รายงานการวิจัย

การผลิตกรดแลคติคจากแบคทีเรียแลคติคที่ใช้แป้ง

Lactic Acid Production from Starch using Lactic Acid Bacteria

สายสมร ลำยอง
นิตยา บุญทิม
เอกชัย ชูเกียรติโรจน์

ปีงบประมาณ 2538, 2539, 2540

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ผ่านสถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้มอบทุนอุดหนุนการวิจัยประเภททั่วไป ประจำปี 2538, 2539 (ปีที่ 2) และ 2540 (ปีที่ 3) และขอขอบคุณสถาบันวิจัยที่ช่วยดำเนินการขอทุนและจัดการเรื่องการเงิน ทำให้งานวิจัยสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ถึงจะมีการล่าช้าไปบ้าง เพราะงานวิจัยมีปัญหาหลายประการ ก็ต้องขออภัยไว้ ณ ที่นี้ด้วย

สายสมร ลำยอง และคณะ
กันยายน 2542

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	4
Abstract	6
ความสำคัญและที่มาของงานวิจัย	8
วัตถุประสงค์	9
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
วิธีการทดลอง	11
ผลการทดลอง	15
อภิปรายผลการทดลอง	27
สรุปผลการทดลอง	29
เอกสารอ้างอิง	30

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ : การผลิตกรดแลคติคจากแบคทีเรียแลคติคที่ใช้แป้ง

Lactic Acid Production from Starch using lactic Acid Bacteria

ชื่อผู้วิจัย นางสายสมร ลำยอง[1]

นางนิตยา บุญทิม[2]

นายเอกชัย ชูเกียรติโรจน์[1]

[1]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

เชียงใหม่ 50200

โทรศัพท์ (053) 943346, 943348

โทรสาร (053) 892259

email : scboi009@chiangmai.ac.th

[2]หน่วยวิจัยจุลชีววิทยาประยุกต์

สถาบันวิจัยและพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

โทรศัพท์ (053)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประเภท ทั่วไป

ประจำปีงบประมาณ 2539-2541 (3 ปี)

งบประมาณ 358,920 บาท (สามแสนห้าหมื่นแปดพันเก้าร้อยยี่สิบบาท)

ปัญหา

ในประเทศไทยเป็นประเทศหนึ่งที่มีการนำเข้ากรดแลคติคจากต่างประเทศ เป็นจำนวนมากในแต่ละปี ซึ่งจากแผนพัฒนาที่จัดทำโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี เมื่อปี 2526 นั้น กรดแลคติคเป็นกรดที่มีศักยภาพการผลิตเป็นอันดับสองรองจากกรดมะนาว ซึ่งคาดว่าจะสามารถผลิตเป็นอุตสาหกรรม เพื่อทดแทนการนำเข้าในปี 2536 ซึ่งตามเป็นจริงแล้ว ยังไม่สามารถเกิดขึ้นได้ เนื่องจากข้อมูลพื้นฐานในการผลิต และเชื้อเป้าหมายที่มีศักยภาพดีพอ ก็ยังไม่สามารถพัฒนาขึ้น

ดังนั้น จึงเป็นความต้องการเร่งด่วนของประเทศที่จะต้องมีการศึกษา หาข้อมูลในการผลิตและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติคในแหล่งธรรมชาติ โดยเฉพาะพวกที่ทนร้อน เพื่อที่จะสามารถนำไปพัฒนาในระดับอุตสาหกรรมได้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

วัตถุประสงค์ในการทดลอง

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคที่เจริญที่ 45° ซ. ที่ผลิตกรดแลคติคได้สูง โดยใช้แป้งเป็นสับสเตรด
2. ศึกษาสภาวะเหมาะสมในการผลิตกรดแลคติค โดยการเลี้ยงแบบรุ่น
3. ปรับปรุงสายพันธุ์โดยใช้ทำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยรังสียูวี

การค้นพบ

ผลจากการวิจัยพบว่า แบคทีเรียแลคติค (LAB) ที่เจริญได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 45 °ซ. นั้น มีการกระจายทั่วไปในผลิตภัณฑ์อาหารหมัก ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียแลคติค กลุ่มที่สร้างกรดอินทรีย์หลายชนิดผสมกัน กลุ่มที่ผลิตเฉพาะกรดแลคติคอย่างเดียว มีจำนวนน้อยกว่าเชื้อแบคทีเรียแลคติค สามารถใช้แป้งสุกได้ ใช้แป้งดิบไม่ได้ แต่ปริมาณกรดที่ผลิตได้ ยังอยู่ในระดับต่ำ ซึ่งจะต่ำลงอีกมากเมื่อใช้แป้งเป็นสับสเตรท ซึ่งจะต่ำกว่าเมื่อใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นสับสเตรท สายพันธุ์ที่ผลิตกรดแลคติคอย่างเดียว และใช้แป้งได้ที่แยกได้จากไส้กรอกข้าว ซึ่งจะมีการใช้ข้าวในการทำด้วย บ่งบอกชนิดว่าเป็น *Pediococcus* sp. 16 สร้างกรดแลคติคสูง 0.8% w/w การเพิ่มปริมารกรดทั้งการปรับสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงจะได้กรดแลคติคเพิ่มเป็น 1.1 % w/w ในอาหารที่มีกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน ใช้เชื้อตั้งต้นในปริมาณ 3% v/v บ่มที่ 45 ° ซ เป็นเวลา 2 วัน การทำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยการ treat ด้วยแสง UV ยังได้ผลไม่ดี

ข้อเสนอแนะ

น่าจะมีการคัดเลือกเชื้อจากแหล่งต่าง ๆ เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ เพราะจะทำให้ได้สายพันธุ์แบคทีเรียแลคติคที่สามารถใช้แป้งผลิตกรดแลคติคได้มากกว่านี้ และหาวิธีในการเก็บเชื้อแบคทีเรียแลคติค ให้มีชีวิตรอดอยู่ได้นาน ซึ่งก็ต้องศึกษากันต่อไป ถ้าสามารถใส่ยีนที่ให้รหัสในการย่อยแป้งเข้าไป น่าจะเป็นวิธีที่ดีที่จะพัฒนาให้แบคทีเรียแลคติคที่สร้างกรดแลคติคสามารถใช้แป้งเป็นสับสเตรทได้ดี การผลิตกรดแลคติคก็จะมีต้นทุนต่ำลง การทำให้เกิดการผ่าเหล่าด้วยวิธีใช้สารที่ทำให้เกิดการผ่าเหล่า ก็เป็นอีกวิธีหนึ่งที่จะทำให้ได้สายพันธุ์ที่ดี โดยลงทุนต่ำ และมีประสิทธิภาพดีในระดับหนึ่ง ซึ่งควรสนับสนุนให้มีการวิจัยในด้านนี้เพิ่มขึ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Abstract

Title : Lactic Acid Production from Starch using Lactic Acid Bacteria

Researcher : Mrs Saisamorn Lumyong[1]

Mrs Nitaya Boontim[2]

Mr Ekachai Chukeatirate[1]

[1]Department of Biology, Faculty of Science Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

[2]Applied Microbiology Research Unit, Institute of Research and Development Science and Technology Chiang Mai University, Chiang Mai 50200

Funding Agency National Research Council of Thailand

Total amunt 358,920 BATH

Duration 3 years 1995, 1996, 1998

Problem

Each year Thailand has imported a large amount of lactic acid and from the developing plan set up by National Biotechnology center in 1983, lactic acid was ranked number 2 after cetric acid. It was expected that Thailand would be able to produce enough lactic acid all replaced the imported by the year 1993 which we were not able to achive that goal due to lack of basic information on production and the organism used in the production had not been developed.

So, it is an urgent need for the country to get and accumulate data on production technique and at the same time improve the productivity of organism by searching for new bacteria from natural resource for high productivity and also thermotolerance which is an important charactor for organism use in industry.

Objectives

1) To isolate and select for bacteria which are able to grow at 45 °C and have high production of lactic acid by using starch as substrate.
2) To study for suitable conditions for lactic acid production.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Discovery :

The results shown that from 83 samples, 72 isolates of thermotolerant lactic acid bacteria (LAB) can be isolates. Twenty nine representative of LAB were investigated. Three of them were homofermentative the others were heterofermentative. All representative of homofermentative and homofermentative were tested for starch utilization. Most of LAB isolates can utilized cooked starch but not row starch. The amount of lactic acid produced was low and even lower when starch was used as carbon source than glucose.

