# การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารเหลว

T033528

นางสาวกรแก้ว ตั้งศีลสุขชัย
นางสาวพรรณพิชา วงศ์รัตนากรไกร

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 33528
วัน, เดือน, ปี 13 ส.ค. 2542

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
พ.ศ. 2541

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# Optimization of Environmental Factors for *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in Liquid Media

Miss Kornkaew Tangsilsukchai

Miss Panpicha Wongrattanakornkri

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

1998

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

| | |
|---|---|
| หัวข้อโครงงานพิเศษ | การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารเหลว |
| โดย | นางสาวกรแก้ว ตั้งศีลสุขชัย |
| | นางสาวพรรณพิชา วงศ์รัตนากรไกร |
| ภาควิชา | ชีววิทยาประยุกต์ |
| อาจารย์ที่ปรึกษา | รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ |

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้นับโครงงานพิเศษฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

_____ หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
(รศ.ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

_____ ประธานกรรมการ
(ผศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง)

_____ กรรมการ
(อาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ)

_____ กรรมการ
(รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**หัวข้อโครงงานพิเศษ** การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารเหลว

**นักศึกษา** นางสาวกรแก้ว ตั้งศีลสุขชัย

นางสาวพรรณพิชา วงศ์รัตนากรไกร

**อาจารย์ที่ปรึกษา** รศ.ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์

**ภาควิชา** ชีววิทยาประยุกต์

**ปีการศึกษา** 2541

## บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเพิ่มจำนวนของ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS และอาหารสูตรดัดแปลง 7 ชนิด โดยศึกษาแหล่งคาร์บอนและไนโตรเจนที่มีอิทธิพลต่อการเพิ่มจำนวน โดยใช้แล็กโทสในรูปของเวย์เป็นแหล่งคาร์บอนแทนกลูโคส และเพปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจนแทนโปรติโอสเพปโทน โดยศึกษาที่ความเข้มข้นของแล็กโทส 20 , 30 และ 40 กรัมต่อลิตร และความเข้มข้นของโปรติโอสเพปโทน และเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร ทำการทดลองในระดับฟลาสก์ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยนับจำนวนโคโลนีในชั่วโมงที่ 24 , 48 และ 72 พบว่าจำนวนโคโลนีมี แนวโน้มเพิ่มขึ้นในแต่ละช่วงเวลา โดยชั่วโมงที่ 72 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นสูงที่สุด แต่แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนไม่มีอิทธิพลร่วมกันในการเพิ่มจำนวน และยังพบว่าการใช้อาหาร MRS และอาหารสูตรดัดแปลงให้ผลไม่แตกต่างกัน สำหรับพีเอชของอาหารส่วนใหญ่จะลดลงตามระยะเวลา และกรดแลกติกที่เชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ผลิตขึ้น มีอัตราการผลิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วงชั่วโมงที่ 24 ถึง 48 และหลังจากชั่วโมงที่ 48 อัตราการผลิตกรดแลกติกจะเพิ่มขึ้นอย่างช้าๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Special Project Title** Optimization of Environmental Factors for *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* in Liquid Media

**Name** Miss Kornkaew Tangsilsukchai

Miss Panpicha Wongrattanakornkri

**Special Project Advisor** Assoc. Prof. Dr. Dusanee Thanaboripat

**Department** Applied Biology

**Academic Year** 1998

## Abstract

*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* was grown in MRS broth in comparison with 7 modified media. Lactose in the form of whey at concentrations of 20 , 30 and 40 g/l was used in substitution of glucose as carbon source. Peptone at concentrations of 10 g/l was used instead of proteose peptone as nitrogen source. The cultures were incubated at 37° C and cell counts were done after 24 , 48 and 72 hours. The results showed that numbers of cells were increased with time and the highest cell count was at 72 hours. There was no correlation between carbon source and nitrogen source for bacterial growth. There was also no significant difference between the use of MRS and modified media. The pH of the media mostly reduced with time whereas lactic acid production increased rapidly at 24 and 48 hours and increased slowly after 48 hours.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัตร อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษ ผศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง และอาจารย์มงคล เพ็ญสายใจ ที่ให้ความเอาใจใส่ แนะนำ และช่วยเหลือเสมอมา ซึ่งต้องขอขอบพระคุณเป็นอย่างมาก และขอขอบคุณบริษัท วิคกี้ คอนโซลิเดท จำกัด ที่ได้มอบข้อมูลเกี่ยวกับเวย์ และให้การสนับสนุนเวย์กิโลกรัมแรกที่ใช้ในการทดลอง ขอบคุณพี่กรองจิตต์ ช้างแก้ว ที่ให้คำแนะนำ และให้ต่อเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR047 มาเพื่อใช้ในการทดลอง และเพื่อนๆ พี่ๆ ทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ และให้กำลังใจมาโดยตลอด

และต้องขอขอบพระคุณบุคคลสำคัญที่สุดที่ทำให้ข้าพเจ้ามีวันนี้ ก็คือ บิดา มารดา อันเป็นที่เคารพยิ่ง ซึ่งได้เลี้ยงดูข้าพเจ้ามาเป็นอย่างดี พร้อมทั้งให้โอกาสในการศึกษาอย่างเต็มที่ และยังให้กำลังใจ เอาใจใส่เสมอมา ในทุกๆด้านอันหาที่เปรียบมิได้ ข้าพเจ้าขอระลึกในพระคุณอันสุดประมาณ และขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้

นักศึกษาผู้ทำโครงงานพิเศษ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญ


| เรื่อง | หน้า |
|---|---|
| บทคัดย่อภาษาไทย | ก |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ | ข |
| กิตติกรรมประกาศ | ค |
| สารบัญ | ง |
| สารบัญตาราง | จ |
| สารบัญรูป | ฉ |
| บทที่ 1 บทนำ | 1 |
| 1.1 วัตถุประสงค์ของโครงงาน พิเศษ | 1 |
| 1.2 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ | 2 |
| 1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 2 |
| บทที่ 2 การตรวจเอกสาร | 3 |
| 2.1 การจัดหมวดหมู่ของ *Lactobacillus* | 3 |
| 2.2 ประโยชน์ของ *Lactobacillus* | 12 |
| 2.3 กรดแลกติก | 16 |
| 2.4 ส่วนประกอบของจุลินทรีย์ | 19 |
| 2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Lactobacillus* | 20 |
| 2.6 ข้อพิจารณาวัตถุดิบที่จะนำมาใช้เป็นสับสเตรต | 23 |
| 2.7 เวย์ | 24 |
| บทที่ 3 วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง | 26 |
| 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง | 26 |
| 3.2 เครื่องมือที่ใช่ในการทดลอง | 27 |
| 3.3 สารเคมี | 28 |
| 3.4 วิธีการทดลอง | 28 |
| 3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ | 30 |
| บทที่ 4 ผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ | 31 |
| บทที่ 5 วิจารณ์และข้อเสนอแนะ | 45 |
| เอกสารอ้างอิง | 47 |
| ภาคผนวก ก. | 50 |
| ภาคผนวก ข. | 52 |
| ภาคผนวก ค. | 54 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญตาราง


| ตารางที่ | หน้า |
|---|---|
| 2.1 คุณสมบัติที่แตกต่างกันของกลุ่ม Regular Nonsporing Gram Positive Rods | 4 |
| 2.2 แสดงแหล่งที่พบของจีนัส *Lactobacillus* | 6 |
| 2.3 การใช้น้ำตาลของ *Lactobacillus* | 8 |
| 2.4 แสดงการแบ่งกลุ่มจีนัส *Lactobacillus* โดยอาศัยลักษณะที่แสดงออก (phenotypic characteristic) | 10 |
| 2.5 การใช้หัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักในยุโรป | 13 |
| 2.6 แบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก lactic acid bacteria | 14 |
| 2.7 แสดงรูปของกรดแลกติกที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ | 17 |
| 2.8 ส่วนประกอบของจุลินทรีย์แต่ละกลุ่ม | 19 |
| 4.1 การเพิ่มจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ | 32 |
| 4.2 ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* | 35 |
| 4.3 ตารางแสดงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงต่าง ๆ | 38 |
| 4.4 ตารางแสดงปริมาณกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ผลิตขึ้นในแต่ละช่วงเวลา | 40 |
| 4.5 ตารางวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* สร้างขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ ในอาหารทั้ง 8 สูตร | 42 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# สารบัญรูป


| รูปที่ | หน้า |
|---|---|
| 2.1 แสดงลักษณะรูปร่าง *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* | 7 |
| 2.2 ตัวอย่างของการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแคปซูล (probiotic) | 15 |
| 2.3 การผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรีย | 18 |
| 2.4 เวย์ผง | 25 |
| 3.1 *Lactobacillus casei subsp. rhamnosus* TISTR047 | 26 |
| 4.1 แสดงการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS | 33 |
| 4.2 แสดงการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง | 33 |
| 4.3 การเพิ่มจำนวนโคโลนีของ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารทั้ง 8 สูตร | 34 |
| 4.4 การเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหาร 8 สูตร | 39 |
| 4.5 ปริมาณกรดแลกติกที่ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ผลิตขึ้น | 41 |


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 1
# บทนำ

กรดแลกติกเป็นกรดที่มีความสำคัญในการผลิตผลิตภัณฑ์ชนิดต่างๆ ที่ใช้อุปโภคบริโภคกันอยู่ภายในชีวิตประจำวันของมนุษย์ เช่น ในการผลิตอาหารประเภทหมักดอง ผลิตภัณฑ์นมเปรี้ยว โยเกิร์ต อุตสาหกรรมอาหารและเครื่องสำอาง และอุตสาหกรรมย่อยพลาสติก โดยส่วนใหญ่กรดแลกติกที่ได้จะผลิตโดยกระบวนการหมัก ส่วนที่เหลือจะผลิตโดยการสังเคราะห์ทางเคมี (Siebold และคณะ ,1995) การผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักนั้น จะใช้เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้หรือที่เรียกว่า Lactic acid bacteria (Tsai และ Coleman,1993 และ Venus และคณะ, 1992) Lactic acid bacteria นี้มีรูปร่างเป็นท่อน แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เจริญได้ทั้งในสภาพที่ไม่มีอากาศ และสภาพมีอากาศ โดยผลผลิตหลักคือกรดแลกติก ซึ่งแบคทีเรียสายพันธุ์ต่างๆ นั้นมีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกแตกต่างกันไป ทั้งในแง่ปริมาณและรูปของกรดแลกติก ซึ่งจะขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดของอาหาร และสิ่งแวดล้อมต่างๆ

โครงงานพิเศษนี้จึงมุ่งที่จะศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโต และการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ซึ่งเป็นเชื้อที่ให้ปริมาณกรดแลกติก และอัตราการผลิตจำเพาะสูง เมื่อเทียบกับเชื้อ *Lactobacillus* สายพันธุ์อื่นๆ เช่น *Lactobacillus delbrueckii* ที่ใช้ปริมาณความเข้มข้นของกลูโคสเท่ากันในการหมัก (Siebold และคณะ ,1995) โดยจะทำการศึกษาในระดับฟลาสก์ เพื่อศึกษาถึงอิทธิพลของแหล่งอาหารต่อการเจริญและเพิ่มจำนวนของเชื้อนี้ได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

## 1.1 วัตถุประสงค์โครงงานพิเศษ

1.1.1 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหาร MRS และอาหารดัดแปลง

1.1.2 ศึกษาถึงอิทธิพลของแหล่งอาหารที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน และการผลิตกรดแลกติก ได้แก่ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**1.2 ขอบเขตของโครงงานพิเศษ**

โครงงานพิเศษนี้จะศึกษาถึงชนิดของแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ซึ่งเป็นแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (Homofermentative Lactic Acid Bacteria)

**1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

1.3.1 เพื่อทราบถึงอิทธิพลของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนต่าง ๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโต และการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

1.3.2 เพื่อใช้วัตถุดิบที่เหลือใช้จากการผลิตเนย (whey) มาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3.3 เพื่อหาสูตรอาหารที่ง่าย ราคาถูก ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการเพิ่มจำนวน รวมทั้งการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 2
# การตรวจเอกสาร

## 2.1 การจัดหมวดหมู่ของ *Lactobacillus*

***Lactobacillus* sp.** จัดอยู่ใน Section 14 Group 19 ของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Sneath และคณะ , 1994)

**Group 19** : Regular Nonsporing Gram-positive Rods ซึ่งแบ่งออกเป็นจีนัสต่างๆ ดังต่อไปนี้

1. Genus *Brochothrix*
2. Genus *Carnobacterium*
3. Genus *Erysipelothrix*
4. Genus *Kurthia*
5. Genus *Lactobacillus*
6. Genus *Listeria*
7. Genus *Renibacterium*

แต่ละ genus จะมีคุณสมบัติที่แตกต่างกันออกไปดังแสดงไว้ในตารางที่ 2.1

**Genus *Lactobacillus***

**ลักษณะทั่วไป** คือ เป็นแท่งยาวและหนา บางครั้งอาจพบว่ามีลักษณะโค้งงอ (bent rods) ไปจนกระทั่งเป็นท่อนสั้นๆ เช่น กลุ่มของ Coryneform Coccobacilli และจะต่อกันเป็นสายสั้นๆ บางสายพันธุ์มีลักษณะเป็น bipolar ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส และไม่มีระบบไซโตโครม ทำให้ไม่สามารถใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนได้ แต่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน จึงจัดเป็นพวก aerotolerant anaerobe ลักษณะการเจริญจะเจริญเติบโตบนผิวหน้าของอาหารแข็ง และจะเพิ่มการเจริญเติบโตโดยการกำจัดออกซิเจน (anaerobe) หรือในสภาวะที่มีออกซิเจนลดลง (reduced oxygen) และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 ถึง 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นพวกต้องการสารอาหารสมบูรณ์ (Complex nutritional requirement) คือ ต้องการกรดอะมิโน เพปไทด์บางชนิดเป็นแหล่งไนโตรเจน และต้องการวิตามิน เกลือแร่ กรดไขมันบางชนิด

**ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้** คือ 2 ถึง 53 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่ เหมาะสมที่สุด คือ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส

**พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญ** คือ 5.5 ถึง 6.2 เป็นพวก Aciduric จึงสามารถเจริญได้ที่ pH 5.0 หรือต่ำกว่านั้น และการเจริญจะลดลงในสภาวะที่เป็นกลาง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติที่แตกต่างกันของกลุ่ม Regular Nonsporing Gram Positive Rods[a] (Sneath และคณะ,1994)

| Characteristics | *Brochothrix* | *Carnobacterium* | *Caryophanon* | *Erysipelothrix* | *Kurthia* | *Lactobacillus* | *Listeria* | *Renibacterium* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Cell morphology | Slender rods, often filaments | Slender straight rods | Short rods in chains | Slender rods, often filaments | Regular rods in chains, cocci in old cultures | Rods, usually straight, sometimes cocco-bacilli | Short rods, often short chains and filaments | Short rods, often in pairs |
| Multicellular rods (trichomes) | – | – | + | – | – | – | – | – |
| Diameter of rods (μm) | 0.6–0.8 | 0.5–0.7 | 1.4–3.2 | 0.2–0.5 | 0.7–0.9 | 0.5–1.6 | 0.4–0.5 | 0.3–1.0 |
| Motility (if motile, peritrichate flagella) | – | D | +[b] | – | +[b] | –[c] | –[d] | – |
| Strictly aerobic | – | – | + | – | +[e] | – | – | + |
| Facultatively anaerobic or microaerophilic | + | + | – | + | – | + | + | – |
| Catalase reaction | + | – | + | – | + | –[f] | + | + |
| Major fermentation products from utilizable carbohydrates anaerobically (if NA, acidity from glucose is noted) | Mainly lactate | Mainly L(+)-lactate | NA (no acid) | Lactate | NA (no acid) | Mainly lactate; may give some acetate, ethanol, $CO_2$ | Lactate | NA (no acid) |
| Peptidoglycan: | | | | | | | | |
| Group[g] | A | ND | A | B | A | A | A | A |
| Diamino acid | *m*-DAP | *m*-DAP | Lys | Lys | Lys | Lys, *m*-DAP, Orn | *m*-DAP | Lys |
| Major fatty acids[h] | S, A, I | S, U, sometimes C | ND | S, A, I, U | S, A, I | S, U, sometimes C | S, A, I | A |
| Major menaquinone[i] | MK-7 | ND | MK-6 | None | MK-7 | None[j] | MK-7 | MK-9 |
| Habitat | Meat products, nonpathogenic | Food products; one species is a pathogen of fish | Cow dung, nonpathogenic | Widespread, may be pathogenic in vertebrates | Animal feces, meat products, nonpathogenic | Widespread in fermentable materials, rarely pathogenic | Widespread in decaying matter, may be vertebrate pathogen | Pathogen in salmonid fish |

[a] Symbols: +, 90% or more strains are positive; –, 90% or more of strains are negative; D, substantial proportion of species differ; NA, not applicble; ND, not determined.

