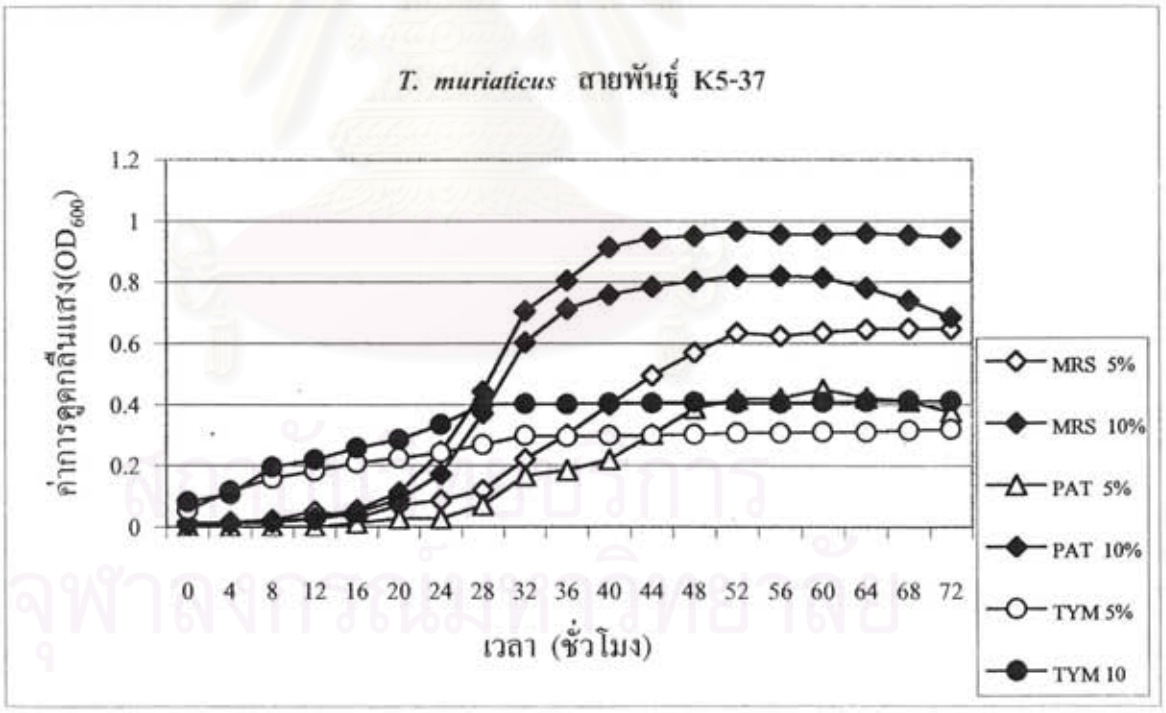
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



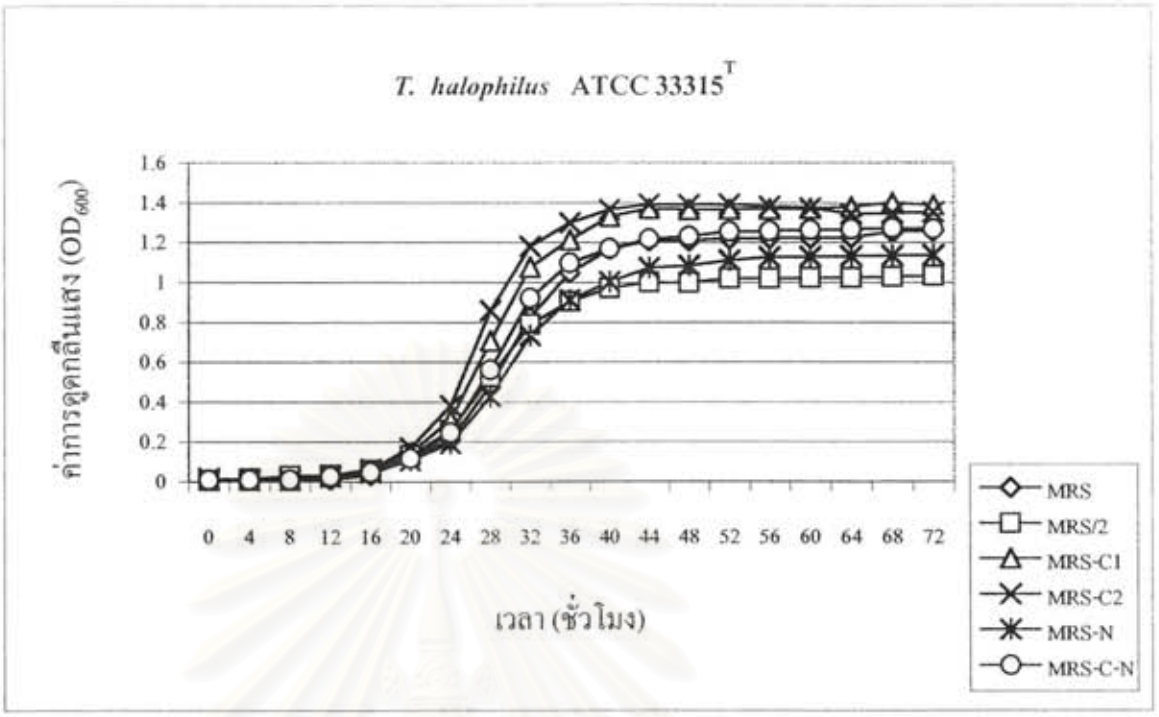


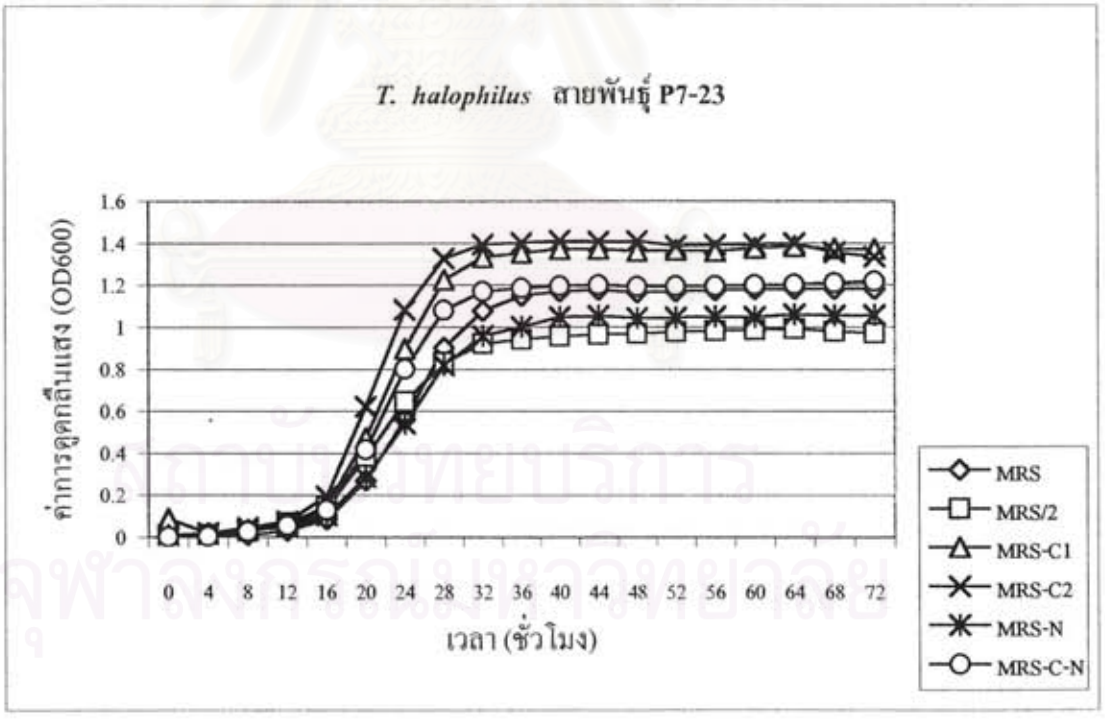
รูปที่ 10 การเจริญของ *T. halophilus* ATCC 33315^{T} และสายพันธุ์ P7-23 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ



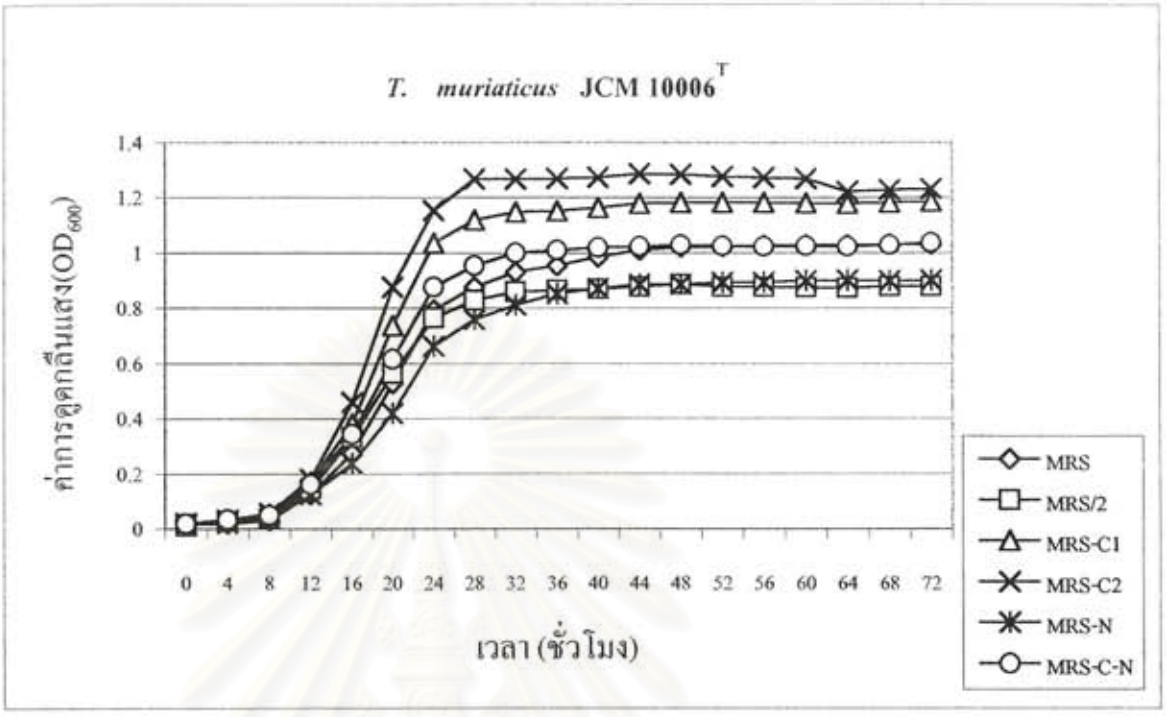


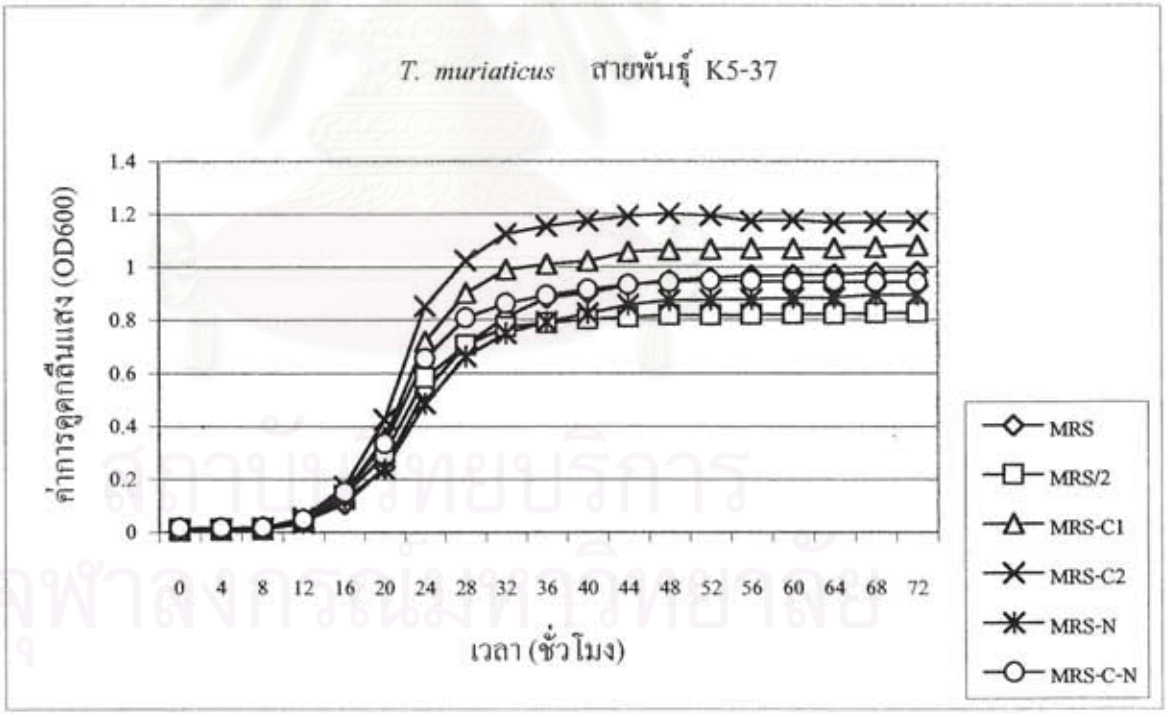
รูปที่ 11 การเจริญของ *T. muriaticus* JCM 10006^T และสายพันธุ์ K5-37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ





รูปที่ 12 การเจริญของ *T. halophilus* ATCC 33315 ^{T} และสายพันธุ์ P7-23 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่ปรับสูตร





รูปที่ 13 การเจริญของ *T. muriaticus* JCM 10006 T และสายพันธุ์ K5-37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่ปรับสูตร

ตารางที่ 21 การรอดชีวิตของแบคทีเรียสายพันธุ์ K1-35 เปรียบเทียบระหว่างการทำหัวเชื้อโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งและไม่ทำแห้ง

เวลา	ไม่ทำแห้ง				ทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง			
	ปลาป่น		ปลาป่น+รำข้าว		ปลาป่น		ปลาป่น+รำข้าว	
	เชื้อตั้งต้น ($x10^6$)		เชื้อตั้งต้น ($x10^7$)		เชื้อตั้งต้น ($x10^7$)		เชื้อตั้งต้น ($x10^6$)	
	อุณหภูมิห้อง	4 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C
0 วัน	$5.50x10^{10}$	$1.15x10^{10}$	$5.80x10^7$	$4.10x10^7$	$9.20x10^9$	$9.80x10^9$	$8.90x10^7$	$4.90x10^7$
7 วัน	$5.60x10^9$	$6.60x10^9$	$3.10x10^7$	$1.26x10^7$	$2.00x10^9$	$7.10x10^9$	$3.00x10^7$	$3.00x10^6$
14 วัน	$1.24x10^7$	$4.40x10^8$	$1.11x10^7$	$1.66x10^7$	$1.12x10^8$	$7.10x10^8$	$9.00x10^5$	$2.70x10^5$
21 วัน	$7.60x10^6$	$4.10x10^8$	$6.10x10^7$	$1.12x10^7$	$4.10x10^7$	$3.80x10^8$	$3.20x10^5$	$1.41x10^6$
28 วัน	$2.42x10^6$	$7.70x10^7$	$8.50x10^6$	$1.58x10^7$	$1.10x10^6$	$3.30x10^8$	$1.46x10^5$	$1.49x10^6$
60 วัน	$8.70x10^5$	$1.11x10^7$	$1.11x10^6$	$8.30x10^5$	$1.40x10^6$	$5.70x10^7$	0	$1.19x10^6$

