

จลศาสตร์ของเชื้อบริสุทธิ์แลคติกแอซิดแบคทีเรีย
สำหรับการผลิตแหนม

ไพโรจน์ วิริยจารี¹, ลักขณา รุจนะไกรกานต์¹,
วิวัฒน์ วรณัจฉริยา¹ และ สุทธยา บุญอนอม¹

KINETIC OF LACTIC ACID BACTERIA
FOR NHAM PRODUCTION

Pairote Wiriyaicharee¹, Lakkana Rujanakraikarn¹,
Wiwat Wattanatchariya¹ and Suthaya Boonthanom¹

ABSTRACT : Glucose is a substrate for the growth of lactic acid bacteria. In the study of kinetics of those cultures in the model system, the glucose was varied to different levels such as 0.2 %, 0.5 %, 0.75 %, 1.0 %, 1.5 % and 2.0 % for 24 hours of fermentation time. It was found that the specific growth rate (μ) of *Lactobacillus plantarum* and *Pediococcus cerevisiae* was dependent upon the initial substrate. Additionally, the maximum specific growth rate (μ_m) was 0.4525 hr⁻¹ for *L. plantarum* and 0.3340 hr⁻¹ for *P. cerevisiae*. On the other hand, the saturation constants (K_s) were 0.1165 % and 0.3442 % for *L. plantarum* and *P. cerevisiae* respectively. In fact that, glucose should be minimum 0.1165 % for the growth of *L. plantarum* and should be minimum 0.3442 % for the growth of *P. cerevisiae*. Because the growth of both cultures are associated fermentation. The product which was lactic acid, therefore, depended upon the growth of those cultures.

¹ คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่ 50200.

¹ Faculty of Agro-Industry, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand.

บทคัดย่อ : สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ที่ผลิตกรดแลกติกอย่างหนึ่ง คือ กลูโคส ได้นำมาใช้เป็นปัจจัยของการศึกษาจลศาสตร์ของเชื้อใน Model system โดยแปรที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.2, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง จากการทดลองพบว่าเชื้อ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* มีค่า Specific growth rate (μ) แปรผันตามค่าความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น และค่า maximum specific growth rate (μ_m) มีค่าเป็น 0.4525 ชั่วโมง⁻¹ และ 0.3340 ชั่วโมง⁻¹ ตามลำดับ ส่วนค่า Saturation constants (K_s) มีค่า ร้อยละ 0.1165 และ 0.3442 นั่นคือเชื้อ *L. plantarum* ต้องการกลูโคสในการเจริญเติบโตอย่างน้อยที่สุด ร้อยละ 0.1165 ส่วนเชื้อ *P. cerevisiae* จะต้องการกลูโคสในการเจริญเติบโตอย่างน้อยที่สุด ร้อยละ 0.3442 และเนื่องจากการเจริญเติบโตของเชื้อทั้งสองเป็นแบบ Growth associated fermentation ดังนั้นผลิตภัณฑ์ที่สร้างขึ้น (กรดแลกติก) จึงขึ้นอยู่กับ การเจริญของเซลล์จุลินทรีย์.

คำนำ

การใช้เชื้อบิวรีเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์เนื้อ เริ่มขึ้นในประเทศสหรัฐอเมริกา และในปัจจุบันแบบที่ประสบความสำเร็จในการใช้เป็นเชื้อบิวรีเริ่มต้นในผลิตภัณฑ์เนื้อ ได้แก่ *Lactobacillus* sp. (Nurmi, 1966; Everson *et al.*, 1970; Bacus, 1984; Gilliland, 1985 และ Gibbs, 1987) *Pediococcus* sp. (Deibel and Niven, 1957; Bacus and Brown, 1981; Bacus, 1984; Gilliland, 1985 และ Gibbs, 1987) และ *Micrococcus* sp. (Niinivaara, 1955; Nurmi, 1966 และ Coretti, 1977) โดย lactobacilli และ pediococci ใช้สำหรับผลิตกรดในผลิตภัณฑ์ ในขณะที่ micrococci ใช้สำหรับรีดิวส์ไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ เพื่อให้เกิดสีแดงในผลิตภัณฑ์.

สำหรับในประเทศไทย เทคโนโลยีการใช้เชื้อบิวรีเริ่มต้นได้เข้ามามีบทบาทต่อการผลิตอาหารหมักดอง โดยเฉพาะในผลิตภัณฑ์แฮม ทั้งนี้เพราะการหมักแฮมโดยทั่วไปอาศัยการหมักตามธรรมชาติ ซึ่งขึ้นกับฤดูกาลที่ทำการผลิตรวมถึงเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดในธรรมชาติที่ปนเปื้อนมากับวัตถุดิบ ทำให้เกิดการแข่งขันในการเจริญเติบโต และเชื้อที่จำเป็นในการหมักมีการเจริญเติบโตไม่เต็มที่เท่าที่ควร เป็นผลให้แฮมที่ได้มีความเสี่ยงต่อความปลอดภัยของผู้บริโภค เนื่องจากส่วนมากนิยมรับประทานในลักษณะดิบ นอกจากนี้การผลิตในแต่ละครั้งมีคุณภาพไม่สม่ำเสมอ คุณภาพและกลิ่นรสของผลิตภัณฑ์มีความผันแปรค่อนข้างมาก และไม่สามารถควบคุมเวลาที่ใช้ในการผลิตได้ เพื่อแก้ไขปัญหาดังกล่าว H-Kittikun และคณะ (1988) ได้ใช้เชื้อ *L. plantarum* 50408, 51006, 60412 และ 61004 ซึ่งแยกได้จากแฮมตัวอย่างในท้องตลาดเป็นเชื้อบิวรีเริ่มต้นในการผลิตแฮม พบว่า ที่เวลาเริ่มต้นการหมักเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด และแลคติกแอซิดแบคทีเรียในแฮมที่เติมเชื้อบิวรีเริ่มต้น มีปริมาณสูงกว่าแฮมที่หมักตามธรรมชาติมากกว่า 1 Log cycle ส่วนแฮมที่หมักตามธรรมชาติมีปริมาณ *Escherichia coli* อยู่สูง และตรวจพบ *Salmonella* sp. ในช่วงเริ่มต้นการหมัก ในขณะที่แฮมที่เติมเชื้อบิวรีเริ่มต้นมีปริมาณ *E. coli* ต่ำกว่ามาก

และตรวจไม่พบ *Salmonella* sp. แต่จากการทดสอบทางประสาทสัมผัสแหนมที่ใช้เชื้อบิวรีสุทธิเริ่มต้นนี้ยังไม่แตกต่างจากแหนมที่หมักตามธรรมชาติ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในด้านเนื้อสัมผัสและสี อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการทดลองต่อไป เนื่องจากมีปัจจัยต่าง ๆ มากมายที่อาจมีผลกระทบต่อคุณภาพของแหนม ผลจากการทดลองนี้ทำให้มีงานวิจัยต่อเนื่อง โดยใช้เชื้อบิวรีสุทธิเริ่มต้นจากเชื้อหลาย ๆ ชนิด แทนการใช้เชื้อบิวรีสุทธิเริ่มต้นเพียงชนิดเดียวในการหมักแหนม แนวความคิดดังกล่าวเริ่มจากการศึกษาของ Everson และคณะ (1974) ที่พบว่า เชื้อ *L. plantarum* ที่ใช้ในการผลิตได้กรอกหมักแห้ง และทั้งหมักนั้นมีช่วงอุณหภูมิในการเจริญเติบโตและผลิตกรดแลคติกได้เฉพาะช่วงเริ่มต้นการหมักเท่านั้น ดังนั้นจึงคิดที่จะใช้ในรูปแบบเชื้อบิวรีสุทธิเริ่มต้นผสม (Mixed starter cultures) ของ (*L. plantarum*) กับแลคติกแอซิกแบคทีเรียชนิดอื่น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีคุณภาพดีขึ้น.

