

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลการแยกแบคทีเรียแลคติกและผลการทดสอบคุณสมบัติของแบคทีเรียแลคติกในการเป็น homofermentative หรือ heterofermentative

คัดเลือกเชื้อที่เจริญ โดยเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีเขียวไปเป็นสีเหลืองในอาหารเหลว (รูป 4.1) มาแยกบนอาหารแข็ง (รูป 4.2) พบว่า สามารถแยกแบคทีเรียแลคติก ได้ทั้งหมดจำนวน 120 ไอโซเลต แบ่งเป็น cocci จำนวน 95 ไอโซเลต และ bacilli จำนวน 25 ไอโซเลต ซึ่งเมื่อนำไปทดสอบคุณสมบัติในการหมัก พบว่า มีเพียง 5 ไอโซเลตเท่านั้นที่มีโคโคไลน์เป็นสีเขียวบนอาหารแข็ง HHD (รูป 4.3) ซึ่งจัดเป็น homofermentative ดังแสดงในตาราง 4.1



รูป 4.1 การเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ของอาหารเหลว MRS

(a) อาหารเหลว MRS

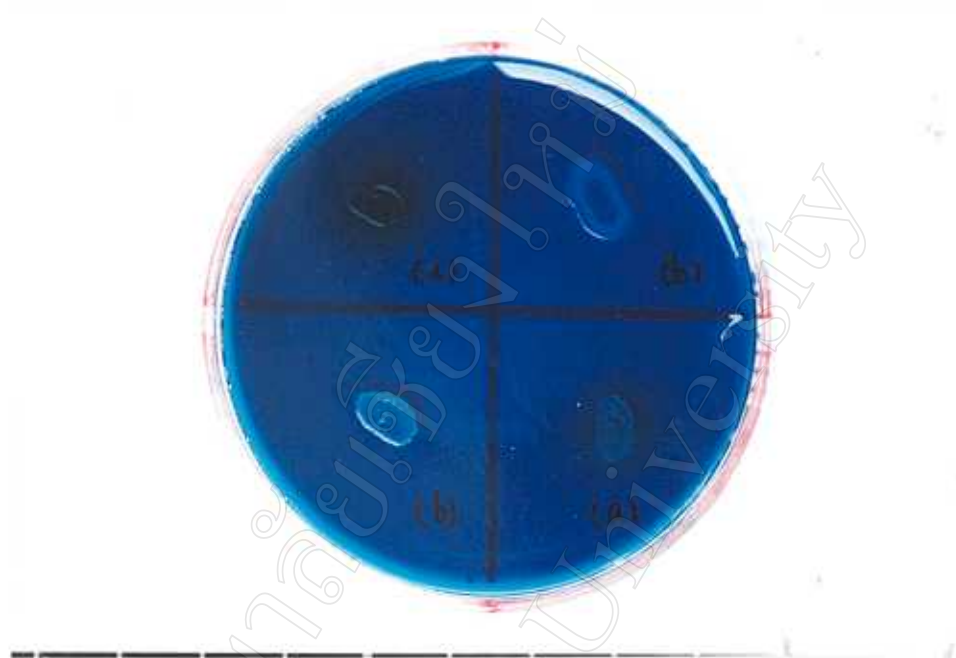
(b) สีอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหลังจากใส่ตัวอย่างอาหารและบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูป 4.2 การเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์บนอาหารแข็ง MRS

(a) อาหารเหลว MRS

(b) สีอาหารเปลี่ยนเป็นสีเหลืองหลังจากใส่ตัวอย่างอาหารและบ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง



รูป 4.3 แสดงการเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์บนอาหารแข็ง HHD

- (a) Homofermentative โคโตนิสีเขียว
- (b) Heterofermentative โคโตนิสีขาว

ตาราง 4.1 แบคทีเรียแลคติกที่แยกได้จำนวน 120 ไอโซเลท

ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งอาหาร	การติดสีกรัม	รูปร่าง	คุณสมบัติในการหมัก
1	LABc001	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
2	LABc002	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
3	LABc003	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
4	LABc004	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
5	LABc005	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
6	LABc006	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
7	LABc007	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
8	LABc008	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
9	LABc009	มะขามทอง	+	กลม	homofermentative
10	LABc010	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
11	LABc011	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
12	LABc012	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
13	LABc013	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
14	LABc014	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
15	LABc015	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
16	LABc016	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
17	LABc017	ถั่วเน่าสด	+	กลม	heterofermentative
18	LABc018	ถั่วเน่าสด2	+	กลม	heterofermentative
19	LABc019	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
20	LABc020	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
21	LABc021	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
22	LABc022	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
23	LABc023	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
24	LABc024	ขนมจีน	+	กลม	heterofermentative
25	LABc025	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
26	LABc026	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
27	LABc027	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
28	LABc028	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
29	LABc029	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
30	LABc030	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative

ตาราง 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งอาหาร	การติดสีกรัม	รูปร่าง	คุณสมบัติในการหมัก
31	LABc031	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
32	LABc032	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
33	LABc033	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
34	LABc034	หญ้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
35	LABc035	ถั่วเน่าแผ่นหางคด	+	กลม	heterofermentative
36	LABc036	ถั่วเน่าแผ่นหางคด2	+	กลม	heterofermentative
37	LABc037	ถั่วเน่าแผ่นหางคด3	+	กลม	heterofermentative
38	LABc038	ถั่วเน่าแผ่นหางคด4	+	กลม	homofermentative
39	LABc039	ถั่วเน่าแผ่นหางคด4	+	กลม	heterofermentative
40	LABc040	ແໝ້ນ	+	กลม	homofermentative
41	LABc041	ขนมจีน1	+	กลม	heterofermentative
42	LABc042	ขนมจีน1	+	กลม	heterofermentative
43	LABc043	ขนมจีน1	+	กลม	heterofermentative
44	LABc044	ขนมจีน2	+	กลม	heterofermentative
45	LABc045	ขนมจีน2	+	กลม	heterofermentative
46	LABc046	ปลาร้าคดยเค่า	+	กลม	heterofermentative
47	LABc047	ແໝ້ນ3	+	กลม	heterofermentative
48	LABc048	ແໝ້ນ4	+	กลม	heterofermentative
49	LABc049	กะป็นครสวรค์1	+	กลม	heterofermentative
50	LABc050	หน่อไม้คอง2	+	กลม	heterofermentative
51	LABc051	หน่อไม้คด	+	กลม	heterofermentative
52	LABc052	กะป็นครสวรค์2	+	กลม	heterofermentative
53	LABc053	ไขโป๊หวาน1	+	กลม	heterofermentative
54	LABc054	ແໝ້ນวิภาดา	+	กลม	heterofermentative
55	LABc055	ไขโป๊หวานฝอย	+	กลม	heterofermentative
56	LABc056	หน่อไม้คอง1	+	กลม	heterofermentative
57	LABc057	น้ำปลาหมัก	+	กลม	heterofermentative
58	LABc058	น้ำปลาหมัก	+	กลม	heterofermentative
59	LABc059	น้ำปลา1	+	กลม	heterofermentative
60	LABc060	น้ำปลา1	+	กลม	heterofermentative

ตาราง 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งอาหาร	การติดสีกรัม	รูปร่าง	คุณสมบัติในการหมัก
61	LABc061	กะปิ	+	กลม	heterofermentative
62	LABc062	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
63	LABc063	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
64	LABc064	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
65	LABc065	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
66	LABc066	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
67	LABc067	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
68	LABc068	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
69	LABc069	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
70	LABc070	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
71	LABc071	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
72	LABc072	หอย้าหมัก	+	กลม	homofermentative
73	LABc073	นมสตรอเบอร์รี่ อสค	+	กลม	heterofermentative
74	LABc074	นมหวาน อสค	+	กลม	heterofermentative
75	LABc075	ปลาร้า2	+	กลม	heterofermentative
76	LABc076	ปลาร้า2	+	กลม	heterofermentative
77	LABc077	ใบเมี่ยงสด	+	กลม	heterofermentative
78	LABc078	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
79	LABc079	น้ำพริกกะปิ	+	กลม	heterofermentative
80	LABc080	ผักกาดคอง	+	กลม	heterofermentative
81	LABc081	น้ำพริกกะปิ2	+	กลม	heterofermentative
82	LABc082	ແໜມເຢື່ອງເໜືອ	+	กลม	heterofermentative
83	LABc083	หอย้าหมัก	+	กลม	heterofermentative
84	LABc084	ปลาสาม	+	กลม	heterofermentative
85	LABc085	กะปิหางคง	+	กลม	heterofermentative
86	LABc086	กระเทียมคอง	+	กลม	heterofermentative
87	LABc087	ขนมจีน	+	กลม	heterofermentative
88	LABc088	น้ำพริกกะปิ	+	กลม	heterofermentative
89	LABc089	น้ำพริกกะปิ1	+	กลม	heterofermentative
90	LABc090	ฝรั่งคอง	+	กลม	heterofermentative

ตาราง 4.1 (ต่อ)