ตารางที่ 22 การรอดชีวิตของแบคทีเรียสายพันธุ์ K5-37 เปรียบเทียบระหว่างการทำหัวเชื้อโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งและไม่ทำแห้ง

เวลา	ไม่ทำแห้ง				ทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง			
	ปลาป่น		ปลาป่น+รำข้าว		ปลาป่น		ปลาป่น+รำข้าว	
	เชื้อตั้งต้น($x10^6$)		เชื้อตั้งต้น ($x10^6$)		เชื้อตั้งต้น($x10^6$)		เชื้อตั้งต้น ($x10^6$)	
	อุณหภูมิห้อง	4 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C
0 วัน	$6.70x10^8$	$5.10x10^9$	$2.07x10^9$	$6.10x10^8$	$7.90x10^8$	$4.90x10^8$	$2.70x10^8$	$1.12x10^9$
7 วัน	$3.10x10^8$	$6.90x10^8$	$4.00x10^8$	$4.50x10^8$	$5.40x10^8$	$1.93x10^8$	$1.40x10^7$	$4.00x10^7$
14 วัน	$1.14x10^7$	$2.08x10^7$	$7.80x10^6$	$5.80x10^7$	$1.16x10^7$	$1.15x10^7$	$4.40x10^6$	$7.80x10^6$
21 วัน	$4.20x10^6$	$3.10x10^7$	$9.60x10^6$	$6.10x10^7$	$9.20x10^5$	4..$50x10^6$	$3.80x10^6$	$6.30x10^6$
28 วัน	$1.26x10^6$	$3.40x10^7$	$1.53x10^7$	$1.39x10^7$	$1.38x10^6$	$7.20x10^6$	$4.50x10^4$	$5.80x10^5$
60วัน	$5.50x10^5$	$8.20x10^6$	$4.50x10^6$	$2.70x10^7$	$6.80x10^3$	$8.60x10^5$	0	$>10^4$

ตารางที่ 23 การรอดชีวิตรของแบคทีเรียสายพันธุ์ PM-8 เปรียบเทียบระหว่างการทำหัวเชื้อโดยวิธีทำแห้งแบบเยือกแข็งและไม่ทำแห้ง

เวลา	ไม่ทำแห้ง				ทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง			
	ปลาป่น		ปลาป่น+รำข้าว		ปลาป่น		ปลาป่น+รำข้าว	
	เชื้อตั้งต้น($x10^7$)		เชื้อตั้งต้น ($x10^6$)		เชื้อตั้งต้น($x10^7$)		เชื้อตั้งต้น ($x10^6$)	
	อุณหภูมิห้อง	4 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C	อุณหภูมิห้อง	4 °C
0 วัน	$1.57x10^9$	$9.50x10^9$	$3.80x10^8$	$9.70x10^8$	$1.35x10^{10}$	$1.87x10^{10}$	$4.70x10^8$	$5.20x10^9$
7 วัน	$>10^8$	$7.30x10^9$	$4.60x10^8$	$1.20x10^8$	$4.20x10^8$	$4.20x10^8$	$4.60x10^7$	$4.20x10^8$
14 วัน	$2.60x10^8$	$2.10x10^9$	$6.40x10^6$	$2.70x10^8$	$4.50x10^7$	$7.90x10^6$	$6.00x10^4$	$4.00x10^5$
21 วัน	$1.38x10^7$	$4.20x10^8$	$1.79x10^7$	$6.70x10^7$	$3.60x10^7$	$> x10^5$	$4.10x10^5$	$6.70x10^6$
28 วัน	$4.00x10^6$	$1.00x10^8$	$1.11x10^7$	$1.24x10^8$	$1.70x10^7$	$4.50x10^6$	$2.60x10^4$	$7.50x10^6$
60 วัน	$1.56x10^6$	$2.19x10^8$	$3.40x10^6$	$1.18x10^8$	$7.00x10^5$	$1.11x10^6$	$1.70x10^3$	$2.40x10^6$

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

1. การแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในระยะต่าง ๆ ของกระบวนการหมักน้ำปลา และการศึกษาสมบัติบางประการของน้ำปลา

1.1 <u>การเก็บตัวอย่างน้ำปลา การแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม และการนับจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมด</u>

จากการเก็บตัวอย่างน้ำปลาจากบ่อหมักที่มีอายุการหมักน้ำปลาตั้งแต่เริ่มต้นการหมักจนกระทั่งสิ้นสุดการหมัก (0-18 เดือน) ที่ผิวบ่อและก้นบ่อหมักของโรงงาน A B และ C ได้ตัวอย่างน้ำปลาทั้งหมด 80 ตัวอย่าง ทำการนับจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดและแยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส ที่เติมโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์ (Weiss , 1992) จากการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่มีลักษณะของโคโลนีสีขาวขุ่นฝังอยู่ในวุ้น ซึ่งเป็นลักษณะของแบคทีเรียชนิดไม่ชอบออกซิเจน และแบคทีเรียที่ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส เพื่อคัดแยกแบคทีเรียสกุล *Staphylococcus* และ *Micrococcus* ที่สร้างเอมไซม์คาตาเลส ซึ่งพบในตัวอย่างน้ำปลาออกจากแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม (Garvie , 1986 ; Tanasupawat และ Daengsubha , 1983) ได้แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มจากโรงงาน A 266 สายพันธุ์ โรงงาน B 100 สายพันธุ์ และโรงงาน C 23 สายพันธุ์ รวมทั้งหมด 389 สายพันธุ์

1.2 <u>การเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในระยะต่าง ๆ ของกระบวนการหมักน้ำปลา</u>

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในระยะต่าง ๆ ของกระบวนการหมักน้ำปลาที่บริเวณผิวบ่อและก้นบ่อ พบว่าโรงงาน A มีจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดอยู่ในช่วง 6.50×10^{0} ถึง 8.25×10^{5} CFU/ml ซึ่งพบแบคทีเรียมากที่สุดในตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมัก 1 เดือนที่บริเวณผิวบ่อ โรงงาน B มีจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดอยู่ในช่วง 0 ถึง 2.40×10^{4} CFU/ml ซึ่งพบแบคทีเรียมากที่สุดในตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมัก 3 เดือนที่บริเวณผิวบ่อ และโรงงาน C มีจำนวน

แบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดอยู่ในช่วง 0 ถึง $9.9x10^4$ CFU/ml ซึ่งพบแบคทีเรียมากที่สุดในตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมัก 0 เดือนที่บริเวณก้นบ่อ ดังตารางที่ 10 จากศึกษาพบว่าแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดจะพบมากในระยะแรกของการหมัก (0-4 เดือน) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Saisithi และ คณะ (1966) ที่พบว่าตัวอย่างน้ำปลาที่มีอายุการหมัก 1 และ 3 เดือน จะมีจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดมากที่สุดเท่ากับ $1.41x10^5$ และ $4.0x10^4$ CFU/ml ตามลำดับ และยังสอดคล้องกับการศึกษาของสายพิณ (2528) ที่พบว่าในระยะแรกของการหมักน้ำปลาจะพบจำนวนแบคทีเรียมากที่สุด อาจเป็นเพราะในระยะแรกแบคทีเรียเริ่มต้นอาจมาจากแบคทีเรียเข้าฉิ่นที่ติดมากับตัวปลา เกลือ รวมทั้งวัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการหมักน้ำปลา แบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มจะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็วหลังจากหมักไปได้ระยะหนึ่งแบคทีเรียที่ทนเค็มได้จะไม่สามารถเจริญต่อไปได้ แต่แบคทีเรียชอบเค็มจะสามารถเจริญต่อไปได้ ทำให้จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดมีจำนวนลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ศิริเพ็ญ (2534)

โรงงาน C พบจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มมากที่สุดที่บริเวณก้นบ่อ เนื่องจากสภาพการหมักน้ำปลาของโรงงาน C เป็นการหมักน้ำปลากลางแจ้งจึงทำให้อุณหภูมิที่บริเวณผิวบ่อมีสูงกว่าบริเวณก้นบ่อ และรวมทั้งจากการศึกษาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ของโรงงาน C (ข้อ 1.3.3) พบว่ามีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูงกว่าโรงงานอื่น ๆ ซึ่งปัจจัยทั้ง 2 นี้ส่งผลต่อการเจริญของแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็ม

1.3 การศึกษาสมบัติบางประการของน้ำปลา

1.3.1 พีเอช (pH)

จากการวัดพีเอชของตัวอย่างน้ำปลาตั้งแต่เริ่มต้นหมักถึงสิ้นสุดกระบวนการหมักน้ำปลา พบว่าพีเอชของน้ำปลาจากโรงงาน A B และ C อยู่ระหว่าง 4.99 - 6.31 , 5.06 -5.69 และ 4.78 - 6.30 ตามลำดับ (รูปที่ 6) ซึ่งสอดคล้องกับมาตรฐานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์น้ำปลาพื้นเมือง (2526) และ ที่กำหนดให้พีเอชของน้ำปลา อยู่ระหว่าง 5.0-6.0 ตามลำดับ และจากการศึกษาคุณสมบัติของน้ำปลา โดย Saisithi และคณะ (1966) , สิทธิพันธุ์ (2522) , Itoh และคณะ (1985a) และ Phithakpol และคณะ (1995) พบว่าน้ำปลามีค่าพีเอชอยู่ระหว่าง 6.2-6.6 , 5.5-5.9 , 5.31-5.58 และ 5.7-6.0 ตามลำดับ จากการทดลองนี้พบว่าค่าพีเอชของตัวอย่างน้ำปลาตลอดระยะเวลาของการหมักมีการเปลี่ยนแปลงไม่มากนัก ทั้งนี้เกิดจากแบคทีเรียกรดแลคติคมีการสร้าง

กรดแลคติคได้ปริมาณน้อย และจากรายงานการเปรียบเทียบปริมาณกรดอะมิโนในน้ำปลาไทย (กองโภชนาการ ,2526 อ้างถึงใน วรรณา , 2534) พบว่ามีกรดกลูตามิค 10 กรัมต่อลิตร เป็นกรดอะมิโนที่พบมากที่สุดในน้ำปลา รวมทั้งกรดแอสปาร์ติคปริมาณเล็กน้อย ซึ่งกรดอะมิโนทั้ง 2 ชนิดนี้มีคุณสมบัติเป็นกรดจึงน่าจะมีส่วนทำให้พีเอชของน้ำปลาเป็นลดลง นอกจากนี้แบคทีเรียยังใช้กรดอะมิโนในน้ำปลาเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อการเจริญ จึงทำให้เกิดก๊าซแอมโมเนียที่เป็นด่างมีผลทำให้พีเอชของน้ำปลาค่อนข้างคงที่ และจากการศึกษาพบว่าบริเวณก้นบ่อมีค่าพีเอชต่ำกว่าที่ผิวบ่อ ทั้งนี้เนื่องจากแบคทีเรียชนิดที่ไม่ชอบออกซิเจนที่สามารถเจริญได้ดีที่ก้นบ่อ สร้างกรดอินทรีย์ ซึ่งทำให้พีเอชต่ำ

1.3.2 ปริมาณกรดแลคติค

จากการศึกษาปริมาณกรดแลคติค (%) ในตัวอย่างน้ำปลาตลอดระยะเวลาของการหมัก พบว่า ปริมาณกรดแลคติคที่บริเวณก้นบ่อมากกว่ากรดแลคติคที่บริเวณผิวบ่อ ทั้งนี้เนื่องจากที่ก้นบ่อมีสภาวะเหมาะสำหรับการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มทำให้มีการผลิตกรดแลคติคมาก ซึ่งสอดคล้องกับค่าพีเอช ปริมาณกรดแลคติคที่วิเคราะห์ได้จะพบตลอดระยะเวลาของการหมัก (รูปที่ 7) ไม่มีความสอดคล้องกับจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดในน้ำปลา (รูปที่ 5) ทั้งนี้เนื่องจากการวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติคทำโดยวิธีไทเทรต เพื่อหาปริมาณกรดทั้งหมดที่คาดว่าอยู่ในรูปกรดแลคติค แต่มีรายงานว่าน้ำปลามีกรดหลายชนิด จากรายงานของประเสริฐ (2511) พบทั้ง กรดฟอร์มิค กรดอะซีติค กรดโพรพิโอนิค และกรดไอโซบิวทีริค Itoh และคณะ (1985) พบกรดแลคติค และกรดอะซีติค และจีรพันธ์ (2538) พบกรดบิวทาโนอิค กรดฟีนิลอะซีติค กรดโพรพิโนอิค กรดไอโซเพนทาโนอิค กรดเบนโซอิค และกรดไพวาลิค ซึ่งกรดแหล่านี้เป็นปัจจัยหลักในการทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการหาปริมาณกรดแลคติค

1.3.3 ปริมาณโซเดียมคลอไรด์

จากการศึกษาปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (%)ในตัวอย่างน้ำปลาตลอดระยะเวลาของการหมัก ของโรงงาน A B และ C พบว่าปริมาณโซเดียมคลอไรด์อยู่ในช่วง 18.25 - 23.62 , 19.25-31.00 และ 22.00-32.50 เปอร์เซนต์ตามลำดับ (รูปที่ 8) ปริมาณโซเดียมคลอไรด์นี้มีค่าใกล้เคียงกับมาตรฐานอุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์น้ำปลาพื้นเมือง (2526) และ ประกาศกระทรวง

สาธารณสุข (2532) ซึ่งระบุว่าในน้ำปลาต้องมีโซเดียมคลอไรด์ ไม่น้อยกว่า 23 เปอร์เซนต์ และไม่น้อยกว่า 20 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ และสอดคล้องรายงานของ Saisithi (1966) , สิทธิพันธุ์ (2522) และ Phithakpol และคณะ (1995) ที่พบว่าในน้ำปลามีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ตั้งแต่ 27.9-30.3 , 24.9-30.6 และ 22.8-26.2 เปอร์เซนต์

โรงงาน A และ B มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์ตลอดระยะเวลาของการหมักน้ำปลาประมาณ 20 และ 24 เปอร์เซนต์ ตามลำดับ แต่โรงงาน C มีปริมาณโซเดียมคลอไรด์สูงกว่า 2 โรงงานคือประมาณ 27 เปอร์เซนต์ ซึ่งมีผลทำให้จำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็มทั้งหมดของโรงงาน C มีจำนวนน้อยกว่า

