การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง

Cultivation of a Lactic Acid Bacteria on Modified MRS Medium

มณีนุช จงไกรจักร

อดิเรก คลองรั้ว

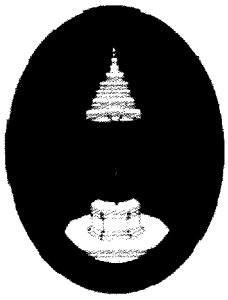
รายงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม

หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา (Microbiology)

คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

2558



ใบรับรองงานวิจัย
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต
โปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์

ชื่อเรื่องงานวิจัย การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง

ชื่อผู้ทำวิจัย นางสาวมณีนุช จงไกรจักร
นายอดิเรก คลองรั้ว

คณะกรรมการสอบโครงการวิจัย

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์สัลวา ตอปี)

.....กรรมการสอบ
(ดร. สายใจ วัฒนเสน)

.....กรรมการสอบ
(อาจารย์วาสนา มู่สา)

คณะกรรมการประจำสาขาวิชารับรองแล้ว

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

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

เมื่อวันที่..... เดือน..... พ.ศ.....

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

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

บทคัดย่อ

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

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

เลข Bib# 113712
3 ก.ย. 2559
5 ต.ค.2
ม.ทักษิณ

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาและจัดทำโครงการวิจัยครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีต้องขอขอบพระคุณ อาจารย์สัลวา ตอปี อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่กรุณาเสียสละเวลาและให้คำปรึกษาแนะนำแนวทาง วิธีการและขั้นตอนการศึกษา ตลอดจนการตรวจทานแก้ไขงานวิจัยนี้จนมีความถูกต้องสมบูรณ์ ทำให้งานวิจัยชิ้นนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีรวมถึงอาจารย์ประโปรแกรมวิชาจุลชีววิทยาที่ให้คำแนะนำเอื้อเฟื้อข้อมูล ผู้ทำวิจัยจึงขอขอบพระคุณอาจารย์ทุกท่านเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่คอยอุปถัมภ์ในเรื่องกำลังทรัพย์และคอยให้กำลังใจตลอดมา ขอบคุณเพื่อนๆ นักศึกษาโปรแกรมวิชาชีววิทยาและชีววิทยาประยุกต์รวมถึงเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ คุณปริญญา ทับเที่ยง คุณสุไวดา สัสดี และคุณอาซือนะ บูเก๊ะเจ๊ะลี ที่ช่วยเหลือในการดำเนินงาน และความสะดวกตลอดมา ทำให้ผู้วิจัยมีความมานะที่จะให้ผลงานออกมาดีที่สุดและสุดท้ายนี้ขอขอบคุณท่านที่มีรายนามในบรรณนุกรมทุกท่าน สำนักวิทยาบริการมหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา ที่เอื้อเฟื้อข้อมูลและสถานที่ในการตรวจสอบเอกสารการทำวิจัยครั้งนี้ให้ลุล่วงได้ด้วยดี

มณีนุช จงไกรจักร
อดิเรก คลองรั้ว

สารบัญ

		หน้า
	บทคัดย่อ	(ก)
	กิตติกรรมประกาศ	(ข)
	สารบัญ	(ค)
	สารบัญตาราง	(ง)
	สารบัญภาพ	(จ)
บทที่1	**บทนำ**	**1**
	ที่มาและความสำคัญ	1
	วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
	ขอบเขตของการวิจัย	2
	ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่2	**เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง**	**3**
	แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก	3
	งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	13
บทที่ 3	**วิธีการดำเนินการวิจัย**	**17**
	วัสดุและอุปกรณ์	17
	วิธีการดำเนินการวิจัย	18
บทที่ 4	**ผลการวิจัยและอภิปรายผลการวิจัย**	**21**
	การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS สูตรดัดแปลง	21
	เปรียบเทียบการเจริญแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ระหว่างอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่ผ่านการคัดเลือกและอาหาร MRS สูตรมาตรฐาน	23
บทที่ 5	**สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ**	**27**
	สรุปผลการวิจัย	27
	ข้อเสนอแนะ	27
	เอกสารอ้างอิง	**28**
	ภาคผนวก	**32**
	ประวัติย่อของผู้วิจัย	**36**

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

สารบัญตาราง

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

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

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 *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐาน และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงสูตรที่ 1 (ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	24
4.3	ค่า pH ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลือง เป็นส่วนผสม เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง	26

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ปัจจุบันอาหารฮาลาล (Halal Food) เป็นเรื่องที่ได้รับการสนใจอย่างมากจากสังคมไทยมิใช่เพียงแต่ชาวไทยมุสลิมที่จำเป็นต้องบริโภคอาหารฮาลาลเท่านั้น ผู้ประกอบการซึ่งต้องผลิตอาหารฮาลาลจำหน่ายแก่ผู้บริโภคมุสลิมในประเทศไทยและเพื่อส่งออกแก่ตลาดโลกมุสลิมซึ่งมีผู้บริโภค 2000 ล้านคน จึงจำเป็นต้องให้ความสนใจอย่างจริงจังและดำเนินกระบวนการผลิตอาหารฮาลาลให้ถูกต้องตามบัญญัติศาสนาอิสลามและระเบียบกรรมการกลางแห่งประเทศไทยประกอบกับประเทศไทยเป็นแหล่งผลิตอาหารและส่งออกสินค้าเกษตรที่สำคัญของโลก อาหารฮาลาลจึงเป็นช่องทางทางการตลาด รัฐบาลจึงมีนโยบายส่งเสริมอุตสาหกรรมอาหารฮาลาลเพื่อการส่งออกโดยปฏิบัติอย่างจริงจังทั้งในด้านการพัฒนาวัตถุดิบ การส่งเสริมผู้ประกอบการแสวงหาตลาดและการพัฒนากลไกการรับรองมาตรฐานอาหารฮาลาลให้เป็นที่น่าเชื่อถือและเป็นที่ยอมรับของผู้บริโภคทั้งในประเทศและต่างประเทศ (สถาบันมาตรฐานฮาลาลแห่งประเทศไทย, 2551) โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในทางอุตสาหกรรม เช่น โยเกริ์ต นมเปรี้ยว และเนยแข็ง เป็นต้น ซึ่งผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีการนำแบคทีเรียที่มีความเกี่ยวข้องมาเพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็นหัวเชื้อให้มีปริมาณมากเพียงพอต่อการนำไปใช้ในทางอุตสาหกรรม ซึ่งต้องเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS โดยเป็นอาหารที่จำเพาะสำหรับเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกแต่เนื่องจากปัจจุบันอาหาร MRS ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงหัวเชื้อเป็นผลิตภัณฑ์ทางอุตสาหกรรมมีส่วนผสมของ Meat extract เป็นแหล่งไนโตรเจนของแบคทีเรียแลคติก ซึ่งอาจจะมีเนื้อหมูเป็นส่วนผสมทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากการหมักของแบคทีเรียแลคติกที่ได้มีการปนเปื้อนของเนื้อหมู ส่งผลให้ไม่เกิดการยอมรับทางศาสนาอิสลามจัดเป็นสิ่งฮารอม ผู้ที่บริโภคอาหารดังกล่าวเข้าไปทำให้ผิดหลักศาสนา โดยมีการทดลองใช้น้ำแช่ข้าวโพดเป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 โดยมีองค์ประกอบของสูตรคือ กลูโคส 118.20 g/L. กากน้ำตาล 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) ดั้งนั้นจากผลการทดลองข้างต้น จึงบ่งชี้ได้ว่าสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนชนิดอื่นได้นอกเหนือจากการใช้ Meat extract เป็นแหล่งไนโตรเจนสำหรับแบคทีเรียแลคติกและนอกจากนี้ความปลอดภัยของอาหารเป็นเรื่องสำคัญสำหรับผู้ผลิตอาหารและผู้ที่เกี่ยวข้องกับการออกกฎหมายเพื่อคุ้มครองผู้บริโภคให้ได้รับอาหารที่ปลอดภัย 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 สมมตติฐาน

