

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 45°C พบปัญหาส่วนใหญ่ที่เกิดขึ้นในขั้นตอนการแยกเชื้อ ได้แก่ การแยกเชื้อจากนมและผลิตภัณฑ์ซึ่งใช้อาหาร M17 ในการแยก พบว่า ขณะเลี้ยงตัวอย่างอาหารในอาหารเหลวจะมีการเจริญของเชื้ออย่างรวดเร็วภายใน 1 - 2 วัน แต่มักไม่สามารถแยกเป็นโคโลนีบนอาหารแข็งได้ อาจเนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกในนมและผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่เป็นเชื้อที่ไวต่ออากาศ ต้องเพาะเลี้ยงใน anaerobic jar อีกปัญหาหนึ่งคือ มักเกิดการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นได้ง่าย โดยเฉพาะราและแบคทีเรียในอากาศ เนื่องจาก MRS เป็นอาหารที่มีสารอาหารอุดมสมบูรณ์เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้อ จึงควรเตรียมและใช้ทันที ไม่ควรเกิน 1 อาทิตย์ แต่ถ้าเก็บในตู้เย็นจะสามารถปราศจากเชื้ออยู่ได้นานประมาณ 1 เดือน ส่วน *Bacillus* sp. สายพันธุ์ที่ไม่ผลิตกรด มักปนเปื้อนมาจากตัวอย่างอาหารที่นำมาแยก เจริญแผ่คลุมโคโลนีที่มีการสร้างกรด ทำให้ไม่สามารถแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้ มักพบในตัวอย่างหน่อไม้ดอง หน่อไม้อัดและหน่อไม้ดัม เมื่อใช้อาหาร MRS ในการแยกเชื้อ แต่จะพบในตัวอย่างอาหารเกือบทุกตัวอย่างที่นำมาแยกในอาหาร MRS ที่มี 2% soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนแทน glucose และปัญหาสุดท้ายคือการเก็บรักษาเชื้อ ในการเก็บเชื้อควรถ่ายเชื้อทุกเดือน เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียแลคติกมีการสร้างกรด และจะถูกทำลายจากกรดที่สร้างขึ้นด้วย นิยมใช้ CaCO_3 เติมลงในอาหารแข็งเพื่อเป็นบัฟเฟอร์ในการจำกัดกรดที่ถูกเชื้อผลิตขึ้น เนื่องจากมีคุณสมบัติไม่แพร่กระจาย (Sakai *et al.*, 1983) จะช่วยรักษาเชื้อให้มีชีวิตยาวนานขึ้น การเก็บรักษาเชื้อโดย skim milk และ litmus milk ก็สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานหลายเดือนและอาจถึง 1 ปี (ศุภวัฒน์, 2540) แต่มีวิธีที่สะดวกและสามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานเป็นปีโดยไม่ทำให้เชื้อกลายพันธุ์ ใน 20% glycerol แช่ช่องแช่แข็งในตู้เย็นหรือตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C (Barbour และ Priest, 1986)

เมื่อนำแบคทีเรียแลคติกทั้ง 120 ไอโซเลทมาทดสอบชนิดในอาหาร HHD agar พบว่ามีเพียง 5 ไอโซเลทที่มีคุณสมบัติในการสร้างกรดเป็นพวก homofermentative ซึ่งแยกได้จากแฮมหมูหมัก ถั่วเน่าแผ่นและกะปิ ซึ่งผลที่ได้ใกล้เคียงกับการทดลองของเอกชัย (2536) ซึ่งทำการทดสอบเช่นเดียวกันนี้ในอาหาร HHD agar และพบว่ามีเชื้อที่เป็นพวก homofermentative 3 ไอโซเลทซึ่งแยกได้จากไส้กรอกข้าว น้ำปูดองและปลาต้มจากเชื้อทั้งหมด 29 ไอโซเลท และการ

ทดสอบโดยวิธีเดียวกันของเยนเรส (2537) พบว่าจากเชื้อทั้งหมด 21 ไอโซเลท ทุกไอโซเลทจัดเป็น heterofermentative จะเห็นได้ว่าเชื้อส่วนใหญ่เป็น heterofermentative ในปี ค.ศ. 1987 McDonald และคณะทำการทดสอบชนิดของจีโนส *Streptococcus*, จีโนส *Lactobacillus* และ จีโนส *Pediococcus* ทั้งหมด 21 สายพันธุ์ในอาหาร HHD agar พบว่ามีเชื้อที่เป็นพวก homofermentative จำนวน 12 สายพันธุ์ คือ *Streptococcus lactis*, *S. faecium*, *S. faecalis*, *S. faecalis* subsp. *liquefaciens*, *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus plantarum*, *L. xylosus*, *L. casei* subsp. *pseudopplantarum*, *L. salivarius* subsp. *salivarius*, *L. salivarius* subsp. *salicinius*, *L. coryniformis* subsp. *torquens* และ *L. coryniformis* subsp. *coryniformis*

จากการทดสอบความสามารถในการใช้แป้งเป็นสับสเตรทของเชื้อบริสุทธิ์จำนวน 120 ไอโซเลท บนอาหารแข็ง MRS ที่มี 2% soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนและ JP2 บ่มที่อุณหภูมิ 45°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ทุกไอโซเลทสามารถเจริญบนอาหารแข็งที่มีแหล่งคาร์บอนเป็น soluble starch ได้ แต่ไม่มีไอโซเลทใดสามารถย่อยแป้งให้เกิดวงใสได้ เช่นกันกับงานทดลองของ เอกชัย (2536) ที่พบว่า แบคทีเรียแลคติกจะใช้น้ำข้าวเจ้าในรูปแป้งสุก ไม่ใช้แป้งดิบและไม่พบเชื้อที่สามารถย่อยแป้งให้เกิดวงใสบนอาหารทดสอบ มีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียแลคติกสายพันธุ์ที่สามารถย่อยแป้งได้โดย Giraud *et al.*, 1991 มีเพียง *Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *Lactobacillus amylophilus*, *L. amylovorus*, *L. acidophilus*, *L. cellobiosus* และบาง species ที่แยกได้จาก animal digestive tracts และ plant wastes และ *L. plantarum* ต่อมาในปี ค.ศ. 1995 Tanasupawat และ Komagata ได้รายงานว่าพบแบคทีเรียแลคติกที่เกี่ยวข้องในอาหารหมักดองของไทย สายพันธุ์ *L. plantarum* ที่มีรายงานการย่อยแป้งได้ดังกล่าว และแยกได้จากส้มผัก แหนม ไส้กรอกเปรี้ยว มัม ผักกุ่มดอง ผักหนามดอง แดงกวาดอง ถั่วอกดอง หอมดอง ข้าวหมากและขนมจีน ในปีเดียวกัน Olympia และคณะรายงานว่าสามารถแยกแบคทีเรียแลคติกที่ย่อยแป้งได้จำนวน 9 สายพันธุ์จากอาหารหมักพื้นเมืองของชาวฟิลิปปินส์ที่เรียกว่า "burong isda" ซึ่งเป็นอาหารหมักจากปลาและข้าว (Olympia *et al.*, 1995) เนื่องจากการใช้เชื้อแบคทีเรียแลคติกที่สามารถย่อยแป้งได้มาผลิตกรดแลคติกจะสามารถลดต้นทุนการผลิตในส่วนของค่าใช้จ่ายในการไฮโดรไลซิสของแป้งไปเป็น glucose อย่างสมบูรณ์ (Yumato and Koji, 1995) จึงควรมีการศึกษาเพื่อค้นหาแบคทีเรียแลคติกที่มีคุณสมบัติดังกล่าวต่อไปอีก โดยอาจใช้ตัวอย่างอาหารที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบหรือใช้อาหารที่มีแป้งเป็นแหล่งคาร์บอนในการแยกและไม่ควรมี glucose เป็นส่วนประกอบหรือปะปนในอาหาร

จากการคัดเลือกเชื้อที่สามารถสร้างกรดแลคติกได้สูงสุดโดยการวิเคราะห์ด้วย HPLC พบว่า ไอโซเลท LABc040 ผลิตกรดแลคติกได้สูงที่สุดในอาหารที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน เท่ากับ 4.39 g/l คิดเป็น 0.44% (w/v) เยนเรส (2537) รายงานว่า เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่าง

ลูกชิ้นปลาผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 0.3868% (w/v) ในอาหารเหลว JP2 ซึ่งมี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนและวิเคราะห์ปริมาณกรดโดยวิธีเดียวกัน จะเห็นได้ว่า เชื้อไอโซเลท LABc040 ซึ่งแยกจากແໜ່ນในการทดลองนี้ผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า โดยใช้อาหารที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอนเหมือนกันแต่มีส่วนประกอบอื่นๆ น้อยกว่า สำหรับการผลิตกรดแลกติกในอาหารเหลวที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน พบว่า ไอโซเลท LABc072 ผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 29.49 g/l คิดเป็น 2.95% (w/v) และเมื่อคิดปริมาณกรดรวม (กรดดีและแอลแลกติก) พบว่า ไอโซเลท LABc038 ผลิตได้สูงสุดเท่ากับ 50.01 g/l คิดเป็น 5.0% (w/v) เอกชัย (2536) รายงานว่า เชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างไส้กรอกข้าวเป็นชนิด homofermentative อยู่ในจีแนส *Pediococcus* สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 1.09% (w/w) ในอาหารเหลว MRS ที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน และ Ohara และ Masahito (1996) รายงานว่า *Bacillus* sp. SHO-1, *B. cereus* และ *B. thuringiensis* ผลิตกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 16.4, 13.3 และ 12.0 g/l ตามลำดับ ในอาหารเหลวที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน จะเห็นได้ว่า เชื้อไอโซเลท LABc072 ซึ่งแยกจากหมักหมกและ ไอโซเลท LABc038 ซึ่งแยกจากถั่วเน่าແໜ່ນในการทดลองนี้ผลิตกรดแลกติกได้มากกว่า และนอกจากนี้ยังพบอีกด้วยว่า เชื้อไอโซเลท LABc026, LABc030, LABc040, LABc090, LABc092 และ LABc093 ผลิตกรดแลกติกเพียงชนิดเดียวในอาหารเหลวที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน ซึ่งมีข้อดี คือ จะช่วยลดขั้นตอนในการ purify กรดได้ (Ohara and Masahito, 1996) การที่พบว่าเชื้อทั้งหกไอโซเลทดังกล่าวผลิตเฉพาะกรดแลกติกเท่านั้นในอาหารเหลวที่มี soluble starch เป็นแหล่งคาร์บอน แต่ผลิตทั้งกรดดีและแอลแลกติกในอาหารที่มี glucose เป็นแหล่งคาร์บอน อาจเนื่องมาจากเชื้อไอโซเลทดังกล่าวสามารถผลิตเอนไซม์ racemase ซึ่งสามารถเปลี่ยนกรดแลกติกให้เป็นกรดดีแลกติกได้ และมีรายงานว่า *Pediococcus pentosaceus* และ *Lactobacilli* หลายชนิดสามารถเปลี่ยนอัตราส่วนของไอโซเมอร์ต่างๆ (เอนไซม์ D-nLDH และ L-nLDH) ในระหว่างการเติบโตแบบไม่ต่อเนื่อง ซึ่งโดยทั่วไปแล้วกรดแลกติกจะถูกสร้างขึ้นเป็นโครงสร้างหลักในระยะแรกของการเจริญและกรดดีแลกติกจะถูกสร้างขึ้นเป็นโครงสร้างหลักในระยะท้ายของ stationary phase และนอกจากนี้ pH และความเข้มข้นของไพรูเวตมีอิทธิพลต่อ activity ของ LDH ต่างๆ อีกด้วย ดังนั้นอัตราส่วนของไอโซเมอร์ต่างๆ จึงแตกต่างกันในแต่ละช่วงของการเจริญ (Garvie, 1980; Axelsson, 1993)