The homofermentative LAB isolated from fermented rice souges identified as *Pediococcus* sp. 16 was selected as a good strain for lactic acid production. It produced the highest yield of lactic acid 1.1% w/w. Mutation by UV radiation to this strain was not efficent enough to increased the amount of lactic acid production.

Suggestion :

The lactic acid bacteria should be isolated from more diverse sources, especially from products which contained starch. Since the isolated LAB from these products should have better ability to produce lactic acid from starch. Suitable maintaining of cultures is need since the bacteria do not survive well in general culture medium and ordinary environment. Transformation of bacteria is also interesting field to study, if we can find gene which high ability to break down starch to sugar and clone this gene to our lactic acid bacteria would improve an ability to produce lactic of the bacteria tremendously.

The research in those area need more consider and support.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

จากข้อสรุปรายงานการสำรวจ สถานภาพและศักยภาพการผลิตและการใช้กรดอินทรีย์ รวมทั้งความต้องการในงานวิจัยและพัฒนาประเทศไทย ที่จัดทำโดยคณะกรรมการที่ได้รับทุนจากศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยี เมื่อปี 2526 พบว่ากรดอินทรีย์ที่อยู่ในแผนพัฒนาอันดับที่ 1 คือ กรดมะนาว (citric acid) ที่ได้ดำเนินการศึกษาวิจัยและผลิตระดับโรงงานแล้วในปัจจุบัน ส่วนกรดแลคติคนั้น ศักยภาพการผลิตมีเป็นที่สอง เพราะปริมาณความต้องการใช้มีแนวโน้มสูงขึ้น ซึ่งสรุปว่าจะสามารถผลิตเป็นอุตสาหกรรมเพื่อทดแทนการนำเข้าและส่งออกได้ในอีก 10 ปีข้างหน้า คือปี 2536 ซึ่งก่อนนี้ก็ควรมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตกรดแลคติคเชิงการค้าอย่างต่อเนื่อง แต่เท่าที่มีข้อมูลในปัจจุบัน ข้อมูลในการผลิตกรดแลคติคก็ยังไม่มีส่วนใหญ่ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการแลคติคก็เป็นในเชิงศึกษาเชื้อที่เกี่ยวข้องในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การทำผักดอง แหนม นมเปรี้ยว เป็นต้น ดังนั้น การศึกษาเรื่องการผลิตกรดแลคติคดังกล่าวก็ยังไม่สามารถพัฒนาขึ้นได้

ตลาดของกรดแบคติคมีอัตราการขยายตัวเพิ่มขึ้นทุกปีทั่วโลก ประเทศไทยเองสั่งเข้าปีละหลายแสนกิโลกรัม มีมูลค่าหลายล้านบาท และยังไม่สามารถผลิตในประเทศเพื่อทดแทนการนำเข้าได้ ความต้องการในตลาดโลกปัจจุบัน ยิ่งเพิ่มมากขึ้นเพราะมีการนำกรดแลคติคไปใช้ผลิตพลาสติกที่ย่อยสลายได้ จะได้พลาสติกที่เหนียวและทนร้อนได้ดี ลดมลภาวะได้ จึงมีความนิยมมาก การผลิตกรดแลคติคในทางอุตสาหกรรมนั้นได้มาจากการสังเคราะห์ทางเคมีประมาณ 60% และทางกระบวนการหมักด้วยเชื้อแบคทีเรีย อีก 40% ประเทศไทยก็นำเข้ากรดแลคติคจากประเทศเนเธอร์แลนด์ อังกฤษ สเปน ฝรั่งเศส เยอรมัน และอื่นๆ อีกหลายประเทศ ส่วนใหญ่ก็จะเป็นกรดอินทรีย์ ที่ได้จากกระบวนการหมัก

ราคาของกรดแลคติคจากกระบวนการหมักยังไม่ถูกนัก ถ้ามีการพัฒนาให้มีการผลิตในประเทศเอง โดยในกระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพ จากแบคทีเรียแลคติคสายพันธุ์ที่สร้างกรดได้สูง โดยใช้วัตถุดิบที่หาง่าย ราคาถูก เช่น แป้ง มันสำปะหลัง แป้งข้าว กากน้ำตาล หรือ whey ก็จะช่วยลดค่าใช้จ่ายของประเทศลงได้มากมาย และเป็นการลงทุนการผลิตที่คุ้มค่าทางเศรษฐกิจ ทั้งยังเป็นการแปรรูปผลิตผลที่มีราคาถูกทางการเกษตร ไปเป็นสินค้าราคาแพง สามารถเพิ่มรายได้ประชาชาติอีกทางหนึ่ง นอกจากนี้การใช้เชื้อแบคทีเรียที่ทนอุณหภูมิสูงได้ จะช่วยลดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นและลดค่าใช้จ่ายในการควบคุมอุณหภูมิของถังหมักได้ด้วย

ดังนั้น จึงเป็นความต้องการเร่งด่วนของประเทศไทย ที่จะต้องเร่งศึกษาวิจัยเพื่อหาข้อมูลในการผลิตกรดแลคติคเชิงการค้าขึ้น โดยการใช้สับสเตรตราคาถูกเช่นแป้ง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

คือ *Lenconostoc merenteroides* และแบคทีเรียที่สร้างกรดแอล-แลคติก คือ *L. lactis* และ *L. casei* subsp. *alactosus* (6) ซึ่งวิธีการจะตรวจว่าสร้างกรดรูปแอล, ดี หรือผสม ทำได้ในจานอาหารวุ้น (มีโคโลนี 50-70 โคโลนี) ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยา เอนไซม์ D(-)-lactate dehydrogenase และต่อกับปฏิกิริยาการเกิดสี บริเวณที่สร้างกรดดีแลคติกและโคโลนีที่สร้างกรดรูป ดี-แอล ผสม และจะติดสีแดงรอบ ๆ ส่วนโคโลนีที่สร้างเฉพาะ แอล-แลคติก จะไม่มีสีแดง (6)

โดยทั่วไปจะอยู่ในรูปของ L. taclic ที่มีความบริสุทธิ์ 40-100% จากแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Streptococcus faecalis, Lactobacillas helvetics, L. amylophetus* และ *L. delbruekii* เป็นต้น (7) กระบวนการหมักโดยแบคทีเรียแลคติกจะให้กรดแลคติคเป็นผลิตภัณฑ์หลัก

ในบราซิล และโคลัมเบีย จะมี "แป้งเปรี้ยว" (sour starch) ขาย ซึ่งผลิตโดยหมัก แป้งมันสัมปะหลังดิบ ในสภาพเหลว ให้เกิดกรดแลคติค และตากแห้ง ใช้ในการเตรียมผลิตภัณฑ์คล้ายขนมปังที่ทำจากตัวสาลี เชื้อที่เกี่ยวข้องคือ *Lactobacillus* หลายสปีชีส์ (8)

บางครั้งการผลิตกรดแลคติกที่ผลิตจากแป้งข้าวสาลีที่มีรำและกลูทิน นำไปผสม amylase ให้มีการย่อยแป้งเป็นน้ำตาลก่อน แล้วหมักต่อให้ได้กรดแลคติกในเชื้อ LAB ; *Lactococcus lactic* 2 สายพันธุ์ ซึ่งจะหมักที่ pH 6.0 และ 5.85 ซึ่งจะให้กรดแลคติก 3.3 g/l จะให้กรดแลกติคเพิ่มขึ้น ถ้าเติม yeast extract ลงไป 5 g/l (9).

