การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของแบคทีเรียแลคโตบาซิลไล ที่แยกจากอาหารหมักดอง

Study of Phenotypic Characterization of Lactobacilli Bacteria Isolated from Fermented Foods

โดย

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์
สุมนา วรรธนะภูติ

576.163
ส257ร
ฉ.1

2530

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ทุนงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ.๒๕๒๗

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายงานผลการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของแบคทีเรียแลคโตบาซิลไลที่แยกจากอาหารหมักดอง

Study of Phenotypic Characterization of Lactobacilli Bacteria Isolated from Fermented Foods

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดย

ผศ.สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

รศ.สุมนา วรรธนะภูติ

๒๕๓๐

I10341468

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
รายการตารางประกอบ	ง
บทที่	
๑. บทนำ	๑
๒. แนวเหตุผล วัตถุประสงค์ และขอบเขตของการวิจัย	๑๐
๓. วัสดุและวิธีการ	๑๑
๔. ผลการทดลอง	๑๖
๕. วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง	๓๔
เอกสารอ้างอิง	๓๖
ภาคผนวก	๓๘

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง การศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ของแบคทีเรียแลคโตบาซิลไลที่แยกจากอาหารหมักดอง

ผู้วิจัยหลัก สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์

ผู้วิจัยร่วม สุมนา วรรธนะภูติ

เดือนปีที่ทำวิจัยเสร็จ พฤษภาคม พ.ศ.๒๕๓๐

บทคัดย่อ

การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ของเชื้อแลคโตบาซิลไลทั้งหมด ๗๐ ไอโซเลตที่แยกจากอาหารหมักดองหลายชนิด พบว่า เชื้อแบคทีเรียเหล่านี้มีรูปร่างแท่งติดสีแกรมบวก ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีเอนไซม์แคตาเลส ไม่มี iron porphyrin ทั้งหมดเป็น-แบคทีเรียจำพวก microaerophiles ซึ่งสามารถสลายกลูโคสได้ ไม่รีดิวส์ไนเตรต ไม่สลายเจลาตินและแป้ง ไม่สร้างเมือกจากการใช้น้ำตาลซูโครส และไม่สร้างแก๊สจากการใช้น้ำตาลกลูโคส บางเชื้อสามารถสลายเอสคิวลินหรืออาร์จินีนได้ บางเชื้อทำให้โปรตีนแข็งตัวและ/หรือรีดิวส์ลิตมัสในอาหารนมได้ เชื้อส่วนใหญ่สามารถใช้กลูโคเนตแล้วให้แก๊ส แต่ปฏิกิริยาทางชีวเคมีของเชื้อเหล่านี้แตกต่างกัน บางเชื้อสามารถทำให้เกิดกรดจากการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ ที่นำมาทำการทดลอง เชื้อเหล่านี้สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีความเป็นกรดหรือด่างที่ pH ระหว่าง ๔.๕ - ๘.๐ และในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ ๒.๐ เปอร์เซนต์ คุณสมบัติของเชื้อที่ทนเกลือได้ในขนาดสูงในอาหารเหลวที่มีโซเดียมคลอไรด์ ๔.๐ - ๘.๐ เปอร์เซนต์ มีความแตกต่างกันไป ซึ่งอาจสัมพันธ์กับความเป็นกรดด่างของอาหารและกับอุณหภูมิที่ใช้ในการเจริญด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อเหล่านี้ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ไบโอติน หรือ ไพริดอกซีน และยังมีบางเชื้อที่เจริญได้ในอาหารซึ่งใช้วิเคราะห์ไธอะมีน หรือ กรดโฟลิค หรือ ริโบฟลาวิน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Project Title : Study of Phenotypic Characterization of Lactobacilli Bacteria Isolated from Fermented Foods.

Name of Investigators: Somboon Tanasupawat
Sumana Vardhanabhuti

Year : May, 1987

ABSTRACT

Seventy lactobacilli isolated from various kinds of fermented foods were characterized phenotypically. They were found to be gram-positive rod shape bacilli, non-motile, non-spore forming, and do not possess catalase enzyme or iron porphyrin. All are microaerophiles which can utilize glucose fermentatively, and none can reduce nitrate nor hydrolyse gelatin or starch. No slimy formed from sucrose utilization, and no gas produced from glucose. Some isolates are able to hydrolyse aesculin or arginine. Some can coagulate protein and/or reduce litmus in milk medium. Most of them can ferment gluconate with gas production. Their biochemical reactions in many sugar media tested are varied in acid production. All isolates were found to grow in acid or alkaline media pH of about 4.5 to 8.0 and in broth culture containing 2.0 percent of sodium chloride. Their halotolerant properties in 4.0 -8.0 percent sodium chloride media, however, are varied and seem to be pH and temperature dependent. Moreover these bacteria were found unable to grow in biotin or pyridoxine assay medium. The ability to grow in thiamine or folic acid or riboflavin assay medium was found possible to certain isolates.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้สถานที่เพื่อปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ในการศึกษาลักษณะเชื้อและขอขอบคุณจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้จัดสรรทุนวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินประจำปี ๒๕๒๗ ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงด้วยดี

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางประกอบ

ตารางที่		หน้า
1.	Physiological and biochemical characteristics of the obligately homofermentative species of the genus Lactobacillus (Group I)	3
2.	Physiological and biochemical characteristics of the facultatively heterofermentative species of the genus Lactobacillus (Group II)	4
3.	Physiological and biochemical characteristics of obligately heterofermentative species of the genus Lactobacillus (Group III)	5
4.	Pattern of fermented carbohydrates of the obligately homofermentative species of the genus Lactobacillus (Group I)	6
5.	Pattern of fermented carbohydrates of the facultatively heterofermentative species of the genus Lactobacillus (Group II)	7
6.	Pattern of fermented carbohydrates of the obligately heterofermentative species of the genus Lactobacillus (Group III)	8
7.	Nutritional requirements of Lactobacillus species	9
8.	ชนิดตัวอย่าง แหล่งที่มา วันเดือนปี และรหัสเชื้อ	17
9.	General characteristics of Lactobacillus species isolated from fermented foods.	19
10.	Pattern of fermented carbohydrates of Lactobacillus species isolated from fermented foods.	26
11.	Growth in vitamin assay medium of Lactobacillus species isolated from fermented foods.	30
12.	Grouping of Lactobacillus species isolated from fermented foods.	35

บทที่ ๑

บทนำ

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบคทีเรียกรดแลคติคประกอบด้วยเชื้อสกุล Lactobacillus Leuconostoc Streptococcus และ Pediococcus จุลินทรีย์เหล่านี้กระจายทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะจะพบ Lactobacillus มากกว่าเชื้อสกุลอื่นที่กล่าวมา ซึ่งพบว่าเกี่ยวข้องกับขบวนการผลิตอาหารและอุตสาหกรรมการหมักหลายอย่าง เช่นการผลิตกรดแลคติค นมเปรี้ยวจำพวก acidophilus milk bulgarian butter milk kefir kumiss และyogurt แตงกวาดอง กะหล่ำปลีดอง และไส้กรอกเปรี้ยว นอกจากนี้บางเชื้อยังใช้ผลิตสารปฏิชีวนะ และใช้เป็นเชื้อสำหรับวิเคราะห์วิตามินและกรดอะมิโนอีกด้วย (๑-๓)

Lactobacillus เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งยาว บางครั้งพบเป็นแท่งโค้ง ถ้าเป็นแท่งสั้นมักเป็น coryneform coccobacilli บางทีต่อกันเป็นสายโซ่ บางเชื้อเคลื่อนที่ได้โดย petrichous flagella ไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก เป็น fermentative bacteria ที่หมักน้ำตาลกลูโคสแล้วสร้างกรดแลคติค แต่ไม่สามารถหมักแลคเตต อาจสร้างผลพลอยได้อื่นจำพวกอะซิเตต เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์ ฟอร์เมตหรือ ซัคซิเนต เป็น microaerophile เจริญได้ดีขึ้นในสภาพที่ไม่มีอากาศ ไม่รีดิวส์ไนเตรต ไม่สลายเจลาติน และเคซีนไม่สร้าง อินโดล และ H_2S ไม่มีเอนไซม์แคตาเลส แต่บางเชื้อสลาย peroxide ด้วยเอนไซม์ pseudocatalase ปฏิกิริยาต่อ benzidine เป็นลบ บางเชื้อสามารถสร้างรงควัตถุสีเหลือง ส้ม สนิมเหล็กหรือแดงอิฐ ต้องการอาหารซับซ้อนทั้งกรดอะมิโน เปปไตด์ อนุพันธ์กรดนิวคลีอิค วิตามิน เกลือแร่ กรดไขมัน หรือเอสเตอร์ของกรดไขมัน และคาร์โบไฮเดรต เชื้อแต่ละสปีชีส์มีความจำเพาะต่อความต้องการสารอาหารต่างกัน เจริญได้ที่ช่วงอุณหภูมิ ๒ - ๕๓ °ซ แต่เจริญได้เหมาะสมที่อุณหภูมิ ๓๐ - ๔๐ °ซ pH ที่เหมาะสมต่อการเจริญประมาณ ๕.๕ - ๖.๒ แต่เชื้อก็เจริญที่ pH 5.0 หรือต่ำกว่านี้ อัตราการเจริญจะลดลงที่ภาวะเป็นกลางหรือเป็นด่าง โมลเปอร์เซนต์ของ G+C ของ DNA อยู่ในช่วง ๓๒-๕๓ (Bd,Tm) (๔-๖)

การแบ่งกลุ่มแบคทีเรียสกุลนี้อาศัยความสามารถหมักน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติค และผลพลอยได้อื่น (by products) พวกที่หมักกลูโคส ๑ โมลเป็นกรดแลคติค ๑.๘ โมล และได้กรดอะซิติค เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์เล็กน้อย จัดไว้ในกลุ่ม homofermenter พวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส ๑ โมล แล้วสร้างกรดแลคติคได้น้อยกว่า ๑.๘ โมล แต่สร้างกรดอะซิติคเอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ได้มากกว่าจัดไว้ในกลุ่ม heterofermenter (๔-๗) ดูตารางแสดงลักษณะของเชื้อและความต้องการวิตามินใน Table ๑-๖ และ ๗. ตามลำดับ

