การพิสูจน์เอกลักษณ์และคุณลักษณะของแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่แยกจากเนื้อตาลโตนดสุก น้ำตาลสด และน้ำตาลเมา ในจังหวัดชัยนาท

IDENTIFICATION AND CHARACTERIZATION OF BACTERIA YEAST AND MOLD ISOLATED FROM RIPE PALMYRA FRUIT PULP, PALMYRA JUICE AND TODDY IN CHAINAT PROVINCE

อำนาจ ภักดีโต[1], สุรพล พหลภาคย์[2] และสัณฐิตา ตังคจิวางกูร[3]
Amnat Pakdeeto[1], Surapol Paholpak[2], Santhita Tungkajiwangkoon[3]

[1] สาขาวิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะเกษตรและชีวภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กทม.10900 [2] สาขาวิชาวิทยาการผลิตและสุขภาพสัตว์ คณะเกษตรและชีวภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กทม.10900 [3] สาขาวิชาวิทยาการผลิตพืชเพื่อชุมชนเมือง คณะเกษตรและชีวภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม กทม.10900

[1]Food Science and Technology Program, Faculty of Agriculture and Life Science, Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok 10900, Thailand [2]Animal Production and Health Sciences Program, Faculty of Agriculture and Life Science, Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok 10900, Thailand [3]Crop production for Urban Communities Program, Faculty of Agriculture and Life Science, Chandrakasem Rajabhat University, Bangkok 10900, Thailand

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ ได้ทำการแยก ตรวจนับ พิสูจน์เอกลักษณ์ของจุลินทรีย์ที่เจริญอยู่ในเนื้อตาลโตนดสุก น้ำตาลสด และน้ำตาลเมา จากศูนย์เรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียงการอนุรักษ์ตาลโตนด ตำบลห้วยกรด อำเภอสรรคบุรี จังหวัดชัยนาท จำนวน 6, 6 และ 7 ตัวอย่างตามลำดับ และทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจากไม้พะยอมและไม้มะเกลือที่มีผลต่อจุลินทรีย์ที่แยกได้เปรียบเทียบกับจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐาน หลังจากทำการตรวจนับแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ทั้งหมด และตรวจวิเคราะห์หาแบคทีเรียก่อโรคที่อยู่ในตัวอย่างข้างต้น พบว่า มีแบคทีเรียในเนื้อตาลโตนดสุกมีอยู่จำนวน 3.3×10^{7} - 4.7×10^{10} CFU/ml ยีสต์และรา มีจำนวน 2.1×10^{5} - 1.7×10^{8}CFU/ml ในน้ำตาลสดมีแบคทีเรียจำนวน 1.2×10^{8} - 2.5×10^{10}CFU/ml ยีสต์และรา จำนวน 1.2×10^{7} - 3.1×10^{8} CFU/ml และในน้ำตาลเมามีแบคทีเรียจำนวน 1.2×10^{7} - 1.9×10^{10} CFU/ml ยีสต์และรา จำนวน 1.3×10^{6} - 2.6×10^{8} CFU/ml นอกจากนี้ยังพบ *Bacillus cereus* ในเนื้อตาลโตนดสุก *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* ในน้ำตาลสด และ *Staphylococcus aureus* ในน้ำตาลเมาอีกด้วย หลังจากนำแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรดอะซิติก ยีสต์และรา ที่แยกได้จำนวน 85, 95, 22 และ 24 ไอโซเลต ตามลำดับ มาทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส และโปรตีเอส พบว่า แบคทีเรีกรดแลคติกและแบคทีเรียกรดอะซิติกไม่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสย่อยเคซีนได้ แต่พบยีสต์ จำนวน 6 ไอโซเลต สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งได้เช่นเดียวกับเชื้อราที่แยกได้ ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อโดยอาศัยคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี สามารถจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ในสกุล *Lactobacillus, Streptococcus*, *Pediococcus* แบคทีเรียกรดอะซิติกอยู่ในสกุล *Acetobacter*, *Gluconobacter* ยีสต์อยู่ในสกุล *Saccharomyces* และราอยู่ในสกุล *Curvularia, Penicillium, Nigrospora* นอกจากนี้จุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐานจำนวน 10 สายพันธุ์ และจุลินทรียที่แยกได้ ชนิดละ 3 สายพันธุ์ ยังถูกนำมาทดสอบด้วยสารสกัดจากเนื้อพะยอม เปลือกพะยอม เนื้อมะเกลือ และเปลือกมะเกลือ (เอททานอล 95 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำ 5:1 เท่า) พบว่า สารสกัดจากเนื้อพะยอมสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐานได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอม โดยสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคได้ดีจากมากไปน้อย ได้แก่ *S. epidermidis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* ATCC 6538, *S. albany, B. cereus* ATCC 9634, *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* ATCC 8739 and *E. aerogenes* ตามลำดับ และยังสามารถออกฤทธิ์ยับยั้งยีสต์และราที่แยกได้บางสายพันธุ์ นอกจากนี้ ผลการวิจัยยังพบว่าทั้งสารสกัดจากเนื้อมะเกลือ และเปลือกมะเกลือ ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐาน แบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรดอะซิติกและยีสต์ที่แยกได้ แต่สารสกัดจากเปลือกมะเกลือมีผลออกฤทธิ์ยับยั้งราที่แยกได้บางสายพันธุ์

