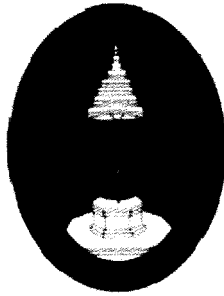


การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง  
Cultivation of a Lactic Acid Bacteria on Modified MRS Medium



มณีนุช จงไกรจักร  
อติเรก คลองไร่

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต  
สาขาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา (Microbiology)  
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา





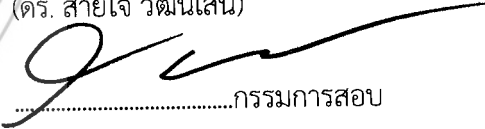
ใบรับรองงานวิจัย  
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา  
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต  
โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์

ชื่อเรื่องงานวิจัย  
ชื่อผู้ทำวิจัย

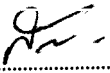
การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง  
นางสาวมณีนุช จงไกรจักร  
นายอดิเรก คลองรั้ว


คณะกรรมการสอบโครงการวิจัย

  
.....อาจารย์ที่ปรึกษา  
(อาจารย์สัลวา ตอปี)

  
.....กรรมการสอบ  
(ดร. สายใจ วัฒนเสน)  
  
.....กรรมการสอบ  
(อาจารย์วาสนา มู่สา)

คณะกรรมการประจำสาขาวิชารับรองแล้ว

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

  
.....  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทศนา ศิริโชติ)  
คณบดีคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

เมื่อวันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

ชื่อเรื่อง	การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง
ชื่อผู้ทำงานวิจัย	นางสาวมณีนุช จงไกรจักร นายอดิเรก คลองรั้ว
อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย	อาจารย์สัลวา ตอปี
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต	สาขาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา
สถาบัน	มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ปีที่พิมพ์	2558

### บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *Lactobacillus plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน พบว่าอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม มีน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 สูงสุดโดยมีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ  $0.830 \pm 0.20$  g/L ที่ 48 ชั่วโมงของการทดลอง ส่วนผลของค่า pH มีแนวโน้มลดลงตั้งแต่เวลา 12-48 ชั่วโมง เท่ากับ  $6.41 \pm 0.01$ ,  $6.32 \pm 0.03$ ,  $4.97 \pm 0.02$ ,  $4.95 \pm 0.02$ ,  $4.99 \pm 0.02$ ,  $5.02 \pm 0.04$  และ  $5.08 \pm 0.03$  ตามลำดับ จากนั้นเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม พบว่ามีปริมาณแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ทั้งหมดเท่ากับ  $8.30 \pm 0.04$  และ  $8.24 \pm 0.03$  log CFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้มีน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ  $0.697 \pm 0.04$  และ  $1.461 \pm 0.10$  g/l ตามลำดับ ส่วนค่า pH ของอาหารทั้งสองสูตรมีแนวโน้มลดลงตลอดการทดลอง ดังนั้นจากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าสามารถนำถั่วเหลืองมาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ทดแทน Meat extract ในอาหาร MRS ในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติก ให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรม

คำสำคัญ: แบคทีเรียกรดแลคติก, *Lactobacillus plantarum* TISTR 541, อาหาร MRS สูตรดัดแปลง

เลขที่	1139112
วันที่	3 ก.พ. 2558
ชื่อผู้พิมพ์	ส.พ.อ. ม.ม.ก.

## กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาและจัดทำโครงการวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอขอบพระคุณ อาจารย์ สัสลา ตอปี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่กรุณาเสียสละเวลาและให้คำปรึกษาแนะนำแนวทาง วิธีการ และขั้นตอนการศึกษา ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขงานวิจัยนี้จนมีความถูกต้องสมบูรณ์ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีรวมถึงอาจารย์ประไพกรมวิชาจุลชีววิทยาที่ให้คำแนะนำเอื้อเพื่อข้อมูล ผู้ทำวิจัยจึงขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยอุปถัมภ์ในเรื่องกำลังทรัพย์และคอยให้กำลังใจตลอดมา ขอขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คุณปริญญา ทับเที่ยง คุณสุไวดา สัสดี และคุณอาชื่อนะ บูเก๊ะเจ๊ะลี ที่ช่วยเหลือในการดำเนินงาน และความสะดวกตลอดมา ทำให้ผู้วิจัยมีความมั่นใจที่จะให้ผลงานออกมามีคุณค่าที่สุดและสุดท้ายนี้ขอขอบคุณท่านที่มีรายนามในบรรณานุกรมทุกท่าน สำนักวิทยบริการมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่เอื้อเพื่อข้อมูลและสถานที่ในการตรวจสอบเอกสารการทำวิจัยครั้งนี้ให้ลุล่วงได้ด้วยดี

มณีนุช จงไกรจักร  
อติเรก คลองรั้ว

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	(ก)
กิตติกรรมประกาศ	(ข)
สารบัญ	(ค)
สารบัญตาราง	(ง)
สารบัญภาพ	(จ)
<b>บทที่ 1 บทนำ</b>	<b>1</b>
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
ขอบเขตของการวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
<b>บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง</b>	<b>3</b>
แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก	3
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
<b>บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย</b>	<b>17</b>
วัสดุและอุปกรณ์	17
วิธีการดำเนินการวิจัย	18
<b>บทที่ 4 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย</b>	<b>21</b>
การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> TISTR 541 ในอาหาร	21
เลี้ยงเชื้อ MRS สูตรดัดแปลง	
เปรียบเทียบการเจริญแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> TISTR 541	23
ระหว่างอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ผ่านการคัดเลือกและอาหาร MRS	
สูตรมาตรฐาน	
<b>บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ</b>	<b>27</b>
สรุปผลการวิจัย	27
ข้อเสนอแนะ	27
เอกสารอ้างอิง	28
ภาคผนวก	32
ประวัติย่อของผู้วิจัย	36

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง สูตรที่ 1, สูตรที่ 2, และสูตรที่ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	22
4.2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงสูตรที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	25



## สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
4.1 ค่า pH ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง สูตรที่ 1 (ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน), สูตรที่ 2 (เนื้อปลาเป็นแหล่งไนโตรเจน) และสูตรที่ 3 (เนื้อไก่เป็นแหล่งไนโตรเจน) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	23
4.2 การเจริญของแบคทีเรีย <i>L. plantarum</i> TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐาน และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงสูตรที่ 1 (ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	24
4.3 ค่า pH ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	26



## บทที่ 1

### บทนำ

#### 1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันอาหารฮาลาล (Halal Food) เป็นเรื่องที่ได้รับการสนใจอย่างมากจากสังคมไทยมิใช่เพียงแต่ชาวไทยมุสลิมที่จำเป็นต้องบริโภคอาหารฮาลาลเท่านั้น ผู้ประกอบการซึ่งต้องผลิตอาหารฮาลาลจำหน่ายแก่ผู้บริโภคมุสลิมในประเทศไทยและเพื่อส่งออกแก่ตลาดโลกมุสลิมซึ่งมีผู้บริโภค 2000 ล้านคน จึงจำเป็นต้องให้ความสนใจอย่างจริงจังและดำเนินกระบวนการผลิตอาหารฮาลาลให้ถูกต้องตามบัญญัติศาสนาอิสลามและระเบียบกรมการกลางแห่งประเทศไทยประกอบกับประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตอาหารและส่งออกสินค้าเกษตรที่สำคัญของโลก อาหารฮาลาลจึงเป็นช่องทางทางการตลาด รัฐบาลจึงมีนโยบายส่งเสริมอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลเพื่อการส่งออกโดยปฏิบัติอย่างจริงจังทั้งในด้านการพัฒนาวัตถุดิบ การส่งเสริมผู้ประกอบการแสวงหาตลาดและการพัฒนาหลักการรับรองมาตรฐานอาหารฮาลาลให้เป็นที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ (สถาบันมาตรฐานฮาลาลแห่งประเทศไทย, 2551) โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น โยเกิร์ต นมเปรี้ยว และเนยแข็ง เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการนำแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรม ซึ่งต้องเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยเป็นอาหารที่จำเพาะสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกแต่เนื่องจากปัจจุบันอาหาร MRS ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อเป็นผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมมีส่วนผสมของ Meat extract เป็นแหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งอาจจะมีเนื้อหมูเป็นส่วนผสมทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียแลคติกที่ได้มีการปนเปื้อนของเนื้อหมู ส่งผลให้ไม่เกิดการยอมรับทางศาสนาอิสลามจัดเป็นสิ่งฮาลาล ผู้ที่บริโภคอาหารดังกล่าวเข้าไปทำให้เกิดผลเสียทางศาสนา โดยมีการทดลองใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 โดยมีองค์ประกอบของสูตรคือ กลูโคส 118.20 g/L, ทรายน้ำตาล 37.27 g/L, น้ำแช่ข้าวโพด 42.54 g/L, Tween80 1.52 ml/L และ  $MnSO_4$  0.30 g/L โดยหลังการหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีการผลิตกรดแลคติกได้ 110 g/L ซึ่งดีกว่าสูตรอาหารที่เติม yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนถึงร้อยละ 30.4 (Beatriz et al., 2004) ดังนั้นจากผลการทดลองข้างต้น จึงบ่งชี้ได้ว่าสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นได้นอกจากการใช้ Meat extract เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับแบคทีเรียแลคติกและนอกจากนี้ความปลอดภัยของอาหารเป็นเรื่องสำคัญสำหรับผู้ผลิตอาหารและผู้ที่เกี่ยวข้องกับการออกกฎหมายเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคที่ได้รับอาหารที่ปลอดภัย ปราศจากเชื้อก่อโรคและสารเคมีที่เป็นพิษต่อร่างกายรวมทั้งถูกต้องตามหลักศาสนาอิสลาม การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อดัดแปลงสูตรอาหาร MRS ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิตกรดแลคติก



## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงต่างๆ

1.2.2 เปรียบเทียบอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ผ่านการคัดเลือก

## 1.3 สมมติฐาน

อาหาร MRS สูตรดัดแปลงสามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้

## 1.4 ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาประสิทธิภาพอาหาร MRS สูตรดัดแปลงต่างๆ ที่มีส่วนผสมของถั่วเหลือง เนื้อปลาและเนื้อไก่ ซึ่งเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 มีวิธีการทดลองดังนี้

1.4.1 การเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง

1.4.2 เปรียบเทียบการเจริญระหว่างอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ผ่านการคัดเลือก

**ตัวแปรต้น :** อาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีส่วนผสมของถั่วเหลือง เนื้อปลาและเนื้อไก่

**ตัวแปรตาม :** การเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงต่างๆ

**ตัวแปรควบคุม :** ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น ส่วนผสมของอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการทดลองและอัตราการขยายของอาหาร MRS

### สถานที่ทำการวิจัย

ณ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์ ศูนย์วิทยาศาสตร์ และอาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

## 1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย

ได้สูตรอาหาร MRS สูตรใหม่ ซึ่งสามารถเพาะเลี้ยงแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกให้เจริญได้ดี

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก

แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria : LAB) จัดอยู่ใน Family Lactobacillaceae สามารถย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลม และรูปท่อน มีการจัดเรียงตัวแบบคู่ คู่สี่ และโซ่ยาว เป็นต้น ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์อะตาเลส (Axelsson, 1993) สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต จะได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลโดยได้จากกระบวนการ Substrate - Level Phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการไพริมิดีน (Pyrimidine) เพปโตเน (Peptone) แมงกานีส (Manganese) อะซิเตต (Acetate) และทวิน 80 (Tween80) เป็นต้น

แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน (Aerobe) ไม่มีออกซิเจน (Anaerobe) และมีออกซิเจนน้อย (Microaerophilic) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53° C อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40° C ช่วงพีเอชที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ดีที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen and Wright, 1993)

แบคทีเรียแลคติกแต่ละสปีชีส์สามารถปรับตัวเพื่อการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน จึงทำให้พบเชื้อกลุ่มนี้กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในคนและสัตว์ โดยเฉพาะบริเวณช่องปาก ลำไส้ พบในแมลงและในผลิตภัณฑ์อาหารต่างๆ

##### 2.1.1 แหล่งที่พบแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกสามารถพบได้ในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ผลิตภัณฑ์ข้าว ผลิตภัณฑ์จากเนื้อและปลา ไวน์ ผลไม้ และน้ำผลไม้ อีกทั้งยังเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในอวัยวะสืบพันธุ์ ช่องปากและระบบทางเดินอาหาร