ลำดับที่	ไอโซเลท	แหล่งอาหาร	การติดสีกรัม	รูปร่าง	คุณสมบัติในการหมัก
91	LABc091	ฝรั่งคอง2	+	กลม	heterofermentative
92	LABc092	แฮมม1	+	กลม	heterofermentative
93	LABc093	แฮมม2	+	กลม	heterofermentative
94	LABc094	แฮมมหม้อ	+	กลม	heterofermentative
95	LABc095	แฮมมเห็ด	+	กลม	heterofermentative
96	LABb001	หญาหมัก	+	ท่อน	heterofermentative
97	LABb002	หญาหมัก	+	ท่อน	heterofermentative
98	LABb003	ถั่วเน่าสด	+	ท่อน	heterofermentative
99	LABb004	กะปิ1	+	ท่อน	heterofermentative
100	LABb005	ไชโป๊	+	ท่อน	heterofermentative
101	LABb006	ไชโป๊	+	ท่อน	heterofermentative
102	LABb007	น้ำปลาหมัก	+	ท่อน	heterofermentative
103	LABb008	ปลาร้า1	+	ท่อน	heterofermentative
104	LABb009	ปลาร้า3	+	ท่อน	heterofermentative
105	LABb010	ปลาร้า3	+	ท่อน	heterofermentative
106	LABb011	หญาหมัก	+	ท่อน	heterofermentative
107	LABb012	หญาหมัก	+	ท่อน	heterofermentative
108	LABb013	เต้าเจี้ยว	+	ท่อน	heterofermentative
109	LABb014	กะปิ2	+	ท่อน	heterofermentative
110	LABb015	กะปิ2	+	ท่อน	homofermentative
111	LABb016	กะปิ3	+	ท่อน	heterofermentative
112	LABb017	กะปิ	+	ท่อน	heterofermentative
113	LABb018	มะขามเปียก	+	ท่อน	heterofermentative
114	LABb019	ไชโป๊หวาน	+	ท่อน	heterofermentative
115	LABb020	ไชโป๊หวาน	+	ท่อน	heterofermentative
116	LABb021	ไชโป๊เค็ม	+	ท่อน	heterofermentative
117	LABb022	ผักกาดคอง	+	ท่อน	heterofermentative
118	LABb023	เต้าเจี้ยว	+	ท่อน	heterofermentative
119	LABb024	หญาหมัก	+	ท่อน	heterofermentative
120	LABb025	หญาหมัก	+	ท่อน	heterofermentative

2. ผลการทดสอบความสามารถในการใช้แป้งเป็นสับสเตรทของเชื้อ

จากการนำเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 120 ไอโซเลทมาทดสอบความสามารถในการใช้แป้งเป็นสับสเตรท พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น soluble starch ได้ โดยพวกที่เป็น bacilli จะเจริญได้ดีกว่าพวกที่เป็น cocci ซึ่งสังเกตได้จากมีความหนาของโคโลนีบนอาหารมากกว่า และพบว่า ไม่มีไอโซเลทใดสามารถย่อยแป้งโดยทำให้เกิดวงใส ผลการทดสอบแสดงดังรูป 4.4



รูป 4.4 การเจริญบนอาหารแข็งที่มี 2% soluble starch (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน

(a) โคโลนีของพวก bacilli

(b) โคโลนีของพวก cocci

3. ผลการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างกรดแลกติกได้สูงสุดโดยวิธี HPLC

จากการนำ 5% (v/v) เชื้อบริสุทธิ์จำนวน 21 ไอโซเลทที่สามารถเจริญได้ดีบนอาหาร MRS agar ที่มี 2% soluble starch (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอนและ JP2 agar มาหมักในอาหารเหลว modified MRS พบว่า เชื้อไอโซเลท LABc040 ผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 4.39 g/l ส่วนเชื้อที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด คือ เชื้อไอโซเลท LABc072 เท่ากับ 3.27 g/ ดังแสดงในตาราง 4.2 และเมื่อนำมาหมักในอาหารเหลว MRS ที่มี glucose เป็นสับสเตรท พบว่า เชื้อไอโซเลท LABc072 ผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด เท่ากับ 29.49 g/l ส่วนเชื้อที่ผลิตกรดแลกติกได้สูงที่สุด คือ เชื้อไอโซเลท LABc038 เท่ากับ 21.98 g/l ดังแสดงในตาราง 4.2

ตาราง 4.2 ปริมาณและชนิดกรดแลกติกที่เชื้อแบคทีเรียแลกติกผลิตขึ้นในอาหารเหลว modified MRS (มี 2% soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน) บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Isolate	lactic acid (g/l)	
	D	L
LABb013	2.73	0.41
LABb025	0.35	0.12
LABc009	3.18	1.75
LABc024	2.34	0.66
LABc025	0.35	1.37
LABc026	0	1.52
LABc027	1.79	0.15
LABc029	0.67	0.7
LABc030	0	0.32
LABc031	0.5	0.44
LABc038	1.84	0.12
LABc040	0	4.39
LABc064	2.72	0.26
LABc066	0.02	0.91
LABc067	0.3	1.03
LABc070	0.77	0.19
LABc072	3.27	1.51
LABc087	0.45	0.18
LABc090	0	1.64
LABc092	0	3
LABc093	0	3.31

ตาราง 4.3 ปริมาณและชนิดกรดแลคติกที่เชื้อแบคทีเรียแลคติกผลิตขึ้นในอาหารเหลว MRS ที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน บ่มที่อุณหภูมิ 40°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

isolate	lactic acid (g/l)	
	D	L
LABb013	15.24	19.89
LABb025	1.26	19.38
LABc009	14.9	26.56
LABc024	17.08	23.34
LABc025	14.86	21.56
LABc026	13.72	17.47
LABc027	14.1	18.77
LABc029	14.06	26.75
LABc030	13.59	17.22
LABc031	17.03	19.58
LABc038	21.98	28.03
LABc040	13.97	17.95
LABc064	15.85	22.61
LABc066	18.07	24.6
LABc067	7.53	25.62
LABc070	12.24	20.05
LABc072	19.41	29.49
LABc087	17.18	23.36
LABc090	14.14	22.36
LABc092	16.48	22.26
LABc093	19.45	25.16

4. ผลการทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและการศึกษาพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท LABc040, LABc072, LABc009, LABc038 และ LABb015

จากการนำไอโซเลท LABc040 (ผลิตกรดแลคติกสูงสุดในอาหารที่มี 2% soluble starch (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน), LABc072 (ผลิตกรดแลคติกสูงสุดในอาหาร MRS ที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอนและผลิตกรดแลคติกสูงสุดในอาหารที่มี 2% soluble starch (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน), LABc009 (ผลิตกรดแลคติกเป็นอันดับสองรองจาก LABc072 ในอาหารที่มี 2% soluble starch (w/v) เป็นแหล่งคาร์บอน), LABc038 (ผลิตกรดแลคติกสูงสุดและผลิตกรดแลคติกเป็นอันดับสองรองจาก LABc072 ในอาหาร MRS ที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน) และ LABb015 (เป็นเพียงไอโซเลทเดียวที่สามารถแยกได้จากอาหารเหลว MRS ที่มี 2% soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน) มาศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและในอาหารเหลว ผลที่ได้แสดงดังตาราง 4.4 และผลการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาและชีวเคมีเทียบเคียงคำบรรยายใน Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ฉบับพิมพ์ครั้งที่ 9 (1994) พบว่า ทั้งไอโซเลท LABc040, LABc072, LABc009 และ LABc038 อยู่ในสกุล *Pediococcus* (ตาราง 4.5) ส่วนไอโซเลท LABb015 อยู่ในสกุล *Bacillus* (ตาราง 4.6)

จากการตรวจสอบคุณสมบัติในการติดสีของแบคทีเรียโดยการย้อมสีแบบแกรม พบว่า ทั้งไอโซเลท LABc040, LABc072, LABc038 และ LABc009 เป็นแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างทรงกลม มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1.0 - 2.0, 1.0 - 2.0, 1.0 - 1.5 และ 1.0 - 1.5 ไมโครเมตร ตามลำดับ มีการเรียงตัวอยู่เป็นคู่ หรือ 4 เซลล์ (รูป 4.5) ไม่สร้างเอนโดสปอร์ เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง MRS ให้โคโลนีสีครีม ส่วนไอโซเลท LABb015 เมื่อเจริญบนอาหารแข็ง MRS ให้โคโลนีสีน้ำตาล ซึ่งเป็นสีเดียวกับสีอาหาร ย้อมสีแบบแกรม เซลล์ติดสีแกรมบวก รูปร่างท่อน มีขนาด 0.5x1.7 ไมโครเมตร มีการเรียงตัวอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรือเป็นคู่ (รูป 4.6) สร้างเอนโดสปอร์อยู่ตรงกลางเซลล์ เมื่อตรวจสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่โดยใช้อาหาร motility test medium พบว่า ทั้งห้าไอโซเลท ไม่สามารถเคลื่อนที่ได้ ทุกไอโซเลทสามารถหมักน้ำตาล glucose ได้โดยไม่เกิดก๊าซและเกิด acid curd ในอาหาร litmus milk การทดสอบอินโดลให้ผลลบ เมื่อนำมาให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55°C เป็นเวลา 15 นาที เพื่อดูความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง พบว่า แบคทีเรียทั้งห้ายังสามารถเจริญได้