Abstract

This research has isolation, counting and identification of microorganisms growing in Ripe Palmyra fruit pulp, Palmyra juice and Toddy, 6, 6, and 7 samples respectively from Center of learning sufficiency economy conservation palmyra, Hauykrot village, Sanburi district, Chainat Province and test the properties extract of *Shorea roxburghii* meat, *Shorea roxburghii* bark, *Diospyros mollis* meat and *Diospyros mollis* bark for inhibited selected microorganisms and type strains of pathogenic microorganisms. After counting all bacteria, yeast mold and test food pathogen bacteria. The bacteria in Ripe Palmyra fruit pulp were found between $3.3x10^7$ to $4.7x10^{10}$ CFU/ml, yeast and mold were $2.1x10^5$ to $1.7x10^8$CFU/ml. Numbers of bacteria in Palmyra Juice were $1.2x10^8$ to $2.5x10^{10}$CFU/ml, yeast and mold were $1.2x10^7$ to $3.1x10^8$ CFU / ml. In addition, we found the numbers of bacteria in toddy were $1.2x10^7$ to $1.9x10^{10}$ CFU/ml, total yeast and mold were $1.3x10^6$ to $2.6x10^8$CFU/ml. In addition, *Bacillus cereus* were found in Ripe Palmyra fruit pulp. *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* found in Palmyra juice and *Staphylococcus aureus* found in toddy. The lactic acid bacteria (85 isolates), acetic acid bacteria (95 isolates), yeast (22 isolates) and mold (24 isolates) from the samples were tested for the enzyme amylase and protease production. Only yeasts (6 isolates) and mold can produce amylase. After identification of lactic acid bacteria (5 groups), acetic acid bacteria (7 groups), yeast (6 groups) and mold (4 groups) by basis on morphological and biochemical properties found lactic acid bacteria had similarity closed to the genus *Lactobacillus, Streptococcus*, *Pediococcus,* acetic acid bacteria closed to the genus *Acetobacter, Gluconobacter,* yeasts closed to the genus *Saccharomyces, and* mold closed to the genus *Curvularia, Penicillium*, *Nigrospora* In addition, 10 of pathogens standard strains and 3 selected strains of lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, yeast and mold were tested with extracts (ethanol 95%:H_2O,5:1) of *Shorea roxburghii* meat, *Shorea roxburghii* bark, *Diospyros mollis* meat and *Diospyros mollis* bark respectively. The extracts of *Shorea roxburghii* meat can inhibit 10 of pathogenic standard than extracts of *Shorea roxburghii* bark substance by it can be inhibited *S. epidermidis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *B. subtilis* ATCC 6633, *M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* ATCC 6538, *S. albany, B. cereus* ATCC 9634, *C. albicans* ATCC 10231, *E. coli* ATCC 8739 and *E. aerogenes* respectively, including some isolated of yeast and mold. In addition, the extracts of *Diospyros mollis* meat and *Diospyros mollis* bark can not be inhibited pathogenic microbial species all standards, lactic acid bacteria, acetic acid bacteria and yeast isolated from the samples. But, the extracts of *Diospyros mollis bark* can be a few inhibited some selected mold.

คำสำคัญ : แบคทีเรียกรดแลคติก, แบคทีเรียกรดอะซิติก, ยีสต์, รา, เนื้อตาลโตนดสุก, น้ำตาลสด, น้ำตาลเมา, พะยอม, มะเกลือ

Keywords: lactic acid bacteria, acetic acid bacteria, yeast, mold, Ripe Palmyra fruit pulp, Palmyra juice, Toddy, *Shorea roxburghii*, *Diospyros mollis*

***ติดต่อนักวิจัย** : อำนาจ ภักดีโต (อีเมล์ **pakdeetocru@gmail.com**)

***Corresponding author**: Amnat Pakdeeto (Email: **pakdeetocru@gmail.com**)

บทนำ

ต้นตาลโตนด (Palmyra palm) เป็นพืชในตระกูลปาล์มในตระกูล Palmaceae พวกเดียวกับมะพร้าว จาก ชิด สละ สาคู ระกำ และอินทผาลัมที่มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Borassus flabellifer* Linn. พบในสามารถขึ้นได้ในเขตร้อน พบโดยทั่วไปในประเทศอินเดีย ไทย พม่า ศรีลังกา และกัมพูชา สำหรับประเทศไทย ต้นตาลโตนดขึ้นหนาแน่นในแถบภาคใต้ของประเทศ ได้แก่ จังหวัดเพชรบุรี นครศรีธรรมราช และจังหวัดสงขลา นอกจากนี้ยังพบในจังหวัดภาคกลาง เช่น พิษณุโลก บุรีรัมย์ สิงห์บุรี ชัยนาท สุพรรณบุรี นครปฐม เป็นต้น โดยจังหวัดสงขลามีจำนวนต้นตาลโตนดมากที่สุดถึงประมาณ 3 ล้านต้น (กรมส่งเสริมการเกษตร, 2544; ปิฎฐะ บุนนาค, 2511) ตำบลห้วยกรด อำเภอสรรคบุรี เป็นพื้นที่แหล่งการผลิตน้ำตาลโตนดแห่งเดียวในจังหวัด

ชัยนาท ดังคำขวัญของชุมชนที่ว่า “ภาษาถิ่นสื่อสาร ตาลโตนดลือเลื่อง พระเครื่องอาคมขลัง ตลาดกลางข้าวและพืชไร่ มรดกไทยรำมะนา ตลาดค้าขายสุกร” ในปี พ.ศ. 2552 สถาพร ถาวรอธิวาสน์ ได้ทำการวิจัยเรื่องการพัฒนาและถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับเตาเคี่ยวตาลโตนดเพื่อยกระดับคุณภาพและความสามารถในการผลิต เนื่องจากพบปัญหาว่าปัจจุบันมีผู้สืบทอดในการขึ้นตาลโตนดน้อยลง จำนวนต้นตาลโตนดในพื้นที่ลดลง การผลิตเตาเคี่ยวน้ำตาลกำลังจะไม่มีผู้สืบทอด และหลังจากงานวิจัยแล้วเสร็จได้ร่วมมือกับชุมชนตำบลห้วยกรดจัดตั้งศูนย์เรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียงและการอนุรักษ์ตาลโตนดขึ้น พร้อมทั้งกำหนดแผนกลยุทธ์ในการพัฒนากลุ่มตาลโตนดอย่างต่อเนื่อง จากนั้นคณะผู้วิจัยได้ทำการลงพื้นที่เพื่อดำเนินกิจกรรมโครงการฟื้นฟูผู้ประสบภัยหลังน้ำท่วม ชุมชนห้วยกรด อำเภอสรรพบุรี จังหวัดชัยนาท ได้รับรู้ปัญหาการทำอาชีพตาลโตนดต่างๆจากชุมชน และได้รับความรู้กระบวนการแปรรูปผลผลิตจากต้นตาลของภูมิปัญญาท้องถิ่น คือ ชุมชนดังกล่าวได้นำเนื้อตาลโตนดสุก (Ripe Palmyra fruit pulp) ไปทำขนมตาล นำน้ำตาลสด (Palmyra juice) มาเคี่ยวเป็นน้ำตาลปี๊บและหมักทำเครื่องดื่มประเภทแอลกอฮอล์พื้นบ้าน เรียกว่าน้ำตาลเมา (Toddy) นอกจากนี้ยังนำน้ำตาลสดมาหมักเป็นน้ำส้มสายชูอีกด้วย หลังจากได้รับข้อมูลผู้วิจัยจึงได้ทำการค้นคว้าผลงานวิจัยต่างๆที่เกี่ยวข้อง พบว่า มีรายงานจุลินทรีย์หลายชนิดเกี่ยวข้อง ได้แก่ แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) แบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) แบคทีเรียก่อโรค (pathogenic bacteria) และยีสต์ (yeast) ที่เข้าไปมีบทบาทในการหมัก ปนเปื้อนและอาจจะทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคทางเดินอาหารของผู้บริโภค แต่ในกระบวนการเก็บเกี่ยวน้ำตาลที่ชาวบ้านใส่ไม้พะยอม (*Shorea roxburghii*) เข้าไปในกระบอกสำหรับรองรับน้ำตาลสด พบมีรายงานการวิจัยว่าไม้พะยอมมีบทบาทในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียก่อโรค ส่วนในกระบวนการทำน้ำตาลเมา พบว่า ชาวบ้านได้ใช้ไม้มะเกลือ (*Diospyros mollis*) ใส่ลงไปในน้ำตาลสดเพื่อให้เกิดการหมักของยีสต์ให้เป็นแอลกอฮอล์ และยังมีการรายงานวิจัยว่าไม้มะเกลือมีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ได้เช่นเดียวกับไม้พะยอม (เพชรนิยม ลัทธิรมย์และคณะ, 2555; อารี แก้วกนกวิจิตร, 2546)

