

การเจริญและกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้  
จากน้ำอ้อยในกระบวนการผลิตเซลล์ยีสต์

GROWTH OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM CANE  
JUICE AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN YEAST CELL  
PRODUCTION PROCESS

ศิริมา วรรณรังษี

SIRIMA VANNARANGSI

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของงานศึกษาค้นคว้าตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545

ISBN 974-324-179-5

การเจริญและกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้  
จากน้ำอ้อยในกระบวนการผลิตเซลล์ยีสต์

GROWTH OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM CANE  
JUICE AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN YEAST CELL  
PRODUCTION PROCESS

ศิริมา วรณรังษี

SIRIMA VANNARANGSI

เลขทอม.....  
เลขทะเบียน..... 45641  
วัน, เดือน, ปี..... 1 2 ค.พ. 2546

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร

บัณฑิตวิทยาลัย

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2545

ISBN 974-324-179-5

**GROWTH OF LACTIC ACID BACTERIA ISOLATED FROM CANE  
JUICE AND ITS ANTIMICROBIAL ACTIVITY IN YEAST CELL  
PRODUCTION PROCESS**



**SIRIMA VANNARANGSI**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENT FOR THE DEGREE OF  
MASTER OF SCIENCE IN FOOD SCIENCE  
SCHOOL OF GRADUATE STUDIES  
KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG  
2002  
ISBN 974-324-179-5**

**COPYRIGHT 2002**

**SCHOOL OF GRADUATE STUDIES**

**KING MONGKUT'S INSTITUTE OF TECHNOLOGY LADKRABANG**

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเจริญและกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยในกระบวนการผลิตเชลลีสต์
นักศึกษา	นางสาวศิริมา วรรณรัมย์
รหัสประจำตัว	43066007
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การอาหาร
พ.ศ.	2545
อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์	ดร.ศศิวิมล ชื่นอิม อาเหม็ด

### บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้ศึกษาปริมาณและการจัดจำแนกเบื้องต้นของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยและกากน้ำตาลและการแยกแบคทีเรียแลกติกจากน้ำอ้อย รวมถึงศึกษาการเจริญและกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนของแบคทีเรียแลกติกเมื่อเลี้ยงร่วมกับ *Saccharomyces cerevisiae* M30 ในกระบวนการผลิตเชลลีสต์ จากผลการแยกจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนมีจำนวนเพิ่มขึ้นใน 24 ชั่วโมงของการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และมีแนวโน้มลดลงในชั่วโมงที่ 24 และ 32 โดยจุลินทรีย์ที่พบที่ 24 และ 32 ชั่วโมงนี้มีลักษณะทางสรีรวิทยาล้ายกับแบคทีเรียแลกติก ส่วนจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในกากน้ำตาลพบว่ามีลักษณะทางสรีรวิทยาล้ายกับ *Bacillus* เมื่อแยกแบคทีเรียแลกติกจากน้ำอ้อยพบแบคทีเรียแลกติกจำนวน 6 ไอโซเลท เมื่อทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตซึ่งประกอบด้วยน้ำตาล 49 ชนิดของแบคทีเรียแลกติกพบว่าเป็น *Lactobacillus pentosus* 2 ไอโซเลท *L. plantarum* 2 ไอโซเลท *L. coprophilus* 1 ไอโซเลท และ *Leu. mesenteroides* 1 ไอโซเลท เมื่อนำแบคทีเรียแลกติก 6 ไอโซเลทมาทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกจากน้ำอ้อย กากน้ำตาลและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค (*Escherichia coli* ATCC25922, *Listeria innocua* ATCC33090T, *Staphylococcus aureus* ATCC12600, *Bacillus cereus* ATCC6633 และ *Salmonella anatum* SO86105) โดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง (agar spot method) พบว่า แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อน ทั้งในสถานะที่ไม่จำกัดและจำกัดการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ อย่างไรก็ตามเมื่อทดสอบการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์อื่นของแบคทีเรียแลกติกในอาหารเหลวด้วยวิธี agar well diffusion พบว่า แบคทีเรียแลกติกให้ผลการยับยั้งจากกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เป็นส่วนใหญ่

จากผลการเลี้ยงเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30 แบบเขย่า โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่า การใช้อาหารน้ำอ้อยร่วมกับยูเรีย 1 กรัมต่อลิตรให้น้ำหนักเซลล์แห้งและผลได้ของเซลล์สูงกว่าเมื่อใช้แอมโมเนียมซัลเฟต 7 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน และเมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติก LF2 (*L. plantarum*) โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อในสภาวะการหมักแบบเดียวกัน พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากอาหารน้ำอ้อยทั้งสองสภาวะมีค่าน้อยกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้เมื่อเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 เพียงอย่างเดียว จากผลการทดลองเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกในอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและมีการเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อย พบว่าจำนวนของแบคทีเรียปนเปื้อนที่เติมลงไปมีแนวโน้มลดลงในสภาวะการหมักแบบ batch culture แต่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed batch culture และพบว่าจำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนมีแนวโน้มลดลงเช่นกันในสภาวะที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* M30 โดยไม่มีแบคทีเรียแลกติกเจริญร่วมด้วย อย่างไรก็ตามพบว่ามีจุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่นนอกเหนือจากที่เติมลงไปเจริญเติบโตในสภาวะการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ในอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและไม่มีแบคทีเรียแลกติก

<b>Thesis Title</b>	Growth of Lactic Acid Bacteria Isolated from Cane Juice and Its Antimicrobial Activity in Yeast Cell Production Process
<b>Student</b>	Miss Sirima Vannarangsi
<b>Student ID.</b>	43066007
<b>Degree</b>	Master of Science
<b>Program</b>	Food Science
<b>Year</b>	2002
<b>Thesis advisor</b>	Dr. Sasivimol C. Ahmed

### ABSTRACT

Quantification and classification of contaminating microorganisms in cane juice and molasses was studied. The number of contaminating microorganisms in cane juice increased during 24 hours of storage at room temperature and decreased between 24 and 32 hours. The microorganisms found at 24 and 32 hours had physiological characteristics similar to lactic acid bacteria (LAB). There were 6 isolates of LAB found in cane juice, which are *Lactobacillus pentosus* (2 isolates), *L. plantarum* (2 isolates), *L. coprophilus* and *Leuconostóc. mesenteroides*. These LAB inhibited the contaminating microorganisms isolated from cane juice and molasses. In addition, these LAB were capable of inhibiting the bacterial pathogens including *E.coli* ATCC25922, *Listeria inocua* ATCC33090<sup>T</sup>, *Staphylococcus aureus* ATCC12600, *Bacillus cereus* ATCC6633 and *Salmonella anatum* SO86105. When tested under conditions that the effects of organic acids and hydrogen peroxide were eliminated, LAB could produce other antimicrobial substances which inhibited the contaminating microorganisms in cane juice and molasses. Antibacterial substance production in liquid culture was tested using agar diffusion assay with contaminating microorganisms in cane juice and molasses as bacterial indicators. The results showed a lower degree of antimicrobial activity when compared with the agar spot method. In addition, the antimicrobial activity was mainly a result of acids and hydrogenperoxide.

In shake flask experiments, cultivation of *S. cerevisiae* M30 in cane juice based medium (20 g/l sugar) using 1 g/l urea as nitrogen source resulted in a higher cell dry weight when compared with 7 g/l ammonium sulfate. The biomass concentrations obtained in the mixed culture of *S. cerevisiae* M30 and LAB (*L. plantarum* LF2) in sterile and non-sterile cane juice based medium were lower than those obtained in the pure yeast culture. Cultivation of *S. cerevisiae* M30 and LAB in non-sterile cane juice based medium with the addition of contaminating bacteria isolated from cane juice showed that the number of contaminating bacteria decreased in batch culture but increased in cyclic fed-batch culture. The number of contaminating bacteria also decreased when *S. cerevisiae* M30 was cultivated with and without the addition of LAB. However, there were other contaminating bacteria found during cultivation when the non-sterile medium was used without the addition of LAB.

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จได้ด้วยความกรุณาจาก ดร.ศศิวิมล ชื่นอ้อม อาเหม็ด อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ให้ความเอาใจใส่ตลอดจนแนะนำแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณอย่างสูง และขอขอบพระคุณ รศ.ดร.วราวุฒิ ทรุส่ง และ ดร.บุญเทิ้ม พันธุ์เพ็ง ที่กรุณาให้เกิดริเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ เพื่อความสมบูรณ์ของวิทยานิพนธ์

ขอขอบพระคุณครูและคณาจารย์ทุกท่าน ที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้าจนกระทั่งสำเร็จการศึกษาอีกชั้นหนึ่ง

ขอบคุณพี่ เพื่อน น้องปริญญาโท และน้องปริญญาตรี สำหรับกำลังใจ และกำลังกายที่มีให้ข้าพเจ้าตลอดมา

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณพ่อ แม่ ที่ให้การสนับสนุนทางด้านกำลังใจ และกำลังทรัพย์ ด้วยดีเสมอมา

คุณค่าและประโยชน์อันพึงมีจากวิทยานิพนธ์ ข้าพเจ้าขอมอบแด่ครู อาจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ศิริมา วรรณรังษี

# สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	III
กิตติกรรมประกาศ.....	V
สารบัญ.....	VI
สารบัญตาราง.....	VIII
สารบัญรูป.....	IX
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2 ขอบเขตของงานวิจัย.....	1
1.3 วัตถุประสงค์.....	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	3
2.1 แบบที่เรียแลกดิกและสารบัญข้ที่แบบที่เรียแลกดิกสร้างขึ้น.....	3
2.2 การคัดแยกแบบที่เรียแลกดิกและการนำไปใช้.....	7
2.3 จลนพลศาสตร์ของการหมัก.....	11
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการ.....	19
3.1 เชื้อจุลินทรีย์.....	19
3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ.....	19
3.3 สารเคมี.....	19
3.4 สารอาหาร.....	20
3.5 วิธีดำเนินการทดลอง.....	20
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์.....	26
4.1 ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล.....	26
4.2 ผลการแยกแบบที่เรียแลกดิกจากน้ำอ้อย.....	32
4.3 การทดสอบการสร้างสารบัญข้การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน ที่แยกจากน้ำอ้อย กากน้ำตาลและแบบที่เรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยแบบที่เรีย แลกดิกที่แยกได้จากน้ำอ้อย.....	35

# สารบัญ (ต่อ)

หน้า

4.4 ผลการเปรียบเทียบการใช้สารอาหารแอมโมเนียมซัลเฟต ((NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) และยูเรีย (H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub> ) ต่อการเจริญของ <i>S. cerevisiae</i> M30 โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน.....	42
4.5 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของ <i>S. cerevisiae</i> M30 โดยใช้สารอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตในสภาวะการหมักแบบ batch culture และใช้ถังหมักคัดแปลงแบบ air lift.....	43
4.6 ผลการศึกษาการเจริญของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยเปรียบเทียบการใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อนในสภาวะการหมักแบบ batch culture และ cyclic fed batch culture.....	44
4.7 ผลการศึกษาการเจริญของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกในอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยเปรียบเทียบกรณีที่มีและไม่มีแบคทีเรียแลกติกเจริญร่วมด้วยในสภาวะการหมักแบบ batch culture และ cyclic fed batch culture.....	46
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง.....	54
บรรณานุกรม.....	56
ภาคผนวก	
ก. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	61
ข. การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์และทางเคมี.....	63
ค. ผลการวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ <i>S. cerevisiae</i> M30.....	68
ประวัติผู้เขียน.....	71

# สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำอ้อยเก็บที่อุณหภูมิห้องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0-32.....	27
4.2 การจัดจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่และลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 1.....	28
4.3 การจัดจำแนกกลุ่มจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่และลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 2.....	29
4.4 ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย.....	35
4.5 ผลการวัดขนาดวงใสของการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยโดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง.....	36
4.6 ผลการวัดขนาดวงใสของการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากกากน้ำตาลโดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง.....	37
4.7 ผลการวัดขนาดวงใสของการยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง.....	38
4.8 ผลการวัดขนาดวงใสของการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยโดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยวิธีทดสอบการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว.....	40
4.9 ผลการวัดขนาดวงใสของการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากกากน้ำตาลโดยแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยวิธีทดสอบการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว.....	41
4.10 ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พบในระหว่างกระบวนการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ในสภาวะที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียแลกติก.....	48
4.11 อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) และน้ำหนักเซลล์แห้งของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30.....	49

# สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
2.1	วิถี homo- และ heterofermentation ของแบคทีเรียแลกติก.....4
2.2	กลไกการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียแลกติก.....5
2.3	การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture.....12
2.4	ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต่อปริมาณเซลล์สูงสุด.....13
2.5	ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือต่ออัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย.....15
2.6	การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเงื้องาง ความเข้มข้นของสับสเตรท และความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่ quasis steady state ในระบบ fed-batch.....18
4.1	การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยที่เก็บที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0-32 ชั่วโมง โดยบ่มที่สภาวะมีอากาศ ไม่มีอากาศ และมีอากาศเล็กน้อย ของน้ำอ้อยทั้ง 2 แหล่ง.....27
4.2	ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พบมากในน้ำอ้อยทั้ง 2 แหล่ง.....30
4.3	ลักษณะทางสรีรวิทยา (ข้อมแกรม) ของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พบมากใน น้ำอ้อยทั้ง 2 แหล่ง.....30
4.4	ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในกากน้ำตาลที่ตรวจพบที่สภาวะการบ่ม แบบมีอากาศและมีอากาศเล็กน้อย.....31
4.5	ลักษณะทางสรีรวิทยา (ข้อมสปอร์) ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้ จากกากน้ำตาลที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศและมีอากาศเล็กน้อย.....32
4.6	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 1.....33
4.7	ลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 1.....33
4.8	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 2.....34
4.9	ลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 2.....34
4.10	น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและผลได้ของเซลล์ของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ที่เลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบบต่างๆ.....42
4.11	จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอชของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ในสภาวะการหมักแบบ batch culture ในถังหมักคัดแปลงแบบ air lift.....43
4.12	จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอชของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อใน สภาวะการหมักแบบ batch culture.....45

## สารบัญญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.13 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช ปริมาณน้ำตาลที่เหลือของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อในสภาวะการหมักแบบ batch culture.....	45
4.14 การเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกในสภาวะการหมักแบบ batch culture ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ 1,000 เท่า.....	46
4.15 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอชของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกและเติมเชื้อเริ่มต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนในสภาวะการหมักแบบ batch culture.....	47
4.16 จำนวนเซลล์ ค่าพีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้ง ของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียปนเปื้อนในสภาวะการหมักแบบ batch culture.....	48
4.17 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลที่เหลือของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture.....	50
4.18 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลที่เหลือของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture.....	51
4.19 ลักษณะของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ที่เกิดการจับกันเป็นก้อนในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า.....	51
4.20 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอชของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกและเติมเชื้อตัวต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture.....	52
4.21 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลที่เหลือของการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียปนเปื้อนในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture.....	53
1ค ความสัมพันธ์ระหว่าง ln จำนวนเซลล์กับเวลาในการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ในสภาวะการหมักแบบ batch culture.....	68
2ค ความสัมพันธ์ระหว่าง ln จำนวนเซลล์กับเวลาในการเลี้ยง <i>S. cerevisiae</i> M30 ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลกติกในสภาวะการหมักแบบ batch culture โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ.....	68

## สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่	หน้า
3ค	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln$ จำนวนเซลล์กับเวลาของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลกติกในสภาวะการหมักแบบ batch culture โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ .....69
4ค	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln$ จำนวนเซลล์กับเวลาของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลกติกและเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนในสภาวะการหมักแบบ batch culture.....69
5ค	ความสัมพันธ์ระหว่าง $\ln$ จำนวนเซลล์กับเวลาของ <i>S. cerevisiae</i> M30 ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปนเปื้อนในสภาวะการหมักแบบ batch culture.....70

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในกระบวนการหมักเซลล์ยีสต์มักใช้กากน้ำตาลและน้ำอ้อยเป็นวัตถุดิบ โดยวัตถุดิบดังกล่าวอาจมีเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการปนเปื้อนอยู่ซึ่งจะส่งผลกระทบต่อกระบวนการผลิต การทำลายเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนโดยใช้ความร้อนนั้น มักไม่นิยมใช้ในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายที่ค่อนข้างสูง แต่จะอาศัยการควบคุมพีเอชที่ประมาณ 4-5 เพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อน อย่างไรก็ตามวิธีนี้จำเป็นต้องอาศัยอุปกรณ์ในการควบคุมพีเอชที่เหมาะสม ซึ่งจะทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการบำรุงรักษา

ในการทดลองนี้จึงได้ศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียแลกติกกับ *S. cerevisiae* M30 ในการผลิตเซลล์ยีสต์ โดยทำการแยกแบคทีเรียแลกติกจากน้ำอ้อย ศึกษาผลของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้ต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยและกากน้ำตาล แบคทีเรียแลกติกเมื่อเข้าสู่กระบวนการหมักจะก่อให้เกิดสารจำพวกกรดอินทรีย์ ได้แก่ กรดแลกติกและกรดอะซิติก ซึ่งจะช่วยให้สภาวะในการเลี้ยงยีสต์มีสภาพเป็นกรด จึงอาจยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนบางชนิดที่ไม่สามารถเจริญได้ในสภาวะที่เป็นกรดได้ นอกจากนี้แบคทีเรียแลกติกยังอาจสร้างสารยับยั้งการเจริญอื่น เช่น คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ เอทานอล และแบคเทอริโอซิน ซึ่งอาจสามารถยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่นๆ ที่เจริญได้ที่สภาวะเป็นกรด

### 1.2 ขอบเขตของงานวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการแยกแบคทีเรียแลกติกจากน้ำอ้อยและศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยกับ *S. cerevisiae* M30 โดยวิธี batch และ cyclic fed-batch culture ในถังหมักตัดแปลงแบบ air lift และศึกษาความสามารถของแบคทีเรียแลกติกในการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในกระบวนการผลิตเซลล์ยีสต์ *S. cerevisiae* M30

### 1.3. วัตถุประสงค์

1.3.1 เพื่อแยกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อยที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อย กากน้ำตาลและแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค

1.3.2 เพื่อศึกษาการเจริญร่วมกันของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยกับ *S. cerevisiae* M30 ในกระบวนการผลิตเซลล์ชีสต์โดยวิธี batch และ cyclic fed-batch culture ในถังหมักตัดแปลงแบบ air lift

## บทที่ 2

# ทฤษฎีและวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

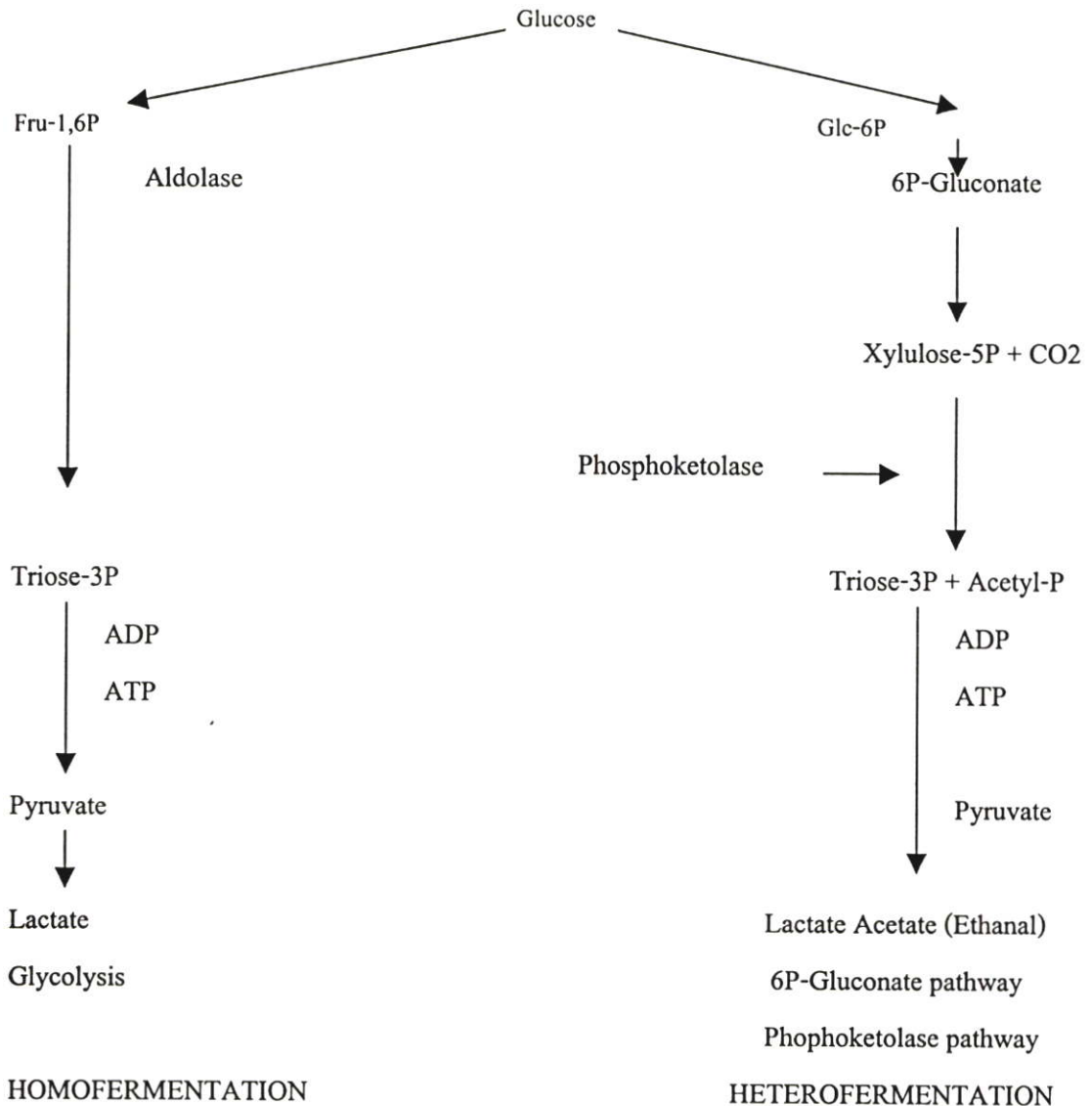
### 2.1 แบคทีเรียแลคติกและสารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น

2.1.1 แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria : LAB) แบคทีเรียแลคติก (Lactic Acid Bacteria : LAB) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก (gram positive) ที่เจริญเติบโตภายใต้สภาวะมีอากาศเล็กน้อย (microaerophilic) จนถึงสภาวะไม่มีอากาศ (strictly anaerobic) ไม่สร้างสปอร์ (non-sporulating) สามารถหมักคาร์โบไฮเดรตได้เป็นผลิตภัณฑ์พวกแลกเตท (lactate) แบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างกลม ได้แก่ *Lactococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Pedicoccus*, *Aerococcus*, *Tetragenococcus*, *Streptococcus* และ *Enterococcus* ส่วนแบคทีเรียแลคติกที่มีรูปร่างเป็นท่อน ได้แก่ *Lactobacillus*, *Carnobacterium* และ *Bifidobacterium* (Pongsak and Parichat, 2000) นอกจากนั้นแบคทีเรียแลคติกยังสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักได้แก่ homofermentative ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติกด้วยวิถีไกลโคไลติก (glycolytic pathway) และ heterofermentative ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียแลคติกที่เปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแลคติก เอทานอล กรดอะซิติก และคาร์บอนไดออกไซด์ด้วยวิถีฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase pathway) (นภา โล่ห์ทอง, 2534) (รูปที่ 2.1)

2.1.2 สารยับยั้งที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น แบคทีเรียแลคติกเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในอุตสาหกรรมนม (milk fermentation) ใ้สักรอกหมักและผักดอง แบคทีเรียแลคติกจะก่อให้เกิดกลิ่นและรสชาติที่ดีในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีผลต่ออายุการเก็บรักษาด้วยเนื่องจากสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่น (antimicrobials) ที่แบคทีเรียแลคติกสร้างขึ้น ได้แก่