จากการทดลองแยกและนับจำนวนแบคทีเรียทนเค็มและชอบเค็ม รวมทั้งการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพบางประการของน้ำปลา คือ พีเอช ปริมาณกรดแลคติค ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ พบว่าค่าที่ได้ไม่อาจใช้เป็นตัวแทนของน้ำปลาในระยะต่าง ๆ ของการหมักอย่างแท้จริง เนื่องจากการเก็บตัวอย่างน้ำปลาไม่ได้เก็บจากบ่อหมักเดียวกันตลอดระยะเวลาของการหมัก (0-18 เดือน) แต่ทำการเก็บตัวอย่างจากบ่อหมักซึ่งมีอายุต่าง ๆ กัน

2. การพิสูจน์เอกลักษณ์ *Tetragenococcus* sp. โดยอาศัยหลักฟีโนไทป์

2.1 การจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้

Tanasupawat และ Daengsubha (1983) ได้แยกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มจากอาหารหมักคองของไทย พบว่า แบคทีเรียที่แยกได้สามารถหมักน้ำตาลหลายชนิดได้เหมือนกัน แต่การหมักน้ำตาลบางชนิดแตกต่างกัน ในการทดลองนี้จึงได้เลือกน้ำตาล 6 ชนิด คือ เมลซิโทส อะราบิโนส มอลโทส กาแลคโทส ไซโลส และไรโบส ซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่ Tanasupawat และ Daengsubha แยกได้สามารถหมักน้ำตาลได้ต่างกันมาใช้ในการทดลองนี้ จากการศึกษาการหมักน้ำตาล 6 ชนิดดังกล่าว ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากตัวอย่างน้ำปลาทั้งหมด 389 สายพันธุ์ เพื่อจัดแบคทีเรียให้เป็นกลุ่ม ๆ ตามรูปแบบการหมักน้ำตาลทั้ง 6 ชนิด พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มมีรูปแบบการหมักน้ำตาล 6 ชนิด รวม 24 รูปแบบ (ตารางที่ 24) โดยแบคทีเรียจากโรงงาน A B และ C มี 20 16 และ 3 รูปแบบ ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 12 13 และ 14 พบว่า รูปแบบการหมักน้ำตาลทั้ง 6 ชนิดได้ + + + + + + เป็นรูปแบบที่พบมากที่สุดมีจำนวนแบคทีเรีย 144 สายพันธุ์ และจากรายงานของ Garvie , 1986 พบว่า การหมักน้ำตาล 6 ชนิด ของ *T. halophilus* มีรูปแบบการหมักน้ำตาลเป็น + + + + - +

เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้ 389 สายพันธุ์ พบว่ามีเพียง 1 สายพันธุ์ (ตารางที่ 24 , รูปแบบที่ 8) ที่มีรูปแบบการหมักน้ำตาลเหมือนกับ *T. halophilus* จะเห็นว่าคุณสมบัติการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม มีความแตกต่างกันมากในแต่ละสายพันธุ์ซึ่งสอดคล้องกับ รายงานของ Uchida (1982) และ Roling และคณะ (1996) ที่ศึกษารูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม "*P. halophilus*" ที่แยกได้จากซีอิ๊ว

ตารางที่ 24 รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม

น้ำตาล	รูปแบบการหมักน้ำตาล																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
เมลซิโทส	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
อะราบิโนส	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
มอลโทส	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
กาแลคโทส	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
ไซโลส	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-
ไรโบส	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
สายพันธุ์	141	48	18	3	5	28	2	1	2	1	10	1	4	3	47	17	7	4	1	3	23	2	3	5

2.2 <u>การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม โดยอาศัยหลักการทางฟีโนไทป์</u>

จากการศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มซึ่งมีรูปแบบการหมักน้ำตาลทั้ง 6 ชนิดแตกต่างกัน (จากข้อ 2.1) รวม 174 สายพันธุ์ โดยอาศัยหลักการทางฟีโนไทป์ ซึ่งศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยาและชีวเคมี ตามแนวทางการศึกษาอนุกรมวิธานแบคทีเรียสกุล *Pediococcus* เปรียบเทียบกับ *Tetragenococcus* sp. สายพันธุ์มาตรฐานซึ่งมีเพียง 2 สปีชีส์ คือ *T. halophilus* ATCC 33315^T และ *T. muriaticus* JCM 10006^T พบว่า ลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ที่แยกได้จากน้ำปลา มีลักษณะของเซลล์ : รูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก จัดเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ เส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ 0.6-1.0 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นสี่เซลล์

ลักษณะโคโลนี : โคโลนีกลม สีขาว ขอบเรียบ โค้งนูน เส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ลักษณะทางชีวเคมี : ไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส สร้างเอนไซม์คาตาเลสที่มีฮีมาติน ไม่ย่อยเจลาติน ไทรบิวไทริน และ แป้ง สามารถสร้างกรดจากการตรวจสอบด้วยเมธิลเรด ไม่สร้างอะซีธิลเมธิล-คาร์บินอล เป็นแบคทีเรียพวกเฟอร์เมนท์เททีฟ ไม่สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ลักษณะทางสรีรวิทยา : เจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่พีเอช 4.2 แต่เจริญได้ที่พีเอช 6.5 , 8.0 และ 9.0 และเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 10 , 15 , 20 และ 25 เปอร์เซนต์ ซึ่งสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดแลคชอบเค็ม 172 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียในสกุล *Tetragenococcus* จากลักษณะการเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์ หรือมากกว่า (Nakagawa และ Kitahara ,1959 ; Tanasupawat และ Daengsubha ,1983 ; Garvie ,1986 ; Weiss ,1992) ส่วนอีก 2 สายพันธุ์ มีลักษณะทางฟีโนไทป์คล้ายแบคทีเรียในสกุล *Aerococcus* และแบคทีเรีย *Pediococcus urinae-equi* ซึ่งมีลักษณะการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นสี่เซลล์ และเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ แต่ไม่สามารถเจริญในโซเดียม-คลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์ (Garvie , 1986 ; Weiss , 1992)

ในการทดลองนี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* สามารถย่อยอาร์จีนีนได้ 162 สายพันธุ์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Coster และ White (1964) และ Weiss (1992) ที่พบว่า *T. halophilus* ย่อยอาร์จีนีนได้ ส่วนอีก 10 สายพันธุ์ ไม่ย่อยอาร์จีนีน สอดคล้องกับรายงานของ Whittenbury (1965) ที่พบว่า *T. halophilus* ไม่ย่อยอาร์จีนีน และSatomi และคณะ (1997) พบว่า *T. muriaticus* ไม่ย่อยอาร์จีนีน ดังนั้นการใช้คุณสมบัติการย่อยอาร์จีนีนไม่สามารถใช้พิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มในระดับสปีชีส์ได้ การศึกษาการเจริญในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์จากการทดลองนี้แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้มี 80 สายพันธุ์ ที่เจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Nakagawa และ Kitahara (1959) และ Ho (1984) พบว่า *T. halophilus* สามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซ็นต์ ส่วนอีก 94 สายพันธุ์ ไม่เจริญในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Satomi และคณะ (1997) ที่พบว่า *T. muriaticus* ไม่เจริญในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์ การศึกษาการย่อยเคซีนของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* เนื่องจากแบคทีเรียมีบทบาทในการหมักน้ำปลา จึงมีความเป็นไปได้ที่แบคทีเรียจะสร้างเอนไซม์โปรติเอส เพื่อมาย่อยสลายเนื้อปลา ซึ่งจากการศึกษาคุณสมบัติดังกล่าวของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสายพันธุ์มาตรฐานและสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำปลา พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากน้ำปลา 89 สายพันธุ์ไม่สามารถย่อยเคซีนได้ คล้ายกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *T. halophilus* ATCC 33315^T และส่วนอีก 85 สายพันธุ์ สามารถ

ย่อยเคซีนได้ คล้ายกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *T. muriaticus* JCM 10006^T และการศึกษาความสามารถหมักน้ำตาลชนิดต่าง ๆ รวม 18 ชนิด พบว่า มีความแตกต่างกันมากในแต่ละสายพันธุ์ แต่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากน้ำปลาส่วนใหญ่สามารถหมักน้ำตาลฟรุคโทส แมนโนส และไรโบสได้

การศึกษาคุณลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *Tetragenococcus* sp. นี้จะเห็นว่าสามารถพิสูจน์เอกลักษณ์ได้ถึงระดับสกุลเท่านั้น จึงได้ทำการศึกษาการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียสกุล *Tetragenococcus* เพิ่มเติมจากลักษณะทางฟีโนไทป์ คือการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอโดยใช้ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่นโดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยไฟโตไบโอติน เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียถึงระดับสปีชีส์

2.3 <u>การจัดกลุ่ม *Tetragenococcus* ที่จัดจำแนกได้ โดยลักษณะทางฟีโนไทป์และเลือกตัวแทนกลุ่ม</u>

จากการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยหลักการทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มทั้งหมด 174 สายพันธุ์ (จากข้อ 2.2) มาทำการจัดกลุ่ม พบว่าแบ่งแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *Tetragenococcus* sp. ได้เป็น 6 กลุ่ม (ดังตารางที่ 16) โดยกลุ่มที่ 4 เป็นแบคทีเรียที่ย่อยอาร์จีนีน ไม่ย่อยเคซีน และเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์ มีจำนวนมากที่สุด คือ 71 สายพันธุ์ ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *T. halophilus* ATCC 33315^T ส่วนแบคทีเรียกลุ่มที่ 5 จำนวน 8 สายพันธุ์ ซึ่งไม่ย่อยอาร์จีนีน ย่อยเคซีน และไม่เจริญในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์ เหมือนกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *T. muriaticus* JCM 10006^T และแบคทีเรียในกลุ่มที่ 1 2 3 และ 6 ซึ่งมีลักษณะทางฟีโนไทป์ทั้ง 3 ลักษณะ ไม่คล้ายกับแบคทีเรียกรดแลคติคสกุล *Tetragenococcus* sp. สายพันธุ์มาตรฐาน

3. การศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของ *Tetragenococcus* sp.

จากการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่เป็นตัวแทนของแต่ละกลุ่มจากลักษณะทางฟีโนไทป์แตกต่างกัน ทั้งหมด 80 สายพันธุ์ (ตารางที่ 17) เปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *T. halophilus* ATCC 33315^T และ *T. muriaticus* JCM 10006^T ซึ่งรายงานของ Wyne และคณะ (1987) ได้กำหนดว่าความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอต้องเท่ากับหรือ

มากกว่า 70 เปอร์เซนต์ขึ้นไป จึงจัดให้เป็นแบคทีเรียในสปีชีส์เดียวกัน จากการศึกษาสามารถจัดจำแนกแบคทีเรียได้เป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 มีแบคทีเรีย 40 สายพันธุ์ ที่พิสูจน์เอกลักษณ์เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสปีชีส์ *T. halophilus* ซึ่งมีความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *T. halophilus* ATCC 33315^{T} เท่ากับ 70.03 – 109.05 เปอร์เซนต์ (Dellagio และคณะ , 1981 ; Satomi และคณะ , 1997)

กลุ่มที่ 2 มีแบคทีเรีย 38 สายพันธุ์ ที่พิสูจน์เอกลักษณ์เป็นแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสปีชีส์ *T. muriaticus* ซึ่งมีความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *T. muriaticus* JCM 10006^{T} เท่ากับ 70.94 – 105.60 เปอร์เซนต์ (Satomi และคณะ , 1997)

กลุ่มที่ 3 แบคทีเรียสายพันธุ์ CO-1 และ CO-2 ไม่มีความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *T. halophilus* ATCC 33315^{T} และ *T. muriaticus* JCM 10006^{T} (ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ เท่ากับ 3.69-4.13 เปอร์เซ็นต์) จึงไม่สามารถจัดจำแนกแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์นี้ให้อยู่ในสกุล *Tetragenococcus* ได้ แต่จากการศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของแบคทีเรีย 2 สายพันธุ์ พบว่ามีลักษณะทางฟีโนไทป์คล้ายคลึงกับแบคทีเรียในสกุล *Aerococcus* และ *P. urinae-equi* คือ จัดเรียงตัวเป็นสี่เซลล์ สามารถเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ แต่ไม่เจริญในโซเดียมคลอไรด์ 18 เปอร์เซนต์ จึงทำการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของแบคทีเรียทั้ง 2 สายพันธุ์เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน *A. viridans* TISTR 393^{T} พบว่าแบคทีเรียสายพันธุ์ CO-1 และ CO-2 ไม่มีความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับ *A. viridans* TISTR 393^{T} (12.35 และ 16.30 เปอร์เซนต์ ดังตารางที่ 25) แต่มีลักษณะทางฟีโนไทป์คล้ายกับแบคทีเรีย "*A. haloviridans*" ที่ Itoh และคณะ (1985b) รายงานไว้คือ สามารถทนเค็มได้ แบคทีเรียกลุ่มนี้ยังไม่เป็นที่ยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ เพราะยังไม่ได้ศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอและลำดับเบส 16S rRNA ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CO-1 และCO-2 เปรียบเทียบกับ "*A. haloviridans*" และ *P. urinae-equi* ต่อไป

การศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ โดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชั่น ในไมโครเพลต โดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ที่แยกได้จากน้ำปลา สามารถใช้พิสูจน์-เอกลักษณ์แบคทีเรียสกุล *Tetragenococcus* ได้ถึงระดับสปีชีส์ คือ *T. halophilus* และ *T. muriaticus* ซึ่งมีลักษณะทางฟีโนไทป์คล้ายคลึงกันมาก เทคนิคนี้ยังมีความรวดเร็ว และปลอดภัยกว่าการใช้สารกัมมันตภาพรังสีติดฉลากโพรบดีเอ็นเอ

ตารางที่ 25 ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียสายพันธุ์ CO-1 และ CO-2 ที่แยกได้จากน้ำปลา เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

ลำดับที่	สายพันธุ์	ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%)			
		T. halophilus ATCC 33315 ^{T}	*T. muriaticus* JCM 10006 ^{T}	*T. muriaticus* K3-26	*A. viridans* TISTR 393 ^{T}
กลุ่มที่ 3					
	C0-1	3.86	4.13	4.88	12.34
	C0-2	3.69	3.81	3.98	16.30
	A. viridans TISTR 393 ^{T}	ND	ND	ND	100