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 สูตรมาตรฐานและอาหร MRS สูตรดัดแปลงที่ผ่านการคัดเลือก

ตัวแปรต้น : อาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีส่วนผสมของถั่วเหลือง เนื้อปลาและเนื้อไก่

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

ตัวแปรควบคุม : ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น ส่วนผสมของอาหาร ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิของการเพาะเลี้ยง ระยะเวลาในการทดลองและอัตราการเขย่าของอาหาร MRS

สถานที่ทำการวิจัย

ณ ห้องปฏิบัติการชีววิทยาและชีวิทยาประยุกต์ ศูนย์วิทยาศาสตร์ และอาคารปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

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 ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส (Axelsson, 1993) สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต จะได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลโดยได้จากกระบวนการ Substrate - Level Phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการไพริมิดีน (Pyrimidine) เพปโตน (Peptone) แมงกานีส (Manganese) อะซิเตด (Acetate) และทวีน 80 (Tween80) เป็นต้น

แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่มีออกซิเจน (Aerobe) ไม่มีออกซิเจน (Anaerobe) และมีออกซิเจนน้อย (Microaerophilic) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53° C อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40° C ช่วงพีเอชที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (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 *Streptococcu , Lactobacillus* และยีสต์ มีจำนวน 10^1-10^2 CFU/ml แต่บริเวณลำไส้เล็กส่วนปลาย (Ileum) จะมีจุลินทรีย์10^6-10^8 CFU/ml โดยเป็นแบคทีเรีย Family *Enterobacteriaceae* และ *Bacteriodes* เด็กทารกหลังจากคลอดได้ไม่กี่ชั่วโมงสามารถพบNormal flora ที่ผิวหนัง เช่น *Streptococcus* และ *Corynebacterium* เป็นต้นและแบคทีเรียแกรมบวกอื่นๆ เช่น *Bifidobacterium, Lactobacillus* และ *Streptococcus* เมื่อเวลาผ่านไป Normal flora จะเปลี่ยนแปลงไป คือ ในลำไส้ของผู้ใหญ่เป็นสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน (Anaerobe condition) ได้แก่ *Bacteroides, Clostridium, Peptostreptococcus, Bifidobacterium* และ *Eubacterium* เป็นต้น โดยมีจำนวนมากกว่ากลุ่มที่ต้องการออกซิเจน (Aerobe) ในอัตราส่วน 1,000:1 แบคทีเรียในกลุ่มที่ต้องการออกซิเจน ได้แก่ *Escherichia coli* สมาชิกอื่นๆ ใน Family *Enterbacteriaceae, Enterococcus* และ *Streptococcus* จำนวนแบคทีเรียต่อกรัมของอุจาระที่อยู่ในลำไส้จะเพิ่มมาก

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

2.1.2 การจำแนกแบคทีเรียแลคติก

แบคทีเรียแลคติกจำแนกได้ดังนี้ (Axelsson, 1993)

1) การจำแนกในระดับจีนัส

เป็นการจำแนกแบคทีเรียแลคติกโดยศึกษารูปร่าง เช่น รูปกลม และรูปแท่ง เป็นต้น การเรียงตัว เช่น คู่สี่ โซ่ และคู่ การหมักน้ำตาลกลูโคส (Glucose fermentation) มี 2 แบบ คือ Homofermentation และ Heterofermantation การสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ การเติบโตที่อุณหภูมิ 10° C และ 45° C การสร้างไอโซเมอร์ของกรดแลคติกในระหว่างการหมักน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีทั้งแบบ 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 การไฮโดรไลซิสอาร์จีนีน (Arginine) การสร้างอะซิโตน (Acetone) การทนต่อเกลือน้ำดี ชนิดการแตกตัวของเม็ดเลือดแดง (Hemolysis) การสร้าง Axtracellular polysaccharide การสร้างเอนไซม์ β - galactosidase และ β - glucuronidase การศึกษาทางซีรัม (Serological typing) การศึกษาส่วนประกอบของกรดไขมัน Electrophoresis ของ Lactate dehydrogenase (LDH) และการศึกษาสัดส่วน G+C content เป็นต้น

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

- เชื้อรูปร่างแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus, Bifidobacterium* และ *Carnobacterium*
- เชื้อรูปร่างกลมโดยมีการแบ่งเซลล์ 2 ระนาบเป็น 4 เซลล์ ได้แก่ *Aerococcu, Tetratencoccus* และ*Pediococcus*
- เชื้อรูปร่างกลมเป็นคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptrococcus, Entrococcus, Lactococcus, Vagococcus,* และ *Leuconostoc* แบคทีเรียแลคติกสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก (สุมณฑา 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 เอธานอล 20-25% โดยผ่าน Phosphoglyconate pathway หรือ Phosphoketolase ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus casei, Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacills brevis*

แบคทีเรียแลคติกได้รับการยอมรับว่าเป็นแบคทีเรียที่ปลอดภัย (Generally recognized as safe bacteria; GRAS status) และมักใช้ในการหมักอาหารและถนอมอาหาร ซึ่งอาจจะหมักตามธรรมชาติโดยใช้แบคทีเรียแลคติกที่มีอยู่ในวัตถุดิบหรืออาจเติมแบคทีเรียแลคติกในรูปเชื้อตั้งต้น (Starter culture) เติมลงในอาหารภายใต้การควบคุม ตัวอย่างของจีนัสที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในกระบวนการหมักผลิตภัณฑ์นมเนื้อ และผัก ได้แก่ *Lactococcus, Staptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactobacillus* และ *Carnobacterium* (ศศิวิมล ชื่นอิ่ม และอดิศร เสวตวิวัฒน์, 2548)

2.1.3 กลุ่มแบคทีเรียแลคติก

1) *Lactobacillus*

เซลล์รูปร่างท่อนยาว ท่อนสั้น คอคโคบาซิลไล (Coccobacilli) มักเรียงตัวเป็นสาย ติดสีแกรมบวกและจะติดสีแกรมลบเมื่ออายุมากขึ้นและอยู่ในสภาพที่เป็นกรดเป็นพวกที่ทนกรด (Aciduric) พีเอชที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต 5.5-6.2 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือด่าง เป็นพวกต้องการออกซิเจนน้อย (Microaeropili) การสร้างสารสีพบได้น้อยมาก ถ้าพบก็จะมีสีเหลืองส้มจนถึงสีแดงอิฐ 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 แคลเซียมเพนโตทิเนต (Calciumpentinate) 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 กรดเพนโททินิก (Pentotinic acid) และ ไนอะซิน (Niacin) บางสายพันธุ์ต้องการไรโบฟลาวิน (Riboflavin) กรดโฟลิก (Folic acid) วิตามิน บี12 (Vitamin B12) และไทอะมีน (Thiamine) และไม่ต้องการไทอะมีน (Thiamin) 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 ต้องการแคลเซียมเพนโตทิเนต (Calciumpentotinate) ไนอะซิน (Niacin) ในการเจริญเติบโต แยกได้จากผลิตภัณฑ์นม ผักดอง ผลิตภัณฑ์มะเขือเทศเน่าเสีย ช่องปากและอุจจาระคน