2.1.2.1 กรดอินทรีย์ (organic acid) กรดอินทรีย์ที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นที่สำคัญ ได้แก่ กรดแลคติก (lactic acid) ที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติก กรดอะซิติก (acetic acid) ที่สร้างโดยแบคทีเรียแลคติกและ bifidobacteria จากกระบวนการหมักคาร์โบไฮเดรต และกรดโพรพิโอนิกสร้างโดยแบคทีเรียโพรพิโอนิก กรดอินทรีย์ทั้งสามชนิดมีผลทำให้ค่าพีเอชของอาหารเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญและให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ด้วย โดยกรดอินทรีย์ดังกล่าวจะมีผลต่อเซลล์เมมเบรนทำให้ electrochemical potential เป็นกลาง กรดอะซิติกทำให้โปรตีนในเซลล์เสียสภาพธรรมชาติ และทำให้ค่าพีเอชภายในเซลล์ (intracellular pH) ของ *Clostridium acetobutylicum* ลดลง และกรดโพรพิโอนิกมีผลต่อผนังเซลล์ของเชื้อรา (Richard, 1992) นอกจากนี้ Corsetti et al. (1998) พบว่า *Lactobacillus sanfrancisco* CB1 สามารถผลิตสารยับยั้ง

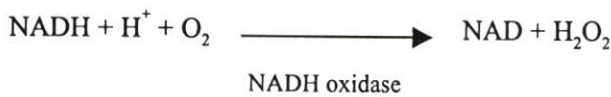
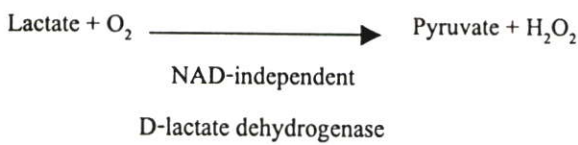
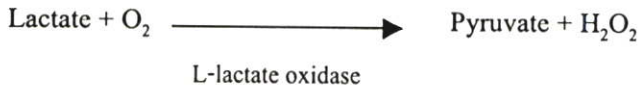
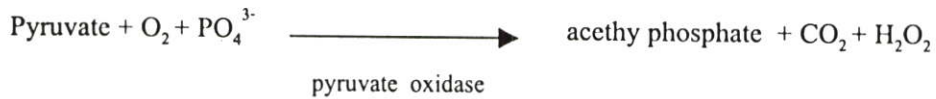
การเจริญเติบโตของเชื้อรา (antimould compounds) ซึ่งเป็นส่วนผสมของกรดอินทรีย์หลายชนิด ได้แก่ กรดอะซิติก กรดคาโปรอิก กรดฟอร์มิก กรดโพรพิโนอิก กรดบิวทิวริก และกรดเอนวาเลอริก (n-valeric) ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราที่ทำให้เกิดการเน่าเสีย เช่น *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus* และ *Monilia* ในการผลิต Sourdough fermentation ได้



รูปที่ 2.1 วิธี homo- และ heterofermentation ของแบคทีเรียแลคติก

ที่มา : Adams and Moss (1995)

2.1.2.2 ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) *Lactobacilli* สร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ในระหว่างการเจริญเติบโตโดยมีกลไกการสร้างที่แตกต่างกัน (รูปที่ 2.2)



รูปที่ 2.2 กลไกการสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยแบคทีเรียแลคติก  
ที่มา : Mark (1989)

แบคทีเรียสายพันธุ์ *Lactobacillus* สามารถผลิตไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ เนื่องจากไม่สามารถสร้างเอนไซม์คะตาเลส (catalase) ซึ่งไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่น เช่น *Staphylococcus aureus* และ *Pseudomonas spp.* ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์จะทำหน้าที่เป็น precursor ทำปฏิกิริยากับสารประกอบอื่นและเกิดเป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ เช่น ในน้ำนมดิบ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียแลคติกจะทำปฏิกิริยากับ endogenous thiocyanate และถูกเร่งปฏิกิริยาด้วย lactoperoxidase เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นได้ กระบวนการนี้เรียกว่า lactoperoxidase antibacterial system ซึ่งเป็นการยึดอายุการเก็บรักษาของน้ำนมดิบที่ไม่ได้แช่เย็น (Mark, 1989)

2.1.2.3 ไดอะเซทิล (diacetyl) ไดอะเซทิล (diacetyl; 2,3-butanedione; dimethyl diketone; 2,3 diketobutane) เป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในกระบวนการสังเคราะห์ pyruvate ของแบคทีเรียแลคติก สายพันธุ์ที่สามารถสร้างไดอะเซทิล ได้แก่ *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus* และ *Lactobacillus* ซึ่งไดอะเซทิลนั้นเป็นที่ทราบกันเป็นอย่างดีว่าก่อให้เกิดกลิ่น buttery ในผลิตภัณฑ์นมหมัก (Mark, 1989) แต่ไดอะเซทิลยังก่อให้เกิดผลการยับยั้ง

จุลินทรีย์อื่นๆ ด้วย Jay (1982) พบว่าปริมาณโคเซเซทิล 200 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของยีสต์และแบคทีเรียแกรมลบ และปริมาณ 300 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกที่ไม่ใช่กลุ่มของแบคทีเรียแลกติกได้

**2.1.2.4 แบคทีเรียโอซิน (bacteriocin)** แบคทีเรียแลกติกจะผลิต ribosomally-synthesized antimicrobial peptides เรียกว่า แบคทีเรียโอซิน ซึ่งเป็น bioactive peptides หรือ โปรตีนที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์บางชนิดได้ ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้อาหารเน่าเสีย (spoilage microorganisms) และ จุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค (food borne pathogens) เช่น *B. cereus*, *Cl. botulinum*, *Stap. Aureus*, *Listeria monocytogenes*, (Lejeune *et al.*, 1998) *A. hydrophila* และ *Micrococcus luteus* (Halami *et al.*, 2000) กลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตแบคทีเรียโอซินนั้นส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียแลกติก ได้แก่ *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vegococcus* และ *Weissella* (Halami *et al.*, 2000)

Klaenhammer (1993) แบ่งแบคทีเรียโอซินออกเป็น 4 ชนิด ตามลักษณะโครงสร้าง ได้แก่ classes I II III และ IV โดยที่ classes I และ II ส่วนใหญ่จะมีขนาดโมเลกุลเล็กและเป็นเปปไทด์แบบ hydrophobic จึงทนต่อความร้อน classes I เรียกว่า lantibiotic (เช่น ไนซิน) และ classes II เรียกว่า non-lantibiotic ซึ่งแบ่งเป็น 3 ส่วนย่อย คือ classes IIa เป็น pediocin-like bacteriocins ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Listeria* ได้ดีมาก (เช่น leucocin A-UAL 187, curvacin A และ pediocin PA-1) classes IIb เป็นแบคทีเรียโอซินที่ประกอบด้วย 2 เปปไทด์ (เช่น lactococcin G และ lactacin F) และ classes IIc เป็นแบคทีเรียโอซินที่สร้างโดย sec-dependent mechanism (เช่น lactococcin B) ส่วน classes III เป็นแบคทีเรียโอซินที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงและไม่ทนต่อความร้อน (เช่น helveticin J, lactacins A และ B) และสุดท้ายคือ classes IV เป็นแบคทีเรียโอซินเชิงซ้อน (complex bacteriocins) ประกอบด้วยส่วนของโปรตีนรวมกับส่วนที่ไม่ใช่โปรตีน ได้แก่ ไขมันหรือคาร์โบไฮเดรต (เช่น plantaricin S, lactocin 27 และ leuconocin S) (Verna *et al.*, 1997)

แบคทีเรียโอซินที่สร้างจากแบคทีเรียแลกติกกำลังเป็นที่ได้รับความสนใจในอุตสาหกรรมนมและกำลังมีการนำไปประยุกต์ใช้ในผลิตภัณฑ์นมโดยอยู่บนฐานของผลของการยับยั้งจุลินทรีย์ (antagonistic effects) ที่เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อโรคและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสีย โดยทั่วไปแบคทีเรียโอซินที่ผลิตจากแบคทีเรียแลกติกที่มีการศึกษาคุณสมบัติแล้วที่สำคัญได้แก่ nisin, diplococcin, acidophilin, bulgarican, lactacins และ plantaricins (Balasubramanyam and Varadaraj, 1998) สำหรับไนซินนั้นเป็นแบคทีเรียโอซินที่นำมาใช้กันอย่างแพร่หลายและได้รับ

การยอมรับจาก FDA ตั้งแต่ ค.ศ. 1988 โดยใช้ชื่อทางการค้าว่า Nisaplin (Aplin and Barrett Ltd, Trowbridge, UK) ในจีนสร้างขึ้นโดย *Lactococcus lactis* มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียแกรมบวกโดยเฉพาะสายพันธุ์ที่สร้างสปอร์และจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคได้ (Delves-Broughton, 1990)

## 2.2 การคัดแยกแบคทีเรียแลคติกและการนำไปใช้

การศึกษาเกี่ยวกับการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคโดยการใช้จุลินทรีย์ชนิดอื่นนั้นมีหลักฐานว่าเกิดขึ้นก่อนจะสิ้นสุดศตวรรษที่ 19 มีรายงานเกี่ยวกับการใช้แบคทีเรียแลคติกเป็นสารควบคุมการเจริญเติบโตทางชีวภาพ (biocontrol agent) ในอาหารจากงานวิจัยของ Saleh and Ordal (1955) ที่ทดลองถ่ายเชื้อ *L. lactis* ในไก่แช่แข็งที่มีการเจริญและผลิตสารพิษของ *C. botulinum* ต่อมา Tanaka *et al.* (1985) ทดค้น Wisconsin process เพื่อใช้รับรองความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์เบคอนซึ่งพบแบคทีเรียแลคติกเป็นจำนวนมากในขณะที่มีปริมาณโซเดียมไนไตรท์ 120 ppm. นอกจากนี้ยังมีการใช้แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์ที่ไม่ผ่านการหมัก (nonfermented foods) เพื่อยืดอายุของอาหาร Gilliland and Speck (1975) และ Raccach *et al.* (1979) นำแบคทีเรียแลคติกจำนวนมาก ( $10^8$  cfu ต่อมิลลิลิตร หรือมากกว่า) ถ่ายเชื้อลงบนเนื้อเพื่อเพิ่มอายุการเก็บและป้องกันการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค โดยรายงานผลว่าปริมาณกรดเพียงเล็กน้อยหรือไม่มีกรดนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเจริญเติบโตของเชื้อ การเน่าเสียที่เกิดขึ้นระหว่างการเก็บรักษาหรืออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงไปจะก่อให้เกิดการผลิตสารที่ก่อให้เกิดการยับยั้งจุลินทรีย์ชนิดอื่น เช่น ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีเรียไอซิดิน นอกจากนี้แล้วยังมีการใช้แบคทีเรียแลคติกในผลิตภัณฑ์จำพวกผัก Romick (1994) ใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ *L. plantarum* เป็นสายพันธุ์ที่ป้องกันการเจริญเติบโตของ *Lis. monocytogenes* ในผลิตภัณฑ์แตงกวาดองในน้ำเกลือ ผลิตภัณฑ์ที่ไม่มีการผลิตกรด (nonacidified) และไม่มีการแช่เย็น พบว่าแตงกวามีลักษณะปรากฏที่ยังมีความสดและมีเนื้อสัมผัสที่ดี *Lis. monocytogenes* ที่เป็นเชื้อที่ใช้ในการทดลองนี้มีคุณสมบัติทางพันธุกรรมว่าเป็นสายพันธุ์ที่สามารถเจริญในน้ำเกลือของแตงกวาดองที่ 5 องศาเซลเซียส (เพิ่มขึ้น 1-2 log units ใน 20 วัน) และในอุณหภูมิสูงกว่าได้ (ประมาณ 10 องศาเซลเซียส) อย่างไรก็ตามพบว่า การเจริญของ *Lis. monocytogenes* ถูกจำกัดโดยการเจริญอย่างเป็นธรรมชาติของแบคทีเรียแลคติกคือ *L. plantarum* Vescovo *et al.* (1996) คัดแยกสายพันธุ์ของแบคทีเรียแลคติกที่อยู่ในกลุ่มที่เจริญได้ที่อุณหภูมิต่ำ (psychrotrophic) จากผักสดที่เป็นส่วนผสมในสลัดและคัดเลือกเฉพาะสายพันธุ์ที่ผลิตแบคทีเรียไอซิดินหรือเกิดวงใสการยับยั้ง (clear zone) จากการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบที่เป็นจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรคเมื่อใช้ agar diffusion tests เมื่อคัดเลือกได้แล้วนำไปทดสอบในผลิตภัณฑ์สลัดที่มี *Aeromonas hydrophilla*, *Lis. Monocytogenes*, *Stap. typhimurium* และ *Stap. aureus* (ปริมาณเชื้อเริ่มต้น

ประมาณ  $10^5$  cfu ต่อกรัม) พบว่าจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรครดงกล่าวไม่สามารถตรวจพบในวันที่ 6 ของการเก็บรักษา (Fred and Henry, 1997) นอกจากนี้ยังมีการแยกแบคทีเรียแลคติกจากแหล่งต่างๆ กันเพื่อให้ได้มาซึ่งแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินใหม่ๆ และนำมาใช้ประโยชน์แก่อุตสาหกรรมอาหาร ดังต่อไปนี้

Kelly *et al.* (1996) คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารสำเร็จรูป พบสายพันธุ์ที่สามารถผลิตแบคเทอริโอซินจำนวน 22 สายพันธุ์จากตัวอย่างอาหาร 14 ตัวอย่าง จากทั้งหมด 41 ตัวอย่าง พบว่าสายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ ปลา และผลิตภัณฑ์จากนม และเป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่มของ *Lactobacillus* และ *Lactococcus* แต่สายพันธุ์ที่ผลิตแบคเทอริโอซินในอาหารจำพวกผลิตภัณฑ์จากผักและผลไม้เป็นสายพันธุ์ที่อยู่ในกลุ่ม *Lactococcus* ดังนั้นอาหารที่พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกที่สามารถสร้างแบคเทอริโอซินจะก่อให้เกิดความปลอดภัยต่ออาหารนั้นและยังเป็นการถนอมรักษาอาหารโดยวิธีทางชีวภาพโดยเฉพาะอย่างยิ่งอาหารที่ผ่านกระบวนการแปรรูปน้อย (minimally processed products)

Casla *et al.* (1996) คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำนมแพะ และ artisanal cheese ได้ทั้งหมด 203 ไอโซเลท โดยพบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้เป็น *L. lactis* จำนวน 2 สายพันธุ์ *Enterococcus faecalis* จำนวน 1 สายพันธุ์ และ *L. curvatus* IFPL105 จำนวน 1 สายพันธุ์ซึ่งแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดสามารถสร้างสารที่มีคุณสมบัติคล้ายกับแบคเทอริโอซิน (bacteriocin-like substance)

Corsetti *et al.* (1996) คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจาก sourdoughs ได้ทั้งหมด 232 สายพันธุ์ พบว่าเป็น *Lactobacillus* จำนวน 9 สายพันธุ์ และแบคทีเรียแลคติกทั้งหมดสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. subtilis* ได้แต่ไม่แสดงผลการยับยั้งยีสต์และเชื้อราซึ่งเป็นเชื้อที่ใช้ในการหมักดังกล่าว

Reenen *et al.* (1998) คัดแยก *L. plantarum* 423 จาก sorghum beer ซึ่งผลิต แบคเทอริโอซิน คือ plantaricin 423 ที่ยับยั้งจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดการเน่าเสียและจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดโรค ได้แก่ *B. cereus*, *C. sporogenes*, *En. Faecalis*, *Listeria* spp. และ *Staphylococcus* spp. โดยที่ plantaricin 423 สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงที่ 80 องศาเซลเซียส แต่กิจกรรมของ plantaricin 423 จะลดลง 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อผ่านการให้ความร้อนที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที และลดลง 75 เปอร์เซ็นต์หลังจากการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส 15 นาที)

Miteva *et al.* (1998) ศึกษาสารยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์สายพันธุ์ *L. delbrueckii* ที่แยกได้จาก Bulgarian yellow cheese ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้ง *Lis. monocytogenes*, *Stap. aureus*, *En. faecalis*, *E. coli*, *Yersinia enterocolitica* และ *Y. pseudotuberculosis* ได้

Banina *et al* (1998) แยก *L. acidophilus* BGRA43 จากอวัยวะของมนุษย์พบว่า เป็นสายพันธุ์ที่มีอัตราการเจริญเติบโตสูงและสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ นอกจากนี้ยังแสดงผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Cl. sporogenes* ได้

Balasubramangam and Varadaraj (1998) คัดแยก *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* CFR 2028 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ใช้กันมากในอาหารหมักของประเทศอินเดีย พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. cereus* F4810 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่สร้างสารพิษ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ milk medium ให้ผลการยับยั้งสูงสุดเมื่อบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และมีการสร้างสารยับยั้งในช่วง logarithmic และช่วงปลาย stationary ของการเจริญเติบโต นอกจากนี้ยังพบว่าสารยับยั้งดังกล่าวมีความคงตัวในสภาวะที่มีค่าพีเอชต่ำ (3.8-5.0) และทนต่อความร้อน (75 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที)

Bogovic-Matijasic *et al.* (1998) พบว่า *L. acidophilus* LF221 สามารถผลิตสารยับยั้งที่มีคุณสมบัติคล้ายแบคทีเรียออซินที่ให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของ *B. cereus* *Clostridium* sp. *Lis. innocua*, *Stap. aureus* และ *Streptococcus* D. เมื่อตรวจสอบแล้วพบว่าสารยับยั้งดังกล่าวเป็นแบคทีเรียออซิน คือ acidocin LF221 A และ acidocin LF221 B นอกจากนี้ *L. acidophilus* LF221 ยังได้รับความสนใจเนื่องจากเป็นจุลินทรีย์สายพันธุ์โพรไบโอติก (probiotic strain) อีกด้วย

Ostergaard *et al.* (1998) คัดแยกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถยับยั้ง *Listeria* sp. (*Lis. innocua*) จากผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทยได้แบคทีเรียแลคติก 4150 โคโลนีโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เมื่อนำมาทดสอบการยับยั้งให้ผลการยับยั้งทั้งหมด 44 สายพันธุ์ จาก 44 สายพันธุ์พบว่ามี 43 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Lis. monocytogenes* แบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 44 สายพันธุ์แสดงผลการยับยั้ง *Vibrio cholerae* และ *V. parahaemolyticus* นอกจากนี้พบว่ามี 37 สายพันธุ์ยับยั้งแบคทีเรียที่ทำให้ปลาเน่าเสีย (เช่น *Aeromonas* sp.) ได้ โดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus* spp. เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 25-37 องศาเซลเซียส และทนต่อความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ได้ถึง 6.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งจะก่อให้เกิดความปลอดภัยในผลิตภัณฑ์ดังกล่าว

Navarro *et al.* (2000) แยกแบคทีเรียแลคติกจาก Rioja red wine ได้ 42 สายพันธุ์ เป็น *Lactobacillus* (32), *Leuconostoc* (6), *Pediococcus* (3) และ *Lactococcus* (1) เมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์อื่นๆ ได้แก่ *Leu. oenos* จำนวน 18 สายพันธุ์และยีสต์จำนวน 19 สายพันธุ์ พบว่ามีแบคทีเรียแลคติกจำนวน 9 สายพันธุ์ที่แสดงผลการยับยั้ง ซึ่งโดยส่วนใหญ่เป็น *L. plantarum* ที่เป็นจุลินทรีย์ที่มีลักษณะเด่นในช่วงการหมักที่เกิดแอลกอฮอล์แล้วของ Rioja red wine

วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล (2543) แยกแบคทีเรียแลคติกได้ 212 ไอโซเลท จากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ 329 ตัวอย่าง พบว่าเป็นแบคทีเรียแลคติกในสกุล *Lactobacillus* 198 ไอโซเลท และ *Pediococcus* 14 ไอโซเลท และเมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบผลการยับยั้งแบคทีเรียอินคิเคเตอร์ 4 ชนิด คือ *B. cereus* ATCC 11778, *Stap. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 และ *S. typhimurium* 3230 พบว่าแบคทีเรียแลคติก 193 ไอโซเลท สามารถยับยั้งแบคทีเรียอินคิเคเตอร์ทั้ง 4 ชนิดได้แต่เมื่อนำไปทดสอบด้วยวิธีเดียวกันในสภาพจำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์และกำจัดผลการยับยั้งจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่ามีเพียง 10 ไอโซเลทที่แสดงผลการยับยั้งและจากการเทียบเคียงชนิดแบคทีเรียแลคติกพบว่าเป็น *L. plantarum* 6 ไอโซเลท *L. brevis* และ *L. fermentum* อย่างละ 2 ไอโซเลท จากนั้นคัดเลือก *L. fermentum* P5 มาศึกษาสมบัติบางประการของสารยับยั้งดังกล่าวพบว่านอกจากกรดอินทรีย์แล้วยังมีสารอื่นที่มีสมบัติเป็นสารพวกโปรตีนที่ทนความร้อนได้สูง และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกได้ดีกว่าแบคทีเรียแกรมลบ ซึ่งสารดังกล่าวน่าจะเป็นแบคเทอริโอซิน ซึ่งช่วยยืดอายุการเก็บอาหารและเพิ่มความปลอดภัยให้ผู้บริโภค

Pongsak and Parichat (2000) คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักพื้นบ้านของไทย เช่น หัวหอมแดง หน่อไม้แดง แดงกวาดอง พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มีการสร้างแบคเทอริโอซิน โดยกำจัดผลการยับยั้งจากไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และกรดอินทรีย์ สารยับยั้งดังกล่าวสร้างจากแบคทีเรียที่แยกได้ 1 ไอโซเลท คือ *L. lactis* subsp. คุณลักษณะของแบคเทอริโอซินที่ *lactis* สร้างมีความไวต่อเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีน ทนต่อความร้อนและมีผลต่อต้านการเจริญเติบโตของ *Leu. mesenteroides* TISTR 473

Vaughan *et al.* (2001) แยกแบคทีเรียแลคติกจากข้าวมอลท์ที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเบียร์ได้ 8 สายพันธุ์ที่สร้างแบคเทอริโอซิน เมื่อนำมาวิเคราะห์พบว่าเป็นสายพันธุ์ *L. sakei* สร้าง sakacin P และแบคเทอริโอซินตัวใหม่อีก 2 ชนิด โดยให้ชื่อว่า sakacin 5X และ sakacin 5T ซึ่งแบคเทอริโอซินทั้งสองให้ผลการยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ทำให้เบียร์เกิดการเน่าเสีย

Sookkhee *et al.* (2001) คัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากปากของคนไทยที่มีสุขภาพดีจำนวน 130 คน พบแบคทีเรียแลคติกจำนวน 3790 ไอโซเลท มี 5 สายพันธุ์ ได้แก่ D6, D14, N14, L17, และ N8 ทั้งหมดให้ผลการยับยั้ง *Sarcina lutea* ATCC 9341, *B. cereus* ATCC 11778, *E. coli* ATCC 25922, *Stap. aureus* ATCC 6538, *Strep. mutans* DTMU 1, *Strep. Salivarius* DTMU 1, *Strep. Sanguis* DTMU 1, *Candida albicans* ATCC 13803 และ *C. albicans* DTMU 2 เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 5 มาตรวจวิเคราะห์พบว่า D6, D14, N14 คือ *L. paracasei* subsp. *paracasei* และ L17 กับ N8 คือ *L. rhamnosus*