ตาราง 4.4 ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็งและในอาหารเหลวของแบคทีเรียแลคติกไอโซเลท LABc040, LABc072, LABc009, LABc038 และ LABb015

คุณลักษณะ	เชื้อไอโซเลท				
	LABc040	LABc072	LABc009	LABc038	LABb015
ขนาด (size)	0.7-1.0 มิลลิเมตร	0.7-1.0 มิลลิเมตร	0.5-1.0 มิลลิเมตร	0.5-1.0 มิลลิเมตร	0.7-1.0 มิลลิเมตร
สี (pigmentation)	สีครีม	สีครีม	สีครีม	สีครีม	สีน้ำตาล
ลักษณะเกี่ยวกับแสง (optical characteristics)	ทึบแสง (opaque)	ทึบแสง (opaque)	ทึบแสง (opaque)	ทึบแสง (opaque)	ทึบแสง (opaque)
รูปร่าง (form)	กลม (circular)	กลม (circular)	กลม (circular)	กลม (circular)	กลมรี
ขอบ (margin)	เรียบ ไม่มีรอยหยัก (entire)	เรียบ ไม่มีรอยหยัก (entire)	เรียบ ไม่มีรอยหยัก (entire)	เรียบ ไม่มีรอยหยัก (entire)	หยัก
การยกของผิว (elevation)	โค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร (convex)	โค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร (convex)	โค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร (convex)	โค้งสูงจากผิวหน้าอาหาร (convex)	แบนเรียบไปกับผิวหน้าอาหาร
ผิวหน้า (surface)	เรียบ (smooth)	เรียบ (smooth)	เรียบ (smooth)	เรียบ (smooth)	เรียบ (smooth)
การเจริญในอาหารเหลว	เจริญขึ้นทั่วหลอด (turbid)	เจริญขึ้นทั่วหลอด (turbid)	เจริญขึ้นทั่วหลอด (turbid)	เจริญขึ้นทั่วหลอด (turbid)	เจริญขึ้นทั่วหลอด (turbid)

ตาราง 4.5 ผลการตรวจสอบลักษณะทางถิ่นฐานวิทยาและชีวเคมีของไอโซเลท LABc040, LABc072, LABc038 และ LABc009 เทียบเคียงกับจีโนส *Pediococcus* sp. (Holt *et al.*, 1994)

ลักษณะที่ตรวจสอบ	ไอโซเลท LABc040	ไอโซเลท LABc072	ไอโซเลท LABc038	ไอโซเลท LABc009	<i>Pediococcus</i> sp.
การคิดสีแบบกรัม	+	+	+	+	+
เส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์, μm	1.0-2.0	1.0-2.0	1.0-1.5	1.0-1.5	1.0-2.0
รูปร่างเซลล์	spherical	spherical	Spherical	Spherical	spherical
การจัดเรียงเซลล์	tetrad, pair	tetrad, pair	tetrad, pair	tetrad, pair	tetrad, some pair
การเจริญที่ 25-30°C	+	+	+	+	+
การเจริญที่ 37°C	+	+	+	+	D
การเจริญที่ 45°C	+	+	+	+	D
การผลิต CO ₂ จาก glucose	-	-	-	-	-
การทดสอบ O-F	fermentative	fermentative	fermentative	fermentative	fermentative
การสร้างกรดจาก					
D-glucose	+	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
การเจริญใน 6.5% NaCl	+	+	+	+	D
การเจริญที่ pH 4.4	+	+	+	+	D
การทดสอบ catalase	-	-	-	-	-
การเคลื่อนที่	-	-	-	-	-

สัญลักษณ์: +, ให้ผลบวก; -, ให้ผลลบ; D, แตกต่างกันตาม species

ตาราง 4.6 ผลการทดสอบทางชีวเคมีของเชื้อแบคทีเรียแลคติก ไอโซเลตต่างๆ

การทดสอบ	LAB c040	LAB c072	LAB c009	LAB c038	LAB b015	<i>Pediococcus</i> sp.	<i>Bacillus</i> sp.
Catalase	-	-	-	-	+	-	+
การสร้างอินโดล	-	-	-	-	-	-	+/-
กรดเคลื่อนที่	-	-	-	-	-	-	+/-
VP	-	-	-	-	-	-	+/-
การย่อยแป้ง	-	-	-	-	+	-	+/-
การใช้ citrate	-	-	-	-	-	-	+/-
การรีดิวซ์ไนเตรท	-	-	-	-	-	-	+/-
การทนเกลือ							
5%	+	+	+	+	+	+	+/-
6.5%	+	+	+	+	+	+	+/-
7%	+	+	+	+	+	+	+/-
10%	+	+	+	+	+	+	+/-
18%	+	+	+	+	+	-	+/-
การเจริญที่							
10°C	+	+	+	+	-	+	+/-
15°C	+	+	+	+	-	+	+/-
37°C	+	+	+	+	+	+	+/-
45°C	+	+	+	+	+	-	+/-
50°C	+	+	+	+	+	-	+/-
55°C	+	-	-	-	+	-	+/-
60°C	-	-	-	-	+	-	+/-
การหมัก							
Glucose	+	+	+	+	+	+	+/-
Fructose	+	+	+	+	+	+	+/-
Maltose	+	+	+	+	+	+	N.R.
Sorbitol	+	+	+	+	+	+	N.R.
Mannitol	-	-	-	-	-	-	+/-
Glycerol	-	-	-	-	-	-	N.R.
ปฏิกิริยาใน litmus milk	+	+	+	+	+	+	N.R.
การย่อยเจลาติน	-	-	-	-	-	-	+/-

N.R. = ไม่มีรายงาน



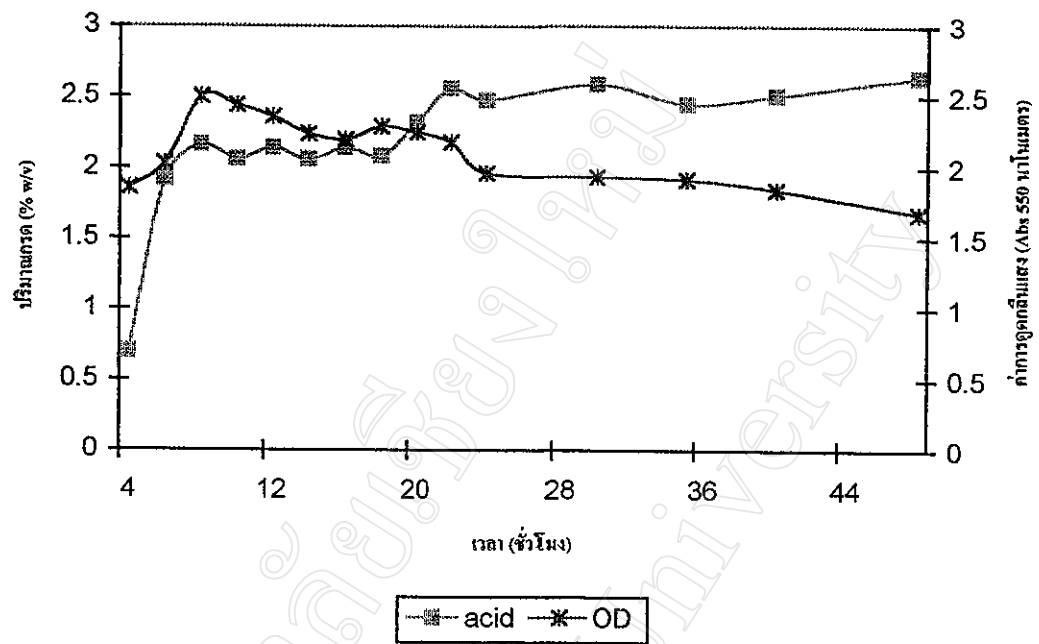
รูป 4.5 การติดสีแกรม การจัดเรียงตัว และขนาดเซลล์ของ *Pediococcus* sp. LABc040