- *Lactobacillus casei*

เซลล์รูปร่างท่อน ขนาด 0.7-1.1x2.0-4.0 ไมโครเมตร ต้องการสารเร่งการเจริญเติบโต เช่น ไรโบฟลาวิน (Ribofravin) กรดโฟลิก (Folic acid) แคลเซียมแพนโททิเนต (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 fermantum*

เซลล์เป็นรูปท่อนขนาด 0.5-0.9 ไมโครเมตร มักอยู่เดี่ยวๆหรือเรียงตัวเป็นคู่ ต้องการแคลเซียมเพนโททิเนต (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 ต้องการแคลเซียมเพนโททิเนต (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) และบริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (Facultative anaerobe) ทำให้เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติกไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเลี้ยงในอาหารจะเจริญตามรอยแทง (Steb) และเติบโตบริเวณผิวอาหารเล็กน้อย ในอาหารเหลวเติบโตสม่ำเสมอทั่วหลอด ไม่ทำให้เกิดโรคในพืชหรือสัตว์ มักพบในอาหารหมัก ไม่ค่อยพบในนม และผลิตภัณฑ์นม (วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล, 2536)

- *Pediococcus pentosaceus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรีมีขนาด 0.8-1.0 ไมโครเมตร เมื่อเติบโตบนอาหารกลูโคส(Glucose) เพปโตน (Peptone) และยีสต์เอ็กแทกซ์ (Yeast etract) โคโลนีมีสีขาวขนาดเล็กมาก ต้องการกรดอะมิโน

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

- *Pediococcus acidilactici*

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

- *Pediococcus halophius*

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 ซีอิ้ว 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) อาร์จีนีน (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. *diacetyllactis*

ลักษณะโดยทั่วไปเหมือน *S. lactis* แต่ *S. lactis* สายพันธุ์นี้สามารถหมักซิเตรต (Citrate) ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (Cabon dixide) อะซิโตอิน (Acitoin) และไดอะซิทิล (Diactetyl)

- *Streptococcus thermophis*

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 (Fermantation)

เป็นกระบวนการย่อยสลายสารอินทรีย์ในสภาพที่ไม่มีอากาศ และใช้สารอินทรีย์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแทนออกซิเจนผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักสภาพรีดิวซ์ และออกซิไดซ์ สำหรับผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End product) ที่ได้จากการหมักคาร์โบไฮเดรตจะเป็นสารอะไรนั้นขึ้นอยู่กับปัจจัยสำคัญ คือ ชนิดของเชื้อ ชนิดของคาร์โบไอเดรต และสภาวะการเลี้ยง เช่น อุณหภูมิ เวลา และความเป็นกรดด่าง โดยทั่วไปผลิตภัณฑ์สุดท้าย (End product) ที่ได้จากการหมักคาร์โบไฮเดรตและแอลกอฮอล์อาจจะมีก๊าซไฮโดรเจน (H_2) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) 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 :

$$\text{glucose } 2 \rightarrow \text{ethanol} + CO_2$$

2) กระบวนการหมักกรดพิโอนิก (Propionic acid fermentation)

แบคทีเรียกลุ่มนี้ การเจริญต้องการสภาพที่ไม่มีออกซิเจน (Anae robe) สุดท้ายจะได้กรดโพรพิโอนิก (Propionic acid) คาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2)

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) แตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อ เช่น กรดอะซิติก (Acetic acid) กรดฟอร์มิก (Formic acid) กรดบิวทิก (Butyric acid) บิวทิลแอลกอฮอล์

(Butyl alcohol) อะซีโตน (Acetone) ไอโซโพรพิว แอลกอฮอล์ (Isoproprl alcohol) และจะมีก๊าซคาร์บอนไดออกไซน์ (CO_2) กับก๊าซไฮโดรเจน (H_2) เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก แต่ที่สำคัญจะไม่มีกรดแลคติก (Lactic acid)

5) กระบวนการหมักกรดแลคติก (Lactic acid fermentation)

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

- Homofermentation

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

กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ถูกเติมฟอสฟอรัส และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (Aldolase) จะเข้าทำปฏิกิริยา เป็นผลให้โมเลกุลกลูโคสแตกออกเป็นกลีเซอรัส-3-ฟอสเฟต (ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรรูเวต (Pyruvate) โดยเกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุลจากการหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เนื่องจากมีการเติมฟอสฟอรัสให้แก่สารตั้งต้น 2 แห่ง ในขั้นสุดท้ายเป็นเป็นการรีดิวซ์ไพรูเวตเป็นแลคเตท ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้ NAD^+ กลับคืนมาจากที่ถูกใช้ไปในการออกซิเดชั่นกลีเซอรัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต

- Heterofermentation หรือ Mixed acid fermentation

เป็นการหมักกลูโคสซึ่งให้ผลผลิตหลายชนิด คือ เอทิลแอลกอฮอล์ กรดอะซิติก 20-25% กรดแลคติก50% และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 20-25% โดยผ่าน Heterofermentation bacteria เช่น *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด

กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมเปลี่ยนเป็นเพนโทส (ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการจัดโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชั่น (Oxidation) และดีคาร์บอกซิเลชั่น (Decaboxylation) ร่วมด้วย น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรัสดีไฮด์ฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม และอะซิทิลฟอตเฟต (Acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase enzyme) กลีเซอรัสดีไฮด์ฟอสเฟต (Glyceroldehyde homofermentation) จะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท (Lactate) เช่นดียวกับการเกิดไกลโคไลซิสในการหมักแบบ Homofermentation แต่เนื่องจากการหมักแบบ Heterofermentation มีกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1 โมเลกุลจึงเกิด ATP 1 โมเลกุล

ในอนาคตของอะเซทติลฟอสเฟต ขึ้นอยู่กับว่าสารที่ทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนอยู่ด้วยหรือไม่ ในสภาวะที่ขาดตัวรับอิเล็คตรอนอะเซทติลฟอสเฟตจะทำหน้าที่นี้เสียเองทำให้ถูกรีดิวซ์เป็นเอทานอลได้เป็น NAD^+ ขึ้นมาใหม่ 2 โมเลกุลจากเอนไซม์ NADH แต่ในสภาวะที่มีออกซิเจน NAD^+สามารถสร้างขึ้นใหม่จากเอนไซม์เอ็นเอดีเอช ออกซิเดส (NADH oxidase) และเพอรอกซิเดส (Peroxidase) ปล่อยอะเซทติลฟอสเฟตที่มีมากพอไปเป็นอะซิเตทจึงเท่ากับการเติมฟอสเฟตให้กับซับเตรตอีกทางหนึ่ง เป็นผลให้ได้ ATP เพิ่มขึ้นมาอีก 1 โมเลกุลเป็น 2 โมเลกุลจากกลูโคส 1โมเลกุล เช่นเดียวกับการหมักแบบ Homofermentation

ในกรณีที่มีการเพิ่มขึ้นของ ATP สะท้อนให้เห็นจากอัตราการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่เป็นไปอย่างรวดเร็ว ผลเช่นเดียวกันนี้สามารถเกิดขึ้นกับตัวรับออกซิเจนอื่นๆด้วย เช่น ฟรุกโตส (Fructose) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์เป็นแมนิทอล (Mannitol)

การระบุว่าการหมักแบบ Heterofermentative หรือไม่อาศัยการชี้บ่งด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่เกิดขึ้น Lactobacilli ทำให้เกิดการหมักแบบ Heterofermentation บางชนิดไม่ทนกรด ถูกนำมารวมไว้ในสกุลใหม่คือ *Carnobaccterium*