[b] Numerous flagella.

[c] Rarely motile.

[d] Motile at 20–25°C, poorly motile at 37°C.

[e] Rhizoid colonies.

[f] Some strains weakly positive.

[g] Symbolism of Schleifer and Kandler (Bacteriol. Rev. *36:* 407–477, 1972).

[h] S, straight-chain saturated; U, monounsaturated; A, *anteiso*-methyl branched; I, *iso*-methyl branched; C, cyclopropane ring fatty acids.

[i] Symbolism of Collins and Jones (Microbiol. Rev. *45:* 316–354, 1981).

[j] *L. mali* contains MK-8 and MK-9; a menaquinone is also found in *L. casei* subsp. *rhamnosus.*

**ขนาด** เซลล์มีความกว้าง 0.5 ถึง 1.2 ไมโครเมตร และมีความยาว 1.0 ถึง 10.0 ไมโครเมตร และขนาดของโคโลนี 2 ถึง 5 มิลลิเมตร บนอาหารแข็ง

**การเคลื่อนที่** ส่วนใหญ่เคลื่อนที่ไม่ได้ (nonmotile) และบางสายพันธุ์สามารถเคลื่อนที่ได้โดยอาศัย peritrichous flagella

**เมแทบอลิซึม** เป็นพวก obligately saccharoclastic คือ ทำการหมัก และเปลี่ยนน้ำตาลในรูป simple carbohydrates เป็นกรดแลกติก

**การจัดกลุ่มของ *Lactobacillus***

1. แบ่งตามความสามารถในการผลิตกรดแลกติก
2. แบ่งตามลักษณะการแสดงออก (Phenotypic characteristic)

*Lactobacillus* สามารถแบ่งตามความสามารถในการผลิตกรดแลกติก ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ

1. Homofermentative Lactic acid bacteria
2. Heterofermentative Lactic acid bacteria

**Homofermentative Lactic acid bacteria**

เมื่อทำการหมักน้ำตาลแล้วได้ผลผลิตเป็นกรดแลกติกเป็นส่วนใหญ่ และมีผลผลิตอื่นๆ เช่น กรดแอซีติก คาร์บอนไดออกไซด์ และสารอื่นๆ อีกเล็กน้อย

ตัวอย่างของ Lactic acid bacteria กลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus casei , L. bulgaricus* เป็นต้น (พวงพร ,2530)

**Heterofermentative Lactic acid bacteria**

เมื่อทำการหมักน้ำตาลแล้วได้ผลผลิตเป็นกรดแลกติก กรดแอซีติก กรดโพรพิโอนิก คาร์บอนไดออกไซด์ แอลกอฮอล์ ฟอร์เมต หรือ ซักซิเนต ในปริมาณใกล้เคียงกัน

ตัวอย่างของ Lactic acid bacteria กลุ่มนี้ได้แก่ *Lactobacillus fermenti* ซึ่งทำให้เนยแข็งเสีย , *Lactobacillus trihodes* ซึ่งทำให้ไวน์เสีย เป็นต้น (พวงพร ,2530)

**แหล่งที่พบ** คือ ในอาหารพวกผลิตภัณฑ์นม (dairy products) ผลิตภัณฑ์จากธัญพืช (grain products) ผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์และปลา (meat and fish products) น้ำ sewage เบียร์ ไวน์ ผลไม้และน้ำผลไม้ ผักดองต่างๆ เช่น กะหล่ำปลีดอง (sauerkraut) , silage , sour dough และ mash (ดังตารางที่ 2.2)

พบว่า *Lactobacillus* บางชนิดเป็น normal flora ในปาก (ทำให้เกิดฟันผุ) ช่องคลอด (vagina) และยังพบในระบบย่อยอาหาร เช่น ในลำไส้ (Stiles และ Holzapfel, 1997) (ช่วยในการย่อยอาหาร) ของสัตว์เลือดอุ่นรวมทั้งมนุษย์

กลุ่มที่ก่อให้เกิดโรคพบได้น้อย กลุ่มนั้นคือ *Listeria monocytogenes* กลุ่มนี้จะปนเปื้อนในอาหาร โดยเฉพาะ dairy products และ processed delitessen meats และยังสามารถเจริญเติบโตในตู้เย็นได้ แต่หากเชื้อชนิดนี้ติดเชื้อ (infect) เข้าไปในหญิงมีครรภ์อาจทำให้ทารก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

พิการแต่กำเนิด หรือทำร้ายตัวอ่อน (fetus) ได้ นอกจากนี้ยังอาจพบ *Lactobacillus casei* ใน sourdough bread และ brined cheese โดยมักเป็นสาเหตุให้เกิดการเน่าเสียของเนยแข็งได้ โดยเกิดจากซิเตรต และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (Hammes และ Vogel,1995)

***Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*** (Sneath และคณะ, 1994) ปัจจุบันเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า ***Lactobacillus rhamnosus*** (Stiles และ Holzapfel, 1997) (รูปที่ 2.1)

เป็นพวก homofermentative lactobacilli เจริญได้ดีทั้งที่อุณหภูมิ 15 และ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งโดยปกติที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส *L. casei* subspecie อื่นๆ ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ยกเว้น subspecie *rhamnosus* เท่านั้น

น้ำตาลที่สามารถใช้ในการหมักเป็นกรดแลกติก ได้แก่ กลูโคส กาแล็กโทส เซลโลไบโอส ฟรักโทส แล็กโทส มอลโทส กลูโคเนต แมนนิทอล แมนโนส แรมโนส ไรโบส ซอร์บิทอล ซูโครส และ amygladin ดังตารางที่ 2.3

**ตารางที่ 2.2** แสดงแหล่งที่พบของจีนัส *Lactobacillus* (Stiles และ Holzapfel, 1997)

| |
|---|
| **มนุษย์ (Humans)** |
| ช่องปาก (oral cavity) |
| ระบบลำไส้ (intestinal tract) |
| ช่องคลอด (vagina) |
| **สิ่งมีชีวิตอื่น ๆ (Other habitats)** |
| พืชและส่วนประกอบของพืช (plants and plant materials) |
| ดิน, น้ำ, น้ำทิ้ง (sewage) และ มูลสัตว์ (manure) |
| ผลิตภัณฑ์อาหารหมัก (นม, เนื้อสัตว์ และผัก) |
| ผลิตภัณฑ์ธัญพืช (cereal products) |
| หญ้าหมัก (silage) |
| **อาหารเสีย (Food spoilage)** |
| เบียร์ |
| ผลไม้ (fruit) และเมล็ดข้าวบด (grain mashes) |
| ปลาบด (marinated fish) |
| Sugar processing |
| นม |
| เนื้อและผลิตภัณฑ์เนื้อ |
| เครื่องดื่มที่ได้จากการหมัก (fermented beverages) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 2.1** แสดงลักษณะรูปร่างของ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.3** การใช้น้ำตาลของ Homofermentative *Lactobacillus* (Sneath และคณะ, 1994)

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

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

**Genus *Lactobacillus*** (Stiles และ Holzapfel, 1997)

แบ่งกลุ่มตามลักษณะของการหมัก (fermentation characteristic) ดังตารางที่ 2.4

1. Obligately homofermentative
2. Facultatively heterofermentative
3. Obligately heterofermentative

Lactobacilli ในกลุ่มที่ 1,2 และบางส่วนของกลุ่มที่ 3 ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร แต่ในกลุ่มที่ 3 เกี่ยวพันกับการทำให้อาหารเสีย

*Lactobacillus* และ *Erysipelothrix* จัดเป็นพวก Facultative anaerobe และไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส

**Lactobacilli** เป็นพวก strictly fermentative และต้องการอาหารสมบูรณ์ เจริญในแหล่งที่อยู่ต่างๆ ได้ (ดังตารางที่ 2.2) ส่วนใหญ่จะเป็นพวกทนกรด (aciduric) หรือ ชอบกรด (Acidophilic) ซึ่งจะผลิตกรดทำให้อาหารที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นส่วนประกอบ ทำให้ค่าพีเอชประมาณ 4.0 เป็นผลให้แบคทีเรียอื่น ๆ ถูกทำลาย ซึ่งเป็นการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ไปด้วย ค่าพีเอชสูงสุดที่เชื้อ *Lactobacillus* สามารถเจริญได้ คือ 7.2

ปัจจุบัน *Lactobacillus* มากกว่า 50 สายพันธุ์ รวมถึงแบคทีเรียในกลุ่ม heterofermentative 5 สายพันธุ์ ถูกจัดอยู่ในจีนัสใหม่ที่มีชื่อเรียกว่า *Weissella* (Collin และคณะ, 1993)

**Obligately homofermentative Lactobacilli**

ในกลุ่มนี้จะใช้น้ำตาลกลูโคสในการผลิตกรดแลกติก แต่ไม่ใช้น้ำตาลเพนโทส และกลูโคเนต เช่น พวก *L. acidophilus* (*L. jugurti*) (Pot และคณะ,1994), *L. delbrueckii*, และ *L. helveticus* ที่รู้จักกันดี คือ *L. farciminis* และ *L. kefiranofaciens* (เป็นสายพันธุ์ใหม่ที่แยกได้มาจากเมล็ดคีเฟอร์ (Takizawa และคณะ, 1994))

มีประโยชน์ในการทำอาหารหมักดอง และ ผลิตภัณฑ์นมหมัก ซึ่งใช้อุณหภูมิสูงในการหมัก (45 ถึง 50 องศาเซลเซียส) เช่น *L. delbruecki* subsp. *bulgaricus* ซึ่งใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตโยเกิร์ต

**Facultatively heterofermentative**

ใช้น้ำตาลเฮกโซส ในการผลิตกรดแลกติก และผลิตแก๊สจากการใช้น้ำตาลกลูโคเนต (ไม่ได้ผลิตจากน้ำตาลกลูโคส)

*Lactobacilli* ในกลุ่มนี้สามารถใช้น้ำตาลเพนโทสโดยอาศัยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (Phosphoketolase) ในการผลิตกรดแลกติก และกรดแอซีติก

ตัวอย่างของ *Lactobacillus* ในกลุ่มนี้คือ *L. casei*, *L. plantarum*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.4** แสดงการแบ่งกลุ่มจีนีส *Lactobacillus* โดยอาศัยลักษณะการแสดงออก (Phenotypic characteristic) (Hammes และ Vogel,1995) (Pot และคณะ,1994) (Vandamme และคณะ,1996)

| Group 1 | Group 2 | Group 3 |
|---|---|---|
| Obligate homofermenters | Facultative heterofermenters | Obligate heterofermenters |
| *L. acidophilus* | *L. acetotolerans* | *L. brevis* |
| *L. amylophilus* | *L. agilis* | *L. buchneri* |
| *L. amylovorus* | *L. alimentarius* | *L. collinoides* |
| *L. aviarius* | *L. bifermentans* | *L. fermentum* |
| subsp. *araffinosus* | *L. casei* | *L. fructivorans* |
| subsp. *aviarius* | *L. coryniformis* | *L. fructosus*[b] |
| *L. crispatus* | subsp. *coryniformis* | *L. hilgardii* |
| *L. delbrueckii* | subsp. *torquens* | *L. kefir* |
| subsp. *bulgaricus* | *L. curvatus* | *L. malefermentans* |
| subsp. *delbrueckii* | *L. graminis* | *L. oris* |
| subsp. *lactis* | *L. hamsteri* | *L. panis*[a] |
| *L. farciminis* | *L. homohiochii* | *L. parabuchneri* |
| *L. gallinarum* | *L. intestinalis* | *L. parakefir*[a] |
| *L. gasseri* | *L. murinus* | *L. pontis*[a] |
| *L. helveticus* | *L. paracasei* | *L. reuteri* |
| *L. jensenii* | subsp. *paracasei* | *L. sanfrancisco* |
| *L. johnsonii* | subsp. *tolerans* | *L. suebicus* |
| *L. kefiranofaciens* | *L. paraplantarum*[a] | *L. vaccinostercus* |
| *L. kefirgranum*[a] | *L. pentosus* | *L. vaginalis* |
| *L. mali* | *L. plantarum* | |
| *L. ruminis* | *L. rhamnosus* | |
| *L. salivarius* | *L. sake* | |
| subsp. *salicinus* | | |
| subsp. *salivarius* | | |
| *L. sharpeae* | | |

[a] Species added since the review by Pot et al. (1994).
[b] *Lb. fructosus* classified with the *Leuconostoc* group of lactic acid bacteria.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**Obligately heterofermentative**

ใช้น้ำตาลเฮกโซสในการผลิตกรดแลกติก กรดแอซีติก และ/หรือ เอทานอล และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยแก๊สที่เกิดขึ้นมาจากการใช้น้ำตาลกลูโคส

กลุ่มนี้ที่สำคัญ คือ *L. sanfrancisco* ซึ่งใช้น้ำตาลมอลโทสในการผลิตกรดแลกติกและกรดแอซิติก และทำให้เกิดสารประกอบที่มีกลิ่นใน sourdough bread

*Lactobacillus* ในกลุ่มนี้จะทำให้เกิดการเน่าเสียของอาหาร เช่น *L. bifermentans* เป็นสาเหตุให้เกิด cracking defect ใน Gouda และ Edam cheeses เนื่องจากแก๊สที่ผลิตขึ้น *L. brevis* ทำให้เกิดการเน่าเสียของผลไม้รสเปรี้ยว (citrus fruits), ไวน์ และ เบียร์

*L. fructivorans*, *L. brevis* และ *L. bruchneri* เป็นสาเหตุให้เกิดการเน่าเสียในมายองเนส (mayonnaise)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.2 ประโยชน์ของ *Lactobacillus***

2.2.1 ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารหมักพวกผัก ผลไม้ เช่น การหมักแตงกวาดอง ขิงดอง กะหล่ำปลีดอง โดย lactic acid bacteria ที่มีบทบาทสำคัญในการหมัก คือ *L. fermenti* , *L. plantarum* , *L. viridescens* (วิเชียร, 2537)

2.2.2 ใช้ในอุตสาหกรรมนมและผลิตภัณฑ์นม เช่น นมเปรี้ยว โยเกิร์ต เนยแข็ง (cheese) lactic acid bacteria ที่มีบทบาทสำคัญ คือ *L. lactis* , *L. casei*

2.2.3 ใช้ในอุตสาหกรรมหมักอาหารพวกเนื้อสัตว์ (Stiles และ Holzapfel, 1997)

2.2.4 ใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรมอาหารหมักไส้กรอก โดย lactic acid bacteria ที่มีบทบาทสำคัญ คือ *L. lactis* และ *Pediococcus cerevisiae*

2.2.5 การผลิตเซลล์จุลินทรีย์ (ลัดดาวัลย์ , 2536) โดยใช้เป็นหัวเชื้อแลกติกเริ่มต้น ซึ่งนิยมมากที่สุดในระดับอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น

2.2.5.1 อุตสาหกรรมนม และผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น โยเกิร์ต เนยแข็ง ครีมเปรี้ยว และอื่นๆ เพื่อทำให้นมมีอายุการเก็บมากขึ้น และมีกลิ่นชวนบริโภคที่ผิดแปลกไป โดยหัวเชื้อเริ่มต้นแลกติกจะเปลี่ยนน้ำตาลแล็กโทสในนมไปเป็นกลูโคส กาแล็กโทส ซึ่งจะถูกย่อยต่อเป็นกรดแลกติก ทำให้โปรตีนนมตกตะกอน นอกจากนี้หัวเชื้อเริ่มต้นแลกติกที่ให้เข้าไปในนมยังทำให้เกิดเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีกลิ่นรส และเนื้อสัมผัสแตกต่างกันออกไป