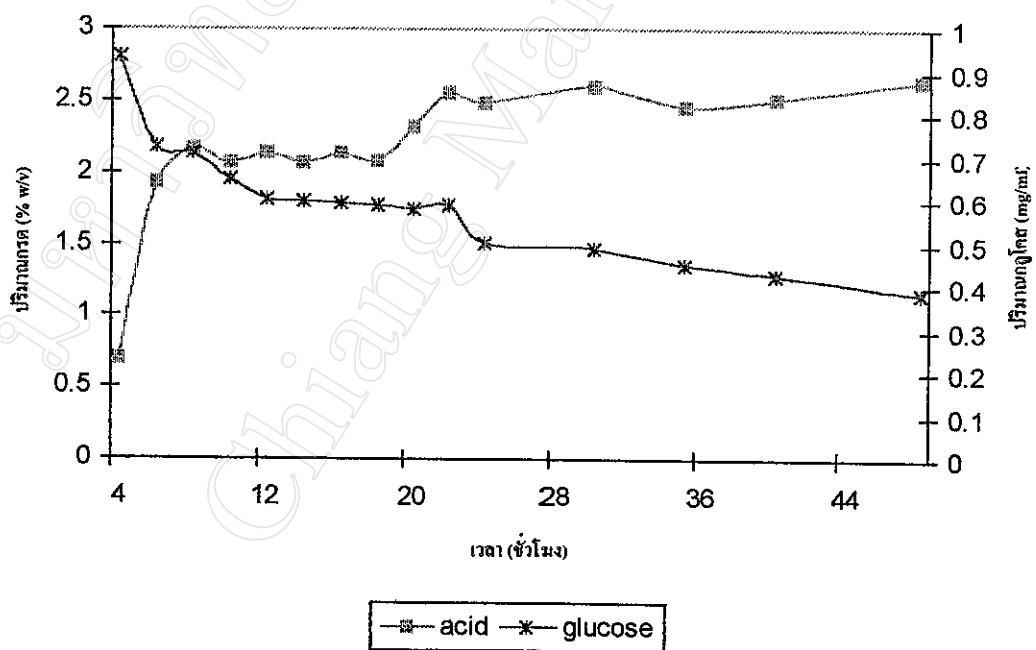
รูป 4.6 การติดสีแกรม การจัดเรียงตัว และขนาดของเซลล์ของ *Bacillus* sp. LABb015

5. ผลการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตกรดโดย *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Pediococcus* sp. LABc072

เมื่อนำเชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Pediococcus* sp. LABc072 มาศึกษาอัตราการเจริญเติบโตและการผลิตกรด พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทผลิตกรดรวมสูงสุดเท่ากับ 2.6% (w/v) และ 3.9% (w/v) ตามลำดับ (รูป 4.7 และรูป 4.8)

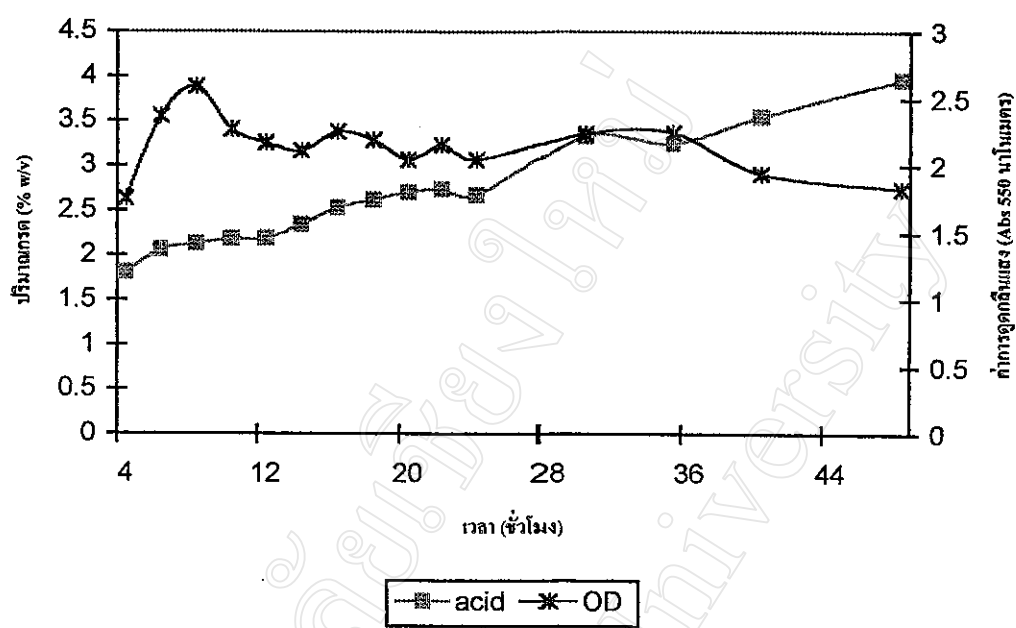


(a)

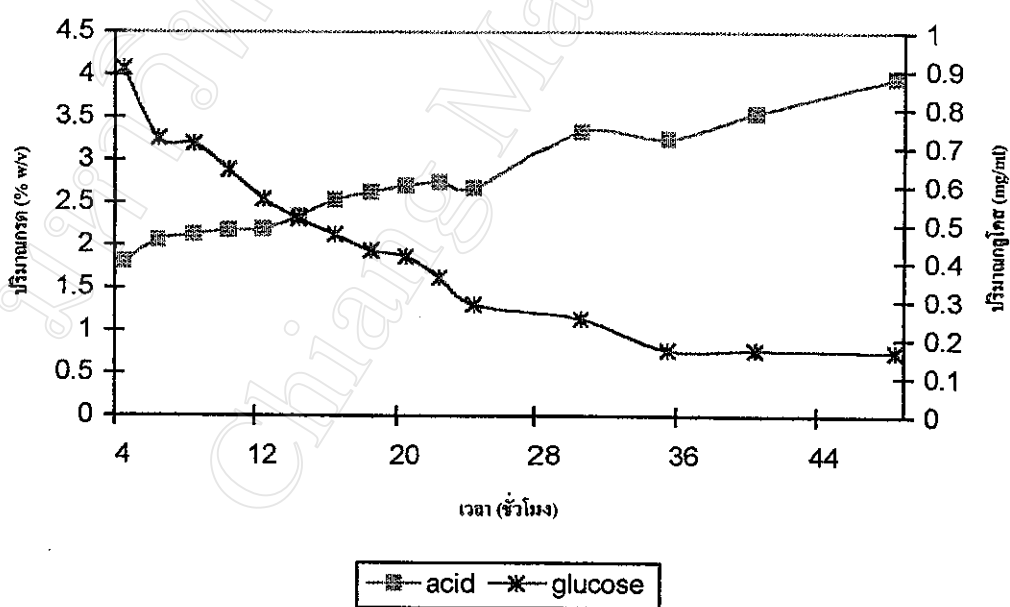


(b)

รูป 4.7 กราฟเปรียบเทียบปริมาณกรดที่เกิดขึ้น *Pediococcus* sp. LABc040 สร้างขึ้นกับอัตราการเจริญเติบโต (a) และปริมาณกลูโคสที่เหลืออยู่ (b) ในอาหารเหลว MRS pH 5.5 บ่มที่อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที



(a)



(b)

รูป 4.8 กราฟแสดงการเปรียบเทียบปริมาณกรดที่เชื้อ *Pediococcus* sp. LABc072 สร้างขึ้นกับอัตรา
การเจริญเติบโต (a) และปริมาณกลูโคสที่เหลืออยู่ (b) ในอาหารเหลว MRS pH 5.5 บ่มที่
อุณหภูมิ 37°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที

6. ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายของ *Pediococcus* sp. LABc040 ด้วยวิธี UV

จากการนำเซลล์แบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* sp. LABc040 ไปรับแสง UV ที่ระยะเวลาต่างๆ กันนั้น พบว่า ที่เวลา 30 วินาที จะพบเซลล์มีชีวิตรอด 2.5% (ตาราง 4.7)

ตาราง 4.7 % ความอยู่รอดของ *Pediococcus* sp. LABc040 เมื่อ treat ด้วย UV

เวลาในการรับรังสี UV (วินาที)	% ความอยู่รอด
0	100.0
10	17.8
20	6.0
30	2.5
60	0.5
90	0.0
120	0.0

7. ผลการศึกษาการชักนำให้เกิดการกลายของ *Pediococcus* sp. LABc040 ด้วยวิธี NTG

จากการนำเซลล์แบคทีเรียแลคติก *Pediococcus* sp. LABc040 treat ด้วย NTG ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า ที่ความเข้มข้น 2000 $\mu\text{g/ml}$ เซลล์มีชีวิตรอด 3.6% (ตาราง 4.8)

ตาราง 4.8 % ความอยู่รอดของ *Pediococcus* sp. LABc040 เมื่อ treat ด้วย NTG

ความเข้มข้น NTG ($\mu\text{g/ml}$)	อัตราการอยู่รอด (%)
0	100.0
100	44.4
500	27.1
1000	12.4
2000	3.6

8. ผลการคัดเลือกเซลล์กลายพันธุ์

จากการสุ่มโคโลนีของ *Pediococcus* sp. LABc040 ที่ผ่านการ treat UV ที่เวลา 30 วินาที จำนวน 200 โคโลนี มาเพาะลงบนอาหารแข็ง JP2 พบว่า ไม่เกิดสายพันธุ์ mutant ที่ย่อยแป้งได้ แต่ยังคงเจริญบนอาหารที่มีแป้ง และเมื่อสุ่ม 50 โคโลนีจาก 200 โคโลนีดังกล่าว มาทดสอบความสามารถในการสร้างกรดเปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลคติกดั้งเดิม (*Pediococcus* sp. LABc040 wild type) พบว่า ผลิตภัณฑ์กรดในรูปกรดรวมในปริมาณต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (ตาราง 4.9)