ในประเทศไทยเรามีผู้ศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติคสกุล Pediococcus (๘) ในผักกาดดอง ผักเสี้ยนดอง ปลาร้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม บูดู ปลาส้ม ส้มฟัก แหนม และไส้กรอกเปรี้ยว และได้ศึกษาเชื้อจำพวก Staphylococcus ในผลิตภัณฑ์ปลาหมักแล้ว (๙) แต่ยังไม่มีผู้รวบรวมเชื้อในกลุ่ม Lactobacillus ซึ่งควรจะมีบทบาทสำคัญที่สุดในกระบวนการหมัก (fermentation process) มาศึกษาโดยละเอียด ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะรวบรวมเชื้อดังกล่าวนี้มาศึกษาลักษณะบางประการ เพื่อจะได้เก็บเชื้อเหล่านี้ไว้ใช้ประโยชน์ในโอกาสต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 1 Physiological and biochemical characteristics of the obligately homofermentative species of the genus Lactobacillus (Group I)

Species	Peptidoglycan type[b]	Teichoic acid	Electrophoretic mobility[c] D-LDH	L-LDH	Allosteric L-LDH	Mol% G + C	Lactic acid isomer(s)[d]	Growth at 15°C	NH_3 from arginine
1a. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*	Lys-DAsp	Glycerol	1.50	–	–	49–51	D	–	d
1b. *L. delbrueckii* subsp. *lactis*	Lys-DAsp	Glycerol	1.50	–	–	49–51	D	–	d
1c. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	Lys-DAsp	Glycerol	1.70	–	–	49–51	D	–	–
2. *L. acidophilus*	Lys-DAsp	Glycerol	1.50[e]	1.30	–	34–37	DL	–	–
3. *L. amylophilus*	Lys-DAsp	None	1.60	1.40	–	44–46	L	+	ND
4. *L. amylovorus*	Lys-DAsp	Glycerol	1.15	1.20	–	40–41	DL	–	ND
5. *L. animalis*	Lys-DAsp	None	–	1.50	–	41–44	L	–	–
6. *L. crispatus*	Lys-DAsp	Glycerol	1.35	1.10	–	35–38	DL	–	–
7. *L. farciminis*	Lys-DAsp	None	1.15	1.20	–	34–36	L(D)	+	+
8. *L. gasseri*	Lys-DAsp	None	1.35[e]	0.95	–	33–35	DL	–	–
9. *L. helveticus*	Lys-DAsp	Glycerol	0.95	1.30	–	38–40	DL	–	–
10. *L. jensenii*	Lys-DAsp	Glycerol	1.50	–	–	35–37	D	–	+
11. *L. ruminis*	mDAP-Direct	None	ND	ND	–	44–47	L	–	–
12. *L. salivarius*	Lys-DAsp	None	–	1.35	–	34–36	L	–	–
13. *L. sharpeae*	mDAP-Direct	Glycerol	1.34	1.48	–	53	L	+	–
14. *L. vitulinus*	mDAP-Direct	None	ND	ND	–	34–37	D	–	–
15. *L. yamanashiensis*	mDAP-Direct	None	ND	ND	–	32–34	L	+	–

[a] Symbols: see Table 4 ; and ND, not determined.
[b] Abbreviations used by Schleifer and Kandler (1972).
[c] Determined in polyacrylamide disk gel electrophoresis pH 7.5; L-LDH rabbit Iso I served as reference.
[d] D or L, the isomer recorded makes up 90% or more of total lactic acid; DL, 25–75% of total lactic acid are of the L-configuration; and D(L) or L(D), the isomer given in brackets makes up 15–20% of total lactic acid.
[e] Strains of this species are known to give more than one band; the migration distance recorded is that obtained with the type strain.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 2 Physiological and biochemical characteristics of the facultatively heterofermentative species of the genus Lactobacillus (Group II)

Species	Peptidoglycan type[b]	Teichoic acid	Electrophoretic mobility[c] D-LDH	Electrophoretic mobility[c] L-LDH	Allosteric L-LDH	Mol% G + C	Lactic acid isomer(s)[d]	Growth at 15°C	NH_3 from arginine
16. *L. agilis*	mDAP-Direct	None	1.40	1.20	−	43–44	L	−	−
17. *L. alimentarius*	Lys-DAsp	None	0.80	1.10	−	36–37	L(D)	+	−
18. *L. bavaricus*	Lys-DAsp	None	−	1.60	+	41–43	L	+	−
19a. *L. casei* subsp. *casei*	Lys-DAsp	None	1.22[e]	0.93	+	45–47	L	+	−
19b. *L. casei* subsp *pseudoplantarum*	Lys-DAsp	None	1.04	0.93	+	45–47	DL	+	−
19c. *L. casei* subsp *rhamnosus*	Lys-DAsp	None	0.75	0.93	+	45–47	L	+	−
19d. *L. casei* subsp *tolerans*	Lys-DAsp	None	−	0.93	+	45–47	L	+	−
20a. *L. coryniformis* subsp. *coryniformis*	Lys-DAsp	None	0.38	−	−	45	D(L)	+	−
20b. *L. coryniformis* subsp. *torquens*	Lys-DAsp	None	0.38	−	−	45	D	+	−
21. *L. curvatus*	Lys-DAsp	None	1.20	1.60	+	42–44	DL	+	−
22. *L. homohiochii*	Lys-DAsp	Glycerol	ND	ND	−	35–38	DL	+	−
23. *L. maltaromicus*	mDAP-Direct	None	ND	ND	−	36	L	+	ND
24. *L. murinus*	Lys-DAsp	None	−	0.92	+	43–44	L	−	−
25. *L. plantarum*	mDAP-Direct	Ribitol or glycerol	1.44	1.28	−	44–46	DL	+	−
26. *L. sake*	Lys-DAsp	None	1.20	1.60	+	42–44	DL	+	−

[a] Symbols: see Table 4 ; and ND, not determined.
[b-e] Footnotes: see Table 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of obligately heterofermentative species of the genus Lactobacillus (Group III)

Species	Peptidoglycan type[b]	Teichoic acid	Electrophoretic mobility[c] D-LDH	Electrophoretic mobility[c] L-LDH	Allosteric L-LDH	Mol% G + C	Lactic acid isomer(s)[d]	Growth at 15°C	NH_3 from arginine
27. *L. bifermentans*	Lys-DAsp	None	1.10	1.20	–	45	DL	+	–
28. *L. brevis*	Lys-DAsp	Glycerol	1.62	1.40	–	44–47	DL	+	+
29. *L. buchneri*	Lys-DAsp	Glycerol	1.33	1.26	–	44–46	DL	+	+
30. *L. collinoides*	Lys-DAsp	Glycerol	1.50	1.22	–	46	DL	+	+
31. *L. confusus*	Lys-Ala	None	2.08	1.82	–	45–47	DL	+	+
32. *L. divergens*	mDAP-Direct	None	–	1.30	–	33–35	L	+	+
33. *L. fermentum*	Orn-DAsp	None	1.85	–	–	52–54	DL	–	+
34. *L. fructivorans*	Lys-DAsp	None	ND	ND	–	38–41	DL	+	+
35. *L. fructosus*	Lys-Ala	None	1.32	1.14	–	47	D(L)	+	–
36. *L. halotolerans*	Lys-Ala-Ser	Glycerol	1.75	1.30	–	45	DL	+	+
37. *L. hilgardii*	Lys-DAsp	Glycerol	1.31	0.97	–	39–41	DL	+	+
38. *L. kandleri*	Lys-Ala-Gly-Ala_2	None	2.10	–	–	39	DL	+	+
39. *L. kefir*	Lys-DAsp	Glycerol	1.23	1.07	–	41–42	DL	+	+
40. *L. minor*	Lys-Ser-Ala_2	Glycerol	2.08	1.50	–	44	DL	+	+
41. *L. reuteri*	Lys-DAsp	None	1.74	0.88	–	40–42	DL	–	+
42. *L. sanfrancisco*	Lys-Ala	None	1.18	1.05	–	36–38	DL	+	–
43. *L. vaccinostercus*	mDAP-Direct	ND	1.32	1.18	–	36	DL	–	–
44. *L. viridescens*	Lys-Ala-Ser	Ribitol	2.03	–	–	41–44	DL	+	–

[a] Symbols: see Table 4; and ND, not determined.
[b–d] Footnotes: see Table 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 4 Pattern of fermented carbohydrates of the obligately homofermentative species of the genus Lactobacillus (Group I)

Species	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
1a. *L. delbrueckii* subsp. *delbrueckii*	−	−	d	−	+	−	+	−	−	d	−	+	−	−	−	−	−	−	−	+	d	−
1b. *L. delbrueckii* subsp. *lactis*	+	−	d	+	+	d	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−
1c. *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	−	−	−	−	+	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
2. *L. acidophilus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	d	d	−	−	+	−	+	d	−
3. *L. amylophilus*	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
4. *L. amylovorus*	$+_w$	−	+	$+_w$	+	+	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	$+_w$	−	+	+	−
5. *L. animalis*	d	d	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	−	−
6. *L. crispatus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−
7. *L. farciminis*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−
8. *L. gasseri*	+	−	+	+	+	+	+	−	d	d	−	+	−	d	d	−	−	+	−	+	d	−
9. *L. helveticus*	−	−	−	−	d	+	+	−	+	d	−	d	−	−	−	−	−	−	−	−	d	−
10. *L. jensenii*	+	−	+	+	+	+	+	−	−	d	d	+	−	−	−	−	−	+	−	+	+	−
11. *L. ruminis*	+	−	+	+	+	+	+	−	d	+	−	+	−	+	+	−	−	+	−	+	−	−
12. *L. salivarius*	−	−	−	d	+	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	d	−	d	−	+	+	−
13. *L. sharpeae*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
14. *L. vitulinus*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	+	d	+	d	−
15. *L. yamanashiensis*	+	−	d	+	+	d	+	−	−	−	−	+	−	−	−	d	−	+	−	+	+	−

[a] Symbols: +, 90% or more strains positive; −, 90% or more strains negative; d, 11-89% strains positive; $+_w$, positive to weak reaction.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 5 Pattern of fermented carbohydrates of the facultatively he[illegible] fermentative species of the genus <u>Lactobacillus</u> (Group II)

Species	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
16. *L. agilis*	+	−	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	d	+	+	−
17. *L. alimentarius*	o	d	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+	−
18. *L. bavaricus*	−	−	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−	+	−	−
19a. *L. casei* subsp. *casei*	+	−	+	+	+	+	+	+	d	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
19b. *L. casei* subsp. *pseudo-plantarum*	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	+	+	+	−
19c. *L. casei* subsp. *rhamno-sus*	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	+	−
19d. *L. casei* subsp. *tolerans*	−	−	−	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
20a. *L. coryniformis* subsp. *coryniformis*	−	−	−	d	+	+	+	+	d	+	+	+	−	d	d	+	−	d	d	+	−	−
20b. *L. coryniformis* subsp. *torquens*	−	−	−	−	+	+	+	+	+	+	+	d	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
21. *L. curvatus*	−	−	+	+	+	+	+	+	d	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	−	−	−
22. *L. homohiochii*	−	−	d	o	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	+	d	−	−	d	−
23. *L. maltaromicus*	+	−	+	o	+	+	+	o	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−
24. *L. murinus*	d	+	+	+	+	+	+	−	+	+	d	+	−	+	+	−	+	d	−	+	d	−
25. *L. plantarum*	+	d	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	d	+	+	−	+	+	+	+	+	d
26. *L. sake*	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	+	+	−	+	+	−

[a] Symbols: see Table 4 , and o, reaction not determined.

