โครงการ
การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจ

ชื่อนิสิต นางสาวพุฒิตา เสือยงค์ รหัสประจำตัว 5932339323

ภาควิชา จุลชีววิทยา

ปีการศึกษา 2562

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

เรื่อง

การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจ

โดย

นางสาวพุฒิตา เสือยงค์

เลขประจำตัว 5932339323

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

โครงการนี้เป็นส่วนหนึ่งของหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ประจำปีการศึกษา 2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อโครงงาน	การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจ
โดย	นางสาวพุฒิตา เสือยงค์ รหัสนิสิต 5932339323
อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา
ปีการศึกษา	2562

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับโครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาบัณฑิต ในรายวิชา 2312499 โครงงานวิทยาศาสตร์

.... หัวหน้าภาควิชาจุลชีววิทยา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กอบชัย ภัทรกุลวณิชย์)

คณะกรรมการสอบโครงงาน

.... อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงาน
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา)

.... กรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. อัญชริดา สวารชร)

.... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. นราพร สมบูรณ์นะ)

.... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. ธัญนุช เกรียงไกรพิพัฒน์)

ชื่อโครงการ การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจ

นิสิตผู้ทำโครงการ นางสาวพุฒิตา เสือยงค์ รหัสประจำตัว 5932339323

อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา

ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นหาแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกที่มีความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ โดยงานวิจัยนี้ใช้ตัวอย่างในการเพื่อการคัดเลือกจำนวน 27 ตัวอย่าง มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็ง MRS+$CaCO_3$ พบว่ามีเชื้อเจริญทั้งหมด 140 ไอโซเลต จากนั้นนำมาคัดเลือกต่อโดยศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและการทดสอบทางชีวเคมี พบว่ามีไอโซเลตที่เป็นแกรมบวก และให้ผลทดสอบแคทาเลสเป็นลบทั้งหมด 102 ไอโซเลต นำทั้ง 102 ไอโซเลตมาทดสอบความสามารถในการทนอุณภูมิสูงที่ 45 และ 50 องศาเซลเซียส พบว่าที่ 45 องศาเซลเซียส มีไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ จำนวน 45 ไอโซเลต ส่วนที่ 50 องศาเซลเซียสมีเพียง NH6-03 เท่านั้นที่สามารถเจริญได้ จากนั้นนำทั้ง 45 ไอโซเลต และเชื้อเปรียบเทียบ (*Lactobacillus casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3) ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส มาทดสอบความทนกรดต่ำ โดยที่ค่าความเป็นกรด-เบส 3 พบว่ามี 22 ไอโซเลต AN2 และ AN3 ที่มีจำนวนโคโลนีมากจนไม่สามารถนับได้ในทุกระดับการเจือจางและจากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดรวมทั้งหมดด้วยวิธีการไทเทรต พบว่า ไอโซเลตที่มีปริมาณกรดรวมมากที่สุดคือ ไอโซเลตที่คัดแยกจาก ตัวอย่างไซเลจ (15SS-02) วัดได้ 270 mM ไอโซเลตที่มีความสามารถในการทนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (NH6-03) วัดได้ 180 mM เชื้อเปรียบเทียบ AN2 และ AN3 วัดได้ 250 และ 260 mM ตามลำดับ งานวิจัยนี้ทำให้ทราบถึงคุณสมบัติเบื้องต้นของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่จะนำไปใช้ในการเพิ่มประสิทธิภาพการหมักแก่พืชหมักชนิดต่าง ๆ โดยงานวิจัยนี้ได้เลือกไอโซเลตที่จะนำไปทดสอบต่อไป คือ 0.5SML-01, 0.5SML-03, 0.5SML-07, 10SSL-01, 10SS-04, NH3-07, NH3-08, FG-01, 15SS-02 และ NH6-03

Project: Isolating lactic acid bacteria strain to enhance the fermentation quality of silage

Student: Miss Phutthita Seauyong ID 5932316923

Advisor: Assist. Prof. Dr. Supat Chareonpornwattana

Department of Microbiology, Faculty of Science, Chulalongkorn University

---

Abstract

This study aims to investigate efficiency of silage Napier grass fermentation which increased by lactic bacteria. 27 samples were used and cultured in MRS+$CaCO_3$ agar, the results found that 140 isolates of lactic bacteria were grown. Investigation of lactic bacteria by their morphologies and biochemistry test, we found that 102 isolates were gram positive bacteria and negative catalase test. These 102 isolates were cultured in 45°C and 50°C, 45 isolates could grow at 45°C and only NH6-03 could grow at 50°C. Then, 45 isolates and control bacteria such as *Lactobacillus casei* AN2 and *L. paracasei* AN3 which could grow at both 45°C and 50°C were tested low-acid resistance (pH 3), found that amount of colony of 22 isolates AN2 and AN3 are countless in every dilution. Amount of total acid which analyzed by titration, found that the most amount of acid which came from lactic bacteria isolated from silage sample (15SS-02) was 270 mM. Amount of acid of thermophile isolate which could grow at 50°C (NH6-03) was 180 mM compared with Amount of acid of control bacteria AN2 and AN3 were 250 and 260 mM respectively. This study informs basic characteristic of lactic bacteria for increasing fermentation efficiency, 0.5SML-01, 0.5SML-03, 0.5SML-07, 10SSL-01, 10SS-04, NH3-07, NH3-08, FG-01, 15SS-02 and NH6-03 isolates lead to be tested for future research.

กิตติกรรมประกาศ

การทำโครงการเรื่อง การคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักไซเลจในครั้งนี้ได้สำเร็จลงด้วยดี

ขอขอบคุณ ผู้ชวยศาตราจารย์ ดร. สุพัฒน์ เจริญพรวัฒนา อาจารย์ที่ปรึกษาโครงการที่ได้ให้คำปรึกษาโครงการที่ได้ให้คำปรึกษา แนะนำแนวทางในการทำงาน เอื้อเฟื้ออุปกรณ์ต่าง ๆ ในการปฏิบัติงาน พร้อมทั้งช่วยตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ

ขอขอบคุณ นางสาวณิชากร สโดอยู่ ที่ให้คำแนะนำ คำปรึกษาพร้อมทั้งให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดีขณะทำปฏิบัติการ

ขอขอบคุณ ครอบครัวที่คอยดูแล และสนับสนุนการศึกษา

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่อำนวยความสะดวกในการใช้เครื่องมือ วัสดุอุปกรณ์ต่าง ๆ ของภาควิชาสำหรับทำโครงการ

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และรุ่นพี่ทุกคน ที่คอยให้ความช่วยเหลือและคำปรึกษาที่ดี รวมทั้งคอยให้กำลังใจมาโดยตลอด

หวังเป็นอย่างยิ่งว่าการศึกษาและค้นคว้าการทำโครงการการคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักไซเลจหญ้าเนเปียร์ในครั้งนี้จะสามารถนำไปใช้ประโยชน์ในจริง

นางสาวพุฒิตา เสือยงค์

พฤษภาคม 2563

สารบัญ

	หน้า
หน้าอนุมัติโครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	1
วัตถุประสงค์การทดลอง	8
บทที่ 2 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	9
บทที่ 3 วิธีการทดลอง	11
บทที่ 4 ผลการทดลอง	13
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการทดลอง	22
เอกสารอ้างอิง	25
ภาคผนวก สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ	28

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่1: ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการทดสอบทางเคมีของแต่ละไอโซเลต	13
ตารางที่2:การเจริญของไอโซเลตต่าง ๆ AN2 และ AN3 ที่ความเป็นกรด-เบส 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5	19

บทที่ 1
บทนำ

การเลี้ยงโคนมในประเทศไทยมีประวัติความเป็นมาไม่ต่ำกว่าหนึ่งร้อยปี โดยมีการขยายตัวในระยะต้นๆ เป็นไปอย่างช้า ๆ จนต่อมาได้รับการสนับสนุนจากรัฐบาลให้มีการเลี้ยงโคนมเพื่อเพิ่มผลผลิตน้ำนมและผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพ มีองค์ประกอบทางโภชนาการ เป็นไปตามเกณฑ์ที่กำหนด ตรงกับความต้องการของตลาดและผู้บริโภค (กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2562) จึงทำให้ในปัจจุบันมีเกษตรกรหันมาเลี้ยงโคนมกันเป็นจำนวนมาก

การเลี้ยงสัตว์ให้มีประสิทธิภาพที่ดีนั้น นอกจากจะขึ้นอยู่กับพันธุ์ของสัตว์แล้ว ปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ อาหารสัตว์ เมื่อสัตว์ได้รับอาหารที่มีคุณภาพดีจะทำให้สัตว์กินอาหารได้มาก ไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติในระบบการย่อยอาหารและให้ผลผลิตสูง แต่ถ้าสัตว์ได้รับอาหารที่มีคุณภาพต่ำนอกจากจะให้ผลผลิตต่ำแล้ว ยังทำให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพ และเป็นการเพิ่มต้นทุนการผลิตอีกด้วย (จีระวัชร์ เข็มสวัสดิ์, 2547)

แต่ในปัจจุบันพืชอาหารสัตว์ไม่สามารถหามาใช้ได้อย่างเพียงพอ เนื่องจากภาวะเศรษฐกิจ ทำให้พื้นที่ที่ในการปลูกพืชอาหารสัตว์ลดลง รวมไปถึงเมื่อถึงฤดูแล้งจะมีความแห้งแล้งเป็นอย่างมาก นอกจากนี้ในบางช่วงเวลาเมื่อฤดูกาลไม่เหมาะสมต่อการเจริญของพืชอาหารสัตว์ จึงทำให้เกิดการขาดแคลนได้ ตรงกันข้ามในฤดูฝนบางพื้นที่ในประเทศดังนั้นจึงมีการเก็บถนอมพืชอาหารสัตว์ไว้ในรูปหญ้าหมักเพื่อทำให้มีอาหารสำหรับไว้ใช้เลี้ยงสัตว์ได้ตลอดทั้งปีและเป็นการเพิ่มคุณค่าทางอาหารแก่พืชอีกด้วย

พืชหมัก (ไซเลจ) หมายถึงการนำพืชอาหารสัตว์ที่มีความชื้นที่เหมาะสมมาเก็บรักษาไว้ในภาวะที่ไม่มีอากาศ เพื่อให้เกิดกระบวนการหมักโดยจุลินทรีย์ในธรรมชาติ โดยคุณค่าทางอาหารสัตว์มีการเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุดในระหว่างกระบวนการหมักจะอาศัยการทำงานของแบคทีเรียกรดแล็กติก (Lactic acid bacteria; LAB) ในภาวะไร้อากาศ โดย LAB ที่ใช้คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำได้ (water soluble carbohydrate; WSC) ที่มีในพืช ได้ผลผลิตเป็นกรดแล็กติกและกรดอื่นๆ ส่งผลให้ค่า pH ลดลง มีผลไปยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดอื่นที่ส่งผลต่อการเน่าเสียของพืชหมักได้ (Muck, 1991)