ตาราง 4.9 ปริมาณกรดรวมที่ผลิตจากเชื้อ 50 โคโลนีที่ผ่านการ treat UV ที่ 2.5% การอยู่รอดและ *Pediococcus* sp. LABc040 wild type

โคโลนี	ปริมาณกรด (% w/v)	โคโลนี	ปริมาณกรด (% w/v)
1	0.7	26	0.3
2	0.8	27	0.3
3	0.6	28	0.5
4	0.8	29	0.6
5	0.7	30	0.6
6	0.4	31	0.7
7	0.3	32	0.6
8	0.8	33	0.8
9	1.4	34	1.2
10	1.0	35	1.3
11	0.9	36	1.1
12	0.9	37	0.4
13	1.1	38	0.7
14	1.2	39	0.6
15	0.7	40	0.9
16	1.0	41	1.0
17	0.6	42	1.1
18	0.5	43	1.2
19	0.5	44	1.1
20	0.4	45	1.5
21	0.3	46	0.8
22	0.6	47	0.9
23	0.7	48	1.5
24	1.0	49	0.7
25	1.2	50	0.5
wild type	2.5		

จากการสุ่มโคโลนีของ *Pediococcus* sp. LABc040 ที่ผ่านการ treat NTG ที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งทำให้เกิด 3.6% การอยู่รอดจำนวน 100 โคโลนี มาเพาะลงบนอาหารแข็ง JP2 พบว่า ไม่เกิดสายพันธุ์ mutant ที่ย่อยแป้งได้แต่ยังคงเจริญบนอาหารที่มีแป้ง และเมื่อสุ่ม 30 โคโลนี จาก 100 โคโลนีดังกล่าวมาทดสอบความสามารถในการสร้างกรดแลกติก เปรียบเทียบกับแบคทีเรียแลกติกดั้งเดิม (*Pediococcus* sp. LABc040 wild type) พบว่า ผลิตภัณฑ์กรดแลกติกในรูปกรดรวมในปริมาณต่ำกว่าสายพันธุ์ดั้งเดิม (ตาราง 4.10)

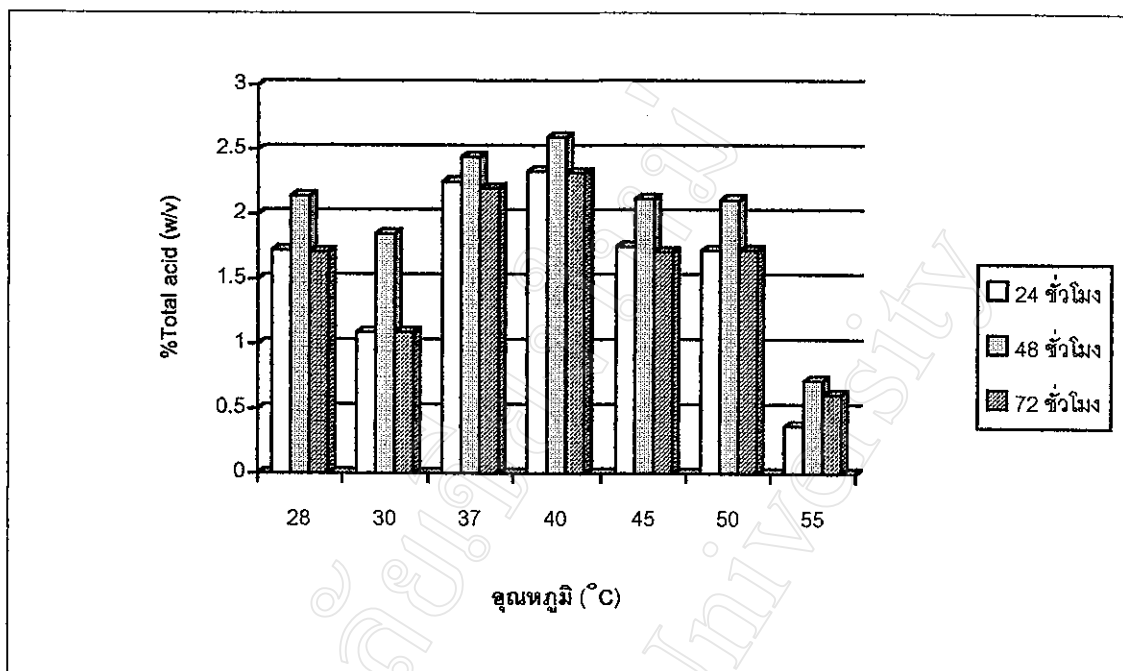
ตาราง 4.10 ปริมาณกรดแลกติกในรูปกรดรวมของเชื้อ 30 โคโลนีที่ผ่านการ treat NTG ที่ความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/ml}$ และ *Pediococcus* sp. LABc040 wild type

โคโลนี	ปริมาณกรด (% w/v)	โคโลนี	ปริมาณกรด (% w/v)
1	0.4	16	0.5
2	1.0	17	0.7
3	0.7	18	0.8
4	1.0	19	0.4
5	0.7	20	0.4
6	0.8	21	1.2
7	0.4	22	1.4
8	0.5	23	0.3
9	0.6	24	1.1
10	0.8	25	0.5
11	0.7	26	0.8
12	0.7	27	0.6
13	0.6	28	1.0
14	0.8	29	0.4
15	0.3	30	0.6
wild type	2.6		

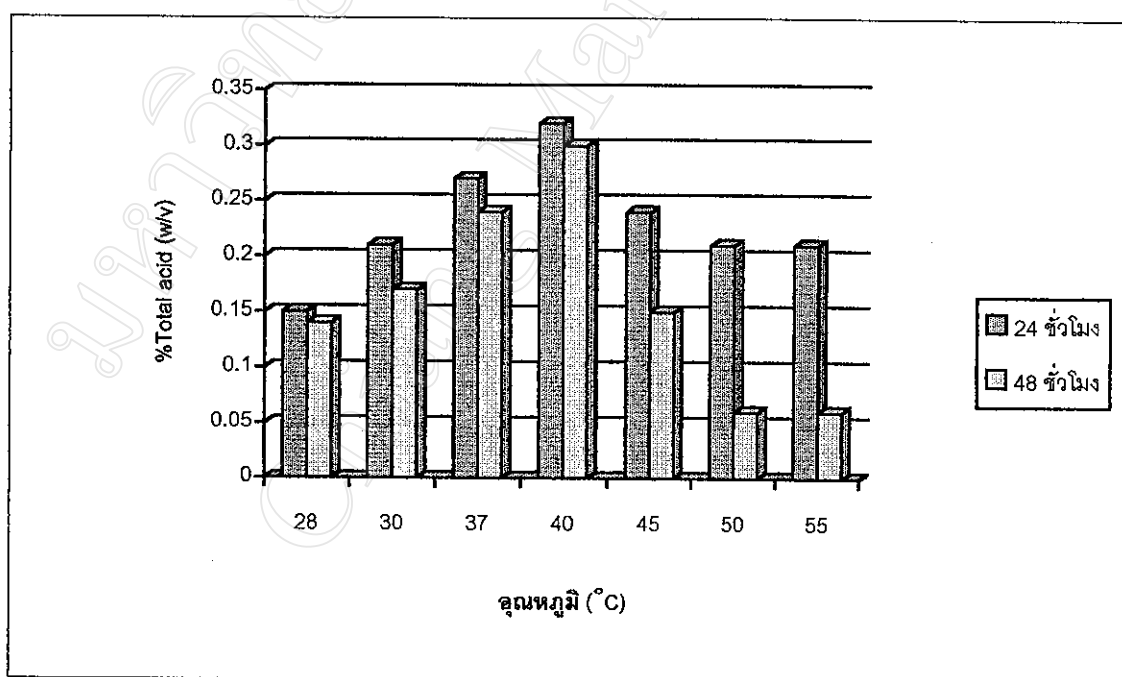
9. ผลการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแลกติกโดย *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Bacillus* sp. LABb015

9.1 ผลการศึกษาอุณหภูมิและระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

หลังจากการบ่มเชื้อ 5% ในอาหารเหลว MRS pH 7.0 และอาหารเหลว modified MRS pH 7.0 ปริมาตร 50 ml ที่อุณหภูมิ 28, 30, 37, 40, 45, 50 และ 55°C บนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 170 รอบต่อนาที แล้วพบว่า ที่อุณหภูมิ 40°C เชื้อทั้ง 2 ไอโซเลทจะผลิตกรดรวมได้มากที่สุด โดย *Pediococcus* sp. LABc040 ผลิตกรดได้มากที่สุดในเวลา 48 ชั่วโมง รองลงมาได้แก่ ที่อุณหภูมิ 37°C (รูป 4.9 (a)) ส่วน *Bacillus* sp. LABb015 ผลิตกรดได้มากที่สุดในเวลา 24 ชั่วโมง รองลงมาได้แก่ ที่อุณหภูมิ 37°C (รูป 4.9 (b))