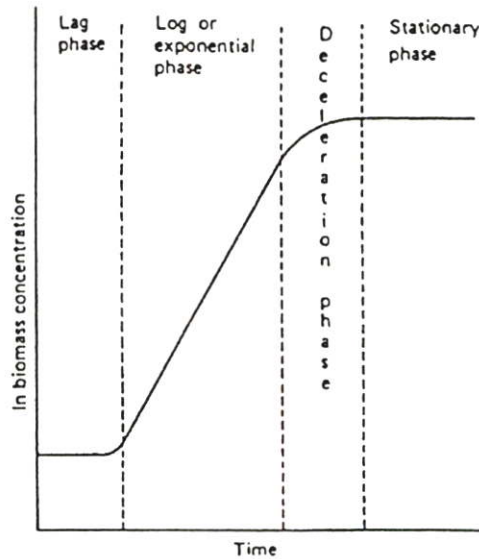
Leisner *et al.* (2001) พบว่าแบคทีเรียแลคติกเป็นจุลินทรีย์ที่ตรวจพบมากใน tempoyak ซึ่งเป็นทุเรียนหมักที่เค็มเกลือลงไปเล็กน้อยของประเทศมาเลเซีย บ่งชี้ว่าแบคทีเรียแลคติกที่พบนั้น โดยส่วนใหญ่เป็น *L. plantarum* นอกนั้นเป็น *L. brevis*, *Leu. Mesenteroides*, *L. mali* และ *L. fermentum*

**2.3 จลนพลศาสตร์ของการหมัก (fermentation kinetics)** (คุชณี ธาระบริพัฒน์, 2537; เกศกมล ไทยทอง, 2542; สมใจ ศิริโชค, 2544)

การศึกษาเกี่ยวกับจลนพลศาสตร์ของการหมักเป็นสิ่งจำเป็นที่จะทำให้ทราบถึงธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงในกระบวนการหมักชนิดหนึ่งๆ อย่างละเอียด โดยศึกษาอัตราเร็วของปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยต่างๆ ที่สำคัญเช่น อัตราการเจริญของจุลินทรีย์ อัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ และอัตราการตายของจุลินทรีย์ เป็นต้น นอกจากนี้ยังศึกษาถึงอิทธิพลของปัจจัยต่างๆ ที่เกี่ยวข้อง ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาทางจลนพลศาสตร์เหล่านี้จะเป็นประโยชน์มากต่อการควบคุมปัจจัยต่างๆ และการจัดระบบของกระบวนการหมักให้เป็นไปอย่างมีประสิทธิภาพ

จลนพลศาสตร์ของการหมัก หมายถึง อัตราการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่มีเอนไซม์ ซึ่งได้มาจากการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์เป็นตัวเร่ง การเปลี่ยนแปลงของตัวแปรที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมหมัก ได้แก่การใช้สารอาหาร (substrate utilization) การสร้างผลิตภัณฑ์ (product formation) และการเพิ่มมวลของเซลล์ รวมทั้งการให้อากาศและการดูดซึมเอาออกซิเจนเข้าไปใช้ภายในเซลล์ ในทางปฏิบัติแล้วจลนพลศาสตร์ของการหมัก จะหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยาทั้งหมด (gross overall reaction rate) การหมักสามารถแบ่งตามลักษณะของกระบวนการที่ใช้ได้เป็น 3 ชนิดคือ batch, continuous และ fed-batch fermentation

**2.3.1 Batch fermentation** จัดเป็นระบบการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบปิด โดยที่สารอาหารเริ่มต้นจะถูกจำกัดเอาไว้ ซึ่งภายหลังจากที่จุลินทรีย์ถูกเติมลงไปแล้วเพียงครั้งเดียวจะมีการเจริญเติบโต ผ่านช่วงระยะเวลาต่างๆ ดังแสดงในรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในสภาพการเพาะเลี้ยงแบบ batch culture

ที่มา: คุษณี ธนะบริพัฒน์ (2537)

เมื่อใส่จุลินทรีย์ลงในอาหาร ระยะแรกเป็นระยะที่จุลินทรีย์กำลังปรับตัว เซลล์จะยังไม่มีการเพิ่มจำนวน เรียกระยะนี้ว่า lag phase ระยะเวลาในช่วง lag phase นี้ ในกระบวนการหมักในระดับอุตสาหกรรมจะต้องทำให้สั้นที่สุดเพื่อลดต้นทุนการผลิต โดยใช้เชื้อเริ่มต้น (starter หรือ inoculum) ที่เหมาะสม หลังจากนั้นจุลินทรีย์จะมีอัตราการเจริญเพิ่มขึ้นตามลำดับ จนกระทั่งเข้าสู่ exponential หรือ log phase ซึ่งเป็นระยะที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุดและคงที่ การเจริญของจุลินทรีย์ในระยะ log phase นี้สามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$\frac{dx}{dt} = \mu x \quad (1)$$

เมื่อ  $x$  = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ (biomass)

$t$  = เวลา มีหน่วยเป็นชั่วโมง

$\mu$  = อัตราการเจริญจำเพาะ (specific growth rate) มีหน่วยเป็นชั่วโมง<sup>-1</sup>

เมื่อ integrate สมการ (1) จะได้

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

เมื่อ  $x_0$  = ความเข้มข้นของมวลเซลล์เริ่มต้น

$x_t$  = ความเข้มข้นของมวลเซลล์หลังจากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา  $t$  ชั่วโมง

$e$  = ฐานของ natural logarithm

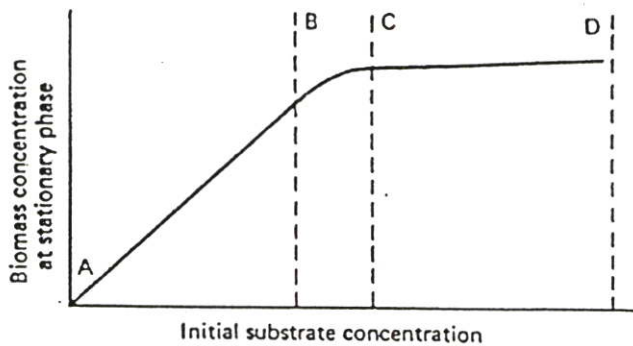
เมื่อใส่ natural logarithm ในสมการ (2) จะได้

$$\ln x_t = \ln x_0 + \mu t \quad (3)$$

ดังนั้นเมื่อเขียนกราฟระหว่าง natural logarithm ของความเข้มข้นของมวลเซลล์กับเวลา จะได้กราฟเส้นตรงซึ่งมีค่าความลาดเอียง (slope) เท่ากับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{\max}$ ) ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของจุลินทรีย์และสภาพแวดล้อมในการเพาะเลี้ยงเชื้อ

ถ้าดูจากสมการ (2) อาจจะทำให้เข้าใจว่าจุลินทรีย์สามารถเพิ่มจำนวนได้อย่างต่อเนื่องไม่มีที่สิ้นสุด แต่ในความเป็นจริงการเจริญของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดด้วยสารอาหาร และสารพิษที่จุลินทรีย์สร้างขึ้น ดังนั้นหลังจากที่จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วไปได้ระยะหนึ่งแล้ว อัตราการเจริญจะค่อยๆ ลดลง จนกระทั่งหยุดเจริญเพิ่มจำนวน

การศึกษาการเจริญที่มีขอบเขตจำกัดของจุลินทรีย์เมื่อเพาะเลี้ยงแบบ batch ในอาหารที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้นต่างกัน พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์สูงสุดที่ระยะ stationary phase กับความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น แบ่งได้เป็น 3 โซนคือ A-B, B-C และ C-D ดังแสดงในรูปที่ 2.4



รูปที่ 2.4 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้นต่อปริมาณเซลล์สูงสุด  
ที่มา: คุษณี ธนะบริพัฒน์ (2537)

ในโซน A-B ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ stationary phase จะเพิ่มขึ้นเป็นอัตราส่วน โดยตรงกับความเข้มข้นของสับสเตรทที่เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถเขียนเป็นสมการได้ดังนี้

$$x = Y (S_R - s) \quad (4)$$

เมื่อ  $x$  = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่ผลิตได้

$Y$  = yield cofactor (dimensionless constant)

$S_R$  = ความเข้มข้นของสับสเตรทเริ่มต้น

$s$  = ความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือ

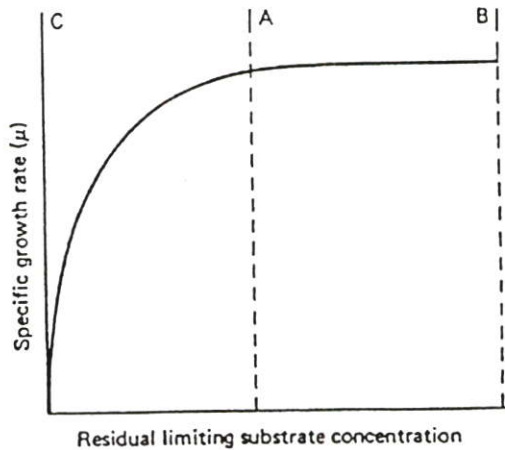
ในโซน A-B การเจริญเพิ่มจำนวนของจุลินทรีย์จะหยุดลงเมื่อ  $s$  มีค่าเท่ากับศูนย์ ดังนั้นจึงสามารถใช้สมการ (4) ในการประมาณค่าปริมาณเซลล์ที่เกิดขึ้นจากสารอาหารที่ใช้เป็นสับสเตรทได้

ในโซน B-C แม้ว่าความเข้มข้นของสับสเตรทที่ใช้จะเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณเซลล์ที่ stationary phase จะเพิ่มขึ้นในอัตราที่ลดลงตามลำดับ เนื่องจากการสะสมสารพิษที่เกิดจากการเจริญของเซลล์เองและการสะสมสารพิษนี้เมื่อเพิ่มขึ้นมากถึงจุดหนึ่งแล้วจะทำให้เซลล์ไม่สามารถเพิ่มจำนวนต่อไปได้ แม้จะเพิ่มความเข้มข้นของสับสเตรทอีกก็ตาม ดังแสดงในโซน C-D

นอกจากนี้การที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญลดลงจนกระทั่งหยุดการเจริญเติบโต เนื่องจากอาหารหมด ยังสามารถอธิบายได้ในรูปความสัมพันธ์ระหว่าง  $\mu$  และความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลืออยู่โดยใช้สมการของ Monod และรูปที่ 2.5 ดังนี้คือ

$$\mu = \mu_{\max} s / K_s + s \quad (5)$$

เมื่อ  $K_s$  = ค่าคงที่ในการใช้สับสเตรท (substrate utilization constant) ซึ่งมีค่าเท่ากับความเข้มข้นของสับสเตรท เมื่อ  $\mu$  เท่ากับ  $\frac{1}{2} \mu_{\max}$  และเป็นค่าที่แสดงสัมพรรคภาพ (affinity) ของจุลินทรีย์ต่อสับสเตรทอีกด้วย



รูปที่ 2.5 ผลของความเข้มข้นของสับสเตรทที่เหลือต่ออัตราการเจริญจำเพาะของแบคทีเรีย  
ที่มา: คุยฉี ชนะบริวัฒน์ (2537)

จากรูปที่ 2.5 โชน A-B จะอยู่ในช่วง log phase ซึ่งอยู่ในช่วงที่มีความเข้มข้นของสับสเตรทมากเกินพอและจุลินทรีย์มีอัตราการเจริญสูงสุด ส่วนโชน C จะอยู่ในช่วง deceleration phase ซึ่งเป็นช่วงที่จุลินทรีย์มีอัตราการเจริญลดลง เนื่องจากความเข้มข้นของสับสเตรทลดลง จึงมีอาหารเหลือไม่เพียงพอที่จะทำให้จุลินทรีย์เจริญได้ในอัตราสูงสุด ในกรณีที่จุลินทรีย์มีสัมพรรคภาพต่อสับสเตรทสูง (มีค่า  $K_s$  ต่ำ) อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเริ่มลดลงก็ต่อเมื่อความเข้มข้นของสับสเตรทลดลงถึงระดับที่ต่ำมาก ดังนั้นจึงทำให้มี deceleration phase สั้น แต่ในกรณีที่จุลินทรีย์มีสัมพรรคภาพต่อสับสเตรทต่ำ (มีค่า  $K_s$  สูง) อัตราการเจริญของจุลินทรีย์จะเริ่มลดลงที่ความเข้มข้นของสับสเตรทค่อนข้างสูง จึงทำให้มี deceleration phase ยาว

การหมักแบบ batch นี้ สามารถใช้ได้ทั้งการผลิตมวลเซลล์ สารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิ และสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ โดยในการผลิตมวลเซลล์ควรใช้สภาวะการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ส่งเสริมให้เซลล์มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด การผลิตสารเมตาบอไลต์ปฐมภูมิควรทำให้การเจริญในระยะ log phase ยาวที่สุด และผลิตสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิ ควรใช้สภาวะที่ทำให้มี log phase สั้นๆ แต่ทำให้มี stationary phase ยาวๆ หรือใช้สภาวะที่ทำให้อัตราการเจริญในช่วง log phase ลดลง ก็จะทำให้มีการสร้างสารเมตาบอไลต์ทุติยภูมิได้เร็วขึ้น

2.3.2 Continuous fermentation เป็นการหมักในอาหารเหลวแบบต่อเนื่องในระบบเปิด เนื่องจากจะมีการไหลเข้าออกของสารอาหารภายในถังหมักตลอดเวลา การหมักแบบนี้เป็นการเติมวัตถุดิบและสารอาหารเข้าไปในถังหมักอย่างต่อเนื่อง ในขณะที่เดียวกันก็มีการแยกเอาอาหาร

เหลวซึ่งมีผลิตภัณฑ์ละลายอยู่ออกมาตลอดเวลา โดยมีการควบคุมอัตราการเติมสารอาหารเข้าและการนำอาหารเหลวออกจากถังหมักให้เท่ากัน

ในการเลี้ยงจุลินทรีย์ในถังหมักแบบต่อเนื่องชนิดผสมเป็นเนื้อเดียวกัน การเติมอาหารใหม่ลงไปในถังหมักในอัตราส่วนที่เหมาะสมกับการนำอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากถังหมัก จะทำให้เกิดสภาวะคงที่ (steady state) ซึ่งจะทำให้ปริมาณเซลล์ที่เกิดใหม่สมดุลกับปริมาณเซลล์ที่ถูกคัดออกจากถังหมัก ภายใต้สภาวะนี้ค่า  $\mu$  จะเท่ากับ dilution rate (D) เนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของเซลล์

ค่า D ( $h^{-1}$ ) เป็นค่าการไหลของอาหารเข้าสู่ระบบถังหมักต่อหน่วยปริมาตรของอาหารเหลวที่บรรจุอยู่ในถังหมัก สามารถเขียนสมการได้ดังนี้

$$D = F/V \quad (6)$$

เมื่อ V = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในถังหมัก (culture volume) หน่วยเป็นลูกบาศก์เมตร

F = อัตราการไหล (Flow rate) ของอาหารเลี้ยงเชื้อเข้าสู่ถังหมัก มีหน่วยเป็นลูกบาศก์เมตรต่อชั่วโมง

ปริมาณเซลล์ในถังหมักที่เพิ่มขึ้น (dx/dt) จะเป็นความแตกต่างระหว่างอัตราการเจริญและอัตราการนำออก ดังสมการ

$$\begin{aligned} dx/dt &= \text{growth} - \text{output} \\ &= \mu x - Dx \end{aligned} \quad (7)$$

และภายใต้สภาวะ steady state อัตราการเพิ่มเซลล์ในถังหมักจะสมดุลกับอัตราการนำเซลล์ออกจากถังหมัก นั่นคือสภาวะ steady state ในทางตรงกันข้ามถ้าค่า D เข้าใกล้ค่า  $\mu_{max}$  การนำเซลล์ออกจากถังหมักจะสูงกว่าอัตราการเจริญของเซลล์ในถังหมัก ทำให้เกิดสภาพที่เรียกว่า wash-out นั่นคือ เซลล์จุลินทรีย์ในถังหมักจะถูกชะล้างออกไปจนหมด ดังนั้นในระบบการหมักอย่างต่อเนื่องจึงต้องมีการคำนวณเพื่อให้อัตราการไหลเข้าของอาหารสัมพันธ์กับอัตราการไหลออกของอาหารและเซลล์จุลินทรีย์

**2.3.3 Fed-batch fermentation** เป็นการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch ซึ่งมีการเติมอาหารเข้าไปอย่างต่อเนื่อง หรือเติมเป็นระยะๆ โดยไม่มีการถ่ายอาหารที่เพาะเลี้ยงเชื้อแล้วออกเลย เพราะฉะนั้นปริมาตรของอาหารจะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

ถ้าพิจารณาการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แบบ batch การเจริญของจุลินทรีย์จะถูกจำกัดโดยความเข้มข้นของสับสเตรท ดังนั้นความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่เวลาใดๆ จะหาได้จากสมการ

$$x_t = x_0 + Y (S_R - s) \tag{8}$$

เมื่อ  $x_t$  = ความเข้มข้นของมวลเซลล์ภายหลังการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา  $t$  ชั่วโมง

$x_0$  = ความเข้มข้นของเชื้อเริ่มต้น

เมื่อ  $s \approx 0$  ความเข้มข้นของมวลเซลล์จะมีค่ามากที่สุด ( $x_{max}$ ) และทำให้  $x_0$  มีค่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับ  $x_{max}$  ดังจากสมการ (8) จะได้

$$x_{max} \approx Y S_R \tag{9}$$

ถ้าเริ่มเติมอาหารเพิ่มในเวลาที  $x$  มีค่าเท่ากับ  $x_{max}$  โดยให้อัตราการเจือจางมีค่าต่ำกว่า  $\mu_{max}$  จะทำให้สับสเตรทที่เข้าสู่ภาชนะเพาะเลี้ยงเชื้อถูกใช้ไปอย่างรวดเร็ว ดังนั้น

$$FS_R \approx \mu (X/Y) \tag{10}$$

เมื่อ  $F$  = อัตราการไหลของอาหาร

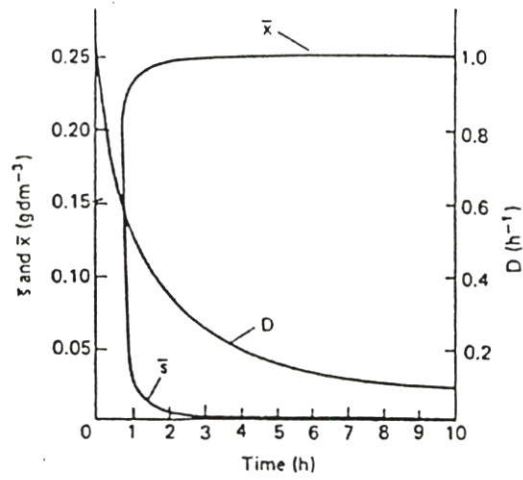
$X$  = ปริมาณมวลเซลล์ทั้งหมดในระบบ

=  $xV$  เมื่อ  $V$  คือปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในระบบที่เวลา  $t$

จากสมการ (10) อาจสรุปได้ว่าสับสเตรทที่เพิ่มเติมเข้าไป มีค่าเท่ากับสับสเตรทที่จุลินทรีย์ใช้ไป ดังนั้น  $ds/dt \approx 0$  และแม้ว่าปริมาณมวลเซลล์ทั้งหมด ( $X$ ) จะเพิ่มขึ้นตามระยะเวลา แต่ความเข้มข้นของมวลเซลล์ ( $x$ ) จะมีค่าคงที่ นั่นคือ  $dx/dt \approx 0$  และ  $\mu \approx D$  สถานะเช่นนี้เรียกว่า quasi steady state อย่างไรก็ตามอัตราการเจือจางจะลดลงเมื่อเวลาเพิ่มขึ้นตามลำดับดังแสดงในรูปที่ 2.6 เนื่องจากปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อในภาชนะเพิ่มขึ้น การหาค่า  $D$  สามารถคำนวณได้จากสมการ

$$D = F / (V_0 + Ft) \tag{11}$$

เมื่อ  $V_0$  = ปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เวลาเริ่มต้น



รูปที่ 2.6 การเปลี่ยนแปลงของอัตราการเจือจาง ความเข้มข้นของสับสเตรท และความเข้มข้นของมวลเซลล์ที่ quasi steady state ในระบบ fed-batch  
ที่มา: คุษณี ธนะบริพัฒน์ (2537)

# บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการ

### 3.1 เชื้อจุลินทรีย์

3.1.1 *S. cerevisiae* M30 เป็นยีสต์ตกตะกอน (flocculent yeast) ได้รับความอนุเคราะห์จาก ดร. จรุงย์ คำนวมตา และ รศ.ดร. สาวิตรี ลิ้มทอง ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

3.1.2 เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่ใช้ในการทดสอบกิจกรรมการยับยั้ง ได้แก่ *E. coli* ATCC25922 *Lis. innocua* ATCC33090T *Stap. aureus* ATCC12600 *B. cereus* ATCC6633 และ *S. anatum* SO86105

### 3.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

3.2.1 เครื่องชั่งแบบหยาบ	PE 204	Mettler	สวิสเซอร์แลนด์
3.2.2 เครื่องชั่งแบบละเอียด	BP 221S	Sartorius	เยอรมัน
3.2.3 เครื่องเขย่าผสม	G-560E	Vortex	สหรัฐอเมริกา
3.2.4 ตู้บ่มเชื้อ		Memmert	เยอรมัน
3.2.5 เครื่องเขย่าแบบหมุน	3017	GFL	เยอรมัน
3.2.6 ตู้อบไมโครเวฟ	NN-5656F	National	จีน
3.2.7 หม้อนึ่งความดัน	SS-320	Tomy	ญี่ปุ่น
3.2.8 ตู้อบฆ่าเชื้อแบบแห้ง			ไทย
3.2.9 ตู้ปลอดเชื้อ	ABS 1200A		อังกฤษ
3.2.10 เครื่องปั่นเหวี่ยง	Universal 16	Hettich	เยอรมัน
3.2.11 เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Spectro 22		สหรัฐอเมริกา
3.2.12 กล้องจุลทรรศน์	CH 30	Olympus	ญี่ปุ่น

### 3.3 สารเคมี

3.3.1 Ammonium citrate	Merck
3.3.2 Magnesium sulfate heptahydrate	Carloerba
3.3.3 Manganese (II) sulfate monohydrate	Merck
3.3.4 Sodium acetate	Merck
3.3.5 di-Potassium hydrogen phosphate-3-hydrate	Merck

3.3.6 Streptomycin	Merck
3.3.7 Cycloheximide	Sigma
3.3.8 Urea	Merck

### 3.4 สารอาหาร

3.4.1 Proteose peptone	Oxoid
3.4.2 Meat extract	Merck
3.4.3 Yeast extract	Merck
3.4.4 Dextrose	Merck
3.4.5 Tween 80	Labchem
3.4.6 Brain heart broth	Merck
3.4.7 Malt extract	Merck

### 3.5 วิธีดำเนินการทดลอง

#### 3.5.1 การแยกเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล

3.5.1.1 เก็บน้ำอ้อย (2 แหล่ง) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 0 10 24 และ 32 ชั่วโมง เพื่อศึกษาปริมาณและจัดจำแนกเบื้องต้นของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่มีในน้ำอ้อย

3.5.1.2 แยกเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยตามข้อ 3.5.1.1 และกากน้ำตาลโดยการเจือจางน้ำอ้อยหรือกากน้ำตาลใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water โดยเจือจางให้ลดลงทีละ 10 เท่า นำตัวอย่างที่เจือจางในระดับที่เหมาะสมมาแยกจุลินทรีย์แบบ viable plate count โดยวิธี spread plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนจุลินทรีย์ (cfu ต่อมิลลิลิตร) ที่เจริญขึ้นมา

3.5.1.3 การจัดจำแนก (Classification) จุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยและกากน้ำตาลขั้นพื้นฐานจากงานเพาะเชื้อมาลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีที่แยกเดี่ยวมาศึกษาลักษณะรูปร่าง (morphology) ลักษณะสรีรวิทยา (physiology) และทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ซึ่งยึดตามแนวทางการจัดจำแนกแบคทีเรียจากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 ดังนี้

1) การย้อมสีแกรม (Gram stain) ตามวิธีของ Hucker (Doetsch, 1981) เกลี่ย (smear) เชื้อแบคทีเรียบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด ทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ นำไปผ่านเปลวไฟไปมา 2-3 ครั้ง หยดสีแกรมคริสตัลไวโอเล็ต (ภาคผนวก ข) ให้ทั่วบริเวณที่มีเชื้อเป็นเวลา 1 นาที ล้างด้วยน้ำ หยดแกรมไอโอดีน (ภาคผนวก ข) ลงให้ทั่วมนาน 1 นาที ล้างด้วยน้ำ

และล้างสีออกด้วย 95% เอทานอล โดยเอียงสไลด์ให้ 95% เอทานอลไหลผ่าน สังเกตคูสึคริสตัล ไวโอเล็ตที่ถูกชะออกมา พอเริ่มจาง หยุดปฏิกิริยาโดยจุ่มลงในน้ำ ชำน้ำให้แห้ง ย้อมสีซาฟรานิน โอ (ภาคผนวก ข) ลงบนเชื่อนาน 20-30 วินาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง นำไปตรวจลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมัน (oil-immersion objective) กำลังขยาย 1000 เท่า

2) การย้อมสปอร์ (endospore stain) ตามวิธีของ Schaeffer and Fulton (Doetsch, 1981) เกลี้ยเชื้อแบคทีเรียบนสไลด์ที่สะอาดทิ้งไว้ให้แห้งในอากาศ หยดมาลาไคท์กรีน (malachite green) เข้มข้น 5% (ภาคผนวก ข) ให้ท่วมบริเวณที่มีเชื้อ ใช้ไฟลนใต้สไลด์พอให้เกิดเป็นไอ 1-2 นาที คอยหยดสีเติมลงไปอย่าให้แห้ง ล้างสีออกด้วยน้ำที่ไหลจากก๊อกน้ำ 30 วินาที ย้อมสีทับด้วยสีซาฟรานินโอทิ้งไว้ 1 นาที ล้างน้ำและซับให้แห้ง นำไปตรวจดูสปอร์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัวน้ำมันกำลังขยาย 1000 เท่า จะเห็นสปอร์สีเขียว ส่วนเซลล์ที่เหลือจะติดสีแดง

3) การทดสอบเอนไซม์อะคาเลส (Smibert and Krieg, 1981) หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้น 3.0% (ภาคผนวก ข) ลงบนเชื้อแบคทีเรียที่อยู่บนสไลด์ที่สะอาด ถ้ามีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงว่าการทดสอบเป็นบวก คือแบคทีเรีนั้นสร้างเอนไซม์อะคาเลส

4) การทดสอบเอนไซม์ออกซิเดส (Smibert and Krieg, 1981) หยดสารละลายเตตระเมทิล พาราฟีนิล ไดเอมีน ไดไฮโดรคลอไรด์ เข้มข้น 1.0% (ภาคผนวก ข) ลงบนกระดาษกรองวอทแมน (Whatman) เบอร์ 1 ซีดบนกระดาษกรองเป็นเส้นยาวประมาณ 1-3 เซนติเมตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงภายใน 30 วินาที ถ้าเกิดสีม่วงตามขอบที่ซิดเชื้อ แสดงว่าผลการทดสอบเป็นบวกและแบคทีเรีนั้นสร้างเอนไซม์ออกซิเดส

### 3.5.2 การแยกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อย

แยกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อย (2 แห่่ง) ที่เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 32 ชั่วโมง เพื่อศึกษาปริมาณของแบคทีเรียแลคติกที่มีในน้ำอ้อย

3.5.2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อย เจือจางน้ำอ้อยใน 0.1 เปอร์เซ็นต์ peptone water โดยเจือจางให้ลดลงทีละ 10 เท่า นำตัวอย่างที่เจือจางในระดับที่เหมาะสมมาแยกจุลินทรีย์แบบ viable plate count โดยวิธี spread plate ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต (ภาคผนวก ก) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง นับจำนวนแบคทีเรีย (cell number) ที่เจริญขึ้นมา และสร้างวงใส

3.5.2.2 ศึกษาลักษณะต่างๆ ของแบคทีเรียปนเปื้อนที่เจริญบนผิวอาหารร่วน เช่น รุปปร่าง ขนาด สี ความโปร่งแสง ความทึบแสง ลักษณะขอบโคโลนี และลักษณะผิวโคโลนี เป็นต้น

3.5.2.3 การจัดจำแนก (classification) แบคทีเรียแลคติกในน้ำอ้อย

1) การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกในน้ำอ้อยขั้นพื้นฐาน เลือกแบคทีเรียแลคติกมาทำให้เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) โดยใช้เข็มเขี่ยเชื้อเก็บ (pick) เชื้อจากงานเพาะเชื้อมาลากบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 36 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีที่แยกเดี่ยวมาศึกษาลักษณะรูปร่าง (morphology) ลักษณะสรีรวิทยา (physiology) และทดสอบทางชีวเคมี (biochemical test) ซึ่งยึดตามแนวทางการจัดจำแนกแบคทีเรียจากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Otto and Norbert, 1986) ตามวิธีข้อ 3.5.1.3

2) การจัดจำแนกแบคทีเรียแลคติกในน้ำอ้อยระดับสกุล นำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้มาทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตจำนวน 49 ชนิด ใช้ API 50CH system บริษัท bioMérieux โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ต้องการทดสอบบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรียแลคติกใส่ใน Lactobacillus medium จนกระทั่งได้เชื้อปริมาณ 2 McF. จากนั้นหยดใน API 50CHI Medium ปิดทับด้วยน้ำมันพาราฟินเหลวที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สังเกตการเปลี่ยนแปลงสีแล้วนำไปวิเคราะห์ผลโดยใช้ APILAB Plus software program

3.5.3 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อย กากน้ำตาล และเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้

3.5.3.1 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบ

1) เชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยที่ชั่วโมงที่ 0 ในสภาวะมีอากาศได้แก่ 2A0/1, 2A0/2, 2A0/3, 2A0/4 และ 2A0/5 และเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากกากน้ำตาลในสภาวะมีอากาศและสภาวะมีอากาศเล็กน้อย ได้แก่ MA1, MA2, MA3, MF1, MF2 และ MF3 ทั้งนี้เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้ต้องนำไปเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะการเลี้ยงที่ต้องมีการให้อากาศตลอดเวลา

2) เชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคที่ใช้ทดสอบ ได้แก่ *Lis. innocua* ATCC 33090<sup>T</sup> *Stap. aureus* ATCC 12600 *B. cereus* ATCC 6633 *S. anatum* SO 86105 และ *E. coli* ATCC 25922

3.5.3.2 การทดสอบการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนบนอาหารแข็ง ทดสอบการยับยั้งโดยวิธี agar spot method (Spelhaug and Harlander, 1989) โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่

ต้องการทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงให้มีจำนวนประมาณ  $10^7$  cfu ต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลวมา 5 ไมโครลิตรหยดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคส 2 เปอร์เซ็นต์ บ่มเชื้อแบคทีเรียแลคติกในสภาวะที่มีอากาศเล็กน้อย โดยใช้ candle jar เปรียบเทียบกับเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่เลี้ยงโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีน้ำตาลกลูโคสเพียง 0.2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อจำกัดผลการยับยั้งจากการสร้างกรดและบ่มในสภาพที่ไม่มีออกซิเจนโดยใช้ anaerobic jar เพื่อจำกัดการเกิดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ บ่มแบคทีเรียแลคติกทั้งสองที่อุณหภูมิ 35-37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำแท็บด้วย BHI soft agar (ภาคผนวก ข) ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกจากน้ำอ้อย กากน้ำตาลและเชื้อแบคทีเรียที่ก่อโรค เจริญอยู่ประมาณ  $10^5$  cfu ต่อมิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งด้วยการวัดขนาดวงใสการยับยั้ง โดยวัดจากขอบหยดเชื้อแบคทีเรียแลคติกจนสุดขอบวงใส

3.5.3.3 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในอาหารเหลว นำแบคทีเรียแลคติกมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลวด้วยวิธี agar well diffusion assay (Schillinger and Lucke, 1989) โดยเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกที่ต้องการทดสอบโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นแบ่งส่วนใสออกเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกเป็นส่วนที่ไม่มีการปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วย 5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) เพื่อทดสอบการสร้างยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกในสภาพที่ไม่จำกัดผลการยับยั้งที่เกิดจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ส่วนที่สองเป็นส่วนที่จำกัดการผลของกรดโดยการปรับพีเอชเป็น 6.5 ด้วย 5 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) และจำกัดผลของไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยเติมเอนไซม์คะตะเลส (5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) จากนั้นนำส่วนใสทั้งสองส่วนมากรองผ่าน membrane filter ที่มีขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร เตรียมผสมเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยและกากน้ำตาลลงใน BHI soft agar ให้มีจำนวนเชื้อของจุลินทรีย์ปนเปื้อนประมาณ  $10^5$  cfu ต่อมิลลิลิตร เทใส่ในจานเพาะเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รอให้แข็งเจาะหลุมให้มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 6 มิลลิเมตร นำส่วนใสทั้งสองส่วนที่กรองผ่าน membrane filter ปริมาณ 100 ไมโครลิตร หยดลงในหลุม บ่มที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการยับยั้งด้วยการวัดขนาดวงใสการยับยั้ง โดยวัดจากขอบหยดเชื้อแบคทีเรียแลคติกจนสุดขอบวงใส

### 3.5.4 เปรียบเทียบสารอาหารแอมโมเนียมซัลเฟต ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) และยูเรีย ( $\text{H}_2\text{N CO NH}_2$ ) ต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารน้ำอ้อย

ในกระบวนการผลิตเซลล์ยีสต์มักนิยมใช้สารอาหารแอมโมเนียมซัลเฟตและยูเรียเป็นแหล่งไนโตรเจนเพื่อใช้ในการสร้างโปรตีนของเซลล์ยีสต์ ในการทดลองนี้จึงเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* M30 โดยใช้สารอาหารแอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 7 กรัมต่อลิตรกับการใช้สารอาหารยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร โดยสารอาหารทั้งสองจะใช้ร่วมกับสารอาหารโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตร และสารอาหารแมกนีเซียมซัลเฟต ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร ซึ่งมีอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MY (MY broth) เป็นตัวควบคุม ใช้สภาวะการเลี้ยงแบบเขย่า (shake flask) โดยทำการเขย่าที่ 150 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างที่ชั่วโมงที่ 0 18 24 นำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง (ภาคผนวก ข) ความเข้มข้นของน้ำตาล (ภาคผนวก ข) จำนวนค่าผลได้ของเซลล์ ( $Y_{x/s}$ ) และ จำนวนเชื้อยีสต์ (viable plate count) (ภาคผนวก ข)

### 3.5.5 ศึกษาการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะการหมักแบบ batch culture และใช้ถังหมักตัดแปลงแบบ air lift

เลี้ยงเชื้อ *S. cerevisiae* M30 ใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตจากข้อ 3.5.4 โดยหมักในถังหมักตัดแปลงแบบ air lift ที่มีปริมาตร 2.3 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 ชั่วโมง นำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาล อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{\text{max}}$ ) และจำนวนเชื้อยีสต์

### 3.5.6 ศึกษาการเจริญและกิจกรรมการยับยั้งจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ของแบคทีเรียแลคติกที่เลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* M30 โดยเปรียบเทียบการเลี้ยงในอาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อและอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในสภาวะการหมักแบบ batch และ cyclic fed-batch culture

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลคติกร่วมกับ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.5 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) และอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเช่นเดียวกับข้อ 3.5.4 ในถังหมักตัดแปลงแบบ air lift ที่มีปริมาตร 2.3 ลิตร อัตราการให้อากาศ 1.5 ลิตรต่อนาที ที่อุณหภูมิห้อง ในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture เก็บตัวอย่างในแต่ละรอบของ fed batch เพื่อนำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์น้ำหนักรวมเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาล จำนวนเชื้อแบคทีเรียแลคติกและยีสต์ที่มีชีวิต

3.5.7 ศึกษาการเจริญของ *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติก ในอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อย ในสภาวะการหมักแบบ batch และ cyclic fed-batch culture

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแลกติกร่วมกับ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อตั้งต้นของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยในสภาวะมีอากาศ โดยใช้สภาวะการหมักแบบ batch culture และในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture เก็บตัวอย่างในแต่ละรอบของ fed batch เพื่อนำมาวัดค่า OD ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง ความเข้มข้นของน้ำตาล จำนวนเชื้อยีสต์ แบคทีเรียแลกติกและเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่มีชีวิต

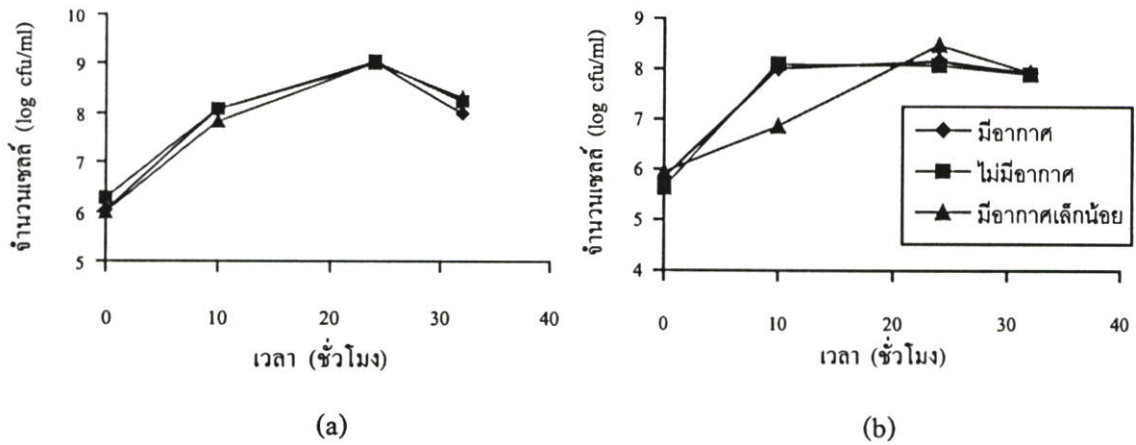
## บทที่ 4

### ผลการทดลองและวิจารณ์

#### 4.1 ผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยและกากน้ำตาล

จากการทดลองคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยจำนวน 2 แหล่งซึ่งเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0 10 24 และ 32 ชั่วโมง โดยบ่มเชื้อที่ 3 สภาวะ คือ มีอากาศ ไม่มีอากาศ และมีอากาศเล็กน้อย พบว่า น้ำอ้อยมีลักษณะทางกายภาพเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือ น้ำอ้อยสดจะมีสีเขียวอ่อน ใสและมีกลิ่นหอม ส่วนน้ำอ้อยเมื่อเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องจะมีสีอ่อนลง มีตะกอน มีกลิ่นเปรี้ยวและมีฟองเกิดขึ้น น้ำอ้อยที่เก็บไว้ตั้งแต่ 0 ถึง 32 ชั่วโมง มีการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนโดยพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนจะเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 24 และเมื่อผ่านไป 32 ชั่วโมงจะมีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนลดลง (รูปที่ 4.1) แต่เชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ชั่วโมงที่ 0 มีจำนวนไอโซเลทที่แยกได้มากกว่าและมีจำนวนไอโซเลทลดลงเมื่อเก็บน้ำอ้อยเป็นเวลา 32 ชั่วโมง และพบว่าลักษณะโคโลนิกรม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ (รูปที่ 4.2) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่มีจำนวนมากในแต่ละชั่วโมงของการเก็บ (ตารางที่ 4.2 และ 4.3) จากการศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาพบว่าเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่มีลักษณะโคโลนิกรม สีขาว ขนาดเล็ก ขอบเรียบ ดังกล่าวซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในน้ำอ้อยและตรวจพบตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึงชั่วโมงที่ 32 แสดงคุณลักษณะเป็นแบคทีเรียแลคติก คือ มีรูปร่างแบบแท่ง (rod) จนถึงแท่งสั้น (short rod) เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะเลสและออกซิเดส (Otto and Norbert, 1986) และเมื่อวัดค่าพีเอชของน้ำอ้อยตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 จนถึงชั่วโมงที่ 32 พบว่าค่าพีเอชของน้ำอ้อยลดลง (ตารางที่ 4.1) แสดงว่าในน้ำอ้อยนั้นมีจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกรดและเป็นจุลินทรีย์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นได้ Tilbury (1975) กล่าวถึงค่าพีเอชของน้ำอ้อยว่ามีค่าอยู่ระหว่าง 5.0-5.5 บุญส่ง แสงอ่อน (2527) วัดค่าพีเอชของน้ำอ้อยเริ่มต้นได้เท่ากับ 5.25 พบว่าใกล้เคียงกับค่าพีเอชเริ่มต้นที่วัดจากน้ำอ้อยที่ใช้ในการทดลองนี้ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 5.16 (ตารางที่ 4.1) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาชนิดของแบคทีเรียในน้ำอ้อยโดยบุญส่ง แสงอ่อน (2527) พบว่า *Streptococcus* เป็นแบคทีเรียที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในน้ำอ้อย นอกจากนี้บางครั้งยังตรวจพบเชื้อ *Lactobacillus fermentum*, *Leuconostoc mesenteroides* และ *Erwinia herbicola* สำหรับแบคทีเรียอื่นที่ตรวจพบโดยทั่วไปในปริมาณเล็กน้อย ได้แก่ *Leu. paramesenteroides*, *Staphylococcus aureus*, *Sarcina* sp., *Lactobacillus curvatus*, *L. xylosus*, *L. plantarum*, *L. cellobiosus*, *Bacillus licheniformis*, *B. coagulan*, *B. macerans*, *B. circulans*, *B.adius*, *B. brevis*, *Mycobacterium* spp., *Pseudomonas* spp.,

*Alcaligenes* spp., *Xanthomonas* spp., *Erwinia uredovora*, *Flavobacterium* spp., *Moraxella* sp., *Acinetobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Serratia* spp., และ *Proteus* spp.



รูปที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงจำนวนจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยที่เก็บที่อุณหภูมิห้องที่เวลา 0 ถึง 32 ชั่วโมง โดยบ่มที่สถานะมีอากาศ ไม่มีอากาศ และมีอากาศเล็กน้อย (a) การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยแหล่งที่ 1 (b) การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยแหล่งที่ 2

ตารางที่ 4.1 การเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำอ้อยเก็บที่อุณหภูมิห้องตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 32

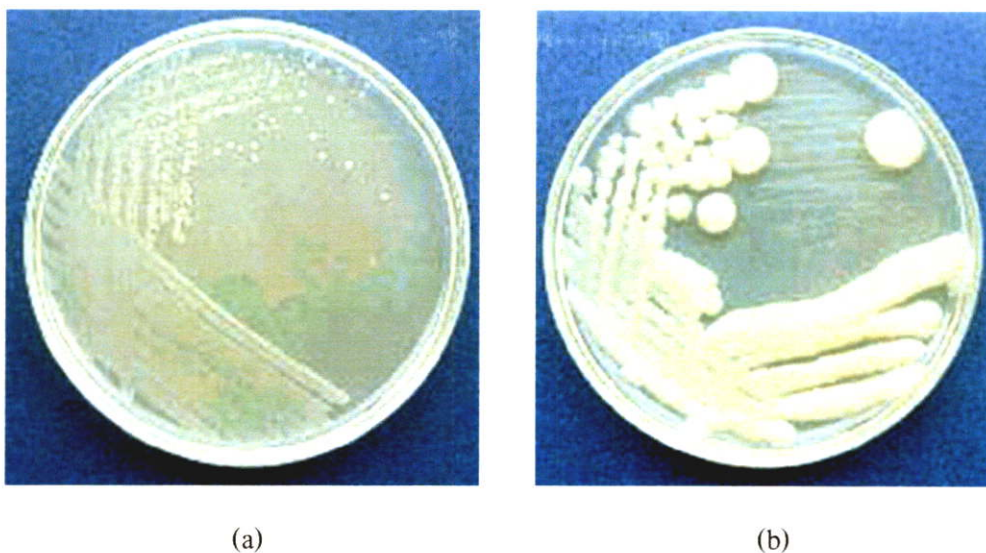
เวลา (ชั่วโมง)	ค่าพีเอช
0	5.16
10	5.08
24	4.05
32	3.52

ตารางที่ 4.2 การจัดจำแนกกลุ่มจุดนิทรรศน์ที่เป็นปรเภทที่ขึ้นประชากรส่วนใหญ๋และลักษณะทางสรีรวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์บนเป็อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 1

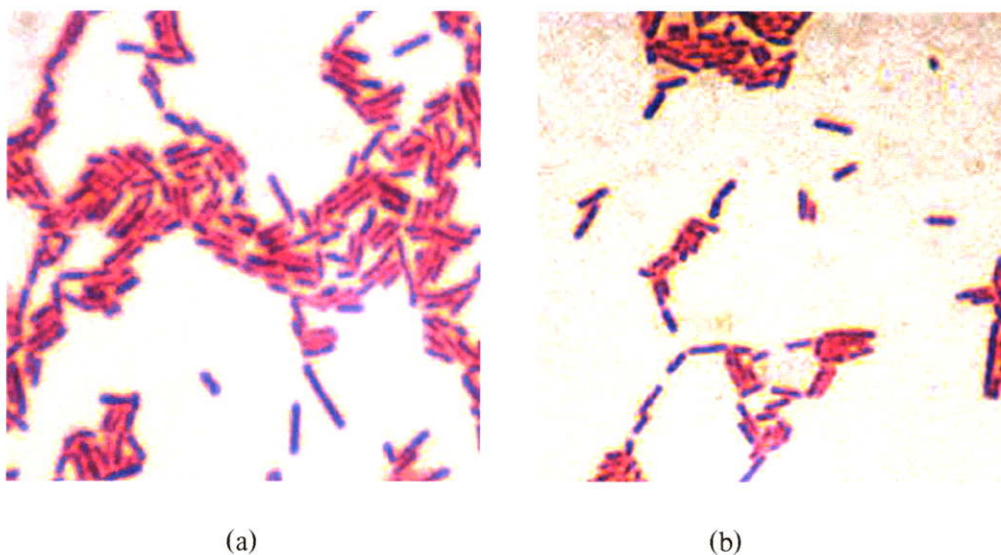
ขั้่งโม่งที่	สภาวะการบ่ม	ลักษณะโคโดไน้	ร้อยละ	รูปร่าง	แกรม	การสร้างสปอร์	การสร้างเอนไซม์คะตาเลส	การสร้างเอนไซม์ออกซิเดส	
0	มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	32.17	แท่งสั้น	+	-	-	-	
		กลม ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ	54.22	แท่ง	+	-	+	-	
	ไม่มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	96.13	แท่ง	+	-	-	-	
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	37.54	แท่งสั้น	+	-	-	-	
	10	มีอากาศ	กลม ขนาดใหญ่ สีเหลือง ขอบเรียบ	42.84	กลม	+	-	+	-
			กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	60.54	แท่ง	+	-	-	-
ไม่มีอากาศ		กลม ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ	29.85	แท่งสั้น	+	-	+	-	
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	98.34	แท่งสั้น	+	-	-	-	
24	มีอากาศเล็กน้อย	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	23.66	แท่ง	+	-	-	-	
		กลม ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ	44.23	แท่งสั้น	+	-	+	-	
	มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่งสั้น	+	-	-	-	
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่งสั้น	+	-	-	-	
	ไม่มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่ง	+	-	-	-	
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่งสั้น	+	-	-	-	
32	มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่งสั้น	+	-	-	-	
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่งสั้น	+	-	-	-	
	ไม่มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่งสั้น	+	-	-	-	
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่ง	+	-	-	-	

ตารางที่ 4.3 การจัดจำแนกคุณลักษณะที่เป็นประโยชน์ต่อประชากรส่วนใหญ่และลักษณะทางสถิติของเชื่อกฎบัตรที่แยกได้จากน้ำอ้อยแห้งที่ 2

ช่วงโม่งที่	สภาวะการบ่ม	ลักษณะโคโกลี่	ร้อยละ	รูปร่าง	แกรม	การสร้างสปอร์	การสร้างเอนไซม์ อะคาเลส	การสร้างเอนไซม์ ออกซิเดส
0	มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	37.73	แท่ง	+	-	-	-
		ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบหัก	24.79	แท่งสั้น	-	-	+	-
	ไม่มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	54.25	แท่ง	+	-	-	-
		กลม ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ	39.74	แท่งสั้น	+	-	-	+
10	มีอากาศเล็กน้อย	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	35.79	แท่ง	+	-	-	-
		กลม ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ	30.16	แท่ง	+	-	-	+
	มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	85.72	แท่งสั้น	+	-	-	-
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	87.39	แท่งสั้น	+	-	-	-
	มีอากาศเล็กน้อย	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	80.18	แท่งสั้น	+	-	-	-
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่งสั้น	+	-	-	-
24	มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่งสั้น	+	-	-	-
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่งสั้น	+	-	-	-
	ไม่มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	100	แท่ง	+	-	-	-
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	73.84	แท่งสั้น	+	-	-	-
32	มีอากาศ	กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	71.94	แท่งสั้น	+	-	-	-
		กลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ	59.48	แท่งสั้น	+	-	-	-

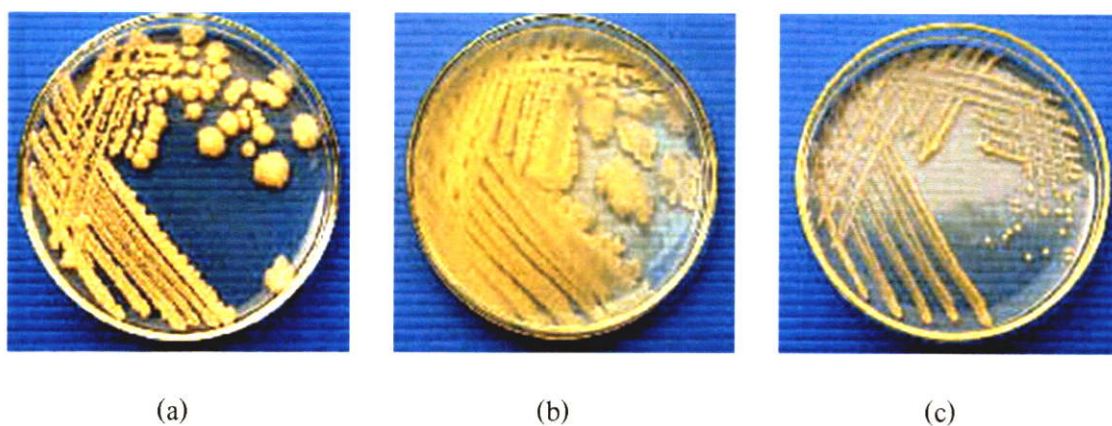


รูปที่ 4.2 ลักษณะโคโลนีของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พบมากในน้ำอ้อยทั้งสองแหล่ง (a) โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ (b) โคโลนีกลม ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ

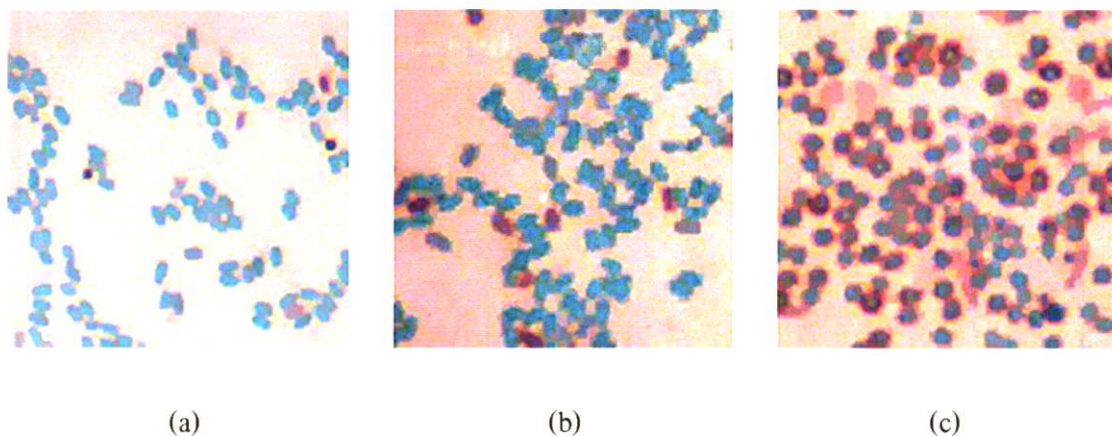


รูปที่ 4.3 ลักษณะทางสรีรวิทยา (ย้อมแกรม) ของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พบมากในน้ำอ้อยทั้งสองแหล่ง (a) โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะเลสและออกซิเดส (b) โคโลนีกลม ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบเรียบ เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปแท่ง ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะเลสและออกซิเดส (ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า)

จุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ตรวจพบในกากน้ำตาลนั้นพบว่าลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากสภาวะการบ่มแบบมีอากาศและสภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อยมีลักษณะเหมือนกัน คือ ลักษณะโคโลนีสีขาว มีลักษณะนูน คล้ายดาว (รูปที่ 4.4a) โคโลนีสีขาว ขอบหยัก (รูปที่ 4.4b) และโคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ ผิวโคโลนีมัน (รูปที่ 4.4c) ซึ่งหลังจากศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาแล้วพบว่าลักษณะโคโลนีดังกล่าวเป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก สร้างสปอร์ สร้างเอนไซม์อะไมเลส และไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดส เมื่อเทียบกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Otto and Norbert, 1986) พบว่าจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลมีแนวโน้มเป็นกลุ่มของ *Bacillus* ส่วนจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากสภาวะการบ่มแบบไม่มีอากาศมีลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก สีขาว ขอบเรียบ ผิวโคโลนีเป็นมัน เป็นแบคทีเรียรูปท่อน แกรมบวก สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์อะไมเลสและออกซิเดส สอดคล้องกับ เกศกมล ไทยทอง (2542) ซึ่งทำการแยกและคัดเลือกแบคทีเรียปนเปื้อนที่เป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาลพบว่า แบคทีเรียที่ปนเปื้อนในกากน้ำตาลเป็นทั้งแบคทีเรียที่เป็นรูปแท่ง สร้างสปอร์และไม่สร้างสปอร์ โดยชนิดที่เป็นประชากรส่วนใหญ่่นั้นเป็นชนิดที่สร้างสปอร์ และเมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาเทียบกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 พบว่าเป็นแบคทีเรียที่อยู่ในสกุลของ *Bacillus*



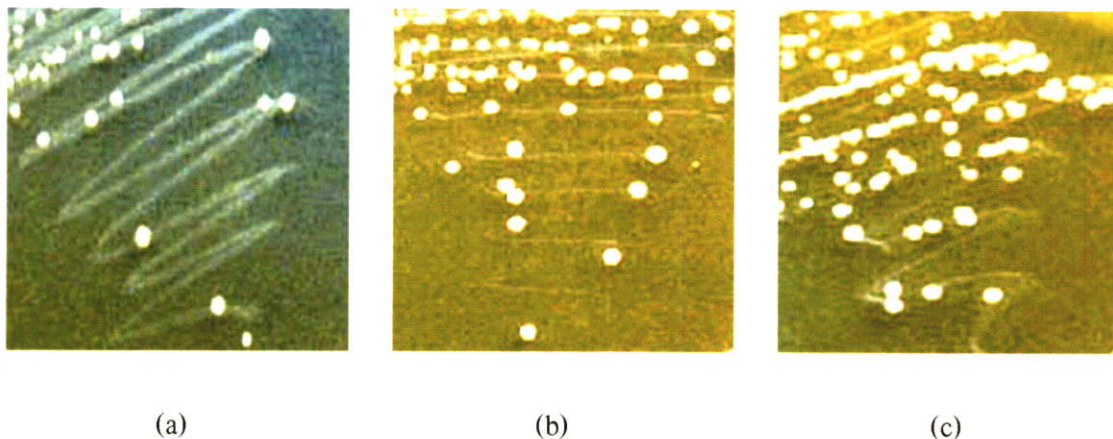
รูปที่ 4.4 ลักษณะโคโลนีของจุลินทรีย์ปนเปื้อนในกากน้ำตาลที่ตรวจพบที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศและมีอากาศเล็กน้อย (a) โคโลนีสีขาว นูน คล้ายดาว (b) โคโลนีสีขาว ขอบหยัก (c) โคโลนีกลม สีขาว ขนาดเล็ก ผิวโคโลนีมัน



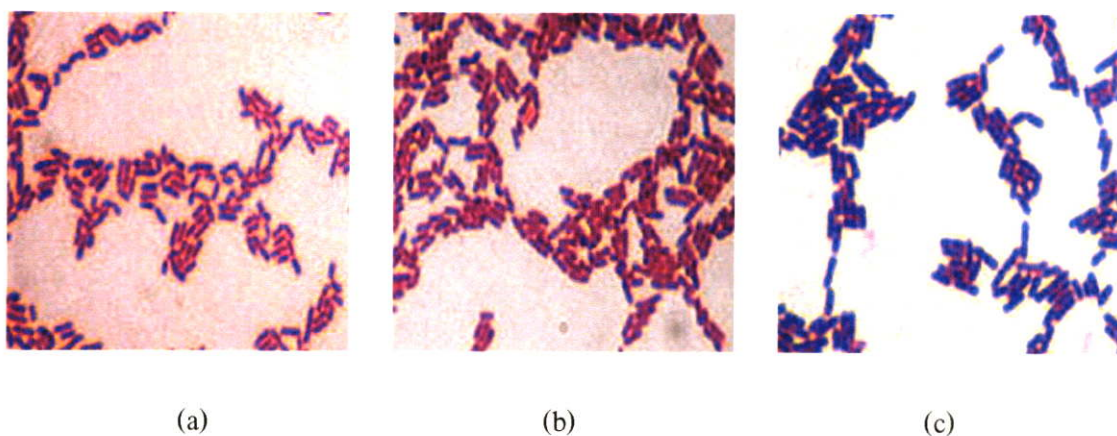
**รูปที่ 4.5** ลักษณะทางสรีรวิทยา (ย้อมสปอร์) ของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากกากน้ำตาลที่  
 สภาพการบ่มแบบมีอากาศและมีอากาศเล็กน้อย (a) สปอร์ของโคโลนิสสีขาว นูน  
 คล้ายดาว (b) สปอร์ของโคโลนิสสีขาว ขอบหยัก (c) สปอร์ของโคโลนิสสีขา  
 ขนาดเล็ก ผิวโคโลนิมัน

#### 4.2 ผลการแยกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อย

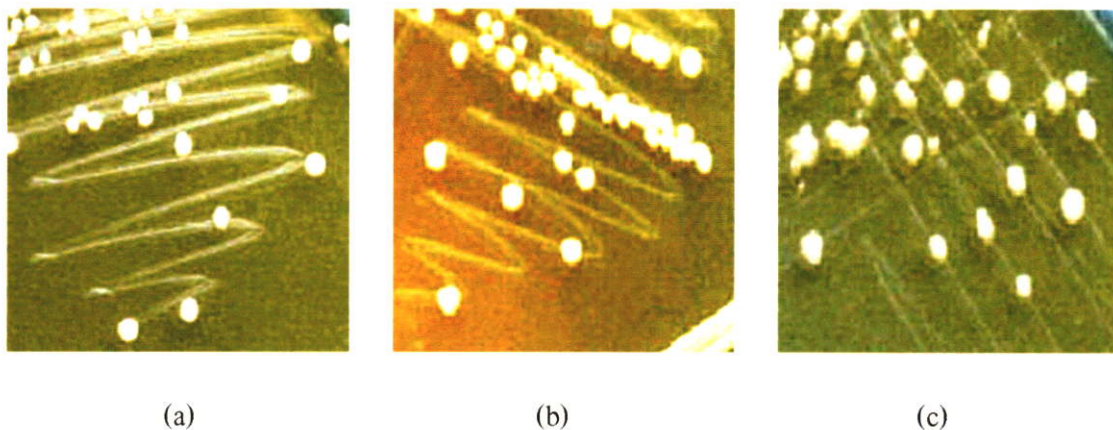
จากผลการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยทำให้ทราบว่าเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนและ  
 เป็นประชากรส่วนใหญ่ในน้ำอ้อยซึ่งตรวจพบตั้งแต่การเก็บรักษาน้ำอ้อยที่อุณหภูมิห้องนาน 24 ถึง  
 32 ชั่วโมงนั้นมีแนวโน้มว่าเป็นแบคทีเรียแลคติก จึงทำการคัดแยกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อยเก็บ  
 อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 32 ชั่วโมงโดยบ่มที่ 2 สภาพ คือ ไม่มีอากาศ และมีอากาศเล็กน้อย เนื่อง  
 จากแบคทีเรียแลคติกจะสามารถเจริญเติบโตได้ดีที่สภาพดังกล่าว อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยก  
 แบคทีเรียแลคติก คือ อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (de Man, Rogosa, and Sharp medium) ที่เติม  
 แคลเซียมคาร์บอเนตซึ่งแบคทีเรียแลคติกจะสร้างกรดอินทรีย์ทำปฏิกิริยากับแคลเซียมคาร์บอเนต  
 เกิดเป็นวงใส (clear zone) ขึ้น พบว่า น้ำอ้อยเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 32 ชั่วโมงมีแบคทีเรีย  
 แลคติกเจริญเติบโตอยู่และมีลักษณะโคโลนิ ลักษณะทางสรีรวิทยา โดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้  
 จากน้ำอ้อยทั้งสองแหล่งมีความแตกต่างกัน แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 1 มี  
 ลักษณะโคโลนิที่แตกต่างจากน้ำอ้อยแหล่งที่ 2 ดังรูปที่ 4.6 และ 4.8



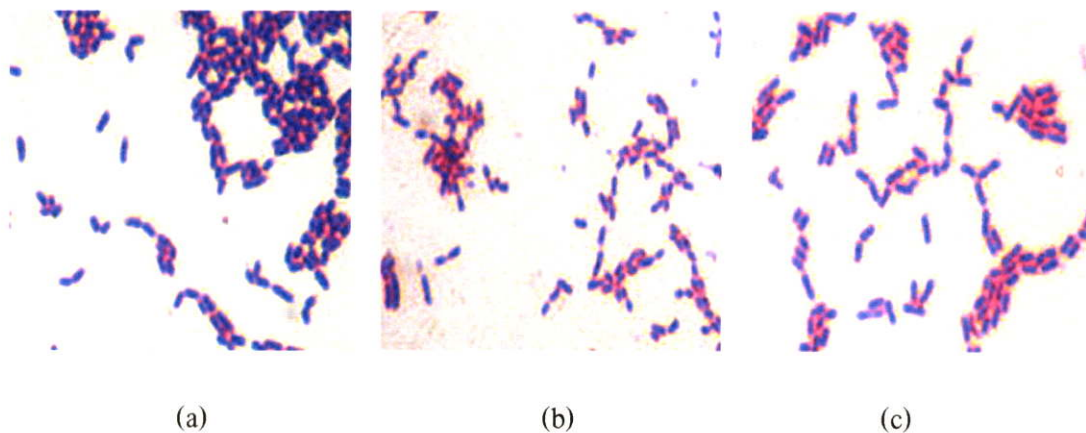
**รูปที่ 4.6** ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อยแหล่งที่ 1 (a) โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบไม่มีอากาศ (LAn) (b) โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (LF1) (c) โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีครีม แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (LF2)



**รูปที่ 4.7** ลักษณะทางสรีรวิทยาของแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อยแหล่งที่ 1 (a) ย้อมแกรมและรูปร่างของโคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบไม่มีอากาศ (LAn) (b) ย้อมแกรมและรูปร่างของโคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (LF1) (c) ย้อมแกรมและรูปร่างของโคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีครีม แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (LF2)



**รูปที่ 4.8** ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียแลกดิกที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 2 (a) โคโลนีกลม ขนาดใหญ่ สีขาว แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (2LF1) (b) โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (2LF2) (c) โคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีครีม แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (2LF3)



**รูปที่ 4.9** ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียแลกดิกที่แยกได้จากน้ำอ้อยแหล่งที่ 2 (a) ย้อมแกรม และรูปร่างของโคโลนีกลม ขนาดใหญ่ สีขาว แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (2LF1) (b) ย้อมแกรมและรูปร่างของโคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีขาว แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (2LF2) (c) ย้อมแกรมและรูปร่างของโคโลนีกลม ขนาดเล็ก สีครีม แยกได้ที่สภาวะการบ่มแบบมีอากาศเล็กน้อย (2LF3)

ผลการทดสอบการใช้คาร์โบไฮเดรตของเชื้อแบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทที่แยกได้จากน้ำอ้อย ดังตารางที่ 4.4

ตารางที่ 4.4 ผลการวิเคราะห์แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย

รหัส	ผลการวิเคราะห์	เปอร์เซ็นต์ความถูกต้อง (% identification)
LAn	<i>L. pentosus</i>	95.9
LF1	<i>L. pentosus</i>	95.9
LF2	<i>L. plantarum</i>	99.9
2LF1	<i>L. coprophilus</i>	99.2
2LF2	<i>Leuco. mes. mes/dext*</i>	99.9
2LF3	<i>L. plantarum</i>	99.9

\**Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides/dextranicum*

### 4.3 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกจากน้ำอ้อย กากน้ำตาล และแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย

4.3.1 การทดสอบการยับยั้งโดยใช้วิธี agar spot method (Spelhaug and Harlander, 1989)

จากผลการทดลองการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนและแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อย ในข้อ 4.1 และ 4.2 ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียแลคติกอาจยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่นๆ ที่พบในน้ำอ้อยได้โดยการสร้างสารยับยั้ง ได้แก่ กรดอินทรีย์ คาร์บอนไดออกไซด์ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และแบคทีริโอซิน ในการทดลองนี้จึงทดสอบการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยที่มีต่อเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่อยู่ในน้ำอ้อย โดยใช้แบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลทมาทดสอบ พบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้ (ตารางที่ 4.5) แสดงว่าแบคทีเรียที่แยกได้จากน้ำอ้อยสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในน้ำอ้อยได้ และเมื่อทดสอบการสร้างสารยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกในสภาพกำจัดกรสร้างกรดอินทรีย์ (อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 0.2%) และกำจัดกรสร้างไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (บ่มเชื้อใน anaerobic jar) พบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนได้แต่วงใสของการยับยั้งที่วัดได้จะมีขนาดเล็กกว่าสภาพการทดสอบแบบไม่กำจัดกรสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ แสดงว่า

แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยอาจสร้างสารอื่นที่นอกเหนือจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ได้ และเมื่อทดสอบการยับยั้งของแบคทีเรียแลคติกกับจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากกากน้ำตาลด้วยวิธีการเดียวกัน พบว่าแบคทีเรียแลคติกให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในกากน้ำตาลได้ (ตารางที่ 4.6)

**ตารางที่ 4.5** ผลการวัดขนาดวงใสของการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง

จุลินทรีย์ปนเปื้อน แบคทีเรียแลคติก		ขนาดวงใสของการยับยั้ง* (เซนติเมตร)				
		2A0/1	2A0/2	2A0/3	2A0/4	2A0/5
LAn	control	1.15	0.80	1.05	1.15	0.65
	sample	0.85	0.30	0.85	0.90	0.35
LF1	control	1.40	0.80	1.15	1.05	0.75
	sample	0.70	0.35	1.00	0.80	0.30
LF2	control	1.20	1.05	1.40	1.05	1.55
	sample	0.70	0.25	0.80	0.80	0.35
2LF1	control	0.65	0.65	0.65	0.45	0.7
	sample	0.20	0.10	0.30	0.25	0.10
2LF2	control	0.75	0.45	0.80	0.40	0.70
	sample	0.25	0.10	0.20	0.10	0.20
2LF3	control	1.10	0.60	0.95	0.90	0.90
	sample	0.60	0.20	0.55	0.45	0.15

\*ขนาดของวงใสวัดจากขอบของแบคทีเรียแลคติก ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

Control คือ ทดสอบภายใต้สภาวะการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Sample คือ ทดสอบภายใต้สภาวะจำกัดการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ตารางที่ 4.6 ผลการวัดขนาดวงใสของการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากกากน้ำตาลโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง

จุลินทรีย์ปนเปื้อน แบคทีเรียแลคติก		ขนาดวงใสของการยับยั้ง * (เซนติเมตร)					
		MA1	MA2	MA3	MF1	MF2	MF3
Lan	Control	0.45	0.55	0.50	0.55	0.25	0.65
	Sample	0.10	0.45	0.35	0.25	0.15	0.25
LF1	Control	0.45	0.50	0.45	0.60	0.25	0.35
	Sample	0.15	0.15	0.25	0.35	0.10	0.10
LF2	Control	0.45	0.35	0.20	0.55	0.35	0.40
	Sample	0.30	0.10	0.10	0.15	0.10	0.15
2LF1	Control	0.55	0.55	0.50	0.50	0.55	0.55
	Sample	0.10	0.20	0.10	0.10	0.10	0.10
2LF2	Control	0.45	0.40	0.30	0.45	0.45	0.50
	Sample	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10	0.10
2LF3	Control	0.50	0.45	0.35	0.50	0.30	0.55
	Sample	0.20	0.30	0.20	0.15	0.10	0.25

\*ขนาดของวงใสวัดจากขอบของแบคทีเรียแลคติก ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

Control คือ ทดสอบภายใต้สภาวะการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Sample คือ ทดสอบภายใต้สภาวะจำกัดการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

นอกจากทดสอบการสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อย และกากน้ำตาล ของแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยแล้ว เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคสายพันธุ์ที่สำคัญจำนวน 5 สายพันธุ์ ได้แก่ *Lis. innocua* ATCC 33090<sup>T</sup> *Stap. aureus* ATCC 12600 *B. cereus* ATCC 6633 *S. anatum* SO 86105 และ *E. coli* ATCC 25922 พบว่าแบคทีเรียแลคติกสามารถสร้างสารยับยั้งแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคได้ (ตารางที่ 4.7)

ตารางที่ 4.7 ผลการวัดขนาดวงใสของการยับยั้งแบบที่เรียกชื่อให้เกิดขึ้นโดยแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำซ้อยโดยวิธีทดสอบบนอาหารแข็ง

แบคทีเรีย	ขนาดวงใสของการยับยั้ง* (เซนติเมตร)											
	<i>E.coli</i> ATCC 25922		<i>Lis. innocua</i> ATCC 33090 <sup>T</sup>		<i>Stap. aureus</i> ATCC 12600		<i>B. cereus</i> ATCC 6633		<i>S. anatum</i> SO 86105			
	Control	sample	control	sample	control	sample	control	sample	control	sample	control	sample
LAn	0.85	0.20	0.75	0.10	0.50	0.10	0.60	0.10	0.60	0.10	0.60	0.10
LF1	0.90	0.15	0.85	0.20	0.75	0.10	0.65	0.10	0.70	0.10	0.70	0.10
LF2	0.90	0.25	0.80	0.10	0.65	0.10	0.75	0.15	0.70	0.10	0.70	0.10
2LF1	0.60	0.10	0.50	0.10	0.45	0.10	0.45	0.10	0.40	0.10	0.40	0.10
2LF2	0.70	0.15	0.60	0.10	0.35	0.10	0.40	0.10	0.50	0.10	0.50	0.10
2LF3	0.60	0.15	0.60	0.10	0.50	0.10	0.60	0.10	0.50	0.10	0.50	0.10

\*ขนาดของวงใสวัดจากขอบเขตที่เรียแลคติก ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

Control คือ ทดสอบภายใต้สภาวะการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Sample คือ ทดสอบภายใต้สภาวะจำกัดการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์โดยใช้สูตรอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS ที่มีการเติมโปตัสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต เพื่อจำกัดผลกรการสร้างกรด (ภาคผนวก ก)

#### 4.3.2 การทดสอบการสร้างสารยับยั้งโดยใช้วิธี agar well diffusion (Schillinger and Lucke, 1989)

จากผลการทดสอบการสร้างสารยับยั้งด้วยวิธี agar spot method ทำให้ทราบว่าแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยสามารถสร้างสารยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยและกากน้ำตาลได้ จึงนำแบคทีเรียแลคติกดังกล่าวมาทดสอบการสร้างสารยับยั้งโดยใช้วิธี agar well diffusion กับจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยที่ 0 ชั่วโมงที่สภาวะมีอากาศและ (ตารางที่ 4.8) จุลินทรีย์ปนเปื้อนที่แยกได้จากกากน้ำตาลที่เจริญเติบโตที่สภาวะมีอากาศและมีอากาศเล็กน้อย (ตารางที่ 4.9) พบว่า ส่วนโสมที่ได้จากการเลี้ยงแบคทีเรียแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ให้ผลจากการสร้างยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยและกากน้ำตาลได้บางไอโซเลทเท่านั้น และขนาดวงใสของการยับยั้งมีขนาดเล็กกว่าการทดสอบด้วยวิธี agar spot method รวมทั้งบางครั้งไม่สามารถเห็นผลการยับยั้งทั้งกรณีของการทดสอบภายใต้สภาวะการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และการทดสอบภายใต้สภาวะจำกัดการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากวิธี agar spot method เป็นการเลี้ยงเซลล์ของแบคทีเรียแลคติกบนอาหารแข็ง ซึ่งแบคทีเรียแลคติกนั้นจะสร้างสารยับยั้งได้อย่างต่อเนื่องตลอดเวลาในการทดสอบ ทำให้สารยับยั้งมีปริมาณมากพอสำหรับยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ใช้ทดสอบ ในขณะที่วิธี agar well diffusion นั้นจะใช้สารในรูปสารละลายซึ่งอาจไม่เข้มข้นเพียงพอต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่ใช้ทดสอบ (วิลาวณิชย์ เจริญจิระตระกูล, 2543)

ตารางที่ 4.8 ผลการวัดขนาดวงไสของการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากน้ำอ้อยโดยแบคทีเรียแลกติก  
ที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยวิธีทดสอบการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว

แบคทีเรียแลกติก \ จุลินทรีย์ปนเปื้อน		ขนาดวงไสของการยับยั้ง* (เซนติเมตร)				
		2A0/1	2A0/2	2A0/3	2A0/4	2A0/5
LAn	control	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	sample	-	-	0.1	-	-
LF1	control	0.2	0.2	0.2	0.1	0.1
	sample	-	0.1	0.1	-	0.1
LF2	control	0.1	0.2	0.4	0.1	0.1
	sample	0.1	-	0.4	-	-
2LF1	control	0.2	-	0.2	-	-
	sample	-	-	0.2	-	-
2LF2	control	0.1	-	0.2	-	-
	sample	-	-	0.2	-	-
2LF3	control	0.2	0.1	0.2	0.1	-
	sample	-	-	0.2	-	-

\*ขนาดของวงไสวัดจากขอบของแบคทีเรียแลกติก ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลอง  
จำนวน 2 ซ้ำ

Control คือ ทดสอบภายใต้สภาวะการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Sample คือ ทดสอบภายใต้สภาวะจำกัดการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

ตารางที่ 4.9 ผลการวัดขนาดวงไสของการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนจากกากน้ำตาลโดยแบคทีเรีย  
แลกดิกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยวิธีทดสอบการสร้างสารยับยั้งในอาหารเหลว

แบคทีเรียแลกดิก \ จุลินทรีย์ปนเปื้อน		ขนาดวงไสของการยับยั้ง * (เซนติเมตร)					
		MA1	MA2	MA3	MF1	MF2	MF3
Lan	Control	-	-	0.05	-	-	0.05
	Sample	-	-	-	-	-	-
LF1	Control	-	0.05	0.10	-	0.10	0.20
	Sample	-	-	0.05	-	0.05	0.15
LF2	Control	-	-	0.10	-	-	0.20
	Sample	-	-	0.05	0.05	-	0.05
2LF1	Control	-	-	0.10	-	-	0.20
	Sample	-	-	0.05	-	-	0.05
2LF2	Control	-	-	0.10	-	-	0.20
	Sample	-	-	0.05	-	-	0.10
2LF3	Control	-	-	0.20	-	0.10	0.20
	Sample	-	-	0.05	-	-	0.10

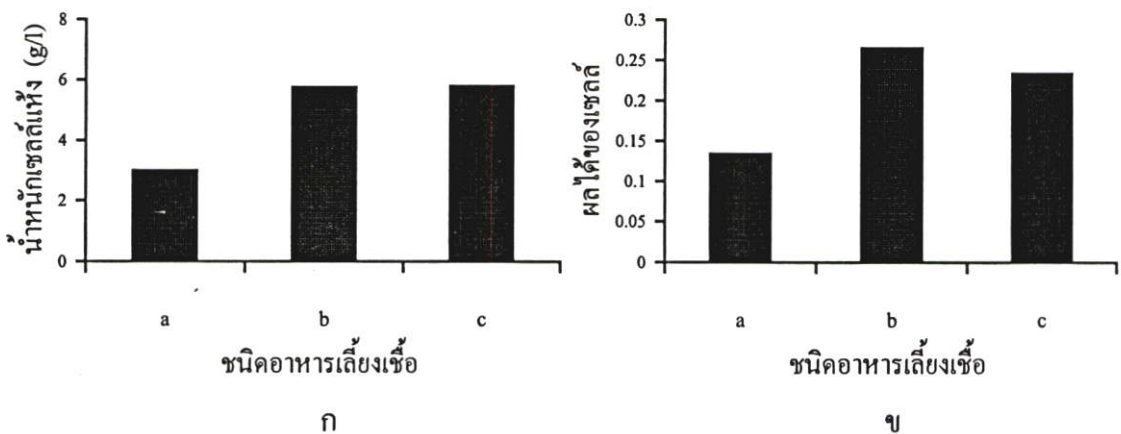
\*ขนาดของวงไสวัดจากขอบของแบคทีเรียแลกดิก ค่าที่ได้เป็นค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลองจำนวน 2 ซ้ำ

Control คือ ทดสอบภายใต้สภาวะการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

Sample คือ ทดสอบภายใต้สภาวะจำกัดการสร้างกรดและไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

#### 4.4 ผลการเปรียบเทียบการใช้แอมโมเนียมซัลเฟต ((NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) และยูเรีย (H<sub>2</sub>N CO NH<sub>2</sub>) ต่อการเจริญของ *S. cerevisiae* M30 โดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

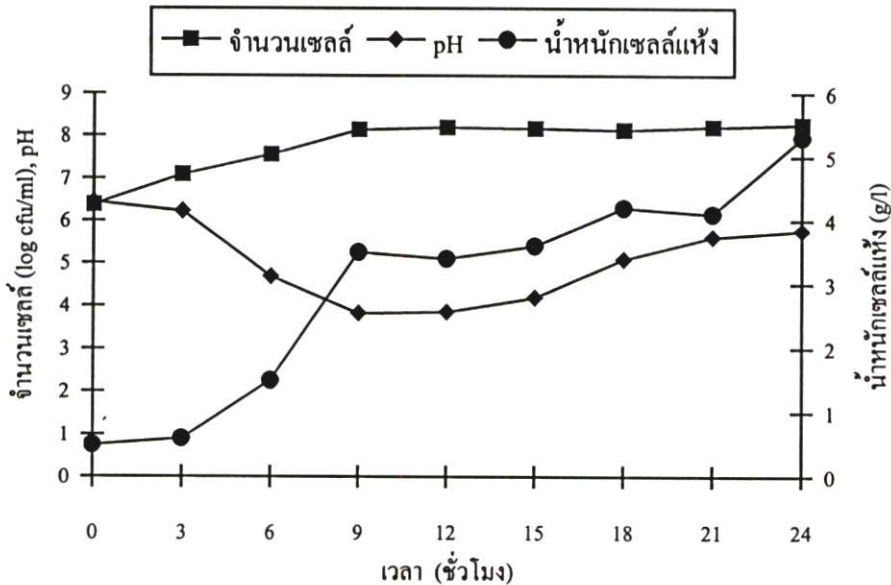
จากการทดลองใช้แอมโมเนียมซัลเฟตปริมาณ 7 กรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับการใช้ยูเรีย ปริมาณ 1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งไนโตรเจน ร่วมกับโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) ปริมาณ 3 กรัมต่อลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟต (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) ปริมาณ 0.5 กรัมต่อลิตร โดยใช้น้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน ที่สภาวะการเลี้ยงแบบเขย่า พบว่า *S. cerevisiae* M30 สามารถเจริญเติบโตในอาหารน้ำอ้อยที่เติมสารอาหารยูเรียได้ดีกว่า อาหารน้ำอ้อยที่เติมสารอาหารแอมโมเนียมซัลเฟต โดย *S. cerevisiae* M30 ให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด คือ 5.75 กรัมต่อลิตร ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับค่าน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดและค่าผลได้ของเซลล์ (Y<sub>x/s</sub>) ของ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงในอาหารเหลว MY พบว่าให้ค่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.10)



รูปที่ 4.10 น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด (ก) และผลได้ของเซลล์ (ข) ของ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงโดยใช้ (a) อาหารน้ำอ้อยเติมแอมโมเนียมซัลเฟต (b) อาหารน้ำอ้อยเติมยูเรีย (c) อาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MY

#### 4.5 ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะการหมักแบบ batch culture และใช้ถังหมักคัดแปลงแบบ air lift

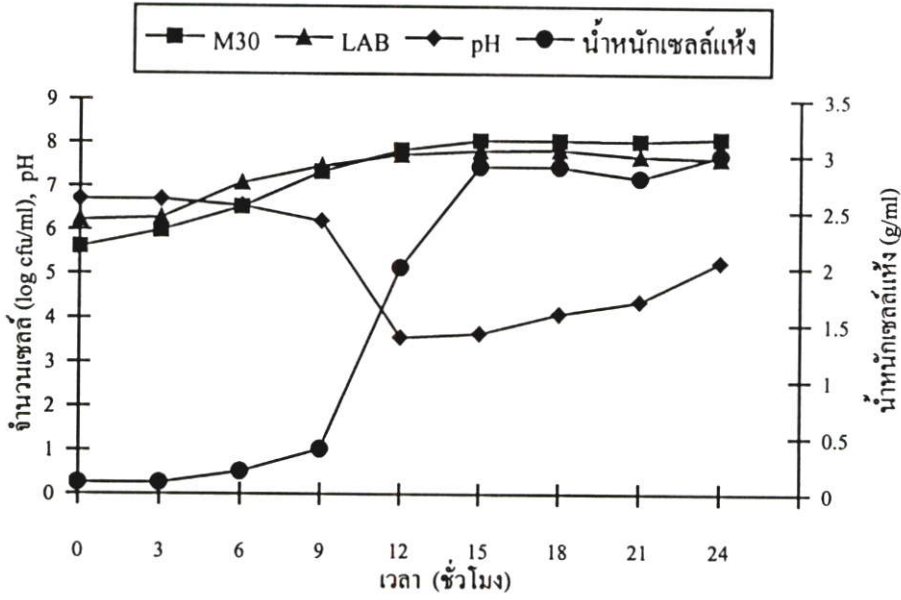
การเจริญเติบโตของ *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะการหมักแบบ batch culture โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่มีความเข้มข้นของน้ำตาล 2 เปอร์เซ็นต์เป็นแหล่งคาร์บอน และยูเรีย 1 กรัมต่อลิตรเป็นแหล่งของไนโตรเจน ร่วมกับโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตรและแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ในถังหมักคัดแปลงแบบ air lift พบว่า *S. cerevisiae* M30 มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) เท่ากับ 0.444 ต่อชั่วโมง (ภาคผนวกรูปที่ 1ค) ค่าเฉลี่ยจากการทำการทดลอง 2 ซ้ำ และให้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.30 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชของน้ำหมักลดลงจนถึงชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.82 จากนั้นจึงเพิ่มขึ้น (รูปที่ 4.11)



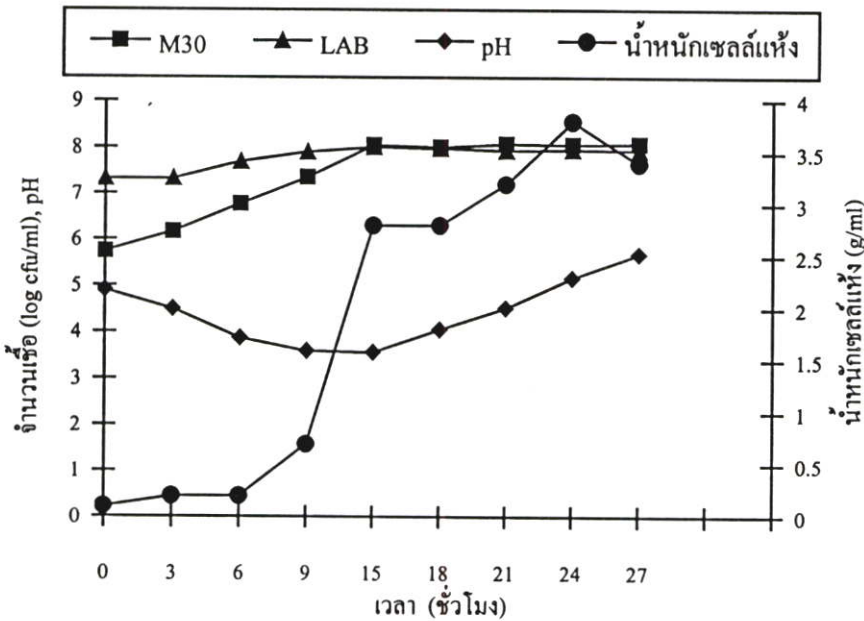
รูปที่ 4.11 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง และค่าพีเอชของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะการหมักแบบ batch culture ในถังหมักคัดแปลงแบบ air lift

#### 4.6 ผลการศึกษาการเจริญของ *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย โดยเปรียบเทียบการใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน ในสภาวะการหมักแบบ batch และสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture

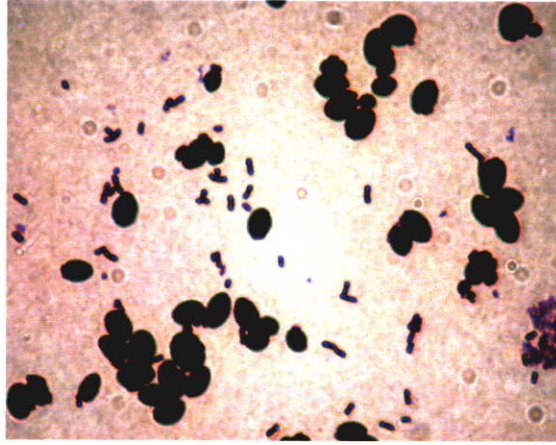
กระบวนการผลิตเซลล์ยีสต์ในระดับอุตสาหกรรมส่วนใหญ่มักไม่มีการฆ่าเชื้อวัตถุดิบเนื่องจากเป็นการเพิ่มค่าใช้จ่ายให้สูงขึ้น ดังนั้นหากมีการนำแบคทีเรียแลกติกซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในวัตถุดิบมาเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* M30 อาจเป็นแนวทางหนึ่งในการลดปริมาณเชื้อปนเปื้อนในวัตถุดิบได้ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงนำแบคทีเรียแลกติก LF2 (*L. plantalum*) ซึ่งทดสอบการยับยั้งด้วยวิธี agar spot method แล้วพบว่าไม่ยับยั้งการเจริญของ *S. cerevisiae* M30 มาเลี้ยงร่วมกับ *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะการหมักแบบ batch culture โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อเปรียบเทียบกับอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ พบว่า *S. cerevisiae* M30 สามารถเจริญเติบโตร่วมกับแบคทีเรียแลกติกได้โดยพิจารณาจากอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อพบว่า มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.442 ต่อชั่วโมง (ภาคผนวกรูปที่ 2ก) และอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงโดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.419 ต่อชั่วโมง (ภาคผนวกรูปที่ 3ค) แต่น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากอาหารน้ำอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีค่าน้อยกว่าการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 เพียงอย่างเดียว กล่าวคือ ในอาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.0 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.12) และอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อได้น้ำหนักเซลล์แห้ง 3.8 กรัมต่อลิตร (รูปที่ 4.13) ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารที่อยู่ในถังหมักมีอย่างจำกัดแต่มีจุลินทรีย์สองชนิดเจริญเติบโต ทำให้เกิดการใช้สารอาหารร่วมกัน ยีสต์จึงใช้สารอาหารได้น้อยลง ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ในอาหารน้ำอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื่อนั้น พบว่า น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารน้ำอ้อยทั้งสองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) (ตารางที่ 4.11) ส่วนค่าพีเอชของการเลี้ยงในอาหารน้ำอ้อยทั้งสอง พบว่าค่าพีเอชของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกในอาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชที่ลดลงในชั่วโมงที่ 12 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.56 จากนั้นจึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยมีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 5.27 ส่วนค่าพีเอชของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกในอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อมีการเปลี่ยนแปลงของค่าพีเอชที่ลดลงในชั่วโมงที่ 15 ซึ่งมีค่าพีเอชเท่ากับ 3.56 จากนั้นจึงมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นโดยมีค่าพีเอชสุดท้ายเท่ากับ 5.68



รูปที่ 4.12 จำนวนเซลล์ น้ำหมักเซลล์แห้ง และค่าพีเอชของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในสภาวะการหมักแบบ batch culture



รูปที่ 4.13 จำนวนเซลล์ น้ำหมักเซลล์แห้ง และค่าพีเอชของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในสภาวะการหมักแบบ batch culture

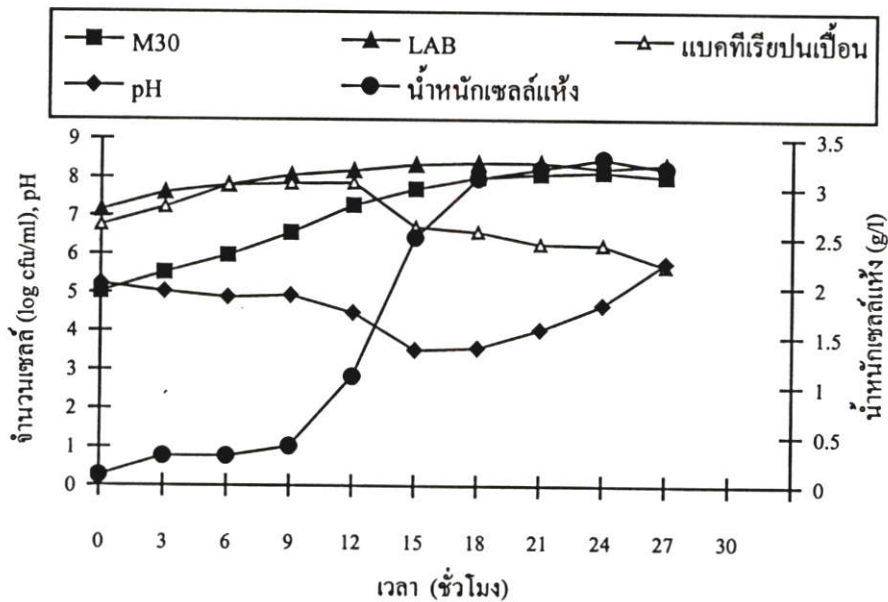


รูปที่ 4.14 การเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกในสภาวะการหมักแบบ batch culture ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1,000 เท่า

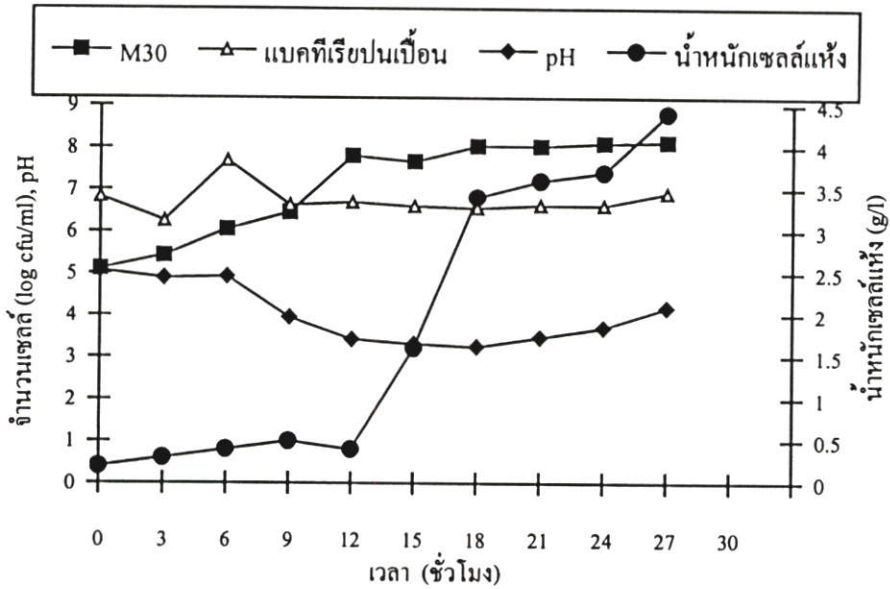
#### 4.7 ผลการศึกษาการเจริญของ *S. cerevisiae* M30 ในอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อและเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อย เปรียบเทียบกรณีที่มีและไม่มีแบคทีเรียแลกติกเจริญร่วมด้วย ในสภาวะการหมักแบบ batch และ cyclic fed-batch culture

ในการทดลองนี้ศึกษาการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกในอาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ และมีการเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยซึ่งมีลักษณะโคโลนีแบบ ขนาดใหญ่ สีขาว ขอบหยัก แกรมลบ ไม่สร้างสปอร์และไม่สร้างเอนไซม์ออกซิเดสแต่สร้างเอนไซม์อะเลส และเป็นประชากรส่วนใหญ่ที่ตรวจพบในน้ำอ้อยที่ 0 ชั่วโมง (ตารางที่ 4.3) จากการเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนดังกล่าวในการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยพบว่า จำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจนถึงชั่วโมงที่ 6 และจากชั่วโมงที่ 6 ถึง 12 มีแนวโน้มคงที่แต่หลังจากชั่วโมงที่ 12 จนถึงชั่วโมงที่ 27 มีแนวโน้มลดลง ในขณะที่เดียวกันกับ *S. cerevisiae* M30 และแบคทีเรียแลกติกสามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนมากขึ้น และเมื่อพิจารณาอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดซึ่งเท่ากับ 0.426 ต่อชั่วโมง (ภาคผนวกรูปที่ 4ค) ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดที่ได้จากการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 เพียงอย่างเดียว ( $P > 0.05$ ) (ตารางที่ 4.11) และน้ำหนักเซลล์แห้งเท่ากับ 3.3 กรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 24 ของการเลี้ยงในสภาวะแบบ batch culture (รูปที่ 4.15) และเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียปนเปื้อนโดยไม่มีการเติมแบคทีเรียแลกติก (รูปที่ 4.16) พบว่า จำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนมีแนวโน้มลดลงเช่นเดียวกัน ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแบคทีเรียปนเปื้อนที่เติมลงไป อาจเป็นสายพันธุ์ที่ไม่ทนสภาวะที่มีค่าพีเอชต่ำ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากน้ำอ้อยที่ชั่วโมงที่ 0 ซึ่งค่าพีเอชของน้ำอ้อยไม่สูงมาก (pH

5.16) และจากการตรวจนับแบคทีเรียปนเปื้อนบนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง NA นั้น พบว่า นอกเหนือจากแบคทีเรียปนเปื้อนที่เดิมลงไปแล้วยังตรวจพบแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆ (ตารางที่ 4.10) ด้วย ในขณะที่การเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลคติกนั้นไม่พบการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นนอกจากแบคทีเรียปนเปื้อนที่เดิมลงไป แสดงว่า แบคทีเรียแลคติกอาจสร้างสารยับยั้งอื่นที่สามารถยับยั้งแบคทีเรียปนเปื้อนในน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบในการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ได้ และจากการสังเกตพบว่าแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆ ที่ตรวจพบนั้นมีลักษณะโคโคไนด์และลักษณะทางสรีรวิทยาเมื่อเทียบเคียงกับ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 2 (Dorothy and Collins, 1986) พบว่าคล้ายกับ *Mycobacterium* ซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียที่เจริญในน้ำอ้อยซึ่งบุญส่ง แสงอ่อน (2527) พบว่า *Mycobacterium* นั้นเป็นแบคทีเรียที่ตรวจพบปริมาณน้อยในน้ำอ้อย



รูปที่ 4.15 จำนวนเซลล์ ค่าพีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้งของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลคติก และเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อน ในสภาวะการหมักแบบ batch culture



รูปที่ 4.16 จำนวนเซลล์ ค่าพีเอช และน้ำหนักรวมเซลล์แห้งของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียปนเปื้อน ในสภาวะการหมักแบบ batch culture

ตารางที่ 4.10 ลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสรีรวิทยาของจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พบในระหว่างกระบวนการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะที่ไม่มีการเติมแบคทีเรียแลกติก