ในระบบทางเดินอาหารมีจุลินทรีย์ประจำถิ่น (Normal flora หรือ Normal microbiota) แตกต่างกันหลายชนิด แต่จุลินทรีย์สามารถผ่านกระเพาะอาหารไปยังลำไส้ได้ โดยปกติลำไส้เล็กส่วนบนจะมีจุลินทรีย์ไม่มาก เช่น *Streptococcus* , *Lactobacillus* และยีสต์ มีจำนวน  $10^1$ - $10^2$  CFU/ml แต่บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum) จะมีจุลินทรีย์  $10^6$ - $10^8$  CFU/ml โดยเป็นแบคทีเรีย Family *Enterobacteriaceae* และ *Bacteriodes* เด็กทารกหลังจากคลอดได้ไม่กี่ชั่วโมงสามารถพบ Normal flora ที่ผิวหนัง เช่น *Streptococcus* และ *Corynebacterium* เป็นต้นและแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* และ *Streptococcus* เมื่อเวลาผ่านไป Normal flora จะเปลี่ยนแปลงไป คือ ในลำไส้ของผู้ใหญ่เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobe condition) ได้แก่ *Bacteriodes*, *Clostridium*, *Peptostreptococcus*, *Bifidobacterium* และ *Eubacterium* เป็นต้น โดยมีจำนวนมากกว่ากลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (Aerobe) ในอัตราส่วน 1,000:1 แบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน ได้แก่ *Escherichia coli* สมาชิกอื่นๆ ใน Family *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus* และ *Streptococcus* จำนวนแบคทีเรียต่อกรัมของอุจจาระที่อยู่ในลำไส้จะเพิ่มมาก

ขึ้นเมื่ออยู่ใกล้ลำไส้ใหญ่ส่วนท้าย (Sigmoid colon) 80% ของอุจจาระแห้งของคนปกติจะมีแบคทีเรีย  $10^{11}$ - $10^{12}$  CFU/g เมื่อได้รับยาปฏิชีวนะจะพบเชื้อแบคทีเรียฉวยโอกาส (Opportunistic microorganism) ในลำไส้ใหญ่ เช่น *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* และแบคทีเรียแกรมลบที่ต่อต่ออย่างจำนวนเชื้อในแต่ละบริเวณของระบบทางเดินอาหาร (นวลจิรา ภัทรธรรอง, 2538)

## 2.1.2 การจำแนกแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกจำแนกได้ดังนี้ (Axelsson, 1993)

### 1) การจำแนกในระดับจีโนส

เป็นการจำแนกแบคทีเรียแลคติกโดยศึกษารูปร่าง เช่น รูปกลม และรูปแท่ง เป็นต้น การเรียงตัว เช่น คู่สี่ โซ่ และคู่ การหมักน้ำตาลกลูโคส (Glucose fermentation) มี 2 แบบ คือ Homofermentation และ Heterofermentation การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ การเติบโตที่อุณหภูมิ  $10^{\circ}$  C และ  $45^{\circ}$  C การสร้างไฮเมออร์ของกรดแลคติกในระหว่างการหมักน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีทั้งแบบ D และ L การเติบโตที่ NaCl 6.4 % และ NaCl 18% และการเติบโตที่ระดับพีเอช 4.4 และ 9.6 เป็นต้น

### 2) การจำแนกในระดับสปีชีส์

เป็นการจำแนกแบคทีเรียแลคติกโดยดูความสัมพันธ์ของดีเอ็นเอ การใช้ 16s rRNA มาช่วยในการจำแนกทำให้สามารถนำมาใช้ในการเขียนสายวิวัฒนาการเพื่อจัดแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียแลคติก

นอกจากนี้สามารถจำแนกแบคทีเรียแลคติกโดยอาศัยการหมักน้ำตาลชนิดต่างๆ การไฮโดรไลซิสอาร์จินีน (Arginine) การสร้างอะซิโตน (Acetone) การทนต่อเกลือ น้ำดี ชนิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) การสร้าง Axtracellular polysaccharide การสร้างเอนไซม์  $\beta$  - galactosidase และ  $\beta$  - glucuronidase การศึกษาทางซีรัม (Serological typing) การศึกษาส่วนประกอบของกรดไขมัน Electrophoresis ของ Lactate dehydrogenase (LDH) และการศึกษาสัดส่วน G+C content เป็นต้น

เดิมมีการจัดแบ่งแบคทีเรียแลคติกเป็น 4 สกุล คือ *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* แต่ในปัจจุบันได้มีการจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกใหม่โดยการพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียแลคติกจากคุณสมบัติต่างๆ ได้ดังนี้ คือ แบคทีเรียแลคติกสกุล *Aerococcus*, *Enterococcus*, *Bifidobacterium*, *Propionibacterium*, *Weissella*, *Vagococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus* และ *Pediococcus* แบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม ตามรูปร่างและการจัดเรียงตัว คือ

- เชื้อรูปร่างแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Carnobacterium*
- เชื้อรูปร่างกลมโดยมีการแบ่งเซลล์ 2 ระบายเป็น 4 เซลล์ ได้แก่ *Aerococcus*, *Tetratencoccus* และ *Pediococcus*

- เชื้อรูปร่างกลมเป็นคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus*, และ *Leuconostoc* แบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก (สมณฑา วัฒนสินธุ์, 2545)

- Homofermentation เป็นแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส (Hexose) โดยทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวตอาศัยเอนไซม์อัลโดเลส (Aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วให้กรดแลคติกมากกว่า

หรือเท่ากับ 80% โดยผ่าน Glycolysis pathway (Embden - Meyerhof pathway : EMP) ซึ่งเป็นแบคทีเรีย *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus*

- Heterofermentation เป็นแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส (Hexose) แล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ 20-25% กรดแลคติก 50% กรดอะซิติก และ เอทานอล 20-25% โดยผ่าน Phosphoglyconate pathway หรือ Phosphoketolase ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacillus brevis*

แบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (Generally recognized as safe bacteria; GRAS status) และมักใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจจะหมักตามธรรมชาติ โดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้น (Starter culture) เติมนลงในอาหารภายใต้การควบคุม ตัวอย่างของจีนัสที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นม เนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus*, *Staphylococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* (ศศิวิมล ชื่นอิม และอดิสร เสวตวิวัฒน์, 2548)

### 2.1.3 กลุ่มแบคทีเรียแลคติก

#### 1) *Lactobacillus*

เซลล์รูปร่างท่อนยาว ท่อนสั้น คอคโคบาซิลลัส (Coccobacilli) มักเรียงตัวเป็นสาย ติดสี่แกรมบวกและจะติดสี่แกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและอยู่ในสภาพที่เป็นกรดเป็นพวกที่ทนกรด (Aciduric) ที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต 5.5-6.2 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือต่างเป็นพวกต้องการออกซิเจนน้อย (Microaerophil) การสร้างสารสีพบได้น้อยมาก ถ้าพบก็จะมีสีเหลืองส้ม จนถึงสีแดงอิฐ มักพบในผลิตภัณฑ์นม ผลิตภัณฑ์ธัญพืช ผลิตภัณฑ์เนื้อ ปลา ไวน์ เบียร์ ผลไม้ น้ำผลไม้ ผักดอง และบริเวณเนื้อเยื่อในท่อทางเดินอาหาร และช่องคลอดของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

#### - *Lactobacillus acidophilus*

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.6-0.9 x 1.5-6 ไมโครเมตร อาจอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายสั้นๆ ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น แคลเซียมเพนโทเทต (Calcium pantothenate) กรดโฟลิก (Folic acid) ไนอะซิน (Niacin) และไรโบฟลาวิน (Riboflavin) แยกได้จากอุจจาระของทารก มีบทบาทในการหมักนมเปรี้ยวชนิดต่างๆ เช่น คิวมิสส์ (Koumiss) เป็นนมหมักที่มีกรดและแอลกอฮอล์ ถิ่นเดิมอยู่ในทางตอนใต้ของรัสเซีย

#### - *Lactobacillus delbrueckii*

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.5-0.8x 2-9 ไมโครเมตร อาจอยู่เดี่ยวๆ หรือเรียงตัวเป็นสายสั้นๆ ไม่เคลื่อนที่ ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต คือ กรดเพนโทเทติก (Pentothic acid) และ ไนอะซิน (Niacin) บางสายพันธุ์ต้องการไรโบฟลาวิน (Riboflavin) กรดโฟลิก (Folic acid) วิตามิน บี12 (Vitamin B12) และไทอะมิน (Thiamine) และไม่ต้องการไทอะมิน (Thiamine) ไพริดอกซิน (Pyridoxine) ไบโอติน (Biotin) และกรดอะมิโนเบนโซอิก (Para aminobenzoic acid) แบ่งได้เป็น 3 ชนิดย่อย คือ

1) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* แยกได้จากผักกาดดองที่อุณหภูมิสูงๆ (40-53 °C)

2) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* แยกได้จากโยเกิร์ต และเนยแข็ง

3) *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *lactis* แยกได้จากนม เนยแข็ง และธัญพืช

- *Lactobacillus plantarum*

เซลล์เป็นรูปท่อน ขนาด 0.9-1.2x3-8 ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการแคลเซียมเพนโทเทิน (Calciumpentotinate) ไนอะซิน (Niacin) ในการเจริญเติบโต แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม ผักดอง ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศเน่าเสีย ช่องปากและอุจจาระคน

- *Lactobacillus casei*

เซลล์รูปร่างท่อน ขนาด 0.7-1.1x2.0-4.0 ไมโครเมตร ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) กรดโฟลิก (Folic acid) แคลเซียมเพนโทเทิน (Calciumpentotinate) ไนอะซิน (Niacin) แยกได้จากนม เนย ผลิตภัณฑ์นม มีบทบาทการหมักยาคูลท์ แบ่งเป็น 4 กลุ่ม คือ

1) *Lactobacillus casei* subsp. *casei*

2) *Lactobacillus casei* subsp. *pseudoplantarum*

3) *Lactobacillus casei* subsp. *rtaamnosus*

4) *Lactobacillus casei* subsp. *tolerun*

- *Lactobacillus fermentum*

เซลล์เป็นรูปท่อนขนาด 0.5-0.9 ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการแคลเซียมเพนโทเทิน (Calciumpentotinate) ไนอะซิน (Niacin) ไทอะมีน (Triamine) ในการเจริญเติบโต แยกได้จากยีสต์ขนมปัง ผลิตภัณฑ์นม ผักกาดดอง น้ำทิ้ง ปาก และอุจจาระคน

- *Lactobacillus brevis*

เซลล์เป็นรูปร่างท่อน มีขนาด 0.7-1.0 x 2-4 ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆ หรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการแคลเซียมเพนโทเทิน (Calciumpentotinate) ไนอะซิน (Niacin) ไทอะมีน (Triamine) กรดโฟลิก (Folic acid) ในการเจริญเติบโต แยกได้จากนม เนยแข็ง กะหล่ำปลีดอง ลำไส้ ปาก และอุจจาระคน

## 2) *Pediococcus*

เซลล์เป็นรูปกลม เรียงตัวเป็นคู่หรืออยู่ติดกัน (Tetrad) เคยมีการเข้าใจว่ามีการแบ่งระนาบเดียวกันให้เซลล์เป็นโซ่ยาวแล้วเรียงตัวใหม่เป็นสี่เซลล์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์และไม่สร้างแคปซูล โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร ขอบเรียบ กลม สีไม่แตกต่างกัน เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (Aerobe) และบริเวณที่ไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) ทำให้เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติกไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเลี้ยงในอาหารจะเจริญตามรอยแทง (Steb) และเติบโตบริเวณผิวอาหารเล็กน้อย ในอาหารเหลวเติบโตสม่ำเสมอทั่วหลอด ไม่ทำให้เกิดโรคในพืชหรือสัตว์ มักพบในอาหารหมัก ไม่ค่อยพบในนม และผลิตภัณฑ์นม (วิลลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

- *Pediococcus pentosaceus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรีมีขนาด 0.8-1.0 ไมโครเมตร เมื่อเติบโตบนอาหารกลูโคส (Glucose) เพปโตน (Peptone) และยีสต์เอ็กแทรกซ์ (Yeast extract) โคโลนีมีสีขาวขนาดเล็กมาก ต้องการกรดอะมิโน

และสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไบโอติน (Biotin) ไนอะซิน (Niacin) และ กรดโฟลิก (Folic acid) ในการเจริญเติบโต ไม่ทนความร้อน เซลล์ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 65° C เป็นเวลา 8 นาที มักพบในอาหารหมัก เช่น แดงกวาดอง

- *Pediococcus acidilactici*

เซลล์เป็นรูปกลมหรือรีมีขนาด 0.6-1.0 ไมโครเมตร ต้องการกรดอะมิโนและสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ไพริดอกซิน (Pyridoxine) เพนทาโทนิคแอซิด (Pentatonic acid) ในการเจริญเติบโต อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต 40° C สามารถทนความร้อนได้ที่อุณหภูมิสูงสุด 52° C และทนความร้อนได้ดีกว่า *Pediococcus pentosaceus* คือ เซลล์ถูกทำลายที่อุณหภูมิ 70° C เป็นเวลา 10 นาที มักพบในอาหารหมัก เช่น กะหล่ำปลีดอง