ดังนั้น ในการวิจัยครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อ 1) ทำการแยกและการตรวจนับจำนวนแบคทีเรียกรด แลคติก แบคทีเรียกรดอะซิติก ยีสต์ รา และวิเคราะห์หาแบคทีเรียก่อโรคที่พบอยู่ในเนื้อตาลโตนดสุก น้ำตาลสด และน้ำตาลเมา 2) ทดสอบแบคทีเรีย ยีสต์ และราที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์ 3) จัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรด อะซิติก ยีสต์ และรา ที่มีคุณลักษณะที่ดีต่อการนำไปใช้ประโยชน์ทางด้านการผลิตอาหาร และ 4) ทดสอบผลของสารสกัดไม้พะยอมและไม้มะเกลือที่มีผลต่อจุลินทรีย์ที่แยกได้และจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐาน เพื่อนำผลการวิจัยไปพัฒนาการแปรรูปผลิตผลจากตาลโตนด เพื่อส่งเสริมอาชีพการทำตาลของชุมชนและประโยชน์ในด้านการอนุรักษ์พันธุกรรมไม้พะยอมและไม้มะเกลือสำหรับใช้ทางด้านการแพทย์ และเภสัชกรรมต่อไปในอนาคต โดยงานวิจัยนี้เป็นงานสนองพระราชดำริในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

<u>1. การตรวจนับแบคทีเรีย ยีสต์ และราทั้งหมด</u> ทำแบบ Total plate count โดยวิธีการ Spread plate technique บนผิวหน้าอาหาร Nutrient agarส่วนการนับยีสต์ และราจะทำบนผิวหน้าอาหาร Potato Dextrose Agar แล้วบ่มไว้ที่ 30-37 องศาเซลเซียส นาน 2-3 วัน สังเกตการเจริญของเชื้อเป็นระยะ ครบกำหนดเวลา แล้วทำการตรวจนับเชื้อ

<u>2. การวิเคราะห์หาแบคทีเรียก่อโรค</u> ทำการตรวจวิเคราะห์โดยใช้วิธีการของ AOAC (1995), FAO (1992), McLandsborough (2005) และ วีรานุช หลาง (2552)

<u>3. การทดสอบแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์</u> ทดสอบการผลิตเอนไซม์โปรติเอส (protease) โดยลากเชื้อลงบนอาหารแข็งเคซีน (casein) ตรวจดูการเกิดบริเวณใส (clear zone) รอบๆโคโลนีของเชื้อ ส่วนการทดสอบผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase) ทำโดยขีดเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS ที่ใส่แป้ง (Starch) แทนกลูโคส ตรวจสอบการย่อยแป้ง โดยราดสารละลายไอโอดีน (Iodine) ให้ทั่วจานเพาะเชื้อ แล้วดูการเกิดบริเวณใสๆรอบๆโคโลนี ตามวิธีของ Tanasupawat and Daengsubha (1983)

<u>4. การแยก จัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดแลคติก</u> แยกโดยใช้อาหารแข็ง MRS-$CaCO_3$ ด้วยเทคนิค pour plate และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น ลักษณะรูปร่างเซลล์ ทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น การติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ คาตาเลส การสร้างแก๊สจากกลูโคส การรีดิวซ์ไนเทรต การย่อยอาร์จีนีน การสร้างเมือก การเจริญได้ที่อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือ และพีเอชต่างๆ การสร้างกรดจาก

การหมักคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ Tanasupawat and Daengsubha (1983) เพื่อจัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดแลคติกขั้นต้นในระดับสกุล (genus) โดยยึดหลักเกณฑ์ตามข้อมูลของ Axelsson (1998)

5. การแยก จัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดอะซิติก แยกโดยใช้อาหารแข็ง GEY-$CaCO_3$ ด้วยเทคนิค pour plate และศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี เช่น รูปร่างเซลล์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ ลักษณะโคโลนี การติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์คาตาเลส การเคลื่อนที่ และการสร้างกรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต ตามวิธีของ Seearunruangchai *et al.,* (2004) เพื่อจัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดแลคติกขั้นต้นในระดับสกุล (genus) โดยยึดหลักเกณฑ์ตามข้อมูลของ Asai (1968)

6. การจัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์ โดยศึกษาลักษณะรูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารแข็ง โดยสังเกตลักษณะสี ผิวหน้า ขอบความนูน และเนื้อโคโลนี ตามวิธีการของ Lodder (1970) และ Barnett *et al*. (1979)

7. การจัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรา โดยตรวจสอบรูปร่างลักษณะสีของเส้นใย บนอาหารแข็ง PDA และสามารถจัดจำแนกเบื้องต้นในระดับสกุลได้โดยการทำ Slide culture และนำไปตรวจดูลักษณะทางสัณฐานวิทยา เช่น การจัดเรียงตัวของเซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ตามวิธีการของ นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ (2551) และ Fisher and Cook (1998)