เทคโนโลยีการใช้เชื้อบิวรีสุทธิเริ่มต้นผสมในผลิตภัณฑ์เนื้อหมักจึงเป็นเทคโนโลยีใหม่ที่ได้ประยุกต์ใช้กับผลิตภัณฑ์อาหารพื้นบ้าน โดยเฉพาะผลิตภัณฑ์แหนม ซึ่ง Wriyacharee (1990) ได้ศึกษาทดลอง และคัดเลือกพันธุ์เชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อผลิตภัณฑ์ดังกล่าว โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) เพื่อให้เกิดรสชาติเปรี้ยวและกลิ่นรสเฉพาะของผลิตภัณฑ์ได้แก่ *Lactobacillus plantarum* (NHI 110) และ *Pediococcus cerevisiae* (NZDRI) และกลุ่มแบคทีเรียที่เปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ (Nitrate reducing bacteria) เพื่อให้เกิดสีชมพูแดงในผลิตภัณฑ์ คือ *Micrococcus varians* (ATCC 15306) โดยใช้เชื้อบิวรีสุทธิเริ่มต้นผสมทั้ง 3 ชนิด ในการผลิตแหนม ซึ่งพบว่า สามารถปรับปรุงคุณภาพแหนมได้ โดยผลิตภัณฑ์มีการผลิตกรดที่ดี มีคุณภาพดีมากในแง่ลักษณะเนื้อสัมผัสและสี และผลิตภัณฑ์มีความปลอดภัยสูง อย่างไรก็ตามก่อนที่จะศึกษาต่อไปในด้านการรวมวิธีการผลิต ควรศึกษาเกี่ยวกับจุลศาสตร์ของเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 กลุ่ม เพื่อต้องการทราบถึงพฤติกรรมและการใช้สารอาหาร และการสร้างผลิตภัณฑ์ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นพื้นฐานในการศึกษาและพัฒนาคุณภาพผลิตภัณฑ์ต่อไป.

สำหรับในการศึกษานี้ มุ่งเน้นถึงจุลศาสตร์ของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างกรดแลคติก ซึ่งมี 2 สปีชีส์ คือ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ De man, Rogosa and Sharpe (MRS) ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และใช้เวลาประมาณ 24 ชั่วโมง ในการเจริญเพื่อให้มีกิจกรรมสูงสุด ทั้งนี้จะศึกษาถึงอัตราการใช้สารอาหาร (กลูโคส) ระดับต่างๆ ที่มีในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Specific substrate uptake rate; q_s) อัตราการเจริญเติบโตสูงสุดโดยวัดในรูปน้ำหนักแห้งของเซลล์ (Maximum specific growth rate; μ_m) ตลอดจนอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (Specific product rate; q_p) ซึ่งในที่นี้คือ กรดแลคติกที่มีผลให้ค่าความเป็นกรดค่า (pH) ของระบบลดลงได้ โดยข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางในการศึกษาถึงชนิดและปริมาณส่วนผสมต่าง ๆ ที่เป็นแหล่งอาหารสำคัญของเชื้อแบคทีเรียในการเปลี่ยนเป็นกรดแลคติกเพื่อให้ได้ pH ของผลิตภัณฑ์แหนมตามต้องการ.

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เนื่องจากจุลินทรีย์ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* สามารถเจริญเติบโตได้ดีในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS แต่ในการทดลองนี้ต้องการศึกษาจุลศาสตร์การใช้น้ำตาลกลูโคสในการเจริญเติบโต และการเปลี่ยนน้ำตาลกลูโคสไปเป็นกรดแลคติกของเชื้อนี้ จึงเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นใหม่โดยไม่มีน้ำตาลกลูโคสเป็นส่วนผสมตามสูตรข้างล่างก่อน แล้วจึงเติมสารละลายกลูโคสทีหลังเพื่อเป็นปัจจัยในการศึกษาที่ใช้ไปของกลูโคสโดยเชื้อแลคติกแอซิกแบคทีเรียดังกล่าว.

อาหารเลี้ยงเชื้อ :

Water	100
	% of water
Yeast extract	0.5
Tween 80	0.1
Dipotassium phosphate	0.2
Sodium acetate	0.5
Diammonium citrate	0.2
Magnesium sulfate . 7 H ₂ O	0.02
Manganese sulfate . 4 H ₂ O	0.005
Peptone	1.0
Beef extract	1.0

สารละลายกลูโคส :

Water	100
Glucose	20% of water

นำอาหารเลี้ยงเชื้อและสารละลายกลูโคสมาเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทั้งให้เย็น แล้วเติมสารละลายกลูโคสลงในอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณกลูโคสระดับต่าง ๆ ดังนี้ :

1. ใช้ปริมาณกลูโคสร้อยละ 0.2 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
2. ใช้ปริมาณกลูโคสร้อยละ 0.5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
3. ใช้ปริมาณกลูโคสร้อยละ 0.75 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
4. ใช้ปริมาณกลูโคสร้อยละ 1.0 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
5. ใช้ปริมาณกลูโคสร้อยละ 1.5 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ
6. ใช้ปริมาณกลูโคสร้อยละ 2.0 ของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น

L. plantarum ถูกเตรียมขึ้นเป็นเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้น ในอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS จำนวน 100 มิลลิลิตรโดยบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นแยกเซลล์ด้วยความเร็ว 2,000 รอบต่อนาที และล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ไม่มีกลูโคส 2 ครั้ง ปั่นแยกเซลล์อีกครั้งหนึ่งและเติมอาหารเลี้ยงเชื้อ MRS ที่ไม่มีกลูโคสในปริมาณเท่ากับ ปริมาตรเริ่มต้น เชื้อให้เข้ากัน จะได้เชื้อบริสุทธิ์ตามต้องการ (การเตรียมในขั้นนี้อาศัยเทคนิค ปั่นแยกเชื้อทั้งสิ้น) ส่วน *P. cerevisiae* ก็อาศัยการเตรียมวิธีเช่นเดียวกัน.

วิธีการทดลอง

ปีเปคเชื้อ *L. plantarum* หรือ *P. cerevisiae* บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อในปริมาณร้อยละ 5 เขย่าให้เข้ากัน บ่มในตูบที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และนำมาต้มด้วยอ่างเพื่อวิเคราะห์หาหน้าหนักของเชื้อบริสุทธิ์เริ่มต้นที่เจริญเติบโต ปริมาณน้ำตาล กลูโคสที่เหลือ ปริมาณกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติกและค่าความเป็นกรดต่างเมื่อเวลาผ่านไป 0, 3, 6, 12, 18 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ.

วิธีการหาน้ำหนักเซลล์แห้งของเชื้อบิสทรีเริ่มต้น

การเตรียมกราฟมาตรฐานระหว่างค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) กับน้ำหนักแห้ง (Dry weight) ของเซลล์ : ปิเปตเชื้อ *L. plantarum* หรือ *P. cerevisiae* บริสุทธิ์ที่เตรียมได้ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูปในปริมาณร้อยละ 5 เขย่าให้เข้ากัน เก็บบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และนำมาสุ่มตัวอย่างเพื่อนำไปวัดการเจริญเติบโตของเชื้อในรูปของความขุ่น ซึ่งได้เป็นค่าการดูดกลืนแสง (Absorbance) โดยใช้เครื่อง Bausch and Lomb Spectronic 21 spectrophotometer ที่ช่วงความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร ทั้งนี้ ตัวอย่างดังกล่าว 1 มิลลิลิตร จะถูกเจือจางด้วยน้ำกลั่น 4 มิลลิลิตร ก่อนนำไปวัด จากนั้นนำตัวอย่างดังกล่าวมาปั่นแยกเซลล์ที่ 2,000 รอบต่อนาที วินาทีอาหารส่วนบนออก นำตะกอนที่ได้ไปอบที่ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

อย่างน้อย 3 ชั่วโมงจนน้ำหนักตะกอนคงที่ สร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับน้ำหนักแห้งของเซลล์ โดยให้น้ำหนักแห้งของเซลล์เป็นแกนนอนจะได้กราฟมาตรฐานที่ใช้เทียบหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ได้.

การวิเคราะห์ทางเคมี

การทดลองทั้ง 6 กลุ่มจะถูกสุ่มตัวอย่างออกมาวิเคราะห์ทางเคมี คือ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) ค่าความเป็นกรดทั้งหมดคิดเทียบกรดแลคติก (Total acidity as lactic acid) และปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ (Reducing sugars) ตามวิธีของ AOAC (1984), Miller (1959), Pearson (1976), Wiriyaacharee (1990) และ วิริยารักษ์ กับ หันพงศ์กิตติกุล (2533, 2535) และวัดค่าการเจริญเติบโตของเชื้อโดยการวัดความขุ่นในรูปของค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 500 นาโนเมตร (Pirt, 1975).

ผลการทดลองและวิจารณ์

จากการทดลองศึกษาการเจริญเติบโตของ *L. plantarum* ในรูปของน้ำหนักแห้งที่ระดับความเข้มข้นน้ำตาลต่างกันในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Model system) พบว่าการเจริญเติบโตจะเริ่มคงที่หลังจากเวลาผ่านไปประมาณ 6 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 0.75 และต่ำกว่า ส่วนที่ระดับสูงกว่านั้นจะเริ่มคงที่เมื่อเวลาผ่านไปประมาณ 18 ชั่วโมง และพบว่าเชื้อ *L. plantarum* สามารถเจริญเติบโตได้มากขึ้นถ้าในระบบมีปริมาณสารอาหาร ซึ่งในที่นี้คือกลูโคส ในระดับที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบที่เวลาเดียวกัน (ภาพที่ 1) ทำนองเดียวกับค่าความเป็นกรดทั้งหมดเมื่อคิดเทียบกรดแลคติกซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นถ้าระดับของกลูโคสมากขึ้นเช่นกัน (ภาพที่ 2) และค่าความเป็นกรดเป็นด่าง (pH) จะเป็นไปในทางตรงกันข้ามกับปริมาณกรดทั้งหมด (ภาพที่ 3) โดยที่ความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 2.0 สามารถลดค่า pH ลงได้ถึง 3.7 ในเวลาเพียง 24 ชั่วโมงเท่านั้น ซึ่งจะลดลงรวดเร็วมากในช่วง 6 ชั่วโมงแรก จาก 6.6 เป็น 5.1-4.4 สำหรับรูปแบบการหมักโดยเชื้อ *L. plantarum* จัดอยู่ในรูปแบบ Growth associated fermentation ซึ่งหมายถึงการหมักที่มีอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (กรดแลคติก) เป็นปฏิกิริยาโดยตรงกับการเจริญของเซลล์ขึ้นทันที.

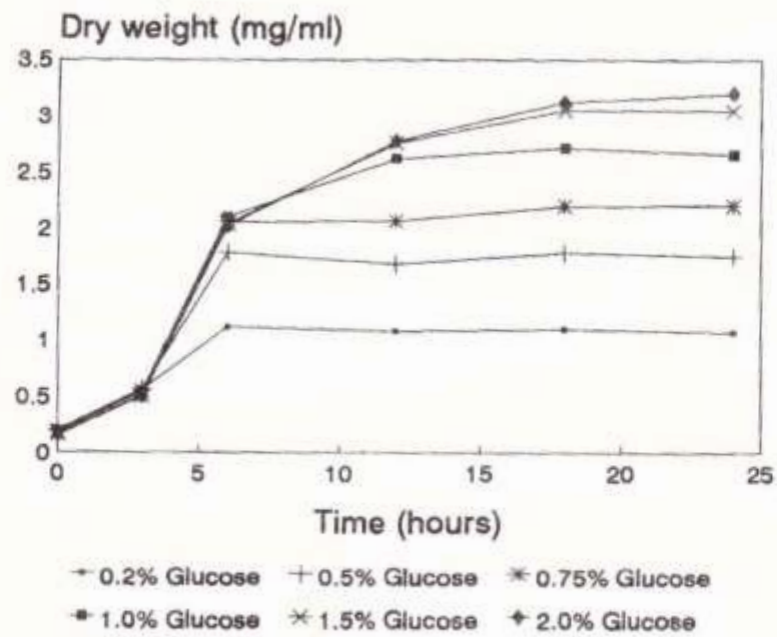


Figure 1. The growth of *L. plantarum* in term of dry weight (mg/ml) during 24 hours in model system (6 levels of glucose as main factors).

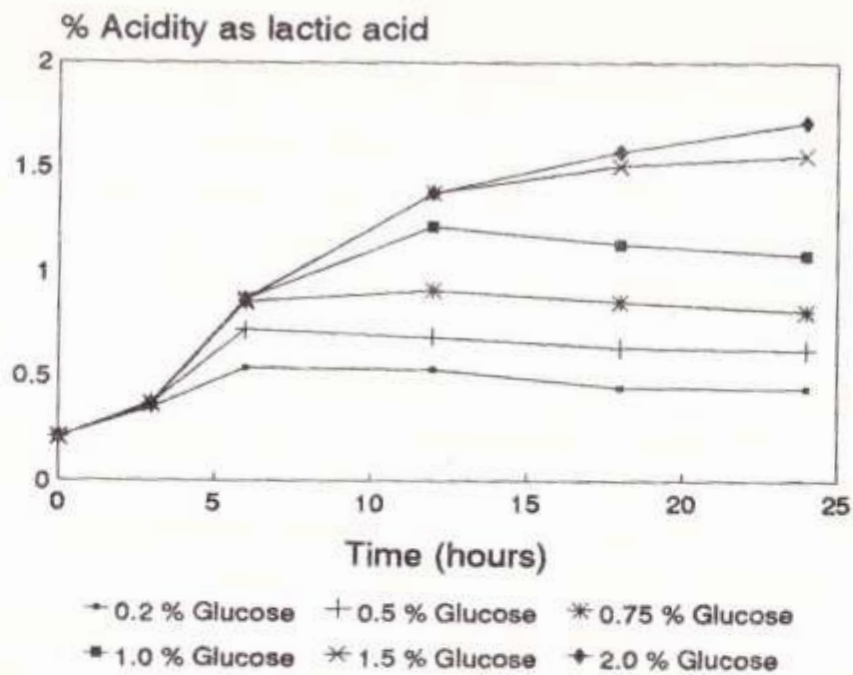


Figure 2. Total acidity as lactic acid (%) changes during 24 hours in model system of *L. plantarum* fermentation (6 levels of glucose as main factors).