- *Pediococcus halophilus*

เป็นเซลล์รูปกลมมีขนาด 0.6-0.8 ไมโครเมตร การเจริญเติบโตบนผิวหน้าอาหารแข็งเจริญเติบโตได้ช้ามาก ส่วนใหญ่ในอาหารเหลวก็เช่นกัน ต้องใช้เวลา 4-5 วัน พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 7 และ 8 อาหารที่ทำให้มีการเจริญเติบโตดี คือ ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) ไนอะซิน (Niacin) และกรดโฟลิก (Folic acid) เจริญเติบโตได้ดีที่มีเกลือแกง NaCl 6-8% เติบโตได้ดีที่มีเกลือแกง 18% และอาจทนต่อเกลือแกงความเข้มข้นสูงถึง 20-26% อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญ คือ 40° C และมักพบในอาหารหมักเกลือที่มีความเข้มข้นสูงๆ เช่น เต้าเจี้ยว ซีอิ๊ว และน้ำปลา ในปัจจุบันถูกจัดไว้ในสปีชีส์ใหม่ชื่อว่า *Tetragenococcus halophilus*

### 3) *Streptococcus*

โดยปกติเป็นรูปกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายเมื่อเติบโตในอาหารเหลว เป็นพวกที่เจริญเติบโตได้ทั้งที่มีออกซิเจน (Aerobe) บริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) บางชนิดต้องการคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มเติมในการเติบโต เมื่อหมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดแลคติกเป็นสารอาหารหลัก ไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ บางชนิดสามารถหมักกรดอินทรีย์ได้ เช่น กรดมาลิก (Malic acid) กรดซิตริก (Citric acid) และกรดอะมิโน (Amino acid) เช่น ซีรีน (Serine) อาร์จินีน (Arginine) ทดสอบคะตะเลต (Catalate test) ให้ผลลบ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตปกติประมาณ 37° C ส่วนอุณหภูมิสูงสุดและต่ำสุดในการเจริญเติบโตแตกต่างกันแต่ละชนิด ตัวอย่างเช่น

- *Streptococcus lactis*

เซลล์รูปไข่ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5-1.0 ไมโครเมตร ส่วนใหญ่เรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นเส้นสั้นๆ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตประมาณ 30° C ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45° C เติบโตในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเกลือแกง 4% ไม่เติบโตในบริเวณที่มีเกลือ 6% บางสายพันธุ์สร้างสารปฏิชีวนะ ไนซิน (Nisin) ซึ่งมีผลยับยั้งแกรมบวกหลายชนิด มักพบแบคทีเรียชนิดนี้ในนม และผลิตภัณฑ์นม

- *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*

ลักษณะโดยทั่วไปเหมือน *S. lactis* แต่ *S. lactis* สายพันธุ์นี้สามารถหมักซิเตรต (Citrate) ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Carbon dioxide) อะซิโตอิน (Acitoin) และไดอะเซทิล (Diactetyl)

- *Streptococcus thermophilis*

เซลล์รูปกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.7-0.9 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นสายยาว เติบโตในอาหารที่มีเกลือแกง 2.5% แต่บริเวณที่มีเกลือแกง 4% ไม่สามารถเติบโต อุณหภูมิต่ำสุดสำหรับการเจริญเติบโต 19-21° C อุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญเติบโต 52° C เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 37° C อยู่รอดที่อุณหภูมิ 60° C นาน 30 นาที มักพบในนม และผลิตภัณฑ์นม เช่น เนยแข็งสวิส และโยเกิร์ต

## 2.1.4 สรีรวิทยาของแบคทีเรียแลคติก

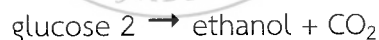
### 2.1.4.1 กระบวนการหมัก (Fermentation)

เป็นกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาพที่ไม่มีอากาศ และใช้สารอินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักสภาพไร้ออกซิเจน และออกซิโดซ์ สำหรับผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End product) ที่ได้จากหมักคาร์โบไฮเดรตจะเป็นสารอะไรนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญคือ ชนิดของเชื้อ ชนิดของคาร์โบไฮเดรต และสภาวะการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ เวลา และความเป็นกรดต่าง โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End product) ที่ได้จากหมักคาร์โบไฮเดรตและแอลกอฮอล์อาจจะมีก๊าซไฮโดรเจน (H<sub>2</sub>) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>) กรดบางชนิด แอลกอฮอล์ และสารพวกคีโตน และแบคทีเรียที่มีการหมักได้ปกติจะเป็นพวกที่ต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจน (Facultative anaerobe) (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2548)

จากการศึกษาวิถี (Pathway) ของการหมักพบว่าที่สำคัญสำหรับการย่อยสลายกลูโคส คือ Embden Meyerhof pathway Pentose Shunt และ Entner-Dandoroff pathway โดยทั้ง 3 วิถีนี้ โมเลกุลของกลูโคสจะต้องถูก Phosphorylation คือมีการเติม Phosphate group เข้าไปช่วงต้นของวิถี และพบว่าแบคทีเรียกลุ่มต่างๆจะมีการหมักอยู่ 5 แบบ (นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ, 2548) คือ

#### 1) กระบวนการหมักแอลกอฮอล์ (Alcoholic fermentation)

โดยแบคทีเรียที่สร้างแอลกอฮอล์ (Alcoholic bacteria) จะย่อยสลายกลูโคสจนได้เป็นกรดไพรูวิก (Pyruvic acid) โดยผ่าน Embden-Meyerhof pathway สุดท้ายได้สมการ ดังนี้ :



#### 2) กระบวนการหมักกรดพิโอไนค (Propionic acid fermentation)

แบคทีเรียกลุ่มนี้ การเจริญต้องการสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobe) สุดท้ายจะได้กรดไพรูวิก (Propionic acid) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO<sub>2</sub>)

#### 3) กระบวนการหมักของกลุ่มโคลิฟอร์ม (Coliform group fermentation)

เป็นคุณสมบัติของแบคทีเรียใน Family Enterobacteriaceae ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ

- ย่อยกลูโคสให้กรดชนิดต่างๆ เช่น *E. coli*

- ย่อยสลายกลูโคสสุดท้ายได้บิวทิลีนไกลคอล (Butylene glycol) เป็นส่วนใหญ่

#### 4) กระบวนการหมักบิวทิลแอลกอฮอล์ (Butyl alcohol fermentation)

พบในแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน (Anaerobic bacteria) เช่น *Clostridium sp.* การย่อยสลายกลูโคสจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End product) แตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดฟอร์มิก (Formic acid) กรดบิวทิก (Butyric acid) บิวทิลแอลกอฮอล์

(Butyl alcohol) อะซีโตน (Acetone) ไอโซโพรพิล แอลกอฮอล์ (Isopropyl alcohol) และจะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ( $\text{CO}_2$ ) กับก๊าซไฮโดรเจน ( $\text{H}_2$ ) เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก แต่ที่สำคัญจะไม่มีกรดแลคติก (Lactic acid)

#### 5) กระบวนการหมักกรดแลคติก (Lactic acid fermentation)

กระบวนการหมักกรดแลคติกเกิดในไซโทพลาสซึม มีการสร้างพลังงานแบบ Substrate level phosphorylation แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ตามชนิดของผลผลิตที่เกิดขึ้น (สมุณษา วัฒนสินธุ์, 2545) คือ

##### - Homofermentation

เป็นการหมักกลูโคสซึ่งให้ผลผลิตเพียงชนิดเดียว คือ กรดแลคติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80% โดยผ่าน Glycolysis (Embden Meyerhof pathway : EMP) และเรียกแบคทีเรียในกลุ่มนี้ว่า Homofermentation เช่น *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด

กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ถูกเติมฟอสฟอรัส และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (Aldolase) จะเข้าทำปฏิกิริยา เป็นผลให้โมเลกุลกลูโคสแตกออกเป็นกลีเซอรอัล-3-ฟอสเฟต (ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต (Pyruvate) โดยเกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุลจากการหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เนื่องจากมีการเติมฟอสฟอรัสให้แก่สารตั้งต้น 2 แห่ง ในขั้นสุดท้ายเป็นเป็นการรีดิวซ์ไพรูเวตเป็นแลคเตท ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้  $\text{NAD}^+$  กลับคืนมาจากที่ถูกใช้ไปในการออกซิเดชันกลีเซอรอัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต

##### - Heterofermentation หรือ Mixed acid fermentation

เป็นการหมักกลูโคสซึ่งให้ผลผลิตหลายชนิด คือ เอทิลแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก 20-25% กรดแลคติก 50% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25% โดยผ่าน Heterofermentation bacteria เช่น *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด

กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมเปลี่ยนเป็นเพนโทส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการจัดโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชัน (Oxidation) และดีคาร์บอกซิเลชัน (Decarboxylation) ร่วมด้วย น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรอัลดีไฮด์ฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม และอะซิลฟอสเฟต (Acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase enzyme) กลีเซอรอัลดีไฮด์ฟอสเฟต (Glyceraldehyde homofermentation) จะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท (Lactate) เช่นเดียวกับการเกิดไกลโคไลซิสในการหมักแบบ Homofermentation แต่เนื่องจากการหมักแบบ Heterofermentation มีกลีเซอรอัลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1 โมเลกุลจึงเกิด ATP 1 โมเลกุล

ในขนาดของอะเซทิลฟอสเฟต ขึ้นอยู่กับว่าสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ด้วยหรือไม่ ในสถานะที่ขาดตัวรับอิเล็กตรอนอะเซทิลฟอสเฟตจะทำหน้าที่นี้เสียเองทำให้ถูกรีดิวซ์เป็นเอทานอลได้เป็น  $\text{NAD}^+$  ขึ้นมาใหม่ 2 โมเลกุลจากเอนไซม์ NADH แต่ในสถานะที่มีออกซิเจน  $\text{NAD}^+$  สามารถสร้างขึ้นมาใหม่จากเอนไซม์เอ็นเอดีเอซ ออกซิเดส (NADH oxidase) และเพอรอกซิเดส (Peroxidase) ปล่อยอะเซทิลฟอสเฟตที่มีมากพอไปเป็นอะซิเตทจึงเท่ากับการเติมฟอสเฟตให้กับซับเตรตอีกทางหนึ่ง เป็นผลให้ได้ ATP เพิ่มขึ้นอีก 1 โมเลกุลเป็น 2 โมเลกุลจากกลูโคส 1 โมเลกุล เช่นเดียวกับการหมักแบบ Homofermentation



ในกรณีที่มีการเพิ่มขึ้นของ ATP สะท้อนให้เห็นจากอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ผลเช่นเดียวกันนี้สามารถเกิดขึ้นกับตัวรับออกซิเจนอื่นๆ ด้วย เช่น ฟรุคโตส (Fructose) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์เป็นแมนนิทอล (Mannitol)

การระบุว่าการหมักแบบ Heterofermentative หรือไม่อาศัยการขึ้นบ่งด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น Lactobacilli ทำให้เกิดการหมักแบบ Heterofermentation บางชนิดไม่ทนกรด ถูกนำมารวมไว้ในสกุลใหม่คือ *Carnobacterium*

### 2.1.5 ความต้องการของสารอาหารของแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์กลุ่มที่ต้องการสารอาหารพิเศษ หรือเฉพาะในการเจริญเติบโต (Fastidious microorganism) มีความต้องการสารอาหารต่างๆ (Salminen and Wright, 1993) ดังต่อไปนี้