จากการศึกษาการผลิตของเชื้อ *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Pediococcus* sp. LABc072 พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทผลิตกรดสูงสุดในช่วงเวลาที่ 48 และปริมาณ glucose ลดลงเรื่อยๆ ตามปริมาณกรดที่เพิ่มขึ้น และลดลงต่ำสุดเมื่อผลิตกรดได้สูงสุด ซึ่งเหมือนกันกับรายงานของ Berry *et. al.* ในปี ค.ศ. 1999

จากการชักนำให้เกิดการกลายของ *Pediococcus* sp. LABc040 ด้วย UV พบว่า ที่เวลา 30 วินาที จะพบเซลล์มีชีวิตรอด 2.5% การชักนำวิธีเดียวกันนี้ของ Leather *et al.* ในปี ค.ศ. 1995 รายงานว่า *Leuconostoc mesenteroides* มีชีวิตรอด 1% ที่เวลา 20 วินาที จะเห็นว่า การทดลองนี้ใช้เวลามากกว่า อาจเนื่องมาจากใช้หลอด UV ขนาดไม่เท่ากันคือ Leather *et al.* ใช้ขนาด 330 W/cm² แต่ในการทดลองนี้ใช้ขนาด 20 W/cm² และพบว่า การชักนำให้เกิดการกลายของ *Pediococcus* sp. LABc040 ด้วย UV และ NTG ยังตรวจไม่พบสายพันธุ์กลายที่ย่อยแป้งหรือผลิตกรดจากแป้งได้ในปริมาณสูง อาจเป็นเพราะ จำนวนโคโลนีของเชื้อที่นำมาทดสอบน้อยเกินไป หากใช้จำนวนโคโลนีที่มากกว่านี้อาจจะพบสายพันธุ์กลายได้ ดังเช่นการทดลองของ Leathers *et al.* ในปี ค.ศ. 1995 ที่ทำการศึกษาการคัดเลือกสายพันธุ์กลายของ *Leuconostoc mesenteroides* โดยใช้แสง UV ซึ่งสุ่มมาจำนวนถึง 5,280 โคโลนี จึงควรมีการสุ่มโคโลนีมาทดสอบในจำนวนที่มากขึ้นและนอกจากนี้ควรเพิ่มระยะเวลาในการบ่มเชื้อให้นานขึ้น อาจนานถึง 1 สัปดาห์ เนื่องจากสายพันธุ์กลายที่ต้องการอาจเจริญได้ช้ากว่าสายพันธุ์กลายอื่นๆ

จากการศึกษาสถานะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของ *Pediococcus* sp. LABc040 และ *Pediococcus* sp. LABc072 พบว่า เชื้อทั้งสองไอโซเลทผลิตกรดสูงสุดเมื่อใช้ yeast extract สูงถึง 6.4 % ซึ่งไม่สามารถใช้เปอร์เซ็นต์ดังกล่าวในอุตสาหกรรมได้ เนื่องจาก yeast extract มีราคาแพง (Yoo *et al.*, 1997) การที่เชื้อทั้งสองไอโซเลทผลิตกรดสูงสุดโดยใช้เปอร์เซ็นต์ yeast extract สูงอาจเนื่องมาจาก ขณะไตเตรทหาปริมาณกรดรวม สีของน้ำหมักที่นำมาไตเตรทมีสีเหลืองเข้มมากขึ้นตามเปอร์เซ็นต์ที่เพิ่มขึ้นของ yeast extract จึงทำให้ใช้ปริมาณ NaOH มากขึ้นในการไตเตรทเพื่อให้ได้สีชมพูจางๆ ซึ่งเป็นจุดยุติ และทำให้การคำนวณปริมาณกรดรวมคลาดเคลื่อนจากความเป็นจริง จึงควรแก้ไขโดยใช้วิธีอื่น เช่น HPLC ในการวิเคราะห์หาปริมาณกรดซึ่งจะทำให้ทราบทั้งชนิดและปริมาณของกรดแต่ละชนิดอีกด้วย