ในการทำพืชหมักให้มีคุณภาพที่ดีนั้น มีปัจจัยหลายอย่างที่เกี่ยวข้อง และมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงของส่วนประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพต่าง ๆ ของพืชสดเมื่อนำมาทำเป็นพืชหมัก ดังนั้น เพื่อให้พืชหมักมีคุณภาพที่ดี ควรคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. ชนิดพืชที่เหมาะสมในการทำหญ้าหมักควรเลือกพืชที่มีเปอร์เซ็นต์คาร์โบไฮเดรตที่ละลายน้ำ (WSC) สูงมากกว่า 6เปอร์เซ็นต์ เพื่อเป็นอาหารของจุลินทรีย์ที่เกิดในระหว่างกระบวนการหมักลักษณะของพืชควรมีลำต้นตันเพื่อให้มีช่องว่างของอากาศภายในน้อยที่สุด ถ้าพืชมีลำต้นกลวงควรทำให้ปล้องแตกและอัดให้แน่นเพื่อไล่อากาศออกให้มากที่สุด

2. อายุการเจริญของพืช พืชที่นำมาหมักไม่ควรแก่หรืออ่อนจนเกินไป ควรตัดในช่วงที่ให้ผลผลิตสูงพร้อมทั้งมีคุณค่าทางอาหารที่เพียงพอ โดยอายุของหญ้าที่จะตัดทำหญ้าหมักมักไม่แน่นอน แต่สามารถสังเกตได้จากเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้งที่ต้องไม่ต่ำกว่า 25 เปอร์เซ็นต์ และไม่สูงกว่า 35 เปอร์เซ็นต์

3. ความยาวของท่อนพืช เนื่องจากพืชหมักต้องในภาวะที่เป็นสุญญากาศ ดังนั้นการตัดหรือสับให้เป็นชิ้นสั้น ๆ จะช่วยให้อัดพืชได้แน่นขึ้น เพื่อเป็นการไล่อากาศออก และมีผลให้จุลินทรีย์สามารถใช้สารอาหารจากพืชเพื่อการเจริญเติบโตได้เร็วขึ้น ทำให้เกิดกรดได้เร็วขึ้น โดยควรตัดพืชให้มีความยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร หรือถ้าไม่สามารถตัดพืชให้สั้นได้ ให้ใช้วิธีตีข้อของต้นพืชให้แตก

4. ระดับความชื้น ความชื้นที่เหมาะสมของพืชต่อการหมักควรอยู่ระหว่าง 65-65 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้อัดแน่นได้ง่าย เป็นการไล่อากาศให้เหลือน้อยที่สุด หรือหมดไป แต่ถ้าพืชที่นำมาหมักมีความชื้นมากเกินไป จะส่งผลให้พืชหมักที่ได้มีลักษณะเป็นเมือก หรือเปรี้ยวจัด อีกทั้งน้ำหรือของเหลวที่ถูกผลิตออกมาในระหว่างการหมักจะมีมาก ทำให้เกิดการสูญเสียของสารหรือธาตุอาหารต่าง ๆของพืช ดังนั้นหากพืชมีความชื้นมากเกินไปควรลดความชื้นลงด้วยการตัดพืชแล้วผึ่งแดดประมาณ 2-3 ชั่วโมง หรืออาจใช้เมล็ดธัญพืชผสมลงไปเพื่อช่วยดูดซับความชื้น นอกจากนี้ยังยังเป็นการเพิ่มคุณค่าทางโภชนาและเพิ่มความน่ากินของพืชหมักอีกด้วย

5. การกำจัดอาการศออกจากถังหรือหลุมหมัก ในการทำพืชหมักมีหลักสำคัญอยู่ที่จะต้องทำให้เกิดกรดแล็กติกให้เร็วและมากที่สุด เพราะเป็นกรดที่รักษาคุณภาพของพืชหมัก เป็นตัวช่วยป้องกันไม่ให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นเจริญขยายจำนวนขึ้น ต้นพืชสดเมื่อตัดมาใหม่ ๆ เซลล์ของพืชยังมีชีวิตอยู่ จะหายใจโดยใช้ออกซิเจนที่หลงเหลืออยู่ระหว่างชิ้นพืชในถังหมัก และคายคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และความร้อนออกมา ถ้ายังมีอากาศอยู่ภายหลังเซลล์พืชตายแล้วพวกเชื้อราและยีสต์จะเจริญขึ้น ทำให้หญ้าหมักมีคุณภาพไม่ดี ด้วยเหตุนี้จึ้งต้องพยายามกำจัดอากาศออกจากถึงหมักให้มากที่สุด เพื่อที่เมื่อเซลล์พืชตาย เชื้อแบคทีเรียที่ไม่ต้องการออกซิเจนซึ่งเป็นพวกที่สร้างกรดอินทรีย์ต่าง ๆ เจริญขยายจำนวนช่วยให้พืชอยูในรูปของพืชหมักที่มีคุณภาพ ดังนั้นการอัดพืชให้แน่นและการปิดให้มิดชิดจึงมีความจำเป็นในการทำหญ้าหมักอยู่มาก

6. สารช่วยหมัก การใช้สารเสริมในกระบวนการหมัก เช่นกากน้ำตาล เมล็ดข้าวโพดบด และมันเส้นบด เป็นสารเสริมที่เป็นสารอาหารหรือแหล่งโภชนะเพื่อปรับปรุงคุณภาพทางโภชนะของพืชหมัก ส่วนการเติมยูเรียเพื่อช่วยเพิ่มปริมาณโปรตีนในพืชหมัก ซึ่งสารเสริมเหล่านี้แม้จะหาได้ง่ายในท้องถิ่นแต่บางครั้งราคาค่อนข้างผันแปรและขาดตลาด โดยเฉพาะปัจจุบันที่มีการนำวัตถุดิบอาหารสัตว์ไปผลิตเป็นแหล่งพลังงาน นอกจากสารเสริมที่เป็นแหล่งของสารอาหารหรือโภชนะแล้วยังมีสารเสริมที่กระตุ้นกระบวนการหมัก เช่น การเติมเชื้อแบคทีเรีย (bacterial inoculants)

พืชหมักที่ดีควรมีสีเขียวแกมเหลือง มีกลิ่นหอมเปรี้ยวอ่อนๆ คล้ายผลไม้ดอง เนื้อพืชหมักจะต้องไม่เป็นเมือก ไม่เละ ความชื้นควรอยู่ระหว่างร้อยละ 65-70 ค่าความเป็นกรด-เบส (pH) อยู่ระหว่าง 3.5 – 4.2 โดยมีกรดแล็กติกมากสุด กรดอะซีติกเป็นส่วนน้อย และไม่ควรมีกรดบิวทิริกหรือมีให้น้อยที่สุด (เกียรติศักดิ์ และคณะ, 2544) พืชหมักที่คุณภาพต่ำจะพบการปนเปื้อนด้วยจุลินทรีย์และสารพิษมากมายที่ไม่พึงประสงค์ เช่น ยีสต์ รา สารพิษจากรา รวมไปถึงแบคทีเรียก่อโรค เช่น *Listeria*และ *Clostridium sp.*เป็นต้น (Wilkinson, 1999)

รูปแบบการทำพืชหมัก

การทำพืชหมักมีรูปแบบการหมัก หรือภาชนะที่บรรจุต่าง ๆ ดังนี้

1. แบบราง (Trench or Horizontal silo) เป็นการขุดรางลึกลงในดิน พื้นเป็นดินหรือเทคอนกรีตให้มีความลาดเทเล็กน้อย เพื่อระบายของเหลวออกได้ง่าย หลุมหมักแบบรางนิยมใช้ทั่วไป เพราะสามารถทำได้โดยไม่ต้องลงทุนมาก และมีประสิทธิภาพในการเก็บสูง อาจจะมีการสูญเสียของพืชหมักเพียง 5 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น

2. แบบกำแพงคอนกรีต (Bunker silo) มีลักษณะเป็นกำแพงตั้งบนดิน อาจทำเป็นกำแพงคอนกรีต หรือนำดินมาทำเป็นคันบ่อ เหมาะกับบริเวณที่มีน้ำใต้ดินสูง ขุดหลุมไม่ได้ หรือระบายน้ำได้ไม่ดี

3. แบบหอคอย (Tower silo) มีลักษณะเป็นหอคอยสูงทำด้วยคอนกรีต หรือโลหะ ทำให้มีค่าใช้จ่ายที่สูง และการบรรจุพืชลงในไซโลแบบนี้ทำได้ยาก จึงไม่ค่อยเป็นที่นิยมมากนัก แม้วิธีการหมักในรูปแบบนี้จะมีการสูญเสียผิวหน้าของพืชหมักน้อยก็ตาม

4. แบบบ่อ (Pit silo) มีลักษณะเป็นหลุมเล็ก ไม่ลึก แต่ไม่เหมาะสำหรับบริเวณที่มีน้ำใต้ดินสูง

5. แบบถุง (Plastic bag) เป็นถุงที่ทำจากพลาสติกถ้าเป็นถุงขนาดใหญ่ต้องสูบอากาศออกภายหลังจากบรรจุพืชเต็มแล้ว รูปแบบนี้สะดวกในการปฏิบัติและนำไปเลี้ยงสัตว์ แต่ควรใช้ถุงพลาสติก 2 ชั้นหรือใช้ถุงกระสอบสวมทับด้านนอกเพื่อป้องกันการฉีกขาด

6. แบบม้วนก้อน (Bale or Wrapping) เป็นการทำพืชหมักโดยใช้เครื่องอัดหญ้าเป็นม้วนก้อนและพันด้วยแถบพลาสติกรอบก้อนพืชให้มีความประมาณ 4-6 ชั้น การทำพืชหมักโดยวิธีนี้สามารถทำได้ 2 ขนาด ตามน้ำหนัก คือขนาดเล็ก โดยมีน้ำหนักประมาณก้อนละ 40 กิโลกรัม ส่วนขนาดใหญ่มีน้ำหนักไม่แน่นอน ขึ้นกับขนาดของพลาสติกที่ใช้ และพบว่าการทำห่อขนาดใหญ่จะมีต้นทุนค่าพลาสติกที่ถูกกว่า อย่างไรก็ดีการทำในรูปแบบนี้ต้องใช้เครื่องมือซึ่งมีต้นทุนสูง

7. แบบกองพื้น (Stack silo) พืชหมักรูปแบบนี้ทำได้ง่ายโดยกองพืชอาหารสัตว์ไว้บนดินแล้วอัดให้แน่นจากนั้นคลุมด้วยพลาสติก แต่วิธีนี้จะทำให้พืชหมักมีการสูญเสียสูง (กรมปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2547)

การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในกระบวนการหมักพืชหมัก

กระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระหว่างการหมัก พบว่ามีกระบวนการที่เกี่ยวข้อง 2 ประการคือ กระบวนการที่ต้องใช้ออกซิเจนและกระบวนการที่ไม่ต้องใช้ออกซิเจน ซึ่งกระบวนการเหล่านี้เกิดขึ้นมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับการทำงานของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ ปริมาณอากาศที่ยังหลงเหลืออยู่ภายหลังการนำพืชอาหารสัตว์เข้าหลุมหมักหรือภาชนะบรรจุและองค์ประกอบต่าง ๆภายในพืชอาหารสัตว์ที่นำมาทำเป็นพืชหมัก เช่น ปริมาณน้ำตาล ความชื้น และแร่ธาตุอาหาร (สายัณห์, 2522) โดย Oude Elferinkและคณะ (2000) สรุปว่ากระบวนการหมักพืชหมักสามารถแบ่งออกเป็น 4ระยะ คือ