(a)

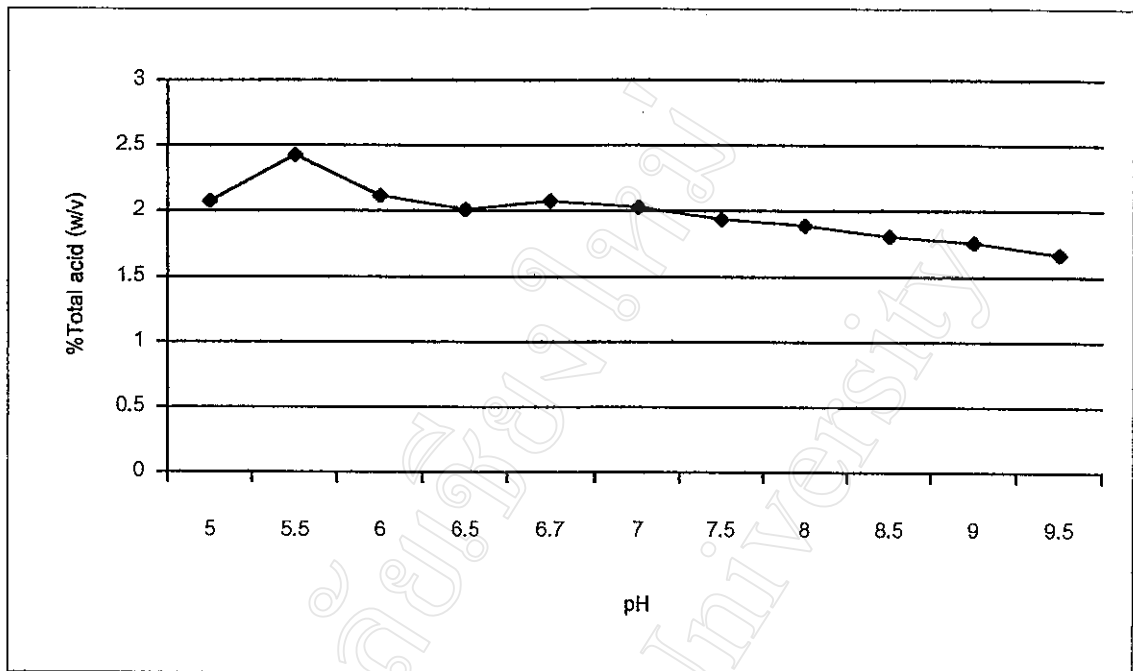


(b)

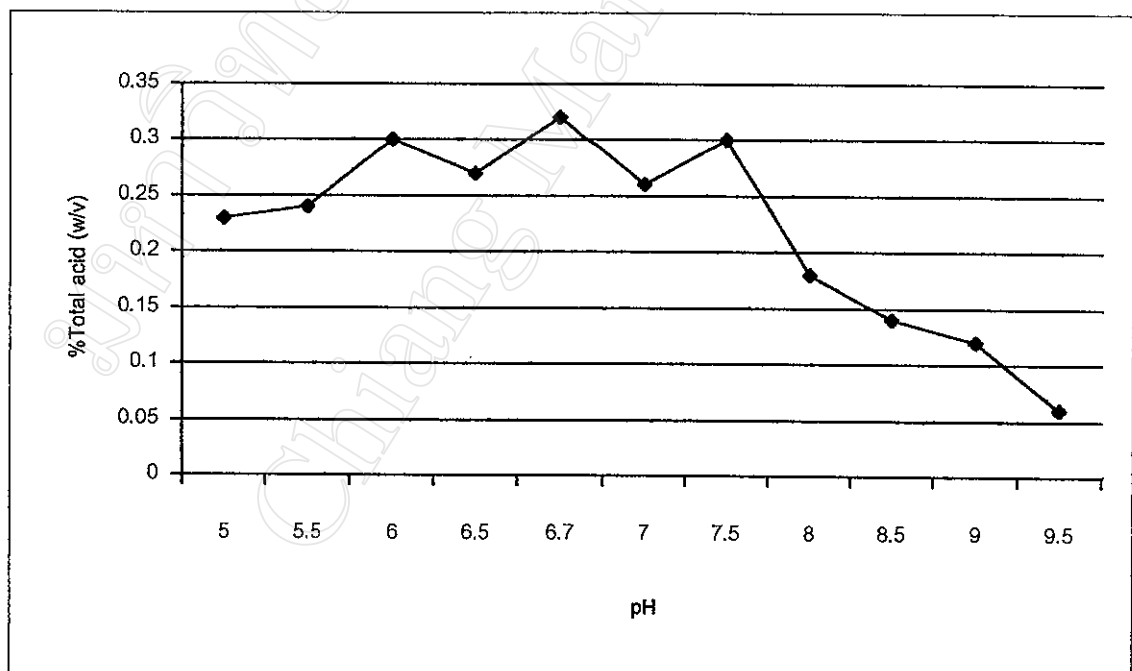
รูป 4.9 ปริมาณกรดที่ผลิตโดย *Pediococcus* sp. LABc040 ในอาหารเหลว MRS pH 7.0 (a) และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหารเหลว modified MRS pH 7.0 (b) ที่อุณหภูมิต่างๆ บนเครื่องเขย่า 170 รอบต่อนาที

9.2 ผลการศึกษา pH เริ่มต้นของอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรด

จากการบ่มเชื้อ 5% ที่อุณหภูมิ 40°C ในอาหารเพื่อการผลิตกรดแลคติก คือ อาหารเหลว MRS และอาหารเหลว modified MRS ปริมาตร 50 ml ตามลำดับ ที่มี pH เริ่มต้นของอาหารแตกต่างกัน คือ 5.0, 5.5, 6.0, 6.5, 6.7, 7.0, 7.5, 8.0, 8.5, 9.0 และ 9.5 พบว่า *Pediococcus* sp. LABc040 สามารถผลิตกรดได้มากที่สุด ในอาหารเหลว MRS ที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 5.5 เท่ากับ 2.4% (w/v) (รูป 4.10 (a)) ส่วนเชื้อ *Bacillus* sp. LABb015 ผลิตกรดได้มากที่สุด ในอาหารเหลว modified MRS ที่มี pH เริ่มต้นเท่ากับ 6.7 เท่ากับ 0.3% (w/v) (รูป 4.10 (b))



(a)

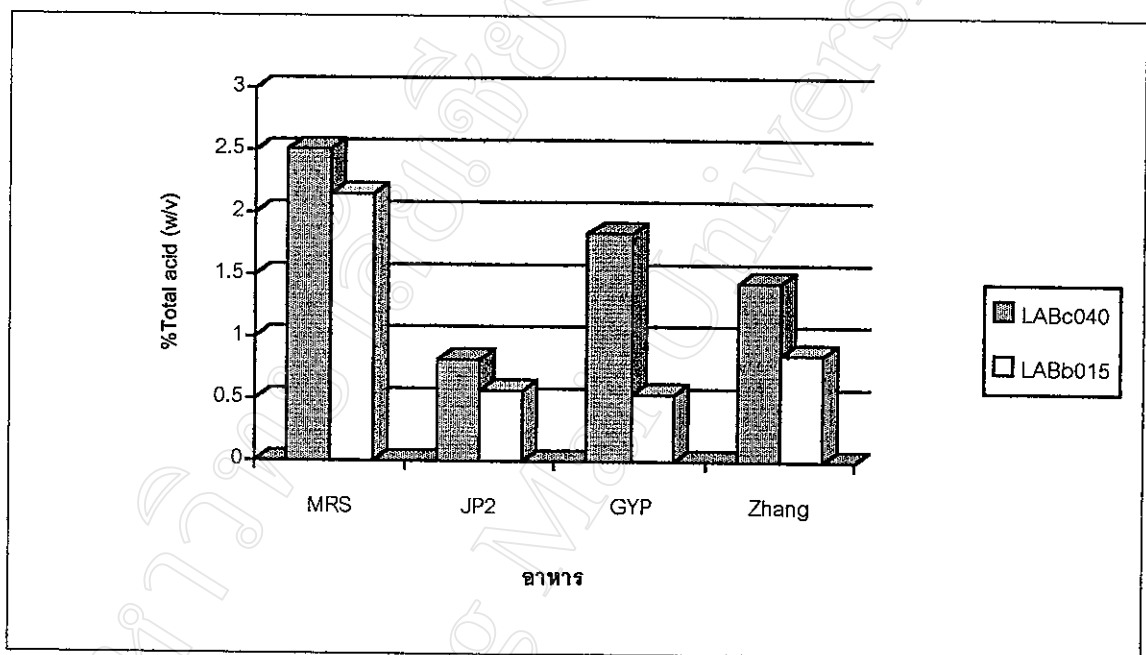


(b)

รูป 4.10 ปริมาณกรดที่ผลิตโดย *Pediococcus* sp. LABc040 ในอาหารเหลว MRS (a) และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหารเหลว modified MRS (b) ที่อุณหภูมิ 40°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที ที่ระดับ pH ต่างๆ

