



รายงานผลการวิจัย

เรื่อง การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยตรง
เพื่อลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพ

Isolation and Screening of Direct Lactic Acid Producing Microorganisms
from Starch for Reduction Cost of Bioplastic Production

ได้รับการจัดสรรงบประมาณวิจัย ประจำปี 2555

จำนวน 280,000 บาท

หัวหน้าโครงการ
ผู้ร่วมโครงการ

นางสาวสมคิด ดีจริง
นางสาวอรุณี คงดี

งานวิจัยเสร็จสิ้นสมบูรณ์

09/08/2556

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยโครงการวิจัยเรื่อง การแยกและคัดเลือกจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกจากแป้งโดยตรงเพื่อลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพ ขอขอบคุณ ทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักวิจัยและส่งเสริมวิชาการการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ประจำปีงบประมาณ 2555 และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) และขอขอบคุณ คณะวิทยาศาสตร์ รวมทั้งหน่วยปฏิบัติการจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ ที่อนุเคราะห์สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในการดำเนินการวิจัยจนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ และขอขอบคุณสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ (BIOTECH) สำหรับแบบที่เรียบบางส่วนที่ใช้ในการทดลองนี้ และขอขอบคุณ นางสาว แวมณี ไชยวงศ์ และนางสาว วิลาวรรณณ เรือนสิทธิ์ ที่มีส่วนช่วยทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

กันยายน 2556

สารบัญ

	หน้า
สารบัญตาราง	ข
สารบัญภาพ	ก
บทกัณฑ์	1
Abstract	2
คำนำ	3
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	6
การตรวจเอกสาร	7
อุปกรณ์และวิธีการ	29
ผลการวิจัย	37
วิจารณ์ผลการวิจัย	55
สรุปผลการวิจัย	68
เอกสารอ้างอิง	69
ภาคผนวก	81

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1	เปรียบเทียบคุณสมบัติของ PLA กับพลาสติกสังเคราะห์
ตารางที่ 2	สัดส่วนและการเติบโตของพลาสติกชีวภาพชนิดต่าง ๆ
ตารางที่ 3	ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในการจำแนกชนิดของ <i>Enterococcus</i> spp.
ตารางที่ 4	การศึกษาเกี่ยวกับอะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
ตารางที่ 5	เปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกจากวัตถุดิบที่มีแป้งชนิดต่าง ๆ โดยอะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
ตารางที่ 6	จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกจากแป้ง
ตารางที่ 7	จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์
ตารางที่ 8	ผลการคัดเลือกขึ้นต้นของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS สูตรดัดแปลง 1
ตารางที่ 9	ตารางสรุปจำนวนแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดและย่อยแป้งได้จากการคัดเลือกขึ้นต้นบนอาหารแข็ง MRS สูตรดัดแปลง 1
ตารางที่ 10	ผลการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรีย NMPYIM เมื่อเปรียบเทียบกับแบคทีเรียต่าง ๆ
ตารางที่ 11	ข้อมูลการจำแนกแบคทีเรีย NMPYIM เมื่อเทียบกับ GenBank
ตารางที่ 12	การใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรีย No. 78, <i>Enterococcus faecium</i> และ <i>Enterococcus durans</i>
ตารางที่ 13	การเตรียมสารละลายมาตรฐาน McFarland
ตารางที่ 14	การเตรียม Acetate buffer
ตารางที่ 15	การเตรียม Phosphate buffer
ตารางที่ 16	ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสในการทำกราฟมาตรฐาน

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	โครงสร้างของ D (-) - Lactic acid และ L(+) - Lactic acid	7
ภาพที่ 2	โครงสร้างทางเคมีของโพลีแลคติก	9
ภาพที่ 3	การผลิตและการสลายโพลีแลคติก	10
ภาพที่ 4	การย่อยสลายที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตจาก PLA	11
ภาพที่ 5	แนวโน้มการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของโลก	13
ภาพที่ 6	วิธีการผลิตกรดแลคติก homofermentative และ heterofermentative	15
ภาพที่ 7	แผนผังการจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม <i>Enterococcus</i> spp.	19
ภาพที่ 8	กระบวนการผลิตกรดแลคติกจากแป้ง	23
ภาพที่ 9	กระบวนการผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยอะมัยโลไลติกแลคติก แอซิดแบคทีเรีย	24
ภาพที่ 10	การผลิตกรดแลคติกจากแป้งของแบคทีเรียในอาหารเหลว	49
ภาพที่ 11	การเจริญและการผลิตกรดแลคติกที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย NMPY1M	50
ภาพที่ 12	ก) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย บนอาหาร MRS 51 ข) รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย NMPY1M	51
ภาพที่ 13	ผลการเทียบลำดับเบสของแบคทีเรีย NMPY1M กับ <i>Enterococcus durans</i>	51

การแยกและคัดเลือกรูปลักษณ์ที่ผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยตรง

เพื่อลดต้นทุนการผลิตพลาสติกชีวภาพ

Isolation and Screening of Direct Lactic Acid Producing

Microorganisms from Starch for Reduction Cost of Bioplastic Production

สมคิด ดีจิง¹ และอรุณี คงดี²

Somkid Deejing¹ and Arunee Kongdee²

^{1,2} คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยแม่โจ้ จ. เชียงใหม่ 50290

บทคัดย่อ

กรดแลคติก สามารถนำมาใช้ในการเตรียมโพลีแลคติก เพื่อนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ การผลิตกรดแลคติกจากแป้งแบบเดิมมีหลายขั้นตอนทำให้มีต้นทุนการผลิตสูง อะมัย โกลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเป็นแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกโดยตรงจากแป้งเพียงขั้นตอนเดียว จึงสามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตกรดแลคติกจากแป้ง งานวิจัยนี้ ได้แยกแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี pour plate บนอาหารแข็ง De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) มาตรฐาน ที่เติม soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ นำแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 473 ไอโซเลท มาคัดเลือกรูปลักษณ์โดยการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดและย่อยแป้งบนอาหารแข็ง MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติม แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ด้วยวิธี point inoculation พบว่า มีแบคทีเรีย 10 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยแป้งและผลิตกรดได้แต่มี 1 ไอโซเลท ที่ผลิตกรดแต่ไม่ย่อยแป้ง เมื่อทดสอบความสามารถในการผลิตกรดและย่อยแป้งของแบคทีเรียทั้ง 11 ไอโซเลท ในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติม แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรีย NMPYIM สามารถผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันสำปะหลังได้สูงสุดเท่ากับ 3.85 กรัมต่อลิตร และเมื่อศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลคติกของแบคทีเรีย NMPYIM ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติม แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ พบว่า แบคทีเรียนี้สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุด เท่ากับ 4.3 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรีย NMPYIM โดยศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ลักษณะทางสัณฐานวิทยา ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี และการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน 16S rRNA พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M มีความเหมือน *Enterococcus durans* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

คำสำคัญ: การแยกและการคัดเลือก อะมิบไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
การผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยตรง การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

Abstract

Lactic acid can be used as precursor of polylactic acid (PLA) and used as material for produce biodegradable plastic. Conventional production of lactic acid from starchy materials requires many steps. Amylolytic lactic acid bacteria (ALAB) utilize starchy biomass and can convert starch directly into lactic acid in single step. The utilization of efficient ALAB can reduced the cost of lactic acid production from starch. In this study, isolation of bacteria from various sources was done on standard De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) agar adding 1% soluble starch and bromocresol purple by pour plate technique. Total 473 bacteria were used for screening the ability of acid production and starch hydrolysis on de Man Rogosa Sharpe (MRS) agar modified 1 adding 1% cassava starch and bromocresol purple by using point inoculation technique. It was found that 10 isolates produced acid and hydrolyzed starch whereas 1 isolate produced acid but not hydrolyzed starch. The lactic acid production from starch of eleven bacteria were examined in MRS broth modified 1 adding 1% cassava starch. The bacterium NMPY1M produced highest amount of lactic acid at 3.85 g/l. Time course of growth and lactic acid production of bacterium NMPY1M were also studied in MRS broth modified 1 adding 1 % cassava starch. It was found that bacterium NMPY1M produced highest lactic acid concentration at 4.3 g/l for 24 hours. The cultural, morphological, biochemical and physiological characteristics of bacterium NMPY1M were also examined. Finally, the identification of bacteria by sequence of 16sRNA was revealed. Bacterium NMPY1M was identified as *Enterococcus durans* NMPY1M at 100 % similarity.

Key words: Isolation and screening, Amylolytic lactic acid bacteria, Direct lactic acid production from starch, Bacterial identification

คำนำ

ปัจจุบันกระแสสิ่งแวดล้อมได้กลายเป็นสิ่งที่หลายประเทศให้ความสำคัญ และทั่วโลกตระหนักถึงปัญหาสิ่งแวดล้อมที่กำลังส่งผลกระทบต่อมนุษย์อย่างเห็นได้ชัด ไม่ว่าจะเป็นภาวะโลกร้อน ภูมิอากาศแปรปรวน และภัยธรรมชาติต่าง ๆ ที่รุนแรงขึ้น จนคร่าชีวิตมนุษย์มากมาย ทำให้เราต้องหันกลับมาให้ความสำคัญกับการดูแลและอนุรักษ์ธรรมชาติ รวมถึงการใช้ผลิตภัณฑ์ที่ไม่ส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม พลาสติกสังเคราะห์ เป็นพลาสติกที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ หรือย่อยสลายได้ยากโดยวิธีการธรรมชาติ การกำจัดโดยการเผาขยะพลาสติกสังเคราะห์ก่อให้เกิดก๊าซเรือนกระจก รวมทั้งยังมีเหลือดค้างทำให้เกิดปัญหากับสิ่งแวดล้อม มีผลให้เกิดภาวะโลกร้อนที่ส่งผลกระทบคือสิ่งมีชีวิตบนโลกมากขึ้น

ปัจจุบัน การผลิตกรดแลคติกได้รับความสนใจเป็นอย่างมาก เนื่องจากกรดแลคติกสามารถนำมาใช้เตรียมโพลิแลคติกแอซิด (Polylactic acid, PLA) เพื่อใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ แนวทางหนึ่งที่จะช่วยลดปัญหาภาวะโลกร้อน หรือภาวะภูมิอากาศเปลี่ยนแปลง คือการใช้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (biodegradable) ทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ ซึ่งกำลังเป็นที่สนใจของนานาประเทศเป็นอย่างมาก แต่ข้อเสียสำคัญที่ทำให้พลาสติกชีวภาพยังไม่เป็นที่แพร่หลาย เนื่องจากยังมีต้นทุนในการผลิตสูงกว่าพลาสติกสังเคราะห์อยู่มาก ปัจจุบัน ประเทศไทยยังต้องนำเข้าเม็ดพลาสติกจากต่างประเทศเพื่อนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์พลาสติก ทำให้เราสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศเป็นจำนวนมาก แต่ประเทศไทยมีศักยภาพในการผลิตพลาสติกได้เอง เนื่องจากประเทศไทยมีวัตถุดิบทางการเกษตรเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะมันสำปะหลัง ซึ่งเป็นวัตถุดิบที่มีปริมาณมากและมีราคาถูกเมื่อเทียบกับแหล่งพืชชนิดอื่นที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ ซึ่งประเทศไทยมีการผลิตและส่งออกมันสำปะหลังปริมาณมาก แต่เดิมกระบวนการผลิตกรดแลคติกจากวัตถุดิบที่มีแป้งมีหลายขั้นตอน ได้แก่ กระบวนการย่อยแป้ง (starch hydrolysis) ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนที่ทำให้แป้งพองตัวเป็นเจล (gelatinization) และการทำให้แป้งเหลว (liquefaction) และการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก (saccharification) จากนั้นจึงเข้าสู่กระบวนการหมัก (fermentation) จากน้ำตาลให้ได้กรดแลคติก แต่มีแบคทีเรียบางชนิดที่สามารถเปลี่ยนแป้งไปเป็นกรดแลคติกได้โดยตรงในขั้นตอนเดียวคือ อะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Amylolytic lactic acid bacteria, ALAB) ที่สามารถช่วยลดต้นทุนในการผลิตกรดแลคติกจากแป้งได้

ปัจจุบัน การผลิตกรดแลคติกจากวัตถุดิบที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบแบบเดิมมีหลายขั้นตอน จึงเป็นสาเหตุทำให้ต้นทุนการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมีต้นทุนสูง ทำให้ส่งผลต่อ

ต้นทุนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพสูงขึ้นตามไปด้วย ในงานวิจัยนี้ จึงสนใจที่จะแยกและคัดเลือกรวมยาลอไลติกแลคติกแอซิคแบคทีเรีย ที่มีศักยภาพในการผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยตรงเพียงขั้นตอนเดียวโดยไม่ต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน และศึกษาการเจริญและผลิตกรดแลคติกที่ระยะเวลาต่าง ๆ รวมทั้งจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ เพื่อการประยุกต์ใช้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในการผลิตกรดแลคติกโดยตรงจากแป้ง และเป็นแนวทางในการช่วยลดต้นทุนการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพให้สามารถแข่งขันกับการผลิตพลาสติกสังเคราะห์ได้ในอนาคต

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อแยกและคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดและย่อยแป้งได้
2. เพื่อศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลคติกจากแป้งที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้
3. เพื่อจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลคติกจากแป้งที่คัดเลือกได้



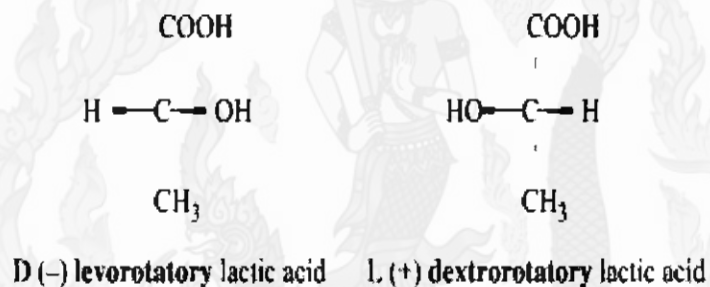
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้แบบที่เรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกจากแป้งโดยตรง และอาจจะนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ ซึ่งการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เพื่อทดแทนพลาสติกสังเคราะห์ที่ช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อม และยังช่วยลดภาวะโลกร้อนซึ่งเป็นการช่วยเพิ่มคุณภาพชีวิตและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมให้กับสิ่งมีชีวิตบนโลก
2. ทราบการเจริญและการผลิตกรดแลกติกจากแป้งโดยตรงที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบบที่เรียที่คัดเลือกได้
3. ทราบชนิดของแบบที่เรียที่ผลิตกรดแลกติกจากแป้งโดยตรงของแบบที่เรียที่คัดเลือกได้
4. เป็นแนวทางช่วยลดขั้นตอนในการผลิตกรดแลกติกจากแป้งโดยตรง และช่วยลดต้นทุนในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพเพื่อแข่งขันกับการผลิตพลาสติกสังเคราะห์
5. เพื่อนำองค์ความรู้ที่ได้ไปพัฒนาต่อยอดงานวิจัยทางด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ เพื่อให้ประเทศไทยสามารถผลิตเม็ดพลาสติกใช้ได้เองภายในประเทศโดยไม่จำเป็นต้องสั่งซื้อจากต่างประเทศ ลดการสูญเสียเงินตราออกนอกประเทศได้
6. ผลิตภัณฑ์สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ
7. การตีพิมพ์บทความในวารสารในประเทศ หรือวารสารนานาชาติ

การตรวจเอกสาร

กรดแลกติก (Lactic acid)

กรดแลกติก เป็นกรดอินทรีย์ มีชื่อทางเคมีว่า 2-hydroxypropanoic acid มีสูตรโมเลกุลคือ $C_3H_6O_3$ หรือ $CH_3CH(OH)COOH$ ประกอบด้วยหมู่แอลกอฮอล์ (OH) และหมู่คาร์บอกซิลิก (COOH) มีคุณสมบัติ ละลายน้ำได้ดี มีการระเหยต่ำ โดยทั่วไป กรดแลกติกจะพบอยู่ในรูป L(+) -lactic acid และ D(-)-lactic acid ซึ่งต่างก็เป็นไอโซเมอร์กันและกัน ดังแสดงในภาพที่ 1 หรืออาจพบร่วมกันในรูปของ Dแอล-แลกติก acid



ภาพที่ 1 โครงสร้างของ D (-) - Lactic acid และ L(+) - Lactic acid

ที่มา: Reddy *et al.* (2008)

การผลิตกรดแลกติก

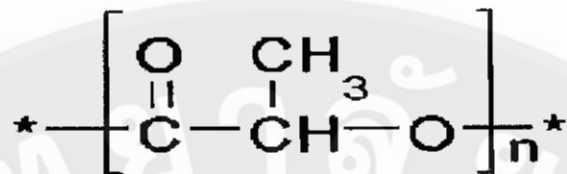
การผลิตกรดแลกติกสามารถผลิตได้โดยกระบวนการทางเคมี และกระบวนการหมัก แต่การผลิตกรดแลกติกโดยวิธีการทางเคมีมีข้อเสียคือ ทำให้เกิดของเหลือทิ้งจากการผลิตปริมาณมาก สิ้นเปลืองพลังงาน การควบคุมการผลิตทำได้ยุ่งยาก และยังต้องควบคุมการตกค้างของสารเคมีระหว่างการผลิตด้วย นอกจากนี้ กรดแลกติกที่สังเคราะห์ขึ้นโดยกระบวนการทางเคมีได้กรดแลกติกในรูปของ จะอยู่ในรูปของ Dแอล-แลกติก acid หากนำ Dแอล-แลกติก acid ไปทำเม็ดพลาสติกจะทำให้คุณภาพของเม็ดพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพด้อยลง ในขณะที่การสังเคราะห์กรดแลกติกโดยกระบวนการหมักของจุลินทรีย์นั้น สามารถผลิตกรดแลกติกได้ในรูปของไอโซเมอร์จำเพาะเป็นชนิด L-(+)-lactic acid หรือ D(-)-Lactic acid อย่างใดอย่างหนึ่ง ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่เลือกใช้ในการหมักด้วย (Anuradha *et al.*, 1999) ซึ่งการใช้กรดแลกติกที่เป็น L-(+)-lactic acid หรือ D(-)-Lactic acid อย่างใดอย่างหนึ่งจะทำให้ได้คุณภาพของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพดีกว่าชนิด Dแอล-แลกติก acid

ความสำคัญและประโยชน์ของกรดแลกติก

กรดแลกติกถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในอุตสาหกรรมหลายชนิด ได้แก่

ในอุตสาหกรรมอาหาร มีการนำกรดแลกติกมาใช้ในการปรับความเป็นกรด-ด่างของอาหาร และเติมแต่งกลิ่นของอาหาร เป็นบัฟเฟอร์ หรือใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียซึ่งมีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร เนื่องจากกรดแลกติกให้รสเปรี้ยวเล็กน้อย ไม่มีกลิ่นรุนแรง กลิ่นของกรดแลกติก เช่น โซเดียมแลคเตท และโพแทสเซียมแลคเตท มีรสเปรี้ยวเล็กน้อย และมีค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เป็นกลางจึงนิยมเติมในอาหารแปรรูปประเภทเนื้อ ไก่ และอาหารทะเล เพื่อยืดอายุการเก็บ แคลเซียมแลคเตท เป็นสารที่นิยมเติมในเครื่องดื่มเกลือแร่ และเครื่องดื่มเสริมแคลเซียม และเร็วกว่าการให้พลังงานของกลูโคสประมาณ 2-10 เท่า นอกจากนี้ กรดแลกติกยังสามารถนำไปเป็นสารตั้งต้นในการผลิตทางเคมีและชีวภาพของการผลิตกรดอินทรีย์ตัวอื่น ๆ เช่น กรดโพรพิโอนิก กรดอะซิติก และกรดอะไซลิก อนุพันธ์ของกรดแลกติกก็สามารถใช้ประโยชน์ในด้านอื่น ๆ อีกมากมาย เช่น ทางการแพทย์ อุตสาหกรรมการย้อมผ้า การชุบโลหะ ใช้เป็นสารอิมัลซิไฟเออร์ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง ใช้เป็นส่วนประกอบในการผลิตยากำจัดวัชพืช สารฆ่าเชื้อรา และยาฆ่าแมลง ใช้เป็นส่วนผสมของแลคเกอร์และสารโพลีเมอร์ ใช้ในการผลิตผลิตภัณฑ์จากยาง ใช้ในการพิมพ์สีผ้า และกระดาดการย้อมสีผ้า ช่วยทำให้เกิดความเงางามของผ้าไหมและผ้าไหมสังเคราะห์ เป็นต้น

ในอุตสาหกรรมโพลีเมอร์ กรดแลกติกสามารถใช้เป็นวัตถุดิบสำหรับการผลิตโพลีแลกติกแอซิด (Polylactic acid, PLA) โพลีแลกติกแอซิด มีโครงสร้างการจัดเรียงตัว 2 แบบ คือ D - และ L- มีชื่อว่า PDLA และ PLLA ตามลำดับ โพลีเมอร์ที่ประกอบด้วยส่วนผสมทั้ง D - และ L- ในโครงสร้างเรียกว่า Poly(DL-lactide) หรือ PDLLA เป็นโพลีเมอร์แบบสแตชันที่มีหมู่เมทิล (Methyl group) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับสมบัติเชิงกลและสมบัติทางความร้อนพบว่า PLLA และ PDLA มีสมบัติเชิงกล เช่น การทนต่อแรงดึงและค่ามอดูลัสและสมบัติทางความร้อนสูงกว่า PDLLA แต่ PDLLA มีเปอร์เซ็นต์การยืดตัว ณ จุดขาดสูง และสามารถย่อยสลายได้ภายในเวลาที่รวดเร็วกว่าไฮโมโพลีเมอร์ อัตราส่วนของ D-แลคติก acid นี้มีผลต่อคุณสมบัติของ PLA คือจุดหลอมเหลว และระดับการตกผลึก (Martin and Averous, 2001) ซึ่งโพลีเมอร์ของกรดแลกติก หรือโพลีแลกติกแอซิด สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพซึ่งสามารถย่อยสลายได้ง่ายโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ โครงสร้างทางเคมีของ Polylactic acid (PLA) แสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 โครงสร้างทางเคมีของโพลีแลคติก (Polylactic acid, PLA)

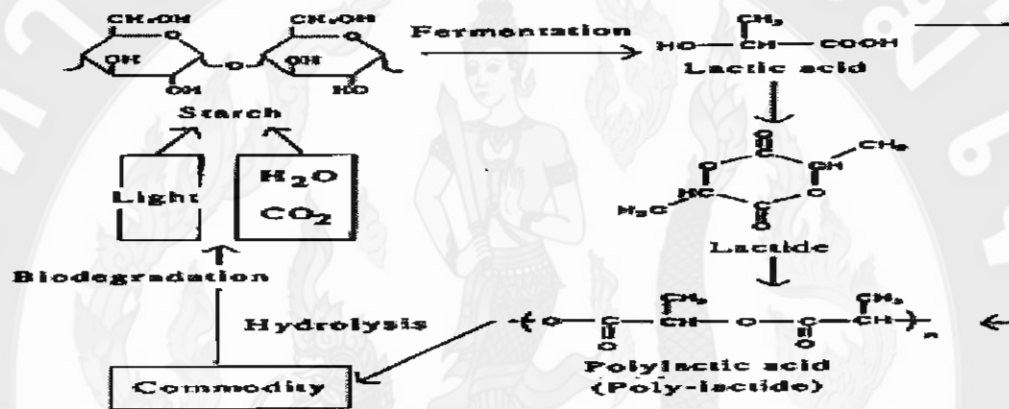
ที่มา : <http://www.nia.or.th/download/document/chapter3.pdf> (14 กันยายน 2554)

กระบวนการผลิตโพลีแลคติกแอซิด เริ่มต้นจากขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ โดยการปลูกพืชผลิตแป้งซึ่งใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) และน้ำเป็นวัตถุดิบ ผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสงของพืชได้ผลผลิตเป็นแป้ง จากนั้นจึงนำเอาแป้งมาผ่านกระบวนการหมักโดยใช้จุลินทรีย์เฉพาะ เพื่อเปลี่ยนโมเลกุลขนาดใหญ่ของแป้งและน้ำตาลเป็นกรดแลคติก ซึ่งใช้เป็นโมโนเมอร์ในขั้นตอนการสังเคราะห์โพลิเมอร์ที่สามารถสังเคราะห์ได้โดยสามารถจำแนกได้เป็น 2 กระบวนการที่แตกต่างกันคือ กระบวนการควบแน่น (polycondensation) และกระบวนการเปิดวง (ring-opening polymerization) ถึงแม้ว่าโพลิเมอร์ที่ผลิตได้จากทั้งสองกระบวนการนี้จะมีโครงสร้างและสมบัติต่าง ๆ เหมือนกันทุกประการ แต่ก็มีรายละเอียดขั้นตอนของกระบวนการสังเคราะห์ที่ต่างกัน จึงเป็นที่มาของการเรียกชื่อโพลิเมอร์ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ ผลิตภัณฑ์โพลิเมอร์ที่ได้จากกระบวนการแรกมักจะเรียกว่า โพลีแลคติกแอซิด เนื่องจากกระบวนการนี้เริ่มต้นจากการใช้กรดแลคติกโดยตรงจนได้โพลิเมอร์ในขั้นตอนสุดท้าย ในกระบวนการที่สองจะมีการเปลี่ยนกรดแลคติก โดยปฏิกิริยาการรวมตัวของกรดแลคติก 2 โมเลกุล แล้วเกิดเป็นสารประกอบแบบวงที่มีชื่อว่าแลคไทด์ (lactide) ก่อน จากนั้นจึงนำเอาวงแหวนแลคไทด์นี้มาสังเคราะห์เป็นสายโซ่ยาวโพลิเมอร์ในขั้นตอนต่อมา ด้วยเหตุนี้จึงเรียกชื่อผลิตภัณฑ์โพลิเมอร์จากกระบวนการนี้ว่า โพลีแลคไทด์ อย่างไรก็ตาม โพลิเมอร์ที่ได้จากทั้งสองกระบวนการก็คือสารชนิดเดียวกันนั่นเอง ซึ่งเมื่อสังเคราะห์ได้แล้วก็สามารถนำมาขึ้นรูปเพื่อใช้ประโยชน์ต่อไป

คุณสมบัติของโพลีแลคติกแอซิด

โพลีแลคติกแอซิด มีลักษณะใสและมีความแวววาวสูงซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของสารเติมแต่งที่ใช้ PLA มีสมบัติทางกลและสามารถนำไปใช้งานได้เช่นเดียวกับโพลิเมอร์พื้นฐานทั่วไปที่มีสมบัติเป็นเทอร์โมพลาสติก PLA สามารถกักเก็บกลิ่นและรสชาติได้ดี มีความต้านทานต่อน้ำมันและไขมันสูง ในขณะที่ก๊าซออกซิเจน ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำสามารถแพร่ผ่านได้ดีมี

ความคงทนต่อ การกระแทกต่ำซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับ PVC ที่ไม่มีการเติมสารเสริมสร้างพลาสติกมีความแข็งแรง ความคงทนต่อการกระแทกและความยืดหยุ่นใกล้เคียงกับ PET นอกจากนี้ PLA ยังมีสมบัติใกล้เคียงกับ PS และสามารถนำไปดัดแปรให้มีสมบัติใกล้เคียงกับ polyethylene (PE) หรือ polypropylene (PP) ดังนั้น PLA จึงสามารถนำไปปรับปรุงสมบัติพื้นฐานทั้งด้านการขึ้นรูปและการใช้งานได้เช่นเดียวกับพลาสติกโอเลฟินส์ที่ผลิตจากระบวนการทางปิโตรเคมี(สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2550) ภาพที่ 3 แสดงการผลิตและการสลายโพลีแลกติก



ภาพที่ 3 การผลิตและการสลายโพลีแลกติก (Polylactic acid , PLA)