2.1.5 ความต้องการของสารอาหารของแบคทีเรียแลคติก

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

1) แหล่งไนโตรเจน

แหล่งไนโตรเจนเป็นธาตุที่มีความสำคัญอันดับสองรองจากคาร์บอน แบคทีเรียแลคติกต้องการแหล่งไนโตรเจนในการสร้างเซลล์ การสืบพันธุ์ และในกระบวนการเมตาบอลิซึมต่างๆ ซึ่งแหล่งโปรตีนที่นิยมใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก ในสูตรอาหารต่างๆ คือสารสกัดจากยีสต์ (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 ทำให้แบคทีเรียแลคติกเจริญได้ดีสูงสุด แต่การใช้แอมโมเนียมซัลเฟตเป็นแหล่งไนโตรเจนชนิดเดียวนั้นจะให้ปริมาณการเจริญของแบคทีเรียแลคติกต่ำที่สุด 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)** เป็นแหล่งของเหลือจากอุตสาหกรรมการทำน้ำมันถั่วเหลืองโดยได้หลังจากหีบเอาน้ำมันออกแล้วจะเหลือเป็นกากถั่วเหลืองป่น กากถั่วเหลืองที่ได้ยังมีสารอาหารอยู่หลายชนิดทั้งโปรตีน กรดอะมิโน วิตามินและเกลือแร่

- **น้ำแช่ข้าวโพด (Corn steep liquor)** เป็นวัตถุดิบเหลือทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม เช่น ข้าวโพดกระป๋อง ซุปข้าวโพด 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 และอาหารสูตรใหม่นี้มีราคาถูกลง

- **โปรตีนสกัดจากเศษเหลือของปลา (Fish hydrolysate)** เป็นแหล่งไนโตรเจนที่ได้จากการสกัดน้ำต้มปลาซึ่งเป็นของเหลือจากโรงงานอุตสาหกรรมปลากระป๋อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในประเทศไทยมีโรงงานปลากระป๋องทั้งปลาซาร์ดีนและปลาทูน่าอยู่เป็นจำนวนมาก เศษเหลือเหล่านี้จะเป็นส่วนหนึ่งของเครื่องในปลาและเศษเหลือส่วนต่างๆ ซึ่งผ่านการย่อยด้วยความร้อนและเอนไซม์ และระเหยจนเข้มข้นเรียกว่า Fish hydrolysate ซึ่งมีโปรตีนสูงเหมาะสำหรับใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ โดย Aspmo และคณะ (2005) ได้นำโปรตีนที่สกัดที่ได้จากการนำเครื่องในปลาที่ผ่านการไฮโดรไลซ์ด้วยเอนไซม์มาใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทน 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) กรดโฟริก (Folic acid : B9) ไซยาโนโคบาลามีน (Cyanocobalamine: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 (Ribroflavin) และโฟลินิก (Folinic)

3) คาร์โบไฮเดรต

แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้น้ำตาลได้หลายประเภทจากโมโนแซคคาร์ไรด์ (Monosaccharide) ประเภทน้ำตาลเพนโทส (Pentose) เช่น อะราบิโนส (Arabinose) ไรโบส (Ribose) และไซโลส (Xylose) เป็นต้น และน้ำตาลเฮกโซส (Hexose) เช่น ฟรุกโตส (Fructose) และเมนโนส (Mannose) ไดแซคคาร์ไรด์ (Disaccharide) เช่น มอลโทส (Maltose) ไตรแซคคาร์ไรด์ (Trisaccheride) เช่น มอลโทไตรโอส (Maltotriose) โพลิเมอร์ (Polymer) เช่น แป้ง (Starch)

นอกจากนี้แบคทีเรียแลคติกสามารถใช้คาร์โบไฮเดรตพวกโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (Oligosaccharide) เช่น ราฟิโนส (Raffinose) และฟรุกโตโอลิโกแซคคาร์ไรด์ (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, Lactobacills 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. themophilus* ในขณะที่ *Lb. bulgaricus* ที่ช่วยสร้างสารให้กลิ่น และรสชาติ (Acetaldehyde) สามารถทนต่อค่าพีเอชที่ต่ำได้ถึง 3.5-3.8 ผลิตภัณฑ์หลังการหมักด้วยแบคทีเรียทั้งสองมีปริมาณกรดทั้งหมดอยู่ระหว่าง 0.90-0.95% และมีปริมาณจุลินทรีย์เพิ่มมากกว่า108 CFU/ml (นิอร โฉมศรี, 2555)

3) บีทาเก้น เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการนำน้ำนมมาผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อในระบบพาสเจอร์ไรส์และนำมาหมักด้วยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ (แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก) ในสภาวะอุณหภูมิที่เหมาะสม โดยจุลินทรีย์กลุ่มนี้จะทำการย่อยน้ำตาลแลคโตสในนมให้เป็นกรดแลคติกที่มีรสเปรี้ยวและมีกลิ่นหอมเฉพาะตัว เมื่อได้รสชาติ กลิ่น และรสตามที่ต้องการแล้ว จะมีการปรุงแต่งสี กลิ่น รส เพื่อให้สามารถบริโภคได้ง่ายขึ้น หลังจากนั้นดำเนินการบรรจุลงบรรจุภัณฑ์โดยวิธีปลอดเชื้อ (Aseptic filling) ซึ่งหมายถึงผลิตภัณฑ์นมหมักนี้ยังคงมีเชื้อแบคทีเรียที่ดีที่มีประโยชน์ต่อร่างกาย ดังนั้นเมื่อดื่มเข้าไปในร่างกายแล้วจะได้รับสารอาหารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในนมหมักและยังได้รับแบคทีเรียที่มีประโยชน์นี้เข้าไปในร่างกายด้วย (วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต, 2532)

4) ยาคูลท์ เป็นนมหมักอีกประเภทหนึ่งของชาวญี่ปุ่นใช้เชื้อ *Lactobacillus casei* ผลจากหางนมที่เติมกลูโคสและสาร่าย *Chlorella* ละลายในน้ำร้อน กรอง ฆ่าเชื้อและเติม *L. casei* หมักที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 4 วัน มีปริมาณของแข็งในนมต่ำกว่านมทั่วไป คือ มีโปรตีน 1.2 % น้ำตาลแลกโตส 1.1% และไขมัน 1.1% ดังนั้นจึงมีการเติมแซคคาไรด์อื่นๆจนทำให้ปริมาณของแข็งในนมเพิ่มขึ้นเป็น 14.1% จะทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติทางประสาทสัมผัสที่ดี (Tamime and Robinson, 1988) ดังนั้นผู้ที่ดื่มยาคูลท์เป็นประจำจะมี *L.casei* ในอุจจาระเพิ่มขึ้น และมีจำนวน *E. coli* ลดลง ยังมีความต้านทานต่อโรคได้ดีกว่าผู้ที่ไม่ดื่มยาคูลท์ การผลิตยาคูลท์ในปัจจุบันได้มีการปรับปรุงโดยการเติมน้ำผักต่างๆ 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 mesenteriodes* ตัวที่ทำให้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นเสียไปคือ *Lactobacillus plantarum* ดังนั้นจึงไม่นิยมหมักไว้หลายวัน เพราะจะทำให้เนื้อสัมผัสนิ่มและมีรสเปรี้ยวมาก (สุมณฑา วัฒนศิลป์, 2545)