8. การทดสอบผลของสารสกัดไม้พะยอมและไม้มะเกลือที่มีผลต่อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่แยกได้ โดยทำการเตรียมสารสกัดจากไม้พะยอมและไม้มะเกลือ ตามวิธีการของ เพชรนิยม ลัทธิรมย์ และคณะ (2555) นำเปลือกไม้พะยอม เนื้อไม้ เปลือกไม้มะเกลือ และเนื้อไม้มะเกลือ มาทำการหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆ นำมาใส่ขวดแก้ว จากนั้นสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ น้ำกลั่นต่อเอทานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วน 1:5 เป็นเวลานาน 7 วัน ทำการกรองตัวทำละลายผ่านสำลี และระเหยตัวทำละลายด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator) จนได้สารสกัดที่เข้มข้น การทดสอบฤทธิ์ยับยั้งเชื้อก่อโรคของสารในไม้พะยอมและไม้มะเกลือโดยเทคนิค Paper disc-agar diffusion ตามวิธีการของ Benson (1998) โดยทำการดูดเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐาน แบคทีเรียกรดแลคติก แบคทีเรียกรดอะซิติก ยีสต์ และราที่คัดแยกได้อายุ 2 วัน ด้วยปิเปตปราศจากเชื้อ มาปริมาณ 100 ไมโครลิตร ถ่ายลงบนอาหาร Nutrient agar สำหรับจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐาน, อาหารแข็ง MRS สำหรับแบคทีเรียกรดแลคติก, อาหารแข็ง GEY สำหรับแบคทีเรียกรดอะซิติก และอาหารแข็ง PDA สำหรับยีสต์และรา จากนั้นทำการเกลี่ยเชื้อให้กระจายทั่วจานเพาะเชื้อ จากนั้นทำการคีบจับ Paper disc (Whatman™ ; CAT No. 2017-006 ขนาด 6 mm.) จุ่มลงในสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอม เนื้อพะยอม เปลือกมะเกลือ และเนื้อมะเกลือ วางลงบนผิวหน้าอาหารแข็งที่เตรียมไว้ข้างต้น โดยวาง 4 ตำแหน่งต่อหนึ่งจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ตรวจและบันทึกผลการทดลองโดยวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางแผ่น Paper disc รวมบริเวณโซนใส (clear zone) ที่เกิดขึ้น ทั้งแนวตั้งและแนวนอน แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาความกว้างบริเวณโซนใส ดังสมการ

$$\text{ความกว้างของบริเวณโซนใส (mm.)} = \frac{\sum \text{เส้นผ่าศูนย์กลางบริเวณโซนใสทั้งแนวตั้งและแนวนอน} - 6}{2}$$

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลการตรวจนับแบคทีเรีย ยีสต์ และราทั้งหมด

จากการนำเนื้อตาลโตนดสุก จำนวน 6 ตัวอย่าง น้ำตาลสด จำนวน 6 ตัวอย่าง และน้ำตาลเมา จำนวน 7 ตัวอย่าง จากศูนย์เรียนรู้เศรษฐกิจพอเพียงการอนุรักษ์ตาลโตนด ตำบลห้วยกรด อำเภอสรรคบุรี จังหวัดชัยนาท รวมทั้งหมดจำนวน 19 ตัวอย่าง มาทำการตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ทั้งหมด พบว่า มีจำนวนแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ในเนื้อตาลโตนดสุก น้ำตาลสด และน้ำตาลทั้งหมด แสดงดังตารางที่ 1

2. ผลการวิเคราะห์หาแบคทีเรียก่อโรค

พบว่า ในเนื้อตาลโตนดสุก มีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *Bacillus cereus* ในน้ำตาลสดมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* และในน้ำตาลเมามักจะมีการปนเปื้อนด้วยแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus* นอกจากนี้ ยังพบว่าในเนื้อตาลโตนดสุก น้ำตาลสด และน้ำตาลเมา ไม่พบการปนเปื้อน *Salmonella* sp. และ *Clostridium perfringens* แสดงดังตารางที่ 1

3. ผลการทดสอบแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ที่สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์

พบว่า ทั้งแบคทีเรีกรดแลคติกและแบคทีเรียกรดอะซิติกไม่สามารถสร้างเอนไซม์โปรติเอสย่อยเคซีนได้ เนื่องจากโดยปกติทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกและแบคทีเรียกรด อะซิติกมักจะมีบทบาทในการผลิตกรดมากกว่าผลิตเอนไซม์ที่มีประโยชน์ทางด้านอาหาร ส่วนเชื้อยีสต์มักจะมีบทบาทในการผลิตแอลกอฮอล์มากกว่าผลิตเอนไซม์ แต่ในงานวิจัยนี้สามารถพบยีสต์ จำนวน 6 ไอโซเลต (isolates) ที่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสย่อยแป้งได้เช่นเดียวกับเชื้อราที่แยกจากน้ำตาลเมา เนื้อตาลโตนดสุก และน้ำตาลสด

<u>4. ผลการแยก จัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดแลคติก</u>

พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกจะสร้างกรดออกมารอบๆโคโลนีและทำปฏิกิริยากับอาหารแข็ง MRS ที่เติมด่าง $CaCO_3$ ลงไป เกิดโซนใส (clear zone) ขึ้นรอบๆโคโลนี หลังจากทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน (Tanasupawat and Daengsubha, 1983) โดยผลการวิจัยครั้งนี้พบการกระจายของแบคทีเรียกรดแลคติกในเนื้อตาลโตนดสุก น้ำตาลสด และน้ำตาลเมา ส่วนใหญ่เป็นเชื้อรูปร่างกลม (cocci) มากกว่ารูปร่างแท่ง (rods) และเมื่อนำเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีแตกต่างกันมาทำการศึกษาคุณสมบัติทางด้านสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการ พบว่า เชื้อทุกไอโซเลต (isolate) มีคุณลักษณะต่างๆ เป็นไปตามคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทุกประการ คือ มีลักษณะโคโลนี กลมนูน สีขาวขุ่น ขอบเรียบโค้งนูนบนอาหารเหลว MRS ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่รีดิวซ์ไนเทรต และสามารถย่อยสลายอาร์จีนีนได้ (Albert *et al*.,1992; Balows *et al.,* 1992) หลังจากทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติก ดังตารางที่ 2 สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก ออกเป็น 5 กลุ่ม โดย กลุ่มที่ 1 และ 2 เป็นเชื้อที่มีลักษณะเซลล์รูปร่างแท่ง จัดเรียงเซลล์แบบเดี่ยว และคู่ ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่รีดิวส์ไนเตรท ย่อยสลายอาร์จีนีน เจริญที่เกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่พีเอช 9.6 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีลักษณะคล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรด แลคติก สกุล *Lactobacillus* (Axelsson,1993;1998; Tanasupawat *et.al*., 2000) กลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อที่มีลักษณะเซลล์รูปร่างกลม จัดเรียงเซลล์แบบสายโซ่ ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่รีดิวส์ไนเตรท ย่อยสลายอาร์จีนีน ไม่เจริญที่เกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ พีเอช 9.6 แต่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส มีลักษณะคล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรด แลคติกสกุล *Streptococcus* (Axelsson,1993;1998) ส่วนกลุ่มที่ 4 และ 5 เป็นเชื้อที่มีลักษณะเซลล์รูปร่างกลม จัดเรียงเซลล์แบบสี่เซลล์ ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่รีดิวส์ไน เตรท ย่อยสลายอาร์จีนีน เจริญที่เกลือ 6.5 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เจริญที่พีเอช 9.6 และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีลักษณะคล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Pediococcus* (Axelsson,1993;1998; Tanasupawat and Daengsubha, 1983) แสดงดังตารางที่ 2

<u>5. ผลการแยก จัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดอะซิติก</u>

พบว่า แบคทีเรียกรดอะซิติกจะสร้างกรดออกมารอบๆโคโลนีและเกิดโซนใสรอบๆ โดยมีลักษณะโคโลนีกลม สีขาวขุ่น ขอบเรียบ โค้งนูนบนอาหารแข็ง GEY-$CaCO_3$ เช่นเดียวกับแบคทีเรียกรดแลคติก แต่มีคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการต่างจากแบคทีเรียกรดแลคติก คือ แบคทีเรียกรดอะซิติกจะเป็นแบคทีเรียที่ติดสีแกรมลบ มีรูปร่างเซลล์แบบแท่งสั้น สร้างเอนไซม์คาตาเลส และสามารถเคลื่อนที่ได้เนื่องจากมีแฟลกเจลลา (flagella) จากการศึกษาลักษณะทางด้านชีวเคมี ได้แก่ การสร้างกรดจาก Ethanol และการหมักคาร์โบไฮเดรต จำนวน 14 ชนิด สามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดอะซิติกที่แยกได้จำนวน 7 กลุ่มที่แตกต่างกันและเมื่อนำคุณสมบัติที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลงานวิจัยของ อภิสิทธิ์ ศรีอรุณเรืองชัย (2541); Asai (1968) และ Seearunruangchai *et al*. (2004) สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียกรดอะซิติกกลุ่มที่ 4 (10 ไอโซเลต) ได้แก่ สายพันธุ์ AFP1-3, AFP4-2, AFP2-5, AFP2-2, AAP6-2, AFP4-1, AAP 6-1, ACP3-2, AFP2-4 และ AFP5-1 มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *Acetobacter aceti* และ กลุ่มที่ 7 (7ไอโซเลต) ได้แก่ สายพันธุ์ ACP3-4, ACP2-2, ACP3-5, AFP1-8, AFP4-4, ACP6-4 และ AFP1-2 มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับแบคทีเรียกรดอะซิติกสายพันธุ์ *Gluconobacter* sp. (Yamada *et al.,* 1997) แสดงดังตาราง 3 นอกจากนี้กลุ่มที่ 1 (21 ไอโซเลต) กลุ่มที่ 2 (18 ไอโซเลต) และกลุ่มที่ 3 (15 ไอโซเลต) กลุ่มที่ 5 (15 ไอโซเลต) และกลุ่มที่ 6 (9 ไอโซเลต) เป็นกลุ่มที่ยังไม่สามารถระบุสายพันธุ์ใดได้

<u>6. ผลการจัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์ยีสต์</u>

พบว่า ยีสต์มีรูปร่างของเซลล์เป็นทรงรี ลักษณะโคโลนี กลมนูน สีขาวขุ่น ทึบแสง ขอบเรียบ ลักษณะหนืด สามารถพิสูจน์ได้ว่าเป็นยีสต์โดยการสัมผัสกลิ่นแอลกอฮอล์ที่จานเพาะเลี้ยงเชื้อ หรือสามารถมองเห็น

เซลล์ยีสต์ที่กำลังขยาย 40 เท่า โดยกล้องจุลทรรศน์ได้ชัดเจนแตกต่างจากเซลล์แบคทีเรียที่ต้องมองด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่าจึงจะสามารถมองเห็นเซลล์ได้ จากการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ได้แก่ ความสามารถในการย่อยสลายและการหมักคาร์โบไฮเดรต จำนวน 15 ชนิด สามารถแบ่งยีสต์ที่แยกได้ออกเป็น 6 กลุ่ม โดยยีสต์กลุ่มที่ 2 (4 ไอโซเลต) ได้แก่ สายพันธุ์ YAP3-3, YAP3-6, YAP2-4 และ YAP3-4 มีคุณสมบัติคล้ายคลึงกับเชื้อยีสต์สายพันธุ์ *Saccharomyces cerevisiae* (Barnett *et al*., 1979; Kreger-Van Rij, 1984; Rippon, 1988) แสดงดังตารางที่ 4 ส่วนยีสต์กลุ่ม 1,3,4, 5 และ 6 เป็นกลุ่มที่ยังไม่สามารถระบุสายพันธุ์ใดได้

<u>7. ผลการจัดกลุ่มและพิสูจน์เอกลักษณ์เชื้อรา</u>

พบว่า สามารถจัดกลุ่มเชื้อราออกเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มที่ 1 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ *Curvularia* sp. กลุ่มที่ 2 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ *Penicillium* sp. และกลุ่มที่ 3 เป็นเชื้อราสายพันธุ์ *Nigrospora* sp. (นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ, 2551; Fisher and Cook, 1998) ส่วนเชื้อรา กลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อราที่ยังไม่สามารถระบุสายพันธุ์ได้ แสดงดังภาพที่ 1