ที่มา : <http://www.google.co.th/imglanding> 3 สิงหาคม 2555

นอกจากนี้ PLA ยังมีคุณสมบัติ จุดหลอมเหลวสูงถึง 180 องศาเซลเซียส และมีความโปร่งแสงสูง จึงมีการพัฒนานำ PLA มาผลิตเป็นบรรจุภัณฑ์เพื่อบรรจุอาหาร ซึ่งมีข้อได้เปรียบในทางการค้าเมื่อเทียบกับบรรจุภัณฑ์อาหารแบบเดิมที่ได้จากการสังเคราะห์ทางเคมี เนื่องจากฟิล์มโพลีเมอร์ของกรดแลกติกสามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ และมีความปลอดภัยสำหรับการบรรจุอาหาร พันธะเอสเทอร์ของ PLA สามารถทำลายได้ง่ายด้วยเอนไซม์ protease, proteinase K, bromelain, ficin, esterase และ trypsin หรือการย่อยสลายโดยจุลินทรีย์ *Fusarium moniliforme*, *Penicillium requeforti* (Torres et al., 1996), *Amyvolatopsis* sp. (Pranamuda et al., 1997) และ *Bacillus brevis* (Tomita et al., 1999) เป็นต้น จากคุณสมบัติดังกล่าว ทำให้ PLA เป็นที่ต้องการในตลาดขณะนี้ และมีแนวโน้มว่าจะมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นในอนาคต แต่ข้อจำกัดทางการค้าของ PLA คือราคาที่ยังสูงอยู่ในปัจจุบัน ดังนั้น ถ้าสามารถใช้วัตถุดิบเหลือใช้ทางการเกษตรราคาถูกเป็นสับสเตรท สำหรับกระบวนการหมักเพื่อผลิตกรดแลกติกได้ ก็จะสามารถลดต้นทุนการผลิต PLA ได้ ตารางที่ 1 แสดงการเปรียบเทียบคุณสมบัติของ PLA กับพลาสติกสังเคราะห์

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบคุณสมบัติของ PLA กับพลาสติกสังเคราะห์

โพลีเมอร์	คุณสมบัติเชิงกล (Mechanical properties)			คุณสมบัติทางความร้อน (Thermal properties)		
	Modulus (MPa)	Strength (MPa)	Elongation at break (%)	Tg(°C)	Tm(°C)	Cost (Baht/Kg)
PE	1,500	35	600	-36	137	~50
PS	3,500	38	27	-10	164	~50
PP	1,920	55	26	-3	-	~50
PLA	2,050	-	9	58	176	~120
PCL	190	14	>500	-61	65	-
PBAT	82	19	>500	-45	114	~150
PBSA	249	9	>500	-30	110	~170
PHBV	900	-	15	5	150	-

การย่อยสลายได้ทางชีวภาพของโพลีแลคติกแอซิด (สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ, 2551)

โพลีแลคติกแอซิดสามารถย่อยสลายได้ดีในโรงหมักขยะอินทรีย์ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส ขึ้นไป แต่จะไม่ย่อยสลายทันทีที่อุณหภูมิต่ำกว่า เนื่องจาก PLA มีอุณหภูมิ Tg ใกล้เคียง 60 องศาเซลเซียส โดยขั้นตอนแรก PLA จะถูกย่อยสลายไปเป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ และกรดแลคติกโดยการไฮโดรไลซิสซึ่งเกิดขึ้นภายใน 2 สัปดาห์ สารประกอบและกรดแลคติกที่ได้จะถูกย่อยสลายต่อไปโดยจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ที่อยู่ในธรรมชาติไปเป็นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และมวลชีวภาพ การย่อยสลายของบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตจาก PLA

แสดงในภาพที่ 4



1 วัน



35 วัน



50 วัน

ภาพที่ 4 การย่อยสลายที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของบรรจุภัณฑ์ที่ผลิตจาก PLA

ที่มา: ธนาวดี (2551) <http://www.vcharkarn.com/varticle/38245> (7 ตุลาคม 2554)

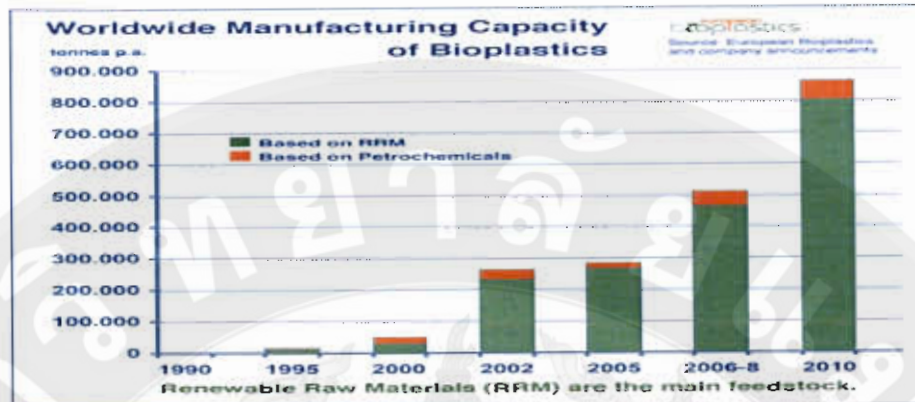
การนำไปใช้ประโยชน์ของโพลีแลคติกแอซิด

PLA เป็นโพลิเมอร์ที่มีสมบัติหลากหลายทำให้สามารถนำไปประยุกต์เป็นพลาสติกมูลค่าเพิ่มต่าง ๆ หลายด้าน ได้แก่ ด้านการแพทย์ เนื่องจาก PLA เป็นโพลิเมอร์ย่อยสลายได้ทางชีวภาพจึงสามารถเข้ากับเนื้อเยื่อ (biocompatible) และสามารถถูกดูดซึม (bioresorbable) ได้โดยระบบชีวภาพ (biological system) ในร่างกาย จึงทำให้ PLA เป็นวัสดุที่มีศักยภาพสูงสำหรับงานทางการแพทย์ และถูกนำมาใช้เป็นเครื่องมือทางการแพทย์มานาน เช่น ไหมเย็บแผล คัตเย็บแผล วัสดุปิดแผล อุปกรณ์ฝังในร่างกาย อุปกรณ์สำหรับยึดกระดูก วัสดุสำหรับนำพาหรือปลดปล่อยยา ซึ่งสามารถควบคุมอัตราและระยะเวลาในการปลดปล่อยยาได้อย่างมีประสิทธิภาพ ด้านการเกษตร เช่น ภาชนะปลูกพืช วัสดุห่อหุ้มและปลดปล่อยยาฆ่าแมลง ยาฆ่าวัชพืช หรือปุ๋ยตามเวลาที่กำหนด ด้านบรรจุภัณฑ์ เช่น บรรจุภัณฑ์ที่ใช้แล้วทิ้ง ภาชนะบรรจุอาหาร ขวดน้ำ ถุงพลาสติก กล่องโฟม ฟิล์มสำหรับหีบห่อ เม็ดโฟมกันกระแทก ตัวเคลือบภาชนะกระดาษ ด้านเส้นใยและแผ่นผ้าแบบ non-woven เช่น ผลิตภัณฑ์อนามัย ผ้าอ้อมสำเร็จรูป เสื้อผ้าและเครื่องนุ่งห่ม เส้นใยสำหรับบรรจุในเครื่องนอน ด้านยานยนต์ เช่น อุปกรณ์ลดแรงกระแทก แผ่นรองพื้นและอุปกรณ์ตกแต่งภายใน ด้านอิเล็กทรอนิกส์และการสื่อสาร เช่น ชิ้นส่วนประกอบในโทรศัพท์เคลื่อนที่ ชิ้นส่วนประกอบในคอมพิวเตอร์ แผ่นซีดี อื่น ๆ เช่น อุปกรณ์เครื่องเขียน บัตรพลาสติก ผลิตภัณฑ์ใช้ในบ้านเรือน สารเคลือบกระดาษ สารยึดติด ท่อพลาสติกชั่วคราว

แนวโน้มการใช้และการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (<http://www.vecharkam.com/>)

9 สิงหาคม 2555

จากกระแสอนุรักษ์ธรรมชาติ และความตระหนักต่อปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะปัญหาภาวะโลกร้อนที่ทั่วโลกกำลังเผชิญร่วมกัน ส่งผลให้ความต้องการผลิตภัณฑ์พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพในตลาดโลกมีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นมาก โดยมีปริมาณความต้องการใช้ทั่วโลกในปี 2550-2551 สูงถึง 500,000 ตันต่อปีและมีอัตราการเจริญเติบโตถึงร้อยละ 70 เทียบกับปี 2548 โดยเฉพาะตลาดสำคัญซึ่งมีปริมาณการใช้พลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ทั้งนี้คาดการณ์ว่า ตลาดสหภาพยุโรปมีแนวโน้มปริมาณการใช้พลาสติกชีวภาพ 40,000-50,000 ตันต่อปี (ขยายตัวร้อยละ 20) ส่วนสหรัฐอเมริกา มีปริมาณความต้องการใช้ 70,000-80,000 ตันต่อปี (ขยายตัวร้อยละ 16) และตลาดญี่ปุ่นมีปริมาณความต้องการใช้ 15,000 ตันต่อปี (ขยายตัวร้อยละ 100) แนวโน้มการใช้และการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ แสดงในภาพที่ 5



ภาพที่ 5 แสดงแนวโน้มการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพของโลก

ที่มา : <http://www.vcharkarn.com> 9 สิงหาคม 2555

สำหรับประเทศไทย มีความพร้อมในด้านวัตถุดิบสำหรับการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ แต่การพัฒนาวัสดุโพลีเมอร์ย่อยสลายได้ยังอยู่ในระดับบุกเบิกและการเริ่มสร้างเทคโนโลยีใหม่ ขณะนี้มีนักวิจัยในหลายมหาวิทยาลัยทั่วประเทศให้ความสนใจ และกำลังศึกษาวิจัยด้านนี้ทั้งเรื่องของเทคโนโลยีการเตรียมวัตถุดิบทางการเกษตรรวมทั้งงานวิจัยทางด้านเทคโนโลยีทางชีวภาพ และเทคโนโลยีในการผลิตและการขึ้นรูปผลิตภัณฑ์ ขณะเดียวกันมีผู้ประกอบการหลายรายของไทยหันมาลงทุนในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพบ้างแล้วแต่ยังคงนำเข้าเม็ดพลาสติกชีวภาพจากต่างประเทศทำให้ต้นทุนสูงกว่าพลาสติกทั่วไป 3-4 เท่า ผู้บริโภคจึงมีอยู่ในวงจำกัด ตารางที่ 2 แสดงสัดส่วนและการเติบโตของพลาสติกชีวภาพชนิดต่าง ๆ ปี ค.ศ. 2011 และคาดการณ์ในปี ค.ศ. 2020 ในมุมมองระดับโลกและระดับทวีปเอเชีย

กระบวนการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์

แบคทีเรียกรดแลกติก

จุลินทรีย์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิตกรดแลกติกโดยกระบวนการหมัก ส่วนใหญ่จะเป็นจุลินทรีย์ในกลุ่มแบคทีเรียแลกติก (Lactic acid bacteria : LAB) ซึ่งจัดอยู่ใน family Lactobacillaceae เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม และรูปท่อน มีการจัดเรียงตัวแบบคู่ คู่สี่ และโซ่ยาว เป็นต้น ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่สร้างเอนไซม์อะคตาเลส (Axelsson, 1998) สามารถสร้างกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์สุดท้ายในการหมักคาร์โบไฮเดรต จะได้พลังงานจากน้ำตาล และสารที่มีโครงสร้างคล้ายน้ำตาลโดยได้จากกระบวนการ substrate level phosphorylation การเลี้ยงเชื้อในอาหารธรรมชาติค่อนข้างยาก เนื่องจากเชื้อมีความต้องการอาหารที่ซับซ้อน (fastidious microorganism) เช่น วิตามิน (vitamin) กรดอะมิโน (amino acid) ไพริมิดีน

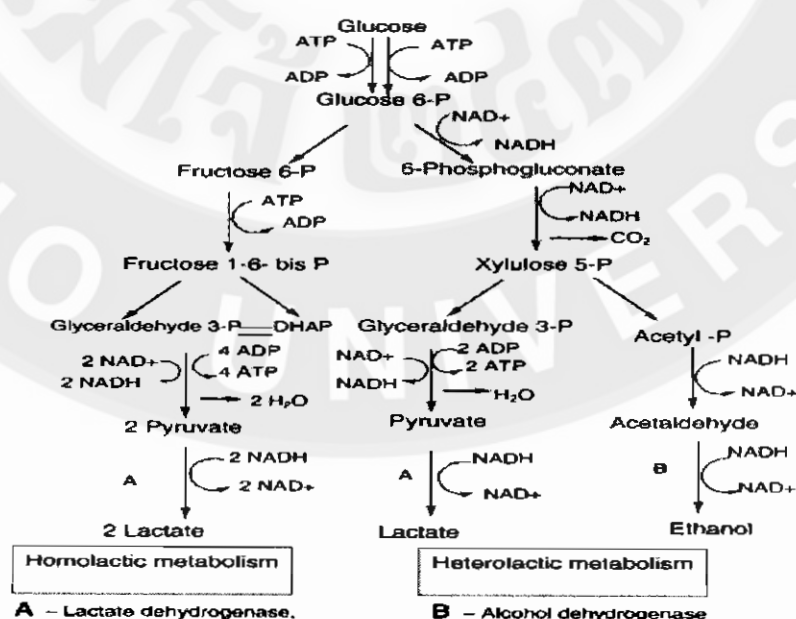
ตารางที่ 2 สัดส่วนและการเติบโตของพลาสติกชีวภาพชนิดต่าง ๆ ปี ค.ศ. 2011 และคาดการณ์ในปี ค.ศ. 2020 ในมุมมองระดับโลกและระดับทวีปเอเชีย โดยอาศัยข้อมูลจาก Baltus (InnoBioPlast 2013)

ชนิดของพลาสติก	สัดส่วนและปริมาณพลาสติกชีวภาพ				ปริมาณการผลิตเพิ่มขึ้น (Tons)	การเติบโต ตามผลผลิต (%)
	ปี ค.ศ. 2011		ปี ค.ศ. 2020			
	(%)	(Tons)	(%)	(Tons)		
ตลาดโลก:						
Degradable plastics:						
PBS	6	98,400	5	415,000	316,600	321.75
PBAT	5	82,000	1	83,000	1,000	1.22
PHA	2	32,800	5	415,000	382,200	1,165.24
PLA	11	180,400	10	830,000	649,600	360.09
Starch blends	20	328,000	9	747,000	419,000	127.74
Nondegradable plastics:						
PA	5	82,000	1	83,000	1,000	1.22
PET	38	623,200	60	4,980,000	4,356,800	699.10
Polyolefin	13	213,200	9	747,000	533,800	250.37
ตลาดเอเชีย:						
Degradable plastics:						
PBS	5	40,000	9	351,000	311,000	777.50
PBAT	0	0	1	39,000	30,000	-
PHA	2	16,000	2	78,000	62,000	387.50
PLA	5	40,000	7	273,000	233,000	582.50
Starch blends	13	104,000	4	156,000	52,000	50.00
Nondegradable plastics:						
PA	5	40,000	1	39,000	-1,000	-2.50
PET	70	560,000	73	2,847,000	2,287,000	408.39
Polyolefin	0	0	3	117,000	117,000	-

(pyrimidine) เปปไทด์ (peptide) แมงกานีส (manganese) อะซิเตต (acetate) และ ทวิน 80 (Tween 80) เป็นต้น แบคทีเรียแลคติกสามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในที่ที่มีออกซิเจน (aerobe) ไม่มีออกซิเจน (anaerobe) และมีออกซิเจนน้อย (microaerophilic) อุณหภูมิที่เชื้อสามารถเจริญได้อยู่ในช่วง 2-53 องศาเซลเซียส อุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดอยู่ในช่วง 30-40 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรดด่างที่เหมาะสม 5.58-6.20 แต่โดยทั่วไปเจริญได้ที่ ค่าความเป็นกรด-ด่างน้อยกว่าหรือเท่ากับ 5.0 อัตราการเจริญเติบโตลดลงเมื่ออยู่ในสภาพที่เป็นกลาง หรือด่าง (Salminen and Wright, 1993) แบคทีเรียแลคติกแต่ละสปีชีส์สามารถปรับตัวเพื่อการเจริญเติบโต ภายใต้สภาวะแวดล้อมแตกต่างกัน จึงทำให้พบเชื้อกลุ่มนี้กระจายอยู่ทั่วไปทั้งในคนและสัตว์ โดยเฉพาะบริเวณช่องปาก ลำไส้ พบในแมลง และในผลิตภัณฑ์อาหารต่าง ๆ แหล่งที่พบแบคทีเรียแลคติก

1. Homofermentative เป็นแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส โดยการเปลี่ยนกลูโคสเป็นไพรูเวตโดยใช้เอนไซม์อัลโดเลส (aldolase) เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา แล้วให้กรดแลกติกมากกว่าหรือเท่ากับ 80 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน glycolysis pathway (Embden-Meyerhof pathway : EMP) ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Pediococcus*, *Streptococcus* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus acidophilus* และ *Lactobacillus delbrueckii*

2. Heterofermentative เป็นแบคทีเรียพวกที่หมักน้ำตาลกลูโคส แล้วให้คาร์บอนไดออกไซด์ 20-25 เปอร์เซ็นต์ กรดแลกติก 50 เปอร์เซ็นต์ กรดอะซิติก 20-25 เปอร์เซ็นต์ โดยผ่าน phosphoglyconate pathway หรือ phosphoketolase pathway ซึ่งเป็นแบคทีเรียสกุล *Leuconostoc* และ *Lactobacillus* บางชนิด เช่น *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus fermentum* และ *Lactobacillus brevis* วิธีการสังเคราะห์กรดแลกติกแบบ homofermentative และ heterofermentative แสดงในภาพที่ 6



ภาพที่ 6 วิธีการผลิตกรดแลกติก homofermentative และ heterofermentative
ที่มา: Reddy *et al.* (2008)

การจำแนกแบคทีเรียแลกติก

การจัดอนุกรมวิธานของแบคทีเรียกรดแลกติก โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชนิดของกระบวนการหมักน้ำตาลกลูโคส ความสามารถในการใช้น้ำตาลแต่ละชนิด และความสามารถในการเจริญที่อุณหภูมิต่าง ๆ ในปัจจุบันได้มีการนำความรู้ทางพันธุศาสตร์มาใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียในระดับจีนัสและสปีชีส์ โดยความพิจารณาความแตกต่างของชนิดกรดนิวคลีอิกบนดีเอ็นเอ (DNA homology) และความใกล้ชิดในสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic) โดยดูจากลำดับเบสบน ribosomal RNA ทำให้การจัดจำแนกมีความถูกต้องมากขึ้น

แบคทีเรียกรดแลกติกสามารถจำแนกได้เป็น 12 สกุล ได้แก่

(1) *Streptococcus* เซลล์มีรูปร่างกลม หรือรูปไข่ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.8-1.2 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นสายโซ่ หรือคู่ ผลิตรกรดแลกติกชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส (Homofermentative) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ มีหลายสปีชีส์เป็นปรสิตในคนหรือสัตว์และบางสปีชีส์สามารถทำให้เกิดโรคได้ เจริญที่อุณหภูมิ 20 - 41 องศาเซลเซียส ปัจจุบันประกอบด้วย 39 สปีชีส์ มี mol % G + C ระหว่าง 34 -46 % (Hardie and Whiley, 1995)

(2) *Vagococcus* เป็นแบคทีเรียกรดแลกติกซึ่งเคลื่อนที่ได้ (ไม่ทุกสายพันธุ์) ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Vagococcus fluvialis* ซึ่งเดิมอยู่ใน *streptococci* (Stiles and Holzapfel, 1997)

(3) *Lactococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมหรือรูปไข่ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-1 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว เป็นคู่หรือค่อกันเป็นสายโซ่ ผลิตรกรดแลกติกชนิด L(+) จากการหมักกลูโคส มักใช้เป็นก๊าล่าเชื้อในผลิตภัณฑ์นม สามารถเจริญได้ที่ 10 องศาเซลเซียส แต่ไม่เจริญที่ 45 องศาเซลเซียส มี mol % G + C ระหว่าง 34-43 % (Teuber, 1995)

(4) *Enterococcus* เซลล์มีรูปไข่ จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว หรือสายโซ่สั้น ๆ ผลิตรกรดแลกติก ชนิด L(+) เป็นผลิตภัณฑ์หลักเท่านั้นจากการหมักกลูโคส ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ สามารถเจริญที่ 10 หรือ 45 องศาเซลเซียส บางสายพันธุ์ผลิตเอนไซม์อะเลสทีนได้ และบางสปีชีส์ทำให้เกิดโรค มี mol % G + C ระหว่าง 37-40 % (Devriese and Pot, 1995)

(5) *Pediococcus* เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.36–1.43 ไมครอน แบ่งเซลล์ลักษณะ 2 ทิศทางบนระนาบเดียวกัน โดยแบ่งตัวครั้งที่ 2 ในทิศด้านขวามือของครั้งแรก ทำให้เกิดลักษณะเฉพาะเป็นเซลล์ 4 เซลล์ติดกันคล้ายจตุรัส (tetrad formation) ในสภาวะไม่มี

อากาศ ผลิตรกรดแลคติกชนิด DL และ L(+) จากการ หมักกลูโคส บางสปีชีส์ทำให้เบียร์และไวน์เสีย (Stiles and Hozapfel, 1997) มี mol % G + C ระหว่าง 34 – 44 %

(6) *Tetragenococcus* มีลักษณะการแบ่งเซลล์เหมือน *Pediococcus* เนื่องจากเดิมคือสปีชีส์ *P. halophilus* ซึ่งจัดจำแนกใหม่จากการเจริญในอาหารซึ่งมีเกลือโซเดียมคลอไรด์สูงถึง 18 % และมีลำดับเบสบน 16s rRNA ใกล้เคียงกับเชื้อสกุล *Enterococcus* และ *Carnobacterium* มากกว่าสกุลเดิม

(7) *Aerococcus* มีลักษณะการแบ่งเซลล์เหมือน *Pediococcus* ประกอบด้วย 2 สปีชีส์ คือ *Aerococcus viridians* และ *A. urinae* ซึ่งเปลี่ยนแปลงจาก *P. homari* และ *P. urinaequi* ตามลำดับ (Stiles and Holzapfel, 1997)

(8) *Leuconostoc* เซลล์มีสัณฐานขึ้นกับอาหารเลี้ยงเชื้อ ในอาหารซึ่งมีกลูโคสเซลล์มีลักษณะยืดอกคล้ายกลุ่ม *Lactobacilli* แต่ในน้ำนมเซลล์จะมีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยว อยู่เป็นคู่หรือเป็นสายโซ่สั้นถึงปานกลาง ผลิตรกรดแลคติกชนิด D(-) เอทานอล คาร์บอนไดออกไซด์และสารหอมระเหยจากการหมักกลูโคส (heterofermentative) จึงช่วยสร้างกลิ่นรสในอาหารหมักดอง การเจริญต้องการสารอาหารสูง (Stiles and Holzapfel, 1997) มี mol % G + C ระหว่าง 37-40 % (Dellaglio *et al.*, 1995)

(9) *Oenococcus* ประกอบด้วยสปีชีส์เดียวคือ *Oenococcus oeni* ซึ่งเปลี่ยนมาจาก *Leuc. oenos* ด้วยสมบัติการทนต่อกรดและเอทานอลปริมาณสูง รวมทั้งข้อมูลพันธุกรรมจากดีเอ็นเอ : ดีเอ็นเอไฮบริไดเซชัน และลำดับเบสของ 16s rRNA ต่างจากสปีชีส์อื่นในสกุล *Leuconostoc* อย่างชัดเจน (Dellaglio และคณะ, 1995)

(10) *Weissella* ประกอบด้วยแบคทีเรีย 7 สปีชีส์ ซึ่งลักษณะคล้าย *Leuconostoc* (*leuconostoc* -like bacteria) รูปร่างเซลล์เป็นแท่งและกลม (Stiles และ Holzapfel, 1997)

(11) *Lactobacillus* กลุ่ม obligately heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซส และเพนโทส ผ่านวิถีฟอสโฟกลูโคเนทเป็น แลคเตท เอทานอล และ คาร์บอนไดออกไซด์ ประกอบด้วย 19 สปีชีส์ เป็นแบคทีเรียกรดแลคติกกลุ่มใหญ่ที่สุด มีความหลากหลายของลักษณะทาง ฟิโนไทป์ สมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมี เนื่องจากความแตกต่างของ mol % G + C ภายในสกุลสูงคือระหว่าง 32-53 % (Axelsson, 1998) พบในแหล่งต่าง ๆ เช่น เชื้อเมือกของมนุษย์และสัตว์ พืช และน้ำทิ้ง เป็นต้น บางสปีชีส์ เป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อในมนุษย์ เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนหรือ ทรงรี (coccobacilli) ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ ประกอบด้วย 55 สปีชีส์ ซึ่งแบ่งได้เป็น 3 กลุ่ม (Stiles and Holzapfel, 1997) คือ กลุ่ม obligately homofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลแลคโทส (มากกว่า 85 %) เป็นกรดแลคติกโดยวิธี

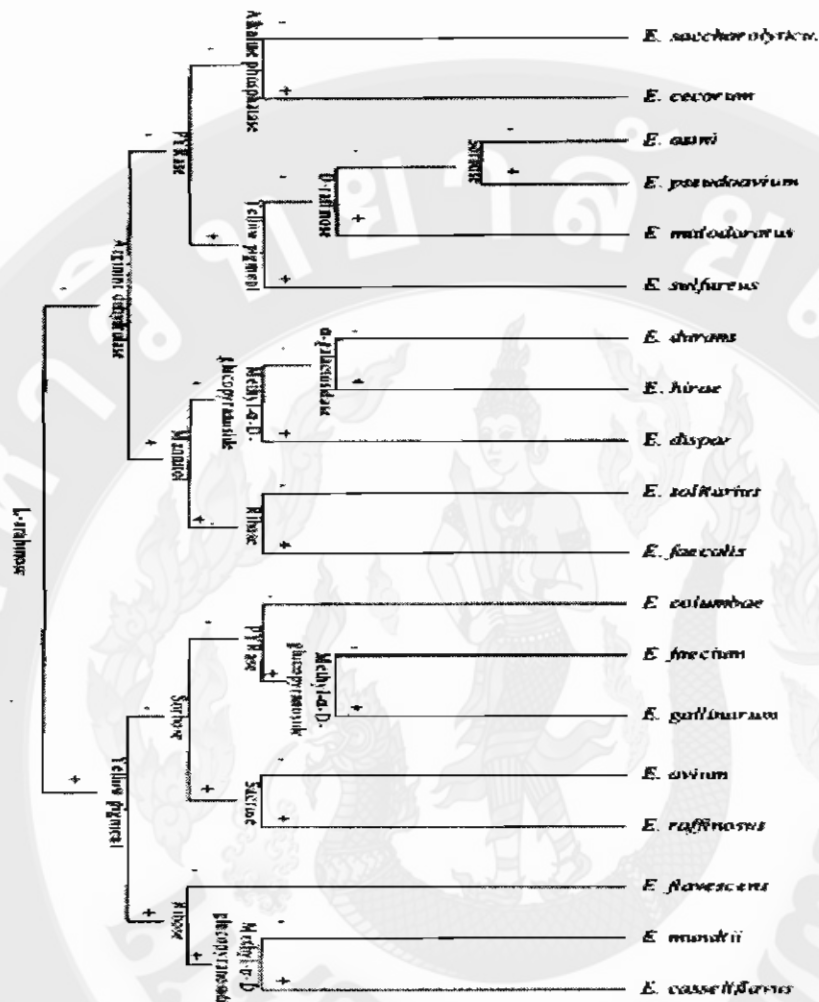
Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) ผลิตเอนไซม์ 1,6 biphosphate-aldolase แต่ไม่ผลิตเอนไซม์ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทส และกลูโคสไม่ได้ ประกอบด้วย 18 สปีชีส์ กลุ่ม Facultatively heterofermentative lactobacilli หมักน้ำตาลเฮกโซสเป็นกรดแลกติกผ่านวิถี EMP มีการผลิตเอนไซม์ทั้ง aldolase และ phosphoketolase จึงหมักน้ำตาลเพนโทสได้

(12) *Carnobacterium* เซลล์มีรูปร่างเป็นท่อนตรงขนาดสั้นถึงปานกลางหรือเป็นท่อนเรียว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5-0.7 ไมครอน และยาว 1.1-3.0 ไมครอน จัดเรียงตัวเป็นเซลล์เดี่ยวหรือคู่ มักไม่พบการเรียงเป็นสายโซ่ ผลิตกรดแลกติก ชนิด L (+) คาร์บอนไดออกไซด์ อะซิเตท และเอทานอลจากการหมักน้ำตาลเฮกโซส มี mol % G+C ระหว่าง 31.6 - 37.2 %

Manera *et al.* (1999) แสดงแผนผังการจำแนกแบคทีเรียในกลุ่ม *Enterococcus* spp. (ภาพที่ 7) และลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีในการจำแนกชนิดของ *Enterococcus* spp. (ตารางที่ 3)

การผลิตกรดแลกติกจากแป้ง

วัตถุดิบที่มีส่วนประกอบของแป้งที่นำมาใช้ในการผลิตกรดแลกติกได้ เช่น ข้าวโพด ข้าวสาลี มันสำปะหลัง มันฝรั่ง เป็นต้น แต่วัตถุดิบที่เป็นแป้งจากมันสำปะหลัง เป็นแหล่งที่น่าสนใจมากที่สุดเนื่องจากมีปริมาณมาก และราคาถูก มันสำปะหลัง เป็นพืชที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของประเทศไทยรองจากข้าวเจ้า การเพาะปลูกและการดูแลรักษาทำได้ง่าย ทนแล้งได้ดี ลงทุนน้อย การรบกวนของแมลง และโรคพืชมีน้อยเมื่อเทียบกับการเพาะปลูกพืชไร่ชนิดอื่น ๆ อีกทั้งรายได้ต่อไร่สูงกว่าพืชไร่อื่น ๆ ทำให้เกษตรกรหันมาปลูกมันสำปะหลังเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ โดยแหล่งเพาะปลูกมันสำปะหลังที่สำคัญคือภาคตะวันออกเฉียงเหนือ และภาคตะวันออกของประเทศไทย การส่งออกผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังอยู่ในรูปของแป้งมันสำปะหลัง มันเส้น และมันอัดเม็ด ซึ่งสามารถทำรายได้เป็นลำดับที่ 6 ใน 10 ลำดับแรกที่ทำรายได้ให้แก่ประเทศไทยเป็นจำนวนมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งมันสำปะหลังอัดเม็ด เป็นสินค้าส่งออกที่สำคัญที่มีมูลค่าการส่งออกสูงที่สุด ใช้เป็นวัตถุดิบอาหารสัตว์ มูลค่าการส่งออกของมันสำปะหลังอัดเม็ดจะส่งไปจำหน่ายในประเทศแถบสหภาพยุโรป แต่สหภาพยุโรปได้ออกประกาศว่าด้วยสุขอนามัย และความปลอดภัยด้านอาหาร ซึ่งต้องควบคุมดูแลความปลอดภัยของอาหารที่ผลิตและนำไปจำหน่ายในสหภาพยุโรป โดยจะดูแลตั้งแต่การเพาะปลูก การใช้สารเคมี ยารักษาโรค สารเคมีที่ใช้ จนถึงขั้นตอนการบริโภค ในการควบคุมดูแลดังกล่าวจะครอบคลุมไปถึงวัตถุดิบในการผลิตอาหารสัตว์ที่นำมาเลี้ยงสัตว์ ก่อนที่จะเข้าสู่กระบวนการแปรรูป เพื่อจำหน่ายให้ผู้บริโภคด้วย จึงส่งผลให้มีการสนับสนุนการใช้ประโยชน์จากมันสำปะหลัง



ภาพที่ 7 แผนผังการจำแนกแบคทีเรียกลุ่ม *Enterococcus* spp.

