สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าจ้าคุณทหารลาดกระบัง

การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแพะ

นายชาคริต เจียมวัฒนสุข
นายเทอดศักดิ์ ขจรบุญ
นางสาวนลินรัตน์ ช่างสุวรรณ

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน 67310
วัน,เดือน,ปี 22 พ.ย. 2548

b 11644334
i.....

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2548

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Screening of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria from Goat.

Mr. Chacrit Jeamwattanasuk

Mr. Thirdsak Kajornboon

Miss. Nalinrat Changsuwan

A Special Project Submitted in Partial fulfilment of the Requirement for the

Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Lardkrabang

Academic Year 2005

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแพะ

นักศึกษา นายชาคริต เจียมวัฒนสุข
นายเทอดศักดิ์ ขจรบุญ
นางสาวนลินรัตน์ ช่างสุวรรณ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ	ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ รศ.ดร.ดุษณี ธนบริพัฒน์	
กรรมการ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง	
กรรมการ ผศ.ลินจง สุขสำภู	

.....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง)
หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากแพะ

นักศึกษา นายชาคริต เจียมวัฒนสุข

นายเทอดศักดิ์ ขจรบุญ

นางสาวนลินรัตน์ ช่างสุวรรณ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม

ปีการศึกษา 2548

อาจารย์ที่ปรึกษา รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง

บทคัดย่อ

ทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจาก นมดิบ ผิวหนัง ทวาร อวัยวะสืบพันธุ์ตัวผู้ เต้านม และมูล ของแพะได้เชื้อจำนวน 50 ไอโซเลต เมื่อนำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในการผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในอาหารแข็ง MRS พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียแลคติก 4 สายพันธุ์มีคุณสมบัตินี้ จากการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีรวิทยาบางประการพบว่าเชื้อสายพันธุ์ GM03 และ JP62 เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน ติดสีแกรมบวก จัดอยู่ในจีนัส *Lactobacillus* เชื้อสายพันธุ์ JP62 และ GB11 เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม ติดสีแกรมบวก จัดอยู่ในจีนัส *Pediococcus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Screening of Exopolysaccharide Producing Lactic Acid Bacteria From Goat.
Name	Mr. Chacrit Jeamwattanasuk Mr. Thirdsak Kajornboon Miss. Nalinrat Changsuwan
Department	Applied Biology
Program	Industrial microbiology
Academic Year	2005
Special Project Advisor	Asso. Prof. Dr. Nuanphan Naranong

Abstract

More than 50 isolates of lactic acid bacteria were isolated from the goats(raw milk, skin, anus, penis, mamma and dung). These isolates were screened for exopolysaccharide production in MRS agar. It was found that 4 strains of lactic acid bacteria were found to produce exopolysaccharide. From the morphological and some physiological studies, the strains GM03 and JP02 were Gram-positive rods and were placed into the genus *Lacobacillus*. In addition the strains JP62 and GB11 were Gram-positive cocci and were classified as the genus *Pediococcus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

การจัดทำงานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเพราะ ได้ความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ซึ่งได้ให้คำปรึกษาแนะนำในทุก ๆ เรื่องกับผู้วิจัยตลอดมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความอนุเคราะห์จากท่านและขอขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ รศ.ดร.ดุษณี ธนบริพัฒน์ และ ผศ.ลินจง สุขลำภู ที่กรุณาให้คำแนะนำ รวมทั้งตรวจแก้ไขข้อผิดพลาดและให้ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์โดยเฉพาะพี่เอกภพ , พี่ประสิทธิ์ และพี่วิทยา ที่ให้ความสะดวกในการทำวิจัยและให้ความสะดวกด้านอุปกรณ์และสารเคมี พี่ ๆ ปริญญาโท โดยเฉพาะพี่เอสและพี่มิกซ์ ที่ให้ทั้งคำปรึกษาและความช่วยเหลือเป็นอย่างดีมาโดยตลอด และขอบคุณเพื่อน ๆ ทุกคนที่คอยเป็นกำลังใจและให้ความช่วยเหลือในทุกเมื่อที่ต้องการความช่วยเหลือ รวมทั้งผู้มีอุปการคุณที่มิอาจกล่าวนามได้ครบถ้วน ณ ที่นี้ ที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจให้ตลอดจนความร่วมมือในเรื่องต่างๆอย่างดียิ่ง

ชาคริต เจียมวัฒนสุข
เทอดศักดิ์ ขจรบุญ
นลินรัตน์ ช่างสุวรรณ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ที่มาโครงงานพิเศษ	1
1.2 วัตถุประสงค์	1
1.3 ขอบเขตของปัญหาพิเศษ	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 แบคทีเรียแลคติกที่สามารถสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ได้	3
2.2 การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียในระดับจีนัส	12
2.3 พอลิแซ็กคาไรด์	13
2.4 ชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์	14
2.5 วิถีหลักในกระบวนการหลักและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์	16
2.6 หน้าที่และประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์	18
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	20
3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี	20
3.2 วิธีการทดลอง	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผล	23
4.1 ผลการทดลอง	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 29
5.1 การจัดกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกในระดับจีนัส 29
5.2 แบคทีเรียแลคติกชนิดที่สามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ได้ 29

เอกสารอ้างอิง 30

ภาคผนวก
ภาคผนวก ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 34
ภาคผนวก ข. การวิเคราะห์ 35

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
ตารางที่ 2.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแลคติกแต่ละสกุล	4
ตารางที่ 2 2 ตัวอย่างชนิดของ *Lactobacillus* ที่พิจารณาจากคุณสมบัติในการหมัก	6
ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา	
ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ	25
ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงชนิดและวิตามินที่พบในแหล่งของคน วัวและแพะ	26
ตารางที่ 4.4 ตารางแสดงแร่ธาตุของน้ำนมแพะ โคและมนุษย์	27

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
2.1	วิถี 6-phosphogluconate / Phosphoketolase	17
2.2	วิถี Leloir	18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของโครงงานพิเศษ

พอลิแซ็กคาไรด์จัดเป็นสารพวกคาร์โบไฮเดรตที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมโดยเฉพาะผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับนม เช่น โยเกิร์ต ชีส ไอศกรีม เป็นต้น ทำหน้าที่เป็นสารทำให้เกิดความคงตัว (Stabilizing agent) มีส่วนช่วยในการรวมตัวกับน้ำหรือทำให้ของเหลวหนืดขึ้น พบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งสร้างทั้งชนิดที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียว(Homopolysaccharide)หรือที่มีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเป็นองค์ประกอบหลายชนิด (Heteropolysaccharide) ที่พบมากเป็นกลุ่มของน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส ส่วนน้ำตาลแรมโนส ฟรุสโตส แมนโนส และกาแลคโตซามีน พบในปริมาณน้อย แบคทีเรียแลคติกที่มีความสำคัญในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้แก่ *Streptococcus* และ *Lactobacillus* (Frengova และคณะ, 2002) ลักษณะสำคัญที่พบคือ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คะตะเลส ไม่สร้างสปอร์ พบทั้งลักษณะเป็นท่อน (*Lactobacillus*) กลม (*Streptococcus, Lactococcus* และ *Leuconostoc*) อาจต่อกันเป็นคู่ สาย หรือเรียงกันเป็นสี่เซลล์ (Tetrad) ซึ่งปัจจุบันแบคทีเรียแลคติกถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลายในด้านอุตสาหกรรมอาหาร เพราะแบคทีเรียแลคติกมีความปลอดภัยซึ่งต่างจากการใช้แบคทีเรียกลุ่มอื่นในการผลิต เพราะเชื้อบางสายพันธุ์ไม่เหมาะสมต่อการนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์อาหาร หรืออาจก่อให้เกิดโรคได้ แบคทีเรียแลคติกจึงเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร นอกจากความปลอดภัยที่ผู้บริโภคได้รับแล้วยังเอื้อประโยชน์ในด้านสุขภาพของผู้บริโภคซึ่งเป็นผลพลอยได้ที่นับว่าเป็นคุณประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ที่มีกลุ่มแบคทีเรียแลคติกอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแพะ
2. เพื่อศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและสรีระวิทยาบางประการของแบคทีเรียแลคติก ที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.3 ขอบเขตของปัญหาพิเศษ

1. คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากตัวอย่างแพะในกลุ่มผู้เลี้ยงแพะในชุมชนวิมานสุข
2. จัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่สามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ได้ในระดับสกุล (Genus)
3. ศึกษาความสามารถในการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ของเชื้อแบคทีเรียแลคติดที่คัดเลือกได้ที่สามารถเจริญได้ในนมแพะ

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่พบในตัวอย่าง
2. ทราบถึงชนิดของแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตพอลิแซ็กคาไรด์
3. เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อใช้ในการศึกษาการผลิตสารพอลิแซ็กคาไรด์ให้ได้ปริมาณสูงและศึกษาคุณสมบัติของสารพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 แบคทีเรียแลคติกที่สังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ได้

แบคทีเรียแลคติก หมายถึง กลุ่มของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกและมีความสามารถในการหมักนมให้เกิดตะกอน นอกจากนี้ยังรวมถึงแบคทีเรียแกรมลบกลุ่มโคลิฟอร์มด้วย แต่แบคทีเรียแลคติกมีเฉพาะที่เป็นแบคทีเรียแกรมบวกเท่านั้นจึงได้มีการแยกกลุ่มแบคทีเรียกลุ่มโคลิฟอร์มออกแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีลักษณะสำคัญ คือ ไม่มีการเคลื่อนที่ (Non-motile) ไม่มีการสร้างสปอร์ (Non-Sporeforming) มีความสามารถในการหมักคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดแลคติก รูปร่างเป็นทรงกลม (cocci) และท่อน (rod) ตามลำดับ

Salminen และคณะ (2004) ได้กล่าวถึงสกุลของแบคทีเรียแลคติค 5 สกุล ได้แก่ *Aerococcus, Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus* และ *Streptococcus* แต่ในปัจจุบันได้มีการจัดแบ่งสกุลของแบคทีเรียแลคติกใหม่และได้ตีพิมพ์เพื่อเผยแพร่ซึ่งจะประกอบด้วย 10 สกุลด้วยกัน คือ *Lactobacillus, Leuconostoc, Streptococcus, Pediococcus, Enterococcus, Aerococcus, Lactococcus, Vagococcus, Carnobacterium* และ *Tetragenococcus* ในปี ค.ศ. 1987 ได้เปลี่ยนชื่อสกุล *Lactobacillus* ที่ไม่สามารถเจริญหรือแพร่พันธุ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีอะซีเตทเป็นแหล่งคาร์บอนเป็นสกุลใหม่ชื่อ *Carnobacterium* ในปี ค.ศ. 1989 ได้จัดแบ่งสกุล *Lactococcus* เป็นสกุลใหม่เพิ่มอีกคือ *Vagococcus* และในปี ค.ศ. 1990 ได้เปลี่ยน *Pediococcus halophilus* เป็นสกุล *Tetragenococcus* ต่อมาได้มีการรวบรวมสกุลของแบคทีเรียแลคติกเพิ่มอีก 6 สกุลรวมเป็น 16 สกุล ดังนี้ *Aerococcus, Alloiococcus, Carnobacterium, Dolosigranulum, Enterococcus, Globicatella, Lactobacillus, Lactococcus, Lactosphaera, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissella*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.1 ลักษณะที่แตกต่างกันของแบคทีเรียแลคติกแต่ละสกุล

ลักษณะ / สายพันธุ์	ท่อน		กลม							
	C.	***La.***	***A.***	***E.***	***V.***	***Lc.***	***Ln.***	***P.***	***S.***	***T.***
การเรียงตัวของเซลล์แบบ Tetrad	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+
เฟอร์เมนท์กลูโคสให้ CO_2	-	±	-	-	-	-	+	-	-	-
เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส	+	±	+	+	+	+	+	±	-	+
เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	-	±	-	+	-	-	-	±	±	-
เจริญที่มี 6.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์	ND[a]	±	+	+	-	-	±	±	+	-
เจริญที่มี 18 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
เจริญที่พีเอช 4.4	ND	±	-	-	±	±	±	+	-	-
เจริญที่พีเอช 9.6	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
ลักษณะสัณฐานของกรดแลคติก	L	DL[b] D, L	L	L	L	L	D	L, DL[b]	L	L
ความสามารถในการเคลื่อนที่	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-

ที่มา: Batt (1999)

C. = Carnobacterium, *La.= Lactobacillus*, *A. = Aerococcus*, *E. = Enterococcus*, *V. = Vagococcus* *Ln. = Leuconostoc*, *P. =Pediococcus*, *S =Streptococcus*, *T.=Tetragenococcus* , *Lc.= Lactococcus*