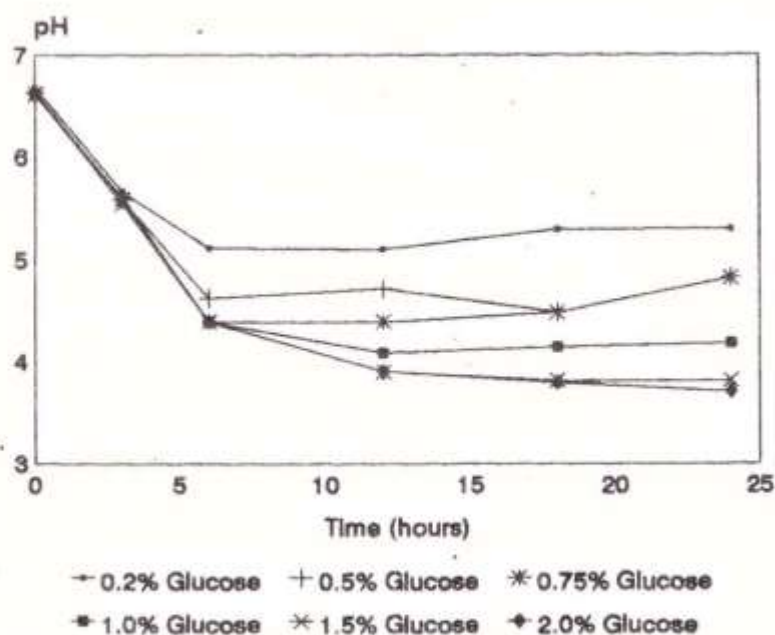


Figure 3. pH changes during 24 hours in model system of *L. plantarum* fermentation (6 levels of glucose as main factors).

เมื่อพิจารณาการใช้สารอาหาร (กลูโคส) ของเชื้อ *L. plantarum* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 0.2-1.0 นั้น เชื้อ *L. plantarum* สามารถใช้สารอาหารได้เกือบหมดภายในเวลา 12 ชั่วโมงแรกของการหมัก (ภาพที่ 4) เมื่อพิจารณาถึงกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าวพบว่าจะเริ่มเข้าสู่ระยะ Stationary phase เนื่องจากข้อจำกัดของสารอาหารดังกล่าวทำให้อัตราการเจริญเติบโตเริ่มเท่ากับอัตราการตายของเซลล์ นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เชื้อสร้างขึ้น เช่น กรดแลกติก เมื่อสะสมในปริมาณมากขึ้นจะมีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *L. plantarum* เองได้ และจากการคำนวณในระยะ Exponential phase พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสต่างๆ จะมีค่า Specific growth rate (μ) แตกต่างกันไปคือ มีค่าเป็น 0.285, 0.369, 0.401, 0.399, 0.418 และ 0.425 ชั่วโมง⁻¹ ที่ความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 0.2, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 ตามลำดับ (ภาพที่ 5) แสดงให้เห็นว่ายิ่งความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นมาก ค่า μ ก็จะมากขึ้นด้วย และจากการสังเกตค่า Doubling time ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า พบว่ามีค่า 2.432, 1.879, 1.730, 1.736, 1.657 และ 1.632 ชั่วโมงตามลำดับ นั่นคือ ความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นมาก มีผลให้เชื้อ *L. plantarum* เจริญเติบโตได้เร็วขึ้นด้วย.

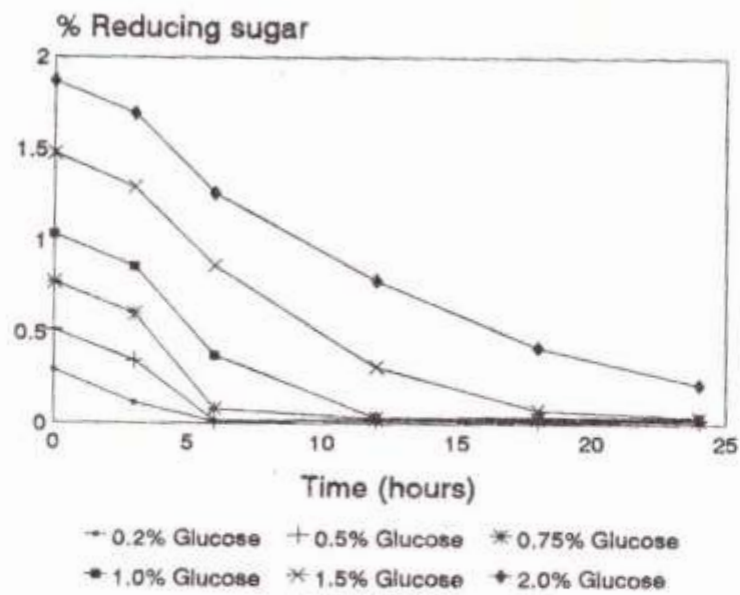


Figure 4. Reducing sugar changes during 24 hours in model system of *L. plantarum* fermentation (6 levels of glucose as main factors).

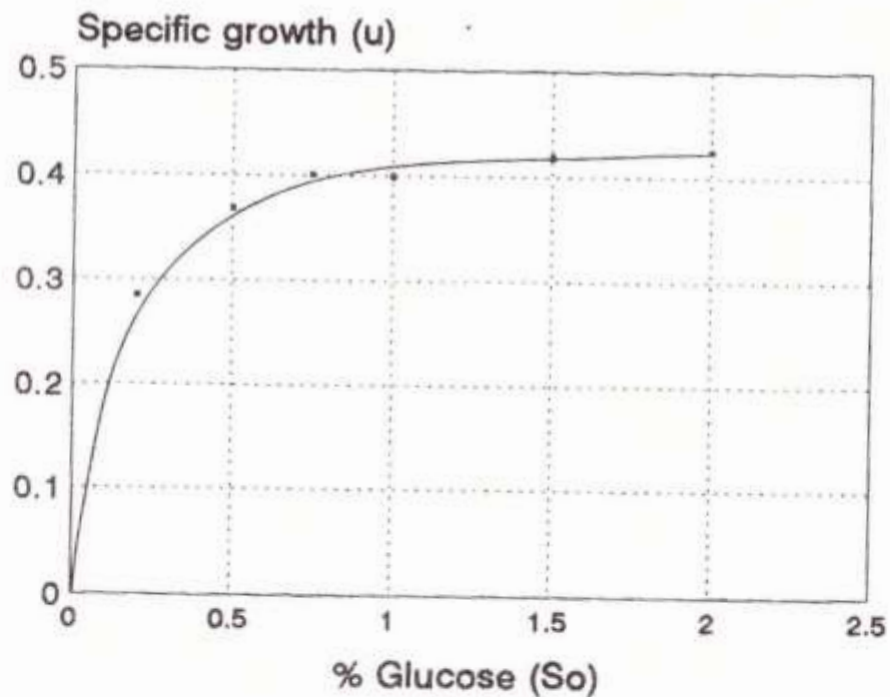


Figure 5. Specific growth rate (μ) of *L. plantarum* in model system.