กรดแลคติกที่แบคทีเรียแลคติคสร้างขึ้นจะมีหลายฟอร์ม D, L และ DL ซึ่งสามารถตรวจวัดได้โดยฉีดลงใน High Performance liquid chromatography (HPLC) โดยใช้คอลั่ม euantiomeric resolution โดยทั่วไปอัตราส่วนระหว่าง L fom กับ D-form ใช้เทียบได้กับ reference ตรวจใช้ UV detector ที่ช่วงคลื่น 254 nm

Zhang & Cheryan (10) ศึกษาการหมักโดยตรงจากแป้งไปเป็นกรดแลคติกโดยการมหักแบบรุ่น ใช้ *L. amylovorus* และวิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติก โดยใช้ HPLC และ refractive index detector ใช้คอลั่ม HPX-8714 มีตัวทำละลายคือ 0.01 NH_2SO_4 flow rate 0.8 ml/min อุณหภูมิของคอลั่ม 65 °ซ พบว่าแป้งมีความเข้มข้นเริ่มต้น 120 g/l ผลิตกรดแบคติก 96.2 g/l ในเวลา 20 ชั่วโมง และผลิตแลคโตด 92.5 g/l ในเวลา 39 ชั่วโมง

มีการพัฒนาใช้พันธุวิศวกรรมกับ *Saccharomyces cerevisiae* เพื่อผลิตกรดแลคติก มีการแสดงออกโดยใช้ lactate dehydrogenase จากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ผลิตได้ 20 g/l การผลิตได้สูงถึง 11 g/l/ชม. โดยเปลี่ยนแปลงสร้างของการเจริญ (11)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

1. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก

เก็บตัวอย่างต่าง ๆที่จะใช้แยกเชื้อจากร้านค้า ในตลาดต้นพยอม อำเภอเมือง จังหวัดเชียงใหม่ จังหวัดลำพูน ลพบุรี และพะเยา รวมทั้งหมด 83 ตัวอย่าง ตัวอย่างต่าง ๆดังกล่าวประกอบไปด้วยอาหารประเภทหมักดอง เช่น แหนม กะปิ ปลาร้า ผักและผลไม้ดอง ผลิตภัณฑ์อาหารจากนม ได้แก่ นมเปรี้ยว และโยเกิร์ต, และผลไม้ที่ทิ้งให้เน่าเสีย ได้แก่ องุ่น สับปะรด และแคนตาลูป นำตัวอย่างดังกล่าวในปริมาณ 0.5 กรัม สำหรับตัวอย่างที่เป็นของแข็งและ 1.0 ml สำหรับตัวอย่างที่เป็นของเหลว ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุน้ำกลั่นฆ่าเชื้อปริมาตร 15 ml เขย่าให้เป็นสารละลายเนื้อเดียวกัน ปิเปตสารละลายผสมที่ได้ในปริมาตร 0.5 ml ใส่ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลว MRS broth ที่เติม bromocresol green เป็นอินดิเคเตอร์ ปริมาตร 15 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ ถ้ามีการสร้างกรดเกิดขึ้น สีของอาหารเหลวภายในหลอดทดลองจะมีการเปลี่ยนแปลงจากสีเขียวเป็นสีเหลือง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลวในระยะเวลา 1-5 วัน แยกหลอดทดลองที่มีการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารเหลว มาแยกเชื้อต่อ โดยนำมาลากเป็นรอยเส้น ลงบนจานอาหาร MRS agar เททับด้วยอาหารชนิดเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สังเกตการขึ้นเป็นโคโลนีของเชื้อบนจานอาหาร MRS agar เลือกเอาโคโลนีที่บริเวณรอบ ๆ มีการเปลี่ยนสีของอาหาร มาตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีกรัมด้วยกล้องจุลทรรศน์ แล้วคัดเอาเฉพาะโคโลนีที่เป็นแบคทีเรียกรัมบวก มีรูปร่างเป็นแท่ง ทรงกลม หรือกึ่งแท่งกึ่งทรงกลม มาแยกเชื้อต่อ ทำซ้ำหลาย ๆครั้ง จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ นำเชื้อบริสุทธิ์ทั้งหมดที่แยกได้ มา stab ลงในหลอดทดลอง ที่มีอาหาร MRS agar และเก็บในหลอดทดลองที่มี MRS broth เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 °ซ เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2. การทดสอบเชื้อบริสุทธิ์ที่ได้ว่าเป็น Homofermentative หรือ Heterofermentative

นำเชื้อบริสุทธิ์แต่ละเชื้อที่แยกได้มา streak ลงบนอาหาร homofermentative heterofermentative differential (HHD) medium เททับด้วยอาหารชนิดเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 1-2 วัน สังเกตสีของโคโลนีที่ขึ้นบนจานอาหาร HHD ถ้าโคโลนีของเชื้อเป็นสีฟ้า หรือสีเขียว แสดงว่าเชื้อบริสุทธิ์นั้นเป็นพวก Homofermentative ส่วนโคโลนีของพวก Heterofermentative จะมีสีขาว (12)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

3. การทดสอบความสามารถในการย่อยแป้งข้าวเจ้า ทั้งดิบและสุกของเชื้อ

เตรียมอาหาร MRS agar โดยใช้แป้งข้าวเจ้า 2% (w/v) เป็นแหล่งของคาร์บอนแทนน้ำตาลกลูโคส ดังนี้

3.1 แป้งข้าวเจ้าดิบ : นำแป้งข้าวเจ้าห่อด้วยฟอยล์แล้วฆ่าเชื้อในตู้อบที่อุณหภูมิ 150 °ซ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วผสมกับอาหาร MRS agar ที่ไม่ได้เติมน้ำตาลกลูโคสผสมให้เข้ากัน แล้วเทลงในจานอาหาร

3.2 แป้งข้าวเจ้าสุก : ใช้แป้งข้าวเจ้า ผสมลงไปเป็นแหล่งของคาร์บอน แทนน้ำตาลกลูโคสในสูตรของอาหาร MRS agar

3.3 ใช้แป้ง soluble starch 2% เป็นแหล่งคาร์บอน และใช้ $(NH_4)_2SO_4$ 10 g/l แทน peptone และ beef extract ในสูตร MRS agar

นำเชื้อบริสุทธิ์ที่แยกได้มา streak ลงบนอาหาร MRS agar ทั้ง 3 สูตร เททับด้วยอาหารชนิดเดียวกัน บ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ สังเกตว่ามีเชื้อใดบ้างที่สามารถเจริญขึ้นได้ ในระยะเวลา 1-5 วัน

4. การคัดเลือกและตรวจสอบ เพื่อหาเชื้อที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้สูงสุด

4.1 วิธีไทเทรต : เพาะเชื้อที่แยกได้ทุกไอโซเลท ลงในหลอดทดลองที่บรรจุอาหาร MRS broth ซึ่งใช้สำหรับหาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้น ปริมาณ 15 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน โดยที่เชื้อแต่ละไอโซเลทจะทำ 2 ซ้ำ เมื่อครบ 5 วัน นำมากรองโดยใช้กระดาษกรอง Whatman No.1 จนได้สารละลายใส ปิเปตสารละลายส่วนใสมา 10 ml ใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml เติมน้ำกลั่น ที่ต้มไล่ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์แล้วลงไป 40 ml หยดด้วย phenolphthalein ซึ่งใช้เป็นอินดิเคเตอร์ลงไป 3 หยด แล้วไทเทรตด้วยสารละลาย 0.1 M โซเดียมไฮดรอกไซด์ จนถึงจุดยุติ ได้สารละลายสีชมพูใส บันทึกปริมาตรของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ไปในการไทเทรต นำค่าปริมาตรเฉลี่ยของสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ได้ มาคำนวณหาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้น โดยคิดเป็นเปอร์เซนต์กรดรวม (% Total acid)

4.2 วิธีการวิเคราะห์กรด วิธีการวิเคราะห์ด้วย TLC : ใช้แผน chromatography สำเร็จ DC Alufolien Cellulose (Merck 5552) สำหรับวิเคราะห์ สารละลายที่ใช้แยกประกอบด้วย ethyl acetate, acetic acid และ น้ำกลั่นในอัตราส่วน 3:1:1 ตามลำดับ แล้ว spnay ด้วยสารละลายที่ทำปฏิกิริยาแล้วเกิดสี เทียบกับ 1% (w/v) ของกรดมาตรฐาน

4.3 เทคนิคทาง chromatography แบบ HPLC (High Performance Liquid Chromatography) : เพาะเชื้อที่แยกได้ทุกไอโซเลทลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS broth ซึ่งใช้สำหรับหาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้น ปริมาณ 15 ml บ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 5 วัน โดยที่เชื้อแต่ละไอโซเลทจะทำ 2 ซ้ำ เมื่อครบ 5 วัน นำมากรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No. 1 แล้วนำมากรองด้วยเครื่องกรองอย่างละเอียดอีกครั้ง โดยใช้กระดาษกรองขนาด 0.2 μ นำไปวิเคราะห์ด้วย