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไชยวัฒน์ นพเก้า (2553) ศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักดองพื้นเมืองของไทยเพื่อคัดกรองให้ได้สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยใช้อาหารแข็ง MRS ที่เติมบรอมครีเซอเพอร์เพิลสำหรับการคัดกรองในเบื้องต้น 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 ดัดแปลงจากการอาหารการหมักรดแลคติกจากงานวิจัยของ Ghasemi และคณะ (2009) จากการทดลองพบว่าเชื้อรหัส SAG303 สามารถสร้างกรดแลคติกได้สูงสุดในอาหารเหลวสำหรับการหมักสูตร 1 เท่ากับ 17.66 g/L ใช้น้ำตาลแลคโตส 19.12 g/L พบว่าอาหารสูตรที่ 1 มีแร่ธาตุอาหารมากกว่าสูตรอาหารอีก 3 สูตร โดยอาหารสูตรที่ 1และสูตรที่ 2 จะมีองค์ประกอบใกล้เคียงกันต่างกันที่อาหารสูตรที่ 2 ใช้ Yeast extract มากกว่าสูตรทั้ง3 และไม่มีการเติมแมงกานีสซัลเฟต สำหรับสูตรที่ 4 มีแร่ธาตุและสารอาหารน้อยกว่าอาหารสูตรอื่นมาก

มาโนชญ์ สุธีรวัฒนานนท์ และสุรีลักษณ์ รอดทอง (2550) ศึกษาการพัฒนาระบบการผลิต CLA ต้นแบบ ด้วยแบคทีเรียแลคติกใช้ในอุตสาหกรรมโดยแบคทีเรียแลคติกแยกได้จากกระเพาะปลาน้ำจืดเกี่ยวกับการสร้าง CLA ในเนื้อปลา และแบคทีเรียแลคติก 2 สายพันธุ์ คือ *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 และ *Lactobacillus lactic* TISTR 1401 จากกรดไขมันลิโนเลอิกบริสุทธิ์ถูกนำมาทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA จากน้ำมันดอกทานตะวันและน้ำมันถั่วเหลือง นำแบคทีเรียทั้งหมดมาเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS และศึกษาสัณฐานของเซลล์แบคทีเรีย การทดสอบความสามารถในการสร้าง CLA นำเชื้อบริสุทธิ์มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRSที่เสริมด้วยกรดไขมันลิโนเลอิกเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพื่อกระตุ้นให้เกิดการสร้างเอนไซม์ลิโนเลเอทไอโซเมอร์จนมีอายุเซลล์อยู่ในช่วง 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 จะเจริญเพิ่มจำนวนได้มากโดยพิจารณาเซลล์ที่มีชีวิตและค่าความเป็นกรดด่าง 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 และคัดเลือกเพื่อนำไปทดสอบสภาวะที่เหมาะสมในการสร้าง CLA คือ *Lactococcus lactic* TISTR 1410, N25-7 และ N25-19 โดยใช้อาหารเหลว Modified MRS เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับทดสอบ

ภัทรพล จันทราภรณ์ (2543) ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดยเชื้อ *L.casei* ssp. Rhamnosus SN11 ที่ถูกตรึง จากการทดลองได้ศึกษาการแทนแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหาร MRS ด้วยวัสดุราคาถูกและผลขององค์ประกอบอื่นๆ ต่อการผลิตแบคเทอริโอซินเพื่อเป็นการทดแทนอาหารสังเคราะห์ที่มีราคาถูก นอกจากนี้ยังอาศัยเทคนิคการตรึงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิต โดยใช้ซูโครสแทนแหล่งคาร์บอนและน้ำปลาทูนึ่งที่ผ่านการแยกไขมันและตกตะกอนโปรตีนเจือจางแทนแหล่งไนโตรเจน โดยมี pH เริ่มต้น 5.5 ซึ่งสูตรอาหารดังกล่าวส่งผลให้เชื้อมีการเจริญและสามารถผลิตแบคเทอริโอซินได้ในปริมาณเท่ากับอาหาร MRS สูตรปกติโดยวัดกิจกรรมการยับยั้งได้ 30 AU/ml. ที่ชั่วโมงที่ 24 นอกจากนี้ยังพบว่าการเลือกวิธีตรึงเชื้อ *L.casei* ssp. *Rhamnosus* SN11 โดยวิธีการดูดซับบน Sintered glasses ที่ผ่านการเคลือบด้วย Polyethynemine (PEN) สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน

ขนิษฐา ปัญญา และสุมิตรา ฤาชา (2556) ศึกษาการแยกแบคทีเรียแลคติกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจากตัวอย่างผัก ผลไม้ ธัญญพืชหมัก จำนวน 30 ตัวอย่าง โดยใช้อาหาร MRS agar ที่เติม $CaCO_3$ 1% พบเอนไซม์เคตะเลส ทั้งหมด 21 ไอโซเลท โดยมีรูปร่างกลม 12 ไอโซเลท และรูปร่างท่อน 9 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกทั้งหมดไปตรวจหาแบคเทอริโอซินที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียทดสอบ 4 ชนิด คือ *Bacillus cereus, Escherichi coli, Staphylococcus aureus* และ *Salmonella*sp. ด้วยวิธี agar welldiffusion assay พบว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท E1, E2 และ I2 มีความสามารถในการผลิตแบคเทอริโอซินยับยั้งการเจริญของ *B.cereus* ได้เมื่อจัดจำแนกสายพันธุ์แบคทีเรียแลคติกที่ผลิตแบคทีริโอซินโดยชุดทดสอบสำเร็จรูป API 50 CHL (BioMerieux) พบว่าแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท E1 และ E2 คือ *Lactobacillus acidophilus* และไอโซเลท I2 คือ *Pediococcus* sp. และจากการศึกษาคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีริโอซินที่ผลิตจากเชื้อ *Lb. acidophilus* E1 สามารถทนความร้อนได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 63 และ 80 องศาเซลเซียส มีความคงตัวในช่วง pH 5-7 ในขณะที่แบคทีริโอซินจาก *Lb. acidophilus* E2 และ *Pediococcus* sp. ไอโซเลท I2 สูญเสียความสามารถในการยับยั้ง *B. cereus* เมื่อผ่านความร้อนและการเปลี่ยนแปลงค่า pH

อาภรณ์ วงวิจารณ์ (2554) ศึกษาสูตรอาหารและกระบวนการผลิตกรดแลคติกชนิด L (+) จากกากน้ำตาลโดยใช้กระบวนการหมักแบบต่อเนื่อง จากการคัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างต่างๆได้ทั้งหมด 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 ที่เลียงเดี่ยว พบว่าเชื้อ *Bifidobacterium* และ *Propionibacterium* สามารถนำไปใช้พัฒนาผลิตภัณฑ์ของนมเปรี้ยวหรือนมถั่วเหลืองได้

Beatriz และคณะ (2004) ศึกษาการทดลองใช้น้ำแช่ข้าวโพด เป็นแหล่งไนโตรเจนในการเจริญของแบคทีเรียแลคติก *Lactobacillus rhamnosus* CGMCC 1466 โดยมีองค์ประกอบของสูตรอาหารคือ กลูโคส 118.20 g/L, กากน้ำตาล 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 ซึ่งผ่านการสกัดด้วยน้ำมาใช้ศึกษาในส่วนของการเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้สารกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของ *Lactobacillus plantarum* TISTR 875 หลังการทำแห้งได้ดีมีการลดลงของเซลล์ 0.11 log CFU/ml และจากการสกัดสารจากธัญพืชส่วนของตะกอนที่เหลือ ก็คือ ใยอาหาร (Crude fiber) นำมาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้เป็นสารตัวกลางในการพยุงเซลล์ พบว่าการเติมใยอาหาร (Crude fiber) จากถั่วเขียวตะกอนละเอียดช่วยให้ *Lactobacillus plantarum* มีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งน้อยกว่าการไม่เติมใยอาหาร (Crude fiber) โดยเซลล์ลดลง 0.25 และ 0.51 log CFU/ml ตามลำดับ นอกจากนี้การปรับพีเอชของอาหรเป็น 6.5 และการวางอาหารเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเหมาะต่อการเจริญของเชื้อมีการรอดชีวิตที่ดีหลังการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