#### 1) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญอันดับสองรองจากคาร์บอน แบคทีเรียแลคติกต้องการแหล่งไนโตรเจนในการสร้างเซลล์ การสืบพันธุ์ และในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ซึ่งแหล่งโปรตีนที่นิยมใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก ในสูตรอาหารต่างๆ คือ สารสกัดจากยีสต์ (Yeast extract) เปปโตน (Peptone) สารสกัดจากเนื้อ (Beet extract) เป็นต้น นอกจากนี้สามารถใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟต  $[(NH_4)_2SO_4]$  เป็นแหล่งไนโตรเจนเพิ่มเติมได้อีกด้วย แต่หากใช้เกลือแอมโมเนียมซัลเฟตเพียงอย่างเดียวเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่าแบคทีเรียแลคติกเจริญได้ไม่ดี เนื่องจากแบคทีเรียแลคติกต้องการกรดอะมิโนหลายชนิดรวมทั้งวิตามินและแร่ธาตุในการเจริญ โดยที่ Calderon และคณะ (2001) ได้ทดสอบแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ ในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก พบว่าการใช้แหล่งไนโตรเจนอินทรีย์ เช่น Yeast extract, Peptone, Beef extract และ Corn hydrolysate ทำให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีที่สุด แต่การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียวนั้นจะทำให้ปริมาณการเจริญของแบคทีเรียแลคติกต่ำที่สุด ดังนั้นประสิทธิภาพของการเจริญและกรดการหมักของแบคทีเรียแลคติกนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับปริมาณของไนโตรเจนแล้ว ยังขึ้นอยู่กับชนิดของแหล่งไนโตรเจนอีกด้วย (Gao et al., 2008; Petrov et al., 2008) ดังนั้นนอกจากจะเลือกใช้แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมแล้ว ยังจำเป็นต้องมีปริมาณสารอาหารไนโตรเจนให้เพียงพอต่อความต้องการ แหล่งไนโตรเจนที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกนอกจาก Yeast extract, Peptone และ Beef extract แล้วยังมีวัตถุดิบอื่นๆ เช่น กากถั่วเหลือง (Soy bean meal) น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor) หางนม (Whey protein) และโปรตีนจากเศษเหลือของปลา (Fish hydrolysate) เป็นต้น

- **กากถั่วเหลือง (Soy bean meal)** เป็นแหล่งของเหลือจากอุตสาหกรรมการทำน้ำมันถั่วเหลือง โดยได้หลังจากหีบเอาน้ำมันออกแล้วจะเหลือเป็นกากถั่วเหลืองป่น กากถั่วเหลืองที่ได้ยังมีสารอาหารอยู่หลายชนิดทั้งโปรตีน กรดอะมิโน วิตามินและเกลือแร่

- **น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor)** เป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ข้าวโพดกระป๋อง ชุบข้าวโพด ขนมขบเคี้ยวจากข้าวโพด เป็นต้น ในน้ำแช่ข้าวโพดจะมีปริมาณกรดอะมิโนค่อนข้างสูงและยังมีคาร์โบไฮเดรตรวมอยู่บ้างเล็กน้อย

- **หางนม (Whey protein)** เป็นส่วนที่เหลือจากการแยกโปรตีนนม (Curd) ออกจากนม ในกระบวนการผลิตชีส ซึ่งมีปริมาณของกรดอะมิโนและน้ำตาลแลคโตสเป็นองค์ประกอบหลักอยู่มาก

นอกจากนี้ยังมีวิตามินชนิดต่างๆ หลายชนิด จึงเหมาะที่จะใช้เป็นวัตถุดิบในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก ซึ่ง Ha และคณะ(2003) ได้ศึกษาการหมักกรดแลคติกของ *Lactobacillus casei* KH-1 ในหางนม (Way protein) ในสูตรอาหารมีกลูโคส 2.39% Yeast extract 1.28% และ Corn steep liquor 3.5% พบว่ามีค่า yield ของกรดแลคติก เท่ากับ 0.312 g/g ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้อาหาร MRS ที่มีค่า yield เท่ากับ 0.382 g/g และอาหารสูตรใหม่นี้มีราคาถูก

- โปรตีนสกัดจากเศษเหลือของปลา (Fish hydrolysate) เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการสกัดน้ำต้มปลาซึ่งเป็นของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมปลากระป๋อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยมีโรงงานปลากระป๋องทั้งปลาซาร์ดีนและปลาทูน่าอยู่เป็นจำนวนมาก เศษเหลือเหล่านี้จะเป็นส่วนหนึ่งของเครื่องในปลาและเศษเหลือส่วนต่างๆ ซึ่งผ่านการย่อยด้วยความร้อนและเอนไซม์ และระเหยจนเข้มข้น เรียกว่า Fish hydrolysate ซึ่งมีโปรตีนสูงเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย Aspino และคณะ (2005) ได้นำโปรตีนที่สกัดที่ได้จากการนำเครื่องในปลาที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์ มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน ในอาหาร MRS มาทดลองเลี้ยง *Lactobacillus* พบว่าสามารถใช้ทดแทน Yeast extract, Peptone และ Beef extract และผลผลิตดีเท่าเทียมกัน

## 2) วิตามิน

วิตามินที่แบคทีเรียแลคติกใช้ในการเจริญเติบโต ได้แก่ ไทอะมีน (Thiamine : B1) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin : B2) ไพริดอกซิน (Pyridoxine : B6) กรดโฟลิก (Folic acid : B9) ไซยาโนโคบาลามีน (Cyanocobalamin:B12) และกรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) โดยที่ *Bifidobacterium infantis* สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B2, B6, B9, และ B12 ได้เป็นจำนวนมาก ส่วน *Bifidobacterium brevis* และ *Bifidobacterium longum* สามารถสังเคราะห์วิตามิน B1, B6, B9, และ B12 ได้เป็นจำนวนน้อย และ *Bifidobacterium adolescentis* ไม่สามารถสังเคราะห์วิตามินดังกล่าวข้างต้น นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกบางสายพันธุ์ยังต้องการกรดนิโคตินิก (Nicotinic acid) กรดเพนโททินิก (Pantothenic acid) ไบโอติน (Biotin) ไรโบฟลาวิน (Riboflavin) และโฟลิก (Folic)

## 3) คาร์โบไฮเดรต

แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจากโมโนแซคคาไรด์ (Monosaccharide) ประเภทน้ำตาลเพนโทส (Pentose) เช่น อะราบินโนส (Arabinose) ไรโบส (Ribose) และไซโลส (Xylose) เป็นต้น และน้ำตาลเฮกโซส (Hexose) เช่น ฟรุคโตส (Fructose) และแมนโนส (Mannose) ไดแซคคาไรด์ (Disaccharide) เช่น มอลโทส (Maltose) ไตรแซคคาไรด์ (Trisaccharide) เช่น มอลโทไตรออส (Maltotriose) โพลีเมอร์ (Polymer) เช่น แป้ง (Starch)

นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตพวกโอลิโกแซคคาไรด์ (Oligosaccharide) เช่น ราฟิโนส (Raffinose) และฟรุคโตโอลิโกแซคคาไรด์ (Fructooligosaccharide : FOS) เป็นต้น ซึ่งในระบบทางเดินอาหารไม่มีเอนไซม์ที่จะย่อยคาร์โบไฮเดรตชนิดนี้ได้

### 2.1.6 ผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรียแลคติก

1) เนยแข็ง (Cheese) เป็นผลิตภัณฑ์นมที่ได้จากกระบวนการหมักน้ำนมของแบคทีเรียสร้างกรดแลคติก ทำให้โปรตีนนมเกิดการตกตะกอน และช่วยสร้างสารให้กลิ่นรสในเนยแข็งอีกด้วย เนยแข็งมีความแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของน้ำนมที่นำมาใช้ในการผลิต แบคทีเรียที่ใช้ในการหมัก ระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บ ขั้นตอนการผลิตที่แตกต่างกันไป และส่วนผสมที่ใช้ในการผลิต ตัวอย่างของแบคทีเรียที่ใช้ในการ

ผลิตเนยแข็ง ได้แก่ *Lactobacillus lactis* subsp. *Lacis*, *L. lactis* subsp. *Cremoris*, *Lactobacillus helveticus*, *Lb. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* และ *Streptococcus thermophiles* เป็นต้น

2) โยเกิร์ต (Yoghurt) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากนมหมักด้วยการใช้เชื้อผสมในอัตราส่วน 1:1 ของ *S. thermophiles* และ *Lb. bulgaricus* ให้มีปริมาณจุลินทรีย์เริ่มต้นอยู่ระหว่าง  $10^6 - 10^7$  CFU/ml ทั้งนี้เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตทำให้ค่าพีเอชลดลง โดยพีเอชเริ่มต้นจาก 6.3-6.5 ลดลงเป็น 4.2-4.4 ซึ่งส่งผลยับยั้งการเจริญของ *S. thermophilus* ในขณะที่ *Lb. bulgaricus* ที่ช่วยสร้างสารให้กลิ่น และรสชาติ (Acetaldehyde) สามารถทนต่อค่าพีเอชที่ต่ำได้ถึง 3.5-3.8 ผลิตภัณฑ์หลังการหมักด้วยแบคทีเรียทั้งสองมีปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.90-0.95% และมีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มมากกว่า  $10^8$  CFU/ml (นิอร โนมศรี, 2555)

3) ปีทาเกิน เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำนมมาผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อในระบบพาสเจอร์ไรส์และนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก) ในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะทำการย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติกที่มีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว เมื่อได้รับรสชาติ กลิ่น และรสตามที่ต้องการแล้ว จะมีการปรุงแต่งสี กลิ่น รส เพื่อให้สามารถบริโภคได้ง่ายขึ้น หลังจากนั้นดำเนินการบรรจุลงบรรจุภัณฑ์โดยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic filling) ซึ่งหมายถึงผลิตภัณฑ์นมหมักนี้ยังคงมีเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ดังนั้นเมื่อดื่มเข้าไปในร่างกายแล้วจะได้รับสารอาหารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในนมหมักและยังได้รับแบคทีเรียที่มีประโยชน์นี้เข้าไปในร่างกายด้วย (วราวุฒิ ครูสง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532)

4) ยาคุลท์ เป็นนมหมักอีกประเภทหนึ่งของชาวญี่ปุ่นใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ผลจากหางนมที่เติมกลูโคสและสารร้าย *Chlorella* ละลายในน้ำร้อน กรอง ฆ่าเชื้อและเติม *L. casei* หมักที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน มีปริมาณของแข็งในนมต่ำกว่านมทั่วไป คือ มีโปรตีน 1.2 % น้ำตาลแลคโตส 1.1% และไขมัน 1.1% ดังนั้นจึงมีการเติมแซคคาไรด์อื่นๆจนทำให้ปริมาณของแข็งในนมเพิ่มขึ้นเป็น 14.1% จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติทางประสาทสัมผัสที่ดี (Tamime and Robinson, 1988) ดังนั้นผู้ที่ดื่มยาคุลท์เป็นประจำจะมี *L. casei* ในอุจจาระเพิ่มขึ้น และมีจำนวน *E. coli* ลดลง ยังมีความต้านทานต่อโรคได้ดีกว่าผู้ที่ไม่ดื่มยาคุลท์ การผลิตยาคุลท์ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงโดยการเติมน้ำผักต่างๆ เช่น มะเขือเทศ กะหล่ำปลี ผักชี และแครอท เป็นต้น ใช้เป็นส่วนผสมในการหมัก

5) กิมจิ เป็นอาหารหมักของชาวเกาหลี ส่วนใหญ่ทำมาจากกะหล่ำปลี วิธีการหมักมีดังนี้ คือ ใช้เกลือที่มีความเข้มข้นต่ำ (น้อยกว่า 3%) ระยะเวลาในการหมักสั้นคือ 3 วัน หมักที่อุณหภูมิ 20°C เกิดกรดประมาณ 0.6% และมีพีเอช 4.2 แบคทีเรียที่ทำให้เกิดการหมัก คือ *Leuconostoc mesenteroides* ตัวที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเสียไปคือ *Lactobacillus plantarum* ดังนั้นจึงไม่นิยมหมักไว้หลายวัน เพราะจะทำให้เนื้อสัมผัสนุ่มและมีรสเปรี้ยวมาก (สุเมธธา วัฒนศิริ, 2545)

## 2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไชยวัฒน์ นพเก้า (2553) ศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองพื้นเมืองของไทยเพื่อคัดกรองให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยใช้อาหารแข็ง MRS ที่เติมบรอมครีเซอเพอร์เฟิล สำหรับการคัดกรองในเบื้องต้น จากนั้นนำเชื้อที่ได้มาทดสอบการสร้างกรดแลคติกในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลงที่ใช้น้ำตาลแลคโตสจากเวย์เป็นแหล่งคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ในการทดลองนี้ใช้อาหารสำหรับการหมักทั้งหมด 4 สูตร เพื่อคัดกรองอาหารพื้นบ้านที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติกโดยเชื้อรหัส SAG 303 คือเชื้อ *Lactobacillus pentosus* อาหารสูตรที่ 1 และอาหารสูตรที่ 2 ดัดแปลงสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกของ De Man และคณะ (1960) และ Roy และคณะ (1987) อาหารสูตรที่ 3 ดัดแปลงจากอาหารสำหรับการหมักกรดแลคติกจากงานวิจัยของ Cho และคณะ (1995) อาหารสูตรที่ 4 ดัดแปลงจากการอาหารการหมักกรดแลคติกจากงานวิจัยของ Ghasemi และคณะ (2009) จากการทดลองพบว่าเชื้อรหัส SAG303 สามารถสร้างกรดแลคติกได้สูงสุดในอาหารเหลวสำหรับการหมักสูตร 1 เท่ากับ 17.66 g/L ใช้ น้ำตาลแลคโตส 19.12 g/L พบว่าอาหารสูตรที่ 1 มีแร่ธาตุอาหารมากกว่าสูตรอาหารอีก 3 สูตร โดยอาหารสูตรที่ 1 และสูตรที่ 2 จะมีองค์ประกอบใกล้เคียงกันต่างกับที่อาหารสูตรที่ 2 ใช้ Yeast extract มากกว่าสูตรทั้ง 3 และไม่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟต สำหรับสูตรที่ 4 มีแร่ธาตุและสารอาหารน้อยกว่าอาหารสูตรอื่นมาก