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เครื่อง HPLC (Shimadzu) คอลัมน์ชนิด SCR-102H ขนาด 8 mm x 30 cm มี mobile phase เป็น 0.1 phosphoric acid ใช้ flow rate เท่ากับ 1.0 ml/min ใช้ UV detector ที่ความยาวคลื่น 210 nm อุณหภูมิคอลัมน์ 40 °ซ และฉีดตัวอย่างที่กรองได้ในปริมาณ 5 µl โดยเทียบกับสารละลายกรดอินทรีย์มาตรฐาน 1% ของกรดแลคติก กรดซิตริค ไพรูวิค ฟูมาริก กรดมาลิก ซิคซิบิดและทริทาริค คำนวนค่าของ retention time และความเข้มข้นโดยใช้ computor (Shimazu Software)

5. การ screen หาการผลิตกรดอินทรีย์

เพาะเชื้อ แต่ละ isolates ในอาหารหมัก 3 มล. ในหลอดทดลอง ที่ประกอบด้วย (% w/v) ฟรัคโตส 10 ; เปปโตน 0.3 ; KH_2PO_4 0.03 ; $ZuSO_4.7H_2O$ 0.4 ; $MgSO_4.7H_2O$ 0.025 และ $CaCO_3$ 5 (แยกฆ่าเชื้อโดยความร้อนแห้ง) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (27+2°ซ) เขย่าที่ 100 rpm เป็นเวลา 4 วัน ทำการแยกเอาส่วนสารละลายมาปรับ pH เป็น 2 แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธี Thin layer chromatography และ High Performmance Liquid Chromatography (HPLC) ตามลำดับ

6. การหาปริมาณหัวเชื้อที่เหมาะสมสำหรับเชื้อที่ผลิตกรดแลคติคได้สูงสุด

นำเชื้อที่ผลิตกรดแลคติคได้สูงสุด มาเตรียมเป็นหัวเชื้อโดยเพาะลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS broth 15 ml บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 1 วัน ปิเปตหัวเชื้อในปริมาณ 1, 2, 3, 4 และ 5 ml ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 ml จำนวน 5 ใบ ที่มีอาหาร MRS broth สำหรับหาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้น ปริมาณ 99, 98, 97, 96 และ 95 ml โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 °ซ เป็นเวลา 5 วัน เมื่อครบ 5 วัน นำขวดแก้วรูปชมพู่แต่ละใบ มาวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้นด้วยวิธีไทเทรต

7. การหาระยะเวลาที่เหมาะสมของเชื้อที่ผลิตกรดแลคติคได้สูงสุด

นำเชื้อที่ผลิตกรดแลคติคได้สูงสุด มาเตรียมเป็นหัวเชื้อเช่นเดียวกับวิธีในข้อ 5. ปิเปตหัวเชื้อในปริมาณ 3 ml ลงในขวดแก้วรูปชมพู่ขนาด 250 ml จำนวน 5 ใบ ที่มีอาหาร MRS broth ซึ่งใช้สำหรับหาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้น ปริมาณ 97 ml โดยทำการทดลอง 2 ซ้ำ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 45 ° ซ แล้ววิเคราะห์ปริมาณกรดแลคติคที่ถูกสร้างขึ้นในแต่ละวัน เป็นเวลา 1-5 วัน ด้วยเครื่อง HPLC

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. การตรวจสอบชนิดของเชื้อที่ผลิตกรดแลคติคได้สูงสุด

นำเชื้อที่ผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด ตรวจสอบลักษณะต่าง ๆดังนี้

8.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา : นำเชื้อไปตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีกรัมด้วยกล้องจุลทรรศน์ สังเกตลักษณะ และรูปร่างของเซลล์ รวมทั้งการจัดเรียงตัว

8.2 การทดสอบเอนไซม์คะตะเลส : หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ลงบนแผ่นสไลด์ แล้วใช้ห่วงลวดแตะโคโลนีของเชื้อ นำไปแตะบนหยดของสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ปฏิกิริยาที่เป็นบวกจะมีฟองก๊าซเกิดขึ้น

8.3 การทดสอบการสร้างสารอินโดล : เพาะเชื้อลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร Peptone broth 0.5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นหยดสารละลายโคแวคส์รีเอเจนท์ลงไป 0.5 มิลลิลิตร ถ้ามีการสร้างสารอินโดลเกิดขึ้น จะเกิดวงแหวนสีแดงที่ผิวหน้าของอาหาร

นำลักษณะต่าง ๆที่ตรวจสอบได้ ไปเทียบกับลักษณะของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติคใน Bergey's Manual of Sustematic Bacteriology volume 2 (13) ว่าเชื้อที่ผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดอยู่ในจีนัสใด

9. การชักนำให้เกิดการผ่าเหล่าโดยใช้แสง UV กับ แบคทีเรียแลคติค isolate 16

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ isolate 16 ในอาหารเหลว MRS 50ml ในฟลาสขนาด 250 ml บ่มที่ 45 $^{\circ}$ ซ ด้วยการเขย่าด้วยความเร็ว 150 rpm เป็นเวลา 48 ชม นำไปเหวี่ยงแยกเซลล์ออก ล้างด้วย buffer 2 ครั้ง จากนั้นนำมาทำให้เจือจางให้ได้เซลล์ ประมาณ 106 เซลล์ต่อ ml (OD< 1) นำสารละลายเซลล์ที่เจือจางแล้ว 20 ml ใส่ในจานอาหาร ที่มี magnetic sterrer ใส่ไว้ นำไปวางใต้แสง UV ที่ระยะห่าง 10 cm ที่เวลาต่าง ๆ กัน จากนั้นนำไปบ่มที่มืด 30 นาทีแล้วนำมาทำให้เจือจางเป็นลำดับขั้นแล้ว spread ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มไว้ที่ 45 $^{\circ}$ซ นาน 24 – 48 ชม ในที่มืด ทำการนับจำนวนโดโลนีที่ปรากฏหลังการ treat UV ที่เวลาต่างกัน เลือก ระยะเวลาที่ทำให้ได้โคโลนีที่มีชีวิตรอดเพียง 3 % ใช้ระยะเวลาดังกล่าทำการ treat เซลล์ของเชื้อ Isolate 16 แล้วบ่มโคโลนีที่ผ่านการ treat ด้วยแสง UV ในอาหารแข็ง MRS ที่มีแป้งสุกเป็นสับสเตรดแทนกลูโคสหรือฟรัคโตส บ่มที่ 45 $^{\circ}$ซ นาน 48 ชม ในที่มืด

เลือกโคโลนีที่ผ่านการ treat ด้วย UV จำนวน 100 โคโลนีมาทำการทดสอบการสร้างกรดแลคติคในอาหารเหลวที่มีแป้งสุกเป้นสับสเตรด ตรวจวัดปริมาณกรดแลคติคโดย HPLC เลือกโคโลนีที่ให้กรดแลคติคสูงไว้ศึกษาต่อไป

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ผลการทดลอง

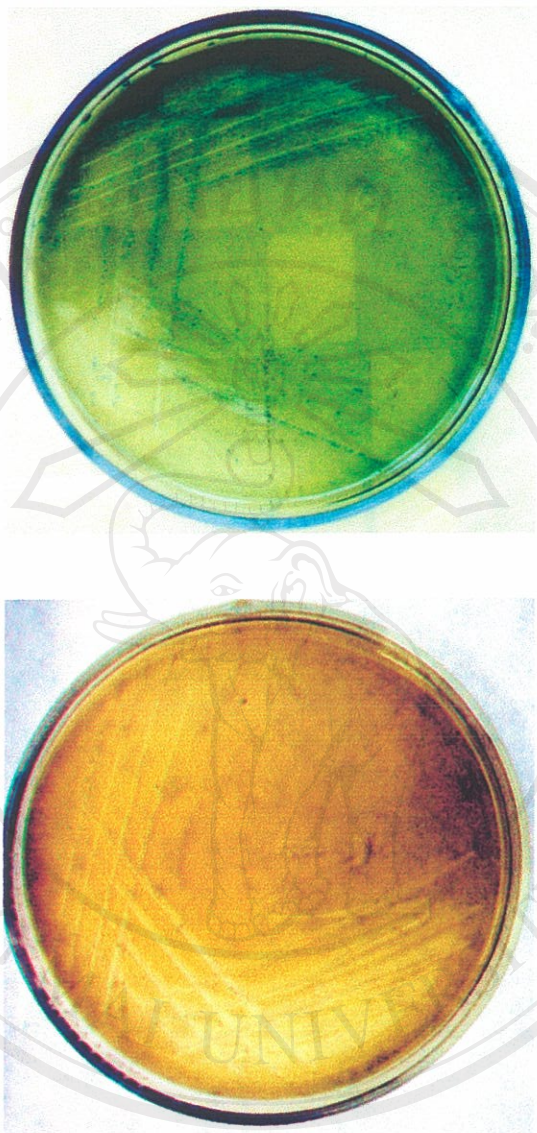
การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สร้างกรดได้