9.3 ผลการศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

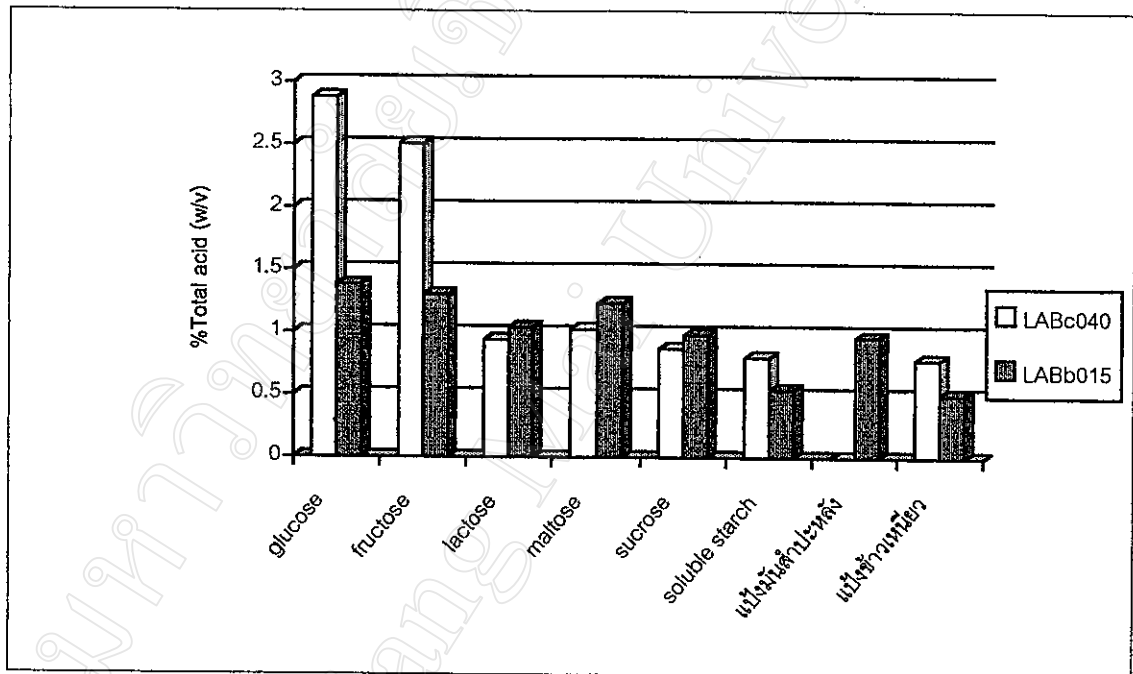
จากการเพาะเลี้ยง 5% ของเชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหารเพื่อการผลิตกรดแตกต่างกัน 4 สูตร คือ MRS , JP2 , GYP และ Zhang พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทสามารถผลิตกรดรวมได้มากที่สุดในอาหาร MRS เท่ากับ 2.5% (w/v) และ 2.2% (w/v) ตามลำดับ (รูป 4.11)



รูป 4.11 ปริมาณกรดที่ผลิตโดย *Pediococcus* sp. LABc040 (48 ชั่วโมง) และ *Bacillus* sp. LABb015 (24 ชั่วโมง) บ่มที่อุณหภูมิ 40°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที ในอาหารชนิดต่างๆ

9.4 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

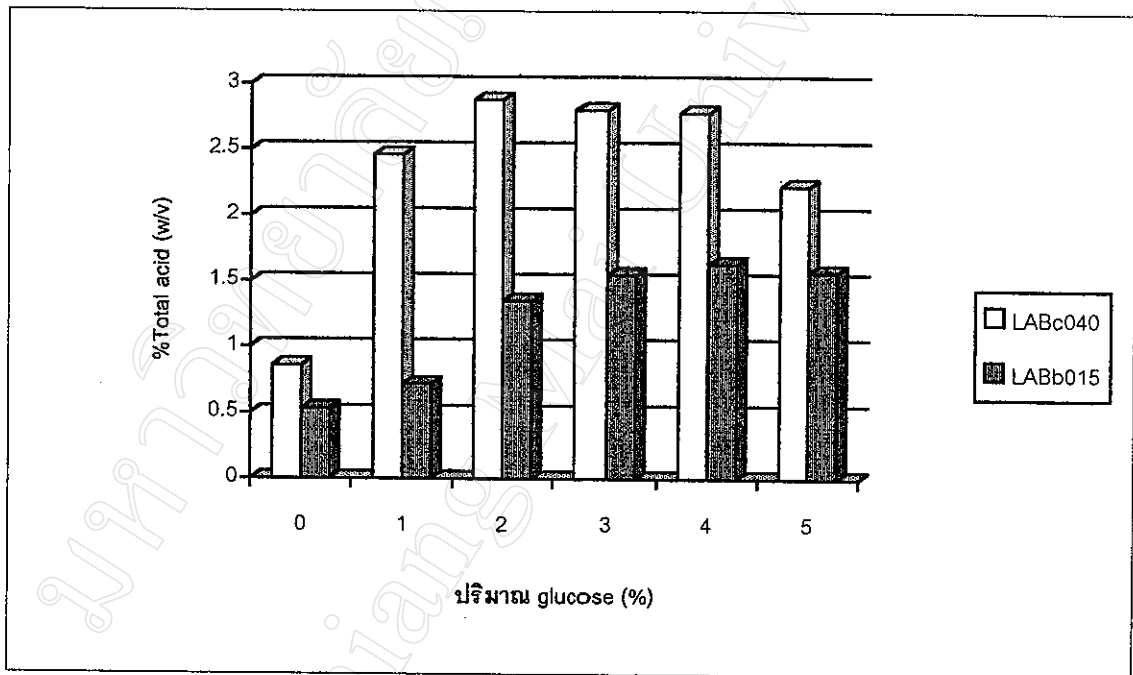
จากการเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหารที่มีชนิดของแหล่งคาร์บอนแตกต่างกัน 8 ชนิด คือ glucose, fructose, lactose, maltose, sucrose, soluble starch, แป้งมันสำปะหลังและแป้งข้าวเหนียว พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทสามารถผลิตกรดได้มากที่สุด ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 2.9% (w/v) และ 1.4% (w/v) ตามลำดับ (รูป 4.12)



รูป 4.12 ปริมาณกรดที่เชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 ผลิตใน 48 ชั่วโมงและ *Bacillus* sp. LABb015 ผลิตใน 24 ชั่วโมง ในอาหารเหลวที่มีแหล่งคาร์บอนความเข้มข้น 2% ชนิดต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 40°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที

9.5 ผลการศึกษาปริมาณ glucose ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

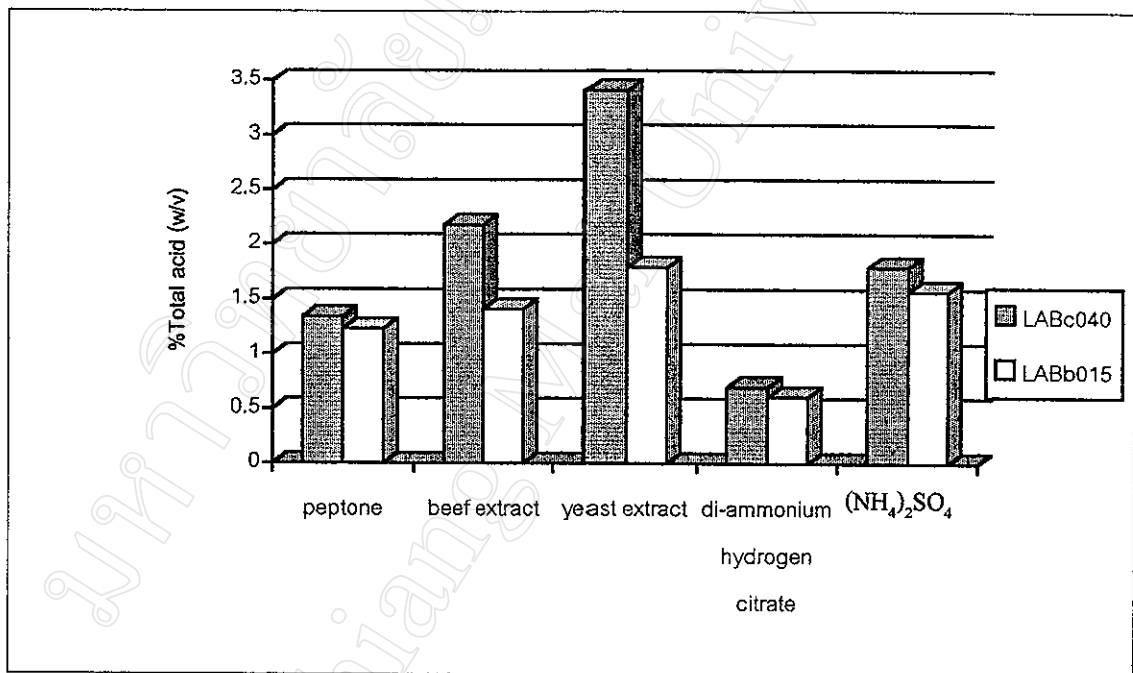
จากการเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดแลกติก ที่มี glucose ในปริมาณต่างๆ กัน คือ 0, 1, 2, 3, 4 และ 5% (w/v) พบว่า เชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 สามารถผลิตกรดได้มากที่สุด ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดที่มี glucose 2% เท่ากับ 2.9% (w/v) และเชื้อ *Bacillus* sp. LABb015 สามารถผลิตกรดรวมได้มากที่สุด ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดที่มี glucose 4% เท่ากับ 1.6% (w/v) (รูป 4.13)