<u>8. ผลการทดสอบผลของสารสกัดไม้พะยอมและไม้มะเกลือที่มีผลต่อจุลินทรีย์ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่แยกได้</u>

พบว่า สารสกัดจากเนื้อพะยอมสามารถทำการยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐานได้ดีกว่าสารสกัดจากเปลือกพะยอม โดยสารสกัดจากเนื้อพะยอมสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ก่อโรคได้มากกว่าส่วนสารสกัดจากเนื้อมะเกลือซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับ อารี แก้วกนกวิจิตร (2546) และทั้งสารสกัดจากเนื้อและเปลือกมะเกลือก็ไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐานทั้งหมดที่นำมาทดสอบได้ แสดงว่า มะเกลือไม่มีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์พวกแบคทีเรียก่อโรค ยีสต์ก่อโรค (*Candida albicans*) และยีสต์ที่แยกได้จากน้ำตาลเมา เนื้อตาลโตนดสุก และน้ำตาลสดได้ นอกจากนี้ ผลการวิจัยยังพบว่าทั้งสารสกัดจากเนื้อพะยอม เปลือกพะยอม เนื้อมะเกลือ และเปลือกมะเกลือยังไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งทั้งแบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria) แบคทีเรียกรดอะซิติก (acetic acid bacteria) ได้อีกด้วย โดยเฉพาะสารสกัดจากเนื้อมะเกลือไม่สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่นำมาทดสอบทั้งหมด ดังแสดงในตาราง 5

สรุปผลการทดลอง

แบคทีเรียในเนื้อตาลโตนดสุกมีมากที่สุด ส่วนจำนวนเชื้อยีสต์และราทั้งหมดพบมากที่สุดในน้ำตาลสด ในเนื้อตาลโตนดสุก พบมีการปนเปื้อนเชื้อ *Bacillus cereus* ในน้ำตาลสดมีการปนเปื้อนเชื้อ *Escherichia coli* และ *Bacillus cereus* และในน้ำตาลเมามักจะมีการปนเปื้อนเชื้อ *Staphylococcus aureus* ดังนั้น ในกระบวนการแปรรูปตาลโตนดควรทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีการพาสเจอไรส์ (pasteurization) ก่อนทุกครั้งเพื่อให้ปลอดภัยต่อผู้บริโภค แบคทีเรียกรดแลคติกที่พบในเนื้อตาลโตนดสุก น้ำตาลสด และน้ำตาลเมา ได้แก่ สายพันธุ์ *lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. และ *Pediococcus* sp. แบคทีเรียกรดอะซิติก ได้แก่สายพันธุ์ *Acetobacter* sp. และ *Gluconobacter* sp. ไม่สามารถสร้างเอนไซม์ โปรตีเอส และเอนไซม์อะไมเลสได้ ยีสต์ ได้แก่ สายพันธุ์ *Saccharomyces* sp. บางสายพันธุ์สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ ดังนั้น ควรนำยีสต์และแบคทีเรียกรดอะซิติกที่แยกได้ไปทำการทดลองผลิตอาหารหมักพื้นบ้าน เช่น ไวน์ผลไม้ และน้ำส้มสายชูหมักเปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐานโดยใช้น้ำตาลสดเป็นวัตถุดิบในการหมักเพื่อพัฒนาผลิตภัณฑ์ชุมชนของตำบลห้วยกรด อำเภอสรรคบุรี จังหวัดชัยนาทให้ดียิ่งขึ้นต่อไป ส่วนเชื้อราที่พบได้แก่สายพันธุ์ *Alternaria* sp., *Penicillium* sp. และ *Nigrospora* sp ส่วนใหญ่สามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ นอกจากนี้จากผล การทดสอบสารสกัดจากเนื้อและเปลือกพะยอมที่สามารถยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐานได้ดีกว่าสารสกัดจากมะเกลือ โดยเฉพาะทั้งสารสกัดจากไม้พะยอมและไม้มะเกลือไม่ยับยั้งจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ เช่น พวกยีสต์ แบคทีเรียกรดอะซิติก และแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้น ควรมีการส่งเสริมและอนุรักษ์สายพันธุ์ไม้พะยอมและไม้มะเกลือให้แพร่หลาย เพื่อประโยชน์ในด้านการส่งเสริมอาชีพทำตาลโตนดและนำไปใช้ประโยชน์ในทางเภสัชกรรมให้กว้างขวางยิ่งขึ้นต่อไปในอนาคต

ตารางที่ 1 แสดงชนิด จำนวนตัวอย่าง รหัสตัวอย่าง จำนวนแบคทีเรีย ยีสต์ ราทั้งหมด และแบคทีเรียก่อโรคที่พบ

ชนิดตัวอย่าง	จำนวนตัวอย่าง	รหัสตัวอย่าง	จำนวนแบคทีเรีย (CFU/ml)	จำนวนยีสต์และรา (CFU/ml)	*S. aureus*	*E. coli*	*Salmonella* sp.	*Cl. perfringens*	*B. cereus*
เนื้อตาลโตนดสุก	6	CP	$3.3x10^{7}$ - $4.7x10^{10}$	$2.1x10^{5}$ - $1.7x10^{8}$	-	-	-	-	+
น้ำตาลสด	6	FP	$1.2x10^{8}$ -$2.5x10^{10}$	$1.2x10^{7}$ - $3.1x10^{8}$	-	+	-	-	+
น้ำตาลเมา	7	AP	$1.2x10^{7}$ - $1.9x10^{10}$	$1.3x10^{6}$ - $2.6x10^{8}$	+	-	-	-	-

ตารางที่ 2 แสดงการจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ออกเป็นกลุ่มต่าง ๆโดยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

คุณสมบัติ	กลุ่มที่ 1 (30)[a]	กลุ่มที่ 2 (3)	กลุ่มที่ 3 (36)	กลุ่มที่ 4 (4)	กลุ่มที่ 5 (12)
รูปร่างเซลล์	◄---- แท่ง	---►	กลม	◄---- กลม	---►
การจัดเรียงตัวของเซลล์	◄-- เดี่ยว หรือ คู่	---►	สายโซ่สั้นๆ	◄---- สี่เซลล์	--►
ลักษณะโคโลนี	◄------- สีขาว	ทรงกลม	ขอบเรียบ	โค้งนูน	-----►
การติดสีแกรม	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	-	-	-	-	-
การสร้างแก๊สจากกลูโคส	-	+	-	-	-
การย่อยเคซีน	-	-	-	-	-
การย่อยแป้ง	-	-	-	-	-
การสร้างเมือก (slime)	-	-	-	-	-
การสร้างกรดจากน้ำตาล :					
D-fructose	-	+	-	-	+
D-galactose	+	-	-	-	-
D-glucose	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-
Lactose	+	_	-	-	+
D-maltose	-	-	+	-	-
D-mannitol	+	-	-	+	-
D-mannose	-	+	+	-	-
D-melibiose	-	-	+	-	-
Raffinose	+	-	+	-	-
D-ribose	+	+	_	+	-
D-sorbitol	-	-	-	+	-
Sucrose	-	-	+	-	+
D-xylose	-	-	-	-	-