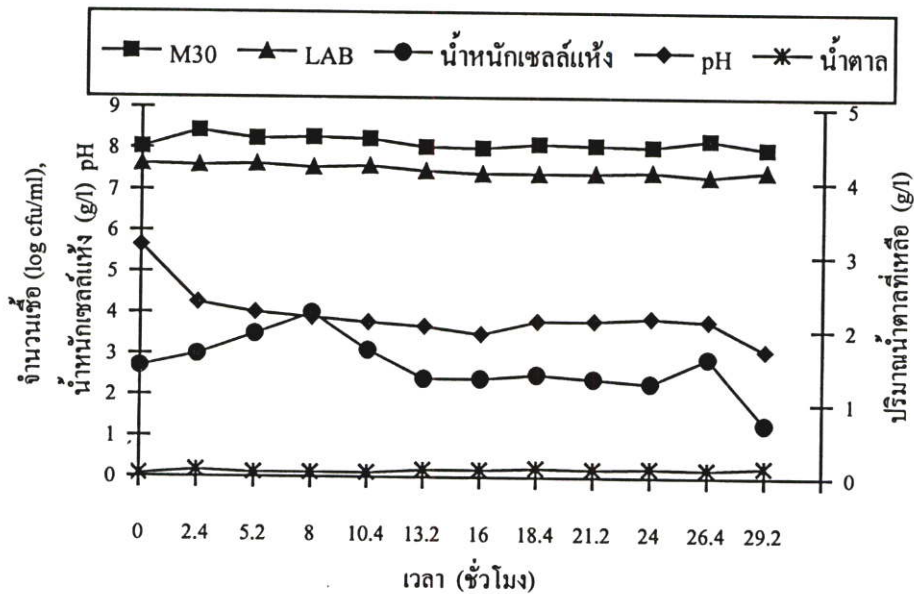
ลักษณะโคโลนี	รูปร่าง	แกรม	การสร้างสปอร์	การสร้างเอนไซม์ อะตาเลส	การสร้างเอนไซม์ ออกซิเดส
กลม ขนาดใหญ่ สีเหลือง	แท่ง	+	-	+	-
กลม สีชมพู	แท่งสั้น	+	-	+	-
กลม ขนาดเล็ก สีขาว	แท่ง	+	-	+	-
กลม ขนาดเล็ก สีเหลือง	แท่ง	+	-	+	-
กลม สีม่วง	แท่ง	+	-	+	-

ตารางที่ 4.11 อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด ( $\mu_{max}$ ) และน้ำหนักเซลล์แห้งของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30

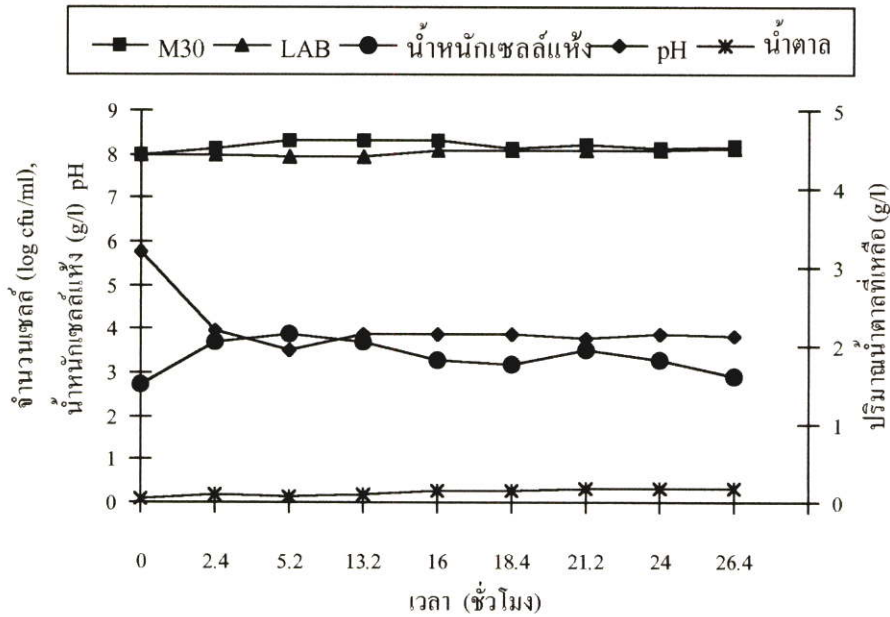
สภาวะการเลี้ยง	$\mu_{max}$ (ต่อชั่วโมง)	น้ำหนักเซลล์แห้ง (กรัมต่อลิตร)
<i>S. cerevisiae</i> M30	0.444 <sup>a</sup>	5.3 <sup>a</sup>
<i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลคติก โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน	0.442 <sup>a</sup>	3.0 <sup>d</sup>
<i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลคติก โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยความร้อน	0.419 <sup>a</sup>	3.8 <sup>bc</sup>
<i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลคติก และเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อย	0.426 <sup>a</sup>	3.3 <sup>cd</sup>
<i>S. cerevisiae</i> M30 ร่วมกับแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อย	0.356 <sup>b</sup>	4.4 <sup>b</sup>

การเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยโดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture (รูปที่ 4.17 และ 4.18) นั้นพบว่า มีค่าพีเอชและน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture มีค่าใกล้เคียงกับค่าพีเอชและน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในสภาวะการหมักแบบ batch culture กล่าวคือ การเลี้ยงโดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อในสภาวะการหมักแบบ batch culture น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.0 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture อยู่ในช่วง 2.4-3.5 กรัมต่อลิตร และการเลี้ยงโดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อในสภาวะการหมักแบบ batch culture น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดเท่ากับ 3.8 กรัมต่อลิตร ส่วนน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้ในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture อยู่ในช่วง 2.7-3.9 กรัมต่อลิตร ส่วนค่าพีเอชของการเลี้ยงโดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อในสภาวะการหมักแบบ batch culture อยู่ในช่วง 3.56-6.71 ส่วนค่าพีเอชของการเลี้ยงในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture อยู่ในช่วง 3.69-5.64 และค่าพีเอชของการเลี้ยงโดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อในสภาวะการหมักแบบ batch culture อยู่ในช่วง 3.56-

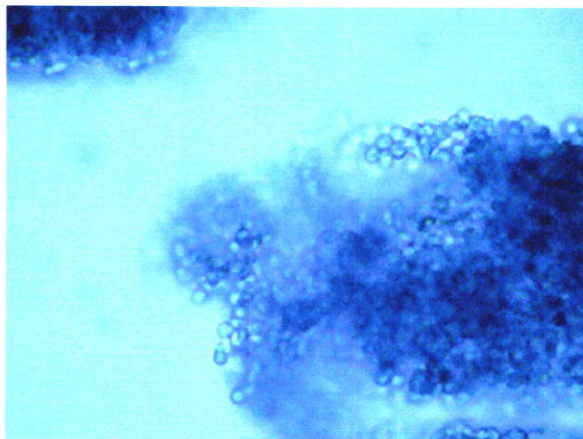
5.68 ส่วนค่าพีเอชของการเลี้ยงในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture อยู่ในช่วง 3.50-5.76 สำหรับสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture มีการตกตะกอน (flocculation) ของยีสต์เกิดขึ้นและเมื่อพิจารณาปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ยีสต์จับกันเป็นก้อนขนาดใหญ่ (รูปที่ 4.19) ทำให้เซลล์ยีสต์ที่อยู่ด้านในไม่สามารถใช้น้ำตาลได้ จึงทำให้ปริมาณน้ำตาลที่เหลืออยู่เพิ่มขึ้น ส่วนการเกิดการตกตะกอนของยีสต์นั้น ประพันธ์ ปันเถิน (2531) กล่าวว่า การตกตะกอนของยีสต์นั้นมีอิทธิพลมาจากพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ได้แก่ ปัจจัยทางเคมี ปัจจัยทางกายภาพ และปัจจัยทางชีววิทยา ในการทดลองนี้อาจเป็นผลมาจากปัจจัยทางชีววิทยา กล่าวคือ เซลล์ที่มีอายุน้อยจะมีความสามารถในการตกตะกอนต่ำ และการตกตะกอนจะเพิ่มขึ้นทีละน้อยๆ ในระหว่างการเจริญและการหมัก



รูปที่ 4.17 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลที่เหลือของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture

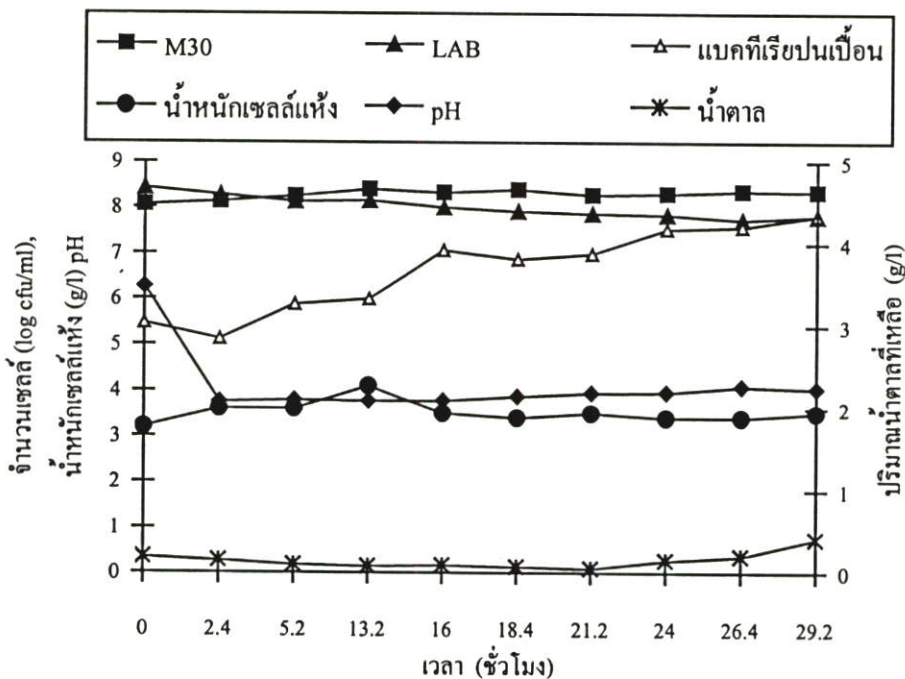


รูปที่ 4.18 จำนวนเซลล์ น้ำหนักเซลล์แห้ง ค่าพีเอช และปริมาณน้ำตาลที่เหลือของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อย โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture

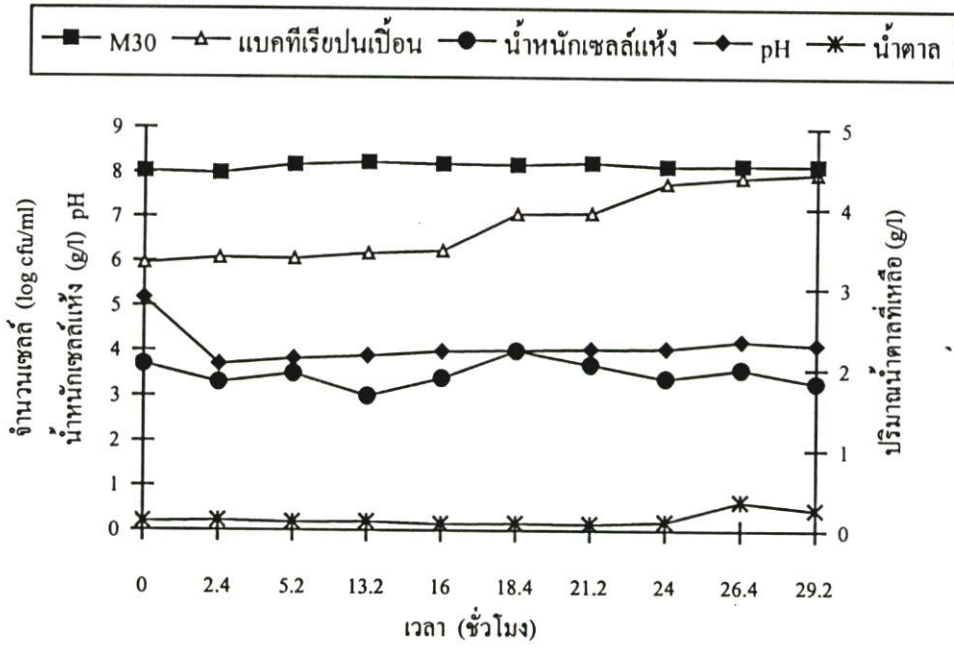


รูปที่ 4.19 ลักษณะของ *S. cerevisiae* M30 ที่เกิดการจับกันเป็นก้อนในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 400 เท่า

ส่วนการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกและมีการเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อน โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture พบว่า จำนวนแบคทีเรียปนเปื้อนที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ช่วงกันจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียแลกติกมีแนวโน้มลดลงเล็กน้อย (รูปที่ 4.20) อย่างไรก็ตามการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกและมีการเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อนพบว่าไม่มีการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นนอกจากแบคทีเรียปนเปื้อนที่เติมลงไป ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อน โดยไม่มีการเติมแบคทีเรียแลกติกพบว่า มีการเจริญของแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นๆ ที่มีลักษณะโคโลนีและลักษณะทางสรีรวิทยาเหมือนกับที่ตรวจพบในการเลี้ยงในสภาวะ batch culture (ตารางที่ 4.10) ส่วนน้ำหนักรวมของ *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch ทั้งในกรณีที่เลี้ยงร่วมกับและไม่ได้เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลกติกนั้น ได้น้ำหนักเซลล์ที่ใกล้เคียงกัน (รูปที่ 4.20 และ 4.21) และน้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้นั้นต่ำกว่าน้ำหนักเซลล์แห้งที่เลี้ยงในสภาวะ batch culture



รูปที่ 4.20 จำนวนเซลล์ ค่าพีเอช และน้ำหนักเซลล์แห้งของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกและเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อน ในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture



รูปที่ 4.21 จำนวนเซลล์ ค่าพีเอช และน้ำหมักเซลล์แห้งของการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ร่วม กับ แบคทีเรียปนเปื้อน ในสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture

## บทที่ 5

### สรุปผลการทดลอง

1. จากการแยกเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยที่เก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 0 ถึง 32 พบว่า เชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยมีปริมาณเพิ่มขึ้นจากชั่วโมงที่ 0 จนถึง 24 และเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมงมีปริมาณจุลินทรีย์ปนเปื้อนลดลง เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบมีหลายกลุ่ม แต่เชื้อจุลินทรีย์ที่ตรวจพบว่าเป็นประชากรส่วนใหญ่และสามารถเจริญเติบโตได้ในชั่วโมงที่ 32 มีลักษณะทางสรีรวิทยาค้ายแบคทีเรียแลคติก ซึ่งสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงค่าพีเอชของน้ำอ้อยที่มีค่าลดลงเมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้น แสดงว่าในน้ำอ้อยมีจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างกรดและยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนอื่นได้ ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ปนเปื้อนที่พบเป็นประชากรส่วนใหญ่ในกากน้ำตาลมีลักษณะคล้าย *Bacillus*
2. แยกแบคทีเรียแลคติกจากน้ำอ้อยได้ 6 ไอโซเลท เมื่อทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรตพบว่า แบคทีเรียแลคติกทั้ง 6 ไอโซเลท คือ *L.pentosus* 2 ไอโซเลท *L. plantarum* 2 ไอโซเลท *L. coprophilus* 1 ไอโซเลท และ *Leu. Mesenteroides* 1 ไอโซเลท
3. แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยอาจสร้างสารอื่น นอกจากกรดอินทรีย์และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ที่ให้ผลการยับยั้งจุลินทรีย์ปนเปื้อนในน้ำอ้อยและกากน้ำตาลรวมถึงแบคทีเรียที่ก่อโรคที่นำมาทดสอบได้แก่ *E. coli* ATCC25922 *Lis. innocua* ATCC33090 *Stap. aureus* ATCC12600 *B. cereus* ATCC6633 และ *S. anatum* SO86105 เมื่อทดสอบโดยวิธี agar spot method
4. ในสภาวะการเลี้ยงแบบเขย่า *S. cerevisiae* M30 เจริญเติบโตโดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่มีสารอาหารยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดีกว่าโดยให้น้ำหนักเซลล์แห้งและผลได้ของเซลล์มากกว่าอาหารน้ำอ้อยที่มีสารอาหารแอมโมเนียมซัลเฟต 7 กรัมต่อลิตร
5. เลี้ยง *S. cerevisiae* M30 โดยใช้อาหารน้ำอ้อยร่วมกับสารอาหารยูเรีย 1 กรัมต่อลิตร โปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 3 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมซัลเฟต 0.5 กรัมต่อลิตร ในสภาวะการหมักแบบ batch culture โดยใช้ถังหมักแบบคัดแปลงแบบ air lift พบว่า ได้น้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุด 5.30 กรัมต่อลิตร และมีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.444 ต่อชั่วโมง

6. ในสภาวะการหมักแบบ batch culture เมื่อพิจารณาจากอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด พบว่า *S. cerevisiae* M30 สามารถเจริญร่วมกับแบคทีเรียแลกติกที่แยกได้จากน้ำอ้อยทั้งสภาวะที่เลี้ยงในน้ำอ้อยที่ผ่านและไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ โดยน้ำหนักเซลล์แห้งของ *S. cerevisiae* M30 ที่ได้จากการเลี้ยงในน้ำอ้อยทั้งสองแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P \leq 0.05$ ) แต่น้ำหนักเซลล์แห้งที่ได้จากการเลี้ยงโดยใช้อาหารน้ำอ้อยทั้งสองน้อยกว่าการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 เพียงชนิดเดียว ทั้งนี้อาจเกิดจากการใช้อาหารร่วมกันของจุลินทรีย์ทั้งสองชนิด ส่วนสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture นั้นได้น้ำหนักเซลล์แห้งใกล้เคียงกับน้ำหนักเซลล์แห้งสูงสุดในการหมักแบบ batch culture

7. ในกรณีที่เลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะการหมักแบบ batch culture และสภาวะการหมักแบบ cyclic fed-batch culture โดยใช้ น้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ ร่วมกับแบคทีเรียแลกติกพบว่าแบคทีเรียแลกติกอาจสร้างสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียปนเปื้อน แต่กรณีที่ไม่มี การเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลกติกพบว่ามีแบคทีเรียปนเปื้อนอื่นนอกเหนือจากแบคทีเรียปนเปื้อนที่แยกได้จากน้ำอ้อยที่เติมลงไป

## บรรณานุกรม

- เกษกมล ไทยทอง. 2542. “ผลของแบคทีเรียปนเปื้อนต่อการเจริญและการผลิตเอทานอลของ *Saccharomyces cerevisiae*” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- คุณณี ธนะบริพัฒน์. 2537. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ : คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- นภา โล่ห์ทอง. 2534. กล้าเชื้ออาหารหมักและเทคโนโลยีการผลิต. กรุงเทพฯ: หจก. ฟีนนี่ พับลิชชิ่ง.
- บุญเทียม พันธุ์เพ็ง. 2543. เอกสารประกอบการเรียนวิชาเคมีวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หมัก. ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตรคณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
- บุญส่ง แสงอ่อน. 2527. “บทบาทของบัคทีเรียในน้ำอ้อย” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ประพันธ์ ปันเถิน. 2531. “ปัจจัยบางประการที่มีอิทธิพลต่อการตกตะกอนของยีสต์ตกตะกอนที่ผลิตเอทานอล” วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล. 2543. “ฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของแบคทีเรียแลคติกที่แยกจากอาหารหมักพื้นบ้านภาคใต้ของไทย.” ว. สงขลานครินทร์ วทท. 22(2): 177-189.
- สมใจ สิริโชค. 2544. จุลชีววิทยาอุตสาหกรรม. กรุงเทพฯ : ศูนย์สื่อเสริมกรุงเทพฯ.
- Adams, M.R. and Moss, M.O. 1995. **Food Microbiology**. England: Red Wood Books LTD.
- Balasubramanyam, B.V. and Varadaraj, M.C. 1998. Cultural conditions for the production of bacteriocin by a native isolate of *Lactobacillus delbruecki* ssp. *bulgaricus* CFR2028 in milk medium. **J. of Appl. Microbiol.** 84: 97-102
- Banina, A., Vukasinovic, M., Brankovic, S., Fira, D., Kojic, M. and Topisirovic, L. 1998. Characterization of natural isolate *Lactobacillus acidophilus* BGRA43 useful for acidophilus milk production. **J. of Appl. Microbiol.** 84: 593-599
- Bogovic-Matijasic, B., Rogelj, I., Nes, I. F. and Holo, H. 1998. Isolation and characterization of two bacteriocins of *Lactobacillus acidophilus* LF221. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 49: 606-612

- Casla, D., Requena, T. and Gomez, R. 1996. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses : characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. **J. of Appl. Bacterio.** 81: 35-41
- Corsetti, A., Gobbetti, M. and Smacchi, E. 1996. Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. **Food Microbiol.** 13: 447-456
- Corsetti, A., Gobbetti, M. and Smacchi, E. 1998. Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria : identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. **Appl. Microbiol Biotechnol.** 50: 253-256
- Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its use as a food preservative. **Food Technol.** 44: 100-117
- Doetsch, R. N. 1981. Determinative methods of light microscopy. In P. Gerhardt, et al. (eds.), **Manual of methods for general bacteriology.**, pp. 21-33. Washington: American Society for Microbiology
- Dorothy, J. and Collins, M.D. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume.2.** Baltimore: Willium and Wilkin.
- Fred, B. and Henry, P.F. 1997. Using Lactic Acid Bacteria to Improve the Safety of Minimally Processed Fruits and Vegetables. **Food Technol.** 51: 44-51
- Gilliland, S.E. and Speck, M.L. 1975. Inhibition of psychrotrophic bacteria by lactobacilli and Pediococci in nonfermented refrigerated foods. **J. Food Sci.** 40: 903-905
- Halami, P.M., Chandrashekar, A. and Nand, K. 2000. *Lactobacillus farciminis* MD, A newer strain with potential for bacteriocin and antibiotic assay. **Let. Appl. Microbiol.** 30 : 197-202.
- Jay, J.M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. **Appl. Environ. Microbiol.** 44: 525
- Kelly, W.J., Asmundson, R.V. and Huang, C.M. 1996. Isolation and characterization of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from ready-to-eat food products. **Int. J. of Food Microbiol.** 33: 209-218
- Klaenhammer, T.R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. **FEMS Microbiol. Rev.** 12: 39-86

- Leisner J.J., Vancanneyt, M., Rusul, G., Pot, B., Lefebvre, K., Fresi, A., and Tee, L.K. 2001. Identification of actic acid bacteria constituting the predominating microflora in an acid-fermented condiment (tempoyak) popular in Malaysia. **Int. J. of Food Microbiol.** 63: 149-157
- Lejeune, R., Callewaert, R., Crabbe, K. and De Vuyst, L. 1998. Modelling the growth and bacteriocin production by *Lactobacillus amylovorus* DCE 471 in batch cultivation. **J. Appl. Microbiol.** 84 : 159-168.
- Mark, A.D. 1989. Antimicrobial Substances from Lactic Acid Bacteria for Use as Food Preservatives. **Food Technol.** 164-167
- Miteva, M., Ivanova, I., Budakov, I., Pantev, A., Stefanova, T., Danova, S., Moncheva, P., Mitev, V., Dousset, X. and Boyaval, P. 1998. Detection and characterization of a novel antibacterial substance produced by a *Lactobacillus delbrueckii* strain 1043. **J. of Appl. Microbiol.** 85: 603-614
- Navarro, L., Zarazaga, M., Saenz, J., Ruiz-Larrea, F. and Torres, C. 2000. Bacteriocin production by lactic acid bacteria isolated from Rioja red wines. **J. of Appl. Microbiol.** 88: 44-51
- Ostergaard, A. Embarek P.K.B., Wedell-Neergaard. C, Huss H.H. and Gram L. 1998. Characterization of anti-listerial lactic acid bacteria from Thai fermented fish products. **Food Microbiol.** 15: 223-233
- Otto, K. and Norbert, W. 1986. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume.2.** Baltimore: Willium and Wilkin.
- Pongsak, R. and Parichat, P. 2000. A Bacteriocin Produced by *Lactobacillus lactis* subsp. *lactis* Isolated from Thai Fermented Foods. **Sci. Asia.** 26: 195-200
- Raccach, M., Baker, R.C., Regenstein, J.M. and Mulnix, E.J. 1979. Potential application of microbial antagonism to extended storage stability of a flesh type food. **J. Food Sci.** 44: 43-46
- Ray, B. and Daeschel, M. 1992. **Food Biopreservatives of Microbial Origin.** Mexico: CRC Press, Inc.