ที่มา : Manera et al. (1999)

ภายในประเทศให้มากขึ้น เช่น สนับสนุนไขมันเส้นเป็นอาหารสัตว์ ทดแทนวัตถุดิบอาหาร ปลาข้าว หรือข้าวโพด โดยเดิมกากถั่วเหลือง ปลาป่น หรือหัวอาหารมากขึ้น เพื่อเพิ่มระดับ โปรตีนในสูตรอาหารสัตว์ให้เพียงพอแก่ความต้องการของสัตว์ สนับสนุนให้มีการใช้มัน สำปะหลังเป็นวัตถุดิบในการผลิตแอลกอฮอล์ เพื่อนำมาผสมกับน้ำมันเชื้อเพลิง และสนับสนุน การใช้แป้งมันสำปะหลังทดแทนการใช้แป้งสาลีในการผลิตผลิตภัณฑ์อาหารบางชนิด นำมาใช้ เป็นภาชนะบรรจุ ซึ่งสามารถใช้บรรจุอาหารแทนโฟมได้ หรือใช้เป็นวัสดุก่อสร้าง เช่น ทดแทนไม้แบบ ไม้ค้ำยันภายในได้ แป้งมันสำปะหลังที่ผลิตได้ในประเทศไทยจัดเป็นแป้ง คุณภาพสูง การใช้แป้งมันสำปะหลังในประเทศ ส่วนใหญ่ใช้ในการบริโภคในครัวเรือน และ ใช้ในอุตสาหกรรมอื่น ๆ เช่น อุตสาหกรรมกาว ไม้อัด ผลิตผงชูรส เป็นต้น รวมทั้งใช้เป็น

[illegible][illegible]

: Manera *et al.* (1999)

ส่วนผสมในการผลิตอาหารสัตว์ กล้าณรงค์ และคณะ 2543 รายงานว่า แป้งมันสำปะหลังเป็นคาร์โบไฮเดรตที่ประกอบด้วย คาร์บอน ไฮโดรเจน และออกซิเจน มีสูตรเคมีโดยทั่วไป คือ $(C_6H_{10}O_5)_n$ แป้งเป็นพอลิเมอร์ของกลูโคส ซึ่งประกอบด้วยหน่วยย่อยของกลูโคส (anhydroglucose unit) เชื่อมต่อกันด้วยพันธะ glucosidic linkage ที่คาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ทางด้านคอนปลายของสายพอลิเมอร์มีหน่วยกลูโคสที่มีหมู่อัลดีไฮด์ (aldehyde group) เรียกว่า reducing end group แป้งประกอบด้วยพอลิเมอร์ของกลูโคส 2 ชนิด คือ พอลิเมอร์เชิงเส้น (amylase) และพอลิเมอร์เชิงกิ่ง (amylopectin) วางตัวในแนวรัศมี แป้งจากแหล่งที่ต่างกันจะมีอัตราส่วนของอะมัยโลสและอะมัยโลเพคตินที่แตกต่างกัน ทำให้คุณสมบัติของแป้งแต่ละชนิดแตกต่างกัน และเมื่อดูโครงสร้างของแป้งมันสำปะหลัง พบว่า ประกอบด้วยหน่วยย่อยของน้ำตาลกลูโคสมาต่อกันเป็นโมเลกุลของแป้ง ดังนั้น แป้งมันสำปะหลังจึงสามารถใช้เป็นแหล่งของกลูโคส และเป็นวัตถุดิบในอุตสาหกรรมการหมักหลายชนิดได้ เช่น อุตสาหกรรมการหมักกรดแลกติก ซึ่งกรดแลกติก เป็นกรดที่มีความสำคัญมาก ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร อุตสาหกรรมสิ่งทอ อุตสาหกรรมทางการแพทย์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในปัจจุบัน กรดแลกติกเริ่มเข้ามามีบทบาทในอุตสาหกรรมพอลิเมอร์ โดยใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตพลาสติกที่สามารถย่อยสลายได้ทางชีวภาพ ซึ่งกำลังเป็นที่ต้องการของตลาดเป็นอย่างมากในขณะนี้ ในปัจจุบัน ประเทศไทยยังต้องสั่งซื้อเม็ดพลาสติกชีวภาพได้จากต่างประเทศเพื่อนำมาใช้ผลิตผลิตภัณฑ์พลาสติกต่าง ๆ แต่ด้วยข้อจำกัดในด้านราคาค้นทุนการผลิตที่ยังสูงอยู่แต่หากมีการเพิ่มปริมาณการผลิตและมีการพัฒนากระบวนการ การสังเคราะห์เม็ดพลาสติกให้ประสิทธิภาพมากขึ้น และสามารถผลิตเม็ดพลาสติกใช้ได้เองภายในประเทศ จะมีผลทำให้เราไม่สูญเสียเงินตราออกนอกประเทศ ดังนั้น ถ้าสามารถใช้แป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นผลผลิตทางการเกษตรราคาถูกเป็นสับสเตรทในการผลิตกรดแลกติกได้ ก็น่าจะสามารถลดราคาของพอลิแลกติกแอซิด หรือเม็ดพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพลงได้ นอกจากนี้ ยังเป็นการเพิ่มมูลค่าของแป้งมันสำปะหลังได้อีกทางหนึ่งด้วย ในกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบที่มีแป้งสามารถผลิตได้โดยไม่จำกัด และปัจจุบันมีงานวิจัยที่สนับสนุนการผลิตมันสำปะหลังให้มีคุณภาพมากยิ่งขึ้น เช่น การพัฒนาพันธุ์มันสำปะหลังที่มีปริมาณแป้งสูงขึ้น ซึ่งประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมที่มีทรัพยากรที่ใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตเม็ดพลาสติกย่อยสลายได้อยู่อย่างไม่จำกัด

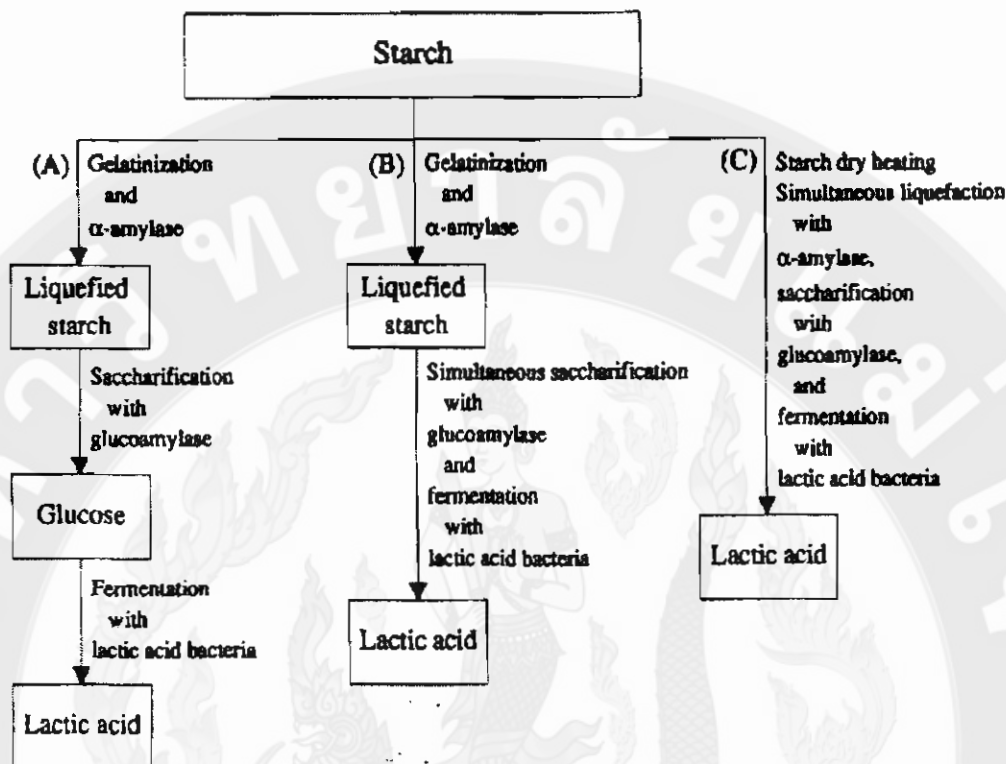
โดยทั่วไปการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง ต้องมีหลายขั้นตอนคือ

1. การย่อยแป้ง (starch hydrolysis) เป็นขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งให้เป็นน้ำตาล โดยอาจใช้กรด (acid hydrolysis) หรือใช้เอนไซม์ (enzymatic hydrolysis) ซึ่งวิธีการที่ใช้เอนไซม์เพื่อย่อยแป้งนั้นจะได้รับความนิยมมากกว่าการย่อยแป้งซึ่งในขั้นตอนนี้ประกอบด้วย

- การเจลาติไนเซชัน (gelatinization) ซึ่งเป็นขั้นตอนที่ทำให้เม็ดแป้งพองตัว โดยเม็ดแป้งจะดูดซึมน้ำ ขณะที่ได้รับความร้อนทำให้เม็ดแป้งพองตัว เรียกอุณหภูมิช่วงนี้ว่า อุณหภูมิการเกิดเจล (gelatinization temperature)
- การเกิดลิกูแฟคชัน (liquefaction) เป็นขั้นตอนการลดความหนืดของแป้งที่เกิดเจล หรือย่อยแป้งเพื่อให้แป้งมีโมเลกุลเล็ก หรือทำให้เหลว โดยการย่อยโมเลกุลของแป้งแบบสุ่มของลูกโซ่กลูโคส ทำให้แยกเป็นสายสั้น ๆ มีขนาดโมเลกุลเล็กลง และมีความหนืดลดลง โดยใช้ เอนไซม์ แอลฟา-อะมัยเลส แทนกรดย่อยที่อุณหภูมิ 90-130 องศาเซลเซียส หรือสูงกว่า ระยะเวลาประมาณ 2 ชั่วโมง
- การเกิดแซคคาริฟิเคชัน (saccharification) เป็นขั้นตอนการย่อยแป้งให้เป็นโมเลกุลของน้ำตาล เพื่อย่อยแป้งสูงให้เป็นน้ำตาลก่อนเข้าสู่กระบวนการหมักโดยใช้เอนไซม์กลูโคอะมัยเลส (glucoamylase หรือ เบต้า-อะมัยเลส (beta-amylase) ผลผลิตที่ได้ในขั้นตอนนี้คือน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว น้ำตาลโมเลกุลคู่ หรือน้ำตาลที่มีโมเลกุลสูงกว่า เช่น กลูโคส มอลโตส หรือมอลโตไตรโอส

2. กระบวนการหมัก (fermentation) น้ำตาลให้เป็นกรดแลกติก เป็นกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์เปลี่ยนน้ำตาลให้เป็นกรดแลกติก

จะเห็นได้ว่า การผลิตกรดแลกติกจากแป้งต้องผ่านหลายขั้นตอนดังกล่าวข้างต้น ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ต้นทุนในการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมีต้นทุนสูง ในภาพที่ 8 แสดงกระบวนการผลิตกรดแลกติกจากแป้งในแนวทางต่าง ๆ กัน คือในแนวทางแบบ A เป็นวิธีการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบที่เป็นแป้ง ต้องใช้หลายขั้นตอนคือ Gelatinization, Liquefaction, Saccharification และ Fermentation ซึ่งเป็นเหตุทำให้ต้นทุนในการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมีต้นทุนสูงขึ้นอย่างมาก แต่มีวิธีการในการลดต้นทุนในการผลิตกรดแลกติกจากแป้งอาจทำได้โดยผ่านแนวทาง B คือมีขั้นตอน Gelatinization, Liquefaction และรวมขั้นตอนของ Saccharification) ไปพร้อมกับ Fermentation หรือเรียกว่า Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) หรือการใช้อีกแนวทางหนึ่งคือ แนวทาง C คือ รวมขั้นตอน Gelatinization, Liquefaction, Saccharification และ Fermentation อยู่ในขั้นตอนเดียว เรียกว่า Simultaneous liquefaction saccharification and fermentation (SLSF) ซึ่งแนวทางแบบ C เราสามารถลดขั้นตอนในการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบที่เป็นแป้งให้เหลือเพียงขั้นตอนเดียว เป็นการช่วยลดต้นทุนในการผลิตกรดแลกติกจากแป้งลงเป็นอย่างมาก ซึ่งในแนวทางแบบ C เป็นการหมักแป้งให้เป็นกรดแลกติกโดยตรง (direct lactic acid fermentation) โดยไม่ต้องผ่านกระบวนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาล ซึ่งจะทำให้ลดค่าใช้จ่ายในขั้นตอนการย่อยแป้งทั้งหมด โดยการใช้จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตกรดแลกติกจากแป้งได้โดยตรงโดยใช้แบคทีเรียที่เป็นพวกอะไมโลไลติกแลกติกแบคทีเรีย (Amylolytic lactic acid bacteria, ALAB)



ภาพที่ 8 กระบวนการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง

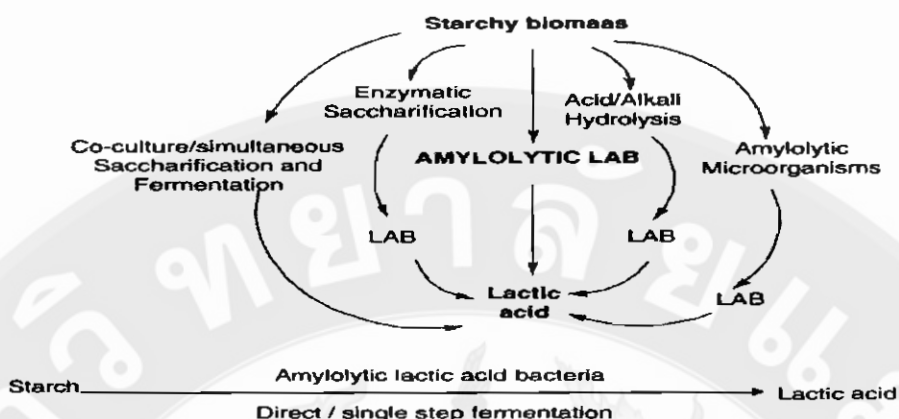
ที่มา: <http://www.google.co.th/imglanding> 3 สิงหาคม 2555

อะมีโลไลติกแลกติกแอซิดแบคทีเรีย (Amylolytic lactic acid bacteria, ALAB)

เป็นแบคทีเรียแลกติกที่สามารถใช้แป้งเป็นแหล่งคาร์บอน ผ่านกระบวนการหมักเป็นกรดแลกติกเพียงขั้นตอนเดียว แบคทีเรียกลุ่มนี้ สามารถแยกได้จากแหล่งตัวอย่างที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบ รวมทั้งในอาหารหมัก ได้มีการวิจัยถึงประสิทธิภาพ ของ ALAB ซึ่งมีคุณสมบัติในการหมักวัตถุดิบประเภทแป้งต่าง ๆ ได้หลากหลายชนิด เช่น แป้งข้าวโพด แป้งมันฝรั่ง แป้งมันสำปะหลัง และวัตถุดิบอื่นที่มีแป้งเป็นองค์ประกอบหลัก (Vishnu *et al.*, 2000) กระบวนการผลิตกรดแลกติกจากแป้งแสดงในภาพที่ 9

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลกติกจากแป้ง

มีรายงานการแยกอะมีโลไลติกแลกติกแอซิดแบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ เช่น อาหารหมักที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ เช่น แป้งจากมันสำปะหลัง และแป้งจากธัญพืช ข้าวโพด ข้าวฟ่าง แบคทีเรียแลกติก *Lactobacillus plantarum* ซึ่งแยกได้จากผลิตภัณฑ์อาหารหมักจากมันสำปะหลังแถบแอฟริกา (Nwankwo *et al.*, 1989) และพบ ALAB สายพันธุ์ใหม่คือ *Lactobacillus manihotivorans* (Morlon-Guyot *et al.*, 1998) ที่แยกได้จากมันสำปะหลังหมักใน



ภาพที่ 9 กระบวนการผลิตกรดแลกติกจากแป้งโดยอะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย
ที่มา: Reddy *et al.* (2008)

โกลัมเบีย นอกจากนี้ Olympia *et al.* (1995) ศึกษาลักษณะของ ALAB คือ *L. plantarum* ซึ่งแยกได้จาก burong isda ซึ่งเป็นอาหารหมักจากปลาและข้าวของฟิลิปปินส์ และ Agati *et al.* (1998) ได้แยก *Lactobacillus fermentum* ที่เป็น ALAB ที่แยกได้ครั้งแรกจากแป้งหมักที่ทำจากแป้งข้าวโพด ต่อมา Sanni *et al.* (2002) ได้แยก *L. plantarum* และ *L. fermentum* จากอาหารหมักที่มีแป้งของไนจีเรีย และมีงานวิจัยเกี่ยวกับ ALAB ที่ใช้ในการผลิตกรดแลกติกจากวัตถุดิบที่เป็นแป้ง เช่น มันสำปะหลังและธัญพืช และมักจะพบ ALAB ในวัตถุดิบที่มีแป้ง (Morlon-Guyot *et al.*, 2000) เนื่องจาก ALAB สามารถผลิต อัลฟา-อะมัยเลส เพื่อย่อยสลายแป้งดิบ (Rodriguez-Sanoja *et al.*, 2000) และสามารถหมักวัตถุดิบที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ เช่น ข้าวโพด (Nakamura, 1981), มันฝรั่ง (Chatterjee *et al.*, 1997) มันสำปะหลัง (Giraud *et al.*, 1994) และสับสเตรทที่เป็นแป้งแตกต่างกัน (Naveena *et al.*, 2003) และ *L. amylovorus* มีกิจกรรมของเอนไซม์อะมัยเลสสูงกว่า *L. afn.vlophizus* (Pompeyo *et al.*, 1993) และทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถผลิตกรดแลกติกจากแป้งได้โดยตรง (Mereier *et al.*, 1992; Yumoto and Ikeda, 1995 ; Zhang and Cheyran, 1991) แบคทีเรีย ALAB สามารถเปลี่ยนแป้งให้เป็นกรดแลกติกได้โดยตรงโดยเป็นการหมักเพียงขั้นตอนเดียว ส่วนใหญ่มักใช้ ALAB ในอาหารหมัก เช่น อาหารหมักจากธัญพืช (ขนมปังจากข้าวไรน์ในยุโรป ขนมปังแถบเอเชีย ข้าวหมัก แป้งคัม และผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มที่ไม่มีแอลกอฮอล์ นอกจากนี้ *Lactobacillus amylophilis* และ *Lactobacillus amylovorus* แยกได้จากการหมักข้าวโพดเพื่อเป็นอาหารสุกรและโค ตามลำดับ (Nakamura, 1981 ; Nakamura and Crowell, 1979), *Lactobacillus* strains LEM 220, 207 และ 202 แยกได้จาก chicken crop ในฝรั่งเศส (Champ *et al.*, 1983), *Leuconostoc* แยกได้จากเหูหมักกับปลาป่น สวีเดน (Lindgren and Refai, 1984) และ *L. plantarum* แยกได้จากปลาหมักและข้าวหมัก

ในญี่ปุ่น (Olympia *et al.*, 1995) ซึ่ง Tanasupawat (1998) ได้แยกแบคทีเรียแลคติกจากอาหารหมักของไทย เช่น ปลาร้า ปลาจ่อม กุ้งจ่อม และหอยคอง พบว่า เป็น *Lactobacillus pentosus*, *L. plantarum*, *L. farciminis* และ *Leuconostoc* sp. นอกจากนี้ Wang *et al.* (2010) แยกอะมิโนไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากดินของโรงงานผลิตน้ำมันในประเทศจีน และศึกษาประสิทธิภาพการผลิต แอล-แลคติก acid จากแป้งมันสำปะหลังโดยใช้ *Lactobacillus rhamnosus* CASL โดยเปรียบเทียบการหมักแบบต่างกัน ของการหมักโดยใช้แป้งมันสำปะหลังกับกลูโคสและแป้งข้าวโพดแบบรวมการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลและการหมักในขั้นตอนเดียว (Simultaneous saccharification and fermentation, SSF) การหมักแบบสองขั้นตอน (Two step fermentation, TSF) และรวมการแป้งให้เหลว การเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลและการหมักในขั้นตอนเดียว (Simultaneous liquefaction saccharification and fermentation, SLSF) พบว่า การใช้แป้งมันสำปะหลังได้ผลการผลิตชนิดแอล-แลคติกได้สูงสุดสูงถึง 175.4 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้แป้งมันสำปะหลังความเข้มข้น 275 กรัมต่อลิตร โดยการหมักแบบ SSF ต่อมา Narita *et al.* (2004) พบว่า แบคทีเรียแลคติก *Streptococcus bovis* 148 มีความสามารถในการผลิต แอล-แลคติก ที่มีความบริสุทธิ์ถึง 95.6 เปอร์เซ็นต์ ได้โดยตรงจากวัตถุดิบที่เป็นแป้งละลายน้ำ หรือแป้งดิบ ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง 6.0 และมีผลผลิตของกรดแลคติกสูงสุดเท่ากับ 14.7 กรัมต่อลิตร ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส จากการหมักแป้งเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร ซึ่ง Thomsen *et al.* (2007) ศึกษาการหมักอาหารที่มีส่วนผสมของน้ำตาล และแป้งโดยอะมิโนไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย จำนวน 6 สายพันธุ์ของ พบว่า *Lactobacillus plantarum* A6 สามารถผลิตกรดแลคติกได้ดี และสามารถใช้แป้งในอาหารโดยมีอัตราการเจริญเติบโต และผลผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 0.7 กรัมต่อชั่วโมง ในปี 2010 Ju-Yu *et al.* (2010) รายงานว่า แบคทีเรียกรดแลคติกที่แยกได้จากเกลือทะเลประเทศเกาหลี 2 สายพันธุ์ เป็นแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างท่อนสามารถเจริญได้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน เจริญในอาหาร MRS ที่อุณหภูมิ 30-37 องศาเซลเซียส และ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.5-8.0 พบว่า อุณหภูมิ และค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการเจริญคือ 37 องศาเซลเซียส และ 7.0 ตามลำดับ ได้และจำแนกชนิดของแบคทีเรียกรดแลคติกทั้ง 2 สายพันธุ์ ที่แยกได้ พบว่า เป็น *Weissella koreensis* MS1-3 และ *Weissella koreensis* MS1-14 Reddy *et al.* (2008) รายงานการวิจัยเกี่ยวกับอะมิโนไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย แสดงในตารางที่ 4 และ Shibata *et al.* (2007) รายงานเปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกโดยตรงจากวัตถุดิบที่มีแป้งชนิดต่าง ๆ โดยอะมิโนไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 4 การศึกษาเกี่ยวกับอะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Reddy *et al.*, 2008)

แบคทีเรีย	สายพันธุ์	แหล่งอ้างอิง
<i>L. manihotivorans</i>	OND32T	Morlon-Guyot and Morlon-Guyot (2001)
<i>L. manihotivorans</i>	LMG18010T	Morlon-Guyot <i>et al.</i> (2000)
	LMG 18011	Ohkouchi and Inoue (2006)
<i>L. fermentum</i>	Ogi E1	Calderon Santoyo <i>et al.</i> (2003), Agati <i>et al.</i> (1998)
<i>L. fermentum</i>	MW2	Agati <i>et al.</i> (1998)
<i>L. fermentum</i>	K9	Sanni <i>et al.</i> (2002)
<i>L. amylovorus</i>	ATCC33622	Zhang and Cheryan (1991)
<i>L. amylovorus</i>	B-4542	Cheng <i>et al.</i> (1991)
<i>L. amylovorus</i>		Nakamura (1981), Zhang and Cheryan (1991), Mercier <i>et al.</i> (1992), Litchfield (1996)
<i>L. amylophilus</i>	JCIM 1125	Yumoto and Ikeda (1995)
<i>L. amylophilus</i>	B 4437	Mercier <i>et al.</i> (1992), Nakamura and Crowell (1979)
<i>L. amylophilus</i>	GV6	Vishnu <i>et al.</i> , 1998, Vishnu <i>et al.</i> , 2000, Vishnu <i>et al.</i> , 2002, Vishnu <i>et al.</i> , 2006 and Vishnu, 2000, Naveena <i>et al.</i> , 2004, Naveena <i>et al.</i> , 2005a, Naveena <i>et al.</i> , 2005b and Naveena <i>et al.</i> , 2005c, Altaf <i>et al.</i> , 2005, Altaf <i>et al.</i> , 2006, Altaf <i>et al.</i> , 2007a และ Altaf <i>et al.</i> , 2007b, Gopal <i>et al.</i> , 2006
<i>L. acidophilus</i>		Lee <i>et al.</i> (2001)
<i>L. fermentum</i>	L9	Lee <i>et al.</i> (2001)
<i>L. plantarum</i>	A6	Thomsen <i>et al.</i> (2007), Giraud <i>et al.</i> (1991)
<i>L. plantarum</i>	LMG18053	Giraud <i>et al.</i> (1991)
<i>L. plantarum</i>	NCIM 2084	Krishnan <i>et al.</i> (1998)

แบคทีเรีย	สายพันธุ์	แหล่งอ้างอิง
<i>S. bovis</i>	148	Junya Narita <i>et al.</i> (2004)
<i>Lactobacillus</i> sp.	TH165	Wang <i>et al.</i> (2005)
<i>Leuconostoc</i>	St3-28	Thomsen <i>et al.</i> (2007)
<i>L. cellobiosus</i>		Chatterjee <i>et al.</i> (1997)
<i>Lactobacillus</i> strains	LEM 220, 207, 202	Champ <i>et al.</i> (1983)
<i>Leuconostoc</i> strains		Lindgren <i>et al.</i> (1984)
<i>S. macedonicus</i>		Diaz-Ruiz <i>et al.</i> (2003)
<i>L. amylolyticus</i>		Bohak <i>et al.</i> (1998)

ตารางที่ 5 เปรียบเทียบการผลิตกรดแลคติกจากวัตถุดิบที่มีแป้งชนิดต่าง ๆ โดยอะมัยโลไลติก-แลคติกแอซิดแบคทีเรีย (Shibata *et al.*, 2007)