1. Aerobic phase ปกติจะเกิดขึ้น 2-3 ชั่วโมงแรกโดยหลังจากที่ทำการอัดพืชหมักลงในถังหมักแล้ว ออกซิเจนที่เหลืออยู่ภายในถังหมักจะถูกเซลล์ของพืชที่มีชีวิตอยู่ใช้ในกระบวนการหายใจ ในขณะที่จุลินทรีย์ที่ใช้ออกซิเจน เช่น ยีสต์(yeast) และ Enterobacteria จะเปลี่ยนคาร์โบไฮเดรตเป็นคาร์บอนไดออกไซด์ น้ำ และความร้อน (สายัณห์, 2547) นอกจากนี้เอนไซม์ในพืช เช่น โปรติเอส (proteases) และคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) จะทำงานในช่วงนี้ด้วย โดย pH ต้องอยู่ในช่วง 6.5-6.0

2. Fermentation phase ระยะนี้จะเริ่มขึ้นเมื่อออกซิเจนภายในถังหมักถูกใช้จนหมดหรืออยู่ในภาวะไร้ออกซิเจน (anaerobic) โดยเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องหลายวันและหลายสัปดาห์โดยขึ้นอยู่กับสมบัติของพืชที่นำมาหมักและภาวะของถังหมัก หากกระบวนการหมักเกิดสมบูรณ์จุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลคติกจะเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้นทำให้เกิดการผลิตกรดแลคติคและกรดอื่นๆ ส่งผลทำให้ความเป็นกรดเบสลดลงอยู่ในช่วง 3.8-5.0

3. Stable phase ระยะนี้ไม่มีปฏิกิริยาใดเกิดขึ้น โดยจุลินทรีย์ที่อยู่ในระยะ fermentation phase จะลดจำนวนลงอย่างช้า ๆ ในขณะที่จุลินทรีย์ที่ทนกรดจะอยู่รอด การทำงานของเอนไซม์โปรตีเอสและจุลินทรีย์บางชนิด เช่น *Lactobacillus buchneri*จะลดลง

4. Aerobic spoilage phase เมื่อพืชหมักสัมผัสกับอากาศระหว่างที่นำออกมาจากถังหมักทำให้เกิดกระบวนการเน่าเสีย เนื่องมาจากการย่อยสลายกรดอินทรีย์โดยยีสต์ซึ่งบางครั้งจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดอะซิติกทำ-ให้ความเป็นกรด-เบสสูงขึ้น และการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิจากกิจกรรมของจุลินทรีย์ที่ต้องการออกซิเจน เช่น เชื้อรา และ Enterobacteria

จุลินทรีย์ในพืชหมัก

1. แบคทีเรียกรดแล็กติก

แบคทีเรียกรดแล็กติกมีความสำคัญมากทางด้านอุตสาหกรรมอาหาร ไม่ว่าจะเป็นอาหารคน หรือสัตว์ โดยแบคทีเรียกลุ่มนี้เป็นแบคทีเรียแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่สร้างเอนไซม์แคทาเลส (catalase) แต่บางชนิดอาจมีเอนไซม์แคทาเลสเทียม (pseudocatalase)ไม่มีไซโทโครม (cytochrome) ทนต่อภาวะที่มีอากาศ (aerotolerant) ทนต่อความเป็นกรดและสามารถผลิตกรดแล็กติกเป็นผลิตภัณฑ์หลักโดยกระบวนการหมักน้ำตาล โดยทั่วไปแบคทีเรียกรดแล็กติกอาศัยอยู่ในบริเวณที่มีสารอาหารที่อุดมสมบูรณ์ เช่น นม เนื้อ และผัก เป็นต้น แต่บางชนิดเป็นแบคทีเรียประจำถิ่น (normal flora) อาศัยอยู่ปาก ลำไส้ และช่องคลอดของมนุษย์และสัตว์ ลักษณะเด่นที่มีความสำคัญมากที่สุดของแบคทีเรียกรดแล็กติกคือการไม่สังเคราะห์กลุ่มพอร์ไฟริน (porphyrin group) เช่น ฮีม (heme) จึงทำให้แบคทีเรียกรดแล็กติกขาดเอนไซม์แคทาเลสและไซโทโครม ในภาวะการเจริญที่มีความเข้มข้นของน้ำตาลต่ำสามารถทนต่อภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบส (pH) ต่ำกว่า 5สุ หรือที่อุณหภูมิสูงกว่า 37-40 องศาเซลเซียส รวมทั้งต้องการสารประกอบไนโตรเจนเพื่อใช้เป็นแหล่งของกรดอะมิโนและวิตามินเพื่อใช้ในการเจริญและการสร้างกรดอินทรีย์(Wolf และคณะ, 1991)

กลุ่มของแบคทีเรียกรดแล็กติกสามารถแบ่งออกเป็น 4 สกุล (Genus) ได้แก่ *Lactobacillus, Leuconostoc, Pediococcus*และ *Streptococcus*โดยสมบัติทางสรีรวิทยาและชีวเคมีของแบคทีเรียกรดแล็กติกทั้ง 4 สกุล และได้มีการนำวิธีการตรวจสอบระดับสารโมเลกุลขนาดใหญ่ (Macromolecule) ภายในเซลล์เพื่อนำมาพิจารณาถึงความสัมพันธ์และลักษณะเฉพาะทางพันธุกรรมโดยเฉพาะกรดนิวคลีอิก ซึ่งใช้ในการจัดจำแนกแบคทีเรียได้ถึงระดับสปีชีส์และสกุลโดยใช้เทคนิคขั้นสูงทางพันธุศาสตร์ เช่นการพิจารณาความเหมือนกันของ DNA (DNA-DNA homology) ที่ใช้จำแนกได้ในระดับสปีชีส์และสกุล การอาศัยความแตกต่างของลำดับเบสของ RNA ในไรโบโซม (rRNA) การเปรียบเทียบลักษณะดังกล่าวข้างต้นมีความแม่นยำมากในการจัดจำแนกและใช้ในการศึกษาถึงความสัมพันธ์กันของแบคทีเรียชนิดต่างๆ ทำให้สามารถจัดแบ่งกลุ่มแบคทีเรียกรดแล็กติกเป็นสกุลต่างๆ ดังนี้ *Aerococcus, Alloiococcus, Bifidobacterium,Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus,Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus*และ*Weissella*(Datta R และ Henry M, 2006)

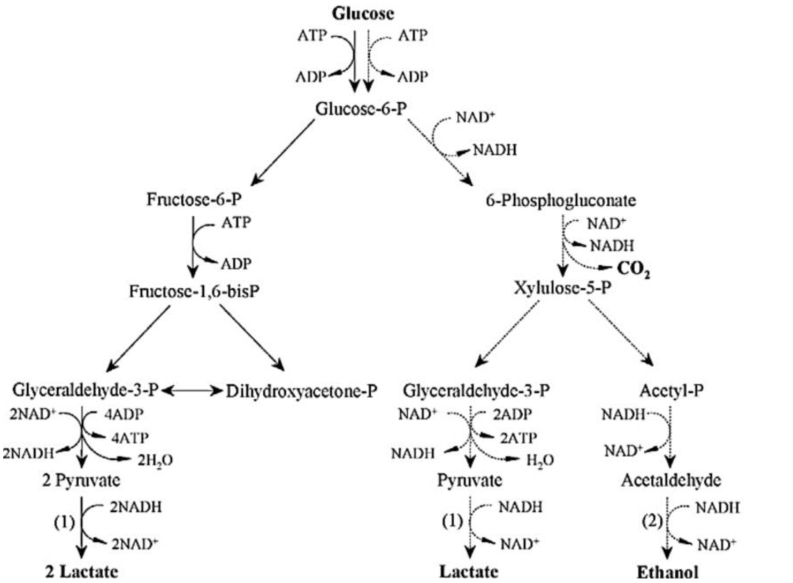
และเมื่อแบ่งตามกระบวนการและผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมัก สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มได้แก่

1. Homofermentative lactic acid bacteriaสามารถหมักน้ำตาลกลูโคส หรือน้ำตาลที่มีคาร์บอน 6 อะตอม ผ่านวิถีไกลโคลิซิส (glycolysis หรือ Embden-Mayerhof-parnas pathway; EMP pathway) โดยมีกระบวนการหมักเป็นแบบ Homofermentationซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็นกรดแล็กติกเป็นส่วนใหญ่ กลไกการเกิดกรดแล็กติก คือ ในขั้นตอนแรกจะเกิดการเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นกลูโคส-6-ฟอสเฟตและ ฟรุกโทส-6-ฟอสเฟตและ ฟรุกโทส-6-ฟอสเฟตจากนั้นถูกเปลี่ยนเป็น ไดไฮดรอกซี-อะซีโตน-ฟอสเฟตและ กลีเซอราล-3-ฟอสเฟตซึ่งเป็นสารประกอบคาร์บอน 3 อะตอม ด้วยเอนไซม์ lactatedehydrogenaseจากนั้นจะเปลี่ยนเป็นกรดไพรูวิกด้วยวิถีไกลโคลิซิสแล้วจึงเปลี่ยนกรดไพรูวิกเป็นกรดแล็กติก 85-95 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 1) จาก

กระบวนการน้ำตาลกลูโคสเป็นกรดแล็กติกจะได้พลังงาน ATP 2 โมเลกุลต่อกลูโคส 1 โมเลกุล ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแล็กติกในกลุ่มนี้ได้แก่ *Enterococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*,*Tetragenococcus*, *Vagococcus*และบางกลุ่มของ *Lactobacillus*เช่น *Lactobacillus plantarum*เป็นต้น (สุพรรณิการ์, 2548)

2. Heterofermentative lactic acid bacteria สามารถหมักน้ำตาลกลูโคสและน้ำตาลชนิดอื่นผ่านวิถีฟอสฟอคีโทเลส (PK pathway หรือ 6-phosphogluconatepathway; 6-PG pathway)ซึ่งจะมีกระบวนการหมักเป็นแบบ Heterofermentationโดยเป็นกระบวนการหมักที่เกิดกรดแล็กติกได้เพียง 50 เปอร์เซ็นต์เท่านั้น ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายหลายชนิด เช่นกรดแล็กติก กรดอะซีติก กรดฟอร์มิก เอทานอลอะซีเทตกลีเซอรอล และคาร์บอนไดออกไซด์ (ภาพที่ 1) เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้ไม่มีเอนไซม์ aldolase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในวิถี EMP ดังนั้นจึงเกิดการหมักผ่านวิถีฟอสฟอกลูโคเนต โดย กลูโคส-6-ฟอสเฟตจะถูกออกซิไดซ์เป็น 6-ฟอสฟอ-กลูโคเนตจากนั้นจะเกิดปฏิกิริยาดีคาร์บอกซิเลชันได้เพนโทส-ฟอสเฟตกับแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ แล้ว เพนโทส-ฟอสเฟตจะแตกตัวโดยเอนไซม์ ฟอสฟอคีโทเลสเป็น trihose-ฟอสเฟตซึ่งจะเปลี่ยนเป็นแล็กเทต และอะเซทิลจะเปลี่ยนเป็นเอทานอล ตัวอย่างแบคทีเรียกรดแล็กติกในกลุ่มนี้ได้แก่*Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Weissella*และบางกลุ่มของ *Lactobacillus*เช่น *Lactobacilluscasei*(สุพรรณิการ์, 2548)