ND , ไม่มีข้อมูล

ปัจจุบันแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* มี 2 สปีชีส์ คือ *T. halophilus* และ *T. muriaticus* ซึ่งมีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันดังสรุปไว้ในตารางที่ 26 แต่จากการผลทดลองในครั้งนี้เปรียบเทียบกับผลการทดลองที่มีผู้วิจัยมาก่อนหน้านี้ ดังกล่าวไว้ข้างต้น พบว่า ทั้งการย่อยอาร์จีนีน การเจริญที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และการหมักน้ำตาลอะราบิโนส แมนนิทอล และซูโครส (Satomi และคณะ , 1997) ไม่สามารถใช้เป็นกุญแจ (key) ในการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียสกุล *Tetragenococcus* ได้ แต่จากผลการทดลองในครั้งนี้ พบว่ามีลักษณะทางฟีโนไทป์เพียง 2 ลักษณะที่น่าจะเป็นกุญแจสำคัญในการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* คือการเจริญในโซเดียมคลอไรด์และการย่อยเคซีน กล่าวคือ ถ้าแบคทีเรียเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์ได้แต่ไม่สามารถย่อยเคซีน ควรจัดเป็น *T. halophilus* ถ้าไม่เจริญในโซเดียมคลอไรด์ 0 เปอร์เซนต์แต่สามารถย่อยเคซีน ควรจัดเป็น *T. muriaticus* ดังแสดงเป็นกุญแจการพิสูจน์เอกลักษณ์ ดังนี้

a) เจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 0 % ไม่ย่อยเคซีน จัดเป็น *T. halophilus*

b) เจริญไม่ได้ในโซเดียมคลอไรด์ 0 % ย่อยเคซีนได้ จัดเป็น *T. muriaticus*

ตารางที่ 26 ลักษณะทางฟีโนไทป์ที่แตกต่างกันของแบคทีเรีย *T. halophilus* และ *T. muriaticus*

ลักษณะ	*T. halophilus* ATCC 33315^T	*T. halophilus* 40 สายพันธุ์	*T. muriaticus* JCM 10006^T	*T. muriaticus* 38 สายพันธุ์
การย่อยอาร์จีนีน	+	+(-1)	-	+(-8)
การย่อยเคซีน	-	-(+3)	+	+(-7)
การเจริญในโซเดียมคลอไรด์				
0 เปอร์เซนต์	+	+	-	-(+2)
การหมักน้ำตาล :				
อะราบิโนส	+	+(-8)	-	+(-12)
แมนนิทอล	-	+(-14)	+	+(-7)
ซูโครส	+	+(-9)	-	-(+5)

4. การศึกษาการวิเคราะห์ฮีสตามีน ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค และองค์ประกอบไขมันของเซลล์ของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus*

4.1 <u>การวิเคราะห์ฮีสตามีนโดยวิธีฟลูออโรสเปคโทรมิเตอร์</u>

จากการวิเคราะห์ปริมาณฮีสตามีนโดยวิธีฟลูออโรสเปคโทรเมทรี ที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสร้างขึ้นทั้งหมด 42 สายพันธุ์ คือ *T. halophilus* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33315^T และ สายพันธุ์ตัวแทน 13 สายพันธุ์ พบว่า *T. halophilus* ATCC 33315^T สามารถสร้างฮีสตามีนได้ในปริมาณ 0.046 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ *T. halophilus* แบคทีเรียสายพันธุ์ตัวแทน สามารถสร้างฮีสตามีนได้ในปริมาณ 0.100-4.458 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จะเห็นได้ว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *T. halophilus* สามารถสร้างฮีสตามีนได้น้อยมาก ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Karnop (1988) (อ้างถึงใน Leisner และคณะ , 1994) ที่พบแบคทีเรีย "*P. halophilus*" ในปลาหมักเกลือ (salted anchovies) ที่สามารถสร้างฮีสตามีน และ

Sato และคณะ (1995) พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม "*P. halophilus*" สามารถสร้างฮีสตามีนได้ในระหว่างการหมักน้ำปลาญี่ปุ่น ในปริมาณ 71 และ 30 มิลลิกรัมต่อตัวอย่างน้ำปลา 100 กรัม

สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *T. muriaticus* สายพันธุ์มาตรฐาน JCM 10006^T และ สายพันธุ์ตัวแทน 26 สายพันธุ์ พบว่า *T. muriaticus* JCM 10006^T สามารถสร้างฮีสตามีนเท่ากับ 44.03 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร และ *T. muriaticus* ที่แยกได้จากน้ำปลาสายพันธุ์ตัวแทน สามารถสร้างฮีสตามีนได้ในปริมาณ เท่ากับ 0.036-52.29 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร จากการศึกษานี้พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *T. muriaticus* บางสายพันธุ์สามารถสร้างฮีสตามีนได้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Satomi และคณะ (1997) พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *T. muriaticus* สามารถสร้างฮีสตามีนได้ ซึ่งในการศึกษานี้ใช้แบคทีเรียตัวแทนเพียง 11 สายพันธุ์เท่านั้น แต่จากการทดลองนี้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มจากบ่อหมักน้ำปลาหลายบ่อและหลายโรงงานจึงทำให้แบคทีเรียมีความหลากหลายมากกว่า ดังจะเห็นได้ว่าปริมาณฮีสตามีนที่แบคทีเรียสกุล *Tetragenococcus* สร้างขึ้นไม่สามารถใช้ในการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียถึงระดับสปีชีส์ได้ ดังที่ Satomi และคณะ (1997) อ้างไว้

แบคทีเรียสายพันธุ์ CO-1 และCO-2 มีปริมาณฮีสตามีนเท่ากับ 42.81 และ 22.87 มิลลิกรัมต่อ 100 มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งยังไม่มีผู้ใดศึกษามาก่อน

4.2 <u>การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค</u>

จากการการวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติค ที่แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *T. halophilus* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33315^T และ สายพันธุ์ตัวแทน 11 สายพันธุ์ และ *T. muriaticus* สายพันธุ์มาตรฐาน JCM 10006^T และ สายพันธุ์ตัวแทน 6 สายพันธุ์ ผลิตได้โดยวิธีเอนไซม์ดี-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส และแอล-แลคเทตดีไฮโดรจีเนส (Okada , 1978) พบว่าแบคทีเรียทุกสายพันธุ์ให้กรดแลคติคที่มีไอโซเมอร์แบบแอล (L) เหมือนกับการศึกษาของ Sakaguchi และ Mori (1969) Garvie (1986) และ Weiss (1992) ซึ่งการศึกษาไอโซเมอร์ของกรดแลคติคเป็นประโยชน์ในการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติค (Manome และคณะ 1998) จึงสรุปว่าแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มที่แยกได้จากน้ำปลาสกุล *Tetragenococcus* สร้างกรดแลคติคไอโซเมอร์แบบแอล จึงใช้การศึกษาไอโซเมอร์ของกรดแลคติคช่วยเสริมการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในสกุลนี้

แบคทีเรียสายพันธุ์ CO-1 และ CO-2 สร้างกรดแลคติคไอโซเมอร์แบบแอล สอดคล้องกับรายงานของ Garvie (1986) , Weiss (1992) และ Axelsson (1993) ที่พบว่า แบคทีเรียในสกุล *Aerococcus* และแบคทีเรีย *Pediococcus urinae-equi* สร้างกรดแลคติคไอโซเมอร์แบบแอล

4.3 การวิเคราะห์องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์

จากการวิเคราะห์องค์ประกอบไขมันของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม *T. halophilus* สายพันธุ์มาตรฐาน ATCC 33315^T และสายพันธุ์ตัวแทน 5 สายพันธุ์ และ *T. muriaticus* สายพันธุ์มาตรฐาน JCM 10006^T และ สายพันธุ์ตัวแทน 7 สายพันธุ์ ตามวิธีของ Ikemoto และคณะ (1978) พบว่า *T. halophilus* และ *T. muriaticus* สายพันธุ์ตัวแทน มีองค์ประกอบของกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัว C18:1 เป็นองค์ประกอบหลัก สอดคล้องกับรายงานของ Collins และคณะ (1990) และ Satomi และคณะ (1997) จึงทำให้องค์ประกอบกรดไขมันของเซลล์แบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* ไม่สามารถในการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียในสกุลนี้

ส่วนแบคทีเรียสายพันธุ์ CO-1 และ CO-2 มีองค์ประกอบกรดไขมันแตกต่างจากแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* และ *Aerococcus*

5. การปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมสำหรับ *Tetragenococcus* sp.

5.1 การศึกษาชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* sp. ทั้งหมด 4 สายพันธุ์ คือ *T. halophilus* ATCC 33315^T และสายพันธุ์ตัวแทน P7-23 และ *T. muriaticus* JCM 10006^T และสายพันธุ์ตัวแทน K5-37 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส (De Man , 1960) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่นิยมใช้เลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติค อาหารเลี้ยงเชื้อพีเอที (Uchida , 1982) ซึ่งมีโซเดียมไทโอไกลโคเลตเพื่อปรับสภาวะของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ไม่มีออกซิเจน และอาหารเลี้ยงเชื้อทีวายเอ็ม (TYM) ซึ่งมีองค์ประกอบส่วนใหญ่ของเกลือแร่ชนิดต่าง ๆ มากกว่าอาหารชนิดอื่น และทำการปรับปริมาณโซเดียมคลอไรด์ในอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรียทั้ง 2 สปีชีส์สามารถเจริญได้

ดีที่สุดในอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส โดย *T. halophilus* เจริญได้ดีที่สุดในโซเดียมคลอไรด์ 5 เปอร์เซนต์และ *T. muriaticus* เจริญได้ดีที่สุดในโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ (รูปที่ 11 และ 12)

อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสเหมาะสมสำหรับการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มสกุล *Tetragenococcus* sp. เนื่องจากมีปริมาณแหล่งไนโตรเจน คือ เปบโทน ผงสกัดจากเนื้อ และผงสกัดจากยีสต์ มากกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดอื่น ๆ อาหารเลี้ยงเชื้อพีเอที มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนรวมทั้งแหล่งคาร์บอน (กลูโคส) น้อยมาก แต่แบคทีเรียก็สามารถเจริญได้พอสมควร ส่วนอาหารทีวายเอ็มมีองค์ประกอบส่วนใหญ่เป็นเกลือแร่ทำให้แบคทีเรียมีการเจริญน้อย ดังนั้นจึงน่าจะทำการศึกษาการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่ลดปริมาณไนโตรเจนและปริมาณแหล่งคาร์บอนลงต่อไปเพื่อลดต้นทุนการผลิต

5.2 การปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ เอ็มอาร์เอส

จากการศึกษาการปรับสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสให้เหมาะสมกับแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็มในสกุล *Tetragenococcus* พบว่า อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสที่มีกลูโคส 0.5 เปอร์เซนต์ จะทำให้เชื้อเจริญได้ดีที่สุด (รูปที่ 13 และ 14) ซึ่งโดยปกติอาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอสจะมีปริมาณกลูโคส 2 เปอร์เซนต์ จากการทดลองปรับสูตรอาหารลดปริมาณกลูโคสเป็น 0.5 เปอร์เซนต์ทำให้แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุด ทั้งนี้อาจเป็นเพราะกลูโคสที่มีปริมาณน้อยในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกเปลี่ยนเป็นกรดแลคติคที่มีปริมาณน้อยลงตามไปด้วย จึงทำให้พีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลงน้อยกว่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีกลูโคสปริมาณมาก

6. การทำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของ *Tetragenococcus* sp.

การทดลองในครั้งนี้เป็นการทดลองเบื้องต้นเพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการทำหัวเชื้อบริสุทธิ์ของ *Tetragenococcus* sp. ต่อไป โดยคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม 3 สายพันธุ์ กล่าวคือ แบคทีเรีย *T. halophilus* สายพันธุ์ PM-8 และ *T. muriaticus* สายพันธุ์ K1-35 และสายพันธุ์ K5-37 ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการทำหัวเชื้อบริสุทธิ์ คือ สามารถหมักน้ำตาลได้หลายชนิดเพื่อการผลิตกรดแลคติคที่มีผลต่อความกลมกล่อมของน้ำปลา สามารถย่อยเคซีนได้ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์เคซีเนสออกมานอกเซลล์เพื่อใช้เร่งการย่อยโปรตีนจากเนื้อปลาทำให้ได้น้ำปลาโดยใช้เวลาหมักสั้นลง นำแบคทีเรียทั้ง 3 สายพันธุ์ มาเพิ่มจำนวนใน

อาหารเลี้ยงเชื้อปลาป่น และปลาป่นผสมรำข้าว โดยเติมโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซนต์ ซึ่งการเลือกใช้ปลาป่นและรำข้าวในการเลี้ยงแบคทีเรียเนื่องจากในกระบวนการหมักน้ำปลาแบคทีเรียใช้สารอาหารจากเนื้อปลา ดังนั้นการใช้ปลาป่นจึงเป็นการชักนำให้แบคทีเรียมีสร้างเอนไซม์สำหรับย่อยสลายเนื้อปลา สำหรับรำข้าวเป็นแหล่งของวิตามินหลายชนิดจะช่วยส่งเสริมการเจริญให้กับแบคทีเรีย นอกจากนี้ปลาป่นและรำข้าวมีราคาถูกและสามารถซื้อได้จากร้านค้าทั่วไปเหมาะสำหรับบุคคลทั่วไปที่จะนำหัวเชื้อบริสุทธิ์ไปประยุกต์ใช้ จากการศึกษาการทำหัวเชื้อบริสุทธิ์แบบทำแห้งแบบเยือกแข็ง (freeze drying) และแบบไม่ทำแห้ง โดยเก็บรักษาหัวเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส และศึกษาเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของแบคทีเรียเป็นเวลา 2 เดือน พบว่าหัวเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อปลาป่นผสมรำข้าวแบบไม่ทำให้แห้ง เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ให้เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์แบคทีเรียมากกว่าแบบทำแห้ง (ตารางที่ 21 , 22 และ 23) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะแบคทีเรียบางส่วนถูกทำลายเนื่องจากกระบวนการแห้ง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤษดา สมิตะสิริ . (2529). บักเตรีชอบเกลือในการหมักน้ำปลา . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .

กรมศุลกากร. (2538) ปริมาณและมูลค่าการส่งออกน้ำปลา. กระทรวงการคลัง , กรุงเทพมหานคร

กรมศุลกากร. (2539) ปริมาณและมูลค่าการส่งออกน้ำปลา. กระทรวงการคลัง , กรุงเทพมหานคร

กรมศุลกากร. (2540) ปริมาณและมูลค่าการส่งออกน้ำปลา. กระทรวงการคลัง , กรุงเทพมหานคร

กรมศุลกากร. (2541) ปริมาณและมูลค่าการส่งออกน้ำปลา. กระทรวงการคลัง , กรุงเทพมหานคร

จีรพันธ์ วรพงษ์ (2538) บทบาทของจุลชีพในขบวนการหมักน้ำปลาโดยวิธีธรรมชาติ : การศึกษากลิ่นและรสของน้ำปลา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.

ฉาตยา ศรีจันทึก. (2535). เศรษฐกิจการผลิตน้ำปลาในจังหวัดระยอง พ.ศ. 2533 . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเศรษฐศาสตร์เกษตร คณะเศรษฐศาสตร์และบริหารธุรกิจ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .

ประเสริฐ สายสิทธิ์ . (2511). กลิ่นและรสของน้ำปลา . วารสารประมง 21 (3) : 467-476.

พงษ์เทพ วิไลพันธ์ (2533) แบคทีเรียชอบเค็มที่สร้างไลเปสในน้ำปลา วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

มณฑิรา อัมพะเศวต (2529) รายงานการค้าเรื่องน้ำปลาของไทย ฝ่ายวิจัยสินค้าเกษตรกรรม กองวิจัยสินค้าและการตลาด กรมเศรษฐกิจการพาณิชย์ กระทรวงพาณิชย์.