จากตัวอย่างทั้งหมด 83 ตัวอย่าง พบว่ามีจำนวนตัวอย่างอยู่ 74 ตัวอย่าง ที่มีการเปลี่ยนสีของอาหารเหลวจากสีเขียวไปเป็นสีเหลือง และมี 7 ตัวอย่าง ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสี ภายใน 5 วัน (ภาพ 1) ได้นำตัวอย่างที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสีของอาหารทั้งหมด 74 ตัวอย่าง ไปแยกต่อจนได้เชื้อบริสุทธิ์ 74 ไอโซเลท นำมาตรวจสอบคุณสมบัติการติดสีกรัมได้ว่า ทั้ง 74 ไอโซเลท เป็นแบคทีเรียกรัมบวก และนำมาเพาะลงในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS agar โดยการ stab และในหลอดทดลองที่มีอาหาร MRS broth เก็บไว้ศึกษาต่อไป

การทดสอบคุณสมบัติในการเป็น homofermentative-heterofermentative ของเชื้อ

นำเชื้อทั้ง 74 ไอโซเลท มาเพาะลงในอาหาร HHD พบว่า มีอยู่ 3 ไอโซเลทที่เป็นพวก homofermentative และอีก 71 isolates เป็นพวก heterofermentative (ตาราง 1)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 1 ลักษณะของแบคทีเรียแลคติคที่เจริญบนอาหาร MRS เมื่อมีการสร้างกรดจะเปลี่ยนสีอาหารจากเขียวเป็นเหลือง

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 1. ชนิดของตัวแทนแบคทีเรีย 29 isolates จากทั้งหมด 74 isolates เมื่อทดสอบด้วย HHD medium บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1-2 วัน

หมายเลข isolate	แหล่งที่มา (ตัวอย่างหมายเลข)	ชนิดของแบคทีเรีย
1	โยเกริตเมจิ	Heterofermentative
2	โยเกริตดัชมิลล์	Heterofermentative
3	โยเกริตดานอน	Heterofermentative
4	โยเกริตโยโมสท์	heterofermentative
5	โยเกริตดัชชี่	heterofermentative
6	นมเปรี้ยวเมจิ	heterofermentative
7	นมเปรี้ยวดัชมิลลี	heterofermentative
8	นมเปรี้ยวดานอน	heterofermentative
9	นมเปรี้ยวภูพิงค์	heterofermentative
10	นมเปรี้ยวไทยเดนมาร์ก	heterofermentative
11	นมเปรี้ยวสหกรณ์	heterofermentative
12	นมเปรี้ยวบีทาเกน	heterofermentative
13	นมเปรี้ยว อ.ส.ค.	heterofermentative
14	แหนมถุง	Heterofermentative
15	แหนมห่อใบตอง	heterofermentative
16	ไส้กรอกข้าวตัวอย่าง 1	**homofermentative**
17	ไส้กรอกข้าวตัวอย่าง2	heterofermentative
18	น้ำปูดอง	**homofermentative**
19	ปูเค็ม	heterofermentative
20	ปลาส้ม	**homofermentative**
21	ปลาร้า 1	heterofermentative
22	ปลาร้า2	heterofermentative
23	กะปิ	heterofermentative
24	ถั่วเน่า	heterofermentative
25	ผักกาดดอง 1	heterofermentative
26	ผักกาดดอง 2	heterofermentative
27	สับปะรด	heterofermentative
28	แคนตาลูป	heterofermentative
29	องุ่น	heterofermentative

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้งข้าวเจ้าของเชื้อ

นำเชื้อ 29 ไอโซเลท มาเพาะลงในอาหาร MRS ที่ใช้แป้งข้าวเจ้า 2% (w/v) เป็นแหล่งของคาร์บอน แทนน้ำตาลกลูโคส ในรูปของแป้งดิบและแป้งสุก พบว่าทั้ง 29 ไอโซเลท ไม่สามารถสลายแป้งดิบได้ และมี 26 ไอโซเลท ที่สามารถใช้แป้งสุกได้ ดังตาราง 2

ตาราง 2. ความสามารถในการใช้แป้งข้าวเจ้าของเชื้อตัวอย่าง 29 ไอโซเลท ในอาหาร MRS ที่มีแป้งข้าวเจ้าดิบและสุก 2% (w/v) บ่มที่ 45°C เป็นเวลา 1-5 วัน

หมายเลข isolate	แป้งข้าวเจ้า	
	แป้งดิบ	แป้งสุก
1	-	+
2	-	+
3	-	+
4	-	+
5	-	+
6	-	+
7	-	+
8	-	+
9	-	+
10	-	+
11	-	+
12	-	+
13	-	+
14	-	+
15	-	+
16	-	+
17	-	+
18	-	+
19	-	+
20	-	+
21	-	-
22	-	-

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเลข isolate	แป้งข้าวเจ้า	
	แป้งดิบ	แป้งสุก
23	-	-
24	-	+
25	-	+
26	-	+
27	-	+
28	-	+
29	-	+

เครื่องหมาย + แสดงว่ามีการเจริญของเชื้อ
เครื่องหมาย - แสดงว่าไม่มีการเจริญของเชื้อ

การวิเคราะห์ปริมาณของกรดที่ถูกผลิตขึ้นโดยเชื้อทั้ง 29 ไอโซเลท

นำเชื้อทั้ง 29 ไอโซเลท มาเพาะลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งใช้สำหรับหาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้น มาบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้นนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซนต์กรดรวม โดยวิธีไทเทรต และวิเคราะห์หาปริมาณของกรดแลคติคด้วย HPLC พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 16 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกข้าว ผลิตกรดแลคติคได้สูงสุดคือ 0.82% (w/w) ได้ผลดังตาราง 3

ตาราง 3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดที่เชื้อผลิตขึ้นในอาหาร MRS broth ที่ใช้สำหรับหาปริมาณกรด บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

หมายเลข isolate	%Total acid (titration)	%Total acid (HPLC)	ปริมาณกรดแลคติค % (w/w)
1	2.40	1.02	0.87
2	2.00	0.79	0.47
3	1.20	1.33	1.03
4	1.05	1.76	1.35
5	0.85	1.39	0.86
6	0.95	2.98	1.50
7	1.72	0.94	0.47

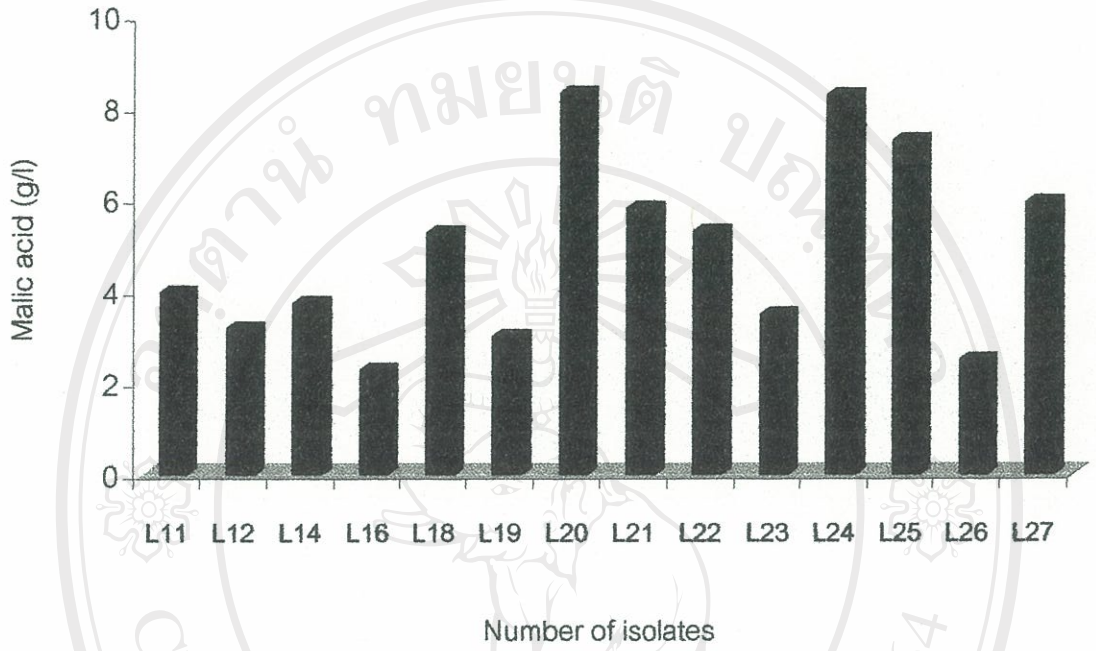
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

หมายเลข isolate	%Total acid (titration)	%Total acid (HPLC)	ปริมาณกรดแลคติค % (w/w)
8	1.04	3.22	1.39
9	1.76	3.46	1.26
10	1.51	0.90	0.69
11	0.72	1.44	1.02
12	0.65	2.73	1.38
13	1.22	3.93	1.15
14	2.45	1.09	0.70
15	2.39	1.20	0.95
16	0.60	1.03	0.82
17	0.75	1.69	0.91
18	0.26	1.68	0.84
19	0.33	1.44	0.93
20	3.01	2.05	0.75
21	0.35	1.30	0.98
22	0.24	2.19	1.19
23	0.30	1.57	0.82
24	0.47	1.28	0.71
25	0.88	2.15	1.12
26	0.66	1.78	1.09
27	0.72	1.22	0.54
28	0.53	1.87	0.84
29	0.70	1.37	1.03

การวิเคราะห์ปริมาณกรดโดย HPLC จากแบคทีเรียแลคติคตัวแทน

จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่าแบคทีเรียที่เป็นตัวแทน ของกลุ่ม heterofermentative12 isolates และ isolate 16ที่เป็นตัวแทนของกลุ่ม homofermentative นั้น กลุ่ม heterofermentative มีการสร้างกรดหลายชนิดกรดที่สร้างได้มากที่สุดคือกรด มาลิค (ภาพ 2) รองลงมาคือกรดวัคซินิคและมีการสร้างกรดแลคติค กรดซิตริค ซึ่งกรดไพรูวิคพบปริมาณต่ำ ไม่พบว่ามีการสร้างกรด ทาทาริค ไพรูวิคและฟูมาลิค ซึ่ง isolate 16 จะสร้างเฉพาะกรดแลคติค (ตาราง 4)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 2 การผลิตกรดมาลิกของแบคทีเรียแลคติค

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 4 ความสามารถของแบคทีเรียแลคติคในการผลิตกรดอินทรีย์

Isolate	Citric acid g/l	Tartaric acid g/l	Malic acid g/l	Pyruvic acid g/l	Succinic acid g/l	Lactic acid g/l	Fumaric acid g/l
L11	0.17	0.00	3.94	0.00	0.33	1.62	0.00
L12	0.52	0.00	3.16	0.00	0.41	0.00	0.002
L14	0.51	0.00	3.7	0.00	0.54	0.15	0.00
L16	0.34	0.00	2.24	0.00	0.24	0.09	0.00
L18	0.34	0.00	5.25	0.29	0.32	3.93	0.00
L19	0.00	0.00	2.98	0.00	0.06	0.00	0.00
L20	1.12	0.00	8.29	0.008	0.23	0.22	0.003
L21	0.83	0.00	5.77	0.017	0.21	0.10	0.00
L22	0.92	0.00	5.27	0.00	0.73	0.85	0.003
L23	0.61	0.00	3.47	0.00	0.48	0.26	0.003
L24	1.69	0.00	8.24	0.00	1.30	1.00	0.003
L25	1.26	0.00	7.25	0.00	0.78	0.79	0.003
L26	0.39	0.00	2.47	0.00	0.38	0.11	0.00
L27	0.94	0.00	5.9	0.00	0.54	0.51	0.00
No16	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.08	0.00

การหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติคาของเชื้อไอโซเลทที่ 16

การหาปริมาณเชื้อตั้งต้น

เพาะหัวเชื้อไอโซเลทที่ 16 ลงในอาหารเหลว MRS ซึ่งใช้ในการหาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้น ในปริมาณ 1%, 2%, 3%, 4% และ 5% ตามลำดับ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน จากนั้น นำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดด้วยวิธีไทเทรต พบว่าปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมของเชื้อไอโซเลทที่ 16 ในการผลิตกรดคือ 3% (ตาราง 5)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตาราง 5. เปอร์เซ็นต์กรดรวมที่ได้จากการใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นต่าง ๆกัน ในอาหาร MRS ซึ่งใช้สำหรับหาปริมาณกรด บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 วัน

ปริมาณเชื้อตั้งต้น (%)	%(w/v) Total acid
1	0.17
2	0.38
3	0.98
4	0.42
5	0.37

การหาระยะเวลาที่เหมาะสม

ใช้ปริมาณเชื้อตั้งต้นของเชื้อไอโซเลทที่ 16 3% เพาะลงในอาหาร MRS ที่ใช้สำหรับหาปริมาณกรด แล้วตรวจวัดกรดแลคติคที่ถูกสร้างขึ้นในแต่ละวันด้วยเครื่อง HPLC พบว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการผลิตกรดแลคติคของเชื้อไอโซเลทที่ 16 คือ 2 วัน (ตาราง 5 ภาพ 3)

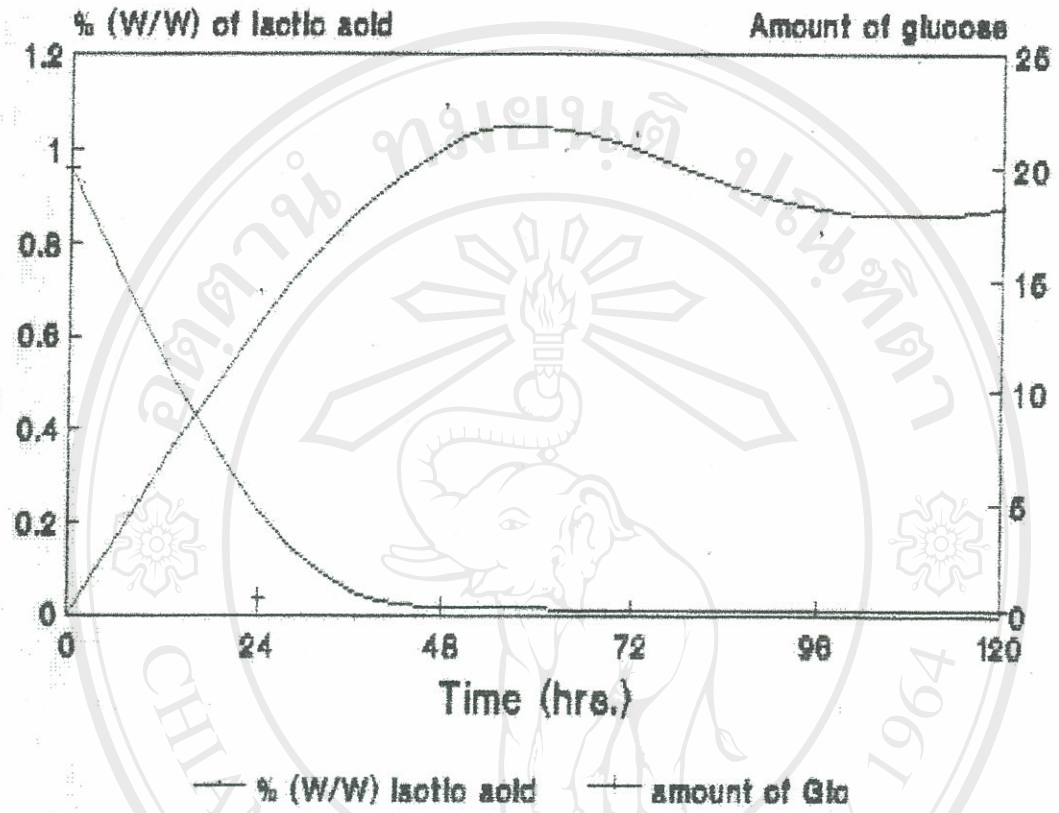
ตาราง 6. กรดแลคติค (% w/v) ที่ถูกสร้างขึ้นในแต่ละวันของเชื้อไอโซเลทที่ 16

ระยะเวลา (วัน)	%(w/w) ของกรดแลคติค
1	0.69
2	1.20
3	1.03
4	0.82
5	0.87

การตรวจสอบจีนัสของเชื้อไอโซเลทที่ 16

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 16 ซึ่งเป็น homofermentative เป็นแบคทีเรียกรัมบวก มีรูปร่างเป็นกึ่งแท่งกึ่งทรงกลม พบการจัดเรียงตัวเป็นคู่และพบในรูปแบบของ tetrads ด้วย ส่วนผลการทดสอบทางชีวเคมี พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 16 ไม่มีเอนไซม์คาตะเลส และไม่ผลิตสารอินโดล นำผลที่ได้ไปตรวจสอบกับลักษณะของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้ใน Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol.2 (13) พบว่าเชื้อไอโซเลทที่ 16 จัดอยู่ในจีนัส *Pediococcus* spp. (ตาราง 7)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพ 3 ไคเนติคของการผลิตกรดแลคติคจากเชื้อไอโซเลทที่ 16 ในอาหาร MRS สำหรับหาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้น บ่มที่อุณหภูมิ 45°C

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 7 ลักษณะต่าง ๆที่ตรวจสอบได้ของเชื้อไอโซเลทที่ 16 เทียบกับลักษระของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกได้

ลักษณะที่ตรวจสอบ	รูปร่างของเซลล์	การจัดเรียงตัว	Catalase test	Indole test
Streptococcus	ทรงกลม	เป็นคู่และเป็นสายยาว	ไม่มี	ND
Leuconostoc	ทรงกลม	เป็นคู่และเป็นสายยาว	ไม่มี	ไม่สร้าง
Pediococcus	ทรงกลมรี	เป็นคู่และ tetrads ไม่พบเป็นสายยาว	ไม่มี	ไม่สร้าง
Lactobacillus	แท่งสั้นหรือแท่งยาว	เป็นสายยาว	ไม่มี	ND
เชื้อไอโซเลทที่ 16	กึ่งแท่งกึ่งทรงกลม	เป็นคู่และ tetrads	ไม่มี	ไม่สร้าง

ND หมายถึง test not determined

9. การผ่าเหล่าของ *Pediococcus* sp. 16 ด้วยวิธี UV

จากการนำเซลล์แบคทีเรียแลคติค ไปรับแสง UV ที่ระยะเวลาต่าง ๆกันนั้นพบว่า ที่เวลา 20 วินาที จะพบเซลล์มีชีวิตรอด 2% (ตาราง 8) จึงเลือกระยะเวลานี้ ทำการ treat เซลล์ส่ายพันธุ์ 16 จำนวนมากต่อ และสามารถคัดโคโลนีของแบคทีเรียแลคติค ที่ผ่าน UV ที่ does ของค่าการตาย 98% นี้ได้จำนวน 100 โคโลนี เมื่อนำมาทดสอบการผลิตกรดแลคติคและตรวจวัดด้วย HPLC พบว่ามีการผลิตกรดแลคติกต่ำกว่า *Pediococcus* sp. 16 ที่เป็นสายพันธุ์ดั่งเดิม

ตาราง 8 เปอร์เซนต์มีชีวิตรอดของแบคทีเรยแลคติคหลังการ treat ด้วยรังสี UV

เวลาในการรับรังสี UV (วินาที)	% ที่รอดชีวิต
0	100
5	70
10	20
15	5
20	2
25	0
30	0

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อภิปรายผลการทดลอง

ขั้นตอนการแยกเชื้อแบคทีเรียจากตัวอย่างชนิดต่าง ๆ 83 ชนิด ที่สร้างกรดในอาหาร MRS broth ให้บริสุทธิ์นี้ค่อนข้างยุ่งยาก เนื่องจากเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่าย โดยเฉพาะจากยีสต์ ทั้งนี้มีสาเหตุมาจากในอาหารหมักดองชนิดต่าง ๆ มักจะมีเชื้อยีสต์เจริญอยู่ร่วมกับเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติค รวมทั้งอาจมีแบคทีเรียอื่น ๆอีกด้วย นอกจากนี้เชื้อยีสต์ยังเจริญได้ง่ายและรวดเร็ว ดังนั้นเมื่อตรวจดูลักษณะการติดสีกรัม แล้วพบว่าเป็นพวกกรัมบวก รูปแท่ง รูปทรงกลม หรือรูปกึ่งแท่งกึ่งทรงกลม ควรรีบถ่ายเชื้อทันทีจากโคโลนีที่เป็นโคโลนีเดี่ยวในระยะแรก และถ่ายเชื้อซ้ำหลาย ๆครั้งเพื่อจะได้แน่ใจยิ่งขึ้นว่าได้เชื้อบริสุทธิ์ เพื่อไว้ศึกษาต่อไป

และเมื่อนำเชื้อที่แยกได้ไปทดสอบความสามารถในการย่อยสลายแป้งข้าวเจ้า พบว่า ในรูปของแป้งสุก มีเชื้อถึง 26 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ ทั้ง ๆที่แป้งเป็นสารโมเลกุลใหญ่ ซึ่งเป็นการยากที่แบคทีเรียกรดแลคติคจะย่อยสลายได้ แต่ในรูปของแป้งสุกเชื้อส่วนใหญ่สามารถใช้ได้เนื่องมาจากโมเลกุลของแป้งถูกสลายด้วยน้ำ และความร้อน ให้มีขนาดโมเลกุลที่เล็กลง และเชื้อสามารถใช้แป้งในส่วนที่ถูกสลายนี้ได้ ซึ่งถ้าเป็นแป้งดิบโมเลกุลของแป้งไม่มีการแตกตัว ทำให้ไม่มีเชื้อไอโซเลทใดเลยที่สามารถใช้ได้

จากนั้นได้นำเชื้อมาทดสอบความสามารถในการสร้างกรด ด้วยวิธีไทเทรต และวิธี HPLC พบว่า วิธีไทเทรตจะทราบปริมาณของกรดจากการคำนวณ โดยอาศัยความสัมพันธ์ระหว่างการทำปฏิกิริยาของกรดที่เชื้อสร้างขึ้น กับสารละลายต่างมาตรฐาน 0.1 M NaOH วิธีนี้ไม่สามารถทราบได้เลยว่า มีกรดชนิดใดบ้างที่เชื้อสร้างขึ้น และกรดแต่ละชนิดมีปริมาณเป็นเท่าไร จะทราบคร่าว ๆเพียงปริมาณทั้งหมดของกรดเท่านั้น ซึ่งจากการวิเคราะห์ด้วย HPLC จะสามารถทราบถึงชนิดของกรดที่ถูกสร้างขึ้นได้ และยังทราบด้วยว่ากรดแต่ละชนิดมีปริมาณเป็นเท่าไร แตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร จะเห็นได้ว่าการวิเคราะห์กรดด้วย HPLC จะให้ผลที่ชัดเจนและแน่นอน แต่วิธีการใช้เครื่องค่อนข้างยุ่งยาก อย่างไรก็ตามถ้าต้องการทราบผลเพียงคร่าว ๆ ก็อาจจะใช้วิธีการไทเทรต และตรวจสอบชนิดของกรดด้วยวิธีโครมาโตกราฟีกระดาษ

จากการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 16 ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกข้าว สามารถผลิตกรดแลคติคได้สูงสุด และได้นำมาศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมของเชื้อในการผลิตกรดแลคติคในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน โดยปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมเป็น 3% ซึ่งจะสามารถผลิตกรดได้สูงสุดเท่ากับ 0.98% และระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติคของเชื้อไอโซเลทที่ 16 ก็คือ 2 วัน ได้ปริมาณกรดแลคติคสูงสุดคือ 1.1% และมีปริมาณของน้ำตาลกลูโคสเหลืออยู่ 0.32 กรัมต่อลิตร (ใช้น้ำตาลกลูโคสปริมาณตั้งต้น 20 กรัมต่อลิตร) ที่เป็นเช่นนี้สามารถอธิบายได้ว่าปริมาณของเชื้อที่น้อยย่อมจะทำให้ผลิตกรดได้น้อยด้วย และถ้าปริมาณของเชื้อมากเกินไป จะทำให้

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อาหารหมดอย่างรวดเร็ว และการสะสมของเสียที่ถูกขับออกมาจากเชื้อก็เกิดขึ้นเร็วด้วย ทำให้เชื้อตายได้ การผลิตกรดแลคติคก็จะเกิดขึ้นน้อย และในเรื่องของระยะเวลาช่วงวันแรก เชื้อจะมีการปรับตัวก่อน จึงมีการผลิตกรดแลคติคได้น้อย ต่อมาในวันที่สอง เชื้อจะมีการผลิตกรดแลคติคได้สูงสุด และจะผลิตในปริมาณที่ค่อนข้างคงที่ในระยะต่อมา อาจจะอธิบายได้ว่าเป็นผลซึ่งเกิดจากการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนประชากรเซลล์ของเชื้อ โดยที่ในวันที่หนึ่งและสอง ก็คือการเจริญในช่วง log phase และต่อจากนั้นเชื้อจะมีอัตราเพิ่มจำนวนเซลล์ที่คงที่ ผลก็คือจะได้ปริมาณของกรดแลคติคที่คงที่ด้วย

มีการทดลองที่ได้รายงานถึงการแยกแบคทีเรียกรดแลคติค และตรวจสอบเชื้อที่สามารถผลิตกรดได้สูงสุด โดยศึกษาปริมาณกรดที่ถูกสร้างขึ้นเป็นเปอร์เซ็นต์กรดรวม ดังนี้ จันทิรา, 2534 พบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างหน่อไม้ดองสร้างกรดได้สูงสุดคือ 3.37% และของ ลงกลนี, 2535 พบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างปลาส้มผลิตกรดได้สูงสุดคือ 3.39% และในงานวิจัยนี้ พบว่าเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างปลาส้มสร้างกรดได้สูงสุดเช่นกันคือ 3.01% แต่ทั้งของจันทิรา และจงกลณี ไม่ได้ทดลองตรวจสอบปริมาณของกรดแลคติคที่ถูกสร้างขึ้นว่าเป็นเท่าไร ในงานวิจัยนี้ได้ตรวจสอบถึงปริมาณกรดแลคติคที่ถูกสร้างขึ้นด้วย และพบว่าเชื้อที่สร้างกรดแลคติคได้สูงสุดคือเชื้อไอโซเลทที่ 16 บ่งบอกชนิดว่าเป็น *Pediocoece* sp. ซึ่งเป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างไส้กรอกข้าว ผลิตกรดแลคติคได้ 1.2% ซึ่งไม่ใช่เชื้อจากตัวอย่างปลาส้มที่สามารถผลิตกรดรวมได้สูงสุด รายงานนี้ เป็นรายงานแรกที่พบ *Pediococcus* สามารถใช้แป้งได้ในการผลิตกรดแลคติคได้

การ treat ด้วยแสง UV ยังไม่ประสพผลสำเร็จ เนื่องจากเซลล์ที่ผ่านการ treat ด้วย UV ที่ does ซึ่งสูงพอแล้วที่ทำให้เกิดการตาย 98% ยังไม่มีการผ่าเหล่าที่ยืนซึ่งควบคุมเกี่ยวกับการผลิตกรดแลคติค ทำให้ปริมารกรดที่ผลิตได้ยังคงเหมือนกับ parent strain ทั้งนี้ อาจจะต้องใช้ mutagen อื่น เช่น nitrous acid หรือ alkylating agent MNNG (N-methyl N-nitro N-nitrosoguanidine) มาทำการ treat เปรียบเทียบต่อไป

หรือเลือกโคโลนีจำนวนมากมาทดสอบหลังการ treat ด้วย UV โดยใช้วิธีการประยุกต์ที่สามารถทดสอบโคโลนีจำนวนมาก ๆได้ มีรายงานของ Leathers *et al.* (14) ทดสอบในกลุ่มที่ใกล้เคียงคือ *Leuconostoc mesenteroides* หาตัวผ่าเหล่าเพื่อดูสัดส่วนของ alterman ต่อ dextran ที่สร้างขึ้นโดย treat ด้วย UV แล้วเลือกโคโลนีจำนวน 5280 มาทดสอบด้วยวิธีที่รวดเร็วที่พัฒนาขึ้น (rapid screening method) ก็สามารถได้ตัวผ่าเหล่าที่ต้องการ สัดส่วนของ alterman ต่อ dextran ได้สูง และคุณสมบัตินี้จะเสถียรมากกว่า 60 รุ่น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

สรุปผลการทดลอง

แยกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรด ซึ่งเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 74 ไอโซเลท จากตัวอย่างอาหารหมักดอง ผลิตภัณฑ์อาหารจากนม และผลไม้ที่ทิ้งไว้ให้เน่าเสีย รวมทั้งหมด 83 ตัวอย่าง ซึ่งจัดเป็นแบคทีเรียกรดแลคติค ชนิด homofermentative 3 ไอโซเลท และชนิด heterofermentative 80 ไอโซเลท คัดเลือกตัวแทน 29 ไอโซเลท ศึกษาพบ 26 ไอโซเลท ที่สามารถใช้แป้งข้าวเจ้าในรูปของแป้งสุกได้ ซึ่งทั้ง 29 ไอโซเลท ไม่สามารถใช้แป้งดิบได้ พบว่า เชื้อไอโซเลทที่ 16 ซึ่งแยกได้จาก ไส้กรอกข้าว สามารถสร้างกรดแลคติคได้สูง 0.8% w/w และจะสร้างเพิ่มขึ้นถึง 1.1% (w/w) ในอาหารที่มีน้ำตาลกลูโคส 2% เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้เชื้อตั้งต้นในปริมาณ 3% บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 2 วัน

เชื้อหมายเลข 16 นี้ บ่งบอกชนิดว่าเป็น *Pediococcus* sp. และเมื่อนำไปทดสอบการผ่าเหล่าด้วยแสง UV พบว่าที่ 20 วินาที ของการ treat จะทำให้เกิดการตาย 98% และโคโลนีที่ผ่านการ treat แล้ว นำไปตรวจสอบการสร้างกรดแลคติค 100 โคโลนี ยังไม่พบโคโลนีใดที่ให้กรดแลคติคสูงกว่า *Pedicoccus* sp. 16

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เอกสารอ้างอิง

1. Viekroy, T.B. 1985. Lactic acid. In Comprehensive Biotechnology Vol 4 (M. Moo-Young, ed.) pp. 761-776.
2. Cheng, P., R.E. Mueller, S. Jaeger, R. Bajpai and E.L. Iannotti. 1991. Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. *J. Ind. Microbiol.* 7:27-34.
3. Hrubant, G.R. 1975. Changes in microbial population during fermentation of feedlot waste with corn. *Appl. Microbiol.* **30** : 113-119.
4. Nakamura, L.K., and C.D. Crowell. 1978. Microbiology of corn fermented with swine waste. *Dev. Ind. Microbiol.* **5** : 395-402.
5. Nakamura, L.K. 1981. *Lactobacillus amylovorus*, a starch hydrolyzing species from waste-corn fermentations. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **31** : 56-63.
6. Jehanno, D., D.Thuault, and C.M. Bourgeois. 1992. Development of method for detection of lactic acid bacteria producing exclusively the L-(+)-isomer of lactic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 4064-4067.
7. Ohara, H. and M. Yahata. 1996. L-Lactic acid production by *Bacillus* sp. in anaerobic and aerobic culture. *J. FEMS. Bioengine.* **81** : 272-346.
8. Figueroa, C., A.M. Davila and J. Pourguie. 1995 : Lactic acid bacteria of the sour cassava starch fermentation. *Lett. Appl. Microbiol.* **21** : 126-130.
9. Hofvendahl, K. and B. Hahn-Hagerdal. 1997. Lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of Lactobacilli and Lactococci. *Enz. Microb. Tech.* **20** : 301-307.
10. Zhang, D.X. and M. Cheryan. 1991. Direct fermentation of starch to lactic acid by *Lactobacillus amylovorus*. *Biotechnol. Lett.* **13** : 733-738.
11. Porro, D., L. Brambilla, B.M. Ranizi, E. Martegani and L. Alberghina. 1995. Development of metabolic engineered *Saccharomyces cerevisiae* cell for the production of lactic acid. *Biotechnol. Prog.* **11** : 294-298.
12. Mc. Donald, L.C., R.F. Mc Feeters, N.A. Daeschel and H.P. Flemming. 1987. A differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**:1382-1384.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เลขทะเบียน.....เลขหมู่.....
สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
ว.ร
579.37
ส 268ก

13. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe. And J.G. Holt. 1986. Bergey's Manaual of Systematie Bacteriology Vol 2. pp. 1043, 1065, 1071-1080, 1209-1235. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.

14. Leathers, T.D., G.T. Hayman and G.L. Cote. 1995. Rapid Screening of *Leuconostoc meseuteroides* mutants for elevated proportions of alternan to dextran. *Curr. Microbiol.* 33 : 19-22.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved