



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

ปริญญา

เทคโนโลยีชีวภาพ

เทคโนโลยีชีวภาพ

สาขา

ภาควิชา

เรื่อง การลดการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเพื่อการหมักไซเลจโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากกากถั่วเหลืองดิบ

The Inactivation of Trypsin Inhibitors by Lactic Acid Bacteria Isolated from Soybean Pulp for Silage Fermentation

نامผู้วิจัย นางสาวปรีชาติ ศรีระพันธุ์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจกสุขสถิตย์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์เชิธร ลีลาวัชรมาศ, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา วีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่ เดือน พ.ศ.

สิงสิงห์ มอววิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

การลดการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเพื่อการหมักไซเลจโดยแบคทีเรีย
กรดแลคติกที่ได้จากกากถั่วเหลืองดิบ

The Inactivation of Trypsin Inhibitors by Lactic Acid Bacteria Isolated from Soybean Pulp
for Silage Fermentation

โดย

นางสาวปรีชา ศิริระพันธุ์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคโนโลยีชีวภาพ)

พ.ศ. 2557

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ปรีชา ศิริระพันธุ์ 2557: การลดการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเพื่อการหมัก
ไซเลจโดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากกากถั่วเหลืองดิบ ปรินญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
(เทคโนโลยีชีวภาพ) สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ อาจารย์ที่ปรึกษา
วิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ประมุข กระจุกสุขสถิตย์, Ph.D. 92 หน้า

การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกจากกากถั่วเหลืองดิบสามารถคัดแยกเชื้อได้ 56 ไอโซเลท พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลคติก 7 ไอโซเลทที่มีการย่อยโปรตีน ทดสอบความสามารถลดสาร
ยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน คือ SBP 3, SBP 10, SBP 16, SBP 20, SBP 24, SBP 43 และ SBP 45
สามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ 14.61, 35.59, 25.74, 21.84, 16.66, 11.12 และ 28.36
เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อทำการศึกษาด้านฐานวิทยา คุณลักษณะทางกายภาพและการทดสอบ
ทางชีวเคมีตามหลักเกณฑ์จาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ของแบคทีเรียกรด
แลคติกไอโซเลท SBP 10 ที่มีความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน เฉลี่ยสูงสุดคือ
35.59 เปอร์เซ็นต์ รวมทั้งศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA เพื่อวิเคราะห์ถึง
ระดับสปีชีส์ ผลการวิเคราะห์มีความเหมือนกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลคือ
Lactobacillus fermentum (100% similarity) นำเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถลดสารยับยั้ง
เอนไซม์ทริปซินได้สูงสุด คือเชื้อ *L. fermentum* SB10 การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการลด
ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในกากถั่วเหลืองดิบ โดยมีการศึกษา 3 ปัจจัย ดังนี้ ปริมาณของ
เชื้อ *L. fermentum* SB 10 ที่ปริมาณ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 0, 3, 6
และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิที่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง
ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลง ซึ่งผลการศึกษากว่าปริมาณของเชื้อ *L. fermentum* SB 10 ที่
ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 37 องศา
เซลเซียสโดยสภาวะนี้แตกต่างจากสภาวะอื่นๆ ในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) พบว่าสารลด
การยับยั้งของเอนไซม์ทริปซินอยู่ที่ 2.62 มิลลิกรัมต่อกรัม ไซเลจที่หมักมีความเป็นกรด-ด่างที่ 3.4
ปริมาณกรดแลคติกอยู่ที่ 5.1 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อมีความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์ของ
น้ำหนักแห้ง เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกอยู่ที่ 7.00×10^7 CFU/g ตามมาตรฐานของไซเลจที่มีคุณภาพ

Parichad Sriraphan 2014: The Inactivation of Trypsin Inhibitor by Lactic Acid Bacteria Isolated from Soybean Pulp for Silage Fermentation. Master of Science (Biotechnology), Major Field: Biotechnology, Department of Biotechnology. Thesis Advisor: Assistant Professor Pramuk Parakulsuksatid, Ph.D. 92 pages.

Fifty six lactic acid bacteria were isolated from soybean pulp (SBP). All these isolates were tested for proteolytic activity. It was found that seven isolates exhibited the ability to digest proteins. The reduction activity against trypsin inhibitor of these isolates was tested. Lactic acid bacteria isolate SBP3, SBP10, SBP16, SBP20, SBP24, SBP43 and SBP45 gave the reduction activities of trypsin inhibitors at 14.61, 35.59, 25.74, 21.84, 16.66, 11.12 and 28.36 respectively. The SB 10 which exhibited highest reduction activity against trypsin inhibitor with activity approximately 35.59 % was further identified using morphological, physical and biochemical characteristics according to the guideline from Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Moreover, 16S rRNA of this isolate was tested to identify bacterial species. It was demonstrated that 16S rRNA nucleotide sequence of SB10 was similar to *Lactobacillus fermentum* with 100% similarity. In order to investigate the optimum condition for trypsin inhibitor reduction, this strain was incubated at various temperatures (30, 37, 45 °C) for 24 hr with various concentrations of cell culture (1, 5, 10%w/w) and molasses (0, 3, 6, 9%w/w). The optimum condition was incubation at 37 °C, 5%w/w cell culture and 6%w/w molasses with the lowest trypsin inhibitor reduction of 2.62 mg/g soybean pulp (p<0.05). The fermented soybean pulp had 2.62 mg/g trypsin inhibitors, pH 3.4, 5.1% lactic acid, 75% dry matter, and 7.00×10^7 CFU of lactic acid bacteria/g, respectively. These characteristics of fermented soybean pulp have property show as good quality silage.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

/ _ / _

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.ประมุข ภาระกุลสุขสถิตย์ ประธานกรรมการที่ให้คำปรึกษา คำแนะนำและสนับสนุนในการเรียน รวมทั้งการทำวิทยานิพนธ์มาโดยตลอด กราบขอบพระคุณ รศ.ดร. วิเชียร ลีลาวัชรมาศ และ รศ.ดร. นวลพรรณ ณ ระนอง ผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัย และ รศ. ดร. มังกร โรจน์ประภากร ที่กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอบพระคุณเป็นอย่างยิ่งสำหรับความช่วยเหลือจากเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตรทุกท่านที่เอื้อเฟื้อสถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆที่ใช้ในการทำวิจัยประกอบวิทยานิพนธ์

ขอบคุณทุกกำลังใจ คำปรึกษา คำแนะนำ และความช่วยเหลือซึ่งกันและกัน เราต่างให้กำลังใจกัน เพื่อเป็นพลังที่จะสู้ให้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี โดยตลอดเวลาที่ผ่านมานั้นเป็นช่วงเวลาที่มีความสุขและประทับใจกับมิตรภาพจากทุกคนเป็นอย่างมาก

ด้วยความดีหรือประโยชน์อันใดเนื่องจากวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ขอมอบแด่คุณพ่อ คุณแม่ที่ได้อบรม ให้กำลังใจ กำลังทรัพย์ และสนับสนุนทางการศึกษาด้วยดีตลอดมา

ปรีชาดิ ศรีระพันธุ์

มิถุนายน 2557

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(5)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
การตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และวิธีการ	37
อุปกรณ์	37
วิธีการ	38
ผลและวิจารณ์	42
สรุปและข้อเสนอแนะ	65
สรุป	62
ข้อเสนอแนะ	63
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	64
ภาคผนวก	70
ภาคผนวก ก อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี	71
ภาคผนวก ข การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกและวิธีการวิเคราะห์เชื้อ	75
ภาคผนวก ค ข้อมูลการทดลอง	83
ประวัติการศึกษาและการทำงาน	92

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 ส่วนประกอบทางโภชนาการในเมล็ดถั่วเหลือง	7
2 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกในระดับจีโนม	18
3 ผลผลิตที่ได้จากการใช้น้ำตาลและกรดอินทรีย์ในการหมักของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆ แสดงในรูปของโมลาร์	25
4 ตัวอย่างศักยภาพของการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องโดยอาศัยกระบวนการทางเทคโนโลยีชีวภาพ	31
5 คุณค่าทางโภชนาและสมบัติทางเคมีบางประการของไซเลทที่มีการใช้และไม่ใช้กลูต้าเรอแบคทีเรียกรดแลกติก	34
6 การประเมินระดับคุณภาพของไซเลทจากผลผลิตที่ได้จากการหมัก	35
7 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar รูปร่างเซลล์ ลักษณะการติดสีแกรมและกิจกรรมการย่อยโปรตีน	44
8 ผลการทดสอบความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน	46
9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่สภาวะต่างๆ	48
10 แสดงการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลืองดิบ	49
11 ค่า % similarity ของแบคทีเรียไอโซเลทโดยใช้ BLASTn เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล	54
12 การลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ <i>L. fermentum</i> ที่ใช้ปริมาณเชื้อที่ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 0, 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส	56

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
13 ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ <i>L. fermentum</i> SB10 ที่ปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24,36 และ 48 ชั่วโมง	60
14 เปรียบเทียบคุณภาพของไซเลจและคุณภาพของไซเลจกากถั่วเหลืองดิบที่หมักด้วย <i>L. fermentum</i> SB10 ที่ปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง	61
ตารางผนวกที่	
ค1 การทดสอบกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเชื้อที่แยกได้จากกากถั่วเหลืองดิบ	84
ค2 การลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ <i>L. fermentum</i> ที่ใช้ปริมาณเชื้อ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากถั่วเหลือง 0, 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส	85
ค3 การลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ <i>L. fermentum</i> ที่ใช้ปริมาณเชื้อ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากถั่วเหลือง 0, 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส	86
ค4 การลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ <i>L. fermentum</i> ที่ใช้ปริมาณเชื้อ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากถั่วเหลือง 0, 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	87

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางผนวกที่	หน้า
ค5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ <i>L. fermentum</i> ที่ใช้ปริมาณเชื้อ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากถั่วเหลือง 0, 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส	88
ค6 การหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ <i>L. fermentum</i> ที่ใช้ปริมาณเชื้อ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากถั่วเหลือง 5, 6 และ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง	89
ค7 ผลการทดสอบความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน	90

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลำดับกรดอะมิโนของ Kunitz trypsin inhibitor (KTI)	12
2	ลำดับกรดอะมิโนของ Bowman-Birk inhibitor (BBI)	13
3	กระบวนการเมตาบอลิซึมโดยอาศัยกลูโคสและฟรุกโตสของ homofermentative lactic acid bacteria และ glycolysis pathway	23
4	กระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคสและฟรุกโตสของ heterofermentative lactic acid bacteria โดย phosphoketolase pathway	24
5	ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SB10 บนอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A: ลักษณะสีม่วงก่อนทำการเจียเชื้อ, B: ลักษณะของสีที่เปลี่ยนไปหลังจากเจียเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก SB10 C: ลักษณะของสีที่เปลี่ยนไปหลังจากเจียเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SB10, D: ลักษณะรูปร่างของไอโซเลท SB10 จากการย้อมแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า)	42
6	ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน partial 16s rRNA sequence ของแบคทีเรียไอโซเลท (เส้นบน: Query) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ <i>L. fermentum</i> Strain SM-7 (เส้นล่าง: subjct)	55
7	แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดแลคติกและจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่สภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้ปริมาณเชื้อ <i>L. fermentum</i> SB10 ที่ปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิในการหมัก 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง	62

การลดการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเพื่อการหมักไซเลจ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากกากถั่วเหลืองดิบ

The Inactivation of Trypsin Inhibitors by Lactic Acid Bacteria Isolated from Soybean Pulp for Silage Fermentation

คำนำ

กากถั่วเหลืองเป็นผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรที่มีคุณค่าทางอาหาร ซึ่งสามารถนำไปใช้ใน
สูตรอาหารเลี้ยงสัตว์ แต่กากถั่วเหลืองดิบไม่เหมาะแก่การจะนำมาใช้เลี้ยงสัตว์ เพราะกากถั่วเหลือง
ดิบมีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน(trypsin inhibitors) อยู่ด้วย สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเป็นสารลด
คุณค่าทางโภชนาการ (anti-nutritional factor) โดยมีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทริปซิน ทำให้
ความสามารถของเอนไซม์ลดลง ไม่สามารถย่อยหรือใช้ประโยชน์จากโปรตีนในอาหารได้เต็มที่
และในขณะเดียวกันตับอ่อนจะสร้างและหลั่งเอนไซม์ทริปซินมากกว่าปกติทำให้สัตว์มีความ
ต้องการกรดอะมิโนมากขึ้น และสูญเสียโปรตีนสูงขึ้น (พันทิพา, 2547) สารชนิดนี้จะมีผลไป
ขัดขวางการย่อยโปรตีนทำให้โปรตีนในสูตรอาหารมีประโยชน์ต่อสัตว์น้อยลง สัตว์ระยะเล็กมี
ความไวต่อสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินมาก สัตว์จะมีการเจริญเติบโตลดลง รวมทั้งการขยายตัวของ
ตัวอ่อนด้วย ดังนั้นก่อนจะนำเอากากถั่วเหลืองมาใช้เลี้ยงสัตว์จะต้องทำให้สุกเสียก่อนเพื่อทำลาย
สารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน การให้ความร้อน 100 องศาเซลเซียส นาน 70 นาทีสามารถทำลายฤทธิ์
ของตัวยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน(ประสาน, 2541) ถึงแม้ว่ากากถั่วเหลืองจากโรงงานนมถั่วเหลืองจะ
ได้รับความร้อนจากกระบวนการสกัดแต่อาจจะให้ความร้อนไม่เพียงพอทำให้กากถั่วเหลืองที่ได้ไม่
สุกและมีปริมาณตัวยับยั้งเอนไซม์ทริปซินสูง หากนำไปเลี้ยงสัตว์ จะแสดงอาการการเจริญเติบโต
ลดลง ประสิทธิภาพการใช้อาหารต่ำ แต่ในทางตรงกันข้ามถ้าให้ความร้อนแก่กากถั่วเหลืองมาก
เกินไป ทำให้กากถั่วเหลืองที่ได้มีสีน้ำตาลคล้ำ มีกลิ่นเหม็นไหม้ ไม่เหมาะที่จะใช้เลี้ยงสัตว์ จึงไม่
เลือกการยับยั้งโดยใช้ความร้อน เนื่องจากสิ้นเปลืองพลังงานในการให้ความร้อน และมีอีก
วิธีการหนึ่งคือการใช้จุลินทรีย์ การที่จะนำกากถั่วเหลืองไปใช้ประโยชน์ได้เต็มที่จึงสนใจศึกษาการ
ทำงานของแบคทีเรียกรดแลคติกในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ
เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ของอาหารหมัก ที่สร้างกรดแลคติกขึ้น ทำให้
ความเป็นกรด-ด่างลดลง ส่งผลให้ยืดอายุการเก็บรักษาไซเลจได้นานขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มนี้

สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีนซึ่งไปย่อยโปรตีนให้กลายเป็นเปปไทด์สายสั้นๆ ทำให้การดูดซึมโปรตีนของสัตว์เร็วขึ้น การใช้ประโยชน์จากกากถั่วเหลืองในการนำไปใช้เป็นอาหารสัตว์ให้เกิดประโยชน์สูงสุด

ในกระบวนการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองไม่มีการให้ความร้อนแก่ถั่วเหลือง ดังนั้นกากถั่วเหลืองจากการผลิตน้ำมันถั่วเหลืองยังคงเป็นกากถั่วเหลืองดิบทำให้มีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินปนอยู่ การใช้กากถั่วเหลืองดิบในอาหารสัตว์ในระดับอุตสาหกรรมจึงไม่เหมาะสมต้องนำกากถั่วเหลืองดิบไปกำจัดหรือทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ ทริปซินเสียก่อน จึงจะนำกากถั่วเหลืองไปใช้เลี้ยงสัตว์ได้(ประสาน,2541) แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่ามีประโยชน์ต่อคนและสัตว์มากมาย การประยุกต์แบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารสัตว์พบว่าสัตว์คิดเชื่อน้อยลงทำให้อัตราการตายลดลง อัตราการเจริญเติบโตสูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียกรดแลคติกมีความสามารถในการทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ด้วย (Huffman *et al.*,2003) ดังนั้นงานวิจัยนี้จะเป็นประโยชน์แก่เกษตรกรที่เพาะเลี้ยงสัตว์เช่น สุกร ไก่ และอื่นๆ ในอุตสาหกรรมขนาดกลางและขนาดย่อม

การศึกษาในครั้งนี้เป็นการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถลดการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินเพื่อการหมักไซเลจ โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากกากถั่วเหลืองดิบ เลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถยับยั้งสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ดีที่สุด นำมาจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกถึงระดับสปีชีส์ และนำแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้ไปศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่ลดการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินดีที่สุด

วัตถุประสงค์

1. เพื่อคัดเลือก และจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่มีความสามารถทำลายสารยับยั้งเอนไซม์
ทริปซินในกากถั่วเหลืองดิบ โดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา ร่วมกับการศึกษาทางพันธุ
ศาสตร์โมเลกุลจากลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน 16S rRNA

2. เพื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลืองดิบ โดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก

การตรวจเอกสาร

1. ความรู้ทั่วไปเกี่ยวกับกากถั่วเหลือง

1.1 กากถั่วเหลือง (soybean pulp)

กากถั่วเหลืองเป็นอาหารแหล่งโปรตีนที่นำมาใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ได้ดี เพราะมีโปรตีนสูงถึง 34 เปอร์เซ็นต์ และเป็นโปรตีนที่มีคุณภาพสูงมีกรดอะมิโนจำเป็น (essential amino acid) หลายชนิด แต่มี cystine และ methionine ในระดับต่ำ มีฟอสฟอรัสสูง แต่มีแคลเซียม และวิตามินบีต่ำ การใช้กากถั่วเหลืองดิบเลี้ยงสัตว์ จะทำให้สัตว์ได้รับประโยชน์จากโปรตีนไม่เต็มที่ มีการเจริญเติบโตต่ำ หรือชะงักการเจริญเติบโต เพราะกากถั่วเหลืองดิบมีสารยับยั้งการใช้ประโยชน์จากโปรตีน (trypsin inhibitors) นอกจากนี้ ยังมีเอนไซม์ยูรีเอส (urease enzyme) ซึ่งจะย่อยโปรตีนในกากถั่วเหลืองให้สลายไปเรื่อยๆ ทำให้ปริมาณ และคุณภาพของโปรตีนลดลงในขณะที่เก็บรักษาไว้ แต่สารทั้ง 2 ชนิดนี้ถูกทำลายได้ง่ายด้วยความร้อน ดังนั้น ในการนำกากถั่วเหลืองไปเลี้ยงสัตว์ จึงควรนำไปทำให้สุกหรือผ่านความร้อนเสียก่อน เพื่อเป็นการลดปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน และเอนไซม์ยูรีเอส กากถั่วเหลืองที่นำมาใช้ผสมในอาหารสัตว์มี 2 ชนิดคือ

1.1.1 กากถั่วเหลืองที่มีเปลือกผสมอยู่ด้วย หรือที่เรียกกันในการค้าว่ากากถั่วเหลือง 44 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์คุณภาพของกากถั่วเหลืองชนิดนี้ โดยกองอาหารสัตว์พบว่า มีโปรตีนประมาณ 47.6 เปอร์เซ็นต์ เยื่อใย (crude fiber) ประมาณ 6.6 เปอร์เซ็นต์

1.1.2 กากถั่วเหลืองที่ไม่มีเปลือกผสมอยู่ มีแต่เนื้อในล้วนๆ หรือที่เรียกกันในการค้าว่ากากถั่วเหลือง 48 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์พบว่า มีโปรตีนสูงถึง 51.5 เปอร์เซ็นต์ ส่วนเยื่อใยต่ำกว่าชนิดที่เปลือกผสมคือ มีประมาณ 4.9 เปอร์เซ็นต์

กากถั่วเหลืองที่นำมาใช้เป็นอาหารสัตว์ จะต้องมีความชื้นไม่เกิน 12 เปอร์เซ็นต์ มีลักษณะเป็นเกล็ด บาง เบา เมื่อใช้มือบีบจะมีลักษณะแข็ง กรอบ ไม่ดิบ หรือไหม้ ไม่มีกลิ่นหืน หรือกลิ่นสาบ และไม่มีสิ่งปลอมปน

1.2 ลักษณะของกากถั่วเหลืองที่ไม่ควรนำมาใช้เลี้ยงสัตว์

1.2.1 มีความชื้นสูง กากถั่วเหลืองที่มีความชื้นสูงจะมีลักษณะจับกันเป็นก้อน มีขนาดไม่แน่นอน และเกิดเชื้อราได้ง่าย

1.2.2 ดิบหรือไหม้ ซึ่งเป็นผลจากการให้ความร้อนในขบวนการเผาไหม้ กากถั่วเหลืองดิบ หรือสุกไม่ดีพอ จะมีสีซีด กลิ่นเหม็นเขียว จับตัวกันเป็นก้อน สาเหตุมาจากความร้อนที่ให้แก่เมล็ดถั่วเหลือง เพื่อการระเหยน้ำ และความร้อนที่เกิดจากแรงอัด เพื่อสกัดน้ำมันในขบวนการสกัดน้ำมัน โดยใช้แรงอัด ต่ำกว่าอุณหภูมิที่กำหนด

กากถั่วเหลืองประเภทนี้จะมีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินค่อนข้างสูง และยังมีเอ็นไซม์ยูรีเอสเหลืออยู่ค่อนข้างสูง กากถั่วเหลืองที่เหมาะสมสำหรับใช้เลี้ยงสัตว์ ควรจะมีค่า Urease Index (pH) อยู่ในช่วง 0.02–0.2 ซึ่งจากการตรวจสอบตัวอย่างกากถั่วเหลือง โดยกองควบคุมคุณภาพอาหารสัตว์ กรมปศุสัตว์พบว่า ตัวอย่างกากถั่วเหลืองจำนวน 98 เปอร์เซ็นต์ มีค่าความเป็นกรด-ด่างอยู่ในช่วง 0–0.25 ส่วนตัวอย่างกากถั่วเหลืองที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 0.25 มีเพียง 2 เปอร์เซ็นต์ เท่านั้น

กากถั่วเหลืองไหม้ จะสังเกตได้ว่ามีกลิ่นเหม็นไหม้ และมีรสขม เพราะความร้อนที่ใช้ในขบวนการผลิตสูงกว่าอุณหภูมิที่กำหนด กากถั่วเหลืองประเภทนี้จะมีคุณค่าทางอาหารลดต่ำลง เพราะการใช้ประโยชน์ได้ของสารอาหาร โดยเฉพาะกรดอะมิโนจำเป็น เช่น ไลซีน เมทไธโอนีน จะใช้ได้น้อยลง

1.2.3 กากถั่วเหลืองเก่า จะมีกลิ่นเหม็นหืน หรือเหม็นสาบ หรือมีแมลงขึ้น หรืออาจเกิดเชื้อรา ดังนั้น เกษตรกรที่ซื้อกากถั่วเหลืองมาเพื่อผสมอาหารสัตว์จะต้องระวัง ไม่เลือกซื้อกากถั่วเหลืองที่มีลักษณะดังกล่าว เพราะสัตว์ไม่ชอบกิน จะกินน้อยลงทำให้สัตว์ได้รับอาหารไม่เพียงพอต่อความต้องการ คุณค่าทางอาหารต่ำ โดยโปรตีนจะลดลงทั้งปริมาณ และคุณภาพ อาจมีสาร aflatoxin จากเชื้อรา หรืออาจปนเปื้อนเชื้อโรคติดต่อจากสัตว์

1.2.4 มีสิ่งปลอมปน ซึ่งบางครั้งจะสังเกตเห็นได้ยาก กากถั่วเหลืองประเภทนี้จะมีคุณค่าทางอาหารผิดปกติ เช่น ปลอมปนด้วยขังข้าวโพด หรือรำข้าว จะทำให้ปริมาณโปรตีนลดลง ในขณะที่ค่าเถ้าอยู่ในระดับปกติ ถ้าปลอมปนด้วย ดิน หิน จะทำให้โปรตีนลดลง

1.3 ประเภทของกากถั่วเหลือง

กากถั่วเหลืองเป็นผลพลอยได้จากโรงงานสกัดน้ำมันถั่วเหลือง โรงงานทำน้ำมันถั่วเหลือง และผลพลอยได้จากเมล็ดถั่วเหลืองที่นำมาเป็นอาหารสัตว์ ซึ่งมีดังนี้

1.3.1 กากถั่วเหลือง (ground soybean) คือ ถั่วเหลืองบดทั้งเมล็ด โดยไม่สกัดเอาน้ำมันออก

1.3.2 ถั่วเหลืองบดทั้งต้น (ground soybean hay) คือ ต้นถั่วเหลืองบดทั้งใบ ลำต้น และเมล็ดซึ่งไม่มีพืชชนิดอื่นและวัชพืชปะปนเลย และมีปริมาณของเยื่อใยจะต้องไม่เกินมาตรฐานสินค้าที่กำหนดไว้ในแต่ละประเภท

1.3.3 เปลือกถั่วเหลือง ส่วนใหญ่จะประกอบด้วยเปลือกชั้นนอกสุดของเมล็ดถั่วเหลือง

คุณภาพโปรตีนจากกากถั่วเหลืองได้รับการยอมรับว่าดีที่สุดในจำนวนโปรตีนจากพืชด้วยกัน ทั้งปริมาณ จำนวนและอัตราส่วนของกรดอะมิโนที่จำเป็นมีอยู่ครบถ้วนเพียงพอกับความต้องการของสัตว์บางประเภทองค์ประกอบทางโภชนาการต่างๆ ในเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองสรุปดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ส่วนประกอบทางโภชนาการในเมล็ดถั่วเหลืองและกากถั่วเหลือง

ส่วนประกอบของถั่วเหลือง (เปอร์เซ็นต์)	ถั่วเหลืองเมล็ด	กากถั่วเหลือง
ความชื้น	10	10
โปรตีน	38	48.5
ไขมัน	18	1.0
เยื่อใย	5.0	3.5
เถ้า	4.6	6.0
แคลเซียม	0.25	0.25
ฟอสฟอรัส	0.20	0.20
พลังงานใช้ประโยชน์ได้	3540	3540
กรดอะมิโน(ร้อยละ)		
ไลซีน	2.4	3.02
เมทไธโอนีน	0.54	0.66
ทริปโตเฟน	0.52	0.65
ทรีโอนีน	1.69	1.91

ที่มา: คัดแปลงจากประสาน (2541)

1.3.4 กากถั่วเหลืองซึ่งได้จากการสกัดน้ำมันด้วยการหีบหรืออัด (soybean meal, mechanical extracted) คือกากถั่วเหลืองที่ได้จากการสกัดน้ำมันโดยวิธีหีบอัดทางกายภาพ วิธีนี้จะต้องใช้ความร้อนในกรรมวิธีในการผลิต ผลพลอยได้ชนิดนี้จะต้องไม่มีสารพิษหรือสารอื่นใดเจือปนอยู่เกินกว่า 0.5 เปอร์เซ็นต์ และปริมาณของเยื่อใยจะต้องไม่เกินมาตรฐานสินค้าที่กำหนดไว้ในแต่ละประเทศ

1.3.5 กากถั่วเหลืองซึ่งได้จากการสกัดน้ำมันด้วยสารละลายอินทรีย์ (soybean meal, solvent extracted) คือกากถั่วเหลืองที่ได้จากการสกัดน้ำมันโดยวิธีสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ วิธีการนี้จะต้องใช้ความร้อนในกรรมวิธีการผลิตเช่นกัน ผลพลอยได้ชนิดนี้จะต้องไม่มีสารพิษหรือสารอื่นใดเจือปนและปริมาณของเยื่อใยจะต้องไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้

1.3.6 กากถั่วเหลืองที่กะเทาะเอาเปลือกนอกออกและสกัดด้วยสารละลายอินทรีย์ (soybean meal, dehulled, solvent extracted) คือกากถั่วเหลืองที่ได้จากการสกัดน้ำมันจากเมล็ดถั่วเหลืองที่เอาเปลือกนอกออกแล้ว โดยใช้สารละลายอินทรีย์สกัดเช่นกัน วิธีนี้ต้องใช้ความร้อนในกรรมวิธีการผลิตและต้องไม่มีสิ่งเจือปนตลอดจนปริมาณเยื่อใยไม่เกินมาตรฐานที่กำหนดไว้

1.3.7 ซอยบินมิลล์ฟีด (soybean mill feed) เป็นผลพลอยได้จากเปลือกนอกของเมล็ดถั่วเหลือง และส่วนหางของเมล็ดถั่วเหลืองจากเครื่องบดถั่วเหลืองจากอุตสาหกรรมการทำแป้งถั่วเหลือง ปริมาณโปรตีนและเยื่อใยจะต้องตรงตามมาตรฐานที่แต่ละประเทศกำหนดไว้

1.3.8 ซอยบินมิลล์รัน (soybean mill run) คือเปลือกนอกและเนื้อถั่วเหลืองที่ติดมาด้วยกับเปลือก ซึ่งเป็นผลพลอยได้จากการทำกากถั่วเหลืองชนิดที่กะเทาะเอาเปลือกออกแล้วสกัดด้วยสารละลาย

1.3.9 ถั่วเหลืองนึ่งหรืออบ (heat processed soybean) คือการเอาถั่วเหลืองทั้งเมล็ดมานึ่งอบ ถั่ว ทั้งเมล็ดแล้วอาจนำมาบดอัดเป็นเม็ด ทำเป็นเกล็ด หรือเป็นผงก็ได้ และมักขายในราคาตามปริมาณโปรตีนของผลผลิต

1.3.10 กราวด์เอ็กทราดูเอ็ด โซล ซอยบิน (ground extruded whole soybean) คือผลที่ได้จากการนำเอาเมล็ดถั่วเหลืองทั้งเมล็ดไปอบด้วยไอน้ำ แล้วอัดผ่านเครื่องอัดแรงดันสูง (extruder) เพื่อให้เกิด friction heat ผลที่ได้มักจะขายราคาตามปริมาณโปรตีนของผลผลิต

กากถั่วเหลืองเป็นแหล่งโปรตีนจากพืชที่มีคุณภาพสูงสุด มีกรดอะมิโนจำเป็นหลายตัวแต่มี cystine และ methionone ในระดับต่ำโดยเฉพาะ methionone มีน้อยมากจึงถูกจัดเป็น first limiting amino acid เม็ดถั่วเหลืองมีโปรตีนประมาณ 38 เปอร์เซ็นต์ ไขมัน 16-21 เปอร์เซ็นต์ แต่เมื่อสกัดเอาน้ำมันออกแล้วจะมีโปรตีนเฉลี่ย 44 เปอร์เซ็นต์ อาจถึง 50 เปอร์เซ็นต์ ขึ้นอยู่กับวิธีสกัดน้ำมันและขนาดของเมล็ด ในทางการค้าได้แบ่งออกเป็น 2 เกรดคือกากถั่วเหลือง 44 เปอร์เซ็นต์ และ 48 เปอร์เซ็นต์ กากถั่วเหลือง 44 เปอร์เซ็นต์ เป็นกากถั่วเหลืองที่มีเปลือกผสมอยู่ด้วย ส่วนกากถั่วเหลือง 48 เปอร์เซ็นต์ คือ กากถั่วเหลืองที่กะเทาะเอาเปลือกออก ไม่มีส่วนของเปลือกปน

1.4 ข้อสังเกตการใช้กากถั่วเหลือง

1.4.1 ถ้าเป็นกากถั่วเหลืองชนิดอัดน้ำมัน (expeller process) จะเก็บได้ประมาณ 1 เดือนครึ่ง ถ้าเป็นชนิดสกัดน้ำมัน (solvent extracted) จะเก็บได้นาน 2 เดือน แต่แมลงจะรบกวนมาก

1.4.2 ถ้ากากถั่วเหลืองไม่สุกจริงจะมีสาร trypsin inhibitor ตกค้างอยู่ สัตว์ที่ได้รับจะมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำ หรือชะงักการเจริญเติบโต

1.4.3 ถั่วเหลืองดิบจะมีเอนไซม์ยูรีเอส ซึ่งจะย่อยโปรตีนในถั่วให้สลายไปเรื่อยๆ หากถั่วนั้นเก็บไว้นานเปอร์เซ็นต์โปรตีนจะลดลง และคุณภาพโปรตีนจะลดลงด้วย

1.4.4 การใช้กากถั่วเหลืองผสมในอาหารสัตว์ควรเสริมกรดอะมิโน methionine cystine (threonine valine และ tyrosine) ลงไปด้วยจะทำให้อัตราการเจริญเติบโตดีขึ้น กรดอะมิโนอีก 3 ตัวที่อยู่ในวงเล็บ ทดลองได้ผลดีในหนู

1.4.5 การใช้ในสัตว์กระเพาะเดี่ยว นอกจากระวังเรื่องการขาดกรดอะมิโนแล้ว ยังต้องระวังเรื่องการขาดวิตามินบีรวมอีกด้วย เพราะพบว่าถ้าไม่เสริมบีรวม (B-complex) ในสูตรอาหารแม่สุกรที่ใช้กากถั่วเหลืองลูกที่เกิดออกมาจะอ่อนแอทั้งคอก โตช้า แม่น้ำนมเลี้ยงลูกน้อย สุกรแก่ๆ จะแสดงการเดินไม่ปกติ ไก่ไข่จะฟักออกน้อย ลูกไก่ไม่แข็งแรง มีลักษณะ hemorrhages คล้ายการขาดวิตามินเค

1.4.6 มีคุณสมบัติเป็นยาระบายอ่อนๆ

1.4.7 มีแคลเซียมต่ำ ฟอสฟอรัสสูง

1.4.8 ในไทยมักพบว่าการปลอมปนกากถั่วเหลืองด้วย รำ ช้างข้าวโพด ดิน หิน กากนุ่น กากฟ้าย จากการสังเกตพบว่า ถ้าปนด้วยรำ หรือช้างข้าวโพดบด ปริมาณโปรตีนจะต่ำกว่าปกติ ปริมาณเถ้าจะเป็นปกติ ถ้าปนด้วย ดิน หิน ปริมาณโปรตีนจะลดน้อย แต่ปริมาณเถ้าจะเพิ่มขึ้นมาก จนผิดสังเกต ถ้าปนด้วยกากเมล็ดพืชอื่นๆ สังเกตดูได้จากลักษณะของกาก เยื่อใย

1.4.9 เม็ดถั่วเหลืองสุก (ไม่ได้สกัดน้ำมัน) ถ้าใช้ในสูตรอาหารสุกรเกิน 10 เปอร์เซ็นต์ จะเกิด soft pork

1.4.10 ในสัตว์เคี้ยวเอื้องสามารถใช้ถั่วเหลืองดิบได้และกากถั่วเหลืองที่ผ่าน ขบวนการ expeller จะใช้ค่า bypass protein (โปรตีนที่สามารถผ่านกระเพาะ 1,2,3 ไปจนถึง 4 ได้ โดยไม่ถูกย่อย แต่จะถูกย่อยในกระเพาะที่ 4 ซึ่งเป็นที่ต้องการมากในปัจจุบัน) สูงกว่าของกากถั่วเหลืองที่ผ่านการสกัดน้ำมันด้วยสารเคมี

1.4.11 นำถั่วเหลืองดิบผ่านความร้อนอุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที เพื่อลดสารพิษลง อย่างไรก็ตามหากั่วหรือผ่านความร้อนนานเกินไปจะทำให้กรดอะมิโนบางชนิด ถูกทำลาย

1.4.12 เมื่อต้องการนำถั่วเหลืองไม่สกัดหรือน้ำมันมาเลี้ยงโคนม ต้องบด เลียก่อน เพื่อจะย่อยได้มากขึ้น และนอกจากนั้นควรให้โคนมได้รับวิตามินเอจากแหล่งอื่นเพิ่มเติม เพราะในถั่วเหลืองมีวิตามินเอต่ำ กล่าวคือ ควรให้โคนมกินพืชอาหารสัตว์สดคุณภาพดีด้วย

1.4.13 ในการใช้ถั่วเหลืองไม่สกัดไขมันผสมอาหารไก่ หากไม่ได้สกัดน้ำมันออก ใช้ได้ในระดับ 10-25 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารผง และ 10-40 ในอาหารอัดเม็ดแต่หากสกัดน้ำมันแล้ว ก็ใช้ได้ 10-40 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารทั้งผงและอัดเม็ด โดยก่อนการผสมต้องบดให้ละเอียดเสียก่อน เพื่อได้ใช้ประโยชน์ได้ดีขึ้น

เมล็ดถั่วเหลืองไม่เหมาะสมที่จะนำมาเลี้ยงไก่และสุกรโดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์ระยะ เล็ก เพราะในถั่วเหลืองดิบมีสารยับยั้งการเจริญเติบโต (anti-growth factor) อยู่หลายตัว สารยับยั้ง การเจริญเติบโตมีผลทำให้สัตว์ไม่สามารถใช้ถั่วเหลืองได้อย่างมีประสิทธิภาพ

1.5 สารลดคุณค่าทางโภชนาการที่พบในถั่วเหลือง

ในการนำถั่วเหลืองและกากถั่วเหลืองมาใช้ประโยชน์มีข้อจำกัดคือ ในเมล็ดถั่วเหลืองมี สารลดการเจริญเติบโต (antinutritional factors) หลายชนิด เช่น

1.5.1 สารซาโปนิน (saponin) ซึ่งขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ไลโซทริน

1.5.2 ไลซิโนอะลานิน (lysinoalanine) ทำให้การใช้ประโยชน์ของกรดอะมิโน-ไลซีนต่ำลง

1.5.3 สารยับยั้งเอนไซม์ทริน (trypsin inhibitors) ขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ทริน ซึ่งกลไกการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทรินเป็นแบบไม่แข่งขัน โดยสารยับยั้งเอนไซม์ทริน จะเกาะรวมตัวกับเอนไซม์ทรินมีผลให้ความสามารถของเอนไซม์ลดลงไม่สามารถย่อยหรือใช้ประโยชน์จากโปรตีนในอาหารได้เต็มที่ และในขณะเดียวกันตับอ่อนจะสร้างและหลั่งเอนไซม์ทรินมากกว่าปกติ ทำให้สัตว์มีความต้องการกรดอะมิโนมากขึ้นและสูญเสียโปรตีนสูงขึ้น

1.5.4 เอนไซม์ยูรีเอส (urease enzyme) ซึ่งจะย่อยโปรตีนในเมล็ดถั่วเหลืองให้สลายไปเรื่อยๆทำให้ปริมาณและคุณภาพของโปรตีนลดลงในขณะที่เก็บรักษาไว้

ดังนั้นการนำเมล็ดถั่วเหลืองมาใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพต้องมีการทำลายสารลดการเจริญเติบโตดังกล่าว ในถั่วเหลืองก่อนเพื่อเพิ่มคุณค่าทางโภชนาการของถั่วเหลือง

1.6 สารยับยั้งเอนไซม์ทรินในถั่วเหลือง

สารยับยั้งเอนไซม์ทรินที่พบในถั่วเหลืองมีมากกว่า 5 ชนิด แต่ที่สกัดได้ในรูปบริสุทธิ์มีเพียง 2 ชนิด คือ

Kunitz trypsin inhibitor (KTI) เป็นสารยับยั้งเอนไซม์ทรินชนิดแรกที่ทำให้บริสุทธิ์เพื่อใช้ในการศึกษาโครงสร้างของสารนี้ โดยโครงสร้างของKTI ประกอบด้วยกรดอะมิโน 181 หน่วย มีน้ำหนักโมเลกุล 21,384 ดัลตัน ซึ่งสายโพลีเปปไทด์มีพันธะ disulfide 2 แห่ง ดังภาพที่ 1 พันธะ disulfide แรกเชื่อมต่อระหว่างกรดอะมิโนหน่วยที่ 39 และ 86 ส่วนอีกพันธะหนึ่งเชื่อมต่อเป็น loop ที่หน่วย 136 และ 145 โดย KTI มี active center ที่ให้เอนไซม์เกาะที่ตำแหน่งพันธะที่ 63 (Arg) - 64 (Ile) ซึ่งจะยับยั้งเฉพาะเอนไซม์ทริน ในบรรดาสารยับยั้งเอนไซม์ทริน

ย่อยได้ของเมทไธโอนีน ไอโซลูซีน และไลซีนต่ำลง และยังเกิดปฏิกิริยา millard browning หรือ การเกิดสีน้ำตาล โดยจะเกิดเมื่อให้ความร้อนแก่โปรตีนในสภาพที่มีน้ำตาลอยู่ด้วยโดยน้ำตาล reducing sugar จะทำปฏิกิริยากับ E-amino group เช่น กลูโคสทำปฏิกิริยากับไลซีนซึ่งกรดอะมิโน ไลซีนเมื่อ อยู่ในรูปเชื่อมกับน้ำตาลร่างกายจะไม่สามารถนำไปใช้ได้

1.7.2 การใช้จุลินทรีย์ นำมาใช้ในผลิตภัณฑ์อาหารจากถั่วเหลืองหลายประเภท เช่น ถั่วเน่าทางภาคเหนือของประเทศไทย, ซีอิ๊ว, เต้าเจี้ยว และเทมเป้ เป็นต้นโดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ เช่น *Aspergillus* sp. และ *Lactobacillus* sp. เป็นต้น ทำให้มีการศึกษาถึงความเป็นไปได้ในการนำ จุลินทรีย์มาลดการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

Kanekar *et al.*, 1992 พบว่าการหมักถั่วเหลืองโดยใช้เชื้อ *L. plantarum* ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 18 ชั่วโมง สามารถลดกิจกรรมของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้

Huffmann *et al.*, 2003 ทดลองหมักถั่วเหลืองโดยการใช้จุลินทรีย์ในกระเพาะ อาหารของสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภายใต้สภาวะที่ถูกควบคุม ซึ่งสามารถทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

Ouwehand *et al.*, 2002 แบคทีเรียกรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร หมักหลายชนิด และในสกุล *Lactobacillus* หลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก เช่น *L. acidophilus* La5, *L. casei* Shirota, *L. fermentum* KLD, *L. plantarum* 299v, *L. reuteri* SD2112 และ *L. johnsonii* La1 โดย *L. johnsonii* La1 นับว่ามีประโยชน์ต่อสุขภาพ โดยใช้พัฒนาเป็นวัคซีน ในช่องปากได้ ช่วยลดการเพิ่มจำนวนของ *Helicobacter pylori* ซึ่งเป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่ติด เชื้อในกระเพาะอาหาร และเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดโรคมะเร็งในกระเพาะอาหาร *L. johnsonii* เป็นแบคทีเรียที่พบในลำไส้ และได้ถูกนำมาศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก อัน ได้แก่ ทนต่อเอนไซม์จากตับอ่อน ทนต่อกรดและน้ำดี ยึดเกาะบริเวณเยื่อลำไส้ได้ดี พิสูจน์แล้วว่า มีประโยชน์ต่อสุขภาพ ปลอดภัยและเลี้ยงง่าย เพิ่มจำนวนได้เร็ว

ข้อดีของวิธีนี้คือ เนื่องจาก แบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียกลุ่มใหญ่ของอาหารหมัก ที่ สร้างกรดแลคติกขึ้น ทำให้ความเป็นกรดต่ำลงลง ส่งผลให้ยัยอายุการเก็บรักษาไข่แดงได้นานขึ้น นอกจากนี้แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถสร้างเอนไซม์โปรตีเอสซึ่งไปย่อยโปรตีนให้กลายเป็นเปปไทด์ สายสั้นๆ ทำให้การดูดซึมโปรตีนของสัตว์เร็วขึ้น

ซึ่งในการทดลองนี้จะเลือกการยับยั้งเอนไซม์ทริปซินด้วยการใช้จุลินทรีย์เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้มุ่งเน้นถึงการทำอาหารสัตว์หมักโดยประชาชนทั่วไป จึงไม่เลือกการยับยั้งโดยใช้ความร้อนเนื่องจากสิ้นเปลืองพลังงานในการให้ความร้อน

2. ลักษณะโดยทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก (lactic acid bacteria: LAB) จัดอยู่ใน family Lactobacillaceae สามารถย้อมติดสีแกรมบวก มีรูปร่างกลมและรูปท่อน มีการจัดเรียงตัวแบบคู่ คู่สี่และโซ่ยาว ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์อะตาเลส (Axelsson, 1998) สามารถสร้างกรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต จะได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลโดยได้จากกระบวนการ substrate-level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมดาค่อนข้างยาก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน (fastidious microorganism) เช่น วิตามิน (vitamin) กรดอะมิโน (amino acid) ไพริมิดีน (pyrimidine) เพปโตน (peptone) แมงกานีส (manganese) อะซิเตต (acetate) และทวิน 80 (Tween 80) เป็นต้น

แบคทีเรียกรดแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในบริเวณที่ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) และมีออกซิเจนน้อย (microaerophilic) อุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ ความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลางหรือเป็นด่าง (Salminen and Wright, 1993)

แบคทีเรียกรดแลคติกแต่ละสปีชีส์สามารถปรับตัวเพื่อการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน จึงทำให้พบแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มนี้กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในคน และสัตว์

2.1 การจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติกจำแนกได้ดังนี้ (Axelsson, 1998) การจำแนกในระดับจีโนม เป็นการจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกโดยศึกษารูปร่าง เช่น รูปร่างกลมและรูปแท่ง การจัดเรียงตัว เช่น คู่สี่ โซ่และคู่ การหมักน้ำตาลกลูโคส (glucose fermentation) มี 2 แบบคือ homofermentative และ heterofermentative การสร้างแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ การเติบโตที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

และ 45 องศาเซลเซียส การสร้างไอโซเมอร์ของกรดแลกติกในระหว่างการหมักน้ำตาลกลูโคสซึ่งมีทั้งแบบ D และ L การเติบโตที่ NaCl 6.5 เปอร์เซ็นต์ และ NaCl 18 เปอร์เซ็นต์ และการเติบโตที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 4.4 และ 9.6 เป็นต้น

การจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกในระดับจิ้นส์ สามารถทำการจำแนกได้ดังแสดงในตารางที่ 2

แบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลกติก สามารถจัดจำแนกได้เป็น 12 สกุล ซึ่งแต่ละสกุลมีลักษณะดังนี้ (Axelsson, 1998)

2.1.1 *Carnobacterium* spp. เชลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรง คล้าย *Lactobacilli* มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.1-3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว เป็นกลุ่มมักไม่พบการเรียงตัวเป็นสายโซ่ ให้ผลตะลันเป็นลบ ไม่สร้างสปอร์ *Carnobacterium* spp. ไม่สามารถเจริญได้บนอาหารอะซีเตตที่ความเป็นกรด-ด่าง 5.4 สามารถหมักกลีเซอรอลและแมนนิทอลได้ด้วย ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Carnobacterium* ได้

นอกจากนั้น *Carnobacterium* ยังสามารถเจริญได้ที่ความเป็นกรด-ด่าง 9.0 นี้ประกอบด้วย 6 สปีชีส์ คือ *Carnobacterium divergens*, *C. funditum*, *C. gallinarum*, *C. mobile*, *C. piscicola* และ *C. alterfunditum* (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.1.2 *Lactococcus* spp. เชลล์มีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเชลล์เดี่ยว คู่ หรือต่อกันเป็นสายโซ่ ไม่เคลื่อนที่ เจริญที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย *Lactococcus lactis* ssp. *lactis*, *Lc. lactis* ssp. *cremoris*, *Lc. lactis* ssp. *hordniae*, *Lc. raffinolactis* และ *Lc. piscium*

2.1.3 *Weissella* spp. เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกสกุลเดียวที่มีทั้งรูปร่างทรงกลมและเป็นท่อน ประกอบด้วย 7 สปีชีส์ ซึ่งเดิมจำแนกอยู่ในสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* คือ *Weissella paramenteroides* (*Leuconostoc paramesenteroides*) *W. cofusus* (*Lactobacillus cofusus*) *W. halotolerans* (*L. halotolerans*) *W. kandleri* (*L. kandleri*) *W. minor* (*L. minor*) และสปีชีส์ใหม่ที่แยกได้จากไส้กรอกเปรี้ยวคือ *W. hellenica* (Stiles and Holzapfel, 1997)

2.1.4 *Aerococcus* spp. เป็นกลุ่มของแบคทีเรียแกรมบวกตระกูล streptococcaceae เซลล์มีรูปร่างกลม ไม่มีการเคลื่อนที่ มีการแบ่งตัวแบบ 2 ระนาบ โดยทั่วไปจึงพบเซลล์อยู่เป็นคู่หรือ 4 เซลล์ สามารถเจริญได้ดีในสภาพที่มีอากาศเพียงเล็กน้อย เป็นพวก homofermentative ไม่สร้างแคตาเลส แต่มีบางสายพันธุ์มีการผลิตแคตาเลสเทียม (pseudocatalase) แบคทีเรียที่พบในสกุลนี้มี 2 ชนิดคือ *A. urinae* และ *A. viridans* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Pediococcus urinae-equi* และ *P. homari* ตามลำดับ

2.1.5 *Enterococcus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีเซลล์เป็นรูปไข่ พบการจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ หรืออาจพบเป็นโซ่สายสั้นๆ สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส และ 45 องศาเซลเซียส เจริญได้ในสภาพที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ และ น้ำดี (bile) 40 เปอร์เซ็นต์ เจริญได้ที่มีความเป็นกรดต่าง 9.6 มีกระบวนการทางชีวเคมีเป็นแบบการหมัก มี GC content ประมาณ 37-45 โมลเปอร์เซ็นต์ แบคทีเรียสกุลนี้ประกอบด้วย 20 สปีชีส์ เปลี่ยนชื่อมาจาก *Streptococcus* (Devriese and Pot, 1995; Jay, 1996; Schleifer and Ludwig, 1995)

2.1.6 *Lactobacillus* spp. เป็นกลุ่มของแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทางฟิโนไทป์ ลักษณะทางชีวเคมี และลักษณะทางสรีรวิทยา อันเนื่องมาจากมีความแตกต่างของ GC content ภายในสกุลค่อนข้างสูง โดยอยู่ระหว่าง 32-53 โมลเปอร์เซ็นต์ (Axelsson, 1998) เซลล์มีรูปร่างเป็นแท่งหรือเป็นรูปทรงรี มีการจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวๆ หรือเป็นโซ่ ไม่เคลื่อนที่ ไม่มีการสร้างแคตาเลส มีบางสายพันธุ์เป็นแคตาเลสเทียม มีคุณสมบัติในการใช้เป็นโพรไบโอติก ได้เป็นอย่างดี พบได้ทั่วไปในมนุษย์และสัตว์ ในนมและผลิตภัณฑ์นม อาหารหมักชนิดต่างๆ และเครื่องดื่มนม พบในพืชเพียงเล็กน้อย เช่น ในหญ้าหมักและ ผักดอง โดยทั่วไปไม่เป็นพิษ (Harrigan, 1998)

Hammes and Vogel (1998) ได้กล่าวถึงการจัดแบ่งแบคทีเรียสกุลนี้โดยพิจารณาจากกระบวนการหมักแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม คือ

ก. Obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแลคโทสได้เป็นกรดแลคติกมากกว่า 85 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่านวิถี Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6-biphosphate-aldolase ได้ แต่ไม่ผลิต phosphoketolase ดังนั้น เชื้อกลุ่มนี้จึงไม่สามารถหมักน้ำตาลเพนโทสได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

ข. Facultative heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้หมักน้ำตาลเฮกโซส ได้เป็นกรดแลคติกโดยผ่านวิถี EMP มีกิจกรรมที่เกิดจากทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงสามารถหมักน้ำตาลเพนโทสได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์

ค. Obligately heterofermentative lactobacilli เชื้อกลุ่มนี้หมักน้ำตาลเฮกโซสและน้ำตาลเพนโทสได้โดยผ่านวิถี phosphogluconate ได้ผลิตกัน้ำเป็นกรดแลคติก เอทานอลและคาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 19 สปีชีส์

2.1.7 *Vagococcus* spp. เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างกลมหรือรูปไข่ เซลล์เป็นแบบเดี่ยวๆ ไม่สร้างสปอร์ สามารถเคลื่อนที่ได้โดยใช้แฟลกเจลลาที่อยู่รอบเซลล์ ไม่สร้างเอนไซม์คาตาเลส ต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจน (facultative anaerobe) เป็นเชื้อที่เติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เติบโตที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สามารถเติบโตได้ในบริเวณที่มีเกลือแกง 4 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เติบโตในบริเวณที่มีเกลือแกง 6.5 เปอร์เซ็นต์ ในความเป็นกรด-ด่างที่ 9.6 จะไม่พบการเติบโตของเชื้อนี้ เป็นเชื้อที่มีปริมาณเบสกวีนีนและ ไฮโดรจีนที่เป็นองค์ประกอบของดีเอ็นเอ 33.6 เปอร์เซ็นต์โมล

2.1.8 *Leuconostoc* spp. เซลล์อาจเป็นรูปร่างกลม แต่โดยมากมักเป็นรูปรี โดยเฉพาะเมื่อเติบโตในอาหารแข็ง การเรียงตัวมักเป็นคู่หรือเป็นสาย เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) และบริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) เมื่อมีการเติบโตในอาหารแข็งโคโลนีมีขนาดเล็กมาก โดยมากขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีมักน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร มักต้องการกรดอะมิโน (amino acid) และสารเร่งการเจริญเติบโต ทุกชนิดต้องการกรด

นิโคตินิก (nicotinic acid) ไทอะมีน (thiamine) ไบโอติน (biotin) และกรดเพนโททินิก (pentotinic acid) หมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติก (lactic acid) เอทานอล (ethanol) และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (carbondioxide) ไม่สามารถไฮโดรไลซิสอาร์จินีน (arginine) สามารถสังเคราะห์ ไดอะซีทิล (diacetyl) จากซิเตรต (citrate) ในน้ำนมได้ (วิลาวณย์, 2536)

2.1.9 *Pedococcus* spp. เซลล์เป็นรูปกลม เรียงตัวเป็นคู่หรือสี่เซลล์ติดกัน (tetrad) เคยมีการเข้าใจว่ามีการแบ่งระนาบเดียวให้เซลล์เป็นโซ่ยาวแล้วเรียงตัวใหม่เป็นสี่เซลล์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างสปอร์ และไม่สร้างแคปซูล โคโลนีมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1-3 มิลลิเมตร ขอบเรียบ กลม สีไม่แตกต่างกัน เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) และบริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) ทำให้เกิดการหมักน้ำตาลกลูโคสให้กรดแลคติก ไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ เมื่อเลี้ยงในอาหารจะเจริญตามรอยแทง (stab) และเติบโตบริเวณผิวอาหารเล็กน้อย ในอาหารเหลวเติบโตสม่ำเสมอทั่วหลอด ไม่ทำให้เกิดโรคในพืชหรือสัตว์มักพบในอาหารหมัก ไม่ค่อยพบในนมและผลิตภัณฑ์นม

2.1.10 *Streptococcus* spp. เซลล์เป็นรูปกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 2 ไมโครเมตร มักเรียงตัวเป็นคู่หรือเป็นสาย เป็นพวกที่สามารถเติบโตได้ทั้งบริเวณที่มีออกซิเจน (aerobe) บริเวณที่มีหรือไม่มีออกซิเจน (facultative anaerobe) บางชนิดต้องการก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เพิ่มเติม เมื่อหมักคาร์โบไฮเดรตให้กรดแลคติกเป็นสารอาหารหลัก ไม่ให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ บางชนิดสามารถหมักกรดอินทรีย์ได้ เช่น กรดมาลิก (malic acid) กรดซิตริก (citric acid) และกรดอะมิโน (amino acid) เช่น ซีรีน (serine) อาร์จินีน (arginine) ทดสอบคาตาเลส (catalase test) ให้ผลลบ อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต ปกติประมาณ 37 องศาเซลเซียส ส่วนอุณหภูมิสูงสุดและอุณหภูมิต่ำสุดในการเจริญเติบโตแตกต่างกันในแต่ละชนิด

2.1.11 *Tetragenococcus* spp. เป็นแบคทีเรียแลคติก รูปกลม มีการจัดเรียงตัวเป็นสี่เซลล์หรือคู่ หรือเซลล์เดี่ยว ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ เคลื่อนที่ได้ การจำแนกโดยอาศัยลักษณะทาง ฟิโนไทป์ ได้แก่ คุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ที่มีรูปร่างเซลล์เป็นสี่เซลล์ และคุณสมบัติทางการเจริญ เป็นเชื้อที่เจริญได้ช้าบนอาหารแข็ง มีโคโลนีเป็นทรงกลมที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 มิลลิเมตร ผิวโคโลนีเรียบ เป็นเชื้อที่ต้องการความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมในการเจริญเติบโต ระหว่าง 7-8 อุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตอยู่ระหว่าง 30-35 องศาเซลเซียส เป็นแบคทีเรียชอบเค็ม สามารถเติบโตได้ในที่มีเกลือแกง 18 เปอร์เซ็นต์ เป็นแบคทีเรียแลคติก ชนิด

homofermentative ที่หมักน้ำตาลกลูโคสให้ผลิตเป็นกรดแลกติกที่มีไอโซเมอร์แบบแอล (L) และให้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์บ้างเล็กน้อย ไม่สามารถสร้างเอนไซม์อะลาเลส ไม่ย่อยอาร์จินีน (arginine) ไม่สามารถรีดิวส์ไนเตรท แต่สามารถหมักน้ำตาลอะราบินโนส (arabinose) ไรโบส (ribose) มอลโทส (maltose) ซูโครส (sucrose) ทรีฮาโลส (trehalose) มอลโทโทรไอส (maltotriose) กลีเซอรอล (glycerol) และมีค่าเปอร์เซ็นต์โมล ของ G+C เป็น 34-36 เปอร์เซ็นต์

2.1.12 *Oenococcus* spp. มีรูปร่างทรงกลม ซึ่งถูกเปลี่ยนมาจาก *Leuconostoc oenus* เดิม เนื่องจากมีลักษณะทางพันธุกรรมแตกต่างจาก *Leuconostoc* และทนต่อกรดได้ดีกว่า (Dick *et al.*, 1995)

2.2 กระบวนการหมักที่เกิดจากแบคทีเรียกรดแลกติก

แบคทีเรียกรดแลกติก สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่ม ตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักคือ

2.2.1 Homofermentative เป็นแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส โดยทำการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวทอาศัยเอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาแล้วให้กรดแลกติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน glycolysis pathway (Embden-Meyerhof pathway: EMP) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Pediococcus* *Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิดเช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii*

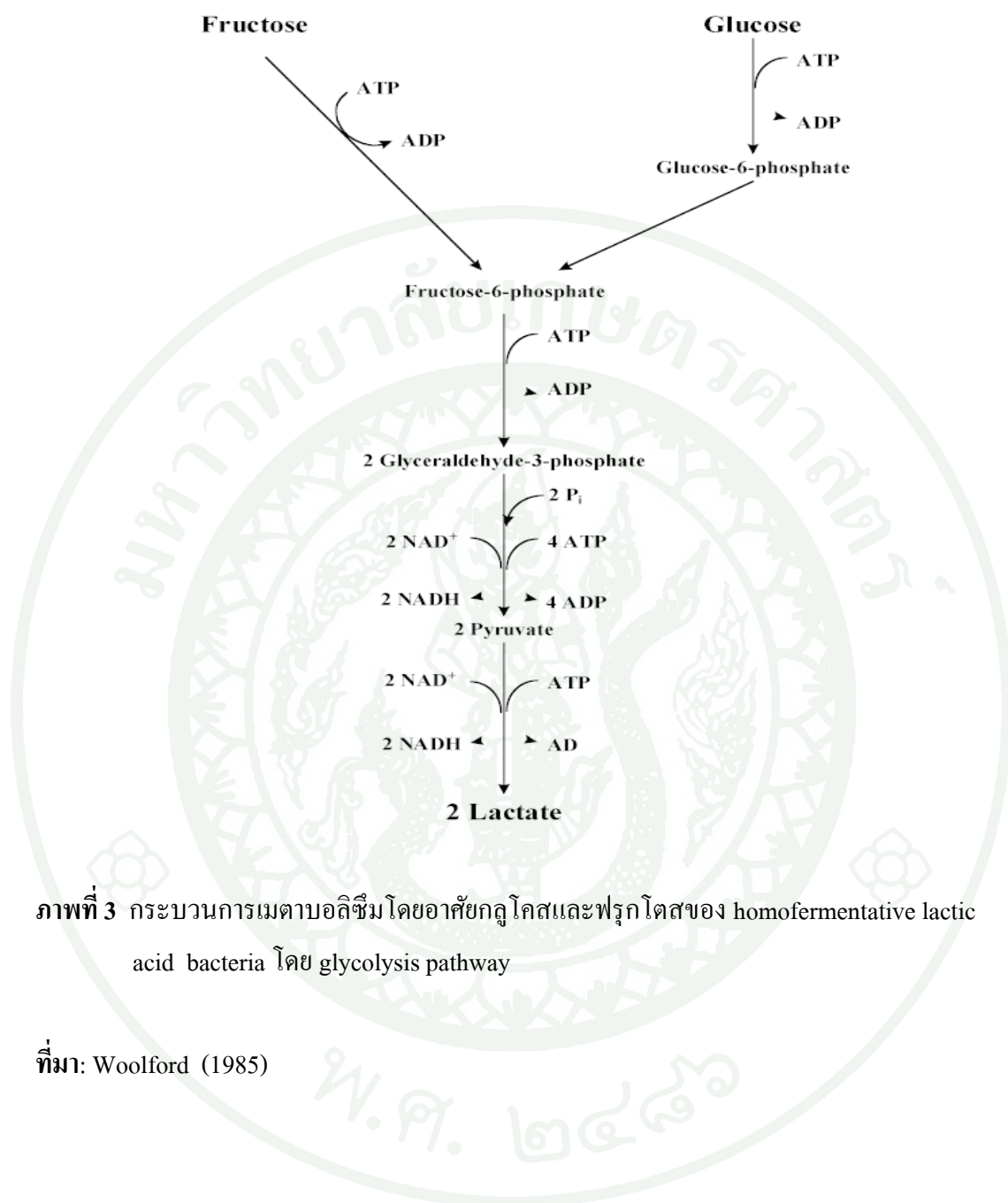
กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ถูกเติมฟอสฟอรัส และเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างขึ้นก่อนที่เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) จะเข้าทำปฏิกิริยาเป็นผลให้โมเลกุลกลูโคสแตกออกเป็นกลีเซอรอัล-3-ฟอสเฟต (ซึ่งมีคาร์บอน 3 อะตอม) 2 โมเลกุล จากนั้นจะถูกเปลี่ยนเป็นไพรูเวต (pyruvate) โดยเกิด ATP ขึ้น 2 โมเลกุลจากการหมักน้ำตาลกลูโคส 1 โมเลกุล เนื่องจากการเติมฟอสฟอรัสให้แก่สารตั้งต้น 2 แห่ง ในขั้นสุดท้ายเป็นการรีดิวซ์ไพรูเวตเป็นแลกเตท ในขั้นตอนนี้ต้องใช้ NADH ได้ NAD⁺ กลับคืนมาจากการที่ถูกใช้ไปในการออกซิเดชันกลีเซอรอัลดีไฮด์-3-ฟอสเฟต

กระบวนการเมตาบอลิซึมดำเนินไปตามวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway) หรือเรียกว่าวิถีเอดเดนเมเยอร์ฮอฟ พาร์นาส (Embden Meyerhof Parnas pathway) ดังแสดงในภาพที่ 3

2.2.2 Heterofermentative เป็นแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส (hexose) แล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ 20-50 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน phosphoglyconate pathway หรือ phosphoketolase pathway ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *L. plantarum*, *L. casei*, *L. fermentum* และ *L. brevis*

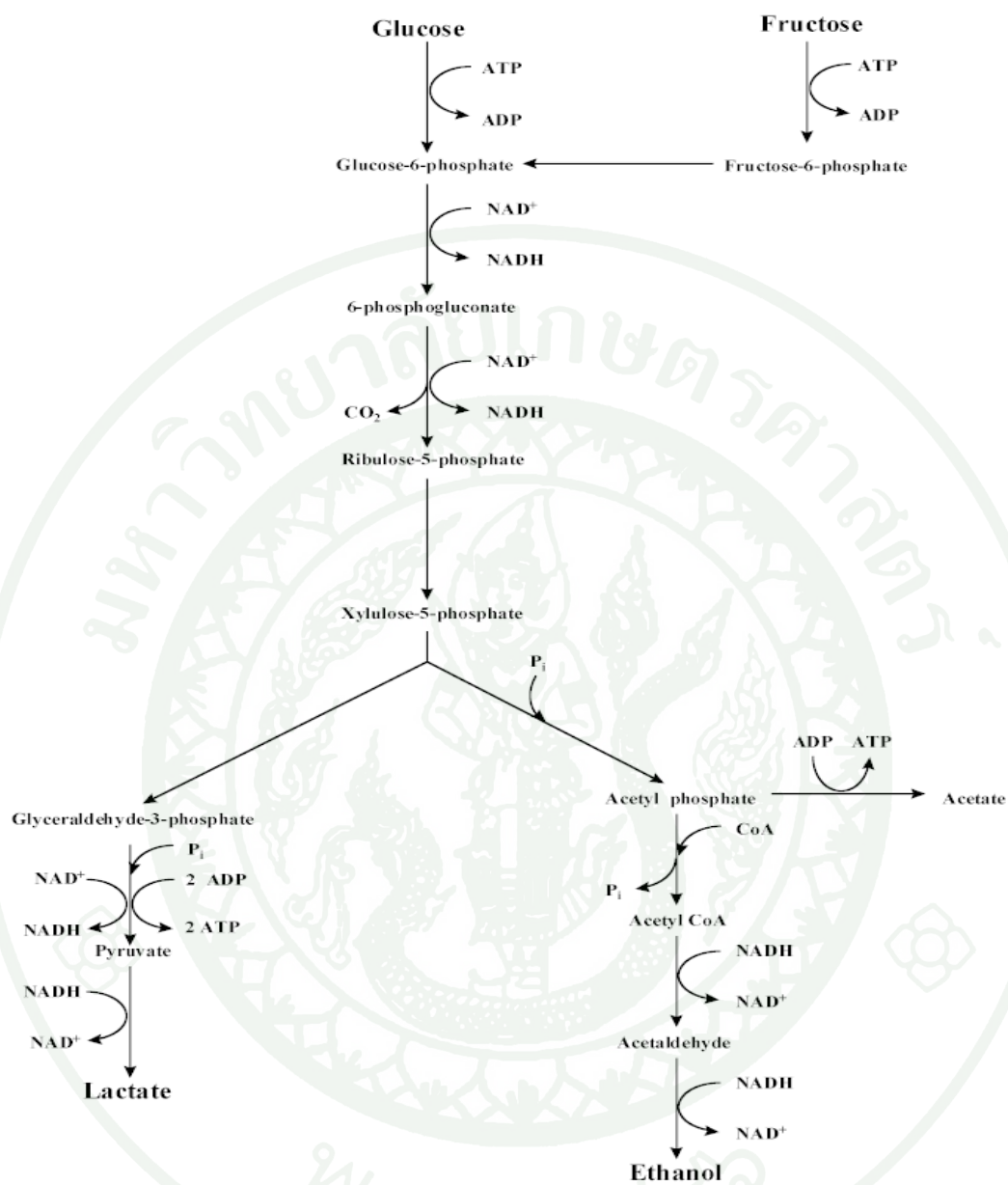
กระบวนการหมักเริ่มจากกลูโคสที่มีคาร์บอน 6 อะตอมเปลี่ยนเป็นเพนโทส(ไรโบส) ซึ่งมีคาร์บอน 5 อะตอม โดยการจัดโครงสร้างภายในโมเลกุลที่มีการออกซิเดชัน (oxidation) และดีคาร์บอกซิเลชัน (decarboxylation) รวมด้วย น้ำตาลที่มีคาร์บอน 5 อะตอมถูกทำให้แตกออกเป็นกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟต ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีคาร์บอน 3 อะตอม และอะซิลฟอสเฟต (acetyl phosphate) โดยเอนไซม์ฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase enzyme) กลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟต (glyceraldehyde phosphate) จะเปลี่ยนไปเป็นแลคเตท (lactate) เช่นเดียวกับการเกิดไกลโคไลซิสในการหมักแบบ Homofermentative แต่เนื่องจากการหมักแบบ Heterofermentative มีกลีเซอรัลดีไฮด์ฟอสเฟตเพียง 1 โมเลกุลจึงเกิด ATP 1 โมเลกุล ดังแสดงในภาพที่ 4

กระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียกรดแลกติกในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าแบคทีเรียกรดแลกติกกลุ่ม Homofermentative lactic acid bacteria สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากกว่ากลุ่ม Heterofermentative lactic acid bacteria เมื่อใช้กลูโคสและฟรุกโตสเป็นสารตั้งต้น (substrate) ประมาณ 2 เท่าตัว (ตารางที่ 3)



ภาพที่ 3 กระบวนการเมตาบอลิซึมโดยอาศัยกลูโคสและฟรุกโตสของ homofermentative lactic acid bacteria โดย glycolysis pathway

ที่มา: Woolford (1985)



ภาพที่ 4 กระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคสและฟรุกโตสของ heterofermentative lactic acid bacteria โดย phosphoketolase pathway

ที่มา: Woolford (1985)

ตารางที่ 3 ผลผลิตที่ได้จากการใช้น้ำตาลและกรดอินทรีย์ในการหมักของแบคทีเรียกลุ่มต่างๆแสดง
ในรูปของโมลาร์

Substrate	Products	Comments
1 glucose	2 lactic acid	Homofermentation
1 fructose	2 lactic acid	Homofermentation
1 glucose	1 lactic acid, 1 acetic acid, 1 carbon dioxide	Heterofermentation
1 glucose	1 lactic acid, 1 ethanol, 1 carbon dioxide	Heterofermentation
3 fructose	1 lactic acid, 1 acetic acid, 1 carbon dioxide, 2 mannitol	Heterofermentation
1 xylose	1 lactic acid, 1 acetic acid	Homo and Hetero
2 citrate	3 lactic acid, 1 acetic acid, 3 carbon dioxide	Homo and Hetero
2 citrate	2 acetic acid, 4 carbon dioxide, 1 2,3-butanediol	Homo and Hetero
1 malate	1 lactic acid, 1 carbon dioxide	Homo and Hetero

ที่มา : Muck (1991)

แบคทีเรียวงศ์ *Lactobacillaceae* มีอยู่เพียง 1 จินัส คือ *Lactobacillus* เซลล์มีรูปร่างเป็น
ท่อน แต่บางครั้งอาจโค้งงอ ปรากฏเป็นเซลล์เดี่ยวหรือต่อเป็นลูกโซ่ ดิคลีแกรมบวก ไม่ต้องการก๊าซ
ออกซิเจน ถึงแม้ว่าการกักออกซิเจนเพื่อการเจริญเติบโต ได้พลังงานจากการออกซิไดส์สารเคมี
และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ต้องการสารประกอบเฉพาะหลายอย่างเพื่อการเจริญเติบโต
(สุพจน์, 2545) *Lactobacillus* เจริญได้ดีในสารอาหารที่มีสภาพเป็นกรดช่วงความเป็นกรดต่าง 5.5-
5.8 เมื่อหมักข่อยน้ำตาลกลูโคสจะให้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก

ปัจจุบันมีการให้ความสนใจในการเติมเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการหมัก เนื่องจากพบว่า การเติมแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการหมักจะช่วยให้การหมักเกิดขึ้นรวดเร็ว จึงมีการนำไปใช้ในพืชอาหารสัตว์ที่ใช้ในการผลิตไซเลจ

3. ไซเลจ (Silage)

พืชทุกชนิดสามารถนำมาหมักได้ แต่การทำไซเลจที่มีคุณภาพต้องทำให้สารอาหารในพืช ถูกใช้ไปโดยจุลินทรีย์น้อยที่สุด คือต้องการทำให้พืชหมักหยุดกระบวนการ โดยเร็วที่สุดโดยดึง ความเป็นกรด-ด่างของพืชหมักลงต่ำโดยเร็ว สารอาหารที่ทำให้เกิดกรดคือ น้ำตาล ดังนั้นพืชที่นำมา หมักต้องมีน้ำตาลหรือแป้งในลำต้นสูง เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ส่วนพืชตระกูลถั่วมีโปรตีนสูงกว่า หญ้าแต่ปริมาณน้ำตาลต่ำ จึงควรทำให้พืชหมักผสมระหว่างถั่วกับหญ้าเพื่อถั่วจะเป็นแหล่งโปรตีน ส่วนหญ้าเป็นแหล่งให้น้ำตาลทำให้ได้พืชหมักคุณภาพดีมีโปรตีนสูง สำหรับพืชที่น้ำตาลต่ำไม่ เพียงพอ อาจใช้วิธีเสริมกากน้ำตาลลงไปในขณะที่ทำการหมักได้

จุลินทรีย์ที่ทำให้คุณภาพของไซเลจสูงขึ้นที่สำคัญคือ *Lactobacillus* ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ที่ช่วย รักษาคุณภาพของไซเลจ โดยจะเปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลคติก และกรดอะซิติก ซึ่งปริมาณกรด ทั้ง 2 จะทำให้ความเป็นกรดของไซเลจสูงขึ้น ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจนถึง 4 หรือต่ำกว่า แต่มี บางรายงานพบว่าสายพันธุ์ที่ใช้ อาจไม่เหมาะสมกับพืชทุกชนิดหรือทุกสภาพแวดล้อมจึงมี การศึกษาการคัดเลือกเชื้อที่เหมาะสมกับสภาพแวดล้อม โดยธรรมชาติจะมีจุลินทรีย์หลายชนิดอยู่ ในพืช แต่กลุ่มที่มีความสำคัญต่อการหมักคือพวกแบคทีเรียกรดแลคติก

3.1 ความหมายของไซเลจ

ไซเลจ คือพืชอาหารสัตว์หมักโดยใช้วัตถุดิบเริ่มต้นที่มีความชื้นสูง (McDonald *et al.*, 1991) เกิดกระบวนการหมักภายใต้สภาวะไร้อากาศของจุลินทรีย์กลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติกซึ่ง สามารถใช้น้ำตาลในวัตถุดิบได้ทำให้เกิดกรดแลคติกในปริมาณสูงเป็นผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลง ซึ่งจะไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ปนเปื้อนต่างๆ ที่เป็นสาเหตุของการเน่าเสียของพืช อาหารสัตว์หมัก (สุพรรณิการ์, 2544) ลักษณะไซเลจที่ดีควรมีค่าความเป็นกรด-ด่างประมาณ 4.2 ปริมาณกรดแลคติก 3-13 เปอร์เซ็นต์ กรดบิวทิริกควรมีน้อยกว่า 0.2 เปอร์เซ็นต์และปริมาณ

ไนโตรเจนในรูปของแอมโมเนียไม่เกิน 11 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณไนโตรเจนทั้งหมด (อำนาจ, 2540) วัตถุประสงค์ของการหมักพืชวัตถุดิบคือการเก็บรักษาพืชอาหารสัตว์ให้มีคุณค่าทางอาหารใกล้เคียงกับพืชอาหารสด การเก็บไซเลจจำเป็นต้องมีการจัดการที่ดี เพื่อลดการเน่าเสียและรักษาคุณค่าทางโภชนาการให้ใกล้เคียงกับพืชอาหารสดมากที่สุด

ไซเลจ คือ อาหารสัตว์ที่มีวัตถุดิบแห้งประมาณ 200 กรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเพียงพอในการเก็บรักษาไว้ในสภาพที่ไม่มีอากาศโดยกระบวนการหมักของกลุ่มแบคทีเรียกรดแลคติก เป็นผลทำให้ระดับความเป็นกรดต่างของไซเลจลดต่ำลงในระดับที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ทำให้หลีกเลี่ยงจากการเน่าเสียที่เกิดจากจุลินทรีย์ทั้งพวกที่ต้องการอากาศและไม่ต้องการอากาศในการเจริญได้ (Muck, 1991)

ไซเลจ หมายถึง พืชอาหารสัตว์ต่าง ๆ เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง หญ้า และถั่วต่างๆ ที่เกี่ยวข้องในขณะที่มีความชื้นพอเหมาะ แล้วนำมาหมักเก็บไว้ในสภาพไร้อากาศ (anaerobic condition) พืชอาหารสัตว์เหล่านี้ได้เปลี่ยนสภาพเป็นไซเลจแล้วจะสามารถอยู่ได้เป็นเวลานานโดยคุณค่าทางอาหารไม่เปลี่ยนแปลง พบว่าสิ่งที่ทำให้ไซเลจมีสภาพคงที่ คือ กรดแลคติก (สายัณห์, 2540) ซึ่งเกิดจากการทำงานของแบคทีเรียกรดแลคติก (Lactic acid bacteria -LAB) ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (Water soluble carbohydrate-WSC) ที่มีในพืช ได้ผลิตเป็นกรดแลคติก ส่งผลให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ลดลง หยุดกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้น มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นประโยชน์หรือที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อไซเลจ ทำให้สภาพของไซเลจคงที่ ซึ่งจะช้าหรือเร็ว ขึ้นขึ้นอยู่กับปริมาณของแบคทีเรียกรดแลคติก ดังนั้นจึงได้มีการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกชนิดต่างๆ ลงไปในการทำไซเลจ เพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อชนิดนี้ให้มีความคงตัวตั้งแต่เริ่มกระบวนการหมักซึ่งจะช่วยให้เกิดกรดแลคติกได้เร็วขึ้น ไซเลจก็จะมีสภาพคงที่เร็วด้วย เป็นการลดการสูญเสียโภชนาการที่เป็นประโยชน์และทำให้ไซเลจมีคุณภาพดีขึ้น

3.2 การใช้สารเสริมในไซเลจ แบ่งได้ดังนี้

3.2.1 สารช่วยยกระตุ้นหรือเร่ง (Stimulants) ตัวอย่างของสารที่ช่วยกระตุ้นให้กระบวนการหมักไซเลจเกิดได้อย่างรวดเร็ว อาทิเช่น การเติมแบคทีเรีย, การใช้เอนไซม์, เติมนสาร substrates

3.2.2 สารยับยั้ง (Inhibitors) การเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ในไซเลจที่มีผลเสียต่อกระบวนการ สารที่ใส่เพื่อป้องกันการเน่าของไซเลจเมื่อสัมผัสกับอากาศ (aerobic deterioration inhibitors) ได้แก่ กรดโพรปิโอนิกและแอมโมเนีย

3.2.3 สารที่ใส่ในไซเลจเพื่อเพิ่มคุณค่าทางอาหาร (nutrients value) ได้แก่ ยูเรีย และกากน้ำตาล

Lindsey and Kung (2010) ศึกษาผลของการรวม *Lactobacillus buchneri* 40788 กับแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ต่อความเสถียรของการหมักคอร์นไซเลจในสภาพใช้อากาศเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของการเติม *L. buchneri* 40788 กับแบคทีเรียกรดแลคติก 3 สายพันธุ์ต่อการหมัก ความเสถียรต่อสภาพใช้อากาศ และคุณค่าสารอาหารของคอร์นไซเลจ ด้วย *L. buchneri* 40788 เทียบกับ *L. plantarum*, *Pediococcus acidilactici* และ *Pediococcus pentosaceus* การใส่หัวเชื้อจะทำให้ความเข้มข้นของกรดอะซิติกและ 1,2-propanediol แต่จะลดความเข้มข้นของกรดแลคติก คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำและเอธานอล การเติม *L. buchneri* 40788 เพื่อปรับปรุงความเสถียรต่อสภาพใช้อากาศของคอร์นไซเลจและการรวมกับสายพันธุ์ *L. plantarum*, *P. acidilactici* ถูกใช้ในการศึกษานี้เพื่อเป็นผลประโยชน์ต่อคุณภาพไซเลจอื่นๆ

สารเคมีและสารชีวภาพหลายชนิดถูกใช้เสริมในไซเลจ เพื่อช่วยลดจำนวนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการระหว่างการหมัก ปัจจุบันมีจุลินทรีย์ทางการค้าหลายชนิดที่ช่วยปรับปรุงคุณค่าทางโภชนาการและองค์ประกอบทางเคมีของไซเลจ ส่งผลต่อการเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์เคี้ยว (Wilkins, 1996) รายงานว่าจุลินทรีย์ที่เสริมลงไปในไซเลจมีผลสำคัญ 3 ประการคือ

ก. ผลต่อกระบวนการหมักได้แก่การเพิ่มอัตราการหมักและการเปลี่ยนแปลงของผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากการหมัก ถ้าหากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นจุลินทรีย์หลักของกระบวนการหมักการเติบโตของแบคทีเรียกรดแลคติกจะทำให้ความเป็นกรด-ด่างของไซเลจลดลงโดยเร็ว ความเข้มข้นของกรดแลคติกจะเพิ่มขึ้น กระบวนการหมักจะยุติโดยเร็วเนื่องจากกรดแลคติกเป็นกรดที่มีความแรงมากกว่ากรดอะซิติก ดังนั้นจึงทำให้ความเป็นกรด-ด่างลดลงโดยเร็ว นอกจากนี้ความสำเร็จของการใช้หัวเชื้อ จุลินทรีย์ในการหมักไซเลจ ควรทำให้ความเป็นกรด-ด่างสุดท้ายลดต่ำลงเนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติก สามารถเจริญได้ในสภาวะที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำ ดังนั้นกระบวนการหมักจึง

ดำเนินการต่อไปได้ อย่างไรก็ตามแม้ว่ากระบวนการหมักในสภาวะนี้จะถูกจำกัดโดยน้ำตาล แต่การเปลี่ยนแปลงจากกรดอะซิติกไปเป็นกรดแลคติกก็จะทำให้ความเป็นกรด-ด่างต่ำลงได้

ข. ผลต่อคุณภาพของไซเลจ โดยทำให้วัตถุดิบแห้ง (dry matter; DM) และพลังงานของไซเลจสูงขึ้น เนื่องจากการหมักชนิด homofermentative โดยทั่วไปวัตถุดิบแห้งจากกระบวนการหมักที่ใช้เชื้อจุลินทรีย์จะมีค่ามากกว่าการหมักโดยไม่ใช้เชื้อประมาณ 1-3 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้หัวเชื้อจุลินทรีย์ยังทำให้ความเป็นกรด-ด่างของไซเลจลดลงอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นการป้องกันการสูญเสียโปรตีนที่แท้จริง (true protein) เพราะแบคทีเรียกรดแลคติกเติบโตได้โดยไม่ต้องใช้กรดอะมิโน ทำให้ความเข้มข้นของแอมโมเนียต่ำลง และจากการที่ความเป็นกรด-ด่างลดลงอย่างรวดเร็วนี้ จะส่งผลให้เอนไซม์ที่ย่อยสลายเฮมิเซลลูโลสลดลง ในขณะที่ทำให้เกิด acid hydrolysis ของเฮมิเซลลูโลสขึ้นซึ่งมีผลเสียต่อไซเลจน้อยกว่าการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

นอกจากนี้เชื้อจุลินทรีย์ชนิด homofermentative จะทำให้จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนในไซเลจถูกยับยั้งโดยกรดไขมันระเหยง่าย (volatile fatty acid; VFA) และระดับของการยับยั้งจะสูงขึ้นเมื่อความเป็นกรด-ด่างยิ่งต่ำลง อีกทั้งจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดการสูญเสียของไซเลจเจริญเติบโตโดยใช้น้ำตาลมากกว่าผลิตภัณฑ์จากการหมัก ดังนั้น เมื่อมีการใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ก็จะทำให้น้ำตาลเหลืออยู่น้อย จุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจนหรือจุลินทรีย์ที่ทำให้ไซเลจสูญเสียอื่นๆ ก็จะเจริญได้น้อย

ค. ผลต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์ การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักไซเลจควรมีผลในทางบวกต่อการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์ เนื่องจากจุลินทรีย์เหล่านี้ นอกจากจะมีบทบาทสำคัญในการผลิตกรดแลคติกเพื่อรักษาคุณภาพของไซเลจแล้วยังช่วยเพิ่มการย่อยได้ของโภชนาณอีกด้วย นอกจากนี้ผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการหมัก เช่น กรดแลคติก กรดอะซิติก และเอทานอล ยังถูกจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนของสัตว์ใช้ประโยชน์ได้ดี โดยเฉพาะกรดแลคติกซึ่งต่อมากจุลินทรีย์ในกระเพาะนี้จะถูกจับเป็นแหล่งโปรตีนในระบบทางเดินอาหารส่วนหลังของสัตว์ และถูกย่อยนำไปใช้ประโยชน์ต่อไป การใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการหมักไซเลจยังทำให้เกิดการยับยั้งการสร้างสารพิษ ซึ่งเป็นผลดีต่อระบบนิเวศภายในกระเพาะรูเมน จึงส่งผลให้สัตว์เจริญเติบโตและให้ผลผลิตได้ดีขึ้น

Hill *et al.*, 2001 ศึกษาผลของการใช้ *Streptomyces achromogenes* ISP 5028 ต่อคุณภาพของไซเลจจากหญ้าไรน์ โดยใช้อัตราส่วนของเชื้อ 2×10^5 สปอร์ต่อกรัมของพืชอาหารสัตว์ หมักในถุงพลาสติกขนาดบรรจุ 10 กิโลกรัม ตรวจสอบคุณภาพเมื่อทำการหมักได้ 0, 1, 2, 3, 5, 10, 30 และ 60 วัน พบว่าปริมาณกรดแลกติกเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วในช่วง 3-5 วันในไซเลจที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังพบว่าระดับกรดแลกติกไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อตรวจสอบที่อายุการหมัก 60 วัน สำหรับกรดไขมันระเหยง่ายอื่นๆ ที่บ่งบอกถึงคุณภาพด้านกลิ่น พบว่าไซเลจที่หมักด้วยเชื้อจุลินทรีย์มีปริมาณมากกว่าไซเลจที่ไม่ได้หมักด้วยเชื้ออย่างชัดเจน ในขณะที่คุณค่าทางโภชนาบางชนิดของพืชอาหารหมักมีแนวโน้มดีขึ้น

เสมอใจ (2551) ศึกษาการใช้แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีในน้ำพืชหมักเป็นสารเสริมในหญ้าหมักเขตร้อน โดยใช้สารเสริม คือ น้ำพืชหมัก 1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) กากน้ำตาล 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และมันเส้นบด 5 เปอร์เซ็นต์ (w/w) และกลุ่มที่ไม่ใช้สารเสริมใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ 1 เปอร์เซ็นต์ (w/w) ตรวจสอบคุณภาพและคุณค่าทางโภชนาใน วันที่ 2, 4, 7, 14, 21 และ 45 ของการหมัก พบว่าจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกในหญ้าหมักทุกชนิดเพิ่มจำนวนขึ้นในสองวันแรกของการหมัก และหลังจากนั้นมีจำนวนลดลงเรื่อยๆ จนถึงช่วงสุดท้ายของการหมัก ค่าความเป็นกรด-ด่างของหญ้าหมักที่เสริมด้วยน้ำพืชหมักลดลงอย่างรวดเร็วและมีค่าลดลงต่ำสุดภายใน 7 วัน หญ้าหมักที่ใช้น้ำพืชหมักเป็นสารเสริม พบว่า กรดแลกติกมีปริมาณคงที่ตั้งแต่วันที่ 14 จนกระทั่งถึงวันสุดท้ายของการหมัก ในวันสุดท้ายของการหมัก หญ้าหมักที่ไม่ใช้สารเสริมมีค่า pH และปริมาณกรดบิวทริกที่สูงกว่าหญ้าหมักกลุ่มที่ใช้สารเสริม ปริมาณ NDF และ ADF ของหญ้าหมักที่เสริมด้วยมันเส้นบดสูงกว่าชนิดอื่นๆ

กฤติกา (2551) ศึกษาชนิดแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกในกากมันสำปะหลังหมักและผลการใช้กากมันสำปะหลังหมักเป็นสารเสริมชีวนะสำหรับลูกสุกรหย่านม โดยการหมักกากมันสำปะหลังสดในสภาพไร้ออกซิเจนเป็นเวลา 3 วัน ทำให้ปริมาณแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกและยีสต์เพิ่มสูงขึ้นจาก 2.2×10^6 CFU/g และ 2.6×10^7 CFU/g เป็น 8.7×10^6 CFU/g และ 3.5×10^7 CFU/g ตามลำดับ แต่ไม่พบ *E.coli* ทั้งในกากมันสำปะหลังสดและกากมันสำปะหลังหมัก และเมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้จากกากมันสำปะหลังหมักมาตรวจสอบชนิดแบคทีเรียผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการทางชีวเคมี สามารถจำแนกแบคทีเรียได้ดังนี้ คือ *Lactobacillus plantarum*, *L. amylophilus*, *L. manihottivorans*, *Bacillus stearothermophilus*, *B. licheniformis*, *B. laterosporus*, *B. pumilus*, *Leuconostoc pseudomesenteroides*, *Leuconostoc mesenteroides* และ *Streptococcus uberis*

การใช้กรรมวิธีทางเทคนิคต่อโภชนศาสตร์สัตว์เคี้ยวเอื้อง อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้องที่สำคัญ คือ ความสามารถในการย่อยได้ของพืชอาหารสัตว์และปริมาณการกินได้อย่างอิสระ มีการใช้เทคโนโลยีชีวภาพในการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง แสดงดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ตัวอย่างศักยภาพของการปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะของอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง โดยอาศัย กระบวนการเทคโนโลยีชีวภาพ

ชนิด	จุดมุ่งหมายการปรับปรุง	กรรมวิธีที่ใช้
ธัญพืช	เพิ่มคุณภาพของโปรตีน	ปรับปรุงกรรมพันธุ์ของเมล็ด เสริมด้วยกรดอะมิโนที่ขาด
พืชตระกูลถั่ว	กำจัดสารประกอบที่ไม่ต้องการหรือเป็นพิษ เช่น ไนยาโนเจนส์, trypsin inhibitor	ใช้เชื้อจุลินทรีย์ วิศวกรรมพันธุศาสตร์
พืชอาหารสัตว์ที่ผ่านการถนอมอาหารเช่นอาหารหมัก	ปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะของผลผลิต	การใช้เชื้อจุลินทรีย์ที่เติมลงไป ในช่วงการหมักร่วมกับน้ำย่อย
อาหารหยาบ	เพิ่มความเป็นประโยชน์ของคาร์โบไฮเดรตโครงสร้างเพื่อให้ย่อยได้ง่ายขึ้นและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น	การใช้เชื้อจุลินทรีย์และน้ำย่อย ในขบวนการก่อนการนำไปเลี้ยงสัตว์

ที่มา: พันทิพา (2547)

3.3 ลักษณะที่ดีของไซเลจ ควรมีลักษณะ ดังนี้

3.3.1 สี ไซเลจที่ดีควรมีสีเขียวแกมเหลือง ถ้าปรากฏเป็นสีน้ำตาลไหม้หรือดำแสดงว่าเกิดความร้อนมากเกินไปในขณะหมัก ทำให้สารอินทรีย์สลายตัวเป็นการสูญเสีย ซึ่งถ้าไซเลจเป็นสีดำไม่ควรนำไปใช้เลี้ยงสัตว์

3.3.2 กลิ่น ไซเลจที่ดีจะมีกลิ่นหอมเปรี้ยวอ่อนๆ คล้ายผลไม้ดอง

3.3.3 เนื้อไซเลจ จะต้องไม่เป็นเมือก ไม่ละ เอมมือเนื้อไม่หลุดออก ไม่มีราหรือส่วนที่บูดเน่าถ้ามีสีขาวๆ เป็นเส้นกระจายบนไซเลจ แสดงว่าเกิดรา

3.3.4 ความชื้น ควรอยู่ระหว่าง 65-70 เปอร์เซ็นต์ หากมีความชื้นสูงกว่านี้พืชหมักจะเปรี้ยวมากและเกิดการสูญเสียโภชนาการออกมากับของเหลว ทดสอบโดยบีบไซเลจด้วยมือ ถ้ามีน้ำเหลวๆ ไหลออกมาแสดงว่า มีความชื้นมากเกินไป ถ้าความชื้นน้อยเกินไปทำให้แบคทีเรียที่สร้างกรด แลคติกลดลง ทำให้ไซเลจเสียได้ง่าย

3.3.5 ความเป็นกรด ควรมีค่าความเป็นกรดอยู่ระหว่าง 3.5-4.2 โดยมีกรดแลคติกอยู่มากกรดอะซิติกเป็นส่วนน้อย และไม่ควรมีการคั่วหรือให้มันน้อยที่สุด ไซเลจที่ดีไม่ควรเปรี้ยวจัดเกินไป ไซเลจที่มีคุณภาพดีควรมีสัดส่วนของกรดต่างๆ ดังนี้กรดแลคติก 1.5-2.5 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 0.5-0.8 เปอร์เซ็นต์ กรดบิวทิริกน้อยกว่า 0.1 เปอร์เซ็นต์

การศึกษาการเพิ่มคุณภาพของไซเลจโดยใช้แหล่งของคาร์โบไฮเดรตจากแหล่งต่างๆ เช่น น้ำตาล กากน้ำตาล ธัญพืช และมันสำปะหลังเป็นสารเสริม ซึ่งจากหลายงานทดลองพบว่า มีการเพิ่มขึ้นของแหล่งอาหารของจุลินทรีย์ในหลุมหมัก (silo) โดยมีการใช้ประโยชน์จากคาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water-soluble carbohydrate, WSC) ที่ได้จากแหล่งคาร์โบไฮเดรตที่เสริมเข้าไปของจุลินทรีย์กลุ่มผลิตกรดแลคติก (lactic acid bacteria, LAB) ทำให้มีการขยายจำนวนได้ดีขึ้นส่งผลทำให้มีการผลิตกรดแลคติกเพิ่มมากขึ้นทำให้ค่าความเป็นกรด-ด่าง ภายในหลุมหมัก (silo) ลดลง ซึ่งเมื่อความเป็นกรด-ด่าง ต่ำกว่า 4.2 จุลินทรีย์ต่างๆ จะไม่สามารถเจริญได้ รวมทั้งเอนไซม์ต่างๆ ของพืชก็จะหยุดกิจกรรมด้วย ทำให้คุณภาพของไซเลจคงที่ตลอดไป การเสริมแหล่งของคาร์โบไฮเดรตร่วมกับไซเลจมีผลทำให้คุณภาพของไซเลจดีขึ้น เช่น สี กลิ่น ปริมาณกรดในพืช

อาหารสัตว์หมัก และปริมาณการย่อยได้ของวัตถุแห้งมีค่าเพิ่มขึ้นของพืชหมักที่เสริมแหล่งคาร์โบไฮเดรตเมื่อเปรียบเทียบกับพืชที่ไม่ได้เสริม

Stokes (1992) ศึกษาผลของการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกต่อคุณค่าทางโภชนาของไซเลจที่ได้โดยแบคทีเรียกรดแลคติกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ *L. plantarum*, *L. brevis*, *P. acidilactici*, *S. diacetylactis* และ *S. cremoris* ปริมาณที่ใช้ 1.76×10^7 cfu/ตันของพืชวัตถุดิบสด โดยพืชวัตถุดิบที่ใช้ทดลองคือหญ้าและถั่วในอัตราส่วน 50:50 ทำการหมักเป็นเวลา 90 วัน พบว่าค่าความเป็นกรด-ด่างลดลง ปริมาณกรดแลคติกเพิ่มขึ้น และมีปริมาณกรดอะซิติกลดลงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม การที่ปริมาณกรดอะซิติกลดลงส่งผลโดยตรงต่อกลิ่นรสของไซเลจเนื่องจากกลิ่นของกรดอะซิติกทำให้ภาวการณ์บริโภคของสัตว์ลดลง การใช้ล้าเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกพบว่าเชื้อยีสลดลง และมีปริมาณโปรตีนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม (ตารางที่ 5)

3.4 ปัจจัยที่ควบคุมคุณภาพของไซเลจ

ในการทำไซเลจ มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อ และมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงส่วนประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพต่างๆ ของพืชสดเมื่อทำการเป็นพืชหมัก ปัจจัยต่างๆที่จะกล่าวถึงมีผลต่อระดับคุณภาพของไซเลจจากผลผลิตที่ได้จากการหมัก แสดงดังตารางที่ 6 ดังนั้นเพื่อให้ได้พืชหมักที่มีคุณภาพสูงจะต้องคำนึงถึงปัจจัยดังต่อไปนี้

3.4.1 ชนิดของพืชที่เหมาะสมในการทำหญ้าหมักควรเลือกพืชที่มีเปอร์เซ็นต์แป้งหรือน้ำตาลสูงพอสมควรเพื่อเป็นอาหารให้แบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติกเจริญโดยเร็ว เป็นการป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์พวกอื่นที่ทำให้รสและกลิ่นของพืชหมักด้อยคุณภาพเจริญเติบโตได้ทัน ลักษณะของต้นพืชควรมีลำต้นเพื่อลดช่องอากาศภายในให้น้อยที่สุด ถ้าใช้พืชที่มีลำต้นกลวงทำพืชหมักจะต้องพยายามทำให้ปล้องแตกและอัดให้แน่นเพื่อไล่อากาศออกให้มากที่สุด อีกประการหนึ่งควรเลือกพืชที่ให้ผลผลิตต่อไร่สูง เช่น ข้าวโพด ข้าวฟ่าง ซึ่งมีคุณภาพดังกล่าวแล้ว และเป็นที่ยอมรับใช้ทำพืชหมักมากกว่าพืชชนิดอื่น แต่ก็มีหญ้าหลายชนิดด้วยที่สามารถนำมาทำไซเลจได้ เช่น หญ้ารูซี่ หญ้ากินนีสีม่วง หญ้าเนเปียร์ เศษเหลือจากการผลิตข้าวโพดฝักอ่อนก็สามารถนำมาทำไซเลจได้นอกจากนี้ยังสามารถนำถั่วอาหารคุณภาพดี เช่น ถั่วคาวาลเคด ถั่วท่าพระสไตโด มาหมักร่วมกับหญ้าได้ ซึ่งจะช่วยให้คุณค่าทางอาหารของไซเลจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากพืชตระกูลถั่วมีโปรตีนสูงกว่าหญ้า

ตารางที่ 5 คุณค่าทางโภชนาและสมบัติทางเคมีบางประการของไซเลจที่มีการใช้และไม่ใช้กล้วย
เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

คุณค่าทางโภชนาและ คุณสมบัติทางเคมี	ไซเลจที่ไม่มีการใช้แบคทีเรีย	ไซเลจที่มีการใช้แบคทีเรีย
	กรดแลคติก	กรดแลคติก
DM, % fresh weight	30.7	32.22
pH	4.25	4.06
Titrable acidity	86.34	78.10
meq NaOH/100 g of DM		
Buffering capacity,	97.05	75.10
meq NaOH/100 g of DM		
Water soluble carbohydrate	5.40	5.64
NDF	49.49	49.31
ADF	33.84	32.66
Cellulose	28.66	28.38
Hemicellulose	15.64	16.65
Crude protein	15.81	16.12
Lactic acid	9.71	10.92
Acetic acid	1.92	1.41
Lactate : Acetate ratio	6.16	7.74
Ammonia N, %	8.72	10.74

ที่มา : Stokes (1992)

ตารางที่ 6 การประเมินระดับคุณภาพของไซเลจจากผลผลิตที่ได้จากการหมัก

ผลผลิตที่เกิดจากการหมัก	ระดับคุณภาพไซเลจ		
	ดี	ปานกลาง	ต่ำ
ความเป็นกรด-ด่างของพืชหมัก			
มีความชื้นต่ำกว่า 65%	น้อยกว่า 4.8	น้อยกว่า 5.2	มากกว่า 5.2
มีความชื้นมากกว่า 65%	น้อยกว่า 4.2	น้อยกว่า 4.5	มากกว่า 4.8
กรดแลกติก,%	3-14	แปรปรวน	แปรปรวน
กรดบิวทีริก,%	0.2	0.2-0.5	มากกว่า 0.5
สัดส่วนของกรดทั้งหมด,%			
กรดแลกติก	มากกว่า 60	40-60	ต่ำกว่า 40
กรดอะซิติก	ต่ำกว่า 25	25-40	มากกว่า 40
กรดบิวทีริก	น้อยกว่า 5	5-10	มากกว่า 10
แอมโมเนียในโตรเจน(%ในโตรเจนทั้งหมด)	น้อยกว่า 10	10-16	มากกว่า 16

ที่มา: ดัดแปลงจาก Bjorge (1996)

3.4.2 เวลาในการตัดพืชมาทำไซเลจ หมายถึง อายุของพืชที่เหมาะสมไม่แก่และไม่อ่อนจนเกินไปโดยตัดในช่วงที่พืชให้ผลผลิตสูง พร้อมทั้งยังมีคุณค่าทางอาหารเพียงพอทั้งโปรตีน แร่ธาตุ และวิตามิน ตัวอย่างเช่น ข้าวโพด ควรจะตัดทำพืชหมักในระยะเมล็ดกำลังเป็นน้ำนม และก่อนที่จะเริ่มแข็งตัวถ้าเป็นข้าวฟ่างควรตัดเมื่อใกล้จะมีดอกอายุประมาณ 10-11 สัปดาห์ จนถึงระยะติดเมล็ดอ่อนๆ สำหรับหญ้าอื่นๆ ควรตัดในระยะเริ่มออกดอก อายุของหญ้าที่จะตัดทำไซเลจไม่แน่นอน แต่ควรสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้งต้องไม่ต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ และไม่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์

3.4.3 ความยาวของท่อนพืช เนื่องจากไซเลจต้องอยู่ในสภาพสุญญากาศ ดังนั้นการตัดหรือสับพืชให้เป็นชิ้นจะมีผลต่อการอัดแน่นเพื่อไล่อากาศออก ความยาวของท่อนพืชจะเป็นเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดพืช เช่น ถ้าเป็นข้าวโพด ข้าวฟ่าง อาจจะตัดให้ยาวประมาณท่อนละ 1 นิ้ว หรือ 2-3 เซนติเมตร ถ้าเป็นพวงหรีดก็ขึ้นอยู่กับลำต้นว่าอวบมากน้อยแค่ไหน หญ้าหรือพืชที่มีความชื้นน้อย ควรจะหั่นให้สั้นกว่าหญ้าหรือพืชที่มีความชื้นสูง การที่ต้องตัดพืชเป็นท่อนสั้นๆ

นั้น ก็เพื่อที่จะช่วยในการอัดแน่นในถังหมักทำได้ง่ายและทำได้ดียิ่งขึ้น รวมทั้งเพื่อให้ น้ำตาลถูกปล่อยออกมาได้เร็ว ซึ่งจะช่วยให้เกิดกรดแลกติกเร็วขึ้น เป็นผลดีต่อคุณภาพของไซเลจ

3.4.4 ระดับความชื้นที่เหมาะสมในพืชโดยปกติแล้วพืชที่จะนำไปหมักมีความชื้นอยู่ระหว่าง 65-70 เปอร์เซ็นต์ ถ้าพืชแห้งเกินไปจะอัดให้แน่นได้ยาก ทำให้มีอากาศหลงเหลือค้างอยู่มาก เป็นผลให้เกิดเชื้อราได้ง่ายพืชหมักที่มีความชื้นต่ำจะทำให้กิจกรรมของจุลินทรีย์ที่สร้างกรดลดลงด้วยดังนั้นถ้าหากพืชแห้งมากเกินไป อาจแก้ไขโดยพยายามตัดเป็นท่อนสั้น ๆ หรือใช้น้ำพรมก่อนบรรจุลงในหลุมหรือถังหมัก ในทางตรงข้ามถ้าพืชที่นำมาหมักมีความชื้นมากเกินไปโอกาสที่จะทำให้ไซเลจมีคุณภาพลดลงก็มีมากขึ้นอาจทำให้ไซเลจมีลักษณะเป็นเมือกหรือเปรี้ยวจัดเกินไป และจะดึงเอาธาตุอาหารในพืชหมักออกมาด้วย ทำให้สูญเสียกรดและธาตุอาหารที่มีประโยชน์ต่อสัตว์ ดังนั้นถ้าหากพืชมีความชื้นมากเกินไป จำเป็นต้องลดความชื้นลงบ้าง ทำได้โดยการตัดพืชแล้วผึ่งแดดไว้ในแปลงสัก 2-3 ชั่วโมง จะทำให้น้ำลดลงหรือที่ไ้หมัก เพื่อดูดซับความชื้นและเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารและความน่ากินของพืชหมักด้วย

3.4.5 การกำจัดอากาศออกจากหลุมหมัก ในการทำไซเลจมีหลักสำคัญอยู่ที่จะต้องทำให้เกิดกรดแลกติกให้เร็วที่สุดและมากที่สุด เพราะเป็นกรดที่รักษาคุณภาพของพืชหมัก เป็นตัวช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญขยายจำนวนขึ้น ต้นพืชสดเมื่อตัดมาใหม่ๆ เซลล์ของพืชในถังหมัก จะคายคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำและความร้อนออกมา ถ้ายังมีอากาศอยู่ภายหลังเซลล์พืชตายแล้ว พวกเชื้อราและยีสต์จะเจริญขึ้น ทำให้ไซเลจมีคุณภาพไม่ดี ด้วยเหตุนี้จึงต้องพยายามกำจัดอากาศให้ออกจากหลุมหมักมากที่สุด เพื่อที่เมื่อเซลล์พืชตาย เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจน ซึ่งเป็นพวกที่สร้าง กรดอินทรีย์ต่าง ๆ เจริญขยายจำนวนช่วยให้พืชอยู่ในรูปของพืชหมัก ฉะนั้น การอัดพืชให้แน่นและการปิดให้มิดชิด จึงมีความจำเป็นในการทำไซเลจอย่างมาก

3.4.6 การใช้สารช่วยหมัก เพื่อเร่งการหมักให้เกิดเร็วขึ้น ทำให้ไซเลจมีคุณภาพดีขึ้น (Woolford,1995) สารช่วยหมัก เป็นพวกสารหรือวัตถุอื่นที่ใส่เพิ่มคุณภาพของไซเลจหรือรักษาไซเลจให้อยู่ในสภาพหมักดอง นอกจากปัจจัยต่างๆ ที่กล่าวแล้ว การที่จะทำให้เกิดกรดแลกติกเร็วและมากนั้นพืชหรือหญ้าที่จะนำมาทำไซเลจจะต้องมีระดับน้ำตาลที่เพียงพอถ้าหากว่าพืชขาดคุณสมบัติข้อนี้ ควรเติมสารช่วยหมัก เช่น กากน้ำตาล เอนไซม์ และเชื้อจุลินทรีย์

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. กากถั่วเหลืองดิบ

ได้รับความอนุเคราะห์จากโรงงานนมถั่วเหลืองไวตามิ้ลค์ บริษัทกรีนสปอต จำกัด

2. จุลินทรีย์

โดยคัดแยกจากกากถั่วเหลือง และเก็บรักษาเซลล์ไว้ในอาหารเหลว MRS ที่มีสารละลายกลีเซอรอลที่ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสเพื่อเป็น stock culture ถ่ายเชื้อจาก stock culture ปริมาตร 5 เปอร์เซ็นต์ (v/v) ลงในอาหารเหลว MRS ปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยถ่ายเชื้อ 2 ครั้งเพื่อเป็น working stock

3. อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี (ภาคผนวก ก)

4. เครื่องมือ

- 4.1 เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง (Horiba รุ่น pH Meter M-11, Japan)
- 4.2 หม้อนึ่งความดัน (Hirayama, Japan)
- 4.3 เครื่องชั่งละเอียด 4 ตำแหน่ง (Satorius, Germany)
- 4.4 ตู้เป็ยเชื้อ (microflow biological safety cabinet)
- 4.5 ตู้บ่มเชื้อ (low temperature incubator)
- 4.6 Vortex mixer (Genie, Scientific Industries, U.S.A)
- 4.7 อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (waterbath)
- 4.8 เครื่องวัดสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (Shimadzu รุ่น UV 120, Japan)
- 4.9 กล้องจุลทรรศน์

- 4.10 ตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
- 4.11 ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส
- 4.12 เครื่องแก้ว

วิธีการ

1. การแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

1.1 การเตรียมตัวอย่าง

ชั่งตัวอย่างกากถั่วเหลือง 10.0 กรัม เติมน้ำละลาย normal saline 90 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันดีโดยการเขย่า จะได้ตัวอย่างที่มีความเจือจาง 1:10 และทำการเจือจางเพิ่มขึ้นครั้งละ 10 เท่าให้ได้ค่าการเจือจางที่เหมาะสม จากนั้นดูดสารละลายตัวอย่างและเจือจางจนได้ความเข้มข้นที่ต้องการปิเปตตัวอย่างเจือจาง 1 มิลลิลิตรลงบนจานเพาะเชื้อความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ และเทอาหารวุ้น MRS ที่มีอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 มิลลิลิตร ลงไปในจานเพาะเชื้อแล้วหมุนจานตามเข็มนาฬิกา 5 รอบ ทวนเข็มนาฬิกา 5 รอบ เคลื่อนจานขึ้นลง 5 ครั้ง เพื่อให้เชื้อผสมและกระจายตัวจนทั่วอาหารเลี้ยงเชื้อและรอจนวุ้นแข็งตัว นำไปบ่มในตู้บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เลือกลโคไลที่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์บรอมครีซอลเพอเพิล (bromocresol purple) จากสีม่วงเป็นสีเหลืองซึ่งแสดงถึงความสามารถที่เชื้อผลิตกรดออกมาได้นำมา streak บนอาหารวุ้น MRS ใหม่ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงเพื่อแยกโคไลเดี่ยว (ทำประมาณ 2 ครั้ง) นำเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ไปศึกษาในขั้นต่อไป

1.2 การหาปริมาณจุลินทรีย์ที่สร้างกรดแลกติกและปริมาณจุลินทรีย์ทั้งหมด

ใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อดูดสารละลายตัวอย่างที่เตรียมได้จากข้อ 1.1 จำนวน 1.0 มิลลิลิตร ใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว โดยใช้ความเข้มข้นละ 3 ซ้ำ จากนั้นเททับด้วยอาหารแข็งสูตร MRS ที่ใส่อินดิเคเตอร์และไม่ใส่อินดิเคเตอร์ ซึ่งผ่านการหลอมไว้ที่อุณหภูมิ 50-55 องศาเซลเซียส ประมาณ 15 มิลลิลิตร เขย่าจนอาหารเลี้ยงเชื้อเบาๆ เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายตัวอย่างผสมกันอย่างทั่วถึง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารแข็งตัว นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับจำนวนโคไลที่เกิดจากการเปลี่ยนสีม่วงเป็นสีเหลือง ในกรณีที่

ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติก และนับจำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมดในอาหารที่ไม่ได้ใส่ อินดิเคเตอร์

1.3 การแยกและการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

หลังจากนับจำนวนแบคทีเรียกรดแลกติกในจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว เลือกเชื้อที่เป็น โคโลนีเดี่ยว และสามารถสร้างกรดได้มาเลี้ยงในอาหารแข็งสูตร MRS บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ทำประมาณ 2 ครั้ง) จากนั้นใช้เข็มเย็บเชื้อเจาะโคโลนีที่อยู่เดี่ยวๆ มาแทง (stap) ลงในหลอดทดลองที่มีอาหารสูตรเดียวกันและมีที่มีแคลเซียมคาร์บอเนต(CaCO_3) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์ ผสมอยู่ นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บเชื้อไว้ในตู้เย็นและทำการถ่ายเชื้อลงสู่อาหารใหม่ทุก 1 เดือน

2. การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีน

นำแบคทีเรียที่ได้มาทำการศึกษากิจกรรมการย่อยโปรตีน (proteolytic activity) โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar (SMA) (Kazanas, 1968) ด้วยวิธีการของปลูกเชื้อแบบจุด (point-inoculation) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน โดยวัดอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีซึ่งมีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนเพื่อทำการศึกษาต่อไป

3. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

นำแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีการย่อยโปรตีนมาศึกษาเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน โดยใช้เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีน นำเชื้อแต่ละไอโซเลตลงใน MRS broth นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาขยายปริมาณให้ได้ปริมาตรที่ต้องการโดยใช้เชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักกากถั่วเหลืองดิบ ใช้กากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักกากถั่วเหลืองดิบ คลุกเคล้าให้ทั่วเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก กากน้ำตาล และกากถั่วเหลืองเข้ากัน แบ่งบรรจุใส่ถุงพลาสติกใส่อากาศ ออกให้มากที่สุด ผูกแล้วนำไปเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไป

วิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ด้วยวิธีดัดแปลงจาก standard AACC (Hamerstrand *et al.*, 1981) (ภาคผนวก ข)

หลักการก็คือจะใช้ สับสเตรทสังเคราะห์ (BAPA : bezoyl-DL-arginine-p-nitroanalide hydrochloride) ซึ่งการวัดปริมาณทริปซินอินฮิบิเตอร์ในตัวอย่างจะใช้สารละลายทริปซินทำปฏิกิริยากับทริปซินอินฮิบิเตอร์ (ตัวยับยั้งทริปซิน) ในตัวอย่างก่อนแล้วจึงใช้ BAPA เป็น substrate ในการวัดปริมาณทริปซินที่เหลือจากการถูกยับยั้งโดยทริปซินที่เหลือจากการถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งจะวัดค่าความแตกต่างด้วยค่าการดูดซับแสงของสารละลายโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

4. การจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลกติกที่คัดเลือกได้

ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา ภายนอก และคุณสมบัติทางชีวเคมีโดยอ้างอิงหลักเกณฑ์ของ Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (Buchanan *et al.*, 1974) และเปรียบเทียบลักษณะสำคัญของแบคทีเรียกรดแลกติกตาม Axelsson (1998) (ภาคผนวก ข) ได้แก่

- 4.1 การตรวจสอบการติดสีแกรม รูปร่างและการจัดเรียงตัว
- 4.2 การตรวจสอบแคตาเลส
- 4.3 การตรวจสอบการสร้างก๊าซ
- 4.4 การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิ 15 และ 45 องศาเซลเซียส
- 4.5 การทดสอบความทนเกลือที่ระดับโซเดียมคลอไรด์ 6.5 และ 18 เปอร์เซ็นต์
- 4.6 การตรวจสอบความสามารถในการเจริญที่ระดับความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และ 9.6

5. การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

สกัดดีเอ็นเอจากแบคทีเรียกรดแลกติกและการทำ PCR เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยใช้ไพรเมอร์คู่ที่จำเพาะต่อบริเวณอนุรักษ์ของยีน นำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ด้วยวิธีอิเล็กโทรโฟเรซิส โดยแช่เจลในสารละลายเอซีดีเอ็มโบร์ 1 ไมล์ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร นาน 5-10 นาที นำไปตรวจสอบภายใต้แสงอัลตราไวโอเล็ตด้วยเครื่อง UV-transilluminator เปรียบเทียบขนาด

กับดีเอ็นเอมาตรฐาน 1 Kb ladder และการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ส่วนปลาย 5' โดยนำชิ้นดีเอ็นเอที่ได้ไปทำบริสุทธิ์ แล้วจึงนำไปหาลำดับเบสโดยตรง (direct sequencing) ด้วยเครื่อง ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer ที่คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร นำข้อมูลลำดับเบสของยีน 16S rRNA ส่วนปลาย 5' ที่ได้จากแบคทีเรียกรดแลกติกมาเปรียบเทียบกับข้อมูลยีน 16S rRNA ของสิ่งมีชีวิตทั้งหมดที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GenBank, EMBL และ DDBJ โดยใช้โปรแกรม Blastn ที่ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

6. ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้แบคทีเรียกรดแลกติก

ศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลือง โดยใช้ปริมาณเชื้อที่ 1,5,10 เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก และเติมกากน้ำตาลที่ 0,3,6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 30,37,45 องศาเซลเซียส ทำการหมักเวลา 24 ชั่วโมง วิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน โดยคัดแปลงจากวิธีของ standard AACC โดย Hamerstrand *et al.*, 1981

การวางแผนการทดลองทางสถิติ โดยใช้แผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Complete Randomize Design) โดยจัดหน่วยทดลองแบบ Factorial Experiment วิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลและเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ของการทดลองเป็นคู่ตามวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ

7. สถานที่และระยะเวลาการวิจัย

7.1 สถานที่ทำการวิจัย

ห้องปฏิบัติการภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะอุตสาหกรรมเกษตร
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

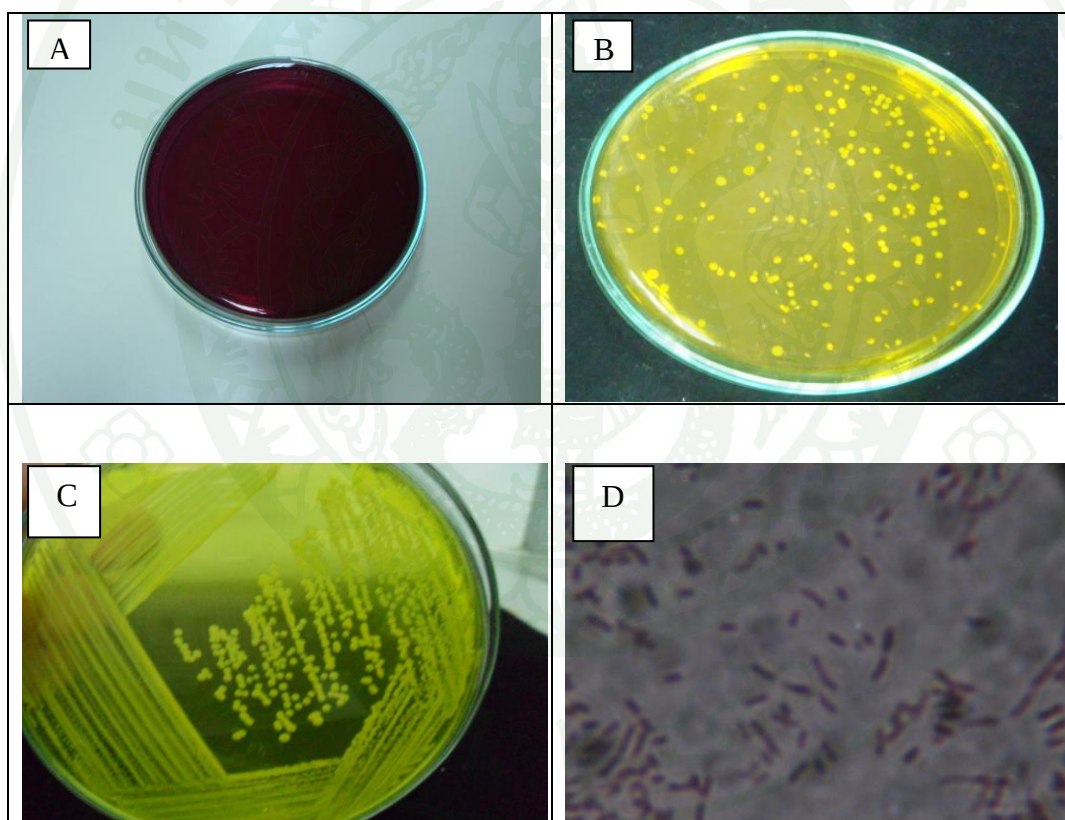
7.2 ระยะเวลาในการวิจัย

การทดลองเริ่มต้นตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2552 สิ้นสุด เดือนมีนาคม 2556

ผลและวิจารณ์

1. การคัดแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถทำลายสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

จากการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากกากถั่วเหลืองดิบโดยเพาะเลี้ยงในอาหาร MRS agar ที่เติมบรอมครีซอลเฟอเฟิล 0.004 เปอร์เซ็นต์ และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสามารถแยกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สร้างกรด จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีม่วง เป็นสีเหลืองซึ่งเกิดจากการสร้างกรดเกิดขึ้น ได้ 56 ไอโซเลท



ภาพที่ 5 ลักษณะ โคลนินของแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SB 10 บนอาหาร MRS agar ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A : ลักษณะสีม่วงก่อนทำการเชื้อเชื้อ, B : ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของในอาหาร MRS Agar , C:ลักษณะของสีที่เปลี่ยนไปหลังจากเชื้อเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SB 10, D:ลักษณะรูปร่างของไอโซเลท SB 10 จากการย้อมแกรมและส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 1000 เท่า)

ผลการแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกจากกากถั่วเหลืองดิบ โดยแยกแบคทีเรียกรดแลกติกในขั้นตอนเลือกโคโลนีที่เปลี่ยนสีอาหารจากม่วงเป็นเหลืองและนำไปทำให้เชื้อบริสุทธิ์ โดยทำการ streak 2 ครั้ง นำไปทดสอบการย้อมแกรมผลและรูปร่างของแบคทีเรีย ผลที่ได้คือมีแบคทีเรียที่สามารถย้อมติดสี Crystal violet ซึ่งเป็นแกรมบวกทั้งสิ้น 56 ไอโซเลตดังแสดงในตารางที่ 7 มีลักษณะเป็นท่อน หลังจากนั้นนำไปทดสอบกิจกรรมการย่อยโปรตีน

2 การคัดเลือกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีน

นำแบคทีเรียที่ได้ มาทำการศึกษากิจกรรมการย่อยโปรตีน (proteolytic activity) โดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar (SMA) ด้วยวิธีปลูกเชื้อแบบจุด (point-inoculation) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง ตรวจสอบความสามารถในการย่อยโปรตีน โดยวัดอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) ต่อเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีซึ่งมีแนวโน้มในการสร้างเอนไซม์ย่อยโปรตีนเพื่อทำการศึกษาต่อไป ผลการศึกษาทดสอบกิจกรรมการย่อยโปรตีนแสดงดังตารางที่ 7 ข้อมูลการวัดอัตราส่วนของเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใส (clear zone) แสดงตารางผนวก ก 1

ตารางที่ 7 ผลการคัดแยกแบคทีเรียกรดแลกติกที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar รูปร่าง
เซลล์ ลักษณะการติดสีแกรม และกิจกรรมการย่อยโปรตีน

ไอโซเลท	รูปร่าง	Gram's stain	อัตราส่วน โซนใสต่อขนาด โคโลนี	ไอโซเลท	รูปร่าง	Gram's stain	อัตราส่วน โซนใสต่อ ขนาดโคโลนี
SB 1	Rod	+	-	SB 29	Rod	+	-
SB 2	Rod	+	-	SB 30	Rod	+	-
SB 3	Rod	+	2.09	SB 31	Rod	+	-
SB 4	Rod	+	-	SB 32	Rod	+	-
SB 5	Rod	+	-	SB 33	Rod	+	-
SB 6	Rod	+	-	SB 34	Rod	+	-
SB 7	Rod	+	-	SB 35	Rod	+	-
SB 8	Rod	+	-	SB 36	Rod	+	-
SB 9	Rod	+	-	SB 37	Rod	+	-
SB 10	Rod	+	2.32	SB 38	Rod	+	-
SB 11	Rod	+	-	SB 39	Rod	+	-
SB 12	Rod	+	-	SB 40	Rod	+	-
SB 13	Rod	+	-	SB 41	Rod	+	-
SB 14	Rod	+	-	SB 42	Rod	+	-
SB 15	Rod	+	-	SB 43	Rod	+	2.22
SB 16	Rod	+	2.17	SB 44	Rod	+	-
SB 17	Rod	+	-	SB 45	Rod	+	2.30
SB 18	Rod	+	-	SB 46	Rod	+	-
SB 19	Rod	+	-	SB 47	Rod	+	-
SB 20	Rod	+	2.14	SB 48	Rod	+	-
SB 21	Rod	+	-	SB 49	Rod	+	-
SB 22	Rod	+	-	SB 50	Rod	+	-
SB 23	Rod	+	-	SB 51	Rod	+	-

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ไอโซเลท	รูปร่าง	Gram's stain	อัตราส่วน โซนใสต่อ ขนาดโคโลนี	ไอโซเลท	รูปร่าง	Gram's stain	อัตราส่วน โซนใสต่อ ขนาดโคโลนี
SB 24	Rod	+	2.17	SB 52	Rod	+	-
SB 25	Rod	+	-	SB 53	Rod	+	-
SB 26	Rod	+	-	SB 54	Rod	+	-
SB 27	Rod	+	-	SB 55	Rod	+	-
SB 28	Rod	+	-	SB 56	Rod	+	-

เมื่อทำการคัดแยกแบคทีเรียที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีนด้วยอาหาร Skim milk agar (SMA) พบว่ามีแบคทีเรียที่สามารถสร้าง Clear zone ได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลท ไอโซเลทที่มีการย่อยโปรตีน คือ ไอโซเลท SB3, SB 10, SB 16, SB 20, SB 24, SB 43 และ SB 45 ตามลำดับ

3. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

นำแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีกิจกรรมการย่อยโปรตีนทั้ง 7 มาทดสอบความสามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน เมื่อทำการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีความสามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินด้วยวิธีดัดแปลงจาก standard AACC (Hamerstrand, 1981) พบว่ามีแบคทีเรียกรดแลกติกที่สามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ 7 ไอโซเลท ดังตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการทดสอบความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

ไอโซเลท	ความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (%)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
SB 3	14.28	14.83	14.74	14.61
SB 10	35.91	35.64	35.23	35.59
SB 16	24.89	25.84	26.51	25.74
SB 20	21.22	22.27	22.03	21.84
SB 24	14.28	18.22	17.50	16.66
SB 43	10.61	11.01	11.74	11.12
SB 45	26.23	29.66	29.20	28.36

จากการวิเคราะห์ความสามารถในการลดปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในกากถั่วเหลืองดิบ พบว่าความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินของไอโซเลท SB 3, SB 10, SB16, SB 20, SB 20, SB 24, SB 43 และ SB 45 สามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน 14.61, 35.59, 25.74, 21.84, 16.66, 11.12 และ 28.36 เปอร์เซ็นต์ จากการวิเคราะห์พบว่าไอโซเลท SB10 สามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้มากที่สุดคือสามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินได้ 35.59 เปอร์เซ็นต์

จากการวิเคราะห์กากถั่วเหลืองดิบมีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน 4.035 มิลลิกรัมต่อกรัมของกากถั่วเหลือง ซึ่งรายงานของ Dale *et al.*, 1987 พบว่าปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินระหว่าง 1-3 มิลลิกรัมต่อกรัมของกากถั่วเหลืองถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการใช้กากถั่วเหลืองมาประกอบสูตรอาหารสัตว์ ในการทดสอบความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินของทั้ง 7 ไอโซเลท มีความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินดังนี้ 3.44, 2.59, 2.99, 3.15, 3.39, 3.58, 2.89 มิลลิกรัมต่อกรัมของกากถั่วเหลือง ตามไอโซเลท SB3, SB 10, SB 16, SB 20, SB 24, SB 43, SB 45 ตามลำดับ ซึ่งเริ่มต้นกากถั่วเหลืองดิบมีสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน 4.035 มิลลิกรัมต่อกรัมของกากถั่วเหลือง จากการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินพบว่า ไอโซเลท SB 10 สามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการใช้กากถั่วเหลืองในสูตรอาหารสัตว์

4. การจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกในกาถั่วเหลืองดิบระดับสปีชีส์

การจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติกสามารถจำแนกเบื้องต้นได้ในระดับสกุลโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาและคุณลักษณะทางกายภาพ เช่น ลักษณะและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ การผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการหมักกลูโคส การเจริญที่อุณหภูมิและความเข้มข้นเกลือระดับต่างๆ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่างต่างๆ เป็นต้น (Axelsson, 1998) และสามารถใช้อัตราจากการทดสอบทางชีวเคมีร่วมด้วย โดยนำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบกับข้อมูลของ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2009) จะทำให้ทราบถึงระดับสปีชีส์ ในปัจจุบันหากต้องการความแม่นยำในการจัดจำแนกสามารถอาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล เช่น การศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA (อ้างอิง Woese, 1987) มาใช้ในการจำแนกแบคทีเรียกรด-แลกติกได้ถึงในระดับสปีชีส์

การจัดจำแนกในระดับสกุล (genera) ของแบคทีเรียกรดแลกติก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) และการเรียงตัวของเซลล์ ความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิและความเข้มข้นของเกลือระดับต่างๆ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) การผลิตเอนไซม์คาตาเลส (catalase) และการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2) จากน้ำตาลกลูโคส ดังตารางที่ 9 และการทดสอบทางชีวเคมี ดังตารางที่ 10

เมื่อทำการจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลกติก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา การเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยใช้กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า แบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต มีรูปร่างท่อน ไม่สร้างสปอร์ และไม่เคลื่อนที่ การทดสอบคาตาเลสเป็นลบ ซึ่งคุณสมบัติเหล่านี้จัดเป็นคุณสมบัติพื้นฐานของแบคทีเรียกรดแลกติก (Salminen, 1998)

ผลการศึกษาความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิ ความเข้มข้นของเกลือ การทนต่อสภาวะความเป็นกรด-ด่าง การผลิตเอนไซม์คาตาเลส และการผลิตคาร์บอนไดออกไซด์จากน้ำตาลกลูโคส ดังตารางที่ 9 เมื่อพิจารณาความสามารถการเจริญที่อุณหภูมิ 15 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่าทั้ง 7 ไอโซเลตไม่สามารถเจริญที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส แต่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีโซเดียมคลอไรด์ 6.5 เปอร์เซ็นต์ พบการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมคลอไรด์เป็น 18 เปอร์เซ็นต์ ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลต อาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 4.5 พบการ

เจริญของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลท แต่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทำการปรับความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นเป็น 9.6 ไม่พบการเจริญของแบคทีเรียทั้ง 7 ไอโซเลท

ตารางที่ 9 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบการเจริญของแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารเลี้ยงเชื้อเหลว MRS ที่สภาวะต่างๆ

ลักษณะการทดสอบ	SB3	SB10	SB16	SB20	SB24	SB43	SB45
การติดสีแกรม ^a							
รูปร่าง	+	+	+	+	+	+	+
การเคลื่อนที่ ^b	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod	Rod
การสร้างสปอร์ ^c	-	-	-	-	-	-	-
การเจริญที่อุณหภูมิ ^d							
15 องศาเซลเซียส	-	-	-	-	-	-	-
45 องศาเซลเซียส	+	+	+	+	+	+	+
การเจริญในอาหารที่มี NaCl ^d							
6.5 เปอร์เซ็นต์	-	-	-	-	-	-	-
18 เปอร์เซ็นต์							
การเจริญที่ความเป็นกรด-ด่าง ^d							
4.5	+	+	+	+	+	+	+
9.6	-	-	-	-	-	-	-
การทดสอบคาตาเลส ^e	-	-	-	-	-	-	-
การสร้าง CO ₂ จากกลูโคส ^f	+	+	+	+	+	+	+
หมายเหตุ ^a + ติดสีแกรมบวก, - ติดสีแกรมลบ ^b + เคลื่อนที่, - ไม่เคลื่อนที่ ^c + สร้างสปอร์, - ไม่สร้างสปอร์ ^d + เจริญ, - ไม่เจริญ ^e + สร้างคาตาเลส, - ไม่สร้างคาตาเลส ^f + สร้าง CO ₂ , - ไม่สร้าง CO ₂							

ตารางที่ 10 แสดงการทดสอบปฏิกิริยาทางชีวเคมีในการจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรีย
กรดแลคติกที่แยกได้จากกากถั่วเหลืองดิบ

TEST	SB 3	SB 10	SB 16	SB 20	SB 24	SB 43	SB 45
Spore	Non spore	Non spore	Non spore	Non spore	Non spore	Non spore	Non spore
Catalase	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-
Indole	-	-	-	-	-	-	-
Motile	-	-	-	-	-	-	-
Litmus milk	Clot	Clot	Clot	Clot	Clot	Clot	Clot
Nitrate	-	-	-	-	-	-	-
Gelatin	-	-	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-	-	-
Esculin hydrolysis	+	+	+	+	+	+	+
Starch hydrolysis	-	-	-	-	-	-	-
Dextrose	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	-	+	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+	+
Mannose	W	+	+	+	+	-	-
Mannitol	W	W	-	-	-	-	-
Salicin	-	W	-/W	-	-	-	-
Sucrose	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	-	-	-	-	-	-	-
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-

Symbols: +,positive; -,negative; w=wait

ไอโซเลทที่คัดแยกจากกากถั่วเหลืองเมื่อตรวจสอบลักษณะของการติดสีแกรมและรูปร่างของเชื้อ พบว่าเป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน เมื่อนำแบคทีเรียกรดแลคติกมาศึกษาวิธีการสร้างกรด โดยนำเชื้อจุลินทรีย์มาเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารเหลว MRS ที่มีหลอดดักแก๊ซ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีแก๊ซเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ซ แสดงว่าจุลินทรีย์ที่แยกได้มีวิธีการสร้างกรดแบบ heterofermentative การสร้างกรดแลคติกของแบคทีเรียกรดแลคติกเกิดจากการใช้สารประกอบคาร์โบไฮเดรตในกระบวนการเมแทบอลิซึมได้กรดแลคติกเป็นผลิตภัณฑ์ แบคทีเรียกรดแลคติกจัดเป็นจำนวน nonsporulating microaerophilic bacteria มีผลิตภัณฑ์หลักที่ได้จากการหมักคือ กรดแลคติก (วรรณทิชา, 2549)

แบคทีเรียวงศ์ *Lactobacillaceae* มีอยู่เพียง 1 จินัส คือ *Lactobacillus* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน แต่บางครั้งอาจโค้งงอ ปรากฏเป็นเซลล์เดี่ยวหรือต่อเป็นลูกโซ่ ติดสีแกรมบวก ไม่ต้องการก๊าซออกซิเจน กิ่งไม่ต้องการก๊าซออกซิเจน เพื่อการเจริญเติบโต ได้พลังงานจากการออกซิไดส์สารเคมี และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ต้องการสารประกอบเฉพาะหลายอย่างเพื่อการเจริญเติบโต (สุพจน์, 2545) *Lactobacillus* เจริญได้ดีในสารอาหารที่มีสภาพเป็นกรดช่วงความเป็นกรดต่าง 5.5-5.8 เมื่อหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสจะให้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก

การทดสอบการสร้างเอนไซม์คาตาเลส (catalase test) แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ ซึ่งตรวจสอบได้โดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเอนไซม์คาตาเลสจะสลาย H_2O_2 กับ O_2 หากมีฟองก๊าซเกิดขึ้นแสดงผลเป็นบวก นั่นคือเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้นสามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลสได้ เมื่อทำการทดสอบคาตาเลส โดยตะโกลนบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้มายีกลงบนแผ่นสไลด์ที่หยดด้วยสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ พบว่าไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้น แสดงผลเป็นลบ หรือไม่สร้างคาตาเลส ซึ่งไอโซเลทที่คัดแยกจากกากถั่วเหลืองดิบทั้ง 7 ไอโซเลท เมื่อทำการทดสอบคาตาเลสแสดงผลเป็นลบ แสดงว่าไอโซเลททั้ง 7 ไม่สามารถสร้างเอนไซม์คาตาเลส (น้อมจิตต์, 2542) แบคทีเรียแกรมบวกและให้ผลคาตาเลสเป็นลบ จัดเป็นแบคทีเรียกรดแลคติก (ธนิกันต์, 2547)

ปฏิกิริยาชีวเคมีของแบคทีเรียเกี่ยวข้องกับเอนไซม์ชนิดต่างๆ การที่แบคทีเรียจะสามารถใช้สารอาหารเพื่อดำรงชีวิตได้ สารอาหารนั้นต้องซึมผ่านเข้าไปภายในเซลล์ ถ้าสารอาหารนั้นมีโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น สารประกอบพวกโปรตีน คาร์โบไฮเดรตและไขมัน แบคทีเรียจะสร้างเอนไซม์และขับออกมาภายนอกเซลล์เพื่อทำการย่อยสลาย สารอาหารเหล่านั้นให้มีโมเลกุลเล็กลงพอที่จะซึมผ่านผนังเซลล์ไปได้ เอนไซม์เหล่านี้มีชื่อเรียกง่ายๆ ว่า exoenzyme จากนั้น endoenzyme ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียสร้างขึ้นภายในจะเข้าทำปฏิกิริยาทางชีวเคมีเปลี่ยนสารอาหารเหล่านั้นมาใช้ให้เป็นประโยชน์ในการดำรงชีวิตต่อไป ตัวอย่างเช่น การทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction) นั้น เจลาตินเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่อยู่ในสภาพกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid) โดยที่อุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส จะอยู่ในสภาพของแข็ง ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 20 องศาเซลเซียส จะอยู่ในสภาพของเหลว แบคทีเรียบางชนิดสามารถสร้างเอนไซม์ gelatinase ออกมาย่อยเจลาตินให้เหลวได้ ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า liquefaction ซึ่งทั้ง 7 ไอโซเลทที่แยกได้ไม่มีคุณสมบัติในการย่อยเจลาติน จึงให้ผลการทดสอบเป็นลบ

การทดสอบความสามารถในการสร้างอินโดล (Indole test) แบคทีเรียบางชนิดมีความสามารถแยกอินโดลออกจากกรดอะมิโนพวก tryptophan ได้ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงนี้ได้โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มี tryptophan เพียงพอ แล้วตรวจสอบอินโดลโดยหยดสารละลายที่มี para-dimethylaminobenzaldehyde เช่น Kovac's reagent ซึ่งมี amyl alcohol ไวสกัดอินโดลที่ออกมาให้ลอยขึ้นมาบนผิวหน้า ซึ่งจะเกิดเป็นวงแหวนสีแดง จากการทดลองพบว่าไอโซเลททั้ง 7 ที่แยกได้ไม่มีความสามารถในการสร้างอินโดล ไม่เกิดวงแหวนสีแดง ดังนั้นจึงให้ผลเป็นลบ

การทดสอบการรีดิวส์ไนเตรต (nitrate reduction) แบคทีเรียบางชนิดสามารถใช้เกลือไนเตรตเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron acceptor) ได้และจะถูกเปลี่ยนเป็นสารประกอบไนไตรท์ ซึ่งทดสอบได้โดยใช้สารละลาย sulfanilic acid กับ alpha-naphthylamine จะได้สีแดง แสดงว่าแบคทีเรียนั้นสามารถรีดิวส์สารประกอบไนเตรตได้ แต่ถ้าไม่เกิดสีแดงยังสรุปไม่ได้ทันทีว่าสารประกอบไนเตรตไม่ถูกรีดิวส์ต้องทดสอบยืนยันโดยการใส่ผงสังกะสีลงไป ถ้าสารประกอบไนเตรตไม่ถูกรีดิวส์โดยแบคทีเรียจะต้องยังเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ ก็จะถูกรีดิวส์ในครั้งนี้ โดยผงสังกะสี ซึ่งจะทำให้เกิดสีแดงขึ้นภายหลังจากใส่ผงสังกะสีแล้ว จึงสรุปได้ว่าแบคทีเรียนั้นไม่สามารถรีดิวส์สารประกอบไนเตรต แต่ถ้าหลังจากใส่ผงสังกะสีแล้ว ยังคงไม่เกิดสีแดง แสดงว่าเชื้อแบคทีเรียนั้นสามารถรีดิวส์สารประกอบไนเตรตได้ เป็นเป็นสารประกอบไนไตรท์ แล้วถูกรีดิวส์ต่อไปเป็นแอมโมเนียหรือแก๊สไนโตรเจนได้

การทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide production) แบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายโมเลกุลของโปรตีนหรือกรดอะมิโน ที่มีกำมะถันเป็นองค์ประกอบให้เป็น H_2S ได้ซึ่ง H_2S จะไปทำปฏิกิริยากับไอออนของตะกั่วในอาหารนั้น เกิดเป็นซัลไฟด์ของตะกั่วซึ่งมีสีน้ำตาลดำ ซึ่งจากการทดลองพบว่า ไอโซเลททั้ง 7 ที่แยกได้ไม่พบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์

การทดสอบการใช้สารอาหารต่างๆ ในน้ำนม น้ำนมประกอบด้วยส่วนประกอบใหญ่ๆ ดังนี้คือ น้ำตาลแลคโตส ไขมัน casein แบคทีเรียบางชนิดสามารถเฟอร์เมนต้น้ำตาลแลคโตสให้เป็นกรดต่างๆ โดยเฉพาะกรดแลคติก ไขมันจะถูกเปลี่ยนเป็น fatty acid และ glycerol ส่วน casein ก็จะถูกย่อยทำให้น้ำนมใสและเหลวขึ้น ซึ่งในการทดสอบจะใช้ litmus milk ซึ่งประกอบด้วย skim milk (น้ำนมที่แยกไขมันออกไปแล้ว) และมี litmus เป็นอินดิเคเตอร์ แบคทีเรียบางชนิดเฟอร์เมนต้น้ำตาลแลคโตส ให้กรดชนิดต่างๆ โดยเฉพาะกรดแลคติก ทำให้ความเป็นกรดต่ำลง จนทำให้โปรตีนในน้ำนมจับตัวกันเป็นตะกอนแข็ง (curd) แยกจากส่วนที่เป็นน้ำ เรียกว่า acid curd ในบางครั้งถ้าแบคทีเรียใช้น้ำตาลแล้วเกิดก๊าซร่วมกับก๊าซจะดัน curd ให้แตกแยกหรือลอยขึ้นมาได้ แบคทีเรียบางชนิดสร้าง clotting enzyme ชื่อ rennin ทำให้โปรตีนในน้ำนมจับตัวกันเป็นตะกอน ซึ่งมีลักษณะอ่อนนุ่ม เรียกว่า rennet curd หรือ sweet curd แบคทีเรียบางชนิดไม่เฟอร์เมนต้น้ำตาลแลคโตส แต่จะใช้โปรตีนในน้ำนมเป็นแหล่งของพลังงานแทน โดยปล่อยเอนไซม์ออกมา hydrolyze โปรตีนในน้ำนม เรียกปฏิกิริยานี้ว่า peptonization เป็นผลให้น้ำนมมีลักษณะใสขึ้นและมีความเป็นกรดต่ำเป็นกรด ซึ่งไอโซเลท ทั้ง 7 ไอโซเลทที่แยกได้มีความสามารถทำให้ litmus milk เกิดการ clot ได้

แบคทีเรียวงศ์ *Lactobacillaceae* มีอยู่เพียง 1 จินัส คือ *Lactobacillus* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อน แต่บางครั้งอาจโค้งงอ ปรากฏเป็นเซลล์เดี่ยวหรือต่อเป็นลูกโซ่ ดิคลีแกรมบวก ไม่ต้องการก๊าซออกซิเจน ถึงแม้ต้องการก๊าซออกซิเจน เพื่อการเจริญเติบโต ได้พลังงานจากการออกซิไดส์สารเคมี และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งคาร์บอน ต้องการสารประกอบเฉพาะหลายอย่างเพื่อการเจริญเติบโต (สุพจน์, 2545) *Lactobacillus* เจริญได้ดีในสารอาหารที่มีสภาพเป็นกรดช่วงความเป็นกรดต่ำ 5.5-5.8 เมื่อหมักย่อยน้ำตาลกลูโคสจะให้ผลผลิตส่วนใหญ่เป็นกรดแลคติก

แบคทีเรียกรดแลคติก *L. fermentum* เป็นแบคทีเรียที่มีรูปร่างเซลล์เป็นท่อน ดิคลีแกรมบวก เจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ไม่ต้องการออกซิเจนหรือกึ่งไม่ต้องการออกซิเจน ไม่สร้างสปอร์ ไม่มีการเคลื่อนที่ มีวิธีการสร้างกรดแบบ heterofermentative ไม่มีคุณสมบัติในการย่อยเจลาติน การทดสอบการสร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (hydrogen sulfide production) ไม่พบการ

สร้างก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ การทดสอบจะใช้ litmus milk ซึ่งมีความสามารถทำให้ litmus milk เกิดการ clot ได้

Sanni *et al.*, 2002 ได้ทำการแยกแบคทีเรียกรดแลคติก *L. plantarum* และ *L. fermentum* ที่คุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์อะไมเลส (amylase-producing) จากอาหารพื้นเมืองของประเทศไนจีเรีย (Nigerian traditional fermented foods) ได้แก่ fufu, burukutu, ogi-baba และ kunu-zakki

สุรลักษณ์ และคณะ(2554) ศึกษาความหลากหลายของสายพันธุ์ของ Lactobacilli ที่พบในไซเลจจากแหล่งผลิตในประเทศไทย ซึ่งจะให้ประโยชน์ในการพัฒนาหัวเชื้อเพื่อใช้ในการผลิตไซเลจและจุลินทรีย์ที่อาจใช้เป็นโพรไบโอติกสำหรับสัตว์ จากการวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียโดยอาศัยฐานวิทยาศาสตร์และคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการสามารถระบุชนิดที่ได้จากไซเลจ คือ *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. delbrueckii*, *L. friminis*, *L. fermentum*, *L. fructosus* และ *L. gasseri*

5. การตรวจสอบทางพันธุศาสตร์โมเลกุลโดยหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA ของเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติก

เมื่อทำการศึกษาทางฐานวิทยาศาสตร์ คุณลักษณะทางกายภาพ และการทดสอบทางชีวเคมี ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติก ไอโซเลท SB 10 ที่มีความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน เกลี่ยสูงที่สุดคือ 35.59 เปอร์เซ็นต์ จึงนำไอโซเลท SB 10 ตรวจสอบลักษณะทางพันธุศาสตร์โมเลกุลของบริเวณ 16S rRNA ในการหาลำดับเบสเพื่อระบุสายพันธุ์ในระดับสปีชีส์ต่อไป

การวิเคราะห์ลำดับเบสของยีนจากแบคทีเรียไอโซเลท SB 10 โดยการสกัดดีเอ็นเอและเพิ่มปริมาณ 16S rRNA ด้วยเทคนิค PCR (polymerase chain reaction) และหาลำดับเบสของ 16S rRNA ด้วยเครื่องหาลำดับเบสอัตโนมัติ ได้ลำดับเบสของ 16S rRNA ของแบคทีเรียไอโซเลท SB 10 แสดงดังภาพที่ 7 เมื่อนำลำดับเบสของ 16S rRNA ที่ได้จากแบคทีเรียไอโซเลท SB 10 มาหาเปอร์เซ็นต์ความคล้ายคลึง (%similarity, %identity) โดยใช้ โปรแกรม BLASTn และเปรียบเทียบความเหมือนระหว่างลำดับเบสของแบคทีเรียไอโซเลท SB 10 กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่ในฐานข้อมูลของ GeneBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) ได้ผลแสดงในตารางที่ 11 จากการเปรียบเทียบลำดับเบส (16S rRNA sequence) ของแบคทีเรียไอโซเลท SB 10 กับลำดับเบสของแบคทีเรียที่มีอยู่

ในฐานข้อมูลของ GeneBank พบว่า ผลการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย มีความคล้ายคลึงกับลำดับ นิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลดังนี้ คือ *Lactobacillus fermentum* (Accession number HM629735) 100 เปอร์เซ็นต์ ผลการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์ดังตารางที่ 11 และผลการทำ BLASTn ของแบคทีเรียกรดแลคติก ดังแสดงในภาพที่ 7

ตารางที่ 11 ค่า %similarity ของแบคทีเรียไอโซเลท โดยใช้โปรแกรม BLASTn เปรียบเทียบลำดับ นิวคลีโอไทด์ในฐานข้อมูล GenBank

Isolates	Organisms	Accession number	% similarity
Soybean pulp	<i>Lactobacillus fermentum</i>	HM629735	550/550 (100%)
	strain SM-7		

ผลการทำ BLASTn ของแบคทีเรียกรดแลคติก

>[gi|300490530|gb|HM629735.1|](#) Lactobacillus fermentum strain SM-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length=1462

Score = 993 bits (1100), Expect = 0.0
Identities = 550/550 (100%), Gaps = 0/550 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 1      TTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGT  60
          |||
Sbjct 601    TTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGAAGAGGGTAGT  660

Query 61     GGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGC  120
          |||
Sbjct 661    GGAATCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAAGTGGCGAAGGC  720

Query 121    GGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA  180
          |||
Sbjct 721    GGCTACCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGACTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGA  780

Query 181    TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTC  240
          |||
Sbjct 781    TACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTC  840

Query 241    AGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT  300
          |||
Sbjct 841    AGTGCCGGAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACT  900

Query 301    CAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACG  360
          |||
Sbjct 901    CAAAGGAATTGACGGGGGCGCACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACG  960

Query 361    CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTC  420
          |||
Sbjct 961    CGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTGCGCCAACCCTAGAGATAGGGCGTTTCCTTC  1020

Query 421    GGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT  480
          |||
Sbjct 1021   GGGAACGCAATGACAGGTGGTGCATGGTCGTCGTGAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTT  1080

Query 481    AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAG  540
          |||
Sbjct 1081   AAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGTTACTAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTAG  1140

Query 541    TGAGACTGCC  550
          |||
Sbjct 1141   TGAGACTGCC  1150

```

ภาพที่ 6 ผลการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน partial 16 s rRNA sequence ของแบคทีเรียโอโซเลท (เส้นบน:Query) กับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเชื้อ *L. fermentum* Strain SM-7 (เส้นล่าง:Sbjct)

6. ศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้แบคทีเรียกรดแลคติก

จากการที่ได้คัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการลดปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในกากถั่วเหลืองดิบ เชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกที่ได้จากกากถั่วเหลืองดิบคือเชื้อ *Lactobacillus fermentum* SB 10 การทดลองนี้จึงนำเชื้อ *L. fermentum* SB 10 มาศึกษาภาวะที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลืองดิบ โดยใช้ปริมาณเชื้อที่ 1, 5 และ 10 เพอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเติมน้ำตาลที่ 0, 3, 6 และ 10 เพอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ทำการหมักที่อุณหภูมิ 30, 37, 45 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง แสดงดังตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ศึกษาภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ *L. fermentum* SB10 ที่ใช้ปริมาณเชื้อที่ 1,5 และ 10 เพอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 0, 3, 6 และ 9 เพอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และหมักที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส

ปริมาณเชื้อ (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก)	ปริมาณกากน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนัก)	ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (mg/g) อุณหภูมิที่เก็บปม (องศาเซลเซียส)		
		30	37	45
1	0	8.63 ^d	8.39 ^c	8.62 ^c
	3	8.31 ^d	7.60 ^d	7.73 ^{de}
	6	7.73 ^d	7.55 ^d	7.44 ^d
	9	8.21 ^{cd}	7.61 ^d	6.31 ^c
5	0	8.38 ^d	7.41 ^d	7.56 ^d
	3	8.40 ^d	5.24 ^c	6.02 ^{bc}
	6	5.28 ^a	2.62 ^a	5.02 ^a
	9	6.68 ^c	3.88 ^b	5.04 ^a
10	0	8.43 ^d	7.41 ^d	8.28 ^{dc}
	3	8.41 ^d	5.84 ^c	6.26 ^c
	6	6.56 ^b	4.45 ^b	5.16 ^{ab}
	9	8.06 ^{cd}	5.31 ^c	5.98 ^{bc}

หมายเหตุ ตัวอักษรที่เหมือนกันแสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ปัจจุบันมีการนำเอาจุลินทรีย์ *Lactobacillus* spp. ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) มาใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตไซเลจ เพิ่มคุณค่าทางโภชนาและลดปัญหาที่เกิดขึ้นจากการผลิตไซเลจ เช่น การเกิดกรดน้ำส้ม การเกิดกลิ่นแอลกอฮอล์เป็นต้น ปัญหาที่เกิดขึ้นเหล่านี้เกิดจากการมีปริมาณแบคทีเรียกรดแลคติกในกระบวนการเริ่มต้นการหมักที่ต่ำเกินไป การเพิ่มการทำงานของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกให้มากขึ้นจะช่วยลดระดับความเป็นค่าความเป็นกรด-ด่าง ในระดับที่จุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของการเสื่อมเสียของพืชอาหารสัตว์ไม่สามารถเจริญเติบโตได้ (อำนาจ, 2540) แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกมีความสามารถในการทนต่อสภาพความเป็นกรด-ด่างต่ำได้ ซึ่งความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมต่อการเจริญอยู่ที่ระหว่าง 5.0-6.0 และยังสามารถเจริญได้เมื่อระดับความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 3.5-4.0 (Knicky, 2005) ความเป็นกรด-ด่างที่ปริมาณเซลล์สูงสุดต่ำลงมาก ซึ่งการที่ความเป็นกรด-ด่างต่ำลงนี้ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ต้องใช้พลังงานเพิ่มขึ้นในการรักษาสสมดุลความเป็นกรด-ด่างภายในเซลล์ กลไกนี้ทำให้สูญเสียพลังงาน ส่งผลให้การเติบโตของเซลล์ช้าลง (สุมนทนา, 2545) สอดคล้องกับผลการศึกษาของ Narendranath and Power (2005) ซึ่งพบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของ *L. pentosus* ลดลงเมื่ออาหารมีความเป็นกรด-ด่างต่ำกว่า 5.5 Caldwell (1995) รายงานว่าความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำเกินไป จะทำให้จุลินทรีย์สูญเสียพลังงานมากในการนำไฮโดรเจนเข้าและออกจากเซลล์เพื่อปรับสมดุลความเป็นกรด-ด่าง เป็นผลให้การเติบโตลดลง และหากความเป็นกรด-ด่างสูงหรือต่ำเกินไปกว่าที่จุลินทรีย์จะปรับตัวได้จะส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์หลายชนิดซึ่งแสดงกิจกรรมได้ในช่วงความเป็นกรด-ด่างที่เหมาะสมเฉพาะของแต่ละชนิด ผลที่ตามมานอกจากจุลินทรีย์มีการเติบโตช้าแล้ว การสร้างผลิตภัณฑ์ก็จะไม่เกิดขึ้น

สุพรรณิการ์ (2544) ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus acidilactic* (M6) พบว่าชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ คือกากน้ำตาล และความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงคือ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เสริมศักดิ์ (2546) ศึกษาเพื่อหาความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมในการหมักกากมันสำปะหลัง โดยการทดลองนี้ใส่กากมันสำปะหลังลงในพลาสติก จากนั้นปรับความชื้นให้ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ ด้วยกากน้ำตาลความเข้มข้น 0, 2.5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และนำไปหมักกับ *S. cerevisiae* และ *R. oligosporus* พบว่าเมื่อเติมกากน้ำตาลความเข้มข้น 2 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกรณีไม่ได้เติมกากน้ำตาลจะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตดีขึ้น เพราะ

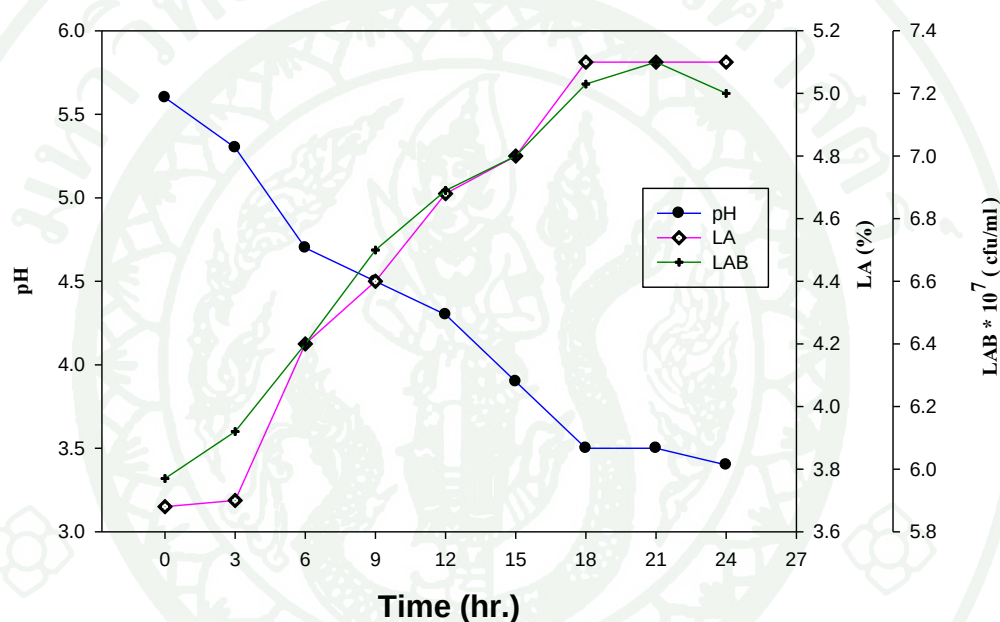
กากน้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนให้กับจุลินทรีย์ และที่สำคัญจุลินทรีย์สามารถนำน้ำตาลซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของกากน้ำตาลไปใช้ได้เลย ซึ่งเมื่อกากน้ำตาลความเข้มข้นที่เหมาะสมจะทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดี แต่ในทางกลับกันเมื่อเติมกากน้ำตาลความเข้มข้นมากเกินไปจะเป็นพิษกับเซลล์ของจุลินทรีย์

จากการที่ได้ศึกษา *L. fermentum* SB 10 ไปหมักกากถั่วเหลืองดิบเพื่อเป็นไซเลจ พบว่าสถานะเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ผลที่ได้ในชั่วโมงที่ 36 และ 48 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการหมักที่ใช้เวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 13) ดังนั้นจึงเลือกใช้สถานะที่เหมาะสมในการหมักเชื้อ *L. fermentum* SB 10 เพื่อลดการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ ตรีปซินคือ ใช้ปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

You-ling GAO *et al.*, 2013 ศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลือง โดยเชื้อ *L. brevis* และ *A. oryzae* ทั้ง 2 เชื้อสามารถลดสารยับยั้งเอนไซม์ตรีปซิน จากก่อนการหมักกากถั่วเหลืองมีปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ตรีปซิน 15.0 มิลลิกรัมต่อกรัม พบว่าการหมักด้วย เชื้อ *L. brevis* ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ตรีปซินลดลงเหลือ 6.4 มิลลิกรัมต่อกรัม และการหมักด้วยเชื้อ *A. oryzae* ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ตรีปซิน 1.6 มิลลิกรัมต่อกรัม

Dale *et al.*, 1987 พบว่าปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ตรีปซินระหว่าง 1-3 มิลลิกรัมต่อกรัมของกากถั่วเหลืองถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการใช้กากถั่วเหลืองมาประกอบสูตรอาหารสัตว์ ซึ่งจากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมในการลดปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ตรีปซินในกากถั่วเหลืองดิบ เพื่อให้ได้สารยับยั้งเอนไซม์ตรีปซินมีปริมาณลดลง โดยมีการศึกษา 3 ปัจจัย ดังนี้ ปริมาณของเชื้อ *L. fermentum* SB 10 ที่ปริมาณ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 0, 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิที่ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ตรีปซินลดลง โดยสถานะนี้แตกต่างจากสถานะอื่นๆ ในทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ซึ่งผลการศึกษาปริมาณของเชื้อ *L. fermentum* SB 10 ที่ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่าสารลดการยับยั้งของเอนไซม์ตรีปซิน อยู่ที่ 2.62 มิลลิกรัมต่อกรัม ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ Dale *et al.*, 1987 ได้กล่าวไว้ ส่วนสถานะการหมักอื่นปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ตรีปซินที่ตรวจหลังการหมักยังเกินเกณฑ์ที่กล่าวไว้ ดังนั้นสถานะที่เหมาะสมกับการหมักกากถั่วเหลืองดิบ

คือ ใช้ปริมาณเชื้อ *L. fermentum* SB 10 ที่ปริมาณ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และเติมกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง เมื่อหมักสภาวะดังกล่าวแล้ว ค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดแลกติก และจำนวนเชื้อจุลินทรีย์แบคทีเรียกรดแลกติกยังอยู่ในเกณฑ์คุณภาพของไซเลจ ตามที่สุพรรณนิการ์ (2544) ลักษณะไซเลจที่ดีควรมีค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.2 ปริมาณกรดแลกติก 3-13 เปอร์เซ็นต์ และมีการเติมแบคทีเรียกรดแลกติกเพื่อเพิ่มคุณภาพของไซเลจ ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณกรดแลกติกและจำนวนเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก ที่สภาวะการหมักกากกล้วยเหลืองดิบโดยใช้ปริมาณเชื้อ *L. fermentum* SB 10 ที่ปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิในการหมัก 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จากการศึกษาพบว่า เมื่อเชื้อ *L. fermentum* SB10 จำนวนเซลล์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นจาก 5.97×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 3 เป็น 7.00×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ในชั่วโมงที่ 24 ค่าความเป็นกรด-ด่างมีแนวโน้มลดลงจาก 5.5 เป็น 3.4 ส่วนกรดแลกติกมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาในการหมักเพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Almeida *et al.*, 2007 พบว่า ในระหว่างกระบวนการหมักเชื้อ *L. platarum* และ *L. pentosus* ค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงจาก 6.5 เป็น 3.4

กรดแลคติกเป็นสารเมแทบอไลต์ (fermentation metabolite) ที่มีความสำคัญในกระบวนการหมัก Muck(1991) และ Woolford (1995) รายงานว่าการผลิตไซเลจที่มีคุณภาพดีควรมีแบคทีเรียกรดแลคติก 10^6 - 10^7 โคโลนีต่อกรัมของพืช จะทำให้ไซเลจมีคุณภาพดี การใช้แบคทีเรียกรดแลคติกผสมที่ประกอบด้วย *L.plantarum*, *L.brevis*, *P.acidilactici* ในไซเลจผสมถั่วและหญ้า(Stokes, 1992) แสดงให้เห็นว่าการเติมแบคทีเรียกรดแลคติกจะช่วยเพิ่มปริมาณกรดแลคติก ทำให้ไซเลจมีความน่ากิน การเติมน้ำตาล เพื่อช่วยให้จุลินทรีย์มีอาหารสำหรับเพิ่มจำนวนและสร้างกรดได้อย่างรวดเร็ว (ทองเลียน, 2541)

ตารางที่ 13 ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ *L. fermentum* SB10 ที่ใช้ปริมาณเชื้อที่ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

การหมักกากถั่วเหลือง <i>L. fermentum</i> SB10	เวลาที่ใช้ในการหมัก (ชั่วโมง)		
	24	36	48
TI (mg/g)	2.92 ^{NS}	2.98 ^{NS}	3.00 ^{NS}
pH	3.40 ^{NS}	3.42 ^{NS}	3.42 ^{NS}
%LA	3.34 ^{NS}	3.21 ^{NS}	3.21 ^{NS}
Curde Protein	26.78 ^{NS}	26.62 ^{NS}	26.54 ^{NS}
LAB (CFU/g)	3.94 x10 ^{7NS}	3.45 x10 ^{7NS}	3.40 x10 ^{7NS}

หมายเหตุ NS: not significance

ตารางที่ 14 เปรียบเทียบคุณภาพของไข่แดงและคุณภาพของไข่แดงจากถั่วเหลืองดิบที่หมักด้วย *L. fermentum* SB 10 ที่ปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์ เก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง

ลักษณะของไข่แดง	ลักษณะคุณภาพไข่แดงที่ดี	<i>L. fermentum</i> SB 10
TI (mg/g)	1-3 mg/g	2.62 mg/g
ความเป็นกรด-ด่างของไข่แดง	3.5-4.2	3.4
กรดแลกติก (%)	3-13%	5.1%
DM,%fresh weight	65-70%	75%
Lactic acid bacteria	10^6 - 10^7 CFU/g	7.00×10^7 CFU/g

Woolford (1995) เสนอว่าการผลิตไข่แดงอาหารสัตว์ที่มีคุณภาพดีทำได้โดยการผลิตไข่แดงที่มีการเติมแบคทีเรียกรดแลกติก 10^6 - 10^7 CFU/g พี่ช

จากการที่ได้ศึกษา *L. fermentum* SB 10 นำไปหมักกากถั่วเหลืองดิบเพื่อเป็นไข่แดง พบว่า สภาวะเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักกากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนักทำการหมักที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินหลังจากหมักด้วยเชื้อลดลงเหลือ 2.62 มิลลิกรัมต่อกรัมของกากถั่วเหลือง ซึ่งตามมาตรฐานที่ยอมรับคือ ระหว่าง 1-3 มิลลิกรัมต่อกรัมของกากถั่วเหลือง ความเป็นกรด-ด่างของไข่แดงอยู่ระหว่าง 3.5-4.2 ไข่แดงที่หมักมีความเป็นกรด-ด่างที่ 3.4 ซึ่งความเป็นกรด-ด่างที่ลดลงจะทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดความเน่าเสียไม่สามารถเจริญได้ ปริมาณกรดแลกติกอยู่ที่ 5.1 เปอร์เซ็นต์ตามมาตรฐานของไข่แดงที่มีคุณภาพ ความชื้นของไข่แดงตามคุณภาพมาตรฐานอยู่ที่ 65-70 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง แต่กากถั่วเหลืองที่หมักด้วยเชื้อมีความชื้น 75 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่มีในไข่แดงเพื่อคุณภาพที่ดีจะอยู่ที่ 10^6 - 10^7 CFU/g ซึ่งเมื่อหมักได้ระยะเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า มีเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกอยู่ที่ 7.00×10^7 CFU/g (ตารางที่ 14)

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียกรดแลคติกจากกากถั่วเหลืองดิบ ศึกษาทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางกายภาพ และการทดสอบทางชีวเคมีตามหลักเกณฑ์จาก Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ได้แบคทีเรียกรดแลคติกไอโซเลท SBP 10 ที่มีความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน เกลี่ยสูงสุดคือ 35.59 เปอร์เซ็นต์ นำไปศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีน 16S rRNA เพื่อให้ทราบถึงระดับสปีชีส์ ผลการวิเคราะห์มีความคล้ายคลึงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของแบคทีเรียในฐานข้อมูลคือ *Lactobacillus fermentum* (100% similarity) และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการหมักกากถั่วเหลืองดิบ โดยมีการศึกษา 3 ปัจจัย ดังนี้ *L. fermentum* SB 10 ที่ปริมาณ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 0, 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และอุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสภาวะที่เหมาะสมในการหมักเชื้อ *L. fermentum* SB 10 ทำให้ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินลดลงเหลือ 2.62 มิลลิกรัมต่อกรัมกากถั่วเหลือง ที่ปริมาณเชื้อ 5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ใส่กากน้ำตาล 6 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามที่ Dale *et al.*, 1987 ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินระหว่าง 1-3 มิลลิกรัมต่อกรัมของกากถั่วเหลืองถือว่าอยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสมต่อการใช้กากถั่วเหลืองมาประกอบสูตรอาหารสัตว์

ข้อเสนอแนะ

1. แบคทีเรียกรดแลคติกได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมอาหารหมักหลายชนิดและในสกุล *Lactobacillus* หลายสายพันธุ์มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก มีสายพันธุ์ *L. fermentum* อยู่ในกลุ่มที่มีคุณสมบัติเป็นโพรไบโอติก จึงควรนำ *L. fermentum* SB 10 ไปศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรียที่เป็นโพรไบโอติก อันได้แก่ ทนต่อเอนไซม์จากตับอ่อน ทนต่อกรดและน้ำดี ยึดเกาะบริเวณเยื่อบุลำไส้ได้ดี พิสูจน์แล้วว่ามิประโยชน์ต่อสุขภาพ ปลอดภัย และเลี้ยงง่าย เพิ่มจำนวนได้เร็ว
2. นำเชื้อ *L. fermentum* ที่คัดแยกได้จากกากถั่วเหลืองดิบนำไปพัฒนาเป็นก้ำเชื้อในรูปแบบของ freeze-drying เพื่อความเหมาะสมในการนำไปใช้ประโยชน์
3. จากการทดลองนำเชื้อที่แยกได้จากกากถั่วเหลืองดิบที่ศึกษาคุณสมบัติการลดการทำงานของสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน จากที่คัดเลือกมีทั้งหมด 7 ไอโซเลท แต่การทดลองครั้งนี้เลือกมาเพียงหนึ่งไอโซเลท ซึ่งในอนาคตอาจจะทำการศึกษาการหมักไซเลทที่มีการใช้เชื้อผสมมากกว่า 1 ไอโซเลท

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- กฤติกา กาบพลอย. 2551. การศึกษาชนิดแบคทีเรียผลิตกรดแลคติกในกากมันสำปะหลังหมักและผล
การใช้กากมันสำปะหลังหมักเป็นสารเสริมชีวนะสำหรับลูกสุกรหย่านม. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชลัท ศานติวราภรณ์. 2542. การคัดแยก และการศึกษาคูณสมบัติของแบคทีเรียกรดแลคติกที่ผลิต
สารยับยั้งจากน้ำนมดิบในประเทศไทย. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- รติกร นัทรทอง. 2543. การศึกษาแบคทีเรียกรดแลคติกจากไข่แดงที่แสดงกิจกรรม β -galactosidase
และลักษณะทางพันธุกรรมของเชื้อ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ทองเลียน บัวจุม. 2541. การคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ย่อยสลายเพื่อใช้ในการปรับปรุง
คุณภาพพืชอาหารหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- พันทิพา พงษ์เพียจันทร์. 2547. หลักการอาหารสัตว์ 2. ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- ประสาน พรโสภณ. 2541. การใช้ความร้อนในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินในกากถั่วเหลือง
เพื่อใช้ประโยชน์เป็นอาหารปลากระดี่ (*Mystus nemurus* Cuv. & Val).
วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เขาวมาลย์ คำเจริญ. 2523. คู่มือปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์. ภาควิชาสัตวศาสตร์
คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.ขอนแก่น.
- สุพรรณิการ์ สมใจเพ็ง. 2544. การผลิตแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อใช้ในการหมักไข่แดง. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เสริมศักดิ์ มานะเลิศสกุล. 2546. การผลิตอาหารสัตว์จากกากมันสำปะหลังและกากน้ำตาลโดยการ
หมักแบบแห้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสมอใจ บุรินอก. 2551. รายงานการวิจัยการใช้แบคทีเรียกรดแลคติกที่มีในน้ำพืชหมักเป็นสารเสริมในหญ้าหมักเขตร้อน. คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน วิทยาเขตสกลนคร, สกลนคร.

วรลักษณ์ ตันติบรรพกุล. 2537. การถ่ายทอดลักษณะปราศจาก Kunitz trypsin inhibitor ในกากถั่วเหลือง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วราภรณ์ หิรัญวงษ์. 2550. คุณสมบัติที่เหมาะสมของแบคทีเรียกรดแลคติกต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ของไก่กระตัง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

วัชร นิลเพชร. 2553. การใช้กากถั่วเหลืองที่ผ่านการเอ็กซ์ทราคต์เป็นแหล่งโปรตีนไหลผ่านในโคนม. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อัจฉรา เพิ่ม. 2549. แบคทีเรียแลคติก. มหาวิทยาลัยราชภัฏสงขลา, กรุงเทพฯ.

อำนาจ เจริรัตน์. 2540. การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกเพื่อประสิทธิภาพการหมักไซเลจ. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อุทัย คันโธ. 2543. กระบวนการผลิตอาหารสัตว์. สาขาวิชาส่งเสริมการเกษตรและสหกรณ์, มหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช. นนทบุรี.

Almeida, E.G., C.C.T.C Rachid and R.F.Schwan. 2007 Microbial population present in fermented beverage cauim produced by Brazilian Amerindians. **Int.J.Food Microbiology** .120 : 146-151.

Association of Official Analytical Chemistry (AOAC). 1990. **Official Method of Analysis**. 15th ed., George Banto Co., Washington, D.C.

- Axelsson, L. 1998. Lactic acid bacteria : Classification and Physiology, pp. 1-72. *In* S. Saminen and A. von Wright (eds.). **Lactic acid bacteria : Microbiology and functions aspect.** 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Beisheir, L. 1991. **Microbiology in practice** 5th ed. Harper Collins publisher, Inc. New York.
- Bjore,M.,1996. Ensilling Process.Agric.Food and Rural Development. *In* www.agric.gov.ab.ca/crops/forage/silage2.html.
- Cecava,M.J. 1995.Silage and crop for silage,pp.117-137. *In* P.W.Tilden and M.J. Cecava (eds.). **Beef Cattle Feeding and Nutrition.** Academic Press,Inc.,London.
- Dale, N.M., A. Araba and E. Whittle.1987. Protein solubility as an indicator of optimum Processing of soybean meal, pp 88-95. **Proceeding of 1987 Georgia Nutrition Conference for the Feed Industry.**
- Dick, L. M., T. E. Dellaglio and M. D. Collins. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenostoc* as *Oenococcus oeni*. (corring). **Int. Syst. Bacteriol.** 45: 395-397.
- Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers, and F. Smith. 1956. Colorimetric method for determination of sugar and related substances. **Anal. Chem.** 28(3): 350-356.
- Hamerstrand, G.E., L.T.Black and J.D.Grover. 1981. Trypsin inhibitor in soy products: Modification of the standard analysis procedure. **Cereal Chem.** 58:42-45.
- Hammes, W.P., and R.F. Vogel. 1995. The genus *Lactobacillus*, pp. 19-54. *In* B.J.B. Wood and W. H. Holzapfel, eds. **The Lactic Acid Bacteria vol. 2: The Genera of Lactic Acid Bacteria.** Chapman & Hall, Glasgow, UK.

Harrigan, W. F. 1998. **Laboratory Method in Food Microbiology**. 3rd ed. Academic Press, New York, pp. 346-348.

Hill, J., G.Q.Xiao and A.S.Ball.2001. Effect of inoculation of herbage prior to ensiling with *Streptomyces achromogenes* ISP 5028 on chemical composition of silage. **Animal Feed Sci. Technol.** 89:83-96

Huffman, E.M., S. Muetzel and K.Becker.2003. The fermentation of soybean meal by rumen microbes in vitro reveals different kinetic features for the inactivation and the degradation of trypsin inhibitor protein. **Animal Feed Sci. Technol.** 106:189-197.

Jay, M. J. 1996. **Modern Food Microbiology**. 5th ed. International Thomson Publishing, New York, pp. 110-113.

Johnson, T.R. and C.L. Case. 1989. **Laboratory experiment in microbiology brief**, 2nd ed. Benjamin cumming publisher company, Inc. Rewood City. 354 p.

Kandler, O. and N. Weiss. 1986. Regular, non-sporing gram-positive rods, pp. 1208-1234. In Sneath P.H.A., ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Vol. 2**. Williams and Wilkins, Baltimore, USA.

Kanekar, P., N. Joshi, S. Sarnaik, and A. Kelkar. 1992. Effect of fermentation by lactic acid bacteria from soybean seeds on trypsin inhibitor activity. **Food Microbiol.** 9:245-249.

Kaznjs, N. (1968). Proteolytic activity of microorganisms isolated from freshwater fish. **J. Appl. Microbiol.** 16:128-132.

Krinsky, N.I. 1998. Carotenoid properties define primary biological action and metabolism defines Secondary biological actions, pp.323-332. *In* T. Ozben (ed.). **Free Radicals, Oxidation Stress and Antioxidants Pathological and Physiological Significance**. Plenum Press, London.

Lindsey, J.R. and L. Kung .2010. Effects of combining *Lactobacillus buchneri* 40788 with various lactic acid bacteria on the fermentation and aerobic stability of corn silage. **Animal Feed Sci. Technol.** 159 :105-109.

Lowry, O.H., N.J. Rosisbough, A.A. Fan and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin Phenol reagent. **J. Bio Chem.** 193: 265-275.

Muck, R.E. 1991. Silage fermentation. pp.171-204. *In* G. Zeikus and E.A. Johnson (eds.). **Mixed Cultures in Biotechnology**. McGraw-Hill, Inc., New York.

Salminen, S. and A. Wright. 1993. **Lactic acid bacteria**. Marcel Dekker, Inc., New York.

Schleifer, K. H. and W. Ludwig. 1995. Phylogenetic relationship of lactic acid bacteria, pp.7-19. *In* B. J. B. Wood and W. H. Holzappel (eds.). **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. 2nd ed. Blackie Academic & Professional, Glasgow.

Stiles, M.E. and W.H. Holzappel. 1997. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. **Int. Food Microbiol.** 36 : 1-29.

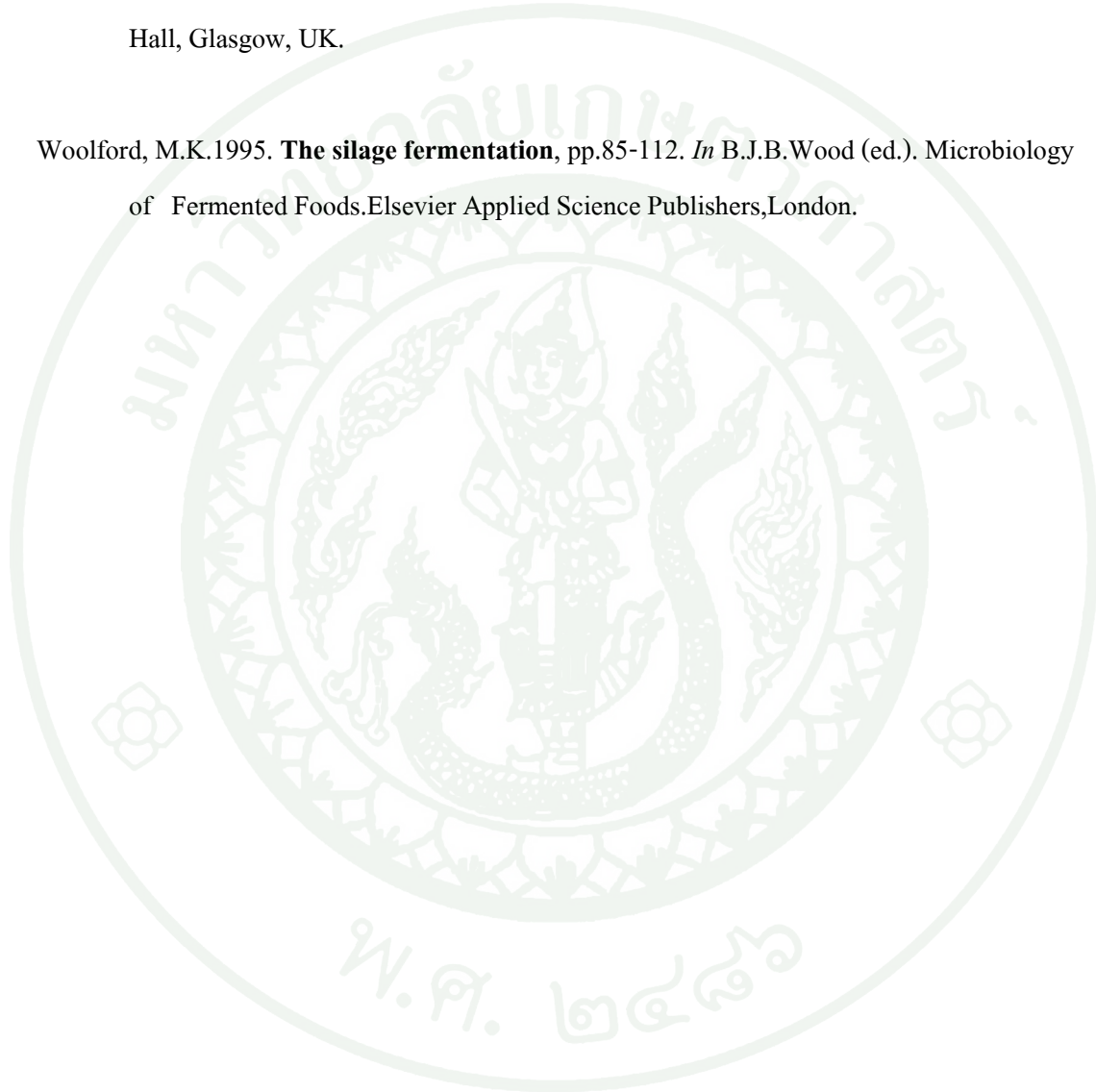
Siliker, J.H., R.P. Elliott, A.C. Baird Parker, F.L. Bryan, J.H.B. Christian, D.S. Clark, J.C. Olson and T.A. Reberdseds. 1980. **Microbiology of food vol. 1: Factor affecting life and death of microorganism**. Academic Press. London. 322 p.

Stokes, M.R. 1992. Effect of enzyme mixture, an inoculants and their interaction on silage fermentation and dairy production. **J. Dairy Sci.** 75: 765-773.

Wistreich, G.A. and M.D. Lechtman. 1980. **Laboratory exercise in microbiology**. 4th eds.
Macmillan publishing Co., Inc., New York. 420 p.

Wood, B.J. B. and W. H. Holzapfel. 1995. **The Genera of Lactic Acid Bacteria**. Chapman &
Hall, Glasgow, UK.

Woolford, M.K.1995. **The silage fermentation**, pp.85-112. *In* B.J.B.Wood (ed.). Microbiology
of Fermented Foods.Elsevier Applied Science Publishers,London.





ภาคผนวก



ภาคผนวก ก
อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS (de Man, Rogosa and Sharpe)

Peptone	10	กรัม
Beef extract	10	กรัม
Yeast extract	5	กรัม
Glucose	20	กรัม
Tween 80	1	มิลลิลิตร
K ₂ HPO ₄	2	กรัม
Sodium acetate	5	กรัม
Tri-ammonium citrate	2	กรัม
MgSO ₄	0.2	กรัม
MnSO ₄	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	กรัม
Agar*	1.5	เปอร์เซ็นต์

ปรับ pH อาหารเลี้ยงเชื้อเป็น 6.2 ± 0.5 ด้วยสารละลายไฮโดรคลอริกความเข้มข้น 2 นอร์มอล แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 10 นาที

หมายเหตุ : สำหรับการเตรียมอาหารแข็ง MRS มีการเติมแคลเซียมคาร์บอเนต 0.5 เปอร์เซ็นต์ หรือ bromocresol purple 0.004 เปอร์เซ็นต์

อาหารเลี้ยงเชื้อ Skim milk agar (SMA)

Skim milk	10.0	กรัม
Agar	15.0	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลาย Skim milk ในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Curde protein)

อุปกรณ์

1. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 1026 Kjeltac[®] System
2. hot plate
3. ปีกเกอร์
4. ขวดชมพู

สารเคมี

1. Sodium hydroxide, NaOH
2. Boric acid, H_3BO_3
3. Anhydrous sodium carbonate, Na_2CO_3
4. Bromocresol green
5. Methyl red
6. 95% Ethanol, C_2H_5OH
7. Concentrated sulfuric acid, H_2SO_4
8. Concentrated hydrochloric acid, HCl (เข้มข้น 37%)
9. Potassium sulphate, K_2SO_4
10. Copper sulphate, $CuSO_4$
11. Distilled water

วิธีการ

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย NaOH เข้มข้น 40 เปอร์เซนต์ เตรียมโดยละลาย NaOH 400 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. สารละลาย Bromocresol green เตรียมโดยละลาย Bromocresol green 0.1 กรัม ใน Ethanol 100 มิลลิลิตร
3. สารละลาย Methyl red เตรียมโดยละลาย Methyl red 0.1 กรัม ใน Ethanol 100 มิลลิลิตร
4. สารละลาย Boric acid เข้มข้น 4 เปอร์เซนต์ โดยละลาย Boric acid 400 กรัม ในน้ำกลั่น ประมาณ 6 ลิตร แล้วนำไปตั้งบน hot plate ต้มและคนจนละลายหมด จากนั้นให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ร้อนจนได้ปริมาตรประมาณ 9 ลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย Bromocresol green และสารละลาย Methyl red ลงไป 100 และ 70 มิลลิลิตรตามลำดับ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นและเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน
5. สารละลายกรดมาตรฐาน 0.1 N ไฮโดรคลอริก (HCl) เตรียมโดยตวงสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นมา 8.2 มิลลิลิตรแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร



การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก

การจัดจำแนกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแลกติก (Axelsson, 1998)

1. การทดสอบคาตาเลส

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกในอาหารแข็ง MRS เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำแผ่นสไลด์มา 1 แผ่น หยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 3 เปอร์เซ็นต์ 1-2 หยด เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกมา 1 ลูบ ขยี้บนแผ่นสไลด์ที่มีสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์อยู่ ถ้ามีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นบวก (catalase positive) ถ้าไม่มีฟองอากาศเกิดขึ้นแสดงว่าให้ผลเป็นลบ (catalase negative) นำเชื้อที่ให้ผลเป็นลบไปย้อมแกรมเพื่อดูรูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ต่อไป

2. การตรวจสอบการติดสีแกรม

เชื้อบริสุทธิ์ลงบนแผ่นสไลด์ที่แห้งและสะอาด ซึ่งมีหยดน้ำกลั่น 1 หยด สเมียร์เชื้อให้เป็นวง ปล่อยให้รอยสเมียร์แห้ง และตรึงเซลล์โดยนำแผ่นสไลด์ผ่านเปลวไฟจนแห้ง นำมาย้อมด้วยสารละลายคริสตัลไวโอเลตเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายส่วนเกินทิ้ง พร้อมทั้งหยดสารละลายไอโอดีนให้ท่วมเป็นเวลา 1 นาที เทสารละลายไอโอดีนทิ้ง ล้างรอยสเมียร์เพื่อกำจัดคริสตัลไวโอเลตส่วนเกินด้วยแอลกอฮอล์ 95 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นล้างแผ่นสไลด์ด้วยน้ำกลั่น หยดสารละลาย safranin O เป็นเวลา 1 นาที ล้างสารละลายส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น ปล่อยให้แผ่นสไลด์แห้ง นำไปศึกษารูปร่างของเซลล์ และการจัดเรียงตัวของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3. การตรวจสอบการสร้างแก๊ส

เตรียมอาหารเหลว MRS ลงในหลอดทดลอง ใส่หลอดดักแก๊ส นำไปฆ่าเชื้อ เชื้อแบคทีเรียกรดแลกติก 1 ลูบ ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ตรวจสอบผลการทดลองโดยดูการเกิดแก๊สที่เกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส ถ้ามีแก๊สเกิดขึ้นในหลอดดักแก๊ส แสดงว่าแบคทีเรียที่ทดสอบเป็นแบคทีเรียที่มีการสร้างกรดแบบ heterofermentative ส่วนแบคทีเรียที่มีการสร้างกรดแบบ homofermentative จะไม่พบแก๊สในหลอดดักแก๊ส

4. การทดสอบการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ

เจียเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียกรดแลกติกที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS นาน 24 ชั่วโมงมา 1 โคโลนี เลี้ยงในอาหารเหลว MRS จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 15 และ 45 องศาเซลเซียส ดูการเจริญและการสร้างกรดของเชื้อที่อายุการบ่ม 24 ชั่วโมง และ 7 วัน

5. การทดสอบความทนเกลือ

เตรียมอาหารเหลว MRS ที่มีความเข้มข้นของเกลือโซเดียมคลอไรด์ 10 เปอร์เซ็นต์ (น้ำหนักต่อปริมาตร) เจียเชื้อแบคทีเรียกรดแลกติกที่เจริญบนอาหารแข็ง MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มา 1 ลูบ นำมาเลี้ยงในอาหารเหลว จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบการเจริญของเชื้อที่อายุการบ่ม 24 ชั่วโมง และ 7 วัน

6. การทดสอบความสามารถในการเจริญที่ค่าความเป็นกรด-ด่าง 4.5 และ 9.6

เตรียมอาหารเหลว MRS ให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 โดยใช้ sodium acetate และ acetic acid การเตรียมประกอบด้วยใช้ acetic acid ความเข้มข้น 0.2 M จำนวน 30.5 มิลลิลิตร (ใช้ acetic acid เข้มข้น จำนวน 11.55 มิลลิลิตร ผสมลงในน้ำกลั่น จนได้ปริมาตรเท่ากับ 1,000 มิลลิลิตร) ผสมกับสารละลาย sodium acetate ความเข้มข้น 0.2 M จำนวน 19.5 มิลลิลิตร นำส่วนผสมทั้งสองชนิด (acetic acid 30.5 มิลลิลิตร และ sodium acetate 19.5 มิลลิลิตร) ไปเจือจางโดยเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 100 มิลลิลิตร สำหรับใช้เป็นสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเตรียมอาหารเหลวแทนน้ำกลั่น วัดค่าความเป็นกรด-ด่างโดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารต่ำกว่า 4.5 ให้ใช้สารละลาย sodium acetate เป็นตัวปรับ และถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างสูงกว่า 4.5 ให้ใช้สารละลาย acetic acid เป็นตัวปรับจนได้ค่า ความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.5 ตามต้องการ

การเตรียมอาหารเหลว MRS ให้มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 9.6 โดยใช้ glycine buffer ซึ่งเตรียมโดยใช้สารละลาย glycine ความเข้มข้นเท่ากับ 0.2 M จำนวน 50 มิลลิลิตร (ซึ่ง glycine จำนวน 15.01 กรัม ละลายน้ำจนได้ปริมาตรเป็น 1,000 มิลลิลิตร) ผสมกับสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ ความเข้มข้น 0.2 M จำนวน 4 มิลลิลิตร จากนั้นเจือจางโดยเติมน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรเป็น 200 มิลลิลิตร ใช้สารละลายดังกล่าวเป็นสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับเตรียมอาหารเหลวแทนน้ำกลั่น วัดค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหาร โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรด-ด่าง ถ้าค่าความเป็นกรด-ด่างของ

อาหารต่ำกว่า 8.6 ให้ใช้สารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เป็นตัวปรับจนได้ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.6 ตามต้องการ

7. การทดสอบการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ในการสร้างกรด

ใช้อาหารเหลวสูตร MRS ที่ไม่เติมกลูโคสและ meat extract เป็นอาหารพื้นฐาน เติม chlorophenol red เป็นอินดิเคเตอร์ จนได้ความเข้มข้น 0.004 เปอร์เซ็นต์ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที น้ำตาลที่เติมลงไปในการอาหารพื้นฐานก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อได้แก่ เซลลโลไบโอส, เด็กทริน, แลคโตส, ราฟฟิโนส, แรมโนส, ซูโครส และเทรฮาโลส ส่วนน้ำตาลบางชนิดที่จะสลายตัวเมื่อถูกความร้อน ได้แก่ อะราบิโนส, มอลโทส และไซโลส ต้องฆ่าเชื้อโดยการกรองด้วยเครื่องกรองแบบที่เรียกว่ามีขนาดของรูกรองเท่ากับ 0.45 ไมโครเมตร แล้วจึงนำไปเติมในอาหารพื้นฐาน ให้มีความเข้มข้นของน้ำตาลชนิดต่าง ๆ เท่ากับ 0.5 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารที่ทดสอบเท่ากับ 6.5 การทดสอบให้เชื้อที่เจริญบนอาหารแข็งสูตร MRS เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจำนวน 1 ลูก ไปเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลชนิดต่าง ๆ ละลายอยู่ จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลภายใน 2 วันและ 7 วัน ถ้าเชื้อที่ใช้ทดสอบชนิดใดใช้น้ำตาลในการสร้างกรด อาหารที่ทดสอบจะเปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลืองแสดงว่าการทดสอบให้ผลเป็นบวก แต่ถ้าไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงแสดงว่าการทดสอบให้ผลเป็นลบ

การวิเคราะห์ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (ดัดแปลงจาก standard AACC (Hamerstrand *et al.*, 1981))

วิธีการนี้ได้ดัดแปลงจากวิธีของ standard AACC โดย Hamerstrand, G.E, L.T. Black and J.D. Grover. 1981. ซึ่งพยายามดัดแปลงส่วนที่เป็นข้อบกพร่องให้หมดไป หลักการก็คือจะใช้ สับสเตรท สังเคราะห์ (BAPA : bezoyl-DL-arginine-p-nitroanalide hydrochloride) ซึ่งการวัดปริมาณทริปซินอินฮิบิเตอร์ในตัวอย่างจะใช้สารละลายทริปซินทำปฏิกิริยากับทริปซินอินฮิบิเตอร์ (ตัวยับยั้งทริปซิน) ในตัวอย่างก่อนแล้วจึงใช้ BAPA เป็น substrate ในการวัดปริมาณทริปซินที่เหลือจากการถูกยับยั้งโดยทริปซินที่เหลือจากการถูกยับยั้งโดยสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ซึ่งจะวัดค่าความแตกต่างด้วยค่าการดูดซับแสงของสารละลายโดยใช้สเปกโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร

ตัวอย่างกากถั่วเหลือง 1 กรัม จะถูกสกัดด้วย 50 มิลลิลิตร ของ 0.01 N NaOH (ปรับ pH ให้ อยู่ระหว่าง 8.4 – 10.0) และดูสารละลายส่วนที่ใส่ไปวิเคราะห์หาปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ ทริปซิน ต่อไป

1.เติมสารละลายตัวอย่างที่สกัดแล้วลงในหลอดทดลองจำนวน 2 มิลลิลิตร 4 หลอด ส่วน หลอดที่ 5 เติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เพื่อเป็นสารละลายทริปซินมาตรฐาน

2.เติมสารละลายทริปซินลงในหลอดที่ 1, 2, 3 และหลอดที่ 5 จำนวน 2 มิลลิลิตร หลังจากนั้นอุ่นที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ส่วนหลอดที่ 4 จะเป็น Sample blank

3.เติมสารละลาย BAPA (อุ่นที่ 37 องศาเซลเซียสก่อนใช้) อย่างรวดเร็วในทุกหลอดจำนวน 5 มิลลิลิตร พร้อมทั้งคนอย่างสม่ำเสมอ หลังจากนั้นทุกหลอดเติม 1 มิลลิลิตร ของ 30% acetic acid พร้อมทั้งคนอย่างสม่ำเสมอ

4.ส่วนหลอดที่ 4 จะเป็น Sample blank ซึ่งจะเตรียมเหมือนกับหลอดที่ใส่สารละลาย ตัวอย่าง แต่จะเติมสารละลายทริปซินภายหลังที่ปฏิกิริยาของการเติม acetic acid สิ้นสุดลง (ประมาณ 10 นาทีหลังเติม acetic acid)

5.สารละลายที่ได้จะนำไปวัดค่าการดูดซับแสงที่ตามความยาวคลื่น 410 นาโนเมตร และ ค่าที่ได้ของตัวอย่างจะเปรียบเทียบกับ Sample blank ซึ่งค่าที่ได้หลังจากหักลบจากค่า trypsin standard แล้วทั้ง 3 ค่า จะเป็นค่าเฉลี่ยแล้วนำไปคำนวณดังสูตร

$$TI, \text{mg/g ของตัวอย่าง} = \frac{A_{std} - A_{sam}}{A_{std}} \times \text{dilution factor}$$

การวิเคราะห์ไขมัน

1. การวิเคราะห์ปริมาณวัตถุแห้ง (dry matter, DM)

นำถ้วยหรือภาชนะอลูมิเนียมพร้อมฝาปิดที่ได้ทำการอบแห้งที่อุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส และชั่งน้ำหนักจนได้น้ำหนักถ้วยที่แน่นอน (X) บรรจุตัวอย่างน้ำหนัก 5 กรัม (W) ลงในถ้วย จากนั้นนำถ้วยพร้อมตัวอย่างไปอบแห้งในตู้อบอุณหภูมิ 105 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งน้ำหนักแห้งมีค่าคงที่ ชั่งน้ำหนักแห้งที่อบได้ (Y) นำไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง

$$\text{เปอร์เซ็นต์วัตถุแห้ง} = \frac{(Y-X)}{W} \times 100$$

2. การวิเคราะห์ระดับความเป็นกรดต่าง

ใช้ตัวอย่าง 25 กรัม เติมน้ำกลั่น 75 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง นำส่วนใสที่ได้จากการกรองไปวัดความเป็นกรดต่าง

3. การวิเคราะห์ปริมาณกรดแลกติก

ปั่นเหวี่ยงแยกเซลล์จากอาหารเหลว MRS ด้วยความเร็ว 9,000 รอบต่อนาที ดูดสารละลายใสปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ เติมน้ำกลั่นปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมน้ำกลั่นปราศจากคาร์บอนไดออกไซด์ปริมาตร 1-2 หยดไทเทรตด้วยสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ 0.1 นอร์มอล จนกระทั่งถึงจุดยุติ (เปลี่ยนเป็นสีชมพู) คำนวณปริมาณกรดแลกติกโดยสมการ

$$\begin{aligned} \text{ปริมาณกรดแลกติก} &= \frac{(N \times V_1 \times 90.08 \times 100)}{1000 \times V_2} \\ (\text{กรัมกรดแลกติกต่อลิตร}) \end{aligned}$$

N = ความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ (นอร์มัล)

V₁ = ปริมาตรของสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต (มิลลิลิตร)

V₂ = ปริมาตรของสารตัวอย่างที่ใช้ (มิลลิลิตร/กรัม)

4. การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน (Curde protein)

อุปกรณ์

1. เครื่องวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน 1026 Kjeltec[®] System
2. hot plate
3. ปีกเกอร์
4. ขวดชมพู

สารเคมี

1. Sodium hydroxide, NaOH
2. Boric acid, H_3BO_3
3. Anhydrous sodium carbonate, Na_2CO_3
4. Bromocresol green
5. Methyl red
6. 95% Ethanol, C_2H_5OH
7. Concentrated sulfuric acid, H_2SO_4
8. Concentrated hydrochloric acid, HCl (เข้มข้น 37%)
9. Potassium sulphate, K_2SO_4
10. Copper sulphate, $CuSO_4$
11. Distilled water

วิธีการ

การเตรียมสารเคมี

1. สารละลาย NaOH เข้มข้น 40 % เตรียมโดยละลาย NaOH 400 กรัม ในน้ำกลั่น 1 ลิตร
2. สารละลาย Bromocresol green เตรียมโดยละลาย Bromocresol green 0.1 กรัม ใน

Ethanol 100 มิลลิลิตร

3. สารละลาย Methyl red เตรียมโดยละลาย Methyl red 0.1 กรัมใน Ethanol 100 มิลลิลิตร

4. สารละลาย Boric acid เข้มข้น 4 % โดยละลาย Boric acid 400 กรัม ในน้ำกลั่นประมาณ 6 ลิตร แล้วนำไปตั้งบน hot plate ต้มและคนจนละลายหมด จากนั้นให้ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นที่ร้อนจนได้ปริมาตรประมาณ 9 ลิตร ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วเติมสารละลาย Bromocresol

green และสารละลาย Methyl red ลงไป 100 และ 70 มิลลิลิตรตามลำดับ ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ลิตร ด้วยน้ำกลั่นและเขย่าให้เป็นเนื้อเดียวกัน

5. สารละลายกรดมาตรฐาน 0.1 N ไฮโดรคลอริก (HCl) เตรียมโดยตวงสารละลายกรด ไฮโดรคลอริกเข้มข้นมา 8.2 มิลลิลิตรแล้วเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้เป็น 1 ลิตร

วิธีการวิเคราะห์

ชั่งตัวอย่างบดละเอียด 0.5 กรัม (จดน้ำหนักที่แน่นอน) ใส่ลงใน digestion tube เติม K_2SO_4 และ $CuSO_4$ ในอัตราส่วน 1:10 จำนวน 2 กรัม แล้วเติม Concentrated H_2SO_4 15 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ นำ digestion tube ไปย่อยใน 2006 Digester ที่อุณหภูมิ 420 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จนได้สารละลายที่ใส ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น นำไปกลั่นด้วย 1026 Distillation unit โดยให้สารละลายกรด บอริกเข้มข้น 4 % ปริมาตร 25 มิลลิลิตร เป็นตัวจับไนโตรเจนที่ปลายเครื่องกลั่น นำส่วนที่กลั่นได้ ไปไตเตรทกับสารละลายกรดมาตรฐาน HCl 0.1 N ซึ่งบรรจุอยู่ใน titration unit จนได้สารละลาย เป็นสีม่วงอมเทา ทำการวิเคราะห์ควบคู่ไปกับการใช้น้ำกลั่นปริมาตร 1 มิลลิลิตร แทนตัวอย่าง (blank) คำนวณผลการวิเคราะห์ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} = \frac{(A-B) \times 0.014 \times N \times 100}{W}$$

A = ปริมาตรของสารละลายกรดมาตรฐาน HCl 0.1 N ที่ไตเตรทกับตัวอย่าง

B = ปริมาตรของสารละลายกรดมาตรฐาน HCl 0.1 N ที่ไตเตรทกับ blank

N = Normality ของสารละลายกรดมาตรฐาน HCl

W = น้ำหนักของตัวอย่าง

$$\text{เปอร์เซ็นต์โปรตีน} = \text{เปอร์เซ็นต์ไนโตรเจน} \times 6.25$$



ภาคผนวก ค
ข้อมูลการทดลอง

ตารางผนวกที่ ค1 การทดสอบกิจกรรมการย่อยโปรตีนของเชื้อที่แยกได้จากกากถั่วเหลืองดิบ

รหัสเชื้อ	รูปร่าง	ศูนย์กลางโคโลนี(A)	ศูนย์กลางเคลียร์โซน (B)	อัตราส่วน(B/A)
SB 3	rod	0.6,0.5,0.6,0.6	1.0,1.0,1.3,1.5	2.09
SB 10	rod	0.5,0.4,0.5,0.5	1.5,1.1,0.9,0.9	2.32
SB 16	rod	0.6,0.6,0.7,0.5	1.2,1.2,1.5,1.3	2.17
SB 20	rod	0.5,0.6,0.6,0.5	1.3,1.2,1.1,1.1	2.14
SB 24	rod	0.7,0.5,0.5,0.6	1.6,1.0,1.1,1.3	2.17
SB 43	rod	0.6,0.7,0.5,0.5	1.3,1.4,1.0,1.4	2.22
SB 45	rod	0.6,0.6,0.6,0.5	1.5,1.3,1.2,1.3	2.30

ตารางผนวกที่ ค2 การลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบ โดยใช้เชื้อ *L.fermentum* SB10 ที่ใช้ปริมาณเชื้อที่ 1,5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 0,3,6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส

ปริมาณเชื้อ (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก)	ปริมาณกากน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนัก)	ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (mg/g) ครั้งที่		
		1	2	3
1	0	8.08	8.92	8.89
	3	8.12	8.37	8.45
	6	7.27	8.10	7.82
	9	8.37	8.32	7.95
5	0	8.62	8.40	8.13
	3	8.25	8.42	8.54
	6	5.14	5.59	5.10
	9	6.53	6.64	6.86
10	0	8.86	8.34	8.10
	3	8.19	8.28	8.75
	6	6.89	6.20	6.60
	9	8.26	8.25	7.66

ตารางผนวกที่ ค3 การลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบ โดยใช้เชื้อ *L.fermentum* SB10 ที่ใช้ปริมาณเชื้อที่ 1,5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 0,3,6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

ปริมาณเชื้อ (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก)	ปริมาณกากน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนัก)	ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (mg/g) ครั้งที่		
		1	2	3
1	0	8.76	8.28	8.12
	3	8.00	7.56	7.25
	6	7.22	7.52	7.90
	9	7.48	7.6	7.75
5	0	7.11	7.65	7.48
	3	5.24	5.00	5.47
	6	2.45	2.94	2.46
	9	3.51	4.13	4.00
10	0	7.21	6.78	8.25
	3	6.10	6.22	5.20
	6	4.25	4.44	4.65
	9	5.12	5.27	5.55

ตารางผนวกที่ ค4 การลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซินที่ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบ โดยใช้เชื้อ *L.fermentum* SB10 ที่ใช้ปริมาณเชื้อที่ 1,5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 0,3,6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส

ปริมาณเชื้อ (เปอร์เซ็นต์ โดยน้ำหนัก)	ปริมาณกากน้ำตาล (เปอร์เซ็นต์โดย น้ำหนัก)	ปริมาณสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (mg/g) ครั้งที่		
		1	2	3
1	0	8.62	8.58	8.65
	3	7.21	8.62	7.35
	6	7.21	7.66	7.45
	9	6.22	6.35	6.36
5	0	7.76	7.67	7.25
	3	5.66	6.15	6.25
	6	4.45	4.85	5.76
	9	4.32	5.24	5.57
10	0	8.21	8.65	7.98
	3	5.25	6.89	6.64
	6	4.55	5.28	5.65
	9	6.65	5.7	5.59

ตารางผนวกที่ ค5 การวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติของการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน ที่ศึกษาสภาวะการหมักกากถั่วเหลืองดิบ โดยใช้เชื้อ *L. fermentum* SB10 ที่ใช้ปริมาณเชื้อที่ 1,5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 0, 3, 6 และ 9 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 30, 37 และ 45 องศาเซลเซียส

SOV	DF	SS	MS	F-Value	Pr > F
ปริมาณเชื้อ (A)	2	61.65	30.82	142.56	< 0.001
ปริมาณกากน้ำตาล (B)	3	82.77	27.59	127.59	< 0.001
อุณหภูมิ (C)	6	16.94	2.82	13.06	< 0.001
AxB	2	54.98	27.49	127.13	< 0.001
AxC	4	15.54	3.88	17.97	< 0.001
BxC	6	11.73	1.95	9.05	< 0.001
AxBxC	12	6.32	0.52	2.44	0.0039
Error	72	15.57	0.21		

CV = 6.79 %

ตารางผนวกที่ ๑๖ การหมักกากถั่วเหลืองดิบโดยใช้เชื้อ *L.fermentum* SB10 ที่ใช้ปริมาณเชื้อที่ 1, 5 และ 10 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก ปริมาณกากน้ำตาล 5, 6 และ 7 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก และทำการเก็บบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

ปริมาณ เชื้อ	ปริมาณ กากน้ำตาล	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	LAB(CFU/ml)		
			24	36	48
1	5	37	1.49×10^7	1.10×10^6	1.00×10^6
		45	3.78×10^6	3.42×10^6	2.55×10^6
		50	3.59×10^6	2.75×10^6	2.19×10^6
1	6	37	1.84×10^6	1.44×10^6	1.35×10^6
		45	3.81×10^6	3.10×10^6	2.82×10^6
		50	2.88×10^6	2.65×10^6	2.21×10^6
1	7	37	4.19×10^7	3.85×10^6	3.27×10^6
		45	2.55×10^6	2.00×10^6	3.55×10^6
		50	2.63×10^6	2.18×10^6	1.79×10^6
5	5	37	3.48×10^7	3.11×10^7	3.00×10^7
		45	3.10×10^7	2.95×10^7	2.82×10^7
		50	2.14×10^7	3.44×10^6	3.11×10^6
5	6	37	3.94×10^7	3.45×10^7	3.40×10^7
		45	3.10×10^6	3.00×10^6	2.92×10^6
		50	2.14×10^6	2.10×10^6	2.08×10^6
5	7	37	3.49×10^7	3.20×10^7	3.11×10^7
		45	2.58×10^6	2.19×10^6	2.10×10^6
		50	2.11×10^6	2.11×10^6	1.98×10^6

ตารางผนวกที่ ค6 (ต่อ)

ปริมาณ เชื้อ	ปริมาณ กากน้ำตาล	อุณหภูมิ (องศาเซลเซียส)	LAB(CFU/ml)		
			24	36	48
10	5	37	4.43×10^7	4.30×10^7	4.00×10^7
		45	3.55×10^6	3.62×10^6	3.25×10^6
		50	3.78×10^6	3.70×10^6	2.96×10^6
10	6	37	3.45×10^7	3.20×10^7	2.90×10^7
		45	3.21×10^6	2.89×10^6	2.82×10^6
		50	2.38×10^6	2.05×10^5	2.21×10^4
10	7	37	3.19×10^7	3.15×10^7	3.00×10^6
		45	2.55×10^6	2.10×10^5	2.15×10^4
		50	2.23×10^6	2.08×10^5	2.79×10^4

ตารางผนวกที่ ๗ ผลการทดสอบความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน

ไอโซเลต	ความสามารถในการลดสารยับยั้งเอนไซม์ทริปซิน (%)			
	1	2	3	ค่าเฉลี่ย
SB 3	14.28	14.83	14.74	14.61
SB 10	35.91	35.64	35.23	35.59
SB 16	24.89	25.84	26.51	25.74
SB 20	21.22	22.27	22.03	21.84
SB 24	14.28	18.22	17.50	16.66
SB 43	10.61	11.01	11.74	11.12
SB 45	26.23	29.66	29.20	28.36

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวปรีชาติ ศรีระพันธุ์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	7 มีนาคม พ.ศ.2521
สถานที่เกิด	อ.หัวหิน จ.ประจวบคีรีขันธ์
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต ชีววิทยาประยุกต์ สถาบันราชภัฏเพชรบุรี
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	เจ้าหน้าที่วิเคราะห์สิ่งแวดล้อม
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	สำนักประสานงานวิจัยโครงการด้านอ้อยและน้ำตาล
ผลงานทางวิชาการ	Isolation, Screening and Identification of Lactic Acid Bacteria with Trypsin Inhibitor Ability from Raw Soybean Pulp. Proceeding: The Proceeding of 49 th Kasetsart University Annual Conference. 2011, Thailand.