ผลการทดลองดังกล่าว (ภาพที่ ๕) สอดคล้องกับสมการแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า μ กับค่าความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้น (S_0) ในการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในระบบการหมักโดย J.Monod ที่พบว่าค่า μ จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารอาหารอย่างใดอย่างหนึ่งที่จำเป็นและมีอยู่จำกัดในสูตรอาหารดังนี้ (วิริยจารี, 2535).

$$\mu = \mu_m \cdot \frac{S_0}{K_s + S_0}$$

แต่เพื่อให้สะดวกต่อการคำนวณหาค่า Maximum specific growth rate (μ_m) และค่า Saturation constant (K_s) จึงเปลี่ยนสมการดังกล่าวให้อยู่ในรูปสมการเชิงเส้นตรงดังนี้ (ภาพที่ 6).

$$\begin{aligned} 1/\mu &= (K_s/\mu_m) \cdot 1/S_0 + 1/\mu_m \\ \text{intercept} &= 1/\mu_m \\ \text{slope} &= K_s/\mu_m \end{aligned}$$

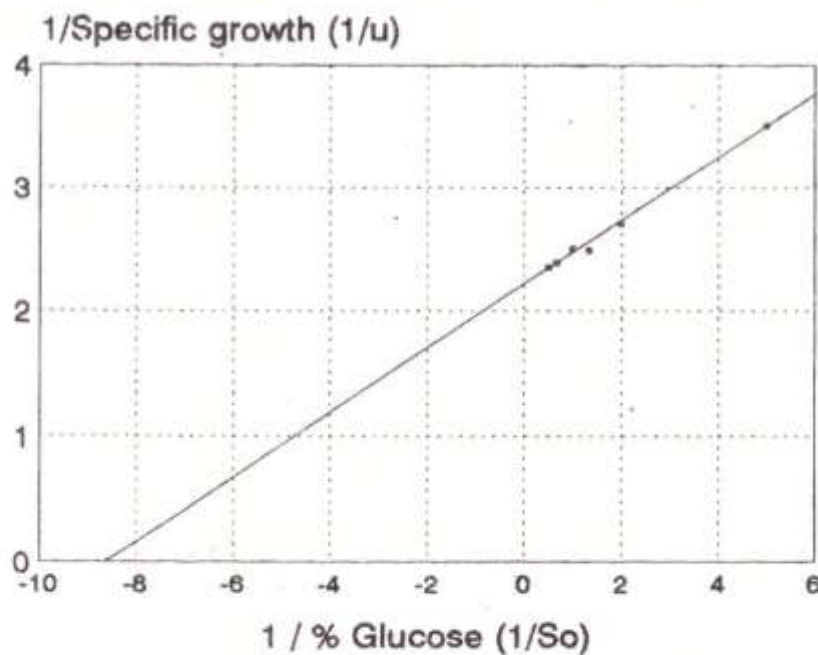


Figure 6. Maximum specific growth rate (μ_m) and saturation constant (K_s) of *L. plantarum* in model system.

จากกราฟในภาพที่ 6 พบว่าค่า Maximum specific growth rate (μ_m) มีค่าเป็น 0.4525 ชั่วโมง⁻¹ และ Saturation constant (K_s) มีค่าร้อยละ 0.1165 ซึ่งหมายความว่าเชื้อ *L. plantarum* ต้องการปริมาณกลูโคสเท่ากับร้อยละ 0.1165 เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตได้ครึ่งหนึ่งของ Exponential phase ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งถ้าปริมาณกลูโคสน้อยกว่านี้ การเจริญเติบโตหรือผลิตรกแลคติกโดยเชื้อดังกล่าวจะเป็นไปโดยไม่สมบูรณ์ ดังนั้นในระบบที่ต้องการให้มีการสร้างกรดแลคติกจากเชื้อ *L. plantarum* จะต้องมีปริมาณสารอาหารคือกลูโคสอย่างน้อยร้อยละ 0.1165 สำหรับค่า Specific substrate uptake rate (qs) หรืออัตราการใช้ปริมาณกลูโคสของเชื้อ ซึ่งหมายถึงปริมาณกลูโคส ที่เชื้อ *L. plantarum* จำนวน 1 มิลลิกรัมใช้ไปในเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ามีค่ามากที่สุดโดยเฉลี่ยในชั่วโมงที่ 3 ของทุก ๆ ความเข้มข้น และที่ความเข้มข้นมากจะมีอัตราการใช้มากด้วย (ตารางที่ 1) ส่วนค่า Specific product rate (qp) หรืออัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ในที่นี้คือกรดแลคติกของเชื้อ *L. plantarum* ซึ่งหมายถึงปริมาณกรดแลคติกที่เชื้อ *L. plantarum* จำนวน 1 มิลลิกรัม สร้างขึ้นในเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ามีค่าสูงในช่วงแรกของการหมัก จากนั้นจะลดลงในชั่วโมงที่ 6 ของการหมักและจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในชั่วโมงที่ 12 และทำนองเดียวกันถ้าที่ความเข้มข้นกลูโคสมากจะมีอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์มากด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 1).

Table 1. Specific substrate uptake rate (qs) and specific product rate (qp) of *L. plantarum* during 24 hours.

% Glucose	Time (hr)									
	3		6		12		18		24	
	qs	qp	qs	qp	qs	qp	qs	qp	qs	qp
0.20	-0.70	0.11	-0.06	0.10	-0.06	0.11	-0.06	0.08	-0.06	0.08
0.50	-0.14	0.15	-0.11	0.12	-0.12	0.12	-0.11	0.10	-0.11	0.10
0.75	-0.16	0.17	-0.14	0.14	-0.15	0.15	-0.14	0.13	-0.14	0.12
1.00	-0.15	0.18	-0.13	0.14	-0.16	0.17	-0.15	0.15	-0.16	0.14
1.50	-0.25	0.19	-0.14	0.15	-0.19	0.19	-0.21	0.19	-0.21	0.20
2.00	-0.36	0.19	-0.17	0.15	-0.20	0.19	-0.22	0.20	-0.25	0.21

- Note :
1. $q_s = -u/Y_{xs}$ (% glucose / mg cells / hr)
 2. $q_p = Y_{px} \cdot u$ (% acidity / mg cells / hr)
- Y_{xs} = Cell yield (mg cells / % glucose)
 $= (X - X_0) / (S_0 - S)$
- Y_{px} = Product yield (% acidity / mg cells)
 $= (P - P_0) / (X - X_0)$

สำหรับการเจริญเติบโตของ *P. cerevisiae* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Model system) พบว่าเชื้อจะเข้าสู่ช่วง Exponential phase ในเวลาประมาณ 6-12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจะเข้าสู่ Stationary phase ซึ่งเป็นที่น่าสังเกตว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสต่ำ เชื้อจะเข้าสู่ Stationary phase ได้เร็วกว่าที่ความเข้มข้นกลูโคสสูง (ภาพที่ 7) ทำนองเดียวกับค่าความเป็นกรดทั้งหมดเมื่อคิดเทียบกรดแลคติก ซึ่งจะมีปริมาณเพิ่มขึ้นถ้าระดับของกลูโคสมากขึ้นเช่นกัน (ภาพที่ 8) และค่าความเป็นกรดต่าง (pH) จะเป็นไปในทางตรงกันข้ามกับปริมาณกรดทั้งหมด (ภาพที่ 9) กล่าวคือที่ความเข้มข้นกลูโคสสูงสามารถลดค่า pH ลงได้ถึง 4.0 จาก pH เริ่มต้น 6.7 ใน 12 ชั่วโมงแรกและพบว่ารูปแบบการหมักของเชื้อ *P. cerevisiae* จัดอยู่ในรูปแบบ Growth associated fermentation เช่นเดียวกับการหมักของ *L. plantarum*