Table 6 Pattern of fermented carbohydrates of the obligately heterofermentative species of the genus Lactobacillus (Group III)

Species	Amygdalin	Arabinose	Cellobiose	Esculin	Fructose	Galactose	Glucose	Gluconate	Lactose	Maltose	Mannitol	Mannose	Melezitose	Melibiose	Raffinose	Rhamnose	Ribose	Salicin	Sorbitol	Sucrose	Trehalose	Xylose
27. *L. bifermentans*	−	−	−	−	+	+	+	−	−	+	+	+	−	−	−	+	+	−	−	−	−	−
28. *L. brevis*	−	+	−	d	+	d	+	+	d	+	−	−	−	+	d	−	+	−	−	d	−	d
29. *L. buchneri*	−	+	−	d	+	d	+	+	d	+	−	−	+	+	d	−	+	−	−	d	−	d
30. *L. collinoides*	−	+	−	+	+	+	+	+	d	+	−	−	−	+	−	−	+	d	−	−	−	+
31. *L. confusus*	+	−	+	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	−	+
32. *L. divergens*	+	−	+	o	+	d	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	−	+	+	−
33. *L. fermentum*	−	d	d	−	+	+	+	+	+	+	−	$+_w$	−	+	+	−	+	−	−	+	d	d
34. *L. fructivorans*	−	−	−	−	+	−	+	d	−	d	−	−	−	−	−	−	$+_w$	−	−	d	−	−
35. *L. fructosus*	o	−	−	o	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
36. *L. halotolerans*	−	−	−	−	+	−	+	+	−	+	−	+	−	−	−	−	+	−	−	−	+	$-_e$
37. *L. hilgardii*	−	−	−	−	+	d	+	+	d	+	−	−	d	−	−	−	+	−	−	d	−	+
38. *L. kandleri*	−	−	−	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	−	−	o	+	−	−	−	−	−
39. *L. kefir*	−	d	−	−	+	−	+	+	+	+	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	−
40. *L. minor*	−	−	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+	+	−	−	−	+	−	−	+	+	−
41. *L. reuteri*	o	+	−	o	+	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	−	+	−	−	+	−	−
42. *L. sanfrancisco*	o	−	−	o	−	+	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
43. *L. vaccinostercus*	−	+	$+_w$	−	−	$+_w$	+	+	−	+	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	+
44. *L. viridescens*	−	−	−	−	+	−	+	−	−	+	−	+	−	−	−	−	−	−	−	d	d	−

[a] Symbols: see Table 4 ; and o, reaction not determined.

Table 7 Nutritional requirements of Lactobacillus species

Species	Biotin	Folic acid	Niacin	Pantothenate	Pyridoxal	Riboflavin	Thiamine	Thymidine	Vitamin B12	References
L.delbrueckii	-	d	+	+	-	d	-	d	d	(5)
L.acidophilus	ND	+	+	+	-	+	-	-	-	(5)
L.amylophilus	ND	+	+	+	+	+	-	ND	ND	(5)
L.amylovorus	ND	+	+	+	ND	+	-	ND	ND	(5)
L.casei	ND	+	+	+	+	+	-	-	-	(4)
L.helveticus	ND	-	+	+	+	+	-	-	-	(5,6)
L.plantarum	ND	-	+	+	-	d	-	-	-	(4,5,6)
L.brevis	ND	+	+	+	-	-	+	ND	-	(5,6)
L.vaccinostercus	+	-	+	+	-	ND	+	ND	ND	(5)

+ , essential ; -, inessential ; d, some strain required ; ND, no data

บทที่ ๒

แนวเหตุผล วัตถุประสงค์ และขอบเขตการวิจัย

ประเทศไทยเรามีอาหารหมักดองมากมาย ซึ่งชาวบ้านในแต่ละภาคได้ถือเป็นอาหารสำคัญที่จะต้องรับประทานเป็นประจำ อาหารเหล่านี้นอกจากจะมีคุณค่าทางอาหารคือ มีโปรตีนสูง เช่น อาหารหมักดองประเภทปลา เนื้อ และหมูแล้ว ยังมีรสชาดจำเพาะที่คนไทยขาดไม่ได้จากกระบวนการผลิตอาหารหมักดอง เป็นที่ทราบกันแล้วว่าแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติคมีบทบาทเกี่ยวข้อง (๔) แต่จากผลงานอดีตในประเทศไทยเรายังไม่มีการศึกษาเฉพาะเรื่องแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัส และมิได้มีการรวบรวมเชื้อดังกล่าวนี้ไว้ และด้วยเหตุที่ประเทศไทยเราตั้งอยู่ในแถบร้อนของเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ดังนั้นแบคทีเรียจำพวกนี้จึงน่าจะมีลักษณะทางสรีรวิทยา และชีวเคมี แตกต่างไปจากแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสของประเทศในแถบหนาว หรือ อบอุ่น จากเหตุผลนี้จึงได้วางโครงการเพื่อรวบรวมเชื้อแบคทีเรียแลคโตบาซิลลัสที่พบในอาหารหมักดองทั้งประเภทผัก ปลา เนื้อและหมูและอื่น ๆ มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา และชีวเคมี รวมทั้งคุณสมบัติที่จะนำไปใช้ทางจุลชีววิเคราะห์ ซึ่งจะได้เชื้อในกลุ่มนี้ไว้ใช้ประโยชน์ทางด้านการศึกษาและวิจัย รวมทั้งการพัฒนาการผลิตอาหารหมักดองให้มีคุณภาพ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัสดุ และ วิธีการ

๑. อาหารหมักดอง

อาหารหมักดองจำพวกผักและผลไม้ที่ใช้ในการแยกเชื้อได้แก่ ผักกาดดอง ผักกุ่มดอง ผักหนามดอง ผักเสี้ยนดอง หน่อไม้ดอง หอมดอง ถั่วงอกดอง ใบเมี่ยงหมัก ทุเรียนเปรี้ยว สตอดอง และ ลูกเหลียงดอง รวมทั้งอาหารประเภทปลา เนื้อและหมู ได้แก่ ปลาส้ม ส้มฟัก ไข่ปลาดอง แหนม หนางหมู หนางเนื้อ มั่ม และไส้กรอกเปรี้ยว

๒. การแยกและทำให้เชื้อบริสุทธิ์

นำตัวอย่างอาหารหมักดองมาทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ เพื่อให้ปริมาณเชื้อในตัวอย่างลดลงเป็นลำดับ ดูดน้ำตัวอย่างใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อแล้วเทอาหารวุ้น GYP $CaCO_3$ ที่หลอมเหลว และมีอุณหภูมิประมาณ ๔๕ °ซ ลงไปเขย่าให้เชื้อและอาหารกระจายทั่ว แล้วบ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นานประมาณ ๓ วัน เมื่อเชื้อเจริญแล้ว เลือกโคโลนีในวุ้นที่เกิดวงใสโดยรอบจากการสร้างกรด นำไปเลี้ยงในอาหารเหลว GYP บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๑ - ๒ วัน ตรวจดูลักษณะเชื้อจากกล้องจุลทรรศน์ โดยการทำเวทเมนท์ แล้วคัดเอาเฉพาะแบคทีเรียที่มีรูปร่างแท่งนำเชื้อจากอาหารเหลวไปทำให้บริสุทธิ์ โดยการทำให้เจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อปั่นให้เชื้อกระจาย แล้วดูดไปหยดลงในจานเลี้ยงเชื้อ เทอาหารวุ้น GYP $CaCO_3$ ลงไปเขย่าให้เชื้อและอาหารกระจายทั่ว แล้วบ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๓ วัน เมื่อเชื้อเจริญแล้ว เลือกโคโลนีเดี่ยวๆ นั้นไปเลี้ยงในอาหารเหลว GYP และทำซ้ำ โดยการเลี้ยงในอาหารวุ้นอีกจนแน่ใจว่าเชื้อบริสุทธิ์

๓. การเก็บรักษาเชื้อ

เก็บรักษาเชื้อเป็นสต๊อค โดย stab ลงหลอดอาหารวุ้น GYP $CaCO_3$ (Glucose 0.5 %) เก็บรักษาไว้ที่ ๔ - ๑๐ °ซ ในตู้เย็น และเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธี lyophization ด้วย

๔. <u>การเตรียมเชื้อและการเพาะเชื้อเพื่อทดสอบคุณสมบัติต่าง ๆ</u>

เตรียมเชื้อเพื่อทดสอบ โดยเลี้ยงในอาหารเหลว GYP บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ ให้นาน ๑ - ๒ วัน การนำไปเพาะลงในอาหารเพื่อทดสอบคุณสมบัติปฏิบัติดังนี้ เมื่อต้องการทดสอบเชื้อในอาหารเหลว เตรียม โดยใช้ลูปแตะเชื้อจากอาหารเหลวที่เตรียมไว้ดังที่กล่าวมาแล้ว ๓ - ๔ ลูป ลงในน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อปริมาตร ๓ มล. ปั่นให้เชื้อกระจายทั่วแล้วดูดเชื้อด้วยพาสเจอไปเปตที่ปราศจากเชื้อ หยดลง ๑ - ๒ หยดของแต่ละหลอดอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเพื่อทดสอบคุณสมบัติ การทดสอบเชื้อในอาหารกึ่งเหลวและอาหารแข็ง ใช้เข็มเขี่ย stab เชื้อลงในหลอดอาหารหรือ ใช้ลูป streak เชื้อลงบนผิวของอาหารแข็ง โดยตรง

๕. <u>การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา</u>

ตรวจสอบการติดสีแกรม (ภาคผนวก) รูปแบบของเซลล์ การเรียงตัวขนาดของเซลล์ และการสร้างสปอร์ของเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้น GYP บ่มที่ ๓๐ °ซ นาน ๓ วัน

๖. <u>การศึกษาลักษณะทางการเจริญ</u>

๖.๑ การเจริญบนอาหารแข็ง ตรวจรูปแบบของ โคโลนี สี ขนาด ของเชื้อที่เจริญบนอาหารแข็ง GYP บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๓ วัน

๖.๒ การเจริญในหลอดอาหารกึ่งเหลว แตะเชื้อลงในอาหารที่เหลวแล้วปั่นให้เชื้อกระจายทั่ว ปล่อยให้อาหารแข็ง บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๓ วัน ตรวจสอบผลถ้าสีของ indicator เปลี่ยนแสดงว่าเชื้อเจริญบริเวณนั้นแล้วสร้างกรด ถ้าเจริญมากบริเวณผิวอาหารและค่อยๆ ลดลงตามความลึก การเจริญนี้เป็นแบบ facultative anaerobic แต่ถ้า เจริญมากจากบริเวณต่ำกว่าผิวจนเกือบถึงก้นหลอด การเจริญเป็นแบบ microaerophilic (๑๐) และตรวจสอบความสามารถเคลื่อนที่ โดยวิธี stab เชื้อลงในอาหารกึ่งเหลว ถ้าเชื้อสามารถเคลื่อนที่ได้จะเห็นการเจริญของเชื้อแผ่ขยายออกจากบริเวณรอย stab

๖.๓ ความสามารถเจริญในอาหารเหลว GYP ที่มีเกลือ โซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 2,4,6,8 และ 10 เปอร์เซนต์ ความสามารถเจริญที่ระดับ pH เริ่มต้น 3.5, 4.0,4.5,5.0,6.0,7.5,8.0,8.5,9.0 และ 9.6 บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๕ วัน และความ-

สามารถเจริญในอาหารเหลว GYP ที่อุณหภูมิ ๑๕ ํซ และ ๔๕ ํซ บ่มไว้นาน ๕ วัน ตรวจสอบผลการเจริญจากความขุ่นของเชื้อ

๗. <u>การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและ ชีวเคมี</u>

๗.๑ การทดสอบ benzidine เพื่อตรวจสอบ iron porphyrin ของแบคทีเรียทดสอบ โดยหยดสารละลาย benzidine dihydrochloride ลงบนเชื้อที่เจริญบนอาหารวุ้น GYP อายุ ๓ วัน แล้วหยดตามด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ๓ เปอร์เซ็นต์ ถ้าโคโลนีของเชื้อเปลี่ยนเป็นสีน้ำเงินอมเขียว แสดงว่าเชื้อนั้นสร้าง iron porphyrin ได้ (๑๑)

๗.๒ การทดสอบเอนไซม์แคตาเลส และ ซูโดแคตาเลส ทดสอบโดยหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น ๓ % ลงบนโคโลนีของเชื้อที่เลี้ยงบนอาหารวุ้น GYP อายุ ๓ วัน ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้น และผลการทดสอบเบนซิดีนเป็นบวก แสดงว่า แบคทีเรียสร้างเอนไซม์แคตาเลส ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแต่ผลการทดสอบเบนซิดีนเป็นลบ แสดงว่าแบคทีเรียนั้นสร้างซูโดแคตาเลส

๗.๓ การรีดิวส์ไนเตรต เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวไนเตรต แล้วบ่มไว้ที่ ๓๐ ํซ นาน ๗ วัน ทดสอบโดยหยดกรดซัลฟานิลิค และ แอลฟาเนฟธิลอามีน (ภาคผนวก) ถ้าเกิดสีแดงขึ้นแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวส์เป็นไนไตรต์ ถ้าไม่ให้ผลดังกล่าว ทดสอบยืนยันโดยใส่ผงสังกะสีลงไปเล็กน้อย ในอาหารที่ทดสอบแล้ว ถ้าเกิดสีแดงแสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวส์ด้วยผง-สังกะสี ผลการทดสอบจึงเป็นลบแท้จริง แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงผลการทดสอบการรีดิวส์ไนเตรตนั้นเป็นบวกจริง

๗.๔ การเจริญใน litmus milk เลี้ยงเชื้อในอาหาร litmus milk (Difco) บ่มไว้ที่ ๓๐ ํซ ตรวจสอบผลภายหลังจากการบ่มเชื้อไว้นาน 7,14 และ 21 วัน ถ้าสีของอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีขาว แสดงว่าเกิดรีดักชั่น ถ้าสีเปลี่ยนเป็นชมพู แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างกรด ถ้าเกิดการตกตะกอนและจับเป็นก้อนของโปรตีน เนื่องจากกรดแสดงว่าเกิด acid curd และถ้าเชื้อสลายโปรตีนได้ อาหารจะใส แสดงว่าเกิด peptonization

๗.๕ การใช้กลูโคสแบบ oxidative หรือ fermentative เลี้ยงเชื้อในอาหาร (ภาคผนวก) หลอดหนึ่งเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อ ส่วนอีกหลอดไม่ต้องเททับด้วยพาราฟิน บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๓ วัน ถ้าสีของ indicator เปลี่ยนจากม่วงเป็นเหลืองเฉพาะหลอดที่ไม่ปิดทับด้วยพาราฟิน แสดงว่าเชื้อใช้กลูโคสแบบ oxidative แต่ถ้าเปลี่ยนสีในหลอดที่ปิดทับด้วย หรือเฉพาะหลอดที่ปิดทับพาราฟินอย่างเดียว แสดงว่าเชื้อใช้กลูโคสแบบ fermentative (๑๒)

๗.๖ การสลายเจลาติน เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเจลาติน แล้วบ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๗ วัน ตรวจผลโดยนำมาไว้ที่ ๒๐ °ซ ถ้าแบคทีเรียสลายเจลาตินได้อาหารจะไม่แข็งตัวที่อุณหภูมินี้

๗.๗ การสลาย aesculin เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว aesculin แล้วบ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๗ วัน ตรวจผลโดยสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีน้ำตาลดำ และการเกิดผลึกคล้ายปะการังขึ้นเนื่องจากการสลาย aesculin เป็น aesculetin ได้ แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก (๑๓)

๗.๘ การสลาย arginine เลี้ยงเชื้อในอาหาร arginine แล้วเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อ บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๗ วัน ถ้าสีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีแดง แสดงว่าเกิดแอมโมเนียขึ้น ผลการทดสอบเป็นบวก (๑๔)

๗.๙ การสลายแป้ง เลี้ยงเชื้อโดย streak บนอาหารวุ้น Starch-YP แล้วบ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๗ วัน ตรวจผลโดยหยดสารละลายไอโอดีนรอบโคโลนีเชื้อ ถ้าเห็นรอยใสรอบๆ แสดงว่ามีการใช้แป้ง ผลการทดสอบเป็นบวก

๗.๑๐ การสร้างเมือกจากน้ำตาลซูโครส เลี้ยงเชื้อโดย streak บนอาหาร Sucrose-YP บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๓ วัน ตรวจผลจากโคโลนีของเชื้อ ถ้าโคโลนีเยิ้มเป็นเมือกและเมื่อใช้เข็มเขี่ยแตะจะติดปลายเข็มยืดเหนียวได้ แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเมือก ผลการทดสอบเป็นบวก

๗.๑๑ การสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต เลี้ยงเชื้อในอาหารคาร์โบไฮเดรตที่มีปริมาตร ๓ มล. (ภาคผนวก) มีคาร์โบไฮเดรตแตกต่างกัน ๒๑ ชนิด คือ อะราบิโนส ไรโบส ไซโลส แรมโนส ฟรักโตส กาแลคโตส กลูโคส แมนโนส เซโลบิโอส แลคโตส

มอลโตส เมลิบิโอส ซูโครส ทรีฮาโลส เมลิซิโตส แรฟิโนส เอสคิวลิน แอลฟา-เมทิล ดี- กลูโคไซด์ ซาลิซิน แมนิตอล และ ซอร์บิตอล หลังจากเพาะเชื้อแล้ว บ่มไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๓ วัน ตรวจผลการสร้างกรดโดยไตเตรทกับ ๐.๑ N NaOH ใช้ bromthymol blue ๐.๒ ก. และ neutral red ๐.๑ ก. ผสมกัน ละลายใน ๓๐๐ มล. เอทานอล เป็น indicator การสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส และกลูโคเนต (๑%) ต้องใส่ durham tube ลงไปในหลอดอาหารด้วย

๘. <u>การศึกษาการเจริญในอาหารที่ขาดวิตามิน</u>

เลี้ยงเชื้อในอาหารสำเร็จรูป (Difco) ที่ขาดวิตามินบางชนิด โดยใช้ Thiamine assay medium, Folic acid assay medium, Biotin assay medium, Riboflavin assay medium และ Pyridoxine assay medium บ่มเชื้อไว้ที่ ๓๐ °ซ นาน ๓ วัน ตรวจผลการเจริญของเชื้อโดยสังเกตจากความขุ่น ถ้าเชื้อสามารถเจริญในอาหารชนิดใด แสดงว่ามีแนวโน้มไม่ต้องการวิตามินชนิดนั้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

044934

บทที่ ๔

ผลการทดลอง

การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติครูปร่างแท่งในอาหารหมักดองประเภทผักและผลไม้ จำนวน ๓๕ ตัวอย่าง ได้เชื้อ ๔๗ ไอโซเลต แยกจากอาหารหมักดองประเภทปลา ๖ ตัวอย่าง ได้เชื้อ ๘ ไอโซเลต และจากอาหารหมักดองประเภทเนื้อและหมู ๑๑ ตัวอย่างได้เชื้อ ๑๕ ไอโซเลต (Table ๘)

การศึกษาลักษณะโดยทั่วไปของเชื้อ Lactobacillus species ทั้ง ๗๐ ไอโซเลต พบว่าลักษณะเซลล์เป็นรูปแท่ง ขนาดประมาณ ๐.๓-๐.๕ x ๐.๘-๔.๐ μm เรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ เป็นคู่ อาจพบเป็นเซลล์โค้งหรือเป็นสายโซ่ ย้อมติดสีแกรมบวกไม่สร้างสปอร์ ลักษณะโคโลนีบนอาหารวุ้น GYP มีรูปร่างกลมขอบเรียบ ผิวโค้งเล็กน้อย (convex) มีสีขาวขุ่น ทึบแสง (opaque) เชื้อเหล่านี้ไม่สามารถเคลื่อนที่ไม่สร้างเอนไซม์แคตาเลส หรือซูโด-แคตาเลส ไม่มี iron porphyrin ไม่สร้างเมือกจากน้ำตาลซูโครส ไม่รีดิวส์ไนเตรต ไม่สลายเจลาตินและแป้ง บางเชื้อสลาย aesculin และ arginine ใช้น้ำตาลกลูโคสแบบ *fermentative* เป็น *microaerophile* ไม่สร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส ส่วนใหญ่สร้างแก๊สจากกลูโคเนต บางเชื้อมีปฏิกิริยาต่อ litmus milk คือ สร้างกรด หรือทำให้นมตกตะกอน และเกิดการรีดิวส์แต่ไม่สามารถสลายนม บางเชื้อเจริญได้ที่ ๑๕° หรือ ๔๕°ซ ส่วนใหญ่เจริญได้ที่ pH ๔.๐-๙.๐ บางเชื้อไม่เจริญที่ pH ๓.๕ หรือ ๙.๖ ส่วนใหญ่เจริญได้ในอาหารเหลว GYP ที่มีโซเดียมคลอไรด์ ๒.๐ - ๖.๐ % (Table ๙)

การสร้างกรดจากคาร์โบไฮเดรต เชื้อทั้งหมดมีความสามารถสร้างกรดจากน้ำตาลกลูโคสแต่บางเชื้อสร้างกรดได้จาก อะราบิโนส ไรโบส ไซโลส แรมโนส ฟรักโตส กาแลคโตส แมนโนส เซโลบิโอส แลคโตส มอลโตส เมลิบิโอส ซูโครส ทรีฮาโลส เมลิซิโตส แรฟิโนส เอสคิวลิน แอลฟ่า-เมทิล ดี-กลูโคไซด์ ซาลิซิน แมนิตอล และ ซอร์บิตอล (Table ๑๐)

การเจริญในอาหารที่ขาดวิตามิน พบว่าเชื้อทั้งหมดไม่สามารถเจริญใน Biotin assay medium และ Pyridoxine assay medium แต่เชื้อส่วนใหญ่เจริญได้ใน Thiamine assay medium Folic acid assay medium และใน Riboflavin assay medium (Table ๑๑)

Table 8 ชนิดตัวอย่าง แหล่งที่มา วันเดือนปี และรหัสเชื้อ

	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่มา	วัน เดือน ปี	รหัสเชื้อ
๑.	ผักกาดดอง	อ่างทอง	๑๔ ธ.ค.๒๔	P1-3
๒.	ผักกุ่มดอง	จันทบุรี	ก.พ.๒๕	P30-1
๓.	ผักกุ่มดอง	สุรินทร์	๖ มี.ค.๒๘	FP51-1
๔.	ผักหนามดอง	นนทบุรี	๑๑ ม.ค.๒๕	P16r
๕.	ผักเสี้ยนดอง	กรุงเทพฯ	๑ ก.พ.๒๕	P24-1,P24-3
๖.	ผักเสี้ยนดอง	สงขลา	๒๔ พ.ค.๒๕	P46-1
๗.	ผักเสี้ยนดอง	กรุงเทพฯ	๖ ก.ค.๒๖	FP6
๘.	ผักเสี้ยนดอง	กรุงเทพฯ	๒๒ ม.ค.๓๐	F4-1,F4-2
๙.	ผักเสี้ยนดอง	กรุงเทพฯ	๒๑ ก.พ.๓๐	F11-1,F11-2
๑๐	[illegible]ียนดอง	กรุงเทพฯ	๗ มี.ค.๓๐	F18-1,F18-2
๑๑.	ผักเสี้ยนดอง	กรุงเทพฯ	๗ มี.ค.๓๐	F19-1,F19-2
๑๒.	หน่อไม้ดอง	ประจวบคีรีขันธ์	๑ ก.พ.๒๕	P28-3
๑๓.	หน่อไม้ดอง	เชียงใหม่	๑๐ พ.ค.๒๕	P305
๑๔.	หน่อไม้ดอง	ยะลา	๖ ส.ค.๒๕	P319,P319-1
๑๕.	หน่อไม้ดอง	กรุงเทพฯ	๗ มี.ค.๓๐	F21-1,F21-2
๑๖.	หอมดอง	สมุทรสาคร	๑๔ ธ.ค.๒๔	P2-4
๑๗.	หอมดอง	นครปฐม	ก.พ.๒๕	P37
๑๘.	หอมดอง	ชัยภูมิ	๑๐ ธ.ค.๒๙	F2-1
๑๙.	หอมดอง	กรุงเทพฯ	๒๒ ม.ค.๓๐	F5-1,F5-2
๒๐.	หอมดอง	กรุงเทพฯ	๒๑ ก.พ.๓๐	F9-1
๒๑.	หอมดอง	กรุงเทพฯ	๗ มี.ค.๓๐	F20
๒๒.	ถั่วงอกดอง	กรุงเทพฯ	๒๑ ก.พ.๓๐	F10-1,F10-2
๒๓.	ใบเมี่ยงหมัก	เชียงใหม่	๒๕ ก.ค.๒๖	FP2-1,FP2-5
๒๔.	ใบเมี่ยงหมัก	เชียงใหม่	๙ พ.ย.๒๖	FP11-1
๒๕.	ใบเมี่ยงหมัก	เชียงใหม่	๒๔ ธ.ค.๒๖	FP14-1,FP14-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 8 (continued)

	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่มา	วัน เดือน ปี	รหัสเชื้อ
๒๖.	ใบเมี่ยงหมัก	เชียงใหม่	๒๔ ธ.ค.๒๖	FP18
๒๗.	ใบเมี่ยงหมัก	เชียงใหม่	๓๑ ธ.ค.๒๖	FP24-1
๒๘.	ใบเมี่ยงหมัก	เชียงใหม่	๓๑ ธ.ค.๒๖	FP25-1
๒๙.	ใบเมี่ยงหมัก	เชียงใหม่	๑๒ ก.พ.๒๗	FP34,FP34-2
๓๐.	ใบเมี่ยงหมัก	เชียงใหม่	๑๒ ก.พ.๒๗	FP37-4
๓๑.	ใบเมี่ยงหมัก	เชียงใหม่	๒ มี.ค.๒๗	FP38-1
๓๒.	ทุเรียนเปรี้ยว	ปัตตานี	๑ ก.ย.๒๕	A330
๓๓.	สตอดอง	สงขลา	ส.ค.๒๕	P322
๓๔.	สตอดอง	ตรัง	ส.ค.๒๕	P325
๓๕.	ลูกเหลียงดอง	สงขลา	ส.ค.๒๕	P323
๓๖.	ปลาส้ม	กรุงเทพฯ	พ.ค.๒๕	A83
๓๗.	ปลาส้ม	กรุงเทพฯ	๒๕ มี.ค.๓๐	F26-1,F26-2
๓๘.	ปลาส้ม	กรุงเทพฯ	๒๕ มี.ค.๓๐	F27-2
๓๙.	ปลาส้ม	กรุงเทพฯ	๒๕ มี.ค.๓๐	F28-1,F28-2
๔๐.	ส้มฟัก	ลพบุรี	ก.ย.๒๗	FP49-2
๔๑.	ไข่ปลาดอง	แพร่	๒๔ ก.ค.๒๕	A314
๔๒.	แหนม	อุดรธานี	๑๔ ม.ค.๒๕	A27-2
๔๓.	แหนม	กรุงเทพฯ	๒๕ ก.ค.๒๖	FN1-3,FN1-4
๔๔.	แหนม	เชียงใหม่	๒๖ ก.ค.๒๖	FN3r,FN3
๔๕.	แหนม	กรุงเทพฯ	๒๗ ก.ค.๒๖	FN4
๔๖.	แหนม	กรุงเทพฯ	พ.ย.๒๖	FN8
๔๗.	แหนม	อุตรดิตถ์	ธ.ค.๒๙	F3-1,F3-2
๔๘.	หนางหมู	ปัตตานี	๑๔ มิ.ย.๒๕	A85-2
๔๙.	หนางเนื้อ	ปัตตานี	๑๔ มิ.ย.๒๕	A93
๕๐.	มั่ม	ขอนแก่น	๑๔ เม.ย.๒๗	FP48-1
๕๑.	ไส้กรอกเปรี้ยว	นครพนม	๑๔ ม.ค.๒๕	A35
๕๒.	ไส้กรอกเปรี้ยว	ขอนแก่น	๒๒ ม.ค.๓๐	F7-1,F7-2

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 9 General characteristics of Lactobacillus species isolated from fermented foods.

Characteristics	Isolates									
	P1-3	P30-1	FP51-1	P16r	P24-1	P24-3	P46-1	FP6	F4-1	F4-2
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Spore formation	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Catalase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Pseudocatalase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Benzidine test	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Slime formation	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Nitrate reduction	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Gelatin hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Aesculin hydrolysis	−	+	−	+	−	+	−	+	+	+
Arginine hydrolysis	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
Starch hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Glucose utilization	← fermentative →									
Relation to oxygen	← microaerophilic →									
Gas from glucose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Gas from gluconate	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
Reaction in litmus milk:										
Acidification	−	+	−	−	$+^{w}$	+	−	+	−	−
Coagulation	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−
Peptonization	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Reduction	−	+	−	−	−	+	−	−	−	−
Growth at 15°	−	+	+	$+^{w}$	−	+	+	+	−	−
Growth at 45°	+	−	+	−	−	$+^{w}$	−	$+^{w}$	−	$+^{w}$
Growth at pH 3.5	+	+	$+^{w}$	+	$+^{w}$	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.5	−	+	+	+	+	+	−	+	+	−
Growth at pH 9.0	−	+	−	−	+	+	−	+	−	−
Growth at pH 9.6	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−
Growth in 2.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.0% NaCl	−	−	+	+	+	+	−	+	+	+
Growth in 8.0% NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+
Growth in 10.0% NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Characteristics	Isolates									
	F11-1	F11-2	F18-1	F18-2	F19-1	F19-2	P28-3	P305	P319	P319-1
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Spore formation	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Catalase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Pseudocatalase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Benzidine test	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Slime formation	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Nitrate reduction	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Gelatin hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Aesculin hydrolysis	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+
Arginine hydrolysis	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
Starch hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Glucose utilization	←——— fermentative ———→									
Relation to oxygen	←——— microaerophilic ———→									
Gas from glucose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Gas from gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reaction in litmus milk:										
Acidification	−	+	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$
Coagulation	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−
Peptoniz	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Reduction	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Growth at 15°	+	−	$+^{w}$	+	−	+	−	−	−	−
Growth at 45°	+	−	+	+	−	−	−	−	−	−
Growth at pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.5	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+
Growth at pH 9.0	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+
Growth at pH 9.6	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−
Growth in 2.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 8.0% NaCl	+	+	+	−	+	+	−	+	−	+
Growth in 10.0% NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 9 (continued)

Characteristics	Isolates									
	F21-1	F21-2	P2-4	P37	F2-1	F5-1	F5-2	F9-1	F20	F10-1
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Spore formation	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Catalase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Pseudocatalase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Benzidine test	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Slime formation	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Nitrate reduction	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Gelatin hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Aesculin hydrolysis	+	+	+	−	+	−	+	+	−	+
Arginine hydrolysis	−	−	−	+	−	−	−	−	+	−
Starch hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Glucose utilization	←——— fermentative ———→									
Relation to oxygen	←——— microaerophilic ———→									
Gas from glucose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Gas from gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
Reaction in litmus milk:										
Acidification	$+^{w}$	$+^{w}$	−	−	$+^{w}$	−	−	−	−	+
Coagulation	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+
Peptonization	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Reduction	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Growth at 15°	$+^{w}$	−	−	−	+	−	−	−	−	+
Growth at 45°	−	−	−	−	−	+	−	+	−	−
Growth at pH 3.5	+	+	$+^{w}$	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.5	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+
Growth at pH 9.0	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+
Growth at pH 9.6	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−
Growth in 2.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.0% NaCl	+	+	+	$+^{w}$	+	+	+	+	+	+
Growth in 8.0% NaCl	−	+	+	−	−	−	+	+	+	−
Growth in 10.0% NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

Characteristics	Isolates									
	F10-2	FP2-1	FP2-5	FP11-1	FP14-1	FP14-2	FP18	FP24-1	FP25-1	FP34
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spore formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudocatalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzidine test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Slime formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aesculin hydrolysis	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose utilization	←fermentative→									
Relation to oxygen	←microaerophilic→									
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas from gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reaction in litmus milk:										
Acidification	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulation	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Peptonization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reduction	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-
Growth at 15°	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 45°	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at pH 3.5	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Growth at pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.5	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 9.0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 9.6	-	+	-	+	-	+	+	-	-	+
Growth in 2.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.0% NaCl	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 8.0% NaCl	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
Growth in 10.0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 9 (continued)

Characteristics	Isolates									
	FP34-2	FP37-4	FP38-1	A330	P322	P325	P323	A83	F26-1	F26-2
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Spore formation	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Catalase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Pseudocatalase	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Benzidine test	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Slime formation	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Nitrate reduction	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gelatin hydrolysis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Aesculin hydrolysis	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+
Arginine hydrolysis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Starch hydrolysis	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Glucose utilization	←――――― fermentative ―――――→									
Relation to oxygen	←――――― microaerophilic ―――――→									
Gas from glucose	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Gas from gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reaction in litmus milk:										
Acidification	+	+	+	$+^{w}$	–	$+^{w}$	$+^{w}$	+	–	+
Coagulation	–	+	+	–	–	–	–	+	–	–
Peptonization	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Reduction	–	+	+	–	–	–	–	–	–	–
Growth at 15°	–	–	–	+	–	+	+	+	+	+
Growth at 45°	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+
Growth at pH 3.5	+	–	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.5	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+
Growth at pH 9.0	+	+	+	+	–	+	+	+	–	+
Growth at pH 9.6	+	–	+	+	–	–	–	+	–	+
Growth in 2.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Growth in 6.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	–	+
Growth in 8.0% NaCl	–	–	$+^{w}$	+	–	–	+	+	–	+
Growth in 10.0% NaCl	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Characteristics	Isolates									
	F27-2	F28-1	F28-2	FP49-2	A314	A27-2	FN1-3	FN1-4	FN3r	FN3
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Spore formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pseudocatalase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Benzidine test	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Slime formation	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Nitrate reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Aesculin hydrolysis	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Arginine hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Glucose utilization	←——— fermentative ———→									
Relation to oxygen	←——— microaerophilic ———→									
Gas from glucose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Gas from gluconate	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
Reaction in litmus milk:										
Acidification	$+^w$	+	$+^w$	-	-	$+^w$	+	-	$+^w$	-
Coagulation	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Peptonization	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reduction	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Growth at 15°	+	-	-	+	+	-	+	+	-	+
Growth at 45°	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
Growth at pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Growth at pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Growth at pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.5	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Growth at pH 9.0	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
Growth at pH 9.6	-	-	+	+	-	+	+	-	+	+
Growth in 2.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.0% NaCl	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Growth in 8.0% NaCl	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Growth in 10.0% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Characteristics	Isolates									
	FN4	FN8	F3-1	F3-2	A85-2	A93	FP48-1	A35	F7-1	F7-2
Gram reaction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Motility	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Spore formation	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
Catalase	−	−	−	−	−	−	−	+	−	−
Pseudocatalase	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Benzidine test	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Slime formation	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Nitrate reduction	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Gelatin hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Aesculin hydrolysis	+	+	−	+	+	−	+	+	+	+
Arginine hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Starch hydrolysis	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Glucose utilization	←fermentative→									
Relation to oxygen	←microaerophilic→									
Gas from glucose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Gas from gluconate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Reaction in litmus milk:										
Acidification	+	$+^{w}$	−	−	$+^{w}$	+	$+^{w}$	+	−	−
Coagulation	+	−	−	−	−	+	−	+	−	−
Peptonization	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Reduction	+	−	−	−	−	+	−	+	−	−
Growth at 15°	+	−	+	+	$+^{w}$	$+^{w}$	+	−	+	+
Growth at 45°	+	$+^{w}$	−	−	−	+	−	−	−	−
Growth at pH 3.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 4.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 5.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 6.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 7.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 8.5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 9.0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth at pH 9.6	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−
Growth in 2.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 4.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 6.0% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in 8.0% NaCl	+	+	−	−	+	+	−	+	−	−
Growth in 10.0% NaCl	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−

+, positive reaction ; $+^{w}$, weak reaction ; −, negative reaction

Table 10 Pattern of fermented carbohydrates of <u>Lactobacillus</u> species isolated from fermented foods.

Carbohydrates	Isolates																	
	P1-3	P30-1	FP51-1	P16r	P24-1	P24-3	P46-1	FP6	F4-1	F4-2	F11-1	F11-2	F18-1	F18-2	F19-1	F19-2	P28-3	P305
L-Arabinose	−	+	+	−	$+^{w}$	+	+	$+^{w}$	−	−	$+^{w}$	−	+	+	+	+	+	+
D-Ribose	−	$+^{w}$	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	+	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	+	+	$+^{w}$
D-Xylose	−	−	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	$+^{w}$	$+^{w}$	−	−	+	−
Rhamnose	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−
Fructose	$+^{w}$	+	$+^{w}$	+	+	+	$+^{w}$	+	$+^{w}$	+	$+^{w}$	−	+	+	+	+	$+^{w}$	+
Galactose	$+^{w}$	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	$+^{w}$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	$+^{w}$	+
Mannose	+	+	$+^{w}$	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
Cellobiose	−	+	+	+	$+^{w}$	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
Lactose	−	+	−	−	$+^{w}$	$+^{w}$	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	−	−	$+^{w}$	−	−
Maltose	+	+	$+^{w}$	+	+	+	$+^{w}$	+	+	$+^{w}$	+	+	+	+	+	+	−	+
Melibiose	+	+	−	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	−	+
Sucrose	$+^{w}$	+	+	−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	−	$+^{w}$	−	+
Trehalose	−	+	−	+	+	+	−	+	+	+	−	+	+	+	+	+	−	+
Melezitose	−	+	−	−	−	+	−	+	−	−	−	−	+	+	+	+	−	+
Raffinose	$+^{w}$	+	−	−	$+^{w}$	−	−	$+^{w}$	−	−	−	+	$+^{w}$	$+^{w}$	+	$+^{w}$	−	+
Aesculin	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	+	+	−	+	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	+	+	+	+	+	−	+
∝Methyl D-glucoside	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	+	−	−	−	+
Salicin	−	+	+	+	+	+	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	−	+	+	+	+	+	−	+
Mannitol	−	$+^{w}$	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	+	+	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	−	−	$+^{w}$
Sorbitol	−	$+^{w}$	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	−	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	$+^{w}$	−	−	$+^{w}$

Table 10 (continued)

Carbohydrates	Isolates																	
	P319	P319-1	F21-1	F21-2	P2-4	P37	F2-1	F5-1	F5-2	F9-1	F20	F10-1	F10-2	FP2-1	FP2-5	FP11-1	FP14-1	FP14-2
L-Arabinose	+	+	+	+	+	−	+	−	+	−	$+^{W}$	+	−	−	+	+	−	−
D-Ribose	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	+	−	+	−	+	$+^{W}$	−	$+^{W}$	−	+	$+^{W}$	+	−	−
D-Xylose	$+^{W}$	$+^{W}$	−	−	+	−	−	$+^{W}$	+	−	−	−	−	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	+	$+^{W}$
Rhamnose	−	−	−	−	−	−	−	−	$+^{W}$	−	−	−	−	−	+	+	+	−
Fructose	+	+	$+^{W}$	$+^{W}$	+	$+^{W}$	+	$+^{W}$	+	+	$+^{W}$	+	$+^{W}$	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	$+^{W}$	+	+	$+^{W}$	+	−	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	$+^{W}$	+	+	−	+	+	+	$+^{W}$	−	+	$+^{W}$	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	+	+	$+^{W}$	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	$+^{W}$	−	−	$+^{W}$	+	+	+	+	$+^{W}$	+	+	+	+	+	+	+
Trehalose	+	+	+	+	$+^{W}$	$+^{W}$	+	−	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+
Melezitose	−	−	−	−	$+^{W}$	−	+	−	−	−	−	+	−	−	+	−	−	−
Raffinose	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	−	+	+	−	+	−	−	−	+	+	+	+	+
Aesculin	+	+	+	+	+	−	−	−	+	+	$+^{W}$	+	−	+	+	+	+	+
∝Methyl D-glucoside	−	−	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	+	+	−	−	−
Salicin	+	+	+	+	+	$+^{W}$	+	−	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	+	−	+	+	+	+	+
Mannitol	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	−	$+^{W}$	$+^{W}$	−	$+^{W}$	−	+	+	+	+	+
Sorbitol	−	−	$+^{W}$	$+^{W}$	−	−	$+^{W}$	−	$+^{W}$	−	−	$+^{W}$	−	−	$+^{W}$	+	+	+

Table 10 (continued)

Carbohydrates	Isolates																
	FP18	FP24-1	FP25-1	FP34	FP34-2	FP37-4	FP38-1	A330	P322	P325	P323	A83	F26-1	F26-2	F27-2	F28-1	F28-2
L-Arabinose	+	-	-	+	+	-	+	+	+	+w	+	+	+	+	+w	+	+w
D-Ribose	+	-	-	+	+	-	+w	+w	+	-	+	+w	+	+	+	+	+w
D-Xylose	+	+	+w	+	+	+	+	+w	+	-	-	+w	+	+w	+w	-	-
Rhamnose	+	-	-	+w	+w	-	+w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	+w	+	+	+	+	+	+	+	+w
Galactose	+	+w	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+w	+	+	+	-	+	+	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	+	+	+w	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Lactose	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+w	+	+w	-	+	+w	-	+w
Maltose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+w	+	+	-	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+	+	+w	-	+	+	+	+	+	+	-
Trehalose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Melezitose	-	-	-	-	-	-	-	+w	-	-	+	-	-	+	+	-	+
Raffinose	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	+	-	-	+
Aesculin	+	+	+	+	+	+	+	+w	-	+w	+	+w	-	+	+	+w	+
α-Methyl D-glucoside	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Salicin	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+w	-	+	+	-	+
Mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+w	-	-	+w	-	-	+w	+w	+w	+w
Sorbitol	-	+	+	-	-	+	-	+w	-	-	+w	+w	-	+w	+w	+w	+w

Table 10 (continued)

Carbohydrates	Isolates																
	FP49-2	A314	A27-2	FN1-3	FN1-4	FN3r	FN3	FN4	FN8	F3-1	F3-2	F85-2	A93	FP48-1	A35	F7-1	F7-2
L-Arabinose	−	$+^{W}$	+	+	+	−	−	+	+	+	+	+	−	−	+	−	−
D-Ribose	−	+	$+^{W}$	+	$+^{W}$	+	−	$+^{W}$	+	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$
D-Xylose	−	+	$+^{W}$	−	−	−	−	−	$+^{W}$	−	−	−	−	−	−	−	−
Rhamnose	−	−	−	−	−	−	−	−	$+^{W}$	−	−	−	−	−	−	−	−
Fructose	+	$+^{W}$	+	+	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	+	+	$+^{W}$	+	+	$+^{W}$	+	+	+	+
Galactose	+	−	+	+	$+^{W}$	$+^{W}$	+	+	+	$+^{W}$	+	+	+	+	+	$+^{W}$	$+^{W}$
Glucose	+	$+^{W}$	+	+	+	+	+	+	+	$+^{W}$	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Cellobiose	+	−	+	+	$+^{W}$	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	−	$+^{W}$	+	−	$+^{W}$	$+^{W}$	+	−	−	+	+	+	+	$+^{W}$	−	−
Maltose	+	+	+	+	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	+	−	−	−	+	−	+	+	+	$+^{W}$	+	+	−	+	+	−	−
Sucrose	+	−	+	+	+	+	+	+	+	$+^{W}$	+	+	−	+	+	+	+
Trehalose	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Melezitose	+	−	+	+	−	+	+	+	−	−	+	+	−	−	+	−	−
Raffinose	+	−	−	−	−	−	+	+	$+^{W}$	−	$+^{W}$	+	−	+	$+^{W}$	−	−
Aesculin	$+^{W}$	$+^{W}$	+	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	+	+	+	−	$+^{W}$	+	$+^{W}$	+	+	+	$+^{W}$
∝Methyl D-glucoside	−	−	+	+	−	+	+	+	+	−	−	+	−	−	+	−	−
Salicin	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitol	$+^{W}$	−	$+^{W}$	$+^{W}$	−	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	−	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$
Sorbitol	$+^{W}$	−	$+^{W}$	$+^{W}$	−	$+^{W}$	−	$+^{W}$	+	−	−	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$	$+^{W}$

Acidity is expressed as ml of 0.1 N NaOH consumed to neutralize 3 ml of culture broth. More than 0.8 ml, +; 0.4 - 0.8 ml, $+^{W}$; less than 0.4 ml, −

Table 11 Growth in vitamin assay medium of Lactobacillus species isolated from fermented foods.

Isolates	อาหารที่ขาดวิตามิน					
	Thiamine	Folic acid	Biotin	Riboflavin	Pyridoxine	GYP broth
P1-3	-	+	-	+	-	+
P30-1	+	-	-	+	-	+
FP51-1	+	-	-	+	-	+
P16r	+	+	-	+	-	+
P24-1	+	+	-	+	-	+
P24-3	+	+	-	+	-	+
P46-1	+	-	-	+	-	+
FP6	+	+	-	+	-	+
F4-1	+	+	-	+	-	+
F4-2	+	+	-	+	-	+
F11-1	+	+	-	+	-	+
F11-2	+	+	-	+	-	+
F18-1	+	+	-	+	-	+
F18-2	+	+	-	+	-	+
F19-1	+	+	-	+	-	+
F19-2	+	+	-	+	-	+
P28-3	+	-	-	+	-	+
P305	+	+	-	+	-	+

Table 11 (continued)

Isolates	อาหารที่ขาดวิตามิน					
	Thiamine	Folic acid	Biotin	Riboflavin	Pyridoxine	GYP broth
P319	+	+	-	+	-	+
F319-1	+	+	-	+	-	+
F21-1	+	+	-	+	-	+
F21-2	+	+	-	+	-	+
P2-4	+	+	-	+	-	+
P37	+	+	-	+	-	+
F2-1	+	+	-	+	-	+
F5-1	+	+	-	+	-	+
F5-2	+	+	-	+	-	+
F9-1	+	+	-	+	-	+
F20	+	-	-	+	-	+
F10-1	+	+	-	+	-	+
F10-2	+	-	-	+	-	+
FP2-1	+	+	-	+	-	+
FP2-5	+	+	-	+	-	+
FP11-1	+	+	-	+	-	+
FP14-1	+	+	-	+	-	+
FP14-2	+	+	-	+	-	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 11 (continued)

Isolates	อาหารที่ขาดวิตามิน					
	Thiamine	Folic acid	Biotin	Riboflavin	Pyridoxine	GYP broth
FP18	+	+	-	+	-	+
FP24-1	+	-	-	-	-	+
FP25-1	+	+	-	-	-	+
FP34	+	+	-	+	-	+
FP34-2	+	+	-	+	-	+
FP37-4	+	+	-	+	-	+
FP38-1	+	+	-	-	-	+
A330	+	+	-	+	-	+
P322	+	-	-	+	-	+
P325	+	+	-	+	-	+
P323	+	+	-	+	-	+
A83	+	+	-	+	-	+
F26-1	+	-	-	+	-	+
F26-2	+	+	-	+	-	+
F27-2	+	+	-	+	-	+
F28-1	+	+	-	+	-	+
F28-2	+	+	-	+	-	+

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Table 11 (continued)

Isolates	Thiamine	Folic acid	Biotin	Riboflavin	Pyridoxine	GYP broth
	อาหารที่ขาดวิตามิน					
FP49-2	+	+	−	+	−	+
A314	+	−	−	+	−	+
A27-2	+	+	−	+	−	+
FN1-3	+	+	−	+	−	+
FN1-4	+	−	−	+	−	+
FN3r	+	+	−	+	−	+
FN3	+	+	−	+	−	+
FN4	+	+	−	+	−	+
FN8	+	+	−	+	−	+
[illegible]	+	−	−	+	−	+
F3-2	+	+	−	+	−	+
A85-2	+	−	−	−	−	+
A93	+	−	−	+	−	+
FP48-1	+	+	−	+	−	+
A35	+	−	−	−	−	+
F7-1	+	+	−	+	−	+
F7-2	+	+	−	+	−	+

+, เชื้อสามารถเจริญ ; −, เชื้อไม่สามารถเจริญ ; GYP broth, อาหารเหลว GYP สำหรับเปรียบเทียบการเจริญ

บทที่ ๕

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา ชีวเคมี และการเจริญในอาหารที่ขาดวิตามินบางชนิดของเชื้อที่แยกจากอาหารหมักดอง จำนวนทั้งหมด ๗๐ ไอโซเลต พบว่า เชื้อเหล่านี้มีลักษณะเป็นรูปร่างแท่ง และถึงแม้จะมีบางเชื้อที่รูปร่างสั้นเกือบคล้ายกับเชื้อในสกุล Streptococcus หรือ Leuconostoc ก็ตาม ผู้วิจัยมีความเห็นว่าทั้ง ๗๐ ไอโซเลตควรจะเป็นเชื้อในสกุล Lactobacillus species เพราะส่วนใหญ่เชื้อเหล่านี้เจริญได้ที่ระดับ pH ต่ำกว่า ๔.๘ ซึ่งแตกต่างจากเชื้อจำพวก Leuconostoc ที่ส่วนใหญ่ไม่สามารถเจริญได้ (๔,๕) นอกจากนี้ส่วนใหญ่เชื้อ Leuconostoc ต้องการ Riboflavin แต่เชื้อที่แยกได้สามารถเจริญใน Riboflavin assay medium จึงมีแนวโน้มไม่ต้องการวิตามินชนิดนี้ เชื้อที่แยกได้ไม่สร้างเมือกจากน้ำตาลซูโครสแต่เชื้อจำพวก Leuconostoc mesenteroides และ Leu. dextranicum สามารถสร้างได้ (๔,๕) ที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ เชื้อที่แยกได้ส่วนใหญ่ไม่สร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส แต่สร้างแก๊สจากกลูโคเนต ซึ่งจะเป็นคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อ Lactobacillus จำพวก homofermenter ทำให้แตกต่างจากเชื้อสกุล Leuconostoc ที่เป็น heterofermenter อย่างชัดเจน (๔-๗) อย่างไรก็ตามมีเชื้อจำนวนน้อยที่ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคเนตซึ่งอาจไม่ใช่เชื้อ Lactobacillus ก็ได้หรืออาจเป็น Lactobacillus จำพวก heterofermenter ก็ได้ ผู้วิจัยไม่สามารถสรุปผลแน่นอนได้ การศึกษาลักษณะอื่น ๆ เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณเปอร์เซนต์ของ G+C ของสาย DNA การวิเคราะห์องค์ประกอบของผนังเซลล์ การวิเคราะห์หา optical form ของกรดแลคติคที่เชื้อสร้างขึ้น และการศึกษาเอนไซม์ lactate dehydrogenase จะมีความสำคัญมากต่อการจัดกลุ่มเชื้อเหล่านี้

สรุปผลการทดลองจะเห็นว่าสามารถแบ่งกลุ่มเชื้อ Lactobacillus species ที่แยกจากอาหารหมักดองได้เป็น ๒ กลุ่มใหญ่ คือ พวกที่ไม่สามารถสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคสแต่สร้างแก๊สจากกลูโคเนต และหมักน้ำตาลไรโบสได้มีจำนวน ๕๓ ไอโซเลต และที่ไม่สามารถหมักน้ำตาลไรโบสได้มี ๑๓ ไอโซเลต กลุ่มที่สองเป็นพวกที่ไม่สร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคสหรือกลูโคเนต พวกที่สามารถหมักน้ำตาลไรโบสได้มี ๒ ไอโซเลต และพวกที่ไม่หมักน้ำตาลไรโบสมี ๒ ไอโซเลต (Table ๑๒)

Table 12 Grouping of Lactobacillus species isolated from fermented foods.