นอกจากนี้พบว่าแบคทีเรียผลิตกรดแล็กกลุ่ม homofermentative บางชนิดสามารถแสดงผลิตภัณฑ์สุดท้ายเหมือนแบคทีเรียกรดแล็กติกกลุ่ม heterofermentative เช่น กรดฟอร์มิก กรดอะซีติก และเอทานอล (Coganและคณะ, 1989) โดยผลิตภัณฑ์เหล่านี้จะผลิตขึ้นเมื่อมีระดับของ ฟรุกโทส-1,6-ไดฟอสเฟต ภายในเซลล์ต่ำ โดยเฉพาะเมื่อเจริญอยู่ในภาวะที่มีน้ำตาลกลูโคสปริมาณจำกัด (Thomas และคณะ, 1979) โดยเรียกแบคทีเรียกลุ่มนี้ว่า Facultative homofermentation (De VuystและVandamme, 1994)



ภาพที่1 การหมักกรดแล็กติกจากกลูโคสแบบ Homolactic fermentation ผ่านกระบวนการไกลโคลิซิส (เส้นทึบ) และการหมักกรดแล็กติกจากกลูโคสแบบ Heterolactic fermentation ผ่านวิถี ฟอสฟอคีโทเลส (เส้นประ)

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแล็กติกโดยจุลินทรีย์

ในการผลิตกรดแล็กติกเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุดจะต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ดังนี้

1. สายพันธุ์ของจุลินทรีย์

สายพันธุ์ที่ให้ความเข้มข้นของกรดแล็กติกและผลผลิตที่สูงมักจะแสดงถึงความสามารถในการสร้างผลผลิตต่อหน่วยเวลาที่สูงด้วย สายพันธุ์ที่ใช้ในการลิตกรดแล็กติกต้องสามารถสร้างกรดแล็กติกได้มาก มีความสม่ำเสมอในการผลิต มีความคงตัวของสายพันธุ์ (Hofvendah และคณะ, 2009)

2. แหล่งของคาร์บอน

ซับสเตรตหลาย ๆ ชนิดถูกใช้ในการผลิตกรดแล็กติกโดยเชื้อแบคทีเรียกรดแล็กติก ผลิตภัณฑ์ที่มีความบริสุทธิ์จะได้การใช้แหล่งน้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์ในการหมัก อย่างไรก็ตามแหล่งน้ำตาลที่มีความบริสุทธิ์นั้นมีราคาแพงจึงไม่คุ้มทุนทำให้มีการใช้ผลผลิตที่เป็นของเหลือทิ้งจากการเกษตรและอุตสาหกรรมมาใช้ให้เกิดประโยชน์ เช่น กากน้ำตาล เวย์ เป็นต้น (Hofvendah และคณะ, 2009)

3. แหล่งของไนโตรเจน

ในองค์ประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อสำหรับการผลิตกรดแล็กติกนั้น จำเป็นต้องเติมสารแหล่งไนโตรเจน เช่น สารสกัดจากยีสต์ เพปโตน เป็นต้น การเติมสารแหล่งไนโตรเจนที่ความเข้มข้นสูงเพียงพอจะให้ผลที่ดีต่อการผลิตกรดแล็กติก อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร MRS ซึ่งมีทั้งสารสกัดจากยีสต์ เพปโตน และสารสกัดจากเนื้อ ดีกว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเพียงสารสกัดจากมอลท์ ดังนั้นจึงสะท้อนให้เห็นว่าแบคทีเรียกรดแล็กติกมีความต้องการสารอาหารที่ค่อนข้างซับซ้อน (Hofvendah และคณะ, 2009)

4. เกลืออนินทรีย์

เกลืออนินทรีย์หลายชนิดส่งผลต่อในกระบวนการหมักกรดแล็กติก เช่น แมงกานีส โดย Ohkouchi and Inoue (2005: 1561) ได้รายงานว่า แมงกานีสเป็นปัจจัยที่จำเป็นต่อกระบวนการหมักกรดแล็กติก โดยมีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของแล็กแทตดีไฮโดรจีเนสในแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Lactobacillus casei*(Hofvendah และคณะ, 2009)

5. ค่าความเป็นกรด-เบส

ถึงแม้แบคทีเรียกรดแล็กติกจะเจริญได้ที่ระดับค่าความเป็นกรด-เบส ในช่วงงที่ค่อนข้างกว้าง (4-7.5) แต่ค่าความเป็นกรด-เบสที่เหมาะสมโดยทั่ว ๆ ไปจะอยู่ในช่วงประมาณ 6-6.5 เนื่องจากแบคทีเรียกลุ่มนี้จะเมแทบอไลซ์น้ำตาลเป็นกรดแล็กติก ทำให้ค่าความเป็นกรด-เบสของอาหารลดลงอย่างรวดเร็ว จึงจำเป็นต้องคอยปรับค่าความเป็นกรด-เบสให้สูงขึ้น การเลี้ยงเชื้อในภาวะที่เป็นกรดนั้น นอกจากจะการเจริญจะช้าลงแล้ว ยังมีผลต่อการอยู่รอดของเชื้อขณะเก็บเมื่ออยู่ในภาวะที่มีกรดมาก ๆ เซลล์บางส่วนจะบาดเจ็บ และไม่สามารถดำเนินกิจกรรมการหมักได้ทันที(Hofvendah และคณะ, 2009)

6. อุณหภูมิ

การเลี้ยงจุลินทรีย์ใด ๆ ก็ตามเพื่อให้ได้ปริมาณมาก จำเป็นต้องควบคุมอุณหภูมิให้เหมาะสมกับเชื้อนั้น ๆ สำหรับแบคทีเรียกรดแล็กติกนั้นอุณหภูมิในการเจริญจะแตกต่างกันไปในแต่ละสกุล

2. Clostridia

เป็นแบคทีเรียแกรมบวก สร้างเอนโดสปอร์และสามารถเจริญภายใต้ภาวะไร้ออกซิเจน (Woolford, 1990; McDonald และคณะ, 1991) สามารถเคลื่อนที่ได้และมีรูปร่างแบบท่อน เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสประมาณ 7.0-7.4 แบคทีเรียกลุ่มนี้สามารถเปลี่ยนกรดแล็กติกและน้ำตาลให้เป็นกรดบิวทิริก นอกจากนี้ยังสามารถเปลี่ยนกรดอะมิโนให้เป็นเอมีน และแอมโมเนีย ทำให้พืชหมักมีกลิ่นเหม็น (Muck, 1991; Woolford, 1998) นอกจากนี้ Clostridia บางชนิดสามารถผลิตสารพิษได้ เช่น *Clostridium botulinum*สามารถผลิตสารพิษที่เรียกว่า บูโทลินัมทอกซิน (Botulinum toxin) ซึ่งเป็นสารพิษที่ออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทอย่างรุนแรง อีกทั้งบูโทลินัมทอกซินยังเป็นสาเหตุของโรคบูโทลิซึมซึ่งทำให้กล้ามเนื้อเป็นอัมพาตถึงตายได้ (Adams และ Moss, 2000) โดยทั่วไปจะพบ *Clostridium* ได้ในช่วงแรก ๆ ของการหมัก หลังจากนั้นแบคทีเรียพวกนี้จะถูกยับยั้งโดยปริมาณกรดและเมแทบอไลต์ที่แบคทีเรียผลลิตกรดแล็กติกสร้างขึ้น (Woolford, 1998)

3. Enterobacteria

เป็นแบคทีเรียที่สามารถใช้น้ำตาลเป็นแหล่งคาร์บอนในการเจริญและเปลี่ยนให้เป็นกรดอะซีติก เอทานอล กรดแล็กติก แก๊สไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยสามารถเจริญได้ทั้งในภาวะที่มีและไม่มีออกซิเจน รวมถึงสามารถย่อยกรดอะมิโนได้ (Jansson, 2005) เจริญได้ดีที่ค่าความเป็นกรด-เบสประมาณ 7.0-7.4

4. ราและยีสต์

สามารถเจริญได้ดีในภาวะที่มีออกซิเจน ดังนั้นเมื่อมีการเปิดถังหมักทำให้พืชหมักมีการสัมผัสกับอากาศแล้ว ราและยีสต์จะสามารถเจริญได้และส่งผลให้พืชหมักขาดความคงตัว (Mc Donald และ คณะ, 1991)

5. ชนิดอื่น ๆ

แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น Listeria monocytogenes ซึ่งก่อโรคในสัตว์ แต่จุลินทรีย์เหล่านี้ไม่สามารถเจริญได้ในภาวะที่มีค่าความเป็นกรด-เบสที่ต่ำกว่า 4.2 จากผลของแบคทีเรียกรดแล็กติก (McDonald และคณะ, 1991)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

งานวิจัยนี้มุ่งหมายคัดแยกและพิสูจน์เอกลักษณ์ของแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกที่มีประสิทธิภาพในการผลิตกรดแล็กติกสูงสุดเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการหมักไซเลจที่นำไปเป็นพืชอาหารแก่โคนม

บทที่ 2
อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งละเอียด
2. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
3. แผ่นสไลด์กล้องจุลทรรศน์
4. เครืองวัดค่าวามเป็นกรด-เบส(pH meter)
5. เครื่องนึ่งอบฆ่าเชื้อ (Autoclave)
6. ตู้อบฆ่าเชื้อ (Hot air oven)
7. ตู้บ่มเชื้อ 30 องศาเซลเซียส (Incubator)
8. อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ(Water bath)
9. ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow cabinet)
10. เครื่องเขย่าสารละลาย (Vortexmixer)
11. เครื่องตีบดตัวอย่าง (Stomacher)
12. ถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีบด (Stomacherbag)
13. เทอร์โมมิเตอร์
14. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 1000 ไมโครลิตร
15. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 100 ไมโครลิตร
16. ไมโครปิเปตต์ ขนาด 20 ไมโครลิตร
17. ทิป ขนาด 1000 ไมโครลิตร
18. ทิป ขนาด 100 ไมโครลิตร
19. ทิป ขนาด 10 ไมโครลิตร
20. หลอดทดลองขนาดต่าง ๆพร้อมฝาปิด
21. ขวดเก็บสาร ขนาด 500 มิลลิลิตร
22. ขวดรูปชมพู่ ขนาดต่าง ๆ
23. กระบอกตวง ขนาดต่าง ๆ
24. จานเพาะเชื้อพลาสติก
25. แท่งแก้วสามเหลี่ยม (Spreader)
26. ตะเกียงแอลกอฮอล์
27. น้ำกลั่น
28. จุกสำลี
29. เข็มเขี่ยเชื้อปลายกลม (Loop)

30. Candle jar
31. บิวเรตต์ (Burette)

สารเคมี

1. อาหารเลี้ยงเชื้อ MRS agar (de MAN, ROGOSA and SHARPE)
2. Agar
3. แคลเซียมคาร์บอเนต ($CaCO_3$)
4. สีคริสตัลไวโอเลต (Gram Crystal Violet)
5. สารละลายไอโอดีน (Gram Iodine)
6. อะซีโตนแอลกอฮอล์ (Gram Decolorized)
7. สีซาฟรานิน (Gram Safranin)
8. H_2O_2
9. NaOH 1 N
10. HCl 4 N
11. ฟีนอล์ฟทาลีน

บทที่ 3
วิธีการดำเนินการทดลอง

1. คัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติก

คัดแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างต่างๆที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียกรดแล็กติกโดยชั่งตัวอย่าง 10 กรัม นำมาละลายใน NaCl 0.85% 100 มิลลิลิตรในถุงพลาสติกปราศจากเชื้อสำหรับใช้ตีบด จากนั้นนำเข้าเครื่องตีบด แล้วนำมาเจือจางที่ความเข้มข้นต่างๆ ตามความเหมาะสมด้วยNaCl 0.85% เกลี่ยลงบนอาหารแข็ง deMan, Rogosa and Sharpe (MRS) + 0.3% $CaCO_3$ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในภาวะไร้ออกซิเจนใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2. คัดแยกเชื้อให้บริสุทธิ์

เลือกโคโลนีเดี่ยวที่มีลักษณะต่างกันและเกิดบริเวณใสรอบโคโลนีจากข้อที่ 1 มา streak ลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในภาวะไร้ออกซิเจนใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. ทดสอบทางสัณฐานวิทยาและทางชีวเคมี

3.1 สังเกตลักษณะโคโลนี

3.2 สังเกตลักษณะรูปร่าง และการติดสีด้วยวิธีย้อมแกรมโดยการส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.3 ทดสอบทางชีวเคมี เช่น ความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส (Catalase test)

3.3.1 เขี่ยโคโลนีเดี่ยวลงบนแผ่นสไลด์กล้องจุลทรรศน์ หยด 3% H_2O_2สังเกตการเกิดฟอง

4. คัดเลือกสายพันธุ์ที่มีความสามารถในหมักหญ้าเนเปียร์

4.1 ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง

4.1.1 เตรียมหัวเชื้อ ปริมาตร 10% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เหลว ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.1.2 ใช้หัวเชื้อ ปริมาตร 10% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เหลว ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง บ่มในอ่างควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการเจริญด้วยการหยดเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในภาวะไร้ออกซิเจนใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.2 ความสามารถในการทนกรด-เบส

4.2.1 เตรียมหัวเชื้อ ปริมาตร 10% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เหลว ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ปรับค่าความเป็นกรด-เบส 6.5 บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.2.2 ใช้หัวเชื้อ ปริมาตร 10% (v/v) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS เหลว ปริมาณ 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง ปรับค่าความเป็นกรด-เบส 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 ด้วย กรดไฮดรอคลอริก 4N และโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการเจริญด้วยการหยดเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ในภาวะไร้ออกซิเจนใน candle jar เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. การวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติก

5.1 วิเคราะห์หาปริมาณกรดรวมทั้งหมดโดยวิธีการไทเทรต

นำหัวเชื้อจากข้อ 4.2.2 ปรับค่าความเป็นกรด-เบส 6.5 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เติมฟีนอล์ฟทาลีน2-3 หยด และไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N

6. จำแนกแบคทีเรียด้วยการหาลำดับ 16s rDNA

พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) จากนั้นส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. คัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติก

การคัดแยกจุลินทรีย์ต่าง ๆ จากตัวอย่างที่คาดว่าจะมีแบคทีเรียกรดแล็กติก จำนวน 27 ตัวอย่าง พบการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารแข็ง MRS ทั้งหมด 140 ไอโซเลตและนำแต่ละไอโซเลตที่โคโลนีเกิดบริเวณใสมาศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาและทดสอบทางเคมีซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส ได้ผลดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการทดสอบทางเคมีของแต่ละไอโซเลต

ตัวอย่าง	รหัส	ลักษณะโคโลนี	แกรม	การทดสอบแคทาเลส
ไซเลจไม่ใส่สารช่วยหมัก	SN-01	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาว สีขาวเหลือง มีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	SN-02	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาว สีขาวครีม มีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	SN-03	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาว สีเหลือง มีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	+
	SN-04	กลม นูน ขอบหยักเล็กน้อย ผิวเรียบ ผิวด้าน สีขาวครีม วัดบริเวณใสรอบโคโลนีได้ 9 มิลลิเมตร	+	-
	SN-06	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาว สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดค่อนข้างเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	SN-07	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิวด้าน สีเหลืองครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
ไซเลจใส่กากถั่วเหลือง 10%	10SS-01	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวครีม เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	10SS-02	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	10SS-03	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดใหญ่ สีขาว เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	10SS-04	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวเหลือง เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
ไซเลจใส่กากถั่วเหลือง 15%	15SS-01	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็กมาก สีขาวครีมเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	15SS-02	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวครีม เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	15SS-03	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาวเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวครีมเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	15SS-05	กลม ผิวเรียบ ขอบหยัก ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวครีมวัดบริเวณใสรอบโคโลนีได้ 6.5 มิลลิเมตร	+	-
	15SS-06	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาวเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวครีม เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
ไซเลจใส่กากถั่วเหลืองและ LAB 10%	10SSL-01	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดใหญ่ สีขาวครีม เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	10SSL-02	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาวเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวครีม เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-

หมายเหตุ: + แกรมบวก, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นบวก

- แกรมลบ, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นลบ

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการทดสอบทางเคมีของแต่ละไอโซเลต

ตัวอย่าง	รหัส	ลักษณะโคโลนี	แกรม	การทดสอบแคทาเลส
ไซเลจใส่กากถั่วเหลืองและ LAB 15%	15SSL-01	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวด้านเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	15SSL-02	กลม แบน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวด้านเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวครีม เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	-
	15SSL-03	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาว เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	-
	15SSL-04	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	15SSL-05	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาว เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
ไซเลจใส่กากน้ำตาล 0.5%	0.5SM-02	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก สีขาวเหลือง เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	0.5SM-03	โคโลนีเยิ้ม แบน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว ขอบโคโลนีใสตรงกลางสีขาวครีมเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	0.5SM-05	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวเหลือง ผิววาวเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	0.5SM-06	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม ผิววาว โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	0.5SM-07	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม ผิววาว โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	-
ไซเลจใส่กากน้ำตาล 2%	2SM-02	โคโลนีเยิ้ม แบน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก ขอบโคโลนีใสตรงกลางสีขาวครีมเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
ไซเลจใส่กากน้ำตาลและLAB 0.5%	0.5SML-01	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	0.5SML-03	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	0.5SML-04	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	0.5SML-05	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว ผิวด้านเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	0.5SML-06	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว ผิวด้านเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	0.5SML-07	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวออกเหลือง ผิววาว โคโลนีมีขนาดค่อนข้างใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
ไซเลจใส่กากน้ำตาลและLAB 2%	2SML-01	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	2SML-03	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว ผิววาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
หญ้าจากบริษัทซันฟู้ด	SG-01	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม ผิวด้านเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	SG-02	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม ผิววาวเล็กน้อย โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	SG-03	กลม นูน ขอบหยัก ผิวขรุขระเล็กน้อย สีขาวครีม ผิวด้าน โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	+
	SG-04	นูน ขอบหยัก ผิวด้าน ขรุขระ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-

หมายเหตุ: + แกรมบวก, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นบวก

- แกรมลบ, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นลบ

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการทดสอบทางเคมีของแต่ละไอโซเลต

ตัวอย่าง	รหัส	ลักษณะโคโลนี	แกรม	การทดสอบแคทาเลส
หญ้าฟาร์ม	FG-01	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีมขุ่น ผิวมันวาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	FG-02	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีมขุ่น ผิวมันวาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	FG-03	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีเหลืองครีมขุ่น ผิวด้าน โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	FG-04	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม ผิวด้าน โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	+
	FG-05	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวอมชมพู ผิวด้าน โคโลนีมีขนาดใหญ่เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	+
วุ้นมะพร้าว	CJ-01	กลม แบน ผิวเรียบ ขอบเรียบ สีเหลืองใส เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	CJ-02	กลม แบน ผิวเรียบ ขอบเรียบ สีเหลืองใส เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
ปลาส้ม	PF-01	กลม นูน ผิววาว สีขาวเหลือง ขอบเรียบ ผิวเรียบ โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	PF-02	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย สีขาวขุ่น ขอบเรียบ ผิวเรียบ โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	PF-03	กลม แบน ผิววาว ขาวใสไม่มีสี ขอบเรียบ ผิวเรียบ โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	PF-04	กลม นูน ผิววาวเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	PF-05	กลม นูน ผิววาวเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	PF-06	กลม นูน ผิววาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	PF-07	กลม แบน ผิววาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีเหลืองใส โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
หมูยอ	WPS-02	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาว สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	WPS-03	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวด้าน สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	-
	WPS-04	รี เยิ้ม แบน ขอบเรียบ ผิวเรียบ โคโลนีมีขนาดเล็ก ผิวด้าน สีขาวขุ่น เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	WPS-06	กลม นูน เยิ้ม ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวด้าน สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
กิมจิ	KC-01	กลม นูน ผิววาวเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	KC-02	รี เยิ้ม แบน ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ ขอบเรียบ ผิวขรุขระเล็กน้อย เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	KC-04	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ วาวเล็กน้อย สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก	+	-
	KC-05	รี เยิ้ม แบน ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ ขอบเรียบ ผิวขรุขระเล็กน้อยเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	KC-06	กลม นูน ผิววาวเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	KC-07	กลม นูน ผิววาวเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	KC-08	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	-

หมายเหตุ: + แกรมบวก, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นบวก

- แกรมลบ, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นลบ

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการทดสอบทางเคมีของแต่ละไอโซเลต

ตัวอย่าง	รหัส	ลักษณะโคโลนี	แกรม	การทดสอบแคทาเลส
เต้าเจี้ยวขาว	FSB-01	กลม นูน ผิววาวเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีเหลืองใส โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	+
	FSB-02	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
เต้าหู้ญี่ปุ่น	PBJ-01	รี เยิ้ม แบน ขอบเรียบ ผิวเรียบ โคโลนีมีขนาดใหญ่ ผิววาว ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
ข้าวหมาก	FR-01	กลม แบน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	FR-02	กลม นูน ผิวด้าน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	+
ขนมจีน	RN-01	โคโลนีขนาดใหญ่ ผิวขรุขระ ขอบหยัก สีขาวครีม เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	+
	RN-02	กลม นูน ผิววาว ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	+
	RN-03	กลม นูน ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	+
	RN-04	กลม นูน ผิวด้าน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
ไส้กรอกอีสาน	SS-01	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาวเล็กน้อย สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	SS-02	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวด้าน สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	SS-03	เยิ้ม แบน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาว สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
แหนมเห็ด	NH1-01	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวมันวาว สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH1-02	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวมันวาวเล็กน้อย ขอบใสตรงกลางสีขาวขุ่น โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH1-03	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวมันวาวเล็กน้อย ขอบใสตรงกลางสีขาวขุ่น โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	-
	NH1-04	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวด้าน สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
แหนมก้อน	NH2-01	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวมันวาวเล็กน้อย สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH2-02	กลม แบน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวด้าน ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH2-03	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวมันวาว สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH2-04	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิววาวเล็กน้อย สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH2-05	กลม นูน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวด้าน สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH2-06	กลม แบน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH2-07	กลม นูน ผิววาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-

หมายเหตุ: + แกรมบวก, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นบวก

- แกรมลบ, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นลบ

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการทดสอบทางเคมีของแต่ละไอโซเลต

ตัวอย่าง	รหัส	ลักษณะโคโลนี	แกรม	การทดสอบแคทาเลส
แหนมเสียบไม้	NH3-01	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-02	แบน รี ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาวเล็กน้อย ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-03	แบน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาวเล็กน้อย ขอบเหลืองใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-04	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-05	กลม นูน ผิวด้าน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-06	กลม นูน ผิวด้าน ขอบหยัก ผิวขรุขระ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-07	กลม นูน ผิวด้าน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-08	กลม นูน ผิวด้าน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-09	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-10	แบน รี ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาวเล็กน้อย ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH3-11	กลม นูน ผิวด้าน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
แหนมถุง	NH4-01	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH4-02	กลม นูน ผิววาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH4-03	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH4-04	กลม นูน ผิวด้าน ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH4-05	กลม นูน ผิววาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH4-06	กลม นูน ผิววาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
แหนมแท่ง	NH5-01	กลม แบน ขอบหยัก ผิวขรุขระ ผิวด้านเล็กน้อย สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-02	กลม นูน ผิววาวเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	-	-
	NH5-03	กลม นูน ผิววาวเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-04	รี นูน ผิววาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-05	กลม นูน ขอบหยัก ผิวขรุขระ ผิวด้านเล็กน้อย สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-06	แบน รี ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาวเล็กน้อย ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-07	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาวเล็กน้อย สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-08	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิวด้านเล็กน้อย สีขาวขุ่น โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-09	กลม แบน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาวเล็กน้อย สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-10	กลม นูน ขอบเรียบ ผิวเรียบ ผิววาวเล็กน้อย สีขาวขุ่น โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-11	รี นูน ผิววาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-12	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็กเกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-

หมายเหตุ: + แกรมบวก, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นบวก

\- แกรมลบ, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นลบ

ตารางที่ 1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาและผลการทดสอบทางเคมีของแต่ละไอโซเลต

ตัวอย่าง	รหัส	ลักษณะโคโลนี	แกรม	การทดสอบแคทาเลส
แหนมแท่ง	NH5-13	กลม แบน ผิวเรียบ ขอบเรียบ ผิวด้าน ขอบใสตรงกลางสีขาวครีม โคโลนีมีขนาดใหญ่ เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH5-14	รี นูน ผิววาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
แหนม	NH6-01	กลม นูน ผิวด้านเล็กน้อย ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาวครีม โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH6-02	กลม นูน เยิ้ม ผิวด้านเล็กน้อย ขอบขรุขระ ผิวเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	+
	NH6-03	รี นูน เยิ้ม ผิววาวเล็กน้อย ขอบขรุขระ ผิวเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH6-04	กลม นูน ผิวมันวาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH6-05	กลม นูน ผิวมันวาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH6-06	กลม นูน ผิวมันวาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH6-07	กลม นูน ผิวมันวาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH6-08	กลม นูน เยิ้ม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-
	NH6-09	กลม นูน เยิ้ม ผิวมันวาว ขอบเรียบ ผิวเรียบ สีขาว โคโลนีมีขนาดเล็ก เกิดบริเวณใสทั่วทั้งเพลต	+	-

หมายเหตุ: + แกรมบวก, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นบวก

- แกรมลบ, ให้ผลการทดสอบแคทาเลสเป็นลบ

2. ทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง

เมื่อนำไอโซเลตที่เป็นแกรมบวก และไม่สามารถสร้างเอนไซม์เอนไซม์คาแทเลสได้ จำนวน 113 ไอโซเลต และเชื้อเปรียบเทียบ (*Lactobacillus casei* AN2 และ *L. paracasei* AN3) มาทดสอบความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูงที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสแล้วสังเกตการเจริญ พบว่ามีไอโซเลตที่สามารถเจริญได้จำนวน 45 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากตัวอย่างไซเลจ 20 ไอโซเลต (SN-01, SN-02, SN-04, 10SS-02, 10SS-04, 15SS-01, 15SS-02, 15SS-03, 10SSL-01, 15SSL-01, 15SSL-04, 15SSL-05, 2SM-02, 0.5SML-01, 0.5SML-03, 0.5SML-04, 0.5SML-05, 0.5SML-06, 0.5SML-07 และ 2SML-03), หญ้าจากบริษัทซันฟู้ด (SG-04), หญ้าฟาร์ม(FG-01), ปลาส้ม 4 ไอโซเลต (PF-02, PF-03, PF-04 และ PF-06), หมูยอ 2 ไอโซเลต (WPS-02 และ WPS-06), ข้าวหมาก (FR-01), ไส้กรอกอีสาน (SS-01), แหนมก้อน 2 ไอโซเลต (NH2-02 และ NH2-06), แหนมเสียบไม้ 4 ไอโซเลต (NH3-02, NH3-07, NH3-08 และ NH3-09), แหนมถุง (NH4-03), แหนมแท่ง 4 ไอโซเลต (NH5-01, NH5-03, NH5-04 และ NH5-014), แหนม 5 ไอโซเลต (NH6-01, NH6-03, NH6-08, NH6-09 และ NH6-010) AN2 และ AN3

3. ทดสอบความสามารถในการทนต่อความเป็นกรด

จากการนำทั้ง 45 ไอโซเลต AN2 และ AN3 ที่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียสมาทดสอบความทนกรดต่ำที่ค่าความเป็นกรด-เบส 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 แล้วตรวจสอบการเจริญด้วยเทคนิคดรอปเพลตที่ระดับความเจือจาง 10^{-1},10^{-2},10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} ได้ผลดังตารางที่ 2

ตารางที่2 การเจริญของไอโซเลตต่าง ๆ AN2 และ AN3 ที่ความเป็นกรด-เบส 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5

รหัสไอโซเลต	การเจริญ (cfu/ml)				
	3	3.5	4	4.5	5
SN-01	TNTC	ไม่มีการเจริญ	1 x10^{6}	TNTC	3.0 x10^{6}
SN-02	5.83x10^{6}	7.66x10^{7}	6.33 x10^{6}	6.67 x10^{6}	5 x10^{6}
SN-04	TNTC	2.13x10^{7}	2.53 x10^{7}	5.0 x10^{6}	1.1 x10^{8}
10SS-02	3.16x10^{6}	2.88 x10^{7}	1.52 x10^{8}	1.05 x10^{8}	7.93 x10^{8}
10SS-04	TNTC	ไม่มีการเจริญ	ไม่มีการเจริญ	ไม่มีการเจริญ	1.67 x10^{6}
15SS-01	TNTC	4.90 x10^{7}	2.83 x10^{8}	1.03 x10^{8}	2.2 x10^{8}
15SS-02	3.41x10^{7}	1 x10^{6}	1 x10^{6}	TNTC	TNTC
15SS-03	2.35x10^{7}	1 x10^{6}	1.5 x10^{6}	TNTC	7.33 x10^{7}
10SSL-01	TNTC	3.67 x10^{6}	1 x10^{6}	4.0 x10^{6}	TNTC
15SSL-01	TNTC	1.85 x10^{7}	5.57 x10^{8}	1.03 x10^{8}	6.0 x10^{6}
15SSL-04	1.63x10^{6}	2.73 x10^{7}	5.43 x10^{8}	5.33 x10^{8}	2.67 x10^{6}
15SSL-05	TNTC	3.97 x10^{7}	1.4 x10^{9}	1.6 x10^{8}	TNTC
2SM-02	7x10^{4}	2 x10^{4}	4.03 x10^{7}	5.26 x10^{6}	1.77 x10^{8}
0.5SML-01	TNTC	ไม่มีการเจริญ	1.67 x10^{6}	TNTC	1.93 x10^{8}
0.5SML-03	TNTC	3.0 x10^{8}	1.12 x10^{9}	5.4 x10^{8}	3.67 x10^{7}
0.5SML-04	9.03x10^{6}	3.63 x10^{7}	2.8 x10^{8}	2.47 x10^{8}	7.6 x10^{8}
0.5SML-05	TNTC	4.1 x10^{8}	6.03 x10^{8}	9.67 x10^{8}	TNTC
0.5SML-06	TNTC	3.6 x10^{8}	9.47 x10^{8}	5.5 x10^{8}	TNTC
0.5SML-07	TNTC	1.5 x10^{7}	2.5 x10^{6}	9.67 x10^{6}	1.83 x10^{8}
2SML-03	1.73x10^{5}	2.83 x10^{7}	2.34 x10^{8}	2.57 x10^{8}	7.37 x10^{8}
SG-04	TNTC	4.13 x10^{7}	3.13 x10^{7}	1.1 x10^{7}	1.47 x10^{7}

หมายเหตุ: TNTC = Too numerous to count

ตารางที่2 การเจริญของไอโซเลตต่าง ๆ AN2 และ AN3 ที่ความเป็นกรด-เบส 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5

รหัสไอโซเลต	การเจริญ (cfu/ml)				
	3	3.5	4	4.5	5
FG-01	TNTC	4.7 x10^{8}	1.02 x10^{9}	1.6 x10^{9}	2.33 x10^{6}
PF-02	1.55x10^{7}cfu/ml	1.37 x10^{7}	1.17 x10^{7}	1.83 x10^{7}	TNTC
PF-03	ไม่มีการเจริญ	1.7 x10^{4}	1.23 x10^{7}	1.73 x10^{7}	8.0 x10^{7}
PF-04	TNTC	8.0 x10^{7}	ไม่มีการเจริญ	1.2 x10^{7}	2.67 x10^{6}
PF-06	2.17 x10^{7}	2.67 x10^{6}	7.67 x10^{6}	2.67 x10^{5}	1.27 x10^{7}
WPS-02	1.81 x10^{7}	1.73 x10^{7}	1.8 x10^{7}	TNTC	2.0 x10^{8}
WPS-06	ไม่มีการเจริญ	2.37 x10^{4}	2.79 x10^{5}	TNTC	2.85 x10^{7}
FR-01	TNTC	1.93 x10^{7}	1 x10^{5}	TNYC	TNTC
SS-01	6.87 x10^{6}	1.53 x10^{7}	1.47 x10^{7}	3.0 x10^{7}	1.97 x10^{8}
NH2-02	ไม่มีการเจริญ	1 x10^{4}	4.23 x10^{6}	9.67 x10^{5}	3.43 x10^{6}
NH2-06	2.75 x10^{7}	3.0 x10^{6}	ไม่มีการเจริญ	TNTC	TNTC
NH3-02	1.08 x10^{7}	2.67 x10^{6}	7.33 x10^{6}	TNTC	2.0 x10^{6}
NH3-07	TNTC	3.0 x10^{7}	ไม่มีการเจริญ	TNTC	2.0 x10^{6}
NH3-08	TNTC	ไม่มีการเจริญ	ไม่มีการเจริญ	TNTC	2.5 x10^{6}
NH3-09	TNTC	6.67 x10^{6}	6.13 x10^{7}	TNTC	9.33 x10^{6}
NH4-03	TNTC	3.67 x10^{6}	4.0 x10^{6}	TNTC	1.0 x10^{7}
NH5-01	1.32 x10^{7}	ไม่มีการเจริญ	3.33 x10^{6}	TNTC	TNTC
NH5-03	8.4 x10^{6}	1.4 x10^{7}	5.8 x10^{7}	2.63 x10^{7}	7.0 x10^{6}
NH5-04	2.96x10^{5}	1.17 x10^{5}	2.63 x10^{6}	TNTC	3.0 x10^{6}
NH5-14	1.36 x10^{7}	6.33 x10^{6}	4.0 x10^{6}	4.0 x10^{6}	2.0 x10^{6}
NH6-01	2.43 x10^{7}	1.33 x10^{6}	3 x10^{6}	TNTC	6.0 x10^{6}
NH6-03	TNTC	ไม่มีการเจริญ	ไม่มีการเจริญ	1.13 x10^{8}	TNTC
NH6-08	1.43 x10^{7}	2.17 x10^{6}	9.33 x10^{6}	2.0 x10^{7}	2.83 x10^{7}
NH6-09	TNTC	8.87 x10^{7}	6.13 x10^{7}	1.0 x10^{8}	3.73 x10^{8}
NH6-10	2.23x10^{6}	5.57 x10^{7}	1.54 x10^{8}	1.0 x10^{8}	3.47 x10^{8}
AN2	TNTC	3.7 x10^{8}	4.47 x10^{8}	4.83 x10^{8}	TNTC
AN3	TNTC	5.87 x10^{6}	7.43 x10^{8}	1.1 x10^{9}	1.25 x10^{7}