แบคทีเรีย	ชนิดของ แป้ง	ความเข้มข้น กรดแลคติก (g/l)	Yield (g/g)	Productivity (g/l/h)	ความ บริสุทธิ์ (%)	แหล่งอ้างอิง
<i>E. faecium</i> No. 78	Sago	16.6 (± 0.5)	0.93 (± 0.02)	1.105 (± 0.06)	98.6	Shibata <i>et al.</i> (2007)
<i>L. amylovorus</i> JCM 1126	Sago	14.3 (± 0.9)	0.81 (± 0.05)	0.595 (± 0.04)	85.4	Shibata <i>et al.</i> (2007)
<i>L. mamhotivorans</i> JCM 12514	Sago	11.0 (± 0.8)	0.56 (± 0.08)	0.458 (± 0.03)	83.7	Shibata <i>et al.</i> (2007)
<i>L. amylovorus</i> ATCC 33620	Cassava	4.8	0.48	0.69	—	Sanoja <i>et al.</i> (2000)
<i>L. plantarum</i> Ogi El	Soluble	8.0	0.31	0.48	—	Sanni <i>et al.</i> (2002)
<i>L. plantarum</i> C5	Soluble	13.5	0.71	0.56	—	Asadi (2012)

เชื้อราที่ผลิตกรดแลกติกจากแป้ง

มีรายงานการผลิตกรดแลกติกจากแป้งโดยตรงโดยใช้เชื้อรา ได้แก่

Yen *et al.* (2009) ผลิตกรดแลกติกโดยตรงจากแป้งมันฝรั่งดิบโดยใช้เชื้อรา *Rhizopus oryzae* โดยการตรึงเซลล์ในแคลซูลของโซเดียมอัลจิเนต (sodium alginate) พบว่า เมื่อใช้เมล็ดแก้วที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางขนาดใหญ่ มีผลทำให้มีพื้นที่ในการเจริญได้มา ซึ่งมีดแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด มีผลทำให้เพิ่มการสะสมกรดแลกติกได้ถึง 55 เปอร์เซ็นต์เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดยใช้เซลล์อิสระที่ระยะเวลา 16 ชั่วโมง และพบว่า ไม่มีการสูญเสียกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้ง (amylolytic enzyme) ต่อมา Na *et al.* (2010) พบว่า *Rhizopus microsporus* var. *Chinensis* CICIM-CUF0088 ที่แยกได้จากดินโรงงานผลิตแป้งในประเทศจีน เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อบนแป้งข้าวโพดดิบ และรำข้าวสาลี เมื่อวิเคราะห์โครมาโทกราฟีแบบแผ่นบาง (TLC) พบว่า เชื้อนี้มีกิจกรรมของเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลส และกลูโคอะมัยเลส ซึ่งอุณหภูมิที่เหมาะสมของการย่อยแป้งข้าวโพดดิบได้สูงถึง 70 องศาเซลเซียส ซึ่งแสดงว่าเชื้อนี้เป็นเชื้อที่ผลิตเอนไซม์ชนิดทนร้อนและสามารถย่อยแป้งข้าวโพดดิบได้ ในปีเดียวกัน John *et al.* (2010) ผลิตกรดแลกติกโดยตรงจากของเหลือทิ้งของอุตสาหกรรมการเกษตรโดยเชื้อ *Rhizopus* sp. เนื่องจากวิธีการผลิตกรดแลกติกจากแป้งแบบเดิมมีหลายขั้นตอน ซึ่งในการทดลองได้ศึกษาแนวทางในการลดต้นทุนในการผลิตกรดแลกติกจากของเหลือทิ้งทางการเกษตร ได้แก่ 1) การใช้จุลินทรีย์ร่วมกัน (co-culture) คือจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดและย่อยแป้งได้ 2) รวมขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลและหมักให้ได้กรดแลกติกในขั้นตอนเดียวโดยใช้เชื้อรา *Rhizopus* sp. 3) การหมักกรดแลกติกจากแป้งโดยตรงโดยใช้เอนไซม์ไลติกแลกติกแอสิดแบคทีเรีย 4) รวมขั้นตอนการเปลี่ยนแป้งเป็นน้ำตาลและหมักน้ำตาลเป็นกรดแลกติก (simultaneous saccharification and fermentation) โดยการเติมเอนไซม์อัลฟาอะมัยเลสและกลูโคอะมัยเลสพร้อมไปกับแบคทีเรียแลกติก ซึ่งพบว่า วิธีการหมักกรดแลกติกจากแป้งโดยตรงโดยใช้เอนไซม์ไลติกแลกติกแอสิดแบคทีเรีย ช่วยลดค่าใช้จ่ายในการผลิตโดยไม่ต้องทำขั้นตอนการทำแป้งให้เหลว (liquefaction) และ การย่อยแป้งเป็นน้ำตาลโมเลกุลเล็ก (saccharification) การใช้เชื้อที่ผลิตเอนไซม์อะมัยเลสได้สามารถช่วยให้ไม่ต้องใช้เอนไซม์อื่นร่วมด้วย และทำให้ได้ผลผลิตของกรดแลกติกเพิ่มขึ้น เมื่อใช้สารตั้งต้นความเข้มข้นสูง

อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

เครื่องมือ

- ตู้ปลอดเชื้อ (Biosafety cabinet class II รุ่น ABS 1200)
- ตู้บ่มเชื้อ (Incubator) รุ่น BD/ED/FD with R3-controller
- ตู้ทำความเย็นเก็บสารเคมี ของ TOSHIBA, Japan
- ตู้ทำความเย็น 4 องศาเซลเซียส ของ SANYO, Japan
- ตู้แช่แข็ง – 20 องศาเซลเซียส ของ SANYO, Japan
- เครื่องชั่งหยาบ (Laboratory balance) 2 ตำแหน่ง ของ METTLER TOLEDO รุ่น PG
- เครื่องชั่ง (Laboratory balance) 4 ตำแหน่ง ของ METTLER TOLEDO รุ่น PG
- เครื่องปั่นผสม (Vortex) ของ KIKA works, Malaysia
- อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น WNB 7-45 ของ Memmert และรุ่น Ecotemp TW20 ของ Julabo
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำไฟฟ้า รุ่น AMA 230S/240S ของ ASTELL
- หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Autoclave) รุ่น 1941X
- เครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH Meter) รุ่น pH 500 ของ Clean
- ไมโครเวฟ (Microwave) ของ Sharp, Japan
- กล้องจุลทรรศน์ (Microscopes) ของ Olympus, Japan
- เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer) รุ่น Genesys 20 ของ Thermo scientific
- เครื่องให้ความร้อน (hot plate, Clifton, 100979)
- เครื่อง PCR Thermal cycler
- ชุดทำ Agarose gel electrophoresis
- เครื่องตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (Transiluminator)

อุปกรณ์

เครื่องมือ ได้แก่

จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish), หลอดทดลอง (test tube), ขวดดูแรน (duran bottle), บีกเกอร์ (beaker), หลอดหยด (dropper), ขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask), ปิเปตแก้ว (measuring pipette), หลอดดักก๊าซ (durham tube), แผ่นสไลด์ (slide), ขวดปริมาตร (volumetric flask)

อุปกรณ์อื่น ๆ ได้แก่

ไมโครปิเปต (micro pipette), ไมโครปิเปตทิป (micropipette tip), ช้อนตักสาร (spatula) , ตะเกียงแอลกอฮอล์, หัวจ่ายเชื้อ (loop), แท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader), แท่งแม่เหล็กกวนสาร (magnetic stirrer), หลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube), หลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge tube), ปากคีบ (forceps), นาฬิกาจับเวลา (Casio, TMR100), หลอดทนความเย็น (cryotube), กล่องทนความเย็น (cryobox), สำลี

สารเคมี

- Sodium chloride (NaCl), Starch soluble, Bromocresol purple, Sodium hydroxide (NaOH), Phenolphthalein, 3,5-dinitrosalicylic acid, Potassium sodium tartrate, Sulfuric acid, Peptone, Beef extract, Yeast extract, Sodium acetate, Tri-sodium phosphate, Di-ammonium hydrogen citrate, Tween 80, Magnesium sulphate.heptahydrate, Manganese sulphate monohydrate monohydrate, Barium chloride (Merck, Germany), Sulfuric acid (labscan, Ireland), Acetic acid, Sodium acetate, Tri-sodium phosphate (Merck, Germany), Alcohol 95% (Unionscience, Thailand), Crystal violet (Poch, Poland), Iodine, Safranin (Merck, Germany), Acetone alcohol, Glucose, Sucrose (Merck, Germany), Galactose (Univer, Australia), Fructose (Fluka, Buch), Mannitol (Univer, New Zealand), Maltose (Fluka, Buch), Xylitol (Fluka, Buch), Lactose (O.V. Chemical and supply, Thailand), Meat peptone, Calcium carbonate (BHD Chemicals, England), Bromocresol purple (Fisher chemicals, UK), Soluble starch (QREC, New Zealand), Arabinose (Himedia, India), Agar (unionscience, Thailand), Glycerol (Merck, Germany), อาหารเลี้ยงเชื้อ De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) สูตรมาตรฐาน ของ Criterion แป้งมันสำปะหลัง, ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNA extraction kit, Universal primer

วิธีการวิจัย

1. การแยก (Isolation) แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดจากแป้งได้

เก็บตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ ได้แก่ อาหารหมัก (ແໝັ່ງ ປາສົ້ມ ຝັກກາດດອງ ໂບເມື່ຍ- ໝັກ ໂບເກີດ) เศษอาหาร แป้งหมักขนมจีน น้ำเสียและดินจากโรงงานผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยวใน จังหวัดเชียงใหม่ นำตัวอย่างมาทำการเจือจางตามลำดับ ในน้ำเกลือ 0.85 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำ ตัวอย่างที่ระดับความเจือจางเหมาะสมมาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) สูตรมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) ที่เติม soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ และมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ โดยวิธี pour plate จากนั้นบ่มไว้ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 – 48 ชั่วโมง แล้วเลือกโคโลนีที่เปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็น สีเหลือง มาทำให้ได้เชื้อบริสุทธิ์โดยการ streak เชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS สูตรมาตรฐาน เพื่อให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จากนั้นเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารวุ้นเยือก ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และเก็บเชื้อบริสุทธิ์ในกลีเซอรอล 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาต่อไป

2. การคัดเลือกขั้นต้นของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดและย่อยแป้งบนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรียที่แยกได้ในการทดลองนี้ และแบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้จากห้องปฏิบัติการ จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ รวมทั้งแบคทีเรียจากศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ (สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) และ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและ เทคโนโลยีชีวภาพ (BIOTECH, BCC) จำนวน 162, 289 และ 22 สายพันธุ์ ตามลำดับ รวม แบคทีเรียที่นำมาคัดเลือกทั้งหมดจำนวน 473 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6) จากนั้นทำการทดสอบ ความสามารถในการผลิตกรดและย่อยแป้ง โดยนำแบคทีเรียมาเพาะเลี้ยงด้วยวิธี point inoculation บนอาหารแข็ง De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมัน สำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ จากนั้นบ่มไว้ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วตรวจผลการทดลองโดยสังเกตดูการ ผลิตกรดจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลืองแล้ววัดขนาด เส้นผ่าศูนย์กลางของวงสีเหลือง และทดสอบการย่อยแป้งของแบคทีเรีย โดยการเทราดด้วย สารละลายไอโอดีนบนโคโลนีของเชื้อหากเกิดบริเวณใสไม่มีสีน้ำเงิน (clear zone) รอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรียแสดงว่าแบคทีเรียสามารถย่อยแป้งได้ แล้ววัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ

วงใสและบันทึกผลการทดลอง ขั้นตอนนี้คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดและย่อยแป้ง ได้ไว้ศึกษาต่อไป

ตารางที่ 6 จำนวนแบคทีเรียทั้งหมดที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิต กรดแลกติกจากแป้ง

แบคทีเรียที่นำมาคัดเลือก	จำนวนเชื้อ
แบคทีเรียที่แยกได้ในการทดลองนี้	162
แบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา	289
แบคทีเรียที่ได้จากศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ (TISTR และ BCC)	22
รวม	473

3. การทดสอบการผลิตกรดแลกติกจากแป้งในอาหารเหลวที่บรรจุในหลอดทดลอง

3.1 การเตรียมเชื้อเริ่มต้น

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกในข้อ 2 มาเตรียมเชื้อเริ่มต้นโดยเฉพาะเลี้ยงเชื้อ ในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุในหลอดทดลอง ปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตร จากนั้นบ่มโดยตั้งไว้ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการเจือจางความขุ่นของซัสเพนชันเชื้อให้มีความขุ่นเท่ากับ McFarland No. 0.5

3.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ บรรจุในหลอดทดลองปริมาตรอาหาร 5 มิลลิลิตร จากนั้นใส่เชื้อเริ่มต้น ปริมาตร 2 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาณอาหาร แล้วนำไปบ่มแบบตั้งไว้โดยไม่เขย่าใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.3 การวิเคราะห์กรดแลกติก

นำแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงได้จากข้อ 3.2 ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดส่วนใสปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดรูปชมพู่ ขนาด 50 มิลลิลิตร แล้วหยดฟีนอล์ฟทาลีน (Phenolphthalein) 1 หยด เพื่อเป็นอินดิเคเตอร์ แล้วไทเทรตด้วย 0.1 N NaOH

(โซเดียมไฮดรอกไซด์) จนกว่าจะเปลี่ยนสีเป็นสีชมพูอ่อน บันทึกผลการทดลองและคำนวณหาความเข้มข้นของกรดแลกติก

ขั้นตอนนี้คัดเลือกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกได้มากที่สุดไว้ศึกษาต่อไป

4. การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย NMPY1M

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกได้คือ แบคทีเรีย NMPY1M มาเตรียมเชื้อเริ่มต้น ตามวิธีการเดียวกับข้อ 3.1 จากนั้นเพาะเลี้ยงเชื้อเริ่มต้นใส่ลงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุในหลอดทดลอง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างทุก ๆ 6 ชั่วโมง ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 ถึง 48 ชั่วโมง ตัวอย่างที่เก็บแต่ละเวลามีจำนวน 3 ข้าง และนำตัวอย่างมาวัดการเจริญของเซลล์แบคทีเรียโดยการวัดค่าความขุ่นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร จากนั้นนำตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่องวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH meter) แล้วนำตัวอย่างที่ได้จากการปั่นเหวี่ยงไปวิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS (Dinitro salicylic acid method)

5. การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

5.1 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (cultural characteristic) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) และลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biochemical characteristics)

5.1.1 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

นำแบคทีเรีย NMPY1M มาเพาะเลี้ยงโดย streak เชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS สูตรมาตรฐาน ในจานเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มไว้ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง บันทึกลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ ขนาดของโคโลนี รูปร่างของโคโลนี ขอบของโคโลนี การยกตัวของผิวโคโลนี และผิวหน้าของโคโลนี

5.1.2 การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำแบคทีเรีย NMPY1M มาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram's staining) แล้วตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบเลนส์ประกอบที่กำลังขยาย 1,000 เท่า บันทึกการติดสีแกรม รูปร่าง และการจัดเรียงตัวของเซลล์

5.1.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

5.1.3.1 ทดสอบการผลิตเอนไซม์อะคะเตเลส

ทดสอบการผลิตเอนไซม์อะคะเตเลส (catalase) โดยเชื้อแบคทีเรีย NMPY1M และลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด แล้วหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ลงบนเชื้อ หากเกิดฟองอากาศ แสดงว่า เชื้อผลิตเอนไซม์อะคะเตเลส (ผลเป็นบวก) หากเชื้อไม่สามารถผลิตเอนไซม์อะคะเตเลสจะไม่เกิดฟองอากาศ (ผลเป็นลบ)

5.1.3.2 ทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

5.1.3.2.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การทดสอบความสามารถในการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรีย โดยเตรียมอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่ใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ได้แก่ glucose, sucrose, galactose, fructose, mannitol, maltose, xylitol, lactose, arabinose, glycerol โดยใช้ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนแต่ละชนิด 1 เปอร์เซ็นต์ และเติม bromocresol purple 0.002 เปอร์เซ็นต์ และมีหลอดดักก๊าซ โดยบรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลอง หลอดละ 10 มิลลิลิตร

5.1.3.2.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อ

นำแบคทีเรีย NMPY1M มาเตรียมเชื้อเริ่มต้นตามวิธีการเดียวกับข้อ 3.1 แล้วนำมาเพาะเลี้ยงลงในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยเติมเชื้อเริ่มต้น 2 เปอร์เซ็นต์ ของปริมาตรอาหาร บ่มไว้ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วบันทึกผล โดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และดูการสร้างก๊าซในหลอดดักก๊าซ แสดงว่า ให้ผลเป็นบวก หากไม่มีการเปลี่ยนแปลง แสดงว่าผลเป็นลบ

5.2 การจำแนกแบคทีเรียโดยใช้การหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA

5.2.1 การสกัดดีเอ็นเอ

5.2.1.1 ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย NMPY 1M ในอาหารเหลวสูตร MRS มาตรฐาน ปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

5.2.1.2 นำอาหารเหลว MRS ที่มีเชื้ออยู่ 1,200 ไมโครลิตร ไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที เทส่วนใส (supernatant)ทิ้งแล้วนำตะกอนของแบคทีเรียที่ได้มาทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอสำเร็จรูป DNA extraction kit ตามขั้นตอน คือ

- เติม lysozyme ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 200 ไมโครลิตร (ละลาย lysozyme 10 มิลลิกรัม ใน TEN buffer ปริมาตร 1 มิลลิลิตร แล้วเติม RNase ปริมาตร 2 ไมโครลิตร) ตั้งทิ้งไว้ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที (กลับหลอดทุก ๆ 3 นาที)
- เติม GB buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากันแล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส (จนกว่าตะกอนจะละลายจนใส กลับหลอดไปมาทุก 3 นาที)
- เติม Absolute ethanol ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน นำสารละลายในหลอดทั้งหมดไปเติมลงใน GD column ที่อยู่ในหลอด microcentrifuge 2 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง
- เติม W1 buffer ปริมาตร 400 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง
- เติม Wash buffer ปริมาตร 600 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง หลังจากนั้นย้าย GD column ลงหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) หลอดใหม่
- เติม Elution buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วทิ้ง GD column แล้วเก็บ ดีเอ็นเอ (ส่วนใส) ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส สำหรับนำไปเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอในส่วนของยีน 16S rRNA

5.2.2 การเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA โดยวิธี Polymerase Chain Reaction (PCR)

5.2.2.1 นำดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่สกัดได้มาทำการเพิ่มปริมาณยีน ในส่วนของ 16S rRNA โดยขั้นตอนนี้จะใช้ Universal primer คือ 27F (forward primer) ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้ 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' และ 15522R (reverse primer) ซึ่งมีลำดับเบส ดังนี้ 5'-AAGGAGGTGATCCARCCGCA-3' (Operon) เพื่อเพิ่มปริมาณยีน 16S rRNA ซึ่งมีลำดับเบสประมาณ 1,500 คู่เบส ทำการเตรียมปฏิกิริยา PCR โดยให้มีปริมาตรรวมเท่ากับ 50 ไมโครลิตร ซึ่งในปฏิกิริยาประกอบด้วย

Master mix	ปริมาตร 25 ไมโครลิตร
Primer 27F	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
Primer 15522R	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
Genomic DNA	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
น้ำกลั่นปลอดเชื้อ	ปริมาตร 12 ไมโครลิตร

5.2.2.2 ผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ให้เข้ากัน จากนั้นนำไปเพิ่มปริมาณอิน 16S rRNA โดยใช้เครื่อง PCR Thermal Cycler โดยกำหนดโปรแกรมการทำงานดังนี้

Initial denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	5 นาที
Denaturation	94 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Annealing	55 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Extension	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	1 นาที
Terminating	72 องศาเซลเซียส	เป็นเวลา	5 นาที
Cooling	4 องศาเซลเซียส	จนกว่าจะใช้งาน	

5.2.2.3 นำ PCR product ที่ได้มาตรวจสอบขนาดของ DNA ภายใต้อินฟฟฟ้า (Agarose gel electrophoresis) ตามขั้นตอน คือ เตรียม Agarose gel ความเข้มข้น 1.5 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักโดยปริมาตร (%w/v) นำไปหลอมให้ละลายปริมาตร 25 มิลลิลิตร ผสมด้วย gel star ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร แล้วนำเจลที่ได้มาเทใน apparatus รอให้เจลแข็งตัว และนำเจลไปวางใน เครื่อง run gel เท 1X TAE buffer ลงไปให้ท่วมเจล จากนั้นเตรียมตัวอย่างดีเอ็นเอดังนี้

DNA marker ประกอบด้วย

O'GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder Plus	ปริมาตร 1 ไมโครลิตร
1X TAE buffer	ปริมาตร 4 ไมโครลิตร
Loading dye	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

DNA ตัวอย่าง ประกอบด้วย

DNA ตัวอย่าง	ปริมาตร 5 ไมโครลิตร
Loading dye	ปริมาตร 2 ไมโครลิตร

5.2.2.4 ปิดฝาเครื่องและตั้งกระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ ระยะเวลา 30-45 นาที จากนั้นนำเจล ไปส่องดูแถบดีเอ็นเอที่เกิดขึ้น โดยเครื่องตรวจสอบแถบดีเอ็นเอ (Transilluminator)

5.2.3 การทำ PCR product ให้บริสุทธิ์

- ปิเปิด PCR product ปริมาตรที่เหลือทั้งหมด (47 ไมโครลิตร) ข้างลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาดเล็ก (microcentrifuge) เติม DF buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร เขย่าให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส (กลับหลอดไปมาทุก 2-3 นาที)

- นำตัวอย่างเดิมลงไป DF column แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อวินาที ระยะเวลา 30 วินาที แล้วเทของเหลวในหลอดทิ้ง

- เติม Wash buffer ปริมาตร 500 ไมโครลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 13,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 30 วินาที เทของเหลวในหลอดทิ้ง ปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 2 นาที

- เติม Elution buffer ปริมาตร 30 ไมโครลิตร ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง ระยะเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 10,000 รอบต่อนาที ระยะเวลา 2 นาที ซึ่งจะได้ PCR product ที่บริสุทธิ์ ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อที่จะนำไปหาลำดับเบสของยีนในส่วน 16s rRNA โดยบริษัท First Laboratories Company ประเทศมาเลเซีย

5.2.4 การวิเคราะห์ผลลำดับเบส

หลังจากการนำดีเอ็นเอส่งจำแนกและได้ลำดับเบสแล้ว นำลำดับเบสที่ได้มาทำด้วยโปรแกรม Bioedit แล้วนำลำดับเบสมาเทียบกับ GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ National Center for Biotechnology Information ในเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>

ผลการวิจัย

1. ผลการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดจากแป้งได้

จากการนำตัวอย่างจากแหล่งต่าง ๆ เช่น อาหารหมัก เศษอาหาร แป้งหมักขนมจีน น้ำเสีย และดินจากโรงงานผลิตเส้นก๋วยเตี๋ยว มาเพาะเลี้ยงลงบนอาหารแข็ง De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) สูตรมาตรฐาน ที่เติม soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี bromocresol purple 0.002 เปอร์เซ็นต์ โดยวิธี pour plate บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า ได้แบคทีเรียจำนวน 162 ไอโซเลท (ตารางที่ 7)

ตารางที่ 7 จำนวนแบคทีเรียที่แยกได้จากแหล่งต่าง ๆ บนอาหารแข็ง MRS ที่เติม soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ และมี bromocresol purple 0.002 เปอร์เซ็นต์

ตัวอย่าง	รหัสเชื้อ	จำนวน ไอโซเลท
แป้งหมัก (เช่น แป้งหมักขนมจีน)	PKJ, PS, UNP	21
อาหารหมัก (เช่น แหนม, ปลาสาม ผักกาดดอง, โขกี้, เมี่ยง)	NCR, NCM, NMPY, NNPY, PSCR, PSPY, PK, MCR, MPY, ON, YK ,PD	94
เศษอาหาร	RM	9
น้ำเสีย (เช่น จากโรงงานผลิต ก๋วยเตี๋ยว, โรงอาหาร)	NK, NP, NS, SF, SW	16
ดิน (จากโรงงานผลิตก๋วยเตี๋ยว และ อื่น ๆ)	SC, SM5 SN, SO, SS,UN	22
รวม		162

แบคทีเรียที่แยกได้ในการทดลองนี้ ได้แก่ แบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วในห้องปฏิบัติการ จุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ แบคทีเรียจากสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (TISTR) และศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพ (BIOTECH) รวมแบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาใช้ในการทดลองนี้ ทั้งหมดจำนวน 473 สายพันธุ์ แสดงไว้ในตารางที่ 6

2. ผลการคัดเลือกขั้นต้นของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดและการย่อยแป้งบนอาหารแข็ง

จากการนำแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 473 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดและย่อยแป้งบนอาหารแข็ง De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี point inoculation บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วสังเกตดูการผลิตกรดจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อจากสีม่วงเป็นสีเหลืองและวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของสีเหลืองและทดสอบการย่อยแป้งของแบคทีเรียโดยการเทราดด้วยสารละลายไอโอดีน หากเกิดบริเวณใสรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย ให้วัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใส ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 ผลการคัดเลือกชั้นต้นของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง MRS สูตรดัดแปลง 1

ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวง ใสหลัง ราด ไอโอดีน (mm)	ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวงใส หลังราด ไอโอดีน (mm)
1	NMCR 1M	-	-	26	NNPY 2M	-	-
2	NMCR 2M	-	-	27	NNPY 3M	-	-
3	NMCR 3M	-	-	28	NNPY 4M	-	-
4	NMCR 4M	-	-	29	PK 1M	-	-
5	NMCM 1M	-	-	30	PK 2M	-	-
6	NMCM 2M	-	-	31	PK 3M	-	-
7	NMCM 3M	-	-	32	PK4M	-	-
8	NMCM 4M	-	-	33	PK 5M	-	-
9	NMCM 5M	-	-	34	MCR 1M	-	-
10	NMPY 1M	5	6	35	MCR 2M	-	-
11	NMPY 2M	-	-	36	MCR 3M	-	-
12	NMPY 3M	-	-	37	MCR 4M	-	-
13	NMPY 4M	-	-	38	MCR 5M	-	-
14	PSCR 1M	-	-	39	MCR 6M	-	-
15	PSCR 2M	-	-	40	MCR 7M	-	-
16	PSCR 3M	-	-	41	MPY 1M	-	-
17	PSCR 4M	-	-	42	MPY 2M	-	-
18	PSCR 5M	-	-	43	MPY 3M	-	-
19	PSPY 1M	-	-	44	MPY 4M	-	-
20	PSPY 2M	-	-	45	MPY 5M	-	-
21	PSPY 3M	-	-	46	MPY 6M	-	-
22	PSPY 4M	-	-	47	MPY 7M	-	-
23	PSPY 5 M	-	-	48	PKJ 1M	-	-
24	PSPY 6M	-	-	49	PKJ 2M	-	-
25	NNPY 1M	-	-	50	PKJ 3M	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)							
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สี่เหลี่ยม (mm)	ขนาดวง สี่เหลี่ยม หลังราด ไอโอดีน (mm)	ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สี่เหลี่ยม (mm)	ขนาดวงสี่ เหลี่ยมหลัง ราดไอโอดีน (mm)
51	PKJ 4M	-	-	76	PSCR 4N	-	-
52	PKJ 5M	-	-	77	PSPY 1N	-	-
53	PKJ 6M	-	-	78	PSPY 2N	-	-
54	PKJ 7M	-	-	79	PSPY 3N	-	-
55	RM 1M	-	-	80	PSPY 4N	-	-
56	RM 2M	-	-	81	NNPY 1N	-	-
57	RM 3M	-	-	82	NNPY 2N	-	-
58	RM 4M	-	-	83	NNPY 3N	-	-
59	YK 1M	-	-	84	NNPY 4N	-	-
60	YK 2M	-	-	85	NNPY 5N	-	-
61	NMCR 1N	6	6	86	PK 1N	-	-
62	NMCR 2N	-	-	87	PK 2N	-	-
63	NMCM 1N	-	-	88	PK 3N	-	-
64	NMCM 2N	-	-	89	PK 4N	-	-
65	NMCM 3N	-	-	90	MCR 1N	-	-
66	NMCM 4N	-	-	91	MCR 2N	-	-
67	NMPY 1N	-	-	92	MCR 3N	-	-
68	NMPY 2N	-	-	93	MPY 1N	-	-
69	NMPY 3N	-	-	94	MPY 2N	-	-
70	NMPY 4N	-	-	95	MPY 3N	-	-
71	NMPY 5N	-	-	96	MPY 4N	-	-
72	NMPY 6N	-	-	97	PKJ 1N	-	-
73	PSCR 1N	-	-	98	PKJ 2N	-	-
74	PSCR 2N	-	-	99	PKJ 3N	-	-
75	PSCR 3N	-	-	100	PKJ 4N	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)							
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวง สีหลัง ลาด ไอโอดีน (mm)	ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวงสี หลังลาด ไอโอดีน (mm)
101	PKJ 5N	-	-	125	BCC 18052	-	-
102	PKJ 6N	-	-	126	BCC 38048	-	-
103	RM 1N	-	-	127	BCC 38063	-	-
104	RM 2N	-	-	128	BCC 38105	-	-
105	RM 3N	-	-	129	BCC 39798	-	-
106	RM 4N	-	-	130	ST1	-	-
107	RM 5N	-	-	131	ST2	-	-
108	TISTR 058	-	-	132	ST3	-	-
109	TISTR 450	7	-	133	ST4	-	-
110	TISTR 457	-	-	134	ST5	-	-
111	TISTR 847	-	-	135	ST6	-	-
112	TISTR 892	-	-	136	ST7	-	-
113	TISTR 894	-	-	137	ST8	-	-
114	TISTR 895	-	-	138	ST9	-	-
115	TISTR 920	-	-	139	ST10	-	-
116	TISTR 926	-	-	140	ST11	-	-
117	TISTR 929	-	-	141	ST12	-	-
118	TISTR 937	-	-	142	ST13	-	-
119	TISTR 945	-	-	143	ST14	-	-
120	TISTR 947	-	-	144	ST15	-	-
121	TISTR 949	-	-	145	ST16	-	-
122	TISTR 951	-	-	146	ST17	-	-
123	TISTR 952	-	-	147	ST18	-	-
124	BCC 18049	-	-	148	ST19	-	-
149	ST20	-	-	176	ST47	-	-
150	ST21	-	-	177	ST48	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)							
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สี่เหลี่ยม (mm)	ขนาดวง สี่เหลี่ยม หลัง รัด ไอโอดีน (mm)	ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สี่เหลี่ยม (mm)	ขนาดวงสี่ เหลี่ยม หลังรัด ไอโอดีน (mm)
151	ST22	-	-	178	ST49	-	-
152	ST23	-	-	179	ST50	-	-
153	ST24	-	-	180	ST51	-	-
154	ST25	-	-	181	ST52	-	-
155	ST26	-	-	182	ST53	-	-
156	ST27	-	-	183	ST54	-	-
157	ST28	-	-	184	ST55	-	-
158	ST29	-	-	185	ST56	-	-
159	ST30	-	-	186	ST57	-	-
160	ST31	-	-	187	ST58	-	-
161	ST32	-	-	188	ST59	-	-
162	ST33	-	-	189	ST60	-	-
163	ST34	-	-	190	ST61	-	-
164	ST35	-	-	191	ST62	-	-
165	ST36	-	-	192	ST63	-	-
166	ST37	-	-	193	ST64	-	-
167	ST38	-	-	194	ST65	-	-
168	ST39	-	-	195	ST66	-	-
169	ST40	-	-	196	ST67	-	-
170	ST41	-	-	197	ST68	-	-
171	ST42	-	-	198	ST69	-	-
172	ST43	-	-	199	ST70	-	-
173	ST44	-	-	200	ST71	-	-
174	ST45	-	-	201	ST72	-	-
175	ST46	-	-	202	ST73	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)							
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวง สีหลัง ลาด ไอโอดีน (mm)	ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวงสี หลังลาด ไอโอดีน (mm)
203	ST74	-	-	229	ST100	-	-
204	ST75	-	-	230	ST101	-	-
205	ST76	-	-	231	ST 102	-	-
206	ST77	-	-	232	ST103	-	-
207	ST78	-	-	233	ST104	-	-
208	ST79	-	-	234	ST105	-	-
209	ST80	-	-	235	ST106	-	-
210	ST81	-	-	236	ST107	-	-
211	ST82	-	-	237	ST108	-	-
212	ST83	-	-	238	ST109	-	-
213	ST84	-	-	239	ST110	-	-
214	ST85	-	-	240	ST111	-	-
215	ST86	-	-	241	ST112	-	-
216	ST87	-	-	242	ST113	-	-
217	ST88	-	-	243	ST114	-	-
218	ST89	-	-	244	ST115	-	-
219	ST90	-	-	245	ST116	-	-
220	ST91	-	-	246	ST117	-	-
221	ST92	-	-	247	ST118	-	-
222	ST93	-	-	248	ST119	-	-
223	ST94	-	-	249	ST120	-	-
224	ST95	-	-	250	ST121	-	-
225	ST96	-	-	251	ST122	-	-
226	ST97	-	-	252	ST123	-	-
227	ST98	-	-	253	ST124	-	-
228	ST99	-	-	254	ST125	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)							
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สี่เหลี่ยม (mm)	ขนาดวง สี่เหลี่ยม หลัง รัด ไอโอดีน (mm)	ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สี่เหลี่ยม (mm)	ขนาดวงสี่ เหลี่ยม หลังรัด ไอโอดีน (mm)
255	ST126	-	-	282	ST153	-	-
256	ST127	-	-	283	ST154	-	-
257	ST128	-	-	284	ST155	-	-
258	ST129	-	-	285	ST156	-	-
259	ST130	-	-	286	ST157	-	-
260	ST131	-	-	287	ST158	-	-
261	ST132	-	-	288	ST159	-	-
262	ST133	-	-	289	ST160	-	-
263	ST134	-	-	290	ST161	-	-
264	ST135	-	-	291	ST162	-	-
265	ST136	-	-	292	ST163	-	-
266	ST137	-	-	293	ST164	-	-
267	ST138	-	-	294	ST165	-	-
268	ST139	-	-	295	ST166	-	-
269	ST140	-	-	296	ST167	-	-
270	ST141	-	-	297	ST168	-	-
271	ST142	-	-	298	ST169	-	-
272	ST143	-	-	299	ST170	-	-
273	ST144	-	-	300	ST171	-	-
274	ST145	-	-	301	ST172	-	-
275	ST146	-	-	302	ST173	-	-
276	ST147	-	-	303	ST174	-	-
277	ST148	-	-	304	ST175	-	-
278	ST149	-	-	305	ST176	-	-
279	ST150	-	-	306	ST177	-	-
280	ST151	-	-	307	ST178	-	-
281	ST152	-	-	308	ST179	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)							
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สี่เหลี่ยม (mm)	ขนาดวง สี่เหลี่ยม หลัง รอย ไอโอดีน (mm)	ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สี่เหลี่ยม (mm)	ขนาดวงสี่ เหลี่ยม หลังรอย ไอโอดีน (mm)
309	ST180	-	-	336	ST207	-	-
310	ST181	-	-	337	ST208	-	-
311	ST182	-	-	338	ST209	-	-
312	ST183	-	-	339	ST210	-	-
313	ST184	-	-	340	ST211	-	-
314	ST185	-	-	341	ST212	-	-
315	ST186	-	-	342	ST213	-	-
316	ST187	-	-	343	ST214	-	-
317	ST188	-	-	344	ST215	-	-
318	ST189	-	-	345	ST216	-	-
319	ST190	-	-	346	ST217	-	-
320	ST191	-	-	347	ST218	-	-
321	ST192	-	-	348	ST219	-	-
322	ST193	-	-	349	ST220	-	-
323	ST194	-	-	350	ST221	-	-
324	ST195	-	-	351	ST222	-	-
325	ST196	-	-	352	ST223	-	-
326	ST197	-	-	353	ST224	-	-
327	ST198	-	-	354	ST225	-	-
328	ST199	-	-	355	ST226	-	-
229	ST200	-	-	356	ST227	-	-
330	ST201	-	-	357	ST228	-	-
331	ST202	-	-	358	ST229	-	-
332	ST203	-	-	359	ST230	-	-
333	ST204	-	-	360	ST231	-	-
334	ST205	-	-	361	ST232	-	-
335	ST206	-	-	362	ST233	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)							
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวง สีหลัง ราด ไอโอดีน (mm)	ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวงสี หลังราด ไอโอดีน (mm)
363	ST234	-	-	390	ST261	-	-
364	ST235	-	-	391	ST262	-	-
365	ST236	-	-	392	ST263	-	-
366	ST237	-	-	393	ST264	-	-
367	ST238	-	-	394	ST265	-	-
368	ST239	-	-	395	ST266	-	-
369	ST240	-	-	396	ST267	-	-
370	ST241	-	-	397	ST268	-	-
371	ST242	-	-	398	ST269	-	-
372	ST243	-	-	399	ST270	-	-
373	ST244	-	-	400	ST271	-	-
374	ST245	-	-	401	ST272	-	-
375	ST246	-	-	402	ST273	-	-
376	ST247	-	-	403	ST274	-	-
377	ST248	-	-	404	ST275	-	-
378	ST249	-	-	405	ST276	-	-
379	ST250	-	-	406	ST277	-	-
380	ST251	-	-	407	ST278	-	-
381	ST252	-	-	408	ST279	-	-
382	ST253	-	-	409	ST280	-	-
383	ST254	-	-	410	ST281	-	-
384	ST255	-	-	411	ST282	-	-
385	ST256	-	-	412	ST283	-	-
386	ST257	-	-	413	ST284	-	-
387	ST258	-	-	414	ST285	-	-
388	ST259	-	-	415	ST286	-	-
389	ST260	-	-	416	ST287	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)							
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวง สีหลัง ลาด ไอโอดีน (mm)	ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวงสี หลังลาด ไอโอดีน (mm)
417	ST288	-	-	441	SF-6	4	2
418	ST289	-	-	442	SF-7	-	-
419	NK-5			443	SF-9	-	-
420	NP-1	7	5	444	SM-3	-	-
421	NP-4	-	-	445	SM-4	-	-
422	NS-1	-	-	446	SM-5	-	-
423	ON-1	-	-	447	SM-7	-	-
424	ON-2			448	SM-8	-	-
425	ON-3			449	SN1-1	-	-
426	ON-4	8	4	450	SN1-2	-	-
427	ON-5	-	-	451	SN2-2	-	-
428	ON-6	-	-	452	SO-1	-	-
429	ON-7	-	-	453	SO-2	-	-
430	PD-1	-	-	454	SO-3	-	-
431	PD-2	-	-	455	SO-5	-	-
432	PS-1	-	-	456	SO-8	-	-
433	PS-2	-	-	457	SS-1	-	-
434	PS-3	-	-	458	SS-3	-	-
435	PS-4	-	-	459	SW-1	6	4
436	SC-5	-	-	460	SW-3	-	-
437	SF-1	-	-	461	SW-41	-	-
438	SF-2	5	2	462	SW-42	4	4
439	SF-4	-	-	463	SW-6	5	5
440	SF-5	6	3	464	UN-1	-	-

ตารางที่ 8 (ต่อ)

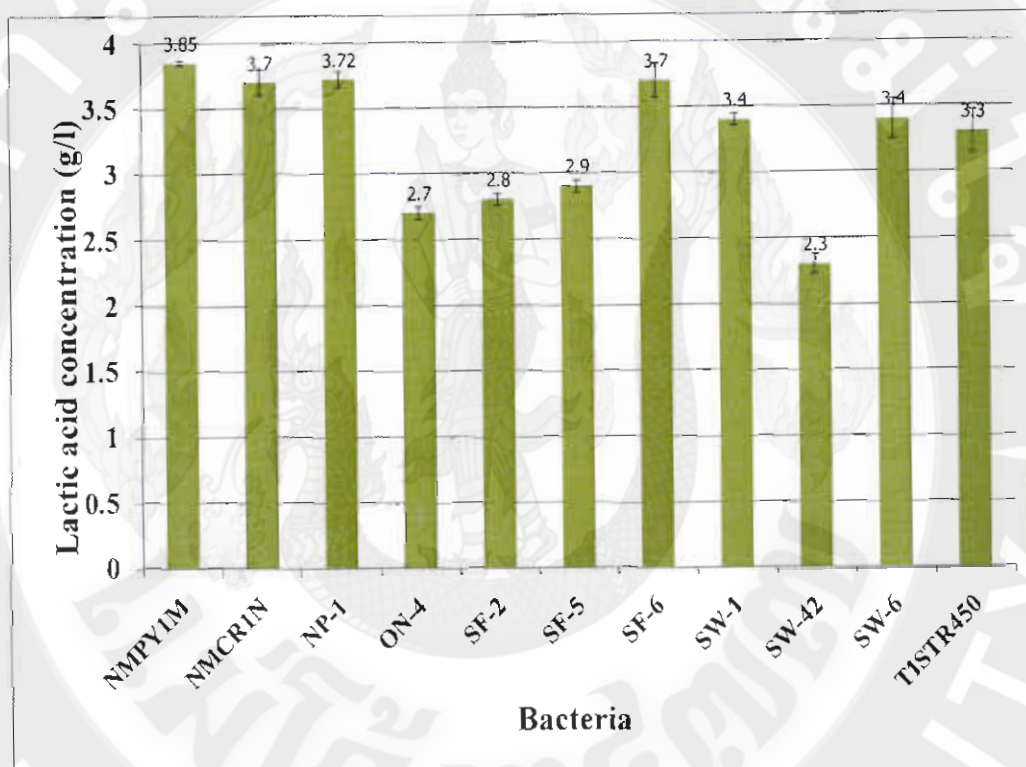
ลำดับ	รหัสเชื้อ	ขนาดวง สีเหลือง (mm)	ขนาดวงสี หลังราด ไอโอดีน (mm)
465	UN-3	-	-
466	UN-4	-	-
467	UN-5	-	-
468	UN-7	-	-
469	UN-8	-	-
470	UNP4321	-	-
471	UNP4322	-	-
472	UNP4323	-	-
473	UNP4324	-	-

ตารางที่ 9 ตารางสรุปจำนวนแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดและย่อยแป้งได้จากการคัดเลือกขั้นต้น
บนอาหารแข็ง MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์

ลำดับ	รหัสเชื้อ	การทดสอบบนอาหารแข็ง MRS สูตรดัดแปลง 1	
		ขนาดวงสีเหลือง (mm)	ขนาดวงสีหลังราดไอโอดีน (mm)
1	NMPY1M	5	6
2	NMCR1N	6	6
3	NP-1	7	5
4	ON-4	8	4
5	SF-2	5	2
6	SF-5	6	3
7	SF-6	4	2
8	SW-1	6	4
9	SW-42	4	4
10	SW-6	5	5
11	TISTR450	7	-

3. ผลการผลิตรกรดแลกติกจากแป้งในอาหารเหลวที่บรรจุในหลอดทดลอง

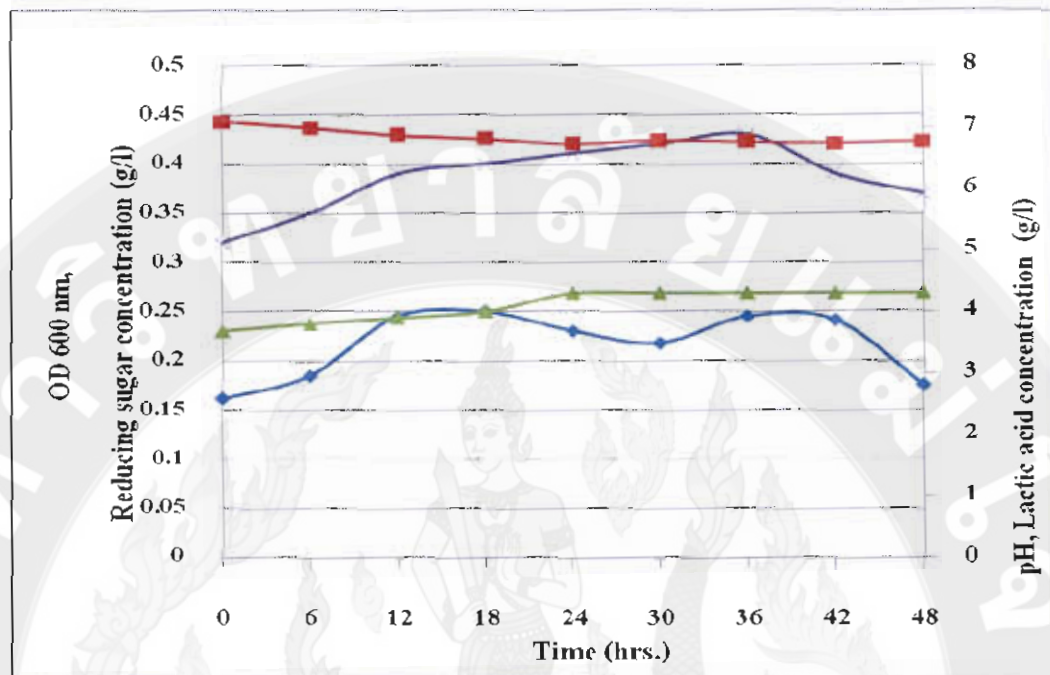
จากการนำแบคทีเรีย ทั้งหมดจำนวน 11 สายพันธุ์ มาทดสอบความสามารถในการผลิตกรดแลกติกจากแป้ง ในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 10



ภาพที่ 10 การผลิตรกรดแลกติกจากแป้งของแบคทีเรียในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่บรรจุในหลอดทดลอง

4. ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตรกรดแลกติกที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้

จากการนำแบคทีเรีย NMPY1M มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 2 ที่มีแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์แบคทีเรียโดยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์โดยวิธี DNS วิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแลกติกโดยการไทเทรตและวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ผลการทดลองแสดงในภาพที่ 11



ภาพที่ 11 การเจริญและการผลิตกรดแลกติกที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย NMPY1M ในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติม แป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

(—◆—) OD_{600} , (—●—) ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์, (—■—) ค่าความเป็นกรด-ด่าง, (—▲—) ความเข้มข้นของกรดแลกติก

5. ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย NMPY1M

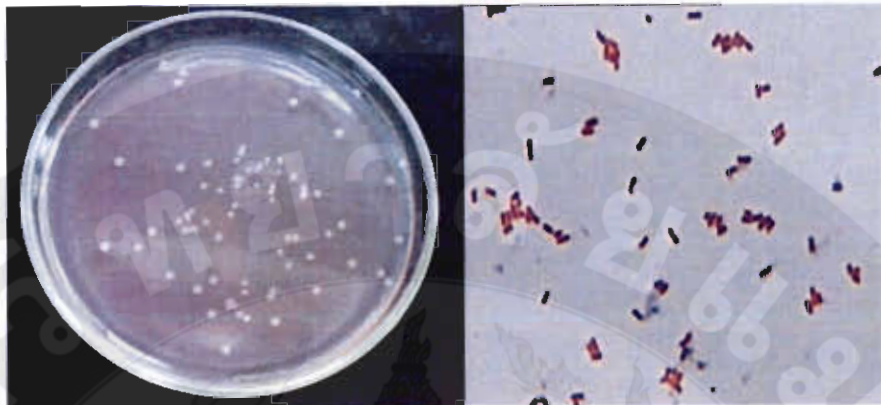
5.1 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง (cultural characteristic) ลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristic) และลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biochemical characteristics)

5.1.1 ผลการศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง

จากการนำแบคทีเรีย NMPY1M มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งโดย streak ลงบนอาหาร MRS สูตรดัดแปลง 1 จะเห็นได้ว่า แบคทีเรีย NMPY1M มีโคโลนีสีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว การยกตัวของโคโลนีขนาดเล็กน้อย (convex) มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 3 มิลลิเมตร (ภาพที่ 12 ก)

5.1.2 ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการนำแบคทีเรีย NMPY1M มาขยี้แบบแกรมแล้วส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า จากผลการทดลองในภาพที่ 12 ข จะเห็นว่า แบคทีเรีย NMPY1M เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม การจัดเรียงตัวของเซลล์เป็นคู่ (diplococci)



ก)

ข)

ภาพที่ 12 ก) ลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย NMPY1M บนอาหาร MRS สูตรดัดแปลง 1

บ่มไว้ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

ข) รูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์แบคทีเรีย NMPY1M เมื่อย้อมแบบแกรมและ

ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ ชนิดเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า

5.1.3 การศึกษาลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี

5.1.3.1 ผลทดสอบการผลิตเอนไซม์อะเลส

เมื่อนำแบคทีเรีย NMPY1M มาทดสอบการผลิตเอนไซม์อะเลสโดยหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ไม่เกิดปฏิกิริยาที่ทำให้ฟองอากาศ (ให้ผลเป็นลบ) แสดงว่า แบคทีเรีย NMPY1M ไม่สามารถผลิตเอนไซม์อะเลส

5.1.3.2 ผลการทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ

เมื่อทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ 10 ชนิด คือ glucose, sucrose, galactose, fructose, mannitol, maltose, xylitol, lactose, arabinose, glycerol โดยมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์และสังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อ คือหากแบคทีเรียใช้แหล่งคาร์บอนแล้วผลึกกรดแลคติกได้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง จากการทดลองในตารางที่ 10

5.2. ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วน

ของยีน 16S rRNA

จากการจำแนกแบคทีเรีย NMPY1M โดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนยีน 16S rRNA แล้วนำลำดับเบสไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ National Center for Biotechnology Information ในเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> ผลการเปรียบเทียบลำดับเบสของแบคทีเรีย NMPY1M ที่ Accession number JF 502566 แสดงในภาพที่ 13 และข้อมูลการจำแนกแบคทีเรีย NMPY1M เมื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank แสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 10 ผลการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรีย NMPY1M เมื่อเปรียบเทียบกับ แบคทีเรียต่าง ๆ

คุณลักษณะ	NMPY1M	<i>Enterococcus durans</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroid</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
ลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง							
ขนาดโคโลนี (size)	3 mm	ND	ND	ND	ND	ND	ND
รูปร่างของโคโลนี (form)	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม
ขอบของโคโลนี (margin)	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ	เรียบ
การยกตัวของผิวโคโลนี (elevation)	แบบ convex	ND	ND	ND	ND	ND	ND
ผิวหน้าของโคโลนี (surface)	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น	สีขาวขุ่น
ลักษณะทางสัณฐานวิทยา							
การติดสีแกรม	+	+	+	+	+	+	+
รูปร่างของเซลล์	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม	กลม
การจัดเรียงตัวของเซลล์	เป็นคู่	เป็นคู่ สายสั้น	เป็นคู่ สาย สั้น	เป็นคู่ สาย สั้น	เป็นคู่ สายสั้น	เป็นคู่ สายยาว	เป็นคู่ สายยาว
ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี							
การผลิตเอนไซม์อะไมเลส	-	-	-	-	-	-	-

ตารางที่ 10 (ต่อ)

การใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ							
คุณลักษณะ	NMPY1M	<i>Enterococcus durans</i>	<i>E. faecium</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	<i>Leuconostoc mesenteroid</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>
Arabinose	-	-	+	-	-	-	-
Fructose	+	+	+	+	+	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	+	-
Glucose	+	+	+	+	+	+	+
Glycerol	-	-	d	+	ND	ND	ND
Lactose	+	+	+	+	+		+
Maltose	+	+	+	+	ND	d	ND
Mannitol	+	+	+	+	-	ND	-
Sucrose	+	d	+	+	-	-	+
Xylitol	-	-	-	-	ND	ND	ND

หมายเหตุ d : แสดงผล 21-79 % , ND : ไม่มีข้อมูล

ที่มา : Manero และ Blanch (1999)

ลำดับเบสที่ได้จากการจำแนกในส่วนของยีน 16S rRNA ของแบคทีเรีย NMPY1M

CTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGT
GAGTAACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGAT
GCTAATACCGCATAACAACCTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCG
GCTATCACTTTTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTC
ACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTG
AGACACGGCCCAAACCTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGAC
GAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAC
TCTGTTGTTAAAGAAGACATATCTGAGAGTAAGTGTTCAGGTATTGACGGTATTT
AACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGC
AAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTG
ATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAACTTGAG
TGCAGAAGAGGACAGTGGAACCTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGG
AAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGA
AAGTATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATG
AATGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
TTCCGCCTGGGG

Query	1	CTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGT	60
Sbjct	28	CTGGTATTGATTGGTGCTTGCATCATGATTTACATTTGAGTGAGTGGCGAACTGGT	87
Query	61	AACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCG	120
Sbjct	88	AACACGTGGGAAACCTGCCAGAAAGCGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCG	147
Query	121	CATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG	180
Sbjct	148	CATAACAACTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAAGATGGCTTCGGCTATCACTTTTGG	207
Query	181	TGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTACCATGGCAATGATACGTA	240
Sbjct	208	TGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGTAACGGCTACCATGGCAATGATACGTA	267
Query	241	GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGG	300
Sbjct	268	GCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAACTCCTACGGG	327
Query	301	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG	360
Sbjct	328	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG	387
Query	361	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAATATCTGAGAGTAAC	420
Sbjct	388	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACCTCTGTTGTTAAAGAAGAATATCTGAGAGTAAC	447
Query	421	TGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAAACAGAAAGCCACGGCTAACCTGACGCGCAGCGCCG	480
Sbjct	448	TGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAAACAGAAAGCCACGGCTAACCTGACGCGCAGCGCCG	507
Query	481	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG	540
Sbjct	508	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG	567
Query	541	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGA	600
Sbjct	568	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAACTGGGA	627
Query	601	AACTTGAGTGCAGAAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA	660
Sbjct	628	AACTTGAGTGCAGAAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATA	687
Query	661	TGGAAGAACAACAGTGGCGGAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAA	720
Sbjct	688	TGGAAGAACAACAGTGGCGGAAGCGGCTGTCTGGTCTGTAACGTACGCTGAGGCTCGAAA	747
Query	721	GTATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCATACCCTAAACGATGAATGCTA	780
Sbjct	748	GTATGGGTAGCAAAACAGGATTAGATACCTTGGTAGTCCATACCCTAAACGATGAATGCTA	807
Query	781	AGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGG	840
Sbjct	808	AGTGTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCATTCGCCCTGGG	867
Query	841	G	
Sbjct	868	G	868

ภาพที่ 13 ผลการเทียบลำดับเบสของแบคทีเรีย NMPY1M ที่เหมือน *Enterococcus durans*

เท่ากับ 100% ที่ Accession number JF502566

ที่มา: <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi#344323417> (25 ธันวาคม 2555)

ตารางที่ 11 ข้อมูลการจำแนกแบคทีเรีย NMPY1M เมื่อนำไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank

ไอโซเลต	แบคทีเรีย	Accession number	Identities	%Homology
NMPY1M	<i>Enterococcus durans</i>	JF502566	841/841	100

วิจารณ์ผลการวิจัย

1. ผลการแยกแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดจากแป้งได้

จากการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างต่าง ๆ บนอาหารแข็ง De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) สูตรมาตรฐาน ที่มี soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ ผลการทดลองในตารางที่ 7 พบว่า แยกได้แบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ คือ แป้งหมัก อาหารหมัก เศษอาหาร น้ำเสีย ดิน ได้จำนวน 21, 94, 9, 16, 22 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมแบคทีเรียที่แยกได้ในการทดลองนี้ทั้งหมด จำนวน 162 ไอโซเลท จะเห็นว่า ในการทดลองนี้ได้แบคทีเรียจากตัวอย่างอาหารหมักมากกว่าจากแหล่งอื่น อาจเป็นผลมาจากมีจำนวนตัวอย่างอาหารหมักมากกว่าตัวอย่างจากแหล่งอื่น ๆ ซึ่งในการทดลองนี้ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ในการแยกแบคทีเรีย ซึ่งอาหารนี้ใช้สำหรับเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจำพวก *Lactobacilli* โดยธรรมชาติของแบคทีเรียกลุ่มนี้ชอบน้ำตาล และมีความสามารถในการผลิตกรดออกมาได้ (มณฑล, 2552) และในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียกรดแลคติกในอาหารเลี้ยงเชื้อทั่วไปทำได้ค่อนข้างยาก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแลคติกเป็นแบคทีเรียที่มีความต้องการอาหารที่มีความซับซ้อน (Fitzpatrick and Keefe, 2001) ซึ่งในการทดลองนี้ ควรจะเลือกแหล่งตัวอย่างที่นำมาแยกแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจากแป้งจากแหล่งที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ โดย Guyot *et al.* (2000) พบว่า วัตถุดิบรวมทั้งอาหารหมักดองที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบมักพบเป็นแหล่งอาศัยของแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตกรดแลคติกจากแป้ง หรือพวกอะมีบิโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งมีศักยภาพในการประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตกรดแลคติกจากแป้ง นอกจากนี้ Ashiru (2012) กล่าวว่า แหล่งของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติกจากแป้งคือ พวกอะมีบิโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย มักจะพบแหล่งอาศัยอยู่ในวัตถุดิบที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ เช่น แป้งข้าวโพดหมัก หรือมันฝรั่ง (Chatterjee, 1997) ซึ่ง Songré-Ouattara (2008) ได้แยก *Lactobacillus plantarum* ซึ่งเป็นแบคทีเรียพวก ALAB จากผลิตภัณฑ์มันสำปะหลังหมักของแอฟริกา นอกจากนี้ แบคทีเรีย *Enterococcus faecium* ที่เป็น ALAB แยกได้จากแป้งสาอุ (Shibata *et al.*, 2007; Hipolito *et al.*, 2012) และ Sanni *et al.* (2002) สามารถแยก ALAB คือ *L. plantarum* และ *L. fermentum* ได้จากอาหารหมักพื้นบ้านที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบของประเทศไนจีเรีย และยังมีรายงานของ Olympia *et al.* (1995) ที่แยก *L. plantarum* ซึ่งเป็นอะมีบิโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียจากอาหารหมักที่ทำจากปลาและข้าวในประเทศฟิลิปปินส์ และ นคร (2548) รายงานการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันสำปะหลังโดยแยกแบคทีเรียแลคติกจากลูกแป้ง พบว่า ในตัวอย่างลูกแป้งส่วนใหญ่มักจะพบแบคทีเรีย *Lactobacillus*, *Leuconostoc* และ