มัทนา แสงจินดาวงษ์ และสมศักดิ์ วินิจนันทรัตน์ (2527) การศึกษาชนิดและปริมาณแบคทีเรียในระยะต้นของการหมักน้ำปลา วารสารประมง 37 : 69-72.

ยงยศ จุฑามาตยางกูร . (2522). การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญของบักเตรี *Pediococcus* sp. ที่แยกได้จากน้ำปลา . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .

ระเบียบ ภูมิรัตน (2512) น้ำปลาพื้นเมือง วิทยาศาสตร์ 23 (8) : 651-656.

ราชกิจจานุเบกษา (2532) น้ำปลา ฉบับ 118 , กระทรวงสาธารณสุข กรุงเทพมหานคร

รายงานกิจกรรมของกรมวิทยาศาสตร์ (2517-2519) การศึกษาเรื่องวิธีวิเคราะห์และหาปริมาณของกรดโฟลิคในน้ำปลาพื้นเมือง 34 : 54-55.

รายงานกิจกรรมของกรมวิทยาศาสตร์ (2516-2517) การศึกษาเรื่องวิตามินบี 12 ในน้ำปลา 33 : 45-48.

วรรณา พรเศรษฐคุณ . (2534). การคัดเลือกสายพันธุ์และการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ชนิดต้องการเกลือเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วิไลลักษณ์ กลมกลาง . (2538). การศึกษาการหมักน้ำปลาโดยใช้เชื้อแบคทีเรียชอบเกลือร่วมกับโคจิ . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ .

วิมล พงศ์ไพโรจน์ . (2521). น้ำปลา. ฉลาดบริโภค 3 (3) : 41-46.

ศิริเพ็ญ เวชชการัณย์ . (2533). สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเติบโตของแบคทีเรียชอบเค็มที่ผลิตโปรติเอส. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .

ศิริเพ็ญ เวชชการัณย์ (2534) น้ำปลา : อาหารที่ได้จากแบคทีเรีย . วารสารศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 1 (1) : 4-5.

สิทธิพันธุ์ ไชยนันทน์ . (2522). การศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติบางประการของเชื้อบักเตรีที่แยกได้จากน้ำปลาไทย ซึ่งผลิตจากปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม . วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

สุทธิศักดิ์ สุขในศิลป์ . (2520). การศึกษาเชื้อบักเตรีในขบวนการหมักซีอิ๊ว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตร์ศาสตร์.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ . (2539). เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์ สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพ ฯ.

สาโรจน์ ประเสริฐศิริวัฒน์ . (2531). การเปลี่ยนแปลงของประชากรแบคทีเรียและชีวเคมีในการหมักน้ำปลา. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย .

สายพิณ ไชยนันท์ และ สิทธิพันธุ์ ไชยนันท์ . (2526). การศึกษาบักเตรีที่มีบทบาททำให้เกิดกลิ่นในน้ำปลาไทย . วารสารคณะครุศาสตร์อุตสาหกรรมและวิทยาศาสตร์ 2 (2) : 1-14.

สายพิณ ไชยนันท์ . (2528). น้ำปลาอาหารหมักพื้นบ้าน . ชัยพฤกษ์วิทยาศาสตร์ 32 (23) : 8-10.

สายสมร ลิปตะสิริ (2518) การศึกษาคุณสมบัติการประการของเชื้อบักเตรีที่แยกได้จากน้ำปลาไทย วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

อุตสาหกรรม , กระทรวง . (2526). มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำปลาพื้นเมือง . สำนักงานมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม กรุงเทพ ฯ.

ภาษาอังกฤษ

Abe , H. , J.N. Park , Y. Fukumoto , E. Fujita , T. Tanaka , T. Washio , S. Otsuka , T. Shimizu and K. Watanabe. (1999). Occurrence of D-amino acids in fish sauce and other fermented fish products. Fisheries Science . 65 (4) : 637-641. Abstract from : Institute for Scientific Information , Citation Database .

Aoki , Y. and H. Yamada (1994). Clinical application of microplate DNA-DNA hybridization procedure for rapid diagnosis of mycobacterial infections. Tubercle Lung Dis. 75 : 213-219.

Axelsson L. T. (1993). Lactic acid bacteria : classification and physiology. In S. Salminen and A. von Wright (eds.) , Lactic acid bacteria , pp. 1-20. New York : Marcell Dekker .

Barrow , G. I. and R. K. A. Feltham (1993). Cowan and Steel' s Manual for the identification of medical bacteria , Australia : Cambridge University Press.

Beddows , C.G. (1998). Fermented fish and fish products . In Wood , B.J.B. (ed.) , Microbiology of fermented foods , vol. 1. , pp. 416-429. New York : Blackie Academic & Professional.

Brock , T. D. and M. T. , Madigan (1974) Microbial taxonomy . In Biology of Microorganisms , pp. 605-618. New Jersey : Prentice Hall.

Chaiyanan , S. , S. Sarayanit , M. Chamaoot and C. Kesornmala . (1989). Fish sauce fermentation by using microbial inoculation and recycling system . Food Science and Technology in Industrial Development

Chaiyanan , S. , S. Chaiyanan , T. Maugel , A. Huq , F. T. Robb and R. R. Colwell. (1999) Polyphasic taxonomy of a novel *Halobacillus, Halobacillus thailandensis* sp. nov. isotated from fish sauce. System. Appl. Microbiol. 22 : 360-365.

Collins , M.D. , A.M. Wiliam and S. Walbanks (1990) The phylogeny of *Aerococcus* and *Pediococcus* as determined by 16S rRNA sequence analysis : description of *Tetragenococcus* gen. nov. FEMS Microbiol Lett 70 : 255-262 .

Collins M.D. , J. Samelis , J. Metaxopoulus and S. Wallbanks (1993) Taxonomic studies on some *Leuconostoc* – like organisms from fermented sausages : description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. J. Appl. Bacteriol. 75 : 595-603.

Coster, E. and H. R. White (1964). Further studies of the genus *Pediococcus* . J. Gen. Microbiol. 37 : 15-31.

Crisan , E.V. and A. Sands . (1975). Microflora of four fermented fish sauces . Appl. Microbiol. 29 (1) : 106-108.

Dellaglio , F. , L. D. Trovatelli and P. G. Sarra . (1981). DNA-DNA homology among representative strains of the genus *Pediococcus* . Zbl. Bakt. Hyg. , I. Abt. Orig. 2 : 140-150.

De Man J. C. , M. Rogosa and M.E. Sharpe. (1960) A medium for the cultivation of lactobacillus. J. Appl. Bacteriol. 23 : 130-135.

Dicks , L.M.T. , F. Dellaglio and M.D. Collins (1995) Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Bacteriol. 45 : 395-397.

Dougan , J. and G. E. Howard . (1975). Some Flavoring constituents of fermented fish sauces . J. Sci. Food Agric. 26 : 887-894.

Ezaki , T. , Y. Hashimoto , N. Takeuchi , H. Yamamoto , S. Liu , H. Miura , K. Matsui and E. Yabuuchi. (1988). Simple genetic method to identify viridans group streptococci by colormetric dot hybridization and fluorometric hybridization in microdilution wells. J. Clin. Microbiol. 26 : 1708-1713.

Ezaki , T. , Y. Hashimoto and E. Yabuuchi . (1989). Fluorometric deoxyribonucleic acid – deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains . Int. J. Syst. Bacteriol. 39 (3) : 224-229.

Garvie , E. I. (1986) Genus *Pediococcus* , . In Bergey ' s Manual of Systematic Bacteriology , vol. 2 pp. 1075-1079 . P.H.A. Sneath , N.S. Mair , M.E. Sharpe and J.G. Holt. : Baltimore : The Wiliams & Wikins .

Gibbons , N. E. (1969). Isolation growth and requirements of halophilic bacteria . In Norris , J. R. and D. W. Ribbons (eds.) , Methods in Microbiology , pp. 169-183 , London : Academic Press.

Goris , J. , K. I. Suzuki , P. D. Vos , T. Nakase and K. Kersters . (1998). Evaluation of a microplate DNA-DNA hybridization compared with the initial renaturation method . Can. J. Microbiol. 44 : 1148-1153 .

Gunther H.L. and H.R. White . (1961). The cultural and physiological characters of the pediococci . J. Gen. Microbiol. 26 :185-197.

Gurtler , M. , M. G. Ganzle , G. Wolf and W. P. Hammes . (1998). Physiological diversity among srtains of *Tetragenococcus halophilus* . System. Appl. Microbiol. 21 :107-112.

Hamada , T. , M. Sugishita , Y. Fukushima , T. Fukase and H. Motai . (1991). Continous production of soy sauce by a bioreactor system . Process Biochemistry 26 : 39-45 .

Hirayama , H. , J. Tamaoka and K. Horikoshi . (1996). Improved immobilization of DNA to microwell plates for DNA-DNA hybridization. Nucleic acids Research 24 (20) : 4098-4099.

Ho , C.C. , S.E. Toh , N. Ajam and K P. Cheah . (1984). Isolation and characterization of halophilic yeasts and bacteria involved in soy sauce fermentation in Malasia. Food Technology in Australia 36(5) : 227-230 , 232.

Itoh , H. , R. S. Hadioetomo , S. Nkkuni and N. Okada . (1985a). Studies on lactic acid bacteria in fish sauces (part 1) chemical composition and microflora of fish sauces. Rept. Natl. Food Res. Inst. 47 : 23-30.

Itoh , H. , R. S. Hadioetomo , S. Nkkuni and N. Okada . (1985b). Studies on lactic acid bacteria in fish sauces (part 2) Identification of salt – tolerance and acid – producing bacteria from fish sauces . Rept. Natl. Food Res. Inst. 47 : 31-40.

Ijong , F.G. and Y. Ohta. (1996). Physiochemical and Microbiological changes associated with Bakasang processing – a traditional indonesian fermented fish sauce. J. Sci. Food Agric. 71 : 69-74.

Johnson , J. L. (1984) . Nucleic Acid in Bacterial Classification. In N. R. Krieg (ed.), Bergey's Manual of Systematic Bacteriolygy, vol. 1. pp. 8-11. Baltimore : Williams & Wilkins .

Kaznowski , A. (1995). A method of colorimetric DNA-DNA hybridization in microplates with covalently immobilized DNA for identification of *Aeromonas* spp. Med. Microbiol. Lett. 4 : 362-369. Abstract from : Life Sciences 1996-1998.

Kenbe , C. and Uchida , K. (1987). Citrate Metabolism by *Pediococcus halophilus* . Appl. Environ. Microbiol. 53 : 1257-1262.

Kozaki , M. (1992). Manuals for experiments of lactic acid bacteria . Asaknra Shoten , Tokyo pp. 126-135. (In Japanese)

Kricka , L. J. (1992). Nucleic acid hybridization test formats : Strategies and applications. In Kricka , L. J. (ed.) Nonisotopic DNA Probe Techniques , New York : Academic Press .

Kusunoki , S. , T. Ezaki , M. Tamesada , Y. Hatanaka , K. Asano , Y. Hashimoto and E. Yabuuchi (1991). Application of colorimetric microdilution plate hybridization for rapid genetic identification of 22 *Mycobacterium* speices. J. Clin. Microbiol. 29 (8) : 1596-1603 .

Leisner , J.J. , J.C. Millan , H.H. Huss and L.M. Larsen. (1994). Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packed sugar –salted fish . J. Appl. Bacteriol. 76 : 417-423.

Manome , A. S. Okada , T. Uchimaru and K. Komagata. (1998). The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for thd identification of lactic acid bacteria . J. Gen. Appl. Microbiol. 44 : 371-374.

Marmur , J. (1961). A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from micro-organism . J. Mol. Biol. 3 :208-218.

Nakagawa , A. and K. Kitahara . (1959). Taxonomic studies on the genus *Pediococcus* . J. Gen. Appl. Microbiol. 5 : 95-126.

Nagata , Y. , H. Yokota , O. Kosuda , K. Yokoo , K. Takemura and T. Kikuchi. (1985). Quantification of picogram levels of specific DNA immobilized in microtiter wells. FEBS Letters 183 (2) : 379-382.

Noda , F. , K. Hayashi and T. Mizunuma. (1980). Antagonism between osmophilic lactic acid bacteria and yeast in brine fermentation of soy sauce. Appl. Environ. Microbiol. 40 : 452-457.

Okada , S. , T. Toyoda and M. Kozaki . (1978). An easy method for the determination of the optical types of lactic acid produced by lactic acid bacteria . Agric. Biol. Chem. 42 (9) : 1781-1783.

O'Leary , W.M. and Wikinson S.G. (1988). Gram-positive bacteria . In Ratledge C. and Wikinson S.G. (eds.) Microbial Lipid vol. 1. pp. 117-201. London : Academic Press.

Osaki , K. , Y. Okamoto , T. Akao and H. Takamatsu . (1985). Fermentation of soy sauce with immobilized whole cells . J. Food Sci. 50 : 1289-1292.

Phithakpol ,B. , W. Varanyanond , S. Reungmaneepatioon and H. Wood. (1995). The Traditionol Fermented Foods of Thailand. Institute of Food Research and Product Development , Kasetsart University , Bangkok : 157 pp.

Roling , W.F.M. and H.W. van Verseveld . (1996). Characterization of *Tetragenococcus halophila* population in indonesian soy mash (Kecap) fermentation . Appl. Environ. Microbiol. 62 (4) :1203-1207.

Saisithi , P. , B. Kasemsarn , J. J. Liston and A. M. Dollar. (1966). Microbiology and chemistry of fermented fish . J. Food Sci. 31 : 105-110.

Sakaguchi , K. and H. Mori. (1969). Comparative study on *Pediococcus halophilus* , *P. soyae* , *P. homari* , *P. urinae-equi* and related species. J. Gen. Appl. Microbiol. 15 : 159-167.

Sanceda , N.G. , T. Kurata and N. Arakawa . (1986). Study on the volatile compouds of fish sauce - Shottsuru , Nampla and Noucman . Agric. Biol. Chem. 50 (5) : 1201-1208 .

Satomi , M. , B. Kimura , M. Mizoi , T. Sato and T. Fuji . (1998). *Tetragenococcus muriaticus* sp. nov. , a new moderately halophilic lactic acid bacterium isolated from fermented squid liver sauce . Int. J. Syst. Bacteriol. 47 (3) : 832-836.

Sato , T. , B. Kimura and T. Fujii . (1995). Histamine contents and Histamine – metabolizing bacterial flora of fish sauce during fermentation . J. Food Hyg. Soc. Jap. 36 (6) : 763-768. Abstract from : Life Sciences 1995.

Shimoda , M. , R. R. Peralta and Y. Osajima . (1996). Headspace gas analysis of fish sauce. J. Agric. Food Chem. 44 : 3601-3605.

Sugita , H. ,T. Nalamura and Y. Deguchi. (1993). Identification of *Plesiomonas shigelloides* isolated from freshwater with the microplate hybridization method . J. Food Protect. 56 (11) : 949-953.