หมายเหตุ: TNTC = Too numerous to count

4. วิเคราะห์ปริมาณกรดรวมทั้งหมด

จากการวิเคราะห์หาปริมาณกรดรวมทั้งหมดด้วยวิธีการไทเทรตด้วยโซเดียมไฮดรอกไซด์ 1 N พบว่า ไอโซเลตที่ปริมาณกรดรวมมากที่สุดคือ ไอโซเลตที่คัดแยกจากตัวอย่างไซเลจ (15SS-02) วัดได้ 270 mM ส่วนไอโซเลตที่มีความสามารถในการทนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (NH6-03) วัดปริมาณกรดรวมได้เพียง 180 mM และเชื้อเปรียบเทียบ AN2 และ AN3 วัดปริมาณกรดรวมได้ 250 และ 260 mM ตามลำดับ

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

จากผลการทดลองการคัดแยกจุลินทรีย์จากตัวอย่างต่าง ๆ จำนวน 27 ตัวอย่าง ซึ่งในการทดลองนี้จะมุ่งเน้นการคัดแยกจุลินทรีย์ชนิดแบคทีเรียกรดแล็กติก เนื่องจากแบคทีเรียกรดแล็กติกนั้นสามารถผลิตสารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (antimicrobial substance) ได้หลายชนิด หนึ่งในนั้นคือ กรดอินทรีย์ โดยพบว่ากรดแล็กติกที่เป็นกรดอินทรีย์นั้นสามารถยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มของยีสต์ รา และแบคทีเรียได้ (Blomและคณะ, 1991) ซึ่งจากการคัดแยกโดยเพาะเชื้อลงบนอาหารแข็ง MRS+$CaCO_3$โดยบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา และทดสอบทางชีวเคมี ที่เป็นการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์แคทาเลส เนื่องจากแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกไม่สามารถสร้างเอนไซม์ชนิดนี้ได้ โดยในการทดสอบจะต้องให้ผลที่เป็นลบ(ไม่เกิดฟองแก๊ส) ทำให้สามารถคัดแยกแบคทีเรียกรดแล็กติกออกจาก *Bacillus* spp. ที่มีรูปร่างแบบแท่งเหมือนแบคทีเรียกรดแล็กติกบางชนิดได้ ซึ่งจากการสังเกตบริเวณใสรอบโคโลนีที่เกิดจากกรดแล็กติกไปละลายแคลเซียมคาร์บอเนตจนทำให้เกิดบริเวณใสรอบโคโลนีและทดสอบการสร้างเอนไซม์แคทาเลสพบว่าสามารถคัดแยกแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกได้ 113 ไอโซเลต

จากนั้นนำมาทดสอบเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียผลิตกรดที่มีความสามารถในการเพิ่มประสิทธิภาพของไซเลจ โดยเกณฑ์ที่นำมาศึกษาได้แก่

ความทนต่ออุณหภูมิสูง (45 และ 50 องศาเซลเซียส) เนื่องจากในช่วงแรกกระบวนการหมักนั้นจะมีความร้อนที่เกิดจากการคายความร้อนจากพืชหมักและกิจกรรมของเซลล์อันเนื่องจากการย่อยสลายพืชหมักเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารและพลังงานของแบคทีเรีย ส่งผลให้ระหว่างกระบวนการมีความร้อนที่สูงขึ้น และผลการทดสอบพบว่า ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสมีไอโซเลตที่ทนได้จำนวน 45 ไอโซเลต โดยเป็นไอโซเลตที่คัดแยกได้จาก ตัวอย่างไซเลจ 20 ไอโซเลต (SN-01, SN-02, SN-04, 10SS-02, 10SS-04, 15SS-01, 15SS-02, 15SS-03, 10SSL-01, 15SSL-01, 15SSL-04, 15SSL-05, 2SM-02, 0.5SML-01, 0.5SML-03, 0.5SML-04, 0.5SML-05, 0.5SML-06, 0.5SML-07 และ 2SML-03), หญ้าจากบริษัทซันฟู้ด (SG-04), หญ้าฟาร์ม (FG-01), ปลาส้ม 4 ไอโซเลต (PF-02, PF-03, PF-04 และ PF-06), หมูยอ 2 ไอโซเลต (WPS-02 และ WPS-06), ข้าวหมาก (FR-01), ไส้กรอกอีสาน (SS-01), แหนมก้อน 2 ไอโซเลต (NH2-02 และ NH2-06), แหนมเสียบไม้ 4 ไอโซเลต (NH3-02, NH3-07, NH3-08 และ NH3-09), แหนมถุง (NH4-03), แหนมแท่ง 4 ไอโซเลต (NH5-01, NH5-03, NH5-04 และ NH5-014), แหนม 5 ไอโซเลต (NH6-01, NH6-03, NH6-08, NH6-09 และ NH6-010) AN2 และ AN3

และเมื่อนำทั้ง 45 ไอโซเลต, AN2 และ AN3 มาทดสอบต่อที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสแล้ว สังเกตการเจริญจากการดูความขุ่นของอาหารเหลว MRS พบว่า มีเพียง 1 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้จากแหนม (NH6-03) เท่านั้นที่สามารถเจริญได้

จากนั้นนำไอโซเลตที่ทนต่ออุณหภูมิ 45 และ 50 องศาเซลเซียสไปทดสอบความทนต่อค่าความเป็นกรดที่ต่ำ เนื่องจากในระยะ 2-3 วันแรกของการหมักนั้นค่าความเป็นกรด-เบสจะลดลงต่ำเร็วมากจากการทำงานของกลุ่มแบคทีเรียที่มีกระบวนการหมักแบบ Homofermentative โดยอยู่ในช่วงค่าความเป็นกรด-เบส 3-4 โดยในการทดสอบนี้ศึกษาการทนกรดตั้งแต่ค่าความเป็นกรด-เบส 3, 3.5, 4, 4.5 และ 5 แล้วตรวจสอบการเจริญด้วยเทคนิคดรอปเพลตที่ระดับความเจือจาง 10^{-1}, 10^{-2}, 10^{-3}, 10^{-4} และ 10^{-5} พบว่าที่ค่าความเป็นกรด-เบส 3 มี 22 ไอโซเลต AN2 และ AN3 ที่มีจำนวนโคโลนีมากจนไม่สามารถนับได้ในทุกระดับการเจือจาง ได้แก่ ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างไซเลจ 11 ไอโซเลต SN-01, SN-04, 10SS-04, 15SS-01, 10SSL-01, 15SSL-05, 0.5SML-01, 0.5SML-03, 0.5SML-05, 0.5SML-06 และ0.5SML-07),หญ้าจากบริษัทซันฟู้ด (SG-04),หญ้าฟาร์ม(FG-01),ปลาส้ม (PF-04),ข้าวหมาก (FR-01), แหนมเสียบไม้ 3 ไอโซเลต (NH3-07, NH3-08 และNH3-09), แหนมถุง (NH4-03), และ แหนม 2 ไอโซเลต (NH6-03 และ NH6-09) และมี 3 ไอโซเลต ที่ไม่มีการเจริญในทุกระดับการเจือจาง ได้แก่ ไอโซเลตที่คัดแยกได้จาก ปลาส้ม (PF-03), หมูยอ(WPS-06) และแหนมก้อน (NH2-02)

ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 3.5 พบว่ามี 4 ไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลตที่คัดแยกได้จาก หญ้าฟาร์ม (FG-01), ตัวอย่างไซเลจ (0.5SML-05, 0.5SML-06 และ 0.5SML-03) สามารถเจริญได้ 4.7×10^{8} cfu/ml, 4.1×10^{8} cfu/ml, 3.6×10^{8} cfu/ml และ 3.0×10^{8} cfu/ml ตามลำดับ และ AN2 เจริญได้ 3.7×10^{8} cfu/ml และมี 6 ไอโซเลต ที่ไม่มีการเจริญในทุกระดับการเจือจาง ได้แก่ ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างไซเลจ (SN-01, 10SS-04, 0.5SML-01), แหนมเสียบไม้ (NH3-08), (NH5-01) และ แหนม (NH6-03)

ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 4 พบว่ามี 3 ไอโซเลตที่มามารถได้ดีที่สุด ได้แก่ ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างไซเลจ (15SSL-05 และ 0.5SML-03) และหญ้าฟาร์ม (FG-01) สามารถเจริญได้ 1.4×10^{9} cfu/ml, 1.12×10^{9} cfu/ml และ 1.02×10^{9} cfu/ml ตามลำดับ และมี 6ไอโซเลต ที่ไม่มีการเจริญในทุกระดับการเจือจาง ได้แก่ ไอโซเลตที่คัดแยกได้จาก ตัวอย่างไซเลจ (10SS-04),ปลาส้ม (PF-04),แหนมก้อน (NH2-06), แหนมเสียบไม้ 2 ไอโซเลต (NH3-07 และ NH3-08) และ แหนม (NH6-03)

ที่ค่าความเป็นกรด 4.5 พบว่ามี 16 ไอโซเลตที่มีจำนวนโคโลนีมากจนไม่สามารถนับได้ในทุกระดับการเจือจาง ได้แก่ตัวอย่างไซเลจ (SN-01, 15SS-02, 15SS-03 และ 0.5SML-01), หมูยอ 2 ไอโซเลต (WPS-02 และ WPS-06), ข้าวหมาก (FR-01), แหนมก้อน (NH2-06), แหนมเสียบไม้ 4 ไอโซเลต (NH3-02, NH3-07, NH3-08 และ NH3-09), แหนมถุง (NH4-03), แหนมแท่ง 2 ไอโซเลต (NH5-01 และ NH5-04) และแหนม (NH06-01)และมี 6ไอโซเลต ที่ไม่มีการเจริญในทุกระดับการเจือจาง ได้แก่ ไอโซเลตที่คัดแยกได้จากตัวอย่างไซเลจ (10SS-04)