ND = Not determine, ND[a] = เจริญไม่ได้ใน 8 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์, + = positive, – = negative, ± = มีการตอบสนองที่ไม่เหมือนกันระหว่างสปีชีส์, b = สร้าง D, Lหรือ DL-Lactic acid

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1 สกุล *Lactobacillus*

เซลล์มีรูปร่างท่อนหรืออาจมีลักษณะเป็นท่อนสั้นหรือเรียวยาว ไม่สร้างสปอร์ เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่สุดส่วนใหญ่เป็น homofermentative ซึ่งหมักน้ำตาลได้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ ลักษณะคือ เปอร์เซ็นต์โมล G+C ในดีเอ็นเอเท่ากับ 33-35 เปอร์เซ็นต์ ต้องการสารอาหารที่ซับซ้อนในการเจริญพบว่ามีความต้องการองค์ประกอบของ กรดอะมิโน เพปไทด์ อนุพันธ์ของกรดนิวคลีอิก วิตามิน เกลือแร่ กรดไขมัน และแหล่งของคาร์โบไฮเดรตที่สมบูรณ์ สามารถเจริญได้สูงในสภาวะไร้อากาศที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 - 10 เปอร์เซ็นต์ เจริญในช่วงอุณหภูมิ 5 - 53 องศาเซลเซียส และเหมาะสมที่ 30 - 40 องศาเซลเซียส พีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 5.5 - 5.8 หรือต่ำกว่า ส่วน พีเอชที่เจริญได้ทั่วไปอยู่ที่ 5.0 หรือต่ำกว่าพบว่าที่สภาวะเป็นกลางหรือด่างเล็กน้อยจะทำให้เชื้อเจริญอยู่ในช่วงของระยะพัก (Lag phase) มากขึ้นเป็นผลให้ผลได้ของการเจริญลดลง มักไม่พบว่าก่อให้เกิดโรคอยู่ในผลิตภัณฑ์ที่เกี่ยวกับพืชและผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมักที่มีแหล่งคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ เช่น อาหารสัตว์ เบียร์ ไวน์ ผลไม้ น้ำผลไม้ และผักดอง เป็นต้น นอกจากนี้ยังพบอยู่ในช่องคลอด ลำไส้ของสัตว์เลือดอุ่น เช่น มนุษย์ เป็นต้น (Wood และ Holzapfel, 1995) นอกจากนี้ยังพบในเยื่อเมือกของมนุษย์และสัตว์ พืช น้ำเสีย และอาหารเน่าเสีย เป็นต้น ซึ่งจัดแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

2.1.1.1 กลุ่ม Obligately Homofermentative Lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสหรือน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์) เป็นกรดแลคติกโดยวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ซึ่งสามารถผลิตเอนไซม์ Fructose-1,6- bisphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase ดังนั้นจึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทส (น้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม) และกลูโคเนตได้

2.1.1.2 กลุ่ม Facultatively Heterofermentative Lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลคติกโดยวิถี EMP สามารถผลิตเอนไซม์ Aldolase และ Phosphoketolase ดังนั้นจึงสามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทส (โดยทั่วไปจะเป็นกลูโคเนต)

2.1.1.3 กลุ่ม Obligately Heterofermentative Lactobacilli

หมักน้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนตเป็นแลคเตท เอธานอล กรดแอซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ ปัจจุบันสามารถแบ่งชนิดของสกุล *Lactobacillus* ได้โดยการอาศัยการแบ่งกลุ่มโดยการพิจารณาจากคุณสมบัติในการหมัก ดังตารางที่ 2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2.2 ตัวอย่างชนิดของ *Lactobacillus* ที่พิจารณาจากคุณสมบัติในการหมัก

กลุ่มที่ 1 **Obligate Homofermenters**	**กลุ่มที่ 2** **Facultative Heterofermenters**	**กลุ่มที่ 3** **Obligate Heterofermenters**
Lactobacillus acidophilus	*Lactobacillus acetotolerans*	*Lactobacillus brevis*
Lb. amylophilus	*Lb. alimentarius*	*Lb. buchneri*
Lb. amylovorus	*Lb. bifermentans*	*Lb. collinoides*
Lb. aviaries	*Lb. casei*	*Lb. fermentum*
subsp.*araffinosus*	*Lb. coryniformis*	*Lb. fructivorans*
subsp. aviaries	subsp. coryniformis	*Lb fructosus*
Lb. crispatus	subsp. torquens	*Lb. hilgardii*
Lb. delbrueckii	*Lb. curvatus*	*Lb. kefir*
subsp. *bulgaricus*	*Lb. homohiochii*	*Lb. malefermentans*
subsp. *delbrueckii*	*Lb. paracasei*	*Lb. panis*
subsp. *lactis*	subsp. *paracasei*	*Lb. parakefir*
Lb. farciminis	subsp. *tolerans*	*Lb. pontis*
Lb. gallinarum	*Lb. paraplantarum*	*Lb. reuteri*
Lb. gasseri	*Lb. pentosus*	*Lb. sanfrancisco*
Lb. helveticus	*Lb. plantarum*	*Lb. suebicus*
Lb. jensenii	*Lb. rhamnosus*	*Lb. vaccinostercus*
Lb. johnsonii	*Lb. sake*	*Lb. vaginalis*
Lb. kefiranofaciens		
Lb. kefirgranum		
Lb. mali		
Lb. ruminis		
Lb. salivarius		
subsp. salicinus		
subsp. salivarius		
Lb. sharpeae		

ที่มา: Stiles และ Holzapfel (1997)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.4 เชื้อในกลุ่ม Lactobacillus กับชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตขึ้น

เชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus helveticus* 776 สามารถผลิตบริเวณซ้ำชนิด Hexasaccharide ที่ประกอบด้วย D-galactose และ D-glucose (Wood และ Holzapfel, 1995)

เชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus helveticus* Ty1-2 สามารถผลิตบริเวณซ้ำชนิด Heptasaccharide ที่มีส่วนของ Galactopyranosyl, D-glucopyranosyl, 2-acetamido-2-deoxy-D-glucopyranosyl (Yamomoto และคณะ, 1994)

เชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus helveticus* Lh59 และ *Lactobacillus helveticus* TN-4 ที่สันนิษฐานว่าเกิดการกลายพันธุ์จากเชื้อสายพันธุ์ TY1-2 ซึ่งผลิตพอลิเมอร์ชนิด Tetrasaccharide เป็นแกนกลางที่มีแขนงข้างเป็น lactosyl และมีอัตราส่วนของ D-galactose และ D-glucose ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (Stingele และคณะ, 1997)

เชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus sake* 0-1 ที่แยกได้จากผลิตภัณฑ์เนื้อหมักมีพอลิเมอร์ชนิด Pentasaccharide บริเวณซ้ำเป็นพวกน้ำตาล กลูโคส แรมโนส และกลีเซอรอลฟอสเฟต (Robijn และคณะ, 1996)

เชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB2772 มีน้ำตาลกาแลคโตสเป็นส่วนมาก มีกลูโคส และแรมโนสในปริมาณน้อยโดยคล้ายกับสายพันธุ์ *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* rr (Grobben และคณะ, 1998)

เชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* LMG 9433, *Lactobacillus kefiranofaciens* K_1 และ *Lactobacillus paracasei* 34-1 สร้างบริเวณซ้ำชนิด Pentamers, Hexamers, Tetramers ตามลำดับ (Mukai และคณะ, 1990 ; Robijn และคณะ, 1996)

เชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus rhamnosus* C 83 สามารถสร้างบริเวณซ้ำชนิด pentasaccharide กับโครงสร้างที่เป็นเส้นตรง (Robijn และคณะ, 1996)

เชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* CG 11 และ *Lactobacillus casei* 0-1 สามารถผลิตเอกโซ-พอลิแซ็กคาไรด์ในสภาวะอุณหภูมิต่ำ ซึ่งเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ในทางตรงกันข้าม *Lactobacillus* ชนิดอื่นสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ในสภาวะที่อุณหภูมิสูง (Cerning, 1990)

เชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus plantarum* EP 56 พบว่าพอลิแซ็กคาไรด์มีองค์ประกอบของน้ำตาลเป็น N-acetylgalactosamine, glucose และ galactose ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 ต่อ 1 (Tallon และคณะ, 2003)

2.1.2 สกุล *Lactococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1.2 × 0.5-1.5 ไมโครเมตร มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว คู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ไม่มีการสร้างแคปซูล ไม่สร้างก๊าซจากการหมักกลูโคส ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส ใช้เป็นกล้าเชื้อในผลิตภัณฑ์นม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และ

ไม่สามารถเจริญได้ที่ความเข้มข้นเกลือที่มากกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ จากอุณหภูมิสูงสุดที่สามารถเจริญได้และมีความทนทานต่อเกลือน้อยนั้นเป็นลักษณะที่ทำให้สายพันธุ์นี้ถูกเปรียบเทียบว่ามีความใกล้เคียงกับพวกสายพันธุ์ *Streptococcus* ลักษณะเด่นของ *Lactococcus* ที่ต่างจากแบคทีเรีย แลคติกชนิดอื่นรวมไปถึงสมาชิกตัวอื่นๆ ของสกุล *Streptococcus* ทั้งค่าพีเอช ความทนทานต่อเกลือและอุณหภูมิที่มีผลต่อการเจริญเติบโต ขณะที่แบคทีเรียแลคติกบางชนิดสร้าง D-lactic acid, L-lactic acid หรือมีการสร้างทั้งแบบ D และ L *Lactococcus* จะสร้างเฉพาะแบบ L-lactic acid แต่เพียงอย่างเดียวเท่านั้น (Wood และ Holzapfel, 1995)

ปัจจุบันประกอบด้วย 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Lactococcus garviae*, *Lactococcus lactis*, *Lactococcus plantarum*, *Lactococcus raffinolactis* และ *Lactococcus pisdium* ซึ่งสามารถแยกได้โดยวัดความสามารถที่จะเจริญในอุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียสและที่ความเข้มข้นเกลือสูงกว่า 4 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ทั้ง 5 สายพันธุ์ยังมีความสามารถที่ต่างกันออกไปในด้านการสร้างกรดจากน้ำตาลรวมไปถึง แลคโตส แมนนิทอล และราฟฟิโนส การตรวจสอบอย่างละเอียดเพื่อทดสอบความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ *Lactococcus* (Salminen และคณะ, 2004)

2.1.2.1 เชื้อในกลุ่ม *Lactococcus* กับชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตขึ้น

ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้จากเชื้อสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ซึ่งถูกเลี้ยงในอาหารเหลว M17 ซึ่งประกอบด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์กลูโคส สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งทำหน้าที่เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์นมหมัก ซึ่งองค์ประกอบของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวส่วนมากเป็นพวกน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส และแรมโนส มีรายงานว่าพบฟอสเฟตเป็นส่วนประกอบใน Heteropolysaccharide ของผลิตภัณฑ์ viilian ที่ผลิตโดยเชื้อสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 0495 ซึ่งแยกได้จากหัวเชื้อของ viili (Deveau และคณะ, 2002)

เชื้อสายพันธุ์ B40 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MRS พบว่าสามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ได้เช่นกันซึ่งจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคสเท่ากับฟรักโตส เชื้อสายพันธุ์ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LC 330 สามารถผลิตได้ทั้งเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีองค์ประกอบเป็นประจุลบของน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส แรมโนส กลูโคซามีน และฟอสเฟต บวก กับเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นกลางประกอบด้วยน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส และกลูโคซามีน กับปลายแขนงที่เป็นน้ำตาลกาแลคโตส (Madiedo และ Reyes-Gavilán, 2005)

2.1.3 สกุล *Streptococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรี มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8 – 1.2 ไมโครเมตร มีการจัดเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสายโซ่โดยการเกิดเป็นสายโซ่จะเกิดได้ดีที่สุดในสภาวะที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวและความยาวของสายโซ่จะเริ่มจากเพียงไม่กี่เซลล์จนมีมากกว่า 50 เซลล์ เป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แบคทีเรียพวก Homofermentative ดังนั้นจึงมีการผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส บางสายพันธุ์อาจมีการสร้างแคปซูล (Capsule) เจริญที่อุณหภูมิ 25 - 45 องศาเซลเซียส และเหมาะสมที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (Johnและคณะ, 1994)

2.1.3.1 เชื้อในกลุ่ม Streptococcus กับชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตขึ้น

เชื้อสายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus* ใช้เลี้ยงร่วมกับเชื้อสายพันธุ์ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ในกระบวนการผลิตโยเกิร์ต โดยเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกผลิตขึ้นนั้นมีลักษณะคล้ายหรือเหมือนกับโครงสร้างโมเลกุลปฐมภูมิ (Frengova และคณะ, 2002)

โครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อสายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus* CNCMI733, CNCMI734 และ CNCMI735 ประกอบด้วยบริเวณซ้ำชนิด Tetrasaccharide ที่มีน้ำตาล D-glucose, D-galactose, และ N-acetyl-D-galactosamine ในอัตราส่วน 2 ต่อ 1 ต่อ 1 (Broadbent และคณะ, 2003)

เชื้อสายพันธุ์ Sfi12 และ Sfi39 พบว่าเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตได้นั้นมีขนาดมวลโมเลกุลมากกว่า 2×10^6 ดาลตัน แต่เชื้อทั้งคู่มีองค์ประกอบของน้ำตาลและโครงสร้างของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่แตกต่างกัน เชื้อสายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus* Sfi12 มีบริเวณซ้ำเป็นชนิด Hexasaccharide ของน้ำตาลกาแลคโตส กลูโคส และแรมโนส ส่วนเชื้อสายพันธุ์ *Streptococcus thermophilus* Sfi39 สร้างบริเวณซ้ำชนิด Tetresaccharide ของน้ำตาลกาแลคโตสและกลูโคส (Tallon และคณะ, 2003)

2.1.4 สกุล *Enterococcus*

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลม เซลล์อาจอยู่เป็นคู่ๆ หรือต่อกันเป็นสายโซ่สั้น ไม่มีเอนโดสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ไม่รีดิวซ์ไนเทรต ไม่สร้างเอนไซม์

คะตาเลส เป็นพวกที่ใช้หรือไม่ใช้ออกซิเจนก็ได้ในการเจริญ ไม่สร้างก๊าซจากกลูโคสแต่เดิมถูกจัดอยู่ในกลุ่มเอ็นเทอโรคอคคัส ของสกุล *Streptococcus* ซึ่งจะประกอบด้วย *S. faecalis* และ *S. faecium* โดยทั้งสอง สปีชีส์มีความคล้ายกันมากแต่มีความแตกต่างกันทางด้านสรีรวิทยาเท่านั้น *S. faecalis* ทนต่อความร้อนได้มากกว่าและแยกได้จากคน ส่วน *S. faecium* แยกได้จากพืช และ *S. faecium* อยู่ในอาหารดิบเสมอ แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นคือ สามารถเจริญได้ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส พวก Enterococci มีลักษณะบางประการที่ไม่เหมือนกับ Streptococci คือ เป็นพวกที่ทนความร้อนได้ดี คือสามารถทนต่ออุณหภูมิที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีได้ สามารถทนเกลือได้ถึงร้อยละ 6.5 หรือมากกกว่า เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอช 9.6 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศา มีเปอร์เซ็นต์โมล G+C ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 37 – 40 เปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียแลคติกพวก Enterococci จัดเป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับโรคทางด้านอาหาร ส่วนใหญ่จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ในด้านความปลอดภัยของอาหารนอกจากนี้ยังถูกใช้เป็นโปรไบโอติก (Probiotic)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับป้องกันและช่วยบำบัดอาการที่ผิดปกติภายในลำไส้ของมนุษย์และสัตว์โดยเฉพาะเชื้อ *Enterococcus faecium* ถูกนำไปประยุกต์ร่วมกับกระบวนการหมักเพื่อผลิตเนยแข็งในหลายๆ ประเทศทางตอนใต้ของทวีปยุโรป ไม่นิยมใช้ในการผลิตอาหาร เนื่องจากจะก่อให้เกิดโรค (Wood และ Holzapfel, 1995)

Enterococci มีลักษณะแตกต่างจาก streptococci ทั่วไปเช่น เป็น thermoduric ทนทานต่อความร้อนที่ใช้ในการพลาสเจอร์ไรซ์หรือความร้อนที่สูงกว่านี้ จึงมีชีวิตรอดและเจริญได้ในนมที่พาสเจอร์ไรซ์แล้วทนต่อความเข้มข้นของเกลือถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์หรือมากกว่า สามารถเจริญได้ในสภาพเป็นด่างที่มีค่าพีเอช 9.6 อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วงกว้าง เช่น บางชนิดเพิ่มจำนวนที่อุณหภูมิต่ำกว่า 5-8 องศาเซลเซียส แต่ส่วนมากเจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 48-50 องศาเซลเซียส พบ ว่า *E. faecalis* เจริญได้ในเบคอนเนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่ม Enterococci มาจากทางเดินอาหารของคนและสัตว์จึงใช้เป็นจุลินทรีย์บ่งชี้การปนเปื้อนจากอุจจาระในอาหาร แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในผลิตภัณฑ์นมและอาจปนเปื้อนอุปกรณ์และเครื่องใช้ต่างๆ ภายในครัวได้ (Johnและคณะ, 1994) Xu และคณะ (2000) พบว่าเชื้อ *Enterococcus faecalis* สามารถสังเคราะห์ polysaccharide ได้

2.1.5 สกุล *Vagococcus*

ในอดีตจัดอยู่ในสกุล Streptococcus เซลล์มีลักษณะรีหรือท่อนสั้น ขนาดเซลล์ประมาณ 0.5-1.2 × 0.5-2.0 ไมโครเมตร อาจอยู่เป็นเดี่ยวๆ คู่ หรือสายโซ่สั้นๆ บางสายพันธุ์สามารถเคลื่อนที่ได้ด้วยแฟลกเจลลาชนิด Peritrichous flagella ไม่รีดิวซ์ไนเตรต อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ในช่วง 25-35 องศาเซลเซียส ตัวอย่างสปีชีส์ เช่น *Vagococcus fluvialis* แยกได้จากอุจจาระของไก่และน้ำในแม่น้ำ และ *Vagococcus salmoninarum* ซึ่งแยกได้จากปลาแซลมอลที่เป็นโรค อาจเกิดความสับสนได้ง่ายกับเชื้อในสกุล *Lactococcus* แต่สามารถแยกความแตกต่างได้ชัดเจนจากองค์ประกอบของกรดไขมัน

2.1.6 สกุล *Tetragenococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม มีการจัดจำแนกใหม่แยกจากสกุล *Pediococcus* เนื่องจากมีความสามารถในการเจริญในอาหารซึ่งประกอบด้วยเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการหมักกรดแลคติกในผลิตภัณฑ์อาหารที่ประกอบด้วยความเข้มข้นของเกลือที่สูง เช่น ซอสถั่วเหลือง (Soy sauce) ตัวอย่างสปีชีส์ ได้แก่ *T. halophilus*, *T. muriaticus*

2.1.7 สกุล *Pediococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36 - 1.43 ไมครอน มีการแบ่งตัวในลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกันทำให้เกิดการเรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกันทุกสปีชีส์ผลิตกรดแลคติก ชนิด DL ยกเว้นสปีชีส์ *P. dextrinicus* ที่ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) จากการหมักน้ำตาลกลูโคส สามารถเจริญได้ใน salt brines ที่มีความเข้มข้นถึง 5.5 เปอร์เซ็นต์ แต่จะเจริญ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ได้ไม่ดีที่เกลือมีความเข้มข้นถึงประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิสำหรับการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงประมาณ 7-45 องศาเซลเซียส และเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 25-32 องศาเซลเซียส

2.1.8 สกุล *Aerococcus*

เซลล์มีรูปร่างกลม มีขนาดเซลล์ 1.0 - 2.0 ไมโครเมตร การเจริญจะลดลงเมื่อมีก๊าซออกซิเจน มีการผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ถ้าเจริญภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนไม่สามารถย่อยสลายสารจำพวกเจลาติน ไม่รีดิวซ์ไนเตรท อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ 30 องศาเซลเซียส ตัวอย่าง 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus urinae* และ *A. viridans* ซึ่งเดิมเป็นสปีชีส์ในสกุล *Pediococcus* คือ *P. homari* และ *P. urinaeequi*

2.1.9 สกุล *Leuconostoc*

เคยถูกเรียกชื่อว่า *Betacoccus* เนื่องจากเป็น herterofermentative ที่หมักน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติก กรดอะซิติก เอธิลแอลกอฮอล์ และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

ในอาหารที่ประกอบด้วยกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดออกคล้ายสกุล *Lactobacillus* แต่เมื่อเจริญในน้ำนมพบว่าเซลล์มีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว โคโลนีมีลักษณะเล็กมีเมือกเมื่อเจริญบนอาหารที่ประกอบด้วยน้ำตาลซูโครส เป็นพวก Facultative anaerobe อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ 20 - 30 องศาเซลเซียส ไม่สามารถย่อยสลายสารจำพวก Arginine และไม่สร้างสารประกอบจำพวกอินโดล เซลล์อยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตกรดแลคติกชนิด D(-) เอทานอล ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง อาจมีความสับสนระหว่างพวก Coccoid rod กับ Heterofermentative lactobacillus

2.1.10 สกุล *Oenococcus*

ประกอบด้วยสปีชีส์ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc onenos* ด้วยคุณสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูงเป็น facultative anaerobe พบใน fruit mashes สามารถเกิดกระบวนการ decarboxylation เปลี่ยนมาเลทไปเป็นกรดแลคติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จึงใช้ในการหมักไวน์ครั้งที่สองหลังจากหมักแอลกอฮอล์เพื่อให้มีรสกลมกล่อมไม่มีรสเปรี้ยวของ กรดมาลิก

2.1.11 สกุล *Weissella*

เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมค่อนข้างรีคล้ายแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* เซลล์มักจะอยู่เดี่ยวๆ หรือบางครั้งพบเป็นสายโซ่สั้นๆ ไม่สร้างเอนไซม์คะตาเลส ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างก๊าซจากการหมักกลูโคส เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ผลิตกรดแลคติกทั้ง DL และ D มีเปอร์เซ็นต์โมลของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 46.3 – 47.0 เปอร์เซ็นต์ ในปัจจุบันถูกจัดให้เป็นสกุลใหม่เพื่อหลีกเลี่ยงความสับสนในด้านการจัดจำแนกแบคทีเรียระหว่างสกุล *Lactobacillus* *Lactococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่งแต่เดิมนั้นมีสปีชีส์อยู่ในสกุล *Leuconostoc*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และ *Lactobacillus* คือ *Leuconostoc paramesenteriodes* (*Weissella paramesenteroides*) *Lactobacillus confusus* (*W. confusa*) *Lactobacillus halatolerans* (*W. halotolerans*) *Lactobacillus kandleri* (*W.kandleri*) *Lactobaciccus minor* (*W. minor*) *Lactobacillus viridescens* (*W. hellenica*) (Wood และ Holzapfel, 1995)

2.1.12 สกุล *Carnobacterium*

เซลล์เป็นรูปร่างท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียวมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 - 0.7 ไมโครเมตร และยาว 1.1 - 3.0 ไมโครเมตร จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือเซลล์คู่ ไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แอซิเตท และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส ไม่รีดิวซ์ไนเตรท พบในผลิตภัณฑ์จำพวกเนื้อ และปลา มีหนึ่ง สปีชีส์ที่ก่อให้เกิดโรคคือ *C. piscicola* ซึ่งจะก่อให้เกิดโรคกับปลาซาลมอน (Wood และ Holzapfel, 1995)