Pediococcus และพบว่า แบคทีเรีย PL10 ที่แยกได้จากลูกแป้ง เมื่อเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว GYE ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่ไม่มีการเขย่าเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ปริมาณกรดแลกติกได้สูงสุดเท่ากับ 3.85 และ 0.10 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้กลูโคสและแป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอน ตามลำดับ เมื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติกจากแบคทีเรียสายพันธุ์ PL10 พบว่า อุณหภูมิที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลกติก เท่ากับ 37 องศาเซลเซียส ที่ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนเท่ากับ 4 เปอร์เซ็นต์ และแบคทีเรียนี้สามารถใช้ฟรุกโตส เพื่อการผลิตกรดแลกติกได้ ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 ซึ่ง Quintero *et al.* (2012) รายงานการผลิตกรดแลกติกจากเชื้อ *Lactobacillus brevis* ในอาหาร HY1 medium ได้เท่ากับ 24.3 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง และ Yuwono and Hadi (2008) พบว่า แบคทีเรียแลกติก *Streptococcus bovis* สามารถผลิตกรดแลกติกได้จากของเหลือทิ้งที่มีแป้งจากเศษเปลือกมันสำปะหลัง และน้ำทิ้งจากการผลิตเต้าหู้ ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 5.5 ได้กรดแลกติกสูงถึง 39.98 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ของเหลือทิ้งเริ่มต้น 20 กรัมต่อลิตร หมักได้ผลผลิต (yield) เท่ากับ 85 เปอร์เซ็นต์ และผลผลิตที่ได้ต่อเวลา (productivity) เท่ากับ 3.01 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ในปี 1995 Damelin *et al.* (1995) รายงานว่า แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดแลกติกจากแป้งโดยตรงสามารถแยกได้จากอาหารชนิดต่าง ๆ ถึง 65 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Tamang *et al.* (2009) แยกแบคทีเรียแลกติกได้ 94 สายพันธุ์ จากการหมักผักและหน่อไม้ดอง แล้วคัดเลือกได้แบคทีเรียกรดแลกติกที่มีคุณสมบัติสร้างกรดแลกติกสูง และ Pringsnlaka *et al.* (2011) รายงานการแยกแบคทีเรียแลกติกจากผลิตภัณฑ์เนื้อสัตว์หมัก และปลาหมัก รวมทั้งหมัก 93 ตัวอย่าง และคัดเลือกได้แบคทีเรียกรดแลกติกจำนวน 152 สายพันธุ์ เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ด้านจุลชีพได้ ซึ่ง โชติมาและสิรินดา (2551) ได้แยก ALAB จากปลาสดได้แบคทีเรียทั้งหมด 106 ไอโซเลท พบว่า มี 40 ไอโซเลท ที่สามารถย่อยแป้งได้ ต่อมา ปิยนันท์ และคณะ (2554) แยกแบคทีเรีย *Enterococcus* sp. จากอาหารหมักดองพื้นบ้านของไทย 5 ประเภทคือ ปลา หมู กุ้ง ปู และหอย จำนวนทั้งหมด 70 ตัวอย่าง พบว่า อาหารจำนวน 28 ตัวอย่าง (ร้อยละ 40) มีการปนเปื้อน *Enterococcus* sp. แต่ไม่พบมีการปนเปื้อนในหอยดอง

2. ผลการคัดเลือกขั้นต้นของแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดและย่อยแป้งบนอาหารแข็ง

จากการนำแบคทีเรียที่แยกได้ในการทดลองนี้ แบคทีเรียที่มีผู้แยกไว้แล้วของห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยแม่โจ้ และแบคทีเรียที่ได้จากศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์ จำนวน 162, 289 และ 22 สายพันธุ์ ตามลำดับ รวมทั้งหมดจำนวน 473 สายพันธุ์ มาคัดเลือกขั้นต้นโดยทดสอบความสามารถในการผลิตกรดและย่อยแป้งมันสำปะหลังบนอาหารแข็ง MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี bromocresol purple เป็นอินดิเค-

เคอร์ โดยเพาะเลี้ยงเชื้อด้วยวิธี point inoculation ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง สังเกตการสร้างกรดโดยดูจากการเปลี่ยนสีของอาหารจากสีม่วงเป็นสีเหลือง และทดสอบการย่อยแป้งโดยหยดสารละลายไอโอดีนลงบนโคโลนีของแบคทีเรีย ซึ่ง ปริชาติและคณะ (2554) กล่าวว่า หากแบคทีเรียสามารถสร้างกรดได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมอินดิเคเตอร์ bromocresol purple จะเปลี่ยนจากสีม่วงเป็นสีเหลือง ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการผลิตกรดออกมาได้ ซึ่งในการทดลองนี้ พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลท คือ NMPY1M, NMCR1N, NP- 1, ON -4, SF- 2, SF- 5, SF- 6, SW -1, SW -6 และ TISTR 450 สามารถผลิตกรดและย่อยแป้งได้ ยกเว้น TISTR 450 ที่สามารถผลิตกรดแต่ไม่สามารถย่อยแป้งได้ (ตารางที่ 9) ซึ่งแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทแยกได้จาก แหนมหมู น้ำเสีย อาหารหมัก และศูนย์เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ซึ่งเกิดบริเวณวงสีเหลืองบนอาหารแข็ง โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางอยู่ระหว่าง 4-7 มิลลิเมตร และมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสหลังรดด้วยสารละลายไอโอดีนอยู่ระหว่าง 2-6 มิลลิเมตร ซึ่ง Diaz-Ruiz *et al.* (2003) ทดสอบการย่อยแป้งในจานเลี้ยงเชื้อพบว่า แบคทีเรียสามารถย่อยแป้งได้ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางบริเวณใสเท่ากับ 7-18 มิลลิเมตร จากนั้นทำการหมัก pozoi ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส โดยใช้เชื้อ *Streptococcus bovis* 25124 พบว่า ชั่วโมงที่ 72 แป้งถูกย่อยจาก 40 เหลือ 3 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 4.4 จำนวนอะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียเท่ากับ $8.7 \log \text{CFU/g}$ น้ำหนักแห้ง และจำนวนของแบคทีเรียกรดแลคติกเท่ากับ $10.2 \log \text{CFU/g}$ น้ำหนักแห้ง ซึ่ง Pringsulaka *et al.* (2010) ได้แยกแบคทีเรียแลคติกจากแหนมและไส้กรอกเปรี้ยวในภาคเหนือ ภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคกลางของประเทศไทย จำนวน 36 ตัวอย่าง โดยการเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS ที่เติมแคลเซียมคาร์บอเนต 1 เปอร์เซ็นต์ แยกได้แบคทีเรียกรดแลคติกทั้งหมด 41 ไอโซเลท ในปีเดียวกัน Boontawan (2010) แยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติกที่สามารถย่อยแป้งได้จากมันสำปะหลังหมักในประเทศไทยโดยเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ 1 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 พบว่า *Pediococcus pentosaceus* สามารถผลิตกรดได้ดี และมีรายงานการแยกอะมัยโลไลติกแบคทีเรีย GV6 ได้จากของเสียของอุตสาหกรรมแป้ง (Vishnu *et al.*, 2006) ต่อมา Fossi และ Tavea (2013) ได้แยกแบคทีเรีย ALAB จากดินในแควมอรูน และคัดเลือกเชื้อเบื้องต้นโดยสังเกตบริเวณใสบนอาหาร MRS ที่มีแป้ง (MRS-starch agar) พบว่า มี 9 ไอโซเลท (04BBA15, 04BBA19, 05BBA22, 05BBA23, 14BYA42, 20BBA60, 17BNG51, 23BYA21, 26BMB81) ที่สามารถย่อยแป้งได้ดีและมีกิจกรรมของเอนไซม์อะมัยเลสได้สูงอีกด้วย นอกจากนี้ ชลธิชา และคณะ (2555) ได้แยกแบคทีเรียจากแป้งหมักขนมจีน ได้จำนวน 468 ไอ-

โซเลท และมีแบคทีเรียที่สามารถย่อยแป้งได้ดีจำนวน 63 ไอโซเลท และย่อยแป้งได้ดีมาก 1 ไอโซเลท จึงนำไปศึกษาคุณลักษณะเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในการหมักแป้งขนมจีนต่อไป

ในการทดลองนี้ จึงนำแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดและย่อยแป้งได้ทั้ง 11 ไอโซเลท คือ NMPY1M, NMCR1N, NP- 1, ON -4, SF- 2, SF- 5, SF- 6, SW -1, SW -6 และ TISTR 450 ไปทดสอบความสามารถในการผลิตกรดแลคติกจากแป้งในอาหารเหลวต่อไป

3. ผลการทดสอบการผลิตกรดแลคติกจากแป้งในอาหารเหลวที่บรรจุในหลอดทดลอง

จากการนำแบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดและย่อยแป้งที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 จำนวน 11 ไอโซเลท มาทดสอบการผลิตกรดในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งบรรจุในหลอดทดลองปริมาตร 5 มิลลิลิตร บ่มแบบตั้งไว้ใน candle jar ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแลคติกโดยการไทเทรต จากผลการทดลอง พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 3.85 กรัมต่อลิตร เมื่อเปรียบเทียบกับไอโซเลทอื่น ๆ ซึ่งการศึกษการผลิตกรดแลคติกและการย่อยแป้งขึ้นต้นบนอาหารแข็งโดยมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์เพื่อดูความสามารถในการสร้างกรดบนอาหารแข็ง ในการทดลองนี้ พบว่า ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของวงสีเหลือง ซึ่งได้จากการเปลี่ยนสีของอินดิเคเตอร์จากสีม่วงเป็นสีเหลือง ไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของกรดที่ผลิตในอาหารเหลวคือ ถ้าขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางวงสีเหลืองกว้างไม่ได้หมายความว่าแบคทีเรียมีความสามารถผลิตกรดได้ปริมาณมาก แต่สามารถบอกได้เพียงว่าแบคทีเรียนั้นมีความสามารถในการผลิตกรดเท่านั้น

ในการทดลองนี้ แบคทีเรีย NMPY1M ที่แยกได้จากแหนมหมู เป็นเชื้อที่มีความสามารถในการผลิตกรดและยังมีความสามารถในการย่อยแป้งได้ด้วย จึงจัดว่าเป็นอะมัยโลไลติกแอซิดแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ซึ่งจะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเป็นแบคทีเรียกลุ่ม *Lactobacillus* sp. และ *Lactococcus* sp. และ *Lactobacillus* sp. ที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสแบบปล่อยออกมานอกเซลล์ สามารถหมักแป้งเป็นกรดแลคติกได้โดยตรง และ พบว่า มีกิจกรรมของเอนไซม์อะมัยเลส (amylase) และพุลูลาเนส (pullulanase) สูงเมื่อหมักบนวัสดุแข็งคือ รำข้าวสาลี (Naveena, 2004) และประมวล (2551) รายงานว่าแบคทีเรีย *Lactobacillus amylophilus* GV6 ผลิตเอนไซม์อะมัยเลสและพุลูลาเนสขับออกมานอกเซลล์ เพื่อผลิตกรดแลคติกจากแป้งโดยตรงได้เช่นเดียวกัน ซึ่ง นฤมล (2551) พบว่าแบคทีเรียแลคติกที่ผลิตกรด แลคติกจากแป้ง (ALAB) ในปลาซั่มจำนวน 40 ไอโซเลท จากแบคทีเรียแลคติกทั้งหมด 785 ไอโซเลท ซึ่งพบแบคทีเรียดังกล่าวใน ระยะเวลาหลังการหมัก 6 ชั่วโมง และเมื่อทดสอบกิจกรรมของ Amylolytic enzyme ในอาหารเหลว MRS ที่เติมแป้ง 2 เปอร์เซ็นต์ แต่ไม่เติมน้ำตาลกลูโคส พบว่า อะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย สายพันธุ์

B62 ให้ค่ากิจกรรมของเอนไซม์อะมัยโลไลติกสูงสุดเท่ากับ 1.15 และ 1.26 หน่วยต่อมิลลิลิตร เมื่อใช้แป้งจากข้าวและแป้งละลายน้ำได้เป็นสับสเตรท ตามลำดับ เมื่อจำแนกชนิดของ ALAB ทั้ง 40 ไอโซเลท พบว่า เป็น *Streptococcus* sp. จำนวน 87.5 เปอร์เซ็นต์ และเป็น *Lactobacillus* sp. จำนวน 12.5 เปอร์เซ็นต์ และในปี 2007 Oguntinyinbo (2007) ใช้ แบคทีเรียกรดแลคติกในการหมักมันสำปะหลังในแต่ละขั้นตอนของการผลิต *gari* แบบดั้งเดิม พบว่า *Lactobacillus plantarum* สามารถผลิตกรดแลคติกจากแป้งได้สูง สามารถผลิตเอนไซม์อะมัยเลสได้สูง คือ นอกจากนี้ Mazzucotelli *et al.* (2013) ได้แยกแบคทีเรียจากของเหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมเกษตรจากแหล่งที่แตกต่างกัน 6 แหล่ง และทดสอบความสามารถในผลิตเอนไซม์บนอาหารเลี้ยงเชื้อจำเพาะ พบว่า จำนวน 28, 18, 13, 15 และ 11 สายพันธุ์ มีกิจกรรมของเอนไซม์ โปรติเอส ไกลเปส เคซิเนส อะมัยเลส และเซลลูเลส ตามลำดับ แล้วได้คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์สูงสุดเพื่อนำไปประยุกต์ใช้ในทางเทคโนโลยีชีวภาพ และจำแนกชนิดของเชื้อ พบว่าเป็นแบคทีเรีย *Bacillus*, *Serratia*, *Enterococcus*, *Klebsiella*, *Stenotrophomonas*, *Lactococcus*

Yuwono and Hadi (2008) รายงานว่า *Streptococcus bovis* สามารถผลิตกรดแลคติกได้จากของเหลือทิ้งที่มีแป้งที่ได้จากเศษเปลือกมันสำปะหลัง ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5 ได้กรดแลคติกสูงถึง 98.39 กรัมต่อลิตร ในปี 2012 Yuwono and Hadi (2012) ผลิตกรดแลคติกจากมันสำปะหลังโดย *Streptococcus bovis* ได้กรดแลคติกเท่ากับ 15.7 กรัมต่อลิตร ซึ่งแบคทีเรียนี้สามารถผลิตกรดแลคติกสูงและยังมีกิจกรรมของเอนไซม์ย่อยแป้งอีกด้วย และยังมีรายงานการผลิตกรดแลคติกจากอะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรีย ได้แก่ *Lactobacillus amylophilus* ผลิตได้ 0.31 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง (Yen and Kang, 2010); *Lactobacillus casei* EMCC 11093 ผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 16.9 กรัมต่อลิตร ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (Affifi, 2011) ซึ่ง Son *et al.* (2013) พบว่า โดย *Lactobacillus manihotivorans* ผลิตกรดแลคติกจากแป้งได้สูงสุดเท่ากับ 71.4 กรัมต่อลิตร

4. ผลการศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย NMPY1M

จากการนำแบคทีเรีย NMPY1M มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เดิมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างทุก 6 ชั่วโมง วัดการเจริญของเซลล์แบคทีเรีย วิเคราะห์ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ วิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดแลคติก และวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ในการทดลองนี้ พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M มีการเจริญสูงสุดที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง และสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 4.3 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีค่าความเป็นกรด-ด่างลดลงเล็กน้อย ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการเจริญและการผลิตกรดแลคติกและ พบว่า ปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้นเล็กน้อย ซึ่งจากรายงาน

ของ Petrov *et al.* (2007) พบว่า *Enterococcus faecium* สามารถผลิตกรดแลกติกจากแป้งสาธูได้สูงสุดเท่ากับ 16.6 กรัมต่อลิตร แบคทีเรียมีการย่อยแป้งสาธูได้น้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ในระยะเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นมีการใช้น้ำตาลทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์ลดลง ในปีเดียวกัน Shibata *et al.* (2007) รายงานว่า อะมัยโลไลติกแลกติกแอซิดแบคทีเรีย 3 สายพันธุ์คือ *Enterococcus faecium* No. 78, *Lactobacillus amylovorus* JCM 1126 และ *L. manihotivorus* JCM 12514. ในการผลิตกรดแลกติกโดยตรงจากแป้งสาธู และพบว่า *L. amylovorus* JCM 1126 และ *L. manihotivorus* JCM 12514 สามารถใช้แป้งมีปริมาณลดลงอย่างรวดเร็วในช่วงแรกของการเจริญ จึงมีผลทำให้ความเข้มข้นของน้ำตาลรีดิวซ์เพิ่มขึ้น ในขณะที่ *E. faecium* No. 78 ใช้แป้งลดลงเล็กน้อย สามารถผลิตกรดแลกติกและกรดอะซิติกได้ความเข้มข้นสูง ซึ่งการที่พบน้ำตาลรีดิวซ์ความเข้มข้นสูงอาจเป็นผลมาจากกิจกรรมของเอนไซม์อะไมเลสสูง ซึ่งส่งผลทำให้ได้กรดแลกติกสูงขึ้นด้วย แบคทีเรีย *E. faecium* No. 78 ผลิตกรดแลกติกชนิดแอล-แลกติกได้ผลผลิตสูงสุดถึง 98.6 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสูงกว่าสายพันธุ์อื่น ๆ และสายพันธุ์นี้มีศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยตรงจากแป้ง และยังมีรายงานของ Wee *et al.* (2008) ผลิตแอล-แลกติก จาโดยใช้แบคทีเรีย *Enterococcus faecalis* RKY1 โดยใช้แป้งข้าวโพด แป้งสาธู แป้งมันสำปะหลัง มันฝรั่ง แป้งสาลี และน้ำแช่ข้าวโพด โดยใช้แป้งความเข้มข้นต่าง ๆ คือ 50, 75, 100 และ 125 กรัมต่อลิตร พบว่า ได้ผลผลิต (yield) ของกรดแลกติกจากแป้งแต่ละชนิดสูงกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ได้ความเข้มข้นของกรดแลกติกสูงถึง 129.9 กรัมต่อลิตร และได้ผลผลิตเท่ากับ 1.04 กรัมต่อลิตร และผลิตได้เร็วกว่า 84 ชั่วโมง เมื่อใช้แป้งข้าวโพดเป็นวัตถุดิบ และยังพบว่า มีความสามารถในการหมักมันสำปะหลังได้สมบูรณ์โดยใช้ระยะเวลาสั้นกว่าแป้งชนิดอื่น ซึ่งการเติมยีสต์เอ็กแทรกซ์ลงไปในการเลี้ยงเชื้อปริมาณเล็กน้อย พบว่า มีผลเสริมการเจริญและการหมักกรดแลกติกได้

นอกจากนี้ Narvhus *et al.* (1998) รายงานการผลิตกรดแลกติกจากแป้งมันฝรั่งของแบคทีเรีย *Lactococcus lactis* พบว่า แบคทีเรียสามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด 5.5 กรัมต่อลิตร จากการใช้แป้งมันฝรั่ง 18 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้ระยะเวลาในการหมัก 144 ชั่วโมง (6 วัน) ต่อมา Coelhol *et al.* (2010) ปรับปรุงการผลิตแอล-แลกติก จากน้ำเสียบแป้งมันสำปะหลังโดย *Lactobacillus rhamnosus* B103 พบว่า เมื่อใช้น้ำทิ้งจากแป้งมันสำปะหลังที่มีน้ำตาลรีดิวซ์ 50 กรัมต่อลิตร ที่เติม Tween 80 และน้ำแช่ข้าวโพด 1.27 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 41.65 กรัมต่อลิตร หลังจากระยะเวลา 48 ชั่วโมง ความเข้มข้นของกรดแลกติกสูงสุดเมื่อผลิตในถังหมักระยะเวลา 36 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 39 กรัมต่อลิตร เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเดียวกัน และ Hipolito *et al.* (2012) ผลิตกรดแลกติกโดยใช้ *Enterococcus faecium* ที่แยกได้

จาก puto ซึ่งเป็นข้าวหมักของฟิลิปปินส์เพื่อใช้ในการย่อยแป้งสาธู พบว่า ผลิตรกรดแลกติกได้ 36.3 กรัมต่อลิตร และในปีเดียวกัน Fitriani and Kokugan (2012) ผลิตรกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลัง โดยเชื้อ *Streptococcus bovis* พบว่า ผลิตรได้ 15.7 กรัมต่อลิตร นอกจากนี้ Quintero *et al.* (2012) ผลิตรกรดแลกติกจากแป้งมันสำปะหลังโดยอะมัยโลไลติกแลกติกแอซิดแบคทีเรียได้สูงสุดเท่ากับ 24.3 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง

ในการทดลองนี้ แบคทีเรีย *Enterococcus durans* NMPY1M สามารถผลิตรกรดแลกติกได้ปริมาณไม่สูงมากนัก อาจเป็นผลมาจากสภาวะในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อการผลิตกรดแลกติกในการทดลองนี้ยังไม่ใช่สภาวะที่เหมาะสม หรืออาจเนื่องมาจากการใช้เชื้อเริ่มต้นน้อยเกินไป ดังนั้น จึงควรหาสภาวะที่เหมาะสม เช่น อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของสารอาหาร และปริมาณเชื้อเริ่มต้น ที่อาจมีผลทำให้เชื้อนี้สามารถผลิตรกรดแลกติกได้สูงขึ้นได้นอกจากนี้ ซึ่ง อรรวรรณ (2544) รายงานการผลิตกรดแลกติกจากกากมันสำปะหลังโดย *Lactococcus* sp. พบว่า สภาวะที่เหมาะสมคือค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส ปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมคือใช้ยีสต์เอ็กแทรกซ์และยูเรีย 0.5 และ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และ Ohkouchi *et al.* (2006) ได้ผลิตรกรดแลกติกโดยตรงจากแป้ง และอาหารเสียโดย *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011 มีปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตรกรดแลกติกคือ ค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้น ซึ่งมีอิทธิพลต่อการผลิตเอนไซม์อะมัยเลสเพื่อการย่อยแป้งให้มีโมเลกุลที่เล็กลง ค่าความเป็นกรด-ด่าง และความเข้มข้นของแมกนีเซียมในอาหารมีผลต่ออัตราการผลิต และผลผลิตของกรดแลกติก สำหรับค่าความเป็นกรด-ด่าง เริ่มต้นที่เหมาะสมคือ 5.0 – 5.5 และค่าความเป็นกรด-ด่าง สำหรับการหมักแป้งโดยตรงเท่ากับ 5.0 การหมักอาหารเสียโดยใช้เชื้อ *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011 ให้ผลิตรกรดแลกติก 19.5 กรัมต่อลิตร และแมกนีเซียมีผลส่งเสริมการหมักกรดแลกติกโดยตรง ซึ่ง พรหมปพร และคณะ (2553) รายงานการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรกรดแลกติกจากน้ำย่อยแป้งด้วยจุลินทรีย์ 2 สายพันธุ์ คือ *Enterococcus faecalis* TISTR 379 ที่สามารถผลิตรกรดแลกติกชนิด แอล-แลกติก และ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053 ที่สามารถผลิตรกรดแลกติกชนิด ดี-แลกติก โดยแปรผันปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมดและแหล่งไนโตรเจน ทำการหมักแบบกะในถังหมักขนาด 5 ลิตร ปริมาตรทำงาน 3 ลิตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส อัตราการกวน 150 รอบต่อนาที และค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 6.0 พบว่า สภาวะที่เหมาะสมในการผลิตรกรดแลกติกจากน้ำย่อยแป้งโดย *E. faecalis* คือที่ปริมาณของแข็งที่ละลายได้ทั้งหมด 10 องศาบริกซ์ โดยใช้เปปไทด์เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถผลิตรกรดแลกติกได้ 83.05 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้และอัตราการผลิต เท่ากับ 1.24 และ 1.76 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ จากการศึกษาข้างพบว่าสภาวะที่

เหมาะสม ในการผลิตกรดแลกติกจากน้ำย่อยแป้งโดย *Leu. mesenteroides* คือที่ปริมาณของแข็ง ที่ละลายได้ทั้งหมด 10 องศาบริกซ์ โดยใช้แอมโมเนียมคลอไรด์เป็นแหล่งไนโตรเจน สามารถ ผลิตกรดแลกติกได้ 22.07 กรัมต่อลิตร คิดเป็นผลได้และอัตราการผลิต เท่ากับ 0.72 และ 0.92 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ Lu *et al.* (2010) รายงานการผลิตกรดแลกติกจาก แป้งเมื่อใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ คือ ข้าวโอ๊ต มันสำปะหลัง ข้าวโพด และ กลูโคส เป็น แหล่งคาร์บอนสำหรับการผลิตกรดแลกติกโดย *Lactobacillus rhamnosus* HG 09 พบว่า เมื่อ อัตราส่วนคาร์บอนต่อไนโตรเจนสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตกรดแลกติก และใช้น้ำ ลูกพลับแทน บีสต์สกัด และใช้รำข้าวสาลีที่ไฮโดรไลซ์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ผลผลิตกรดแลกติก ถึง 45.78 กรัมต่อ 100 กรัม พบว่า เมื่อใช้แป้งข้าวโอ๊ตที่ไฮโดรไลซ์ เป็นแหล่งคาร์บอน สามารถผลิตกรดแลกติกได้สูงสุด

5. ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

5.1 การศึกษาลักษณะการเจริญบนอาหารแข็ง (cultural characteristic) ลักษณะทาง สัณฐานวิทยา (morphological characteristic) และลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (physiological and biochemical characteristics)

จากการศึกษาลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย NMPY1M บนอาหารแข็ง MRS มาตรฐาน พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M มีโคโลนีสีขาวขุ่น กลม ขอบเรียบ ผิวหน้ามันวาว การยกตัวของ โคโลนีขนาดเล็กน้อย มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนี 3 มิลลิเมตร การศึกษาลักษณะทางสัณฐาน วิทยาของแบคทีเรีย NMPY1M ได้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ กำลังขยาย 1,000 เท่า พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M เป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม เซลล์อยู่เป็นคู่ (diplococci) และ Morlon-Guyot *et al.* (1998) พบว่า *Lactobacillus* ที่แยกได้ระหว่างการหมักแป้งมัน สำปะหลังเปรี้ยว เป็นแบคทีเรียรูปร่างท่อน แกรมบวก ไม่สร้างเอนไซม์อะซิเตส ไม่สร้าง สปอร์ และไม่เคลื่อนที่ สามารถผลิตกรดแลกติกชนิด แอล-แลกติก และเป็นพวก homofermentative ค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมในการเจริญเท่ากับ 6.0 และสามารถเจริญ ได้ที่อุณหภูมิ 15 และ 45 องศาเซลเซียส และเมื่อจำแนกชนิดโดย 16s rRNA พบว่า เป็นสาย พันธุ์ใหม่ คือ *Lactobacillus manihotivorans*

ในการทดลองนี้ เมื่อนำแบคทีเรีย NMPY1M มาทดสอบการผลิตเอนไซม์อะซิเตส โดยหยดสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ พบว่า ให้ผลเป็นลบ แสดงว่า แบคทีเรีย NMPY1M ไม่สามารถผลิตเอนไซม์อะซิเตส และเมื่อทดสอบการใช้แหล่ง คาร์บอนชนิดต่าง ๆ 10 ชนิด คือ glucose, sucrose, galactose, fructose, mannitol, maltose, xylitol, lactose, arabinose, glycerol พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M สามารถใช้แหล่งคาร์บอนที่เป็น

glucose, sucrose, galactose, fructose, mannitol, maltose, lactose แต่ไม่สามารถใช้แหล่งคาร์บอนจาก arabinose, glycerol และ xylitol ได้ ในการทดลองนี้ พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M มีการใช้น้ำตาลแล้วผลิตกรดแต่ไม่สร้างก๊าซ ซึ่งแสดงว่าแบคทีเรียนี้เป็นพวกที่สร้างผลผลิตเป็นกรดเป็นส่วนใหญ่ ซึ่ง อัจฉรา (2550) กล่าวว่า แบคทีเรียที่สามารถผลิตกรดอย่างเดียว แต่ไม่ผลิตก๊าซและผลพลอยได้อื่น ๆ จัดเป็นพวก homofermentative แต่หากแบคทีเรียใดใช้น้ำตาลแล้วผลิตได้ทั้งกรดและผลิตก๊าซและผลพลอยได้อื่น ๆ ร่วมอีกหลายชนิด จัดเป็นพวก heterofermentative และ Yun *et al.* (2003) ทดสอบความสามารถในการใช้คาร์โบไฮเดรตชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรีย *Enterococcus faecium* RKY1 พบว่า เชื้อนี้สามารถใช้น้ำตาลไซโลส กลีเซอรอล หางน้ำมัน และแป้ง แต่เมื่อใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบ ด้วยน้ำตาลกลูโคส ฟรุคโตส และมอลโตส พบว่า สามารถผลิตกรดแลกติกได้ผลผลิตสูงเท่ากับ 5.2, 6.0 และ 0.96 กรัมต่อกรัมของแหล่งคาร์บอน และเชื้อนี้มีความสามารถในการผลิตกรดแลกติกชนิดแอล-แลกติกที่มีความบริสุทธิ์สูงถึง 99 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งสายพันธุ์นี้ผลิตกรดแลกติกโดยวิธี homofermentative คือผลิตกรดแลกติกชนิดเดียวเป็นส่วนใหญ่ ซึ่ง Hwanhlem *et al.* (2011) แยกแบคทีเรียกรดแลกติก จากปลาซั้ม ได้จำนวน 138 ไอโซเลท พบว่า เป็นแบคทีเรียกรดแลกติก 133 ไอโซเลท ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวก มีรูปร่างกลม ท่อนสั้น และรูปร่างท่อนจำนวน 23, 75 และ 33 ไอโซเลท ตามลำดับ และพบว่า *Streptococcus salivarius* และ *Enterococcus faecalis* สามารถผลิตสารยับยั้งเชื้อก่อโรคได้