ค่าความเป็นกรด-เบส 5 พบว่าทุกไอโซเลตสามารถโตได้ที่ค่าความเป็นกรด-เบส 5 โดยมี 10 ไอโซเลต และ AN2 ที่มีจำนวนโคโลนีมากจนไม่สามารถนับได้ในทุกระดับการเจือจาง ได้แก่ตัวอย่างไซเลจ (15SS-02, 10SSL-01, 15SSL-05, 0.5SML-05 และ 0.5SML-06), ปลาส้ม (PF-02), ข้าวหมาก (FR-01), แหนมก้อน (NH2-06), แหนมแท่ง (NH5-01) และ แหนม (NH06-03)

จากนั้นนำทั้ง 45 ไอโซเลตมาวิเคราะห์หาปริมาณกรดรวมทั้งหมด พบว่า มี 15 ไอโซเลตที่ให้ปริมาณกรดรวมสูงที่สุดอยู่ในช่วง 250-270 mM โดยไอโซเลตที่ปริมาณกรดรวมมากที่สุดคือ ไอโซเลตที่คัดแยกจากตัวอย่างไซเลจ (15SS-02) วัดได้ 270 mM ส่วนไอโซเลตที่มีความสามารถในการทนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (NH6-03) วัดปริมาณกรดรวมได้เพียง 180 mM และเชื้อเปรียบเทียบ AN2 และ AN3 วัดปริมาณกรดรวมได้ 250 และ 260 mM ตามลำดับ

ซึ่งการวิเคราะห์เพียงปริมาณกรดรวมทั้งหมดนั้นไม่เพียงพอต่อการคักเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กติก เนื่องจากปริมาณกรดที่ได้เป็นปริมาณกรดรวม ซึ่งในกรดรวมนั้นอาจจะมีกรดชนิดอื่น ๆ ที่ไม่ใช่กรดแล็กติก ดังนั้นเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียกรดแล็กให้มีประสิทธิภาพที่สูงขึ้นควรนำไปวิเคราะห์หาปริมาณกรดแล็กติกด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) ทั้งนี้ปริมาณกรดแล็กติกที่ได้นั้นยังขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกอีกด้วย และเพื่อทราบถึงสายพันธุ์ควรมีการนำไป พิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยวิธีทางชีววิทยาระดับโมเลกุล โดยสกัดดีเอ็นเอ แล้วเพิ่มจำนวนดีเอ็นเอบริเวณ 16S rDNA ด้วยปฏิกิริยาลูกโซ่พอลิเมอเรส (polymerase chain reaction; PCR) จากนั้นส่งหาลำดับนิวคลีโอไทด์ แล้วนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลเพื่อระบุเอกลักษณ์ของแบคทีเรีย

เมื่อคัดเลือกจนสามารถระบุสายพันธุ์ของแบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกแล้วจึงนำไปทดสอบร่วมกับไซเลจ ซึ่งไซเลจที่มีคุณภาพดีนั้นหากพิจารณาลักษณะทางกายภาพจะต้องมีค่าความเป็นกรด-เบส 3.5-4.2 กลิ่นของไซเลจที่ได้ควรมีกลิ่นหอมเปรี้ยวอ่อน ๆ คล้ายผลไม้ดอง ต้องไม่มีกลิ่นเหม็นเน่าหรือฉุนของแอมโมเนียที่อาจจะได้จากแบคทีเรียชนิดอื่นที่มีกระบวนการหมักแบบ Heterofermentation ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์อื่น ๆ ที่ไม่ใช่กรดแล็กติก เนื้อของไซเลจต้องไม่เป็นเมือกเละหรือมีราเกิดขึ้นบริเวณผิวหน้าของไซเลจที่เกิดการสัมผัสกับอากาศ สีของไซเลจควรมีสีเหลืองอมเขียว ไม่ควรเป็นสีน้ำตาลไหม้เพราะอาจเกิดจากความร้อนที่มากเกินไปในระหว่างการหมัก ซึ่งจะส่งผลให้สารอินทรีย์สลายตัว เกิดการสูญเสียโภชนะ หรือธาตุอาหาร เมื่อวิเคราะห์หาปริมาณกรด ควรมีปริมาณกรดแล็กติกมากที่สุด และควรมีกรดอะซิติกและบิวทีริกน้อยที่สุด

เอกสารอ้างอิง

Axelsson, L. J. F. S., & DEKKER-, T.-N. Y.-M. (2004). Lactic acid bacteria: classification and physiology. 139, 1-66.

Blom, H., & Mørtvedt, C. (1991). Anti-microbial substances produced by food associated micro-organisms. In: Portland Press Ltd.

De Man, J., Rogosa, d. M., & Sharpe, M. E. J. J. o. a. B. (1960). A medium for the cultivation of lactobacilli. 23(1), 130-135.

De Vuyst, L., & Vandamme, E. J. (1994). Antimicrobial potential of lactic acid bacteria. In Bacteriocins of lactic acid bacteria (pp. 91-142): Springer.

Elferink, S., Driehuis, F., Gottschal, J. C., Spoelstra, S. F. J. F. P. P., & Papers, P. (2000). Silage fermentation processes and their manipulation. 17-30.

Fitzpatrick, J. J., Ahrens, M., & Smith, S. J. P. B. (2001). Effect of manganese on Lactobacillus casei fermentation to produce lactic acid from whey permeate. 36(7), 671-675.

Fu, W., & Mathews, A. J. B. e. j. (1999). Lactic acid production from lactose by Lactobacillus plantarum: kinetic model and effects of pH, substrate, and oxygen. 3(3), 163-170.

Hatheway, C. L. J. C. b. E., & foods, c. i. (1993). Clostridium botulinum and other clostridia that produce botulinum neurotoxin. 3-20.

Helander, I. M., von Wright, A., Mattila-Sandholm, T. J. T. i. F. S., & Technology. (1997). Potential of lactic acid bacteria and novel antimicrobials against Gram-negative bacteria. 8(5), 146-150.

Hofvendahl, K., Hahn–Hägerdal, B. J. E., & technology, m. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources1. 26(2-4), 87-107.

Janson, S. J. S. D. o. m. s. u. o. a. s. (2005). Lactic acid bacteria in silage–growth, antibacterial activity and antibiotic resistance.

Muck, R.E., (1991). Silage Fermentation In J.G. Zeikus and E.A. Johnson (eds.), Mixed cultures in Biotechnology. McGraw-Hill, New York, 171-204.

Muck, R. E. (2002). Effects of corn silage inoculants on aerobic stability. Paper presented at the 2002 ASAE Annual Meeting.

Stiles, M. E., & Holzapfel, W. H. J. I. j. o. f. m. (1997). Lactic acid bacteria of foods and their current taxonomy. 36(1), 1-29.

Tamada, J., Yokota, H., Ohshima, M., & Tamaki, M. J. A.-A. J. o. A. S. (1999). Effect of additives, storage temperature and regional difference of ensiling on the fermentation quality of Napier grass (Pennisetum purpureum Schum.) silage. 12(1), 28-35.

Wang, S., Yuan, X., Dong, Z., Li, J., & Shao, T. J. A. S. J. (2017). Isolating and evaluating lactic acid bacteria strains for effectiveness on silage quality at low temperatures on the Tibetan Plateau.88(11), 1722-1729.

Weinberg, Z., Shatz, O., Chen, Y., Yosef, E., Nikbahat, M., Ben-Ghedalia, D., & Miron, J. J. J. o. d. s. (2007). Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro digestibility of wheat and corn silages. 90(10), 4754-4762.

Whittenbury, R. J. M. (1964). Hydrogen peroxide formation and catalase activity in the lactic acid bacteria. 35(1), 13-26.

Wilkinson, J. J. N. t. (1999). Silage and animal health. 7(6), 221-232.

Wolf, G., Strahl, A., Meisel, J., & Hammes, W. P. J. I. j. o. f. m. (1991). Heme-dependent catalase activity of lactobacilli. 12(2-3), 133-140.

กวิน เจริญยงค์, (2555). การคัดแยกและจำแนกแล็กติกแอซิดแบคทีเรียในข้าวโพดสายพันธุ์ CP-KKK หมักจากประเทศไทยและข้าวโพดหมักเชิงพาณิชย์จากประเทศจีน, โครงการการเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์, ระดับปริญญาบัณฑิต ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. (2562). เกษตรฯ kick off สร้างโคนมไทยเข้มแข็ง พร้อมผลักดันสู่การ แข่งขันในตลาดโลก. 15 กุมภาพันธ์ 2563, https://www.moac.go.th/news-preview-411691791549

เกียรติศักดิ์ กล่ำเอม, เกียรติสุรักษ์ โภคสวัสดิ์, วิรัช สุขสราญ และ ฉายแสง ไผ่แก้ว, (2544). หญ้าหมัก (1). กรุงเทพ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

จีระวัชร์ เข็มสวัสดิ์, (2547). มาตรฐานพืชอาหารสัตว์คุณภาพดี (1). กรุงเทพ: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย จำกัด.

นวรัตน์ บุญทองเนียม. (2562). สรุปข้อมูลและสถิติจำนวนเกษตรกรโคนม ประจำเดือนมกราคม ปี2563. 15 กุมภาพันธ์2563, http://ict.dld.go.th/webnew/images/stories/stat_web/monthly/2563/january63/2---milk.pdf

สุพรรณิการ์ ศรีบัวทอง, (2548). การคัดเลือกแบคทีเรียแล็กติกจากข้าวหมักเพื่อใช้เป็นกล้าเชื้อขนมจีนแป้งหมัก. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

ภาคผนวก

สูตรและวิธีการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. อาหารเลี้ยงเชื้อแข็ง MRS agar (w/v)

Peptone	1.0%
Meat extract	0.8%
Yeast extract	0.4%
Glucose	2.0%
Sodium acetate trihydrate	0.5%
Polysorbate 80	0.1%
Dipotassium hydrogen phosphate	0.2%
Triammonium citrate	0.2%
Magnesium sulfate heptahydrate	0.02%
Magnesium sulfate tetrahydrate	0.005%
Agar	1%
Distilled water	1000 ml
ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ	6.5

วิธีการเตรียม

ชั่งสารทั้งหมดและละลายลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วย 0.1 NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ประมาณ 6.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที ทิ้งให้เย็นลงนำไปเทลงเพลต รอจนแข็งตัว

2. อาหารเลี้ยงเหลว MRS (w/v)

Peptone	1.0%
Meat extract	0.8%
Yeast extract	0.4%
Glucose	2.0%
Sodium acetate trihydrate	0.5%
Polysorbate 80	0.1%
Dipotassium hydrogen phosphate	0.2%
Triammonium citrate	0.2%
Magnesium sulfate heptahydrate	0.02%
Magnesium sulfate tetrahydrate	0.005%
Distilled water	1000 ml
ปรับค่าความเป็นกรด-เบสเท่ากับ	6.5

วิธีการเตรียม

ชั่งสารทั้งหมดและละลายลงในน้ำกลั่น 950 มิลลิตร คนด้วยแท่งแก้วให้สารอาหารละลาย ปรับค่าความเป็นกรด-เบส ด้วย 0.1 NaOH หรือ 0.1 N HCl จนได้ประมาณ 6.2 ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 20 นาที