2.2.5.2 หัวเชื้อเริ่มต้นแลกติกในอุตสาหกรรมไส้กรอก เพื่อเปลี่ยนเนื้อให้เป็นผลิตภัณฑ์เนื้อต่างๆ เช่น salami , bologna , peperoni , frankfurter และอื่นๆ ที่มีกลิ่นรส สี และเนื้อสัมผัสชวนรับประทานต่าง ๆ กันออกไป โดย lactobacillus และ streptococci จะสร้างกรดแลกติกที่เป็นวัตถุกันเสีย (preservative) ทำให้ผลผลิตที่ได้มีอายุการเก็บรักษานานขึ้น ขณะเดียวกัน micrococci จะช่วยเปลี่ยน myoglobin ไปเป็น nitrosomyoglobin ซึ่งทำให้เนื้อมีสีแดง lactic acid bacteria ยังผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ออกมาที่ผิวหน้าของไส้กรอก ซึ่งช่วยทำให้จุลินทรีย์อื่นที่ไม่ต้องการบางชนิดเจริญได้ ในขณะเดียวกัน micrococci จะสร้างเอนไซม์คาตาเลสที่มีประสิทธิภาพในการทำลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ในยามที่ไม่ต้องการ (Creager และคณะ ,1994 ) นอกจากอุตสาหกรรมไส้กรอกแล้ว ในยุโรปยังมีการนำหัวเชื้อเริ่มต้นแลกติกมาใช้ในการผลิตอาการหมักอื่นๆ อีกมากมาย ดังแสดงในตารางที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.5** การใช้หัวเชื้อในการผลิตอาหารหมักในยุโรป (วิเชียร , 2537)

| ชื่ออาหาร | วัตถุดิบ | จุลินทรีย์ที่ใช้ | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | แบคทีเรีย | ยีสต์ | รา | หัวเชื้อแลคติก |
| Sauerkraut | กะหล่ำปลีขาว | | | | + |
| ผักดองอื่นๆ | ผักอื่นๆ | | | | + |
| มะกอก | มะกอกเขียวและดำ | | | | + |
| น้ำผัก | ผักต่างๆ | | | | ++ |
| โยเกิร์ต เนยแข็งจากถั่วเหลือง | โปรตีนจากถั่วเหลือง | | | | +++ |
| ซีอิ๊ว | ถั่วเหลือง | | X | x | |
| Sour dough | แป้งสาลี,แป้งไรด์ | | X | | ++ |
| Kwass | มอลต์,ขนมปัง | | X | | |
| โกโก้ | | ACB[1] | X | | |
| กาแฟ | | | X | | |
| ไวน์ | องุ่น | | X | | +++ |
| เบียร์ | มอลต์ | | X | | +++ |
| ไส้กรอก | เนื้อสัตว์ต่างๆ | MIC[2] | | | 3 |
| นมเปรี้ยว | นม | | | | +++ |
| โยเกิร์ต | นม | | | | +++ |
| เนยเหลว | ครีม | | | | +++ |
| เนยแข็ง | นม | PRO[4] | | | +++ |
| เนยแข็งเชื้อรา | นม | | X | | +++ |

1 Acetic acid bacteria
2 Micrococci and Staphylococci
3 ขึ้นอยู่กับประเทศผู้ผลิต
4 Propionibacteria

2.2.6 ผลิตแบคเทอริโอซิน (สารปฏิชีวนะที่อยู่ในรูปเพปไทด์ หรือโปรตีนสามารถสามารถยับยั้งแบคทีเรียได้)ทำหน้าที่เป็นวัตถุกันเสียในอาหาร เช่น ไนซิน (ผลิตในอุตสาหกรรม) (วิเชียร, 2537) ตัวอย่างแบคเทอริโอซินที่ผลิตจาก lactic acid bacteria แสดงในตารางที่ 2.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.6** แบคเทอริโอซินที่ผลิตจากlactic acid bacteria (Tortola และคณะ , 1995 และ วิเชียร , 2537)

| แบคเทอริโอซิน | Lactic Acid Bacteria | การทำลายแบคทีเรีย |
|---|---|---|
| ไนซิน | *Lactobacillus lactis* | แบคทีเรียแกรมบวก |
| แลคโตคอคซิน | *Lactobacillus lactis* ADRI 85L030 | *Clostridium tyrobutyricum* , *Lactobacillus helveticus* , *Streptococcus thermophilus* |
| แลคโตซิน เอส (Lactocin) | *Lactobacillus sake*145 | แบคทีเรียแกรมบวก, *Pediococcus, Leuconostoc* และ *Lactobacillus* |
| แลคโตซิน เอฟ | *Lactobacillus acidophilus* | *Enterococcus faecalis* |
| คาร์โนซิน | *Carnobacterium piscicola U149* | *Carnobacterium* ,Lactobacilli , Pediococci , Lactococci |
| แลคตาซิน บี | *Lactobacillus acidophilus* | *Lactobacillus delbrueckii* |
| บรีวิซิน 37 | *Lactobacillus brevis* | *Lactobacillus helveticus* , *Lactobacillus brevis* , *P. damnosus* , *Leuconostoc oenos* |
| เคซีซิน 80 | *Lactobacillus casei* | *Lactobacillus casei* |
| แลคติซิน 60 | *Lactobacillus delbrueckii* | *Lactobacillus delbrueckii* |
| แพลนทาริซิน 60 | *Lactobacillus plantarum* | *Lactobacillus lactis, Lactobacillus plantarum* , *L.* spp. , *Leuconostoc* spp. , *Pediococcus* spp. , *Enterococcus faecalis* |
| แพลนทาซิน | *Lactobacillus plantarum* | Endospore germination |
| มีเซนเทอโรซิน 5 | *Leuconostoc mesenteroides* | *Listeria monocytogenes* |
| พีดิโอซิน | *Pediococcus acidilactici* | แบคทีเรียแกรมบวก , endospore germination |
| ฮิราอีซิน เอส | *Enterococcus hirae* | *Listeria monocytogenes* |
| โพรพิโอนิซิน | *Propionibacterium thoenii* | แบคทีเรียแกรมลบ |

2.2.7 ใช้ทางด้านการแพทย์ เพื่อเพิ่มภูมิคุ้มกันของเซลล์เจ้าบ้าน (host) เพื่อต่อต้านการบุกรุกของเซลล์จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ (Wood ,1992)

2.2.8 ใช้ควบคุมจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคในพืช

2.2.9 มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น ยับยั้งการเจริญของเชื้อโรคต่างๆ ที่เข้าสู่ร่างกาย เช่น *E. coli* , *Pseudomonas* spp.

2.2.10 มีความสามารถในการควบคุมการเกิดมะเร็งโดยทำหน้าที่เป็น Antitumour โดยมักพบจุลินทรีย์พวกนี้ได้ในนมหมัก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.11 เป็น probiotic คือ ใช้ประโยชน์จากตัวจุลินทรีย์เป็นอาหารเสริมให้แก่ร่างกาย ช่วยในการย่อยอาหารในระบบย่อยอาหาร เช่น การนำ *Bifidobacterium, L. acidophilus, L. casei* (Stiles และ Holzapfel, 1997) ทำการผลิตเป็นแคปซูลใช้รับประทานเพื่อเพิ่มเชื้อจุลินทรีย์ในลำไส้เล็ก ช่วยย่อยอาหาร หรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆที่ปนเปื้อนมากับอาหาร ตัวอย่างดังรูปที่ 2.2

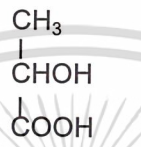
**รูปที่ 2.2** ตัวอย่างของการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ในรูปแคปซูล (probiotic)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.3 กรดแลกติก

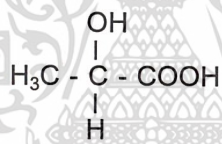
กรดแลกติกที่ผลิตโดยกระบวนการหมักนั้นมีอยู่ 2 รูปแบบ คือ L(+) และรูป D(-) ซึ่งมีสูตรโครงสร้างทางเคมีต่างกัน แบคทีเรียบางชนิดจะผลิตได้เพียง 1 รูปแบบ ขณะที่แบคทีเรียบางชนิดผลิตได้ทั้ง 2 รูปแบบ ดังตารางที่ 2.7 โดยรูปของกรดแลกติก และปริมาณของกรด แลกติก นั้นขึ้นอยู่กับ ชนิดของจุลินทรีย์ ชนิดอาหารและสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ

แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกได้จะเปลี่ยนกลูโคสให้กลายเป็นไพรูเวตโดยกระบวนการไกลโคไลซีส (รูปที่ 2.3) แล้วเปลี่ยนไพรูเวตให้เป็นกรดแลกติก โดยกรดแลกติกมีสูตรโครงสร้างดังนี้

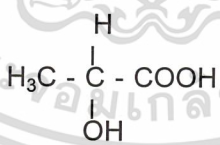


รูปแบบของกรดแลกติกมี 2 รูปแบบคือ L(+) และรูป D(-) ซึ่งต่างกันที่โครงสร้างทางเคมี

สูตรโครงสร้างกรดแลกติกรูป L(+)



สูตรโครงสร้างกรดแลกติกรูป D(-)

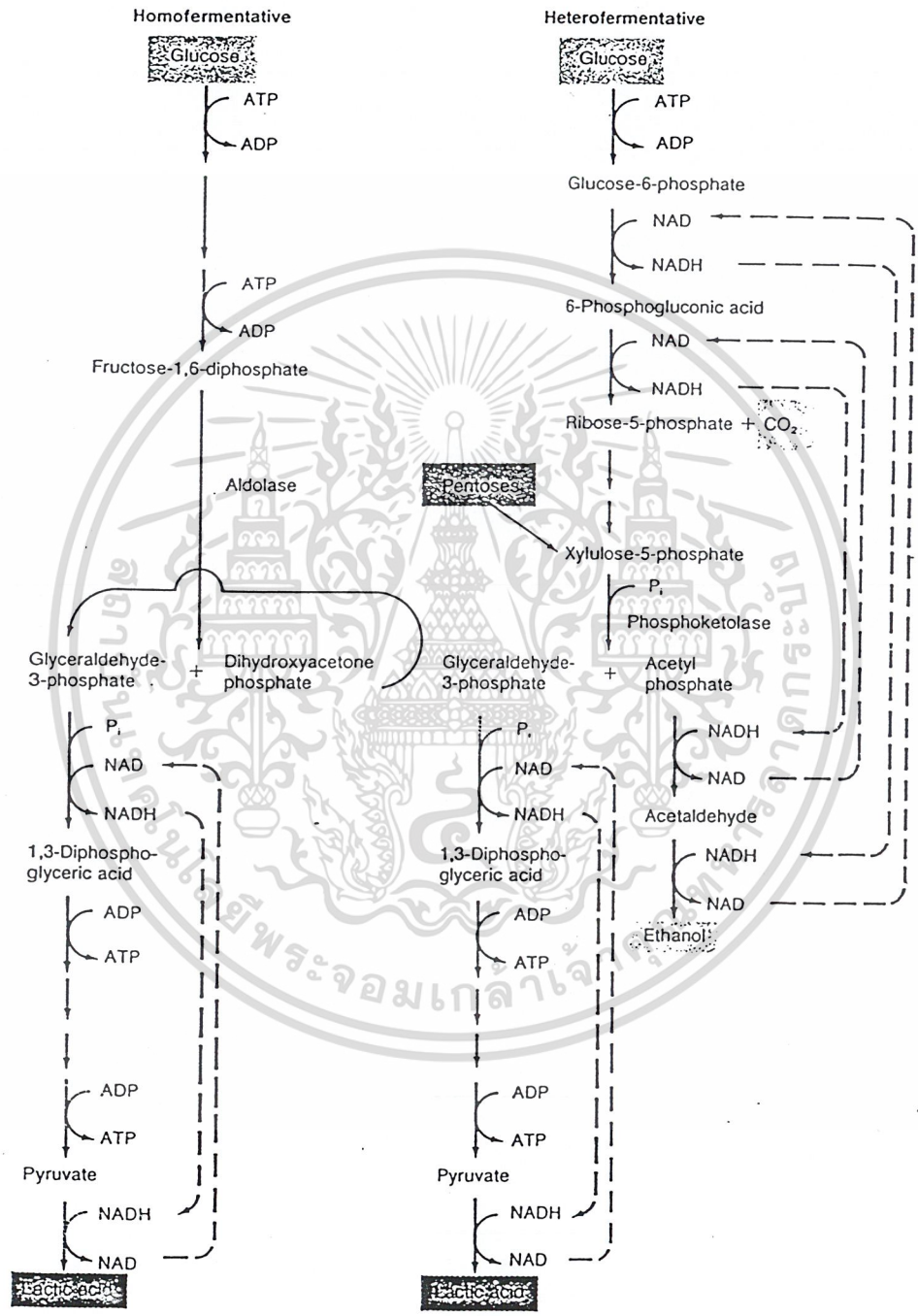


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 2.7** แสดงรูปของกรดแลกติกที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ (พวงพร, 2530)

| ชนิดจุลินทรีย์ | | รูปแบบของกรดแลกติก |
|---|---|---|
| **โฮโมเฟอร์เมนเตตีฟ** | | |
| *Streptococcus* | *sp.* | L(+) |
| *Lactobacillus* | *lactis* | D(-) |
| *Lactobacillus* | *plantarum* | DL |
| *Lactobacillus* | *thermophilus* | L(+) |
| *Lactobacillus* | *bulgaricus* | DL |
| *Lactobacillus* | *casei* | L(+) |
| *Pediococcus* | sp. | DL |
| *Bacillus* | sp. | L(+) |
| *Clostridium* | sp. | DL |
| **เฮทเทอโรเฟอร์เมนเตตีฟ** | | |
| *Lactobacillus* | *lactis* | DL |
| *Leuconostoc* | sp. | D(-) |
| *Microbacterium* | sp. | L(+) |
| *Rhizopus* | sp. | L(+) |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 2.3** การผลิตกรดแลกติกโดยแบคทีเรีย (Brock และ Mandigan,1988)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 2.4 ส่วนประกอบของจุลินทรีย์

จุลินทรีย์แต่ละกลุ่มมีส่วนประกอบแตกต่างกันไปดังแสดงในตารางที่ 2.8

**ตารางที่ 2.8** ส่วนประกอบของจุลินทรีย์ (Stanbury และ Whitaker,1984)

| ธาตุองค์ประกอบเซลล์ | จุลินทรีย์ | | |
|---|---|---|---|
| | แบคทีเรีย | ยีสต์ | เชื้อรา |
| คาร์บอน | 50 – 53 | 45 – 5.0 | 40 – 63 |
| ไฮโดรเจน | 7.0 | 7.0 | - |
| ไนโตรเจน | 12 – 15 | 7.5 – 11 | 7 – 10 |
| ฟอสฟอรัส | 2.0 – 3.0 | 0.8 – 2.6 | 0.4 – 4.5 |
| กำมะถัน | 0.2 – 1.0 | 0.01 – 0.24 | 0.1 – 0.5 |
| โปแตสเซียม | 1.0 – 4.5 | 1.0 – 4.0 | 0.2 – 2.5 |
| โซเดียม | 0.5 – 1.0 | 0.01 – 0.1 | 0.02 – 0.5 |
| แคลเซียม | 0.01 – 1.1 | 0.1 – 0.3 | 0.1 – 1.4 |
| แมกนีเซียม | 0.1 – 0.5 | 0.1 – 0.5 | 0.1 – 0.5 |
| คลอไรด์ | 0.5 | - | - |
| เหล็ก | 0.02 – 0.2 | 0.01 – 0.5 | 0.1 – 0.5 |

จากข้อมูลของธาตุที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์จุลินทรีย์ชนิดต่างๆ จะเป็นแนวทางการจัดการเกี่ยวกับการเตรียมสูตรอาหาร โดยอย่างน้อยที่สุดในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ จะต้องมีปริมาณธาตุต่างๆ ไม่น้อยกว่าปริมาณของธาตุที่เป็นองค์ประกอบของเซลล์นั้น ซึ่ง Cooney (1981) ได้แสดงให้เห็นว่า ธาตุฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม มีอยู่เพียงพอในอาหารทั่วไป แต่ที่ควรระวังคือ สังกะสี และทองแดงซึ่งมีอยู่ต่ำ ต้องเติมให้เพียงพอ เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดไม่สามารถสร้างสารอาหารจำเพาะที่มีความจำเป็นได้เช่น กรดอะมิโน วิตามิน หรือนิวคลีโอไทด์ จึงจำเป็นต้องเติมลงไปให้เพียงพอ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**2.5 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญของ *Lactobacillus*** (Creager และคณะ,1994)

**2.5.1 ปัจจัยทางกายภาพ (Physical factors)** ได้แก่

2.5.1.1 พีเอช (pH)

จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญที่สุดแตกต่างกัน โดยทั่วไปพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญนี้มักมีค่าเป็นกลาง หรือใกล้เคียง (พีเอช 7.0) และส่วนใหญ่จะสามารถเจริญได้ในช่วงพีเอชสูงและต่ำกว่าพีเอชที่เหมาะสมไม่เกิน1หน่วย *Lactobacillus* sp. จัดเป็นแบคทีเรียชนิดที่ชอบกรด (Acidophiles) ซึ่งสามารถผลิตกรดแลกติกได้ แต่สามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่เป็นกรดไม่มากนัก (mild acidity) เท่านั้น

ผลกระทบของพีเอชที่มีต่อการเจริญของจุลินทรีย์มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกรดอินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และความสามารถในการป้องกันของผนังเซลล์ พบว่าใน *Lactobacillus* และจุลินทรีย์อื่นๆที่ผลิตกรดอินทรีย์ในระหว่างการหมัก จะทำให้เกิดการสะสมของกรดอินทรีย์ขึ้นในอาหารซึ่งมีผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อเองด้วย

2.5.1.2 อุณหภูมิ (Temperature)

*Lactobacillus* sp. เป็นแบคทีเรียพวก mesophile แต่ในบางครั้งก็จัดอยู่ในพวก facultative thermophile ช่วงอุณหภูมิที่สามารถเจริญได้ คือ 2 ถึง 53 องศาเซลเซียส แต่ช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุด คือ 30 ถึง 40 องศาเซลเซียส

2.5.1.3 ออกซิเจน (Oxygen)

*Lactobacillus sp.* เป็นแบคทีเรียพวก aerotolerant anaerobe ซึ่งหมายถึง แบคทีเรียที่สามารถเจริญเติบโตได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน ได้รับพลังงานจากการหมัก แต่ไม่ได้ใช้ออกซิเจนในการเมแทบอลิซึม แม้ว่าจะมีออกซิเจนอยู่ในสภาพแวดล้อมรอบๆ เซลล์ก็ตาม ซึ่งจะแตกต่างจากพวก microaerophile และ facultative anaerobe คือ พวก microaerophile นั้นจะสามารถเจริญได้ดีที่สุดในสภาวะที่มีออกซิเจนเล็กน้อย โดยจะเจริญใต้ผิวหน้าของอาหารในบริเวณที่มีออกซิเจนในปริมาณที่เหมาะสม ส่วนพวก facultative anaerobe หมายถึง จุลินทรีย์ที่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่มีออกซิเจนโดยใช้วิถีการเมแทบอลิซึมแบบหนึ่ง แต่เมื่อเจริญในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนจะใช้วิถีการเมแทบอลิซึมอีกแบบหนึ่ง

2.5.1.4 ความชื้น (Moisture)

โดยปกติเซลล์ทุกเซลล์ที่มีเมแทบอลิซึมที่สมบูรณ์มีความต้องการสภาวะแวดล้อมที่มีน้ำ เซลล์เดี่ยวๆ มีการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง ซึ่งแตกต่างกับสิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ที่มีผิวปกคลุมอยู่และมีของเหลวภายในอีกด้วย เซลล์เดี่ยว ๆ (จุลินทรีย์) ส่วนใหญ่จะมีชีวิตอยู่ได้เพียงไม่กี่ชั่วโมงเท่านั้นในสภาวะที่ปราศจากความชื้น มีเพียงแต่จุลินทรีย์ที่สร้างสปอร์ และสปอร์ของมันเท่านั้นที่สามารถอยู่ได้ในสภาวะที่แห้งแล้ง ดังนั้น *Lactobacillus* sp.ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ไม่สร้างสปอร์จึงไม่สามารถทนอยู่ได้ในสภาวะที่แห้งแล้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.1.5 รังสี (Radiation)

พลังงานจากรังสี เช่น รังสีอัลตราไวโอเลต สามารถทำให้เกิดการกลาย (การเปลี่ยนแปลงของ DNA) และฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ แต่อย่างไรก็ตามในจุลินทรีย์บางชนิด ก็มีรงควัตถุที่สามารถกรองรังสีและช่วยปกป้อง DNA จากการทำลายได้อีกด้วย และจุลินทรีย์บางชนิดก็มีระบบเอนไซม์ที่ใช้ซ่อมแซม DNA ที่ถูกทำลายได้อีกด้วย

**2.5.2 ปัจจัยทางด้านอาหาร (Nutritional factors)** ได้แก่

2.5.2.1 แหล่งคาร์บอน (Carbon Source)

แบคทีเรียจำนวนมากใช้สารประกอบคาร์บอนส่วนใหญ่ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ และบางส่วนเป็นแหล่งพลังงาน ส่วนจุลินทรีย์ที่สังเคราะห์แสงจะรีดิวส์คาร์บอนไดออกไซด์เพื่อสังเคราะห์กลูโคส และสารประกอบอินทรีย์อื่นๆ จุลินทรีย์ทั้งชนิดออโตโทรป และเฮทเทอโรโทรปซึ่งรวมถึง *Lactobacillus* จะได้พลังงานจากการย่อยสลายกลูโคสโดยวิถีไกลโคไลซิส การหมัก และวัฏจักรเครป และใช้สารตัวกลาง (intermediates) ในวิถีเหล่านี้ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ด้วย

2.5.2.2 แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen Source)

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดรวมทั้งจุลินทรีย์ต้องการไนโตรเจนเพื่อใช้ในการสังเคราะห์เอนไซม์ กรดนิวคลีอิก และโปรตีนต่าง ๆ จุลินทรีย์บางชนิดใช้ไนโตรเจนจากแหล่งไนโตรเจนอนินทรีย์ และมีจุลินทรีย์บางชนิดที่ได้รับพลังงานจากการเมแทบอไลต์สารประกอบไนโตรเจนอีกด้วย จุลินทรีย์จำนวนมากรีดิวส์ไนเตรตไอออน ($NO_3^-$) ไปเป็นกลุ่มอะมิโน ($-NH_2$) และใช้กลุ่มอะมิโนเพื่อสร้างกรดอะมิโน บางชนิดสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนได้ครบทั้ง 20 ชนิดที่พบในโปรตีน ในขณะที่จุลินทรีย์อื่นๆ ผลิตกรดอะมิโนเพียงบางชนิด หรือเพียงชนิดเดียวออกมาสู่อาหาร จุลินทรีย์ที่มีความจำเพาะบางชนิดต้องการกรดอะมิโนทั้ง 20 ตัว และสารอื่นๆ ที่จำเป็นบางชนิดในอาหาร ส่วนจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคจะได้กรดอะมิโนที่ใช้สังเคราะห์โปรตีนจากเซลล์ของมนุษย์หรือสิ่งมีชีวิตอื่นๆ ที่มันอาศัยอยู่ กรดอะมิโนแต่ละตัวที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น หรือที่ได้จากอาหารจะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน ในวิธีที่คล้ายคลึงกันนั้นไพรีน และไพริมิดีนก็จะถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ DNA และ RNA กระบวนการที่โปรตีน และกรดนิวคลีอิกถูกสังเคราะห์ขึ้นนั้นเกี่ยวข้องขึ้นกับข้อมูลทางพันธุกรรมที่อยู่ในเซลล์

2.5.2.3 ซัลเฟอร์และฟอสฟอรัส (Sulfur and Phosphorus)

นอกเหนือจากคาร์บอน และไนโตรเจนแล้วจุลินทรีย์ยังต้องการแร่ธาตุอื่นๆ อีก โดยเฉพาะซัลเฟอร์และฟอสฟอรัสซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ จุลินทรีย์ใช้ซัลเฟอร์ และกรดอะมิโนที่ประกอบด้วยซัลเฟอร์ในการสังเคราะห์โปรตีน โคเอนไซม์ และส่วนประกอบอื่นๆ ของเซลล์ จุลินทรีย์บางชนิดสามารถสังเคราะห์กรดอะมิโนที่ประกอบด้วยซัลเฟอร์จากสารประกอบซัลเฟอร์อนินทรีย์และกรดอะมิโนอื่นๆ จุลินทรีย์จะได้ฟอสฟอรัสส่วนมากจากไอออนฟอสเฟตอนินทรีย์ ($PO_4^{3-}$) และจะใช้ฟอสฟอรัส (ในรูปฟอสเฟต) ในการสังเคราะห์ ATP ฟอสโฟลิปิด และกรดนิวคลีอิก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.4 แร่ธาตุ (Trace element) คือ

แร่ธาตุจำเป็นที่ต้องการเพียงเล็กน้อย แต่ว่าขาดไม่ได้ จุลินทรีย์จำนวนมากต้องการแร่ธาตุที่แตกต่างกันออกไปในรูปของไอออน สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการโซเดียม และคลอไรด์จำนวนเล็กน้อยแต่จุลินทรีย์ที่ชอบเกลือ (halophile) ต้องการไอออนของแร่ธาตุทั้ง 2 นี้ในปริมาณมาก โพแทสเซียม สังกะสี และแมงกานีส จะถูกใช้ในการกระตุ้นเอนไซม์บางชนิด โคบอลท์ถูกใช้ในการสังเคราะห์วิตามินบี12 เหล็กถูกใช้ในการสังเคราะห์สารประกอบที่มีฮีม และเอนไซม์บางชนิด (ไซโตโครมของระบบการถ่ายทอดอิเล็กตรอนประกอบด้วยฮีม) แม้ว่าความต้องการเหล็กจะมีเพียงเล็กน้อย แต่ถ้าหากขาดจะทำให้ไม่สามารถเจริญได้ แบคทีเรียแกรมบวกต้องการแคลเซียมในการสังเคราะห์ผนังเซลล์ และในพวกที่สร้างสปอร์ใช้ในการสังเคราะห์ผนังของสปอร์

2.5.2.5 วิตามิน (Vitamin)

เป็นสารที่จำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นได้เองเท่านั้น จุลินทรีย์จำนวนมากไม่ต้องการวิตามิน เนื่องจากพวกมันสามารถสังเคราะห์สารต่างๆ ที่ต้องการจากสารประกอบพื้นฐาน จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่ต้องการวิตามินในอาหารที่ใช้เลี้ยง เนื่องจากพวกมันขาดเอนไซม์ที่จะสังเคราะห์วิตามินขึ้นมาใช้เอง วิตามินที่จุลินทรีย์บางชนิดต้องการนั้น ได้แก่ อิโนซิทอล โคลีน กรดโฟลิก วิตามินบี12 และวิตามินเค จุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคแก่มนุษย์มักต้องการวิตามินชนิดต่างๆ และสามารถเจริญได้ก็ต่อเมื่อได้รับวิตามินที่ต้องการจากเซลล์เจ้าบ้าน (host) การที่จะเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์เหล่านี้ในห้องทดลองได้จะต้องใช้อาหารที่มีความซับซ้อน และประกอบด้วยสารต่างๆ ที่จำเป็นที่ตามปกติพวกมันจะได้รับจากเซลล์เจ้าบ้านครบถ้วนเท่านั้น เนื่องจาก *Lactobacillus* เป็นพวกต้องการอาหารสมบูรณ์ (Complex nutritional requirement) ดังนั้นในบางกรณีจึงมีความต้องการวิตามินบางชนิดด้วยเช่นกัน

2.5.2.6 แหล่งของเอนไซม์ (Enzyme)

จุลินทรีย์ส่วนใหญ่จะเคลื่อนย้ายสารต่าง ๆ ที่มีขนาดโมเลกุลเล็กผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แล้วจึงทำการเมแทบอไลต์ สารต่าง ๆ เหล่านี้ได้แก่ กลูโคส กรดอะมิโน เพปไทด์สั้นๆ นิวคลีโอไซด์และฟอสเฟต รวมทั้งไอออนอนินทรีย์ แม้ว่าจุลินทรีย์ไม่สามารถเคลื่อนย้ายสารโมเลกุลใหญ่ ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เข้ามาได้ก็ตาม แต่พวกจะใช้วิธีย่อยสลายสารเหล่านั้นเสียก่อน แล้วจึงทำการดูดซึมเข้าสู่เซลล์ นอกเหนือจากเอนไซม์ที่ใช้ภายในเซลล์ (endoenzyme) แล้ว แบคทีเรียและเชื้อราจำนวนมากจะผลิตเอนไซม์ที่ใช้ภายนอกเซลล์ (exoenzyme) แล้วปล่อยผ่านออกสู่ภายนอกเซลล์ เอนไซม์เหล่านี้ได้แก่ “extracellular enzyme” ที่ถูกผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียแกรมบวกชนิดท่อน ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาในอาหารรอบๆเซลล์จุลินทรีย์ และ “periplasmic enzyme” ที่ผลิตขึ้นจากแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยาระหว่างเยื่อหุ้มเซลล์และผนังเซลล์ เอนไซม์ที่ใช้ภายนอกเซลล์ส่วนใหญ่จะเป็นพวกไฮโดรเลส (hydrolase) ทำหน้าที่ เติมน้ำในขณะที่ทำการย่อยสลายสารพวกคาร์โบไฮเดรต ลิปิด หรือโปรตีน ใน *Lactobacillus* sp. ก็ใช้ exoenzyme เช่นกัน เช่น ในการใช้น้ำตาลแล็กโทส เชื้อจะย่อยน้ำตาลแล็กโทสให้เป็นโมเลกุลที่เล็กลง โดยเปลี่ยนเป็นกลูโคสและกาแล็กโทสเสียก่อนแล้วจึงดูดซึมเข้ามาในเซลล์เพื่อทำการเมแทบอไลต์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5.2.7 การปรับตัวเมื่อมีสารอาหารจำกัด (Adaptation to Limited Nutrients) จุลินทรีย์จะมีการปรับตัวเมื่อมีการจำกัดปัจจัยทางด้านสารอาหารได้หลายวิธี เช่น

2.5.2.7.1 ทำการสังเคราะห์เอนไซม์ให้มีปริมาณมากขึ้น เพื่อดูดซึมและนำสารอาหารที่มีอยู่จำกัดนั้นมาใช้ วิธีการนี้จะทำให้จุลินทรีย์ สามารถนำสารอาหารซึ่งมีอยู่ในจำนวนน้อยนั้น มาใช้ได้ในอัตราส่วนที่สูงขึ้น

2.5.2.7.2 สังเคราะห์เอนไซม์เพื่อใช้ในการเมแทบอไลต์สารอาหารอื่นๆ เช่น ในกรณีที่มีปริมาณกลูโคสอยู่จำกัด จุลินทรีย์บางชนิดจะผลิตเอนไซม์ขึ้นมาเพื่อใช้ย่อยสลายสารอาหารที่มีอยู่มากกว่า เช่น แล็กโทส เป็นต้น

2.5.2.7.3 การปรับอัตราการย่อยสลายสารอาหารและอัตราการสังเคราะห์สารต่างๆ ให้สัมพันธ์กับปริมาณสารอาหารที่มีอยู่ให้ช้าลง และลดการสังเคราะห์สารที่ไม่จำเป็นต่อการเจริญเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการสูญเสียพลังงานโดยไม่จำเป็น

**2.6 ข้อพิจารณาวัตถุดิบที่จะนำมาใช้เป็น substrate** (บุษบา,2540)

สิ่งที่ควรนำมาเป็นข้อพิจารณาเลือกวัตถุดิบเป็นแหล่งสับสเตรต มีดังต่อไปนี้

1. ราคา
2. มาตรฐาน (standard or quality control)
3. หาได้สม่ำเสมอตลอดปี
4. ความต้องการสารคาร์บอนหรือไนโตรเจนพิเศษ( requirement of specific carbon or nitrogen sources)
5. ความสะดวกหรือความลำบากในการเก็บเกี่ยวผลิตภัณฑ์
6. การควบคุมมลภาวะ (pollution control)

ราคา มาตรฐาน และ availability มีความสำคัญที่สุดเนื่องจาก

1. วัตถุดิบแม้มีราคาถูก แต่มีปริมาณน้อยก็ใช้ไม่ได้
2. ของเหลือทิ้งจากโรงงานที่ใช้เป็นวัตถุดิบ แม้จะมีมาก แต่ถ้าไม่ได้ปรับมาตรฐาน และความจำเพาะ ก็ไม่เป็นที่ต้องการ
3. วัตถุดิบประเภทเมล็ดหรือแป้งมักขึ้นราได้ง่าย ต้องเก็บในถุงหรือกระสอบพลาสติกกันแสงในห้องที่อากาศถ่ายเท ที่อุณหภูมิ 10ถึง15 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Stanbury และ Whitaker (1984) ได้ให้ข้อคิดเห็นถึงการนำวัตถุดิบราคาถูกดังกล่าวมาใช้ควรพิจารณาข้อต่อไปนี้

1. เป็นสารอาหารที่จะผลิตสารหรือชีวมวลต่อกรัมวัตถุดิบได้มากที่สุด
2. เป็นสารอาหารที่จะผลิตสารหรือชีวมวลได้เข้มข้นมากที่สุด
3. เป็นสารอาหารที่ให้อัตราการผลิตสารได้มากที่สุด
4. เป็นสารอาหารที่ให้สารอื่นที่ไม่ต้องการเกิดขึ้นน้อยที่สุด
5. ราคาควรถูก มีคุณภาพสม่ำเสมอ และหาได้ตลอดปี
6. ต้องเป็นสารอาหารที่ไม่สร้างปัญหาในกระบวนการหมัก การแยก การทำให้บริสุทธิ์ และการกำจัดของเสีย

**2.7 เวย์ ( whey)**

เวย์เป็นของเหลวที่เป็นผลพลอยได้จากการทำเนยแข็ง ซึ่งในการผลิตเนยแข็งแต่ละครั้งจะได้เวย์เป็นปริมาณมาก การที่จะระบายเวย์ออกสู่สิ่งแวดล้อมก็จะทำให้เกิดมลภาวะ ดังนั้นเพื่อที่จะแก้ปัญหานี้จึงควรนำเวย์กลับมาใช้ใหม่ ซึ่งอาจทำโดยการนำมาแปรรูปเป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งผลิตภัณฑ์จากเวย์ที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมการผลิตอาหารในปัจจุบันคือ เวย์ผง (รูปที่ 2.4)

เวย์มีปริมาณของแข็งทั้งหมดประมาณ 6.4 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งประกอบด้วย แล็กโทส โปรตีน เกลือแร่ และกรดแลกติก ในจำนวนนี้ แล็กโทสเป็นส่วนประกอบที่มีมากที่สุดคือ มีถึง 75 เปอร์เซ็นต์ ของของแข็งทั้งหมด ปกติเวย์จะเสียง่ายเนื่องจากในเวย์มีของแข็งต่ำ ประกอบกับมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์สตาร์ตเตอร์ที่ใช้ทำเนยแข็ง ดังนั้นเพื่อยืดอายุการเก็บของเวย์ จึงต้องพยายามที่จะขจัดน้ำออกจากเวย์ โดยทำการระเหยน้ำออกจากเวย์แล้วนำไปทำแห้งด้วยเครื่องสเปรย์ดรายเพื่อทำเป็นเวย์ผง (Renyard และ Whitehead, 1992)

เวย์ผง เป็นผลิตภัณฑ์ที่ดูดความชื้นได้ง่ายเนื่องจากมีปริมาณแล็กโทสสูง ดังนั้นในการผลิตเวย์ผงมักผลิตในรูปไม่ดูดความชื้น (non - hydroscopic whey powder) เวย์ผงในรูปนี้นิยมใช้เป็นส่วนผสมอาหารกันมาก โดยเฉพาะใช้เป็นส่วนผสมที่สำคัญในการผลิตอาหารทารก เนื่องจากเวย์ผงมีราคาถูกกว่าวัตถุดิบอื่นๆ (เช่น หางนมผง) (Early, 1992) ในการผลิตเวย์ผงในรูปที่ไม่ดูดความชื้นนั้น จะต้องทำให้แล็กโทสที่มีอยู่ในเวย์มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ตกผลึกก่อนที่นำไปทำแห้ง แต่ก่อนอื่นต้องกำจัดเกลือแร่ที่มีอยู่มากเกินไปในเวย์ออกเสียก่อน จากนั้นจึงนำเวย์ไปทำให้เข้มข้นในเครื่องระเหยจนมีปริมาณของแข็ง 55 ถึง 62 เปอร์เซ็นต์ ทำให้เย็นลงอย่างรวดเร็วจนถึงอุณหภูมิ 30 ถึง 45 องศาเซลเซียส แล้วถ่ายเวย์เข้มข้นใส่ลงในถังตกผลึก ทำให้เวย์มีอุณหภูมิลดลงอีกจนถึง 12 ถึง 18 องศาเซลเซียส แล็กโทสที่อยู่ในเวย์เข้มข้นนี้จะอยู่ในสภาพที่อิ่มตัวยิ่งยวด (supersaturated lactose) จากนั้นจึงทิ้งไว้ให้แล็กโทสในเวย์ตกผลึก การตกผลึกนี้อาจเร่งด้วยการเติมผลึกแล็กโทสลงไปเล็กน้อย หรืออาจเติมในรูปเวย์ผงที่มีผลึกแล็กโทสก็ได้ หลังจากได้เวย์เข้มข้นที่ผ่านการตกผลึกแล็กโทสแล้วจะนำไปทำแห้งด้วยเครื่องทำแห้งแบบสเปรย์ดราย โดยจะทำให้เวย์มีความชื้นเหลือประมาณ 12 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงทิ้งไว้ให้เกิดการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตกผลึกอีกครั้ง เมื่อเกิดการตกผลึกอย่างสมบูรณ์แล้ว เวย์ผงก็จะถูกลำเลียงไปทำให้แห้งอีกครั้งด้วยฟลูอิดเบดดรายเออร์ (fluid bed dryer) เพื่อขจัดความชื้นที่ยังเหลืออยู่ออก ก็จะได้เวย์ผงในรูปที่ไม่ดูดความชื้น ซึ่ง 95 เปอร์เซ็นต์ ของแล็กโทสในเวย์ผงจะอยู่ในรูปผลึก (Knipschildt และ Andersen, 1994)

**รูปที่ 2.4** เวย์ผง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 3
# วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

## 3.1 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดลอง

*Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 047 (รูปที่ 3.1) จากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

**รูปที่ 3.1** *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 047

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.2 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

1. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)
2. เครื่องชั่งแบบหยาบ 2 ตำแหน่ง
3. เครื่องชั่งแบบละเอียด 4 ตำแหน่ง
4. ตู้อบ (Hot air oven)
5. เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge)
6. Incubator
7. Incubator shaker
8. pH meter
9. Laminar Air flow
10. เดซิกเคเตอร์
11. หลอดทดลองชนิดฝาเกลียว
12. จานเพาะเชื้อ
13. ขวดรูปชมพู่ ขนาด 250 มิลลิลิตร
14. ปิเปตต์ขนาดต่างๆ
15. บิวเรตต์
16. บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
17. loop เขี่ยเชื้อ
18. ตะเกียงแอลกอฮอล์
19. กล้องจุลทรรศน์
20. Haemacytometer
21. ช้อนตักสาร
22. Pasteur pipette
23. หลอด Centrifuge
24. ขวด Duran สำหรับใส่น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ
25. ขวดน้ำกลั่น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

## 3.3 สารเคมี

1. Protease peptone
2. Peptone
3. Beef extract
4. Yeast extract
5. Glucose (Dextrose)
6. Tween 80
7. Ammonium citrate $(NH_4)_2COOH$
8. Sodium acetate $(NaCH_3COOH)$
9. Magnesium sulfate $(MgSO_4.7H_2O)$
10. Manganese sulfate $(MnSO_4.4H_20)$
11. Dipotassium hydrogen phosphate $(K_2HPO_4)$
12. Sodium hidroxide (NaOH)
13. Bromthymol blue
14. Neutral red
15. Ethanol $(C_2H_5OH)$ 95%
16. Lactobacillus MRS broth
17. Agar
18. Sodium hydrogen pthalate
19. low mineral whey (Demineralised spray dried sweet whey powder)

## 3.4 วิธีการทดลอง

### 3.4.1 การเพิ่มปริมาณเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 047 บนอาหารเอียง

นำเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 047 มาเพิ่มปริมาณให้มากขึ้นในอาหาร MRS และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

### 3.4.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* TISTR 047 ในอาหารเหลว

#### 3.4.2.1 การเตรียมหัวเชื้อ

นำเชื้อที่เตรียมได้จากข้อ 3.5.1 มาเพาะเลี้ยงในหลอดอาหาร MRS เหลว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง จากนั้นถ่ายเชื้อ 1 ถึง 2 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุอาหาร MRS เหลว 100 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**3.4.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus***

นำหัวเชื้อที่ได้จากข้อ 3.5.2.1 เจือจางที่ความเข้มข้น 1 ต่อ 100 มานับจำนวนโดยใช้ haemacytometer ถ่ายเชื้อลงในขวดรูปชมพู่ซึ่งบรรจุอาหารดัดแปลงปริมาตร 100 มิลลิลิตร ให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้น $10^6$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหาร MRS เป็นอาหารควบคุม (ภาคผนวก ก) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ทำการเก็บผลในชั่วโมงที่ 24 48 และ 72

**3.4.2.3 การเพาะเลี้ยงเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* ในอาหารสูตรดัดแปลง**

สูตรอาหารดัดแปลง มีการเปลี่ยนแปลงส่วนผสมโดยใช้แล็กโทสในรูปของเวย์แทนน้ำตาลกลูโคส โดยการคำนวณจากเปอร์เซ็นต์น้ำตาลแล็กโทสซึ่งประกอบอยู่ในเวย์ 77.5 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข) ให้เป็น 20, 30 และ 40 กรัม (ในอาหาร 1 ลิตร) และใช้เพปโทนแทนโปรติโอสเพปโทน ในปริมาณที่เท่ากัน คือ 10 กรัมต่อลิตร

สูตรอาหารดัดแปลงมีทั้งหมด 7 สูตร ดังนี้

สูตร 1 กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

สูตร 2 แล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร และโปรติโอสเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

สูตร 3 แล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร และเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

สูตร 4 แล็กโทส 30 กรัมต่อลิตร และโปรติโอสเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

สูตร 5 แล็กโทส 30 กรัมต่อลิตร และเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

สูตร 6 แล็กโทส 40 กรัมต่อลิตร และโปรติโอสเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

สูตร 7 แล็กโทส 40 กรัมต่อลิตร และเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

**3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณเซลล์**

วิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้น ด้วยวิธี standard plate count โดยเก็บตัวอย่างในช่วงเวลาต่าง ๆ มาเจือจางด้วยน้ำกลั่นโดยอัตราส่วนอยู่ในช่วงที่สามารถนับโคโลนีได้ แล้วนำมา pour plate ด้วยอาหารวุ้น MRS เมื่ออาหารแข็งดีแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยคว่ำจานไว้เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจผลโดยการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญขึ้น

**3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณกรดผลิตขึ้น**

นำตัวอย่างมาวิเคราะห์ปริมาณกรดดังต่อไปนี้

1. แยกเซลล์ออกจากอาหารเหลวด้วยการปั่นเหวี่ยงโดยใช้ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 นาที แยกเซลล์ออกทิ้งและเก็บส่วนใส
2. วัดพีเอชของส่วนใส (supernatant) ที่ได้จากการปั่นเหวี่ยง
3. นำส่วนใสที่ได้ 4 มิลลิลิตร เจือจางด้วยน้ำที่ปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ (เตรียมโดยนำน้ำกลั่นมาต้มให้เดือด 3 ถึง 5 นาทีแล้วทิ้งให้เย็น) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล โดยใช้ mixed indicator (ภาค

เอกสารนี้เป็นเอกสาร... ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผนวก ก) เป็น indicator แล้วนำปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้มาคำนวนตามสูตร

$$\text{ปริมาณกรด(มิลลิกัมต่อมิลลิลิตร)} = 90 \times \frac{[\text{ปริมาณของ NaOH(มล.)} - \text{ปริมาตรของ blank(มล.)}] \times \text{ความเข้มข้นของNaOH (N)}}{\text{ปริมาตรของตัวอย่าง(มล.)}}$$

**3.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ**

นำข้อมูลการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* และปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตขึ้นในอาหารสูตรต่างๆ มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบบล็อก (Randomized Complete Block Design)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 4
# ผลการทดลองและการวิเคราะห์ทางสถิติ

## 4.1 ผลของการเพิ่มจำนวนเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารเหลวสูตรต่าง ๆ

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยการศึกษาแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ดังนี้

กำหนดให้ ปัจจัยที่ 1 คือ C : แหล่งคาร์บอน มี 4 แหล่ง คือ

$C_1$ : กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

$C_2$ : แล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร

$C_3$ : แล็กโทส 30 กรัมต่อลิตร

$C_4$ : แล็กโทส 40 กรัมต่อลิตร

ปัจจัยที่ 2 คือ N : แหล่งไนโตรเจน มี 2 แหล่ง คือ

$N_1$ : โปรติโอสเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

$N_2$ : เพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

เมื่อนำทั้ง 2 แหล่งมาผสมกันเป็นสูตรอาหารได้ทั้งหมด 8 สูตร ดังนี้

$C_1N_1$ คือ กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และโปรติโอสเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร เป็น CONTROL คือ MRS

สูตรอาหารดัดแปลง

$C_1N_2$ คือ กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และ เพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

$C_2N_1$ คือ แล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร และ โปรติโอสเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

$C_2N_2$ คือ แล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร และ เพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

$C_3N_1$ คือ แล็กโทส 30 กรัมต่อลิตร และ โปรติโอสเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

$C_3N_2$ คือ แล็กโทส 30 กรัมต่อลิตร และ เพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

$C_4N_1$ คือ แล็กโทส 40 กรัมต่อลิตร และ โปรติโอสเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

$C_4N_2$ คือ แล็กโทส 40 กรัมต่อลิตร และ เพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

ทำการทดสอบแบบแฟคทอเรียล (Factorial) ใช้การวางแผนการทดลองแบบบล็อก (Randomized Complete Block Design) หลังจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหาร MRS ดังรูปที่ 4.1 และอาหารดัดแปลง ดังรูป 4.2 เก็บผลการทดลอง 3 ช่วงเวลา คือ ชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 ได้ผลการทดลองเป็นไปดังตารางที่ 4.1และรูปที่ 4.1 ถึง 4.3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ตารางที่ 4.1** การเพิ่มจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในช่วงระยะเวลาต่าง ๆ

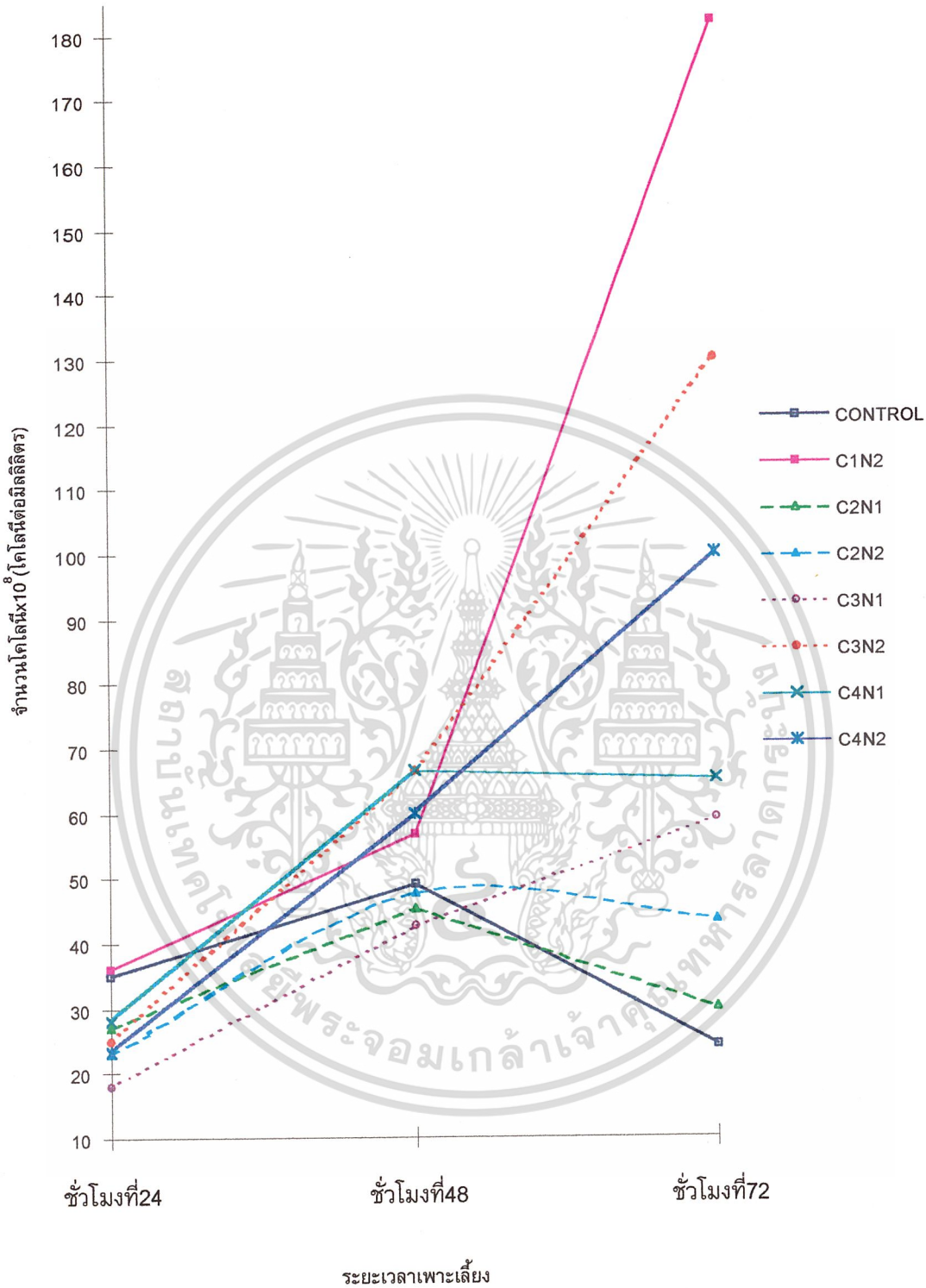
| อาหารเลี้ยงเชื้อ | จำนวนโคโลนี x $10^8$ (โคโลนีต่อมิลลิลิตร) | | | |
|---|---|---|---|---|
| | ชั่วโมงที่ 24 | ชั่วโมงที่ 48 | ชั่วโมงที่ 72 | รวม |
| CONTROL | 35.0000 | 49.0000 | 24.0000 | 108.0000 |
| $C_1N_2$ | 36.0000 | 56.6667 | 182.0000 | 274.6667 |
| $C_2N_1$ | 27.0000 | 45.3333 | 30.6667 | 103.0000 |
| $C_2N_2$ | 23.0000 | 47.6667 | 43.3333 | 114.0000 |
| $C_3N_1$ | 18.0000 | 42.6667 | 59.0000 | 119.6667 |
| $C_3N_2$ | 25.0000 | 66.6667 | 130.0000 | 221.6667 |
| $C_4N_1$ | 28.0000 | 66.6667 | 65.3333 | 221.6667 |
| $C_4N_2$ | 23.3333 | 60.0000 | 100.0000 | 160.0000 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**รูปที่ 4.1** แสดงการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS

**รูปที่ 4.2** แสดงการเจริญของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารเลี้ยงเชื้อสูตรดัดแปลง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.3** การเพิ่มจำนวนโคโลนีของ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ในอาหารทั้ง 8 สูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลข้างต้นดังตารางที่ 4.1 และรูปที่ 4.3 พบว่า อาหารส่วนใหญ่เชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* สามารถเพิ่มจำนวนได้สูงขึ้นตามช่วงเวลา โดยชั่วโมงที่ 72 เชื้อสามารถเพิ่มจำนวนได้สูงสุด แต่มีอาหาร 4 สูตรที่เชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* เพิ่มจำนวนได้ในช่วงแรก (ชั่วโมงที่ 24 ถึง 48) และลดลงในช่วงต่อมา (หลังชั่วโมงที่ 48) ได้แก่ MRS, $C_2N_1$, $C_2N_2$, $C_4N_1$

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ผลทางสถิติ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.2

**ตารางที่ 4.2** ตารางวิเคราะห์ความแปรปรวนการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

| Source of variation | Degree of freedom | Sum of Square | Mean Square | F – value |
|---|---|---|---|---|
| Period of time | 2 | $1.0980 \times 10^{20}$ | $5.4900 \times 10^{19}$ | 6.0520* |
| Media | 7 | $9.0630 \times 10^{19}$ | $1.2947 \times 10^{19}$ | 1.4272$^{ns}$ |
| C – source (C) | 3 | $2.5885 \times 10^{19}$ | $8.6267 \times 10^{18}$ | 0.9510$^{ns}$ |
| N – source (N) | 1 | $3.8254 \times 10^{19}$ | $3.8254 \times 10^{19}$ | 4.2165$^{ns}$ |
| C x N | 3 | $2.6497 \times 10^{19}$ | $8.8323 \times 10^{18}$ | 0.9736$^{ns}$ |
| Error | 14 | $1.2700 \times 10^{20}$ | $9.0714 \times 10^{18}$ | |
| Total | 23 | $3.2743 \times 10^{20}$ | | |

CV = 56.3%

ns nonsignificant

**สมมติฐานที่ 1**

Ho : แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus*

Ha : แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีอย่างน้อย 1 คู่ ที่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus*

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า

ค่า F - value ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากตารางแสดงว่า **ยอมรับ Ho** คือ แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการเพิ่มจำนวนของเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* อย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**สมมติฐานที่ 2**

Ho : แหล่งคาร์บอนทั้งสี่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกัน

Ha : แหล่งคาร์บอนทั้งสี่มีอย่างน้อย 1 คู่ ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* แตกต่างกัน

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า

ค่า F - value ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากตารางแสดงว่า **ยอมรับ Ho** คือ แหล่งคาร์บอนทั้งสี่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

**สมมติฐานที่ 3**

Ho : แหล่งไนโตรเจนทั้งสองมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกัน

Ha : แหล่งไนโตรเจนทั้งสองมีอย่างน้อย 1 คู่ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* แตกต่างกัน

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า

ค่า F - value ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากตารางแสดงว่า **ยอมรับ Ho** คือ แหล่งไนโตรเจนทั้งสองมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

**สรุปผลการทดลอง**

จากสมมติฐานข้อหนึ่งพิสูจน์เห็นว่า แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการเพิ่มจำนวนของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าอาหารดัดแปลงทั้ง 7 สูตรที่นำมาทดลองเพื่อการใช้ทดแทน MRS มีประสิทธิภาพต่อการเพิ่มจำนวนไม่แตกต่างจาก MRS อย่างมีนัยสำคัญ แต่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญ (Macro nutrient) ต่อการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์จึงจำเป็นต้องอาศัยทั้งแหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจนร่วมกัน ในขณะที่อาหาร MRS มีราคาสูง และจากสมมติฐานในข้อ 2 และ 3 ทำให้ทราบว่า แหล่งคาร์บอนทั้งสี่แหล่ง และแหล่งไนโตรเจนทั้งสองแหล่งมีผลต่อการเพิ่มจำนวนของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จึงอาจใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ๆ และแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ที่มีราคาถูกมาทดแทนเพื่อลดต้นทุนในการผลิตได้ โดย Lactobacillus MRS ขนาด 500 กรัม ราคา 2,960 บาท (Difco) **แหล่งคาร์บอน** ได้แก่ Lactose monohydrate ขนาด 500 กรัม ราคา 511 บาท (Hispanlab), 940 บาท (Difco), 480 บาท (E-Merck), Glucose (Dextrose) ขนาด 500 กรัม ราคา 355 บาท (Hispanlab), 850-960 บาท (Difco), 350 บาท (E-Merck) การทดลองใช้ในรูปของ Glucose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับใช้ในการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ในโครงการค้า

monohydrate 900 บาท ต่อ 25 กิโลกรัม ในขณะที่ Demineralised spray dried sweet whey powder ขนาด 500 กรัม ราคาเพียง 25 บาท **แหล่งไนโตรเจน** ได้แก่ Proteose peptone ขนาด 500 กรัม 2,646 บาท (Hispanlab), 4,000 บาท (Difco) ในขณะที่ Peptone ขนาด 500 กรัม ราคา 1,860 บาท จะเห็นได้ว่า Demineralised spray dried sweet whey powder และเพปโทนราคาถูกมากเมื่อเทียบกับอาหาร MRS จากการทดลองจึงเลือกใช้เวย์ซึ่งมีแล็กโทสเป็นส่วนประกอบ (ภาคผนวก ข) แทนกลูโคส และใช้เพปโทนแทนโปรติโอสเพปโทน ในสูตรอาหาร MRS ซึ่งประสิทธิผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

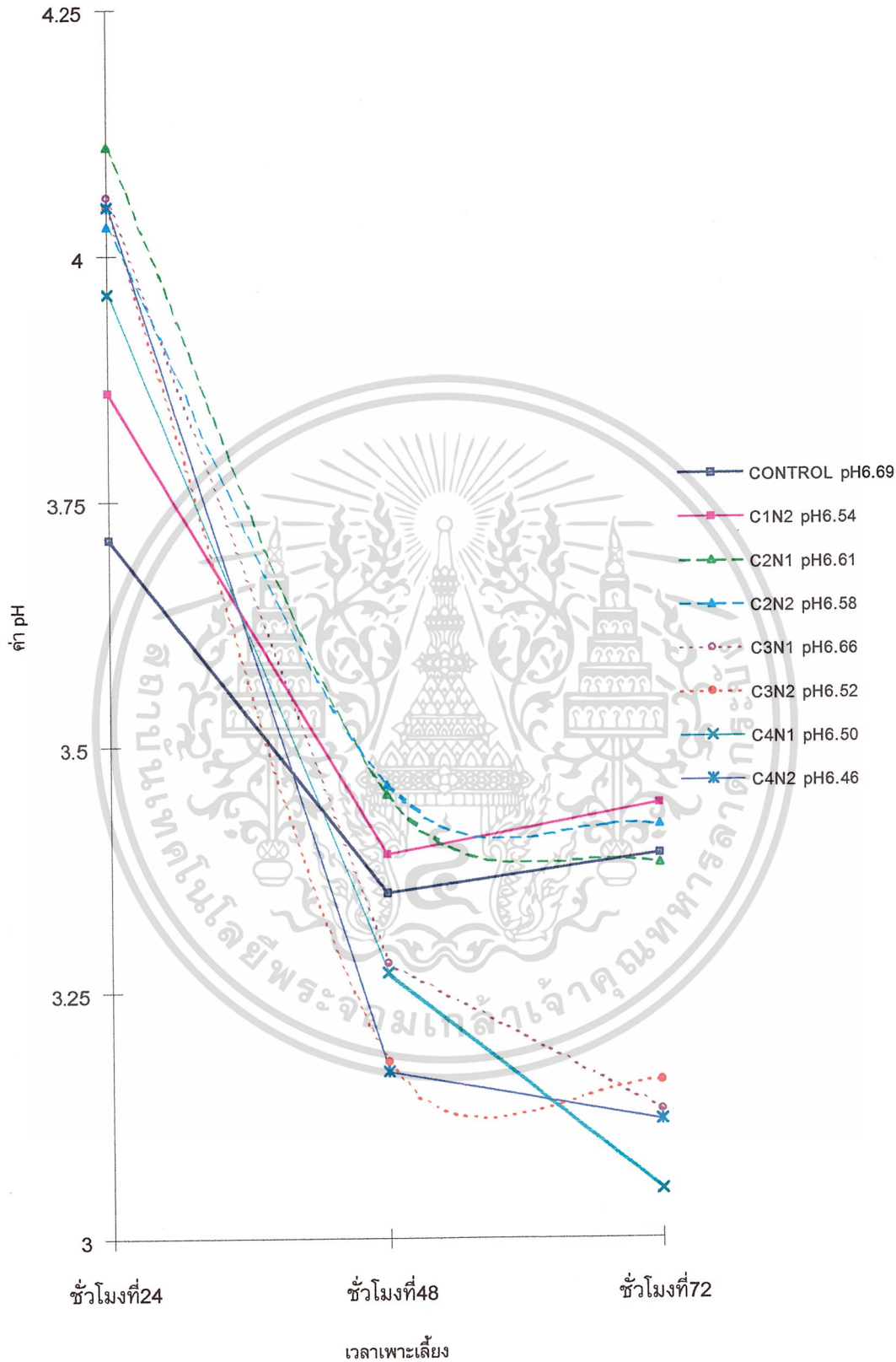
## 4.2 ผลการทดลองวัดการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชในอาหารทั้ง 8 สูตร

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงพีเอชโดยเพาะเลี้ยงเชื้อ *L. casei* subsp. *Rhamnosus* ในอาหารทั้ง 8 สูตร เก็บเกี่ยวผลโดยการปั่นเหวี่ยงเอาตัวเซลล์ออก จากนั้นวัดค่าพีเอชของ supernatant ได้ผลตามตารางที่ 4.3 และรูปที่ 4.2

**ตารางที่ 4.3** ตารางแสดงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงต่าง ๆ

| อาหารเลี้ยงเชื้อ | เริ่มต้น | ค่าพีเอช | | |
|---|---|---|---|---|
| | | ชั่วโมงที่24 | ชั่วโมงที่48 | ชั่วโมงที่ 72 |
| CONTROL | 6.69 | 3.71 | 3.35 | 3.39 |
| $C_1N_2$ | 6.54 | 3.86 | 3.39 | 3.44 |
| $C_2N_1$ | 6.61 | 4.11 | 3.45 | 3.38 |
| $C_2N_2$ | 6.58 | 4.03 | 3.46 | 3.42 |
| $C_3N_1$ | 6.66 | 4.06 | 3.28 | 3.13 |
| $C_3N_2$ | 6.52 | 4.05 | 3.18 | 3.16 |
| $C_4N_1$ | 6.50 | 3.96 | 3.27 | 3.05 |
| $C_4N_2$ | 6.46 | 4.05 | 3.17 | 3.12 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.4** การเปลี่ยนแปลงพีเอชในอาหาร 8 สูตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**ผลการทดลอง**

ในอาหารทั้ง 8 สูตรพบว่า อาหารส่วนใหญ่ค่าพีเอช จะลดลงเรื่อย ๆ ตามช่วงระยะเวลา โดยในชั่วโมงที่ 72 ค่าพีเอชจะต่ำสุด แต่จะมีอาหารอยู่ 2 สูตร ซึ่งค่าพีเอชเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 72 คือ อาหาร MRS และ อาหาร $C_1N_2$ ซึ่งประกอบด้วยกลูโคส 20 กรัมต่อลิตร และเพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

## 4.3 ผลการศึกษาการผลิตกรดแลกติก

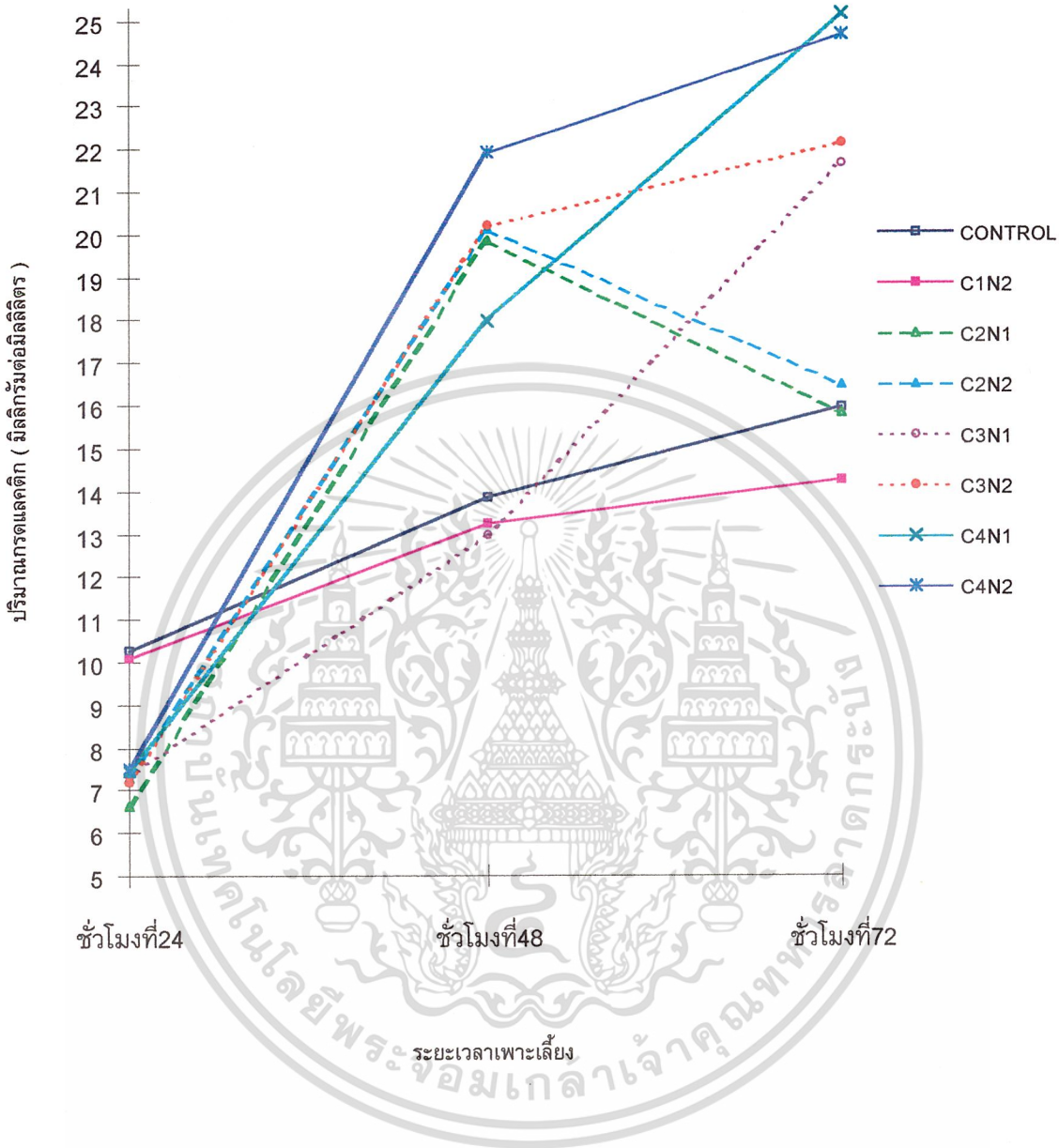
การศึกษาการผลิตกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อโดยศึกษาแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่เชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* สามารถใช้และผลิตกรดแลกติกได้ปริมาณสูงในแต่ละช่วงเวลา โดยการเลี้ยงเชื้อในอาหาร 8 สูตร ซึ่งมีปัจจัยมีทำการศึกษาอันได้แก่ ส่วนประกอบของแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน รวมถึงแบบแผนของการวางแผนการทดลอง ดังที่กล่าวไว้ในหัวข้อ 4.1 เก็บผลโดยวัดปริมาณกรดแลกติก โดยนำสารละลายมาไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล เก็บผลตามช่วงเวลา 3 ช่วง คือ ชั่วโมงที่ 24, 48 และ 72 ได้ผลการทดลองเป็นไปดังตารางที่ 4.4 และรูปที่ 4.5

นำผลการทดลองในตารางที่ 4.4 มาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in Randomized Complete Block Design ลอง 8 treatment (อาหาร 8 สูตร) 3 ช่วงเวลา (ดังตารางที่ 4.5)

**ตารางที่ 4.4** ตารางแสดงปริมาณกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*

| อาหารเลี้ยงเชื้อ | ปริมาณกรดแลกติก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | | | รวม |
|---|---|---|---|---|
| | ชั่วโมงที่ 24 | ชั่วโมงที่ 48 | ชั่วโมงที่ 72 | |
| CONTROL | 10.2606 | 13.8621 | 15.9569 | 40.0796 |
| $C_1N_2$ | 10.1063 | 13.2300 | 14.2590 | 37.5953 |
| $C_2N_1$ | 6.6224 | 19.8524 | 15.8099 | 42.2847 |
| $C_2N_2$ | 7.2986 | 20.1243 | 16.4861 | 43.9090 |
| $C_2N_1$ | 7.3440 | 12.9728 | 21.6458 | 41.9626 |
| $C_3N_2$ | 7.2104 | 20.2125 | 22.1603 | 49.5832 |
| $C_4N_1$ | 7.4676 | 17.9781 | 25.1811 | 50.6268 |
| $C_4N_2$ | 7.4970 | 21.9398 | 24.6960 | 54.1328 |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้




**รูปที่ 4.5** ปริมาณกรดแลกติกที่ *Lactobacillus casei*subsp. *rhamnosus* ผลิตขึ้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จากข้อมูลในตารางที่ 4.4 และ รูปที่ 4.5 พบว่าแนวโน้มการสร้างกรดแลกติกในอาหารทั้ง 8 สูตร พบว่า สูตรอาหารส่วนใหญ่ ได้แก่ MRS, $C_1N_2$, $C_3N_1$, $C_3N_2$, $C_4N_1$, $C_4N_2$ เชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* สามารถใช้ในการผลิตกรดแลกติกได้ โดยปริมาณกรดจะแปรผันตรงกับช่วงเวลา คือ ยิ่งช่วงเวลานานขึ้นปริมาณกรดแลกติกยิ่งสูงขึ้น โดยอาหารบางสูตรมีอัตราการเพิ่มของกรดแลกติกอย่างรวดเร็ว ในขณะที่บางสูตรอัตราการเพิ่มกรดแลกติกเป็นไปอย่างช้า ๆ (สังเกตจากรูปที่ 4.5) แต่มีเพียงสูตรอาหาร 2 สูตรที่ไม่เป็นเช่นนั้น คือ $C_2N_1$ และ $C_2N_2$ โดยพบว่า ปริมาณกรดแลกติกสูงขึ้นในช่วงแรก (ชั่วโมงที่ 24 ถึง 48) และลดลงช่วงที่ 2 (ชั่วโมงที่ 48 ถึง 72)

เมื่อนำผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ทางสถิติ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ 4.5

**ตารางที่ 4.5** ตารางวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติกที่เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* สร้างขึ้นในช่วงเวลาต่าง ๆ ในอาหารทั้ง 8 สูตร

| Source of variation | Degree of freedom | Sum of Square | Mean Square | F - value |
|---|---|---|---|---|
| Period of time | 2 | $6.0933 \times 10^{18}$ | $3.0467 \times 10^{18}$ | 26.4539** |
| Media | 7 | $7.7633 \times 10^{17}$ | $1.1090 \times 10^{17}$ | 0.9629 ns |
| C – source (C) | 3 | $6.4437 \times 10^{17}$ | $2.1479 \times 10^{17}$ | 1.8650 ns |
| N – source (N) | 1 | $4.3918 \times 10^{16}$ | $4.3918 \times 10^{16}$ | 0.3813 ns |
| C x N | 3 | $8.8042 \times 10^{16}$ | $2.9347 \times 10^{16}$ | 0.2548 ns |
| Error | 14 | $1.6124 \times 10^{18}$ | $1.1517 \times 10^{17}$ | |
| Total | 23 | $8.4820 \times 10^{18}$ | | |

CV = 22.6%

ns nonsignificant

**สมมติฐานที่ 1**

Ho : แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการผลิตกรดแลกติก ของเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus*

Ha : แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนมีอย่างน้อย 1 คู่ที่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus*

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ค่า F - value ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากตารางแสดงว่า **ยอมรับ Ho** คือ แหล่งคาร์บอน และแหล่งไนโตรเจน ไม่มีอิทธิพลร่วมกันต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* อย่างมีนัยสำคัญ

**สมมติฐานที่ 2**

Ho : แหล่งคาร์บอนทั้งสี่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกัน

Ha : แหล่งคาร์บอนทั้งสี่มีอย่างน้อย 1 คู่ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* แตกต่างกัน

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า

ค่า F - value ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากตารางแสดงว่า **ยอมรับ Ho** คือ แหล่งคาร์บอนทั้งสี่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ

**สมมติฐานที่ 3**

Ho : แหล่งไนโตรเจนทั้งสองมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกัน

Ha : แหล่งไนโตรเจนทั้งสองมีอย่างน้อย 1 คู่ที่มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* แตกต่างกัน

จากตารางวิเคราะห์ความแปรปรวน พบว่า

ค่า F - value ที่ได้จากการคำนวณมีค่าน้อยกว่าค่า F ที่ได้จากตารางแสดงว่า **ยอมรับ Ho** คือ แหล่งไนโตรเจนทั้งสองมีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญ

**สรุปผลการทดลอง**

จากสมมติฐานข้อหนึ่งพิสูจน์ให้เห็นว่า ในทางสถิติแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนไม่มีอิทธิพลร่วมกัน ต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* อย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า อาหารดัดแปลงทั้ง 7 สูตรที่นำมาทดลองเพื่อใช้ทดแทน MRS มีประสิทธิภาพต่อการผลิตกรดแลกติกไม่แตกต่างจาก MRS อย่างมีนัยสำคัญ แต่ในการผลิตกรดแลกติก ซึ่งเป็น Primary metabolite จำเป็นต้องอาศัยแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจน เพื่อการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของ *L. casei* ในช่วงแรกก่อน เมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโตอย่างสมบูรณ์แล้ว ก็จะมีการผลิตกรดแลกติกขึ้น แต่เนื่องจากอาหาร MRS มีราคาสูง และจากสมมติฐานในข้อ 2 และ 3 ทำให้ทราบว่า แหล่งคาร์บอนทั้งสี่แหล่ง และแหล่งไนโตรเจนทั้งสองแหล่งที่นำมาทดลอง มีผลต่อการผลิตกรดแลกติกของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ดังนั้นจึงอาจใช้แหล่งคาร์บอนอื่น ๆ และแหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ที่มีราคาถูกมาทดแทนเพื่อลดต้นทุนในการผลิตได้ โดยราคา Lactobacillus MRS ขนาด 500 กรัม 2,960

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บาท (Difco) **แหล่งคาร์บอน** ได้แก่ Lactose monohydrate ขนาด 500 กรัม ราคา 511 บาท (Hispanlab), 940 บาท (Difco), 480 บาท (E-Merck), Glucose (Dextrose) ขนาด 500 กรัม ราคา 355 บาท (Hispanlab), 850-960 บาท (Difco), 350 บาท (E-Merck) ระดับการทดลองใช้ในรูปของ Glucose monohydrate ราคา 900 บาท ต่อ 25 กิโลกรัม ในขณะที่ Demineralised spray dried sweet whey powder ขนาด 500 กรัม ราคาเพียง 25 บาท **แหล่งไนโตรเจน** ได้แก่ Proteose peptone ขนาด 500 กรัม ราคา 2,646 บาท (Hispanlab), 4,000 บาท (Difco) ในขณะที่ Peptone ขนาด 500 กรัม ราคาเพียง 1,860 บาท จากการทดลอง จึงเลือกใช้เวย์ซึ่งมีส่วนประกอบของน้ำตาลแล็กโทส (ภาคผนวก ข) แทนกลูโคส และใช้เพปโทนแทนโปรติโอสเพปโทน ในสูตรอาหาร เนื่องจากราคาถูกกว่ามาก และประสิทธิผลต่อการผลิตกรดแลกติกไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# บทที่ 5
# วิจารณ์และข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวน และการผลิตกรดแลกติกของ *L. casei* subsp. *rhamnosus* พบว่า แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนไม่มีอิทธิพลร่วมกัน คือ ไม่ได้ทำงานร่วมกันในการเจริญเติบโต เพิ่มจำนวน และการผลิตกรดแลกติก แต่แหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนเป็นสารอาหารหลัก (Macro nutrients) ของจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงจำเป็นที่ต้องมีทั้งแหล่งคาร์บอนและแหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารทั้ง 7 สูตรที่นำมาทดลอง เพื่อใช้ทดแทน MRS ซึ่งมีราคาแพงพบว่า แนวโน้มของการเพิ่มจำนวนและการผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นตามช่วงเวลา ซึ่งมีแนวโน้มใกล้เคียงกับ MRS

หลักสำคัญของเทคโนโลยีชีวภาพในอุตสาหกรรมคือ ต้นทุนการผลิตที่ต่ำ ดังนั้นในการทดลองจึงใช้เวย์ ซึ่งมีน้ำตาลแล็กโทสเป็นส่วนประกอบ 77.5 เปอร์เซ็นต์ และมีแหล่งอาหารอื่นๆ ประกอบอยู่ด้วย และมีราคาถูกทำหน้าที่เป็นแหล่งแหล่งคาร์บอน และเพปโทนซึ่งมีราคาถูกกว่าโปรติโอสเพปโทนมากเป็นแหล่งไนโตรเจน พบว่า การเพิ่มจำนวน และการผลิตกรดแลกติกไม่แตกต่างจากการใช้อาหาร MRS จึงเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะใช้สารดังที่กล่าวคือ เวย์ และเพปโทนมาเป็นส่วนประกอบหนึ่งในอาหาร

มีการทดลองใช้เวย์ชนิดต่างๆ ในการผลิตกรดแลกติก เช่น salt whey (Zayed และ Winter,1995) เวย์โปรตีนต่ำ (Deproteinized whey) (Roukas และ Kotzekidou,1998) เป็นต้น

จากการทดลองใช้ salt whey พบว่า เชื้อ *L. casei* ผลิตกรดแลกติกได้ 12 กรัมต่อลิตร หลังจากบ่ม 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และปริมาณเซลล์ $6.2x10^7$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร และจากการทดลองการผลิตกรดแลกติกแบบ fedbatch โดยใช้เวย์โปรตีนต่ำ ด้วยเชื้อ *L. casei* ร่วมกับ *Lactococcus lactis* (Roukas และ Kotzekidou,1998) พบว่า แล็กโทสความเข้มข้น 100 และ 150 กรัมต่อลิตร จะมีผลให้การผลิตกรดแลกติกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในระหว่างชั่วโมงที่ 6 ถึง 18 และจะเพิ่มขึ้นอย่างช้า ๆ หลังชั่วโมงที่ 24 นับตั้งแต่การถ่ายเชื้อ นอกจากนี้ยังพบว่า ปริมาณเซลล์จะเป็นไปในแนวทางเดียวกับกรดแลกติกที่เพิ่มขึ้น คือ ปริมาณเซลล์ที่สูงสุดจะให้ปริมาณกรดแลกติกที่สูงสุดด้วย

จากการศึกษาการผลิตกรดแลกติก ในปี 1995 ของ Hujanen โดยให้ความเข้มข้นกลูโคส 100 กรัมต่อลิตร และใช้เพปโทนเป็นแหล่งไนโตรเจน ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อ *L. casei* ผลิตกรดแลกติกได้ 9 กรัมต่อลิตร ในชั่วโมงที่ 24

นอกจากนี้มีการทดลองศึกษาการใช้แหล่งไนโตรเจนอื่น ๆ ต่อการผลิตกรดแลกติก (Hujanen และคณะ, 1995) เช่น Yeast extract, Malt sprouts, Grass extract, Corn-steep liquor และ ยูเรีย เป็นต้น พบว่า แหล่งไนโตรเจนที่มีเปอร์เซ็นต์ของไนโตรเจนสูงส่วนใหญ่ จะให้ผลผลิตกรดแลกติกที่ต่ำกว่าแหล่งไนโตรเจนที่มีเปอร์เซ็นต์ไนโตรเจนต่ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีการทดลองใช้แหล่งอาหารราคาถูกเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การใช้แครอท (de Castro และคณะ,1995) การใช้น้ำคั้นผักกาด (ละอองทิพย์ และ วิเชียร,2537) โดยใช้เชื้อ *L. plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* พบว่าให้ผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกับ MRS

นอกจากการศึกษาอิทธิพลของอาหารที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนและการผลิตกรดแลกติกแล้ว ยังมีการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการผลิตกรดแลกติกของเชื้อ *L. casei* (Hujanen และคณะ, 1995) พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกของ *L. casei* คือ 37 องศาเซลเซียส โดยปริมาณกรดแลกติกที่ผลิตได้สูงถึง 4.1 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และภายใน 24 ชั่วโมงสามารถผลิตได้ถึง 80 กรัมต่อลิตร และ 45 กรัมต่อลิตร ภายใน 48 ชั่วโมง และยังพบว่า หากใช้ความเข้มข้นกลูโคสต่ำกว่า 1 กรัมต่อลิตร เชื้อ *L. casei* สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 41 องศาเซลเซียส สำหรับเชื้อ *L. casei* subsp. *rhamnosus* ที่สภาวะเดียวกันสามารถผลิตกรดแลกติกความเข้มข้น 75 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ได้ภายใน 48 ชั่วโมง

**ข้อเสนอแนะ**

1. ควรศึกษาความเข้มข้นของเวย์ในปริมาณสูงขึ้น (มากกว่า 70 กรัมต่อลิตร) และควรทำการทดลองเป็นแบบ fed batch เพื่อลดการตกตะกอนของเวย์
2. ควรศึกษาแหล่งอาหารจากพืช ผัก ผลไม้ เช่น หัวผักกาด เนื่องจากราคาถูก และพืชเหล่านี้สามารถนำมาหมักได้ ดังนั้นน่าจะมีสารอาหารที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตของ *Lactobacillus*
3. การใช้เวย์เป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ สำหรับกระบวนการผลิตกรดแลกติก ในระดับอุตสาหกรรม โดยเฉพาะในอุตสาหกรรมนม และเนย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# เอกสารอ้างอิง


บุษบา ยงสมิทธ์, **จุลชีววิทยาการหมักวิตามินและสารสี** . กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, หน้า 27 – 28 , 2540.

พวงพร โชติกุล, **จุลชีววิทยาของอาหารและนม** . กรุงเทพฯ : ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง , 2530.

ลัดดาวัลย์ รัศมิทัต. **จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม**:จุลินทรีย์กับอุตสาหกรรมอาหาร.พิมพ์ครั้งที่ 1. มหาวิทยาลัยบูรพา. ชลบุรี. , 2536.

ละอองทิพย์ มัทธุรส และวิเชียร ลีลาวัชรมาศ. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกระดับอุตสาหกรรมราคาถูก. **โปรซีสดิงส์แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 2 .** จตุจักร กรุงเทพฯ, หน้า 125 - 138 , 2537.

วิเชียร ลีลาวัชรมาศ. สรุปงานวิจัยแลคติกแอซิดแบคทีเรียของยุโรป 1993-1995. **โปรซีสดิงส์แลคติกแอซิดแบคทีเรียในอุตสาหกรรมอาหารไทย ครั้งที่ 2** . ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา , หน้า 64 - 73 , 2537.

Brock, T.D. and Mandigan, T.M. **Biology of Microorganism. 5th ed.** , Prentice Hall , New York , pp. 751 – 754 , 1988.

Cocharan, W.G. and Cox, G.M. **Experimental Design**, John Wiley and Sons , New York , 1957.

Collins, M.D., Williums, A.M. and Wallbanks, S. Taxonomic studies on some *Leuconostoc*-like organisms from fermented sausages : discription of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. **J. Appl. Bacteriol.** 75 (1993) : 595 – 603.

Cooney, C.L. Growth of micro-organisms. *In* H.J. Rehm and G. Reed(eds.). **Biotechnology Vol.1** , Verlag Chemie, Weinhelm , pp. 73 -112 , 1981.

Creager, Joan G. , Black, Jacquelyn G. and Davison, Vee E. **Microbiology. Principle and Applications.** Prentice Hall, Englewood Cliffs, New Jersey ,1994.

de Castro, A. ,Rejano, L. ,Sanchez, A.H. and Montano, A. Fermentation of lye – treated carrot by *Lactobacillus plantarum*. **J. Food Sci.** 60/2(1995) : 316 – 319.

Early, R. Milk powders . *In* : R. Early (ed.). **The Technology of Dairy Products.** VCH Publishers, Inc., New York. , pp. 167 - 196 , 1992.

Hammes, W.P. and Vogel, R.F. The genus *Lactobacillus*. *In*. : B.J.B. Wood and W.H. Holzapfel (editors). **The Lactic Acid Bacteria , The Genera Lactic acid Bacteria. Vol2.** Blackie Academic, London. , pp. 19 – 54, 1995.


เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Hujanen, M. and Linko, Y.Y. Effect of temperature and nitrogen sources on L(+) - lactic acid production by *Lactobacillus casei*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 45(1996): 307 – 313.

Knipschildt, M.E. and G.G. Andersen. Drying of milk and milk products. *In* R.K. Robinson (ed.). **Modern Dairy Technology Vol.1. 2d ed.** , Chapman & Hall, Great Britain , pp. 159 - 254, 1994.

Pot, B. ,Ludwig, W. ,Kersters, K. and Schleifer, K.H. Taxonomy of lactic acid bacteria microbiology, genetics and applications. *In* : L. de Vuyst and E.J. Vandamme (editors) , **Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria.** Chapman and Hall, London, pp 13 – 90 , 1994.

Renyard, S.J. and P.D. Whitehead. Milk concentrates.. *In* R. Early(ed.). **The Technology of Dairy Products.** VCH Publishers, Inc., New York , pp.147 - 166, 1992.

Roukas, T. and Kotzekidou, T. Lactic acid production from deprotinized whey by mixed cultures. **Enz. Microbial Tech** . 22(1998) : 199 – 204 .

Siebold, M. , Frieling, P.V. , Joppien, R. , Rimdfleisch, D. , Roper, H. and Schugerl, K. Comparison of the production of lactic acid by three different lactobacilli and its recovery by extraction and electrodialysis. **Process Biochamistry.** 30 (1995) : 81 – 95.

Sneath, Peter H.A. , Holt ,John G. , Krieg, Noel R. , Staley, James T. , Williums, Stanley T. **Bergey's Mannual of Determinative Bacteriology.** Ninth edition. 428 East Preston street Baltimore, Maryland, 1994.

Sneath, Peter H.A. , Mair, Nicholus S. , Sharpe, M. Elisabeth , Holt, John G. , Murray, R.G.E. , Brenner, Don , Bryant, Marvin P. , Krieg, Noel R , Moulder, James W. ,Pfennig, Norbert, Staley , James T. **Bergey's Mannual of Systematic Bacteriology. Volume 2.** 428 East Preston street Baltimore, Maryland ,1994.

Stanbury, P.F. and A. Whitaker. **Principle of Fermentation Technology**, Pergamon Press. ,1984.

Stiles, Micheal E. and Holzapfel, Wilhelm H. Lactic acid bacteria of foods and their current Taxonomy . **Int. J. Food microbiol.** 36(1997) : 1 - 29 .

Takisawa, S., Kojima, S., Tamura, S., Fujinaga, S. Benno, Y. and Nakase, T. *Lactobacillus kefirgranum* sp. nov. and *Lactobacillus parakefir* sp. nov., two new species from kefir grains. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 44(1994) : 435-439.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Tortola, Gerard J. , Funke, Berdell R. , Case, Christine L. **Microbiology and Introduction 5th edition.** BenJamin/Commings Publishing Company Inc. ,1995.

Tsai , Sp. And Coleman , RD. Strain screening and development for industrial lactic acid fermentation. **Appl. Biochem. Biotechnol.** ,39/40(1993) : 323 – 335.

Vandamme, P. ,Pot, B. ,Gills, M. ,de Vos, P. ,Kersfers, K. and Swings, J. Polyphasic Taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiol. Rev.** 60(1996) : 407 – 438.

Venus, J. , Idler, F. and Albrecht, C. New ways of selecting lactic acid bacteria for biotechnological processes. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** ,37(1992) : 240 – 243.

Wood, Brian J.B. **Lactic Acid Bacteria in Health and Disease.** Elsevier Science Publishers Ltd. London , pp.263-296 , 1992.

Zayed, G. and Winter, J. Batch and continuous production of lactic acid from salt whey using free and immobilized culture of Lactobacilli. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 44(1995) : 362 – 366.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ก.

## สูตรอาหารและสารเคมีต่าง ๆ

**1. สูตรอาหาร MRS (ต่อปริมาณ 1 ลิตร)**

| | |
|---|---|
| Proteose peptone | 10 กรัม |
| Beef extract | 10 กรัม |
| Yeast extract | 5 กรัม |
| Glucose | 20 กรัม |
| Tween 80 | 1 มิลลิลิตร |
| Ammonium citrate $(NH_4)_2COOH$ | 2 กรัม |
| Sodium acetate $(NaCH_3COOH)$ | 5 กรัม |
| Magnesium sulfate $(MgSO_4.7H_2O)$ | 0.1 กรัม |
| Manganese sulfate $(MnSO_4.4H_20)$ | 0.05 กรัม |
| Dipotassium hydrogen phosphate $(K_2HPO_4)$ | 2 กรัม |

ปรับ pH เป็น $6.2 \pm 0.2$

**2. Mix Indicator**

| | |
|---|---|
| Bromthymol Blue | 0.2 กรัม |
| Neutral Red | 0.1 กรัม |
| ละลายใน Ethanol | 300 มิลลิลิตร |

**3. สารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ($HKC_8H_4O_4$)**

$HKC_8H_4O_4$

น้ำกลั่น

**วิธีการเตรียม**

- นำ $HKC_8H_4O_4$ มาอบให้แห้งที่ 120 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วทำให้เย็นในเดซิกเคเตอร์

- ชั่งน้ำหนักที่แน่นอนของ $HKC_8H_4O_4$ 2.0 - 2.4 กรัม ละลายและปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นในขวดวัดปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

- คำนวนหาความเข้มข้นโดยใช้สูตร

$$\text{ความเข้มข้น } HKC_8H_4O_4 \text{ (M)} = \frac{\text{น้ำหนัก } HKC_8H_4O_4 \text{ ที่ชั่งมา} \times 1000}{\text{มวลโมเลกุล } HKC_8H_4O_4 \times 100}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

* มวลโมเลกุล $HKC_8H_4O_4$ = 204

**4. โซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล (NaOH 0.1 N)**

| | |
|---|---|
| โซเดียมไฮดรอกไซด์ | 4 กรัม |
| ละลายในน้ำกลั่นและปรับปริมาตรครบ | 1 ลิตร |

**การหาความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH**

- บรรจุ NaOH ที่เตรียมไว้ลงในบิวเรต
- ไทเทรตกับสารละลายมาตรฐานโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลตปริมาตร 25 มิลลิลิตร โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นอินดิเคเตอร์ จนกระทั่งสารละลายเปลี่ยนเป็นสีชมพูอ่อน
- คำนวนหาความเข้มข้นที่แน่นอนดังสูตร

$$\text{ความเข้มข้นที่แน่นอนของ NaOH} = \frac{25 \times \text{ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน } HKC_8H_4O_4}{\text{ปริมาตรของ NaOH ที่ใช้ไทเทรต}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ข

คุณสมบัติของเวย์ที่นำมาใช้แทนกลูโคสในการทดลอง

## คุณสมบัติทางด้านเคมี

| CHEMICAL | |
|---|---|
| LACTOSE | 77.5% |
| PROTEIN (N x 6.38) | 13.15% |
| ASH (550°C) | 4.4% |
| MOISTURE | 2.0% |
| ORGANIC MILK SALTS | 2.0% |
| FAT | 1.0% |
| pH (10% SOL.20°C) | 6.5 |

## คุณสมบัติทางด้านจุลชีววิทยา

| MICROBIOLOGICAL | |
|---|---|
| STANDARD PLATE COUNT | 2000/g |
| YEASTS | <10/g |
| MOULDS | <10/g |
| ENTEROBACTERIACEAE | <10/g |
| STAPHYLOCOCCUS AUREUS | NEG.IN 1g |
| SALMONELLA | NEG.IN 50g |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**คุณสมบัติทางด้านกายภาพ**

| PHYSICAL AND ORGANOLEPTIC | |
|---|---|
| COLOUR | WHITE/CREAM |
| TASTE/ODOUR | NEUTRAL |
| PARTICLE SIZE | 100% < 500μm |

**คุณสมบัติทางด้านโภชนาการ**

| NUTRITIONAL | |
|---|---|
| ENERGY VALUE | 1570 kJ/100 g |

หมายเหตุ

ตารางข้อมูลข้างต้นมาจาก บริษัท วิคกี้ คอนโซลิเดท จำกัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

# ภาคผนวก ค

ตารางแสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS และอาหารดัดแปลง

| อาหาร | จำนวนโคโลนี x $10^8$ (โคโลนีต่อมิลิลิตร) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ชั่วโมงที่ 24 | | | | ชั่วโมงที่ 48 | | | | ชั่วโมงที่ 72 | | | |
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| CONTROL | 27.0000 | 31.0000 | 47.0000 | **35.0000** | 38.0000 | 62.0000 | 47.0000 | **49.0000** | 49.0000 | 14.0000 | 9.0000 | **24.0000** |
| $C_1N_2$ | 36.0000 | 37.0000 | 35.0000 | **36.0000** | 40.0000 | 80.0000 | 50.0000 | **56.6667** | 168.0000 | 258.0000 | 120.0000 | **182.0000** |
| $C_2N_1$ | 33.0000 | 21.0000 | 27.0000 | **27.0000** | 48.0000 | 25.0000 | 63.0000 | **45.3333** | 31.0000 | 28.0000 | 33.0000 | **30.6667** |
| $C_2N_2$ | 16.0000 | 19.0000 | 34.0000 | **23.0000** | 41.0000 | 75.0000 | 27.0000 | **47.6667** | 40.0000 | 50.0000 | 40.0000 | **43.3333** |
| $C_3N_1$ | 11.0000 | 20.0000 | 23.0000 | **18.0000** | 35.0000 | 50.0000 | 43.0000 | **42.6667** | 64.0000 | 39.0000 | 74.0000 | **59.0000** |
| $C_3N_2$ | 18.0000 | 17.0000 | 40.0000 | **25.0000** | 60.0000 | 90.0000 | 50.0000 | **66.6667** | 70.0000 | 140.0000 | 180.0000 | **130.0000** |
| $C_4N_1$ | 16.0000 | 35.0000 | 33.0000 | **28.0000** | 57.0000 | 61.0000 | 82.0000 | **66.6667** | 90.0000 | 61.0000 | 45.0000 | **65.3333** |
| $C_4N_2$ | 18.0000 | 34.0000 | 18.0000 | **23.3333** | 100.0000 | 40.0000 | 40.0000 | **60.0000** | 90.0000 | 70.0000 | 140.0000 | **100.0000** |

กำหนดให้

C คือ แหล่งคาร์บอนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

$C_1$ : กลูโคส 20 กรัมต่อลิตร

$C_2$ : แล็กโทส 20 กรัมต่อลิตร

$C_3$ : แล็กโทส 30 กรัมต่อลิตร

$C_4$ : แล็กโทส 40 กรัมต่อลิตร

N คือ แหล่งไนโตรเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อ

$N_1$ : โปรติโอสเพปโทน (proteose peptone) 10 กรัมต่อลิตร

$N_2$ : เพปโทน 10 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางบันทึกผลการทดลอง แสดงค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อในชั่วโมงต่าง ๆ

| อาหาร | เริ่มต้น | ค่าพีเอช | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ชั่วโมงที่24 | | | | ชั่วโมงที่48 | | | | ชั่วโมงที่ 72 | | | |
| | (blank) | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| CONTROL | 6.69 | 3.73 | 3.73 | 3.68 | **3.71** | 3.34 | 3.35 | 3.35 | **3.35** | 3.39 | 3.39 | 3.39 | **3.39** |
| $C_1N_2$ | 6.54 | 3.85 | 3.86 | 3.87 | **3.86** | 3.39 | 3.40 | 3.39 | **3.39** | 3.45 | 3.44 | 3.44 | **3.44** |
| $C_2N_1$ | 6.61 | 4.14 | 4.10 | 4.10 | **4.11** | 3.45 | 3.45 | 3.45 | **3.45** | 3.38 | 3.38 | 3.38 | **3.38** |
| $C_2N_2$ | 6.58 | 4.03 | 4.07 | 3.99 | **4.03** | 3.46 | 3.46 | 3.45 | **3.46** | 3.42 | 3.42 | 3.42 | **3.42** |
| $C_3N_1$ | 6.66 | 4.07 | 4.07 | 4.05 | **4.06** | 3.28 | 3.28 | 3.29 | **3.28** | 3.13 | 3.13 | 3.12 | **3.13** |
| $C_3N_2$ | 6.52 | 4.03 | 4.08 | 4.05 | **4.05** | 3.19 | 3.17 | 3.18 | **3.18** | 3.17 | 3.16 | 3.16 | **3.16** |
| $C_4N_1$ | 6.50 | 4.00 | 3.93 | 3.94 | **3.96** | 3.27 | 3.28 | 3.27 | **3.27** | 3.05 | 3.06 | 3.05 | **3.05** |
| $C_4N_2$ | 6.46 | 4.06 | 4.02 | 4.07 | **4.05** | 3.17 | 3.17 | 3.18 | **3.17** | 3.11 | 3.12 | 3.12 | **3.12** |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงผลปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต

| อาหาร | เริ่มต้น | ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | ชั่วโมงที่ 24 | | | | ชั่วโมงที่ 48 | | | | ชั่วโมงที่ 72 | | | |
| | | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| CONTROL | 1.63 | 6.10 | 6.25 | 6.50 | **6.28** | 8.05 | 7.50 | 8.20 | **7.92** | 9.00 | 8.80 | 8.80 | **8.87** |
| $C_1N_2$ | 1.20 | 4.80 | 4.95 | 7.60 | **4.78** | 6.60 | 7.50 | 7.50 | **7.20** | 7.70 | 7.70 | 7.60 | **7.67** |
| $C_2N_1$ | 1.13 | 4.15 | 4.15 | 4.10 | **4.13** | 9.90 | 10.10 | 10.40 | **10.13** | 8.40 | 8.40 | 8.10 | **8.30** |
| $C_2N_2$ | 1.04 | 4.50 | 4.05 | 4.50 | **4.35** | 10.10 | 10.30 | 10.10 | **10.17** | 8.70 | 9.25 | 7.60 | **8.52** |
| $C_3N_1$ | 1.20 | 4.30 | 4.75 | 4.55 | **4.53** | 7.10 | 7.10 | 7.05 | **7.08** | 11.00 | 11.25 | 10.80 | **11.02** |
| $C_3N_2$ | 1.10 | 4.35 | 4.15 | 4.40 | **4.30** | 10.10 | 10.30 | 10.40 | **10.27** | 11.15 | 11.10 | 11.20 | **11.15** |
| $C_4N_1$ | 1.28 | 4.45 | 4.85 | 4.70 | **4.67** | 9.40 | 9.50 | 9.40 | **9.43** | 12.70 | 12.50 | 12.90 | **12.70** |
| $C_4N_2$ | 1.30 | 5.00 | 4.65 | 4.45 | **4.70** | 11.10 | 11.00 | 11.65 | **11.25** | 12.20 | 12.50 | 12.80 | **12.50** |

**หมายเหตุ**

น้ำหนักที่แน่นอนของโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต ($HKC_8H_4O_4$) คือ 2.04 กรัม

ความเข้มข้นที่แน่นอนของโพแทสเซียมไฮโดรเจนพทาเลต คือ 0.1 โมลาร์

ปริมาณโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต คือ 25.63 มิลลิลิตร

ดังนั้นความเข้มข้นที่แน่นอนของโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต คือ 0.098 นอร์มอล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางแสดงปริมาณกรดแลคติกที่เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* ผลิตได้ในช่วงเวลาต่าง ๆ

| อาหาร | ปริมาณกรดแลคติก (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) | | | | | | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | ชั่วโมงที่ 24 | | | | ชั่วโมงที่ 48 | | | | ชั่วโมงที่ 72 | | | |
| | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย | 1 | 2 | 3 | เฉลี่ย |
| CONTROL | 9.8564 | 10.1871 | 10.7384 | **10.2606** | 14.1561 | 12.9434 | 14.4869 | **13.8621** | 16.2509 | 15.8099 | 15.8099 | **15.9569** |
| $C_1N_2$ | 7.9380 | 8.2688 | 14.1120 | **10.1063** | 11.9070 | 13.8915 | 13.8915 | **13.2300** | 14.3325 | 14.3325 | 14.1120 | **14.2590** |
| $C_2N_1$ | 6.6591 | 6.6591 | 6.5489 | **6.6224** | 19.3379 | 19.7789 | 20.4404 | **19.8524** | 16.0304 | 16.0304 | 15.3689 | **15.8099** |
| $C_2N_2$ | 7.6293 | 6.6371 | 7.6293 | **7.2986** | 19.9773 | 20.4183 | 19.9773 | **20.1243** | 16.8903 | 18.1031 | 14.4648 | **16.4861** |
| $C_3N_1$ | 6.8355 | 7.8278 | 7.3686 | **7.3440** | 13.0095 | 13.0095 | 12.8993 | **12.9728** | 21.6090 | 22.1603 | 21.1680 | **21.6458** |
| $C_3N_2$ | 7.1663 | 6.7253 | 7.2765 | **7.2104** | 19.8450 | 20.2860 | 20.5065 | **20.2125** | 22.1603 | 22.0500 | 22.2705 | **22.1603** |
| $C_4N_1$ | 6.9899 | 7.8719 | 7.5411 | **7.4676** | 17.9046 | 18.1251 | 17.9046 | **17.9781** | 25.1811 | 24.7401 | 25.6221 | **25.1811** |
| $C_4N_2$ | 8.1585 | 7.3868 | 6.9458 | **7.4970** | 21.6090 | 21.3885 | 22.8218 | **21.9398** | 24.0345 | 24.6960 | 25.3575 | **24.6960** |

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้