Ha และคณะ (2003) ศึกษาการหมักกรดแลคติกของ *Lactobacillus casei* KH-1 ในหางนม (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 และอาหารสูตรใหม่นี้มีราคาถูกลง

ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์ (2550) ศึกษาการหาสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลคติกซึ่งคัดเลือกได้จากแหนมและปลาส้มจากการคัดเลือกในอาหาร 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

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

3.1.1 วัสดุ

ถั่วเหลือง เนื้อปลา และเนื้อไก่

3.1.2 อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งแบบละเอียด (analytical balance)
2. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (pH meter)
3. กล้องถ่ายรูปดิจิตอล (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. บิกเกอร์ (beaker)
17. ปิเปตต์ (pipette)
18. เครื่องเขย่า (shaker)
19. ตู้ดูดความชื้น (Dessicator)
20. กล้องจุลทรรศน์ (Microscope)
21. หลอด Eppendorf
22. เครื่องเขย่าสาร (Vortex)

SUKHOTHAI RAJABHAT UNIVERSITY

3.2 สารเคมี

1. Peptone
2. Yeast extract
3. Glucose
4. Sodium acetate trihdate
5. Tween 80
6. Diipotassium hydrogen phosphate
7. Triammonium citrate
8. Magmesium 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 แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm ที่อุณหภูมิ 37° C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำกล้าเชื้อมาเจือจางโดยใช้ 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้าย 1 X 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 จากนั้นนำส่วนประกอบข้างต้นผสมในน้ำกลั่น 1000 ml ปรับให้มี pH 6.5 ด้วย 6N HCl นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว ที่อุณหภูมิ 121° C เป็นเวลา 15 นาที แล้วนำกล้าเชื้อจากข้อ 3.3.1 ปริมาตรร้อยละ10 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, หาน้ำหนักเซลล์แห้งและค่า pH

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 4
ผลการวิจัย และอภิปรายผลการวิจัย

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

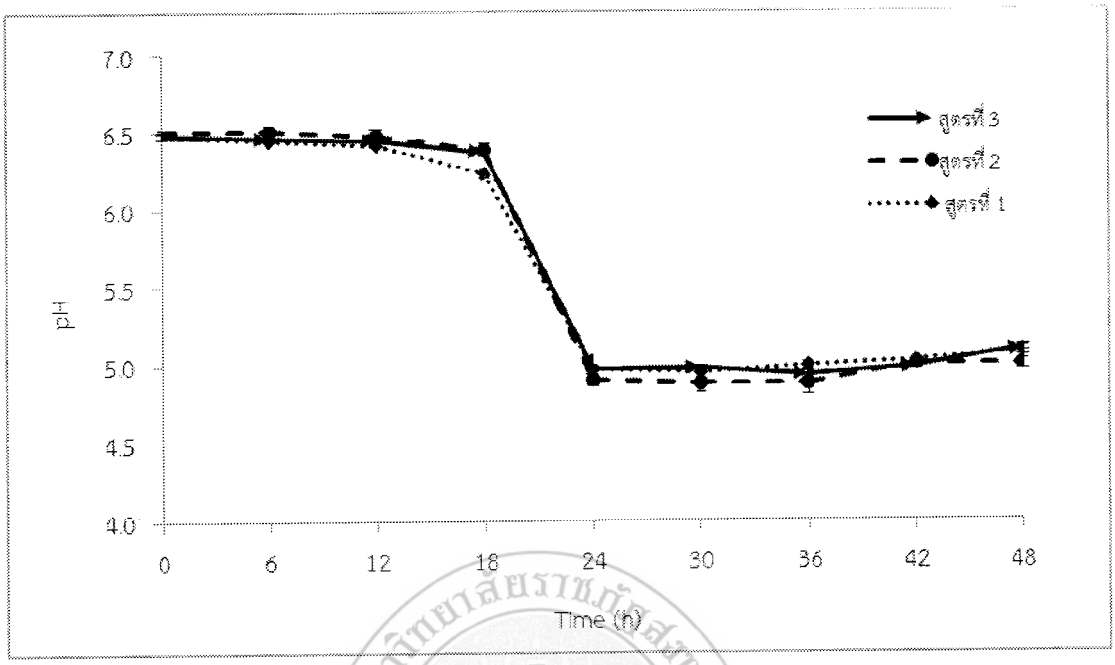
จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตร ซึ่งแต่ละสูตรมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ถั่วเหลือง เนื้อปลา และเนื้อไก่ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงโดยเขย่าที่ความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 ชั่วโมง โดยเก็บตัวอย่างทุกๆ 6 ชั่วโมง จากนั้นวิเคราะห์หาน้ำหนักเซลล์แห้ง และวัดปริมาณการสร้างกรดที่เกิดขึ้นซึ่งวัดค่า 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 ± 0.20 g/L (ตารางที่ 4.1) ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ พัชรวรรณ รัตนอุบล (2552) ศึกษาผลของสภาวะที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อต่อการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 หลังการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง โดยเริ่มจากการนำสารสกัดจากธัญพืช 3 ชนิด คือ ถั่วเหลือง ถั่วเขียวและข้าวโพด ซึ่งผ่านการสกัดด้วยน้ำมาใช้ศึกษาเป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า การใช้สารสกัดจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งคาร์บอนสามารถส่งเสริมการรอดชีวิตของ *L. plantarum* TISTR 875 และจากการสกัดสารจากธัญพืช ส่วนของตะกอนที่เหลือคือ ใยอาหาร (Crude fiber) นำมาเติมในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าการเติมใยอาหารจากถั่วเขียวตะกอนละเอียดช่วยให้ *L. plantarum* มีการลดลงของเซลล์หลังการทำแห้งน้อยกว่าการไม่เติมใยอาหาร และเนื่องจากงานวิจัยที่ผู้วิจัยศึกษาครั้งนี้ใช้น้ำจากถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจนและไม่ได้ใช้ใยอาหารจากถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมแต่ยังทำให้แบคทีเรีย *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, คาร์โบไฮเดรท 26.7 g/100 g, กากใย 4.7 g/100 g แร่ธาตุต่างๆ เช่น แคลเซี่ยม 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, ไนอาซีน 1.5 mg/100 g, วิตามินซี 14.0 mg/100 g (กรมวิชาการเกษตร, 2554) ดังนั้นถั่วเหลืองจึงสามารถนำมาใช้ได้ทั้งเป็นแหล่งไนโตรเจนและแหล่งคาร์บอน

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

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (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)