หมายเหตุ: [a] number of isolate; **+** , positive; **w**, weak; **-** , negative re

ตารางที่ 3 แสดงการจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดอะซิติก ที่แยกจากได้ออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ โดยคุณลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมี

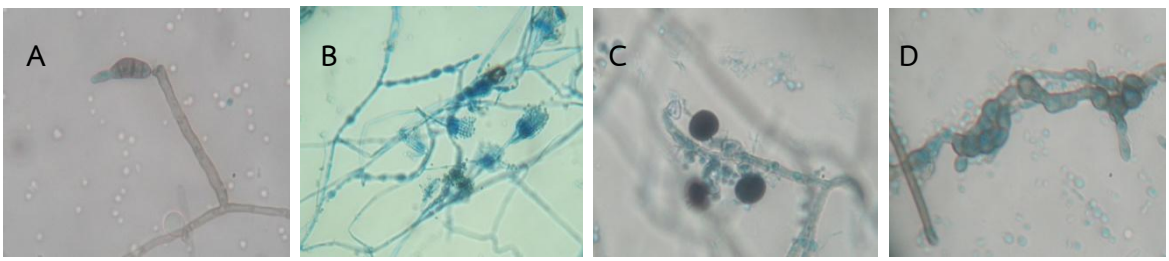
คุณสมบัติ	กลุ่มที่ 1 (21)[a]	กลุ่มที่ 2 (18)	กลุ่มที่ 3 (15)	กลุ่มที่ 4 (10)	กลุ่มที่ 5 (15)	กลุ่มที่ 6 (9)	กลุ่มที่ 7 (7)	[b]*Acetobacter aceti*	[b]*Gluconobacter sp.*
รูปร่างเซลล์	◄	···	···	···	แท่งสั้น	···	···	···	►
การจัดเรียงตัวของเซลล์	◄	···	···	···	เดี่ยว คู่	···	···	···	►
ลักษณะโคโลนี	◄	···	···	สีครีม	ทรงกลม	ขอบเรียบ	โค้งนูน	···	►
การติดสีแกรม	-	-	-	-	-	-	-	-	-
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การเคลื่อนที่	+	+	+	+	+	+	+	+	+
การสร้างกรดจากน้ำตาล :									
D-fructose	-	+	+	+	w	+	+	w	w
D-galactose	-	-	-	-	-	+	-	w	-
D-glucose	-	-	-	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	-	w	w	w	w	-	+
D-maltose	w	-	+	+	+	+	+	w	w
D-mannitol	-	-	-	-	+	w	+	-	+
D-mannose	-	w	-	w	w	+	-	+	w
D-melibiose	-	-	-	w	w	+	-	-	w
Raffinose	-	-	-	-	+	w	-	-	-
D-ribose	-	w	w	w	w	w	+	w	+
D-sorbitol	-	-	-	-	+	+	w	-	+
Sucrose	-	w	w	w	+	+	w	-	-
D-xylose	-	w	W	-	+	w	-	w	w

หมายเหตุ: [a] number of isolate; **+** , positive; **w**, weak; **-** , negative reaction.
ที่มา: [b]อภิสิทธิ์ ศรีอรุณเรืองชัย (2541); Seearunruangchai *et al*. (2004)

ตารางที่ 4 แสดงการจัดกลุ่มยีสต์ (yeast) ที่แยกได้โดยอาศัยคุณลักษณะทางชีวเคมี

คุณสมบัติ	กลุ่มที่ 1(3)[a]	กลุ่มที่ 2(4)	กลุ่มที่ 3(3)	กลุ่มที่ 4(5)	กลุ่มที่ 5(4)	กลุ่มที่ 6(3)	*S. cerevisiae*[b]
สร้างแก๊สจากน้ำตาล :							
D-glucose	w	+	+	w	-	w	+
D-galactose	-	+	+	-	-	-	w
Sucrose	-	+	+	-	-	-	w
D-maltose	-	w	-	-	-	-	w
การย่อยสลายน้ำตาล :							
D-fructose	+	+	+	+	-	-	ND
D-galactose	-	+	+	w	-	-	w
D-glucose	+	+	+	+	-	+	+
Lactose	w	+	w	w	+	-	-
D-mannitol	w	w	-	-	-	-	w
D-melibiose	-	+	w	w	w	w	w
Raffinose	-	+	+	-	-	-	+
D-ribose	-	w	+	+	+	+	-
D-xylose	-	-	+	+	+	+	-

หมายเหตุ: [a] number of isolate; **+** , positive; **w**, weak; **-** , negative reaction.
ที่มา: [b]Kreger-Van Rij (1984); Rippon (1988)



ภาพที่ 1 แสดงโครงสร้างเชื้อรา กลุ่มที่ 1 สายพันธุ์ *Curvularia* sp. (A) กลุ่มที่ 2 สายพันธุ์ *Penicillium* sp. (B) กลุ่มที่ 3 สายพันธุ์ *Nigrospora* sp. (C) และกลุ่มที่ 4 เป็นเชื้อราที่ยังไม่ทราบสายพันธุ์ (D)

ตารางที่ 5 แสดงผลการทดสอบสารสกัดเนื้อพะยอม เปลือกพะยอม เนื้อมะเกลือ และเปลือกมะเกลือที่มีผลยับยั้งจุลินทรีย์ก่อโรคสายพันธุ์มาตรฐานต่างๆ และจุลินทรีย์คัดเลือกที่แยกได้