รูป 4.13 ปริมาณกรดที่ผลิตโดย *Pediococcus* sp. LABc040 (pH 5.5 ในเวลา 48 ชั่วโมง) และ *Bacillus* sp. LABb015 (pH 6.7 ในเวลา 24 ชั่วโมง) ที่มี glucose ในปริมาณต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 40°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที

9.6 ผลการศึกษาชนิดของแหล่งไนโตรเจนที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

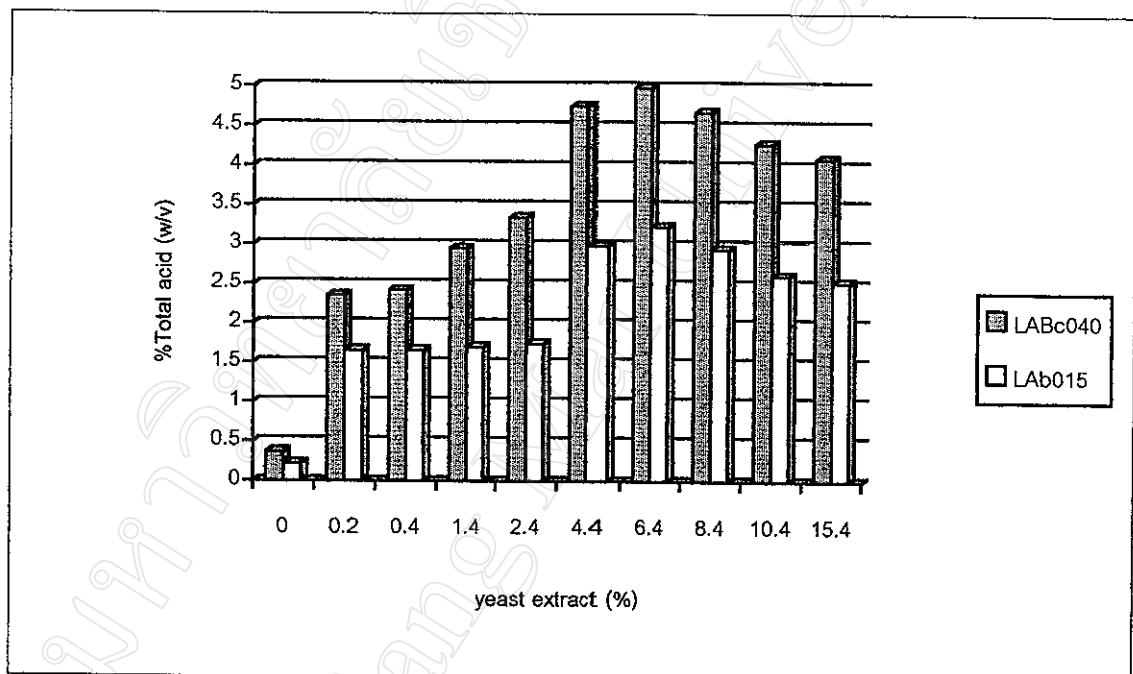
จากการเพาะเชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดที่มีแหล่งไนโตรเจนที่แตกต่างกัน 5 ชนิด คือ peptone, beef extract, yeast extract, di-Ammonium hydrogen citrate และ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ในปริมาณ 2.4% (w/v) พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทสามารถผลิตกรดรวมได้มากที่สุดในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดที่มี yeast extract เป็นแหล่งไนโตรเจน เท่ากับ 3.4% (w/v) และ 1.8% (w/v) ตามลำดับ (รูป 4.14)



รูป 4.14 ปริมาณกรดที่เชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 ในอาหาร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 2% glucose, pH 5.5 ในเวลา 48 ชั่วโมง และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหาร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 4% glucose, pH 6.7 ในเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตขึ้นในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดที่มีแหล่งไนโตรเจนชนิดต่างๆ บ่มที่อุณหภูมิ 40°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที

9.7 ผลการศึกษาปริมาณ yeast extract ที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

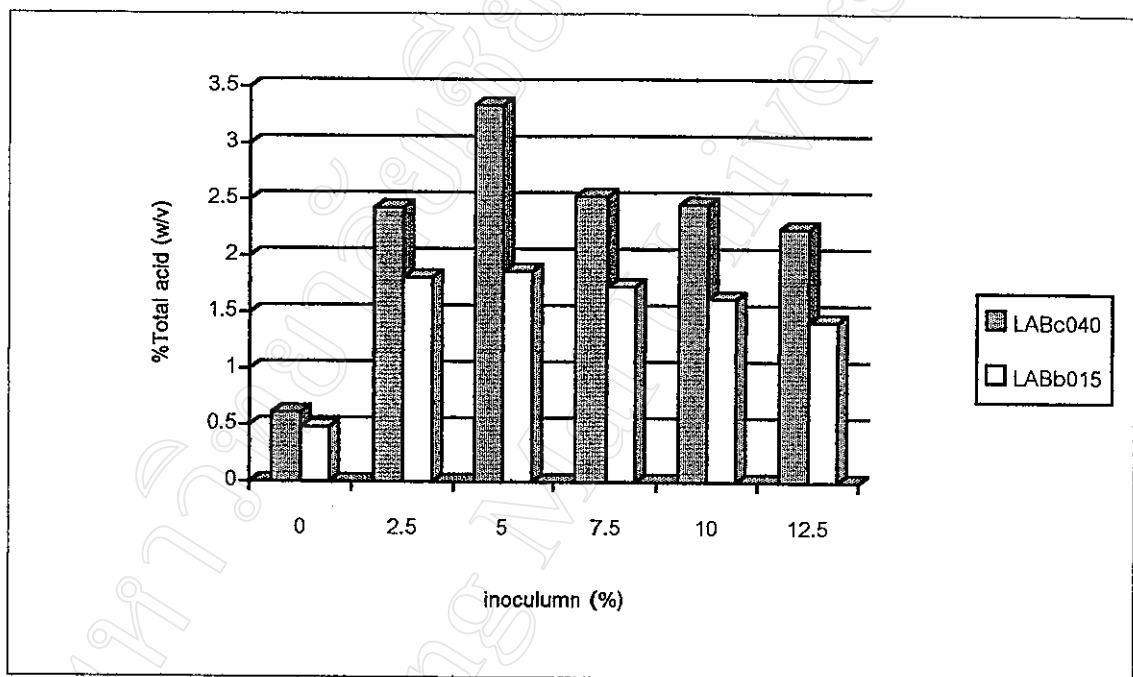
จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหารสำหรับการผลิตกรดที่มีแหล่งไนโตรเจน คือ yeast extract ในปริมาณต่างๆ คือ 0, 0.2, 0.4, 1.4, 2.4, 4.4, 6.4, 8.4, 10.4 และ 15.4% (w/v) พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทสามารถผลิตกรดรวมได้มากที่สุด ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดที่มีปริมาณ yeast extract 6.4% (w/v) เท่ากับ 5.0% (w/v) และ 3.2% (w/v) ตามลำดับ (รูป 4.15)



รูป 4.15 ปริมาณกรดที่เชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 ในอาหาร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 2% glucose, pH 5.5 ในเวลา 48 ชั่วโมง และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหาร MRS ที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น 4% glucose, pH 6.7 ในเวลา 24 ชั่วโมง ผลิตขึ้นในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดที่มี yeast extract ในปริมาณต่างๆ กัน บ่มที่อุณหภูมิ 40°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที

9.8 ผลการศึกษาปริมาณเชื้อตั้งต้นที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดรวม

จากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Bacillus* sp. LABb015 ในอาหารเหลวสำหรับการผลิตกรดคือ อาหารเหลว MRS พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทสามารถผลิตกรดได้มากที่สุด ในอาหารเหลว MRS ที่มีปริมาณเชื้อตั้งต้น 5% เท่ากับ 3.3% (w/v) และ 1.9% (w/v) ตามลำดับ (รูป 4.16)



รูป 4.16 ปริมาณกรดที่เชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 (pH 5.5 ในเวลา 48 ชั่วโมง) และ *Bacillus* sp. LABb015 (pH 6.7 ในเวลา 24 ชั่วโมง) ผลิตขึ้นในอาหารเหลว MRS บ่มที่อุณหภูมิ 40°C บนเครื่องเขย่าอัตรา 170 รอบต่อนาที