ลักษณะทั่วไปของแบคทีเรียกรดแลกติกคือ เป็นกลุ่มแบคทีเรียแกรมบวกซึ่งไม่สร้างสปอร์ ขาดเอนไซม์อะเลส ขาดไซโตโครม ทนต่อสภาวะมีอากาศ (aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรด ต้องการสารอาหารสูงในการเจริญ และผลิตกรดแลกติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักจากการหมักน้ำตาล อย่างไรก็ตาม แบคทีเรียกลุ่มนี้ บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์อะเลสเทียม (pseudocatalase) ซึ่งขาดกลุ่มพอร์ไฟริน (porphyrin group) และในสภาวะจำกัดสารอาหารกลุ่ม Streptococci เช่น *Streptococcus bovis* มีการผลิตกรดแลกติกเพียงเล็กน้อยเท่านั้น (Axelsson, 1998) ซึ่ง Shibata *et al.* (2007) ศึกษาคุณลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรีย เมื่อทดสอบการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ โดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL ของแบคทีเรีย No. 78 เปรียบเทียบกับ *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus durans* แสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 การใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ ของแบคทีเรีย No. 78, *Enterococcus faecium* และ *Enterococcus durans* เมื่อทดสอบโดยใช้ชุดทดสอบ API 50 CHL (Shibata *et al.*, 2007)

แหล่งคาร์บอน	No. 78	<i>E.</i> <i>faecium</i>	<i>E.</i> <i>durans</i>	แหล่งคาร์บอน	No. 78	<i>E.</i> <i>faecium</i>	<i>E.</i> <i>durans</i>
Glycerol	—	d	—	Inulin	—	—	—
Erithritol	—	—	—	Melezitose	—	—	—
D-Arabinose	—	ND	ND	D-Raffinose	+	d	—
L-Arabinose	+	+	—	Amidon/starch	+	d	d
Ribose	+	+	—	Glycogen	+	—	—
D-Xylose	—	d	—	Xylitol	—	—	—
L-Xylose	—	—	—	α -Gentibiose	+	ND	ND
Adonitol	—	—	—	D-Turanse	—	—	—
α -Methyl-xyloside	—	—	—	D-Lyxose	—	—	—
Galactose	+	+	+	D-Tagatose	—	—	—
D-Glucose	+	+	+	D-Fucose	—	—	—
D-Fructose	+	+	—	L-Fucose	—	—	—
D-Mannose	+	+	+	D-Arabitol	—	—	—
L-Sorbose	—	—	—	L-Arabitol	—	—	—
Rhamnose	—	—	—	Esculine	+	ND	ND
Dulcitol	—	—	—	Salicine	+	+	+
Inositol	—	ND	ND	Cellobiose	+	+	+
Mannitol	+	+	—	Maltose	+	+	+
Sorbitol	—	—	—	Lactose	+	+	+
-Methyl-D-mannoside	—	ND	ND	Melobiose	+	(+)	+
N-Acetyl-glucosamine	+	+	+				
Amygdalin	—	+	+				
Arbutine	+	+	+				
Saccharose	+	+	d				
Trehalose	+	+	+				

(+) ผลบวก; (-) ผลลบ; ND: ไม่มีข้อมูล; (d) 75 to 89% ให้ผลบวก

Gilmore and Michael (2002) พบว่า Enterococci เป็น แกรมบวก รูปร่างกลม ที่อยู่รอดได้ในธรรมชาติ สามารถพบได้ใน ดินน้ำ และพืช บางสายพันธุ์ นำไปใช้ ในการผลิตอาหาร หรือบางชนิดเป็นสาเหตุของการติดเชื้อของมนุษย์และ สัตว์ เช่น พวกที่อาศัยอยู่ใน ระบบทางเดินอาหาร และ อวัยวะเพศของมนุษย์ Enterococci สามารถเจริญเติบโตได้ ในช่วงอุณหภูมิ 10-42 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างกว้าง บางชนิดเคลื่อนที่ได้ มีมากกว่า 15 สปีชีส์ ในจีนัส *Enterococcus* ที่เป็นเชื้อที่แยกได้จากตัวอย่างทางการแพทย์ เช่น *E. faecalis* โดยทั่วไป Enterococci จะเรียงตัวเป็นสายโซ่ สั้น หรือ อยู่เป็นคู่ หรือหรืออาจพบรูปร่างยาว หรือท่อนสั้น Enterococci ไม่ผลิตเอนไซม์อะคะเลส ไม่ใช้ออกซิเจน สามารถเจริญได้ใน 6.5% NaCl สามารถย่อยสลาย esculin ในที่มีเกลือน้ำดี 40%

Law-Brown and Meyers (2003) ศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรียที่แยกได้จาก *Phoeniculus purpureus* โดยจำแนกสายพันธุ์ JLB-1 (T) พบว่า เป็นแบคทีเรียพวก facultatively anaerobic, รูปร่างกลม แกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่เคลื่อนที่ ไม่ผลิตเอนไซม์อะคะเลส และทำการทดสอบลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี ระบุว่าพวก homofermentative จัดอยู่ในกลุ่มแบคทีเรียแลคติก *Enterococcus* หรือ *Streptococcus* เมื่อเปรียบเทียบกับลำดับเบสใน 16S rRNA ในฐานข้อมูลของ GenBank พบว่า มีความใกล้เคียงกับแบคทีเรีย *Enterococcus faecium*, *Enterococcus avium* และ *Enterococcus asini* ซึ่งสายพันธุ์ JLB-1 (T) ไม่ผลิตกรดจากน้ำตาลแลคโตส, D-mannitol, D (+)-melezitose หรือ D-sorbitol นอกจากนี้ ยังไม่สามารถย่อยอาร์จินีน (arginine) หรือ ฮิปพูเรท (hippurate) และไม่สามารถเจริญได้ในที่มีเกลือน้ำดี 40 เปอร์เซ็นต์ และที่มีน้ำดี (bile) 6.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งมีลักษณะแตกต่างจากพวก streptococci คือไม่สลายเม็ดเลือดแดง สายพันธุ์ JLB-1 (T) เป็นสมาชิกใหม่ของ enterococci ชื่อว่า *Enterococcus phoeniculicola*

Abdel-Rahman *et al.* (2013) ปรับปรุงประสิทธิภาพการผลิตกรดแลคติกโดยการหมักที่แตกต่างกันจากแบคทีเรีย *Enterococcus mundtii* QU 25 ซึ่งเป็นแบคทีเรียแลคติกทนร้อนและเป็นพวก homofermentative หมักน้ำตาลกลูโคสได้กรดแลคติกชนิดแอล-แลคติก ได้ความเข้มข้นของกรดแลคติกสูงในสภาวะค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.0 ที่อุณหภูมิ 43 องศาเซลเซียส ในการหมักที่มีน้ำตาลกลูโคสเริ่มต้นเท่ากับ 100 กรัมต่อลิตร ได้เซลล์สูงถึง 82.4 กรัมต่อลิตร ของผลผลิตกรดแลคติก 0.858 กรัมต่อกรัมกลูโคส และได้ผลผลิตต่อเวลา เท่ากับ 2.0 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบการหมักแบบ fed batch และมีการนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ พบว่า ได้ผลผลิตกรดแลคติก เพิ่มขึ้นเป็น 5.5 เท่าสูงกว่าการหมักแบบ batch ระยะเวลา 6 ชั่วโมง และได้กรดแลคติกสูงถึง 132 กรัมต่อลิตร และได้ผลผลิตกรดแลคติก 0.853 กรัมต่อกรัมกลูโคส

และได้ผลผลิตต่อเวลา 6.99 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่งมีศักยภาพในการผลิตกรดแลกติกโดยใช้สารตั้งต้นที่ระดับความเข้มข้นสูงซึ่งไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อสารตั้งต้น

ALAB ผลิตเอนไซม์อะมัยเลสที่ใช้ในกระบวนการย่อยและหมักกรดแลกติกจากแป้งในขั้นตอนเดียว (Reddy *et al.*, 2008) ALAB สามารถนำไปใช้ในการผลิตเชิงพาณิชย์ของกรดแลกติกจากวัสดุที่เป็นแป้ง และในการลดความหนืดของอาหารเสริมสำหรับทารกที่มีแป้งเป็นส่วนประกอบ (John *et al.*, 2009; Nguyen, 2007; Songré-Ouattara, 2010) ซึ่งความหลากหลายของ ALAB ที่แยกและมีการประยุกต์ใช้ประโยชน์กันมาก ได้แก่ แบคทีเรียในกลุ่ม *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* และ *Streptococcus* (John *et al.*, 2009, Reddy *et al.*, 2008) ซึ่ง *Lactobacillus plantarum* A6 (LMG 18053) ที่แยกได้จากมันสำปะหลัง ได้มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางและประยุกต์ใช้ในการผลิตอาหารได้ (Giraud *et al.*, 1991, Nguyen *et al.*, 2007, Songré-Ouattara, 2010)

ซึ่งจากผลการทดลองนี้ พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M มีการใช้แหล่งคาร์บอนชนิดต่าง ๆ เหมือนกับ *Enterococcus durans* ผู้ทดลองจึงนำแบคทีเรียดังกล่าวไปจำแนกชนิดโดยการหาลำดับเบสของ 16S rRNA ต่อไป

5.2. ผลการจำแนกแบคทีเรียโดยการหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน 16S rRNA

จากการจำแนกแบคทีเรีย NMPY1M โดยหาลำดับเบสของดีเอ็นเอในส่วนที่ยีน 16S rRNA แล้วนำลำดับเบสไปเทียบกับฐานข้อมูลใน GenBank โดยใช้โปรแกรม BLAST ของ National Center for Biotechnology Information ในเว็บไซต์ <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov> จากการทดลองนี้ พบว่า เมื่อเปรียบเทียบลำดับเบสของ แบคทีเรีย NMPY1M ใน GenBank ได้ผลการเปรียบเทียบ ซึ่งมี Accession number ที่ระบุว่าเป็นแบคทีเรีย *Enterococcus durans* มีความเหมือนเท่ากับ 100% และ Shibata *et al.* (2007) ได้จำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้วิธีการทดสอบทางสรีรวิทยาและชีวเคมีและ หาลำดับเบส 16S rDNA พบว่าเป็น *Enterococcus faecium* No.78 และเชื้อนี้ผลิตกรดแลกติกจากแป้งสาธิตได้ผลผลิตของกรดแลกติกสูงสุดเท่ากับ 3.04 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง ซึ่ง Wang *et al.* 2006 แยกอะมัยโลไลติกแลคติกแอซิดแบคทีเรียได้จากของเหลือทิ้งในครัวเรือน พบว่า ได้จำนวน 6 สายพันธุ์ และสายพันธุ์ FH164 สามารถผลิตกรดแลกติกได้จากแป้งได้อัตราเร็วที่สุด คือได้กรดแลกติกเท่ากับ 32.67 กรัมต่อลิตร โดยผลิตได้จากแป้งที่ละลายน้ำได้ 40.50 กรัมต่อลิตร ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 5.5-6.0 ที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อจำแนกชนิดของเชื้อโดยใช้ 16S rDNA พบว่า เป็น *Streptococcus* sp. และพบว่าสายพันธุ์นี้สามารถผลิตกรดแลกติกได้ 28.23 กรัมต่อลิตร เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อในของเหลือทิ้งจากครัวเรือนที่

ไม่ได้ผ่านการฆ่าเชื้อ ซึ่งได้ผลผลิตสูงกว่าชุดควบคุมถึง 19.2 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Phonyiam (2008) แยก ALAB จากปลาสดซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ปลาหมักของไทย และจำแนกชนิดของแบคทีเรียเป็นสกุล *Streptococcus* sp. จำนวน 87 เปอร์เซ็นต์ และสกุล *Lactobacillus* sp. จำนวน 12.5 เปอร์เซ็นต์ ต่อมา Oupathumpanont *et al.* (2009) คัดเลือกแบคทีเรียแลคติกจากแป้งขนมจีน พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมบวก 287 ไอโซเลท และไม่ผลิตเอนไซม์อะไมเลส และแยกออกเป็น 4 กลุ่ม โดยดูจากความสามารถในการผลิตก๊าซ และสัณฐานวิทยาของเซลล์ พบว่า ไอโซเลท P1 และ P39 สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงเท่ากับ 9.1 และ 8.6 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ชุดทดสอบ พบว่า ทั้ง 2 ไอโซเลท เป็น *Lactobacillus plantarum* และมีรายงานการผลิตกรดแลคติกจาก *Lactobacillus plantarum* โดยใช้วัตถุดิบเป็นแป้งจากข้าวฟ่างหวานที่ย่อยแล้วและรำข้าวสาลี พบว่า ได้ผลผลิตกรดแลคติกเท่ากับ 92.5 และ 50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (Asady, 2012)

Hagedorn *et al.* (2013) ศึกษาการปนเปื้อนของแบคทีเรีย *Enterococcus* sp. ในตัวอย่างอุจจาระบริเวณชายหาดตามที่สาธารณะ แยกได้จำนวน 1279 ไอโซเลท จากจำนวนตัวอย่าง 17 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่แยกจากแหล่งต่าง ๆ เช่น ระบบบำบัดน้ำเสีย น้ำทะเลบริเวณชายหาดที่แตกต่างกัน 7 บริเวณ และน้ำจืดไหลบ่ามาจากระบบ ซึ่งจากการจำแนกชนิด พบว่า เป็น *Enterococcus faecalis* และ *E. faecium* ที่มาจากอุจจาระของมนุษย์ และเป็นชนิดที่โดดเด่นในน้ำเสีย และยังพบว่า มี *E. casseliflavus* และ *E. mundtii* อีกด้วย ซึ่งการตรวจดังกล่าว ใช้ในการประเมินคุณภาพด้านสุขอนามัยของชายหาดโดยดูจากการค้นพบว่ามีการปนเปื้อนของอุจจาระ

สรุปผลการวิจัย

การแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างต่าง ๆ โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อบนอาหารแข็ง De Man, Rogosa and Sharpe (MRS) สูตรมาตรฐาน ที่เติม soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ โดยวิธี pour plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง พบว่า ได้แบคทีเรียจากแหล่งต่าง ๆ คือ แป้งหมัก อาหารหมัก เศษอาหาร น้ำเสีย ดิน ได้จำนวน 21, 94, 9, 16, 22 ไอโซเลท ตามลำดับ รวมแบคทีเรียที่แยกได้ในการทดลองนี้ จำนวน 162 ไอโซเลท

การคัดเลือกขึ้นต้นโดยการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดและย่อยแป้งของแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 473 สายพันธุ์ บนอาหารแข็ง MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติม soluble starch 1 เปอร์เซ็นต์ โดยมี bromocresol purple เป็นอินดิเคเตอร์ ด้วยวิธี point inoculation ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า มีแบคทีเรียจำนวน 11 ไอโซเลท คือ NMPY1M, NMCR1N, NP-1, ON-4, SF-2, SF-5, SF-6, SW-1, SW-6 และ TISTR 450 สามารถผลิตกรดและย่อยแป้ง ยกเว้น TISTR 450 ที่สามารถผลิตกรดได้แต่ไม่สามารถย่อยแป้งได้

การทดสอบการผลิตกรดแลคติกจากแป้งในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ของแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ในขึ้นต้นจำนวน 11 ไอโซเลท พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M สามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 3.85 กรัมต่อลิตร

การศึกษาการเจริญและการผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันสำปะหลังที่ระยะเวลาต่าง ๆ ของแบคทีเรีย NMPY1M ในอาหารเหลว MRS สูตรดัดแปลง 1 ที่เติมแป้งมันสำปะหลัง 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M มีการผลิตกรดแลคติกสัมพันธ์กับการเจริญ โดยสามารถผลิตกรดแลคติกได้สูงสุดเท่ากับ 4.3 กรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การจำแนกแบคทีเรียโดยศึกษาการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ลักษณะทางสรีรวิทยาและชีวเคมี และการหาลำดับเบสในส่วนของ 16S rRNA พบว่า แบคทีเรีย NMPY1M มีความเหมือนกับ *Enterococcus durans* เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

เอกสารอ้างอิง

- กล้าณรงค์ ศรีรอด. 2543. **เทคโนโลยีของแป้ง**. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ. คณะอุตสาหกรรมเกษตร. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 200 น.
- ชลธิชา เลี่ยมคำ วิลาวัณย์ เจริญจิระตระกูล ฌัฐพงษ์ บวรเรืองโรจน์ และปรียานุช บวรเรืองโรจน์. 2555. การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีความสามารถในการย่อยแป้งเพื่อใช้เป็นกล้ำเชื้อในกระบวนการหมักขนมจีน. **เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 50**. กรุงเทพฯ. 31 มกราคม-2 กุมภาพันธ์ 2555: 101-107.
- โชติมา โพธิทรัพย์ และ สิริินดา บุนนาค. 2551. การบ่งชี้อิทธิพลของแบคทีเรียกรดแลคติกที่มีต่อส่วนผสมคาร์โบไฮเดรตที่เป็นองค์ประกอบในสูตรที่ใช้ทำปลาหมึก. **มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น**
- ธนาวิดี ลีจากภัก. 2551. พลาสติกย่อยสลายได้ : อดิศักดิ์ ปัจจุบัน อนาคต. <http://www.vcharkarn.com/vaarticle/38245> [15 ตุลาคม 2554].
- นกร หน่อแก้ว. 2548. การผลิตกรดแลคติกจากแป้งมันสำปะหลังโดยแลคติกแบคทีเรียที่แยกได้จากลูกแป้ง. **รายงานผลการวิจัย. โปรแกรมชีววิทยาประยุกต์. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏอุดรดิตถ์. อุดรดิตถ์.**
- นวลจิรา ภัทรธรรอง. 2538. โรคที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. **รายงานผลการวิจัย ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์. สงขลา.**
- ประมวล ทราชทอง. 2551. Amylolytic lactic acid bacteria (ALAB). **วิชาการ. 4(38) : 301-305.**
- ปรีชาดิ ศรีระพันธุ์ วิเชียร ลีลาวัชรมาศ และ ประมุข ภาระกุลสุขสถิตย์. 2554. การแยก คัดเลือก และจัดจำแนกแบคทีเรียกรดแลคติกที่สามารถลดการทำงานของสารยับยั้งทริปซินจากกากถั่วเหลืองดิบ. **รายงานผลงานวิจัย. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ**
- พัคตร์ประไพ ประจำเมือง และ วิชัย ลีลาวัชรมาศ. 2546. เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยแป้ง. **ศูนย์บริการวิชาการ. 4(11): 28-31.**
- พรหมปพร เชี่ยววงศ์รอบ ภรณ์ทิพย์ อุดตโมบล บุวลักษณ์ ขุนอิน และสุภาดา เอ็นดู. 2553. การศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแลคติกจากน้ำย่อยแป้ง โดย *Enterococcus*

faecalis TISTR 379 และ *Leuconostoc mesenteroides* TISTR 053. งานวิจัยองค์ความรู้ คลังปัญญา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี. ปทุมธานี.

มนทล สุกใส. 2552. **MRS broth**. <http://www.thaifoodscience.com/mrs-broth.html> [3 กันยายน 2554].

สมาคมอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพไทย. 2551. เทคโนโลยีของประเทศผู้นำด้านพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ. <http://www.nia.or.th/download/document/chapter3.pdf> [14 กันยายน 2554].

สำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ. 2551. พลาสติกย่อยสลายได้ เทคโนโลยีที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม เพื่อการพัฒนาที่ยั่งยืน. http://www2.mtec.or.th/th/special/biodegradable_plastic/type_and_usage_plas.html [23 สิงหาคม 2554].

อัญญา เพิ่ม. 2550. แบคทีเรียแลคติก. สำนักพิมพ์ภาพพิมพ์: กรุงเทพฯ. 150 น.

อรรธรณ ชื่นคุ้ม. 2544. การผลิตกรดแลคติกจากกากมันสำปะหลัง วิทยานิพนธ์ หลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมสิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี. นครราชสีมา.

Abdel-Rahman, M.A., Y. Tashiro, T. Zendo and K. Sonomoto .2013. Improved lactic acid productivity by an open repeated batch fermentation system using *Enterococcus mundtii* QU 25 . **RSC Advances** .. 3: 8437-8445.

Afifi, M.M. 2011. Enhancement of lactic acid production by utilizing liquid potato wastes. **Inter. J. Biol. Chem.** 5: 91-102.

Agati, V.J.P., Guyot J., P. Morlon-Guyot , N. Talamonda and D.J. Hounhouigan. 1998. Isolation and characterization of new amylolytic strains of *Lactobacillus fermentum* from fermented maize doughs (mawe and ogi) from Benin. **J. Appl. Microbiol.** 85: 512–520.

Altaf, M., B.J. Naveena, M. Venkateshwar, E.V. Kumar and G. Reddy. 2006. Single step fermentation of starch to L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using inexpensive nitrogen sources to replace peptone and yeast extract-optimization by RSM. **Proc. Biochem.** 41: 465–472.

- Altaf, M., B.J. Naveena and G. Reddy. 2007a. Use of inexpensive nitrogen sources and starch for L(+) lactic acid production in anaerobic submerged fermentation. **Biores. Technol.** 98: 498–503.
- Altaf, M., M. Venkateshwar, M. Srijana and G. Reddy. 2007b. An economic approach for L-(+) lactic acid fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using inexpensive carbon and nitrogen sources. **J. Appl. Microbiol.** 103: 372–380.
- Anuradha, R., A.K. Suresh and K.V. Venkatesh. 1999. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid, **Proc. Biochem.** 35: 367–375.
- Asady, A.K.G. 2012. Production of lactic acid by a local isolate of *Lactobacillus plantarum* using cheap starchy material hydrolysates. **Pak. J. Nutrition.** 11(1): 88-93.
- Ashiru, A.W., O.D. Teniola, N.N. Dibiana and A. Apena. 2012. Isolation of starch degrading spoilage bacteria from 'Ogi' (fermenting maize starch). **Pakistan J. Nutrition.** 11: 243-246.
- Axelsson, L. 1998. Lactic acid Bacteria : Classification and physiology. In: (Salminen, S. and Von Wright, A. (eds.) **Lactic acid bacteria.** Marcel Dekker. New York. pp. 1-64.
- Baltus, W. 2013. (Senior Advisor, National Innovation Agency: NIA, Thailand). The Asian bioplastic resin market- An analysis. InnoBioPlast 2013, Thursday 24 January 2013. 13:25-13:50 h.
- Bohak, I., W. Back, L. Richter, M. Ehrmann, W. Ludwig and K.H. Schleifer. 1998. *Lactobacillus amylolyticus* sp. nov., isolated from beer malt and beer wort. **Syst. Appl. Microbiol.** 21: 360–364.
- Boontawan, P. 2010. **Development of lactic acid production process from cassava by Using lactic acid bacteria production process from cassava by using lactic acid Bacteria.** Ph.D.Thesis Suranaree University of Technology. Nakhonratchasima.
- Champ, M., O. Szylit O, P. Raibaud. and A. Abdelkader. 1983. Amylase production by three *Lactobacillus* strains isolated from chicken crop. **J. Appl. Bacteriol.** 55: 487-493.
- Chatterjee, M., S.L. Chakrabarty, B.D. Chattopadhyay and R.K. Mandal. 1997. Production of lactic acid by direct fermentation of starchy wastes by an amylase-producing *Lactobacillus*. **Biotechnol. Lett.** 19: 873–874.

- Cheng, P., R.E. Muller, S. Jaeger, R. Bajpai and E.L. Jannotti. 1991. Lactic acid production from enzyme thinned cornstarch using *Lactobacillus amylovorus*. **J. Ind. Microbiol.** 7: 27–34.
- Coelho, L.F., C.J.B. Lima, M.P. Bernardo, G.M. Alvarez and J. Conitiero. 2010. Improvement of L(+)-lactic acid production from cassava waste water by *Lactobacillus rhamnosus* B103. **J. Sci. Food Agric.** 90: 1944-1950.
- Damelin, L. H., G.A. Dykes and A. von Holy. 1995. Biodiversity of lactic acid bacteria from food-related ecosystems. **Microbios.** 83: 13-22.
- Dellaglio, F., L. M. T. Dicks and S. Torriani. 1995. The genus *Leuconatoc* pp. 235-278. In: B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel, (eds.). **The genera of lactic acid bacteria.** Chapman and Hall. Glasgow. pp.105-110.
- Devriese, L.A. and B. Pot. 1995. The genus *Enterococcus*, pp. 327-367. In B.J. B. Wood and W. H. Journal of Health Promotion and Environmental Health. 33(3): 97-109.
- Diaz-Ruiz, G., J.P. Guyot, F. Ruiz-Teran, J. Morlon-Guyot and C. Wachter. 2003. Microbial and physiological characterization of weakly amylolytic but fast-growing lactic acid bacteria: a functional role in supporting microbial diversity in Pozol, a Mexican fermented maize beverage. **Appl. Environ. Microbiol.** 69: 4364-4374.
- Fitriani, J. and T. Kokugan. 2012. Lactic acid production from fresh cassava roots using single stage membrane bioreactor. **Modern Appl. Sci.** 6(1): 60-65.
- Fitzpatrick, J.J. and U. O’Keeffe. 2001. Influence of whey protein hydrolyzate addition to Whey permeate batch fermentations for producing lactic acid. **Proc. Biochem.** 37: 183-186.
- Fossi, B.T. and F. Tavea. 2013. **Application of amylolytic *Lactobacillus fermentum* 04BBA19 fermentation for simultaneous production of thermostable α -amylase and lactic acid.** 2nd Edn. Marcelina Kongo. Cameroon. pp. 132-136.
- Gilmore, M. 2002. The Enterococci: **Pathogenesis, molecular biology, and antibiotic resistance.** Washington. DC: American Society for Microbiology Press. pp. 220-235.
- Giraud, E., A. Brauman, S. Keleke, B. Lelong and M. Raimbault. 1991. Isolation and physiological study of an amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36: 379–383.