มานิชญ์ สุธีพัฒนานนท์ และสุรสิทธิ์ รอดทอง (2550) ศึกษาการพัฒนาระบบการผลิต CLA ต้นแบบ ด้วยแบคทีเรียแลคติกใช้อุตสาหกรรมโดยแบคทีเรียแลคติกแยกได้จากกระเพาะปลาน้ำจืดเกี่ยวกับการสร้าง CLA ในเนือปลา และแบคทีเรียแลคติก 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 และ *Lactobacillus lactis* TISTR 1401 จากกรดไขมันลิโนเลอิกบริสุทธิ์ ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลือง นำแบคทีเรียทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS และศึกษาสัญญาณของเซลล์แบคทีเรีย การทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA นำเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ลิโนเลอเทอโอไซเมอร์จนมีอายุเซลล์อยู่ในช่วง late log phase เป็นช่วงที่มีการสร้าง CLA เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว Alonso และคณะ (2003) นำแบคทีเรียเหล่านี้มาลงอาหารเหลวทดสอบ 2 ชนิด อาหารเหลว MRS และอาหาร Modified MRS เพื่อเปรียบเทียบปริมาณการสร้าง CLA ผลการทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA ของแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS ที่มีน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลืองพบว่าแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS จะเจริญเพิ่มจำนวนได้มากโดยพิจารณาเซลล์ที่มีชีวิตและค่าความเป็นกรดต่าง แต่มีการสร้าง CLA ในปริมาณที่ต่ำแตกต่างจากการเลี้ยงในอาหารเหลวทดสอบ Modified MRS อย่างชัดเจน พบว่าแบคทีเรียมีการเจริญน้อยพบการสร้าง CLA ในปริมาณที่มาก จากผลการทดลองนี้แบคทีเรียแลคติกต่างสายพันธุ์มีความสามารถในการสร้าง CLA ทั้งปริมาณและชนิดต่างกัน องค์ประกอบของอาหารมีผลอย่างยิ่งต่อปริมาณการสร้าง CLA การเลี้ยงในอาหาร MRS เป็นอาหารที่ครบถ้วนสมบูรณ์เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกทำให้มีการเจริญของเซลล์ในปริมาณมากแต่ไม่ส่งผลให้มีการสร้าง CLA แต่เนื่องจากเลี้ยงในอาหารเหลวทดสอบ Modified MRS ที่ถูกลดปริมาณแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนโดยไม่มีน้ำตาลและสารสกัดจากเนื้อวัว (Beef extract) ทำ

ให้เชื้อเจริญน้อยเมื่อเทียบกับเลี้ยงในอาหารเหลว MRS แต่มีการสร้าง CLA ได้มากขึ้น แบคทีเรียที่มีศักยภาพในการสร้าง CLA และคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบสถานะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA คือ *Lactococcus lactis* TISTR 1410, N25-7 และ N25-19 โดยใช้อาหารเหลว Modified MRS เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบ

ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินโดยเชื้อ *L.casei* ssp. *Rhamnosus* SN11 ที่ถูกตรึง จากการทดลองได้ศึกษาการแทนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MRS ด้วยวัสดุราคาถูกและผลขององค์ประกอบอื่นๆ ต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินเพื่อเป็นการทดแทนอาหารสังเคราะห์ที่มีราคาถูก นอกจากนี้ยังอาศัยเทคนิคการตรึงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต โดยใช้ซูโครสแทนแหล่งคาร์บอนและน้ำปลาหนึ่งทีผ่านการแยกไขมันและตกตะกอนโปรตีนเจือจางแทนแหล่งไนโตรเจน โดยมี pH เริ่มต้น 5.5 ซึ่งสูตรอาหารดังกล่าวส่งผลให้เชื้อมีการเจริญและสามารถผลิตแบคทีเรียโอซินได้ในปริมาณเท่ากับอาหาร MRS สูตรปกติโดยวัดกิจกรรมการยับยั้งได้ 30 AU/ml. ที่ชั่วโมงที่ 24 นอกจากนี้ยังพบว่าวิธีการเลือกวิธีตรึงเชื้อ *L.casei* ssp. *Rhamnosus* SN11 โดยวิธีการดูดซับบน Sintered glasses ที่ผ่านการเคลือบด้วย Polyethylenimine (PEN) สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน

ชนิษฐา ปัญญา และสุมิตรา ฤาชา (2556) ศึกษาการแยกแบคทีเรียแลคติกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซินจากตัวอย่างผัก ผลไม้ ธัญพืชหมัก จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร MRS agar ที่เติม  $\text{CaCO}_3$  1% พบเอนไซม์เคดะเลส ทั้งหมด 21 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างกลม 12 ไอโซเลท และรูปร่างท่อน 9 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกทั้งหมดไปตรวจหาแบคทีเรียโอซินที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 4 ชนิด คือ *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* และ *Salmonella* sp. ด้วยวิธี agar well diffusion assay พบว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท E1, E2 และ I2 มีความสามารถในการผลิตแบคทีเรียโอซินยับยั้งการเจริญของ *B.cereus* ได้เมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีเรียโอซินโดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux) พบว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท E1 และ E2 คือ *Lactobacillus acidophilus* และไอโซเลท I2 คือ *Pediococcus* sp. และจากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. acidophilus* E1 สามารถทนความร้อนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 63 และ 80 องศาเซลเซียส มีความคงตัวในช่วง pH 5-7 ในขณะที่แบคทีเรียโอซินจาก *Lb. acidophilus* E2 และ *Pediococcus* sp. ไอโซเลท I2 สูญเสียความสามารถในการยับยั้ง *B. cereus* เมื่อผ่านความร้อนและการเปลี่ยนแปลงค่า pH

อาภรณ์ วงวิจารณ์ (2554) ศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) จากกากน้ำตาลโดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างต่างๆ ได้ทั้งหมด 460 ไอโซเลท และคัดเลือกได้แบคทีเรียรหัส SW4-3 สามารถผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) 15.7 g/L ในอาหาร MRS สูตรทดแทนกลูโคสด้วยกากน้ำตาล พบว่าเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pediococcus pentosaceus* SW4-3 เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการปรับสูตรให้มีราคาต่ำโดยใช้กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนและ Fish hydrolysate เป็นแหล่งไนโตรเจน เชื้อนี้สามารถผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) ได้ 15.2 g/L ซึ่งไม่ต่างจากสูตรอาหาร MRS เดิม ทำให้สามารถลดต้นทุนด้านอาหารได้ 72% เมื่อ

เทียบกับสูตรอาหารการหมักแบบกะและเชื้อ *Pediococcus pentosaceus* มีการผลิตกรดแลคติกไอโซเมอร์ L(+) (L+productivity) เท่ากับ 0.85 g/L/h ซึ่งเมื่อเทียบกับการหมักแบบต่อเนื่องในสภาวะเดียวกัน

Qian Qian Wu และคณะ (2012) ศึกษาเชื้อ *Bifidobacterium* lnt57 (lnt57) และ *Propionibacterium ferudenreichii* subsp. *Shermanii* ATCC 13673 (ATCC 13673) โดยการเพาะเลี้ยงร่วมกันในอาหารที่แตกต่างกัน เช่น นมวัว นมถั่วเหลือง และอาหาร MRS ดัดแปลง แล้วนับจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย วัดค่า pH ระดับความเข้มข้นของกรดอินทรีย์และน้ำตาลต่างๆโดยนำมาวิเคราะห์หลังจากเพาะเลี้ยง 7 วัน พบว่าในนมถั่วเหลืองมีการอยู่รอดของ lnt57 สูงและ ATCC 13673 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ lnt57 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ 69.4% ในตอนท้ายของการหมัก ส่วนในนมวัวเมื่อเพาะเลี้ยง ATCC 13673 ร่วมกับ lnt57 ทำให้อัตราการเจริญของเชื้อ lnt57 มีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นจาก 24 ชั่วโมง จนถึง 120 ชั่วโมง โดยเพิ่มขึ้นประมาณ 10 เท่า และไม่ได้ส่งผลต่อการอยู่รอดของ lnt57 หลัง 96 ชั่วโมงของการหมักในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง นอกจากนี้ความอยู่รอดของเซลล์ ATCC 13673 เลี้ยงร่วมกับ lnt57 มีอัตราเพิ่มขึ้น 3.2-7.4 เท่า เมื่อเทียบกับ ATCC 13673 ที่เลี้ยงเดี่ยว ดังนั้นการเจริญและรูปแบบการใช้สารอาหารทั้งสองสายพันธุ์ในระหว่างการเลี้ยงร่วมกันแสดงให้เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนของการเพาะเลี้ยงร่วมกัน lnt57 และ ACCT 13673 ในนมถั่วเหลือง โดยเพิ่มขึ้น 2 เท่าเมื่อเทียบกับ lnt57 ที่เลี้ยงเดี่ยว พบว่าเชื้อ *Bifidobacterium* และ *Propionibacterium* สามารถนำไปใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ของนมเปรี้ยวหรือนมถั่วเหลืองได้

Beatriz และคณะ (2004) ศึกษาการทดลองใช้น้ำแช่ข้าวโพด เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 โดยมีองค์ประกอบของสูตรอาหารคือ กลูโคส 118.20 g/L, ภาคน้ำตาล 37.27 g/L, น้ำแช่ข้าวโพด 42.54 g/L, Tween80 1.52 mL/L, และ  $MnSO_4$  0.30 g/L โดยหลังการหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีการผลิตกรดแลคติกได้ 110 g/L ซึ่งมากกว่าการใช้สูตรอาหารที่เติม Yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนถึงร้อยละ 30.4

พัชรวรรณ รัตนอุบล (2552) ศึกษาผลของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเริ่มจากการนำสารสกัดจากธัญพืช 3 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ถั่วเขียวและข้าวโพด ซึ่งผ่านการสกัดด้วยน้ำมาใช้ศึกษาในส่วนของความเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 หลังการทำแห้งได้ดีมีการลดลงของเซลล์ 0.11 log CFU/ml และจากการสกัดสารจากธัญพืชส่วนของตะกอนที่เหลือ ก็คือ โยอาหาร (Crude fiber) นำมาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นสารตัวกลางในการพองเซลล์ พบว่าการเติมโยอาหาร (Crude fiber) จากถั่วเขียวตะกอนละเอียดช่วยให้ *Lactobacillus plantarum* มีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งน้อยกว่าการไม่เติมโยอาหาร (Crude fiber) โดยเซลล์ลดลง 0.25 และ 0.51 log CFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้การปรับพีเอชของอาหารเป็น 6.5 และการวางอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเหมาะต่อการเจริญของเชื้อมีการรอดชีวิตที่ดีหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

Ha และคณะ (2003) ศึกษาการหมักกรดแลคติกของ *Lactobacillus casei* KH-1 ในทางนม (Way protein) ในสูตรอาหารมีกลูโคส 2.39% Yeast extract 1.28% และน้ำแช่ข้าวโพด 3.5% พบว่ามีค่า Yield ของกรดแลคติก เท่ากับ 0.312 g/g ซึ่งใกล้เคียงกับการใช้อาหาร MRS ที่มีค่า Yield เท่ากับ 0.382 g/g และอาหารสูตรใหม่นี้มีราคาถูก

ดวงเดือน วัฏฐานุรักษ์ (2550) ศึกษาการหาสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลคติกซึ่งคัดเลือกได้จากเหวมและปลาสดจากการคัดเลือกในอาหาร GYP agar พบว่าสามารถคัดแยกเชื้อได้ทั้งหมด 4 ไอโซเลต คือ LA1, LA2, LA3 และ LA4 ซึ่งมีรูปร่างกลมและท่อน ติดสีแกรมบวก เมื่อนำเชื้อที่คัดเลือกได้ มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกเปรียบเทียบกับเชื้อ *Lactobacillus plantarum* TISTR 541 นำมาเพาะเลี้ยงโดยใช้สูตรอาหาร MRS พบว่าเชื้อ *L. plantarum* ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 23.62 g/L และนำเชื้อ *L. plantarum* มาเพาะเลี้ยงในสูตรอาหาร 5 สูตร GYP GS MEA MRS และ MRS สูตรดัดแปลง พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก คือ อาหาร MRS ให้ปริมาณของกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 21.37g/L และเมื่อนำเชื้อ *L. plantarum* มาเลี้ยงลงอาหาร MRS ในสภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า ที่ความเร็ว 100 rpm ความเร็ว 150 rpm และความเร็ว 200 rpm พบว่าเชื้อ *L. plantarum* ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุด 23.62 g/L ที่ความเร็ว 200 rpm และเลี้ยงเพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก พบว่าเชื้อ *L. plantarum* จะให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 30.50 g/L ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 1.86 ค่า pH เท่ากับ 3.65 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 6.50 g/L และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.68 g