Group	Isolates
I. No gas from glucose. Gas from gluconate.	
a. ribose ferment*	F2-1, F3-1, F3-2, F4-1, F4-2, F5-2, F7-1, F7-2, F9-1, F10-1, F11-1, F18-1, F18-2, F19-1, F19-2, F21-1, F21-2, F26-1, F26-2, F27-2, F28-2, A27-2, A35, A83, A85-2, A93, A314, A330, P2-4, P16r, P24-1, P24-3, P28-3, P30-1, P46-1, P319, P319-1, P305, P322, P323, FN1-3, FN1-4, FN4, FN8, FP2-1, FP2-5, FP6, FP11-1, FP18, FP34, FP34-2, FP38-1, FP48-1.
b. ribose not ferment.	F5-1, F10-2, F11-2, P1-3, P37, P325, FN3, FP14-1, FP14-2, FP24-1, FP25-1, FP37-4, FP49-2.
II. No gas from glucose or gluconate.	
a. ribose ferment.	F28-1, FN3r.
b. ribose not ferment.	F20, FP51-1.

*some isolates ferment weakly.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I10341468

เอกสารอ้างอิง

1. Carr,J.G., C.V. Cutting, and G.C. Whiting. 1975. Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food. London : Academic Press. Inc. LTD.

2. Jay, J.M. 1978. Modern Food Microbiology. 2nd ed., Litton Educational Publishing, Inc.

3. Prescott, S.C. and C.G. Dunn. 1959. Industsial Microbiology. 3rd ed., McGraw-Hill Book Company, Inc.

4. Buchanan, R.E. et al. 1974. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Baltimore : The Williams & Wilkins Company.

5. Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Genus Lactobacillus in Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol 2,p.1209, ed. by H.A. Sneath, Williams & Wilkins Co., Baltimore.

6. Sharpe, M.E. and T.F. Fryer. 1966. Identification of Lactic acid Bacteria in Identification Methods for Microbiologists, Part A, p. 65 ed. by B.M. Gibbs and F.A. Skinner, New York : Academic Press.

7. Doelle, H.W. 1975. Fermentation of Lactic Acid Bacteria in Bacterial Metabolism. 2nd ed. New York : Academic Press : 622 - 646.

8. Tanasupawat, S. and W. Daengsubha. 1983. Pediococcus species and Related Bacteria Found in Fermented Foods and Related Materials in Thailand. J. Gen. Appl. Microbiol. 29 : 487 - 506.

9. Tanasupawat,S. and K. Komagata. 1986. Identification of Gram-poritive, and Catalase-positive Cocci Isolated from Fermented Fish in Thailand. Annual Reports of International Center of Cooperative Research in Biotechnology, Japan., 9 : 239 - 252.

10. Whittenbury, R. 1963. The Use of Soft Agar in the Study of Condition Affecting the Utilization of Fermentable Substrates. J. Gen. Microbiol. 32: 375 - 384.

11. Deibel, R.H. and J.B. Evans. 1960. Modified Benzidine Test for the Defection of Cytochrome Containing Respiratory System in Microorganism. J.Bact. 79 : 356 - 360.

12. Baird-Parker, A.C. 1966. Methods for Classifying Staphylococci and Micrococci in Identification Methods for Microbiologists, Part A, p. 59 ed. by B.M. Gibbs and F.A. Skinner, New York : Academic Press.

13. Gemmel, M. and W. Hodgkiss. 1964. The Physiological Characteristics and Flagella Arrangement of Motile Homofermentative Lactobacilli. J. Gen. Microbiol. 35 : 519 - 526.

14. Thornley, M.J. 1960. The Differentiation of Pseudomonas from other Gram-negative Bacteria on the Basis of Arginine Metabolism. J.Appl. Bact. 23 : 37 - 52.

ภาคผนวก

สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อ

องค์ประกอบของอาหารแต่ละสูตรต่อไปนี้ต้องใช้น้ำกลั่น ๑๐๐ มล. และต้องฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ ๑๒๐ °ซ นาน ๑๕ นาที ยกเว้นการเตรียมอาหารน้ำตาลในการทดสอบการสร้างกรด ต้องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ ๑๑๐ °ซ นาน ๑๐ นาที

1. Aesculin broth

Aesculin	1	g
Glucose	0.25	g
Ferric citrate	0.05	g
Beef exfract	0.5	g
Yeast extract	0.5	g
$MnSO_4 \cdot 4H_2O$	0.01	g
Tween 80	0.1	g

2. Arginine agar

Peptone	0.1	g
NaCl	0.5	g
K_2HPO_4	0.03	g
L(+) arginine HCl	1.0	g
Phenol red	0.001	g
Agar	0.3	g
pH	7.2	

3. Fermentable carbohydrate broth

Carbohydrate	0.5	g
Yeast extract	0.4	g

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Peptone	0.5	g
Salt solution	0.5	ml
	pH 6.8	

สำหรับการสร้างแก๊สจากน้ำตาลกลูโคส หรือ กลูโคเนต (๑%) ใช้ durham tube บรรจุลงไปในหลอดอาหาร เพื่อให้แก๊สแทนที่อาหารในหลอด

4. Gelatin broth

Gelatin	10.0	g
Glucose	1.0	g
Yeast extract	0.5	g
Peptone	0.5	g
Sodium acetate	0.3	g
Salt solution	0.5	ml
	pH 6.8	

5. GYP-agar

Glucose	1.0	g
Yeast extract	0.5	g
Peptone	0.5	g
Agar	1.5	g
	pH 6.8	

การแยกเชื้อต้องเติม $CaCO_3$ 1.0 g เพื่อดูการสร้างกรด

6. GYP-broth

Glucose	1.0	g
Yeast extract	0.5	g
Peptone	0.5	g

	Sodium acetate	0.5	g
	Salt solution	0.5	ml
		pH 6.8	
<u>Salt solution</u> :	$MgSO_4.7H_2O$	4.0	g
	$MnSO_4.4H_2O$	0.2	g
	$FeSO_4.7H_2O$	0.2	g
	NaCl	0.2	g
	Distilled water	100	ml

การทดสอบความสามารถเจริญของเชื้อใน NaCl ให้เติมสารดังกล่าวนี้ลงในอาหารตามปริมาณที่ต้องการ ส่วนการทดสอบการเจริญที่ระดับ pH เริ่มต้นต่าง ๆ ให้เตรียม GYP broth แล้วฆ่าเชื้อ และปรับด้วยสารละลาย NaOH หรือ HCl ที่ปราศจากเชื้อจนได้ระดับ pH ตามต้องการ โดยวัดด้วย pH meter

7. <u>Nitrate broth</u>

Peptone	1.0	g
NaCl	1.0	g
KNO_3	0.1	g

8. <u>Oxidative-Fermentative Test</u>

Tryptone	1.0	g
Yeast extract	0.1	g
Glucose	1.0	g
BCP	0.004	g
Agar	0.2	g

9. <u>Soft agar</u>

Glucose	1.0	g
Beef extract	0.5	g

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Yeast extract	0.5	g
Tween 80	0.05	g
BCP	0.004	g
Agar	0.15	g
	pH 6.8-7.0	

10. SYP agar

Sucrose or starch	1.0	g
Yeast extract	1.0	g
Peptone	1.0	g
Agar	1.5	g

สารเคมี และ วิธีเตรียม

1. การย้อมสีแกรม (Hucker modification)

1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Solution A :	Crystal violet	2.0	g
	Ethyl alcohol	20	ml
Solution B :	Ammonium oxalate	0.8	g
	Distilled water	80	ml

ผสมสารละลาย A และ B เข้าด้วยกัน

1.2 Lugol's solution

Iodine	1.0	g
KI	2.0	g
Distilled water	300	ml

1.3 Counterstain solution

Safranin O	10	ml

(2.5% solution in 95% ethanol)

Distilled water	100	ml

วิธีการย้อม นำสไลด์ที่ smear เชื้อมาทำให้แห้งและ fix แล้วย้อมด้วยสารละลาย ๑.๑ นาน ๑ นาที ล้างสีออกด้วยน้ำ แล้วหยดสารละลาย ๑.๒ ลงไปปล่อยไว้นาน ๑ นาที ล้างด้วยน้ำ แล้วซับให้แห้ง หยด ethyl alcohol ๙๕% ลงไป decolorize ซับให้แห้งแล้วย้อมทับด้วยสารละลาย ๑.๓ นาน ๑๐ วินาที แล้วล้างน้ำและทำให้แห้ง นำไปตรวจสอบดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเชื้อติดสีของ crystal violet แสดงว่าเป็นเชื้อแกรมบวก แต่ถ้าติดสีแดงของ safranin แสดงว่าเป็นเชื้อแกรมลบ

2. Benzidine hydrochloride solution

ละลาย benzidine ๑ กรัม ใน gracial acetic acid ๒๐ มล. เติมน้ำกลั่นลงไป ๓๐ มล. นำไปทำให้ร้อนและคนให้เข้ากัน แล้วปล่อยให้เย็น เติม ethyl alcohol ลงไป ๕๐ มล. เขย่าให้เข้ากัน ใส่ขวดสีชาเก็บไว้ในตู้เย็น

3. Hydrogen peroxide solution

Hydrogen peroxide	3.0	g
Distilled water	100	ml

ผสมให้เข้ากันเก็บใส่ขวดสีชาไว้ในตู้เย็น

4. Nitrate test solution

Solution A :	Sulphanilic acid	0.8	g
	Acetic acid (5N)	100	ml

ละลาย sulphanilic acid ใน acetic acid โดยให้ความร้อนเล็กน้อย

Solution B :	α-Naphthylamine	0.5	g
	Acetic acid (5N)	100	ml