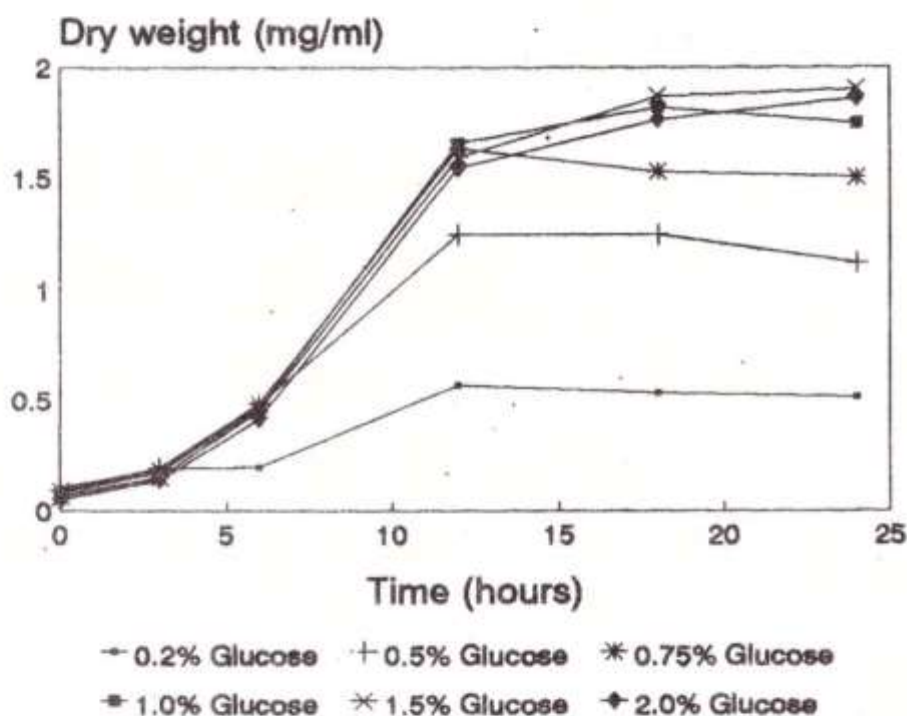


Figure 7. The growth of *P. cerevisiae* in term of dry weight (mg/ml) during 24 hours in model system (6 levels of glucose as main factors).

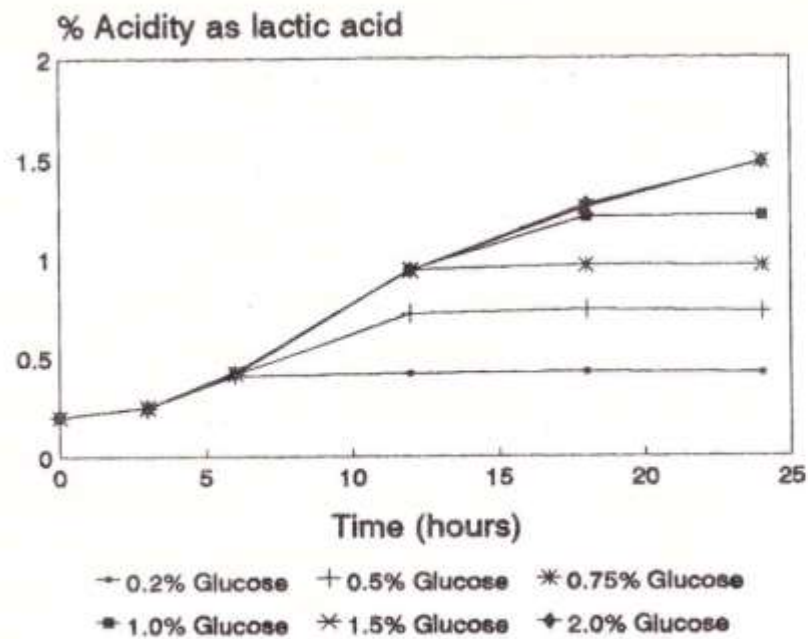


Figure 8. Total acidity as lactic acid (%) changes during 24 hours in model system of *P. cerevisiae* fermentation (6 levels of glucose as main factors).

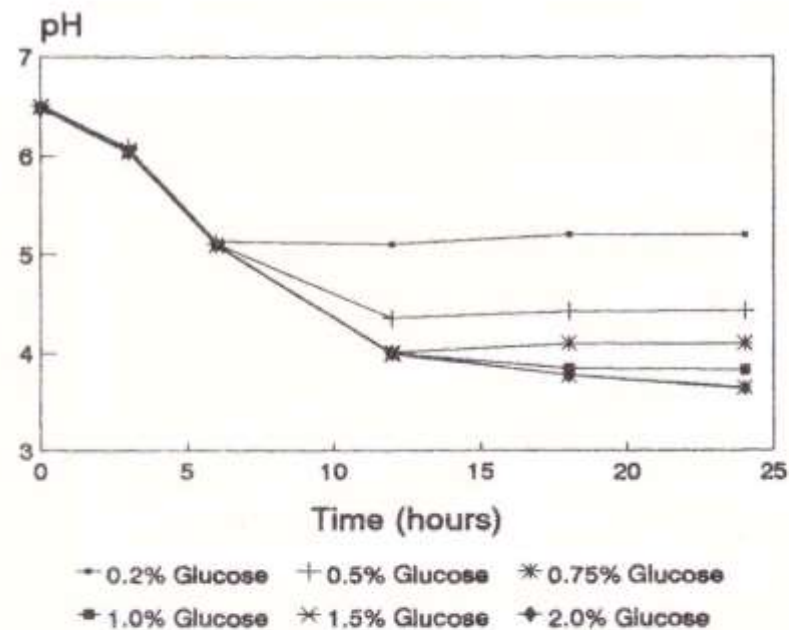


Figure 9. pH changes during 24 hours in model system of *P. cerevisiae* fermentation (6 levels of glucose as main factors).

เมื่อพิจารณาการใช้สารอาหาร (กลูโคส) ของเชื้อ *P. cerevisiae* พบว่าที่ระดับความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 0.2-1.0 นั้น เชื้อ *P. cerevisiae* สามารถใช้สารอาหารได้เกือบหมดภายในเวลา 18 ชั่วโมงแรกของการหมัก (ภาพที่ 10) และเมื่อพิจารณาถึงกราฟการเจริญเติบโตของเชื้อดังกล่าว พบว่าจะเริ่มเข้าสู่ระยะ Stationary phase เนื่องจากข้อจำกัดของสารอาหารดังกล่าวทำให้อัตราการเจริญเติบโตเริ่มเท่ากับอัตราการตายของเซลล์ นอกจากนั้นผลิตภัณฑ์ที่เชื้อสร้างขึ้น เช่น กรดแลกติก เมื่อสะสมในปริมาณมากขึ้นจะยับยั้งการเจริญของเชื้อ *P. cerevisiae* เองได้ และจากการคำนวณในระยะเวลา Exponential phase พบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของกลูโคสต่าง ๆ จะมีค่า Specific growth rate (μ) แตกต่างกันไปคือ มีค่าเป็น 0.144, 0.215, 0.245, 0.253, 0.269 และ 0.285 ชั่วโมง⁻¹ มีความเข้มข้นกลูโคสร้อยละ 0.2, 0.5, 0.75, 1.0, 1.5 และ 2.0 ตามลำดับ (ภาพที่ 11) แสดงให้เห็นว่าค่า μ จะแปรผันโดยตรงกับค่าความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นที่มีในสูตรอาหาร และพบว่าเชื้อ *P. cerevisiae* มีค่า μ ต่ำกว่าของเชื้อ *L. plantarum* และจากการสังเกตค่า Doubling time ซึ่งเป็นเวลาที่เชื้อใช้ในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็น 2 เท่า พบว่ามีค่า 4.826, 3.226, 2.826, 2.745, 2.573 และ 2.429 ชั่วโมงตามลำดับ หมายความว่าความเข้มข้นของสารอาหารเริ่มต้นมาก ผลิตให้เชื้อ *P. cerevisiae* เจริญเติบโตได้เร็วขึ้นด้วย.

อย่างไรก็ตามผลการทดลองดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ J. Monod เกี่ยวกับการเจริญของแบคทีเรียในระบบการหมักจึงสามารถคำนวณหาค่า Maximum specific growth rate (μ_m) และค่า Saturation constant (K_s) ได้ (วิริยจรัส, 2535) ดังกราฟภาพที่ 12.

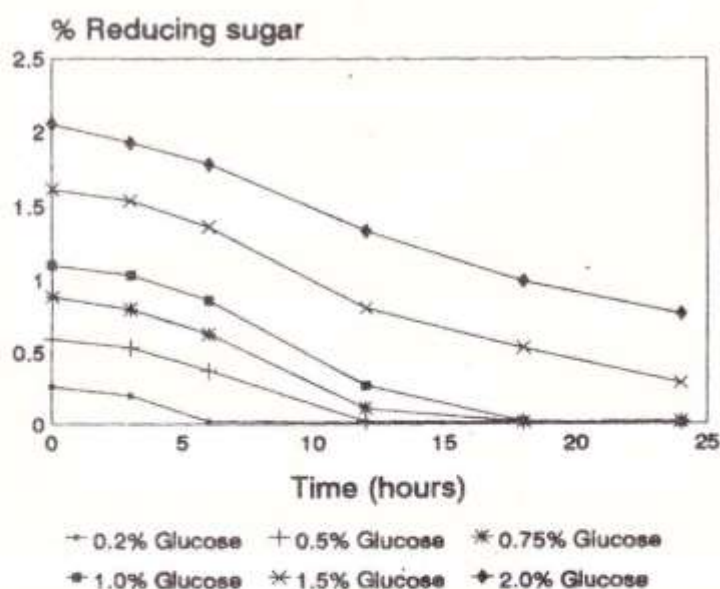


Figure 10. Reducing sugar changes during 24 hours in model system of *P. cerevisiae* fermentation (6 levels of glucose as main factors).

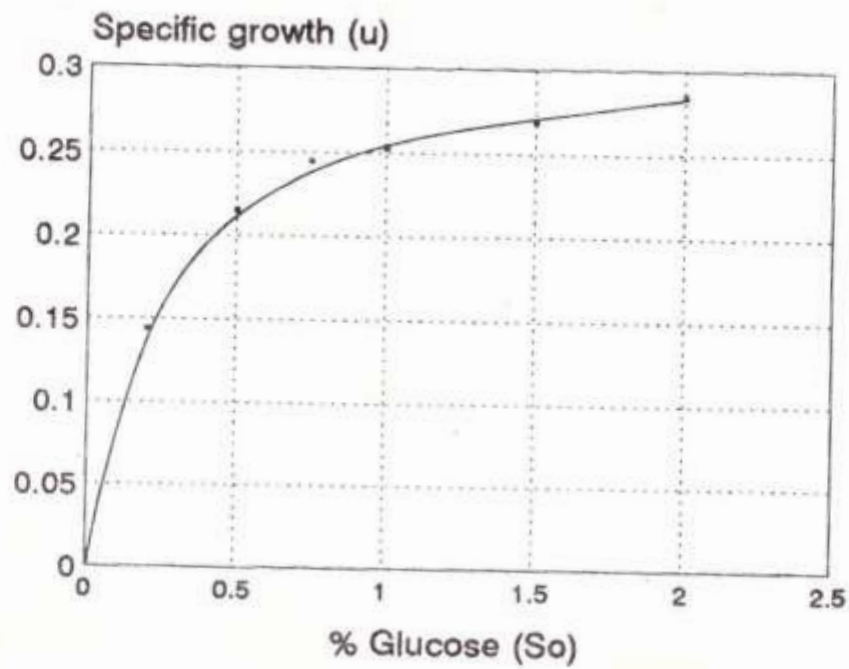


Figure 11. Specific growth rate (u) of *P. cerevisiae* in model system.

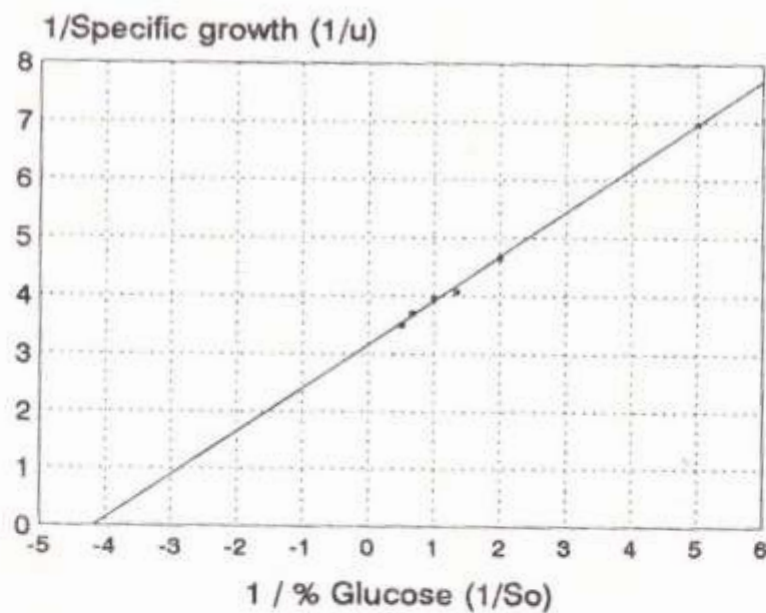


Figure 12. Maximum specific growth rate (u_m) and saturation constant (K_s) of *P. cerevisiae* in model system.

จากกราฟภาพที่ 12 พบว่าค่า Maximum specific growth rate (μ_m) มีค่าเป็น 0.3340 ชั่วโมง⁻¹ และ Saturation constant (K_s) มีค่าร้อยละ 0.3422 ซึ่งหมายความว่าเชื้อ *P. cerevisiae* ต้องการปริมาณกลูโคสเท่ากับร้อยละ 0.3442 เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตไปได้ครึ่งหนึ่งของ Exponential phase ของเชื้อดังกล่าว ซึ่งถ้าปริมาณกลูโคสน้อยกว่านี้การเจริญเติบโตหรือผลิตรกรดแลคติกโดยเชื้อดังกล่าวจะเป็นไปได้ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นในระบบที่ต้องการให้มีการสร้างกรดแลคติกจากเชื้อ *P. cerevisiae* จะต้องมีปริมาณสารอาหารคือกลูโคสอย่างน้อยร้อยละ 0.3442 สำหรับค่า Specific substrate uptake rate (q_s) หรืออัตราการใช้ปริมาณกลูโคสของเชื้อ *P. cerevisiae* พบว่ามีค่ามากที่สุดในช่วงเวลาที่ 3 ของทุก ๆ ความเข้มข้น จากนั้นจะลดลงและจะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในช่วงเวลาที่ 18 (ตารางที่ 2) ส่วนค่า Specific product rate (q_p) ซึ่งหมายถึงอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ ในที่นี้คือกรดแลคติกของเชื้อ *P. cerevisiae* พบว่ามีค่าค่อนข้างคงที่ในช่วงแรกของการหมัก แต่จะเพิ่มขึ้นอีกครั้งในเวลากการหมักที่ 24 ชั่วโมง นอกจากนี้พบว่าถ้าในระบบการหมักมีปริมาณความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นมากก็จะมีอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์มากด้วยเช่นกัน (ตารางที่ 2).

Table 2. Specific substrate uptake rate (q_s) and specific product rate (q_p) of *P. cerevisiae* during 24 hours.

% Glucose	Time (hr)									
	3		6		12		18		24	
	q_s	q_p	q_s	q_p	q_s	q_p	q_s	q_p	q_s	q_p
0.20	-0.15	0.11	-0.09	0.08	-0.08	0.07	-0.09	0.08	-0.09	0.08
0.50	-0.14	0.11	-0.12	0.12	-0.11	0.10	-0.11	0.10	-0.12	0.11
0.75	-0.22	0.12	-0.16	0.14	-0.12	0.12	-0.15	0.13	-0.15	0.13
1.00	-0.19	0.14	-0.16	0.15	-0.13	0.12	-0.16	0.15	-0.17	0.15
1.50	-0.26	0.17	-0.18	0.16	-0.14	0.13	-0.16	0.16	-0.20	0.19
2.00	-0.44	0.18	-0.21	0.18	-0.14	0.14	-0.18	0.18	-0.20	0.20

Note : 1. $q_s = -u/Y_{st}$ (% glucose / mg cells / hr)
 2. $q_p = Y_{pk} \cdot u$ (% acidity / mg cells / hr)
 Y_{st} = Cell yield (mg cells / % glucose)
 $= (X - X_0) / (S_0 - S)$
 Y_{pk} = Product yield (% acidity / mg cells)
 $= (P - P_0) / (X - X_0)$

สรุปผลการทดลอง

จากการวิจัยครั้งนี้พบว่าปริมาณสารอาหารเริ่มต้น (กลูโคส) มีผลต่ออัตราการเจริญเติบโต และอัตราการสร้างผลิตภัณฑ์ (กรดแลคติก) ของ *Lactobacillus plantarum* และ *Pediococcus cerevisiae* กล่าวคือ ถ้าปริมาณสารอาหารเริ่มต้นมากเชื้อทั้งสองสามารถเจริญเติบโตได้เร็ว และสามารถสร้างผลิตภัณฑ์ได้มาก ซึ่งพบว่า เชื้อ *L. plantarum* มีค่า Maximum specific growth rate (μ_m) เป็น 0.4525 ชั่วโมง⁻¹ ขณะที่เชื้อ *P. cerevisiae* มีค่าดังกล่าวเป็น 0.3340 ชั่วโมง⁻¹ นั่นคือ เชื้อ *L. plantarum* สามารถเจริญเติบโตได้มากกว่าในเวลาเท่ากัน ส่วนค่า Saturation constant (K_s) พบว่ามีค่าร้อยละ 0.1165 และ 0.3442 ตามลำดับ ซึ่งหมายความว่า เชื้อ *L. plantarum* ต้องการกลูโคสในการเจริญเติบโตน้อยกว่าเชื้อ *P. cerevisiae* สำหรับค่า Specific substrate uptake rate (q_s) และค่า Specific product rate (q_p) พบว่า *P. cerevisiae* มีอัตราการใช้กลูโคสมากกว่า *L. plantarum* ที่เวลาและความเข้มข้นกลูโคสเริ่มต้นเดียวกัน ส่วนอัตราในการสร้างกรดแลคติกพบว่า *L. plantarum* จะสร้างได้โดยเฉลี่ยในช่วง 3-12 ชั่วโมงแรกของการหมัก ส่วน *P. cerevisiae* สร้างได้โดยเฉลี่ยในช่วง 18-24 ชั่วโมงของการหมัก ข้อแตกต่างของเชื้อทั้งสองชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งช่วงเวลาที่มีการเจริญเติบโต และการสร้างกรดแลคติกที่ต่างกันนั้น นับว่าเป็นข้อดีที่จะนำมาประยุกต์ใช้ในการผลิตหมักที่อาศัยเทคโนโลยีเชื้อยีสเริ่มต้นผสม ซึ่งจะเป็นการเพิ่มระยะเวลาในการผลิตกรดแลคติกให้มากขึ้น โดยช่วงแรกอาศัยการผลิตกรดแลคติกจากเชื้อ *L. plantarum* และช่วงหลังจากเชื้อ *P. cerevisiae* ซึ่งคาดว่าจะให้คุณภาพหมักที่ดีตามต้องการได้.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณศูนย์พันธุ์วิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ ที่ได้สนับสนุนการวิจัย มา ณ โอกาสนี้ด้วย.

เอกสารอ้างอิง

- วริยจारी, ไพโรจน์ และ หันพงศ์กิตติกุล, อรุณ. (2533, 2535). ปฏิบัติการอุตสาหกรรมการหมัก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
วริยจारी, ไพโรจน์. (2535). วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการหมัก. ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.

- AOAC. (1984). Official Methods of Analysis (13th edition) Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C.
- Bacus, J. (1984). Utilization of Microorganisms in Meat Processing. Research Studies Press, Ltd., England.
- Bacus, J.N., and Brown, W.L. (1981). Use of microbial cultures : Meat products. Food Technol. 35 : 74-78, 83.
- Coretti, K. (1977). Starter cultures in the meat industry. Die Fleischwirtschaft. 3 : 368-388.
- Deibel, R.H., and Niven, C.F., Jr. (1957). *Pediococcus cerevisiae* : A starter culture for summer sausage. Bacteriol. Proc. 14-15.
- Everson, C.W., Danner, W.E., and Hammes, P.A. (1970). Bacterial starter cultures in sausage products. J. Agr. Food Chem. 18 : 570-571.
- Everson, C.W., Danner, W.E., and Hammes, P.A. (1974). Process for Curing Dry and Semi-dry Sausages. U.S. Patent 3,814,817.
- Gibbs, P.A. (1987). Novel uses for lactic acid fermentation in food preservation. J. Appl. Bacteriol. Symposium Supplement, 51S-58S.
- Gilliland, S.E. (1985). Bacterial Starter Cultures for Foods. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.
- H-kittikun, A., Wriyacharee, P., and Rujanakraikarn, L. (1988). Nham (Thai fermented pork) making with starter cultures. p. 427-429. In Proceedings 34th International Congress of Meat Science and Technology. Brisbane, Australia.
- Miller, G.L. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars. Analytical Chemistry 31 : 426-428.
- Niinivaara, F.P. (1955). The influence of pure bacterial cultures on aging and changes of the red color of dry sausage. Suomen Maataloustieteellisen Seuran Julkaisuja No. 84, Acta Agra Finnica (Helsinki). 97 : 45-49.
- Nurmi, E. (1966). Effect of bacterial inoculations on characteristics and microbial flora of dry sausage. Thesis, University of Helsinki, Finland. Acta Agra Finnica. No. 108.
- Pearson, D. (1976). The Chemical Analysis of Food. Churchill Livingstone. London and New York.
- Pirt, A.J. (1975). Principles of Microbe and Cell Cultivation. Blackwell Scientific Publication. London.
- Wriyacharee, P. (1990). The Systematic Development of a Controlled Fermentation Process Using Mixed Bacterial Starter Cultures for Nham, a Thai Semi-dry Sausage. Ph.D. Thesis in Product Development in Food Fermentation, Massey University, New Zealand.