ชนิดจุลินทรีย์	รหัสเชื้อ	ขนาดบริเวณที่ยับยั้งเชื้อ (clear zone) ของสารสกัด [a]พะยอมและมะเกลือ (มิลลิเมตร)			
		สารสกัดเนื้อพะยอม	สารสกัดเปลือกพะยอม	สารสกัดเนื้อมะเกลือ	สารสกัดเปลือกมะเกลือ
Staphylococcus aureus	ATCC 6538	13	12.5	0	0
Staphylococcus epidermidis	ATCC 12228	25.5	22.5	0	0
Bacillus cereus	ATCC 9634	8.5	10	0	0
Bacillus subtilis	ATCC 6633	14	9	0	0
Escherichia coli	ATCC 8739	5	4	0	0
Pseudomonas aeruginosa	ATCC 27853	16	13	0	0
Micrococcus luteus	ATCC 9341	14	10.5	0	0
Enterobacter aerogenes	-	2	1.5	0	0
Salmonella albany	-	9.5	7	0	0
Candida albicans	ATCC 10231	8	9	0	0
Lactic acid bacteria	LCP3-5, LFS-1, LAP1-8	0	0	0	0
Acetic acid bacteria	ACP4-6, AFP6-2, AAP4-1	0	0	0	0
Yeast	YCP6-6	28.5	23	0	0
Yeast	YFP6-11	0	0	0	0
Yeast	YAP3-3	16	9	0	0
Mold	MCP6-3, MFP6-2	w	w	0	w
Mold	MAP4-6	w	0	0	w

หมายเหตุ: [a]สารสกัดจากการใช้เอทานอล (ethanol) 95% : น้ำ (H_2O) ในอัตราส่วน 5:1 (v/v) เป็นตัวทำละลาย, w; weak reaction, ATCC; American Type Culture Collection

คำขอบคุณ

โครงการวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากรพระราชดำริฯ และทุนสนับสนุนการวิจัยจากสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏจันทรเกษม ผู้วิจัยขอขอบคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

เอกสารอ้างอิง

กรมส่งเสริมการเกษตร. 2544. ตาลโตนดผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปและรูปแบบโรงผลิต. กรมส่งเสริมการเกษตร. กรุงเทพฯ.

นงลักษณ์ ศรีอุบลมาศ. 2551. คู่มือปฏิบัติการจุลชีววิทยา. ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ.

ปิฎฐะ บุนนาค. 2511. ปาล์มน้ำตาล หรือน้ำตาลปาล์ม: ปาล์ม. พระนคร: โรงพิมพ์แพร่พิทยา. หน้า 260-272.

เพชรนิยม ลัทธิรมย์ ศศิธร ธงชัย และ จาตุรงค์ จงจีน. 2555. ฤทธิ์ต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบจากเปลือกพะยอมในการต้านเชื้อรา *Colletotrichum* sp. รายงานการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.

วีรานุช หลาง. 2552. คู่มือตรวจวิเคราะห์ด้านจุลชีววิทยาทางอาหาร. สาขาวิชาวิทยาศาสตร์. คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์.

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน, กรุงเทพฯ.

สถาพร ถาวรอธิวาสน์. 2552. การพัฒนาและถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับเตาเคี่ยวตาลโตนดเพื่อยกระดับคุณภาพและความสามารถในการ ผลิต ตำบลห้วยกรด อำเภอสรรบุรี จังหวัดชัยนาท. วารสารจันทรเกษมสาร ปีที่ 15 ฉบับที่ 29 กรกฎาคม-ธันวาคม. หน้า 83-90.

อารี แก้วกนกวิจิตร. 2546. ผลของไม้พะยอมและไม้มะเกลือที่มีต่อจุลินทรีย์ในน้ำตาลสดและน้ำตาลเมา.วิทยานิพนธ์ปริญญาโท ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ.

อภิสิทธิ์ ศรีอรุณเรืองชัย. 2541. การแยก การพิสูจน์เอกลักษณ์ และการใช้ประโยชน์ของ อะซิติกแอซิดแบคทีเรียจากผลไม้. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ.

Albert, B., Hans, G., Martin., Wim. H., and Karl, H. 1992 .The Prokaryotes, 2nd edition. New York. Springer-Verlag.

AOAC. 1995. Official Methods of Analysis of AOAC International, 16th ed. Arlington. Virginia: AOAC International.

Asai, T. 1968. Acetic acid bacteria classification and biochemical activities. University of Tokyo Press, Tokyo. 343p.

Axelsson, L. 1993. Lactic acid bacteria: classification and physiology, pp. 1-63. *In* S. Salminen and A. von Wright (eds.). Lactic Acid Bacteria . Marcel Dekker, Inc., New York.

Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : classification and physiology, pp. 1-72. *In* S. Salminen and A. von Wright (eds.). Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Function Aspects. Marcel Dekker, Inc., New York

Balows, A, Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K. H. 1992. The Prokaryotes, 2nd ed. Vol. II, Springer-Verlag, New York.

Barnett, J. A., Payne, R. W., Yarrow, D. 1979. A guide to identifying yeasts. Cambridge University Press, London, New York, Melbourne.

Benson, H. J. 1998. Microbiological Applications Laboratory. Manual in General Microbiology. 7th ed.WCB McGraw Hill.

FAO. 1992. Bacteriological analytical manual. 7th ed. Arlington, Virginia. AOAC International.

Fisher, F. and Cook, N. B.1998 . Fundamentals of diagnostic mycology.Philadelphia. W. B. Saunders Co.

Kreger-Van Rij, N.J.W. (ed). 1984. The Yeasts: a taxonomic study. 3rd Edition. ElsevierScience Publishers B.V., Amsterdam, The Netherlands.

Lodder, J. 1970. The Yeast, A taxonomic study. North-Holland Publishing Co., Amsterdam, London.

McLandsborough, L. 2005. Food microbiology laboratory. CRC Press LLC.USA.179p.

Seearunruangchai, A.,___S. Tanasupawat, S. Keeratipibul, C. Thawai, T. Itoh, and Y. Yamada. 2004. Identification of acetic acid bacteria isolated from fruits collected in Thailand.. J. Gen. Appl. Microbiol. 50: 47-53.

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

Tanasupawat, S., S. Shida, S. Okada, and Komagata, K. 2000. *Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 50: 1479-1485

Yamada, Y., Hoshino, K. and Ishikawa, T. 1997. The phylogeny of acetic acid bacteria based on the partial sequences of 16S Ribosomal RNA: the evaluation of the subgenus *Gluconoacetobacter* to the generic level. Biosci. Biotech. Biochem. 61(8): 1244-1251.