Sugita , H. , T. Nakamura , K. Tanaka and Y. Deguchi . (1994). Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with the microplate hybridization method. Appl. Environ. Microbiol. 60 : 3036-3038.

Suzuki , K. I. , J. Sasaki , M. Uramoto , T. Nakase and K. Komagata. (1996). *Agromyces mediolanus* sp. nov., nom. Rev. , comb. nov. , a speicess for "*Corynebacteruim mediolanum*" Mamoli 1939 and for some aniline- assimilating bacteria which contain 2, 4 - diaminobutyric acid in the cell wall peptidoglycan . Int. J. System. Bacteriol. 46 : 88-93.

Stanier , R. Y. (1986). The classification and phylogeny of bacteria . In Stanier , R. Y. , Ingraham , J. L. , Wheelis , M. L. and P. R. Painter (eds.) , The Microbial World , pp. 138-139 . New Jersey : Prentice-Hall.

Stiles , M. E. and W. H. Holzapfel . (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. Int. J. Food Microbiol. 36 : 1-29.

Tanasupawat , S. and K. Komagata . (1995). Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand . World Journal of Microbiology & Biotechnology 11 : 253-256.

Tanasupawat , S. and W. Daengsubha . (1983). *Pediococcus* species and related bacteria fonf in fermented foods and related materials in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 29 : 487-506.

Tanasupawat , S. , Y. Hashimoto , T. Ezaki , M. Kozaki and K. Komagata . (1992). *Staphylococcus piscifermentams* sp. nov. , from fermented fish in Thailand . Int. J. Syst. Bacteriol. 42 (4): 577-581.

Thitiwan S. (1996). Role of lactic acid bacteria in soy sauce fermentation. Master's Thesis, Department of Biotechnology, Graduate School, Mahidol University.

Thongthai, C., T. J. McGennity, P. Suntinanalert and W.D. Grant (1992) Isolation and characterization of an extremely halophilic archaeobacterium from traditionlly fermented Thai fish sauce (nam pla). Lett. Appl Microbiol. 14 : 111-114.

Tomaoka, J. (1994). Determination of DNA base composition. In Goodfellow, M. and A.G. O' Donnell (eds.), pp. 463-470. Chemical method in prokaryotic systematics. New York : John Wiley and Sons.

Uchida, K. (1982). Multiplicity in soy pediococci carbohydrate fermentation and its application for analysis of their flora. J. Gen. Appl. Microbiol. 28 : 215-223.

Validation of the publication of new names and new combinations previously effectively published outside the IJSB. (1994). Int. J. Syst. Bacteriol. 44 (2) : 370-371.

Villar, M., A.P. de R. Holgado, J.J. Sanchez, R.E. Trucco and G. Oliver. (1985). Isolation and characterization of *Pediococcus halophilus* from salted anchovies (*Engraulis anchoita*). Appl. Environ. Microbiol. 49 (3) : 664-666.

Wayne, G., D.J. Brenner, R.R. Colwell, P.A.D. Grimont, O. Kandler, M.J. Krichevsky, L.H. Moore, W.E.C. Moore, R.G.E. Murry, E. Stackebrandt, M.P. Starr and H.G. Truper. (1987) Report of the Ad Hoc committee on reconciliaation of approaches to bacterial systemtics Int. J. Syst. Bacteriol. 37 (4) : 463-464.

Weiss, N. (1992). The genera *Pediococcus* and *Aeromonas*. In Balows, A., H. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer. (eds.), The Prokaryotes, pp. 1502-1504. New York : Springer-Verlag.

Whittenbury, R. (1965). A study of some pediococci ans their relationship to *Aerococcus viridans* and the enterococci. J. Gen Microbiol. 40 : 97-106.

Yaeshima, T., S. Takahachi, N. Ishibashi and S. Shimamura. (1996). Identification of bifidobacteria from dairy products and evaluation of a microplate hybridization method. Int. J. Food Microbiol. 30 : 303-313.

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ปรับพีเอชเป็น 7.0 นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 15 นาที ยกเว้นสูตรอาหารบางสูตรที่จะระบุไว้โดยเฉพาะ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อเอ็มอาร์เอส

เปปโทน(peptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ(Meat extract)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์ (Yeast extract)	5.0	กรัม
กลูโคส (Glucose)	20.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนออโทฟอสฟาเทต(K_2HPO_4)	2.0	กรัม
ทวีน 80 (Tween 80)	1.0	มิลลิลิตร
โซเดียมอะซิเทตไทร ไฮเดรต ($CH_3COOHNa.3H_2O$)	5.0	กรัม
แอมโมเนียมซิเทรตไดเบสิก (ammonium citrate basic)	2.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.20	กรัม
แมกกานีสซัลเฟต ($MnSO_4 . 4H_2O$)	0.05	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	50.0	กรัม
วุ้น(Agar)	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

2. อาหารทดสอบการรีดิวส์ไนเทรต

เปปโทน	3	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5	กรัม
โปแทสเซียมไนเทรต	3	กรัม
ทวีน 80	1	มิลลิลิตร
โซเดียมคลอไรด์	50	กรัม
วุ้น	1	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. อาหารทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลสในอาหารที่มีฮีมาติน

อาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอส	980	มิลลิลิตร
ฮีมาติน (hematin)	20	มิลลิกรัม

ละลายฮีมาติน 20 มิลลิกรัมใน 0.01 นอร์มอลของโซเดียมคลอไรด์ ปริมาตร 2 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรให้เท่ากับ 20 มิลลิลิตร ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นนำไปทำให้ปลอดเชื้อโดยผ่านแผ่นกรอง (0.45 ไมครอน) จึงนำไปผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวเอ็มอาร์เอสที่ปลอดเชื้อแล้ว

4. อาหารทดสอบอาร์จีนีน

เปปโทน	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนออโทฟอสฟาเทต	0.30	กรัม
แอล-อาร์จีนีน โมโนไฮโดรคลอริก (L-arginine-HCl)	10.0	กรัม
ฟีนอลเรด (Phenol red)	0.01	กรัม
ทวีน 80	1.00	มิลลิลิตร
วุ้น	3.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

5. อาหารทดสอบการย่อยเคซีน

สารละลายสกิมมิลค์ 10 เปอร์เซนต์	10	มิลลิลิตร
อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอ็มอาร์เอส	990	มิลลิลตร

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอ็มอาร์เอสที่มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร แต่เติมน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเตรียมสารละลายสกิมมิลค์ 10 เปอร์เซนต์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นเทสารละลายสกิมมิลค์ผสมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอ็มอาร์เอสปราศจากเชื้อที่หลอม ผสมให้เข้ากันจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

6. อาหารทดสอบการย่อยเจลาติน

ผงสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
เปปโทน	5.0	กรัม

ทวีน 80	1.2	มิลลิลิตร
เจลาติน (Gelatin)	100	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

7. อาหารทดสอบการย่อยแป้ง

แป้ง (soluble starch)	20.0	กรัม
อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งเอ็มอาร์เอส (ไม่เติมกลูโคส)	1000	มิลลิลิตร

8. อาหารทดสอบการย่อยไทรบิวไทรีน

เปปโทน	5.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ	3.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	10.0	กรัม
ไทรบิวไทรีน (Tributyrin)	10.0	มิลลิลิตร
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

9. อาหารทดสอบเมธิลเรดและอะเซทธิลเมธิลคาร์บินอล (MR-VP)

กลูโคส	10.0	กรัม
ทริปโทน (Tryptone)	10.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนออโทฟอสฟาเทต	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.5	กรัม
แมกกานีสซัลเฟต ($MnSo_4 . 4H_2O$)	0.5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

10. อาหารทดสอบออกซิเดทีฟ-เฟอร์เมนท์เททีฟ (O-F medium)

เปปโทน	2.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	5.0	กรัม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลูโคส	10.0	กรัม
ทวีน 80	0.5	มิลลิลิตร
บรอมครีซอลเพอร์เพิล (Bromcresol purple)	0.04	กรัม
วุ้น	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

11 อาหารทดสอบการสร้างก๊าซซัลไฟด์ (TSI)

ผงสกัดจากเนื้อ	3.0	กรัม
เปปโทน	20.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
แลคโทส (Lactose)	10.0	กรัม
ซูโครส (Sucrose)	10.0	กรัม
เฟอร์ริคซัลเฟต ($FeSO_4 . 7H_2O$)	0.2	กรัม
โซเดียมไทโอซัลเฟต ($Na_2S_2O_3 . 5H_2O$)	0.3	กรัม
วุ้น	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

12. อาหารทดสอบการหมักน้ำตาล

ผงสกัดจากยีสต์	4.0	กรัม
เปปโทน	5.0	กรัม
ผงสกัดจากเนื้อ	5.0	กรัม
น้ำตาล	5.0	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	0.2	กรัม
แมกกานีสซัลเฟต ($MnSo_4 . 4H_2O$)	0.01	กรัม
เฟอร์ริคซัลเฟต	0.01	กรัม
บรอมคลีซอลเพอร์เพิล	0.04	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

13. อาหารทดสอบฮีสตามีน

เปปโทน	5.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
กลูโคส	1.0	กรัม
แอล-ฮีสติดีน (L-histidine)	5.0	กรัม
ทวีน 80	1.0	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

14. อาหารเลี้ยงเชื้อพีเอที (PAT)

เปปโทน	10.0	กรัม
ผงสกัดจากยีสต์	3.0	กรัม
กลูโคส	10.0	กรัม
ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนออโทฟอสฟาเทต	5.0	กรัม
โซเดียมไทโอไกลโคเลต(Sodium thioglycolate)	1.0	กรัม
โซเดียมอะซิเทต	3.3	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

15. อาหารเลี้ยงเชื้อทีวายเอ็ม (TYM)

ผงสกัดจากยีสต์	1.0	กรัม
ทริปโตน	1.0	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.7	กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต ($MgSO_4.7H_2O$)	6.3	กรัม
แมกนีเซียมคลอไรด์ ($MgCl_2 . 6H_2O$)	4.6	กรัม
แคลเซียมคลอไรด์ ($CaCl_2 . 2H_2O$)	1.2	กรัม
โซเดียมคาร์บอเนต ($NaHCO_3$)	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำแคลเซียมคลอไรด์ และ โซเดียมคาร์บอเนต นึ่งฆ่าเชื้อแยกกัน เมื่อเย็นแล้วจึงเทผสมในส่วนประกอบของอาหารอื่น ๆ ที่เตรียมไว้

16. อาหารหัวเชื้อปลาป่น

ปลาป่น	10	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	4	กรัม
น้ำกลั่น	40	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

17 อาหารหัวเชื้อปลาป่นผสมรำข้าว

ปลาป่น	5	กรัม
รำข้าว	5	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	4	กรัม
น้ำกลั่น	40	มิลลิลิตร

นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีการวิเคราะห์ทางเคมี

1. <u>การวิเคราะห์ปริมาณเปอร์เซนต์กรดทั้งหมด</u> (AOAC ,1975)

1.1 สารเคมีที่ใช้

1.1.1 0.1 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ ชั่งโซเดียมไฮดรอกไซด์ 4.0 กรัม ลงในขวดกำหนดปริมาตร (volumetric flask) ขนาด 1000 มิลลิลิตร ละลายในน้ำกลั่นจนปริมาตรเป็น 1000 มิลลิลิตร จนได้สารละลาย 0.1 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์

1.1.2 ฟีนอฟทาลีน

ผงฟีนอฟทาลีน	1.0 กรัม
เอธานอล 95 เปอร์เซนต์	100.0 มิลลิลิตร

1.1.3 สารละลายมาตรฐานโปแตสเซียมไฮโดรเจนพาทาเลต ($KHC_8H_4O_4$) อบ $KHC_8H_4O_4$ ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส ข้ามคืนและเก็บไว้ในภาชนะดูดความชื้น ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง ชั่ง $KHC_8H_4O_4$ 0.1 กรัม (ใช้เครื่องชั่งละเอียด)

1.2 การเทียบมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์

นำ $KHC_8H_4O_4$ ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปริมาตร 50 มิลลิลิตร หยดฟีนอฟทาลีน 3 หยด ลงไปเป็นตัวบ่งชี้ ทำการไทเตรตด้วย 0.1 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ นำค่าปริมาตรของโซเดียมคลอไรด์ที่ใช้ไปคำนวณความเข้มข้นมาตรฐานโดยใช้สูตร

$$\text{นอร์มอล (Normality)} = \frac{\text{น้ำหนัก (กรัม) ของ } KHC_8H_4O_4 \times 100}{\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของ NaOH} \times 204.229}$$

1.3 วิธีการหาเปอร์เซนต์กรดทั้งหมด

นำตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร ต้มให้เดือด ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง หยดฟีนอฟทาลีนลงไป 3 หยด ทำการไทเทรตด้วย 0.1 นอร์มอล ของโซเดียมไฮดรอกไซด์ และเทียบกับ ชุดควบคุม(น้ำกลั่น) 10 มิลลิลิตร บันทึกปริมาตรของโซเดียมดรอกไซด์ นำมาคำนวณหาเปอร์เซนต์กรดทั้งหมด โดยเปรียบเทียบกรดแลคติค จากสูตร

$$\text{เปอร์เซนต์กรดทั้งหมด} = \frac{\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร)ของ NaOH x นอร์มอลของ NaOH x 0.090 x 100}}{\text{ปริมาตร (มิลลิลิตร) ของตัวอย่างน้ำปลา}}$$

2. <u>การวิเคราะห์ปริมาณโซเดียมคลอไรด์</u> (NaCl)

2.1 สารเคมีที่ใช้

2.1.1 โปแตสเซียมไดโครเมต 5 เปอร์เซนต์

ชั่งโปแตสเซียมไดโครเมต (K_2CrO_4) 5 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

2.1.2 สารละลาย 0.0141 นอร์นอล ของซิลเวอร์ไนเทรต ($AgNO_3$)

ชั่งซิลเวอร์ไนเทรต 2.395 กรัม ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร ขนาด 1000 มิลลิลิตร

2.2.3 การเทียบมาตรฐานของซิลเวอร์ไนเทรต

ชั่งโซเดียมคลอไรด์ 0.5844 กรัม (อบที่ 100 องศาเซลเซียส นาน 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในภาชนะดูดความชื้นก่อนชั่ง) ละลายน้ำกลั่น ปรับปริมาตรให้เป็น 100 มิลลิลิตร ในขวดกำหนดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร ปิเปตสารละลายโซเดียมคลอไรด์ที่เตรียมปริมาตร 5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ หยดตัวบ่งชี้โปแตสเซียมไดโครเมต 3-4 หยด แล้วนำไปไทเทรตกับซิลเวอร์ไนเทรต จนได้สีแดงอิฐที่จุดยุติ นำปริมาตรของซิลเวอร์ไนเทรต ที่ใช้ไปคำนวณจากสูตร

$$N_1V_1 = N_2V_2$$

เมื่อ N_1 = นอร์มอลของซิลเวอร์ไนเทรต

N_2 = นอร์มอลของโซเดียมคลอไรด์

V_1 = ปริมาตรของซิลเวอร์ไนเทรต

V_2 = ปริมาตร ของโซเดียมคลอไรด์

2.2 วิธีเคราะห์ปริมาณโซเดียม

ปิเปตตัวอย่างน้ำปลา 1 มิลลิลิตร ทำเจือจาง 1000 เท่า เติมโปแตสเซียมไดโครเมต เป็นตัวบ่งชี้ 1 มิลลิลิตร นำมาไทเทรตด้วย 0.0141 นอร์มอล ของซิลเวอร์ไนเทรตมาตรฐาน จนได้สีแดงอิฐ ที่จุดยุติ นำปริมาตรของซิลเวอร์ไนเทรต มาคำนวณตามสูตร

$$\text{ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (กรัมต่อลิตร)} = \frac{(\text{ปริมาตรของซิลเวอร์ไนเทรต} - \text{Blank}) \times 0.5 \times 1000}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง}}$$