## บทที่ 3

### วิธีการดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุและอุปกรณ์

##### 3.1.1 วัสดุ

แก้วเหลือง เนื้อปลา และเนื้อไก่

##### 3.1.2 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
3. กล้องถ่ายภาพดิจิทัล (digital camera)
4. หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave)
5. ตะเกียงแอลกอฮอล์ (turnel)
6. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifige)
7. จานเพาะเชื้อ (petri dish)
8. หลอดทดลอง (test tube)
9. ลูกยาง (ball for pipette)
10. แท่งแก้วคน (stirring rot)
11. ช้อนตักสาร (spatula)
- \*12. กระบอกตวง (cylinder)
13. หลอด Microcentrifige
14. ตู้บ่มเชื้อ (incubator)
15. ขวดรูปชมพู่ (flask)
16. ปิกเกอร์ (beaker)
17. ปีเปตต์ (pipette)
18. เครื่องเขย่า (shaker)
19. ตู้ดูดความชื้น (Dessicator)
20. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
21. หลอด Eppendorf
22. เครื่องเขย่าสาร (Vortex)



### 3.2 สารเคมี

1. Peptone
2. Yeast extract
3. Glucose
4. Sodium acetate trihydrate
5. Tween 80
6. Dipotassium hydrogen phosphate
7. Triammonium citrate
8. Magnesium sulfate heptahydrate
9. Manganese sulfate tetrahydrate
10. De Man-Rogosa-Sharpe agar (MRS)

### 3.3 วิธีการทดลอง

#### 3.3.1 การเตรียมกล้าเชื้อ

3.3.1.1 นำแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 streak ลงบนอาหาร MRS agar (สูตรมาตรฐาน) เพื่อกระตุ้นให้แบคทีเรียเจริญ สำหรับใช้เป็นกล้าเชื้อจากนั้นนำกล้าเชื้อที่เจริญ 2-3 Loopfull ใส่ในอาหาร MRS broth (สูตรมาตรฐาน) ปริมาตร 50 ml แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำกล้าเชื้อมาเจือจางโดยใช้ 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย  $1 \times 10^8$  CFU/ml โดยเทียบกับ 0.5 Mcfarland

#### 3.3.2 การเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง

##### 3.3.2.1 สูตรที่ 1

ถั่วเหลือง	10	g
Peptone	10	g
Yeast extract	4	g
Glucose	20	g
Sodium acetate trihydrate	5	g
Tween 80	1	ml
Dipotassium hydrogen phosphate	2	g
Diammonium citrate	2	g
Magnesium sulfate heptahydrate	0.2	g
Manganese sulfate tetrahydrate	0.05	g

##### 3.3.2.2 สูตรที่ 2

เนื้อปลา	10	g
Peptone	10	g

Yeast extract	4	g
Glucose	20	g
Sodium acetate trihydrate	5	g
Tween 80	1	ml
Dipotassium hydrogen phosphate	2	g
Diammonium citrate	2	g
Magnesium sulfate heptahydrate	0.2	g
Manganese sulfate tetrahydrate	0.05	g

### 3.3.2.3 สูตรที่ 3

เนื้อไก่	10	g
Peptone	10	g
Yeast extract	4	g
Glucose	20	g
Sodium acetate trihydrate	5	g
Tween 80	1	ml
Dipotassium hydrogen phosphate	2	g
Diammonium citrate	2	g
Magnesium sulfate heptahydrate	0.2	g
Manganese sulfate tetrahydrate	0.05	g

นำส่วนผสมที่เป็นถั่วเหลือง เนื้อปลา และเนื้อไก่ มาบดให้ละเอียดแล้วขยำเอาเฉพาะน้ำมาใช้เป็นส่วนผสม จากนั้นนำส่วนผสมข้างต้นผสมในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับให้มี pH 6.5 ด้วย 6N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 บอนต์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121° C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.1 ปริมาตรร้อยละ 10 ใส่ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ทั้ง 3 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรทำ 3 ซ้ำ แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นนำมาวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและวัดปริมาณการสร้างกรดที่เกิดขึ้นโดยวัดค่า pH ซึ่งการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งมีดังนี้

นำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 6000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเทส่วนใสทิ้งเหลือแต่ตะกอน แล้วนำตะกอนเซลล์ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ 2 ครั้ง จากนั้นนำตะกอนใส่หลอด Microcentrifuge ที่ทราบน้ำหนักแน่นอน แล้วอบที่อุณหภูมิ 105° C จนได้น้ำหนักคงที่ แล้วนำมาคำนวณจากสูตร :

$$\text{น้ำหนักเซลล์แห้ง (g/L)} = \frac{(\text{น้ำหนักเซลล์แห้งหลังอบ} - \text{น้ำหนักเซลล์แห้งก่อนอบ}) \times 1,000}{\text{ปริมาตรตัวอย่างที่ใช้}}$$

แล้วคัดเลือกสูตรอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่แบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 เจริญได้ดีที่สุด เพื่อนำไปใช้ทดสอบขั้นตอนต่อไป

### 3.3.3 เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS ดัดแปลงที่ผ่านการคัดเลือก

นำอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ผ่านการคัดเลือกจาก 3.3.2 และอาหาร MRS สูตรมาตรฐาน แล้วเติมกล้าเชื้อ จากข้อ 3.3.1 ปริมาตรร้อยละ 10 ใส่ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลง ซึ่งแต่ละสูตรทำ 3 ซ้ำ จากนั้นนำไปเขย่าความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้วหาปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดโดยวิธี pour plate, หา น้ำหนักเซลล์แห้งและค่า pH



## บทที่ 4

### ผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

#### 4.1 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรดัดแปลง

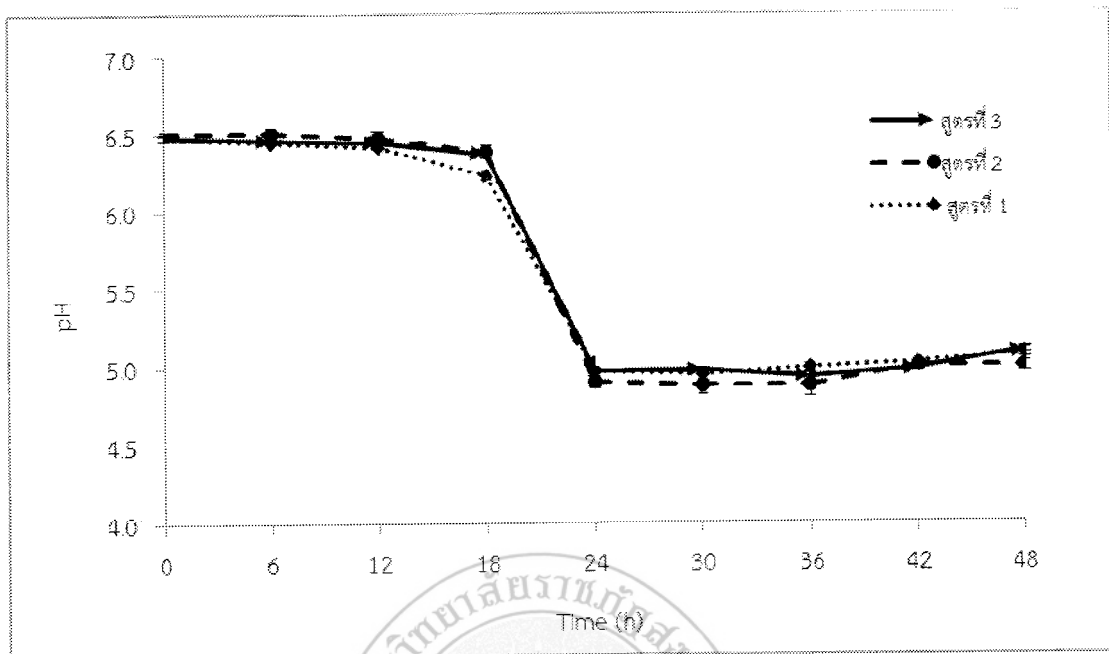
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ถั่วเหลือง เนื้อปลา และเนื้อไก่ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์หา น้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดปริมาณการสร้างกรดที่เกิดขึ้นซึ่งวัดค่า pH พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตรที่มีถั่วเหลือง เนื้อปลา และเนื้อไก่เป็นแหล่งไนโตรเจนมีการเจริญเพิ่มขึ้นที่ 6 ชั่วโมงของการทดลอง (ระยะ Log phase) และมีการเจริญคงที่ ที่ 12 ชั่วโมงของการทดลอง (ระยะ Stationary phase) โดยอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีเนื้อปลาและเนื้อไก่มีปริมาณแบคทีเรียลดลงที่ 24-48 ชั่วโมงของการทดลอง (ระยะ Death phase) ส่วนอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนมีการเจริญของแบคทีเรียเพิ่มขึ้นสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงของการทดลอง โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเท่ากับ  $0.830 \pm 0.20$  g/L (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พัทธวรรณ รัตนอุบล (2552) ศึกษาผลของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเริ่มจากการนำสารสกัดจากรั้วพืช 3 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ถั่วเขียวและข้าวโพด ซึ่งผ่านการสกัดด้วยน้ำมาใช้ในการศึกษาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 และจากการสกัดสารจากรั้วพืช ส่วนของตะกอนที่เหลือคือ โยอาหาร (Crude fiber) นำมาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมโยอาหารจากถั่วเขียว ตะกอนละเอียดช่วยให้ *L. plantarum* มีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งน้อยกว่าการไม่เติมโยอาหาร และเนื่องจากงานวิจัยที่ผู้วิจัยศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนและไม่ได้ใช้โยอาหารจากถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมแต่ยังทำให้แบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 สามารถเจริญได้ดี และมีน้ำหนักเซลล์แห้งเพิ่มขึ้นตลอดการทดลองเนื่องจากถั่วเหลืองที่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 เพราะแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารที่มีความสำคัญอันดับสองรองจากคาร์บอน และนอกจากนี้ในถั่วเหลืองมีสารอาหารอยู่หลายชนิดทั้งโปรตีน กรดอะมิโน วิตามินและเกลือแร่ (Calderon et al., 2001) ซึ่งมีองค์ประกอบดังนี้ ได้แก่ โปรตีน 34.0 g/100 g, ไขมัน 18.7 g/100g, คาร์โบไฮเดรต 26.7 g/100 g, กากใย 4.7 g/100 g แร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซียม 245.0 mg/100g, ฟอสฟอรัส 500.0 mg/100g, เหล็ก 10.0 mg/g และวิตามินต่างๆ เช่น ไทอามีน 0.7 mg/100 g, ไรโบฟลาวิน 0.2 mg/100g, ไนอาซิน 1.5 mg/100 g, วิตามินซี 14.0 mg/100 g (กรมวิชาการเกษตร, 2554) ดังนั้นถั่วเหลืองจึงสามารถนำมาใช้ได้ทั้งเป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน

ตารางที่ 4.1 ปริมาณน้ำหนักรวมของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง สูตรที่ 1, สูตรที่ 2, และสูตรที่ 3 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักรวม (g/L) ± SD		
	สูตรที่ 1	สูตรที่ 2	สูตรที่ 3
0	0.313±0.10	0.088±0.04	0.063±0.01
6	0.288±0.10	0.066±0.04	0.063±0.04
12	0.561±0.10	0.399±0.03	0.241±0.10
18	0.580±0.20	0.438±0.10	0.286±0.02
24	0.511±0.10	0.336±0.10	0.300±0.04
30	0.836±0.01	0.297±0.04	0.205±0.04
36	0.672±0.10	0.300±0.04	0.191±0.10
42	0.802±0.10	0.213±0.04	0.197±0.08
48	0.830±0.20	0.175±0.07	0.161±0.02

หมายเหตุ: สูตรที่ 1 = ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน, สูตรที่ 2 = เนื้อปลาเป็นแหล่งไนโตรเจน และ สูตรที่ 3 = เนื้อไก่เป็นแหล่งไนโตรเจน

ส่วนค่า pH ที่เวลา 0, 6, 12, 18, 24, 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง พบว่าค่า pH ของอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่เวลา 12-48 ชั่วโมงของการทดลอง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.41±0.01, 6.23±0.03, 4.97±0.02, 4.95±0.02, 4.99±0.02, 5.02±0.04 และ 5.08±0.03 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.1) โดย pH เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ซึ่งแม้แบคทีเรียแลคติกจะทนกรดและเจริญได้ดีที่สภาวะเป็นกรด โดยสามารถเจริญได้ที่ pH ต่ำกว่า 4.0 หรือบางสายพันธุ์เจริญได้ที่สภาวะเบสที่ pH 9.6 แต่โดยทั่วไปค่า pH ที่เหมาะสมจะอยู่ในช่วง pH 5.5-6.0 และเนื่องจากแบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลแล้วเปลี่ยนให้เป็นกรดแลคติก ดังนั้นค่า pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อจึงลดลงอย่างรวดเร็ว ปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้นส่งผลให้ไปยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแลคติก (Product inhibition) เมื่อมีปริมาณแบคทีเรียน้อย การสร้างกรดจึงเกิดได้ช้าหรือหยุดลง (Akerberg et al., 1998)

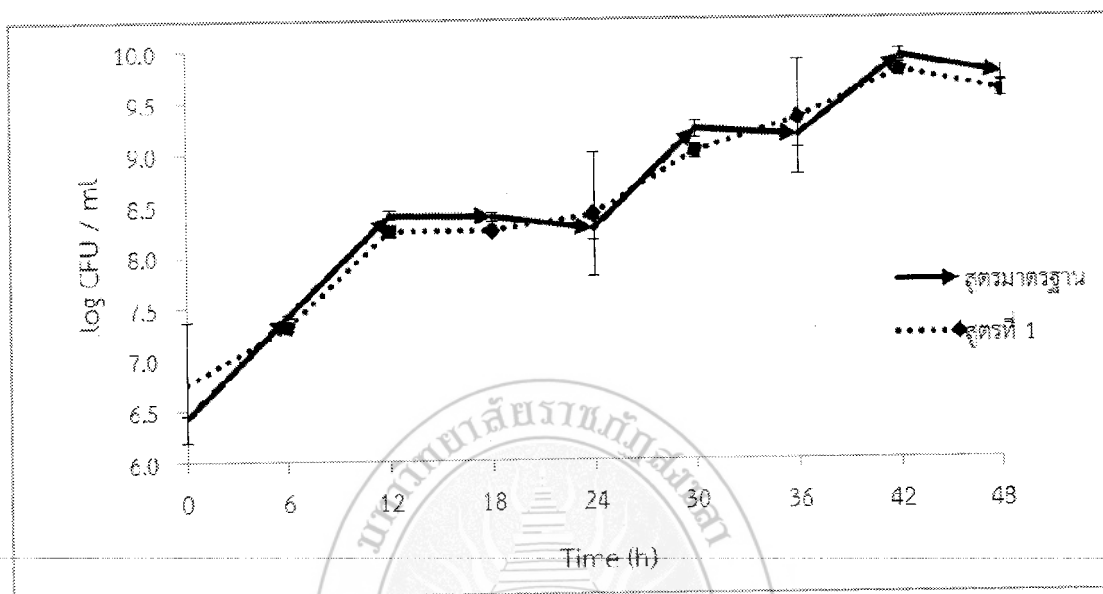


ภาพที่ 4.1 ค่า pH ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง สูตรที่ 1 (ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน), สูตรที่ 2 (เนื้อปลาเป็นแหล่งไนโตรเจน) และสูตรที่ 3 (เนื้อไก่เป็นแหล่งไนโตรเจน) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

#### 4.2 เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ผ่านการคัดเลือก

จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม แล้วนำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้ววัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี pour plate, หาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่า pH พบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 จากอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมเจริญได้ดีใกล้เคียงกัน เนื่องจากมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร MRS สูตรมาตรฐาน เท่ากับ  $8.38 \pm 0.04$  log CFU/ml และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม เท่ากับ  $8.24 \pm 0.03$  log CFU/ml ที่ 18 ชั่วโมงของการทดลอง (ภาพที่ 4.2) และมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากขึ้นที่เวลา 42 ชั่วโมงของการทดลอง ซึ่งจากผลการทดลองบ่งชี้ได้ว่าอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมมีแหล่งไนโตรเจนใกล้เคียงกับอาหาร MRS สูตรมาตรฐาน ทำให้แบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 สามารถเจริญได้ดีใกล้เคียงกับอาหาร MRS สูตรมาตรฐาน เนื่องจากแหล่งไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญอันดับสองรองจากคาร์บอน แบคทีเรียแลคติกต้องการแหล่งไนโตรเจนในการสร้างเซลล์ การสืบพันธุ์ และในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ (Gao et al., 2008) ซึ่งงานวิจัยของ Beatriz และคณะ (2004) ได้มีการทดลองใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *L. rhamnosus* CGMCC 1466 โดยมีองค์ประกอบของสูตร คือ กลูโคส 118.20 g/L, กากน้ำตาล

37.27 g/L, น้ำแซ่ข้าวโพด 42.54 g/L, Tween80 1.52 ml/L และ  $MnSO_4$  0.30 g/L โดยหลังการหมักเป็นเวลา 12 ชั่วโมง พบว่ามีการผลิตกรดแลคติกได้ 110 g/L ซึ่งดีกว่าสูตรอาหารที่เติม yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจนถึงร้อยละ 30.4



ภาพที่ 4.2 การเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงสูตรที่ 1 (ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ส่วนการวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 30 ชั่วโมงของการทดลอง เท่ากับ  $0.697 \pm 0.04$  g/L และ  $1.461 \pm 0.10$  g/L ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) ซึ่งน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหารทั้งสองสูตรมีปริมาณที่แตกต่างกัน โดยน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมมีปริมาณเซลล์สูงกว่าในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานตลอดการทดลอง เนื่องจากในอาหารสูตรดัดแปลงมีตะกอนของถั่วเหลือง ทำให้เมื่อวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งจะมีตะกอนของถั่วเหลืองผสมกับเซลล์แบคทีเรีย ส่งผลให้มีน้ำหนักเซลล์แห้งมากกว่าอาหาร MRS สูตรมาตรฐาน โดยจากรายงานวิจัยของดวงเดือน วัฒนานุรักษ์ (2550) ศึกษาการหาสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลคติก พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก คือ อาหาร MRS ให้ปริมาณของกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 21.37 g/L และเมื่อนำแบคทีเรีย *L. plantarum* มาเลี้ยงในอาหาร MRS ที่สภาวะนิ่งและสภาวะเขย่า โดยสภาวะเขย่าใช้ ความเร็ว 100 rpm, 150 rpm และ 200 rpm พบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* ให้ปริมาณกรดแลคติกสูงสุดในชั่วโมงที่ 96 เท่ากับ ให้ปริมาณกรด



แลคติกสูงสุด 23.62 g/L ที่ความเร็ว 200 rpm นอกจากนี้ทดสอบหาระยะเวลาที่ 30.50 g/L ค่าความขุ่นของเซลล์เท่ากับ 1.86 ค่า pH เท่ากับ 3.65 ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เท่ากับ 6.50 g/L และน้ำหนักรีดิวซ์เท่ากับ 0.68 g ซึ่งจากผลการทดลองของผู้วิจัย พบว่าน้ำหนักรีดิวซ์ของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานมีปริมาณน้ำหนักรีดิวซ์ใกล้เคียงกับรายงานวิจัยดังกล่าว

ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำหนักรีดิวซ์ของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงสูตรที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

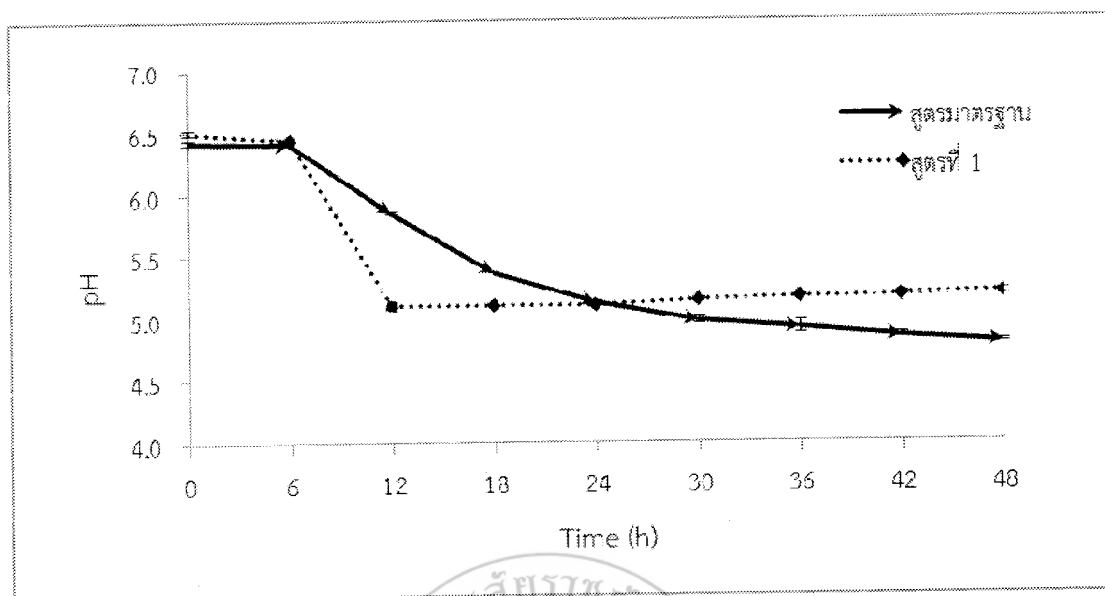
เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักรีดิวซ์ (g/L) ± SD	
	สูตรมาตรฐาน	สูตรที่ 1
0	0.050±0.03	0.113±0.01
6	0.347±0.40	0.313±0.01
12	0.480±0.09	0.755±0.05
18	0.591±0.04	1.302±0.10
24	0.688±0.01	0.716±0.40
30	0.697±0.04	1.461±0.10
36	0.494±0.20	1.230±0.20
42	0.552±0.06	1.158±0.06
48	0.657±0.10	0.913±0.10

หมายเหตุ: อาหารสูตรมาตรฐาน (De Man-Rogosa-Sharpe agar) และสูตรที่ 1 = ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน

ผลการศึกษาค่า pH ต่อการเจริญแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ของอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าค่า pH มีแนวโน้มลดลงตลอดการทดลอง โดยอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS ที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม มีค่า pH ลดลงที่ 6 ชั่วโมงของการทดลอง เท่ากับ 6.41±0.02 และ 6.44±0.01 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.3) ซึ่งจากผลการทดลองของผู้วิจัย พบว่าค่า pH ของทั้งสองการทดลองมีความสอดคล้องและใกล้เคียงกับค่า pH ดังที่กล่าวก่อนหน้า

๑  
 5๙๑.๑  
 ม 14 ๓





ภาพที่ 4.3 ค่า pH ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

#### 5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษากาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตรซึ่งแต่ละสูตรมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ถั่วเหลือง เนื้อปลา และเนื้อไก่ แล้วนำไปเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บทุกๆ 6 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่า pH พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน มีการเจริญของแบคทีเรียสูงสุดที่ 48 ชั่วโมงของการทดลอง โดยมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้ง เท่ากับ  $0.830 \pm 0.20$  g/L แล้ววัดปริมาณการสร้างกรดที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า pH พบว่าค่า pH ของอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่เวลา 12-48 ชั่วโมงของการทดลอง ซึ่งมีค่าเท่ากับ  $6.41 \pm 0.01$ ,  $6.23 \pm 0.01$ ,  $4.97 \pm 0.01$ ,  $4.95 \pm 0.01$ ,  $4.99 \pm 0.01$ ,  $5.02 \pm 0.01$  และ  $5.08 \pm 0.02$  ตามลำดับ จากนั้นเปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ผ่านการคัดเลือกโดยวัดการเจริญของแบคทีเรียด้วยวิธี pour plate พบว่าแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 จากอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมเจริญได้ดีใกล้เคียงกัน เนื่องจากมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยมีปริมาณแบคทีเรียทั้งหมดในอาหาร MRS สูตรมาตรฐาน เท่ากับ  $8.38 \pm 0.04$  log CFU/ml และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม เท่ากับ  $8.24 \pm 0.03$  log CFU/ml ที่ 18 ชั่วโมงของการทดลอง จากนั้นวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม มีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดที่ 30 ชั่วโมงของการทดลอง เท่ากับ  $0.697 \pm 0.04$  และ  $1.461 \pm 0.10$  g/L ตามลำดับ โดยผลการศึกษาค่า pH ต่อการเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม พบว่าค่า pH มีแนวโน้มลดลงตลอดการทดลอง โดยอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมมีค่า pH ลดลงที่ 6 ชั่วโมงของการทดลอง เท่ากับ  $6.41 \pm 0.02$  และ  $6.44 \pm 0.01$  ตามลำดับ

#### 5.2 ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาวัสดุเหลือใช้ที่ได้จากโรงงานอุตสาหกรรมที่เหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียแลคติก เช่น น้ำทิ้งมันส้มปะหลัง น้ำหมักจากเส้นใยปาล์ม เพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียแลคติก
2. การเตรียมอาหารสูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม ควรหาวิธีป้องกันการปนเปื้อนของตะกอนถั่วเหลืองในสูตรอาหารดัดแปลง เช่น การใช้น้ำเวย์

## เอกสารอ้างอิง

- กรมวิชาการเกษตร. 2554. องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง. กรุงเทพฯ : กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์.
- ชนิษฐา ปัญญา และสุมิตรา ฤาชา. 2556. ศึกษาการแยกแบคทีเรียแลคติกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคทีเรียโอซิน. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี.
- ไชยวัฒน์ นพแก้ว. 2553. ศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยแบคทีเรียแลคติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.
- ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์. 2550. ศึกษาการหาสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลคติก. มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์.
- นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2548. จุลชีววิทยาทั่วไป. กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- นวลจิรา ภัทรรังรอง. 2538. โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- นิอร โฉมศรี. 2555. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: เชียงใหม่ปรีนติ้งการพิมพ์.
- พัชรวรรณ รัตนอุบล. 2552. การรอดชีวิตของโปรไบโอติกโดยใช้สารพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์ชีนไบโอติก. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ภัทรพล จันทราภรณ์. 2543. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคทีเรียโอซินโดยเชื้อ *Lactobacillus.casei* ssp. *Rhamnosus* SN11 ที่ถูกตรึง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- มาโนชญ์ สุธีวัฒนานนท์ และสุรลักษณ์ รอดทอง. 2550. ศึกษาการพัฒนาระบบการผลิต CLA ต้นแบบด้วยแบคทีเรียแลคติกใช้ในทางอุตสาหกรรม. สาขาเทคโนโลยีการอาหาร สำนักวิชาการเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยสุรนารี.
- วราวุฒิ ครุสง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พรีนติ้งเฮาส์.
- วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. อาหารพื้นเมือง. ใน ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจุลินทรีย์. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- ศศิวิมล ชื่นอิม และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2548. การใช้ประโยชน์และการตรวจหาแบคทีเรียแลคติกในอาหาร. วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 23(1) : 88-101.
- สมณฑา วัฒนศิลป์. 2545. จุลชีววิทยาทางอาหาร. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

- สถาบันมาตรฐานฮาลาลแห่งประเทศไทย. 2551. **คู่มือแนะนำฮาลาล – ฮารอม**. สถาบันมาตรฐาน  
แห่งประเทศไทย.
- อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2554. **การศึกษาสูตรและกระบวนการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+)**. รายงาน  
การวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.
- Alonso, L., Cuesta, E. P. and Gilliland, S. E. 2003. Production of free linoleic acid by  
*Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*. Of human intestinal  
original. Journal. of Dairy Science 86 : 1941-1946.
- Akerberg, C., Hofwendahl, K., Hahn-Hagerdal, B., and Zacchi, G. 1998. Modelling the  
Influence of pH, Temperature, Glucose and Lactic acid Concentrations on  
the Kinetics of Lactic Acid Production by *Lactococcus lactis* ssp. Lactis  
ATCC 19435 in Whole-wheat Flour. Applied Microbiology and Biotechnology.  
49 : 682-690.
- Aspmo, S.I., Horn, S.J. and Eijsink, V.G.H. 2005. Use of Hydrolysates from Cold (Gad  
us Morhua) Viscera as Complex Nitrogen source for Lactic Acid Bacteria.  
FEMS Microbiology Letters. 248 : 65-68.
- Axelsson, L.T. 1993. Lactic Acid Bacteria : classification and physiology. In Lactic Acid  
Bacteria. (ed. Salminen, S. and Wright, A.V.) New York : Marcel Dekk. 1-64.
- Beatriz, R., Ana B.M., Jose, M.D. and Juan C.P. 2004. Development of Culture  
Media Containing Spent Yeast Cells of *Debaryomyces hansenii* and Corn  
steep Liqueor for Lactic Acid Production with *Lactobacillus rhamnosus*.  
International Journal of Food Microbiology. 8 : 1894-1899.
- Calderon, J, Nararro ME, Jimenez-Caydevill ME, and Santos-MA. 2001. **Eyposure to aesenlc  
and lend and neuropsychological development in Mexican Children**. Environ.  
Ren, (sec. A) 85 : 69-76.
- Cho, Yun-Kyung. 1995. **Optimization of medium components for lactic production**.  
Kor Journal. Apply Microbial Biotechnol. 23 : 12-18.
- De Man, J. C., Rogosa M. and Sharpe M. Elisabeth. 1960. **Medium for cultivation of  
lactobacilli**. Journal Apply Bacterial. 23 : 130-135.
- Gao. M.T., Kaneko, M., Hirata, E. and Hano, T. 2008. **Utilization of Rice Bran as Nutrient  
Source Fermentative lactic Acid Production**. Bioresource Technology. 99 :  
3659-3664.
- Ghasemi, Mostafa. 2009. **Effect of different media on production of lactic acid from  
whey By *Lactobacills bulgaricus***. Afr. Journal Biotechnol. 8 : 81-84.

- Ha PK, Benoit NE, Yocnem R, Sciubba J, Zahurak M, and Sidransky D. 2003. **A transcriptional progression model for head and neck cancer.** Clin Cancer Res. 9 : 3058-3064.
- Qian Qian Wu, Hyun Ju You, Hyung Jin Ahn, Bin Kwon, and Geun Eog Ji. 2012. **Changes in growth and survival of *Bifidobacterium* by coculture with *Propionibacterium* in soy milk, cow's milk, and modified MRS medium.** International Journal of food Microbiology 157(1) : 65-72.
- Roy, Denis, Jacques Goulet, and Anh Le Duy. 1987. **Continuous of lactic for whey permeate By free and calcium alginate entrapped *Lactobacillus helveicus*.** Journal Dairy Sci. 70 : 506-513.
- Salminen, S and Wright, A. V. 1993. **Lactic acid bacteria.** New York : Marcel Dekker Inc.
- Stiles, M.E. and Hasting, J. W. 1991. **Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria: Potential for Use in Meat Preservation.** Trends in Food Science and Technology. 2: 247-251.
- Tammiune, A.Y. and Robinson, R.K. 1988. **Tecnology of thermophilic fermented milk.** Bulletin of the International Dairy Federation (IDF). 227 : 82-95.
- Toit, M., Franz, C.M.A., Dick, L.M.T., Schillinger, U., Haberer, P., Warlies, B., Ahrens, F. and Holzapfel, W.H. 1998. **Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminary minipig feeding trial and their effect on serum cholesterol levels faeces moisture content.** Journal. Food Microbiol. 40 : 93-104.



ภาคผนวก ก.  
อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. De Man Rogosa Sharpe agar (MRS)

ส่วนประกอบ / สารเคมี

Meat extract	10	g
Peptone	10	g
Glucose	20	g
Yeast extract	4	g
Sodium acetate trihydrate	5	g
Tween 80	1	ml
Dipotassium hydrogen phosphate	2	g
Diammonium citrate	2	
Magnesium sulfate heptahydrate (MgSO <sub>4</sub> )	0.2	g
Manganese sulfate tetrahydrate (MnSO <sub>4</sub> )	0.05	g

วิธีการเตรียม

1. ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นที่ปลอดเชื้อ 1000 ml
2. หลอมละลายโดยใช้ความร้อนและนำไปฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ 121° C ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
3. การเก็บรักษา: เก็บในตู้เย็น

2. 0.85% NaCl solution

ส่วนประกอบ / สารเคมี

Sodium chloride (NaCl)	8.5	g
Distilled water	1,000	ml

วิธีการเตรียม

1. ละลายส่วนผสมในขวดน้ำกลั่น
2. บรรจุใส่ในขวดฝาเกลียว ติดฉลากแสดงชื่อ วันที่เตรียม และวันหมดอายุ
3. นำไปฆ่าเชื้อใน Autoclave อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. การเก็บรักษา : การเก็บในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ

## 3. 0.5 Mcfarland standard

## วิธีการเตรียม

1. ใช้ 1.175% Barium chloride ปริมาตร 0.5 ml ผสมกับ 1% Sulfuric acid ปริมาตร 99.5 ml
2. จากนั้นใส่ในหลอดฝาเกลียว เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง



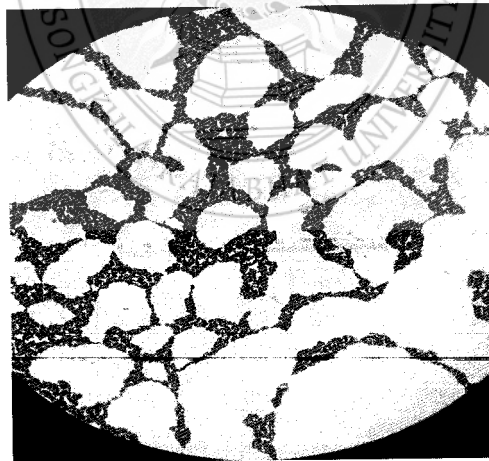


ภาคผนวก ข.

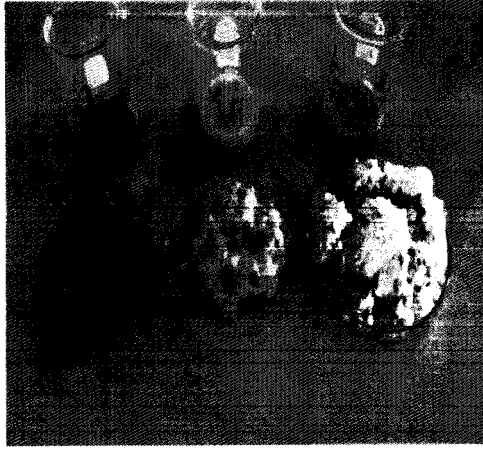
การเพาะเลี้ยง *L. plantarum* TISTR 541



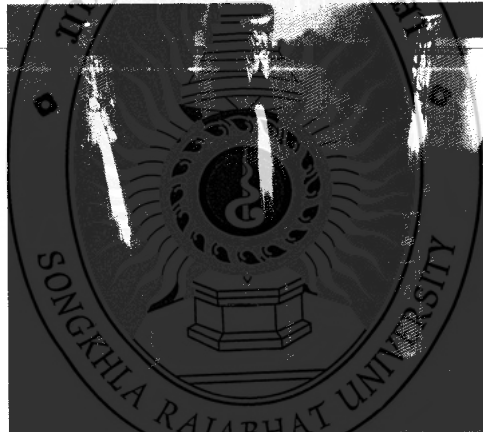
ภาพที่ 1 การเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS



ภาพที่ 2 ลักษณะรูปร่างและการจัดเรียงตัวของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า



ภาพที่ 3 ส่วนผสมที่เป็นแก้วเหลือง เนื้อไก่ และเนื้อปลา



ภาพที่ 4 อาหาร MRS สูตรดัดแปลงบดให้ละเอียดขยำเอาเฉพาะน้ำ



**ประวัติย่อผู้ทำวิจัย**

## ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ - สกุล	นางสาว มณีนุช จงไกรจักร
วันเดือนปีเกิด	21 กรกฎาคม 2535
สถานที่เกิด	อำเภอ เชียงใหญ่ จังหวัด นครศรีธรรมราช
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	37 หมู่ 7 ตำบล เขาพระบาท อำเภอ เชียงใหญ่ จังหวัด นครศรีธรรมราช 80190
ประวัติการศึกษา	<p>พ.ศ. 2547 ชั้นประถมศึกษา โรงเรียนวัดแดง</p> <p>พ.ศ. 2550 ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียน เชียงใหญ่</p> <p>พ.ศ. 2554 ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียน เชียงใหญ่</p> <p>พ.ศ. 2558 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา</p>



## ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อสกุล	นายอดิเรก คลองรั้ว
วันเดือนปีเกิด	12 มิถุนายน 2535
สถานที่เกิด	อำเภอเหนือคลอง จังหวัดกระบี่
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	58 หมู่ 6 ตำบลเกาะศรีบอยา อำเภอเหนือคลอง จังหวัดกระบี่ 81130
ประวัติการศึกษา	<p>พ.ศ. 2547 ชั้นประถมศึกษา โรงเรียนบ้านเกาะศรีบอยา</p> <p>พ.ศ. 2550 ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนอุทยานศึกษาระบี่</p> <p>พ.ศ. 2554 ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอุทยานศึกษาระบี่</p> <p>พ.ศ. 2558 วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์          แขนงวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี          มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา</p>