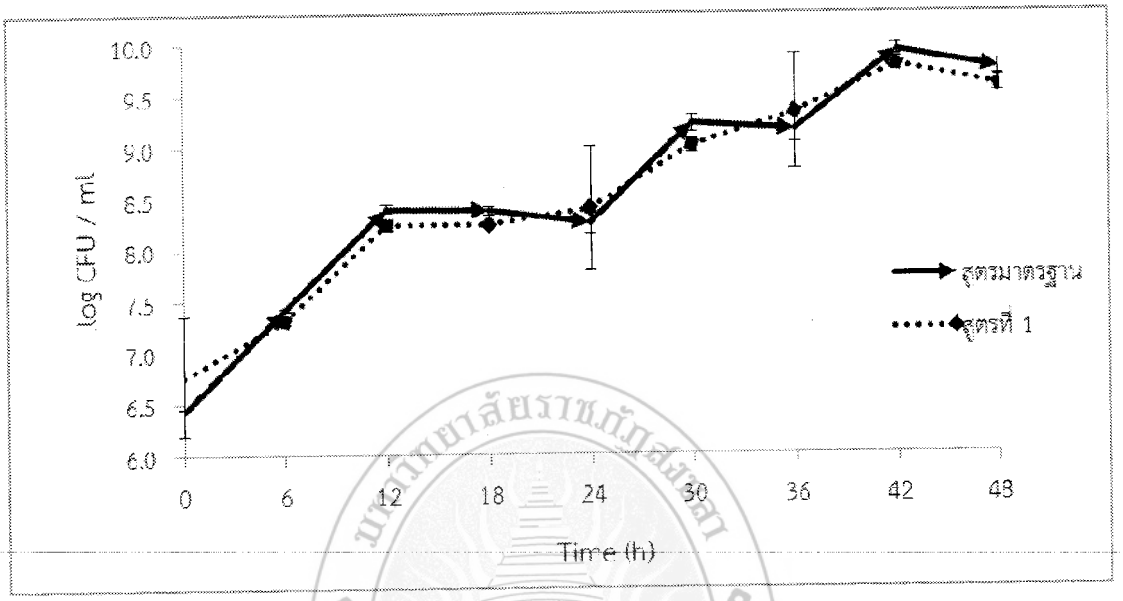


ภาพที่ 4.1 ค่า pH ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลง สูตรที่ 1 (ถั่วเหลืองเป็นแหล่งไนโตรเจน), สูตรที่ 2 (เนื้อปลาเป็นแหล่งไนโตรเจน) และสูตรที่ 3 (เนื้อไก่เป็นแหล่งไนโตรเจน) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

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±0.04 log CFU/ml และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมเท่ากับ 8.24±0.03 log CFU/ml ที่ 18 ชั่วโมงของการทดลอง (ภาพที่ 4.2) และมีการเจริญเติบโตเพิ่มมากที่สุดที่เวลา 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, 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



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±0.04 g/L และ 1.461±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 วัฏฏานุรักษ์ (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 และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 0.68 g ซึ่งจากผลการทดลองของผู้วิจัย พบว่าน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานมีปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกับรายงานวิจัยดังกล่าว

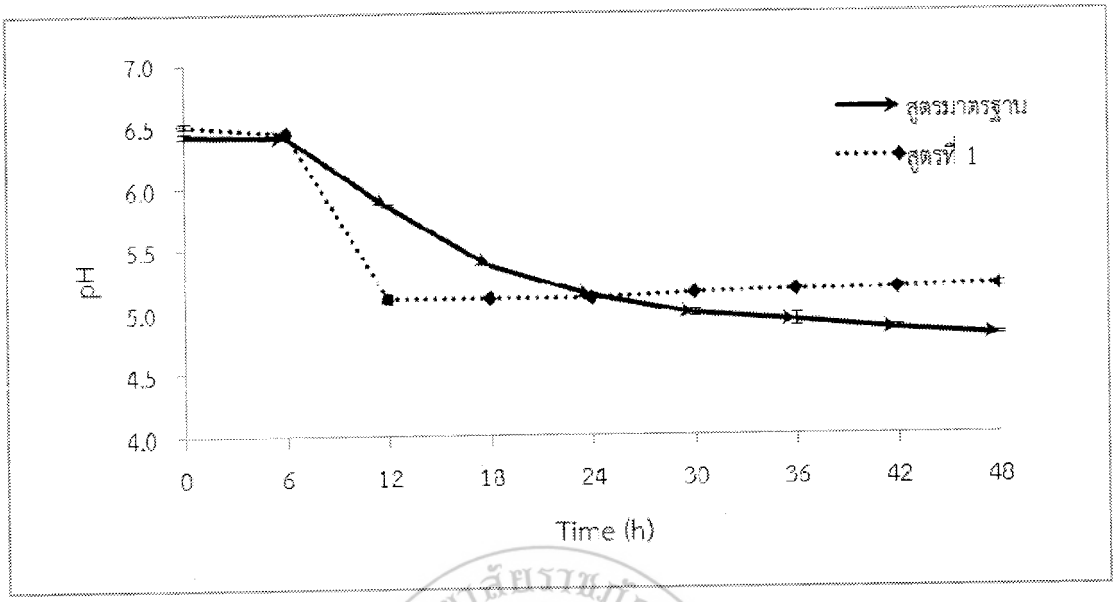
ตารางที่ 4.2 ปริมาณน้ำหนักเซลล์แห้งของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรมาตรฐานและอาหาร MRS สูตรดัดแปลงสูตรที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เวลา (ชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (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 ดังที่กล่าวก่อนหน้านี้

5 ต.ค. 2559



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

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

บทที่ 5
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการวิจัย

การศึกษาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแลคติก *L. plantarum* TISTR 541 ในอาหาร MRS สูตรดัดแปลงทั้ง 3 สูตรซึ่งแต่ละสูตรมีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน คือ ถั่วเหลือง เนื้อปลา และเนื้อไก่ แล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 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 ± 0.20 g/L แล้ววัดปริมาณการสร้างกรดที่เกิดขึ้น โดยวัดค่า pH พบว่าค่า pH ของอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสมมีแนวโน้มลดลงตั้งแต่เวลา 12-48 ชั่วโมงของการทดลอง ซึ่งมีค่าเท่ากับ 6.41±0.01, 6.23±0.01, 4.97±0.01, 4.95±0.01, 4.99±0.01, 5.02±0.01 และ 5.08±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±0.04 log CFU/ml และอาหาร MRS สูตรดัดแปลงที่มีถั่วเหลืองเป็นส่วนผสม เท่ากับ 8.24±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±0.04 และ 1.461 ±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±0.02 และ 6.44± 0.01 ตามลำดับ

5.2 ข้อเสนอแนะ

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

เอกสารอ้างอิง

กรมวิชาการเกษตร. 2554. **องค์ประกอบทางเคมีของถั่วเหลือง.** กรุงเทพฯ : กระทรวงการเกษตรและสหกรณ์.

ขนิษฐา ปัญญา และสุมิตรา ฤาชา. 2556. **ศึกษาการแยกแบคทีเรียแลคติกเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซิน.** คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี.

ไชยวัฒน์ นพเก้า. 2553. **ศึกษาองค์ประกอบของอาหารและสภาวะการหมักที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากเวย์โดยแบคทีเรียแลคติก**. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาจุลชีววิทยา ภาควิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร.

ดวงเดือน วัฏฏานุรักษ์. 2550. **ศึกษาการหาสูตรอาหารและสภาวะการเลี้ยงที่เหมาะสมของการผลิตกรดแลคติก.** มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยลงกรณ์.

นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และปรีชา สุวรรณพินิจ. 2548. **จุลชีววิทยาทั่วไป.** กรุงเทพฯ : จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

นวลจิรา ภัทรรังรอง. 2538. **โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.** สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

นิอร โฉมศรี. 2555. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 1. เชียงใหม่: เชียงใหม่ปริ้นติ้งการพิมพ์.