3. การย้อมสีแกรม

3.1 แกรมคริสตัลไวโอเลต

สารละลาย A :	คริสตัลไวโอเลต	2.0	กรัม
	เอธานอล 95 เปอร์เซนต์	20.0	มิลลิลิตร
	ละลายคริสตัลไวโอเลตในเอธานอล		
สารละลาย B :	แอมโมเนียมออกซาเลต	0.8	กรัม
	น้ำกลั่น	80.0	มิลลิลิตร

ละลายแอมโมเนียมออกซาเลตในน้ำกลั่น ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน

3.2 แกรมไอโอดีน

ผงไอโอดีน	1.0	กรัม
โปแตสเซียมไอโอไดด์	2.0	กรัม
น้ำกลั่น	300.0	มิลลิลิตร

ผสมผงไอโอดีน และโปแตสเซียมไอโอไดด์ในโกร่ง บดให้เข้ากัน ละลายด้วยน้ำกลั่น จน ปริมาตร 300.0 มิลลิลิตร แล้วผสมให้เข้ากัน

3.3 แกรมซาฟานิน

ซาฟานิน	0.25	กรัม
เอธานอล 95 เปอร์เซนต์	10.0	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0	มิลลิลิตร

ละลายซาฟานินในเอธานอล เติมน้ำกลั่นแล้วผสมให้เข้ากัน กรองผ่านกระดาษกรอง

4. สารทดสอบการรีดิวส์ในเทรด

สารละลาย A : Dimethyl-naphthylamine	0.6	มิลลิลิตร
กรดอะซีติค (5 N)	1000.0	มิลลิลิตร
สารละลาย B : Sulfanilic acid	8.0	กรัม
กรดอะซีติค (5N)	1000.0	มิลลิลิตร

5. สารทดสอบการสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride	1	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

เตรียมใหม่ทุกครั้ง

6. สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซนต์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 95 เปอร์เซนต์	0.31	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	9.69	มิลลิลิตร

เก็บไว้ในขวดสีชา และในตู้เย็น

7. สารละลายทดสอบการสร้างกรดด้วยเมธิลเรด

เมธิลเรด	0.04	กรัม
เอธานอล	40	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	จนถึง 100	มิลลิลิตร

ละลายเมธิลเรดในเอธานอล ปรับปริมาตรสารละลายด้วยน้ำกลั่นเป็น 100 มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

8. สารละลายทดสอบอะเซทธิลเมธิลคาร์บินอล

สารละลาย A : แอลฟา-แนฟทอล	5.0	กรัม
เอธานอล	100	มิลลิลิตร
ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในขวดสีชา		
สารละลาย B : โปแตสเซียมไฮดรอกไซด์	40	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

9. สารละลายบ่งชี้บรอมครีซอลเพอร์เพิล

ผงบรอมครีซอลเพอร์เพิล	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

10. สารละลายชาลีนอีดีทีเอ

อีดีทีเอ	37.22	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	8.76	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร
ปรับพีเอชด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ จนได้พีเอชเท่ากับ 8.0		

11. บัฟเฟอร์ทริสเอสดีเอส

ทริส	1.21	กรัม
เอสดีเอส	10	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

12. บัฟเฟอร์ทริส พีเอช 9.0

ทริส	1.21	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	0.54	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

13. สารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม

ฟีนอล	100	มิลลิลิตร
คลอโรฟอร์ม	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

14. สารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต (10xSSC)

ไทรโซเดียมซิเทรต	5.91	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	8.76	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต 0.1xSSC คือ นำสารละลาย 10xSSC มา 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางด้วยน้ำกลั่นในขวดกำหนดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร จนได้ปริมาตรเท่ากับ 100 มิลลิลตร

15 สารละลายเอนไซม์อาร์เอนเอสเอ

15.1 50 มิลลิโมลลาร์ ของทริสไฮโดรคลอริคพีเอช 7.5

ทริส	0.06	กรัม
น้ำกลั่น	10	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริก จนได้พีเอชเท่ากับ 7.5

15.2 เอนไซม์อาร์เอนเอสเอ	0.1	กรัม

ชั่งผงเอนไซม์อาร์เอนเอสเอ 0.1 กรัม ละลายใน 50 มิลลิโมลลาร์ของทริสไฮโดรคลอริค ปริมาตร 10 มิลลิลิตร และนำไปแช่น้ำร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำลายเอนไซม์ดีเอ็นเอส (DNase) ทำให้เย็นและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

16. ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีนพีเอช 7.2 (2xPBS)

Na_2PO_4	2.3	กรัม
KH_2PO_4	0.4	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	16.0	กรัม
โปแตสเซียมคลอไรด์	0.4	กรัม

17 สารละลาย 0.1 โมลลาร์ของแมกนีเซียมคลอไรด์

แมกนีเซียมคลอไรด์	0.95	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

18. บัฟเฟอร์ทริสไฮโดรคลอริคพีเอช 9.0

ทริส	1.21	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริค จนได้พีเอชเท่ากับ 9.0

19. สารละลายพรีไฮบริไดเซชั่น

19.1 สารละลาย 100 x Denhardt

อัลบูมินโบวีน	2	กรัม
โพลีไวนิลไพโลลิโดน	2	กรัม
ฟีคอล 400	2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

19.2 สารละลายซาลมอนสเปิร์มดีเอ็นเอ

ซาลมอนสเปริมดีเอ็นเอ	10	มิลลิกรัม

บัฟเฟอร์ทริสอีดีทีเอ พีเอช 7.6

ทริส	0.121	กรัม
อีดีทีเอ	0.037	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ละลายซาลมอนสเปริมดีเอ็นเอในบัฟเฟอร์ทริสอีดีทีเอ พีเอช 7.6 นำมาต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที และแช่เย็นทันที หลังจากนั้นนำไปผ่านเครื่องสั่นโดยใช้เสียง เป็นเวลา 3 นาที

19.3 สารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต (20xSSC)

ไทรโซเดียมซิเทรต	8.8	กรัม
โซเดียมคลอไรด์	17.5	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

สารละลายพรีไฮบริไดเซชั่นเตรียมได้ดังนี้

สารละลาย 100x Denhardt	5	มิลลิลิตร
สารละลายซาลมอนสเปิร์มดีเอ็นเอ	1	มิลลิลิตร
สารละลายซาลีนโซเดียมซิเทรต 20xSSC	10	มิลลิลตร
ฟอร์มามายด์	50	มิลลิลตร
น้ำกลั่น	34	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

20. สารละลายไฮบริไดเซชั่น

สารละลายพรีไฮบริไดเซชั่น	100	มิลลิลิตร
เดกซแทรนซัลเฟต	5	กรัม

21. สารละลายอัลบูมินโบวีน

อัลบูมินโบวีน	0.25	กรัม
ไทรทอน X-100	50	ไมโครลิตร
ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลีน	50	มิลลิลิตร

22. สารละลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เชื่อมติดกับสเทรปทาวิดิน

สารละลายอัลบูมินโบวีน	10	มิลลิลิตร
เอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เชื่อมติดกับสเทรปทาวิดิน	10	ไมโครลิตร

23 สารละลายเทรทาเมธิลเบนซิดีนกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

23.1 บัฟเฟอร์กรดซิตริคกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต

กรดซิตริค	1.92	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	7.16	กรัม
ไดเมธิลฟอร์มามายด์ 10 เปอร์เซนต์	100	มิลลิลิตร

23.2 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.3 เปอร์เซนต์

ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 95 เปอร์เซนต์	0.03	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	9.97	มิลลิลิตร

23.3 สารละลายเทรทาเมธิลเบนซิดีน

3,3',5,5' เทรทาเมธิลเบนซิดีน	10	มิลลิกรัม
ไดเมธิลฟอร์มามายด์	1	มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายเทรทาเมธิลเบนซิดีนกับไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ดังนี้

บัฟเฟอร์กรดซิตริคกับไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	5	มิลลิลิตร
สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.3 เปอร์เซนต์	0.1	มิลลิลิตร
สารละลายเทรทาเมธิลเบนซิดีน	0.1	มิลลิลิตร

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

24. สารละลายออร์โท-พาทาลลิคไดอัลดีไฮด์

ออร์โท-พาทาลลิคไดอัลดีไฮด์	0.025	กรัม
เมธานอล	25	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์

25. สารละลายเอ็นเอดี (NAD)

NAD	10	มิลลิกรัม
น้ำกลั่น	1	มิลลิลิตร

เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และต้องเตรียมใหม่ทุกสัปดาห์

26. บัฟเฟอร์ทริส พีเอช 7.5 และพีเอช 8.1

ทริส	2.4	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

ปรับพีเอชด้วยกรดไฮโดรคลอริค จนได้พีเอชเท่ากับ 7.5และ 8.1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมบัติบางประการของน้ำปลา โรงงาน A

เดือน	พีเอช		ปริมาณกรดแลคติค (%)		ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (%)	
	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ
0	5.43	5.43	1.15	1.15	20.75	20.75
1	5.43	5.23	1.12	1.21	23.62	20.62
2	5.36	5.10	1.01	2.38	19.75	20.75
3	5.23	5.14	2.07	2.52	21.50	20.76
4	5.38	5.17	1.80	2.31	20.50	19.75
5	6.31	5.10	1.53	1.66	22.00	21.25
6	5.45	5.12	1.66	1.68	20.00	21.25
7	5.66	5.14	2.00	2.13	18.55	19.25
8	5.36	5.36	2.31	2.47	18.87	18.87
9	5.26	4.99	1.93	2.92	18.86	18.75
10	5.78	5.33	0.76	2.52	19.12	19.00
11	5.67	5.30	2.07	2.38	19.55	18.75
12	5.76	5.32	2.00	2.20	18.25	20.25
18	5.25	5.06	1.98	1.98	19.25	19.25

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมบัติบางประการของน้ำปลา โรงงาน B

เดือน	พีเอช		ปริมาณกรดแลคติค (%)		ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (%)	
	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ
0	5.69	5.69	0.90	0.90	24.00	24.00
1	5.45	5.37	1.66	1.80	21.75	23.50
2	5.45	5.60	1.85	1.99	21.00	20.50
3	5.38	5.06	1.96	3.20	19.25	23.05
4	5.60	5.11	1.86	3.10	19.75	19.25
5	5.17	5.24	3.00	3.26	22.00	21.75
6	5.33	5.18	2.89	2.79	19.25	23.25
7	5.60	5.74	1.55	3.70	31.00	27.25
8	5.30	5.37	1.75	2.85	28.75	28.00
9	5.41	5.51	1.55	2.30	27.25	28.62
10	5.40	5.19	1.30	2.85	28.75	28.55
11	5.35	5.29	1.95	2.45	28.50	26.75
12	5.39	5.38	2.40	2.30	20.00	25.75

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมบัติบางประการของน้ำปลา โรงงาน C

เดือน	พีเอช		ปริมาณกรดแลคติค (%)		ปริมาณโซเดียมคลอไรด์ (%)	
	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ	ผิวบ่อ	ก้นบ่อ
0	5.67	5.67	0.74	0.74	26.75	26.75
1	6.30	5.29	0.20	1.98	25.50	22.00
2	5.60	5.41	1.44	1.84	25.25	24.00
3	5.47	5.26	1.84	2.25	24.90	30.25
4	5.51	5.39	1.84	1.89	28.75	31.25
5	5.63	5.28	0.81	1.53	30.00	27.00
6	5.78	5.30	1.08	1.89	25.50	24.50
7	5.65	5.54	1.57	2.18	29.00	25.25
8	5.56	5.22	1.41	2.20	32.00	26.75
9	5.71	5.26	0.72	2.43	31.50	28.25
10	5.54	5.35	1.84	2.00	30.25	26.75
11	5.86	5.38	0.70	2.10	28.25	29.00
12	4.97	4.78	2.47	3.74	29.50	32.50

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม จากโรงงาน A

รูปแบบที่	Mel	Ara	Mal	Gal	Xyl	Rib	รหัสเชื้อ
I	+	+	+	+	+	+	K0-1 , K0-2 K1-8,K1-30,K1-35,K1-36 K2-15,K2-25,K2-30,K2-31, K2-33,K2-34,K2-41,K2-44 K3-24,K3-25 K4-1,K4-2,K4-3,K4-4,K4-5, K4-6,K4-7,K4-8,K4-9,K4-10, K4-11,K4-13,K4-15,K4-17, K4-21,K4-22,K4-25,K4-32, K4-36,K4-38,K4-41,K4-43, K4-45,K4-46,K4-48,K4-51 K5-36,K5-38,K5-46,K5-52 K6-26,K6-27,K6-28,K6-30, K6-33,K6-34,K6-36,K6-39, K6-44,K6-45,K6-46 K8-5,K8-6,K8-8,K8-9,K8-10, K8-14,K8-16,K8-18,K8-20 K18-4

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแบบที่	Mel	Ara	Mal	Gal	Xyl	Rib	รหัสเชื้อ
2	-	+	+	+	+	+	K1-37,K1-39,K1-40 K2-2,K2-27,K2-28,K2-35,K2-36 K3-6,K3-7,K3-10,K3-22,K3-28, K3-37,K3-39,K3-43 K4-14,K4-18,K4-20,K4-23, K4-24,K4-26,K4-27,K4-39, K4-40,K4-44 K5-28,K5-30,K5-31,K5-32, K5-39,K5-40,K5-41,K5-44, K5-45,K5-47,K5-48,K5-56 K6-29,K6-40,K6-42,K6-50 K8-13,K8-19 K9-2,K9-4
3	-	-	+	+	+	+	K0-3 K3-40,K3-42,K3-47 K4-50 K6-32
4	-	-	-	+	+	+	K1-23 K2-32 K5-54
5	-	-	-	-	+	+	K1-1,K1-6,K1-9,K1-14 K2-40
6	-	-	-	-	-	+	K1-5,K1-7,K1-10,K1-16,K1-18, K1-22,K1-24,K1-31,K1-32, K1-33,K1-34,K1-38,K1-43 K2-1,K2-7,K2-8,K2-18,K2-19, K2-20,K2-22,K2-26 K3-4 K5-42