2.2 การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียในระดับสกุล

แบคทีเรียในกลุ่มแลคติกแบ่งได้เป็นกลุ่มที่มีลักษณะเป็นท่อน *(Lactobacillus, Carnobacterium)* และรูปร่างกลม (*Lactococcus , Leuconostoc , pediococcus* ฯลฯ) ยกเว้นเชื้อในสกุล *Weissella* ที่อาจพบได้ทั้งรูปร่างที่มีลักษณะกลมและท่อน ถ้ามีการแบ่งเซลล์ออกเป็น 2 ทิศทางในระนาบเดียวกันเซลล์ที่มีลักษณะเป็น 4 เซลล์ที่เรียกว่า Tetrad เนื่องจากการแบ่งเซลล์เป็น 2 ระนาบ ซึ่งสามารถใช้ในการจัดจำแนกเชื้อในกลุ่มของพวกที่มีรูปร่างกลม กลุ่มที่มีการเรียงตัวเป็น tetrad เช่นสกุล *Aerococcus Pediococcus* และ *Tetragenococcus*. กลุ่มที่มีการหมักน้ำตาลกลูโคสภายใต้สภาวะมาตรฐาน ปริมาณกลูโคสและปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญ (กรดอะมิโน , วิตตามิน , และกรดนิวคลีอิก) ที่ไม่จำกัด บวกกับสภาวะที่ไม่ก๊าซออกซิเจนหรือมีปริมาณจำกัด ภายใต้สภาวะเช่นนี้เราจะแบ่งเชื้อออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ Homofermentative คือ หมักน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแล-คติกเป็นส่วนใหญ่ และ Heterofermentative คือ หมักน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติก เอทานอล กรดอะซิติก และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ โดยเราสามารถแยกความแตกต่างของกลุ่มออกจากกลุ่ม Homofermentative โดยสังเกตจากฟองที่เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ถูกผลิตขึ้น ซึ่งพบว่าเชื้อในกลุ่มสกุล *Leuconostoc , Oenococci , Weissellas* และ บางส่วนของเชื้อในกลุ่มสกุล *Lactobacillus* นอกจากนั้นจะเป็นในกลุ่มของ Homofermentative การเจริญที่อุณหภูมิหนึ่งสามารถใช้ในการแยกแยะเชื้อในกลุ่มที่มีลักษณะรูปร่างกลม พบว่าเชื้อในกลุ่มสกุล *Entercocci* จะเจริญได้ทั้งที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส กลุ่มสกุล *Lactococci* และ *Vagococci* เจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส สกุล *Streptococcus* จะไม่เจริญที่ 10 องศาเซลเซียส ในขณะที่ 45 องศาเซลเซียส อาจมีการเจริญในเชื้อบางสปีชีส์ ความสามารถในการทนเกลือที่ 6.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ใช้ในการจำแนกระหว่างเชื้อสกุล *Enterococci , Lactococci ,*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Vagococcus และ *Streptococcus* (พบว่าอาจมีปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นหลากหลาย) นอกจากนี้ยังมีการทดสอบความสามารถในการทนเกลือความเข้มข้นสูงที่ 18 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ซึ่งมีเชื้อสายพันธุ์เดียวที่สามารถเจริญได้คือเชื้อในกลุ่มสกุล *Tetragenococcus* การทดสอบเชื้อเพื่อดูการอยู่รอดในสภาวะที่กรดหรือด่าง ซึ่งใช้ในการแยกความแตกต่างของเชื้อสกุล *Aerococci* , *Carnobacterium* , *Enterococci* , *Tetranococci* และ *Vagococci* (Salminen, 1998)

2.3 พอลิแซ็กคาไรด์ (Polysaccharide)

พอลิแซ็กคาไรด์ในอดีตผลิตโดยสาหร่ายหรือพืช แต่ในปัจจุบันสามารถผลิตจากจุลินทรีย์โดยกระบวนการหมักในอุตสาหกรรมโดยจุลินทรีย์ ซึ่งพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผลิตขึ้นโดยจุลินทรีย์นี้จะอยู่ในรูปของแหล่งพลังงานที่จุลินทรีย์ใช้สะสมไว้และเป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์ (Cell wall) และแคปซูล (Capsule) เนื่องจากพอลิแซ็กคาไรด์มีความสามารถในการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของน้ำโดยทำให้เกิดเป็นเจล และเปลี่ยนลักษณะการไหลของของเหลวได้ ดังนั้นจึงมีการนำพอลิแซ็กคาไรด์มาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมต่าง ๆ เช่น อาหาร ยา เครื่องสำอาง น้ำมัน กระดาษ สิ่งทอต่าง ๆ เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากแหล่งจุลินทรีย์ได้เปรียบกว่าการผลิตจากแหล่งพืช เนื่องจากสามารถคุมการผลิตให้คงที่ได้ นอกจากนี้องค์ประกอบทางเคมีและฟิสิกส์ของพอลิแซ็กคาไรด์จากจุลินทรีย์ก็ไม่มีการเปลี่ยนแปลง จุลินทรีย์จะสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ในรูปของแคปซูล (Capsule) และในรูปของเมือก เรียกว่า "Slime polysaccharide" พอลิแซคคาไรด์ทั้ง 2 ชนิดนี้แตกต่างกันคือ พอลิแซ็กคาไรด์ในรูปของแคปซูล (Capsule) จะเกาะที่ผิวของเซลล์อย่างเหนียวแน่นในขณะที่พอลิแซ็กคาไรด์ในรูปของเมือกจะเกาะที่ผิวเซลล์อย่างหลวม ๆ แต่การแยกความแตกต่างของพอลิแซคคาไรด์ทั้ง 2 ชนิดเป็นไปได้ยากเนื่องจากเซลล์ที่สร้างแคปซูลเป็นจำนวนมากจะมีลักษณะคล้ายกับพอลิแซ็กคาไรด์ที่อยู่ในรูปของเมือก

ในศตวรรษที่ 19 ประเทศฟินแลนด์ได้นำแบคทีเรียแลคติกมาใช้ในอุตสาหกรรมนมหมักเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์นมหมักที่มีความข้นสูง โดยใช้ในรูปหัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางเช่นสกุล *Lactococcus* ต่อมาในปี 1980 มีการใช้หัวเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอุณหภูมิสูงมาใช้ในการผลิตมากขึ้น นอกจากนี้ยังมีการนำแบคทีเรียแลคติกที่มีความสามารถในการผลิตเมือกมาทดสอบเพื่อดูกิจกรรมที่ส่งผลต่อการเจริญของเนื้องอก ซึ่งก็ยังไม่ทราบหน้าที่ที่แน่ชัดของปรากฏการณ์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น ยังพบอีกว่าสายพันธุ์ผลิตเมือกยังมีความสามารถในการต่อต้านการบุกรุกไวรัสของแบคทีเรีย (Bacteriophage) มากกกว่าสายพันธุ์ที่ไม่มีความสามารถในการผลิตเมือก

โดยเหตุปัจจัยที่ส่งเสริมทำให้เชื้อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์เนื่องจากสาเหตุดังเช่น ป้องกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์จากสภาวะที่แห้ง ป้องกันการบุกรุกจากไวรัสของแบคทีเรีย ป้องกันสารเคมีที่เป็นพิษต่อเซลล์ เป็นแหล่งของคาร์บอนและพลังงาน และป้องกันการถูกกินจากพวกโปรโตซัวหรือเม็ดเลือดขาว เป็นต้น (Brierley และคณะ, 1973)

2.4 ชนิดของพอลิแซ็กคาไรด์

พอลิแซ็กคาไรด์ที่ถูกผลิตขึ้นจากแบคทีเรียแลคติกทั้งพวกที่เจริญได้ดีที่อุณหภูมิปานกลางและอุณหภูมิสูง มีความหลากหลายไปในแต่ละสายพันธุ์ โดยส่วนใหญ่จะพบน้ำตาลกลูโคส และกาแลคโตส เป็นหลัก บางครั้งอาจพบองค์ประกอบคล้ายน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมและน้ำตาลแรมโนส อาจมีสารจำพวกโปรตีน แต่ลักษณะของกรดอะมิโนในโปรตีนมีลักษณะเหมือนกับที่พบในหางนม (Skimmed milk) ซึ่งมีรายงานการพบน้ำตาลกลูโคส กาแลคโตส แรมโนส กลีเซอรอล และฟอสฟอรัส จากพอลิแซ็กคาไรด์ชนิด Capsular polysaccharide จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* (Nakajima H,1992) ซึ่งแต่ละชนิดสามารถที่จะจัดจำแนกได้จาก องค์ประกอบของน้ำตาลบริเวณที่เกิด นอกจากนี้ยังมีน้ำหนักมวลโมเลกุล โครงรูป (Conformation) และคุณสมบัติที่มีอิทธิพลต่อ พอลิแซ็กคาไรด์ โดยลักษณะหรือปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์จะแตกต่างกันออกไปตามปัจจัยต่างๆ เช่น องค์ประกอบของอาหาร (แหล่งคาร์บอน และไนโตรเจน)สภาวะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง (อุณหภูมิ พีเอช เวลา ฯลฯ)(Salminn และคณะ, 2004)

ชนิดของเอกโซโพลิแซ็กคาไรด์ที่พบในธรรมชาติแบ่งตามลักษณะของโครงสร้างโมเลกุลน้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบได้ดังนี้

2.4.1 Homopolysaccharide

เป็นกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวเพียงชนิดเดียว โดยเชื้อหลาย ๆ สปีชีส์ของแบคทีเรียแลคติกสามารถที่จะใช้น้ำตาลซูโครสเป็นสารตั้งต้นในการผลิตพอลิเมอร์พวก Dextrans , Mutans และ Levan ได้ตามลำดับ Dextrans คือ กลุ่มของเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ที่เกิดจากการประกอบกันของ Glucans ที่สร้างโดยเชื้อในกลุ่มสกุล *Lactobacillus* , *Leuconostoc* , *Strepeococcus* ที่รู้จักกันเช่น *Leuconostoc mesenteriodes* และ *Leuconostoc dextranicum* โครงสร้างของ Dextrans ส่วนมากประมาณ 95 เปอร์เซ็นต์จะเป็นการต่อเชื่อมกันด้วยพันธะ แอลฟา-1,6 linkages และพันธะอื่นๆ เพียงเล็กน้อย เช่น แอลฟา - 1,2 , แอลฟา- 1,3 หรือ แอลฟา-1,4 linkagesในส่วนของแขนง

Dextran จะถูกสังเคราะห์ภายนอกเซลล์โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ Dextransucrase ที่เร่งซูโครส เพื่อที่จะผลิต D-fructose และ D-glucose จากนั้น D-glucose จะถูกขนส่งไปยังตัวรับเพื่อจะสร้างเป็น Dextrans ดังปฏิกิริยา

Sucrose + Glucan acceptor ⟶ Dextrans หรือ Mutans + D-fructose

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Mutans ถูกสังเคราะห์ขึ้นโดยมีลักษณะคล้ายกับ Dextrans โดยเชื้อ *Streptococcus mutan* และ *Streptococcus sobrinus* อย่างไรก็ตาม Mutans ก็ยังต่างกับ Dextrans ในส่วนของพันธะที่ใช้ในการต่อเชื่อมส่วนมากเป็นพวก แอลฟา-1,3 linkages ทำให้พอลิเมอร์ชนิดนี้ไม่สามารถละลายน้ำได้ในธรรมชาติ นอกจากนี้เชื้อ *Streptococcus salivarius* บางสายพันธุ์สามารถผลิต Fructan ของ Levan กับ ส่วนของ 2 , 6-linkaged Beta-fructofuranoside โดยเอนไซม์ Levansucrase เป็นตัวย่อยน้ำตาลซูโครส และขนส่ง D-fructose เป็นสาย Fructan ที่จะสร้างเป็น Levan ดังปฏิกิริยา

Sucrose + Fructan acceptor ⟶ Levan + D-glucose

เอนไซม์ที่สามารถตอบสนองในการสังเคราะห์พอลิเมอร์ของกลูโคสที่มักถูกอ้างอิงในการนำไปใช้บ่อยๆคือ glucosyltransferases (GTFs) และ glucansucrases ส่วน sucrases ที่รู้จักกันดีว่าสามารถตอบสนองในการสร้างของการประกอบกันเป็นพอลิเมอร์ของฟรุกโตสที่ถูกอ้างถึงบ่อยๆคือ fructosyltransferases (FTFs) มีเอนไซม์อยู่ 2 ชนิดที่เป็นที่รู้จักกันของ sucrases ที่ใช้สังเคราะห์เป็น fructan คือ พวก inulosucrases ซึ่งจะสังเคราะห์ได้ inulins และพวก levansucrases ซึ่งจะตอบสนองได้ต่อการสังเคราะห์ levan (Tallgren และคณะ, 1999)

2.4.2 Heteropolysaccharide

เชื้อในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติกส่วนมากสามารถผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่เป็นองค์ประกอบของ เอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ ชนิดนี้ส่วนใหญ่ คือ น้ำตาลกาแลคโตส และกลูโคสกับน้ำตาลชนิดอื่นเพียงเล็กน้อย เช่น น้ำตาลแรมโนส แมนโนส และกาแลคโตซามีน ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับพวก Homopolysaccharide แล้ว พบว่าผลผลิตของHeteropolysaccharide จะมีปริมาณต่ำกว่ามาก Heteropolysaccharide จะถูกสังเคราะห์ภายในเซลล์ที่บริเวณ Cytoplasmic membrane โดยจะใช้น้ำตาลนิวคลีโอไทด์ เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สายพอลิแซ็กคาไรด์ วิถีการสังเคราะห์ของ Heteropolysaccharides แสดงความคล้ายคลึงกันกับการสังเคราะห์ส่วนประกอบของผนังเซลล์อย่างเช่น lipopolysaccharides, peptidoglycan และ teichoic acid ยิ่งไปกว่านั้นน้ำตาลนิวคลีโอไทด์ทำหน้าที่เป็นสารตั้งต้นหรือ Precursors ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบของผนังเซลล์ต่างๆ เช่นเดียวกับการสังเคราะห์พอลิแซ็กคาไรด์ชนิด Heteropolysaccharides พบว่าน้ำตาลนิวคลีโอไทด์มีส่วนสำคัญในการเปลี่ยนน้ำตาลเช่นเดียวกับการกระตุ้นน้ำตาลซึ่งจำเป็นสำหรับการสร้างพอลิเมอร์ของน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว เอนไซม์หลายชนิดที่มีความเกี่ยวข้องในกระบวนการการสังเคราะห์ Heteropolysaccharides ยกตัวอย่างเช่นพวกที่เกี่ยวข้องในกระบวนการสังเคราะห์น้ำตาลนิวคลีโอไทด์ซึ่งไม่ได้มีความสำคัญเฉพาะการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์อย่างเดียวเท่านั้นแต่ยังมีบทบาทสำคัญในวิถีกลไกอื่นๆ อีกด้วย อย่างเช่น การเผาผลาญน้ำตาล ในทางกลับกันการสร้างเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ของแบคทีเรียแลคติกต้องการเอนไซม์ glycosyltransferases ที่มีความจำเพาะสำหรับการประกอบกันเป็นหน่วยที่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ซ้ำกัน (Walker และ Schuerch, 1986)

2.5 วิถีหลักในกระบวนการหมักและการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์

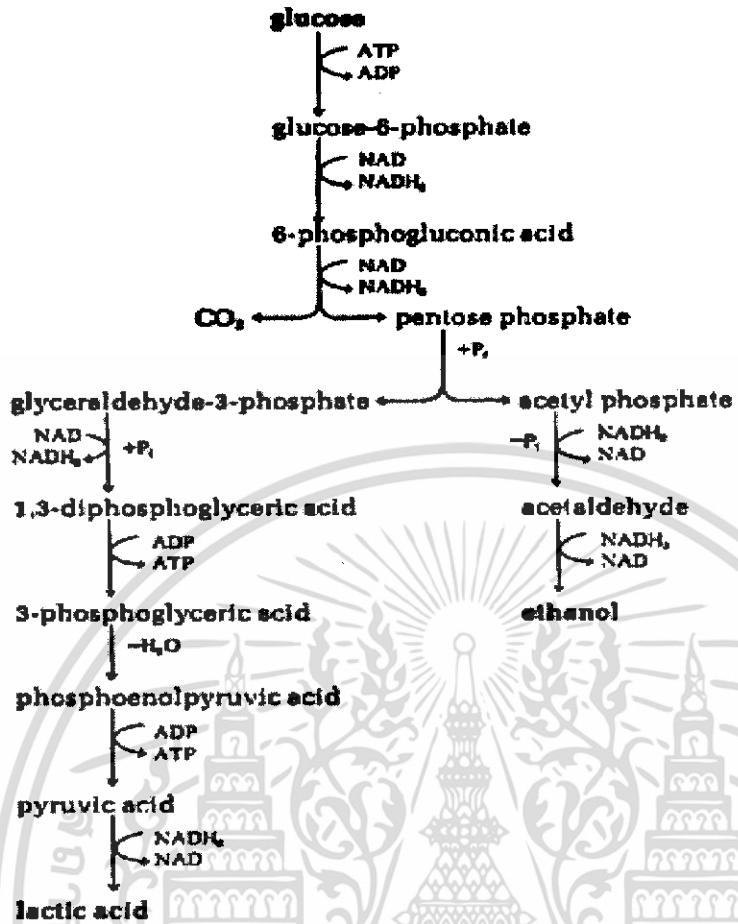
Glycolysis (Emden – Meyerhof – Parnas pathway) ใช้ในแบคทีเรียแลคติกเกือบทุกชนิด ยกเว้นเชื้อในกลุ่มสกุล *Leuconostoc* บางสปีชีส์ของเชื้อในกลุ่มสกุล *Lactobaccilus* , *Oenococci* และ *Weissella* ในกระบวนการหมักน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม (Hexose Fermentation)

โดยกระบวนการจาก Fructose -1 , 6 – diphosphate (FDP) ถูกย่อยให้เล็กลงด้วยเอนไซม์ FDP aldolase ได้เป็น dihydroxyacetone phosphate (DHAP) และ Glyceraldehyde-3-phosphate (GAP) ซึ่ง GAP (DHAP เปลี่ยนเป็น GAP) จะถูกเปลี่ยนเป็น Pyruvate ในกระบวนการเมทาบอลิซึมประกอบด้วยขั้นของ Substrate-level phosphorylation ที่มี 2 ส่วน คือ ภายใต้สภาวะปกติที่มีน้ำตาลมากเกินพอและมีปริมาณก๊าซออกซิจนที่จำกัดโดย pyruvate จะลดปริมาณลงกลายเป็นกรดแลคติก โดย NAD^+ ที่ขึ้นกับเอนไซม์ lactate dehydrogenase (nLPH) เกิดเป็น NADH เป็นผลให้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายส่วนใหญ่เกิดเป็นกรดแลคติกซึ่งชี้ให้เห็นว่าจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็น Homolactic fermentative bacteria

วิถีในกระบวนการหมักหลักอื่นที่สำคัญคือ วิถี 6-phosphogluconate / phosphoketolase pathway ซึ่งเป็นวิถีที่ทำให้เกิดผลิตภัณฑ์อื่นๆนอกเหนือจากกรดแลคติก เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เอทานอล เป็นต้น ลักษณะเช่นนี้ก็เป็นลักษณะที่สำคัญของแบคทีเรียแลคติกในกลุ่ม Heterolactic fermentation bacteria

สำหรับวิถี 6-phosphogluconate สามารถดูกระบวนการต่างๆ ได้จากรูปที่ 2.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 วิถี 6-phosphogluconate / Phosphoketolase

ที่มา : Salminen และคณะ (2004)

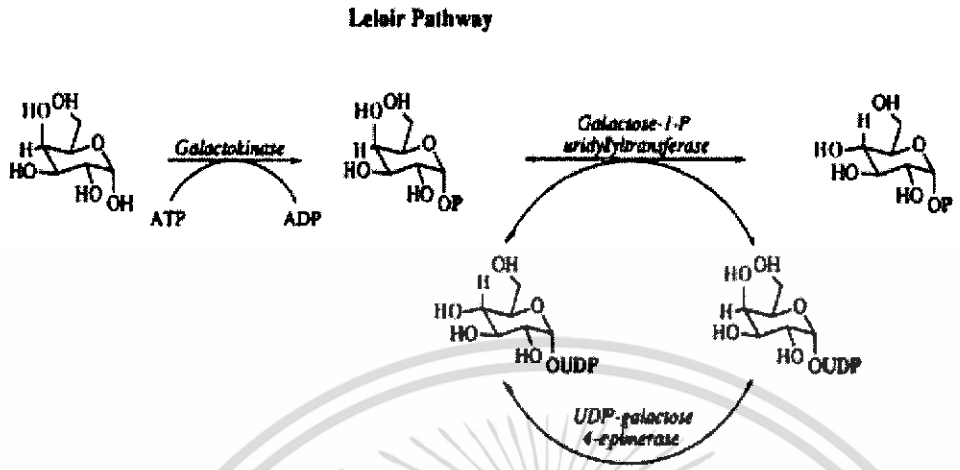
จากวิถีข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าในกลุ่มของพวก Homolactic fermentation เมื่อทำการหมักน้ำตาลกลูโคสจะได้ 2 โมลของกรดแลคติกและพลังงาน 2 ATP ต่อการใช้น้ำตาลกลูโคส 1 โมลแต่ส่วนมากพวก Heterolactic fermentation เมื่อผ่านกระบวนการหมักกลูโคสด้วยวิถี 6-phosphogluconate / phosphoketolase จะได้ 1 โมล ของกรดแลคติก, เอทานอล, คาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงาน 1 ATP ต่อการใช้น้ำตาล 1 โมลเช่นกัน นอกจากน้ำตาลกลูโคสยังมีการใช้น้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอมอื่นๆ ไม่ว่าจะเป็นน้ำตาลแมนโนส, น้ำตาลกาแลคโตส และน้ำตาลฟรุ๊คโตส ที่สำคัญคือน้ำตาล Galactose ซึ่งจะอาศัย PTS (Sugar Phosphotransferase system) เป็นตัวการสำคัญในระบบเมทาบอลิซึมเพื่อเปลี่ยนน้ำตาล galactose เป็น galactose – 6 – phosphate ผ่านเข้าสู่วิถี Tagatose-6-phosphate สุดท้ายจะได้ผลิตภัณฑ์เป็น Glyceraldehyde-3-phosphate ซึ่งก็จะเข้าสู่วิถีไกลโคไลซิสต่อไป ตัวอย่างแบคทีเรียแลคติกที่มีการทำงานเช่นนี้คือ *Lactococcus lactis* , *Entorococcus faecalis* และ *Lactobacillus casei* (Salminen และคณะ, 2004)

นอกจากนี้ยังมีการใช้ Permease ในการขนส่งน้ำตาล กาแลคโตสเพื่อเปลี่ยนเป็นglucose–6-phosphate โดยอาศัยวิถี Leloir pathwayในพวกที่ไม่มีระบบของ Sugar Phosphotransferase system

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

67310

วิถี Leloir สามารถดูได้จากรูปที่ 2.2



รูปที่ 2.2 วิถี Leloir

ที่มา : Salminen และคณะ (2004)

2.6 หน้าที่และประโยชน์ของพอลิแซ็กคาไรด์

2.6.1 ให้พลังงานและความร้อน

คาร์โบไฮเดรตเป็นบ่อเกิดของพลังงานที่มีราคาถูกที่สุด คาร์โบไฮเดรตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือแป้งให้พลังงานเท่ากันหมด คือ 1 กรัมให้พลังงาน 4 แคลอรี่ยกเว้นเซลลูโลสที่ดูดซึมไม่ได้

2.6.2 ช่วยให้ไขมันเผาไหม้สมบูรณ์

ไขมันในร่างกายจะเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ถ้ารับประทานคาร์โบไฮเดรตไม่พอทำให้เกิดสารที่เป็นโทษแก่ร่างกายขึ้นในเลือดและในปัสสาวะ (ketone bodies) ซึ่งถ้าเป็นเช่นนี้นานๆ ในรายที่เป็นเบาหวานขั้นรุนแรงจะทำให้ความเป็นกรดด่างของร่างกายเปลี่ยนไปร่างกายมีความเป็นกรดมากไปอวัยวะต่างๆ ทำงานผิดปกติอาจรุนแรงถึงขั้นหมดสติและตายได้

2.6.3 ช่วยสงวนหรือประหยัดการใช้โปรตีนในร่างกาย

ถ้าร่างกายได้พลังงานจากคาร์โบไฮเดรตและไขมันไม่เพียงพอร่างกายจะนำโปรตีนมาเผาผลาญให้เกิดพลังงานซึ่งเป็นการไม่ประหยัดเพราะโปรตีนเป็นสารอาหารที่มีราคาแพงควรสงวนไว้ใช้ประโยชน์ในการเสริมสร้างและซ่อมแซมร่างกายซึ่งสารอาหารอื่นทำแทนไม่ได้

2.6.4 ช่วยขับถ่าย

เซลลูโลสช่วยกระตุ้นในการทำงานของลำไส้และป้องกันการท้องผูกและปัจจุบันเชื่อกันว่าช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งที่ทวารหนักได้ แลกโตสเป็นอาหารที่เหมาะกับการเจริญเติบโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ของแบคทีเรียที่ทำให้เกิดกรดในลำไส้ของทารก การเกิดกรดดังกล่าวนี้ช่วยการดูดซึมของแคลเซียม ทำให้ทารกเจริญเติบโตได้ดี เดกซ์ทรินเป็นอาหารที่เหมาะแก่แบคทีเรียในลำไส้ใหญ่แบคทีเรียพวกนี้ใช้พลังงานจากเดกซ์ทรินในการสังเคราะห์วิตามินบีต่างๆ ซึ่งเป็นประโยชน์ต่อร่างกาย

2.6.5 ช่วยรักษาสภาพ สภาวะน้ำตาลในเลือดให้คงที่

คือ 70-100 มิลลิกรัมต่อเลือด 100 มิลลิลิตรทำงานปกติ เช่น คนปกติระดับน้ำตาลในเลือดคงที่ถ้าระดับน้ำตาลในเลือดสูงผิดปกติเป็นอาการของโรคเบาหวาน ถ้าต่ำผิดปกติทำให้เกิดอาการชักหรือช็อกหรือหมดสติทั้งนี้เพราะกลูโคสเป็นอาหารสำคัญของเซลล์และเนื้อเยื่อในสมอง เซลล์ของสมองต่างจากเซลล์อื่นในร่างกายที่ว่าใช้กลูโคสได้อย่างเดียวและเป็นบ่อเกิดของพลังงาน ไม่อาจใช้ไขมันมาเผาผลาญให้พลังงานเหมือนเซลล์อื่นได้ ดังนั้นถ้าน้ำตาลไปเลี้ยงสมองไม่พอจะทำให้เกิดอาการช็อกหรือหมดสติได้

ระดับน้ำตาลในเลือดยังช่วยควบคุมการบริโภคอาหารของมนุษย์ ถ้าระดับน้ำตาลในเส้นเลือดแดงสูงกว่าในเส้นเลือดดำมากแสดงว่ามีคาร์โบไฮเดรตที่ร่างกายใช้ประโยชน์ได้อยู่เป็นจำนวนมาก (Vailable หรือ Utilization) จะรู้สึกอิ่ม แต่ถ้าระดับน้ำตาลในเส้นเลือดแดงต่ำเกือบเท่าเส้นเลือดดำแสดงว่ามีคาร์โบไฮเดรตที่ใช้ได้น้อยหรือเก็บไว้น้อยในร่างกายจะทำให้รู้สึกหิว (Hunger)

2.6.6 ช่วยทำลายพิษของสารบางอย่าง

สารเคมีบางอย่างเข้าไปในร่างกายโดยบังเอิญ หรือติดไปกับอาหาร เมื่อไปที่ตับ ตับจะกำจัดสารพิษโดยทำปฏิกิริยากับสารพวกคาร์โบไฮเดรตให้กลายเป็นสารที่ไม่มีพิษ

2.6.7 อาหารพวกคาร์โบไฮเดรต ยังให้ประโยชน์อย่างอื่น

เช่น เมล็ดข้าวมีวิตามินบีซึ่งเป็นประโยชน์แก่ร่างกาย ในสัตว์บางพวกมีเอนไซม์เปลี่ยนกลูโคสให้เป็นวิตามินซีไม่ต้องอาศัยวิตามินซีจากอาหาร คาร์โบไฮเดรตบางตัวเมื่อหุงต้มช่วยแต่ง กลิ่น รส และสีให้สารอื่น เช่น น้ำตาลไหม้ (caramel) ใช้เป็นสารปรุงแต่งอาหารได้ ไกลโคไซด์ (glycoside) ซึ่งเป็นสารที่มีคาร์โบไฮเดรตในโมเลกุลและมีอยู่ในพืชหลายชนิดนั้นนำมาใช้เป็นยาและสารแต่งรสอาหารให้หวานได้ ปัจจุบันกำลังมีการวิจัยใช้สารพวกไกลโคไซด์เป็นสารแต่งรสอาหารให้หวานแทนน้ำตาลเทียมพวกไซคลาเมท(cyclamate)ซึ่งสงสัยกันว่าเป็นพิษต่อร่างกายและไม่ควรใช้กับอาหาร

(เสาวนีย์ จักรพิทักษ์ . 2532 : 23)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมี

3.1.1 อาหารเหลว MRS (HIMEDIA)

3.1.2 น้ำมันสำหรับส่องกล้องจุลทรรศน์

3.1.3 ชุดย้อมแกรม

3.1.4 ตะเกียงแอลกอฮอล์

3.1.5 ชุดเครื่องแก้ว(PYREX)

2.1.6 เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง (SARORIUS)

3.1.7 เครื่องชั่งหยาบทศนิยม 2 ตำแหน่ง (SHIMADZU)

3.1.8 เครื่องผสมสาร (Vortex Mixtuer)

3.1.9 กล้องจุลทรรศน์ (OLYMPUS)

3.1.10 ตู้ปลอดเชื้อ Laminar air flow (ASTEC MICROFLOW ABS 1200)

3.1.11 ตู้บ่มเชื้อ (MEMERT)

3.1.12 เครื่องปั่นเหวี่ยงสำหรับหลอด Eppendorf (HERMLE Z 383 K)

3.1.13 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (HACH DR/4000)

3.1.15 หม้อนึ่งความดัน (HIRAYAMA HA-300 M IV)

3.1.16 สารเคมี

3.1.16.1 กรดซัลฟิวริก(conc. H_2SO_4)

3.1.16.2 สารละลายฟีนอล(C_6H_5OH)

3.1.16.3 สารคอปเปอร์ซัลเฟต($CuSo_4.5H_2O$)

3.1.16.4 สารคริสตัลไวโอเลต

3.1.16.5 กรดไฮโดรคลอริก(conc. HCl)

3.1.16.6 โซเดียมไฮดรอกไซด์(conc. NaOH)

3.2 วิธีการทดลอง

3.2.1 การแยกและการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียแลคติก

3.2.1.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติก

นำนมดิบปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเหลว MRS 90 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ จากนั้นนำไปตีป่นด้วยเครื่องตีป่น(Stomacher) เป็นเวลา 1 นาที นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำมูลแพะหนัก 10 กรัม ใส่ลงในอาหารเหลว MRS 90 มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปราศจากเชื้อ ตีป่นเป็นเวลา 1 นาที บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำไม้พันสำลีที่ผ่านการลากสัมผัสจาก ตัวแพะ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ เต้านม หาง ทวาร มาใส่ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นประมาณ 10 วินาที บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมงเช่นกัน เมื่อครบเวลาที่กำหนด นำสารละลายเชื้อของแต่ละตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ 9 มิลลิลิตร ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นดูดตัวอย่างเชื้อที่ระดับความเจือจาง 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} มาอย่างละ 0.1 มิลลิลิตร หยดลงบนจานอาหารแข็ง MRS ที่ประกอบด้วย 0.5 เปอร์เซ็นต์ Bromocresol purple ทำการเกลี่ยสารละลายบนผิวหน้าอาหารจนหน้าอาหารแห้ง นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงในสภาวะไร้อากาศ เมื่อแบคทีเรียเจริญให้เลือกเก็บโคโลนีที่รอบ ๆ โคโลนีเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลืองหรือเป็นโซนใส นำโคโลนีที่ได้ทั้งหมดมาทำให้บริสุทธิ์โดยการ เขี่ยลงบนอาหารแข็ง MRS เพื่อให้ได้โคโลนีที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว จากนั้นทำการคัดเลือกโคโลนีแบคทีเรียแลคติกที่มีลักษณะเหนียวยืดหรือเป็นเมือกเพื่อทำการตรวจสอบในขั้นตอนต่อไป

3.2.1.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.2.1.1 มาเก็บรักษาด้วยวิธีการ Stab เชื้อด้วยเข็มเขี่ย (Needle) ในหลอดอาหารแข็ง MRS ที่มี 0.5%(กรัมต่อปริมาตร)$CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส 2 วัน จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส การเก็บในลักษณะนี้จะสามารถเก็บรักษาเชื้อได้ประมาณ 1 เดือน

3.2.2 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotype) ของแบคทีเรียแลคติก

3.2.2.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียแลคติกจากขั้นตอนที่ 3.2.1.1 ลากบนอาหารแข็ง MRS เป็นเวลา 1-2 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากนั้นถ่ายลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตรที่ปราศจากเชื้อ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วันทำการตรวจสอบลักษณะรูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์ การย้อมติดสีแกรมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ส่วนลักษณะการเจริญของโคโลนี สี จะตรวจสอบบนอาหารแข็ง ตามลำดับ

3.2.2.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

3.2.2.2.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส

ทำการลากเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน และทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตาเลส ด้วยการหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(H_2O_2) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ลงบนโคโลนีของเชื้อ ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อมีการสร้างเอนไซม์คะตะเลส ได้ให้บันทึกผลเป็นบวก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2.2.2. การทดสอบการเจริญที่ พีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือ

การตรวจสอบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ที่ปรับพีเอชหลังฆ่าเชื้อด้วยวิธีนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) เป็น 4.4 และ 9.6 ด้วย 15 และ 5 เปอร์เซ็นต์สารละลายกรดไฮโดรคลอริก กับ 5 และ 1 N สารละลายด่างโซเดียมไฮดรอกไซด์ โดยรอจนอาหารเลี้ยงเชื้อมีอุณหภูมิถึงอุณหภูมิห้องก่อนจึงปรับค่า เมื่อปรับค่าเสร็จแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 คืนเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน เชื้อที่จะนำมาตรวจสอบนั้นจะบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MRS เป็นเวลา 2 วัน จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบประมาณ 5000 รอบต่อนาที ล้างเซลล์ด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ ทำอย่างเดิม 2 ครั้ง ก่อนนำมาทำเป็นสารละลายเชื้อปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำหลอดอาหารที่ไม่ปนเปื้อนมาใส่สารละลายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลว่าอาหารมีการขุ่นเนื่องจากการเจริญของเชื้อหรือไม่ การตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ทำโดยนำสารละลายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิตามที่ต้องการตรวจสอบ เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลเหมือนกับการทดสอบพีเอช การตวจสอบความสามารถในการเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือที่ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ โดยนำสารละลายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลเหมือนกับการทดสอบ พีเอช และอุณหภูมิ

3.2.3 การศึกษาความสามารถในการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์

3.2.3.1 การทดสอบการสร้างแคปซูล

ทำการเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน นำเชื้อที่ได้มาทำการย้อมสีแคปซูล(Capsule staining) หลังจากนั้นนำไปตรวจสอบการสร้างแคปซูลด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าพบว่ามีโซนใสรอบเซลล์แสดงว่าเซลล์สร้างแคปซูลจริง

3.2.3.2 การทดสอบขั้นยืนยันว่าแคปซูลที่สร้างเป็นกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์

นำเชื้อมาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 20 ชั่วโมง จากนั้นทำการปั่นเหวี่ยงที่ 10000 g เพื่อนำเซลล์แบคทีเรียออก นำสารละลายที่ปราศจากเซลล์มาผ่านกระบวนการ Dialysis ที่มีขนาดของรู 10,000 ดาลตัน เพื่อแยกโมเลกุลของน้ำตาลเด็กโทรสออกเป็นระยะเวลา 2 วันซึ่งในแต่ละวันจะทำการตรวจสอบสารละลายนอกถุง Dialysis เพื่อให้ทราบแน่ชัดว่าน้ำตาลเด็กโทรสได้แพร่ออกมาหมดจริง เป็นผลให้ส่วนของอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในถุง Dialysis มีเฉพาะพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่มีส่วนของน้ำตาลเด็กโทรสอยู่

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและวิจารณ์ผล

4.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกและลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่โคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกได้เชื้อจากน้ำนมดิบ 3 สายพันธุ์ เป็นรูปร่างท่อน 2 สายพันธุ์ คือ GM01 และ GM03 รูปร่างกลม 1 สายพันธุ์ คือ GM02 จากอวัยวะสืบพันธุ์เพะตัวผู้ 3 สายพันธุ์ เป็นรูปร่างกลม 2 สายพันธุ์ คือ JP01 และ JP62 รูปร่างท่อน 1 สายพันธุ์ คือ JP02 จากตัวเพะ 3 สายพันธุ์ เป็นรูปร่างกลม 2 สายพันธุ์ คือ GB01 และ GB11 รูปร่างท่อน 1 สายพันธุ์ คือ GB03 หางเพะ 1 สายพันธุ์ เป็นรูปร่างท่อน คือ GT01

ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อทุกสายพันธุ์ที่เหมือนกันคือ โคโลนีสีขาว กลมนูน ขอบเรียบ ติดสีแกรมบวก เชื้อสายพันธุ์ GM 01 มีรูปร่างท่อน อาจเป็นท่อนสั้นๆ หรือยาว อยู่เดี่ยวๆ หรือเรียงตัวเป็นคู่ เชื้อสายพันธุ์ GM 02 มีรูปร่างกลม เซลล์มีการเรียงตัวกันเป็นคู่ๆ เชื้อสายพันธุ์ GM 03 มีรูปร่างท่อน เซลล์อยู่เดี่ยวๆ คู่ หรืออาจต่อเป็นสายโซ่สั้นๆ เชื้อสายพันธุ์ GB 01 เซลล์มีรูปร่างกลม เรียงตัวในลักษณะเตแตรท เชื้อสายพันธุ์ GB 03 มีรูปร่างเป็นท่อน ส่วนใหญ่ยาวเรียว อาจอยู่เป็นคู่หรือต่อเป็นสายโซ่สั้นๆ เชื้อสายพันธุ์ GB 11 มีรูปร่างกลม เรียงตัวเป็นเตแตรท เชื้อสายพันธุ์ GT 01 มีรูปร่างเป็นท่อนค่อนข้างยาว เซลล์อยู่กันเป็นคู่ หรือโซ่สั้นๆ เชื้อสายพันธุ์ JP 01 รูปร่างกลม อยู่กันเป็นคู่ เชื้อสายพันธุ์ JP 02 เซลล์มีรูปร่างท่อน ยาวเรียว ส่วนใหญ่จะอยู่เดี่ยวๆ เชื้อสายพันธุ์ JP 62 รูปร่างกลม เรียงตัวในลักษณะเตแตรท ดังตารางที่ 4.1

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา

แหล่งที่คัดแยกได้	สายพันธุ์	รูปร่าง	การติดสีแกรม	การจัดเรียงตัว
นมแพะ	GM 01	ท่อน	+	เดี่ยว , คู่
	GM 02	กลม	+	คู่
	GM 03	ท่อน	+	เดี่ยว , คู่ , สายโซ่สั้นๆ
ตัวแพะ	GB 01	กลม	+	เตแตรท
	GB 03	ท่อน	+	คู่ , สายโซ่สั้นๆ
	GB 11	กลม	+	เตแตรท
อวัยวะสืบพันธุ์	JP 01	กลม	+	คู่
แพะตัวผู้	JP 02	ท่อน	+	เดี่ยว
	JP 62	กลม	+	เตแตรท
หางแพะ	GT 01	ท่อน	+	คู่ , สายโซ่สั้นๆ

4.2 ผลการทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ

จากการนำแบคทีเรียแลคติกที่คัดแยกได้ทั้งหมดมาทำการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ ได้แก่ การสร้างเอนไซม์คะตาเลส การเจริญในอาหาร MRS ที่มีระดับของพีเอช 9.6, 4.4 เกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์ การเจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าเชื้อทุกสายพันธุ์ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส ไม่เจริญในความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ที่ 18 เปอร์เซ็นต์ แต่ทุกสายพันธุ์สามารถเจริญได้ใน 6.5 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ เชื้อสายพันธุ์ GM 01, JP 62 และGB 11 เจริญที่พีเอช 4.4 อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียสแต่ไม่พบการเจริญที่พีเอช 9.6 เชื้อสายพันธุ์ GM 03, JP 01 และGB 03 ไม่เจริญที่พีเอช 4.4 และ 9.6 แต่เจริญที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสายพันธุ์ JP 02 และ GM 02 พบการเจริญที่พีเอช 4.4 และ 9.6 อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส เชื้อสายพันธุ์ GT 01 และ GB 01 เจริญที่พีเอช 4.4 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่เจริญที่พีเอช 9.6 อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส ตามลำดับดังตารางที่ 4.2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ผลการทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ

สายพันธุ์	การสร้างเอนไซม์คะตาเลส	การเจริญ					
		พีเอช 4.4	พีเอช 9.6	6.5% เกลือ	18% เกลือ	อุณหภูมิ 10 ^{0}C	อุณหภูมิ 45 ^{0}C
GM 01	-	-	-	+	-	+	+
JP 62	-	+	-	+	-	+	+
GB 11	-	-	-	+	-	+	+
GM 03	-	-	-	+	-	+	+
GB 03	-	-	-	+	-	+	+
JP 01	-	-	-	+	-	+	+
JP 02	-	+	+	+	-	+	+
GM 02	-	-	+	+	-	+	+
GT 01	-	-	-	+	-	-	+
GB 01	-	-	-	+	-	-	+

4.3 ผลการจัดจำแนกเชื้อในระดับสกุล

จากข้อมูลในหัวข้อ 4.1.1 และ 4.1.2 เราสามารถจำแนกเชื้อในระดับสกุลได้ดังนี้ เชื้อสายพันธุ์ GM 01, GM 03, GB 03, GT 01และ JP 02 เป็นท่อน ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ฉะนั้นเชื้อกลุ่มนี้จะเป็นเชื้อในสกุล *Lactobacillus* sp. เชื้อสายพันธุ์ GM 02 และ JP 01 เซลล์มีลักษณะกลม อยู่เป็นคู่ เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เชื้อกลุ่มนี้จึงเป็นเชื้อในกลุ่มของสกุล *Enterococcus* sp. เชื้อสายพันธุ์ GB01, GB 11และ JP 62 เซลล์มีลักษณะกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นแบบเตเตรท เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส และไม่เจริญที่ 18 เปอร์เซ็นต์โซเดียมคลอไรด์ เพราะฉะนั้นเชื้อกลุ่มนี้จึงเป็นกลุ่มของเชื้อในสกุล *Pediococcus* sp. ซึ่งหลักเกณฑ์ในการจักจำแนกสามารถดูได้จากตารางที่ 2.1

ผลสรุปของข้อมูลข้างต้นนั้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Psoni และคณะ (2003) ที่พบจุลินทรีย์ในกลุ่มของ *Lactobacillus* และ*Enterococcus* จากผลิตภัณฑ์ Batzos ชีส ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากน้ำนมแพะดิบ นอกจากนี้ Herreros และคณะ (2004) สามารถแยกเชื้อในกลุ่มของแบคทีเรียแลคติคได้ถึง 31 สายพันธุ์จากผลิตภัณฑ์ชีสที่ได้จากนมแพะในประเทศสเปน ประกอบด้วยหลายสกุลดังนี้ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis, Lactococcus lactis* subsp. *cremoris, Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis, Leuconostoc mesenteroides* subsp.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

dextranicum, Leuconostoc mesenteroides subsp. *mesenteroides, Lactobacillus plantarum* และ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ในทำนองเดียวกัน Sa'nchez และคณะ (2006) ได้ทำการคัดแยกเชื้อในในกลุ่ม Lactobacilli ในระหว่างกระบวนการบ่ม Manchego ชีส ซึ่งใช้กระบวนการตรวจสอบด้วยวิธี RAPD-PCR พบเชื้อในกลุ่มของ *Lactobacillus plantarum, Lactobacillus brevis, Lactobacillus fermentum, Lactobacillus pentosus, Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus curvatus* เป็นต้น Morvan และ Jobli (2000) พบแบคทีเรียในรูเมน 3 ชนิดที่สามารถเปลี่ยนกรดโอเลอิกเป็นกรด 10-Hydroxystearic ได้แก่ *Enterococcus gallinarum, Pediococcus acidilactici, Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacillus reuteri*

จากข้อมูลที่สอดคล้องกันนั้นเป็นผลเนื่องมาจากสารอาหารที่พบในนมแพะนั้นมีอยู่เป็นจำนวนมาก (ดังตารางที่ 4.3 และ 4.4) ซึ่งแบคทีเรียแลคติกเป็นแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารที่อุดมสมบูรณ์ในการเจริญ ดังนั้นโอกาสที่เราจะพบแบคทีเรียแลคติกจึงมีความเป็นไปได้สูงตามความอุดมสมบูรณ์ของแหล่งที่ต้องการค้นหา ดังตารางที่ 4.3 และ 4.4

ตารางที่ 4.3 ตารางแสดงชนิดและปริมาณของวิตามินที่พบในแหล่งของนมคน วัว และแพะ

วิตามิน	แหล่งของนม			ปริมาณ (ไมโครกรัม /100กรัม)
	คน	วัว	แพะ	
เอ	64	53	56	65
ดี	0.03	0.03	0.03	0.06
ซี	5.0	1.0	1.3	6.1
อี	0.3	0.7	0.7	0.3
บี 1	140	400	480	68
บี 2	36	162	138	101
กรดแพนโธทินิค	200	300	300	304
ไบโอติน	0.8	2.0	2.0	3.0
ไนอะซิน	200	100	200	710
กรดโฟลิก	5.2	5.0	1.0	10
บี 12	0.3	0.4	0.1	0.2
บี 6	11	42	46	41
เค	-	-	-	-

ที่มา: www.saanendoah.com/compare.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 ตารางแสดงแร่ธาตุของน้ำนมแพะ โค และมนุษย์ (ปริมาณในนม 100 กรัม)

แร่ธาตุ (มิลลิกรัม)	นมแพะ	นมโค	นมมนุษย์
แคลเซียม	-	134	119.32
ฟอสฟอรัส	111	93	14
โซเดียม	50	49	17
แมกนีเซียม	14	13	3
โปแตสเซียม	204	152	51
เหล็ก	0.05	0.05	3
สังกะสี	0.30	0.38	0.17

ที่มา: สมชัย และณิชารัตน์ (2547)

4.4 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สร้างแคปซูล

จากการตรวจสอบความสามารถในการสร้างแคปซูลบนอาหารแข็ง MRS จำนวน 10 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแคปซูลได้ 4 สายพันธุ์ โดยเป็นกลุ่มที่มีรูปร่างท่อน 2 สายพันธุ์ ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ GM 03, JP 02 เป็นเชื้อในสกุล *Lactobacillus* sp. ส่วนเชื้อสายพันธุ์ JP 62 และ GB 11 เป็นเชื้อในสกุล *Pediococcus* sp. ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Francois และคณะ (2004) ที่มีการนำเชื้อ *Lactobacillus plantarum* 162 RM ที่เป็นสายพันธุ์สร้าง capsular exopolysaccharide มาศึกษาผลกับหน้าที่ที่มีต่อนมหมัก และ Kareish ชีสชนิดนุ่ม อีกทั้ง Dabour และ Lapointe (2005) ได้มีการศึกษาจัดจำแนกลักษณะของโครโมโซมด้วยวิธีทางโมเลคิวลาจากกลุ่มยีนที่ผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* ที่ส่งเสริมลักษณะทางเนื้อสัมผัสโดยมีผลลดปริมาณไขมันถึง 50 เปอร์เซ็นต์ใน Cheddar ชีส ซึ่งการที่แบคทีเรียแลคติกเหล่านี้สามารถแสดงผลในการสร้างแคปซูลได้เนื่องจากแหล่งของตัวอย่างที่เก็บมานั้นมีการเก็บได้จากผิวหนังของแพะเป็นผลให้แบคทีเรียแลคติกต้องมีการสัมผัสกับอากาศโดยตรงทำให้เกิดการกระตุ้นตัวเองให้ผลิตแคปซูลเพื่อป้องกันเซลล์จากการถูกออกซิไดซ์จากก๊าซออกซิเจนเนื่องจากแบคทีเรียในกลุ่มของแลคติกนี้ไม่มียีนในการสังเคราะห์เอนไซม์คะตาเลสที่จะเปลี่ยนสารไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นเป็น น้ำ และก๊าซออกซิเจนได้ นอกจากนี้อาจเป็นผลจากสาเหตุอื่นๆ เช่น ป้องการการถูกกินจากกลุ่มพวกโปรโตซัว การทำลายจากน้ำย่อย การเข้าบุกรุกของไวรัส เป็นต้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.5 ผลขั้นยืนยันว่าแคปซูลที่สร้างขึ้นเป็นกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์

การตรวจสอบขั้นยืนยันว่าแคปซูลที่สร้างมานั้นจัดอยู่ในกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ จำนวน 4 สายพันธุ์ มีแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแคปซูลในกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์ 4 สายพันธุ์ โดยเป็นกลุ่มที่มีรูปร่างกลม 2 สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ JP 62 และ GB 11 ซึ่งเป็นกลุ่มของเชื้อในสกุล *Pediococcus* รูปร่างท่อน 2 สายพันธุ์ได้แก่ เชื้อสายพันธุ์ GM 03 และ JP 02 เป็นกลุ่มของเชื้อในสกุล *Lactobacillus* โดยเมื่อดูผลจากค่าการดูดกลืนแสงที่ 490 นาโนเมตร พบว่าเมื่อนำสารละลายเชื้อที่ผ่านการเลี้ยงในอาหาร MRS เป็นเวลา 20 ชั่วโมง และผ่านขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์โดยกระบวนการ Dialysis ปั่นเหวี่ยงเพื่อแยกเซลล์ออกก่อนที่จะนำมาหาค่าคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดด้วยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก พบว่าเชื้อทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถให้ค่าการดูดกลืนแสงมากกว่าค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุม(อาหารเหลว MRS ที่ไม่ได้ใส่เชื้อ) ทั้งหมดจึงสามารถสรุปได้ว่าแคปซูลที่สร้างขึ้นนั้นเป็นกลุ่มของพอลิแซ็กคาไรด์จริง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในงานของ Duenas และคณะ (2003) ที่มีการนำเชื้อ *Pediococcus damnosus* สายพันธุ์ 2.6 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร Semidefined Medium เหมือนกับ Grobben และคณะ (1998) นำเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* สายพันธุ์ NCFB มาศึกษาการสร้างพอลิแซ็กคาไรด์จากชนิดเดียวกันเพื่อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ ในรายงานของ Ayad และคณะ (2004) ที่ทำการคัดเลือกแบคทีเรียจากผลิตภัณฑ์นมพื้นบ้านในประเทศอียิปต์ (Egyptian Diary Product) พบว่าบางสายพันธุ์ของเชื้อในกลุ่ม Enterococcus ที่คัดแยกได้สามารถผลิตเอกโซพอลิแซ็กคาไรด์ทำให้มีลักษณะเป็นเมือกหรือสร้างแคปซูลได้ Kimmel และคณะ (1998) ทำการศึกษาพัฒนาอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากเชื้อ *Lactobacillus delbrueckii*. สายพันธุ์ RR

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลอง

เชื้อแบคทีเรียแลคติกจำนวน 50 สายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากส่วนต่างๆ ของแพะ นำมาคัดเลือกเชื้อที่มีลักษณะโคโลนีเป็นเมือกไว้ 10 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ GB01 GB03 GB11 GM01 GM02 GM03 GT01 JP01 JP02 และ JP62 โดยสามารถจัดจำแนกอยู่ในสกุล *Lactobacillus* *Enterococcus* และ *Pediococcus* จากนั้นคัดเลือกเชื้อผลิตพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีส่วนประกอบเป็นคาร์โบไฮเดรตโดยวิธีฟีนอล-ซัลฟิวริก ได้เชื้อ 4 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์ GM01 และ JP02 จัดอยู่ในสกุล Lactobacillus สายพันธุ์ JP62 และ GB11 อยู่ในสกุล *Pediococcus*

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

สมชัย สวาสดิพันธ์ และณิชารัตน์ สวาสดิพันธ์. 2547. ประสบการณ์การดื่มนมแพะ. เกษตรกรรมธรรมชาติ. ฉบับที่ 7 : 32.

เสาวนีย์ จักรพิทักษ์. 2532. หลักโภชนาการปัจจุบัน. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพฯ : ไทยวัฒนาพานิช.

Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. and El-Soda, M. 2004. Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological criteria. *Journal of Food Microbiology*. 21 : 715-725.

Batt, C. A. 1999. Introduction of Lactic acid bacteria in food. Department of Food Science. Oxford University Press. London.

Brierley, C.L. and Brierley, J.A. 1973. Production of exopolysaccharides from a thermophilic microorganism isolated from a marine hot spring in flegrean areas. *Journal of Industrial Microbiology in Biotechnology*. 19(2) :183-188

Broadbent, J.R., Mcmahon, D.J., Welker, D.L., Oberg, C.J. and Moineau, S. 2003. Biochemistry Genetics and Applications of Exopolysaccharide Production in *Streptococcus thermophilus*. *Journal of Dairy Science*. 86 : 407-423.

Cappuccino, G., Jane, N. and Sherman, N. 2002. Microbiology A Laboratory Manual. 6th. New York : Benjamin Commings.

Cerning, J. 1990. Exocelular polysaccharide produce by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology*. 87 : 113-130

Dabour, N. and Lapointe, G. 2005. Identification and Molecular Characterization of the Chromosomal Exopolysaccharide Biosynthesis Gene Cluster from *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SMQ-461. *Stela Dairy Research Centre and Institute for Nutraceuticals and Functional Foods*.

Deveau, H., Calsteren, M.V. and Moineau, S. 2002. Effect of Exopolysaccharides on Phage-Host Interactions in *Lactococcus lactis* . *Journal of Dairy Science*. 68(9) : 4364-4369.

Dubois, Gilles, K.A., Hamilton, J.K., Reber, P.A. and Smith, F. 1956. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry. 31 : 350-356

Duenas, M., Munduate, A., Perea, A. and Irastorza, A. 2003. Exopolysaccharide production by *Pediococcus damnosus* 2.6 in a semidefined medium under different growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 87 : 113-120.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Zambou, F.N., Nourel-Noda, A., Mbiapo, F.T. and Morsi, E. 2004. Effect of ropy and capsular exopolysaccharides producing strain of *Lactobacillus plantarum* 162RM on characteristics and functionality of fermented milk and soft Kareish type cheese. *African Journal of Biotechnology*. 51(3) : 443-451

Frengova, G.L., Simova, E.D., Beshkova, D.M. and Simov, Z.I. 2002. Exopolydaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria of Kefir Grains. . *Natural for Science*. 57(9-10) : 805-810.

Grobben, G. J., Joe, I.C., Kitzen, V.A., Boels, I. C., Boer, F., Sikkema, J., Smith, M.R. and Bont, J.A.M. 1998. Enhancement of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* NCFB 2772 with a Simplified Defined Medium. *Applied Environmental Microbioogy*. 64(4) : 1333–1337.

Herreros, M.A., Sandoval, H., Gonzalez, L., Castro, J.M., Fresno, J.M. and Tornadijo, M.E. 2005. Antimicrobial activity and antibiotic resistance of lactic acid bacteria isolated from Armada cheese (a Spanish goats' milk cheese). *Food Microbiology*. 22 : 455-459.

John, H.G., Novel, K.R., Peter, S.H.A., Jame, S.T. and Stanley, W.T. 1994. *Bergey's manual of Determination Bacteriology*. 9th ed. New York : Willium & Wilkin.

Stacy, K.A., Robert, R.F. and Gregory, Z.R. 1998. Optimization of Exopolysaccharide Production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* RR Grown in a Semidefined Medium. *Journal of Applied Environmental Microbiology*. 64(2) : 659-664

Psoni L., Tzanetakis N. and Litopoulou-T. E. Microbiological characteristics of Batzos, a traditional Greek cheese from raw goat's milk. 2003. *Jorurnal of Food Microbiology*. 20(5) : 688-703

Madiedo, P.R. and Reyes-Gavilán, C. G. 2005. Methods for the Screening, Isolation, and Characterization of Exopolysaccharides Produced by Lactic Acid Bacteria. *Journal of Dairy Science*. 88 : 843-856.

Morvan, B. and Jobli, K.N. 2000. Hydration of Oleic Acid by *Enterococcus gallinarum*, *Pediococcus acidilactici* and *Lactobacillus* sp. Isolated from the Rumen. Anarobe metabolism. *Journal o f Applied Microbiology*. 5 : 605-611.

Mukai, T., Toba, T., Itoh, T. and Adachi, S. 1990. Structural investigation of the capsular polysaccharide from *Lactobacillus kefiranofaciens* K1. *Journal of Dairy Science*. 204 : 227-32.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Nakajima, H., Hirota, T., Toba, T. and Adachi, S. 1992. Structure of the Extracellular polysaccharide from slime-forming *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* SBT 0495 *Carbohydrate Researeh*. 224 : 245-53.

Robijn, G.W., Gallego, G.R., Van Den Berg, D.J., Haas, H., Kamerling, J.P. and Vliegenthart, J.F. 1996. Structural characterization of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* LMG9433. *Journal of Dairy Science*. 288 : 203-18.

Salminen, S., Wright, A.V. and Ouwehand, A. 2004. Lactic Acid Bacteria Microbial and Functional Aspects. Third Edition. New York : Marcel Dekker.

Sanchez, I., Sesena, S., Poveda, J.M., Cabezas, L. and Palop, L. 2006. Genetic diversity, dynamics, and activity of *Lactobacillus* community involved in traditional processing of artisanal Manchego cheese. *International Journal of Food Microbiology*. 107 : 265-273.

Stiles, M.E. and Holzapfel, W.H. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. *Institute Journal of Food Microbiology*. 36 : 1-29.

Stingele, F., Lemoine, J. and Neeser, J.R., 1997. *Lactobacillus helveticus* Lh59 secretes an exopolysaccharide that is identical to the one produced by *Lactobacillus helveticus* TN-4, a presumed spontaneous mutant of *Lactobacillus helveticus* TY1--2. *Carbohydrate Research*. 302(3-4) :197-202.

Tallgren, H.A., Airaksinen, U., Weissenberg, V.R., Ojamo, H., Kuusisto, J. and Leisola, M. 1999. Exopolysaccharide-Producing Bacteria from Sugar Beets. *Journal of Dairy Science* 65(2) : 862–864.

Tallon, R., Bressollier, P. and Urdaci, C.M. 2003. Isolation and characterization of two exopolysaccharide produced by *Lactobacillus plantarum* EP56. *Journal of Dairy Science*. 59 :105-109

Walker, G.J. and Schuerch. C. 1986. Activity of branched dextrans in the acceptor reaction of a glucosyltransferase (GTF-I) from *Streptococcus mutans* OMZ176. *Journal of Dairy Science*. 146(2) : 259-70.

Wood, B.J.B. and Holzapfel, W.H. 1995, The genera of lactic acid bacteria. Blackie Glasgow : Academic & Professional.

Yamamoto, Y., Murosaki, S., Yamauchi, R., Kato, K. and Sone, Y. 1994. Structural study on an exocellular polysaccharide produced by *Lactobacillus helveticus TY1-2*. *Journal of Dairy Science*. 261(1) : 67-78.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Xu, Y., Kavindra, V., Singh, Qin, X., Murray, B.E. and George, W. M. 2000. Analysis of a Gene Cluster of *Enterococcus faecalis* Involved in Polysaccharide Biosynthesis. *Journal of Dairy Science.* 68(2) : 815-823.

www.saanendoah.com/compare.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารสูตร MRS Broth (HIMEDIA) มีส่วนประกอบดังนี้

Proteose peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Dextrose	20	กรัม
Polysorbate 80	1	กรัม
Ammonium citrate	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Magnesium sulphate	0.1	กรัม
Manganese sulphate	0.05	กรัม
Dipotassium Phosphate	2	กรัม

ชั่งอาหาร MRS 55.15 กรัม ละลายในน้ำปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ เป็นเวลา 15 นาที

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

การวิเคราะห์

ข.1 การย้อมแกรม Cappuccino และคณะ (2002)

สารเคมี

1. สารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)
2. สารละลายซาฟรานิน (Safranin)
3. สารละลายแกรมไอโอดีน (Gram Iodine solution)
4. น้ำมันสำหรับส่องกล้องจุลทรรศน์ (Immersion oil)
5. แอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์

วิธีการ

1. หยดน้ำที่ปราศจากเชื้อลงบนสไลด์ จากนั้นนำลูป (Loop) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเขี่ยเชื้อแล้วเกลี่ย (Smear) ลงบนหยดน้ำจนเชื้อกระจายทั่ว
2. ตั้งทิ้งไว้จนแห้งนำไปผ่านไฟ 2-3 ครั้ง (Fixed)
3. หยดสีคริสตัลไวโอเลตลงบนรอยเกลี่ยตั้งทิ้งไว้นาน 1-2 นาที จากนั้นชะสีออกด้วยน้ำ
4. หยดสารละลายแกรมไอโอดีนให้ท่วมรอยเกลี่ยตั้งทิ้งไว้นาน 1 นาที จากนั้นชะออกด้วยน้ำ
5. ชะสีออกโดยแอลกอฮอล์ความเข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ ทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที ล้างน้ำจนสะอาด
6. หยดสีซาฟรานินบนรอยเกลี่ย ประมาณ 1 นาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง ตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเป็นแบคทีเรียแกรมบวกจะติดสีม่วงและแกรมลบติดสีแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ข.2 วิธีการตรวจสอบการสร้างแคปซูลของแบคทีเรียแลคติก Cappuccino และคณะ (2002)

สารเคมี

1. สารละลายคริสตัลไวโอเลต (Crystal violet)

2 สารละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 20 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/ปริมาตร)

วิธีการ

1. ล้างแผ่นสไลด์ให้สะอาด หยดสารละลายคริสตัลไวโอเลตลงบนแผ่นสไลด์พอประมาณ (3-4 หยด) จากนั้นนำลูปที่เขี่ยเชื้อเกลี่ยลงบนสารละลายคริสตัล

2. นำแผ่นสไลด์มาเกลี่ยสารละลายคริสตัลไวโอเลตที่มีเชื้ออยู่ให้เป็นแผ่นฟิล์มบางๆ

3. ทิ้งไว้ให้แห้งตามปกติ ห้ามใช้วิธีลนไฟ

4. ชะด้วยสารละลาย 20 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/ปริมาตร) $CuSO_4.5H_2O$ จนสีไม่ถูกชะออก

5. ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ถ้ามีการสร้างแคปซูลรอบเซลล์จะปรากฏสีฟ้าอ่อน

ข.3 การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลทั้งหมด โดยวิธี Phenol – sulfuric acid ตามวิธีของ Dubois และคณะ (1956) โดยใช้กรดเข้มข้นย่อยพอลิแซ็กคาไรด์เป็นโมเลกุลเดี่ยวซึ่งสามารถวัดปริมาณน้ำตาลได้ประมาณ 1 – 100 ไมโครกรัม และเป็นวิธีการที่รวดเร็วสามารถวิเคราะห์หาปริมาณน้ำตาลทั้งหมดอย่างไม่เฉพาะเจาะจงโดยที่น้ำตาลนั้นอาจจะอยู่ในรูปน้ำตาลรีดิวซ์หรือ neutral sugar ทั้งชนิดที่เป็นโมโนแซ็กคาไรด์ และพอลิแซ็กคาไรด์

สารเคมี

1. สารละลายฟีนอลความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/ปริมาตร)

2. กรดซัลฟิวริกเข้มข้น

วิธีการ

1. นำตัวอย่าง (แบลงค์ใช้น้ำกลั่น) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2. เติมสารละลายฟีนอล 5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองในข้อ 1 ผสมให้เข้ากันแล้วนำหลอดทดลองไปแช่ในน้ำเย็น

3. เติมกรดซัลฟิวริกเข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร ลงในหลอดทดลองในข้อ 2 ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที

4. นำไปวัดสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้