พัชรวรรณ รัตนอุบล. 2552. **การรอดชีวิตของโปรไบโอติกโดยใช้สารพรีไบโอติกในผลิตภัณฑ์ซินไบโอติก.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ภัทรพล จันทราภรณ์. 2543. **ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตแบคเทอริโอซินโดยเชื้อ *Lactobacillus.casei* ssp. Rhamnosus SN11 ที่ถูกตรึง.** วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

มาโนชญ์ สุธีวัฒนานนท์ และสุรีลักษณ์ รอดทอง. 2550. **ศึกษาการพัฒนาระบบการผลิต CLA ต้นแบบด้วยแบคทีเรียแลคติกใช้ในทางอุตสาหกรรม.** สาขาเทคโนโลยีการอาหาร สำนักวิชาการเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยสุรนารี.

วราวุฒิ ครูส่ง และรุ่งนภา พงศ์สวัสดิ์มานิต. 2532. **เทคโนโลยีการหมักในอุตสาหกรรม.** กรุงเทพฯ : โอ.เอส.พริ้นติ้งเฮาส์.

วิลาวัลย์ เจริญจิระตระกูล. 2536. **อาหารพื้นเมือง.** ใน ผลิตภัณฑ์อาหารหมักจุลินทรีย์. สงขลา : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ศศิวิมล ชื่นอิ่ม และอดิศร เสวตวิวัฒน์. 2548. **การใช้ประโยชน์และการตรวจหาแบคทีเรียแลคติกในอาหาร.** วารสารเกษตรพระจอมเกล้า. 23(1) : 88-101.

สุมณฑา วัฒนศิลป์. 2545. **จุลชีววิทยาทางอาหาร.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

สถาบันมาตรฐานฮาลาลแห่งประเทศไทย. 2551. **คู่มือแนะนำฮาลาล – ฮารอม.** สถาบันมาตรฐานแห่งประทศไทย.

อาภรณ์ วงษ์วิจารณ์. 2554. **การศึกษาสูตรและกระบวนการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+).** รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี.

Alonso, L., Cuesta, E. P. and Gillilland, 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., Hofvvendahl, 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 Hydroltsates 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 Liquoor 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. **Eyposureto 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, Jecques Goulet, and Anh Le Duy. 1987. **Continuous of lactic fon 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 Hastiings, J. W. 1991. **Bacteriocin Production by Lactic Acid Bacteria: Protential 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 Holzaptel, W.H. 1998. **Characterization and selection of probiotic lactobacilli for a preliminaly minipig feeding trial and their effect on serum choresterol levels faeces moistire content.** Journal. Food Microbiol. 40 : 93-104.

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ภาคผนวก

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 ($MgSO_4$)	0.2	g
Manganese sulfate tetrahydrate ($MnSO_4$)	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 ปอนต่อตารางนิ้ว เวลา 15 นาที
4. การเก็บรักษา : การเก็บในตู้เย็นควบคุมอุณหภูมิ

3. 0.5 Mcfarland standard

วิธีการเตรียม

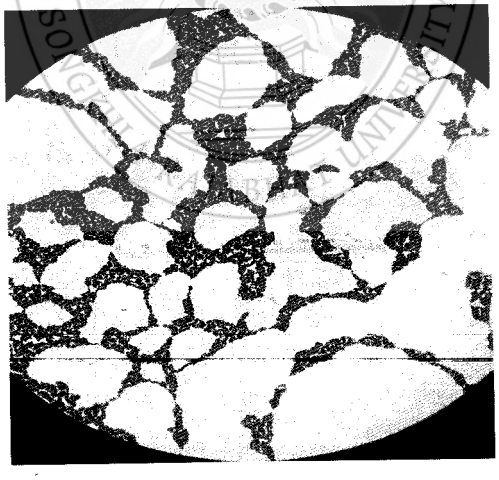
1. ใช้ 1.175% Barium chloride ปริมาตร 0.5 ml ผสมกับ 1% Sulfuric acid ปริมาตร 99.5 ml
2. จากนั้นใส่ในหลอดฝาเกลียว เก็บไว้ในที่มืด อุณหภูมิห้อง

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา
SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

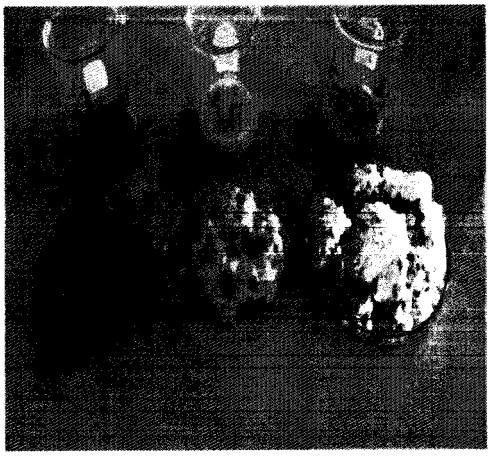
ภาคผนวก ข.

การเพาะเลี้ยง *L. plantarum* TISTR 541

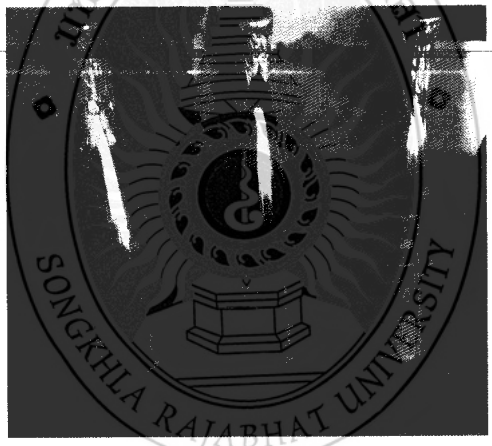
ภาพที่ 1 การเจริญของแบคทีเรีย *L. plantarum* TISTR 541บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS



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



ภาพที่ 3 ส่วนผสมที่เป็นถั่วเหลือง เนื้อไก่ และเนื้อปลา



ภาพที่ 4 อาหาร MRS สูตรดัดแปลงบดให้ละเอียดขยำเอาเฉพาะน้ำ

SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ประวัติย่อผู้ทำวิจัย

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล นางสาว มณีนุช จงไกรจักร

วันเดือนปีเกิด 21 กรกฎาคม 2535

สถานที่เกิด อำเภอ เชียรใหญ่ จังหวัด นครศรีธรรมราช

สถานที่อยู่ปัจจุบัน 37 หมู่ 7 ตำบล เขาพระบาท อำเภอเชียรใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80190

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2547 ชั้นประถมศึกษา โรงเรียนวัดแดง

พ.ศ. 2550 ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนเชียรใหญ่

พ.ศ. 2554 ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนเชียรใหญ่

พ.ศ. 2558 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ แขนงวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY

ประวัติย่อของผู้วิจัย

ชื่อสกุล นายอดิเรก คลองรั้ว
วันเดือนปีเกิด 12 มิถุนายน 2535
สถานที่เกิด อำเภอเหนือคลอง จังหวัดกระบี่
สถานที่อยู่ปัจจุบัน 58 หมู่ 6 ตำบลเกาะศรีบอยา อำเภอเหนือคลอง จังหวัดกระบี่ 81130
ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2547 ชั้นประถมศึกษา โรงเรียนบ้านเกาะศรีบอยา
พ.ศ. 2550 ชั้นมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนอุทยานศึกษากระบี่
พ.ศ. 2554 ชั้นมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนอุทยานศึกษากระบี่
พ.ศ. 2558 วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์
แขนงวิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา

มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา SONGKHLA RAJABHAT UNIVERSITY