- Reenen, C.A., Dicks, L.M.T. and Chikindas, M.L. 1998. Isolation, purification and partial characterization of plantaricin 423, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum*. **J. of Appl. Microbiol.** 84: 1131-1137
- Richard, G.E. 1992. The Antimicrobial Action of Lactic acid Bacteria : Natural Food Preservation Systems. In J.B. Brian, **The Lactic Acid Bacteria Volume. 1**, pp. 211-232. England: Elsevier Science Publishers LTD.
- Romick, T.L. 1994. Biocontrol of *Listeria monocytogenes*, a psychrotrophic pathogen model, in low salt, non-acidified, refrigerated vegetable product. Ph. D. thesis. North Carolina State University, United State.
- Saleh, M.A. and Ordal, Z.J. 1955. Studies on growth and toxin production of *Clostridium botulinum* in a precooked frozen food. **Food Res.** 20: 340-350
- Schillinger, U. and Lucke, F.K. 1989. Antibacterial activity of *Lactobacillus sake* isolated from meat. **Appl. Environ. Microbiol.** 55 : 1901-1906.
- Smibert, R. M., and Krieg, N. R. 1981. General characterization. In P. Gerhardt, et al. (eds.), **Manual of methods for general bacteriology**, p. 413 and 420. Washington: American Society for Microbiology
- Spelhaug, S.R. and Harlander. S.K. 1989. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentasaceus*. **J. Food Prot.** 52 : 856-862.
- Sookkhee, S., Chulasiri, M and Prachyabrued, W. 2001. Lactic acid bacteria from healthy oral cavity of Thai volunteers: inhibition of oral pathogens. **J. of Appl. Microbiol.** 90: 172-179
- Tanaka, N., Meske, L., Doyle, M.P., Traisman, E., Thayer, D.W. and Johnston, R.W. 1985. Plant trials of bacon made with lactic acid bacteria, sucrose and lowered sodium nitrite. **J Food Prot.** 48: 679-686
- Tilbury, R.H. 1975. **Lactic acid Bacteria in Beverage Food**. New York: Academic Press.
- Vaughan, A., Eijsink, V.G.H., O'Hanlon, K. and D. van Sinderen. 2001. An analysis of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from malted barley. **J. of Appl. Microbiol.** 91: 131-138

- Vescovo, M., Torriani, S., Orsi, C., Macchiariol, F. and Scolari, G. 1996. Application of antimicrobial-producing lactic acid bacteria to control pathogens in ready-to-use vegetable. **J. Appl. Bacteriol.** 81: 113-119
- Verna, C. M., Gottlieb, A., John, W. H. 1997. Purification of bacteriocins of lactic acid bacteria: problems and pointers. **Inter. J. of Food Microbiol.** 34: 1-16

**ภาคผนวก ก**  
**การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ**

**อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS**

โปรติโอสเปปโตน (bacto proteose peptone No. 3)	10.0 กรัม
สารสกัดจากเนื้อ (bacto meat extract)	10.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (bacto yeast extract)	5.0 กรัม
เดกซ์โตรส	20.0 กรัม
ทวิน 80 (tween 80)	1.0 กรัม
ไดโทแทสเซียมฟอสเฟต	2.0 กรัม
แอมโมเนียมซัลเฟต	2.0 กรัม
โซเดียมอะซิเตต	5.0 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.1 กรัม
แมงกานีสซัลเฟต	0.05 กรัม

pH 6.2-6.4

ละลายอาหาร 55 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร เติมน้ำตาลปริมาณ 15 กรัม ลงไป ต้มให้ร้อน ละลาย ใส่อาหารวุ้น MRS ที่หลอมเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที สำหรับกรณีของการตรวจการสร้างกรดของแบคทีเรียแลคติกให้เติมแคลเซียมคาร์บอเนต ปริมาณ 5 กรัม ก่อนนำไปหนึ่งฆ่าเชื้อ

**อาหารเลี้ยงเชื้อ MY**

สารสกัดจากยีสต์ (bacto yeast extract)	3.0 กรัม
โปรติโอสเปปโตน	5.0 กรัม
เดกซ์โตรส	20.0 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	3.0 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร เติมน้ำตาลปริมาณ 15 กรัม ลงไป ต้มให้ร้อน ละลาย ใส่อาหารวุ้น MY ที่หลอมเหลวปริมาตร 150 มิลลิลิตร ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร หนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**BHI (Brain Heart Infusion) soft agar**

ชั่ง BHI จำนวน 37.0 กรัม และวุ้นผง 0.7 เปอร์เซ็นต์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกรอง 1 ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**อาหารเลี้ยงเชื้อ NA**

สารสกัดจากเนื้อ (bacto meat extract)	3.0 กรัม
peptone from meat	5.0 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS (สำหรับทดสอบ antimicrobial activity ที่สภาวะจำการสร้างกรด)**

กลูโคส	2.0 กรัม
สารสกัดจากมอลต์ (malt extract)	2.0 กรัม
โปรติโอสเปปโตน	10.0 กรัม
สารสกัดจากยีสต์ (yeast extract)	4.0 กรัม
ทวิน 80 (tween 80)	1.0 มิลลิลิตร
ไดแอมโมเนียมซิเตรต	2.0 กรัม
แมกนีเซียมซัลเฟต	0.2 กรัม
แมงกานีส	0.05 กรัม
ไดโปแตสเซียมไฮโดรเจนฟอสเฟต	8.7 กรัม
โพแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต	8.0 กรัม
วุ้น	15.0 กรัม

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1 ลิตร ต้มให้วุ้นละลาย นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

**ภาคผนวก ข**  
**การวิเคราะห์ทางจุลินทรีย์และทางเคมี**

**1.การเตรียมสารเคมี**

1.1 สารละลายแกรมคริสตัลไวโอเลต ประกอบด้วย

สารละลาย A

คริสตัลไวโอเลต	2.0 กรัม
เอทานอล 95%	2.0 กรัม

สารละลาย B

แอมโมเนียมออกซาลेट	0.8 กรัม
น้ำกลั่น	80.0 มิลลิลิตร

ผสมสารละลาย A และ B ให้เข้ากัน

1.2 สารละลายแกรมไอโอดีน

ไอโอดีน	1.0 กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์	2.0 กรัม
น้ำกลั่น	300.0 มิลลิลิตร

บดไอโอดีนและโพแทสเซียมไอโอไดด์ให้ละเอียดแล้วค่อยๆ เติมน้ำลงไปทีละน้อยจนไอโอดีนละลายหมด เก็บในขวดแก้วสีน้ำตาล

1.3 สารละลายซาฟรานินโอ

ซาฟรานินโอ	0.25 กรัม
เอทานอล 95%	10.0 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

1.4 สารละลายมาลาไคท์กรีน 5%

มาลาไคท์กรีน	5.0 กรัม
น้ำกลั่น	100.0 มิลลิลิตร

### 1.5 สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์

สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 35%	1.71 มิลลิลิตร
น้ำจืดไอออน	18.29 มิลลิลิตร

บรรจุในขวดแก้วสีน้ำตาลและเก็บรักษาในตู้เย็น

### 1.6 สารละลายเตตระเมทิล พาราฟินิล ไดเอมีน ไดโครคลอไรด์ 1%

เตตระเมทิล พาราฟินิล ไดเอมีน ไดโครคลอไรด์	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

ผสมให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 15 นาที ก่อนนำไปใช้ เก็บรักษาในตู้เย็น

## 2. การตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์โดยวิธีเกลี่ยบนผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ (spread plate)

เทอาหารเลี้ยงเชื้อปริมาณ 20 มิลลิลิตร ลงในงานเพาะเชื้อ ร่องอาหารในงานเพาะเชื้อแข็ง นำไปตากผิวหน้าของอาหารในตู้เขี่ยเชื้อ (laminar flow) เปิดแสง UV และพัดลมดูดอากาศทิ้งไว้ประมาณ 20 นาที นำตัวอย่างอาหารที่ระดับความเจือจางที่ต้องการโดยใช้ปิเปตดูดตัวอย่างอาหารปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงบนผิวหน้าอาหาร ใช้แท่งแก้วรูปสามเหลี่ยมจุ่มแอลกอฮอล์ลงไฟแล้วทิ้งให้เย็นในอากาศ เกลี่ยตัวอย่างอาหารให้กระจายทั่วผิวหน้าของอาหาร จนมีความรู้สึกว่าตัวอย่างอาหารซึมลงไปในการเพาะเชื้อ นำงานเพาะเชื้อไปใส่ในตู้บ่มเชื้อ นับจำนวนโคโลนีในระดับความเจือจางที่เหมาะสมได้ประมาณ 30-300 โคโลนี จำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิกรัมของตัวอย่างอาหาร

## 3. การวิเคราะห์น้ำหนักเซลล์แห้ง

นำ microcentrifuge tube ไปอบไล่ความชื้นด้วยตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 ชั่วโมง หลังจากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นในโถดูดความชื้น (desiccator) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วนำไปชั่งน้ำหนัก (a) โดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใช้ลงใน microcentrifuge tube นำไปปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสออกเก็บไว้สำหรับวิเคราะห์ จากนั้นเติมน้ำกลั่นลงไปแล้วเขย่าเพื่อล้างเซลล์ จากนั้นปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ความเร็วรอบ 8000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใสทิ้งแล้วนำส่วนของตะกอนที่ได้อบในตู้อบลมร้อนอุณหภูมิ 90 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10-18 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นในโถดูดความชื้น จากนั้นชั่งน้ำหนัก (b) นำน้ำหนัก (b) - (a) จะได้เป็นน้ำหนักเซลล์แห้ง นำไปคำนวณค่าน้ำหนักเซลล์แห้งเป็นกรัมต่อลิตร ทำการทดลอง 4-8 ซ้ำ

#### 4.การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาล

การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี Somogyi-Nelson (บุญเทียม พันธุ์เพ็ง, 2543)

##### 1.น้ำยา Somogyi

น้ำยา Somogyi I เตรียมโดยละลาย  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  72 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้ว 250 มิลลิลิตร เติม  $\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (Potassium sodium tartrate.  $4\text{H}_2\text{O}$  หรือ Rochelle salt) 6 กรัม เติม  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  12 กรัม และ  $\text{NaHCO}_3$  8 กรัม คนให้ละลายที่ละอย่างตามลำดับ แล้วเติมน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้วจนมีปริมาตร 400 มิลลิลิตร

น้ำยา Somogyi II เตรียมโดยละลาย  $\text{NaSO}_4$  18 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มเดือดแล้ว 75 มิลลิลิตร เติม  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  แล้วถ่ายใส่ขวดควงปริมาตรแล้วเติมน้ำกลั่นให้ปริมาตรครบ 100 มิลลิลิตร

ผสมน้ำยา Somogyi I และน้ำยา Somogyi II ในอัตราส่วน 4 ต่อ 1 โดยปริมาตรก่อนใช้

##### 2.น้ำยา Nelson

เตรียมโดยละลาย  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$  (ammonium molybdate) 25 กรัม ในน้ำกลั่นที่ต้มให้เดือดแล้ว 450 มิลลิลิตร เติม conc.  $\text{H}_2\text{SO}_4$  21 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมสารละลายของ  $\text{Na}_2\text{HAsO}_7$  (sodium hydrogen arsenate) (12 กรัม ในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร) เก็บไว้ในขวดแก้วสีน้ำตาล 24-48 ชั่วโมง เพื่อให้คงตัวก่อนนำมาใช้

#### วิธีวิเคราะห์

1.ดูดสารละลายตัวอย่าง 0.5 มิลลิลิตร ที่มีปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ทั้งหมดไม่เกิน 50 ไมโครกรัม ลงในหลอดทดสอบ เติมน้ำยา Somogyi ที่ผสมแล้ว 1 มิลลิลิตร นำไปต้มให้เดือด 15 นาที

2.ทำให้เย็นโดยแช่ในน้ำเย็น เติมน้ำยา Nelson 1 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัดค่าการดูดกลืนคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 520 นาโนเมตร โดยวัดเทียบกับ blank ซึ่งใช้น้ำกลั่นแทนสารตัวอย่าง

3.อ่านค่าความเข้มข้นของกลูโคสจากกราฟมาตรฐาน ซึ่งได้จากการทดลองวิธีเดียวกันโดยใช้น้ำตาลกลูโคสที่มีความเข้มข้น 25 50 75 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

## 5. การวิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลโดยวิธีของ Lane and Eynon (บุญเทียม พันธุ์เพ็ง, 2543)

### 1. สารเคมี (reagents)

#### 1.1 Fehling solution A (Copper sulfate solution)

ละลาย  $\text{CuSO}_4$  34.634 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร

#### 1.2 Fehling solution B (Alkaline tartrate solution)

ละลาย Sodium potassium tartrate 173 กรัม และ NaOH 50 กรัมในน้ำ 500 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรโดยใช้ขวดปรับปริมาตร เมื่อต้องการใช้ให้ผสม Fehling solution A และ Fehling solution B อย่างละ 5 มิลลิลิตร แล้วใช้ทันที ห้ามผสมทิ้งไว้ค้างคืน

#### 1.3 HCl เข้มข้นหรือผสมกับน้ำอัตราส่วน HCl : $\text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 1 : 1

#### 1.4 NaOH 20 เปอร์เซนต์

#### 1.5 Methylene blue 1 เปอร์เซนต์

1.6 Invert sugar standard solution ชั่ง sucrose 0.5 กรัม ด้วยเครื่องชั่งชนิดละเอียด เติมน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เติม HCl (1:1) 1 มิลลิลิตร แล้ว Hydrolyze ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส นาน 10-15 นาที หรือตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 24 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่น 50 มิลลิลิตร แล้วทำให้เป็นกลางหรือเป็นกรดเล็กน้อยด้วย NaOH 20 เปอร์เซนต์ ปรับปริมาตรสุดท้ายให้เป็น 100 มิลลิลิตร ด้วยขวดปรับปริมาตร

### 2. Standardization

2.1 ผสม Fehling A และ B อย่างละ 5 มิลลิลิตร กับสารละลายน้ำตาล (จากข้อ 1.6) ประมาณ 8.5-9 มิลลิลิตร ต้มเดือด 2 นาที

2.2 เติม methylene blue 3-4 หยด

2.3 ไตเตรทด้วยสารละลายน้ำตาลต่อไปจนสีฟ้าหมดไป และมีตะกอนสีแดงของ  $\text{Cu}_2\text{O}$

### ข้อควรระวัง

1. การไตเตรทของ standard solution ควรใช้ไม่เกิน 10 มิลลิลิตร เมื่อใช้ Fehling A+B 10 มิลลิลิตร ถ้าใช้ Fehling solution A+B 25 มิลลิลิตร จะใช้ไม่เกิน 25 มิลลิลิตร

2. เมื่อนำมาคำนวณหาค่า factor ของ Fehling (A+B) ควรจะมีค่าไม่เกิน 0.04-0.06

### วิธีคำนวณหา factor

$$\text{factor} = \frac{360.312xy}{342.296 \times 100}$$

เมื่อ x = น้ำหนัก sucrose ที่ใช้

y = ปริมาตรของสารละลาย sucrose ที่ทำปฏิกิริยาพอดี  
กับ Fehling (A+B) 10 มิลลิลิตร

### 3 การ hydrolyze น้ำตาล

อย่างดังนี้

3.1 ใส่น้ำตาล x มิลลิลิตร ลงใน volumetric flask แล้ว hydrolyze ตัว

น้ำตาล 15°Brix ขึ้นไปใช้ตัวอย่าง 2 มิลลิลิตร เติมสารละลาย HCl (1:1) 1 มิลลิลิตร

น้ำตาล 10-15°Brix ใช้ตัวอย่าง 4 มิลลิลิตร เติมสารละลาย HCl (1:1) 2 มิลลิลิตร

น้ำตาล 10°Brix ขึ้นไปใช้ตัวอย่าง 6 มิลลิลิตร เติมสารละลาย HCl (1:1) 3 มิลลิลิตร

นาที่

3.2 Hydrolyze ในตู้อบลมร้อนที่ 70 องศาเซลเซียส ประมาณ 10-15

3.3 ทำให้เย็นแล้วปรับพีเอชให้เป็นกลางหรือกรดเล็กน้อยด้วย NaOH 20 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งปริมาณที่ใช้มีดังนี้

ถ้าใช้กรด HCl 1 มิลลิลิตร เติม 20 เปอร์เซ็นต์ NaOH 0.95 มิลลิลิตร

ถ้าใช้กรด HCl 2 มิลลิลิตร เติม 20 เปอร์เซ็นต์ NaOH 1.95 มิลลิลิตร

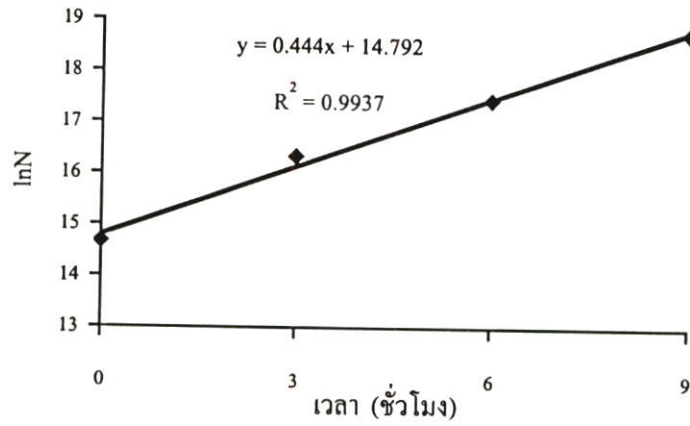
ถ้าใช้กรด HCl 3 มิลลิลิตร เติม 20 เปอร์เซ็นต์ NaOH 2.95 มิลลิลิตร

### การคำนวณหา total invert sugar

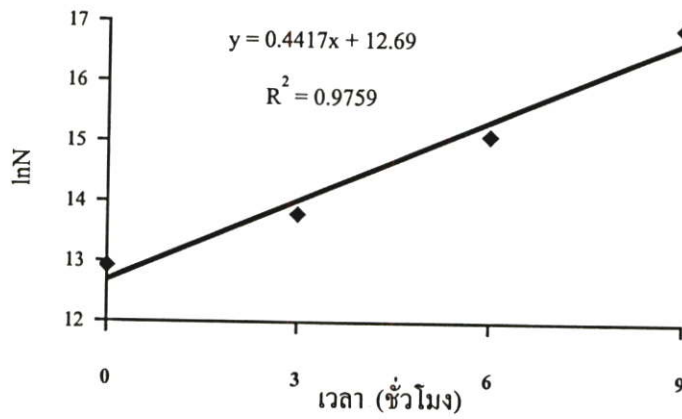
$$\text{เปอร์เซ็นต์ total invert sugar} = \frac{\text{factor} \times \text{ปริมาตร 100 มิลลิลิตร} \times 100}{\text{มิลลิลิตรของน้ำ} \times \text{ค่าไตเตรท}}$$

## ภาคผนวก ก

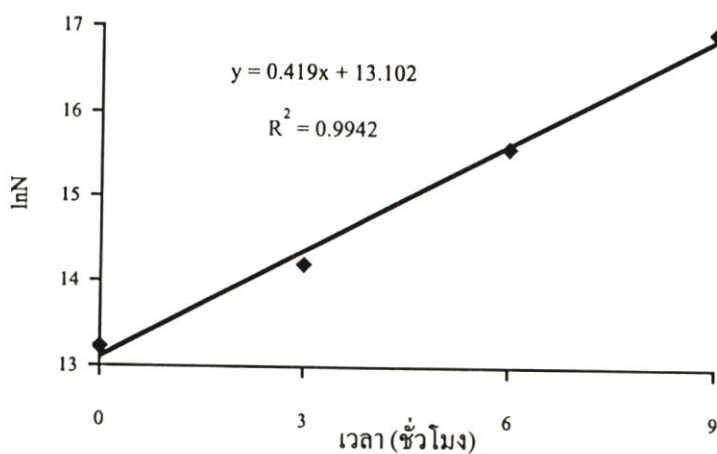
ตัวอย่างผลการวิเคราะห์อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของ *S. cerevisiae* M30



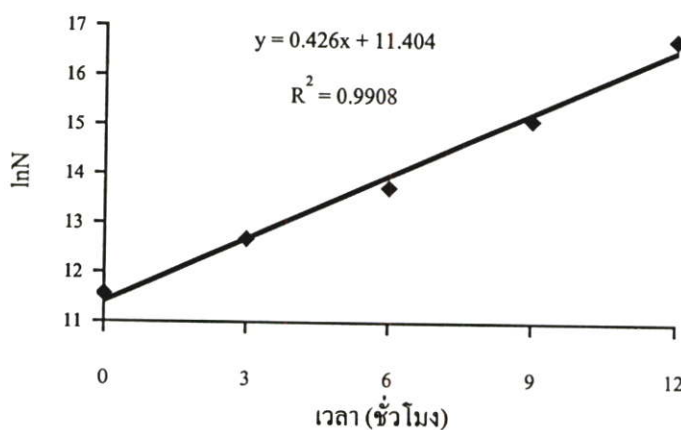
รูปที่ 1ค ความสัมพันธ์ระหว่าง ln จำนวนเซลล์กับเวลาในการเลี้ยง *S. cerevisiae* M30 ในสภาวะการหมักแบบ batch culture



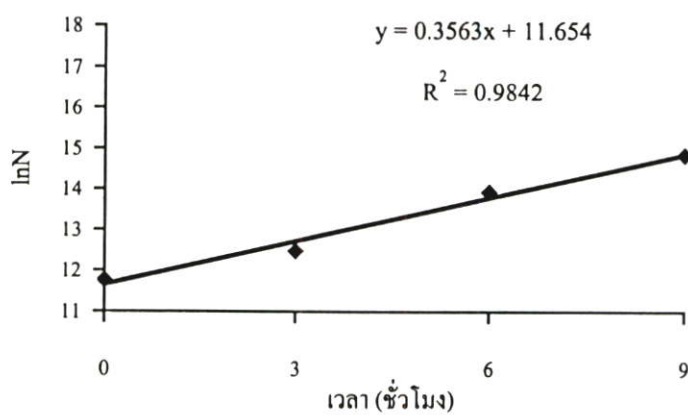
รูปที่ 2ค ความสัมพันธ์ระหว่าง ln จำนวนเซลล์กับเวลาของ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงร่วมกันแบบที่เรียลแลคติก ในสภาวะการหมักแบบ batch culture โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ผ่านการฆ่าเชื้อ



รูปที่ 3ค ความสัมพันธ์ระหว่าง ln จำนวนเซลล์กับเวลาของ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลกติก ในสภาวะการหมักแบบ batch culture โดยใช้อาหารน้ำอ้อยที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ



รูปที่ 4ค ความสัมพันธ์ระหว่าง ln จำนวนเซลล์กับเวลาของ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียแลกติก และเติมเชื้อตั้งต้นของแบคทีเรียปนเปื้อน ในสภาวะการหมักแบบ batch culture



รูปที่ 5ค ความสัมพันธ์ระหว่าง ln จำนวนเซลล์กับเวลาของ *S. cerevisiae* M30 ที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียปนเปื้อน ในสภาวะการหมักแบบ batch culture

## ประวัติผู้เขียน

นางสาวศิริมา วรรณรังษี เกิดวันที่ 25 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2518 ที่จังหวัดจันทบุรี สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาที่โรงเรียนวัฒนาวิทยาลัย สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ-เทคโนโลยีทางอาหาร จากมหาวิทยาลัยรังสิต เมื่อปี พ.ศ. 2540 และศึกษาต่อระดับวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การอาหาร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง สำเร็จการศึกษาเมื่อปี พ.ศ. 2545 ปัจจุบันรับราชการ ตำแหน่งอาจารย์ 1 ระดับ 4 สังกัดสถาบันเทคโนโลยีราชมงคล วิทยาเขตโชติเวช