- Giraud, E., B. Lelong and M. Raimbault. 1991. Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 36: 96–9.
- Giraud, E, A. Champaviller, M. Raimbault. 1994. Degradation of raw starch by a wild amylolytic strain of *Lactobacillus plantarum*. **Appl. Environ. Microbiol.** 60: 4319–4323.
- Guyot, J.P., M. Calderon and M.J.P. Guyot. 2000. Effect of pH control on lactic acid fermentation of starch by *Lactobacillus manihotivorans* LMG 180010T. **J. Appl. Microbiol.** 88: 176-182.
- Guyot, J.P. and J. Morlon-Guyot . 2001. Effect of different cultivation conditions on *Lactobacillus manihotivorans* OND32, an amylolytic lactobacillus isolated from sour starch cassava fermentation. **Int. J. Food Microbiol.** 67: 217-225.
- Guyot, J.M., J.P. Guyot, B. Pot, I.J. Hautl and M. Raimbaultl. 1998. *Lactobacillus rnanihotivorans* sp. nov., a new starch-hydrolysing lactic acid bacterium isolated during cassava sour starch fermentation. **Inter. J. Syst. Bacteriol.** 48: 1101-1109.
- Hagedorn, C. 2013. Comparison of *Enterococcus* Species Diversity in Marine Water and Wastewater Using Enterolert and EPA Method 1600. **J. Environ. Public Health.** 2013: 22-30.
- Hipolito, C.N., O.C. Zarrabal, R.M. Kamaldin, L.T. Yee, S. Lihan, K.B. Bujang and Y. Nitta. 2012. Lactic acid production by *Enterococcus faecium* in liquefied sago starch. **AMB Express.** 2: 53-58.
- Holzapel. 1995. In: B.J.B. Wood and W. H. Hardie, J. M. and R. A. Wiley. (ed.). **The genera of lactic acid bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow. Pp. 75-124. The genus *Streptococcus*. pp. 75-124.
- Holzapel 1997. In: Stiles, M. E. and W. H. Holzapel. (ed.). **The genera of lactic acid bacteria.** Chapman and Hall, Glasgow. Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. pp.36 : 1-29.
- Hwanhlem, N., S. Buradaleng, S.Wattanachant, S. Benjakul, A. Tani and S. Maneerat. 2011. Isolation and screening of lactic acid bacteria from Thai traditional fermented fish

- (Plasom) and production of Plasom from selected strains. **Food Control**. 22: 401-407.
- John, R.P., G.S. Anisha, K.M. Nampoothiri and A. Pandey. 2010. Lactic acid fermentation: direct. Encyclopedia. **Biotechnol. Agric. Food**. 10: 1081.
- John, R.P., K.M Nampoothiri and A. Pandey. 2009. Direct lactic acid fermentation: focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. **Biotechnol. Adv.** 27: 145-152.
- Ju Yu, J. and O. Suk-Heung . 2010. Isolation and characterization of lactic acid bacteria strains with ornithine producing capacity from natural sea salt. **Microbiology**. 48: 467-472.
- Krishnan S., S. Bhattacharya and N.G. Karanth. 1998. Media optimization for production of lactic acid by *Lactobacillus plantarum* NCIM 2084 using response surface methodology. **Food Biotechnol.** 199812: 105–121.
- Law-Brown J., P.R. Meyers. 2003. *Enterococcus phoeniculicola* sp. nov., a novel member of the enterococci isolated from the uropygial gland of the Red-billed Woodhoopoe, *Phoeniculus purpureus*. **Int J Syst Evol Microbiol**. 2003 May;53(Pt 3):683-5.
- Lee H.S., G. Se, S. Carter. 2001. Amylolytic cultures of *Lactobacillus acidophilus*: potential probiotics to improve dietary starch utilization. **J. Food Sci.** 66: 2.
- Lindgren S. and O. Refai. 1984. Amylolytic lactic acid bacteria in fish silage. **J. Appl. Bacteriol.** 57: 221-228
- Litchfield, J.H. 1996. Microbiological production of lactic acid. **Adv Appl Microbiol** 42: 45–95.
- Lu Z., Feng He, Yue Shi, Mingbo Lu and Longjiang Yu. 2010. Fermentative production of L(+)-lactic acid using hydrolyzed acorn starch, persimmon juice and wheat bran hydrolysate as nutrients. **Biores. Technol.** 101: 3642–3648.
- Manero A. and A.R. Blanch. 1999. Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. **Appl. Environ. Microbiol.** 65 (10): 4425–4430
- Martin, O. and L. Averous. 2001. Poly(lactic acid) : plasticization and properties of biodegradable multiphase systems. **Polymer**. 42: 6209-6219.

- Mazzucotelli, C.A.; A.G. Poncel, C.E. Kotlar and del Rosario Moreira .2013. Isolation and characterization of bacterial strains with a hydrolytic profile with potential use in bioconversion of agroindustrial by-products and waste. **Food Sci. Technol.** 33 (2): 125-132.
- D. Rouleau and D. Dochain. 1992. Kinetics of lactic acid fermentation on glucose and corn by *Lactobacillus acidophilus*. J. Clzeni. **Technol. Biotechnol.** 5: 111-121.
- Na L.Y., G.Y. Shi G, W. Wang and Z.X. Wang. 2010. A newly isolated *Rhizopus microsporus* var. *Chinensis* capable of secreting amylolytic enzymes with raw starch digesting activity. **J. Microbiol. Biotechnol.** 20(2): 383-390.
- Nakamura, L.K. 1981. *Lactobacillus anzylovorus*, a new starch hydrolyzing species from cattle waste-corn fermentations. **Int. J. Syst. Bacteriol.** 31: 56-63.
- Nakamura, L.K. and C.D. Crowell. 1979. *Lactobacillus amylophilus*, a new starch-hydrolyzing species from swine waste-corn fermentation. **Dev. Ind. Microbiol.** 20: 531-540.
- Narita, J., S. Nakahara, H. Fukuda and A. Kondo. 2004. Efficient production of L-Lactic acid from raw starch by *Streptococcus bovis* 148. **J. Biosci. Bioeng.** 97(6): 423–425.
- Narvhus, J.A., K. Østeraas, T. Mutukumira and R.K. Abrahamsen. 1998. Production of fermented milk using a malty compound-producing strain of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*, isolated from Zimbabwean naturally fermented milk. **Int. J. Food Microbiol.** 41: 73–80.
- Naveena B.J., M.D. Altaf, K. Bhadriah and G. Reddy. 2004. Production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in semi-solid state fermentation using wheat bran. **Food Technol. Biotechnol.** 42: 147–52.
- Navcena, B.J., M.D. Altaf, K. Bhadriah and G. Reddy. 2005. Selection of medium components by Plackett Burman design for production of L(+) lactic acid by *Lactobacillus amylophilus* GV6 in SSF using wheat bran. **Biores. Technol.** 485: 90-96.
- Naveena, B.J., M.D. Altaf, K. Bhadrappa, S.S. Madhavendra and G. Reddy. 2005b. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using wheat bran as support and substrate—medium optimization using RSM. **Proc. Biochem.** 40: 681–690.

- Naveena, B.J., M.D. Altaf, K. Bhadriah and G. Reddy. 2005c. Screening and interaction effects of physical parameters total N content and buffer on L(+) Lactic acid production in SSF by *Lactobacillus amylophilus* GV6 using Taguchi designs. **Ind. J. Biotechnol.** 4(3): 301–28.
- Naveena, B.J., C. Vishnu, M.D. Altaf and G. Reddy. 2003. Wheat bran an inexpensive substrate for production of lactic acid in solid state fermentation by *Lactobacillus amylophilus* GV6-optimization of fermentation conditions. **J. Sci. Ind. Res.** 62: 453–456.
- Nguyen, T.T. 2007. Effect of fermentation by amylolytic lactic acid bacteria, in process combinations, on characteristics of rice/soybean slurries: a new method for preparing high energy density complementary foods for young children. **Food Chem.** 100: 623–631.
- Nwankwo, D., E. Anadu and R. Usoro. 1989. Cassava fermenting organisms. **MIRCEN J.** 5: 169–179.
- Oguntoyinbo, F.A. 2007. Identification and functional properties of dominant lactic acid bacteria isolated at different stages of solid state fermentation of cassava during traditional *gari* production. **Microbiol. Biotechnol.** 23: 1425–1432.
- Ohkouchi, Y and Y. Inoue. 2006. Direct production of L(+)-lactic acid from starch and food wastes using *Lactobacillus manihotivorans* LMG18011. **Biores. Technol.** 97: 1554–1562.
- Olympia, M, H. Fukuda, H. Ono, Y. Kaneko and M.Takano.1995. Characterization of starch-hydrolyzing lactic acid bacteria isolated from a fermented fish and rice food, “Burong Isda,” and its amylolytic enzyme. **J. Ferment. Bioeng.** 80: 124–30.
- Oupathumpanont, O., W. Chantarapanont, T. Suwonsichon, V. Haruthaithanasan and A. Chompreeda. 2009. Screening lactic acid bacteria for improving the Kanom-jeen process. **Kasetsart J. Nat. Sci.** 43: 557-565.
- Petrov, K., Z. Urshev .and P. Petrova. 2008. L(+)-Lactic acid production from starch by a novel amylolytic *Lactococcus lactis subsp. lactis* B84. **Food Microbiol.** 25: 550-557 .

- Phonyiam, N. 2008. Amylolytic lactic acid bacteria recovered and screened from plaa-som and its amylolytic enzyme. **Proceeding papers. The 13th International biotechnology symposium & exhibition (IBS-2008) biotechnology for the sustainability of human society international convention and exhibition center Dalian/China** 12 October, 2008: 374.
- Phonyiam, N. and S. Yunchalard. 2008. Amylolytic lactic acid bacteria recovered and screened from plaa-som and its amylolytic enzyme. **J. Biotechnol.** 55: 745.
- Pompeyo, C.C., M.S. Gomez, S. Gasparian and J. Morlon-Guyot. 1993. Comparison of amylolytic properties of *Lactococcus amylivor* and *Lactobacillus amylophilus* **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 6: 266-269.
- Pranamuda, H., Y. Tokiwa and H. Tanaka. 1997. Polylactide degradation by *Amycolatopsis* sp. **Appl. Environ. Microbiol.** 63 (4): 1637-1640.
- Pringsulaka, O., N. Thongngam, N. Suwannasai, W. Atthakor, K. Pothivejkul and A. Rangsiruji. 2012. Partial characterisation of bacteriocins produced by lactic acid bacteria isolated from Thai fermented meat and fish products. **Food Control.** 23: 547-551.
- Ouattara L.T., C.M. Rivier, C.I. Vernire, C. Humblot, B. Diawara and J.P. Guyot. 2010. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (bensaalga) of functional interest in nutrition. **Int. J. Food Microbiol.** 128: 395-400.
- Quintero, J.E., A. Acosta, C. Mejia, R. Rios and A.M. Torres. 2012. Lactic acid production via cassava flour hydrolysate fermentation. **Vitae.** 19(3): 1-8.
- Reddy, G., M.D. Altaf, B.J. Naveena, M. Venkateshwar and E. Vijay Kumar. 2008. Amylolytic bacterial lactic acid fermentation — A review. **Biotechnology Advances.** 26: 22-34.
- Reddy, G., B.J. Naveena. And M.D. Altaf. 2006. Lactic acid: a potential microbial metabolite. *In: Maheshwari DK, Dubey RC, Kang SC. editors. Biotechnological applications of microorganisms, a technocommercial approach.* vol. 3. New Delhi: I.K International publishing house pvt. Ltd. pp. 45-66.

- Sanni, A., J.M. Guyot and J.P. Guyot. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. **Int. J. Food Microbiol.** 72: 53–62.
- Sanni, A., M. Guyot and J.P. Guyot. 2002. New efficient amylase-producing strains of *Lactobacillus plantarum* and *L. fermentum* isolated from different Nigerian traditional fermented foods. **Int. J. Food Microbiol.** 72: 53–62.
- Sanoja, R.R., M.J. Guyot, J. Jore, J. Pintado, J. Juge and J.P. Guyot. 2000. Comparative characterization of complete and truncated forms of *Lactobacillus amylovorus* amylase and the role of the C-terminal direct repeats in raw starch binding. **Appl. Environ. Microbiol.** 66: 3350–3356.
- Santoyo, C.M., G. Loiseau, R.R. Sanoja, and J.P. Guyot. 2003. Study of starch fermentation at low pH by *Lactobacillus fermentum* Ogi E1 reveals uncoupling between growth and amylase production at pH 4. **Int. J. Food Microbiol.** 80: 77–87.
- Shibata, K., D.M. Flores, G. Kobayashi and K. Sonomoto. 2007. Direct lactic acid fermentation with sago starch by a novel amylolytic lactic acid bacterium. *Enterococcus faecium*. **Enzyme Microb. Technol.** 41: 149–155.
- Skory, C. D., S. N. Freer and R. J. Bothast. 1998. Production of L(+)-lactic acid by *Rhizopus oryzae* under oxygen limiting condition. **Biotechnol. Lett.** 20(2): 191–194.
- Son, M.S. and Y.J. Kwon. 2013. Direct fermentation of starch to L(+)-lactic acid by fed-batch culture of *Lactobacillus manihottivorans*. **Food Sci. Biotechnol.** 22(1): 289–293.
- Songré-Ouattara, L.T., . 2010. Ability of selected lactic acid bacteria to ferment a pearl millet-soybean slurry to produce gruels for complementary foods for young children. **J. Food Sci.** 75: M261–M269.
- Songré-Ouattara, L.T., C.M. Rivier, C.I. Vernire, C. Humblot, B. Diawara and J.P. Guyot. 2008. Enzyme activities of lactic acid bacteria from a pearl millet fermented gruel (ben-saalga) of functional interest in nutrition. **Int. J. Food Microbiol.** 128: 395–400.
- Tamang, J.P., B. Tamang, U. Schillinger, C. Guigas and W. Holzapfel. 2009. Functional properties of lactic acid bacteria isolated from ethnic fermented vegetables of the Himalayas. **Food Microbiol.** 135: 28–33.

- Tanasupawat, S., S. Okada and K. Komagata. 1998. Lactic acid bacteria found in fermented fish in Thailand. **J. Gen. Appl. Microbiol.** 44: 193–200.
- Termpittayapaisith, A. 2013. (Secretary General, National Economic and Social Development Board: NESDB, Thailand). Progress in implementation of Thailand's national roadmap. InnoBioPlast. Thursday 24 January 2013. 11-12.
- Teuber, M. 1995. The genus *Lactococcus*, pp. 134-173. In: B.J. B. Wood and W. H. Holzapfel (eds.). **The genera of lactic acid bacteria**. Chapman and Hall, Glasgow. pp. 156-180.
- Thomsen, M.H., J.P. Guyot and P. Kiel. 2007. Batch fermentations on synthetic mixed sugar and starch medium with amylolytic lactic acid bacteria. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** 74: 540-546.
- Torres, A., S.M. Roussos and M. Vert. 1996. Screening of microorganisms for biodegradation of poly(lactic acid) and lactic acid- containing polymers. **Appl. Environ. Microbiol.** 62 (7): 2393-2397.
- Vishnu, C, B.J. Naveena, M.D. Altaf, M. Venkateshwar, G. Reddy. 2006. Amylopullulanase: a novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid. **Enzyme Microb. Technol.** 38: 545-550.
- Vishnu, C., B.J. Naveena, M.D. Altaf, M. Venkateshwar and G. Reddy. 2006. Amylopullulanase: A novel enzyme of *L. amylophilus* GV6 in direct fermentation of starch to L(+) lactic acid. **Enzyme Microb. Technol.** 38: 545–550.
- Vishnu, C., G. Seenayya and G. Reddy. 2000. Direct fermentation of starch to L(+) lactic acid By amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. **Bioproc. Eng.** 23: 155–158.
- Vishnu, C, G. Seenayya and G. Reddy. 2002. Direct fermentation of various pure and crude starchy substrates to L(+) lactic acid using *Lactobacillus amylophilus* GV6. **World J. Microbiol. Biotechnol.** 18: 429–33.
- Vishnu, C, K. Sudha Rani G. Reddy and G. Seenayya. 1998. Amylolytic bacteria producing lactic acid. **J. Sci. Ind. Res.** 57: 600–603.
- Wang, X.M., X.Q. Wang and H.Z. Ma. 2006. Isolation of an amylolytic lactic acid bacterium And its application on lactic acid production from kitchen waste. **Huan Jing Ke Xue.** 27(4): 800-804.

- Wang, L., B. Zhao, V. Liu, C. Yang, B. Yu, Q. Li, C. Ma, P. Xu and Y. Ma. 2010. Efficient production of L-lactic acid from cassava powder by *Lactobacillus rhamnosus*. **Biores. Technol.** 101: 7895–7901.
- Wee, Y.J., V.A. Reddy, and H.W. Ryu. 2008. Fermentative production of L-lactic acid from starch hydrolysate and corn steep liquor as inexpensive nutrients by batch culture of *Enterococcus faecalis* RKY. **J. Chem. Technol. Biotechnol.** 83: 1387-1393.
- Yen, H.W. and Y.C. Lee. 2009. Production of lactic acid from raw sweet potato powders by *Rhizopus oryzae* immobilized in sodium alginate capsules. **Appl. Biochem. Biotechnol.** 162(2). 607-615.
- Yen, H.W. and J.L. Kang. 2010. Lactic acid production directly from starch in a starch-controlled fed batch operation using *Lactobacillus amylophilus*. **Bioproc. Biosys. Eng.** 10: 1-7.
- Yumoto, I. and K. Ikeda. 1995. Direct fermentation of starch to L(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. **Biotechnol. Lett.** 17: 543–6.
- Yun, J.S. and H.W. Ryu. 2003. Production of Optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. **Enz. Microb. Technol.** 33: 416-423.
- Yuwono, S.D. and S. Hadi. 2008. Production of lactic acid from Onggok and Tofu liquid waste with concentrate *Maguro* waste supplement by *Streptococcus bovis*. **Australian J. Basic Appl. Sciences.** 2(4): 939-942.
- Yuwono, S.D. and S. Hadi. 2012. Lactic acid production from fresh cassava roots using single-stage membrane bioreactor. **Modern Appl. Sci.** 6(1): 115-120.
- Zhang, D.X. and M. Cheryan. 1991. Direct fermentation of starch to lactic acid by *Lactobacillus amylovorus*. **Biotechnol. Lett.** 10: 733–738.



ภาคผนวก ก

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารแข็ง De Man, Rogaso and Sharpe (MRS) agar สูตรมาตรฐาน

Dextrose	20.00	กรัมต่อลิตร
Meat peptone	10.00	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10.00	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.00	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5.00	กรัมต่อลิตร
Disodium phosphate	2.00	กรัมต่อลิตร
Ammonium citrate	2.00	กรัมต่อลิตร
Tween [®] 80	1.00	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulfate	0.10	กรัมต่อลิตร
Manganese sulfate	0.05	กรัมต่อลิตร
Agar	15	กรัมต่อลิตร
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ชั่งอาหาร MRS สำเร็จรูป 55 กรัมต่อลิตร ละลายในน้ำกลั่นและผสมให้เข้ากัน แล้วเติมวุ้น
สำหรับเตรียมอาหารแข็ง ส่วนอาหารเหลวส่วนประกอบเหมือนกันแต่ไม่ต้องเติมวุ้น นำไปนึ่งฆ่า
เชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

อาหาร De Man, Rogaso and Sharpe (MRS) สูตรดัดแปลง 1

Peptone	10.00	กรัมต่อลิตร
Beef extract	10.00	กรัมต่อลิตร
Yeast extract	5.00	กรัมต่อลิตร
Sodium acetate	5.00	กรัมต่อลิตร
Tri-sodium phosphate	2.00	กรัมต่อลิตร
Di-ammonium hydrogen citrate	2.00	กรัมต่อลิตร
Tween [®] 80	1.00	กรัมต่อลิตร
Magnesium sulphate 7 hydrate	0.10	กรัมต่อลิตร
Manganese sulphate monohydrate	0.05	กรัมต่อลิตร
แป้งมันสำปะหลัง	10	กรัมต่อลิตร
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ขั่งสารต่าง ๆ ตามที่ปริมาณกำหนดไว้ ละลายในน้ำกลั่น ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน นำไปนึ่ง
ฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นระยะเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข

การเตรียมสารเคมี

สารละลาย 0.85% NaCl (Sodium chloride)

NaCl	0.85	กรัม
Distilled water	100	มิลลิลิตร
นำส่วนผสมทั้งสองละลายให้เข้ากัน		

สารละลาย 0.1 M NaOH (Sodium hydroxide)

Sodium hydroxide	4	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร
นำส่วนผสมทั้งสองละลายให้เข้ากัน		

สารละลาย 1% Phenolphthalein

Phenolphthalein	1	กรัม
Alcohol	100	มิลลิลิตร
นำส่วนผสมทั้งสองละลายให้เข้ากัน		

สารละลาย DNS

DNS (3,5-dinitrosalicylic acid)	10	กรัม
NaOH (Sodium hydroxide)	16	กรัม
Sodium potassium tartate	300	กรัม
Distilled water	1,000	มิลลิลิตร

ชั่ง DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 250 มิลลิลิตร เติมน้ำ NaOH 16 กรัม ที่ละลายในน้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร คนให้เข้ากัน นำไปอุ่นในอ่างน้ำร้อนจนกระทั่งสารละลายใส จากนั้นเติมน้ำ Sodium potassium tartate ลงไปที่ละน้อยจนครบ 300 กรัม ปรับปริมาตรสุดท้ายให้ได้ 1,000 มิลลิลิตร เก็บรักษาไว้ในขวดสีชาที่อุณหภูมิห้อง

สารละลายมาตรฐานกลูโคส 1500 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร

Glucose 0.15 กรัม

Distilled water 100 มิลลิลิตร

ละลาย Glucose ด้วยน้ำกลั่น จากนั้นทำการปรับปริมาตรให้ได้ 100 มิลลิลิตร โดยใช้ขวดปรับปริมาตรขนาด 100 มิลลิลิตร

สารละลาย 1% Barium chloride

Barium chloride 1 กรัม

Distilled water 100 มิลลิลิตร

นำส่วนผสมทั้งสองละลายให้เข้ากัน

สารละลาย 1% Sulfuric acid

C_1 แทนความเข้มข้นของ Sulfuric acid คือ 98%

C_2 แทนความเข้มข้นของ Sulfuric acid ที่ต้องการ คือ 1%

V_1 คือ ปริมาตรที่ต้องการหา

V_2 คือ ปริมาตรของสารละลายที่ต้องการเตรียม คือ 100 มิลลิลิตร

วิธีคำนวณ

ต้องการเตรียมสารละลาย 1% sulfuric acid ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

$$98 \times V_1 = 1 \times 100$$

$$V_1 = 1.02 \text{ มิลลิลิตร}$$

ดังนั้น ใช้ sulfuric acid 1.02 มิลลิลิตร และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 100

มิลลิลิตร

Crystal violet stain

Crystal violet 0.5 กรัม

Distilled water 100 มิลลิลิตร

Decolorizer

95% Ethanol 250 มิลลิลิตร

Acetone 250 มิลลิลิตร

Gram iodine solution

Iodine	1.0 กรัม
Potassium iodine	2.0 กรัม
Distilled water	300 มิลลิลิตร

Safranin O solution

Safranin O	2.5 กรัม
95 % Ethanol	100 มิลลิลิตร
Distilled water	400 มิลลิลิตร

การเตรียมสารละลายมาตรฐาน McFarland

ตารางที่ 13 การเตรียมสารละลายมาตรฐาน McFarland

McFarland number	1% Barium chloride (มิลลิลิตร)	1% sulfuric acid (มิลลิลิตร)	ปริมาณเซลล์โดยเฉลี่ย ($\times 10^6$ /มิลลิลิตร)
0.5	0.05	9.95	150
1	0.1	9.9	300
2	0.2	9.8	600
3	0.3	9.7	900
4	0.4	9.6	1200
5	0.5	9.5	1500
6	0.6	9.4	1800
7	0.7	9.3	2100
8	0.8	9.2	2400
9	0.9	9.1	2700
10	1.0	9.0	3000

การเตรียม Acetate Buffer

สารละลาย A : 0.2 M Acetic acid (11.55 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.2 M Sodium acetate (27.20 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

ตารางที่ 14 การเตรียม Acetate buffer

pH	สารละลาย A	สารละลาย B
3.6	46.3	3.7
3.8	44.0	6.0
4.0	41.	9.0
4.2	36.8	13.2
4.4	30.5	19.5
4.6	25.5	24.5
4.8	20.0	30.0
5.0	14.8	35.2
5.2	14.5	39.5
5.4	8.8	41.2
5.6	4.8	45.2

หมายเหตุ เตรียมบัฟเฟอร์โดยการผสมสารละลาย A และ B ตามค่าความเป็น กรด-ด่าง ที่ต้องการ

การเตรียม Phosphate buffer

สารละลาย A : 0.05 M Sodium phosphate (7.80 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

สารละลาย B : 0.05 M Monobasic sodium phosphate (8.90 กรัม เติมน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร)

ตารางที่ 15 การเตรียม Phosphate buffer

pH	สารละลาย A	สารละลาย B
5.8	4.00	46.00
6.0	6.15	43.85
6.2	9.25	40.75
6.4	13.25	36.75
6.6	18.75	31.25
6.8	24.50	25.50
7.0	30.50	19.50
7.2	36.50	14.00
7.4	40.50	9.50
7.6	43.50	6.50
7.8	45.75	4.25
8.0	47.35	2.65

หมายเหตุ เตรียมบัฟเฟอร์โดยการผสมสารละลาย A และ B ตามค่าความเป็น กรด-ด่าง ที่ต้องการ

ภาคผนวก ค

การวิเคราะห์

วิธีการวิเคราะห์ Reducing sugar ด้วยวิธี DNS (Miller,1959)

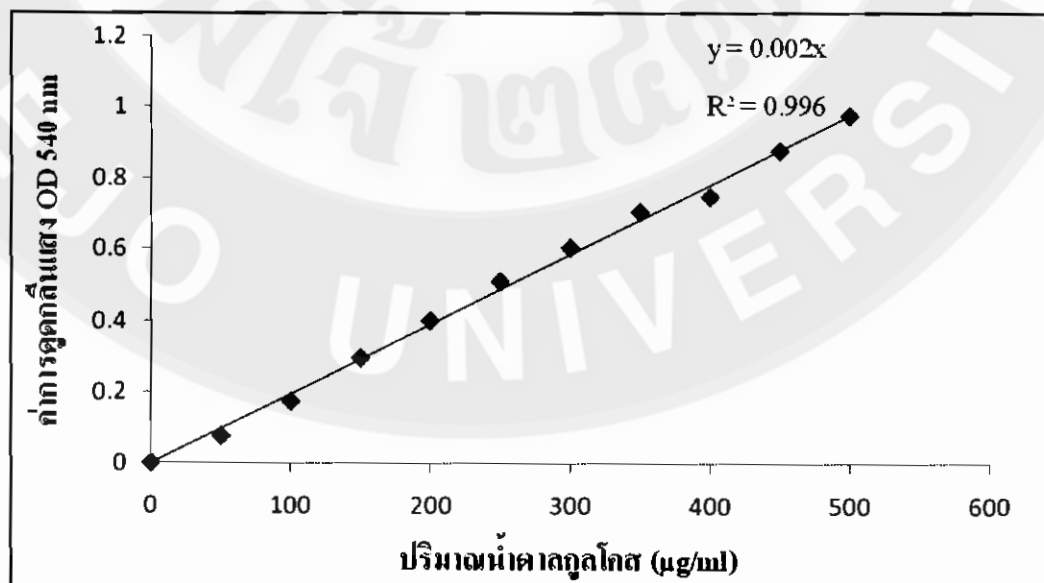
1. ดูดสารละลายตัวอย่าง ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ในหลอดทดลอง
2. เติมสารละลาย DNS 500 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที (ใช้ลูกแก้วปิดปากหลอด)
3. ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร
4. วัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ใช้หลอดที่ 1 เป็น blank (ใช้น้ำกลั่นแทนตัวอย่าง ทำปฏิกิริยาเดียวกับตัวอย่าง)
5. นำค่าดูดกลืนแสงไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคส ด้วยวิธี DNS method

1. ดูดสารละลายน้ำตาลกลูโคส น้ำกลั่น และ DNS โดยใช้ปริมาณตามตารางที่ 15
2. นำไปต้มในน้ำเดือด 15 นาที (ใช้ลูกแก้วปิดปากหลอด)
3. ทิ้งไว้ให้เย็น จากนั้นเติมน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร โดยใช้หลอดที่ 1 เป็น blank
5. นำค่าดูดกลืนแสงที่ได้สร้างกราฟมาตรฐานซึ่งได้ผลดังภาพที่

ตารางที่ 16 ความเข้มข้นของสารละลายกลูโคสในการทำกราฟมาตรฐาน

หลอดที่	น้ำตาลกลูโคส (μl)	น้ำกลั่น (μl)	DNS (μl)	ค่า Abs (540 nm)
1	0	500	500	0
2	50	450	500	0.076
3	100	400	500	0.174
4	150	350	500	0.296
5	200	300	500	0.400
6	250	250	500	0.510
7	300	200	500	0.604
8	350	150	500	0.705
9	400	100	500	0.748
10	450	50	500	0.877
11	500	0	500	0.975



ภาพที่ 14 กราฟมาตรฐานสารละลายน้ำตาลกลูโคสโดยวิธีการ Dinitrosalicylic acid (DNS)

ภาคผนวก ง

การคำนวณ

การหาปริมาณกรดแลกติกโดยการไทเทรต

1. ปิเปตอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 มิลลิตร หยดฟีนอล์ฟทาเลอิน 1-3 หยด ไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ (NaOH) ความเข้มข้น 0.1 N จนกว่าจะเปลี่ยนเป็นสีชมพู(ทำ 3 ซ้ำ) บันทึกปริมาตรโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้ในการไทเทรต

2. คำนวณค่าปริมาณกรดแลกติกตามสมการดังนี้

$$[\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}] = \frac{0.1 \text{ N NaOH} \times \text{ปริมาณ NaOH ที่ใช้ไป (ml)}}{\text{ปริมาณของตัวสารกรดที่ใช้ (ml)}}$$

สมการคำนวณหาความเข้มข้นของกรดแลกติก (g/l)

$$[\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}] \text{ (g/l)} = \frac{[\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}]}{1000 \text{ ml}} \times 90 \text{ g/mole } [\text{CH}_3\text{CHOHCOOH}]$$