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแบบที่	Mel	Ara	Mal	Gal	Xyl	Rib	รหัสเชื้อ
7	+	+	+	+	-	+	K4-19
8	+	+	+	-	+	+	K6-41
9	+	-	+	+	+	+	K3-26,K3-34 K4-16,K4-28,K4-29,K4-30,K4-37 K6-25,K6-37,K6-47
10	+	-	+	-	+	+	K6-35
11	-	+	+	+	-	+	K2-17 K4-34
12	-	+	-	-	+	-	K1-45 K9-1
13	-	+	-	+	+	+	K1-2,K1-11,K1-17,K1-19, K1-20,K1-25,K1-26,K1-28, K1-42,K1-44 K2-3,K2-4,K2-5,K2-10,K2-11, K2-12,K2-14,K2-16,K2-21, K2-24,K2-43 K3-8,K3-19,K3-35,K3-46,K3-48 K5-37,K5-43,K5-49,K5-51,K5-53 K8-1,K8-2,K8-4,K8-11,K8-12,K8-17 K9-3 K18-2,K18-3,K18-6,K18-7, K18-8,K18-9,K18-10,K18-11, K18-12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแบบที่	Mel	Ara	Mal	Gal	Xyl	Rib	รหัสเชื้อ
14	-	+	-	-	+	+	K1-3,K1-41 K2-6,K2-9 K3-1,K3-13,K3-21,K3-30,K3-38, K3-41 K4-47,K4-49 K5-55 K8-7 K18-1,K18-5,K18-13
15	-	+	-	-	-	+	K1-15,K1-46 K3-33
16	-	+	-	+	-	+	K1-21,K1-29 K3-27
17	-	+	+	-	+	+	K3-18
18	-	-	+	+	-	+	K2-13,K2-29,K2-37,K2-39,K2-42 K3-2,K3-3,K3-5,K3-9,K3-11, K3-12,K3-14,K3-15,K3-16, K3-17,K3-20,K3-23,K3-29, K3-32,K3-36 K4-31,K4-42
19	-	-	+	-	-	+	K8-3
20	-	-	-	+	-	+	K1-4,K1-12,K1-13,K1-27 K2-28

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม จากโรงงาน B

รูปแบบที่	Mel	Ara	Mal	Gal	Xyl	Rib	รหัสเชื้อ
1	+	+	+	+	+	+	PM-1,PM-2,PM-3,PM-4,PM-5, PM-11,PM-12,PM-13,PM-14, PM-16,PM-17,PM-18,PM-19, PW-7,PW-10,PW-11,PW-12, PW-13,PW-17,PW-18,PW-21 PS30-3,PB30-1,PB30-4 PS60-1,PS60-2,PS60-3, PS60-4,PB60-2,PB60-4 P3-3 P7-2,P7-3,P7-4,P7-5,P7-6,P7-9, P7-10,P7-11,P7-14,P7-15,P7-16, P7-17,P7-19,P7-21,P7-22,P7-23, P7-26,P7-29,P7-30,P7-31,P7-32, P7-33,P7-34,P7-35
2	-	+	+	+	+	+	PW-15 P3-2,P3-4,P3-5 P6-1,P6-2,P6-3,P6-4 P7-18
3	-	-	+	+	+	+	PM-8,PW-9,PW-16,PW-20 PB30-3, P3-1 P4-1,P4-5,P5-2 P7-7,P7-12,P7-20
4	-	-	-	-	-	+	PS30-1,PS30-2,PB30-2 P5-2 P7-37

รูปแบบที่	Mel	Ara	Mal	Gal	Xyl	Rib	รหัสเชื้อ
5	-	-	-	-	-	-	PW-8
6	+	+	+	-	+	+	P7-27
7	+	+	-	-	-	+	PW-5
8	-	+	+	+	-	+	PW-14 PS60-6
9	-	+	-	-	+	-	PM-15
10	-	+	-	+	-	+	PW-6
11	-	+	+	-	+	+	PM-10 PB60-3
12	-	+	-	+	+	+	P4-2,P4-4,P4-6 P5-3
13	-	-	+	+	-	+	P7-28
14	-	-	+	-	+	+	PM-21 P7-24,P7-25
15	-	-	+	-	-	+	P7-36
16	-	-	-	+	+	+	P4-3

รูปแบบการหมักน้ำตาลของแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม จากโรงงาน C

รูปแบบที่	Mel	Ara	Mal	Gal	Xyl	Rib	รหัสเชื้อ
1	+	+	+	+	+	+	C1-1,C1-2,C1-3,C1-4,C1-5,C1-6, C1-7,C1-8,C1-10,C1-11,C1-12, C1-13,C1-14,C1-15,C1-16, C1-17,C1-18,C1-19,C1-20
2	-	+	+	+	+	+	CO-1,CO-2 C1-9
3	-	-	-	-	-	-	C2-1

การจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติคชอบเค็ม โดยใช้ลักษณะฟีโนไทป์ที่แตกต่างกัน

กลุ่มที่ 1

Characteristics	K0-2	K2-2	K2-7	K2-15	PM-8	P7-7	PB60-2	CO-1	C0-2
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+
casien	+	+	+	+	+	+	+	+	+
gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-
starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;									
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Lactose	-	-	-	+	-	-	+	+	+
D-Mannitol	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	-	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	-	+	+	+	+	-	+	-	-
Methyl-glucoside	-	+	-	+	+	+	+	-	+
L-Raffinose	-	-	-	-	-	-	+	-	-

Characteristics	K0-2	K2-2	K2-7	K2-15	PM-8	P7-7	PB60-2	CO-1	C0-2
L-Rhamnose	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Salicin	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	+	+	+	+	+	+	-	-
L-Sorbose	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Sucrose	-	-	-	+	-	-	+	+	+
D-Trehalose	-	+	+	+	-	-	+	+	+
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	-	+	+	+	+	-	-	+	+
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	-	-
25%	+	+	+	+	+	+	+	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 2

Characteristics	K1-3	K1-12	K1-14	K1-15	K1-21	K1-27	K1-35	K1-37	K1-41	K1-42	K1-45	K1-46	K2-3	K2-9	K2-26	K2-28	K2-32
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
casien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;																	
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Methyl-glucoside	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
L-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Characteristics	K1-3	K1-12	K1-14	K1-15	K1-21	K1-27	K1-35	K1-37	K1-41	K1-42	K1-45	K1-46	K2-3	K2-9	K2-26	K2-28	K2-32
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Trehalose	+	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

กลุ่มที่ 2 (ต่อ)

Characteristics	K2-40	K3-1	K3-4	K3-6	K3-8	K3-28	K3-33	K3-35	K3-38	K3-43	K3-46	K5-31	K5-36	K5-37	K5-38	K5-42	K5-43	K5-50
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;																		
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-
Methyl-glucoside	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-

Characteristics	K2-40	K3-1	K3-4	K3-6	K3-8	K3-28	K3-33	K3-35	K3-38	K3-43	K3-46	K5-31	K5-36	K5-37	K5-38	K5-42	K5-43	K5-50
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 2 (ต่อ)

Characteristics	K5-51	K5-52	K5-53	K5-54	K6-29	K8-1	K8-7	K8-11	K8-13	K8-14	K9-1	K9-3	K18-3	K18-4	K18-6	K18-9	K18-12	PM-15
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;																		
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
Esculin	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
Methyl-glucoside	-	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-
L-Raffinose	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-

Characteristics	K5-51	K5-52	K5-53	K5-54	K6-29	K8-1	K8-7	K8-11	K8-13	K8-14	K9-1	K9-3	K18-3	K18-4	K18-6	K18-9	K18-12	PM-15
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 2 (ต่อ)

Characteristics	PW-5	PW-6	PW-8	P7-18	P7-37	P4-2	P4-3	P4-4	P5-1	P5-3	P6-1	P6-2	P6-3	P6-4	C2-1
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casien	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;															
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
D-Mannose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Methyl-glucoside	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Characteristics	PW-5	PW-6	PW-8	P7-18	P7-37	P4-2	P4-3	P4-4	P5-1	P5-3	P6-1	P6-2	P6-3	P6-4	C2-1
L-Rhamnose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Sucrose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Trehalose	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 3

Characteristics	K1-8	K1-10	K1-11	K1-23	K2-13	K2-17	K2-35	K3-2	K3-24	K3-29	PW-14	PW-15	P4-1	P4-5	P4-6	P5-2
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;																
Amygdalin	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Dextrin	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+
Lactose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Mannose	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
Methyl-glucoside	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L-Raffinose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Characteristics	K1-8	K1-10	K1-11	K1-23	K2-13	K2-17	K2-35	K3-2	K3-24	K3-29	PW-14	PW-15	P4-1	P4-5	P4-6	P5-2
L-Rhamnose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	-
Sorbitol	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-
Sucrose	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Trehalose	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 4

Characteristics	K2-27	K2-37	K2-34	K2-44	K4-2	K4-13	K4-15	K4-16	K4-19	K4-18	K4-30	K4-31	K4-32	K4-34	K4-40	K4-41	K4-50	K4-47
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Casien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;																		
Amygdalin	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Esculin	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Lactose	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
D-Mannitol	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-
Methyl-glucoside	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
L-Raffinose	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Characteristics	K2-27	K2-37	K2-34	K2-44	K4-2	K4-13	K4-15	K4-16	K4-19	K4-18	K4-30	K4-31	K4-32	K4-34	K4-40	K4-41	K4-50	K4-47
L-Rhamnose	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-
Salicin	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-
L-Sorbose	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+
Sucrose	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
D-Trehalose	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 4 (ต่อ)

Characteristics	K4-46	K5-55	K6-25	K6-26	K6-32	K6-35	K6-36	K6-41	K8-3	K8-5	PM-10	PM-13	PW-7	PW-9	PW-13	PS30-2	PB30-1	PB30-3
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
casien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;																		
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+
Lactose	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+
D-Mannitol	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+	+	+	-	+
D-Mannose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Methyl-glucoside	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Raffinose	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+

Characteristics	K4-46	K5-55	K6-25	K6-26	K6-32	K6-35	K6-36	K6-41	K8-3	K8-5	PM-10	PM-13	PW-7	PW-9	PW-13	PS30-2	PB30-1	PB30-3
L-Rhamnose	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Sucrose	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	-	+	-	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	-
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 4 (ต่อ)

Characteristics	PS60-2	PS60-6	P3-1	P3-2	P3-3	P3-4	P3-5	P7-2	P7-14	P7-23	P7-25	P7-26	P7-27	P7-28	P7-36	C1-1	C1-2	C1-3
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
casien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;																		
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Esculin	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	-
Lactose	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
D-Mannitol	+	-	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
Methyl-glucoside	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
L-Raffinose	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-

Characteristics	PS60-2	PS60-6	P3-1	P3-2	P3-3	P3-4	P3-5	P7-2	P7-14	P7-23	P7-25	P7-26	P7-27	P7-28	P7-36	C1-1	C1-2	C1-3
L-Rhamnose	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+
Salicin	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
D-Trehalose	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 4 (ต่อ)

Characteristics	C1-4	C1-5	C1-6	C1-7	C1-8	C1-9	C1-10	C1-11	C1-12	C1-13	C1-14	C1-15	C1-16	C1-17	C1-18	C1-19	C1-20
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
casien	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
starch	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;																	
Amygdalin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dextrin	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	+	-	+
D-Mannitol	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Methyl-glucoside	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
L-Raffinose	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+

Characteristics	C1-4	C1-5	C1-6	C1-7	C1-8	C1-9	C1-10	C1-11	C1-12	C1-13	C1-14	C1-15	C1-16	C1-17	C1-18	C1-19	C1-20
L-Rhamnose	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D-Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
10%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 5

Characteristics	K1-31	K2-29	K3-26	K6-50	K9-2	K9-4	K18-1	K18-2
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase with hematin	+	+	+	+	+	+	+	+
Hydrolysis of arginine	-	-	-	-	-	-	-	-
casien	+	+	+	+	+	+	+	+
gelatin	-	-	-	-	-	-	-	-
Tributyrin	-	-	-	-	-	-	-	-
starch	-	-	-	-	-	-	-	-
MR	+	+	+	+	+	+	+	+
VP	-	-	-	-	-	-	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F	F	F	F	F	F	F
H_2S production	-	-	-	-	-	-	-	-
Acid production from ;								
Amygdalin	+	-	+	-	+	+	-	-
D-Cellobiose	+	+	+	-	+	+	+	-
Dextrin	-	-	-	-	+	+	+	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	-	+
D-Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	+	+	-	+
Lactose	-	-	-	-	+	+	-	-
D-Mannitol	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Mannose	-	+	+	+	+	+	+	+
D-Melibiose	+	-	-	-	+	+	-	-
Methyl-glucoside	-	-	+	-	-	-	-	-
L-Raffinose	-	-	-	-	+	+	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Characteristics	K1-31	K2-29	K3-26	K6-50	K9-2	K9-4	K18-1	K18-2
L-Rhamnose	-	-	-	-	+	+	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	-	+	+
Sorbitol	+	+	-	+	+	+	+	+
L-Sorbose	+	-	+	-	+	+	-	-
Sucrose	-	-	+	-	+	+	-	-
D-Trehalose	-	-	-	+	+	+	+	+
Growth at 40 C	+	+	+	+	+	+	+	+
50 C	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 4.2	-	-	-	-	-	-	-	-
5.0	-	-	+	-	-	-	-	-
6.5	+	+	+	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+	+	+	+
9.0	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at NaCl 0 %	-	-	-	-	-	-	-	-
10%	+	+	+	+	+	+	+	+
15%	+	+	+	+	+	+	+	+
20%	+	+	+	+	+	+	+	+
25%	+	+	+	+	+	+	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กลุ่มที่ 6

Characteristics	K3-40	K3-42
Oxidase	-	-
Catalase with hematin	+	+
Hydrolysis of arginine	-	-
casien	-	-
gelatin	-	-
tributyrin	-	-
starch	-	-
MR	+	+
VP	-	-
Oxidative/Fermentative	F	F
H_2S production	-	-
Acid production from ;		
Amygdalin	-	-
D-Cellobiose	-	-
Dextrin	-	-
Esculin	-	-
D-Fructose	+	+
Glycerol	-	-
Lactose	-	-
D-Mannitol	+	+
D-Mannose	+	+
D-Melibiose	-	-
Methyl-glucoside	-	-
L-Raffinose	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Characteristics	K3-40	K3-42
L-Rhamnose	-	-
Salicin	-	-
Sorbitol	-	-
L-Sorbose	-	-
Sucrose	-	-
D-Trehalose	-	-
Growth at 40 C	+	+
50 C	-	-
Growth at pH 4.2	-	-
5.0	-	-
6.5	+	+
8.0	+	+
9.0	+	+
Growth at NaCl 0 %	-	-
10%	+	+
15%	+	+
20%	+	+
25%	+	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวจารุวรรณ ทองสนิท เกิดวันที่ 21 มกราคม พ.ศ. 2517 ที่จังหวัดพิษณุโลก สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ในปีการศึกษา 2538 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยาทางอุตสาหกรรม คณะวิทยาศาสตร์ ที่จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2539 และสำเร็จการศึกษาในภาคปลาย ปีการศึกษา 2542

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย