

การคัดเลือกยีสจากชนิดที่ไวต่อกวนดเนสที่ผลิตที่โรงงานโคละระบีที

SCREENING OF DIACETYL-PRODUCING
LACTIC ACID BACTERIA



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาทบทวนหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545

ISBN 974-648-881-7

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างไดอะซีทิล

SCREENING OF DIACETYL - PRODUCING
LACTIC ACID BACTERIA



อำนาจ ภัคดีโต

AMNAT PAKDEETO



พิมพ์.....
ลงทะเบียน..... 44030
เดือน, ปี 2. ๒. ๒๕๔๕

b.....
i.....

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเชิงสารนิพนธ์เท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัด ISBN 974 - 648 - 831 - 7 ของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

**SCREENING OF DIACETYL - PRODUCING
LACTIC ACID BACTERIA**



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF
MASTER OF SCIENCE IN BIOTECHNOLOGY**

SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

2002

ISBN 974 - 648 - 831 - 7



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
COPYRIGHT 2002

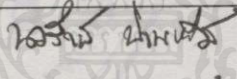
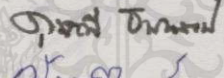
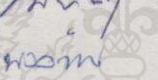
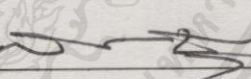
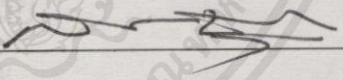
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES

KING MONGKUT 'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG

บัณฑิตวิทยาลัย
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ใบรับรองวิทยานิพนธ์

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การคัดเลือกรวมแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างไดอะซีทิล
SCREENING OF DIACETYL-PRODUCING LACTIC ACID
BACTERIA

ชื่อนักศึกษา นายอำนาจ ภัคดีโต
รหัสประจำตัว 41065210
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ รศ.ดร.นวลพรรณ ณ ระนอง
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ดร.สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์		ลายมือชื่อ
ผศ.นวรรตน์	ปานแหม่ม	
รศ.ดร.คุณฉวี	ชนะบริพัฒน์	
ผศ.ณัฐดา	วิโรจน์แสงอรุณ	
รศ.ดร.นวลพรรณ	ณ ระนอง	
รศ.ดร.สมบูรณ์	ธนาสุภวัฒน์	

วัน/เดือน/ปี ที่สอบ 2 เมษายน 2545 เวลา 13.00 น. เป็นต้นไป

สถานที่สอบ ณ อาคารจุฬารณวลัยลักษณ์ 1 ชั้น 4 ห้อง 424

บัณฑิตวิทยาลัยรับรองแล้ว



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้ วันที่...เดือน...ปี... พ.ศ. ๒๕๔๕
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างโคอะซีติล
นักศึกษา	นายอำนาจ กักดีโต
รหัสประจำตัว	41065210
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
พ.ศ.	2545
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	รศ.ดร. นवलพรรณ ฌ ระนอง
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ร่วม	รศ.ดร. สมบูรณ์ ชนาศุภวัฒน์

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจำนวน 137 ไอโซเลตจากนมพาสเจอร์ไรซ์ จำนวน 5 ตัวอย่าง นมดิบ จำนวน 6 ตัวอย่าง และอาหารหมักคองจำนวน 21 ตัวอย่าง จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบว่า มีเชื้อรูปร่างแท่ง จำนวน 57 ไอโซเลต และรูปร่างกลม จำนวน 80 ไอโซเลต การคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอินบนอาหารแข็ง และในอาหารเหลว MMRS พบว่า มีเชื้อจำนวน 115 ไอโซเลตสามารถผลิตโคอะซีติลจากซีเทรตได้ และเชื้อรูปร่างแท่งที่สามารถผลิตโคอะซีติลได้ปริมาณสูงในอาหาร MMRS ได้แก่ สายพันธุ์ SR8-1, AP17-1 และ SR4-2 ผลิตได้ปริมาณ 2.49, 2.29 และ 2.12 mM ตามลำดับ ส่วนเชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ PM4-9, PM3-13, PM3-14 และ AP2-1 ผลิตได้ปริมาณ 2.7, 2.37, 2.35 และ 1.90 mM ตามลำดับ

การพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดแลคติกคัดเลือกโดยศึกษาลักษณะทางพีโนไทป์ พบว่า สายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 จัดอยู่ในสกุล *Lactobacillus* สายพันธุ์ PM3-13, PM3-14, PM4-9 จัดอยู่ในสกุล *Enterococcus* และสายพันธุ์ AP2-1 จัดอยู่ในสกุล *Weissella* จากการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ พบว่า สายพันธุ์ AP17-1, SR4-2, SR8-1 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับ *Lactobacillus pentosus* NRIC1069^T เท่ากับ 77.2 ถึง 111.6 เปอร์เซ็นต์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ ทั้ง 3 นี้ เป็น *Lactobacillus pentosus* สายพันธุ์ PM3-13, PM3-14, PM4-9 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับ *Enterococcus faecium* NRIC1145^T เท่ากับ 72.1 ถึง 99.6 เปอร์เซ็นต์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์ทั้ง 3 เป็น *Enterococcus faecium* และ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สายพันธุ์ AP2-1 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับ *Weissella confusa* NRIC 0207^T เท่ากับ 100.5 เปอร์เซ็นต์ จึงพิสูจน์เอกลักษณ์สายพันธุ์นี้เป็น *Weissella confusa*

จากการศึกษาการเจริญ การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอินของเชื้อคัดเลือกในอาหารเหลว MMRS พบว่า การผลิตโคอะซีติลสูงสุดอยู่ในระยะ stationary phase ของการเจริญของเชื้อในสภาวะแบบไม่เขย่าซึ่งแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติลได้สูงจากมากไปน้อยได้แก่ SR4-2, PM3-14, SR8-1, AP2-1, PM4-9, PM3-13 และ AP17-1 โดยผลิตได้เท่ากับ 3.35, 3.27, 3.25, 3.16, 3.04, 2.98 และ 2.79 mM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า สายพันธุ์ SR4-2 และ AP17-1 สามารถผลิตอะซีโทอินได้ปริมาณเล็กน้อยทั้งในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่าและแบบไม่เขย่า



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Thesis Title	Screening of Diacetyl - Producing Lactic Acid Bacteria
Student	Mr. Amnat Pakdeeto
Student ID.	41065210
Degree	Master of Science
Programme	Biotechnology
Year	2002
Thesis Advisor	Associate Professor Dr. Nuanphan Naranong
Thesis Co-advisor	Associate Professor Dr. Somboon Tanasupawat

ABSTRACT

One hundred and thirty - seven isolates of lactic acid bacteria were isolated from pasteurized milk (5 samples), raw milk (6 samples) and fermented foods (21 samples) in Thailand. From the morphological studies, there were 55 rods and 80 cocci. These isolates were screened for diacetyl/acetoin production on MMRS medium. One hundred and fifteen strains of lactic acid bacteria were found to produce diacetyl from citrate. The rod strains SR8-1, AP17-1 and SR4-2 could produce 2.49, 2.29 and 2.12 mM of diacetyl respectively whereas the coccal strains PM4-9, PM3-13, PM3-14 and AP2-1 could produce 2.70, 2.37, 2.35 and 1.90 mM respectively.

Based on the phenotypic characteristics studies, the strains AP17-1, SR4-2 and SR8-1 belonged to genus *Lactobacillus*, the strains PM3-13, PM3-14 and PM4-9 were included in genus *Enterococcus* and strain AP2-1 was in genus *Weissella*. All selected strains were carried out for DNA relatedness using photobiotin labelling DNA-DNA hybridization in microplate wells. Strains AP17-1, SR4-2 and SR8-1 showed high degree (77.2-111.6%) of DNA-DNA homologies with *Lactobacillus pentosus* NRIC 1069^T. They were identified as *Lactobacillus pentosus*. Strains PM3-13, PM3-14 and PM4-9 showed high degree (72.1-99.6%) of DNA-DNA

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

homologies with *Enterococcus faecium* NRIC1145^T. They were identified as *Enterococcus faecium*. Strains AP2-1 showed high degree (100.5%) of DNA-DNA homology with *Weissella confusa* NRIC 0207^T. It was identified as *Weissella confusa*.

From the study of growth, diacetyl and acetoin production of the selected strains in MMRS broth, the maximum production of diacetyl was found at the stationary phase of static condition. The strains SR4-2, PM3-14, SR8-1, AP2-1, PM4-9, PM3-13 and AP17-1 could produce 3.35, 3.27, 3.25, 3.16, 3.04, 2.98 and 2.79 mM respectively. Furthermore, the strains SR4-2 and AP17-1 could produce the small amount of acetoin in both shaking and static conditions.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ได้ โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษารองศาสตราจารย์ ดร. นवलพรรณ ณ ระนอง และอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ ที่ให้ความช่วยเหลือ ให้คำแนะนำ ข้อคิดเห็น และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ นวรัตน์ ปานแยม ประธานกรรมการวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. คุณณี ธนะบริพัฒน์ กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายในภาควิชา และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ณัฐดา วิโรจน์แสงอรุณ กรรมการวิทยานิพนธ์ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอกภาควิชา ที่กรุณาเป็นกรรมการในการสอบและช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอแมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการเก็บตัวอย่างนมดิบ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ นवलศรี นิวัติชัยวงศ์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษา กล้ากสิกิจ ที่ให้ความรู้และคำแนะนำการใช้เครื่องมือวิเคราะห์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พิณทิพย์ พงษ์เพชร หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ใช้เครื่องมือและสถานที่ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง รวมทั้งเจ้าหน้าที่ เพื่อนๆ และน้องๆ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเกษตรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้มีส่วนช่วยเหลือให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และพี่น้อง ที่ให้กำลังใจ ช่วยเหลือ สนับสนุน ในการทำวิทยานิพนธ์จนเสร็จสมบูรณ์

อำนาจ กักศิโต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญภาพ.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์.....	1
1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย.....	3
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก.....	4
2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล <i>Lactobacillus</i> , <i>Enterococcus</i> และ <i>Weissella</i>	4
2.3 การหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	7
2.4 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติล.....	8
2.5 โครงสร้างและคุณสมบัติของโคอะซีติล.....	10
2.6 ประโยชน์ของโคอะซีติล.....	11
2.7 ข้อเสียของโคอะซีติล.....	11
2.8 การผลิตโคอะซีติล.....	12
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	23
3.1 การแยกและเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย.....	28
3.2 การจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้.....	29

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติล.....	29
3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	31
3.5 การศึกษาการเจริญ การสร้างกรด การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	34
บทที่ 4 ผลการทดลอง.....	35
4.1 ผลการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก.....	35
4.2 ผลการจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก.....	35
4.3 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติล.....	46
4.4 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	54
4.5 ผลการศึกษาการเจริญ การสร้างกรด การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....	71
บทที่ 5 วิจารณ์ผลการทดลอง.....	85
บทที่ 6 สรุปผลการทดลอง.....	93
บรรณานุกรม.....	95
ภาคผนวก ก.....	102
ภาคผนวก ข.....	106
ภาคผนวก ค.....	121
ประวัติผู้เขียน.....	129

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ทางการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2.1	คุณสมบัติต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติก.....6
2.2	คุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติก ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นมหมัก.....9
2.3	คุณสมบัติทางกายภาพของโคอะซีติล.....10
4.1	ชนิดตัวอย่าง แหล่งที่มา วันเดือนปีที่แยกเชื้อ รหัสเชื้อ และจำนวนไอโซเลต.....36
4.2	ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการ ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้.....39
4.3	จำนวนกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษา แบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี.....45
4.4	การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติก บนอาหารแข็งและอาหารเหลว MMRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง.....47
4.5	คุณลักษณะทางพีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติก สายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน.....57
4.6	คุณลักษณะทางพีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน.....61
4.7	คุณลักษณะทางพีโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน.....65
4.8	ไอโซเมอร์ของกรดแลคติกที่แบคทีเรียกรดแลคติกสร้างขึ้น.....69
4.9	แสดงความมลัยคลิ่งทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียกรดแลคติก เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน.....70
	ตารางภาคผนวก.....118

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2.1	สูตรโครงสร้างของไดอะซีติล.....10
2.2	การสังเคราะห์ไดอะซีติลโดยวิถี hexose-diphosphate จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโดยเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในระยะ stationary phase.....16
2.3	การสังเคราะห์ไดอะซีติลจากซิเทรตของแบคทีเรียกรดแลคติก.....18
2.4	การสังเคราะห์สาร acetyl - CoA โดยทาง hexose-monophosphate shunt ของเชื้อ <i>Leuconostoc</i> spp.....19
2.5	การเปลี่ยนแปลง NADH ไปเป็น NAD ที่เกิดจากแก๊สออกซิเจนช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ NADH oxidase.....21
4.1	การผลิตไดอะซีติลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MMRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง53
4.2	การผลิตอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เจริญในอาหารเหลว MMRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง.....54
4.3	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะเข่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....72
4.4	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่เข่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....72
4.5	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR4-2 เมื่อเลี้ยงในสภาวะเข่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....74
4.6	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR4-2 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่เข่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....74

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.7	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR8-1 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....76
4.8	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR8-1 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวMMRS.....76
4.9	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....78
4.10	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....78
4.11	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-14 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....80
4.12	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-14 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลวMMRS80
4.13	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM4-9 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....82
4.14	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM4-9 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS82

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4.15	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....84
4.16	การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีติล และอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 เมื่อเลี้ยงใน สภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS.....84
ภาพภาคผนวก.....	114



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของวิทยานิพนธ์

แบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic Acid Bacteria) เป็นแบคทีเรียในสกุล (genus) *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Carnobacterium*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenococcus* และ *Aerococcus* มีลักษณะรูปร่างเป็นทั้งแท่ง (rods) กลม (cocci) หรือเรียงตัวเป็นสี่เหลี่ยม (tetrad) ไม่เคลื่อนที่และไม่สร้างสปอร์ ย้อมติดสีแกรมบวก สามารถเปลี่ยนน้ำตาลหรือคาร์โบไฮเดรตให้เป็นกรดแลคติกได้ ปัจจุบันมีการจำแนกสกุลใหม่เพิ่มเติมจากเดิมเป็นชื่อ *Weissella*, *Atopobium*, *Oenococcus*, *Alloliococcus*, *Lactosphaera* และ *Paralactobacillus* แบคทีเรียกรดแลคติกพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ (homofermentative) สามารถหมักน้ำตาลที่มี 6 คาร์บอนได้กรดแลคติก 85-95 เปอร์เซ็นต์ ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ (heterofermentative) สามารถหมักน้ำตาลได้กรดแลคติก 50 เปอร์เซ็นต์ และได้เอทานอล (ethanol) กรดแอซีติก (acetic acid) ไดอะซีทิล (diacetyl) รวมทั้งแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ส่วนกรดแลคติกที่แบคทีเรียพวกนี้สร้างขึ้นมีทั้ง L(+) lactic acid ซึ่งถูกดูดซึมได้ดีในระบบทางเดินอาหารโดยร่างกายสามารถเปลี่ยนเป็นกลูโคสเพื่อสามารถนำไปใช้ได้ และสามารถเก็บสะสมอยู่ในรูปของไกลโคเจน ชนิด D(-) lactic acid ซึ่งร่างกายไม่สามารถนำไปใช้ได้จะถูกขับออกทางปัสสาวะ และเชื้อบางชนิดยังสามารถสร้าง DL lactic acid (Nakazawa, 1991; Seppo และ Atte, 1993; Wood และ Holzzapfel, 1995) แบคทีเรียกรดแลคติกเหล่านี้ปกติกระจายอยู่ทั่วไปตามธรรมชาติ โดยเฉพาะสกุล *Lactobacillus* จะพบมากกว่าเชื้อสกุลอื่นๆ และยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตอาหารและอุตสาหกรรมนมหมักหลายชนิด เช่น การผลิตแตงกวาดอง กะหล่ำปลีดอง ไข่กรอกเปรี้ยวและนมเปรี้ยวจำพวกนมอะซิโดฟิลัส (acidophilus milk) บัลกาเรียนบัตเตอร์มิลค์ (bulgarian butter milk) คีเฟอร์ (kefir) คูมึส (kumiss) และโยเกิร์ต (yogurt) (Pragna และ Tanvi, 1977) นอกจากนี้แบคทีเรียกรดแลคติกยังถูกจัดเป็น Food-grade organisms ซึ่งได้รับรองว่าเป็น GRAS (generally recognized as safe) และเป็นที่ยอมรับกันว่าสามารถผลิต extracellular polysaccharides (EPS) ซึ่งจะมีอยู่มากในเนื้อสัมผัส (texture) ของนมหมัก (Cerning, 1990; Roller, 1992) ใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่น่าจะให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านกรรม

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คิดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไดอะซีติล (diacetyl; biacetyl; 2,3-diketobutane) เป็นสารที่ผลิตขึ้นโดยเชื้อบางสายพันธุ์ในสกุล *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* และ *Lactobacillus* และเป็นสารที่ให้คุณสมบัติเฉพาะตัวทางกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์นมหมักหลายชนิด โดยเฉพาะเนยเหลว (butter) บัตเตอร์มิลค์ (buttermilk) และเนยแข็งคottage (cottage cheese) (Vedamuthu, 1982) นอกจากนี้ ไดอะซีติลยังถูกผลิตโดยจุลินทรีย์อื่นๆอีกหลายชนิด และพบได้ในน้ำมัน น้ำมันของต้นเบย์ (bay oil) และน้ำมัน (oils) อื่นๆอีกหลายชนิด ในการผลิตไดอะซีติลสามารถทำได้โดยใช้ปฏิกิริยาทางเคมี โดยทำการเปลี่ยนสาร methyl ethyl ketone ไปเป็นสาร isonitroso compound แล้วทำการย่อยให้ได้ ไดอะซีติลโดยกระบวนการไฮโดรไลซิส (hydrolysis) ด้วยกรดไฮโดรคลอริก (HCl) หรือ ทำการหมักน้ำตาลกับสาร methyl acetyl carbinol ด้วยเทคนิคพิเศษ (Budavari, 1989; Lewis, 1989) นอกจากนี้ไดอะซีติลยังเป็นสารที่เป็นประโยชน์ในเชิงการค้าอีกด้วย ซึ่งเป็นสารที่มีลักษณะเป็นของเหลวสีเหลืองเขียวให้กลิ่นที่รุนแรง ระเหยได้ มีจุดเดือดที่ 88 องศาเซลเซียส ละลายได้ในน้ำมัน (oil) และน้ำที่มีปริมาณมากกว่า 4 เท่า ซึ่งคุณสมบัติของไดอะซีติลที่กล่าวมานั้นจะแตกต่างกันตามระดับความเข้มข้นของหัวเชื้อกลิ่น (starter culture distillate) ที่นำมาใช้ในการผลิต ค่า LD₅₀ ของไดอะซีติลที่ให้แก่หนู (rats) คือ 1.58 กรัม/น้ำหนักหนู 1 กิโลกรัม (Windholz, 1984) ส่วนในด้านอาหารนั้นไดอะซีติลไม่เพียงเป็นสารต้นตอในการให้คุณสมบัติทางกลิ่นรสแก่อาหารหลายๆชนิดเท่านั้น แต่ไดอะซีติลยังมีคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์อีกด้วย (Hedgecock และ Jones, 1950) อย่างไรก็ตามคุณสมบัติในการต่อต้านจุลินทรีย์ให้ผลเพียงความเข้มข้นที่สูง ซึ่งที่ความเข้มข้นต่ำๆ ไดอะซีติลไม่มีฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์และยังสามารถถูกย่อยสลายจนหมดหรือถูกทำลายโดยจุลินทรีย์บางชนิด (Lemoigne, 1982) ได้แก่ *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp. และ *Alkaligenes* spp. (Elliker, 1945)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1.2 ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการวิจัย

- 1.2.1 เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตโคอะซีติลได้สูง
- 1.2.2 เพื่อพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก โดยอาศัยลักษณะทางฟีโนไทป์ (Phenotypic characteristics) และความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology)
- 1.2.3 เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตโคอะซีติลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้ เป็นการแยก คัดเลือก และพิสูจน์เอกลักษณ์แบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตโคอะซีติลได้ปริมาณมาก จากนมพาสเจอร์ไรซ์ นมดิบ และอาหารหมักดองบางชนิด รวมทั้งศึกษาการเจริญ การสร้างกรด การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ในระดับฟลาสก์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 1.4.1 สามารถคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติลได้สูง โดยแยกเชื้อจากตัวอย่างนมดิบ นมพาสเจอร์ไรซ์ และอาหารหมักดองบางชนิด
- 1.4.2 ทราบถึงการกระจาย (distribution) และ ความหลากหลาย (diversity) ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสกุลต่างๆที่สามารถผลิตโคอะซีติลได้ ในนมพาสเจอร์ไรซ์ นมดิบ และอาหารหมักดองบางชนิด
- 1.4.3 ทราบถึงการเจริญ การสร้างกรด การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกได้ เมื่อเพาะเลี้ยงในระดับฟลาสก์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria)

แบคทีเรียกรดแลคติกมีประวัติมานานนับศตวรรษ และเป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ในธรรมชาติเป็นจุลินทรีย์ที่ทำให้นมเปรี้ยว (milk – souring organisms) แต่ักพบแบคทีเรียนี้ในแหล่งอื่นนอกเหนือจากนม เช่น บริเวณช่องปาก ลำไส้ แผลง ฟิช (ผิวใบ) ผัก ผลไม้ รากต้นไม้ รัชูพืช หญ้าหมักเนย ไล้กรอก เครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์ และอาหารหมักคอง ต่างๆ

Orla – jensen (1919) ได้จำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยลักษณะของเซลล์ได้แก่ รูปร่างกลมหรือแท่ง การเรียงตัวเป็นสี่เหลี่ยม (cocci or rods, tetrad formation) การไม่เคลื่อนที่และ ไม่สร้าง สปอร์ การย้อมติดสีแกรมบวก การสร้างกรดแลคติกจากน้ำตาล และการเจริญที่ระดับอุณหภูมิแตกต่างกัน ปัจจุบันนอกจากลักษณะทางพีโนไทป์แล้ว ได้มีวิธีการตรวจสอบลักษณะกรดนิวคลีอิกของเชื้อเพื่อบ่งบอกความแตกต่างระดับสปีชีส์ (species) และสับสปีชีส์ (subspecies) โดยเฉพาะการตรวจความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology) และการศึกษาลำดับเบสของ rRNA และ DNA

ในการจำแนกสกุลของแบคทีเรียกรดแลคติกยังจำเป็นต้องใช้แนวคิดของ Orla – Jensen (1919) โดยอาศัยลักษณะรูปร่าง เชื้อรูปร่างแท่ง ได้แก่ *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* และ *Carnobacterium* เชื้อรูปร่างกลมเป็นคู่หรือสายโซ่ ได้แก่ *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Vagococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่งมีคุณสมบัติต่างๆดังตารางที่ 2.1 ปัจจุบันมีการจัดจำแนกสกุลใหม่เพิ่มเติมจากเดิมเป็นเชื้อ *Weissella*, *Alloliococcus*, *Atopobium*, *Oenococcus*, *Lactosphaesa* และ *Paralactobacillus* (Axelsson, 1993)

2.2 แบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus*, *Enterococcus* และ *Weissella*

2.2.1 สกุล *Lactobacillus* เป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ที่มีรูปร่างแท่ง (rods) มักเรียงต่อกันเป็นสายโซ่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ย้อมติดสีแกรมบวก มีความหลากหลายของลักษณะทางพีโนไทป์ คุณสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี มี mol % G+C ของดีเอ็นเอ อยู่ระหว่าง 32-53 เปอร์เซ็นต์ (Axelsson, 1998) ข่อยน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเป็นส่วนใหญ่ ถ้าเป็นพวกโฮโมเฟอร์เมนเททิฟ จะข่อยน้ำตาลแล้วให้กรดแลคติกเกือบทั้งหมดมีกรดแอซิดิก แก๊สคาร์บอนไดออกไซด์และอื่นๆบ้างเล็กน้อย แต่ถ้าเป็นพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเททิฟจะข่อยน้ำตาลแล้วให้สารระเหยได้ รวมทั้งแอลกอฮอล์ในปริมาณมากพอกับกรดแลคติก สามารถแบ่งแบคทีเรีย

กรดแลคติกออกได้ 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรกเป็นพวก Obligate homofermentative lactobacilli ที่สามารถหมักน้ำตาลกลูโคส (มากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์) เป็นกรดแลคติกโดยวิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate-aldolase (FDP aldolase) แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase และไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทส (pentose) และ กลูโคนเนท (gluconate) กลุ่มที่ 2 คือพวก Facultatively heterofermentative lactobacilli ที่สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซส (hexose) เป็นกรดแลคติก โดยวิธี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคสแต่สร้างแก๊สจากกลูโคนเนท ผลิตทั้งเอนไซม์ 1,6 biphosphate-aldolase (FDP aldolase) และ เอนไซม์ phosphoketolase และสามารถหมักน้ำตาลเพนโทส และ กลุ่มที่ 3 คือพวก Obligate heterofermentative lactobacilli ที่สามารถหมักน้ำตาลเฮกโซสผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคนเนท (Phosphogluconate pathway) เป็นแลคเตต (lactate) เอทานอล (ethanol) กรดแลคติก (lactic acid) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) สร้างแก๊สจากกลูโคส ไม่ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate-aldolase (FDP aldolase) แต่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase สามารถหมักน้ำตาลเพนโทส และ สร้างแก๊สจากกลูโคนเนทได้ (Sharpe, 1981; Kandler และ Weiss, 1986)

2.2.2 สกุล *Enterococcus* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมหรือกลมรี เซลล์อาจอยู่เป็นคู่ๆ หรือต่อกันเป็นสายโซ่สั้น ไม่มีเอนโดสปอร์ ข้อมติดสีแกรมบวก ผลิตกรดแลคติกชนิด L(+) ไม่มีริวิซไนเทรต ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส เป็นพวกที่ใช้ออกซิเจนหรือไม่ก็ได้ในการเจริญ (facultative anaerobe) ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส (homofermentative) แต่เดิมถูกจัดอยู่ในกลุ่ม เอ็นเทอโรคอคคัส (enterococcus group) ของสกุล *Streptococcus* ซึ่งจะประกอบด้วย *S. faecalis* และ *S. faecium* โดยทั้งสองสปีชีส์คล้ายกันมากแตกต่างกันทางด้านสรีรวิทยาเท่านั้น *S. faecalis* มักทนต่อความร้อนได้มากกว่าและแยกได้จากคน ส่วน *S. faecium* แยกได้จากพืช *S. faecalis* และ *S. faecium* มักอยู่ในอาหารดิบเสมอ แบคทีเรียในกลุ่มนี้มีลักษณะเด่นคือ สามารถเจริญได้ที่ 10 และ 45 องศาเซลเซียส พวก *Enterococci* มีลักษณะบางประการที่ไม่เหมือนกับ *Streptococci* คือ เป็นพวกที่ทนความร้อนได้ดี (60 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที) สามารถทนเกลือได้ถึงร้อยละ 6.5 หรือมากกว่า เจริญได้ในอาหารที่มีพีเอช 9.6 เจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 และ 45 องศาเซลเซียส ปัจจุบันมี 5 สปีชีส์ ได้แก่ *Enterococcus faecalis*, *E. faecium*, *E. avium*, *E. gallinarum* และ *E. cecorum* มี mol % G+C ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 37-40 เปอร์เซ็นต์ (Devriese และ Pot, 1995) แบคทีเรียกรดแลคติกพวก *Enterococci* จัดเป็นจุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับ โรคทางด้านอาหาร ส่วนใหญ่จึงถูกใช้เป็นตัวบ่งชี้ (indicators) ในด้านความปลอดภัยของอาหาร (Stiles, 1989) นอกจากนี้ยัง

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ถูกใช้เป็นโพรไบโอติก (probiotics) สำหรับป้องกันและช่วยบำบัดอาการที่ผิดปกติในลำไส้ (intestinal disorders) ของมนุษย์ (Lewenstein และคณะ, 1979) และ สัตว์ (Ushe และ Nagy, 1985) โดยเฉพาะเชื้อ *Enterococcus faecium* ถูกนำไปประยุกต์ร่วมกับกระบวนการหมักเพื่อผลิตเนยแข็ง (cheese) ในหลายๆ ประเทศทางตอนใต้ของทวีปยุโรป (Stiles และ Holzapel, 1997)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติต่างๆ ของแบคทีเรียกรดแลคติก

คุณสมบัติ	รูปร่างแท่ง		รูปร่างกลม									
	<i>Carnobacterium</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Weissella</i> ^a	<i>Aerococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Lactococcus</i>	<i>Vagococcus</i>	<i>Leuconostoc</i>	<i>Oenococcus</i>	<i>Pediococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Tetragenococcus</i>
รูปร่างสี่เหลี่ยม	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
สร้างแก๊ส CO ₂ จากกลูโคส	-	+/-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
เจริญที่อุณหภูมิ 10 °C	+	+/-	+	+	+	+	+	+	+/-	-	-	+
เจริญที่อุณหภูมิ 45 °C	-	+/-	-	-	+	-	-	-	+/-	+/-	-	-
เจริญในแกลลี่ 6.5 %	ND	+/-	+/-	+	+	-	-	+/-	+/-	-	-	+
เจริญในแกลลี่ 18 %	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
เจริญที่พีเอช 4.4	ND	+/-	+/-	-	+	+/-	-	+/-	+	-	-	-
เจริญที่พีเอช 9.6	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+
ไอโซเมอร์กรดแลคติก	L	D,L, DL ^b	D,DL ^b	L	L	L	D	L, DL ^b	L	L	L	L

+, ผลบวก -, ผลลบ +/-, แตกต่างกันระหว่างสปีชีส์ ND, ไม่มีข้อมูล

^a, บางสายพันธุ์มีรูปร่างเป็นท่อน ^b, ชนิดของกรดแลคติกแตกต่างกันตามสปีชีส์

ที่มา : Axelsson (1993; 1998); Collins และ คณะ (1993); Dicks และ คณะ (1995)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

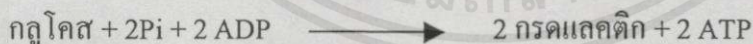
2.2.3 สกุล *Weissella* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างกลมค่อนข้างรี คล้ายแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* (leuconostoc-like bacteria) เซลล์มักจะอยู่เดี่ยว ๆ หรือบางครั้งพบเป็นสายโซ่สั้น ๆ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ย้อมติดสีแกรมบวก สร้างแก๊สจากกลูโคส (heterofermentative) เจริญที่ อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ผลิตภัณฑ์กรดแลคติกทั้งชนิด DL และ D มี mol % ของดีเอ็นเออยู่ระหว่าง 46.3-47 เปอร์เซ็นต์ (Schillinger และ Holzapfel, 1989) ใน ปัจจุบันถูกจัดให้เป็นสกุลใหม่ เพื่อหลีกเลี่ยงความสับสนในด้านการจัดจำแนกแบคทีเรียระหว่าง สกุล *Lactobacillus* *Lactococcus* และ *Leuconostoc* ซึ่งแต่เดิมนั้นมีสปีชีส์ (species) อยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Leuconostoc paramesenteroides* (*Weissella paramesenteroides*) *Lactobacillus confusus* (*W. confusa*) *Lactobacillus halotolerans* (*W. halotolerans*) *Lactobacillus kandleri* (*W. kandleri*) *Lactobacillus minor* (*W. minor*) *Lactobacillus viridescens* (*W. viridescens*) และ สปีชีส์ใหม่ (Collins และคณะ, 1993) ซึ่งแยกได้จากไส้กรอกหมัก คือ *W. hellenica* (Stiles และ Holzapfel, 1997)

2.3 การหมักของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถหมักน้ำตาลได้ 2 แบบ คือ

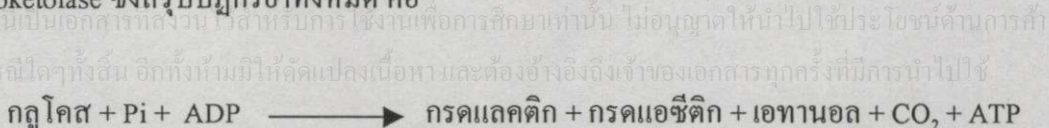
1) การหมักกรดแลคติกแบบโฮโมเฟอโรเมนเตทีฟ (homofermentative lactic acid)

แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้เมื่อมีการใช้น้ำตาลเฮกโซส จะสร้างกรดแลคติก 85-95 เปอร์เซ็นต์ (1.8 โมลต่อกลูโคส 1 โมล) โดยวิถี Embden-Meyerhof Parnas (EMP) จะเป็นวิถีที่สำคัญสำหรับคาร์โบไฮเดรตเมตาบอลิซึม ซึ่งสรุปปฏิกิริยาทั้งหมด คือ



2) การหมักกรดแลคติกแบบเฮเทอโรเฟอโรเมนเตทีฟ (heterofermentative lactic acid)

แบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้ จะสร้างกรดแลคติกในปริมาณที่น้อยกว่า คือ ประมาณ ร้อยละ 50 และมีสารอื่นๆอีก คือ เอทานอลและกรดแอซีติกร้อยละ 20-25 ที่เหลือเป็นแก๊ส คาร์บอนไดออกไซด์อีกร้อยละ 25 จุลินทรีย์ในกลุ่มนี้จะมีการสลายคาร์โบไฮเดรตโดยวิถี Pentose Phosphoketolase ซึ่งสรุปปฏิกิริยาทั้งหมด คือ



2.4 แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตไดอะซีทิล

ไดอะซีทิล (diacetyl) เป็นสารที่สามารถสร้างขึ้นโดยแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นมหมัก เช่น *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *diacetylactis*, *Lactococcus cremoris*, *Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus lactis*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus dextranicum*, *Leuconostoc cremoris*, *Leuconostoc dextranicum*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc citrovorum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium infantis* (ตารางที่ 2.2) และบางสายพันธุ์ของเชื้อ *Propionibacterium shermanii* (Vedamuthu, 1982; Kempler, 1983; Cathy, 1994) แบคทีเรียที่สร้างกลิ่นและรสพวกนี้อาจเป็นพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ หรือ เฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ ซึ่ง Christensen และ Pederson (1958) ได้รายงานไว้ว่า แบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟจะผลิตไดอะซีทิลได้มากกว่าพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟ เมื่อทำการเลี้ยงในอาหารที่มีน้ำตาลต่ำแต่เติมกรดซิตริกลงไป ลักษณะโดยทั่วไปของจุลินทรีย์เหล่านี้จะเป็นพวกแกรมบวก รูปร่างมีทั้งเป็นแท่งและกลม ไม่สร้างสปอร์ การแบ่งตัวจะเกิดเพียง 1 ระนาบเท่านั้นยกเว้นเชื้อ *Pediococcus* spp. ส่วนใหญ่จะไม่มีการสร้างเอนไซม์คาตาเลส นอกจากนี้ ยังพบว่ามีเชื้อยีสต์บางชนิดที่สามารถผลิตไดอะซีทิลได้ เช่น *Saccharomyces cerevisiae* (Chuang และ Collins, 1968)

ตารางที่ 2.2 คุณสมบัติบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่เกี่ยวข้องกับผลิตภัณฑ์นมหมัก

สกุล	รูปร่าง	อุณหภูมิ ^a	สปีชีส์	Major end-products	Secondary end-products
<i>Streptococcus</i>	Coccus	40-44 °C	<i>S. thermophilus</i>	L(+) lactic acid	Acetaldehyde, Acetone, Acetoin, Diacetyl, [Ethanol]
<i>Lactobacillus</i>	Rod	40-44 °C	<i>Lb. bulgaricus</i>	D(-) lactic acid	Acetaldehyde, Acetone, Acetoin, Diacetyl, [Ethanol]
			<i>Lb. helveticus</i>	DL lactic acid	Acetaldehyde, Acetic acid, Diacetyl, [Ethanol]
			<i>Lb. lactis</i>	D(-) lactic acid	Acetaldehyde, Acetone, Diacetyl, [Ethanol]
		25-30 °C	<i>Lb. acidophilus</i>	DL lactic acid	Acid Acetaldehyde, [Ethanol]
			<i>Lb. casei</i>	L(+) lactic acid	Acetic acid, [Ethanol]
<i>Lactococcus</i>	Coccus	25-30 °C	<i>Lc. lactis</i>	L(+) lactic acid	Acetaldehyde, Acetone, Diacetyl, Ethanol
			<i>Lc. cremoris</i>	L(+) lactic acid	Acetaldehyde, Acetone, Diacetyl, [Ethanol]
			<i>Lc. diacetylactis</i>	L(+) lactic acid, Acetaldehyde, CO ₂ , Diacetyl, Acetoin	Acetone, Ethanol
<i>Pediococcus</i>	Coccus	25-30 °C	<i>P. acidilactici</i>	DL lactic acid	[Acetoin, Diacetyl]
<i>Leuconostoc</i>	Ovoid	25-30 °C	<i>Leuc. cremolis</i>	D(-) lactic acid ,	Ethanol
			<i>Leuc. dextranicum</i>	Acetoin, Acetic	
			<i>Leuc. Lactis</i>	acid, Diacetyl, CO ₂	
<i>Bifido-Bacterium</i>	Rod or Bifid	35-38 °C	<i>B. breve</i>	L(+) lactic acid , Acetic acid	Formic acid, Succinic acid, Acetaldehyde, Acetone, Acetoin, Diacetyl, [Ethanol]
			<i>B. bifidum</i>		
			<i>B. longum</i>		
			<i>B. infantis</i>		

^a optimal growth temperature, ¹ ผลิตได้ปริมาณเล็กน้อย (trace end-products)

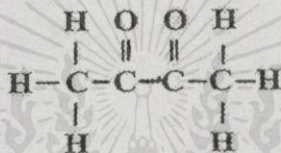
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ที่มา : Cathy (1994)

ไม่ว่าจะอย่างไรก็ตาม อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 โครงสร้างและคุณสมบัติของไดอะซีติล

ไดอะซีติล เป็นสารประกอบที่ถูกค้นพบในเนยเหลว หลังปี ค.ศ. 1929 (Van Neil และคณะ, 1929) ซึ่งเป็นสารที่แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ผลิตขึ้นโดยสร้างมาจากสารตัวกลางคือ ไพรูเวท (pyruvate) และมีความสำคัญต่ออุตสาหกรรมทำเนยเพราะเป็นสารที่มีกลิ่นหอม นอกจากนี้ยังเป็นสารที่ถูกจัดอยู่ในบัญชี GRAS (generally recognized as safe) ของประเทศสหรัฐอเมริกา (Jay, 1982) มีชื่อทางเคมีว่า biacetyl; 2,3-butanedione; 2,3-diketobutane; dimethyl diketone หรือ dimethyl glyoxal สูตรโมเลกุล $C_4H_6O_2$ มีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 2.1 และคุณสมบัติทางกายภาพดังตารางที่ 2.3



ภาพที่ 2.1 สูตรโครงสร้างของไดอะซีติล

ตารางที่ 2.3 คุณสมบัติทางกายภาพของไดอะซีติล

สถานะ	ของเหลวระเหยและติดไฟได้
ลักษณะสีและกลิ่น	สีเขียวปนเหลือง กลิ่นฉุนรุนแรง
ความสามารถในการละลาย	สามารถผสมรวมได้กับ แอตกอฮอล์ อีเทอร์ น้ำมัน (fixed oils) propylene glycol และ ละลายได้ใน กลีเซอริน (glycerine) และน้ำ
มวลโมเลกุล	86.10
จุดเดือด	88 องศาเซลเซียส
จุดแสงผ่าน	80 องศาฟาเรนไฮท์
ความหนาแน่น	0.9904
ดัชนีหักเห	1.393-1.397
ความหนาแน่นของการระเหย	3.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารสงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ที่มา : Budavari (1989); Lewis (1989) ต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

แหล่งที่พบ ต้นเบย์ (bay) น้ำมันหลายชนิด เนยเหลว นอกจากนี้ยังอาจพบได้ในไวน์ขาว ไวน์แดง บรันดี (brandy) หญ้าหมัก (end silage) และอาหารหมักอีกหลายชนิด (Jay, 1982)

2.6 ประโยชน์ของไคอะซีดิล

2.6.1 ใช้เป็นสารที่ให้กลิ่นรสแก่เนยเหลว น้ำส้มสายชู กาแฟ (roasted coffee) มارجารีน (margarine) โอเลโอมาการีน (oleomargarine) (Lewis, 1989; Budavari, 1989)

2.6.2 สามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์พวก ยีสต์ แบคทีเรียแกรมลบและแบคทีเรียแกรมบวก เช่น ไคอะซีดิลในระดับความเข้มข้น 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบและยีสต์ ส่วนระดับความเข้มข้น 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรจะสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นไคอะซีดิลจึงมีผลในการต่อต้านจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและทำให้อาหารเน่าเสียหลายชนิด และไคอะซีดิลยังถูกนำมาใช้ประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ได้อีกด้วย (Ray, 1992) อย่างไรก็ตามไม่นิยมใช้ไคอะซีดิลเพื่อการถนอมอาหารเพราะในระดับความเข้มข้นที่สูงจะให้กลิ่นที่รุนแรง นอกจากนี้ไคอะซีดิลยังสามารถนำมาใช้เป็นน้ำยาฆ่าเชื้อ (disinfectant) และทำความสะอาดเครื่องมือ เครื่องใช้ พื้นผิวโต๊ะทำงาน เนื่องจากไคอะซีดิลสามารถระเหยได้รวดเร็ว (Seppo และ Atte, 1993)

2.6.3 เป็นสารที่มีความสำคัญในการเพิ่มกลิ่นรส โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์อาหารที่ผลิตโดยใช้กระบวนการหมักแต่ผลิตภัณฑ์ที่ไคอะซีดิลมีบทบาทสำคัญ ได้แก่ ผลิตภัณฑ์นมต่างๆ เช่น ครีมเปรี้ยว เนยเหลว เนยแข็ง ปริมาณไคอะซีดิลจะเป็นตัวบ่งชี้ถึงลักษณะคุณภาพของผลิตภัณฑ์ผลิตภัณฑ์ เช่น ในการทำเนยแข็งถ้ามีการเติมไคอะซีดิลลงไปในกลุ่ม (curd) ปริมาณ 1.7 พีพีเอ็ม จะทำให้มีผลต่อการรับสัมผัสของลิ้น ในการผลิตไคอะซีดิลสามารถทำให้ปริมาณของไคอะซีดิลเพิ่มขึ้นโดยการควบคุมสิ่งแวดล้อมและการใช้สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ผลิตไคอะซีดิลสูง (Carlbert และ Price, 1949a, b)

2.7 ข้อเสียของไคอะซีดิล

2.7.1 แบคทีเรียกรดแลคติกบางชนิดสามารถใช้ประโยชน์จากไคอะซีดิลได้ ดังนั้นความเข้มข้นของไคอะซีดิลอาจจะลดค่าลงได้ในระหว่างที่ทำการเก็บ (Ray, 1992)

2.7.2 ในระดับความเข้มข้นที่สูงของไคอะซีดิลอาจมีความเป็นพิษต่อระบบทางเดินของกระเพาะอาหาร ในระดับความเข้มข้นที่ปานกลางหากรับประทานเข้าไปอาจเป็นพิษต่อระบบการย่อยอาหารและทำความระคายเคืองต่อผิวหนังได้เมื่อเกิดการสัมผัสขึ้น และเนื่องจากไคอะซีดิลเป็นของเหลวที่ติดไฟได้ฉะนั้นเมื่อให้ความร้อนแก่ไคอะซีดิลที่มีความเข้มข้นสูงอาจได้รับอันตรายจากควันที่เกิดจากการเผาไหม้ได้ซึ่งมีผลต่อระบบหายใจ (Lewis, 1989)

2.8 การผลิตไคอะซีติล

2.8.1 ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการผลิตไคอะซีติล

Christensen และ Pederson (1958) ได้ศึกษาปัจจัยต่างๆที่มีผลต่อการผลิตไคอะซีติล โดยเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสปีชีส์ที่ทำการผลิตไคอะซีติลนั้น ขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย แบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเตที่ผลิตไคอะซีติลได้มากกว่าแบคทีเรียพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเตที่ฟ และกรดซिटริกเป็นสารที่จำเป็นสำหรับการผลิตไคอะซีติลโดยแบคทีเรียบางสายพันธุ์ซึ่งจากการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกหลายสปีชีส์ พบว่า มีการผลิตไคอะซีติลเพิ่มมากขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีปริมาณน้ำตาลต่ำและมีกรดซิทริกเป็นส่วนประกอบอยู่ด้วย นอกจากนี้ ปริมาณที่มากของไคอะซีติลที่ถูกผลิตขึ้นดังกล่าวยังอยู่ภายใต้สภาวะที่ไม่ค่อยเหมาะสมอีกด้วย จากผลการทดลองทำให้ทราบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์โดยเฉพาะสปีชีส์ที่เป็นพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเตที่ฟอาจจะเจริญเติบโตโดยปราศจากการผลิตไคอะซีติล ดังนั้นการผลิตไคอะซีติลจึงไม่จำเป็นต้องขึ้นอยู่กับการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์นั้นๆ

Kaneko และคณะ (1990b) ได้ศึกษาการเพิ่มขึ้นของการผลิตไคอะซีติลโดยเชื้อแบคทีเรียผ่าเหล่า (diacetyl-resistant mutants) ที่เกิดจากเชื้อ Citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 โดยทำการเลี้ยงเชื้อในสภาวะที่มีอากาศ พบว่า การเติมโลหะไอออนพวก Cu^{2+} และ Fe^{3+} มีผลในการยับยั้งการใช้ซิเทรตของเชื้อ Citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 และกระตุ้นการผลิตไคอะซีติลซึ่งอาจเป็นเพราะว่าไคอะซีติลทำให้กิจกรรมการใช้ซิเทรตของเชื้อให้ลดต่ำลง เชื้อที่ถูกทำให้ผ่าเหล่าสามารถผลิตไคอะซีติลได้มากกว่าสายพันธุ์พ่อแม่ในสภาวะที่ไม่ได้ควบคุมการผลิตและยังใช้ประโยชน์จากซิเทรตในปริมาณที่มากกว่าอีกด้วย อย่างไรก็ตามยังพบอีกว่าเชื้อสายพันธุ์พ่อแม่ที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศสามารถผลิตไคอะซีติลได้มากกว่าการเจริญภายใต้สภาวะไม่เขย่าและยังมีการผลิตไคอะซีติลต่อไปได้หลังจากซิเทรตถูกใช้จนหมดแล้วและที่สำคัญ คือ เชื้อที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศที่ปราศจากซิเทรตในอาหารเลี้ยงเชื้อมีแนวโน้มการผลิตไคอะซีติลเป็นไปในทางที่สูงขึ้นโดยการเติม Cu^{2+} ส่วนเชื้อที่เจริญในสภาวะที่มีอากาศสามารถใช้น้ำตาลกลูโคส หรือซิเทรตได้มากกว่าการเจริญภายใต้สภาวะไม่เขย่าแต่ผลิตแลคเตดและเอทานอลได้น้อยและยังพบอีกว่า การเพิ่มการผลิตไคอะซีติลในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า แสดงให้เห็นถึงปรากฏการณ์การผลิตที่ซับซ้อนที่มีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ diacetyl synthase ซึ่งจำกัดทางด้านกิจกรรมของปฏิกิริยารีดักชัน (reduction) ของไคอะซีติลที่เปลี่ยนไปเป็นอะซีโทอิน (acetoin) และการกระตุ้นการผลิตไคอะซีติลจากไพรูเวทที่เกิดจากวิถีการย่อยสลายแบบไกลโคไลซิส (glycolysis)

Kaneko และคณะ (1990a) ได้ศึกษาผลของ hemin หรือ Cu^{2+} ที่มีต่อการหมัก อะซิโธอิน โดยเชื้อ Citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 ในสภาวะการเจริญแบบมีอากาศ พบว่าเชื้อ Citr⁺ *L. lactis* subsp. *lactis* 3022 สามารถผลิตชีวมวล (biomass) ได้มาก และสามารถเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเพื่อผลิตไดอะซีติลและอะซิโธอินได้มากเช่นกันเมื่อเชื้อเจริญในสภาวะที่มีอากาศร่วมกับ hemin และ Cu^{2+} จากการเติม hemin หรือ Cu^{2+} แก่อาหารเลี้ยงเชื้อมีผลอย่างมากต่อการกระตุ้นกิจกรรมของเอนไซม์ diacetyl synthase และมีผลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ NAD-dependent diacetyl reductase อย่างมากเช่นกัน และพบว่า hemin ไม่มีอิทธิพลต่อกิจกรรมของเอนไซม์ NADH oxidase และ เอนไซม์ lactate dehydrogenase จากผลการทดลองครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าไพรูเวทที่เกิดขึ้นโดยวิถีไกลโคไลซิสน่าจะมีความเร็วในการเปลี่ยนไปเป็นไดอะซีติลและไดอะซีติลน่าจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิโธอินโดยเอนไซม์ NAD - dependent diacetyl reductase เพื่อทำการ reoxidized สาร NADH เมื่อเซลล์แบคทีเรียถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีอากาศร่วมกับ hemin หรือ Cu^{2+} แต่ค่า Y_{Glu} สำหรับการเลี้ยงเชื้อที่มี hemin จะได้ปริมาณที่ต่ำกว่าการเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี hemin เพราะมีการยับยั้งการผลิตอะซิเทตเกิดขึ้น ซึ่งพบว่าปริมาณน้ำตาลกลูโคสมากเกินไป ก็ตามยังพบอีกว่าในสภาวะที่มีกรดไลโปอิก (lipoic acid) โคแฟกเตอร์ (cofactor) ที่สำคัญ คือ เอนไซม์ dihydrolipoamide acetyltransferase ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของ pyruvate dehydrogenase complex และ hemin หรือ Cu^{2+} จะช่วยเพิ่มการผลิตอะซิเทตแล้วยับยั้งการผลิตไดอะซีติลและอะซิโธอิน กิจกรรมของเอนไซม์ diacetyl synthase ถูกทำให้ลดต่ำลงได้โดยการเติมกรดไลโปอิก จากผลการทดลองครั้งนี้เป็นการชี้ให้เห็นว่า hemin หรือ Cu^{2+} จะช่วยกระตุ้นการสร้าง acetyl coenzyme A (acetyl-CoA) จากไพรูเวทและกรดไลโปอิกจะยับยั้งการรวมตัวของ acetyl-CoA กับ hydroxy ethyl thiamine Ppi นอกจากนี้ยังพบว่า acetyl-CoA ไม่ได้ใช้สำหรับสังเคราะห์ไดอะซีติล ซึ่งจะถูกเปลี่ยนไปเป็นอะซิเทต (acetate) แทน

Kaneko และคณะ (1991) ได้ศึกษาถึงความแตกต่างของการผลิตไดอะซีติลระหว่างแบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 และแบคทีเรียสายพันธุ์ Citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 พบว่า เชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 แสดงถึงการมีระดับกิจกรรมของเอนไซม์ diacetyl reductase ที่ต่ำกว่าเชื้อ Citr⁺ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 มาก แต่ก็แสดงถึงระดับกิจกรรมของเอนไซม์ diacetyl synthase, lactate dehydrogenase และ NADH oxidase ที่สูงกว่า 2, 3 และ 9 เท่า ตามลำดับและยังพบว่า โลหะไอออนมีความจำเป็นต่อเอนไซม์ diacetyl synthase ที่อยู่ในเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์สำหรับผลิตไดอะซีติลและส่วนสกัดของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 สามารถผลิตไดอะซีติลจากไพรูเวทได้ปริมาณมากเมื่อปฏิกิริยาของเอนไซม์ diacetyl synthase ได้รับอากาศซึ่งมากกว่าไม่ได้รับอากาศ

Starrenburg และ Hugenholtz (1991) ได้ศึกษาการหมักซิเทรตโดยเชื้อ *Lactococcus* และ *Leuconostoc* spp. แบบต่อเนื่องที่ทำการปรับค่าของปัจจัยต่างๆทางกายภาพและชีวภาพ เช่น พีเอช ปริมาณแก๊สออกซิเจนและอัตราเร็วของการเจริญเติบโตของเชื้อ พบว่า กระบวนการหมักซิเทรต และน้ำตาลแล็กโทสของเชื้อทั้ง 2 สายพันธุ์ มีแนวโน้มที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งมีไพรูเวทเป็นตัวกลางที่สำคัญ เชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* ซึ่งเป็นเชื้อแบคทีเรียพวกโฮโมเฟอร์เมนเตทีฟ สามารถทำการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นแลคเตต (lactate) ที่อัตราการเจริญสูง พีเอชต่ำ และความเข้มข้นของน้ำตาลแล็กโทส ในการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องผลผลิตที่ได้มีค่าพีเอชสูงกว่า 6.0 การหมักอะซีโทอิน/บิวทานีไดออกด้วย α -acetolactate ซึ่งเป็นสารตัวกลาง พบว่า การให้อากาศมีผลน้อยในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องและภายใต้สภาวะการผลิตไพรูเวทจากซิเทรตที่มากเกินไป เชื้อ *Leuconostoc* spp. แสดงให้เห็นถึงข้อจำกัดของการย่อยสลายที่ยืดหยุ่นได้ (flexibility) และพบว่ากระบวนการเปลี่ยนน้ำตาลแล็กโทสของแบคทีเรียพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเตทีฟมีความคล้ายคลึงกันในทุกๆสภาวะที่มีการเลี้ยงเชื้อแบบต่อเนื่องและแบบแบตช์ (batch) ไพรูเวทที่ผลิตจากน้ำตาลแล็กโทสหรือซิเทรตจะถูกเปลี่ยนไปเป็น ดี-แลคเตต (D-lactate) และทั้งเชื้อ *Lactococcus lactis* และ *Leuconostoc* spp. ใช้ประโยชน์จากซิเทรตที่ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช ในอัตราเร็วสูงสุดอยู่ในช่วง พีเอช 5.5 และ 6.0 อัตราเร็วของการเจริญจำเพาะสูงสุดถูกกระตุ้นโดยซิเทรตน้อยในเชื้อ *L. lactis* ส่วนเชื้อ *Leuconostoc* spp. จะถูกกระตุ้นโดยซิเทรตมาก และจากการเปลี่ยนแปลงซิเทรตเป็นผลทำให้ค่า yield ของการเจริญเพิ่มขึ้นซึ่งขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำตาลแล็กโทสที่ให้แก่เชื้อ *L. lactis* และ *Leuconostoc* spp. จากผลการทดลองครั้งนี้ ทำให้เราทราบว่าพลังงานถูกเก็บรักษาไว้ในระหว่างที่มีการย่อยสลายซิเทรตของเชื้อทั้งสอง

Gutierrez และคณะ (1996) ได้ศึกษาการผลิตไดอะซีติลจากหางนมที่ผ่านการกรองโดยเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* เพื่อทำการประเมินค่าของการนำหางนมมาใช้เป็นสับสเตรต (substrate) สำหรับผลิตไดอะซีติลและหาค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของสารอาหารเสริมชนิดต่างๆ ที่ช่วยเพิ่มการผลิตไดอะซีติล พบว่า เมื่อเพิ่ม yeast extract เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตรแก่หางนมหัวเชื้อเริ่มต้นแลคติกสามารถผลิตไดอะซีติลและอะซีโทอินได้ปริมาณ 26 กรัมต่อลิตร และ 440 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และเมื่อเพิ่มปริมาณ yeast extract เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับโลหะไอออนพวก Ferrous ion (Fe^{2+}) หรือ Copper ion (Cu^{2+}) แก่หางนม จะไม่สามารถทำให้เชื้อผลิตไดอะซีติลและอะซีโทอินเพิ่มขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่จากการเพิ่มซิเทรตเข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร ร่วมกับ yeast extract เข้มข้น 5 กรัมต่อลิตร เชื้อสามารถผลิตอะซีโทอินเพิ่มขึ้นถึง 560 กรัมต่อลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

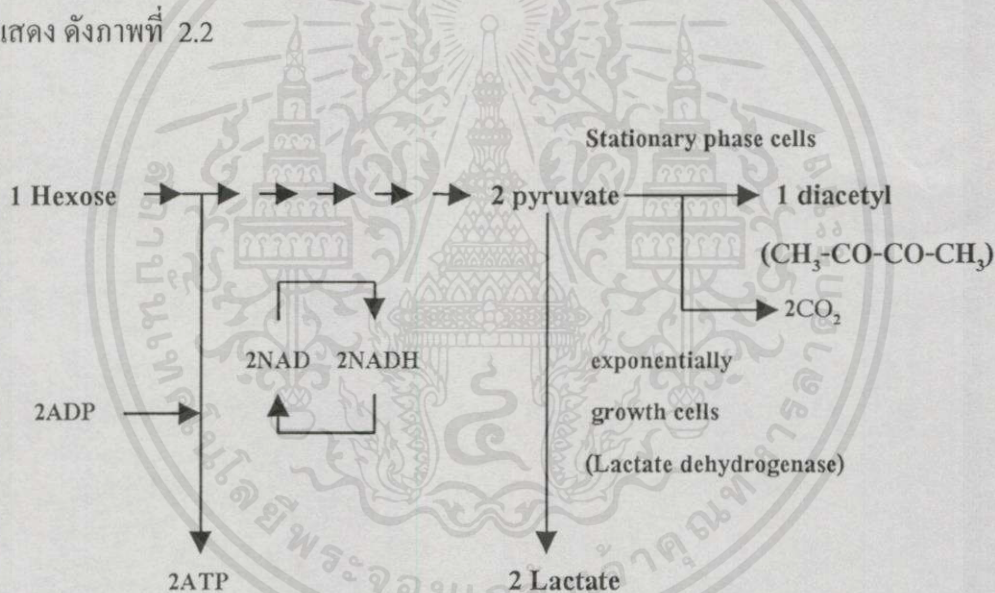
Boumerdassi และคณะ (1996) ได้ทำการปรับปรุงการผลิตโคอะซีติลโดยแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ 483 ด้วยวิธีการผ่านแก๊สออกซิเจนควบคุม ซึ่งหลังจากที่ทำการให้อาหารเลี้ยงเชื้ออิมิตัวด้วยแก๊สออกซิเจนที่มีความเข้มข้น 21 และ 50 เปอร์เซ็นต์ และเพิ่มความดันของแก๊สออกซิเจนแก่ถังหมัก ภายใต้ความดันบรรยากาศ 1 และ 2 atm พบว่าแก๊สออกซิเจนมีผลเพียงเล็กน้อยต่อการเจริญของเชื้อที่ใช้ในการหมัก แต่แก๊สออกซิเจนกลับมีผลอย่างมากต่อการผลิตโคอะซีติล และภายใต้สภาวะแก๊สไนโตรเจนความเข้มข้นสูงสุดของโคอะซีติลที่เชื้อผลิตเท่ากับ 0.015 mM ส่วนเชื้อที่เจริญในอาหารที่มีความเข้มข้นของแก๊สออกซิเจนละลายอยู่ประมาณ 21 และ 50 เปอร์เซ็นต์จะผลิตโคอะซีติลได้ความเข้มข้นสูงสุดเท่ากับ 0.13 และ 0.26 mM ตามลำดับ และการผลิตโคอะซีติลของเชื้อจะได้ปริมาณสูงสุดถึง 0.39 และ 0.45 mM เมื่อทำการเลี้ยงเชื้อภายใต้สภาวะความดันของแก๊สออกซิเจน เท่ากับ 1 และ 2 atm ตามลำดับ และผลของแก๊สออกซิเจนที่มีต่อกิจกรรมของเอนไซม์ lactate dehydrogenase และการเกิดปฏิกิริยา chemical decarboxylation ของ α -acetolactate ยังสามารถนำมาใช้อธิบายถึงการผลิตโคอะซีติลที่มีปริมาณสูงกว่าเดิมได้

2.8.2 วิธีการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตและซิเทรตของแบคทีเรียกรดแลคติก

จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตโคอะซีติล (และอะซีโทอิน) ส่วนใหญ่เป็นพวกที่สามารถเปลี่ยนไพรูเวท ที่มากเกินพอไปเป็นสารประกอบที่มีคุณสมบัติเป็นกลางที่ไม่เกิดเป็นพิษต่อร่างกาย ซึ่งทั้งโคอะซีติลและอะซีโทอินนั้นเป็นสารที่ถูกผลิตขึ้นในปริมาณที่น้อย (Collins, 1972) และโคอะซีติลยังเป็นสารที่มีคุณสมบัติพิเศษอีกอย่างหนึ่ง คือ เป็นสารประกอบที่ช่วยต่อต้านจุลินทรีย์พวกแบคทีเรีย แกรมลบ ยีสต์ และรา ได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมบวก และเนื่องจากโคอะซีติลเป็นสารที่มีศักยภาพที่สูงต่อการต่อต้านจุลินทรีย์ ดังนั้นจึงถูกนำไปใช้ต่อต้านจุลินทรีย์ในอุตสาหกรรมอาหาร (Jay, 1982) ในการเพิ่มการผลิตโคอะซีติลจะต้องคำนึงอย่างน้อย 3 สิ่งคือ สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่ใช้ผลิตจะต้องสามารถสร้างโคอะซีติลได้จริง ต้องควบคุมสภาพแวดล้อมให้สอดคล้องกับความต้องการของเชื้อที่เลือกไว้และส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องเอื้ออำนวยให้แบคทีเรียสร้างไพรูเวทที่เหลือใช้จากการสร้างเซลล์หรือการเกิดออกซิเดชันของสาร NAD (Collins, 1972)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

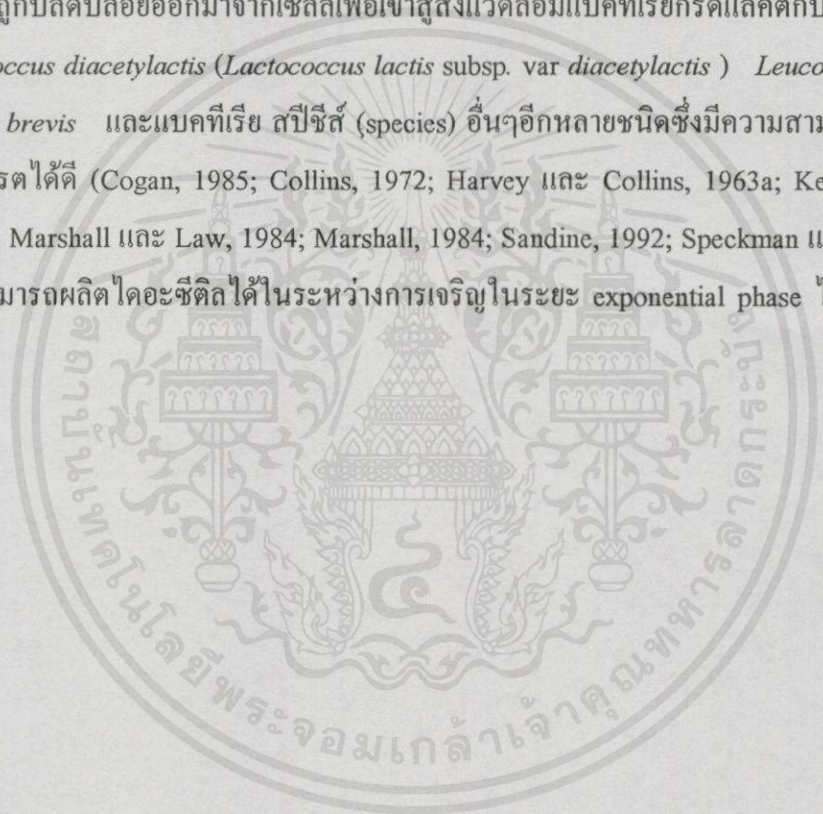
ในปัจจุบันนี้โคอะซีตลเป็นสารสำคัญที่ถูกนำไปใช้ประโยชน์เป็นหัวเชื้อกลิ่น (starter culture distillate) การเข้าใจทางด้านชีวเคมีและระบบการควบคุมพันธุกรรมของแบคทีเรียที่ใช้เป็นหัวเชื้อจะเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในด้านการเพิ่มผลผลิตซึ่งจากการใช้จุลินทรีย์ในการถนอมอาหารพบว่าจุลินทรีย์หลายชนิดรวมทั้งแบคทีเรียกรดแลคติกสามารถทำการสังเคราะห์โคอะซีตลโดยใช้วิธีการย่อยสลายที่แตกต่างกัน สารเมตาบอไลท์สำคัญที่ก่อให้เกิดการสังเคราะห์โคอะซีตลคือไพรูเวท โดยปกติแล้วสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแลคติกจะสามารถทำการสังเคราะห์โคอะซีตลได้ปริมาณน้อยมาก ในขณะที่มีการเจริญเติบโตเต็มที่ในอาหารเหลวที่มีคาร์โบไฮเดรตเป็นสารสำหรับย่อยสลาย เช่น น้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลแล็กโทส อย่างไรก็ตามยังพบว่าการผลิตโคอะซีตลนั้นเกิดจากการย่อยสลายสารคาร์โบไฮเดรตของเซลล์แบคทีเรียในช่วงของการเจริญเติบโตในระยะ stationary phase อีกด้วย (Collins, 1972) ความสัมพันธ์ของวิถีทางชีวเคมี (biochemical pathways) ของการใช้ไพรูเวทในช่วงการเจริญเติบโตของแบคทีเรียระยะ exponential phase และ stationary phase แสดง ดังภาพที่ 2.2



ภาพที่ 2.2 การสังเคราะห์โคอะซีตล โดยวิถี hexose-diphosphate จากการย่อยสลายคาร์โบไฮเดรตโดยเซลล์แบคทีเรียที่เจริญในระยะ stationary phase ที่มา : Ray (1992)

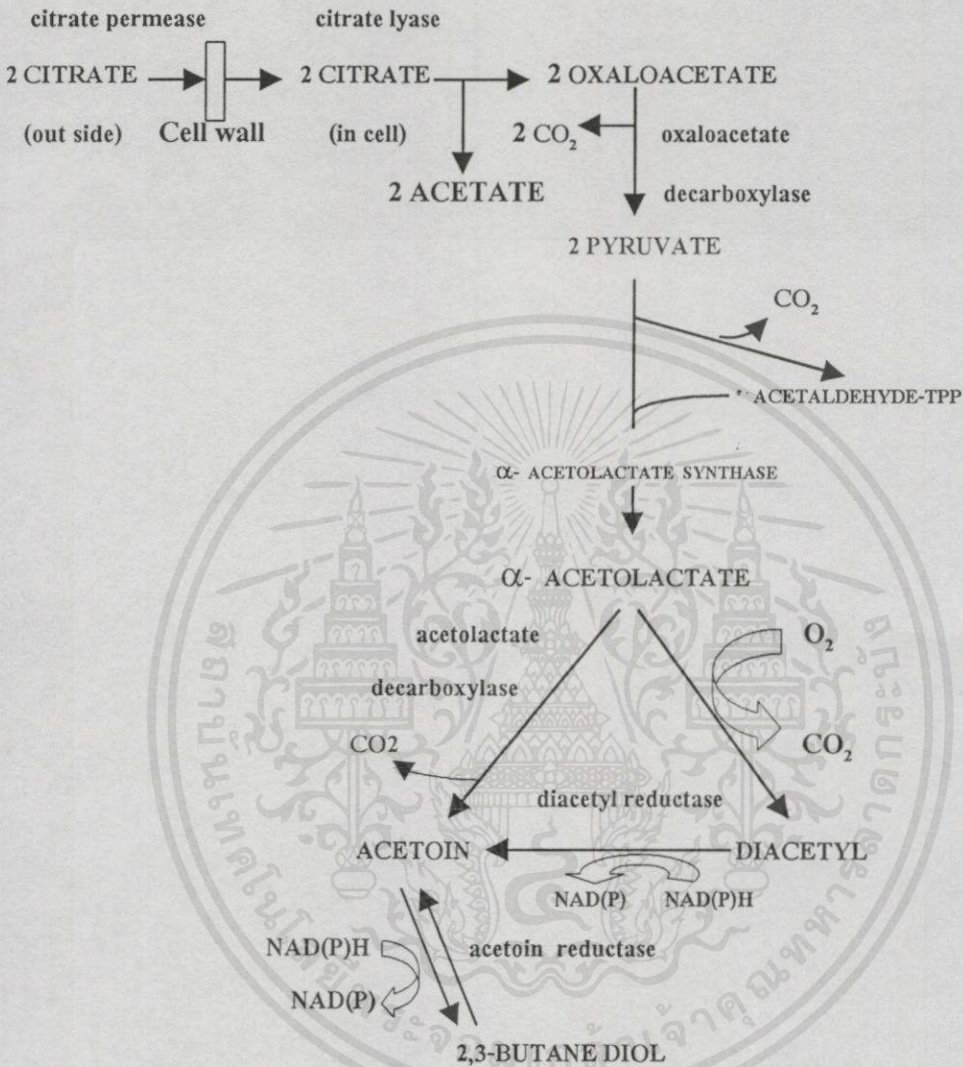
ในระหว่างที่เซลล์แบคทีเรียมีการเจริญเติบโตเต็มที่ที่จะทำการย่อยสลายน้ำตาลเฮกโซส เช่น น้ำตาลกลูโคส ซึ่งจะถูกย่อยสลายโดยแบคทีเรียกรดแลคติกหลายชนิดเพื่อสร้างไพรูเวท และสร้างพลังงาน ATP เกิดขึ้น โดยใช้วิธีการย่อยสลายแบบ hexose diphosphate หรือ วิถี Embden-Meyerhof-Panas (Collins, 1972; Marshall และ Law, 1984; Marshall, 1984) แล้วในแต่ละโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสยังมีวิธีการสร้าง NADH จำนวน 2 โมเลกุล จาก NAD 2 โมเลกุลอีกด้วย และ

ปฏิกิริยาต่างๆก็ยังคงดำเนินต่อไปเพื่อสร้างพลังงาน ATP ให้แก่เซลล์เพื่อใช้ในการเจริญเติบโต โดยโมเลกุลของ NADH จะต้องถูกเปลี่ยนกลับไปให้เป็น NAD เสียก่อน ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจะสำเร็จลงได้โดยการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นกรดแลคติกโดยใช้เอนไซม์ lactate dehydrogenase ซึ่งแลคเตตจะถูกปลดปล่อยเข้าสู่ภาวะแวดล้อม ในขณะที่เซลล์มีการเจริญอยู่ในช่วง stationary phase นั้นมีความต้องการพลังงาน ATP น้อยลง และมีการเปลี่ยน NADH ไปเป็น NAD ซึ่งเป็นช่วงที่เกิดวิกฤตน้อย ปริมาณไพรูเวทที่เป็นพิษที่สูงต่อเซลล์เริ่มมีการสะสม แบคทีเรียที่สามารถทำการผลิตไดอะซีติลสามารถเปลี่ยนโมเลกุลของไพรูเวทที่เกิดการสะสมนี้ไปเป็นโมเลกุลของไดอะซีติลที่มีคุณสมบัติที่ไม่เป็นพิษได้โดยไม่ต้องทำการเปลี่ยนสาร NADH ไปเป็น NAD เสียก่อน แล้วโมเลกุลของ NAD จะถูกปลดปล่อยออกจากเซลล์เพื่อเข้าสู่สิ่งแวดล้อมแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ เช่น *Streptococcus diacetylactis* (*Lactococcus lactis* subsp. var *diacetylactis*) *Leuconostoc* spp. *Lactobacillus brevis* และแบคทีเรีย สปีชีส์ (species) อื่นๆอีกหลายชนิดซึ่งมีความสามารถในการย่อยสลายซิเทรตได้ดี (Cogan, 1985; Collins, 1972; Harvey และ Collins, 1963a; Kempler และ McKay, 1981; Marshall และ Law, 1984; Marshall, 1984; Sandine, 1992; Speckman และ Collins, 1968) และสามารถผลิตไดอะซีติลได้ในระหว่างการเจริญในระยะ exponential phase ได้อย่างคงที่สม่ำเสมอ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ขั้นตอนต่างๆในกระบวนการทางชีวเคมี (biochemical steps) ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลาย ซิเทรตไปเป็นไพรูเวทนั้นจะไม่มีการผลิต NADH เกิดขึ้นซึ่งอธิบายได้ ดังภาพที่ 2.3



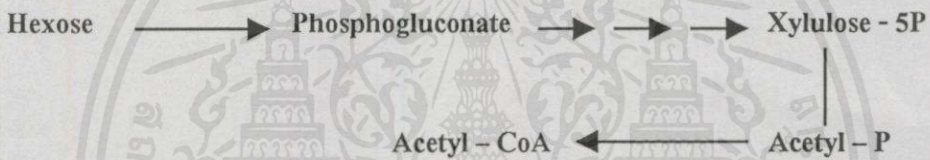
ภาพที่ 2.3 การสังเคราะห์ไดอะซีตอลจากซิเทรตของแบคทีเรียกรดแลคติก

ที่มา : Hugenholtz และ Starrenburg (1992); Cogan (1981)

จากรูปเป็นการแสดงถึงความสัมพันธ์ของการขนย้ายซิเทรตจากอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งอยู่นอก เซลล์เข้าสู่ส่วนที่เป็นไซโตพลาสซึม (cytoplasm) ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ของแบคทีเรียโดยเอนไซม์ citrate permease เสร็จแล้วซิเทรตที่อยู่ภายในเซลล์ก็จะถูกทำให้แตกออก (cleaved) เป็นอะซิเทต (acetate) และ oxaloacetate โดยเอนไซม์ citrate lyase จากนั้นสาร oxaloacetate จะถูกเปลี่ยนไป เป็นสารไพรูเวท และปล่อยแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ออกมา โดยเอนไซม์ oxaloacetate decarboxylase จากนั้นสารไพรูเวทจะถูก decarboxylate เกิดเป็นสาร acetaldehyde-thiamin

pyrophosphate (TPP) และแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ ต่อมาเอนไซม์ α -acetolactate synthase (ALS) จะทำให้ TPP รวมตัวกับโมเลกุลในตำแหน่งที่ 2 ของสารไพรูเวท เพื่อทำการผลิตสาร α -acetolactate ซึ่งต่อมาจะเกิดปฏิกิริยา chemical oxidative decarboxylation ของสาร α -acetolactate เพื่อทำให้เกิดสารไดอะซีติลขึ้น ส่วนสารอะซีโทอินสามารถเกิดได้โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ α -acetolactate decarboxylase ที่ decarboxylate สาร α -acetolactate, เกิดจากปฏิกิริยารีดักชันของสารไดอะซีติลโดยเอนไซม์ acetoin dehydrogenase หรือ เกิดจากปฏิกิริยา chemical nonoxidation decarboxylation และสาร 2,3-butane diol สามารถเกิดได้โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ acetoin reductase

เชื้อสกุล *Leuconostoc* บางสายพันธุ์ที่ไม่สามารถทำการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็น acetyl-CoA ได้สามารถที่จะสร้างโมเลกุลของไดอะซีติลได้จากการย่อยสลายน้ำตาลเฮกโซส โดยทาง hexose monophosphate shunt ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับการผลิตไพรูเวท (ดังภาพที่ 2.4)



ภาพที่ 2.4 การสังเคราะห์สาร acetyl-CoA โดยทาง hexose monophosphate shunt ของเชื้อ *Leuconostoc* spp.
ที่มา : Ray (1992)

สาร acetyl phosphate ที่ผลิตจากสาร xylulose 5 - phosphate สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็นสาร acetyl-CoA แล้วต่อมาก็จะเกิดการรวมตัวกับสาร acetyl-TPP ที่เกิดจากสารไพรูเวท เพื่อทำการผลิตไดอะซีติลต่อไป (Marshall และ Law, 1984)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

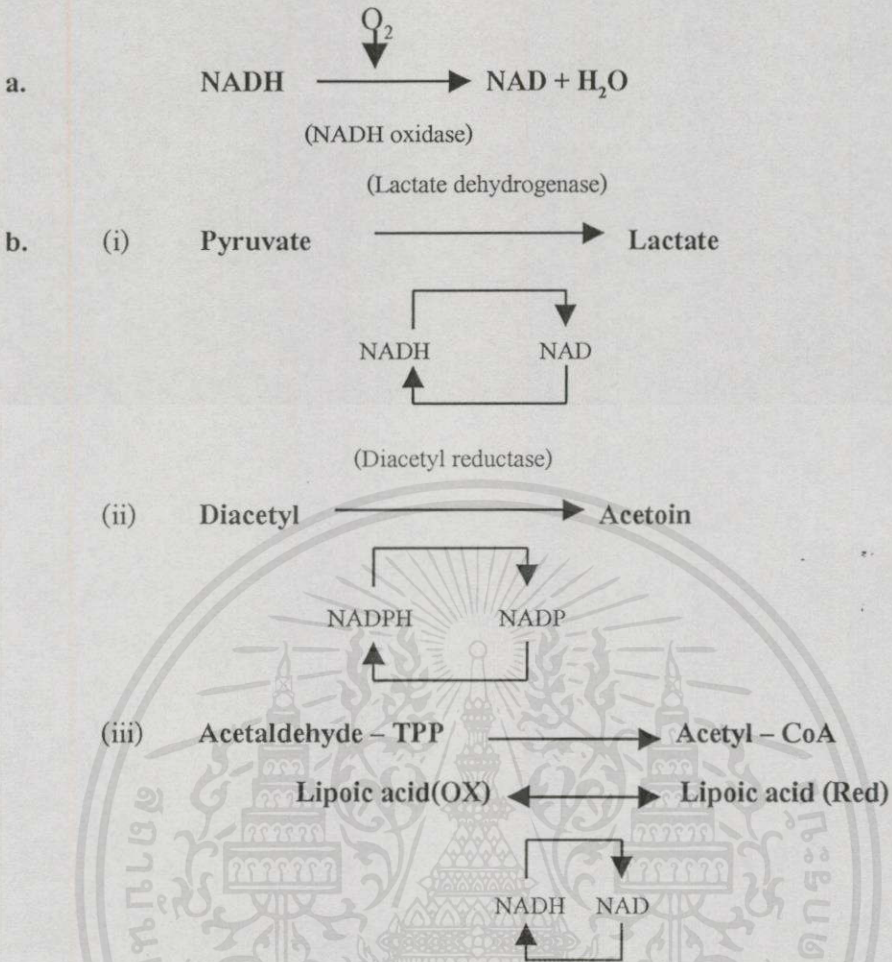
2.8.3 ปัจจัยต่างๆที่มีอิทธิพลต่อการผลิตโคอะซีติล

ความแตกต่างกันทางสรีรวิทยา พันธุกรรมของเชื้อและปัจจัยต่างๆทางด้านสิ่งแวดล้อมที่ควบคุมการย่อยสลายชีวมวล และไพรูเวทสามารถเพิ่มหรือลดการผลิตโคอะซีติลของแบคทีเรียกรดแลคติกได้ กิจกรรมของเอนไซม์ citrate permease ซึ่งจัดเป็นเอนไซม์ชักนำ (inducible enzyme) และเป็นเอนไซม์ที่ขึ้นอยู่กับค่าพีเอช (pH) ซึ่งค่าพีเอชเริ่มต้นที่เหมาะสมเท่ากับ 5.4 และมีค่าอยู่ในช่วง 4.3-6.5 เอนไซม์ citrate lyase เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นอยู่ในเซลล์เชื้อ *L.lactis* subsp.*lactis* var.*diacetylactis* แต่เป็นเอนไซม์ชักนำที่อยู่ภายในเชื้อ *Leuconostoc* spp. ซึ่งต้องการโลหะไอออนพวก Mg^{2+} หรือ Mn^{2+} และมีพีเอชที่เหมาะสมเท่ากับ 7.0 ส่วนเอนไซม์ diacetyl synthase เป็นเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นในเชื้อ *Leuconostoc* spp. แต่ถูกยับยั้งไว้มิให้แสดงออกโดยชีวมวลที่อยู่ภายในเซลล์เชื้อ *L.lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* ซึ่งค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกมีอิทธิพลมากต่อการผลิตโคอะซีติล โดยพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆดังกล่าวจะทำการผลิตโคอะซีติลในปริมาณที่น้อยมากในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าพีเอช 5.5 (Collins, 1972; Harvey และ Collins, 1963b; Marshall และ Law, 1984)

การให้อากาศแก่อาหารเลี้ยงเชื้อในระหว่างการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกบางสายพันธุ์ เช่น เชื้อ *L.lactis* subsp.*lactis* var.*diacetylactis* สามารถเพิ่มการผลิตโคอะซีติลได้ (Bruhn และ Collins, 1970; Collins, 1972) ซึ่งอากาศที่ให้นี้เราถือว่าเป็นแก๊สออกซิเจนซึ่งทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ NADH oxidase และช่วยเพิ่มการเปลี่ยน NADH ไปเป็น NAD โดยไม่เกี่ยวข้องกับขั้นตอนต่างๆของการผลิตกรดแลคติกจากไพรูเวท (ภาพ 2.5a)

ไพรูเวทที่ไม่ได้ถูกนำไปใช้สามารถที่จะนำมาใช้เพื่อทำการสร้างโคอะซีติลได้ซึ่งในทำนองเดียวกันการสร้างสาร NAD โดยการให้อากาศยังช่วยลดการเปลี่ยนโคอะซีติลไปเป็นอะซีโทอินโดยเอนไซม์ diacetyl reductase ได้อีกด้วย ดังนั้นตั้งแต่เริ่มการให้อากาศแก่อาหารเลี้ยงเชื้อจะเกิดการการสร้างสาร NAD โดยเอนไซม์ NADH-oxidase และจะเกิดการกระตุ้นสาร acetyl-CoA ซึ่งวิธีการให้อากาศนี้สามารถนำไปใช้เพื่อผลิตโคอะซีติลได้ (ภาพ 2.5b)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



- ภาพที่ 2.5 (a) การเปลี่ยน NADH ไปเป็น NAD ที่เกิดจากแก๊สออกซิเจนช่วยกระตุ้นการผลิตเอนไซม์ NADH oxidase
- (b) การสร้าง NAD โดยเอนไซม์ NADH oxidase (2.5a) ไปช่วยลดปฏิกิริยาต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการเปลี่ยนแปลง NADH ให้ไปเป็น NAD (หรือ NADP) และช่วยเพิ่มความเข้มข้นของไดอะซีติลทั้งทางตรงและทางอ้อม
- ที่มา : Ray (1992)

แบคทีเรียกรดแลคติกที่ถูกทำให้กลายพันธุ์มีความแตกต่างจากแบคทีเรียกรดแลคติกที่พบอยู่ตามธรรมชาติอย่างมากในด้านการผลิตไดอะซีติล Kuila และ Ranganathan (1978) รายงานว่าเชื้อ *L.lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* ที่พบอยู่ตามธรรมชาติ (wild strain) ซึ่งปกติเป็นเชื้อที่ผลิตได้ทั้งกรดแลคติกและไดอะซีติลในปริมาณที่ปานกลางหลังจากทำให้ผ่าเหล่าจะให้สายพันธุ์ที่ผ่าเหล่าได้ 2 ชนิด คือ เชื้อชนิดแรกสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 0.38 เปอร์เซ็นต์และผลิตไดอะซีติลได้ 138 พีพีเอ็ม ส่วนเชื้อชนิดที่สองสามารถผลิตกรดแลคติกได้ 0.93 เปอร์เซ็นต์แต่

สามารถผลิตโคอะซีติลได้เพียง 42.8 พีพีเอ็ม เท่านั้น ถือว่าเป็นเชื้อกลุ่มผู้สร้าง (former group) ที่มีการผลิตโคอะซีติลได้สูงซึ่งเป็นผลมาจากปฏิกริยารีดักชันในการเกิดกรดแลคติกและเกิดมาพร้อมกับ การสะสมไพรูเวทและไพรูเวทที่มากเกินไปจะถูกเปลี่ยนไปเป็นโคอะซีติล โดยแบคทีเรียที่ผ่าเหล่านี้ McKay และ Balduin (1974) ได้รายงานว่เชื้อผ่าเหล่านี้สายพันธุ์ *L.lactis* subsp. *lactis* C2 กับเอนไซม์ lactate dehydrogenase ที่ไม่สมบูรณ์ (defective) จะทำการเปลี่ยนไพรูเวทไปเป็นโคอะซีติล (และอะซีโทอิน) ในปริมาณที่มากเมื่อเชื้อถูกเลี้ยงในอาหารเหลว และแบคทีเรียที่ถูกทำให้ผ่าเหล่านี้ที่ไม่มีเอนไซม์ citrate permease อยู่ในเซลล์จะไม่สามารถขนย้ายซิเทรตเข้าสู่เซลล์ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้ซิเทรตเพื่อผลิตโคอะซีติลได้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

อุปกรณ์ที่สำคัญ

1. เครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) รุ่น UV-160A ของบริษัท Shimadzu, Japan
2. ตู้ลามินาโฟลว์ (Laminar flow) รุ่น BV-126 ของบริษัท International Scientific Supply, Thailand
3. เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง รุ่น ϕ 50 ของบริษัท Beckman, USA.
4. เครื่องหมุนเหวี่ยงปรับความเย็น (Refrigerated centrifuge) รุ่น SCR20B ของบริษัท Hitachi, Japan
5. กล้องจุลทรรศน์ รุ่น CHS ของบริษัท Olympus Optical, Japan
6. หม้อนึ่งความดัน (Autoclave) รุ่น HA-3D ของบริษัท Hirayama, Japan
7. ตู้แช่เยือกแข็งอุณหภูมิต่ำ (Deep freezer) อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส รุ่น A ของบริษัท Kelvinator, SAUD
8. กระดาษกรอง (Filter paper) ชนิด qualitative ของบริษัท Toyoroshi Kaisha, Japan
9. Cellulose TLC plastic sheet Art.5577 ของบริษัท Merck, Germany
10. คิวเวท (Cuvet) ชนิด S-10SM ของบริษัท Sigma, USA.
11. สไลด์ (Slide) ขนาด 2.5 X 7.5 cm. ยี่ห้อ Sail, China
12. แผ่นแก้วปิดปิดสไลด์ (cover glass) ของบริษัท Deckglaser, Germany
13. เครื่องผสมสาร (Vortex mixture) รุ่น K-550-GE ของบริษัท Scientific Industries, USA.
14. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Thelco 84 ของบริษัท Precision Scientific, USA.
15. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง รุ่น BA210S ของบริษัท Sartorius, Germany
16. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 3 ตำแหน่ง รุ่น 518 ของบริษัท Sartorius, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

17. เครื่องชั่งหยาบทศนิยม 2 ตำแหน่ง รุ่น BA610 ของบริษัท
Sartorius, Germany
18. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น Thelco 6 ของบริษัท Precision Scientific,
USA.
19. ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น B-60 และ UM100 ของบริษัท Memmert,
Germany
20. เครื่องเขย่า (Shaker) รุ่น SGM 300 ของบริษัท Gallenkamp
21. เครื่องแก้วต่างๆ ยี่ห้อ Pyrex
22. ตู้อบฆ่าเชื้อลมร้อน (Hot air oven) รุ่น T5090E ของบริษัท Heraeus,
Germany
23. เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilize) รุ่น FTS
ของ บริษัท Science Engineer International Co., LTD.
24. เครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (gas chromatography) ยี่ห้อ Chrompack
รุ่น CP 9000 ของบริษัท สิทธิพรแอสโซซิเอต จำกัด

สารเคมีและเอนไซม์

1. โซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) ของบริษัท Merck, Germany
2. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) ของบริษัท Carlo, USA.
3. โซเดียมคลอไรด์ (Sodium chloride) ของบริษัท BHD chemical, England.
4. บรอมไทมอลบลู (Bromthymol blue) ของบริษัท BHD chemical,
England
5. โบรโมคลีซอลเพอร์เพิล (Bromocresol purple) ของบริษัท May and
Baker, England
6. อีเทอร์ (Ether) ของบริษัท Merck, Germany
7. ฟีนอล์ฟทาเลอิน (Phenolphthalein) ของบริษัท Merck, Germany
8. คริสตัลไวโอเลต (Crystal violet) ของบริษัท Merck, Germany
9. ไอโอดีน คริสตัล (Iodine crystal) ของบริษัท Carlo Erba, USA.
10. ซาฟรานิน (Safranin) ของบริษัท Fluka, Switzerland
11. อิมเมอร์ชันออยล์ (Immersion oil) ของบริษัท Merck, Germany
12. เอทานอล (Ethanol) ของบริษัท Clinac, Thailand
13. เมทานอล (Methanol) ของบริษัท Merck, Germany
14. นิวทรัลเรด (Neutral red) ของบริษัท Merck, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและข้อมูลอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

15. เอทิลอะซิเตต (Ethyl acetate) ของบริษัท Merck, Germany
16. ซัลฟานิลิก แอซิด โซเดียม (Sulfanilic acid Sodium) ของบริษัท Merck, Germany
17. ไดเมทิลอัลฟาแนฟทาลามีน (Dimethyl- α -naphthalamine) ของบริษัท May and Baker, England
18. กรดไฮโดรคลอริก (Hydrochloric acid) ของบริษัท May and Baker, England
19. ผงถ่านกัมมันต์ (Activated carbon) ของบริษัท May and Baker, England
20. แอมโมเนียมซิเตรต (Ammonium citrate) ของบริษัท Merck, Germany
21. ไพริดีน (Pyridine) ของบริษัท May and Baker, England
22. แคลเซียมคาร์บอเนต (Calcium carbonate) ของบริษัท BHD chemical, England
23. ทริส (Tris) ของบริษัท Wako, Japan
24. เอนไซม์ดี-แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (D(-) Lactate dehydrogenase) ได้จากเชื้อ *L. leichmannii* ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany
25. เอนไซม์แอล-แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (L(+) Lactate dehydrogenase) ได้จากกล้ามเนื้อกระต่าย ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany
26. ดีแอล-แลคติกแอซิด (DL-lactic acid) ของบริษัท Fluka, Switzerland
27. นิโคตินาไมด์ อะดีนีน ไดนิวคลีโอไทด์ (Nicotinamide adenine dinucleotide) ของบริษัท Boehringer Mannheim, Germany
28. ไดโพแทสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Dipotassium hydrogen phosphate) ของบริษัท Merck, Germany
29. โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Potassium dihydrogen phosphate) ของบริษัท Merck, Germany
30. แอมโมเนียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (Ammonium dihydrogen phosphate) ของบริษัท May and Baker, England
31. แมกนีเซียมซัลเฟต (Magnesium sulphate) ของบริษัท May and Baker, England
32. เฟอร์รัสซัลเฟต (Ferrous sulphate) ของบริษัท May and Baker, England
33. แมงกานีสซัลเฟต (Manganese sulphate) ของบริษัท Merck, Germany

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับ เพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น

34. โพแทสเซียมคลอไรด์ (Potassium chloride) ของบริษัท Fluka Garantie, Germany
35. โซเดียมไฮดรอกไซด์ (Sodium hydroxide) ของบริษัท Merck, Germany
36. ไฮดรอกซิลามีนไฮโดรคลอไรด์ (Hydroxylamine hydrochloride) ของบริษัท Merck, Germany
37. แอลฟาแนฟทอล (α -naphthol) ของบริษัท Merck, Germany
38. ครีเอทีน (Creatine) ของบริษัท Sigma chemical Company, USA.
39. คอปเปอร์ซัลเฟต (Copper sulphate) ของบริษัท Merck, Germany
40. เฟอรัลซิเตรต (Ferric citrate) ของบริษัท Merck, Germany
41. คอปเปอร์ (II) คลอไรด์ไดไฮเดรต ของบริษัท Merck, Germany
42. เฟอรัล (II) คลอไรด์เตตระไฮเดรต ของบริษัท Merck, Germany

อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. เปปโทน (peptone) ของบริษัท Oxoid, England
2. ทริปโทน (tryptone) ของบริษัท Difco, USA.
3. ผงสกัดจากยีสต์ (yeast extract) ของบริษัท Oxoid, England
4. ผงสกัดจากเนื้อ (meat extract) ของบริษัท Merck, Germany
5. สกิมมิลค์ (skim milk) ของบริษัท Difco, USA.
6. แป้งแบบละลายน้ำได้ (soluble starch) ของบริษัท Merck, Germany
7. ดี-อะมิกดาลิน (D-amygdalin) ของบริษัท Sigma, USA.
8. แอล-อะราบินอส (L-arabinose) ของบริษัท Difco, USA.
9. ดี-เซลโลไบโอส (D-cellobiose) ของบริษัท Sigma, USA.
10. เอสคูลิน (Esculin) ของบริษัท Sigma, USA.
11. ดี-ฟรักโทส (D-fructose) ของบริษัท Fluka, Swizerland
12. ดี-กาแล็กโทส (D-galactose) ของบริษัท Fluka, Swizerland
13. ดี-กลูโคส (D-glucose) ของบริษัท Difco, USA.
14. กลูโคนเนต (Gluconate) ของบริษัท Sigma, USA.
15. กลีเซอรอล (Glycerol) ของบริษัท Sigma, USA.
16. อินนูลิน (Inulin) ของบริษัท Sigma, USA.
17. แล็กโทส (Lactose) ของบริษัท Difco, USA.
18. ดี-มอลโทส (D-Maltose) ของบริษัท Sigma, USA.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามนำผลัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

19. ดี-แมนนิทอล (D-mannitol) ของบริษัท Merck, Germany
20. ดี-แมนโนส (D-mannose) ของบริษัท Fluka, Switzerland
21. ดี-เมลลิไบโอส (D-melibiose) ของบริษัท Wako, Japan
22. ดี-เมลเลซิโทส (D-melezitose) ของบริษัท Fluka, Switzerland
23. แอลฟา-เมทิลดี-กลูโคไซด์ (α -Methyl-D-glucoside) ของบริษัท Sigma, USA.
24. ราฟฟิโนส (Raffinose) ของบริษัท Difco, USA.
25. แอล-แรมโนส (L-rhamnose) ของบริษัท Difco, USA.
26. ดี-ไรโบส (D-ribose) ของบริษัท Fluka, Switzerland
27. ซาลิซิน (Salicin) ของบริษัท Sigma, USA.
28. ดี-ซอร์บิทอล (D-sorbitol) ของบริษัท BDH, England
29. ซูโครส (Sucrose) ของบริษัท Merck, Germany
30. ดี-ทรีฮาโลส (D-Trehalose) ของบริษัท Cica Kanto, Japan
31. ดี-ไซโลส (D-xylose) ของบริษัท Sigma, USA.
32. ลิทมัส มิลค์ (litmus milk) ของบริษัท Difco, USA.

แหล่งของเชื้อจุลินทรีย์

1. แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากน้ำนมดิบ ซึ่งได้รับจากศูนย์เก็บนมดิบ ภาคกลาง ขององค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) อำเภอวมกเหล็ก จังหวัดสระบุรี ที่ทำการรวบรวมน้ำนมโคดิบจากเกษตรกรผู้เลี้ยงโคนมตาม จังหวัด สระบุรี จังหวัดนครราชสีมา จังหวัดลพบุรี จังหวัด เชียงใหม่ จังหวัด ลำพูน และจังหวัดราชบุรี
2. แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากนมพาสเจอร์ไรซ์ที่จำหน่ายตามห้างสรรพสินค้าใน เขตกรุงเทพมหานคร และอาหารหมักดองต่างๆ ที่มีจำหน่ายอยู่ตามตลาดสด เทศบาลเมืองจังหวัดพิษณุโลก ตลาดสดอำเภอเรณูนคร จังหวัดนครพนม ตลาด นัดสวนจตุจักร ตลาดสดเขตตลิ่งชัน กรุงเทพมหานครและได้รับความอนุเคราะห์ จาก รศ.ดร. สมบูรณ์ หนาสุภวัฒน์
3. แบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067^T, *Lactobacillus pentosus* NRIC 1069^T, *Enterococcus faecium* NRIC 1145^T, *Enterococcus faecalis* TISTR 379^T และ *Weissella confusa* NRIC 0207^T โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร. สมบูรณ์ หนาสุภวัฒน์

วิธีการทดลอง

3.1 การแยกและเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (Tanasupawat และ Daengsubha, 1983)

3.1.1 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

3.1.1.1 การแยกเชื้อจากนม

นำตัวอย่างนมนมดิบ หรือนมพาสเจอร์ไรซ์จากแหล่งต่าง ๆ มาปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่งในอาหารเหลว GYPB (ภาคผนวก ก 4) หรือ อาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก 6) ที่มีปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง จำนวน 3 ข้าง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน เพื่อให้เชื้อเจริญ เมื่อครบเวลานำสารละลายเชื้อของนมแต่ละตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร ทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นเข้มข้น 0.85 เปอร์เซ็นต์ที่ปราศจากเชื้อ จากนั้นคัดตัวอย่างเชื้อที่ระดับความเจือจางต่าง ๆ กัน คือ $1:10^6$, $1:10^8$ และ $1:10^{10}$ ความเจือจางละ 1 มิลลิลิตร ใส่งในงานเพาะเชื้อแล้วเทอาหารแข็ง GYPB-CaCO₃ (ภาคผนวก ก 5) หรือ อาหารแข็ง MRS-CaCO₃ (ภาคผนวก ก 7) ที่หลอมเหลวและมีอุณหภูมิไม่สูงกว่า 45 องศาเซลเซียส เขย่าให้เชื้อและอาหารเลี้ยงเชื้อกระจายทั่ว (pour plate technique) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน เมื่อแบคทีเรียเจริญเลือกเก็บโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งในและบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดโซนใสรอบๆโคโลนี นำโคโลนีทั้งหมดถ่ายลงในอาหารเหลว GYPB นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน ทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยการ streak ลงบนอาหารแข็ง GYPB (ภาคผนวก ก 5) หรือ อาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก 7) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

3.1.1.2 การแยกเชื้อจากอาหารหมักดอง

นำชิ้นส่วนของอาหารหมักดองใส่งในอาหารเหลว GYPB (ภาคผนวก ก 4) หรือ อาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก 6) ที่มีปริมาตร 4.5 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1 วัน จากนั้นนำสารละลายเชื้อมา streak บนอาหารแข็ง GYPB-CaCO₃ หรือ อาหารแข็ง MRS-CaCO₃ แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-3 วัน เลือกเก็บโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งในและบนพื้นผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เกิดโซนใสรอบโคโลนี ถ่ายลงในอาหารเหลว GYPB แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน และทำเชื้อให้บริสุทธิ์โดยทำการ streak เชื้อลงบนอาหารแข็ง GYPB (ภาคผนวก ก 5) หรือ อาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก 7) เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว

3.1.2 การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

นำโคโลนีเดี่ยวของเชื้อแบคทีเรียจากข้อ 3.1.1 มาเก็บรักษาด้วยวิธีการ stab เชื้อด้วยเข็ม เข็ม (needle) ในหลอดเก็บเชื้อที่มีอาหารแข็ง GYPB-CaCO₃ (glucose 0.5 เปอร์เซ็นต์) แล้วนำไป เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และ เก็บรักษาในอาหารสคิม มิลค์ (skim milk) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/ปริมาตร) ที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง (-20 องศาเซลเซียส) หรือ เก็บรักษาโดย วิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็ง (lyophilization)

3.2 การจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

นำแบคทีเรียที่เก็บไว้จากข้อ 3.1.2 ทั้งหมด ถ่วงลงในอาหารเหลว MRS (ภาคผนวก ก 6) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน แล้วทำการตรวจสอบลักษณะรูปร่าง การจัดเรียงตัวของเซลล์ ลักษณะโคโลนี การคิดสีแกรม การสร้างเอนไซม์คาตาเลส การสร้างแก๊สจาก กลูโคส การย่อยสลายอาร์จินีน การรีดิวซ์ไนเตรต และการเจริญในอาหารเหลว MRS ที่พีเอช 9.6 อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจัดกลุ่มแบคทีเรียกรด แลคติกขั้นต้นในระดับสกุล (genus) โดยยึดหลักเกณฑ์ตามข้อมูลของ Axelsson (1998) (ตารางที่ 2.1) (ส่วนรายละเอียดของวิธีการทดสอบแสดงอยู่ในหัวข้อ 3.4)

3.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตไดอะซีติล

3.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินบนอาหารแข็ง (Phalip และคณะ, 1994)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่เก็บไว้ทั้งหมดจากข้อ 3.1.2 มาเลี้ยงบนอาหารแข็ง GYPB หรือ อาหารแข็ง MRS นาน 1-2 วัน จากนั้นใช้เข็มเข็มเชื้อ (needle) และโคโลนีเดี่ยว มาทำ point inoculation ลงบนอาหารแข็ง MMRS (ภาคผนวก ก 10) ที่ไม่ได้ใส่ beef extract จำนวน 1 จุด ตรง กลางจานเพาะเชื้อจำนวน 3 จ้า แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาทำการทดสอบการสร้างไดอะซีติล/อะซีโทอินของเชื้อ โดยทดสอบ (DAD overlay) (วิธีเตรียมตามภาคผนวก ข 2) ที่มีอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส ในปริมาตร 18 มิลลิลิตร ลง บนผิวอาหารแข็ง MMRS ทับโคโลนีของเชื้อ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เพื่อดูการเกิด

ปฏิกิริยาระหว่างสารไดอะซีติล/อะซีโทอินที่เชื้อแบคทีเรียผลิตกับสารทดสอบ ทั้งไว้นาน 60 นาที บันทึกผลโดยการวัดความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางของโซนสีแดงเป็นเซนติเมตร

3.3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินในอาหารเหลว (ดัดแปลงจาก Phalip และคณะ, 1994; Mattessich และ Cooper, 1989)

นำแบคทีเรียกรดแลคติก จากข้อ 3.3.1 ที่สามารถผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินได้ มาเลี้ยงในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำสารละลายเชื้อด้วยน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ แล้วทำการปรับความขุ่นของเชื้อให้มีค่า Optical Density (O.D) เท่ากับ 0.5 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-160; Shimadzu, Kyoto, Japan) ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร (Boumerdassi และคณะ, 1997) ทำการถ่ายเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลว MMRS (ภาคผนวก ก 9) ปริมาตร 15 มิลลิลิตรที่บรรจุอยู่ในหลอดทดลองขนาดใหญ่ แล้วทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเซลล์แบคทีเรียออกจากน้ำหมักโดยทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใส (supernatant) ที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณไดอะซีติล/อะซีโทอินด้วยวิธีวัดการเกิดสี (colorimetric method) โดยดูดส่วนใสมา 1 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลอง และเติมสารละลายครีเอทีน (creatine) 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร และ สารละลายแอลฟาแนฟทอล (α -naphthol) 7.5 เปอร์เซ็นต์ที่ละลายอยู่ใน 2.5 N NaOH 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 7 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วและทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยาสีแดงเป็นเวลานาน 9 นาที (ภาคผนวก ข 8) จากนั้น นำสารผสมที่เกิดสีไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร (Mattessich และ Cooper, 1989) (ภาคผนวก ข 8) และนำค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน (ภาคผนวก ข 9)

3.3.3 การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตไดอะซีติลในอาหารเหลว

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินได้สูงจากข้อ 3.3.2 ที่มีรูปร่างกลม (cocci) และ รูปร่างแท่ง (rods) จำนวน 12 ไอโซเลต (isolate) มาเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการปรับความขุ่นของเชื้อให้มีค่า Optical Density (O.D) เท่ากับ 0.5 ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร แล้วทำการถ่ายเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ลงในอาหารเหลว MMRS ที่มีปริมาตร 250 มิลลิลิตร ในพลาสติกขนาด 500 มิลลิลิตร บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 48 ชั่วโมง ในสภาวะไม่เขย่า และสภาวะเขย่า (ทำ 3 ซ้ำ) จากนั้นทำการวิเคราะห์หาปริมาณไดอะซีติลและ

อะซีโทอิน ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟีโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Thornhill และ Cogan(1984) (ภาคผนวก ข 10)

3.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.4.1 การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ (phenotype) ของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตไดอะซีติลได้สูงที่คัดเลือกจากข้อ 3.3.2 มาถ่ายลงในอาหารเหลว MRS บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน แล้วทำการพิสูจน์เอกลักษณ์ของเชื้อโดยอาศัยการศึกษาลักษณะต่าง ๆ ดังนี้ (Kandler และ Weiss, 1986; Albert และคณะ, 1992; Balows และคณะ, 1992)

3.4.1.1 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารแข็ง (Tanasupawat และ Daengsubha, 1983)

นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตไดอะซีติลได้สูงจากข้อ 3.3.3 มาถ่ายลงในอาหารเหลว MRS และบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 1-2 วัน แล้วทำการตรวจสอบและบันทึกลักษณะรูปร่าง ขนาด และการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การย้อมติดสีแกรม (ตามภาคผนวก ข 1) และลักษณะการเจริญของโคโลนีบนอาหารแข็ง

3.4.1.2 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Tanasupawat และ Daengsubha, 1983)

3.4.1.2.1 ทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส

ทำการ streak เชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS (ภาคผนวก ก 7) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน แล้วทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลสด้วยการหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ข 3) ลงบนโคโลนีของเชื้อ ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นแสดงว่าเชื้อสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้

3.4.1.2.2 ทดสอบการสร้างแก๊สจากกลูโคส

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MRS (ไม่มีซิเทรต) ที่ใส่หลอดดักแก๊ส (durham tube) บรรจุลงไปในหลอดทดลอง แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3 วัน ถ้ามีฟองแก๊สเกิดขึ้นภายในหลอดดักแก๊สให้บันทึกผลบวก แสดงว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกพวกเฮเทอโรเฟอร์เมนเตที่ฟ แต่ถ้าไม่มีฟองแก๊สเกิดขึ้นบันทึกผลลบ แสดงว่าเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกพวกโฮโมเฟอร์เมนเตที่ฟ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4.1.2.3 การรีดิวซ์ไนเตรต

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวไนเตรต (nitrate) (ภาคผนวก ก 8) แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 7 วัน คูดสารละลายเชื้อปริมาตร 1 มิลลิตรใส่หลอดทดลอง แล้วหยดสารละลาย Nitrate test solution (ภาคผนวก ข 4) โดยหยดสารละลาย A จำนวน 3 หยด และ สารละลาย B จำนวน 2 หยด เขย่าให้เข้ากันแล้วสังเกตผล ถ้ามีการรีดิวซ์ไนเตรตสารละลายจะเป็นสีแดง แสดงว่าไนเตรตถูกรีดิวซ์เป็นไนไตรต์ แต่ถ้าไม่เกิดผลดังกล่าวทดสอบยืนยันโดยใส่ผงสังกะสีผลการทดสอบจึงเป็นลบแท้จริง แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงผลการทดสอบการรีดิวซ์ไนเตรตนั้นเป็นจริง

3.4.1.2.4 การสลายอาร์จินีน

เลี้ยงเชื้อในอาหารอาร์จินีน (arginine) (ภาคผนวก ก 2) แล้วเททับด้วยพาราฟินเหลวที่ปราศจากเชื้อแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ถ้าสีของอาหารเปลี่ยนจากสีเหลืองส้มเป็นสีแดงแสดงว่าเกิดแอมโมเนียขึ้น ผลการทดสอบเป็นบวก

3.4.1.2.5 การย่อยสลายเอสคูลิน

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวเอสคูลิน (aesculin) (ภาคผนวก ก 1) แล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 7 วัน ตรวจสอบโดยการสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเป็นสีเขียวปนดำ และเกิดผลึกคล้ายปะการังขึ้น เนื่องจากการสลายเอสคูลินเป็นเอสคูเลติน (aesculetin) ได้ แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวก

3.4.1.2.6 การย่อยเคซีน

ลากเชื้อลงบนอาหารแข็งเคซีน (casein) (ภาคผนวก ก11) บ่มที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบดูโซนไฮรอปๆโคโลนีของแบคทีเรีย ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียสามารถสร้างเอนไซม์ย่อยเคซีน (caseinase) ได้

3.4.1.2.7 การย่อยแป้ง

ลากเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS ที่ใส่ แป้ง (starch) แทนกลูโคส (ภาคผนวก ก12) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ตรวจสอบการย่อยแป้ง โดยราดสารละลายไอโอดีน (Iodine) ให้ทั่วงานเพาะเชื้อ ถ้าเกิดโซนไฮรอปๆโคโลนีของแบคทีเรียแสดงว่าแบคทีเรียสร้างเอนไซม์ย่อยแป้งได้

3.4.1.2.8 การเจริญใน litmus milk

เลี้ยงเชื้อในอาหาร litmus milk (Difco) เข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ (กรัม/ปริมาตร) บ่มไว้ที่ 30 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลภายหลังจากการบ่มเชื้อไว้นาน 7, 14, และ 21 วัน ถ้าสีของอาหารเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีขาวแสดงว่าเกิด reduction ถ้าสีเปลี่ยนเป็นสีชมพู แสดงว่าเชื้อสามารถสร้างกรด(acid) ถ้าเกิดการตกตะกอนและจับเป็นก้อนของโปรตีน เนื่องจากกรดแสดงว่าเกิด coagulation และถ้าเชื้อสลายโปรตีนได้อาหารจะใส แสดงว่าเกิด liquefaction

3.4.1.2.9 การทดสอบการสังเคราะห์กรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต

เลี้ยงเชื้อในอาหารคาร์โบไฮเดรต (ภาคผนวก ก 3) 3 มิลลิลิตร ได้แก่ น้ำตาล D-amygdalin L-arabinose D-cellobiose esculin D-fructose D-galactose D-glucose gluconate glycerol inulin lactose D-maltose D-mannitol D-mannose D-melibiose D-melezitose α -methyl-D-glucoside raffinose L-rhamnose D-ribose salicin D-sorbitol sucrose D-trehalose) และ D-xylose) หลังจากเพาะเชื้อแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ตรวจสอบผลการสังเคราะห์โดยหยด Mixed indicator ลงไป ถ้ามีสีแดงเกิดขึ้น แสดงว่า มีการสังเคราะห์กรดจากการหมักคาร์โบไฮเดรต แล้วนำมาไทเทรตด้วย 0.1N NaOH เพื่อดูปริมาณการสังเคราะห์

3.4.1.2.10 การทดสอบการเจริญที่ พีเอช อุณหภูมิ และความเข้มข้นของเกลือ

ตรวจสอบการเจริญของเชื้อในอาหารเหลว MRS ที่ปรับพีเอชเป็น 4.0, 4.5, 8.0, 8.5 และ 9.6 อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส และ การเจริญที่ความเข้มข้นของเกลือ 4.0, 6.5, 8.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ โดยบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 วัน ตรวจสอบผลการเจริญจากความขุ่นของเชื้อ

3.4.2 การวิเคราะห์แผ่นิงเซลล์ (Komagata และ Suzuki, 1987)

นำเชื้อที่เลี้ยงในอาหารเหลว GYPB ที่หมუნเหวี่ยง 6,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้เซลล์ตกตะกอนแล้วนำเซลล์ที่ได้ไปทำการย่อย (hydrolyse) ด้วย 6N HCl 1 มิลลิลิตร โดยนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำให้เย็นแล้วนำไปหยดบน TLC Plate No. 5577 และ Developed ด้วย pyridine : methanol : water : 6N HCl (10:80:26:4) ปริมาตร/ปริมาตร แล้วนำไปสเปรย์ด้วย 0.2 เปอร์เซ็นต์ ของสารละลายนินไฮดริน (ninhydrin solution)

3.4.3 การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติก (Okada และคณะ, 1978)

ศึกษาไอโซเมอร์ (isomer) ของกรดแลคติกที่เชื่อผลิดว่าเป็น D-form หรือ L-form โดยนำกรดที่สกัดได้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ D หรือ L-lactate dehydrogenase (LDH) โดยมี NAD เป็นโคเอนไซม์ (coenzyme) ซึ่งจะถูกรีดิวซ์เป็น NADH และสามารถตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (ภาคผนวก ข 6)

3.4.4 การศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology)

ของแบคทีเรียกรดแลคติก

3.4.4.1 การแยกและทำให้ดีเอ็นเอบริสุทธิ์ (Marmur, 1961; Tamaoka, 1994)

เลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว GYPB บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส 18-24 ชั่วโมง เก็บเซลล์โดยการปั่น แล้วทำให้เซลล์แตกด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) กำจัดโปรตีนด้วยฟีนอล-

คลอโรฟอร์ม และตกตะกอนด้วย 95 เปอร์เซ็นต์เอทานอลแล้วทำให้บริสุทธิ์โดยการใช้เอนไซม์ RNase A (Sigma)

3.4.4.2 ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน (DNA-DNA hybridization)

(Ezaki และคณะ, 1989; Tanasupawat และคณะ, 2000)

ทำการตรึงดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่คัดเลือกในปริมาณที่เท่ากันลงในหลุมของไมโครเพลตทำการไฮบริไดซ์ด้วยโพรบดีเอ็นเอซึ่งเตรียมมาจากดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน (type strain) ทั้งรูปร่างแท่งและรูปร่างกลมโดยติดฉลากด้วยโฟโตไบโอติน (photobiotin) และตรวจหาโฟโตไบโอติน โดยการทำให้เกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับสเตรปตาไวดิน (streptavidin) ที่เชื่อมอยู่กับเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส (peroxidase) แล้วจึงทดสอบหาปฏิกิริยาของเอนไซม์โดยเติมสารตั้งต้นเททราเมทิลเบนซิไดน (3,3', 5,5' tetramethylbenzidine) ที่ทำให้เกิดสี ตรวจสอบด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต (colorimetric microplate reader, Biorad รุ่น 3550) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณโดยเปรียบเทียบกับค่าจากโพรบดีเอ็นเอของสายพันธุ์มาตรฐานเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ (ดำเนินการตามภาคผนวก ข 7)

$$\text{Homology (\%)} = \frac{V_{\text{sample}} - V_{\text{reference}}}{V_{\text{probe}} - V_{\text{reference}}} \times 100 ; V = \text{value}$$

3.5 การศึกษาการเจริญ การสร้างกรด การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติก

นำแบคทีเรียกรดแลคติก จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่คัดเลือกจากข้อ 3.4 มาเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2 วัน ปรับความขุ่นของเชื้อให้เท่ากัน ตามวิธีการดังข้อ 3.3.2 จากนั้นถ่ายเชื้อแต่ละชนิด ปริมาณ 4 มิลลิลิตร ลงในพลาสติกที่มีอาหารเหลว MMRS ปริมาตร 400 มิลลิลิตรที่บรรจุในพลาสติกขนาด 1,000 มิลลิลิตร ทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในสภาวะเขย่าที่ความเร็วรอบ 200 รอบต่อนาที เปรียบเทียบกับสภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเชื้อครั้งละ 6 มิลลิลิตร ในทุกๆ 6 ชั่วโมง เป็นเวลา 3-5 วัน โดยแบ่งน้ำหมักจำนวน 2 มิลลิลิตร มาวัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 575 นาโนเมตร โดยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์และวัดค่าพีเอชโดยเครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ส่วนที่เหลือนำมาทำการแยกเซลล์ออกโดยการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที แล้วนำส่วนใสที่ได้ไปทำการวิเคราะห์หาปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอินด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี (ภาคผนวก ข 10) นำข้อมูลที่ได้มาสร้างกราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อ ความขุ่นของเชื้อ ปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอินที่เชื้อสร้างขึ้นต่อเวลา (ชั่วโมง)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ผลการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

ผลการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก จากนมพาสเจอร์ไรซ์ จำนวน 5 ตัวอย่าง พบว่าได้เชื้อ 49 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม 44 ไอโซเลต รูปร่างแท่ง 5 ไอโซเลต นมดิบจำนวน 6 ตัวอย่าง ได้เชื้อ 40 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม 26 ไอโซเลต รูปร่างแท่ง 14 ไอโซเลต อาหารหมักคองจำนวน 21 ตัวอย่าง ได้เชื้อ 40 ไอโซเลต เป็นแบคทีเรียรูปร่างกลม 10 ไอโซเลต รูปร่างแท่ง 30 ไอโซเลต และได้รับความอนุเคราะห์เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกจากชีอิ้ว 4 ตัวอย่าง จาก รศ.ดร. สมบูรณ์ ธนาสุภวัฒน์ จำนวน 8 ไอโซเลต รวมทั้งหมด 137 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.1

4.2 ผลการจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก

จากการนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้งหมดมาทำการศึกษาลักษณะเบื้องต้นทางด้าน สัณฐานวิทยา และชีวเคมีบางประการ ได้แก่ ลักษณะรูปร่างเซลล์ การติดสีแกรม การสร้างเอนไซม์ คาทาเลส การสร้างแก๊สจากกลูโคส การรีดิวซ์ไนเตรต การย่อยสลายอาร์จีนิน และการเจริญในอาหาร MRS ที่มีพีเอช 9.6 เกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และการเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อทุกสายพันธุ์มีลักษณะโคโลนีกลมมน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ โค้งนูนบนอาหาร แข็ง MRS ติดสีแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คาทาเลส และไม่รีดิวซ์ไนเตรต เชื้อที่แยกจากนมพาสเจอร์ไรซ์ และนมดิบส่วนใหญ่จะมีรูปร่างกลม (cocci) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อที่แยกจากอาหารหมักคองส่วนใหญ่จะเป็นเชื้อพวกรูปร่างแท่ง (rods) ส่วนคุณสมบัติอื่นๆของเชื้อในแต่ละสายพันธุ์ เช่น การสร้างแก๊สจากกลูโคส การย่อยสลายอาร์จีนิน การเจริญที่พีเอช 9.6 เกลือโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส นั้นมีความแตกต่างกัน ดังตารางที่ 4.2

นอกจากนี้ยังสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยรูปร่างของเซลล์ และการสร้างแก๊สจากกลูโคสได้จำนวน 4 กลุ่ม คือ แบคทีเรียกรดแลคติกรูปร่างแท่งไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 52 ไอโซเลต รูปร่างแท่งสร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 5 ไอโซเลต รูปร่างกลมไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 77 ไอโซเลต และรูปร่างกลมสร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 3 ไอโซเลต ดังแสดงในตารางที่ 4.3

ตารางที่ 4.1 ชนิดตัวอย่าง แหล่งที่มา วันเดือนปีที่แยกเชื้อ รหัสเชื้อ และจำนวนไอโซเลต

วันที่แยกเชื้อ	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัส	จำนวนไอโซเลต
19/7/42	นมพาสเจอร์ไรซ์ (ดัชมิลล์)	บริษัท ดัชมิลล์ จำกัด อำเภอนครไชยศรี จังหวัดนครปฐม	PM1-1, PM1-2, PM1-3 PM1-4, PM1-5, PM1-6 PM1-7, PM1-8, PM1-11 PM1-12	10
19/7/42	นมพาสเจอร์ไรซ์ (ออร์คิด)	บริษัท อุดสาหกรรม นมไทย จำกัด อำเภอเมือง จังหวัดสมุทรปราการ	PM2-1, PM2-2, PM2-3	3
19/7/42	นมพาสเจอร์ไรซ์ (โฟร์โมสต์)	บริษัท โฟร์โมสต์อาหาร นม (กรุงเทพ) หลักสี่ กรุงเทพมหานคร	PM3-1, PM3-2, PM3-4 PM3-5, PM3-10, PM3-11 PM3-12, PM3-13, PM3-14 PM3-15, PM3-16, PM3-17 PM3-18, PM3-22	14
19/7/42	นมพาสเจอร์ไรซ์ (ซีพี-เมจิ)	บริษัท ซีพี-เมจิ จำกัด อำเภอหนองแค จังหวัดสระบุรี	PM4-1, PM4-3, PM4-4 PM4-5, PM4-6, PM4-7 PM4-8, PM4-9, PM4-10 PM4-11, PM4-12, PM4-13, PM4-15, PM4-16	14
6/8/42	นมพาสเจอร์ไรซ์ (โชคชัย)	บริษัท นมโชคชัย จำกัด อำเภอปากช่อง จังหวัดนครราชสีมา	PM5-1, PM5-2, PM5-3, PM5-4, PM5-5, PM5-6, PM5-7, PM5-8	8
11/8/42	นมดิบ	อำเภอมวกเหล็ก จังหวัดสระบุรี	RM1-12, RM1-13, RM1-17 RM1-22, RM1-23, RM1-24, RM1-25, RM1-26, RM1-27	9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

วันที่แยก เชื้อ	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัส	จำนวน ไอโซเลต
24/8/42	นมดิบ	บ้านสวนมะเดื่อ จังหวัด ลพบุรี, อำเภอปากช่อง, อำเภอสี่คิ้วจังหวัด นครราชสีมา และอำเภอ พัฒนานิคม จังหวัดลพบุรี	RM5-1, RM5-2, RM5-6, RM6-6	4
27/8/42	นมดิบ	อำเภอพัฒนานิคม จังหวัด ลพบุรี และบ้านซับ กระดาน จังหวัดสระบุรี	RM3-3, RM7-3, RM7-5, RM7-10, RM8-2, RM8-3, RM8-4, RM8-5, RM8-7	9
27/8/42	นมดิบ	อำเภอไชยปราการ จังหวัดเชียงใหม่	RM4-3, RM9-5, RM9-8, RM10-4, RM10-5, RM10-6	6
27/8/42	นมดิบ	จังหวัดลำพูน	RM11-3, RM12-6	2
17/10/43	นมดิบ	จังหวัดราชบุรี	RM13-1, RM13-2, RM13-3, RM13-4, RM13-5, RM13-6, RM13-7, RM13-8, RM13-10 RM13-11	10
15/9/43	มะม่วงคอง	ตลาดสดเทศบาลเมือง พิษณุโลก	AP1-1, AP1-3	2
	หนุ่ย		AP2-1, AP2-2	2
	กุนเชียง		AP4-1, AP4-2, AP4-3	3
	ผักกาดคอง		AP5-1	1
	ฝรั่งคอง		AP8-2	1
	พุทราคอง		AP12-1, AP12-2	2
	ปูดอง		AP13-1	1
	ปลาเจ้า		AP15-2, AP15-3	2
	แหนม		AP16-1, AP16-2	2

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.1 (ต่อ)

วันที่แยก เชื้อ	ชนิดตัวอย่าง	แหล่งที่มา	รหัส	จำนวน ไอโซเลต
15/9/43	ปลาร้า	ตลาดสดเทศบาลเมือง พิษณุโลก	AP17-1, AP17-2, AP17-3	3
	ผักเสี้ยนคอง		AP19-1, AP19-2, AP19-3	3
	ผักกึ๋กาคอง		AP20-1, AP20-2, AP20-4	3
30/10/43	แป้งหมักขนมจีน	ตลาดสดอำเภอเรณูนคร จังหวัดนครพนม	AP22-1	1
	อุ		AP23-1, AP23-2	2
	ส้มดั้น		AP24-1, AP24-2, AP24-3	3
	ข้าวหมาก	ตลาดสดเขต คลิ่งชัน กรุงเทพ ฯ	AP27-2, AP27-3, AP27-4	3
30/10/43	ใบเมี่ยง(เปรี้ยว)	ตลาดนัดสวนจตุจักร	AP35-3	1
	ใบเมี่ยง(หวาน)		AP36-2	1
	แหนมหนูหมู		AP37-1, AP37-2, AP37-4	3
	ถั่วเน่า		AP38-2	1
16/7/42	ชีอิ้ว	ได้รับความอนุเคราะห์ จาก รศ.ดร. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์	SR4-1, SR4-2	2
1/7/42			SR8-1, SR8-2	2
			SR62-1, SR62-2	2
			SR133-1, SR133-2	2
รวมทั้งหมด				137

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมีบางประการของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้

รหัส	การติดสีแกรม	รูปร่าง	การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	การสร้างแก๊สจากกลูโคส	การรีดิวซ์ไนเทรต	การย่อยสลายอาร์จีนีน	การเจริญ		
							ที่ 9.6	เกลือ 6.5 %	อุณหภูมิ 45 °C
PM1-1	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM1-2	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM1-3	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM1-4	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM1-5	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM1-6	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM1-7	+	กลม	-	-	-	+	+	-	
PM1-8	+	แท่ง	-	-	-	+	+	-	
PM1-11	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM1-12	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM2-1	+	แท่ง	-	-	-	+	+	+	
PM2-2	+	แท่ง	-	-	-	+	+	+	
PM2-3	+	แท่ง	-	-	-	+	+	+	
PM3-1	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-2	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-4	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-5	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-10	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-11	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-12	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-13	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-14	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-15	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-16	+	กลม	-	-	-	+	+	+	

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัส	การติดเชื้อแกรม	รูปร่าง	การสร้างเอนไซม์ คาตาเลส	การสร้างแก๊สจาก กลูโคส	การรีดิวซ์ไนเตรต	การย่อยสลาย อาร์จินีน	การเจริญ		
							พีเอช 9.6	เกลือ 6.5 %	อุณหภูมิ 45 °C
PM3-17	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-18	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM3-22	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-1	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-3	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-4	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-5	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-6	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-7	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-8	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-9	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-10	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-11	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-12	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-13	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-15	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM4-16	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM5-1	+	กลม	-	-	-	+	+	-	
PM5-2	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM5-3	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM5-4	+	แท่ง	-	-	-	+	+	+	
PM5-5	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM5-6	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
PM5-7	+	กลม	-	-	-	+	+	+	

ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัส	การติดเชื้อแกรม	รูปร่าง	การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	การสร้างแก๊สจากกลูโคส	การดิวิชั่นในหลอด	การย่อยสลายอาร์จีนีน	การเจริญ		
							ที่ 9.6	เกลือ 6.5%	อุณหภูมิ 45 °C
PM5-8	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM1-12	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM1-13	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM1-17	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM1-22	+	แท่ง	-	-	-	+	+	-	
RM1-23	+	แท่ง	-	-	-	+	+	-	
RM1-24	+	แท่ง	-	-	-	+	-	-	
RM1-25	+	แท่ง	-	-	-	+	+	-	
RM1-26	+	แท่ง	-	+	-	-	-	-	
RM1-27	+	กลม	-	-	-	+	+	-	
RM3-3	+	กลม	-	-	-	+	+	-	
RM4-3	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM5-1	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM5-2	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM5-6	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM6-6	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM7-3	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM7-5	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM7-10	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM8-2	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM8-3	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM8-4	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM8-5	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM8-7	+	กลม	-	-	-	+	+	+	

ไม่ทำการตีใจาทั้งสิน อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัส	การติดตั้งเกม	รูปร่าง	การตั้งเอนไซม์คาตาเลส	การตั้งเอนกแกดจากกนูโคส	การรีดิวซ์ไนเตรต	การย่อยสลายอาร์จีนีน	การเจริญ		
							ที่ 9.6	เกลือ 6.5 %	อุณหภูมิ 45 °C
RM9-5	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM9-8	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM10-4	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM10-5	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM10-6	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM11-3	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
RM12-6	+	กลม	-	-	-	+	-	-	
RM13-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	
RM13-2	+	แท่ง	-	-	-	-	-	-	
RM13-3	+	แท่ง	-	-	-	+	-	-	
RM13-4	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	
RM13-5	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	
RM13-6	+	กลม	-	-	-	+	-	-	
RM13-7	+	แท่ง	-	+	-	+	-	+	
RM13-8	+	แท่ง	-	-	-	+	-	-	
RM13-10	+	แท่ง	-	-	-	+	-	-	
RM13-11	+	แท่ง	-	-	-	+	-	-	
AP1-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	-	
AP1-3	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	
AP2-1	+	กลม	-	+	-	+	-	-	
AP2-2	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	
AP4-1	+	กลม	-	-	-	+	-	+	
AP4-2	+	กลม	-	-	-	+	+	+	
AP4-3	+	กลม	-	-	-	+	+	+	

หมายเหตุ: + หมายถึงการเจริญ, - หมายถึงไม่มีการเจริญ

ถ้าการเจริญเกิดขึ้นที่อุณหภูมิ 45 °C แสดงว่าเชื้อสามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัส	การติดเชื้อ	รูปร่าง	การสร้างเอนไซม์ คาตาเลส	การสร้างแก๊สจาก กลูโคส	การรีดิวซ์ไนเตรต	การย่อยสลาย อาร์จินีน	การเจริญ		
							ที่ 9.6	เกลือ 6.5 %	อุณหภูมิ 45 °C
AP5-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP8-2	+	กลม	-	+	-	+	-	+	-
AP12-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP12-2	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP13-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP15-2	+	แท่ง	-	-	-	-	-	-	-
AP15-3	+	แท่ง	-	-	-	-	-	-	-
AP16-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP16-2	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP17-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP17-2	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP17-3	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP19-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP19-2	+	แท่ง	-	-	-	-	-	-	-
AP19-3	+	แท่ง	-	-	-	+	+	+	-
AP20-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP20-2	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP20-4	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP22-1	+	แท่ง	-	+	-	+	-	+	+
AP23-1	+	กลม	-	-	-	+	-	+	+
AP23-2	+	กลม	-	-	-	+	-	+	+
AP24-1	+	แท่ง	-	+	-	-	-	+	-
AP24-2	+	กลม	-	-	-	+	-	+	+

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.2 (ต่อ)

รหัส	การติดตั้งแก็ม	รูปร่าง	การสร้างอนิเมชัน คาตาเลส	การสร้างแกดเจท กนูโคส	การรีวิวนิเวต	การชอยสกาย อาร์จิน	การเจริญ		
							พีเอช 9.6	เกลือ 6.5%	อุณหภูมิ 45 °C
AP24-3	+	กลม	-	+	-	+	-	+	-
AP27-2	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
AP27-3	+	แท่ง	-	-	-	-	-	+	-
AP27-4	+	แท่ง	-	-	-	-	-	+	-
AP35-3	+	แท่ง	-	-	-	-	-	-	-
AP36-2	+	แท่ง	-	-	-	-	-	+	+
AP37-1	+	แท่ง	-	-	-	-	-	+	+
AP37-2	+	กลม	-	-	-	+	-	+	-
AP37-4	+	แท่ง	-	-	-	-	-	+	-
AP38-2	+	แท่ง	-	+	-	-	-	-	-
SR4-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
SR4-2	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
SR8-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
SR8-2	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
SR62-1	+	แท่ง	-	-	-	-	-	-	-
SR62-2	+	แท่ง	-	-	-	-	-	+	-
SR133-1	+	แท่ง	-	-	-	-	+	+	-
SR133-2	+	แท่ง	-	-	-	-	-	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.3 จำนวนกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่ใช้ในการศึกษาแบ่งตามลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยาและชีวเคมี

กลุ่มแบคทีเรีย	จำนวนไอโซเลต	รหัส
รูปร่างแท่งไม่สร้างแก๊ส จากกลูโคส	52	PM1-8, PM2-1, PM2-2, PM2-3, PM5-4, RM1-22, RM1-23, RM1-24, RM1-25, RM13-1, RM13-2, RM13-3, RM13-4, RM13-5, RM13-8, RM13-10, RM13-11, AP1-1, AP1-3, AP2-2, AP5-1, AP12-1, AP12-2, AP13-1, AP15-2, AP15-3, AP16-1, AP16-2, AP17-1, AP17-2, AP17-3, AP19-1, AP19-2, AP19-3, AP20-1, AP20-2, AP20-4, AP27-2, AP27-3, AP27-4, AP35-3, AP36-2, AP37-1, AP37-4, SR4-1, SR4-2, SR8-1, SR8-2, SR62-1, SR62-1, SR133-1, SR133-2
รูปร่างแท่งสร้างแก๊ส จากกลูโคส	5	RM1-26, RM13-7, AP22-1, AP24-1, AP38-2
รูปร่างกลมไม่สร้างแก๊ส จากกลูโคส	77	PM1-1, PM1-2, PM1-3, PM1-4, PM1-5, PM1-6, PM1-7, PM1-11, PM1-12, PM3-1, PM3-2, PM3-4, PM3-5, PM3-10, PM3-11, PM3-12, PM3-13, PM3-14, PM3-15, PM3-16, PM3-17, PM3-18, PM3-22, PM4-1, PM4-3, PM4-4, PM4-5, PM4-6, PM4-7, PM4-8, PM4-9, PM4-10, PM4-11, PM4-12, PM4-13, PM4-15, PM4-16, PM5-1, PM5-2, PM5-3, PM5-5, PM5-6, PM5-7, PM5-8, RM1-12, RM1-13, RM1-17, RM1-27, RM3-3, RM4-3, RM5-1, RM5-2, RM5-6, RM6-6, RM7-3, RM7-5, RM7-10, RM8-2, RM8-3, RM8-4, RM8-5, RM8-7, RM9-5, RM9-8, RM10-4, RM10-5, RM10-6, RM11-3, RM12-6, RM13-6, AP4-1, AP4-2, AP4-3, AP23-1, AP23-2, AP24-2, AP37-2
รูปร่างกลมสร้างแก๊ส จากกลูโคส	3	AP2-1, AP8-2, AP24-3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติล

4.3.1 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอินบนอาหารแข็ง

จากการตรวจสอบความสามารถในการผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอินบนอาหารแข็ง MMRS ของแบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้ทั้งหมด จำนวน 137 ไอโซเลต ที่แบ่งกลุ่มตามลักษณะฟีโนไทป์ ดังตารางที่ 4.3 พบว่า มีแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอิน ได้ทั้งหมด จำนวน 115 ไอโซเลต โดยเป็นเชื้อรูปร่างกลม จำนวน 74 ไอโซเลต ซึ่งมีค่าความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางกลางโซนสีแดง ที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างสารโคอะซีติล/อะซีโทอินที่เชื้อผลิตขึ้นรอบๆโคโลนีกับ สารทดสอบ อยู่ระหว่าง 0.88-4.63 เซนติเมตร ส่วนเชื้อรูปร่างแท่ง จำนวน 41 ไอโซเลต มีค่าความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางโซนสีแดง อยู่ระหว่าง 0.98 - 4.88 เซนติเมตร เชื้อรูปร่างกลมที่สามารถสร้าง โซนสีแดงบนอาหารแข็ง MMRS ได้กว้าง ได้แก่ เชื้อ PM3-13, PM3-12, PM4-9 และ PM3-14 ซึ่ง สามารถสร้างโซนสีแดง ที่มีความยาวเส้นผ่าศูนย์กลาง เท่ากับ 4.63, 3.97, 3.58 และ 3.57 เซนติเมตร ตามลำดับ ส่วนเชื้อรูปร่างแท่งที่สามารถสร้างโซนสีแดงที่มีความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางได้กว้าง ได้แก่ เชื้อ SR8-1, AP17-1, AP17-2 และ AP20-4 ซึ่งสามารถสร้างโซนสีแดงที่มีความยาว เส้นผ่าศูนย์กลางเท่ากับ 4.88, 4.85, 4.35 และ 3.55 เซนติเมตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

4.3.2 ผลการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอินบนอาหารเหลว

ผลการตรวจสอบการสร้างโคอะซีติล/อะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกคัดเลือก จำนวน 115 ไอโซเลตที่ได้จากข้อ 3.3.1 ในอาหารเหลว MMRS พบว่า เชื้อรูปร่างกลมสามารถผลิต โคอะซีติล/อะซีโทอิน ที่มีความเข้มข้นอยู่ระหว่าง 3.39-443.35 มิลลิกรัม/ลิตร ส่วนเชื้อรูปร่างแท่ง สามารถผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอินที่มีความเข้มข้นอยู่ในระหว่าง 1.03-565.58 มิลลิกรัม/ลิตร เชื้อรูปร่างกลมที่สามารถผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอิน ได้สูงในอาหารเหลว ได้แก่ เชื้อ PM3-13, PM3-12, PM4-9, PM3-14, AP2-1, AP8-2 และ AP24-3 ซึ่งสามารถผลิตได้ปริมาณ 443.35, 389.18, 388.91, 385.98, 383.74, 361.30 และ 228.38 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เชื้อรูปร่างแท่งสามารถ ผลิตได้สูงได้แก่ เชื้อ SR8-1, AP38-2, AP17-1, SR4-2 และ AP20-4 ซึ่งสามารถผลิตได้เท่ากับ 565.58, 315.62, 211.80, 151.19 และ 70.52 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกบนอาหารแข็ง และอาหารเหลว MMRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

กลุ่มแบคทีเรีย	รหัส	ปริมาณโคอะซีติล/อะซีโทอิน	
		อาหารแข็ง MMRS	อาหารเหลว MMRS
		ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลาง โชนสีแดง (ซม.)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
รูปร่างแท่ง ไม่สร้างแก๊สจาก กลูโคส	PM1-8	1.57	14.27
	RM1-22	1.18	7.24
	RM1-25	1.50	12.78
	RM13-1	0.98	5.44
	RM13-2	2.05	7.40
	RM13-4	1.06	7.80
	RM13-5	1.13	12.45
	AP1-1	1.75	1.03
	AP2-2	2.53	10.59
	AP5-1	2.35	4.81
	AP12-2	1.45	6.33
	AP13-1	2.63	3.97
	AP15-2	1.50	8.83
	AP16-1	1.65	10.79
	AP16-2	1.78	6.33
	AP17-1	4.85	211.80
	AP17-2	4.35	25.03
	AP19-1	1.55	23.59
	AP19-2	1.65	33.02
	AP19-3	1.85	4.81
AP20-1	1.63	11.23	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

กลุ่มแบบคที่เรีย	รหัส	ปริมาณไดอะซีทิล/อะซีโทอิน	
		อาหารแข็ง MMRS	อาหารเหลว MMRS
		ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลาง ทองโชนสีแดง (ซม.)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
รูปร่างแท่ง ไม่สร้างแก๊สจาก กลูโคส	AP20-2	2.75	50.76
	AP20-4	3.55	70.52
	AP27-2	3.15	16.38
	AP27-3	2.80	12.65
	AP27-4	2.10	20.55
	AP35-3	1.63	38.53
	AP36-2	2.23	4.12
	AP37-1	1.58	3.87
	AP37-4	1.53	13.53
	SR4-1	1.90	25.40
	SR4-2	3.35	151.19
	SR8-1	4.88	565.58
	SR8-2	3.55	38.39
	SR62-1	2.53	35.95
	SR62-2	2.10	14.86
	SR113-1	2.55	13.24
SR113-2	2.53	14.27	
รูปร่างแท่ง สร้างแก๊สจาก กลูโคส	AP22-1	1.83	35.93
	AP24-1	2.15	10.20
	AP38-2	2.55	315.62

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

กลุ่มแบคทีเรีย	รหัส	ปริมาณโคอะซีติล/อะซีโทอิน	
		อาหารแข็ง MMRS	อาหารเหลว MMRS
		ความยาวเส้นค่าศูนย์ กลางโซนสีแดง (ซม.)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
รูปร่างกลม ไม่สร้างแก๊สจาก กลูโคส	PM1-1	2.43	97.79
	PM1-2	2.38	83.43
	PM1-3	2.48	104.19
	PM1-4	2.25	73.25
	PM1-5	2.03	58.67
	PM1-6	2.41	76.98
	PM1-7	2.13	60.86
	PM1-11	2.58	156.11
	PM1-12	1.82	19.51
	PM3-1	3.15	323.98
	PM3-2	3.45	361.11
	PM3-4	3.43	379.40
	PM3-5	3.03	308.59
	PM3-10	3.45	359.97
	PM3-11	3.13	343.57
	PM3-12	3.97	389.18
	PM3-13	4.63	443.35
PM3-14	3.57	385.98	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเผยแพร่ และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

กลุ่มแบบที่เรีย	รหัส	ปริมาณโคอะซีติล / อะซีโทอิน	
		อาหารแข็ง MMRS	อาหารเหลว MMRS
		ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลาง ของโคนสีแดง (ซม.)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
รูปรางกลม ไม้สร้างแก๊สจาก กลูโคส	PM3-15	3.35	344.03
	PM3-16	2.53	144.52
	PM3-17	2.62	139.86
	PM3-18	2.61	144.14
	PM3-22	2.63	209.76
	PM4-1	2.95	307.01
	PM4-3	3.30	348.64
	PM4-4	2.80	292.16
	PM4-5	2.83	299.64
	PM4-6	2.85	306.66
	PM4-7	3.25	326.74
	PM4-8	2.95	313.94
	PM4-9	3.58	388.91
	PM4-10	3.45	354.07
	PM4-11	3.43	352.29
	PM4-12	2.83	304.10
	PM4-13	3.17	321.67
	PM4-15	3.43	351.83
PM4-16	2.77	279.48	

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

กลุ่มแบคทีเรีย	รหัส	ปริมาณไดอะซีทิล/อะซีโทอิน	
		อาหารแข็ง MMRS	อาหารเหลว MMRS
		ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลาง กลางโชนสีแดง (ซม.)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
รูปรางกลม ไม้สร้างแก๊สจาก กลูโคส	PM5-1	0.88	4.56
	PM5-2	2.63	199.07
	PM5-5	2.65	151.70
	PM5-6	2.63	149.87
	PM5-7	2.52	106.57
	PM5-8	2.67	155.62
	RM1-12	1.90	21.07
	RM1-13	2.67	284.27
	RM1-17	2.05	28.64
	RM3-3	1.41	12.52
	RM4-3	2.54	98.02
	RM5-1	1.83	18.34
	RM5-2	2.51	125.72
	RM5-6	1.85	19.61
	RM6-6	2.37	75.72
	RM7-3	2.12	66.45
	RM7-5	2.10	69.01
	RM7-10	2.45	123.78
	RM8-2	2.41	111.24

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

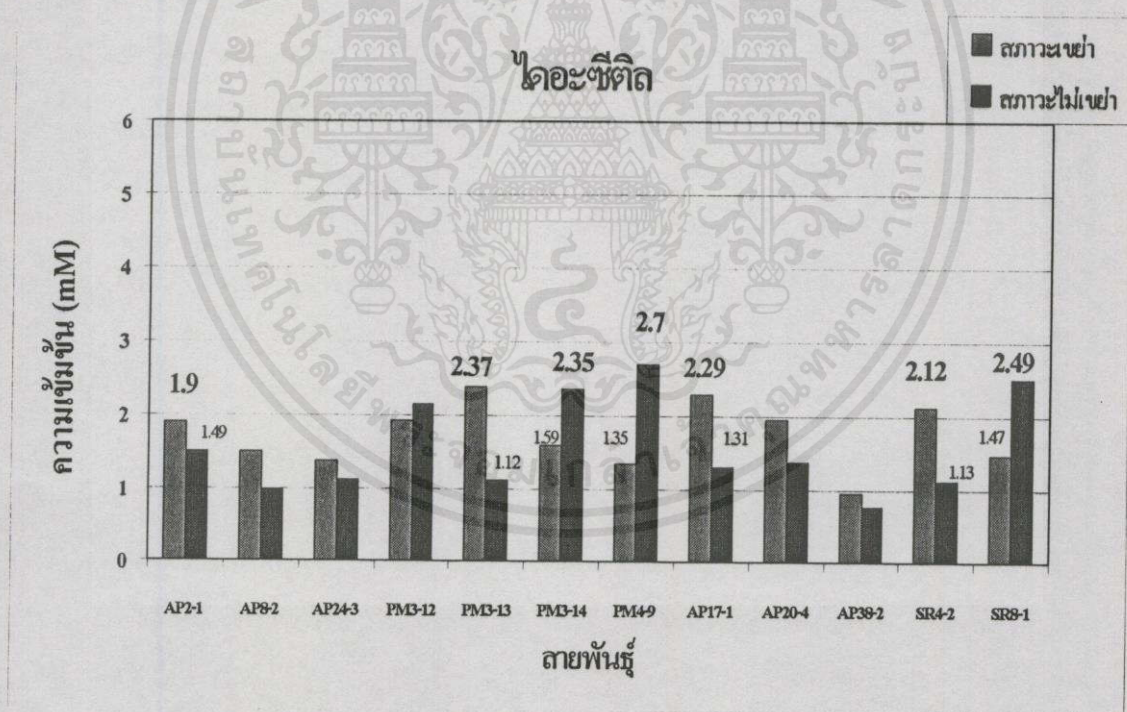
ตารางที่ 4.4 (ต่อ)

กลุ่มแบคทีเรีย	รหัส	ปริมาณไดอะซิติล/อะซีโทอิน	
		อาหารแข็ง MMRS	อาหารเหลว MMRS
		ความยาวเส้นผ่าศูนย์กลาง ของโคนสีแดง (ซม.)	ความเข้มข้น (มิลลิกรัม/ลิตร)
รูปร่างกลม ไม่สร้างแก๊สจาก กลูโคส	RM8-3	2.20	60.47
	RM8-4	2.56	91.24
	RM8-5	2.31	77.25
	RM8-7	2.33	86.99
	RM9-5	2.35	72.63
	RM9-8	2.23	72.04
	RM10-4	2.47	78.53
	RM10-5	2.65	146.51
	RM10-6	2.58	135.12
	RM11-3	2.47	88.52
	RM12-6	1.48	12.60
	AP4-3	2.55	5.05
	AP23-2	2.05	8.83
	AP24-2	2.10	8.19
	AP37-2	1.60	3.39
รูปร่างกลม สร้างแก๊สจาก กลูโคส	AP2-1	2.55	383.74
	AP8-2	2.57	361.30
	AP24-3	2.15	228.38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3.3 ผลการศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถผลิตโคอะซีติลได้สูงในอาหารเหลว

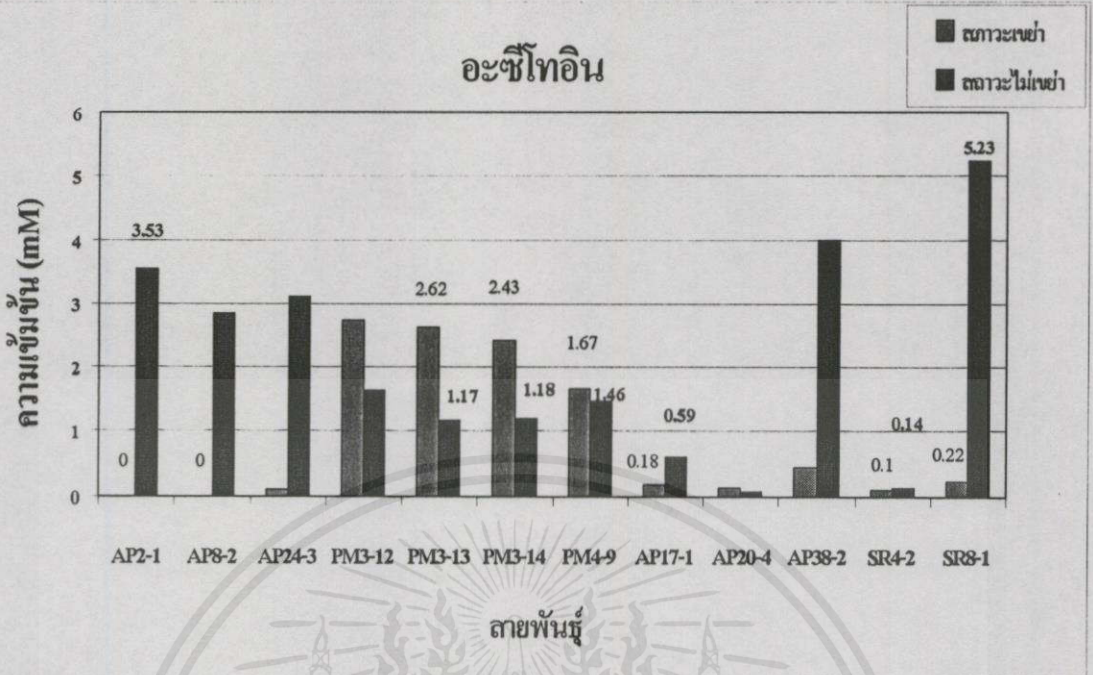
นำแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติที่ดีต่อการผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอินทั้งในอาหารแข็งและเหลว MMRS จำนวน 12 ไอโซเลต มาเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ปริมาณ 250 มิลลิลิตร ในระดับพลาสติก ทั้งสภาวะเขย่าและสภาวะไม่เขย่า ที่ อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วทำการวิเคราะห์หาปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอินโดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี พบว่า ในสภาวะไม่เขย่า เชื้อ PM4-9, SR8-1 และ PM3-14 สามารถผลิตโคอะซีติลได้สูงถึง 2.7, 2.49 และ 2.35 mM ตามลำดับ ขณะที่สามารถผลิตอะซีโทอิน เท่ากับ 1.46, 5.23 และ 1.18 mM ตามลำดับ ส่วนในสภาวะเขย่า พบว่าเชื้อ PM3-13, AP17-1 และ SR4-2 สามารถผลิตโคอะซีติลได้สูงถึง 2.37, 2.29 และ 2.12 mM ตามลำดับ ขณะที่สามารถผลิตอะซีโทอินได้เท่ากับ 2.62, 0.18 และ 0.10 mM ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อ AP2-1 สามารถผลิตโคอะซีติลได้ 1.90 mM แต่ผลิตอะซีโทอินในปริมาณน้อยจนไม่สามารถตรวจวิเคราะห์ด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ดังภาพที่ 4.1 และ 4.2



ภาพที่ 4.1 การผลิตโคอะซีติลของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MMRS

ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนลิขสิทธิ์ไว้สำหรับใช้ในกิจการของหน่วยงานที่มอบหมายให้ดำเนินการศึกษาวิจัย ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.2 การผลิตอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเหลว MMRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง

4.4 ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.4.1 ผลการศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารแข็ง

เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ตัวแทน จำนวน 7 สายพันธุ์ ที่สามารถผลิตไดอะซิติลได้สูง จากภาพที่ 4.1 มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการเจริญบนอาหารแข็ง MRS พบว่า ทุกสายพันธุ์ มีลักษณะโคโลนีสีขาว ทรงกลม ขอบเรียบ โคนมน การจัดเรียงตัวของเซลล์เป็น ลักษณะ เต็มๆ คู่ และสายโซ่สั้นๆ และติดสีแกรมบวก เชื้อสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 เป็นที่มีเชื้อรูปร่างแท่ง ที่มีขนาดเซลล์อยู่ระหว่าง 0.8-1.0 x 1.5-5.0 ไมโครเมตร และมีขนาดโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS อยู่ในระหว่าง 0.4-1.5 มิลลิเมตร แต่เชื้อสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14, PM4-9 และ AP2-1 เป็นที่มีเชื้อรูปร่างกลมค่อนข้างรี มีขนาดเซลล์อยู่ระหว่าง 0.5-1.0 ไมโครเมตร และมีขนาดโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS อยู่ในระหว่าง 0.3-1.6 มิลลิเมตร ทั้งนี้ได้แสดงลักษณะของเชื้อ *Lactobacillus pentosus* NRIC 1069^T และ *Lactobacillus plantarum* NRIC 1067^T ดังตารางที่ 4.5 เชื้อ *Enterococcus faecium* NRIC 1145^T, *Enterococcus faecalis* NRIC 1142^T ดังตารางที่ 4.6 และ เชื้อ *Weissella confusa* NRIC 0207^T และ *Leuconostoc mesenteroides* NRIC 1541^T ดังตารางที่ 4.7 ไปด้วย

4.4.1.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

เมื่อนำเชื้อจากข้อ 4.4.1.1 มาศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี พบว่า ทั้งเชื้อรูปร่างแท่งสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 และร่างกลมสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 มีลักษณะเหมือนกับ คือ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส ไม่มีควิซอินเทรค ไม่ย่อยแป้ง ไม่สร้างเมือกจากน้ำตาลซูโครส (sucrose) ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยา liquefaction ใน litmus milk แต่สามารถทำให้เกิดปฏิกิริยา reduction และ acid ใน litmus milk ไม่เจริญที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เจริญได้ที่พีเอช 8.0, 8.5 และเจริญได้ในโซเดียมคลอไรด์ 4.0, 6.0 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถสร้างกรดจาก L-arabinose, D-cellobiose, esculin, D-fructose, D-galactose, D-glucose, gluconate, lactose, D-mannose, D-ribose และ salicin (ดังตารางที่ 4.5 - 4.7)

เชื้อรูปร่างแท่งสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 มีลักษณะเหมือนกันคือ สามารถเกิดปฏิกิริยา reduction และ acid ใน litmus milk เจริญในอาหาร MRS ที่มีค่าพีเอช 4.0, 4.5, 8.0 และ 8.5 เจริญที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 4.0, 6.5 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถเจริญในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สร้างกรดจาก D-amygdalin, L-arabinose, esculin, D-fructose, D-galactose, D-glucose, gluconate, glycerol, lactose, D-mannitol, D-mannose, D-melibiose, D-ribose, salicin, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose และ D-xylose จากผลดังกล่าวนี้ พบว่า เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *L. pentosus* NRIC 1069^T (ดังตารางที่ 4.5)

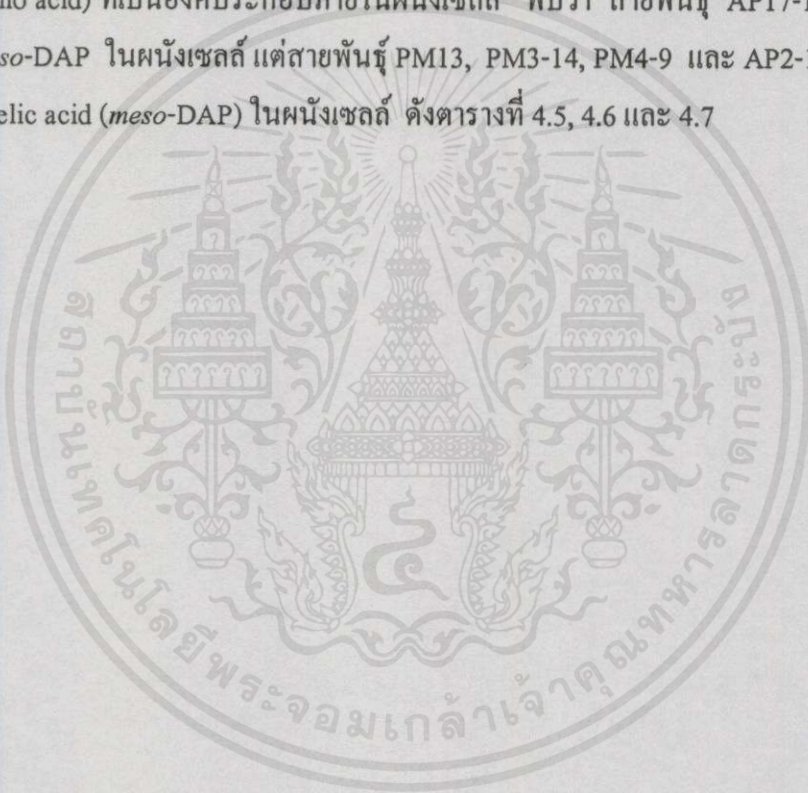
เชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 มีลักษณะเหมือนกัน คือ ไม่สามารถย่อยเคซีน และแป้ง แต่สามารถย่อยสลายอาร์จินีน ไม่เกิดปฏิกิริยา coagulation และ liquefaction ใน litmus milk สามารถเจริญในอาหาร MRS ที่มีค่าพีเอช 8.0, 8.5, 9.6 แต่ไม่เจริญในอาหาร MRS ที่มีค่าพีเอช 4.0 เจริญที่ความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 4.0, 6.5 และ 8.0 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเจริญในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สร้างกรดจาก L-arabinose, D-cellobiose, esculin, D-fructose, D-galactose, D-glucose, gluconate, lactose, D-maltose, mannose, D-ribose และ salicin แต่ไม่สามารถสร้างกรดจาก D-melezitose, α -methyl-D-glucoside และ D-sorbitol จากผลดังกล่าวนี้ พบว่า เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ มีลักษณะใกล้เคียงกับเชื้อ *E. faecium* NRIC 1145^T (ดังตารางที่ 4.6)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

นอกจากนี้ ยังพบว่าเชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ AP2-1 มีคุณสมบัติสำคัญที่แตกต่างจากเชื้อสายพันธุ์ข้างต้นบางประการ คือ สามารถสร้างแก๊สจากกลูโคส สามารถสลายอาร์จีนีน สร้างเมือก (slime) จากน้ำตาลซูโครส ไม่เกิดปฏิกิริยา reduction, acid และ coagulation ใน litmus milk ไม่สามารถเจริญที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6.5, 8.0 และ 10.0 เปอร์เซ็นต์ ไม่สามารถสร้างกรดจาก L-arabinose, lactose, D-mannitol, D-melibiose, D-melezitose, raffinose, L-rhamnose, salicin, D-sorbitol และ D-trehalose จากผลดังกล่าวนี้ พบว่า เชื้อสายพันธุ์ AP2-1 มีลักษณะใกล้เคียงกับ *Weissella confusa* NRIC 0207^T (ดังตารางที่ 4.7)

4.4.2 ผลการวิเคราะห์ผนังเซลล์

จากการนำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก ที่ได้จากข้อ 4.4.1 มาวิเคราะห์ผนังเซลล์เพื่อหากรดอะมิโน (amino acid) ที่เป็นองค์ประกอบภายในผนังเซลล์ พบว่า สายพันธุ์ AP17-1, SR4-2, และ SR8-1 มี meso-DAP ในผนังเซลล์ แต่สายพันธุ์ PM13, PM3-14, PM4-9 และ AP2-1 ไม่มี meso-Diaminopimelic acid (meso-DAP) ในผนังเซลล์ ดังตารางที่ 4.5, 4.6 และ 4.7



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 คุณลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติก สายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

คุณสมบัติ	AP17-1	SR4-2	SR8-1	^a <i>L. pentosus</i> NRIC 1069 ^T	^b <i>L. plantarum</i> NRIC 1067 ^T
รูปร่างเซลล์	←----- แท่ง -----→				
ขนาดเซลล์ (μm)	←----- 0.8-1.0 x 1.5-5.0 -----→				
การจัดเรียงตัวของเซลล์	←----- เดี่ยว คู่ หรือ สายโซ่สั้นๆ -----→				
ลักษณะโคโลนี	←----- สีขาว ทรงกลม ขอบเรียบ โค้งนูน -----→				
ขนาดโคโลนี(mm)	←----- 0.4 – 1.5 -----→				
การติดสีแกรม	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	-	-	-	-	-
การสร้างแก๊สจากกลูโคส	-	-	-	-	-
การย่อยสลายอาร์จีนิน	-	-	-	-	-
การรีดิวซ์ไนเตรต	-	-	-	-	-
การย่อยเคซีน	w	w	+	ND	ND
การย่อยแป้ง	-	-	-	-	-
การสร้างเมือก (slime)	-	-	-	-	-
ปฏิกิริยาใน litmus milk					
reduction	+	+	+	+	+
acid	+	+	+	+	+
coagulation	w	w	w	-	-
liquefaction	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

คุณสมบัติ	AP17-1	SR4-2	SR8-1	^a <i>L. pentosus</i> NRIC 1069 ^T	^b <i>L. plantarum</i> NRIC 1067 ^T
การเจริญที่อุณหภูมิ					
45 องศาเซลเซียส	-	-	-	-	-
50 องศาเซลเซียส	-	-	-	-	-
การเจริญที่พีเอช					
4.0	+	+	+	+	+
4.5	+	+	+	+	+
8.0	+	+	+	+	+
8.5	+	+	+	+	+
9.6	w	+	+	+	-
การเจริญในโซเดียมคลอไรด์					
4.0 %	+	+	+	+	+
6.5 %	+	+	+	+	+
8.0 %	+	+	+	+	+
10.0 %	+	-	-	-	-
ไอโซเมอร์กรดแลคติก	DL	DL	DL	DL	DL
Peptidoglycan type: <i>meso</i> -DAP	+	+	+	+	+

+ , positive; w, weak; - , negative reaction; ND, No data ;

NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan.

a,b, ข้อมูลจาก Tanasupawat และคณะ (1992a)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

คาร์โบไฮเดรต	AP17-1	SR4-2	SR8-1	^a <i>L. pentosus</i> NRIC 1069 ^T	^b <i>L. plantarum</i> NRIC 1067 ^T
D-amygdalin	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	+
D-cellobiose	+	+	+	+	+
esculin	+	+	+	+	+
D-fructose	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+
gluconate	+	+	+	+	+
glycerol	+	+	+	+	-
inulin	+	+	w	ND	ND
lactose	+	+	+	+	+
D-maltose	+	+	w	+	+
D-mannitol	+	+	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+
D-melibiose	+	+	+	+	+
D-melezitose	w	w	w	-	+
α -methyl-D-glucoside	w	w	w	-	-
raffinose	w	w	w	-	+
L-rhamnose	w	+	w	+	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่าจะวิธีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.5 (ต่อ)

คาร์โบไฮเดรต	AP17-1	SR4-2	SR8-1	^a <i>L. pentosus</i> NRIC 1069 ^T	^b <i>L. plantarum</i> NRIC 1067 ^T
D-ribose	+	+	+	+	+
salicin	+	+	+	+	+
D-sorbitol	+	+	+	+	+
sucrose	+	+	+	+	+
D-trehalose	+	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+	-

+, positive; w, weak; -, negative reaction; ND, No data ;

NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan.

a,b, ข้อมูลจาก Tanasupawat และคณะ (1992a)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 คุณลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติก สายพันธุ์ PM3-13 , PM3-14 และ PM4-9 เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

คุณสมบัติ	PM3-13	PM3-14	PM4-9	^a <i>E. faecium</i> NRIC 1145 ^T	^b <i>E. faecalis</i> NRIC 1142 ^T
รูปร่างเซลล์	←----- กลม, รี -----→				
ขนาดเซลล์ (μm)	←----- 0.5 – 1.0 -----→				
การจัดเรียงตัวของเซลล์	←----- เดี่ยว คู่ หรือ สายโซ่สั้นๆ -----→				
ลักษณะโคโลนี	←----- สีขาว ทรงกลม ขอบเรียบ โคนูน -----→				
ขนาดโคโลนี(mm)	←----- 0.3 – 1.6 -----→				
การติดสีแกรม	+	+	+	+	+
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	-	-	-	-	-
การสร้างแก๊สจากกลูโคส	-	-	-	-	-
การย่อยสลายอาร์จินีน	+	+	+	+	+
การรีดิวซ์ไนเตรด	-	-	-	-	-
การย่อยเคซีน	-	-	-	-	-
การย่อยแป้ง	-	-	-	-	-
การสร้างเมือก (slime)	-	-	-	-	-
ปฏิกิริยาใน litmus milk					
reduction	+	+	+	-	+
acid	+	+	+	w	+
coagulation	-	-	-	-	-
liquefaction	-	-	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

คุณสมบัติ	PM3-13	PM3-14	PM4-9	^a <i>E. faecium</i> NRIC 1145 ^T	^b <i>E. faecalis</i> NRIC 1142 ^T
การเจริญที่อุณหภูมิ					
45 องศาเซลเซียส	+	+	+	+	+
50 องศาเซลเซียส	-	-	-	-	-
การเจริญที่พีเอช					
4.0	-	-	-	ND	ND
4.5	w	w	w	w	-
8.0	+	+	+	ND	ND
8.5	+	+	+	ND	ND
9.6	+	+	+	ND	ND
การเจริญในโซเดียมคลอไรด์					
4.0 %	+	+	+	ND	ND
6.5 %	+	+	+	w	w
8.0 %	+	+	+	-	-
10.0 %	-	-	-	-	-
ไฮโซเมอร์กรดแลคติก	L	L	L	L	L
Peptidoglycan type: <i>meso</i> -DAP	-	-	-	-	-

+ , positive; w, weak; - , negative reaction; ND, No data;

NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan.

a,b, ข้อมูลจาก Facklam และ Collins (1989); Tanasupawat และคณะ(1992c)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

คาร์โบไฮเดรต	PM3-13	PM3-14	PM4-9	^a <i>E. faecium</i> NRIC 1145 ^T	^b <i>E. faecalis</i> NRIC 1142 ^T
D-amygdalin	w	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	+	-
D-cellobiose	+	+	+	+	+
esculin	+	+	+	w	+
D-fructose	+	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+	+
D-glucose	+	+	+	+	+
gluconate	+	+	+	+	-
glycerol	w	w	-	-	+
inulin	w	w	w	-	-
lactose	+	+	+	+	+
D-maltose	+	+	+	+	+
D-mannitol	w	w	+	+	+
D-mannose	+	+	+	+	+
D-melibiose	w	+	+	-	-
D-melezitose	-	-	-	-	+
α -methyl-D-glucoside	-	-	-	-	-
raffinose	-	-	w	-	-
L-rhamnose	w	w	w	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.6 (ต่อ)

คาร์โบไฮเดรต	PM3-13	PM3-14	PM4-9	^a <i>E. faecium</i>	^b <i>E. faecalis</i>
				NRIC 1145 ^T	NRIC 1142 ^T
D-ribose	+	+	+	ND	ND
salicin	+	+	+	+	+
D-sorbitol	-	-	-	-	+
sucrose	w	w	+	+	-
D-trehalose	w	w	w	-	+
D-xylose	w	-	-	-	-

+ , positive; w, weak; - , negative reaction; ND, No data ;

NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan.

a,b, ข้อมูลจาก Facklam และ Collins (1989); Tanasupawat และคณะ(1992c)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 คุณลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติก สายพันธุ์ AP2-1

เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

คุณสมบัติ	AP2-1	^a <i>W. confusa</i> NRIC 0207 ^T	^b <i>Leu. mesenteroides</i> NRIC 1541 ^T
รูปร่างเซลล์		←..... กลม, รี	
ขนาดเซลล์ (μm)		←..... 5.0 – 1.0	
การจัดเรียงตัวของเซลล์		←..... เดี่ยว คู่ หรือ สายโซ่สั้นๆ	
ลักษณะโคโลนี		←..... สีขาว ทรงกลม ขอบเรียบ โค้งนูน	
ขนาดโคโลนี(mm)		←..... 0.3 – 1.6	
การติดสีแกรม	+	+	+
การสร้างเอนไซม์คาตาเลส	-	-	-
การสร้างแก๊สจากกลูโคส	+	+	+
การย่อยสลายอาร์จินีน	+	+	-
การรีดิวซ์ไนเตรต	-	-	-
การสร้างเมือก (slime)	+	+	+
ปฏิกิริยาใน litmus milk			
reduction	-	-	-
acid	-	-	+
coagulation	-	-	-
liquefaction	-	ND	ND

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับครูใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

คุณสมบัติ	AP2-1	^a <i>W. confusa</i> NRIC 0207 ^T	^b <i>Leu.mesenteroides</i> NRIC 1541 ^T
การเจริญที่อุณหภูมิ			
45 องศาเซลเซียส	-	-	-
50 องศาเซลเซียส	-	ND	ND
การเจริญที่พีเอช			
4.0	+	+	+
4.5	+	+	+
8.0	+	+	+
8.5	+	+	+
9.6	-	-	-
การเจริญในโซเดียมคลอไรด์			
4.0 %	+	+	+
6.5 %	-	-	-
8.0 %	-	-	-
10.0 %	-	-	-
ไอโซเมอร์กรดแลคติก	DL	DL	D
Peptidoglycan type: <i>meso</i> -DAP	-	-	-

+, positive; w, weak; -, negative reaction; ND, No data ;

NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan.

a, b, ข้อมูลจาก Kandler และ Weiss (1986); Schillinger และคณะ (1989); Hammes และคณะ (1992); Collins และคณะ (1993); Tanasupawat และคณะ (1993), (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

คาร์โบไฮเดรต	AP2-1	^a <i>W. confusa</i>	^b <i>Leu. mesenteroides</i>
		NRIC 0207 ^T	NRIC 1541 ^T
D-amygdalin	-	ND	-
L-arabinose	-	-	+
D-cellobiose	+	+	+
esculin	+	+	+
D-fructose	+	+	+
D-galactose	+	+	+
D-glucose	+	+	+
gluconate	+	+	-
glycerol	w	ND	ND
inulin	w	ND	ND
lactose	-	-	+
D-maltose	+	+	+
D-mannitol	-	-	+
D-mannose	+	+	+
D-melibiose	-	-	+
D-melezitose	-	-	ND
α -methyl-D-glucoside	-	ND	ND
raffinose	-	-	+
L-rhamnose	-	-	-

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาติให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4.7 (ต่อ)

คาร์โบไฮเดรต	AP2-1	^a <i>W. confusa</i> NRIC 0207 ^T	^b <i>Leu. mesenteroides</i> NRIC 1541 ^T
D-ribose	+	+	-
salicin	-	-	+
D-sorbitol	-	-	-
sucrose	+	+	+
D-trehalose	-	-	+
D-xylose	+	+	+

+ , positive; w, weak; - , negative reaction; ND, No data ;

NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Tokyo, Japan.

a, b, ข้อมูลจาก Kandler และ Weiss (1986); Schillinger และคณะ (1989); Hammes และคณะ (1992); Collins และคณะ (1993); Tanasupawat และคณะ (1993), (2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.4.3 ผลการวิเคราะห์ชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลกติก

เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลกติกสายพันธุ์ จากข้อ 4.4.1 มาวิเคราะห์หาชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลกติก โดยทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ D หรือ L lactate dehydrogenase (D-LDH หรือ L-LDH) พบว่าสายพันธุ์ AP2-1, AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 สร้างกรดแลกติกชนิด DL (DL-lactic acid) ส่วนสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 สร้างกรดชนิด L (L-lactic acid) ดังตารางที่ 4.8

ตารางที่ 4.8 ไอโซเมอร์ของกรดแลกติกที่แบคทีเรียกรดแลกติกสร้างขึ้น

สายพันธุ์	OD ₃₄₀		D/L		[E]	Type
	D-LDH	L-LDH	S _R	B _R		
AP17-1	0.352	0.204	1.725	1.67	-0.032	DL
SR4-2	0.33	0.186	1.774	1.67	0.062	DL
SR8-1	0.348	0.212	1.641	1.67	0.018	DL
PM3-13	0.032	0.099	0.323	2.77	0.884	L+DL
PM3-14	0.066	0.311	0.212	1.67	0.874	L+DL
PM4-9	0.031	0.096	0.322	2.77	0.883	L+DL
AP2-1	0.35	0.266	1.315	1.67	0.213	DL+L

4.4.4 ผลการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของของแบคทีเรียกรดแลกติก

นำแบคทีเรียกรดแลกติกจากข้อ 4.4.1 มาพิสูจน์เอกลักษณ์โดยศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology) ด้วยเทคนิคดีเอ็นเอไฮบริไดเซชันในไมโครเพลตโดยติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโพลีโตไบโอติน พบว่าแบคทีเรียรูปร่างแท่ง สายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Lactobacillus pentosus* NRIC 1069^T และ *L. plantarum* NRIC 1067^T มีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง กับ *Lactobacillus pentosus* NRIC 1069^T อยู่ในระหว่าง 77.2-111.6 เปอร์เซ็นต์ เชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *Enterococcus faecium* NRIC 1145^T และ *E. faecalis* TISTR 379^T แล้วมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (% homology) กับ *Enterococcus faecium* NRIC 1145^T อยู่ในระหว่าง 72.1-99.6 เปอร์เซ็นต์ และเชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ AP2-1 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Weissella confusa* NRIC 0207^T แล้วมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง เท่ากับ 100.5 เปอร์เซ็นต์ ดังตารางที่ 4.9

ตารางที่ 4.9 แสดงความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (%) ของแบคทีเรียกรดแลคติก เปรียบเทียบกับสายพันธุ์มาตรฐาน

สายพันธุ์	% Homology with labeled strains	
	NRIC 1069 ^T	NRIC 1067 ^T
AP17-1	111.6	19.6
SR4-2	77.2	13.4
SR8-1	100.9	53.6
<i>L. pentosus</i> NRIC 1069 ^T	100	34.9
<i>L. plantarum</i> NRIC 1067 ^T	18.4	100
	NRIC1145 ^T	TISTR 379 ^T
PM3-13	83.8	5.5
PM3-14	72.1	2.7
PM4-9	99.6	17.1
<i>E. faecium</i> NRIC 1145 ^T	100	3.4
<i>E. faecalis</i> TISTR 379 ^T	19.7	100
	NRIC 0207 ^T	
AP2-1	100.5	
<i>W. confusa</i> NRIC 0207 ^T	100	

TISTR, Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand;

NRIC, NODAI Research Institute Culture Collection, Tokyo University of Agriculture, Tokyo,

Japan.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับกรใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

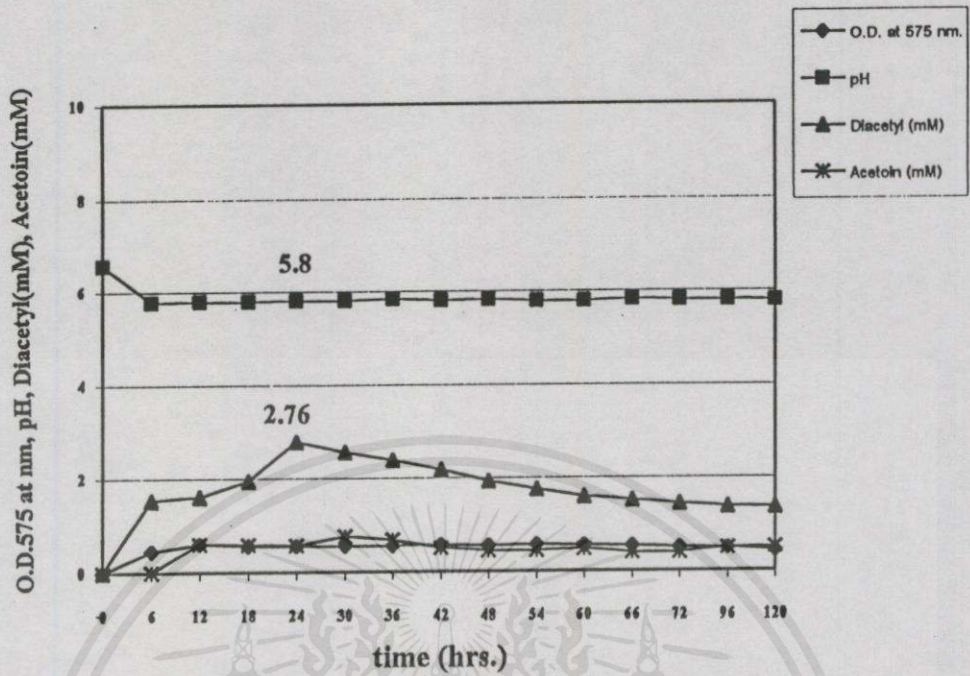
4.5 ผลการศึกษาการเจริญ การสร้างกรด การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติก

4.5.1 แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1

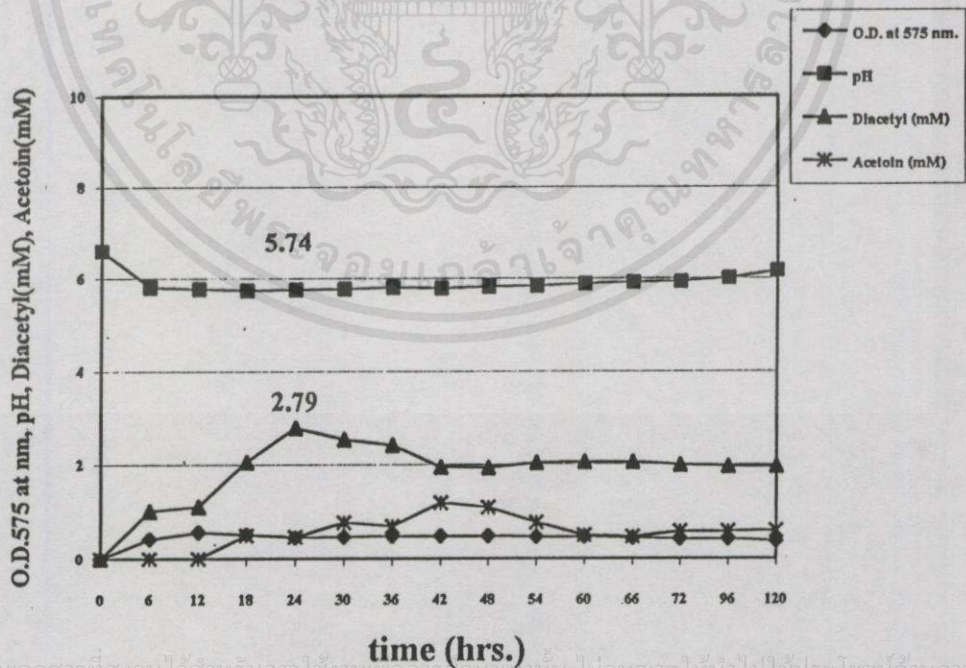
การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1 ในสภาวะเขย่า พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.59 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลงเล็กน้อย ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงและมีค่าอยู่ระหว่าง 5.7-5.8 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.76 mM ที่พีเอช 5.80 เมื่อทำการหมักได้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.75 mM ในชั่วโมงที่ 30 ของการหมัก หลังจากนั้นจะลดลง ดังภาพที่ 4.3

การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1 ในสภาวะไม่เขย่า พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นเดียวกับสภาวะเขย่าและยังพบว่า เชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.57 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงและมีค่าอยู่ระหว่าง 5.7-6.2 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.79 mM ที่พีเอช 5.74 เมื่อทำการหมักได้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.18 mM ในชั่วโมงที่ 42 ของการหมัก หลังจากนั้นจะเริ่มลดลง ดังภาพที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.3 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

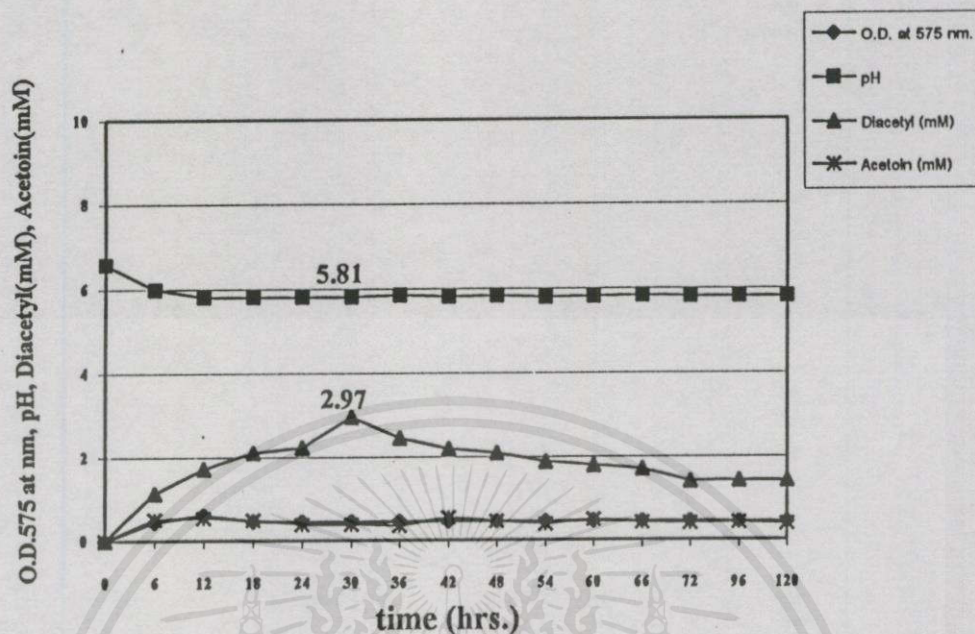


ภาพที่ 4.4 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

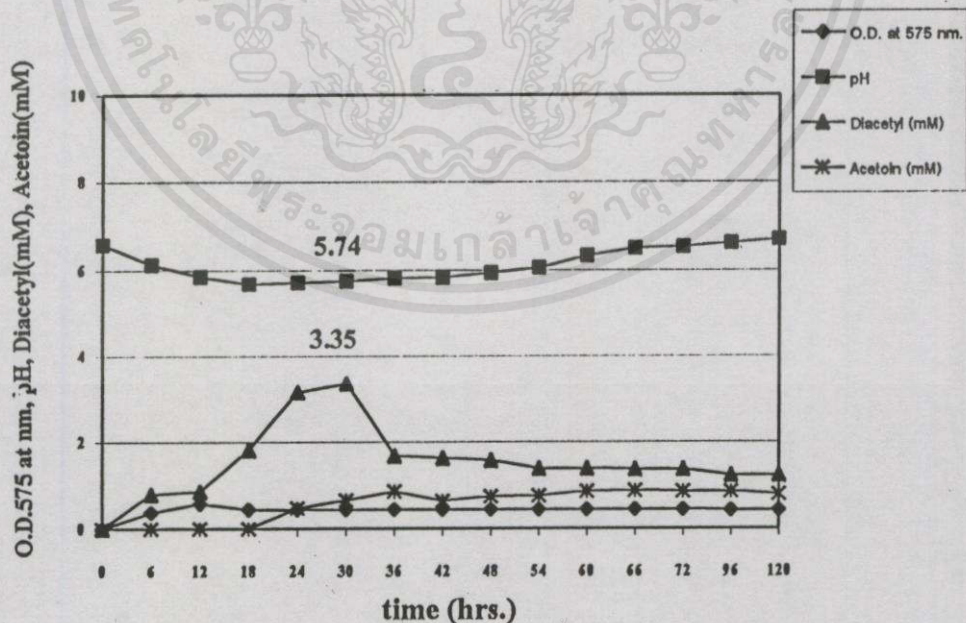
การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR4-2 ในสภาวะเขย่า พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.61 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงเล็กน้อยและมีค่าอยู่ระหว่าง 5.7-6.0 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.97 mM ที่พีเอช 5.81 เมื่อทำการหมักได้ 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR4-2 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.54 mM ในชั่วโมงที่ 12 และ 42 ของการหมัก หลังจากนั้นจะลดลงตามลำดับ ดังภาพที่ 4.5

การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR4-2 ในสภาวะไม่เขย่า พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นเดียวกับสภาวะเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.59 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงและมีค่าอยู่ระหว่าง 5.6-6.5 ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 72 ของการหมัก แต่ชั่วโมงที่ 96 ของการหมักค่าพีเอชเริ่มมีแนวโน้มสูงขึ้น ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 3.35 mM ที่พีเอช 5.74 เมื่อทำการหมักได้ 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR4-2 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.89 mM ในชั่วโมงที่ 66 ของการหมัก หลังจากนั้นจะเริ่มคงที่ ดังภาพที่ 4.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.5 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR4-2 เมื่อเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

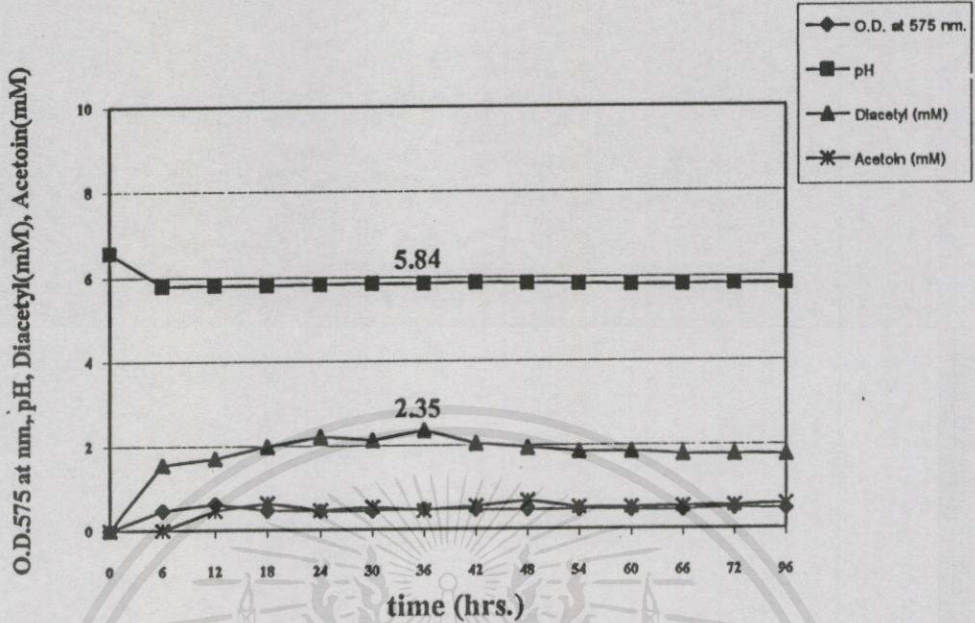


ภาพที่ 4.6 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR4-2 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

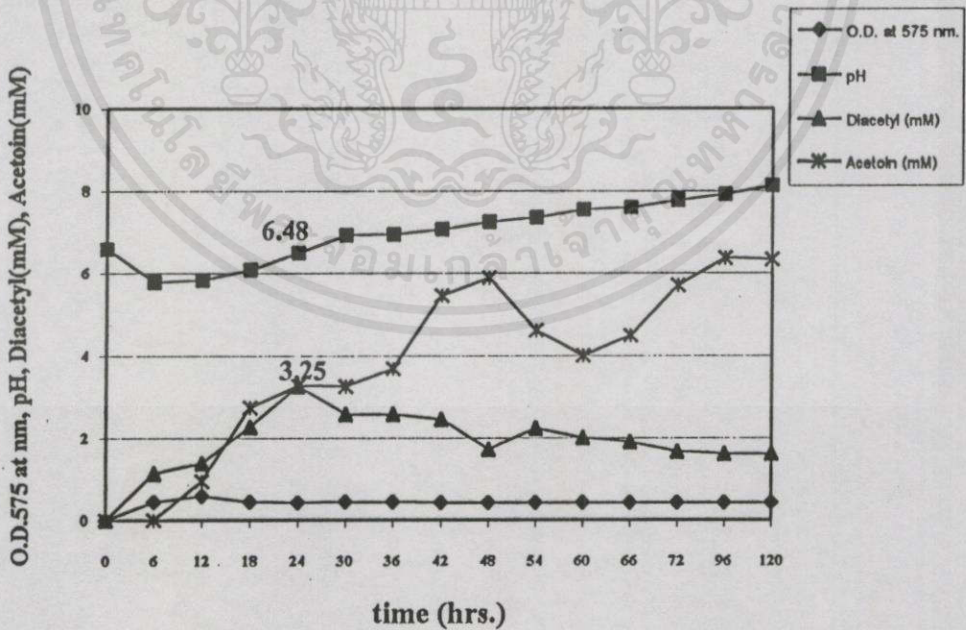
การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR8-1 ในสภาวะเขย่า พบว่าเชื่อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื่อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.61 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื่อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงและมีค่าอยู่ระหว่าง 5.7-5.9 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณไคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.35 mM ที่พีเอช 5.84 เมื่อทำการหมักได้ 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR8-1 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.67 mM ในชั่วโมงที่ 48 ของการหมัก หลังจากนั้นจะลดลง ดังภาพที่ 4.7

การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR8-1 ในสภาวะไม่เขย่า พบว่าเชื่อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นเดียวกับสภาวะเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่าเชื่อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.59 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื่อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 24 ของการหมักและมีค่าอยู่ระหว่าง 5.7-6.4 แต่ชั่วโมงที่ 30 ของการหมักค่าพีเอชเริ่มมีแนวโน้มสูงขึ้นโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.9-8.2 จนตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณไคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 3.25 mM ที่พีเอช 6.48 เมื่อทำการหมักได้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR8-1 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 6.36 mM ในชั่วโมงที่ 96 ของการหมัก ดังภาพที่ 4.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.7 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR8-1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS



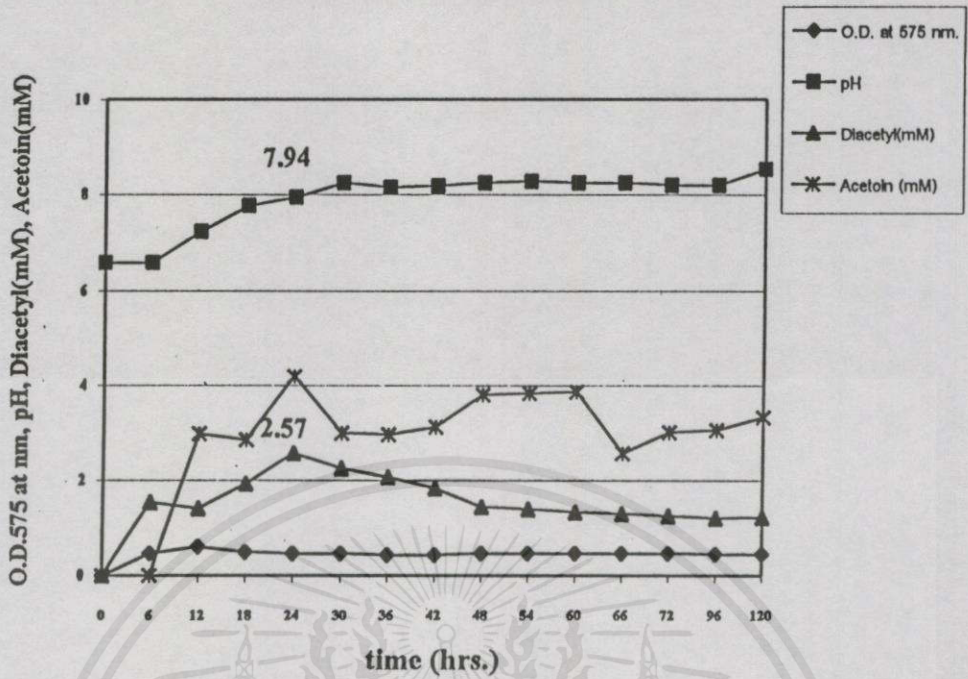
ภาพที่ 4.8 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ SR8-1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

4.5.2 แบบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9

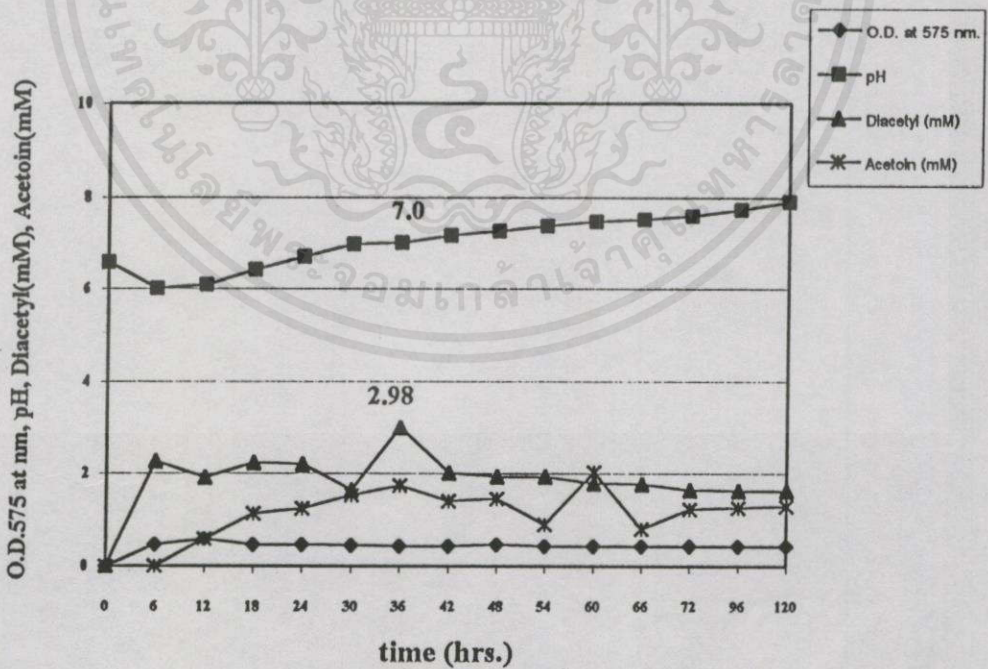
การเจริญของแบบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13 ในสภาวะเขย่า พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.60 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มเพิ่มขึ้นและมีค่าอยู่ระหว่าง 6.5-8.5 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.57 mM ที่พีเอช 7.94 เมื่อทำการหมักได้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 4.20 mM ในชั่วโมงที่ 24 ของการหมักเช่นเดียวกัน หลังจากนั้นจะเริ่มลดลง ดังภาพที่ 4.9

การเจริญของแบบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13 ในสภาวะไม่เขย่า พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นเดียวกับสภาวะเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.58 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 18 ของการหมักและมีค่าอยู่ระหว่าง 6.0-6.4 แต่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมักค่าพีเอชเริ่มสูงขึ้นและมีค่าอยู่ระหว่าง 6.7-7.9 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.98 mM ที่พีเอช 7.0 เมื่อทำการหมักได้ 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.03 mM ในชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก หลังจากนั้นจะเริ่มลดลง ดังภาพที่ 4.10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.9 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่หมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

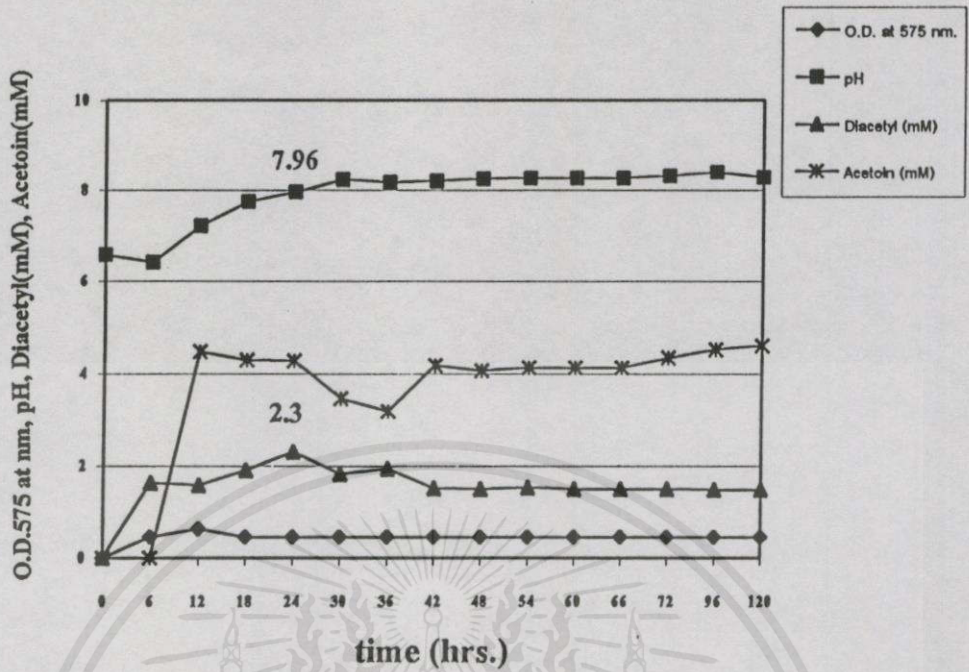


ภาพที่ 4.10 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่หมัก ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

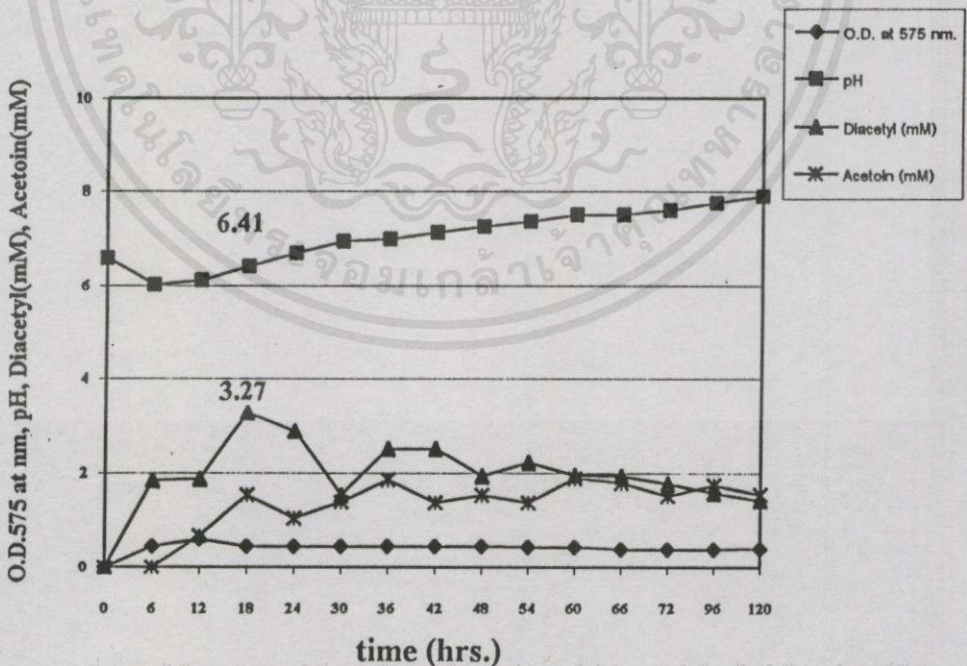
การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-14 ในสภาวะเขย่า พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.63 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงเล็กน้อยและจะเพิ่มขึ้นในชั่วโมงที่ 12 ของการหมักโดยมีค่าอยู่ระหว่าง 7.2-8.4 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.30 mM ที่พีเอช 7.96 เมื่อทำการหมักได้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-14 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 4.59 mM ในชั่วโมงที่ 120 ของการหมัก ดังภาพที่ 4.11

การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-14 ในสภาวะไม่เขย่า พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นเดียวกับสภาวะเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.62 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 18 ของการหมักและมีค่าอยู่ระหว่าง 6.0-6.4 แต่ชั่วโมงที่ 24 ของการหมักค่าพีเอชเริ่มสูงขึ้นและมีค่าอยู่ระหว่าง 6.6-7.9 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 3.27 mM ที่พีเอช 6.41 เมื่อทำการหมักได้ 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-14 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.88 mM ในชั่วโมงที่ 60 ของการหมัก หลังจากนั้นจะเริ่มลดลง ดังภาพที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.11 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-14 เมื่อเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

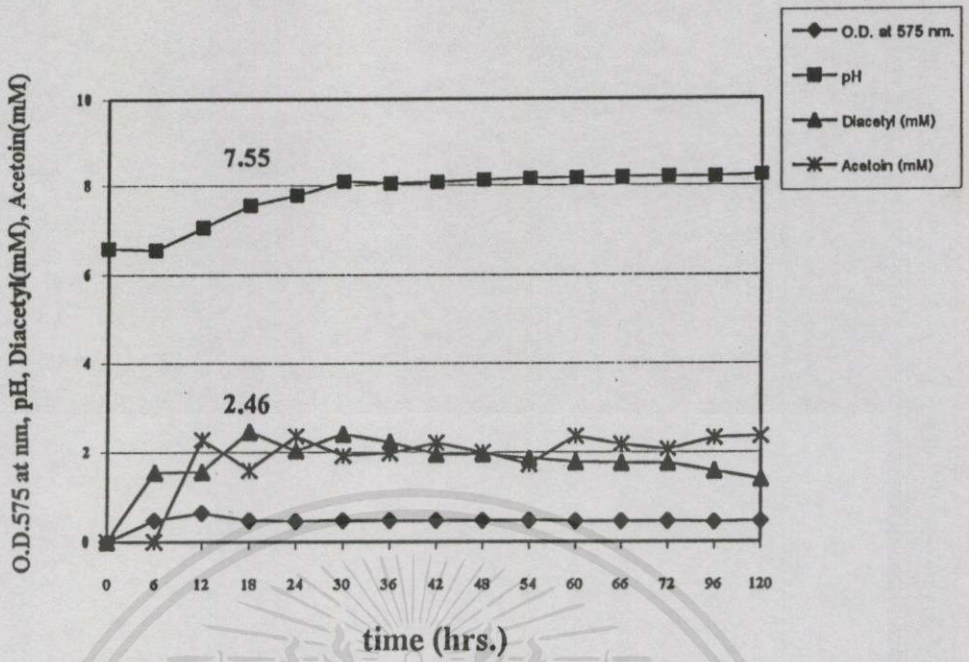


ภาพที่ 4.12 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-14 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

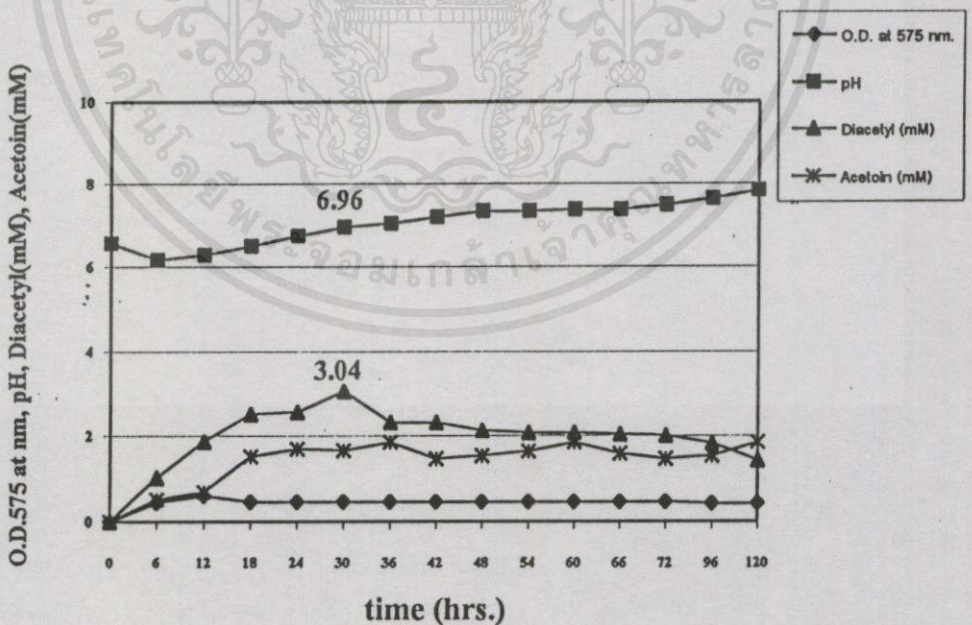
การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM4-9 ในสภาวะเขย่า พบว่า เชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วจนใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.62 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 6 ของการหมักแต่ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมักค่าพีเอชเริ่มเพิ่มขึ้นและมีค่าอยู่ระหว่าง 7.0-8.2 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.46 mM ที่พีเอช 7.55 เมื่อทำการหมักได้ 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM4-9 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 2.36 mM ในชั่วโมงที่ 24 ของการหมัก หลังจากนั้นจะลดลงตามลำดับ ดังภาพที่ 4.13

การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM4-9 ในสภาวะไม่เขย่า พบว่าเชื้อมีการเจริญอย่างรวดเร็วจนใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นเดียวกับสภาวะเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่าเชื้อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.59 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื้อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มลดลงตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 18 ของการหมัก โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 6.1-6.4 แต่ในชั่วโมงที่ 24 ของการหมักค่าพีเอชเริ่มสูงขึ้นและมีค่าอยู่ระหว่าง 6.7-7.8 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 3.04 mM ที่พีเอช 6.96 เมื่อทำการหมักได้ 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM4-9 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 1.84 mM ในชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก ดังภาพที่ 4.14

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4.13 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM4-9 เมื่อเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

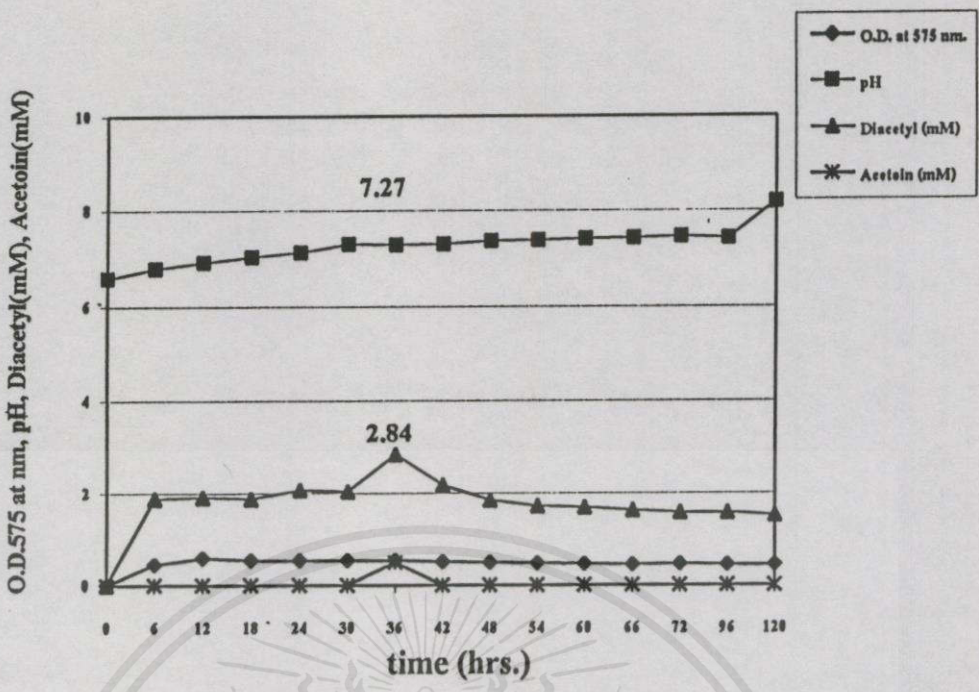


ภาพที่ 4.14 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอินของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM4-9 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

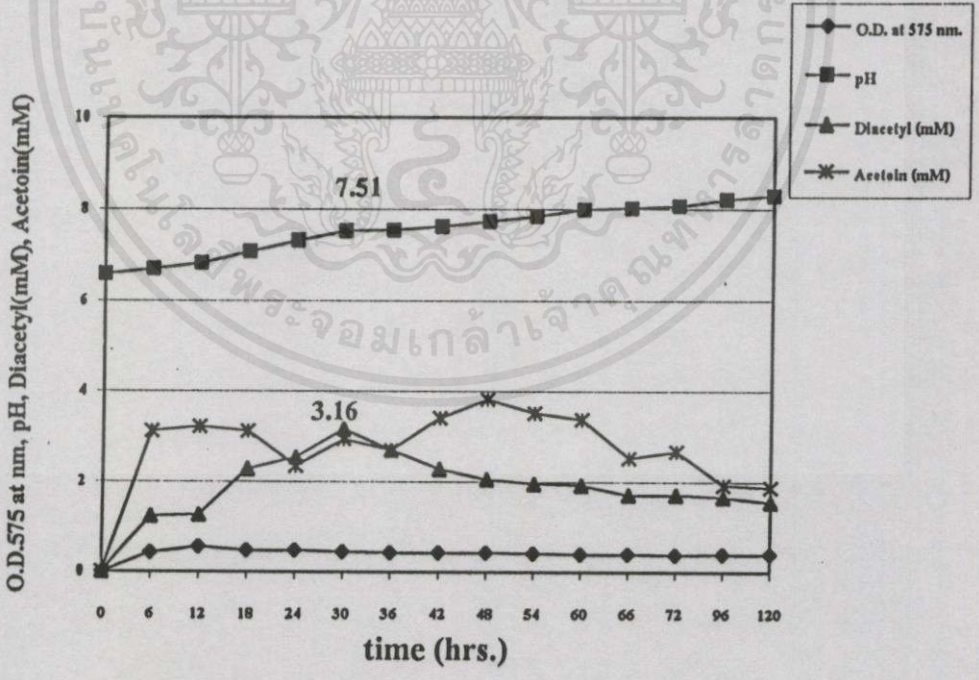
4.5.3 แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1

การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 ในสภาวะเขย่า พบว่าเชื่อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก นอกจากนี้ยังพบว่าเชื่อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.58 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลงเล็กน้อย ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื่อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มเพิ่มขึ้นและมีค่าอยู่ระหว่าง 6.7-8.2 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 2.84 mM ที่พีเอช 7.27 เมื่อทำการหมักได้ 36 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 0.49 mM ในชั่วโมงที่ 36 ของการหมัก ดังภาพที่ 4.15

การเจริญของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 ในสภาวะไม่เขย่า พบว่าเชื่อมีการเจริญอย่างรวดเร็วใน 12 ชั่วโมงแรกของการหมักเช่นเดียวกับสภาวะเขย่า นอกจากนี้ยังพบว่าเชื่อมีปริมาณเซลล์สูงสุดโดยมีค่าความขุ่นเท่ากับ 0.55 ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก หลังจากนั้นปริมาณเซลล์จะลดลง ค่าพีเอชของอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 6.57 หลังจากเชื่อมีการเจริญค่าพีเอชจะเริ่มเพิ่มขึ้นและมีค่าอยู่ระหว่าง 6.6-8.3 ตลอดระยะเวลาของการหมัก ปริมาณโคอะซีติลผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 3.16 mM ที่พีเอช 7.51 เมื่อทำการหมักได้ 30 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะค่อยๆ ลดลง ส่วนอะซีโทอินที่ผลิตจากแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 มีค่าสูงสุดเท่ากับ 3.82 mM ในชั่วโมงที่ 48 ของการหมักหลังจากนั้นจะเริ่มลดลง ดังภาพที่ 4.16



ภาพที่ 4.15 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะเขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS



ภาพที่ 4.16 การเจริญ การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอช การผลิตไดอะซีทิลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 เมื่อเลี้ยงในสภาวะไม่เขย่า ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในอาหารเหลว MMRS

วิจารณ์ผลการทดลอง

5.1 การแยกแบคทีเรียกรดแลคติก

จากผลการแยกเชื้อแบคทีเรียจากนมพาสเจอร์ไรซ์ จำนวน 5 ตัวอย่าง นมดิบ จำนวน 6 ตัวอย่าง และอาหารหมักดอง จำนวน 21 ตัวอย่าง พบว่า การกระจายของเชื้อที่แยกได้จากอาหารหมักดองนั้นส่วนใหญ่พบเชื้อพวกรูปร่างแท่ง(rods) ซึ่งเชื้อพวกนี้อาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการหมักตามการรายงานของ Tanasupawat และคณะ (1993; 1995; 1998) ส่วนการกระจายของเชื้อที่แยกได้ทั้งในนมพาสเจอร์ไรซ์และนมดิบส่วนใหญ่เป็นเชื้อพวกรูปร่างกลม (cocci) ซึ่งเชื้อเหล่านี้อาจเกิดการปนเปื้อนในระหว่างการเก็บตัวอย่างและยังไม่แสดงบทบาทในการหมัก ซึ่งสอดคล้องกับข้อมูลของ Devriese และคณะ (1991); Teuber และคณะ (1991) ซึ่งอธิบายถึงแหล่งของเชื้อพวก *Lactococcus* และ *Enterococcus* มักจะพบในนมดิบและผลิตภัณฑ์นมต่างๆ

5.2 การจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก

จากผลการจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก พบว่า เชื้อทุกสายพันธุ์มีลักษณะต่างๆเป็นตามคุณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกทุกประการคือ มีลักษณะโคโลนีกลมมน สีขาวขุ่น ขอบเรียบ โค้งนูนบนอาหารเหลว MRS ดิสคิสแกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส และไม่รีดิวซ์ไนเตรด (Albert และคณะ, 1992; Balows และคณะ, 1992) ซึ่งสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกโดยอาศัยคุณสมบัติทางรูปร่างของเซลล์ และการสร้างแก๊สจากกลูโคส ออกเป็น 4 กลุ่ม คือ กลุ่มที่แรกเป็นแบคทีเรียกรดแลคติกพวกรูปร่างแท่งไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 52 ไอโซเลต กลุ่มที่ 2 พวกรูปร่างแท่งสร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 5 ไอโซเลตซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียกรดแลคติก ทั้งสกุล *Lactobacillus* และ *Carnobacterium* (Axelsson, 1998) กลุ่มที่ 3 พวกรูปร่างกลมไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 77 ไอโซเลต ซึ่งส่วนใหญ่มีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Enterococcus* คือ สามารถเจริญในอาหารเหลว MRS ที่มีพีเอช 9.6 เกลือโซเดียม-คลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และอุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสได้ดี (Axelsson, 1998) และกลุ่มที่ 4 พวกรูปร่างกลม สร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 3 ไอโซเลต ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งสกุล *Weissella* และ *Leuconostoc* คือ ไม่เจริญในอาหารเหลว MRS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส และ พีเอช 9.6 (Axelsson, 1998)

ไม่ว่ากรณีใดๆก็ตาม อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตไดอะซีติล

5.3.1 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินบนอาหารแข็ง

จากผลการตรวจสอบความสามารถในการผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินบนอาหารแข็ง MMRS ของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มต่างๆ ที่แยกได้ทั้งหมด จำนวน 137 ไอโซเลต พบว่า เชื้อรูปร่างกลม ให้ค่าความขาวเส้นผ่าศูนย์กลางโซนสีแดงที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างไดอะซีติล/อะซีโทอินกับสารทดสอบได้กว้างใกล้เคียงกับเชื้อรูปร่างแท่ง โดยเชื้อทั้งรูปร่างกลมและแท่งที่สามารถสร้างโซนสีแดงได้กว้างส่วนใหญ่เป็นเชื้อพวกที่ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส หรือ พวกที่มีการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตฟ ดังตารางที่ 4.4 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Christensen และ Pederson (1958)

5.3.2 การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินบนอาหารเหลว

จากผลการตรวจสอบการสร้างไดอะซีติล/อะซีโทอิน ในอาหารเหลว MMRS ที่มีปริมาณซิเทรตที่สูง พบว่าเชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ PM3-13 เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเทรตเพื่อผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินได้สูงถึง 443.35 มิลลิกรัม/ลิตร ซึ่งมากกว่าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ 125 ที่สามารถผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินได้เพียง 415 มิลลิกรัม/ลิตร ตามรายงานของ Phalip และคณะ (1994) ส่วนเชื้อรูปร่างแท่งสายพันธุ์ SR8-1 เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้ซิเทรตได้ดีและสามารถผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินได้มากกว่าเชื้อ *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ 125 เช่นเดียวกันคือ สามารถผลิตได้สูงถึง 565.58 มิลลิกรัม/ลิตร

นอกจากนี้ ยังพบเชื้อรูปร่างแท่งสายพันธุ์ AP38-2, AP17-1, SR4-2 และ AP20-4 สามารถผลิตได้สูงถึง 315.62, 211.80, 151.19 และ 70.52 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ เชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ PM3-12, PM4-9, PM3-14, AP2-1, AP8-2 และ AP24-3 สามารถผลิตไดอะซีติล/อะซีโทอินได้สูงถึง 389.18, 388.91, 385.98, 383.74, 361.30 และ 228.38 มิลลิกรัม/ลิตร ตามลำดับ ดังตารางที่ 4.4

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสาร ทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.3.3 การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติลได้สูงในอาหารเหลว

จากผลการคัดเลือกเชื้อที่สามารถผลิตโคอะซีติลในอาหารเหลว MMRS ปริมาณ 250 มิลลิลิตร พบว่า ในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบไม่เขย่า เชื้อ PM4-9, SR8-1 และ PM3-14 สามารถผลิตโคอะซีติลได้สูงถึง 2.7, 2.49 และ 2.35 mM ตามลำดับ ขณะที่สามารถผลิตอะซีโทอินเท่ากับ 1.46, 5.23 และ 1.18 mM ตามลำดับ ส่วนในสภาวะการเลี้ยงเชื้อแบบเขย่า พบว่า เชื้อ PM3-13, AP17-1 และ SR4-2 สามารถผลิตโคอะซีติลได้สูงถึง 2.37, 2.29 และ 2.12 mM ตามลำดับ ขณะที่สามารถผลิตอะซีโทอินเท่ากับ 2.62, 0.18 และ 0.10 mM ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่า เชื้อ AP2-1 สามารถผลิตโคอะซีติลได้สูงถึง 1.90 mM จากการผลิตโคอะซีติลของเชื้อทั้งหมด ทั้ง 2 สภาวะข้างต้นนั้น พบว่า ค่าการผลิตโคอะซีติลที่ได้น้อยกว่าการผลิตโคอะซีติลของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 ที่เจริญในสภาวะการให้อากาศในอาหารเหลว MRS ที่เติม $100 \mu\text{M}$ FeCl_3 และ $10 \mu\text{M}$ hemin แทน triamonium citrate ซึ่งสามารถผลิตได้สูงถึง 8.0 และ 4.0 mM ตามลำดับ (Kaneko และคณะ, 1991)

5.4 การพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

5.4.1 การศึกษาลักษณะทางฟิโนไทป์ของแบคทีเรียกรดแลคติก

พบว่า ทุกสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก คือ มีลักษณะโคโลนีสีขาว ทรงกลม ขอบเรียบ โค้งนูน การจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นลักษณะเดี่ยว คู่ และสายโซ่สั้น ๆ ติดสี่แกรม บวก และ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส (Kandler และ Weiss, 1986; Albert และคณะ, 1992) และ Balows และคณะ, 1992) เชื้อสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 เป็นที่มีเชื้อรูปร่างแท่ง ที่มีขนาดเซลล์อยู่ระหว่าง $0.8-1.0 \times 1.5-5.0$ ไมโครเมตร และมีขนาดโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS อยู่ในระหว่าง 0.4-1.5 มิลลิเมตร แต่เชื้อสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14, PM4-9 และ AP2-1 เป็นที่มีเชื้อรูปร่างกลมรี มีขนาดเซลล์อยู่ระหว่าง 0.5-1.0 ไมโครเมตร และมีขนาดโคโลนีบนอาหารแข็ง MRS อยู่ในระหว่าง 0.3-1.6 มิลลิเมตร

เชื้อรูปร่างแท่งสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 มีลักษณะที่สำคัญคือ ไม่สร้างแก๊ส จากกลูโคส (homofermentative) เจริญที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6.5 ถึง 8.0 เปอร์เซ็นต์ และไม่สามารถเจริญในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แต่สามารถผลิตกรดแลคติก ชนิด DL เหมือนกับ *Lactobacillus pentosus* และ *L. plantarum* (Tanasupawat และคณะ, 1992a) จากคุณสมบัติเหล่านี้สามารถจัดแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ไว้ในสกุล *Lactobacillus* (Axelsson, 1998) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อสกุล *Carnobacterium* ที่ไม่สามารถเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมอะซิเตต (Sodium acetate) เป็นส่วนประกอบ (Hammes และคณะ, 1992) นอกจากนี้

เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ยังมีคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ใกล้เคียงกับ *Lactobacillus pentosus* NRIC1069^T มากกว่า *Lactobacillus plantarum* NRIC1067^T คือ มี meso-DAP ในอยู่ผนังเซลล์ซึ่งพบว่ามีในเชื้อ *Lactobacillus pentosus* และ *L. plantarum* (Tanasupawat และคณะ, 1992a; 1995) สามารถสร้างกรดจาก glycerol และ D-xylose (Tanasupawat และ คณะ, 1992a; Kandler และ Weiss, 1986) (ตารางที่ 4.5) ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้สอดคล้องกับรายงานของ Hammes และคณะ (1992)

เชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 มีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่สำคัญคือ ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส (homofermentative) เจริญในอาหาร MRS ที่มีค่าพีเอช 9.6 เจริญที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเจริญในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่มี meso-Diaminopimelic acid (meso-DAP) อยู่ในผนังเซลล์ ซึ่งมักจะไม่มีพบในแบคทีเรียกรดแลคติกพวกรูปร่างกลม (Collins และคณะ, 1993; Schillinger และคณะ, 1989) และสามารถผลิตกรดแลคติกชนิด L เหมือนกับ *Enterococcus faecium* (Tanasupawat และคณะ, 1992b) จากคุณสมบัติเหล่านี้สามารถจัดแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 3 สายพันธุ์ไว้ในสกุล *Enterococcus* (Axelsson, 1998; Tanasupawat และคณะ, 1992b) นอกจากนี้เชื้อทั้ง 3 ยังมีคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ใกล้เคียงกับ *Enterococcus faecium* NRIC1145^T มากกว่า *Enterococcus faecalis* NRIC1142^T คือ สามารถสร้างกรดจาก L-arabinose, gluconate แต่ไม่สร้างกรดจาก D-melezitose และ D-sorbitol (Facklam และ Collins, 1989; Tanasupawat และ คณะ, 1992b) (ตารางที่ 4.6)

เชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ AP2-1 มีลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีที่สำคัญ คือ สร้างแก๊สจากกลูโคส (heterofermentative) สร้างเมือก (slime) จากน้ำตาลซูโครส สามารถย่อยสลายอาร์จีนิน ไม่สามารถเจริญในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส พีเอช 9.6 และความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ ไม่มี meso-Diaminopimelic acid (meso-DAP) อยู่ในผนังเซลล์ซึ่งมักจะไม่มีพบในแบคทีเรียกรดแลคติกพวกรูปร่างกลม (Collins และคณะ, 1993; Schillinger และคณะ, 1989) แต่ผลิตกรดแลคติกชนิด DL เหมือน *Weissella confusa* (Collins และคณะ, 1993) จากคุณสมบัติเหล่านี้ สามารถจัดแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 อยู่ในสกุล *Weissella* (Axelsson, 1998) (ตารางที่ 2.1) ซึ่งแตกต่างจากเชื้อในสกุล *Leuconostoc* ที่สร้างกรดแลคติกชนิด D และไม่สามารถสลายอาร์จีนิน (Stiles และ Holzappel, 1997; Collins และ คณะ, 1993) นอกจากนี้สายพันธุ์ AP2-1 ยังมีคุณสมบัติทางฟีโนไทป์ใกล้เคียงกับ *Weissella confusa* NRIC 0207^T มากกว่า *Leuconostoc mesenteriodes* NRIC 1541^T คือ สามารถสลายอาร์จีนิน ไม่สามารถสร้างกรดจาก L-arabinose, lactose, D-mannitol, D-melibiose, raffinose, salicin และ D-trehalose แต่สามารถสร้างกรดจาก gluconate และ D-ribose (Collins และ คณะ, 1993; Schillinger และคณะ, 1989; Tanasupawat และคณะ, 1993; 2000; Hammes และคณะ, 1992; Kandler และ Weiss, 1986) (ตารางที่ 4.7)

5.4.2 การศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของแบคทีเรียกรดแลคติก

พบว่า เชื้อรูปร่างแท่งสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน *Lactobacillus pentosus* NRIC 1069^T แล้วพบว่ามีความคล้ายคลึง (% homology) ร้อยละ 77.2 ถึง 111.6 และมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงร้อยละ 13.4 ถึง 53.6 กับ *L. plantarum* NRIC 1067^T นอกจากนี้เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ยังสามารถผลิตกรดแลคติกชนิด DL และสร้างกรดจาก D-amydalin, lactose, gluconate, glycerol, D-mannitol, D-mannose, D-melibiose, α -methyl-D-glucoside, raffinose, D-ribose, salicin, D-sorbitol, sucrose, D-trehalose, D-xylose และผนังเซลล์ประกอบด้วย DAP (*meso*-diaminopimelic acid) ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียรูปร่างแท่งสายพันธุ์ AP17-1 ที่แยกจากปลาร้าและ SR4-2 และ SR8-1 ที่แยกจากชีอิ้ว เป็น *Lactobacillus pentosus* (Wayne และ คณะ, 1987; Axelsson, 1998; Tanasupawat และคณะ, 1992; 1998)

แบคทีเรียรูปร่างกลมสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน แล้วมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงร้อยละ 72.1 ถึง 99.6 กับ *Enterococcus faecium* NRIC 1145^T และมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง ร้อยละ 2.7 ถึง 17.1 กับ *E. faecalis* TISTR 379^T นอกจากนี้เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ยังสามารถสร้างกรดจาก L-arabinose, lactose, D-maltose, salicin และ gluconate เจริญในอาหาร MRS ที่มีค่าพีเอช 9.6 เจริญที่ความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์ 6.5, 8.0 เปอร์เซ็นต์ สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ไม่มี DAP (*meso*-diaminopimelic acid) ในผนังเซลล์ และผลิตกรดแลคติกชนิด L ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียรูปร่างกลมสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 ที่แยกจากนมพาสเจอร์ไรซ์ เป็น *Enterococcus faecium* (Wayne และ คณะ, 1987; Facklam และ Collins, 1989; Tanasupawat และคณะ, 1992b; Axelsson, 1998)

เชื้อรูปร่างกลมสายพันธุ์ AP2-1 เมื่อเปรียบเทียบกับ *Weissella confusa* NRIC 0207^T แล้วมีค่าเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงร้อยละ 100.5 นอกจากนี้เชื้อสายพันธุ์ AP2-1 ยังสามารถสร้างเมือกจากน้ำตาลซูโครส 2 เปอร์เซ็นต์ และสลายอาร์จีนีน ไม่มี DAP (*meso*-diaminopimelic acid) ในผนังเซลล์ และผลิตกรดแลคติกชนิด DL ดังนั้นจึงจัดแบคทีเรียรูปร่างกลม สายพันธุ์ AP2-1 ที่แยกจากหมูยอเป็น *Weissella confusa* (Kandler และ Weiss, 1986; Wayne และ คณะ, 1987; Schillinger และคณะ, 1989; Hammes และคณะ, 1992; Collins และคณะ, 1993; Axelsson, 1998; Tanasupawat และคณะ, 1993; 2000)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5 การศึกษาการเจริญ การสร้างกรด การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอิน ของแบคทีเรียกรดแลคติก

5.5.1 แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตอิก ในอาหารเหลว MMRS ปริมาณ 400 มิลลิลิตร ในระดับพลาสติก พบว่า เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณเซลล์สูงสุด อยู่ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมักทั้งสภาวะเขย่าและไม่เขย่า ซึ่งทำให้ทราบถึงระยะต่างๆในการเจริญของเชื้อ คือ ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมักจัดเป็นระยะ late log phase หรือ early stationary phase และหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาหนึ่งพบว่าลักษณะการเจริญของเชื้อจะคงที่และค่อนข้างคงลงในระยะ stationary และ late stationary phase ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอินด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี สามารถตรวจพบ ปริมาณโคอะซีติลในน้ำหมักที่ผลิตโดยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการหมักทั้งสภาวะเขย่าและไม่เขย่า จากข้อมูลที่ได้นี้ทำให้ทราบว่าเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตโคอะซีติล ตั้งแต่ระยะ log phase หรือ exponential phase ของการเจริญ นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตโคอะซีติลของสายพันธุ์ AP17-1 ใกล้เคียงกันทั้งสภาวะเขย่าและไม่เขย่า ส่วนสายพันธุ์ SR4-2 และ SR8-1 สามารถผลิตโคอะซีติลในสภาวะไม่เขย่าสูงกว่าสภาวะเขย่า ซึ่งในระยะ stationary phase สายพันธุ์ SR4-2 สามารถผลิตโคอะซีติลได้สูงถึง 3.35 mM ที่พีเอช 5.74 ในชั่วโมงที่ 30 ของการหมักในสภาวะไม่เขย่าซึ่งสูงกว่าการหมักในสภาวะเขย่าถึง 0.88 เท่า และยังพบว่าการผลิตโคอะซีติลยังคงมีอยู่หลังจากเชื้อเริ่มหยุดการเจริญ (stationary phase) ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Collins (1972); Ray (1992) และค่าการผลิตโคอะซีติลที่ได้้น้อยกว่าการผลิตโคอะซีติลของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 ที่เจริญในอาหาร MRS ที่เติม 100 μM FeCl_3 และ 10 μM hemin แทน triamonium citrate ซึ่งสามารถผลิตได้สูงถึง 8.0 mM และ 4.0 mM ตามลำดับ ในสภาวะเขย่า ซึ่งรายงานโดย Kaneko และคณะ (1991) นอกจากนี้ ยังพบว่าการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ในสภาวะไม่เขย่าจะให้ค่าการผลิตโคอะซีติลที่สูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะเขย่าในอาหารเหลว MMRS ซึ่งตรงข้ามกับการรายงานของ Boumerdassi และคณะ (1996); Bruhu และ Collins (1970) และ Collins (1972)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

5.5.2 แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9

จากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการหมักแบบโฮโมเฟอร์เมนเตอิกในอาหารเหลว MMRS ปริมาณ 400 มิลลิลิตร ในระดับพลาสติก พบว่า เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์มีปริมาณเซลล์สูงสุด อยู่ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก ทั้งสภาวะเขย่าและไม่เขย่าเช่นเดียวกับสายพันธุ์ข้างต้น ซึ่งทำให้ทราบถึงระยะต่างๆ ในการเจริญของเชื้อทั้ง 3 คือ ชั่วโมงที่ 12 ของการหมักจัดเป็นระยะ late log phase หรือ early stationary phase และหลังจากทำการเลี้ยงเชื้อเป็นระยะเวลาหนึ่ง พบว่าลักษณะการเจริญของเชื้อจะคงที่และค่อยๆ ลดลงในระยะ stationary และ late stationary phase ตามลำดับ จากการวิเคราะห์ปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอินด้วยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี สามารถตรวจพบปริมาณโคอะซีติลในน้ำหมักที่ผลิตโดยเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการหมักทั้งสภาวะเขย่าและไม่เขย่า จากข้อมูลที่ได้นี้ทำให้ทราบว่า เชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์สามารถผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอินตั้งแต่ระยะ log phase หรือ exponential phase ของการเจริญ นอกจากนี้ยังพบว่าการผลิตโคอะซีติลของเชื้อสายพันธุ์ทั้ง 3 สายพันธุ์ ในสภาวะไม่เขย่าสูงกว่าสภาวะเขย่า โดยเฉพาะระยะ stationary phase สายพันธุ์ PM3-14 สามารถผลิต โคอะซีติลได้สูงถึง 3.27 mM ที่พีเอช 6.41 ในชั่วโมงที่ 18 ของการหมัก ในสภาวะไม่เขย่าซึ่งสูงกว่าการผลิตในสภาวะเขย่าถึง 0.7 เท่า และยังพบว่าการผลิตโคอะซีติลยังคงมีอยู่หลังจากเชื้อเริ่มหยุดการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Collins (1972); Ray (1992) และค่าการผลิตโคอะซีติลที่ได้น้อยกว่าการผลิตโคอะซีติลของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 ที่เจริญในอาหาร MRS ที่เติม 100 μM FeCl_3 และ 10 μM hemin แทน triammonium citrate ซึ่งสามารถผลิตได้สูงถึง 8.0 mM และ 4.0 mM ตามลำดับ ในสภาวะการให้อากาศ ซึ่งรายงานโดย Kaneko และคณะ (1991) นอกจากนี้ยังพบอีกว่าพบว่าการเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 สายพันธุ์ในสภาวะไม่เขย่าจะให้ค่าการผลิตโคอะซีติลที่สูงกว่าการเลี้ยงในสภาวะแบบเขย่าในอาหารเหลว MMRS ซึ่งตรงข้ามกับการรายงานของ Boumerdassi และคณะ (1996); Bruhu และ Collins (1970) และ Collins (1972)

5.5.3 แบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1

จากผลการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP2-1 ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่มีการหมักแบบเฮเทอโรเฟอร์เมนเตอิกในอาหารเหลว MMRS ปริมาณ 400 มิลลิลิตร ในระดับพลาสติก พบว่า เชื้อสายพันธุ์ AP2-1 มีปริมาณเซลล์สูงสุดของการเจริญ อยู่ในชั่วโมงที่ 12 ของการหมัก ทั้งสภาวะเขย่าและไม่เขย่าเช่นเดียวกับสายพันธุ์ข้างต้น ซึ่งทำให้ทราบถึงระยะต่างๆ ในการเจริญของเชื้อ คือ ชั่วโมงที่ 12 ของการหมักจัดเป็นระยะ late log phase หรือ early stationary phase หลังจากนั้น การเจริญของเชื้อจะคงที่และค่อยๆ ลดลงในระยะ stationary และ late stationary phase ตามลำดับ และหลังจากทำการวิเคราะห์ปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอินด้วยแก๊สโครมาโตกราฟี สามารถตรวจพบปริมาณโคอะซีติลในน้ำหมักตั้งแต่ชั่วโมงที่ 6 ของการหมัก ทั้ง 2 สภาวะที่ทำ

การเลี้ยงเชื้อ จากข้อมูลที่ได้ทำให้ทราบว่าเชื้อสามารถผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอิน ตั้งแต่ระยะ log phase หรือ exponential phase ของการเจริญ นอกจากนี้ยังพบว่าในระยะ stationary phase สายพันธุ์ AP2-1 สามารถผลิตโคอะซีติลได้สูงถึง 3.16 mM ที่พีเอช 7.51 ในช่วงเวลาที่ 30 ของการหมักในสภาวะไม่เขย่าซึ่งผลิตได้สูงกว่าการหมักในสภาวะเขย่าถึง 0.89 เท่า และยังพบว่าการผลิตโคอะซีติลยังคงมีอยู่หลังจากเชื้อเริ่มหยุดการเจริญ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Collins (1972) และ Ray (1992) และค่าการผลิตโคอะซีติลที่ได้้น้อยกว่าการผลิตโคอะซีติลของเชื้อ *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 ที่เจริญในอาหาร MRS ที่เติม 100 μ M FeCl₃ และ 10 μ M hemin แทน triammonium citrate ซึ่งสามารถผลิตได้สูงถึง 8.0 mM และ 4.0 mM ตามลำดับ ในสภาวะการให้อากาศ (Kaneko และคณะ, 1991) นอกจากนี้ ยังพบอีกว่าการเลี้ยงเชื้อในสภาวะไม่เขย่าให้ค่าการผลิตโคอะซีติลที่สูงกว่าสภาวะเขย่าในอาหารเหลว MMRS ซึ่งตรงข้ามกับการรายงานของ Boumerdassi และคณะ (1996); Bruhu และ Collins (1970) และ Collins (1972)



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลการทดลอง

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด จำนวน 137 ไอโซเลต โดยแยกจากนมพาสเจอร์ไรซ์ จำนวน 49 ไอโซเลต นมดิบ จำนวน 40 ไอโซเลต และอาหารหมักคองจำนวน 48 ไอโซเลต และทำการจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมดที่แยกได้โดยอาศัยลักษณะรูปร่างของเซลล์และการสร้างแก๊สจากกลูโคสของเชื้อสามารถจัดกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกออกเป็น 4 กลุ่มคือ กลุ่มแรก เป็นแบคทีเรียพวกรูปร่างแท่งที่ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 52 ไอโซเลต กลุ่มที่ 2 เป็นแบคทีเรียพวกรูปร่างแท่งที่สร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 5 ไอโซเลต กลุ่มที่ 3 เป็นแบคทีเรียพวกรูปร่างกลมที่ไม่สร้างแก๊สจากกลูโคส จำนวน 77 ไอโซเลต และกลุ่มที่ 4 เป็นแบคทีเรียพวกรูปร่างกลมที่สร้างแก๊สจากกลูโคสจำนวน 3 ไอโซเลต และเมื่อนำเชื้อในแต่ละกลุ่มมาทดสอบการผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอินบนอาหารแข็งและอาหารเหลว MMRS พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกรูปร่างแท่งที่สามารถผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอินได้สูงทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว MMRS ได้แก่ สายพันธุ์ AP17-1, AP38-2, AP20-4, SR4-2 และ SR8-1 ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกรูปร่างกลมที่สามารถผลิตโคอะซีติล/อะซีโทอินได้สูงทั้งอาหารแข็งและอาหารเหลว MMRS ได้แก่ สายพันธุ์ PM3-12, PM3-13, PM3-14, PM4-9, AP2-1, AP8-2 และ AP24-3 หลังจากนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่คัดเลือกจำนวน 12 สายพันธุ์ ดังกล่าวมาเลี้ยงในอาหารเหลว MMRS ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง พบว่า แบคทีเรียกรดแลคติกรูปร่างแท่งสายพันธุ์ SR8-1, AP17-1 และ SR4-2 สามารถผลิตโคอะซีติลได้ปริมาณ 2.49, 2.29 และ 2.12 mM ตามลำดับ ส่วนแบคทีเรียกรดแลคติกรูปร่างกลมสายพันธุ์ PM4-9, PM3-13, PM3-14 และ AP2-1 สามารถผลิตโคอะซีติลได้ปริมาณ 2.70, 2.37, 2.35 และ 1.90 mM ตามลำดับ

จากนั้นนำแบคทีเรียกรดแลคติกสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2, SR8-1, PM3-13, PM3-14, PM4-9 และ AP2-1 มาทำการพิสูจน์เอกลักษณ์โดยศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์ต่างๆ ได้แก่ ลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเจริญ สรีรวิทยา ชีวเคมี องค์ประกอบภายในผนังเซลล์ และชนิดไอโซเมอร์ของกรดแลคติก พบว่า สายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Lactobacillus* สายพันธุ์ PM3-13, PM3-14, PM4-9 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Enterococcus* และสายพันธุ์ AP2-1 เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกสกุล *Weissella* หลังจากทำการศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอของเชื้อสายพันธุ์ดังกล่าวโดยใช้เทคนิคดีเอ็นเอไฮบริดไอเซนในไมโครเพลตโดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยไฟโตไบโอดีน พบว่า สายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับ *Lactobacillus pentosus* NRIC 1069^T เท่ากับ 77.2 ถึง 111.6 เปอร์เซ็นต์ สายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 มีเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับ

Enterococcus faecium NRIC 1145^T เท่ากับ 72.1 ถึง 99.6 เปอร์เซ็นต์ และ สายพันธุ์ AP2-1 มี เปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอกับ *Weissella confusa* NRIC 0207^T เท่ากับ 100.5 เปอร์เซ็นต์ ดังนั้น จึงจัดสายพันธุ์ AP17-1, SR4-2 และ SR8-1 เป็นเชื้อ *Lactobacillus pentosus* สายพันธุ์ PM3-13, PM3-14 และ PM4-9 เป็นเชื้อ *Enterococcus faecium* และ สายพันธุ์ AP2-1 เป็นเชื้อ *Weissella confusa*

จากการศึกษาการเจริญ การสร้างกรด การผลิตโคอะซีติลและอะซีโทอินของเชื้อคัดเลือก จำนวน 7 สายพันธุ์ ในอาหารเหลว MMRS พบว่า เชื้อทุกสายพันธุ์มีปริมาณเซลล์สูงสุดอยู่ที่ ชั่วโมงที่ 12 ของการหมักและสามารถผลิตโคอะซีติลตั้งแต่ระยะ exponential phase หรือ log phase ของการเจริญทั้งในสภาวะเขย่าและสภาวะไม่เขย่า นอกจากนี้ยังพบการผลิตโคอะซีติลของเชื้อในระดับที่สูงในระยะ stationary phase ของการเจริญของเชื้อในสภาวะไม่เขย่า คือ ระหว่างชั่วโมงที่ 18 ถึง 36 ของการหมัก แบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิตโคอะซีติลได้สูงจากมากไปน้อยได้แก่ SR4-2, PM3-14, SR8-1, AP2-1, PM4-9, PM3-13 และ AP17-1 โดยสามารถผลิตโคอะซีติลได้สูงถึง 3.35, 3.27, 3.25, 3.16, 3.04, 2.98 และ 2.79 mM ตามลำดับ โดยมีช่วงพีเอชอยู่ระหว่าง 5.74 - 7.51 นอกจากนี้ ยังพบว่าสายพันธุ์ SR4-2 และ AP17-1 สามารถผลิตอะซีโทอินในปริมาณต่ำทั้งในสภาวะเขย่าและไม่เขย่าอีกด้วย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บรรณานุกรม

- Albert, B., Hans, G., Martin, D., Wim, H., and Karl, H. 1992. **The Prokaryotes**, 2nd edition. New York. Springer-Verlag.
- Axelsson, L. 1993. **Lactic acid bacteria : classification and physiology**, pp. 1-63. *In* S. Salminen and A. von Wright (eds.). **Lactic Acid Bacteria** . Marcel Dekker, Inc., New York.
- Axelsson, L. 1998. **Lactic acid bacteria : classification and physiology**, pp. 1-72. *In* S. Salminen and A. von Wright (eds.). **Lactic Acid Bacteria : Microbiology and Function Aspects**. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Balows, A, Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., and Schleifer, K.H. 1992. **The Prokaryotes**, 2rd ed. Vol.II, Springer-Verlag, New York.
- Boumerdassi, H., Desmazzeud, M., Monnet, C., Boquien, C.Y., and Corrieu, G. 1996. "Improvement of diacetyl production by *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CNRZ483 through oxygen control." **J. Dairy Sci.** 79 : 775-781.
- Boumerdassi, H., Monnet, C., Desmazzeud, M., and Corrieu, G. 1997. "Isolation and Properties of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar *diacetylactis* CNRZ483 Mutants Producing Diacetyl and Acetoin from Glucose." **Appl. Environ. Microbiol.** 63(6) : 2293-2299.
- Bruhn, J. C., and Collins, E. B. 1970. "Reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase of *Streptococcus diacetylactis*." **J. Dairy Sci.** 53 : 857.
- Budavari, S. 1991. **The Merck Index, encyclopedia of chemical 's Drugs and Biologicals**. Merck & Co.,Inc. : 2945.
- Carlbert, H. E., and Price, W. V. 1949a. "A study of the diacetyl in cheese. I diacetyl content and flavor of cheddar cheese." **J. Dairy Sci.** 32 : 515.
- Carlbert, H. E., and Price, W. V. 1949b. "A study of the diacetyl in cheese. II The changes in diacetyl content of cheddar cheese during manufacturing and curing." **J. Dairy Sci.** 32 : 521.
- Cathy, J. 1994. "Lactic acid bacteria." **Danone world newsletter**. Volume 5.
- Cerning, J. 1990. "Exocellular polysaccharides produced by lactic acid bacteria." **FEMS Microbiol. Rev.** 87 : 113-130.

- Christensen, M. D., and Pederson, C. S. 1958. "Factors affecting diacetyl production by Lactic Acid Bacteria." **Appl. Microbiol.** 6 : 319-322.
- Chuang L.F., and E.B. Collins. 1968. "Biosynthesis of diacetyl in bacteria and yeast." **J. Bacteriol.** 95 : 2083-2089.
- Cogan, T. M. 1981. "Constitutive nature of the enzymes of citrate metabolism in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*." **J. Dairy Sci.** 48: 489-495.
- Cogan, T. M. 1985. The *Leuconostoc* : milk products, in **Bacterial starter cultures for foods**, Gillilan, S.E., Ed., CRC Press, Boca Raton, FL, chap. 3.
- Collins, E. B. 1972. "Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms." **J. Dairy Sci.** 55 : 1022.
- Collins, M. D., Samelis, J., Metaxopoulos, J. and Wallbanks, S. 1993. "Taxonomix studies on some leuconostoc-like organisms from fermented sausages : description of a new genus *Weissella* for the *leuconostoc paramesenteriodes* group of species." **J. Appl. Bacteriol.** 75 : 595-603.
- de Man J. C., Rogosa, M. and Sharpe, M. E. 1960. "A medium for the cultivation of *lactobacillus*." **J. Appl. Bacteriol.** 23 : 130-135.
- Devriese, L. A., Collins, M. D., Wirth, R. 1991. The genus *Enterococcus*, In *The Prokaryotes* Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K. H., Eds. 2nd Ed., Vol.2. pp. 1465-1481. New York . Springer-Verlag.
- Devriese, L. A. and Pot, B. 1995. The genus *Enterococcus*. pp.327-367. In B.J.B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman and Hall, Glasgow.
- Dicks, L. M. T., F. Dellaglio and M. D. Collins. 1995. "Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [Corrig.] gen. nov." **Int. J. Syst. Bacteriol.** 45: 395-397.
- Elliker, P. R. 1945. "Effect of various bacteria on diacetyl content and flavor of butter." **J. Dairy Sci.** 28: 93.
- Ezaki, T., Y. Hashimoto and E. Yabuuchi. 1989. "Fluorometric deoxyribonucleic acid hybridization in microdilution wells as an alternative to membrane filter hybridization in which radioisotopes are used to determine genetic relatedness among bacterial strains." **Int. J. Syst. Bacteriol.** 39(3) : 224-229.

- Facklam, R. R. and Collins, M. D. 1989. "Identification of *Enterococcus* species isolated from human infection by a convention test scheme." **J. Clinic. Microbiol.** 27 : 731-734.
- Gutierrez, N. A., A. D. Debarr, and I. S. Maddox. 1996. "Production of diacetyl from whey permeate using *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*." **J. Ferment. Bioeng.** 81(2) :183-184.
- Hammes, W. P., Weiss, N., and Holzapfel, W. 1992. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In *The Prokaryotes*, 2nd ed. Vol.II. Chapter 70., Springer-Verlag, New York.
- Harvey, R. J., and Collins, E. B. 1963a. "Role of citrate and acetoin in the metabolism of *Streptococcus diacetylactis*." **J. Bacteriol.** 86 : 1301.
- Harvey, R. J., and Collins, E. B. 1963b. "Citrate transport system of *Streptococcus diacetylactis*." **J. Bacteriol.** 86 :1301.
- Hedgecock, L. W., and Jones, L. R. 1950. Antibacterial activity of diacetyl, in *Bacterial Proceedings. American Society of Microbiology, Washington, D.C.* :127.
- Hugenholz, J., and M. J. C. Starrenburg. 1992. "Diacetyl production by difference strains of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* var. *diacetylactis* and *Leuconostoc spp.*" **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 38: 17-22.
- Jay, J. 1982. "Antimicrobial properties of diacetyl." **Appl. Environ. Microbiol.** 44 : 525-532.
- Kandler, O., and Weiss, N. 1986. Genus *Lactobacillus*. Beijerinck. 1901.212. In *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol.2, ed. By Sneath, H.A., Mair, N.S., Sharpe, M.E., and Holt, J.G., Williams & Wilkins Co., Baltimore : 1208-1234.
- Kaneko, T., M. Takahashi, and H. Suzuki. 1990a. "Acetoin fermentation by citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 grown aerobically in the presence of hemin and Cu^{2+} ." **Appl. Environ. Microbiol.** 56 : 2644-2649.
- Kaneko, T., Y. Watanabe, and H. Suzuki. 1990b. "Enhancement of diacetyl production by diacetyl-resistant mutant of citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 and by aerobic conditions of growth." **J. Dairy Sci.** 73 : 291-298.

- Kaneko, T., Y. Watanabe, and H. Suzuki. 1991. "Differences between *Lactobacillus casei* subsp. *casei* 2206 and citrate-positive *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 3022 in the characteristics of diacetyl production." *Appl. Environ. Microbiol.* 57(10) : 3040-3042.
- Kempler, G. M., and McKay, L. L. 1981. "Biochemistry and genetics of citrate utilization in *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis*." *J. Dairy Sci.* 64 :1527.
- Kempler, G.M. 1983. "Production of flavor compounds by microorganism." *Adv. In Appl. Microbiol.* 29 : 42.
- Komagata, K., and Suzuki, K. 1987. Lipid and cell wall analysis in bacteria systematics. In *Methods in Microbiology*. vol. 19 ed. By Colwell, R. R. and Grigorava, R. Academic Press Limited, London.161-207.
- Kozaki, M. 1992. **Manuals for experiment of lactic acid bacteria**. Asakra Shoten, Tokyo pp. 126 –135. (In Japanese)
- Kuila, R. K., and Ranganathan, B. 1978. "Ultraviolet light-induced mutants of *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* with enhanced acid-or flavor-producing abilities." *J. Dairy Sci.* 61 : 379.
- Lemoigne, M. 1982. "Sur le metabolisme du diacetyle." *C.R. Soc. Biol*, 97, 1479, 1927; cited by Jay, J.M. *Appl. Environ. Microbiol.* 44 : 525.
- Lewenstein, A., Frigerio, G. and Monori, M. 1979. "Biological properties of SF 68, a new approach to the treatment of diarrheal diseases." *Curr. Ther. Res.* 26 : 967-981.
- Lewis, R. J. Sr. 1989. In *Food additive handbook*. Van Nostrand Reinhold, New York.:96.
- Marmur, J. 1961. "A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from Microorganism." *J. Mol. Biol.* 3 : 208-218.
- Marshall, V. M. E. and Law, B. A. 1984. The physiology and growth of dairy lactic acid bacteria. In *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Davies, F. L. and Law, B. A., eds., Elsevier, New York, chap.3.
- Marshall, V. M. E. 1984. Flavor development in fermented milks. In *Advances in the Microbiology and Biochemistry of Cheese and Fermented Milk*, Davies, F. L. and Law, B. A., eds., Elsevier, New York.

- Mattessich, J., and Cooper, J. R. 1989. "The spectrophotometric determination of diacetyl." *J. Anal. Biochem.* 180 : 349 –350.
- McKay, L. L., and Balduin, K. A. 1974. "Altered metabolism in a *Streptococcus lactis* C2 mutant deficient in lactic dehydrogenase." *J. Dairy Sci.* 57 :181.
- Nakazawa, J. 1991. **Functions of fermented milk: challenges for the health sciences.** Elsevier science Publishers Ltd. London.
- Okada, S., Toyoda, T., and Kozaki, M. 1978. "An easy method for the determination of the optical types of lactic acid produced by lactic acid bacteria." *Agric. Biol. Chem.* 42(9) :1781 -1783.
- Orla-Jensen, S. 1919. "The Lactic Acid Bacteria," pp. 81-197. *Cited* by M.E. Stiles and W. H. Holzapfel. Lactic acid bacteria of food and their current taxonomy. *Int. Food. Microbiol.* 36 : 1-29.
- Phalip, V., Schemitt, P., and Dives, C. 1994. "A method for screening diacetyl and acetoin – producing bacteria on agar plates." *J. Basic Microbiol.* 34(4) : 277 – 280.
- Pragna, D., and Tanvi, S. 1977. "Controlled fermentation of vegetables using mixed inoculum of lactic cultures." *J. Food Sci. Technol.* 34(2) :155-158.
- Ray, B. 1992. Diacetyl of Lactic Acid Bacteria as a food biopreservative. In *Food Biopreservatives of Microbial Origin.* CRC Press, Inc. Daeschel, Mark. Chapter 6.137-151.
- Roller, S. 1992. "Biotechnology in the production and modification of biopolymers for foods." *Crit Rev. Biotechnol.* 12 : 261-277.
- Sandine, W. E. 1985. The *Streptococci* : milk products, In *Bacterial Starter Cultures for Foods.* Gilliland, S.E., Ed., CRC Press. Boca Raton. chap. 1.
- Schillinger, U. and W. H. Holzapfel. 1989. "Nucleic acid hybridization studies on *Leuconostoc* and heterofermentative lactobacilli and description of *Leuconostoc amelibiosum* sp. Nov." *System. Appl. Microbiol.* 12 : 48-55.
- Seppo, S., and Atte, W. 1993. **Lactic Acid Bacteria.** Marcel Dekker, Inc, New York.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- Sharpe, M. E. 1981. The genus *Lactobacillus*, In *The Prokaryotes*, A Hand book on Habitates, Isolation and Identification of Bacteria M.P. Starr, H.Stolp, H.G. Truper, A. Balows, and H.G. Schlegel, eds., Spring-Verlag, Berlin .pp. 1653-1674.
- Speckman, R. A., and Collins,E. B. 1968. "Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetylactis* and *Leuconostoc citrovorum*." *J. Bacteriol.* 95 :174.
- Starrenburg, M. J. C., and Hugenholtz, J. 1991. "Citrate fermentation by *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp." *Appl. Environ. Microbiol.* 57(12) : 3535-3540.
- Stiles, M. E. 1989. **Less recognized or presumptive foodborne pathogenic bacteria.** In :M. P. Doyle (editor). *Foodborne Bacterial Pathogens*. Marcel Dekker, New York, pp. 673-733.
- Stiles, M. E. and Holzapfel, W. H. 1997. "Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy." *Int. Food Microbiol.* 36: 1-29.
- Tanasupawat, S., and Daengsubha, W. 1983. "*Pediococcus* species and related bacteria found in fermented foods and related materials in Thailand." *J.Gen. Appl. Microbiol.* 29 : 487-506.
- Tanasupawat, S., Ezaki, T., Suzuki, K., Okada, S., Komagata, K. 1992a. "*Lactobacillus pentosus* and *Lactobacillus plantarum* strains from fermented foods in Thailand." *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 38., 121-134.
- Tanasupawat, S., Okada, S., Suzuki, K., M. Kozaki and K. Komagata. 1992b. "Identification of *Enterococcus hirae*, *E. faecalis*, *E. faecium* and *E. casseliflavus* strains from fermented foods." *Bull.JFCC.* 8 : 86-94.
- Tanasupawat, S., Okada, S., Suzuki, K., M. Kozaki and K. Komagata. 1993. "Lactic acid bacteria, particularly heterofermentative lactobacilli found in fermented foods in Thailand." *Bull. JFCC.* 9 : 65-78.
- Tanasupawat, S. and Komagata, K. 1995. "Lactic acid bacteria in fermented foods in Thailand." *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 253-256.
- Tanasupawat, S., Okada, S., and Komagata, K. 1998. "Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand." *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 44, 193-200.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีคนนำไปใช้

- Tanasupawat, S., Shida, O., Okada, S., and Komagata, K. 2000. "*Lactobacillus acidipiscis* sp. nov. and *Weissella thailandensis* sp. nov., isolated from fermented fish in Thailand." *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50 :1479-1485.
- Teuber, M., Geis, A., Neve, H. 1991. The genus *Lactococcus*, In *The Prokaryotes* Balows, A., Truper, H. G., Dworkin, M., Harder, W., Schleifer, K.H., Eds. 2nd Ed., Vol.2. pp.1482-1501. New York . Springer-Verlag.
- Thornhill, P. J., and Cogan, T. M. 1984. "Use of gas-liquid chromatography to determine the end products of growth of Lactic Acid Bacteria." *Appl. Environ. Microbiol.* 47(6) : 1250-1254.
- Tomaoka, J. 1994. Determination of DNA base composition . In *Chemical method in prokaryotic systematics*. Good fellow, M. and A.G. O'Donnell (eds.) : pp. 463-470, New York; John Wiley and Sons.
- Ushe, T. C. and Nagy, B. 1985. "Inhibition of small intestinal colonization of enterotoxigenic *Escherichia coli* by *Streptococcus faecium* M74 in pigs." *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig.* B181, pp.374-382.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K. and Swings, J. 1996. "Polyphasic taxonomy a consensus approach to bacterial systematics." *Microbiol. Rev.* 60 : 407-438.
- Van Neil, C. B., A. J. Kluyver, and H. G. Derx. 1929. "Uber das Butter-aroma." *Biochem.* 210 : 234-251.
- Vedamuthu, E. R. 1982. Fermented milk, In *Fermented Foods*. Rose, A. H., Ed. Academic Press. New York. p. 203.
- Wayne, L. G., Brenner, D. J., Colwell, R. R., Grimont, P.A. D., Kandler, O., Krichevsky, M. I., Moore, L. H., Moore, W. E. C., Murray, R. G. E., Stackebrandt, E., Starr, M. P., and Truper, H. G., 1987. "Report of the *Ad Hoc* committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics." *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 37, 463-464.
- Windholz, M. 1984. *The Merck Index*. Merck. Rahway. NJ. 428.

Wood, B. J. B., Holzappel, W. H., 1995. *The Genera of Lactic Acid Bacteria*, Blackie Academic & Profession; London.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับบริการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปเผยแพร่โดยไม่ได้รับอนุญาต
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกโดยไม่ได้รับอนุญาตจากผู้จัดทำเอกสารทุกครั้งที่มีคนนำไปใช้

ภาคผนวก ก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

องค์ประกอบของอาหารแต่ละสูตรต่อไปนี้ใช้น้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร และต้องฆ่าเชื้ออาหารที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลานาน 15 นาที

1. Aesculin broth

Aesculin	1	กรัม
Glucose	0.25	กรัม
Ferric citrate	0.25	กรัม
Beef extract	0.5	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.01	กรัม
Tween 80	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร
pH 6.8		

2. Arginine agar

Peptone	0.1	กรัม
NaCl	0.5	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.03	กรัม
L(+) arginine HCl	1.0	กรัม
Phenol	0.001	กรัม
Agar	0.3	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร
pH 6.8		

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. Fermentable carbohydrate broth

Carbohydrate	0.5	กรัม
Yeast extract	0.4	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
Salt solution	0.5	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร
Salt solution :		
MgSO ₄ · 7H ₂ O	4.0	กรัม
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.2	กรัม
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.2	กรัม
NaCl	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	100	มิลลิลิตร

pH 6.8

ต้องฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

4. Glucose yeast extract peptone beef extract broth (GYPB broth)

Glucose	1.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	0.5	กรัม
Beef extract	0.2	กรัม
Sodium acetate	0.3	กรัม
Tween 80	25	มิลลิลิตร
Salt solution	0.5	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

pH 6.8

5. GYPB agar

สูตรเดียวกับ GYPB (ข้อ 4) แต่เติม

Agar	1.5	กรัม
CaCO ₃ **	0.5	กรัม

pH 6.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานภายในเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า

ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งยังมีผลบังคับใช้เฉพาะภายในหน่วยงานเท่านั้น ไม่สามารถนำออกไปใช้

6. MRS broth (de Man และคณะ, 1960)

Glucose	2.0	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Beef extract	1.0	กรัม
Sodium acetate	0.5	กรัม
Ammonium citrate	0.2	กรัม
Tween 80	0.1	กรัม
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.02	กรัม
MnSO ₄ · 4H ₂ O	0.005	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร
pH 6.2 - 6.4		

7. MRS agar

สูตรเดียวกับ MRS broth (ข้อ 7) แต่เติม

Agar	1.5	กรัม
CaCO ₃ **	0.5	กรัม
pH 6.2 - 6.4		

** ใส่กรณีเมื่อต้องการดูการสักรดของแบคทีเรียกรดแลคติก

8. Nitrate broth

Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
NaCl	1.0	กรัม
KNO ₃	0.1	กรัม
Agar	0.1	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้ pH 6.8 ศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. MMRS broth (Phalip และคณะ, 1994)

Glucose	0.18	กรัม
Yeast extract	0.5	กรัม
Peptone	1.0	กรัม
Beef extract	1.0	กรัม
Sodium acetate	0.5	กรัม
Trisodiumcitrate.2H ₂ O	1.29	กรัม
Tween 80	0.15	กรัม
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0.02	กรัม
MnSO ₄ . 4H ₂ O	0.005	กรัม
K ₂ HPO ₄	0.2	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร
pH 6.2 - 6.4		

10. MMRS agar

สูตรเดียวกับ MMRS broth (ข้อ 9) ยกเว้น Beef extract และเติม

Agar	1.5	กรัม
pH 6.2 - 6.4		

11. อาหารแข็งทดสอบการย่อยเคซีน (Casein)

Skim milk (10 เปอร์เซนต์)	10	มิลลิลิตร
MRS agar	990	มิลลิลิตร

เตรียม MRS agar ที่มีส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 1000 มิลลิลิตร แต่เติมน้ำกลั่น 990 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ และเตรียมสารละลาย Skim milk 10 เปอร์เซนต์ นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำ 10 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที หลังจากนั้นเทสารละลาย Skim milk ผสมลงใน MRS agar ที่ปราศจากเชื้อ หลอมผสมให้เข้ากันจึงเทลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

12. อาหารทดสอบการย่อยแป้ง (Starch)

Soluble starch	20	กรัม
MRS agar (ไม่เติม glucose)	1000	มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้า ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

สารเคมีและวิธีวิเคราะห์ทางเคมี

1. สีย้อมแกรม (Hucker modification)

1.1 Ammonium oxalate crystal violet

Solution A :	Crystal violet	2.0	กรัม
	Ethyl alcohol	20	มิลลิลิตร
Solution :	Ammonium oxalate	0.8	กรัม
	Distilled water	80	มิลลิลิตร

1.2 Lugol's solution

Iodine	1.0	กรัม
KI	2.0	กรัม
Distilled water	300	มิลลิลิตร

1.3 Counterstain solution

Safranin O (2.5% solution in 95% ethanol)	10	มิลลิลิตร
Distilled water	100	มิลลิลิตร

วิธีการย้อม

นำสไลด์ที่ทำการ smear เชื้อแล้วมาทำให้แห้ง และ fix โดยผ่านไคความร้อนของ ตะเกียงแอลกอฮอล์ แล้วย้อมด้วยสารละลาย Ammonium oxalate crystal violet นาน 1 นาที ล้างสี ออกด้วยน้ำแล้วหยดสารละลาย Lugol's solution ลงไป ปล่อยให้ย้อมนาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำแล้วซับ ให้แห้ง หยด Ethyl alcohol เข้มข้น 95 เปอร์เซ็นต์ลงไป decolorize ซับให้แห้งแล้วย้อมทับด้วย Counterstain solution นาน 10 วินาที แล้วล้างน้ำและทำให้แห้ง เสร็จแล้วนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ถ้าเชื้อติดสีของ crystal violet แสดงว่าเป็นเชื้อแกรมบวกแต่ถ้าติดสีแดงของ Safranin O แสดงว่าเป็นเชื้อแกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ทำการฉีกๆทิ้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. สารทดสอบ (diacetyl-acetoin detection overlay)

2.1 Solid medium

Agar (MERCK)	4.5	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

2.2 Reaction mixture

2.2.1 Creatine solution

creatine	0.5	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

2.2.2 α -naphthol solution

α -naphthol	7.5	กรัม
NaOH	10	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

หมายเหตุ ต้องทำการเตรียมส่วนผสมของสาร Reaction mixture ก่อนที่จะนำมาผสมรวมกับ Solid medium

วิธีการเตรียม DAD overlay

ทำการชั่งน้ำหนักปริมาณ 4.5 กรัม แล้วผสมรวมกับน้ำกลั่น ปริมาณ 100 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปหลอมให้ร้อนละลายด้วยเตาหลอมไมโครเวฟ นาน 7 นาที แล้วทำการลดอุณหภูมิให้เหลือต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส โดยใช้แท่งแก้วคนให้ร้อนผสมรวมเป็นเนื้อเดียวกัน แล้วทำการเติมสาร Reaction mixture ประกอบด้วย Creatine solution 3 มิลลิลิตร และ α -naphthol solution 3 มิลลิลิตร ลงไปผสมกับ Solid medium ปริมาตร 12 มิลลิลิตร แล้วใช้แท่งแก้วคนสารละลายทั้ง 2 ให้เข้ากันก็จะได้สารทดสอบตามที่ต้องการ

3. Hydrogen peroxide solution

Hydrogen peroxide	3.0	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันเก็บใส่ขวดสีชา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4. Nitrate test solution

Solution A :	sulfanilic acid	0.8	กรัม
	Acetic acid (5N)	100	มิลลิลิตร
ละลาย sulphanilic acid ใน acetic acid โดยให้ความร้อนเล็กน้อย			
Solution B :	Dimethyl-naphthylamine	0.06	กรัม
	Acetic acid (5N)	100	มิลลิลิตร

5. Mixed indicator

Bromthymol blue	0.2	กรัม
Neutral red	0.1	กรัม
Ethanol	300	มิลลิลิตร

6. การวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดแลคติก

6.1 การสกัดกรดแลคติก

6.1.1 เเพาะเชื้อลงในอาหารเหลว MRS (ที่ไม่ใส่โซเดียมอะซิเตด) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3-5 วัน

6.1.2 นำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเร็วที่ 7,000 รอบต่อนาที นำส่วนน้ำใสมาปรับพีเอชด้วย 1N HCl ประมาณ 2 หยด และเติมผงแอคติเวเทดคาร์บอน (activated carbon) ลงไปให้มากพอเพื่อกำจัดเอ็นเอดี (NAD)

6.1.3 นำส่วนผสมที่ได้จากข้อ 6.1.2 ไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 2-3 นาที แล้วกรองผงแอคติเวเทดคาร์บอนออก

6.1.4 นำสารละลายที่ได้จากข้อ 6.1.3 ไปทำให้แห้งโดยวิธีไลโอไฟล์ไลต์ แล้วหยด 1N HCl 1 หยด และเติมไดเอทิลอีเทอร์ ปริมาตร 7-8 มิลลิลิตร ปั่นผสมและเก็บไว้ค้างคืน

6.1.5 นำชั้นของไดเอทิลอีเทอร์ใส่ในหลอดทดลองและระเหยไดเอทิลอีเทอร์ โดยใช้อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 40 - 50 องศาเซลเซียส จนแห้ง

6.1.6 เติมน้ำกลั่น ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดทดลอง สารละลายนี้คือ สารละลายกรดแลคติก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

6.2 การเตรียมสารละลายโซเดียมแลคเตต

6.2.1 ไทเทรต 1 มิลลิลิตร ของสารละลายกรดแลคติก (จากข้อ 6.1.6) ด้วย 0.01 N NaOH โดยใช้ฟีนอล์ฟทาลีนเป็นตัวบ่งชี้ คำนวณปริมาณกรดแลคติก

6.2.2 นำสารละลายจากข้อ 6.1.6 ที่มีกรดแลคติกประมาณ 8-12 มิลลิกรัม มาปรับพีเอชเป็น 7.5 ด้วย 0.01 N NaOH

6.2.3 เจือจางสารละลายที่ได้ด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จะได้สารละลายโซเดียมแลคเตตที่จะใช้เป็นสารตั้งต้นในการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ดี-แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (D-lactate dehydrogenase, D-LDH) และเอนไซม์แอล-แลคเตตดีไฮโดรจีเนส (L-lactate dehydrogenase, L-LDH)

6.2.4 เตรียมสารละลายมาตรฐานโซเดียมแลคเตต (DL-lactate) เช่นเดียวกับวิธีข้างต้น

6.3 ปฏิริยาเอนไซม์

6.3.1 นำสารตั้งต้น (สารตัวอย่างและสารละลายมาตรฐาน) คือสารละลายโซเดียมแลคเตต แบ่งใส่หลอดทดลองหลอดละ 3 มิลลิลิตร รวม 3 หลอด

หลอดที่ 1 เติม น้ำกลั่น ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเอ็นเอดี ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร เพื่อเป็นหลอดควบคุม

หลอดที่ 2 เติมทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 8.1 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเอ็นเอดี ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์ดี-แลคเตตดีไฮโดรจีเนส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (100 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

หลอดที่ 3 เติมทริสบัฟเฟอร์ พีเอช 7.5 ปริมาตร 0.4 มิลลิลิตร และเอ็นเอดี ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร และเติมเอนไซม์แอล-แลคเตตดีไฮโดรจีเนส ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (100 หน่วยต่อมิลลิลิตร)

6.3.2 ปลอ่ยให้เกิดปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงของเอ็นเอดีเอชที่เกิดจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ ด้วยเครื่องสเปกโทรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

6.3.3 หาค่าอัตราส่วน D/L ของกรดแลคติกโดยคำนวณจากค่าปฏิกิริยาของกรดแลคติกกับเอนไซม์ดี-แลคเตตดีไฮโดรจีเนส และกรดแลคติกกับเอนไซม์แอล-แลคเตตดีไฮโดรจีเนส อัตราส่วนระหว่าง D/L ของกรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้น เรียกว่า S_R (sample ratio)

และอัตราส่วนระหว่าง D/L ของกรดแลคติกมาตรฐาน (DL-lactate) เรียกว่า B_R (basic ratio) นำค่าต่างๆ ที่ได้จากปฏิกิริยาของเอนไซม์มาแทนค่าในสูตร

$$[E] = 1 - S_R / B_R$$

การตัดสินใจว่ากรดแลคติกที่แบคทีเรียสร้างขึ้นเป็นไอโซเมอร์ใดทำตามข้อกำหนดดังนี้ (Kozaki, 1992)

+1.00	≥	[E]	≥	+0.92	: L	}	L
+0.92	≥	[E]	≥	+0.54	: L+DL		
+0.54	>	[E]	≥	+0.05	: DL + L	}	DL
+0.05	>	[E]	≥	-0.15	: DL		
-0.15	≥	[E]	>	-1.00	: DL+D	}	D
-1.00	≥	[E]	>	-16.00	: D+DL		
-16.00	≥	[E]			: D	}	

7. การศึกษาความคล้ายคลึงทางดีเอ็นเอ (DNA-DNA homology)

ของแบคทีเรียกรดแลคติกคัดเลือก

7.1 การแยกและการทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์

7.1.1 เติ้มเชื้อในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 400 มิลลิลิตร ที่เติมไกลซีน(glycine)

1-1.5 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง

7.1.2 เก็บเซลล์โดยการปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น (refrigerated centrifuge) 7,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ล้างเซลล์ 2 ครั้ง ด้วยสารละลายซาลินอดีดีทีเอพีเอช 8.0

7.1.3 ทำให้เซลล์แตกด้วยเอนไซม์ไลโซไซม์ (lysozyme) 10 มิลลิกรัม บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที หรือมากกว่า 30 นาที จนกว่าสารละลายจะมีลักษณะหนืดขึ้น

7.1.4 เติ้ม 1 มิลลิลิตร ของทริสเอสบีเอส และ 6-8 มิลลิลิตร ของทริสบีเอส-เฟอรัฟพีเอช 9.0 เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

7.1.5 เติ้มสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

7.1.6 สารละลายจะแบ่งเป็น 2 ชั้น ชั้นล่างคือสารละลายฟีนอล-คลอโรฟอร์ม ส่วนชั้นบนคือสารละลายดีเอ็นเอ ให้ดูดสารละลายส่วนบนย้ายไปลงในหลอดใหม่ เติ้มสารละลาย

ฟีนอล-คลอโรฟอร์ม 5-10 มิลลิลิตร ลงไปซ้ำอีกครั้งเขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จึงนำไปปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็น 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที

7.1.7 ลูคัสสารละลายดีเอ็นเอส่วนบน มาตกตะกอนดีเอ็นเอด้วยเอทานอล (แช่เย็น) 95 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร และพันสายดีเอ็นเอที่ตกตะกอนด้วยแท่งแก้ว

7.1.8 ล้างสายดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 เปอร์เซ็นต์ และ 95 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ปล่อยให้สายดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง

7.1.9 ละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายซาไลน์โซเดียมซิเตรต (0.1xSSC) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

7.1.10 ทำดีเอ็นเอให้บริสุทธิ์จากอาร์เอ็นเอ (RNA) ด้วยเอนไซม์อาร์เอ็นเอสเอ ปริมาตร 0.3 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

7.1.11 เติม 0.5 มิลลิลิตร ของสารละลายซาไลน์โซเดียมซิเตรต (10xSSC) และ 5 มิลลิลิตร ของสารละลายฟีนอลคลอโรฟอร์ม เขย่าให้เข้ากันเป็นเวลา 30 นาที จึงปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเย็นที่ 12,000 รอบต่อนาที

7.1.12 นำสารละลายดีเอ็นเอชั้นบนมาตกตะกอนดีเอ็นเอ ด้วยเอทานอล (แช่เย็น) 95 เปอร์เซ็นต์ และพันสายดีเอ็นเอด้วยแท่งแก้ว

7.1.13 ล้างดีเอ็นเอด้วยเอทานอล 70 และ 95 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ดีเอ็นเอแห้งที่อุณหภูมิห้อง และละลายดีเอ็นเอด้วยสารละลายซาไลน์โซเดียมซิเตรต (0.1xSSC)

7.1.14 นำสารละลายดีเอ็นเอไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 นาโนเมตร เพื่อตรวจสอบความบริสุทธิ์และปริมาณของดีเอ็นเอ หากดีเอ็นเอยังไม่บริสุทธิ์ให้ทำซ้ำ (ข้อ 7.1.10 – 7.1.13)

7.2 ดีเอ็นเอไฮบริดเซชันโดยการติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยฟอสโฟอามิโน

ขั้นตอนการทำดีเอ็นเอไฮบริดเซชันในไมโครเพลต เป็นดังนี้

7.2.1 การตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยวลงในไมโครเพลต

7.2.1.1 นำ 10 ไมโครกรัม ของสารละลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ต้องการพิสูจน์เอกลักษณ์ (DNA unknown) สารละลายดีเอ็นเอของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐาน ซึ่งใช้เป็นดีเอ็นเอสายพันธุ์อ้างอิง (reference strain) และสารละลายดีเอ็นเอของคาล์ฟไทมัส (calf thymus) ซึ่งเป็นดีเอ็นเอควบคุม ใต้อินหลอด eppendorf

เอกสารนี้เป็นเอกสาร ผลงาน วิทยาศาสตร์ การใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.2.1.2 นำดีเอ็นเอไปต้มในน้ำเดือดเป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอสายคู่แยกเป็นดีเอ็นเอสายเดี่ยว และทำให้เย็นทันทีเพื่อทำให้เกิดดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่สมบูรณ์

7.2.1.3 เติมนสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร น้ำกลั่น 0.3 มิลลิลิตร และ 0.1 M $MgCl_2$ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ ผสมให้เข้ากันโดยการเขย่าเบา ๆ

7.2.1.4 คุก 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายดีเอ็นเอสายเดี่ยว ใส่ใน ไมโครเพลต (2 ช่อง) บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

7.2.1.5 เติมนสารละลายในหลุมไมโครเพลตทิ้งไปและทำให้แห้งที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.2.1.6 นำดีเอ็นเอสายเดี่ยวที่ตรึงในไมโครเพลตไปใช้ในขั้นตอนการทำไฮบริดเชชันต่อไป (ข้อ 7.2.3) หรือสามารถเก็บไว้ในภาชนะดูความชื้น

7.2.2 การติดฉลากโพรบดีเอ็นเอด้วยโฟโตไบโอติน

7.2.2.1 นำ 1 ไมโครกรัม ของสารละลายดีเอ็นเอ ของแบคทีเรียสายพันธุ์มาตรฐานลงในหลอด eppendorf เติมนสารละลายโฟโตไบโอติน (ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ในอัตราส่วนดีเอ็นเอต่อโฟโตไบโอติน เท่ากับ 1 : 1.5

7.2.2.2 นำไปฉายแสงโดยนำหลอด eppendorf ที่มีสารละลายดีเอ็นเอและโฟโตไบโอตินแช่ในอ่างน้ำแข็ง และฉายแสงด้วย Sunlamp เป็นเวลา 25 นาที

7.2.2.3 เติมนทรินไฮโดรคลอไรด์บัฟเฟอร์ ทีเอช 9.0 ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร

7.2.2.4 กำจัดโฟโตไบโอตินที่เหลือด้วยบิวทานอล ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน และปั่นแยกด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงปรับความเร็วที่ 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 นาที (ทำ 2 ครั้ง)

7.2.2.5 คุดสารละลายส่วนบนทิ้ง นำสารละลายส่วนล่าง คือสารละลายดีเอ็นเอที่ติดฉลากด้วยโฟโตไบโอติน (biotinylated DNA) ต้มในน้ำเดือด เป็นเวลา 15 นาที แล้วทำให้เย็นทันทีในน้ำแข็ง

7.2.2.6 นำไปผ่านเครื่องต้นความถี่สูง เป็นเวลา 3 นาที เพื่อให้ดีเอ็นเอเป็นชิ้นเล็ก (200-800 เบส)

7.2.2.7 หลังจากนั้นนำไปใส่ในสารละลายไฮบริดเชชัน ปริมาตร 1 มิลลิลิตร เพื่อทำการไฮบริดเชชันในข้อ 7.2.3 ต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารผลงานวิจัยสำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น มิอนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

7.2.3 การไฮบริไดเซชัน

7.2.3.1 นำไมโครเพลตที่ทำการตรึงดีเอ็นเอสายเดี่ยว จากข้อ 3.2.1 มาเติม 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายฟรีไฮบริไดเซชัน นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

7.2.3.2 เทสารละลายในไมโครเพลตทิ้ง และเติม 0.1 มิลลิลิตร ของสารละลายไฮบริไดเซชัน (โพรบดีเอ็นเอ) บ่มที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

7.2.4 การตรวจสอบไฮบริไดเซชัน

7.2.4.1 เทสารละลายไฮบริไดเซชันในไมโครเพลต ทิ้งไปและล้างแต่ละหลุมด้วย 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายซาไลน์โซเดียมซัลเฟต (0.2xSSC) (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

7.2.4.2 เติม 0.2 มิลลิลิตร ของสารละลายอัลบูมินโบวีน บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

7.2.4.3 เทสารละลายอัลบูมินโบวีนที่อยู่ในไมโครเพลตทิ้ง และเติม 0.1 มิลลิลิตรของเอนไซม์เปอร์ออกซิเดสที่เชื่อมติดกับสเตรปทาวิน บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที

7.2.4.4 เทสารละลายเอนไซม์ทิ้ง และล้างด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ (ทำซ้ำ 3 ครั้ง)

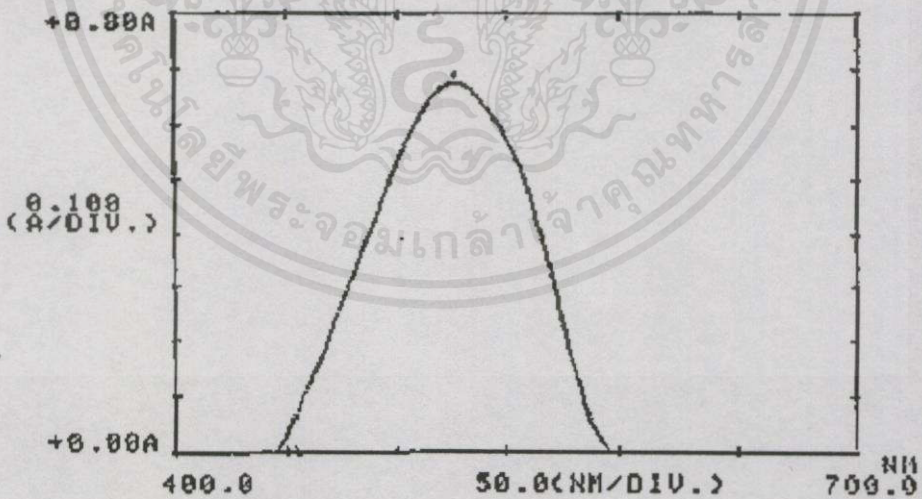
7.2.4.5 เติม 0.1 มิลลิลิตรของสารละลายเททราเมทิลเบนซิดีนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที

7.2.4.6 หยุดปฏิกิริยาด้วย 2 N H_2SO_4 และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร ด้วยเครื่องอ่านไมโครเพลต (microplate reader, Biorad รุ่น 3550)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

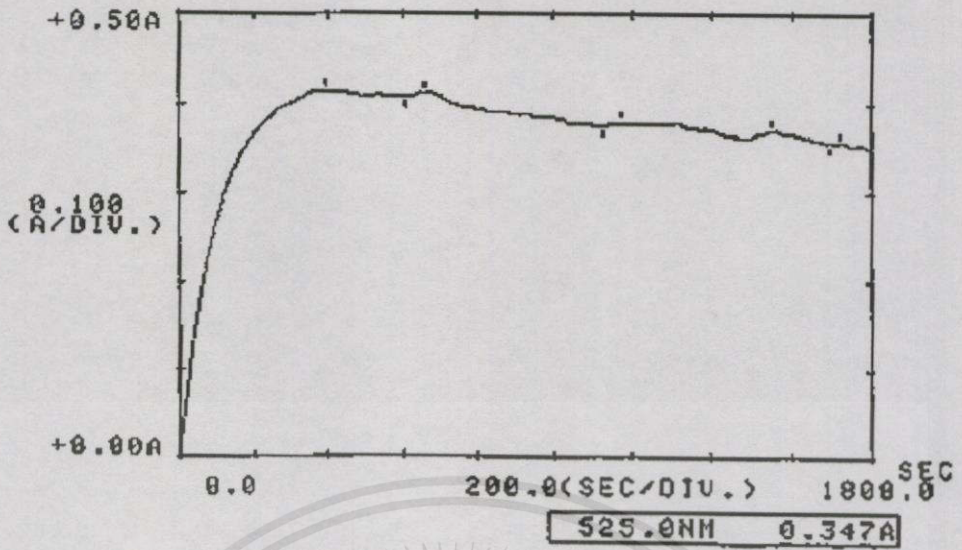
8. การหาค่า λ_{\max} และเวลาของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดระหว่างสารผสมทดสอบ reaction mixture กับสารมาตรฐานไดอะซีติล

นำสารละลายมาตรฐานไดอะซีติลมาทำให้เจือจางที่ความเข้มข้นไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วบีบฉีดสายละลายใส่ลงในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายครีเอทีน (creatine) 0.5 เปอร์เซ็นต์ ปริมาณ 1 มิลลิลิตร และ สารละลาย แอลฟาแนฟทอล (α -Naphthol) 7.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ใน 2.5 N NaOH ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 7 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็ว นำสารผสมไปวัดค่า λ_{\max} ของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดระหว่างสารผสมทดสอบ reaction mixture กับสารมาตรฐานไดอะซีติล ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (UV-160; Shimadzu, Kyoto, Japan) โดยเลือก MODE SPECTRUM และกำหนดค่า λ เริ่มต้น (λE) เท่ากับ 400 นาโนเมตร ค่า λ สุดท้าย (λS) เท่ากับ 700 นาโนเมตร เสร็จแล้ว SET BLANK และกดปุ่ม START เครื่องจะทำการวัดค่า λ_{\max} ของสารอย่างรวดเร็วและแปรผลออกมา ดังภาพที่ 1 ส่วนการหาเวลาการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดของสารมาตรฐานไดอะซีติลกับ reaction mixture หาได้โดยเลือก MODE TIME SCAN และกำหนดค่า ความยาวคลื่น (λ_{\max}) ที่ได้รับการทดลองข้างต้น คือ 525 นาโนเมตร (ภาพที่ 1) กำหนดค่าเวลาเป็นวินาที (second) SET BLANK และกดปุ่ม START เครื่องจะทำการ SCAN หาค่าเวลาของการเกิดปฏิกิริยาของสารในทุกๆวินาทีจนครบเวลาที่ตั้งไว้และแปรผลออกมา ดังภาพที่ 2



ภาพที่ 1 แสดงค่า λ_{\max} ของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดระหว่างสารผสมทดสอบ reaction mixture กับสารมาตรฐานไดอะซีติล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาค้นคว้าเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะครั้งใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

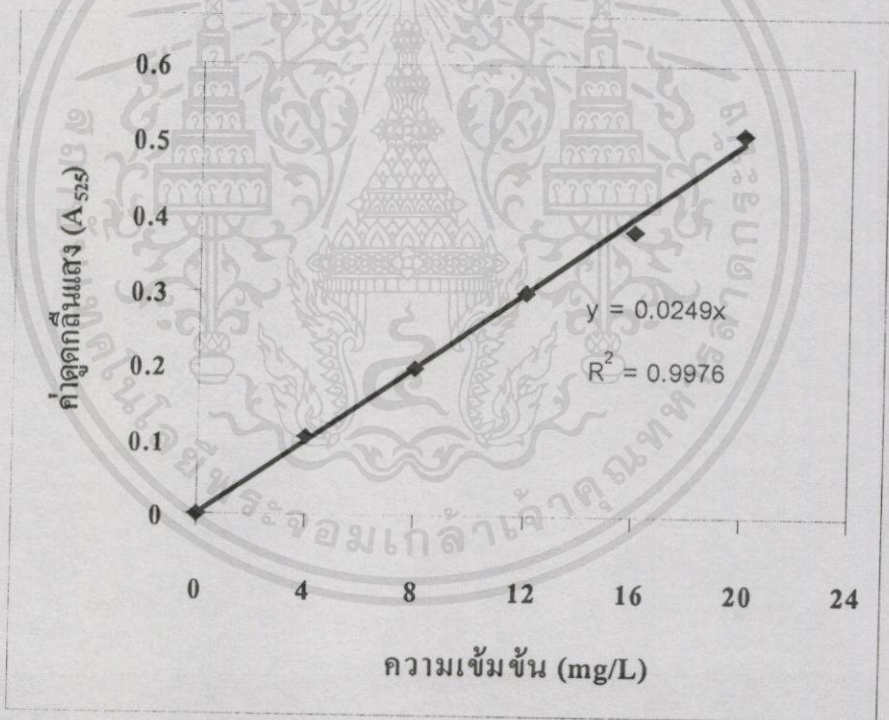


ภาพที่ 2 แสดงเวลา (วินาที) ของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดระหว่างสารผสมทดสอบ reaction mixture กับสารมาตรฐานไดอะซีติล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. การหากราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โคอะซีติล

นำค่า λ_{\max} และเวลาของการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดระหว่างสารผสมทดสอบ reaction mixture กับสารมาตรฐานโคอะซีติล ที่ได้จากข้อ 8 มาหากราฟมาตรฐานสำหรับวิเคราะห์โคอะซีติล โดยเตรียมสารละลายมาตรฐานโคอะซีติลให้มีความเข้มข้น 4, 8, 12, 16 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ปิเปตต์แต่ละความเข้มข้นของสารมาใส่ลงในหลอดทดลอง หลอดละ 1 มิลลิลิตร เติมสารละลายครีเอทีน (creatin) 0.5 เปอร์เซ็นต์ 1 มิลลิลิตร และ สารละลายแอลฟา-แนฟทอล (α - Naphthol) 7.5 เปอร์เซ็นต์ ที่ละลายอยู่ใน 2.5 N NaOH ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้เป็น 7 มิลลิลิตรด้วยน้ำกลั่น แล้วผสมให้เข้ากันอย่างรวดเร็วและทิ้งไว้ให้เกิดปฏิกิริยา นาน 9 นาที (จากข้อมูลในภาพที่ 2) นำสารผสมไปวัดค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) ด้วยสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่น 525 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับความเข้มข้นของโคอะซีติลที่ระดับต่างๆ ดังภาพที่ 3



ภาพที่ 3 แสดงกราฟมาตรฐานของโคอะซีติล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะในรูปแบบใดก็ตาม อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10. การวิเคราะห์ไโคอะซีติลและอะซีโทอินด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโตกราฟี (ดัดแปลงจากวิธีการของ Thornhill และ Cogan (1984))

10.1 การหาค่า Retention time (t_R) ของสารละลายมาตรฐานไโคอะซีติล อะซีโทอิน และ สารละลายมาตรฐาน internal standard (n - butanol)

นำสารละลายมาตรฐานไโคอะซีติล อะซีโทอิน และ สารละลายมาตรฐาน internal standard (n-butanol) ที่มีความเข้มข้น 300, 300, และ 0.0125 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ตามลำดับ มาปริมาณ อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร มาผสมกับอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากเชื้อ และน้ำกลั่น ปริมาณอย่างละ 0.7 และ 0.2 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการฉีดสารมาตรฐานแต่ละชนิด ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ที่มีสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ตามตารางที่ 13 จะได้โครมาโทแกรมออกมาที่แตกต่างกันตามค่า Retention time (t_R) ของสารแต่ละชนิด ซึ่งจะได้ Retention time (t_R) ของไโคอะซีติล เท่ากับ 0.67, Retention time (t_R) ของ internal standard (n-butanol) เท่ากับ 1.19 และ Retention time (t_R) ของอะซีโทอิน เท่ากับ 2.67 ดังภาพที่ 5

10.2 การทำ Calibration curve

ปีเปตต์สารละลายมาตรฐานของ ไโคอะซีติล (diacetyl) และอะซีโทอิน (acetoin) ที่มีความเข้มข้น 1000, 2000, 3000, 4000 และ 5000 มิลลิกรัม/ลิตร อย่างละ 0.1 มิลลิลิตร มาผสมกับสารละลายมาตรฐาน internal standard (n-butanol) ที่มีความเข้มข้น 0.125 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) ปริมาณ 0.1 มิลลิลิตร และเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ (ปราศจากเชื้อ) ที่ใช้สำหรับเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียกรดแลคติก ปริมาณ 0.7 มิลลิลิตร จะได้สารละลายผสมที่ประกอบด้วย ไโคอะซีติล และ อะซีโทอิน เข้มข้น อย่างละ 100, 200, 300, 400 และ 500 มิลลิกรัม/ลิตร ในสารละลายมาตรฐาน internal standard 0.0125 เปอร์เซ็นต์ (ปริมาตร/ปริมาตร) จากนั้นทำการฉีดสารละลายผสมที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาณ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ที่มีสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ตามตารางที่ 1 จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานต่อพื้นที่ใต้พีคของสารละลาย internal standard (n-butanol) แล้ว plot กราฟ ระหว่างความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน กับอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐานต่อพื้นที่ใต้พีคของสารละลาย internal standard (n-butanol) จะได้ standard curve สำหรับวิเคราะห์ไโคอะซีติลและ อะซีโทอิน ดังภาพที่ 4

ทั้งนี้ อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

10.3 การเตรียมตัวอย่างวิเคราะห์

นำน้ำหมักมาทำการหมุนเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบ/นาที นาน 10 นาที และนำมากรองด้วยค้วยกระดาษกรอง ขนาด 0.45 ไมครอน จากนั้นปั่นปดต์ส่วนใส (supernatant) ปริมาณ 0.7 มิลลิลิตร ผสมกับน้ำกลั่น และ สารละลายมาตรฐาน internal standard (n-butanol) อย่างละ 0.2 และ 0.1 มิลลิลิตร ตามลำดับ จากนั้นทำการฉีดสารละลายผสมที่ความเข้าต่างๆ 1 ไมโครลิตร เข้าเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี ที่มีสภาวะที่เหมาะสมของเครื่อง ตามตารางที่ 1 จากนั้นคำนวณหาอัตราส่วนของพื้นที่ใต้พีคของสารละลายตัวอย่างต่อพื้นที่ใต้พีคของสารละลาย internal standard (n-butanol) และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาปริมาณ ไคอะซีติลและอะซีโทอิน ตามสมการเส้นตรงของ Standard curve ดังภาพที่ 4

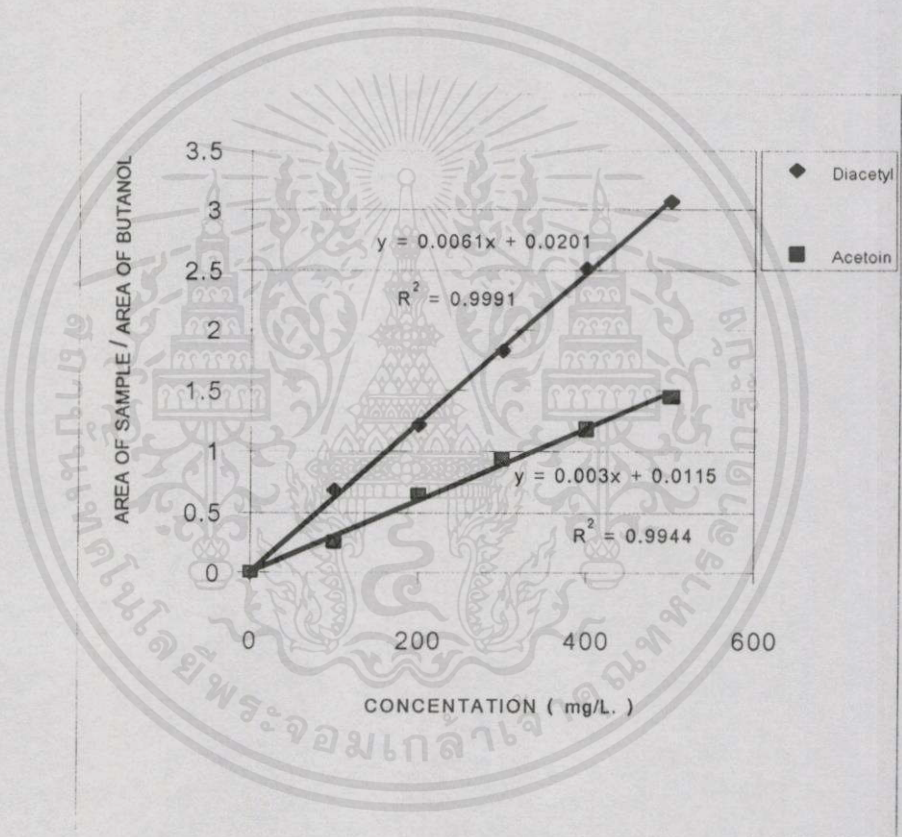
ตารางที่ 1 สภาวะที่เหมาะสมของเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

GC Parameter	GC Condition
Pack Column	10 % CW-20M+2%KOH ON CSORB WAW 80/100 MESH Dimension 6' x 1/4" x 2 mm GLASS T-MAX 250°C
Carrier gas	N ₂ , 30 ml/min flow rate
Supply gas	H ₂ , 30 ml/min flow rate Air 3000 ml/min flow rate
Column temperature	120 °C
Injection temperature	190 °C
Detector	FID, 190 °C
Internal standard	BUTANOL bp.; 117.7 °C
Standard	DIACETYL, bp.; 88 °C / ACETOIN, bp.; 148 °C

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 อัตราส่วนพื้นที่ใต้พีคของสารละลายมาตรฐาน ไดอะซีทิลและอะซีโทอิน

ความเข้มข้น (mg/L)	Peak area [std.diacetyl/int. std.]	Peak area [std.acetoin /int. std.]
0.0	0.0	0.0
100	0.49	0.26
200	1.05	0.52
300	1.53	0.79
400	2.08	1.11
500	2.57	1.40

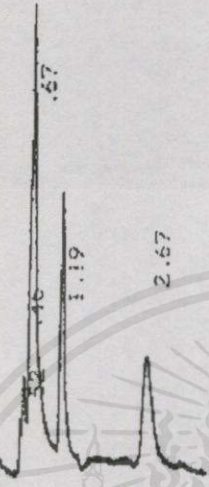


ภาพที่ 4 แสดง calibration curve ของ ไดอะซีทิลและอะซีโทอิน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CHANNEL A INJECT 06/20/01 04:40:15 STORED TO BIN #

Std. 300 mg/L
n-butanol 0.0125 % (v/v)



DATA SAVED TO BIN # 6

06/20/01 04:40:15 CH#

FILE #	METHOD #	RT	AREA	BC
1	1	0.46	1.938	199.02
2	1	0.52	5.24	538.02
3	1	0.67	53.153	5458.03
4	1	1.19	20.403	2695.01
5	1	2.67	19.264	1978.01
TOTAL				10266

ภาพที่ 5 โครมาโทแกรมและค่า R ของสารละลายมาตรฐาน ไดอะซีดีล, อะซีโทอินที ความเข้มข้น 300, 300 mg/L และ internal standard (butanol) เข้มข้น 0.0125 % (v/v)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ไฮอะซีติล และ อะซีโทอิน หลังทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว MMRS 250 มิลลิลิตรนาน 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยเครื่องแก๊สโครมาโตกราฟี

รหัสเชื้อ	รูปร่าง	การเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะเขย่า				การเลี้ยงเชื้อแบบสภาวะไม่เขย่า			
		ปริมาณ diacetyl		ปริมาณ acetoin		ปริมาณ diacetyl		ปริมาณ acetoin	
		(mg/L)	(mM)	(mg/L)	(mM)	(mg/L)	(mM)	(mg/L)	(mM)
AP2-1	กลม	163.63	1.90	ND	ND	128.12	1.49	311.10	3.53
AP8-2	กลม	129.05	1.50	ND	ND	84.76	0.98	174.78	2.83
AP24-3	กลม	119.68	1.39	8.60	0.10	97.57	1.13	272.78	3.09
PM3-12	กลม	166.80	1.94	239.20	2.72	184.64	2.14	101.64	1.65
PM3-13	กลม	204.18	2.37	230.71	2.62	96.22	1.12	103.17	1.17
PM3-14	กลม	136.91	1.59	214.32	2.43	202.71	2.35	103.70	1.18
PM4-9	กลม	116.16	1.35	146.98	1.67	232.67	2.70	128.30	1.46
AP17-1	แท่ง	197.39	2.29	15.69	0.18	112.54	1.31	36.52	0.59
AP20-4	แท่ง	168.67	1.96	10.49	0.12	119.63	1.39	5.96	0.09
AP38-2	แท่ง	81.70	0.95	38.57	0.44	65.35	0.76	351.83	3.99
SR4-2	แท่ง	182.39	2.12	9.19	0.10	112.84	1.13	12.36	0.14
SR8-1	แท่ง	126.36	1.47	19.49	0.22	214.88	2.49	460.91	5.23

ND, Not detected by GC; Diacetyl (M.W. 86.09); Acetoin (M.W. 88.10)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษานั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 2 ค่าความขุ่น พีเอช ปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอิน ของเชื้อสายพันธุ์ AP17-1 หลังทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ในอาหารเหลว MMRS 400 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่น (O.D.at 575nm)		ค่าพีเอช (pH)		ปริมาณโคอะซีติล (mM)*		ปริมาณอะซีโทอิน (mM)*	
	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า
0	0.00	0.00	6.57	6.57	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.44	0.42	5.77	5.79	1.52	1.01	ND	ND
12	0.59	0.57	5.78	5.75	1.61	1.10	0.59	ND
18	0.55	0.52	5.79	5.72	1.93	2.05	0.58	0.51
24	0.55	0.46	5.80	5.74	2.76	2.79	0.56	0.48
30	0.55	0.47	5.80	5.76	2.55	2.54	0.75	0.78
36	0.55	0.49	5.83	5.79	2.37	2.41	0.68	0.70
42	0.56	0.49	5.80	5.78	2.17	1.94	0.51	1.18
48	0.55	0.49	5.82	5.81	1.92	1.92	0.44	1.09
54	0.56	0.48	5.78	5.82	1.74	2.04	0.44	0.78
60	0.55	0.48	5.79	5.87	1.59	2.05	0.47	0.51
66	0.54	0.44	5.81	5.90	1.51	2.05	0.40	0.48
72	0.51	0.42	5.80	5.91	1.43	1.99	0.40	0.58
96	0.48	0.42	5.80	6.00	1.37	1.96	0.49	0.59
120	0.42	0.38	5.78	6.15	1.35	1.96	0.51	0.60

* ค่าที่วิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 3 ค่าความขุ่น พีเอช ปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอิน ของเชื้อสายพันธุ์ SR4-2 หลังทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ในอาหารเหลว MMRS 400 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่น (O.D.at 575 nm)		ค่าพีเอช (pH)		ปริมาณโคอะซีติล (mM)*		ปริมาณอะซีโทอิน (mM)*	
	สถานะ เข่า	สถานะ ไม่เข่า	สถานะ เข่า	สถานะ ไม่เข่า	สถานะ เข่า	สถานะ ไม่เข่า	สถานะ เข่า	สถานะ ไม่เข่า
0	0.00	0.00	6.57	6.57	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.44	0.38	5.98	6.11	1.13	0.81	0.50	ND
12	0.61	0.59	5.80	5.85	1.72	0.87	0.54	ND
18	0.46	0.45	5.80	5.68	2.11	1.82	0.49	ND
24	0.45	0.45	5.80	5.71	2.23	3.14	0.38	0.48
30	0.45	0.45	5.81	5.74	2.97	3.35	0.38	0.68
36	0.45	0.45	5.84	5.80	2.45	1.68	0.35	0.88
42	0.45	0.45	5.81	5.83	2.20	1.63	0.54	0.66
48	0.45	0.45	5.82	5.92	2.09	1.59	0.45	0.76
54	0.45	0.45	5.78	6.04	1.89	1.40	0.39	0.78
60	0.45	0.45	5.80	6.32	1.80	1.39	0.48	0.88
66	0.45	0.45	5.82	6.48	1.70	1.38	0.41	0.89
72	0.45	0.45	5.80	6.52	1.41	1.38	0.40	0.88
96	0.44	0.44	5.81	6.60	1.42	1.24	0.41	0.88
120	0.44	0.44	5.80	6.68	1.42	1.24	0.39	0.80

* ค่าที่วิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 4 ค่าความขุ่น พีเอช ปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอิน ของเชื้อสายพันธุ์ SR8-1
หลังทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ในอาหารเหลว MMRS
400 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่น (O.D.atv 575nm)		ค่าพีเอช (pH)		ปริมาณโคอะซีติล (mM)*		ปริมาณอะซีโทอิน (mM)*	
	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า
0	0.00	0.00	6.57	6.57	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.45	0.44	5.79	5.78	1.53	1.12	ND	ND
12	0.61	0.59	5.80	5.82	1.70	1.38	0.45	0.95
18	0.45	0.44	5.81	6.07	1.97	2.26	0.63	2.72
24	0.44	0.43	5.83	6.48	2.21	3.25	0.45	3.26
30	0.44	0.44	5.84	6.91	2.12	2.57	0.52	3.24
36	0.48	0.44	5.84	6.93	2.35	2.56	0.43	3.67
42	0.46	0.43	5.85	7.06	2.03	2.44	0.54	5.45
48	0.45	0.43	5.84	7.23	1.92	1.72	0.67	5.88
54	0.46	0.43	5.82	7.35	1.84	2.22	0.50	4.60
60	0.44	0.43	5.80	7.54	1.83	2.00	0.51	4.00
66	0.43	0.43	5.81	7.60	1.77	1.89	0.53	4.48
72	0.47	0.43	5.83	7.78	1.76	1.66	0.55	5.71
96	0.45	0.42	5.82	7.91	1.75	1.61	0.58	6.36
120	0.43	0.42	5.82	8.13	1.75	1.60	0.60	6.33

* ค่าที่วิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่จำกัดวงใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 5 ค่าความขุ่น พีเอช ปริมาณไดอะซีติลและอะซีโทอิน ของเชื้อสายพันธุ์ PM3-13 หลังทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ในอาหารเหลว MMRS 400 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่น (O.D.at 575 nm)		ค่าพีเอช (pH)		ปริมาณไดอะซีติล (mM)*		ปริมาณอะซีโทอิน (mM)*	
	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า
0	0.00	0.00	6.57	6.57	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.46	0.46	6.58	6.01	1.53	2.26	ND	ND
12	0.60	0.58	7.22	6.09	1.41	1.91	2.98	0.58
18	0.49	0.46	7.76	6.41	1.92	2.23	2.86	1.13
24	0.46	0.46	7.94	6.70	2.57	2.19	4.20	1.25
30	0.46	0.44	8.23	6.96	2.26	1.64	2.99	1.54
36	0.43	0.42	8.14	7.00	2.06	2.98	2.97	1.74
42	0.43	0.43	8.17	7.15	1.83	2.00	3.13	1.40
48	0.46	0.46	8.23	7.25	1.44	1.93	3.80	1.46
54	0.46	0.42	8.26	7.36	1.39	1.93	3.83	0.90
60	0.46	0.42	8.24	7.45	1.32	1.78	3.86	2.03
66	0.46	0.42	8.23	7.50	1.30	1.77	2.57	0.81
72	0.46	0.43	8.19	7.58	1.25	1.64	3.01	1.24
96	0.44	0.42	8.19	7.72	1.20	1.63	3.06	1.27
120	0.44	0.42	8.52	7.90	1.21	1.62	3.33	1.29

* ค่าที่วิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 6 ค่าความขุ่น พีเอช ปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอิน ของเชื้อสายพันธุ์ PM3-14 หลังทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ในอาหารเหลว MMRS 400 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่น (O.D. at 575 nm)		ค่าพีเอช (pH)		ปริมาณโคอะซีติล (mM)*		ปริมาณอะซีโทอิน (mM)*	
	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า
0	0.00	0.00	6.57	6.57	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.46	0.45	6.41	6.02	1.63	1.83	ND	ND
12	0.63	0.62	7.20	6.10	1.57	1.87	4.46	0.68
18	0.46	0.46	7.74	6.41	1.90	3.27	4.29	1.54
24	0.46	0.45	7.96	6.69	2.30	2.88	4.27	1.05
30	0.46	0.46	8.23	6.94	1.82	1.54	3.45	1.39
36	0.46	0.45	8.17	6.98	1.93	2.50	3.18	1.86
42	0.46	0.45	8.20	7.13	1.51	2.49	4.18	1.38
48	0.46	0.46	8.24	7.26	1.49	1.93	4.06	1.54
54	0.46	0.44	8.27	7.36	1.53	2.21	4.12	1.38
60	0.46	0.44	8.27	7.51	1.50	1.95	4.13	1.88
66	0.46	0.40	8.27	7.51	1.49	1.93	4.13	1.79
72	0.46	0.39	8.31	7.60	1.49	1.78	4.34	1.53
96	0.46	0.40	8.39	7.76	1.48	1.58	4.52	1.75
120	0.46	0.41	8.28	7.90	1.48	1.43	4.59	1.55

* ค่าที่วิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษเท่านั้น ไม่อนุญาตให้ทำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 7 ค่าความขุ่น พีเอช ปริมาณไดอะซีติลและอะซีโทอิน ของเชื้อสายพันธุ์ PM4-9 หลังทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ในอาหารเหลว MMRS 400 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่น (O.D.at 575 nm)		ค่าพีเอช (pH)		ปริมาณไดอะซีติล (mM)*		ปริมาณอะซีโทอิน (mM)*	
	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า
0	0.00	0.00	6.57	6.57	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.46	0.44	6.54	6.17	1.54	1.02	ND	0.50
12	0.62	0.59	7.05	6.28	1.55	1.85	2.27	0.68
18	0.46	0.45	7.55	6.49	2.46	2.51	1.58	1.51
24	0.45	0.45	7.78	6.75	2.03	2.55	2.36	1.69
30	0.46	0.45	8.09	6.96	2.41	3.04	1.91	1.65
36	0.46	0.46	8.04	7.04	2.22	2.32	1.96	1.84
42	0.46	0.46	8.07	7.19	1.95	2.32	2.21	1.46
48	0.46	0.45	8.12	7.34	1.94	2.12	2.00	1.53
54	0.46	0.45	8.15	7.33	1.85	2.07	1.72	1.63
60	0.45	0.46	8.17	7.37	1.76	2.06	2.36	1.84
66	0.45	0.45	8.19	7.38	1.75	2.04	2.17	1.58
72	0.45	0.45	8.21	7.48	1.74	1.99	2.06	1.45
96	0.43	0.42	8.21	7.64	1.57	1.82	2.32	1.52
120	0.44	0.42	8.23	7.83	1.39	1.42	2.35	1.84

* ค่าที่วิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ 8 ค่าความขุ่น พีเอช ปริมาณโคอะซีติลและอะซีโทอิน ของเชื้อสายพันธุ์ AP2-1 หลังทำการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 3-5 วัน ในอาหารเหลว MMRS 400 มิลลิลิตร

เวลา (ชั่วโมง)	ค่าความขุ่น (O.D.at 575 nm)		ค่าพีเอช (pH)		ปริมาณโคอะซีติล (mM)*		ปริมาณอะซีโทอิน (mM)*	
	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า	สภาวะ เขย่า	สภาวะ ไม่เขย่า
0	0.00	0.00	6.57	6.57	0.00	0.00	0.00	0.00
6	0.44	0.42	6.78	6.69	1.87	1.23	ND	3.11
12	0.58	0.55	6.91	6.81	1.91	1.26	ND	3.20
18	0.54	0.46	7.02	7.06	1.87	2.28	ND	3.11
24	0.53	0.46	7.12	7.30	2.07	2.53	ND	2.34
30	0.53	0.44	7.29	7.51	2.03	3.16	ND	2.97
36	0.53	0.42	7.27	7.53	2.84	2.70	0.49	2.70
42	0.50	0.42	7.29	7.61	2.17	2.27	ND	3.40
48	0.49	0.42	7.35	7.73	1.84	2.05	ND	3.82
54	0.48	0.4	7.37	7.83	1.72	1.96	ND	3.51
60	0.46	0.39	7.40	7.98	1.68	1.92	ND	3.36
66	0.44	0.38	7.41	8.01	1.63	1.72	ND	2.51
72	0.45	0.37	7.44	8.06	1.58	1.72	ND	2.66
96	0.44	0.38	7.42	8.20	1.58	1.66	ND	1.93
120	0.44	0.39	8.17	8.29	1.51	1.55	ND	1.87

* ค่าที่วิเคราะห์โดยแก๊สโครมาโตกราฟี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายอำนาจ ภัคคีโต เกิดวันที่ 17 พฤศจิกายน พ.ศ. 2514 ที่จังหวัดพิษณุโลก
 สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
 มหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปีการศึกษา 2536 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
 สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอม
 เกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ในปีการศึกษา 2541 และสำเร็จการศึกษาในปีการศึกษา 2544



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
 ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้คัดลอกเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้